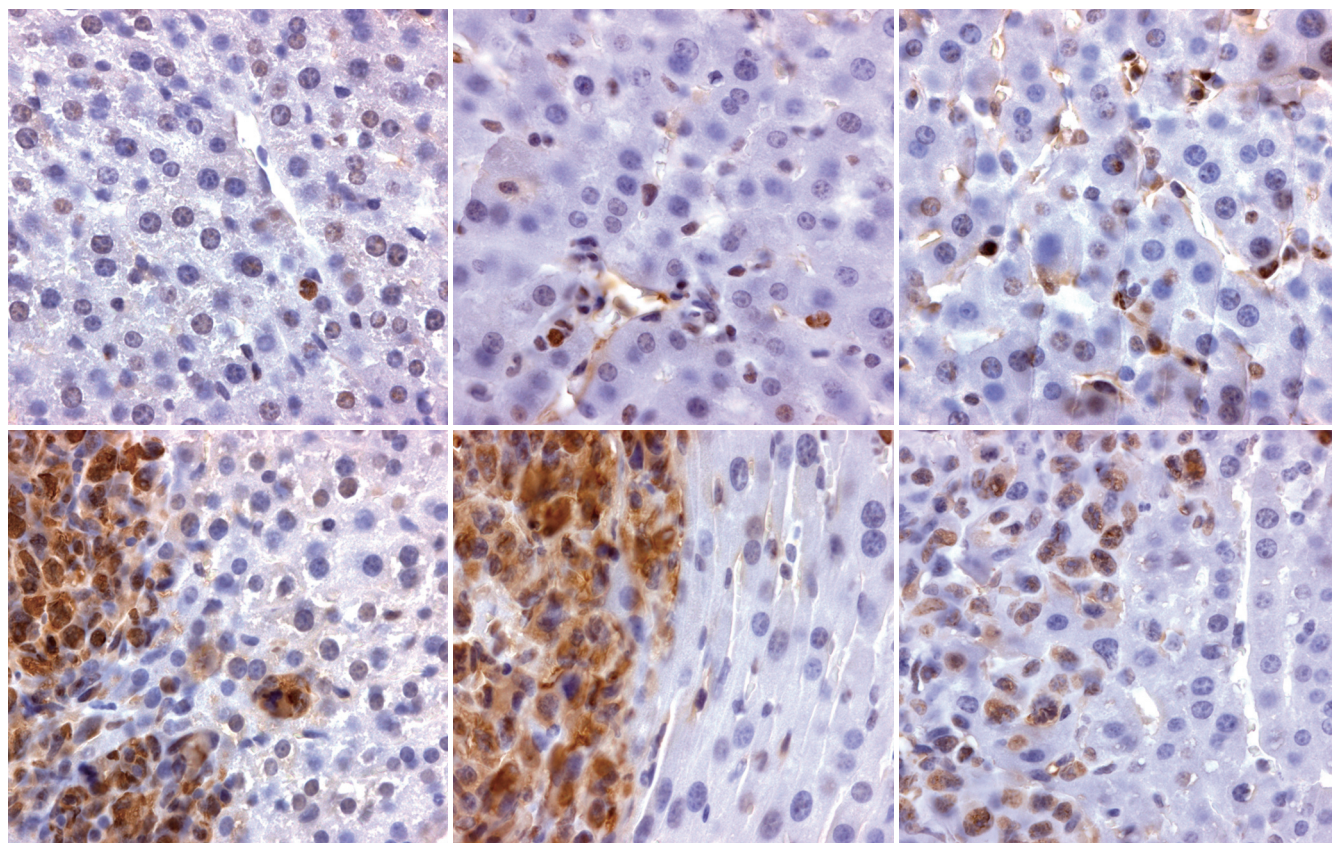


# 世界华人消化杂志

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 2 月 8 日 第 14 卷 第 4 期 (Volume 14 Number 4)



4 / 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®

## 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  |
| 江学良副主任医师 | 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  |
| 白文元教授   | 石家庄 |
| 白玉贤教授   | 哈尔滨 |

|         |     |
|---------|-----|
| 蔡淦教授    | 上海  |
| 曹洁副教授   | 上海  |
| 陈海龙教授   | 大连  |
| 陈红松副研究员 | 北京  |
| 陈积圣教授   | 广州  |
| 陈建荣副教授  | 南通  |
| 陈立波副教授  | 武汉  |
| 陈凇教授    | 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  |
| 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  |
| 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  |
| 李奇林教授    | 广州  |
| 李涛主治医师   | 北京  |
| 李晓宇主任医师  | 北京  |
| 李延青教授    | 济南  |
| 李永哲副研究员  | 北京  |
| 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  |
| 林勇讲师     | 上海  |
| 刘宝瑞教授    | 南京  |
| 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  |



# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

|          |     |          |     |            |      |
|----------|-----|----------|-----|------------|------|
| 刘铁夫教授    | 哈尔滨 | 孙学英教授    | 哈尔滨 | 许亚平副教授     | 镇江   |
| 刘正稳教授    | 西安  | 邵升副教授    | 哈尔滨 | 严律南教授      | 成都   |
| 刘作金副教授   | 重庆  | 谭学瑞教授    | 汕头  | 杨冬华教授      | 广州   |
| 龙致贤教授    | 北京  | 唐采白副教授   | 徐州  | 杨广顺教授      | 上海   |
| 鲁华玉研究员   | 北京  | 唐芙爱教授    | 郑州  | 杨建勇教授      | 广州   |
| 陆才德教授    | 宁波  | 唐霓副研究员   | 重庆  | 杨林副研究员     | 广州   |
| 陆云飞教授    | 南宁  | 唐文富主治医师  | 成都  | 杨维良教授      | 哈尔滨  |
| 禄韶英主治医师  | 西安  | 唐文皓副主任医师 | 上海  | 杨希山教授      | 广州   |
| 吕明德教授    | 广州  | 唐旭东主任医师  | 北京  | 杨云生教授      | 北京   |
| 吕宁主任医师   | 北京  | 汤展宏副教授   | 南宁  | 姚登福教授      | 南通   |
| 吕云福教授    | 海口  | 唐志鹏副研究员  | 上海  | 姚树坤教授      | 石家庄  |
| 马大烈教授    | 上海  | 田素礼教授    | 哈尔滨 | 伊力亚尔·夏合丁教授 | 乌鲁木齐 |
| 茅爱武主任医师  | 上海  | 屠红副研究员   | 上海  | 阴赅宏研究员     | 北京   |
| 梅林教授     | 北京  | 万德森教授    | 广州  | 于红刚副教授     | 武汉   |
| 孟庆华教授    | 北京  | 万军教授     | 北京  | 于健春教授      | 北京   |
| 宁琴教授     | 武汉  | 汪波副主任医师  | 北京  | 于颖彦教授      | 上海   |
| 牛建昭教授    | 北京  | 王承党副教授   | 福州  | 郁宝铭教授      | 上海   |
| 欧希龙副教授   | 南京  | 王春友教授    | 武汉  | 喻荣彬副教授     | 南京   |
| 潘林娜教授    | 哈尔滨 | 王广义教授    | 长春  | 张柏和教授      | 上海   |
| 潘兴华副主任医师 | 昆明  | 王吉耀教授    | 上海  | 张方信主任医师    | 兰州   |
| 潘秀珍教授    | 福州  | 王鲁副教授    | 上海  | 张吉翔教授      | 南昌   |
| 彭波副教授    | 西安  | 王效民教授    | 厦门  | 张锦生教授      | 上海   |
| 彭吉润主任医师  | 北京  | 王学美研究员   | 北京  | 张军教授       | 西安   |
| 彭曦副研究员   | 重庆  | 王正康教授    | 北京  | 张青云研究员     | 北京   |
| 彭心宇教授    | 石河子 | 王志刚副主任医师 | 上海  | 张群华教授      | 上海   |
| 彭志海教授    | 上海  | 王忠裕教授    | 大连  | 张水军教授      | 郑州   |
| 秦波教授     | 重庆  | 卫洪波教授    | 广州  | 张绪清副教授     | 重庆   |
| 秦成勇教授    | 济南  | 魏经国教授    | 西安  | 张学教授       | 北京   |
| 秦环龙教授    | 上海  | 魏来教授     | 北京  | 张宗明教授      | 北京   |
| 钱建民教授    | 上海  | 闻勤生教授    | 西安  | 赵桂珍教授      | 沈阳   |
| 秦仁义教授    | 武汉  | 吴德全教授    | 哈尔滨 | 赵景民教授      | 北京   |
| 卿三华教授    | 广州  | 吴建国教授    | 武汉  | 赵连三教授      | 成都   |
| 邱双健副教授   | 上海  | 吴君主任医师   | 贵阳  | 赵平副教授      | 上海   |
| 任超世研究员   | 天津  | 吴萍主任医师   | 徐州  | 郑民华教授      | 上海   |
| 任建安教授    | 南京  | 席启主任医师   | 大同  | 智发朝教授      | 广州   |
| 任建林教授    | 厦门  | 夏建川研究员   | 广州  | 周伯平教授      | 深圳   |
| 邵成浩讲师    | 上海  | 向德兵讲师    | 重庆  | 周丁华主任医师    | 北京   |
| 邵先玉教授    | 泰安  | 肖恩华教授    | 长沙  | 周国雄主任医师    | 南通   |
| 邵永孚教授    | 北京  | 谢晓华副教授   | 广州  | 周士胜教授      | 大连   |
| 沈洪教授     | 南京  | 徐爱民副教授   | 上海  | 周霞秋教授      | 上海   |
| 沈琳副教授    | 北京  | 许春舫主任医师  | 苏州  | 周晓东研究员     | 广州   |
| 沈薇教授     | 重庆  | 徐存拴教授    | 新乡  | 朱春兰主任医师    | 哈尔滨  |
| 施瑞华教授    | 南京  | 徐大华副主任医师 | 北京  | 朱立元教授      | 深圳   |
| 石统东副教授   | 重庆  | 徐德忠教授    | 西安  | 朱人敏教授      | 南京   |
| 宋振顺教授    | 西安  | 徐列明教授    | 上海  | 邹小明教授      | 哈尔滨  |
| 孙诚谊教授    | 贵阳  | 徐小元教授    | 北京  | 左国营副主任药师   | 昆明   |
| 孙家邦教授    | 北京  | 许玲副教授    | 上海  |            |      |
| 孙秀发教授    | 武汉  | 许文燮教授    | 上海  |            |      |

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2006 年 2 月 8 日

第 14 卷

第 4 期

(总第156期)

## 述 评

359 2型糖尿病血脂异常的治疗进展

王学美

## 基 础 研 究

365 应用MS-RDA筛选胃癌甲基化差异片段

廖爱军, 苏琦, 王珣, 曾斌, 石巍

370 胃电刺激对大鼠胃扩张反应神经元及增食欲素的影响

孙向荣, 徐珞, 叶俊丽

376 幽门螺杆菌阳性消化性溃疡患者胃黏膜核因子 $\kappa$ B、 $\beta$ -防御素-2表达及其与胃窦炎症的关系

凌江红, 李家邦, 聂海明, 蒋荣鑫, 申定珠, 韦宗平

382 转染试剂及幽门螺杆菌对AGS细胞形态的影响

邹清华, 曾浔, 孟凡亮, 何利华, 张建中

387 趋化性细胞因子MIP-1 $\alpha$ 动员DC前体细胞的体内抗胃癌效应

何宋兵, 汪良, 黄瑞, 张雁云

392 血小板活化因子受体拮抗剂对幼年大鼠肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的影响

王丽杰, 刘春英, 许玲芬, 高红, 姜卫国, 孙梅

398 骨髓间充质干细胞在胰腺生理更新和病理再生中的作用

江学良, 李兆申, 崔慧斐

## 文 献 综 述

405 白介素与溃疡性结肠炎

口锁堂, 吴焕淦, 施达仁

412 中药治疗急性胰腺炎的主要机制与作用的实验研究进展

张喜平, 王英

417 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展

张喜平, 张宇

422 成体胰腺干细胞基础研究进展

郭欣, 李国立, 黄跃南, 吴德全, 于洪亮, 杨茂鹏, 关文增

429 脾肿瘤的诊治进展

黄跃南, 郭欣, 王夫景, 于洪亮, 杨茂鹏, 王启余, 杨维良

## 研 究 快 报

434 血管生成素-2与基质金属蛋白酶-7在大肠癌中的表达及意义

李霞, 朱尤庆, 罗峻, 陶文惠, 黄超, 张金梅

438 重症急性胰腺炎大鼠肺组织中LIF的表达变化及意义

滕晓丽, 赵秋, 杜静, 谷华, 覃华

## 临 床 经 验

442 昆明白族儿童幽门螺杆菌感染与HLA-DQA1等位基因的相关性

王美芬, 黄永坤, 郝萍, 戚勤, 文革生, 李海林, 周丽芳

446  $^{125}\text{I}$  Ni-Ti合金支架治疗晚期食管癌的配合与护理6例

孙翠萍, 郑剑英, 吕宾, 徐毅

450 埃索美拉唑对十二指肠球溃疡合并幽门螺杆菌感染的治疗

谢玉民

453 慢性乙型肝炎患者血清脂质水平与病理分级分期的关系

洪永孟, 朱幼芙, 吴爱华, 侯金林

## 病 例 报 告

457 进食花椒致严重过敏反应2例

田蕾, 尹悦玲



|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 附 录  | 459 世界华人消化杂志投稿须知                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 致 谢  | 464 致谢世界华人消化杂志编委                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 消 息  | 364 我国科技论文总数连续三年世界第五<br>375 消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛征文通知<br>381 技法与经验<br>386 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》<br>397 首届北京地坛感染病学术会议<br>428 第一届全国临床营养支持学术会议通知<br>433 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛通知<br>449 更正与说明专栏、专家门诊<br>456 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知<br>458 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 封面故事 | Otto Kollmar, Michael D Menger, Martin K Schilling. Macrophage inflammatory protein-2 contributes to liver resection-induced acceleration of hepatic metastatic tumor growth.<br><i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(6): 858-867<br><a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/858.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/858.asp</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 国际会议 | 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus<br>February 22-25, 2006<br><a href="mailto:isde@sapmea.asn.au">isde@sapmea.asn.au</a><br><a href="http://www.isde.net">www.isde.net</a><br><br>Easl 2006 - The 41st Annual Meeting<br>April 26-30, 2006<br><br>Canadian Digestive Disease Week Conference<br>March 4-12, 2006<br><a href="http://www.cag-acg.org">www.cag-acg.org</a><br><br>XXX pan-American congress of digestive diseases<br>XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas<br>November 25-December 1, 2006<br><a href="mailto:amg@gastro.org.mx">amg@gastro.org.mx</a><br><a href="http://www.gastro.org.mx">www.gastro.org.mx</a> |

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名  
(旬刊)

创 刊 1993-01-15  
改 刊 1998-01-25  
出 版 2006-02-08  
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 管鑫妍  
中文编辑 潘伯荣 张海宁 管鑫妍  
电子编辑 张敏 张勇 李琪  
本期审读 王瑾晖

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会  
出版 世界胃肠病学杂志社  
100023, 北京市2345信箱  
E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@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  
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 M 4481

国内定价 每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证 1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# World Chinese Journal of Digestology

**February 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 4**

|                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>EDITORIAL</b>           | 359 Progress in treatment of abnormal metabolism of blood lipid in type 2 diabetes<br><i>Wang XM</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>BASIC RESEARCH</b>      | <p>365 Isolation of differentially methylated DNA sequences of gastric cancer by methylation-sensitive representational difference analysis<br/><i>Liao AJ, Su Q, Wang X, Zeng B, Shi W</i></p> <p>370 Effects of gastric electrical stimulation on responsive neurons to gastric distension and expression of orexin in rats<br/><i>Sun XR, Xu L, Ye JL</i></p> <p>376 Expression of nuclear factor-kappa B and <math>\beta</math>-defensin-2 in patients with <i>Helicobacter pylori</i>-positive peptic ulcer and their relations with antral gastritis<br/><i>Ling JH, Li JB, Nie HM, Jiang RX, Shen DZ, Wei ZP</i></p> <p>382 Effects of transfection reagents and <i>Helicobacter pylori</i> on morphology of AGS cells<br/><i>Zou QH, Zeng X, Meng FL, He LH, Zhang JZ</i></p> <p>387 Anti-gastric carcinoma efficacy of macrophage inflammation protein-1<math>\alpha</math> recruited dendritic cell vaccine in mice<br/><i>He SB, Wang L, Huang R, Zhang YY</i></p> <p>392 Effect of platelet activating factor receptor antagonist on tight junction associated protein between epithelial cells of intestinal mucosa in young rats<br/><i>Wang LJ, Liu CY, Xu LF, Gao H, Jiang WG, Sun M</i></p> <p>398 Role of bone marrow mesenchymal stem cells in pancreas self-restoration and pathological regeneration<br/><i>Jiang XL, Li ZS, Cui HF</i></p> |
| <b>REVIEW</b>              | <p>405 Relationship between interleukin and ulcerative colitis<br/><i>Kou ST, Wu HG, Shi DR</i></p> <p>412 Progress of experimental study on main effect and mechanism of Traditional Chinese Medicine in treatment of acute pancreatitis<br/><i>Zhang XP, Wang Y</i></p> <p>417 Advance in mechanism of intestinal barrier injury in acute pancreatitis<br/><i>Zhang XP, Zhang Y</i></p> <p>422 Advance in basic research of adult pancreatic stem cells<br/><i>Guo X, Li GL, Huang YN, Wu DQ, Yu HL, Yang MP, Guan WZ</i></p> <p>429 Progress in diagnosis and treatment of splenic tumor<br/><i>Huang YN, Guo X, Wang FJ, Yu HL, Yang MP, Wang QY, Yang WL</i></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>RAPID COMMUNICATION</b> | <p>434 Clinical significance and expression of angiotensin-2 and matrix metalloproteinase-7 in human colorectal carcinoma<br/><i>Li X, Zhu YQ, Luo J, Tao WH, Huang C, Zhang JM</i></p> <p>438 Role of leukemia inhibitory factor on lung injury in rats with severe acute pancreatitis<br/><i>Teng XL, Zhao Q, Du J, Gu H, Qin H</i></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>CLINICAL PRACTICE</b>   | 442 Association between HLA-DQA1 alleles and <i>H pylori</i> infection in Bai-ethnic children from Kunming<br><i>Wang MF, Huang YK, Hao P, Qi Q, Wen GS, Li HL, Zhou LF</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

|                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                               | <p>446 Nursing care of patient with esophageal nitinol stent and iodine-125 seeds for advanced-stage carcinoma of esophagus<br/><i>Sun CP, Zheng JY, Lv B, Xu Y</i></p> <p>450 Efficacy of Esomeprazole in treatment of duodenal ulcer complicated with <i>Helicobacter Pylori</i> Infection<br/><i>Xie YM</i></p> <p>453 Relationship between serum lipid level and pathological grading and staging in chronic hepatitis B patients<br/><i>Hong YM, Zhu YF, Wu AH, Hou JL</i></p>                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>CASE REPORT</b>            | <p>457 Severe allergic reaction induced by intake of Pericarpium Zanthoxyli: analysis of 2 cases<br/><i>Tian L, Yin YL</i></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>APPENDIX</b>               | <p>459 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>ACKNOWLEDGMENT</b>         | <p>464 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>COVER</b>                  | <p><i>Otto Kollmar, Michael D Menger, Martin K Schilling.</i> Macrophage inflammatory protein-2 contributes to liver resection-induced acceleration of hepatic metastatic tumor growth.<br/><i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(6): 858-867<br/><a href="http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/858.asp">http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/858.asp</a></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>INTERNATIONAL MEETINGS</b> | <p>10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus<br/>February 22-25, 2006<br/><a href="mailto:isde@sapmea.asn.au">isde@sapmea.asn.au</a><br/><a href="http://www.isde.net">www.isde.net</a></p> <p>Easl 2006 - The 41st Annual Meeting<br/>April 26-30, 2006</p> <p>Canadian Digestive Disease Week Conference<br/>March 4-12, 2006<br/><a href="http://www.cag-acg.org">www.cag-acg.org</a></p> <p>XXX pan-American congress of digestive diseases<br/>XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas<br/>November 25-December 1, 2006<br/><a href="mailto:amg@gastro.org.mx">amg@gastro.org.mx</a><br/><a href="http://www.gastro.org.mx">www.gastro.org.mx</a></p> |

**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 February 8, 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](mailto:wcjd@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

**ISSN** 1009-3079 CN 14-1260/R

**Copyright** © 2006 by The WJG Press



## 2型糖尿病血脂异常的治疗进展

王学美

王学美, 北京大学中西医结合研究所、北京大学第一医院中西医结合研究室 北京市 100034

王学美, 女, 1964-09-10生, 天津市武清县人, 汉族, 1991年北京医科大学博士研究生毕业, 研究员, 主要从事中西医结合治疗糖尿病、高脂血症的临床研究。

通讯作者: 王学美, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学中西医结合研究所、北京大学第一医院中西医结合研究室, wangxueimei64@sohu.com

电话: 010-66551122-3053 传真: 010-66551328

收稿日期: 2005-12-22 接受日期: 2006-01-07

### 摘要

血脂异常是糖尿病并发大血管病变的主要危险因素之一。糖尿病血脂异常的特点为甘油三酯(TG)增高、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)降低、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)轻、中度增高, LDL-C亚型小而密LDL(sLDL-C)比例增高, 加之氧化的低密度脂蛋白(Ox LDL)增多。糖尿病已列为冠心病的等危症, 血脂异常的治疗目标等同于冠心病患者。糖尿病患者血脂异常的治疗首先应使LDL-C达到目标值, 即 $LDL-C < 2.6 \text{ mmol/L}$  ( $1 \text{ g/L}$ ), 糖尿病合并心血管疾病患者建议使用他汀类药物, 并建议将LDL-C降到较低水平 $LDL-C < 1.81 \text{ mmol/L}$  ( $0.7 \text{ g/L}$ )。对糖尿病患者进行降脂治疗, 能显著降低心血管疾病风险。

**关键词:** 糖尿病; 血脂异常; 治疗进展

王学美. 2型糖尿病血脂异常的治疗进展. 世界华人消化杂志 2006;14(4):359-364

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/359.asp>

### 0 引言

糖尿病血脂代谢异常是目前国内外学者普遍关注的热点问题。目前, 我国现有糖尿病患者约5 000万, 且呈几何级数上升。2004年北京地区2型糖尿病患者中血脂异常患病率为48.0%<sup>[1]</sup>。近年来, 许多大规模流行病学研究发现, 糖尿病患者冠心病(CHD)的发病危险为非糖尿病人群的3-4倍, 合并血脂异常者明显增加, 而且发现, 动脉粥样硬化是糖尿病的主要死亡原因之一, 其中糖尿病患者死于冠状动脉粥样硬化性心脏病约占75%。研究表明, 降低低密度脂蛋白胆固醇

(LDL-C)和甘油三酯(TG)水平和/或升高高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平, 可减少CHD事件的发生, 从而为糖尿病患者合理综合治疗, 严格控制血脂代谢异常提供了强有力的依据。

### 1 从循证医学看糖尿病血脂异常的干预治疗

英国2型糖尿病前瞻性研究(UKPDS)证实, 对糖尿病患者强化血糖控制, 可显著降低微血管并发症, 而大血管疾病的危险下降不明显。研究认为, LDL-C是糖尿病患者最强的冠心病危险预测因子, 可通过降低LDL-C来减少CHD危险<sup>[2]</sup>。

进一步的流行病学研究则证实, 血脂异常不仅是糖尿病患者发生冠心病的独立危险因素, 而且是重要的危险因素。Laasko *et al*<sup>[3]</sup>对313例2型糖尿病患者进行7 a随访研究, 发现低水平的HDL-C、高水平的极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)、TG是2型糖尿病患者发生冠心病的独立危险因素<sup>[3]</sup>。

通过对既往已完成的冠心病一级预防和二级预防试验的亚组分析发现, 使用他汀类药物对糖尿病患者进行降脂治疗, 和对所有人群一样, 同样能显著降低心血管疾病风险。

北欧辛伐他汀生存(Scandinavian Simvastatin survival study, 4S)中涉及4 444名冠心病患者, LDL-C水平高(平均 $1.85 \text{ g/L}$ ), 随机分为辛伐他汀组与安慰剂组, 其中糖尿病亚组202例分析显示辛伐他汀使主要冠脉事件减少55%, 而非糖尿病组减少32%<sup>[4]</sup>。胆固醇和心脏再发事件试验(cholesterol and recurrent events, CARE)对患者冠心病的LDL-C较低(基线 $1.39 \text{ g/L}$ )患者随机分为普伐他汀和安慰剂治疗, 对其中糖尿病亚组586例分析显示普伐他汀治疗使冠脉事件相对危险性减少25%, 非糖尿病患者减少23%<sup>[5]</sup>。这两项研究结果表明糖尿病患者采用他汀类降低LDL-C的疗效大于(4S)或等于(CARE)非糖尿病人群。近年一项冠心病一级与二级预防试验, 为心脏保护研究(heart protection study, HPS)入组20 536例, 其中糖尿病患者5 963例占29%(主要为2型糖尿病), 随机服辛伐他汀( $40 \text{ mg/d}$ )组及安慰

### ■背景资料

长期以来对糖尿病(DM)的干预主要针对降低血糖, 但英国前瞻性糖尿病研究(UKPDS)结果显示, 强化降糖治疗虽然可以减少微血管病的发生, 但不能显著降低大血管病变的危险性, 其原因与忽视了对DM患者血脂异常的治疗有关。

## ■研究前沿

糖尿病已列为冠心病的等危症, 血脂异常的治疗目标等同于冠心病患者。在其他因素一致的情况下, LDL-C升高带来的心血管病危险远大于血压、糖化血红蛋白A1c(HbA1c)和HDL-C。

剂组, 经5.5 a观察药物使冠心病事件危险降低27% ( $P < 0.0001$ ), 这种保护作用在无冠心病的糖尿病患者中更为显著<sup>[6]</sup>。在用氟伐他汀(来适可)干预预防研究(Lescol intervention prevention study, LIPS)中糖尿病占202例(12%), 药物降低心血管事件亦多于非糖尿病<sup>[7]</sup>。

2004年阿托伐他汀糖尿病协作研究(CARDS)是第一个设计在单纯的2型糖尿病患者中进行评估对主要心血管事件一级预防作用的前瞻性研究。共入选2 838例2型DM伴多种心血管危险因素患者, 阿托伐他汀10 mg治疗使主要终点事件减少37%, 所有心血管事件减少32%, 所有原因死亡减少27%, 脑卒中减少48%, 说明他汀类治疗有利于DM患者心血管病的一级预防, 目前认为DM患者使用他汀类药物不应仅仅遵循设定的LDL-C水平的阈值, 而应主要依据对心血管危险因素的全面评估。结果提示对于2型糖尿病患者合并心血管疾病发生风险大者应当早期运用他汀类药物治疗, 降低心血管疾病发生率。CARDS进一步支持了在糖尿病患者应更早进行调脂治疗<sup>[8]</sup>。

在贝特类药物的临床研究中赫尔辛基心脏研究(Helsinki heart study, HHS)中以吉非贝齐作冠心病一级预防研究, HHS首次令人信服的证实贝特类药物可以降低心血管事件的发生率, 而且糖尿病患者和患有典型糖尿病性血脂异常者可从治疗中获得更大的益处。HHS中CHD事件减少被认为与吉非贝齐使LDL-C水平降低和HDL-C水平升高有关<sup>[9]</sup>。美国退伍军人高密度脂蛋白胆固醇干预试验(veterans affairs high-density lipoprotein cholesterol intervention trial, VA-HIT)随机选取CHD确诊患者, 基线HDL-C低( $\leq 1.03$  mmol/L), LDL-C不高, 对比吉非贝齐和安慰剂, 历时7 a, 在627例DM亚组中, 联合终点(CHD死亡, 非致死性心肌梗死和确诊的脑卒中)的相对危险降低24%, 说明吉非贝齐对冠心病有糖尿病的患者有降低心血管事件作用<sup>[10]</sup>。最近一项糖尿病动脉粥样硬化干预研究(diabetes arteriosclerosis intervention study, DAIS)中, DAIS的目的是检验非诺贝特能否延缓血管造影下冠脉病变进展, 参与者为418例2型糖尿病患者, 经过平均3 a的小量非诺贝特(200 mg/d)治疗, 比较狭窄冠脉节段阻塞面积的百分数和最小管腔直径, 结果表明药物可明显延缓冠状动脉狭窄的进展, 此作用与其升HDL-C、降TG、LDL-C密切相关。虽然DAIS没有明确的减

少CHD事件的结论, 但通过应用非诺贝特, 主要CHD事件减少了23%<sup>[11]</sup>。另外, 正在进行的非诺贝特干预及减少糖尿病心脏事件的研究(FIELD), 是一个为期5 a的国际多中心随机、双盲、安慰剂对照试验, 有9 795例具有冠心病高危因素的2型糖尿病患者参与, 其研究结果将进一步证实贝特类药物对低LDL-C患者血脂和CHD事件的影响。

Grover *et al*<sup>[12]</sup>对糖尿病血脂异常药物治疗的成本效益分析发现, 糖尿病患者无论有无冠心病或冠心病危险因素, 只要血脂异常达到治疗标准, 接受药物调脂治疗均可获得良好的远期疗效, 且具有合理的成本效益比。

## 2 糖尿病血脂异常的特点及发生机制

糖尿病血脂异常的特点为甘油三酯(TG)增高最为常见、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)降低、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)轻、中度增高, LDL-C亚型小而密LDL(sLDL-C)比例增高, 加之氧化的低密度脂蛋白(Ox LDL)增多。上述脂质异常都有致动脉硬化的作用, 共同构成一组相关的危险因素。其中小而密LDL及LDL-C升高最危险。

糖尿病血脂异常的发生机制首先是糖尿病患者脂蛋白脂酶的活性降低。脂蛋白脂酶的活性不仅取决于基因的表达, 还主要依赖于胰岛素的作用。糖尿病患者由于其体内胰岛素水平低或产生胰岛素抵抗, 胰岛素作用减弱, 而脂蛋白脂酶的活性也相应降低。脂蛋白脂酶是水解甘油三酯的关键酶, 主要分布在脂肪、心肌、骨骼肌、胰腺B细胞以及巨嗜细胞等处, 脂蛋白脂酶活性降低, 会导致其水解甘油三酯的能力下降, 富含甘油三酯的颗粒水解减慢, 并导致高密度脂蛋白粒子生成减少。同时, 脂蛋白脂酶还可以促进脂蛋白颗粒的摄取, 并可以作为低密度脂蛋白的受体和其他几种低密度脂蛋白受体的配体, 随着脂蛋白脂酶活性的降低, 这几种作用也会下降<sup>[13]</sup>。

其次, 糖尿病患者胆固醇酯转移蛋白(CETP)的活性升高。CETP的活性受甘油三酯的调控, 由于糖尿病患者体内甘油三酯水平升高, 则CETP的活性也相应升高。而CETP活性升高, 会导致极低密度脂蛋白向高密度脂蛋白传递的甘油三酯增多, 在肝脂酶的作用下, 高密度脂蛋白中的甘油三酯大量水解, 就会形成小而密的高密度脂蛋白, 在临床上我们发现糖尿病患者

体内存在大量小而密的高密度脂蛋白,而这种小而密高密度脂蛋白的肾脏清除速度加快,这样就会导致高密度脂蛋白数量降低;同时,极低密度脂蛋白向外传递的甘油三酯增多,这样就容易形成大量小而密的低密度脂蛋白颗粒。

### 3 糖尿病血脂异常的治疗目标

DM患者存在多种血脂异常,处理各种血脂异常原则亦不尽相同。根据各种血脂异常对DM患者发生CHD的危险性不同,应首先处理升高的LDL-C浓度及改变LDL的成分。

2001年美国国家胆固醇教育计划(NCEP)成人治疗组第三次制定的治疗指南(ATPIII)将糖尿病列为冠心病的等危症,对糖尿病患者的血脂异常的治疗目标值等同于无糖尿病的冠心病患者,LDL-C治疗目标值为 $<2.6\text{ mmol/L}$ ( $1\text{ g/L}$ )<sup>[14]</sup>。2004年发表的NCEP ATPIII修订建议,将糖尿病合并心血管疾病患者定义为极高危,可选择将LDL-C水平降至 $<1.81\text{ mmol/L}$ ( $0.7\text{ g/L}$ )。糖尿病患者血脂异常的治疗首先应使LDL-C达到目标值,即LDL-C $<2.6\text{ mmol/L}$ ( $1\text{ g/L}$ );在TG $>2.26\text{ mmol/L}$ ( $2\text{ g/L}$ )时,而HDL-C为治疗的次要目标,即非HDL-C $<3.4\text{ mmol/L}$ ( $1.3\text{ g/L}$ )[LDL-C $<2.6\text{ mmol/L}$ ( $1\text{ g/L}$ )+VLDL-C $<0.8\text{ mmol/L}$ ( $0.3\text{ g/L}$ );HDL-C $>1.04\text{ mmol/L}$ ( $0.4\text{ g/L}$ )(ATP III推荐)或 $>1.16\text{ mmol/L}$ ( $0.45\text{ g/L}$ )(ADA推荐)<sup>[15,16]</sup>。

2004年中华医学会糖尿病分会也提出了多发性硬化(MS)患者血脂异常治疗目标的建议:LDL-C $<2.6\text{ mmol/L}$ ( $1\text{ g/L}$ )、TG $<1.7\text{ mmol/L}$ ( $1.5\text{ g/L}$ )、HDL-C $>1.04\text{ mmol/L}$ ( $0.4\text{ g/L}$ )(男)或 $>1.3\text{ mmol/L}$ ( $0.5\text{ g/L}$ )(女)。

### 4 糖尿病血脂异常的药物治疗

糖尿病血脂异常的治疗应在强化血糖控制的同时进行积极的调脂治疗,包括治疗性生活方式改变和药物治疗两大类。改善生活方式(包括合理饮食、减轻体质量、运动和戒烟)是药物治疗的基础。合理饮食首先要限制每日总热卡摄入,要多食全谷类及富含纤维素食品,总脂肪酸的摄入量低于每日总热量的30%,以不饱和脂肪酸代替饱和脂肪酸或反式脂肪酸(如氢化植物油),每日胆固醇摄入量小于200 mg。限制脂肪摄入是治疗高TG有效的基本措施。

糖尿病患者经血糖控制、饮食及运动治疗,血脂仍未达标,则需应用调脂药物。尤其当患者

存在严重脂代谢异常或有发展至CHD的极高危因素时,应及早应用调脂药物。糖尿病患者已存在CHD或其他血管疾病,应该选择调脂药物与生活方式干预同时进行。

糖尿病患者的调脂治疗的首要目标是LDL-C,其次是HDL-C,然后是TG水平。血脂达标值在不同指南中稍有差异,但总体原则一致。

常用的4类调脂药物中,他汀类药物通过抑制HMG-CoA还原酶减少胆固醇的合成,并能上调肝脏LDL受体,加速LDL-C的降解,从而降低LDL-C的水平,还可通过减少VLDL的生成而降低TG水平。贝特类药物通过作用于过氧化物酶增殖体激活受体(PPAR) $\alpha$ ,从而减少肝脏VLDL颗粒生成并增加脂肪酶活性,主要作用是导致TG水平降低,也可轻度(5%-15%)升高HDL-C水平。烟酸可以显著升高HDL-C,也可降低TG,LDL-C和脂蛋白 $\alpha$ (Lp $\alpha$ )水平,但可以导致糖耐量恶化,在糖尿病患者属相对禁忌,所以只能作为二线药物。胆酸交换树脂通过在肠道中吸附从胆汁排除的胆酸,阻断胆固醇的肠肝循环,增加胆固醇从粪便排除,从而降低胆固醇。

根据4类调脂药物的不同药理作用和大型临床实验研究的结果,糖尿病患者的调脂治疗措施应当遵循下列原则选择药物。

4.1 降低LDL-C 首选HMG-CoA还原酶抑制剂(他汀类),次选胆酸螯合树脂类或非诺贝特。

4.1.1 他汀类药物 常用药物有阿托伐他汀、辛伐他汀、普伐他汀、血脂康等。这些药物效果肯定,调脂能力为降低血清总TC水平22%-42%、降低LDL-C为23%-55%、降低TG水平为10%-45%、升高HDL-C水平4%-15%,安全性也很好。在医生指导下合理使用,不但能纠正血脂异常,还可以改善内皮功能、抑制血小板功能、抗血栓形成、抑制炎症反应,同时对已经形成的动脉硬化斑块有较好地稳定作用,防止进一步的斑块破裂造成心肌梗死或脑梗死有肯定的作用。多数研究结果提示,通过降低血中LDL-C、升高HDL-C、降低TG等水平,可明显减少包括急性心肌梗死及冠心病死亡的各种冠心病事件,还可减少总死亡率。使用中应注意检查肝功能和肌酶,如果肝功能正常,是非常安全的药物。目前临床上有5种他汀类药物,每mg降低LDL-C的程度稍有不同,此外,他们在体内的代谢清除途径也有所不同。他汀类药物一般在晚饭后或睡前服用(在晚上服用降低LDL-C的效果大于早晨),多数人有较好的耐受性。其主

### ■ 相关报道

- 1 Turner RC, Millns H, Neil HA, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR, Holman RR. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ* 1998; 316: 823-828
- 2 Colloun H, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JH. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 685-696



### ■创新盘点

总结了糖尿病血脂异常的特点,强调了糖尿病患者血脂异常的治疗首先应使LDL-C达到目标值,即LDL-C<2.6 mmol/L(1 g/L),并介绍了获得过确切临床证据的调脂中药。

要副作用是肝酶升高和肌病,副作用的发生随剂量的增大而增加。为防止出现严重副作用,在使用8-12 wk左右,应监测ALT和AST,以后可每年监测1次或多次,禁用于活动性和慢性肝病患者。在患者开始服药时先告知如有肌痛、肌无力或酱油色尿要立即报告,并查CK,CK升高是肌病的最好指标。肌病的发生多与老年患者、合并多种疾病或使用多种药物有关。必须注意他汀类药物与烟酸、贝特类药物(尤其是吉非贝齐)、环孢霉素、红霉素及CYP3A4抑制剂合用可能引起横纹肌溶解症,如果临床需要联合用药则尽可能小剂量联合使用,并且密切监测肝功能、血肌酶及肾功能等指标。一旦出现严重不良反应,应及时停药并做对症处理。

**4.1.2 胆酸结合树脂** 此类药物也有降低TC的效果,但由于作用 and 安全性较他汀类药物差,所以仅作为必要时的联合用药。胆酸结合树脂与他汀类药物合用可加强其降低LDL-C的作用。该药禁用于家族性异常 $\beta$ -脂蛋白血症,由于有升高TG的倾向,禁用于TG>4.5 mmol/L的患者,对于TG>2.3 mmol/L者相对禁忌。药物的主要副作用包括胃肠道症状(便秘、腹痛、腹胀等)以及减少某些同时服用药物的吸收。

**4.2 升高HDL-C** 任何改善胰岛素抵抗的措施都有轻度升高HDL-C的作用,例如增加体力活动、减肥等,都应该作为基础治疗的方法之一。选用的药物有贝特类和烟酸类。

**4.2.1 贝特类药物** 主要作用为降低TG、LDL-C,升高HDL-C。特别是在TG>4.5 mmol/L,而LDL-C正常或轻度增高时。该类物质同样具有较好的耐受性和安全性,主要副作用有胃肠道症状、胆石、可逆性伴CK升高的肌病,不适用于有严重肝肾损害的患者,对伴有肾功能损害的糖尿病患者要慎用或避免使用。常用药物有非诺贝特、吉非贝齐等。调脂能力为降低血清TG水平20%-60%、降低总TC水平10%-30%、升高HDL-C水平10%-30%。

**4.2.2 烟酸类及其衍生物** 烟酸可降低TG、LDL-C和Lp $\alpha$ ,同时能升高HDL-C,也可将小LDL转变成正常大小LDL,因此能有效的改善致动脉粥样硬化性血脂紊乱。在所有调脂药物中,烟酸是最有效的升HDL-C和降Lp $\alpha$ 药物。烟酸也有较多的副作用,有些患者不能耐受,副作用包括面部潮红,胃肠道症状等,主要副作用是肝毒性、高尿酸血症以及升高血糖,这些副作用随剂量的增加而增加。一般认为2型糖尿病患者应避免

使用高剂量烟酸(>3 g/d),可考虑用小剂量烟酸(<2 g/d),小剂量可有效治疗致动脉粥样硬化性血脂异常而不会明显加重高血糖,使用中注意经常监测血糖和调整降糖药物。烟酸禁用于有慢性肝病和严重痛风患者,相对禁用于高尿酸血症,烟酸衍生物阿西莫司副作用较轻,可用于2型糖尿病患者。

**4.3 降低TG** 对糖尿病患者而言,虽然高TG血症是其血脂异常的特征之一,但多数患者的TG水平在血糖控制满意后得到明显改善,所以轻度升高的TG水平,不要在血糖未控制前立刻使用降低TG的药物。

在血糖控制满意后,TG水平仍然未达标时,可以选用贝特类药物,此类药物降低TG水平为首选,降低血清TG水平在20%-60%,效果及安全性见上述。另外大剂量他汀类药物也有较好的降低TG的效果。治疗应首先控制血糖,同时减轻体质量、运动和戒酒;TG>11.3 mmol/L者有发生急性胰腺炎的危险,应严格限制脂肪摄入(<总热量的10%);推荐使用吉非罗齐、非诺贝特(肾脏病时应慎用)或大剂量他汀类药物。

**4.4 混和血脂异常治疗** 如果LDL-C增高为主,首选他汀类药物,此时TG和HDL-C异常得到部分改善,且距离达标差距不大,可进一步加大他汀类药物的用量。

如果LDL-C增高为主,但是TG和HDL-C异常也十分显著,单纯他汀类药物的使用不能完全纠正上述异常时,可考虑他汀类药物联合贝特类药物,但需密切观察毒副作用。

**4.5 调脂中药** 目前中医对血脂代谢异常有了深入的研究。从大量的临床研究资料证明,各医家对血脂异常的认识都比较一致。其标为痰湿与瘀血,其本涉及到心肝脾肾四脏的功能失调。目前用于降脂治疗的中药制剂较多,但大多同时具有调脂、抗血小板聚集、抗衰老等多种功能,且大多数品种的调脂作用尚需临床作进一步验证,仅有少数制剂在CHD1,2级预防中获得过确切疗效的证据。

陈巧云 *et al*<sup>[17]</sup>对国内杂志报道的脂必妥临床试验结果进行Meta分析,并与洛伐他汀进行对比,同时采用专家评分法对脂必妥与洛伐他汀进行总体评价的结果表明,两者分别在3.15 g/d、20 mg/d的剂量下,均可有效治疗高胆固醇血症,其中他汀类药物降TC、LDL-C的作用略强,但脂必妥降低TG和升高HDL-C的作用较好。脂必妥发生ALT升高等严重副作用较洛



伐他汀少,且更廉价。此外,脂必妥还具有明显的降低红细胞聚集和血液黏滞性作用,可显著改善患者的血流变及微循环<sup>[18]</sup>。

近年来,国内将血脂康对CHD2级预防的研究结果进行了公布<sup>[19]</sup>,结果显示,服用血脂康1.2 g/d剂量后,可使TC血浆浓度下降13.2%,LDL-C下降20.2%,TG下降15%,HDL-C升高4.9%;CHD事件发生率减少45.1%,次要事件发生率减少31%。此外,还显示血脂康常规剂量下不仅可获得明显的临床疗效,且疗效优于同等剂量的化学他汀类药物,这可能与含有其他具有协同作用的成分的综合作用有关。长期服用血脂康安全性好,副作用少,不良反应临床表现仅见胃痛、乏力等。临床研究中还发现血脂康对糖尿病患者糖、脂代谢有明显的作用,在服用降糖药物的同时,加服血脂康,可使血糖及糖化血红蛋白值均较治疗前明显降低。对伴有高脂血症的糖尿病患者,降糖药物与血脂康联合应用,可获得降糖、降脂临床药理相加的作用<sup>[20]</sup>。

近年来对于糖尿病高脂血症的治疗,调脂西药均不同程度存在着横纹肌溶解、肝肾损害及停药后易反弹等副作用,相比之下,中医药安全性高,因而具有一定的优势。目前存在的主要问题是中药制剂临床研究缺少多中心、大样本的严格随机对照研究,可信度较低;临床评价标准不一致,难以判断不同剂型的优劣。今后应重视基础研究,建立公认的动物模型,从生物学分子水平评价中医药的疗效;将糖尿病、高脂血症看成一个整体,从中医辨证论治的观点出发,本着“异病同治”、“同病异治”的治疗原则,拓展中医学学术发展空间,亦将有助于中医学向个体化医疗目标发展,这对预防和阻止糖尿病患者血脂异常的发生和发展具有积极作用。

纵观多年的大型临床试验,糖尿病患者受益于降低LDL已经有充足的循证医学证据。首选他汀类药物治疗,可减少糖尿病患者心血管事件的发生。然而,在应用调脂药物的同时,应权衡调脂药物的疗效、安全性和费用,并应坚持治疗性生活方式改变,控制其他危险因素如血糖等,配合中医中药起到减毒增效的作用。

## 5 参考文献

- 1 尹香君,焦淑芳,李红,谢瑾,王瑜,吴立军.北京地区2型糖尿病代谢异常及血压控制情况.中国慢性病预防与控制 2004;12:57-58
- 2 Turner RC, Millns H, Neil HA, Stratton IM, Manley

- SE, Matthews DR, Holman RR. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ* 1998; 316: 823-828
- 3 Laakso M, Lehto S, Penttilä I, Pyörälä K. Lipids and lipoproteins predicting coronary heart disease mortality and morbidity in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Circulation* 1993; 88: 1421-1430
- 4 Pyörälä K, Pedersen TR, Kjekshus J, Faergeman O, Olsson AG, Thorgeirsson G. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care* 1997; 20: 614-620
- 5 Goldberg RB, Mellies MJ, Sacks FM, Moye LA, Howard BV, Howard WJ, Davis BR, Cole TG, Pfeffer MA, Braunwald E. Cardiovascular events and their reduction with pravastatin in diabetic and glucose-intolerant myocardial infarction survivors with average cholesterol levels: subgroup analyses in the cholesterol and recurrent events (CARE) trial. The Care Investigators. *Circulation* 1998; 98: 2513-2519
- 6 Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 2005-2016
- 7 Serruys PW, de Feyter P, Macaya C, Kokott N, Puel J, Vrolix M, Branzi A, Bertolami MC, Jackson G, Strauss B, Meier B. Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 287: 3215-3222
- 8 Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JH. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 685-696
- 9 Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987; 317: 1237-1245
- 10 Robins SJ, Collins D, Wittes JT, Papademetriou V, Deedwania PC, Schaefer EJ, McNamara JR, Kashyap ML, Hershman JM, Wexler LE, Rubins HB. Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285: 1585-1591
- 11 Genest J, Frohlich J, Steiner G. Effect of fenofibrate-mediated increase in plasma homocysteine on the progression of coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2004; 93: 848-853
- 12 Grover SA, Coupal L, Zowall H, Dorais M. Cost-effectiveness of treating hyperlipidemia in the presence of diabetes: who should be treated? *Circulation* 2000; 102: 722-727
- 13 Eckel RH. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N*

## ■应用要点

糖尿病患者血脂异常首选他汀类药物,可减少糖尿病患者心血管事件的发生。然而,在应用调脂药物的同时,应权衡调脂药物的疗效、安全性和费用,并应坚持治疗性生活方式改变,控制其他危险因素如血糖等,配合中医中药起到减毒增效的作用。

## ■名词解释

1 NCEP: 为National Cholesterol Education Program的缩写, 中文译为美国国家胆固醇教育计划。

2 ATPⅢ: 为Adult Treatment PanelⅢ缩写。NCEPATPⅢ是指美国国家胆固醇教育计划成人治疗组第三次制定的治疗指南。

- 14 *Engl J Med* 1989; 320: 1060-1068
- Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497
- 15 Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 720-732
- 16 Franz MJ, Bantle JP, Beebe CA, Brunzell JD, Chiasson JL, Garg A, Holzmeister LA, Hoogwerf B, Mayer-Davis E, Mooradian AD, Purnell JQ, Wheeler M. Nutrition principles and recommendations in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: S36-S46
- 17 陈巧云, 魏水易, 陆晓和. 脂必妥与洛伐他汀用于治疗高胆固醇血症的对比分析. *医学研究生学报* 2004; 17: 233-239
- 18 孙桂芬, 刘淑贤, 夏圣梅. 脂必妥治疗老年高脂血症前后血液流变性的观察. *中国微循环* 2002; 2: 110-111
- 19 陆宗良. 血脂康调整血脂对冠心病二级预防的研究. *中国医学论坛报* 2004; 30: 211
- 20 孙美珍, 田林华, 迟家敏. 血脂康对2型糖尿病糖、脂代谢的影响. *中华内科杂志* 1998; 37: 374-376

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

• 消息 •

## 我国科技论文总数连续三年世界第五

本刊讯 2004年度中国科技论文统计结果于2005-12-06在北京揭晓, 与上一年度相比, 我国科技论文SCI论文数增长15.2%, 论文被引用篇数和次数分别增长4.4%和4.3%。更可喜的是, 在过去十年间, 我国论文被引用数已排在世界第14位, 与上一年同一数据相比, 位次提高了4位。

据介绍, 2004年度《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP)共收录我国作者的论文111 356篇, 比上年增加93 352篇, 增长率为19.3%。我国科技论文占世界论文总数的6.3%, 较上年增加1.2%, 连续3年保持在世界第5位, 前4位国家是美国、日本、英国和德国。根据生物医学专家的建议, 今年在统计中新增加了美国《医学索引》(MEDLINE)检索系统, 该系统是当今较权威的生物医学文献检索系统, 我国大陆75种期刊被收录其中。

2004年度我国国内论文最多的学科仍是临床医学, 基础医学名列第六。国内被引用次数最多的学科也是临床医学, 基础医学名列第五。国际被引用论文篇数, 基础医学与临床医学名列第八和第九。由于综合大学并校, 高校论文产出前20位排名榜中已不见了医学院校, 但在MEDLINE收录的高等院校排名中, 仍可看到医学科技论文对综合大学论文排名的贡献。2004年排在SCI收录论文数第一的医疗机构是北京大学第一医院, 解放军总医院在国内论文被引用次数、国内论文数和国际国内论文总数三个统计项目中, 均名列医疗机构第一。

在同时公布的第四届中国百种杰出学术期刊中, 22种医药卫生类期刊榜上有名。[摘自《健康报(记者张荔子)》]

## 应用 MS-RDA 筛选胃癌甲基化差异片段

廖爱军, 苏琦, 王珣, 曾斌, 石巍

廖爱军, 南华大学肿瘤研究所, 南华大学附属第一医院消化内科 湖南省衡阳市 421001

苏琦, 南华大学肿瘤研究所 湖南省衡阳市 421001

王珣, 曾斌, 石巍, 南华大学附属第一医院消化内科 湖南省衡阳市 421001

廖爱军, 女, 1964-08-08生, 湖南省宁乡县, 汉族, 2004年南华大学肿瘤研究所病理学博士生, 教授, 主要从事胃癌病因、发病机制及防治的研究。

湖南省科研计划重大专项, No. 04SK1004

湖南省教育厅科学研究资助项目, No. 99C195

通讯作者: 苏琦, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学肿瘤研究所. suqi1@hotmail.com

电话: 0734-8279064 传真: 0734-8281547

收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-11-25

### Isolation of differentially methylated DNA sequences of gastric cancer by methylation-sensitive representational difference analysis

AI-Jun Liao, Qi Su, Xun Wang, Bin Zeng, Wei Shi

AI-Jun Liao, Institute of Cancer Research, Nanhua University; Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Qi Su, Institute of Cancer Research, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Xun Wang, Bin Zeng, Wei Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Supported by the Key Foundation of Science and Technology Program of Hunan Province, No. 04SK1004, and the Scientific Research Foundation from Education Department of Hunan Province, No. 99C195

Correspondence to: Dr. Qi Su, Cancer Research Institute, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province China. suqi1@hotmail.com

Received: 2005-11-23 Accepted: 2005-11-25

### Abstract

**AIM:** To isolate the differentially methylated DNA sequences between gastric cancer and normal gastric mucosa.

**METHODS:** The differentially methylated DNA sequences between gastric cancer and normal gastric mucosa were isolated by methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA). Similarities between the separated fragments and the human genomic DNA were analyzed with Building Loads Analysis and Sys-

tem Thermodynamics (BLAST) program.

**RESULTS:** Three differentially methylated DNA sequences, CRS1308, CRS1309, and CRS1310, were obtained. CRS1309 and CRS1310 had been accepted by GenBank. CRS1309 was highly similar to the eleventh exon of LOC440683 (98%), 3' end of LOC440887 (99%), and promoter and exon region of DRD5 (94%). CRS1310 was consistent (98%) with a CpG island, in ribosomal RNA, isolated from colorectal cancer by Minoru Toyota in 1999.

**CONCLUSION:** The methylation degree is different between gastric cancer and normal gastric mucosa. The differentially methylated DNA sequences can be isolated effectively by MS-RDA.

**Key Words:** Gastric cancer; DNA methylation; Differential sequences; MS-RDA

Liao AJ, Su Q, Wang X, Zeng B, Shi W. Isolation of differentially methylated DNA sequences of gastric cancer by methylation-sensitive representational difference analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):365-369

### 摘要

**目的:** 应用甲基化敏感性代表性差异分析法(methylation-sensitive representational difference analysis, MS-RDA)筛选胃癌和正常胃组织间甲基化差异DNA片段。

**方法:** 通过MS-RDA筛选胃癌和正常胃组织间DNA甲基化差异片段, 经克隆、测序后进行生物信息学分析。

**结果:** 获得3个甲基化差异片段, 分别为 CRS1308, CRS1309, CRS1310序列, 其中 CRS1309和CRS1310已被GenBank收录, 登陆号分别为AY887106和AY887107, CRS1309序列与LOC440683基因第11外显子、LOC440887基因的3'端, DRD5基因启动子和外显子区域均有很高的相似性(分别为98%, 99%, 94%), CRS1310序列与1999年Minoru Toyota在人类结肠癌中分离出的核糖体RNA上的甲基化差异性CpG岛有很高的相似性(98%)。

### ■背景资料

研究胃癌组织与正常胃组织基因的甲基化分布的差异, 不仅可探讨甲基化在胃癌发生中的作用, 同时也可筛选出与胃癌发生有关的新的相关基因, 为胃癌研究提供新的指标。MS-RDA通过采用甲基化敏感性四碱基限制性内切酶消化基因组DNA, 按甲基化分布的差异最大限度降低了基因组DNA的复杂性, 使整个基因组较短的酶切片段得到了有效富集。



# ■创新盘点

从本研究结果表明, MS-RDA能有效分离两种组织的差异甲基化DNA片段, 是研究胃癌中DNA甲基化作用, 筛选新的抑癌基因的一种较好的方法。

**结论:** 胃癌和正常胃组织间DNA甲基化存在差异, MS-RDA可有效分析这两种不同组织间甲基化的差异, 筛选出有意义的甲基化差异片段。

**关键词:** 胃癌; DNA甲基化; 差异片段; MS-RDA

廖爱军, 苏琦, 王珣, 曾斌, 石巍. 应用MS-RDA筛选胃癌甲基化差异片段. 世界华人消化杂志 2006;14(4):365-369  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/365.asp

## 0 引言

1993年Lisitsyn *et al*<sup>[1]</sup>在消减杂交的基础上发展了一种代表性差异分析(RDA)的方法, 该方法通过限制性内切酶消化基因组DNA, 降低基因组的复杂性, 经多轮消减杂交结合PCR后使差异性的靶基因片段得到大量的富集, 后来, Ushijima *et al*<sup>[2]</sup>采用甲基化敏感性限制性内切酶消化基因组DNA, 而在RDA的基础上形成了MS-RDA(甲基化敏感性代表性差异分析), 该方法被用来筛选肿瘤中发生异常甲基化的基因. 我们运用MS-RDA方法筛选胃癌与正常胃组织间DNA甲基化差异片段, 为进一步研究胃癌新的相关抑癌基因提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胃腺癌患者胃窦部肿瘤边缘黏膜及其癌旁(>5 cm)正常胃黏膜各1-3 g, 用锡箔、纱布包好置于液氮中保存, 组织标本术后经病理检查结果证实。

**1.2 方法** 取100 mg组织匀浆, 加入1.5 mL DNA提取液及胰RNA酶(Fermentas公司)(10 g/L)20  $\mu$ L, 混匀, 37℃孵育1 h, 加入蛋白酶K(Fermentas公司)(20 g/L)40  $\mu$ L, 上下颠倒混匀, 37℃消化3 h后溶液变得清亮, 使用经典的酚氯仿抽提法提取基因组DNA. 在10  $\mu$ g基因组DNA中加入10  $\mu$ L甲基化敏感性限制性内切酶Hpa II(Fermentas公司)(10 MU/L), 混匀稍离心后, 37℃酶切20 h. 未甲基化的-CCGG-位点被切割成黏性末端, 已甲基化的位点未被切割. 在酶切产物中加入RHpa II<sub>24</sub>和RHpa II<sub>11</sub>接头(表1), 50℃孵育1 min, 然后以1 min降1℃的速度逐步冷却到10℃, 使其自身退火形成RHpa II<sub>24/11</sub>接头, 在T<sub>4</sub> DNA连接酶(TaKaRa公司)作用下, 16℃连接14-16 h<sup>[1]</sup>. 以上述连接接头后, 产物接头中的RHpa II<sub>24</sub>为引物在LA Taq酶(TaKaRa公司)作用下进行PCR扩增, 95℃变性1 min, 72℃退火3 min, 26个循环后72℃延伸10 min, 使带有R接

表1 MS-RDA所使用的接头及序列

| 接头名称                  | 序列                                    |
|-----------------------|---------------------------------------|
| RHpa II <sub>24</sub> | 5'-AGC ACT CTC CAG CCT CTC ACC GAC-3' |
| RHpa II <sub>11</sub> | 5'-CGG TCG GTG AG-3'                  |
| JHpa II <sub>24</sub> | 5'-ACC GAC GTC GAC TAT CCA TGA AAC-3' |
| JHpa II <sub>11</sub> | 5'-CGG TTT CAT GG-3'                  |
| NHpa II <sub>24</sub> | 5'-AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAC-3' |
| NHpa II <sub>11</sub> | 5'-CGG TCC CTC GG-3'                  |
| SHpa II <sub>24</sub> | 5'-ACT TCT ACG GCT GAA TTC CGC CAC-3' |
| SHpa II <sub>11</sub> | 5'-CGG TGT CGG AAT-3'                 |

头的DNA片段即扩增子得到有效富集<sup>[2]</sup>, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳观察扩增子。

**1.2.1 消减杂交** 胃癌扩增子和胃正常扩增子在同裂酶Msp I酶(Fermentas公司)酶切作用下切除R接头, 酶切产物用DNA片段纯化试剂盒(TaKaRa公司)纯化以去除混于其中的R接头. 将胃癌扩增子去R接头纯化后的产物连上JHpa II<sub>24/11</sub>接头(表1)作为检测子, 胃正常扩增子去R接头产物作为驱赶子进行的杂交称为正交, 反之称为反交, 检测子和驱赶子按1:40的比例混合沉淀后溶于4  $\mu$ L杂交缓冲液, 然后96℃变性10 min, 67℃杂交24 h, 杂交反应完成后, 取1/10体积杂交产物为模板, 以JHpa II<sub>24</sub>为引物进行PCR反应, 13个循环后加入Mung Bean Nuclease(TaKaRa公司)消化单链核苷酸, 酚/氯仿抽提后继续PCR反应20-30个循环<sup>[2]</sup>. 将上述第1轮正交和反交的产物用Msp I消化, 经DNA片段纯化试剂盒纯化后, 依次换以N/S接头, J接头分别进行随后的第2轮, 第3轮杂交和扩增. 检测子和驱赶子的比例由第1轮的1:40分别改为1:400, 1:4 000<sup>[3]</sup>, 获得胃癌和正常胃组织间差异甲基化DNA片段(图1)。

**1.2.2 克隆测序及相似性分析** 将最终的消减杂交产物进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外投射仪下将目的条带切胶, 经琼脂糖凝胶回收试剂盒(TaKaRa公司)回收后与pGEM-T载体(Promega公司)在4℃下连接12 h, 将连接产物加入高效感受态制备试剂盒(Fermentas公司)制备的JM109感受态细菌进行转化复苏后, 将菌液涂布于含有氨苄青霉素的LB固体培养基上, 37℃培养箱中培养14 h, 挑取阳性克隆, 在LB液体培养基中37℃摇菌8 h, 用碱法提取质粒DNA, 经PCR法鉴定目的片段已转化到细菌质粒中, 将菌液送TaKaRa公司测序, 测序结果经BLAST系统进行相似性分析。

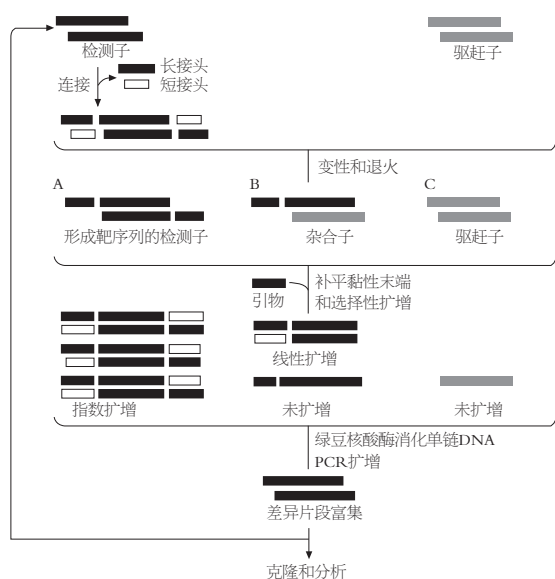


图1 MS-RDA实验策略示意图。

## 2 结果

**2.1 基因组DNA扩增子及甲基化差异片段** 胃癌组织和正常胃组织基因组DNA的Hpa II酶切产物加RHpa II<sub>24/11</sub>接头, 经PCR扩增有效富集的扩增子(图2)。扩增子在200-1 000 bp之间为明亮的弥散的条带。将胃癌组织作为检测子, 胃正常组织作为驱赶子经过3轮正交反应后便可在400 bp左右见1条清晰的差异性条带(图3)。以胃正常组织作为检测子, 胃癌组织作为驱赶子进行2轮反交后可在400 bp左右及200-300 bp间见2条明亮清晰的差异条带(图4)。

**2.2 克隆测序及BLAST分析** 正交和反交后的3条甲基化差异DNA片段经pGEM-T克隆后, 分别挑取阳性克隆进行序列测通分析。其中正交的1条差异片段CRS1308的测序结果不理想, 存在较多的误读和失读, 考虑为GC含量丰富, 模板存在复杂的二级结构导致测序时峰值叠加, 测序仪无法准确识别, 表2中的相关数据仅供参考。反交的2条差异片段CRS1309和CRS1310已被GenBank收录, 登陆号分别为AY887106和AY887107, 经BLAST分析后发现, 其中AY887106序列与1q21.1的LOC440683基因第11外显子有98%的相似性, 与2p11.1的LOC440887基因的3'端有99%的相似性, 与4p16.1位置的DRD5基因的启动子和外显子区域有94%的相似性, AY887106序列与LOC440887基因、LOC440683基因和DRD5基因的位置关系如图5。AY887107序列位于核糖体RNA上, 与1999年Toyota *et al*<sup>[4]</sup>在人类结肠癌中分离出的甲基化差异性CpG岛有98%的相似性。BLAST分析结果归

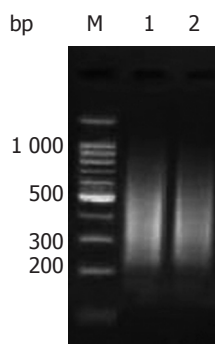


图2 胃癌组织和正常胃组织的扩增子。M: DNA marker; 1: 胃癌组织扩增子; 2: 正常胃组织扩增子。

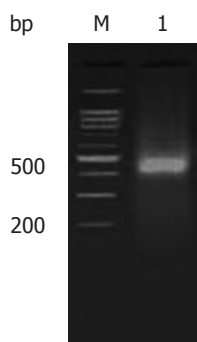


图3 3轮消减杂交后正交结果。M: DNA marker; 1: 位于400 bp左右的差异片段。

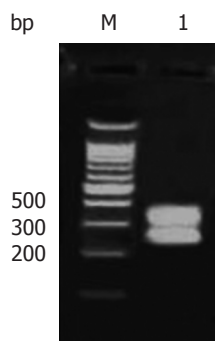


图4 2轮消减杂交后反交结果。M: DNA marker; 1: 分别位于400 bp左右和200-300 bp之间的2条差异片段。

纳为表2。

## 3 讨论

DNA甲基化通过影响基因转录、促进基因突变、增加染色体结构的不稳定性等多方面机制促进胃癌的发生、发展, 是表遗传学修饰的一种重要方式, 研究胃癌组织与正常胃组织基因的甲基化分布的差异, 不仅可探讨甲基化在胃癌发生中的作用, 同时也可筛选出与胃癌发生有关的新的相关基因, 为胃癌研究提供新的指标。早期使用Southern杂交和限制性标志的基因扫描(restriction landmark genomic scanning)也能确定

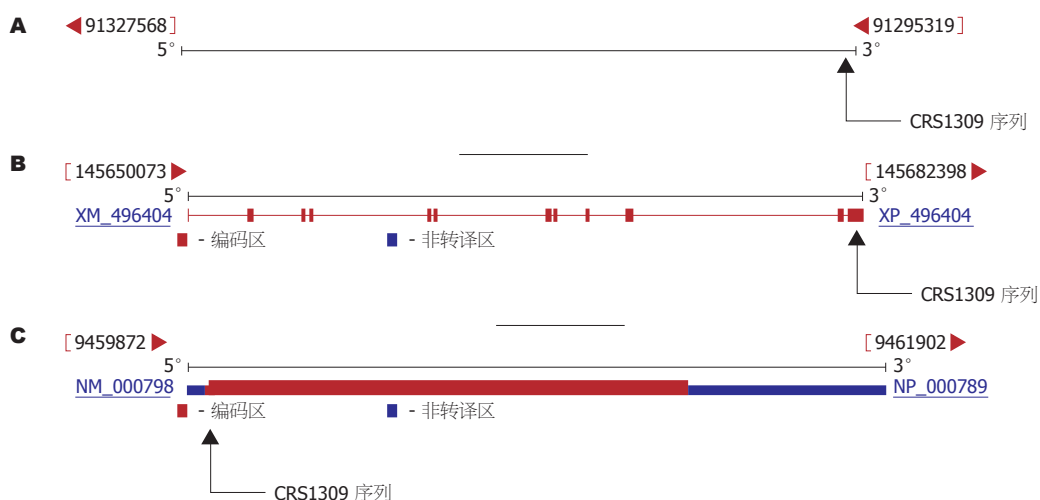


图 5 CRS1309序列与LOC440887 (A) 基因LOC440683基因 (B) 和DRD5基因 (C) 结构位置关系.

表 2 MS-RDA分析所获得的差异甲基化片段的特征

| 片段                 | 筛选 (次数) | 长度 (bp) | GC (%) | CG/GC   | 相似性       |     |       |         |
|--------------------|---------|---------|--------|---------|-----------|-----|-------|---------|
|                    |         |         |        |         | 染色体定位     | S   | E     | 相似率 (%) |
| CRS1308            | 2       | 431     | 46.6   | 0.653 8 | 18q21.1-2 | 272 | 1e-69 | 86      |
| CRS1309 (AY887106) | 2       | 264     | 66.3   | 0.700 0 | 2p11.1    | 521 | e-145 | 99      |
|                    |         |         |        |         | 1q21.1    | 498 | e-138 | 98      |
|                    |         |         |        |         | 4p16.1    | 435 | e-119 | 94      |
| CRS1310 (AY887107) | 2       | 395     | 50.6   | 0.928 6 | 8q13.3    | 745 | 0     | 98      |

异常甲基化基因, 但是前者仅局限于已知基因, 后者则存在操作复杂以及分离得到的基因难以克隆的缺点<sup>[5]</sup>. Ushijima *et al*<sup>[12]</sup>创建MS-RDA的同时也成功的筛选出了小鼠肝肿瘤中差异性甲基化片段. MS-RDA采用甲基化敏感性四碱基限制性内切酶消化基因组DNA, 可按甲基化分布的差异最大限度降低基因组DNA的复杂性后<sup>[3]</sup>酶切产物连接R*Hpa* II<sub>24/11</sub>接头进行PCR, 使整个基因组较短的酶切片段有效富集. 由于长片段难以经PCR扩增, 而短片段扩增效率高, 这就为随后的消减杂交的效率打下了基础, 同时将“检测子”和“驱赶子”两者之间的差异转化为限制性内切酶位点之间的差异<sup>[1]</sup>, 我们得到的扩增子是位于200-1 000 bp之间的弥散条带. 将“检测子”和“驱赶子”进行多轮消减杂交结合PCR扩增, 其中的靶序列即差异甲基化片段为同聚体, 两端均有接头成指数扩增, 而“驱赶子”和“检测子”相同序列形成的异源二聚体因只有单链接头只能成线性扩增, 这样二者间的相同序列被彻底抵消, 从而使“驱赶子”中缺乏而存在于“检测子”中的甲基化差异片段呈指数扩增而得到有效的富集, 因此MS-RDA中“驱赶

子”和“检测子”间的差异比较不是酶切片段长度的比较而是两者间甲基化差异信息的比较, 因而可有效的筛选出甲基化差异片段. MS-RDA的实验方法较为繁复, 费用较高, 我们无法进行大样本量的筛选, 仅采用一例标本进行研究, 目的是希望通过该实验为胃癌发病机制研究提供一个新的研究靶点, 为后续研究提供一个方向和平台. 我们采用的标本为同一个体的胃癌组织及其癌旁正常组织, 可排除由于个体差异及其他干扰因素而导致的假阳性结果, 因此我们筛选出的片段可以反映该个体在胃癌发展过程中相关基因甲基化的差异. 我们从GenBank提供的信息显示, 与AY887106序列高度相关的LOC440683基因和LOC440887基因都是目前研究甚少的新基因, LOC440683基因的最新信息更新认为其可能为多巴胺受体D5基因的假基因, 是物种进化过程中的产物, LOC440887基因被认为可能与髓细胞/淋巴细胞或多系混合性白血病有关, 编码ALR(急性淋巴母细胞性白血病[ALL]-1相关)样蛋白, 并与位于染色体7q36上的MLL3基因具有密切的相关性. Tan *et al*<sup>[6]</sup>发现在髓性白血病中发现MLL3基因所在的染色



体区域频繁缺失, 认为MLL3基因的缺失在恶性白血病的发生发展中起着重要的作用. 2002年, Ruault *et al*<sup>[7]</sup>发现1, 2, 13和21号染色体的着丝粒部位存在MLL3基因的部分拷贝, 而LOC440887基因正是位于2号染色体的着丝粒部位, 很可能为其部分拷贝. 我们已在NCBI的网站上对MLL3基因进行了Digital Northern分析, 结果认为MLL3基因在人胃组织中有表达, 并在胃癌及正常胃组织间存在一定的表达差异, 我们目前正在进行相关的实验室研究. AY887107序列位于核糖体RNA上, 与1999年Toyota *et al*<sup>[4]</sup>在人类结肠癌中分离出的甲基化差异性CpG岛有98%的相似性, 进一步表明该位点在胃肠道肿瘤中较易发生甲基化.

MS-RDA由于周期较短、富集效率高且假阳性低的特点而广泛的应用于基因筛选和克隆方面. 2001年, Takai *et al*<sup>[8]</sup>应用MS-RDA对两种肺癌细胞株EBC-1和LK-2中异常甲基化基因筛选发现HTR1B基因沉默以及EDN1基因的低表达. 2003年, Miyamoto *et al*<sup>[9]</sup>应用MS-RDA发现人类结肠癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌中3-OST-2基因的沉默均与甲基化相关. 2004年, Hagihara *et al*<sup>[10]</sup>应用MS-RDA在人类胰腺癌中筛选出111个甲基化差异片段, 其中35个位于已知基因的5'区域. 但是MS-RDA同时也存在步骤繁多, 作为“检测子”和“驱赶子”样本要求具有高度同源性, 最后富集的片段小于1 kb的缺点, 有可能使部分信息丢失, 但从本研究结果表明, MS-RDA能有效分离两种组织的差异甲基化DNA片段, 是研究胃癌中DNA甲基化作用, 筛选新的抑癌基因的一种较好的方法.

#### 4 参考文献

- 1 Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 1993; 259: 946-951
- 2 Ushijima T, Morimura K, Hosoya Y, Okonogi H, Tatematsu M, Sugimura T, Nagao M. Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2284-2289
- 3 Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 5640-5648
- 4 Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 1999; 59: 2307-2312
- 5 Parkes V, Modha N, Ulrich JM, Jones T, Francis GE. DNA-protein interaction sites in differentiating cells. II. A subset of alphoid repetitive sequences with retinoic acid induced protein attachment and an unusual purine-pyrimidine 'signature'. *Exp Hematol* 1996; 24: 568-579
- 6 Tan YC, Chow VT. Novel human HALR (MLL3) gene encodes a protein homologous to ALR and to ALL-1 involved in leukemia, and maps to chromosome 7q36 associated with leukemia and developmental defects. *Cancer Detect Prev* 2001; 25: 454-469
- 7 Ruault M, Brun ME, Ventura M, Roizes G, De Sario A. MLL3, a new human member of the TRX/MLL gene family, maps to 7q36, a chromosome region frequently deleted in myeloid leukaemia. *Gene* 2002; 284: 73-81
- 8 Takai D, Yagi Y, Wakazono K, Ohishi N, Morita Y, Sugimura T, Ushijima T. Silencing of HTR1B and reduced expression of EDN1 in human lung cancers, revealed by methylation-sensitive representational difference analysis. *Oncogene* 2001; 20: 7505-7513
- 9 Miyamoto K, Asada K, Fukutomi T, Okochi E, Yagi Y, Hasegawa T, Asahara T, Sugimura T, Ushijima T. Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. *Oncogene* 2003; 22: 274-280
- 10 Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, Hiraoka N, Wakazono K, Seki S, Fukushima S, Tsao MS, Sugimura T, Ushijima T. Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene* 2004; 23: 8705-8710

#### ■同行评价

本研究利用MS-RDA方法筛选胃癌甲基化差异片段, 方法先进, 研究设计合理, 充实了胃癌发生过程中基因变异的材料, 为胃癌的研究提供了新的指标.

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 胃电刺激对大鼠胃扩张反应神经元及增食欲素的影响

孙向荣, 徐璐, 叶俊丽

## ■背景资料

肥胖已经成为威胁人类健康的一大难题。胃电刺激疗法是在西方国家兴起了一种新型肥胖治疗方法。动物实验发现, 胃电刺激可减少胃窦的运动频率、抑制胃排空、减弱胃的慢波节律, 从而减少食物摄入量。在临床上胃电刺激可明显抑制肥胖患者的食欲并减轻患者体重。但胃电刺激的中枢作用机制至今仍不明了。我们通过观察胃电刺激对大鼠下丘脑VMH的胃扩张敏感性神经元的作用以及中枢内orexin表达的影响, 探讨胃电刺激的中枢作用机制。

孙向荣, 徐璐, 叶俊丽, 青岛大学医学院病理生理教研室 山东省青岛市 266021

孙向荣, 女, 1977-03-05生, 山西省宁武县人, 汉族, 2002年青岛大学医学院硕士, 讲师, 主要从事神经内分泌研究。

国家自然科学基金资助项目, No.30470642

青岛市科技局资助项目, No.05-1-JC-93

通讯作者: 徐璐, 266021, 青岛市登州路38号, 青岛大学医学院病理生理教研室. luoxukai@yahoo.com

电话: 0532-83056510 传真: 0532-83813986

收稿日期: 2005-11-30 接受日期: 2005-12-06

## Effects of gastric electrical stimulation on responsive neurons to gastric distension and expression of orexin in rats

Xiang-Rong Sun, Luo Xu, Jun-Li Ye

Xiang-Rong Sun, Luo Xu, Jun-Li Ye, Department of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30470642, and Qingdao Scientific and Technique Division, No. 05-1-JC-93

Correspondence to: Dr. Luo Xu, Department of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, 38 Dengzhou Road, Qingdao 266021, Shandong Province, China. luoxukai@yahoo.com

Received: 2005-11-30 Accepted: 2005-12-06

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of gastric electrical stimulation (GES) on responsive neurons to gastric distension (GD) in ventromedial hypothalamus (VMH) and the expression of orexin in rat brain.

**METHODS:** Fifty-two adult Wistar rats were used in this experiment. The effects of GES on GD responsive neurons in VMH were observed by recording extracellular potentials of single neuron. GD responsive neurons were classified as GD-excitatory (GD-E) and GD-inhibitory (GD-I) ones according to their responses to GD. GES with three sets of parameters were applied for one minute respectively: GES1 (6 mA, 0.3 ms, 40 Hz, 2 s-on, 3 s-off) with standard pulse trains; GES2 with reduced on-time to 0.1 s and GES3 with decreased frequency to 20 Hz. After GES1

was using for 2 h, we observed the expression of orexin-A immunoreactive (orexin-A-IR) positive neurons in lateral hypothalamus area (LHA) by fluorescent immunohistochemistry and the content of orexin in rat brain by radioimmunoassay.

**RESULTS:** Ninety neurons in VMH were recorded, of which 82 (85.41%) responded to GD (3-5 mL, 10-30 s). Of the 82 GD responsive neurons, 31 (37.8%) were GD-E neurons and 51 (62.2%) were GD-I neurons. 55.0%, 17.6%, and 14.3% of GD-E neurons were excited by GES1, GES2, and GES3 respectively. More GD-E neurons were excited by GES1 than by GES2 and GES3 ( $P = 0.002$  and  $0.016$ , respectively). Of the GD-I neurons, 63.6%, 37.9%, and 51.9% neurons were excited by GES1, GES2, and GES3, respectively. GES2 was noted to be less effective in comparison with GES1 ( $P = 0.043$ ). After GES1 was in application for 2 h, the levels of orexin-A-IR positive neurons were significantly decreased in LHA as compared with those in control group ( $6.97 \pm 1.51/0.1 \text{ mm}^2$  vs  $26.62 \pm 8.30/0.1 \text{ mm}^2$ ,  $P < 0.01$ ), and the content of orexin peptide was decreased obviously in the hypothalamus ( $112.54 \pm 11.58 \text{ fmol/mg}$  vs  $185.23 \pm 15.22 \text{ fmol/mg}$ ,  $P < 0.01$ ), mesencephalon ( $71.95 \pm 8.45 \text{ fmol/mg}$  vs  $98.48 \pm 12.02 \text{ fmol/mg}$ ,  $P < 0.05$ ), medulla oblongata ( $72.36 \pm 6.58 \text{ fmol/mg}$  vs  $101.29 \pm 15.22 \text{ fmol/mg}$ ,  $P < 0.05$ ), solitary tract nucleus ( $69.12 \pm 4.99 \text{ fmol/mg}$  vs  $89.21 \pm 9.23 \text{ fmol/mg}$ ,  $P < 0.05$ ) by radioimmunoassay. However, the content of orexin peptide had no significant change in pons.

**CONCLUSION:** GES may activate the GD responsive neurons in VMH and the excitatory effect of GES is related to the frequency and time of stimulation. Decreased expression of orexin in the brain may also take part in the central mechanism of GES.

**Key Words:** Gastric electrical stimulation; Ventromedial hypothalamus; Orexin; Fluorescent immunohistochemistry; Radioimmunoassay; Rats

Sun XR, Xu L, Ye JL. Effects of gastric electrical stimulation on responsive neurons to gastric distension and expression of orexin in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*

2006;14(4):370-375

## 摘要

**目的:** 观察胃电刺激(GES)对大鼠下丘脑腹内侧区(VMH)胃扩张(GD)相关神经元的作用及脑内增食欲素(orexin)表达的影响, 初步探讨GES的中枢作用机制。

**方法:** 选用成年Wistar大鼠52只, 采用细胞外记录神经元单位放电方法, 记录VMH神经元自发放电活动, 根据神经元对胃扩张刺激反应的不同, 分为胃扩张兴奋性神经元(GD-E)和胃扩张抑制性神经元(GD-I)。观察3组不同参数的胃电刺激(GES1, GES2, GES3)对VMH内GD-E和GD-I放电频率的影响: GES1(6 mA, 0.3 ms, 40 Hz, 2 s-on, 3 s-off)为标准参数; GES2的串刺激持续时间减少为0.1 s; GES3的串刺激频率减少至20 Hz, 其他参数均同GES1。采用免疫荧光组织化学染色方法和放射免疫分析法观测胃电刺激2 h对大鼠下丘脑外侧区(LHA)增食欲素-A(orexin-A)阳性神经元和不同脑区orexin含量表达的影响。

**结果:** VMH记录的96个神经元中有82个神经元(85.41%)对胃扩张刺激(GD, 3-5 mL, 10-30 s)有反应, 其中31个(37.8%)为胃扩张兴奋性(GD-E)神经元, 51个(62.2%)为胃扩张抑制性(GD-I)神经元。GES1, 2, 3分别兴奋了55.0%, 17.6%, 14.3%的GD-E神经元。GES1对GD-E神经元的作用明显强于GES2和GES3 ( $P = 0.002$ ,  $P = 0.016$ )。63.6%, 37.9%和51.9%的GD-I神经元分别被GES1, 2, 3所兴奋, 其中GES2的兴奋作用较弱( $P = 0.043$ )。GES1刺激胃窦部2 h, 下丘脑LHA orexin-A免疫阳性神经元表达明显减少( $6.97 \pm 1.51/0.1 \text{ mm}^2$  vs  $26.62 \pm 8.30/0.1 \text{ mm}^2$ ,  $P < 0.01$ ); 且下丘脑、中脑、延脑和孤束核中orexin免疫反应物(IR)的含量与对照组相比明显减少( $112.54 \pm 11.58 \text{ fmol/mg}$  vs  $185.23 \pm 15.22 \text{ fmol/mg}$ ,  $P < 0.01$ ;  $71.95 \pm 8.45 \text{ fmol/mg}$  vs  $98.48 \pm 12.02 \text{ fmol/mg}$ ,  $P < 0.05$ ;  $72.36 \pm 6.58 \text{ fmol/mg}$  vs  $101.29 \pm 15.22 \text{ fmol/mg}$ ,  $P < 0.05$ ;  $69.12 \pm 4.99 \text{ fmol/mg}$  vs  $89.21 \pm 9.23 \text{ fmol/mg}$ ,  $P < 0.05$ ), 但脑桥内orexin-IR的含量与对照组相比无显著差异。

**结论:** GES可兴奋下丘脑“饱中枢”-VMH内胃扩张反应性神经元, 电刺激作用的强弱与GES刺激的频率和刺激的持续时间有关; 脑内orexin的降低可能也参与了GES的中枢作用机制。

**关键词:** 胃电刺激; 下丘脑腹内侧核; 增食欲素; 免疫

## 荧光组织化学; 放射免疫; 大鼠

孙向荣, 徐璐, 叶俊丽. 胃电刺激对大鼠胃扩张反应神经元及增食欲素的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(4):370-375  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/370.asp>

## 0 引言

肥胖已成为中国面临的一个严重的公共健康问题, 其不但会导致糖尿病、高血压、癌症等诸多疾病, 还会使人早逝。因此如何行之有效的减肥已成为医学界及营养学界专家研究的一个热点。目前治疗肥胖的一些方法因其难以坚持, 容易反弹, 且影响身体健康而不能为广大肥胖患者所完全接受。最近, 在西方国家兴起了一种新型肥胖治疗方法——胃电刺激疗法<sup>[1-4]</sup>。有文献报道, 胃电刺激可减少胃窦的运动频率、抑制胃排空、减弱胃的慢波节律, 从而减少食物摄入量<sup>[5-7]</sup>。在临床上胃电刺激可明显抑制肥胖患者的食欲并减轻患者体重<sup>[1-4]</sup>。但胃电刺激的中枢作用机制至今仍不明了。我们通过观察胃电刺激对大鼠下丘脑VMH的胃扩张敏感性神经元的作用以及中枢内orexin表达的影响, 探讨胃电刺激的中枢作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 采用健康成年Wistar大鼠(由青岛市药检所提供), 雌雄兼备, 体质量250-350 g, 置于室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12/12 h昼夜循环光照条件下生活, 自由摄食、饮水。

1.1.2 实验仪器 MEZ8201型微电极放大器; VC-II型双道记忆示波器; QC-111J型直方图分析仪; SSEW-3301电子刺激器, 均由日本光电公司生产。

### 1.2 方法

1.2.1 电生理实验 200 g/L乌拉坦(1 g/kg)经腹腔注射麻醉大鼠。颈部正中纵行切口, 行气管插管术。腹部正中纵行切口, 经胃底部切口将胃内容物掏出, 以温和生理盐水清洗。置入一薄软胶气囊, 经聚乙烯软管连至一5 mL注射器, 实验中注入生理盐水(3-5 mL, 0.5 mL/s,  $37^\circ\text{C}$ )扩张胃, 用以鉴别胃扩张敏感神经元<sup>[8]</sup>。胃窦部近胃小弯侧缝合一铂金刺激电极, 电极尖端相距约0.2 cm, 关闭腹腔。头部正中切口, 牙科钻颅骨钻孔, 切开脑膜暴露脑表面, VMH定位参照Paxinos-Watson大鼠脑图谱。坐标定位: AP -2.3--2.8 mm; L 0.5-1.0 mm; H 9.0-10.4 mm。

## ■研究前沿

胃电刺激疗法目前已被应用于治疗肥胖、呕吐等疾病。关于其在临床应用中的可行性及其治疗机制的研究成为学术界的热点。



### ■创新盘点

目前关于胃电刺激的相关文献主要集中在其对动物的摄食量、体质量、呕吐反应等行为的学的影响的研究以及其对胃肠动力、胃肠肌电活动的影响的外周机制的研究。我们的研究则从脑内摄食相关核团及脑内神经肽表达入手,开辟了更深层次的研究领域。

用液压推进器将电极送至预定深度后进行细胞外记录,记录电极内充灌20 g/L蒺藜天蓝的0.5 mol/L的醋酸钠溶液,观察细胞电信号与噪声比在3:1以上。信号经MEZ-8201型微电极放大器输入VC-11双道示波器,电信号经由示波器同步Y轴输出,经SUMP-PC生物信号处理系统进行放电频率分析,并绘出序列密度直方图。以神经元放电频率的变化率超过20%作为神经元兴奋或抑制指标,神经元表现兴奋或抑制反应可确定为GD敏感神经元。给予3组不同参数的胃电刺激(GES1: 6 mA, 0.3 ms, 40 Hz, 2 s-on, 3 s-off; GES2: 6 mA, 0.3 ms, 40 Hz, 0.1 s-on, 4.9 s-off; GES3: 6 mA, 0.3 ms, 20 Hz, 2 s-on, 3 s-off)观察GD神经元自发放电频率的变化。

**1.2.2 免疫组织化学实验** GES1电刺激胃2 h后立即用生理盐水、40 g/L多聚甲醛/PBS经心脏灌注固定。断头取脑,后固定2 h,梯度蔗糖浸泡过夜,待组织块沉底后行脑冠状连续冰冻切片,片厚20  $\mu\text{m}$ 。各组脑片均都在同一水平每隔3张取1,各组均取6张。脑片经40 mL/L正常羊血清/0.5 mL/L Triton X-100/PBS孵育2-3 h后,与orexin-A单克隆抗体(1:300, Chemicon international, CA, USA)孵育液(4 mL/L NGS和0.5 mL/L Triton X-100的PBS孵育液)孵育40 h(4 $^{\circ}\text{C}$ )。二抗选用羊抗小鼠Cy3-IgG(1:500, Jackson Immunoresearch, USA)孵育2 h(避光),0.01 mol/L PBS冲洗后,甘油/PBS封片剂(Citifluor, UK)封片,激光共聚焦显微镜(Biorad, MRC1024型,日本)下观察免疫阳性细胞。

**1.2.3 放射免疫实验** 放射免疫试剂盒由上海第二军医大学提供,脑区内orexin的提取和放免检测严格按说明书进行操作。首先配制orexin标准液(将orexin标准品用PBS缓冲液稀释成每100  $\mu\text{L}$ 分别含2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1 280 pg的orexin); orexin抗血清用PBS稀释至1:8 000(orexin纯品和抗orexin兔血清为美国Sigma公司产品)。动物实验完毕,迅速断头取脑。将脑和垂体置于煮沸的生理盐水中煮5 min;吸干、分离下丘脑、称质量,加1 mol/L盐酸1.0 mL制成匀浆,室温下静置100 min。然后加1 mol/L氢氧化钠1 mL中和,4 000 r/min离心20 min,取上清液测定。测定程序:各管加 $^{125}\text{I}$ -orexin 100  $\mu\text{L}$ ,抗orexin血清100  $\mu\text{L}$ 。样品管加100-200  $\mu\text{L}$ ,标准管加orexin 100  $\mu\text{L}$ ,最后以磷酸缓冲液补足总反应体积为500  $\mu\text{L}$ ;4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内孵育24 h;各管加1:3羊抗兔血清100  $\mu\text{L}$ ,继

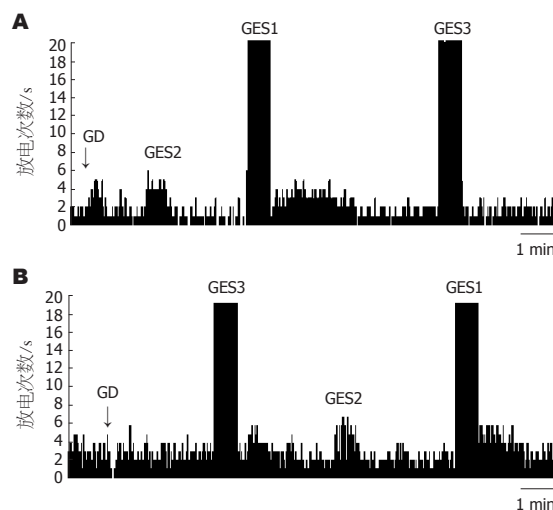


图1 GES1, GES2, GES3对VMH内GD-E和GD-I神经元放电频率的影响。A: 对GD-E神经元; B: 对GD-I神经元。

续孵育24 h, 4 000 r/min离心20 min, 弃上清液。测沉淀物的cpm, 根据同批测定管的orexin竞争抑制曲线, 求取每mg组织中orexin-IR的含量。

**统计学处理** 采用软件GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software公司, 美国)进行统计分析, 数据以mean $\pm$ SD表示, 两样本均数的比较采用 $t$ 检验, 各组电刺激之间的作用差别用 $\chi^2$ 检验,  $P<0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 电生理实验结果

**2.1.1 VMH内神经元对胃扩张刺激的反应** 52只大鼠的VMH共记录到96个神经元单位放电, 其中82个神经元(82/96, 85.41%)为GD反应性神经元; 在82个GD反应性神经元中, 51个神经元(51/82, 62.19%)为GD-I神经元, 31个(31/82, 37.80%)为GD-E神经元。给以胃扩张刺激后, GD-E神经元的放电频率由 $1.51\pm0.33$  Hz增加至 $2.84\pm0.62$  Hz ( $P<0.01$ ); 而GD-I神经元的放电频率却显著下降, 由 $1.20\pm0.20$  Hz降至 $0.61\pm0.10$  Hz ( $P<0.01$ )(图1)。

**2.1.2 GES对GD-E和GD-I神经元的作用** GES1、GES2和GES3使GD-E神经元兴奋率分别为55.00%, 17.64%和14.29%。GES1的作用与GES2和GES3相比有显著差异( $P=0.002$  vs GES2;  $P=0.016$  vs GES3)(图1A)。GES1作用的潜伏期为0-120 s, 持续时间为 $85.56\pm14.15$  s, GD-E神经元的平均放电频率由 $1.50\pm0.34$  Hz升高到 $2.63\pm0.83$  Hz。63.64%, 37.93%和51.85%的GD-I神经元分别被GES1、GES2和GES3所兴奋, GES1

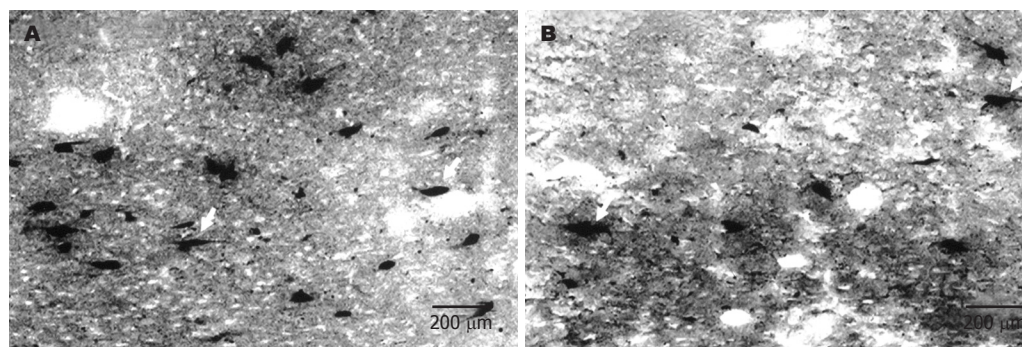


图 2 GES1刺激2 h后LHA内orexin-A免疫反应阳性神经元表达的变化. A: 假刺激组; B: 刺激组.

#### ■应用要点

我们将为新兴的治疗肥胖的方法即胃电刺激疗法提供切实可靠的可行性理论支持. 对不同刺激参数的效果的比较研究将为临床上胃电刺激治疗肥胖的参数选择提供有价值的实验依据.

表 1 GES对脑内orexin-IR含量的影响 (mean  $\pm$  SD)

| 组织  | n  | orexin-IR含量 (fmol/mg湿组织) |                                 |
|-----|----|--------------------------|---------------------------------|
|     |    | 假手术对照组                   | GES组                            |
| 下丘脑 | 10 | 185.23 $\pm$ 15.22       | 112.54 $\pm$ 11.58 <sup>b</sup> |
| 中脑  | 10 | 98.48 $\pm$ 12.02        | 71.95 $\pm$ 8.45 <sup>a</sup>   |
| 脑桥  | 10 | 66.78 $\pm$ 9.20         | 59.89 $\pm$ 5.98                |
| 延脑  | 10 | 101.29 $\pm$ 15.22       | 72.36 $\pm$ 6.58 <sup>a</sup>   |
| 孤束核 | 10 | 89.21 $\pm$ 9.23         | 69.12 $\pm$ 4.99 <sup>a</sup>   |

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 假手术对照组.

的作用与GES2的作用相比差别有显著意义( $P = 0.043$ )(图1B). GES1对GD-I神经元作用的潜伏期为0-190 s, 持续时间为119.26  $\pm$  14.70 s, GD-I神经元的平均放电频率由1.05  $\pm$  0.25 Hz升高到1.49  $\pm$  0.30 Hz.

2.2 荧光免疫组化实验 采用荧光免疫组化染色, 镜下可见大鼠下丘脑LHA内有orexin-A-IR神经元的表达. 该神经元胞体较大, 呈梭形或多形性. 部分神经元的突起可见有orexin-A-IR的表达(图2). 经GES1刺激胃2 h后, LHA中orexin-A-IR神经元的表达与对照组相比明显减少(26.62  $\pm$  8.30/0.1 mm<sup>2</sup> vs 6.97  $\pm$  1.51/0.1 mm<sup>2</sup>,  $P < 0.01$ ).

2.3 放射免疫实验 经GES1刺激胃2 h后, 下丘脑、中脑、延脑和孤束核中orexin-IR含量与对照组相比明显减少( $P < 0.05-0.01$ )(表1), 但脑桥内orexin-IR含量与对照组相比无显著差异.

### 3 讨论

1996年, Cigaina *et al*<sup>[9]</sup>首先报道了胃电刺激可以减轻肥胖模型猪的体质量, 并使处于生长期的小猪摄食量和体质量减少. 胃电刺激同样可以抑制肥胖大鼠的摄食量从而减轻大鼠体质量<sup>[10]</sup>. 临床研究也进一步证实GES可以减轻肥胖患者的体质量<sup>[1-4]</sup>. 本实验选择的胃电刺激标准参数为40 Hz/0.3 ms/2 s-on 3 s-off/6 mA. 研究结果

显示, 该参数的胃电刺激可以兴奋大鼠饱食中枢-VMH的GD反应神经元. 为了进一步比较不同参数的胃电刺激对GD敏感性神经元的影响, 我们设置了刺激持续时间减少组(GES2)和刺激频率减慢组(GES3)作为对照, 结果显示GES2与GES3对GD敏感性神经元的兴奋作用都减弱, 其中GES2减弱的程度更为明显. 此结果提示, 在GES改变中枢GD敏感性神经元兴奋过程中, 刺激的持续时间及刺激频率均起着一定的影响, 其中持续时间的影响作用更为明显.

胃的牵张刺激可兴奋胃壁机械感受器, 兴奋通过迷走传入纤维上传至脑干的孤束核(NTS)继而上传至下丘脑及其他脑区, 如海马、杏仁核、皮层等, 引起进食后系统性的情绪、心理及植物神经系统的活动反应<sup>[11,12]</sup>. 电生理学上利用对胃扩张刺激的电应答反应, 鉴定消化道机械感受性传入信息的神经途径, 用以研究参与调控胃肠机能的中枢部位及影响其活动的神经体液因素. 有文献报道, 胃电刺激抑制动物摄食主要通过改变胃肠肌电活动而影响其动力<sup>[13,14]</sup>. 本研究进一步证实了该过程是由GD反应性神经元参与完成的. 在胃电刺激作用下, VMH的GD反应性神经元兴奋性提高, 其可将电刺激传入的信号传向更高一级的中枢-海马、杏仁核、皮层或与下丘脑食欲调节网络有关的核团——弓状核、室旁核(PVN)、下丘脑外侧区(LHA)等部位的神经元相互作用, 最终使动物产生饱感而抑制摄食. 有文献报道, 胃扩张刺激可作为一种饱信号, 通过迷走神经传入中枢, 在臂旁核(PBN)可记录到发生兴奋或抑制反应的神经元, 前者主要对胃的机械刺激敏感, 但对味觉没有反应, 而后者则多为味觉敏感性神经元<sup>[15]</sup>. 已知NTS和VMH有相互纤维联系<sup>[16,17]</sup>, 由此推测, 胃电刺激可作为一种饱信号由迷走神经介导而兴奋VMH的GD-E神经元, 继而通过与其他



# ■名词解释

胃电刺激: 将一微小的刺激电极埋于胃浆膜层, 在不同的部位给予不同参数的电刺激, 可以起到不同的作用。目前的研究表明, 刺激电极埋于胃窦小弯部且给予低频电刺激可破坏胃的正常慢波运动, 延缓胃排空速度, 抑制胃窦收缩, 从而起到抑制胃运动, 减少动物摄食量的作用。而刺激电极埋于胃大弯近贲门端且给予高频电刺激可以明显减弱胃轻瘫患者的呕吐症状。

摄食敏感的神经中枢联系而产生饱感, 减少摄食。而GD-I神经元通路的兴奋可能主要参与味觉活动的调节。

orexin由下丘脑后外侧区神经元合成, 有A、B两种亚型<sup>[18]</sup>, 其作用的受体也有两种亚型-OR1和OR2<sup>[19,20]</sup>。其中, OR1选择性的与orexin-A结合, 而OR2则与orexin-A和orexin-B均有很强的亲和力<sup>[21]</sup>。orexin-A有调节摄食和觉醒的作用, 其促进摄食的作用比orexin-B强100倍<sup>[22]</sup>。脑室内或下丘脑注射orexin, 动物可产生剂量依赖性摄食量增加<sup>[23,24]</sup>; 注射orexin抗体或其拮抗剂则可显著抑制饥饿动物的摄食量<sup>[25-27]</sup>。Mondal *et al*<sup>[28,29]</sup>用放射免疫的方法观察到orexin广泛分布于下丘脑的外侧区, VMH, 视上核(SON)、PVN和弓状核, 此外, 中脑的黑质、延髓的蓝斑核和NTS也有orexin免疫反应阳性物的分布。orexin能神经纤维及orexin特异性受体在脑干及脊髓内广泛分布, 其中投射到迷走神经复合体(DVC)的神经纤维在调控胃肠功能上起着重要的作用<sup>[22]</sup>。本研究结果显示, GES1刺激2 h后, 下丘脑、中脑、延髓及NTS内orexin-IR明显降低, 下丘脑LHA内orexin-A-IR阳性神经元表达也显著减少。由此推测, 电刺激胃窦部, 可能通过减少中枢内orexin的表达, 继而通过一定的传导通路抑制迷走神经活动而调节胃肠运动及消化腺分泌<sup>[30]</sup>, 辅助完成对摄食的抑制作用。

总之, GES可兴奋饱中枢的GD反应性神经元和减少脑内orexin的表达, 其对神经元电活动影响的强弱与GES的强度、频率和刺激持续时间有关。以上机制可能参与了GES治疗肥胖过程。我们还为临床上治疗肥胖参数的选择提供了有价值的实验依据。

## 4 参考文献

- 1 Miller KA. Implantable electrical gastric stimulation to treat morbid obesity in the human: operative technique. *Obes Surg* 2002; 12: 17S-20S
- 2 D'Argent J. Gastric electrical stimulation as therapy of morbid obesity: preliminary results from the French study. *Obes Surg* 2002; 12: 21S-25S
- 3 Yao S, Ke M, Wang Z, Xu D, Zhang Y, Chen JD. Retrograde gastric pacing reduces food intake and delays gastric emptying in humans: a potential therapy for obesity? *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1569-1575
- 4 Cigaina V. Gastric pacing as therapy for morbid obesity: preliminary results. *Obes Surg* 2002; 12: 12S-16S
- 5 Zhu H, Chen JD. Implantable gastric stimulation inhibits gastric motility via sympathetic pathway in dogs. *Obes Surg* 2005; 15: 95-100
- 6 Xu X, Zhu H, Chen JD. Pyloric electrical stimulation

- reduces food intake by inhibiting gastric motility in dogs. *Gastroenterology* 2005; 128: 43-50
- 7 Ouyang H, Xing J, Chen JD. Tachygastria induced by gastric electrical stimulation is mediated via alpha- and beta-adrenergic pathway and inhibits antral motility in dogs. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 846-853
- 8 Guan Y, Tang M, Jiang Z, Peeters TL. Excitatory effects of motilin in the hippocampus on gastric motility in rats. *Brain Res* 2003; 984: 33-41
- 9 Cigaina V V, Saggiaro A, Rigo V V, Pinato G, Ischai S. Long-term effects of gastric pacing to reduce feed intake in swine. *Obes Surg* 1996; 6: 250-253
- 10 Yin J, Chen JD. Retrograde gastric electrical stimulation reduces food intake and weight in obese rats. *Obes Res* 2005; 13: 1580-1587
- 11 Otake K, Nakamura Y. Forebrain neurons with collateral projections to both the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure and the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience* 2003; 119: 623-628
- 12 Schusdziarra V. Regulation of food intake. *Zentralbl Chir* 1996; 121: 354-357
- 13 Xu X, Brining DL, Chen JD. Effects of vasopressin and long pulse-low frequency gastric electrical stimulation on gastric emptying, gastric and intestinal myoelectrical activity and symptoms in dogs. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 236-244
- 14 Ouyang H, Yin J, Chen JD. Therapeutic potential of gastric electrical stimulation for obesity and its possible mechanisms: a preliminary canine study. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 698-705
- 15 Baird JP, Travers JB, Travers SP. Parametric analysis of gastric distension responses in the parabrachial nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: R1568-R1580
- 16 Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 137-154
- 17 Monnikes H, Ruter J, Konig M, Grote C, Kobelt P, Klapp BF, Arnold R, Wiedenmann B, Tebbe JJ. Differential induction of c-fos expression in brain nuclei by noxious and non-noxious colonic distension: role of afferent C-fibers and 5-HT3 receptors. *Brain Res* 2003; 966: 253-264
- 18 Yamamoto Y, McKinley MJ, Nakazato M, Yamashita H, Shirahata A, Ueta Y. Postnatal development of orexin-A and orexin-B like immunoreactivities in the Eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*) hypothalamus. *Neurosci Lett* 2006; 392: 124-128
- 19 Soffin EM, Gill CH, Brough SJ, Jerman JC, Davies CH. Pharmacological characterisation of the orexin receptor subtype mediating postsynaptic excitation in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* 2004; 46: 1168-1176
- 20 Ammoun S, Holmqvist T, Shariatmadari R, Oonk HB, Detheux M, Parmentier M, Akerman KE, Kukkonen JP. Distinct recognition of OX1 and OX2 receptors by orexin peptides. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 507-514
- 21 Ziolkowska A, Spinazzi R, Albertin G, Nowak M, Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG. Orexins stimulate glucocorticoid secretion from cultured rat and human adrenocortical cells, exclusively acting via the OX1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 96: 423-429



- 22 Janas-Kozik M, Krupka-Matuszczyk I. The role of orexines in appetite regulation. *Psychiatr Pol* 2004; 38: 95-104
- 23 Thorpe AJ, Teske JA, Kotz CM. Orexin A-induced feeding is augmented by caloric challenge. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R367-R372
- 24 Asakawa A, Inui A, Inui T, Katsuura G, Fujino MA, Kasuga M. Orexin reverses cholecystokinin-induced reduction in feeding. *Diabetes Obes Metab* 2002; 4: 399-401
- 25 Yamada H, Okumura T, Motomura W, Kobayashi Y, Kohgo Y. Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 527-531
- 26 Ishii Y, Blundell JE, Halford JC, Upton N, Porter R, Johns A, Jeffrey P, Summerfield S, Rodgers RJ. Anorexia and weight loss in male rats 24 h following single dose treatment with orexin-1 receptor antagonist SB-334867. *Behav Brain Res* 2005; 157: 331-341
- 27 Ishii Y, Blundell JE, Halford JC, Upton N, Porter R, Johns A, Rodgers RJ. Differential effects of the selective orexin-1 receptor antagonist SB-334867 and lithium chloride on the behavioural satiety sequence in rats. *Physiol Behav* 2004; 81: 129-140
- 28 Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Hanada R, Sakata T, Matsukura S. Characterization of orexin-A and orexin-B in the microdissected rat brain nuclei and their contents in two obese rat models. *Neurosci Lett* 1999; 273: 45-48
- 29 Amiot C, Brischoux F, Colard C, La Roche A, Fellmann D, Risold PY. Hypocretin/orexin-containing neurons are produced in one sharp peak in the developing ventral diencephalon. *Eur J Neurosci* 2005; 22: 531-534
- 30 Takahashi N, Okumura T, Yamada H, Kohgo Y. Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 623-627

## ■同行评价

本文明确指出了研究的背景目的和材料方法, 其实验结果与结论相符, 讨论行文条理分明, 文献引用恰当, 具有科学性和一定可读性。

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

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

## ●消息●

## 消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛征文通知

本刊讯 《中华胃肠外科杂志》与浙江省人民医院定于2006-04-21/25在杭州共同举办“消化道肿瘤外科治疗专题”高级论坛, 主要探讨消化道肿瘤手术治疗的有关问题, 包括不同术式的选择及手术的规范化问题、腹腔镜下进行各种手术的选择及相关问题。为活跃学术论坛, 促进消化道肿瘤外科治疗的发展, 特向广大普外科工作者征稿。

论坛的具体内容包括: (1)肝移植手术适应证及相关问题(黄洁夫主讲); (2)肝胆系统肿瘤手术的选择(郑树森主讲); (3)消化系统肿瘤的综合治疗(樊代明主讲); (4)胰腺肿瘤外科治疗进展(赵玉沛主讲); (5)胃癌的根治性手术(詹文华主讲); (6)腹腔镜下的胃癌根治术(余佩武主讲); (7)胃癌腹膜转移的外科治疗(朱正纲主讲); (8)低位直肠癌的保肛手术(汪建平主讲); (9)腹腔镜下的结直肠癌手术(郑民华主讲); (10)规范的TME手术及相关问题(顾晋主讲); (11)胃癌外科治疗的新进展(叶再元主讲)。(世界胃肠病学杂志社 2006-02-08)

# 幽门螺杆菌阳性消化性溃疡患者胃黏膜核因子 $\kappa$ B、 $\beta$ -防御素-2 表达及其与胃窦炎症的关系

凌江红, 李家邦, 聂海明, 蒋荣鑫, 申定珠, 韦宗平

## ■背景资料

*H. pylori*感染引起胃黏膜局部的炎症反应是导致消化性溃疡发生、难以愈合和容易复发的主要原因。NF- $\kappa$ B是一种重要的多功能核转录因子, 参与许多基因特别是炎症反应相关基因的表达及调控, HBD-2是第一种在炎症刺激下合成的人类抗菌多肽。HBD-2基因启动子区域存在数个NF- $\kappa$ B的结合位点, 细胞中NF- $\kappa$ B的激活可诱导HBD-2基因转录增强, NF- $\kappa$ B对HBD-2的调控表达在*H. pylori*相关性消化性溃疡的胃黏膜炎症反应中的作用和意义尚不清楚, 国内外未见相关报道。

凌江红, 李家邦, 蒋荣鑫, 申定珠, 中南大学湘雅医院中西医结合研究所 湖南省长沙市 410008

聂海明, 韦宗平, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西省南宁市 530021

凌江红, 女, 1969-05-17生, 广西省合山市人, 汉族, 中南大学湘雅医院博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事内科消化系统疾病的中西医结合诊断与治疗。

湖南省科技计划重点项目, No. 02SSY1005-4

通讯作者: 李家邦, 410008, 湖南省长沙市湘雅路141号, 中南大学湘雅医院中西医结合研究所。ljh001006@sina.com

电话: 0731-4327227

收稿日期: 2005-11-15 接受日期: 2005-12-24

## Expression of nuclear factor- $\kappa$ B and $\beta$ -defensin-2 in patients with *Helicobacter pylori*-positive peptic ulcer and their relations with antral gastritis

Jiang-Hong Ling, Jia-Bang Li, Hai-Ming Nie, Rong-Xin Jiang, Ding-Zhu Shen, Zong-Ping Wei

Jiang-Hong Ling, Jia-Bang Li, Rong-Xin Jiang, Ding-Zhu Shen, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Hai-Ming Nie, Zong-Ping Wei, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China

Supported by the Fund from the Key Science and Technology Plan of Hunan Province, No. 02SSY1005-4

Correspondence to: Dr. Jia-Bang Li, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, 141 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. ljh001006@sina.com

Received: 2005-11-15 Accepted: 2005-12-24

## Abstract

**AIM:** To investigate the roles of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), human  $\beta$ -defensin-2 (HBD-2) and antral gastritis in *H. pylori*-positive peptic ulcer (PU).

**METHODS:** Patients with *H. pylori*-positive ( $n = 40$ ) or *H. pylori*-negative ( $n = 17$ ) PU were included in this study. Eight individual were selected as normal controls. Antral histopathology was observed in the patients and controls.

The expression of NF- $\kappa$ Bp65 and  $\beta$ -defensin-2 were measured by immunohistochemistry, and then compared between *H. pylori*-positive and negative patients and normal group as well as between patients with different stages of PU by One-Way ANOVA. Nonparametric statistics was used to analyze the correlations of *H. pylori* infection, NF- $\kappa$ Bp65, HBD-2 expression with the degree of antral gastritis. Meanwhile, the relationship between expression of NF- $\kappa$ Bp65 and HBD-2 was also analyzed in *H. pylori*-positive PU.

**RESULTS:** The histological severities of both active and chronic inflammation were correlated with *H. pylori* density (active:  $r = 0.374$ ,  $P < 0.01$ ; chronic:  $r = 0.333$ ,  $P < 0.05$ ). NF- $\kappa$ Bp65 was expressed mainly in the nucleus of gastric epithelial and mesenchymal cells in lamina propria while HBD-2 was expressed mainly in the cytoplasm of the surface cells of gastric mucosal epithelium. The expression of NF- $\kappa$ Bp65 and HBD-2 were significantly higher in *H. pylori*-positive patients than those in *H. pylori*-negative ones ( $6.4 \pm 3.28$  vs  $3.78 \pm 2.16$ ,  $P < 0.01$ ;  $12.96 \pm 5.03$  vs  $4.69 \pm 2.05$ ,  $P < 0.01$ ), and both expression of NF- $\kappa$ Bp65 and HBD-2 were correlated with histological severity of active and chronic inflammation (active:  $r = 0.744$ ,  $0.524$ ,  $P < 0.01$ ; chronic:  $r = 0.650$ ,  $0.606$ ,  $P < 0.01$ ). There was a positive correlation between the expression of NF- $\kappa$ Bp65 and HBD-2 ( $r = 0.438$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of NF- $\kappa$ Bp65 ( $4.28 \pm 2.11$ ,  $3.65 \pm 2.27$ ) and HBD-2 ( $8.15 \pm 4.28$ ,  $6.24 \pm 3.71$ ) in PU patients at the stage of healing and scarring were lower significantly than those ( $7.14 \pm 3.24$ ,  $13.56 \pm 5.43$ ) of PU patients at active stage ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** *H. pylori* infection leads to the over-expression of NF- $\kappa$ B and HBD-2 and enhancement of active and chronic inflammation. NF- $\kappa$ B activation may contribute to the induction of HBD-2 expression, and play an important role in the pathogenesis of *H. pylori*-positive PU.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Peptic ulcer; Nuclear factor- $\kappa$ B;  $\beta$ -defensin-2; Inflammation

Ling JH, Li JB, Nie HM, Jiang RX, Shen DZ, Wei ZP. Expression of nuclear factor-kappa B and  $\beta$ -defensin-2 in patients with *Helicobacter pylori*-positive peptic ulcer and their relations with antral gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):376-381

## 摘要

**目的:** 检测幽门螺杆菌(*H pylori*)阳性消化性溃疡(peptic ulcer, PU)患者胃窦黏膜组织学改变和炎症相关基因核因子 $\kappa$ B(Nuclear- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、人 $\beta$ -防御素-2(human  $\beta$ -defensin-2, HBD-2)蛋白表达, 探讨胃窦黏膜炎症及NF- $\kappa$ B、HBD-2在*H pylori*相关性PU中的作用及其意义。

**方法:** 57例PU患者, 其中*H pylori*感染者40例, 非*H pylori*感染者17例, 另设正常对照组8例; 观察各组患者胃窦组织学改变, 免疫组化法检测胃窦黏膜NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2的表达。观察NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2的细胞定位情况, 用One-Way ANOVA方法比较*H pylori*感染者与非*H pylori*感染者及正常组胃黏膜NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2表达量, 并对PU不同分期患者胃黏膜NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2的表达量进行比较; 非参数统计方法分析*H pylori*感染与PU患者胃窦炎症程度的关系、NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2表达与胃窦炎症程度的关系及*H pylori*阳性PU NF- $\kappa$ Bp65与HBD-2表达的相关性。

**结果:** PU患者胃窦的炎症程度与*H pylori*的感染程度呈正相关(活动性 $r = 0.374$ ,  $P < 0.01$ ; 慢性 $r = 0.333$ ,  $P < 0.05$ )。在*H pylori*阳性PU患者NF- $\kappa$ Bp65主要表达于胃黏膜上皮细胞和固有层间质细胞胞核, HBD-2主要表达于胃黏膜表层上皮细胞胞质, 二者的表达均较*H pylori*阴性组显著增强( $6.4 \pm 3.28$  vs  $3.78 \pm 2.16$ ,  $P < 0.01$ ;  $12.96 \pm 5.03$  vs  $4.69 \pm 2.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且均与胃窦黏膜炎症程度具有显著相关性(活动性 $r = 0.744$ ,  $0.524$ ,  $P < 0.01$ , 慢性 $r = 0.650$ ,  $0.606$ ,  $P < 0.01$ ); *H pylori*阳性PU胃黏膜NF- $\kappa$ Bp65表达与HBD-2表达呈正相关关系( $r = 0.438$ ,  $P < 0.01$ )。愈合期和疤痕期PU患者NF- $\kappa$ Bp65( $4.28 \pm 2.11$ ,  $3.65 \pm 2.27$ )、HBD-2( $8.15 \pm 4.28$ ,  $6.24 \pm 3.71$ )的表达较活动期者( $7.14 \pm 3.24$ ,  $13.56 \pm 5.43$ )显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** *H pylori*感染导致胃黏膜NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2表达增加, 胃黏膜炎症程度增强。NF- $\kappa$ B可能通过诱导HBD-2的表达, 参与胃窦黏膜炎症反应, 从而影响了*H pylori*相关性PU的病理生理过程。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 消化性溃疡; 核因子 $\kappa$ B;  $\beta$ -防御素-2; 炎症

凌江红, 李家邦, 聂海明, 蒋荣鑫, 申定珠, 韦宗平. 幽门螺杆菌阳性消化性溃疡患者胃黏膜核因子 $\kappa$ B、 $\beta$ -防御素-2表达及其与胃窦炎症的关系. *世界华人消化杂志* 2006;14(4):376-381  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/376.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)已被证实为消化性溃疡(PU)的主要病因, 炎症反应是其中一个重要的致病机制。核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)是一种重要的多功能核转录因子, 参与许多基因特别是炎症反应相关基因的表达及调控。人 $\beta$ -防御素-2(human  $\beta$ -defensin-2, HBD-2)是第一种在炎症刺激下合成的人类抗菌多肽。我们用免疫组化法检测*H pylori*阳性PU患者胃窦黏膜NF- $\kappa$ B、HBD-2的表达并探讨其与胃窦组织学的关系, 为进一步阐明*H pylori*相关性PU的发病机制提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择因上腹不适到广西医科大学胃镜室行胃镜检查的患者, 经尿素酶检查和胃黏膜活检两者确诊为*H pylori*阳性的胃或十二指肠溃疡40例和*H pylori*阴性的胃或十二指肠溃疡17例, 其中男34例, 女23例, 年龄21-59( $41.70 \pm 11.48$ )岁, 有消化性出血等并发症和其他系统严重合并症, 胃镜前使用过任何制酸剂和针对*H pylori*的抗菌素者不列入研究对象。另取8例无黏膜病变且*H pylori*阴性患者的胃黏膜活检标本作正常对照组。NF- $\kappa$ B/p65(Rel A)Ab-1兔多克隆抗体为美国Lab Vision公司产品。 $\beta$ -defensin-2兔多抗、链酶亲和素生物素复合体(SABC)试剂盒为武汉博士德生物工程公司产品。即用型快速免疫组化Max Vision试剂盒(主要成分辣根过氧化物酶标记的多聚羊抗兔IgG)、R-二联氨基苯胺(DAB)显色试剂盒购自福建迈新公司。

**1.2 方法** 胃镜下溃疡分期采用日本学者畸田隆夫倡导的分期法, 分为活动期、愈合期和疤痕期。在胃小弯胃窦距幽门5 cm处取活检标本6块, 1块做*H pylori*尿素酶试验, 5块40 g/L多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4  $\mu$ m厚连续切片以备HE染色、Warthin-Starry银染色及免疫组织化学检测。*H pylori*诊断采用快速尿素酶试验和Warthin-Starry银染色, 2项结果均阳性诊断为*H pylori*阳性, 2项结果均阴性诊断为*H pylori*阴性。根据中华医学会消化病学分会2000年全国慢性胃炎研

## ■ 相关报道

- 1 Isomoto H, Mizuta Y, Miyazaki M, Takeshima F, Omagari K, Murase K, Nishiyama T, Inoue K, Murata I, Kohno S. Implication of NF-kappaB in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2768-2776
- 2 Ohara T, Morishita T, Suzuki H, Masaoka T, Nagata H, Hibi T. Pathophysiological role of human beta-defensins 2 in gastric mucosa. *Int J Mol Med* 2004; 14: 1023-1027



### ■创新盘点

HBD-2作为一种炎症诱导表达的抗菌肽,其抗微生物活性倍受重视,但本文发现*H. pylori*感染后可激活NF- $\kappa$ B,后者诱导HBD-2表达参与炎症反应并引起胃和十二指肠黏膜的进一步损伤,即HBD-2可能还具有“前炎症因子”样作用。

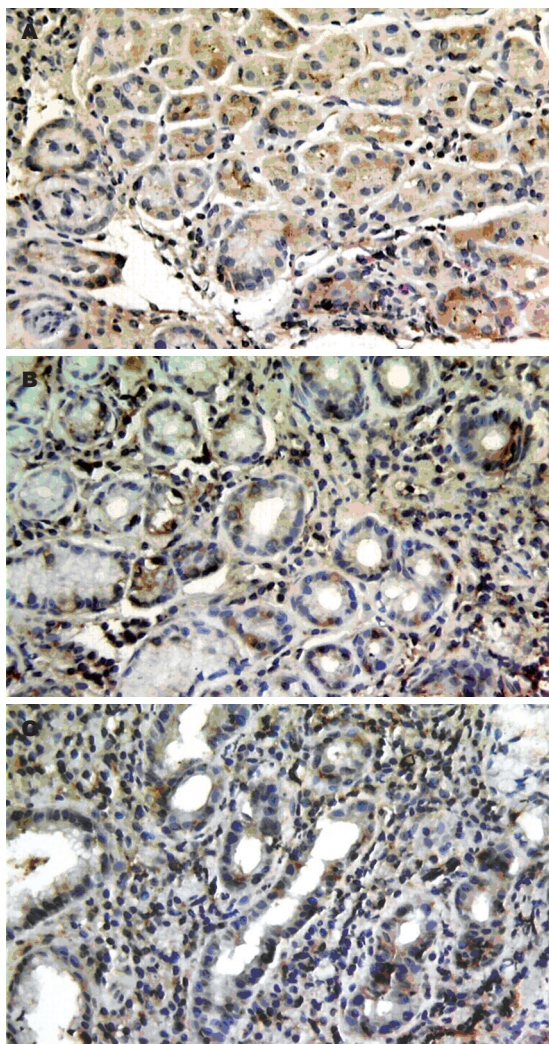


图1 胃黏膜NF- $\kappa$ Bp65表达(免疫组化 $\times 400$ )。A: 正常胃黏膜; B: *H. pylori*阴性PU胃黏膜; C: *H. pylori*阳性PU胃黏膜。

讨会共识意见中组织学分级标准将*H. pylori*、活动性、慢性炎症分成无、轻度、中度、重度四个等级。

**1.2.1 NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2蛋白的免疫组化检测** 石蜡切片置60℃的烤箱5-6 h后,主要步骤如下:切片常规脱蜡至水,30 mL/L过氧化氢-甲醇室温下孵育10 min,以阻断内源性过氧化酶的活性,高压加热方法修复抗原,滴加NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2一抗(工作浓度分别为1:100、1:150),4℃过夜,滴加即用型Max Vision试剂,室温15 min,滴加SABC,室温30 min, DAB显色,镜下控制反应时间,充分水洗,苏木素轻度复染,脱水、透明、封片。以PBS代替一抗作为阴性对照。

**1.2.2 免疫组织化学结果判断** 由于NF- $\kappa$ Bp65在激活情况下是位于核内的,故以胞核出现棕褐色颗粒为阳性表达。HBD-2以细胞质出现棕黄色染色为阳性表达。以病理图像分析仪进行图像

表1 *H. pylori*阳性PU胃黏膜NF- $\kappa$ Bp65, HBD-2的表达(mean  $\pm$  SD)

| 组别                  | <i>n</i> | NF- $\kappa$ Bp65             | HBD-2                         |
|---------------------|----------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常                  | 8        | 1.41 $\pm$ 0.53               | 1.38 $\pm$ 0.45               |
| PU                  | 57       | 5.62 $\pm$ 3.21 <sup>b</sup>  | 10.50 $\pm$ 5.78 <sup>h</sup> |
| <i>H. pylori</i> 阴性 | 17       | 3.78 $\pm$ 2.16 <sup>df</sup> | 4.69 $\pm$ 2.05 <sup>ij</sup> |
| <i>H. pylori</i> 阳性 | 40       | 6.40 $\pm$ 3.28               | 12.96 $\pm$ 5.03              |
| 轻度                  | 13       | 4.69 $\pm$ 1.91               | 11.20 $\pm$ 2.81              |
| 中度                  | 19       | 6.90 $\pm$ 3.53               | 12.64 $\pm$ 5.50              |
| 重度                  | 8        | 7.97 $\pm$ 3.57               | 16.58 $\pm$ 5.30              |

<sup>b</sup>*P* = 0.000, *t* = 9.073 vs 正常组; 正常组、*H. pylori*阴性、*H. pylori*阳性PU三组间NF- $\kappa$ Bp65比较*P* = 0.000, *F* = 12.882, 其中<sup>d</sup>*P* = 0.003 vs *H. pylori*阳性, <sup>f</sup>*P* = 0.001 vs 正常组; *H. pylori*阳性轻、中、重度三组间NF- $\kappa$ Bp65比较*P* = 0.05, *F* = 3.245. <sup>h</sup>*P* = 0.000, *t* = 11.659 vs 正常组; 正常组、*H. pylori*阴性、*H. pylori*阳性PU三组间HBD-2比较*P* = 0.000, *F* = 41.151, 其中<sup>i</sup>*P* = 0.000 vs *H. pylori*阳性, <sup>j</sup>*P* = 0.000 vs 正常组; *H. pylori*阳性轻、中、重度三组间HBD-2比较*F* = 3.243, *P* = 0.05.

分析,测量阳性反应的细胞密度(即阳性反应细胞面积/测量框面积),所测数据以mean  $\pm$  SD表示。

**统计学处理** 采用SPSS 13.0统计软件对数据进行处理,两组间比较采用*t*检验;多组间比较用One-Way ANOVA进行分析,方差齐采用LSD方法,方差不齐采用Tamhane's T2. 相关分析采用非参数统计方法,计算Spearman相关系数。

## 2 结果

**2.1 NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2的细胞定位** NF- $\kappa$ Bp65主要表达于胃黏膜腺上皮细胞和固有层炎性细胞。正常胃黏膜中NF- $\kappa$ Bp65染色主要在胃黏膜腺上皮细胞胞质, *H. pylori*阴性胃黏膜NF- $\kappa$ Bp65胞核胞质表达并存,而*H. pylori*感染者胃黏膜中则以胞核着色为主,尤以固有层间质细胞为著(图1)。HBD-2蛋白在正常胃黏膜无表达,在*H. pylori*阴性胃黏膜上皮细胞胞质中有少量表达,而*H. pylori*感染胃黏膜中HBD-2蛋白表达明显增多,主要位于胃黏膜表层上皮细胞胞质(图2)。

**2.2 *H. pylori*阳性PU胃黏膜NF- $\kappa$ Bp65, HBD-2的表达(表1)** PU患者NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2的表达较正常组相比均显著增高(*P* < 0.01),其中*H. pylori*阳性患者与*H. pylori*阴性患者及正常组比较, NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2的表达均显著增高(*P* < 0.01)、*H. pylori*阴性患者NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2的表达亦较正常组显著增高(*P* < 0.01)。在不同*H. pylori*密度之间比较, NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2表达随*H. pylori*密度增高,但差别无显著性。



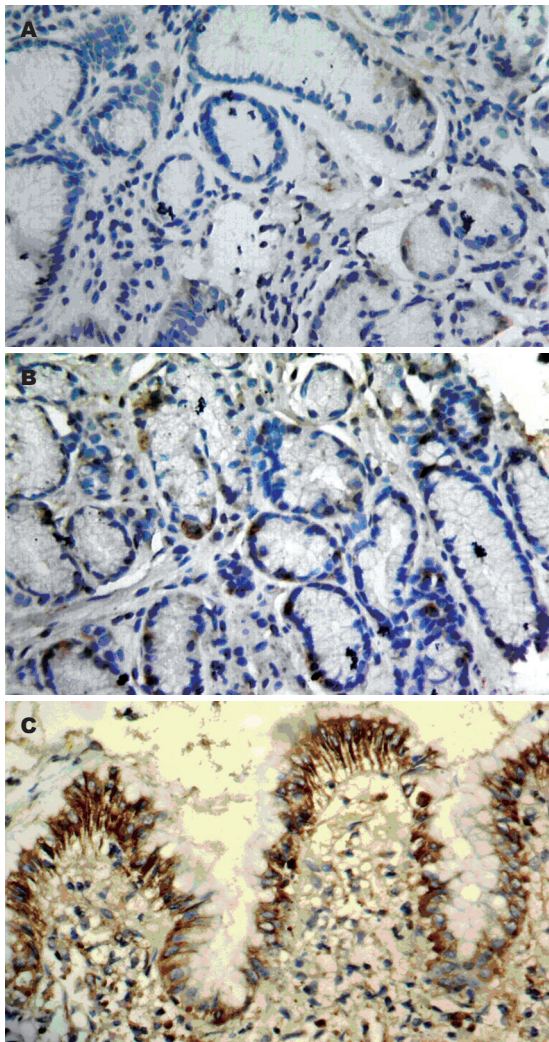


图2 胃黏膜HBD-2表达(免疫组化 $\times 400$ )。A: 正常胃黏膜; B: *H. pylori*阴性PU胃黏膜; C: *H. pylori*阳性PU胃黏膜。

2.3 PU不同分期患者胃黏膜NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2的表达(表2) 活动期较愈合期和疤痕期相比, NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2的表达显著增加( $P < 0.01$ )。

2.4 *H. pylori*感染与PU患者胃窦炎症程度的关系 Spearman等级相关分析显示PU患者胃窦活动性和慢性炎症程度均与*H. pylori*的感染程度呈正相关(分别 $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ , 表3)。

2.5 NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2表达与胃窦炎症程度的关系 Spearman等级相关分析显示, NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2的表达均与胃窦慢性炎症程度相关( $r = 0.650$ ,  $P = 0.000$ ;  $r = 0.606$ ,  $P = 0.000$ ); 与活动性炎症程度相关( $r = 0.744$ ,  $P = 0.000$ ;  $r = 0.524$ ,  $P = 0.000$ )。

2.6 *H. pylori*阳性PU NF- $\kappa$ Bp65与HBD-2表达的相关性 经Spearman等级相关分析发现, *H. pylori*阳性PU患者胃窦黏膜NF- $\kappa$ Bp65表达与HBD-2表达呈正相关( $r = 0.438$ ,  $P = 0.000$ )。

表2 PU不同分期患者胃黏膜NF- $\kappa$ Bp65、HBD-2的表达(mean  $\pm$  SD)

| 组别  | <i>n</i> | NF- $\kappa$ Bp65            | HBD-2                        |
|-----|----------|------------------------------|------------------------------|
| 活动期 | 30       | 7.14 $\pm$ 3.24              | 13.56 $\pm$ 5.43             |
| 愈合期 | 12       | 4.28 $\pm$ 2.11 <sup>b</sup> | 8.15 $\pm$ 4.28 <sup>f</sup> |
| 疤痕期 | 15       | 3.65 $\pm$ 2.27 <sup>d</sup> | 6.24 $\pm$ 3.71 <sup>h</sup> |

三组NF- $\kappa$ Bp65比较 $P = 0.000$ ,  $F = 9.475$ , 其中<sup>b</sup> $P = 0.006$ , <sup>d</sup> $P = 0.000$  vs 活动期。三组HBD-2比较 $P = 0.000$ ,  $F = 13.377$ , 其中<sup>f</sup> $P = 0.006$ , <sup>h</sup> $P = 0.000$  vs 活动期。

表3 57例PU *H. pylori*感染程度与胃窦炎症程度的分布(*n*)

| <i>H. pylori</i> | <i>n</i> | 活动性 |   |    |   | 慢性 |   |    |   |
|------------------|----------|-----|---|----|---|----|---|----|---|
|                  |          | 0   | 1 | 2  | 3 | 0  | 1 | 2  | 3 |
| 无                | 17       | 7   | 5 | 3  | 2 | 0  | 8 | 9  | 0 |
| 轻度               | 13       | 5   | 3 | 3  | 2 | 0  | 4 | 7  | 2 |
| 中度               | 19       | 2   | 3 | 10 | 4 | 0  | 4 | 11 | 4 |
| 重度               | 8        | 1   | 1 | 3  | 3 | 0  | 1 | 5  | 2 |

活动性 $r = 0.374$ ,  $P = 0.004$ ; 慢性 $r = 0.333$ ,  $P = 0.011$ 。

### 3 讨论

NF- $\kappa$ B是一种作用广泛的转录因子, 在未受刺激的细胞中, 以非活性状态存在于胞质。我们发现较正常组和*H. pylori*阴性PU相比, *H. pylori*阳性PU胃黏膜NF- $\kappa$ B以胞核着色为主, 其表达量明显增多, 提示*H. pylori*感染诱导和激活胃黏膜NF- $\kappa$ B, 使其移入胞核, 发挥转录调节功能。文献[1-6]支持此观点。我们研究还发现NF- $\kappa$ B核表达量有随*H. pylori*密度增高的趋势, 但重度与中度比较差别并无统计学意义, 可能与样本例数不足有关, 亦可能与*H. pylori*毒力有关, 有报道含cag致病岛的*H. pylori*更具激活NF- $\kappa$ B的能力<sup>[7-9]</sup>。

在感染、炎症反应中, NF- $\kappa$ B激活可进一步调控前炎症介质[如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 白介素-1、6(IL-1、IL-6)]、黏附分子、趋化因子(如单核细胞趋化蛋白-1和IL-8)和一些炎性相关酶类使之过度或持续表达, 致大量的炎性细胞积聚浸润于炎症部位, 而NF- $\kappa$ B调节的产物, 如TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 又能激活NF- $\kappa$ B<sup>[10-12]</sup>。这意味着存在一个放大且延续炎症反应的复杂的调节环路, NF- $\kappa$ B是其中一个中心环节。本研究显示, *H. pylori*感染与PU患者胃窦活动性和慢性炎症程度相关; NF- $\kappa$ B的表达与PU患者胃窦活动性和慢性炎症程度均呈正相关, PU愈合后NF- $\kappa$ B表达明显减低, 可能与胃黏膜炎症随溃疡愈合减

### ■名词解释

抗菌肽: 天然免疫的重要介质, 是机体在进化过程中为适应环境、求得生存而最早产生的免疫活性分子, 是炎症反应起保护作用的重要分子基础。他是由单基因编码的、植物和动物(包括人类)细胞产生的小分子肽类物质, 具有广谱抗微生物活性。

防御素(defensins): 在哺乳动物中性粒细胞和上皮细胞中发现的一组富含半胱氨酸阳离子的小分子抗菌多肽, 分子量为3.5-4 ku, 含29-34个氨基酸, 具有广泛的抗微生物活性, 可激活参与天然免疫和获得性免疫的宿主细胞, 诱导参与炎症预激的细胞因子。防御素是一个主要抗菌肽家族, 根据一级结构和二硫键形成次序的不同可分为 $\alpha$ 和 $\beta$ 两个亚家族。

### ■同行评价

研究NF- $\kappa$ B和HBD-2可以增加对*H pylori*致病因素的了解,对研究*H pylori*的致病机制有较大意义.本文研究立题有依据,选择病例可靠,幽门螺杆菌诊断规范,试剂和试验方法标准,统计学,结果可信,免疫组化胃黏膜组织图谱清晰优质,讨论切题,条理性较强.不足之处是所研究的NF- $\kappa$ Bp65与HBD-2主要是与胃窦黏膜的慢性炎症的关系,而与消化性溃疡关系不很确切.

轻有关,提示*H pylori*感染激活NF- $\kappa$ B后诱导的胃窦黏膜的炎症反应与PU的发生密切相关.

HBD-2是一种在炎症刺激下合成的人类抗菌多肽.有研究发现细胞毒*H pylori*和IL-1 $\beta$ 能显著上调AGS、MKN7细胞系HBD-2表达,且其作用呈时间、剂量依赖性<sup>[13,14]</sup>.正常胃窦活检组织不能检出HBD-2表达,但*H pylori*阳性胃炎、胃十二指肠溃疡患者HBD-2显著增加<sup>[15-20]</sup>.我们的研究表明,*H pylori*感染使HBD-2的表达明显增强并与胃黏膜炎症的活动性和慢性炎症程度显著相关.HBD-2基因启动子区域存在数个NF- $\kappa$ B的结合位点,细胞中NF- $\kappa$ B的激活可诱导HBD-2的基因转录增强<sup>[21-24]</sup>.我们的研究显示,*H pylori*阳性PU NF- $\kappa$ Bp65与HBD-2表达呈正相关,推测NF- $\kappa$ B可能通过HBD-2基因的转录参与*H pylori*阳性PU的发生,HBD-2在*H pylori*相关性PU中的表达与*H pylori*感染后以NF- $\kappa$ B为中心的炎症反应诱导有关.体外实验发现HBD-2在浓度为 $10^{-7}$  mol/L(0.3 mg/L)时可抑制50% *H pylori*生长,而 $10^{-5}$  mol/L(30 mg/L)则可完全抑制*H pylori*生长<sup>[15]</sup>.提示HBD-2的诱导表达可能对*H pylori*相关性PU具有保护作用,HBD-2表达缺失可能会加重*H pylori*相关性胃窦黏膜炎症反应,导致组织损伤.但同时也应认识到HBD-2在发挥清除*H pylori*的有利作用的同时,可能也引起了胃和十二指肠黏膜的进一步损伤<sup>[19,25]</sup>,因而其意义有待进一步研究.

### 4 参考文献

- 1 Isomoto H, Miyazaki M, Mizuta Y, Takeshima F, Murase K, Inoue K, Yamasaki K, Murata I, Koji T, Kohno S. Expression of nuclear factor-kappaB in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa detected with southwestern histochemistry. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 247-254
- 2 Chu SH, Kim H, Seo JY, Lim JW, Mukaida N, Kim KH. Role of NF-kappaB and AP-1 on *Helicobacter pylori*-induced IL-8 expression in AGS cells. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 257-265
- 3 Kim JM, Kim JS, Jung HC, Oh YK, Chung HY, Lee CH, Song IS. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappaB signaling pathway to induce iNOS and protect human gastric epithelial cells from apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G1171-G1180
- 4 Isomoto H, Mizuta Y, Miyazaki M, Takeshima F, Omagari K, Murase K, Nishiyama T, Inoue K, Murata I, Kohno S. Implication of NF-kappaB in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2768-2776
- 5 Seo JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. *Helicobacter pylori* in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases, AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *Lab Invest* 2004; 84: 49-62
- 6 Nozaki K, Tanaka H, Ikehara Y, Cao X, Nakanishi H, Azuma T, Yamazaki S, Yamaoka Y, Shimizu N, Mafune K, Kaminishi M, Tatematsu M. *Helicobacter pylori*-dependent NF-kappa B activation in newly established Mongolian gerbil gastric cancer cell lines. *Cancer Sci* 2005; 96: 170-175
- 7 Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Sheu BS, Muta T, Inoue H, Chen CC. Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 1465-1477
- 8 Yang GF, Deng CS, Xiong YY, Gong LL, Wang BC, Luo J. Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: association with *Helicobacter pylori* cagA (+) infection. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 491-496
- 9 Brandt S, Kwok T, Hartig R, Konig W, Backert S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9300-9305
- 10 Tergaonkar V, Bottero V, Ikawa M, Li Q, Verma IM. IkappaB kinase-independent IkappaBalpha degradation pathway: functional NF-kappaB activity and implications for cancer therapy. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 8070-8083
- 11 Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C451-C462
- 12 Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11
- 13 Bajaj-Elliott M, Fedeli P, Smith GV, Domizio P, Maher L, Ali RS, Quinn AG, Farthing MJ. Modulation of host antimicrobial peptide (beta-defensins 1 and 2) expression during gastritis. *Gut* 2002; 51: 356-361
- 14 O'Neil DA, Cole SP, Martin-Porter E, Housley MP, Liu L, Ganz T, Kagnoff MF. Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin-1. *Infect Immun* 2000; 68: 5412-5415
- 15 Hamanaka Y, Nakashima M, Wada A, Ito M, Kurazono H, Hojo H, Nakahara Y, Kohno S, Hirayama T, Sekine I. Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in *Helicobacter pylori* induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001; 49: 481-487
- 16 Wehkamp J, Schmidt K, Herrlinger KR, Baxmann S, Behling S, Wohlschlaeger C, Feller AC, Stange EF, Fellermann K. Defensin pattern in chronic gastritis: HBD-2 is differentially expressed with respect to *Helicobacter pylori* status. *J Clin Pathol* 2003; 56: 352-357
- 17 Uehara N, Yagihashi A, Kondoh K, Tsuji N, Fujita T, Hamada H, Watanabe N. Human beta-defensin-2 induction in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosal tissues: antimicrobial effect of overexpression. *J Med Microbiol* 2003; 52: 41-45
- 18 Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, Nishi Y, Wen CY, Wada A, Ohnita K, Hirayama T, Nakazato M, Kohno S. High concentrations of human beta-defensin 2 in gastric juice of patients with *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2005; 11:



- 4782-4787
- 19 Ohara T, Morishita T, Suzuki H, Masaoka T, Nishizawa T, Hibi T. Investigation of the possibility of human-beta defensin 2 (hBD2) as a molecular marker of gastric mucosal inflammation. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1320-1324
- 20 Taha AS, Faccenda E, Angerson WJ, Balsitis M, Kelly RW. Gastric epithelial anti-microbial peptides-histological correlation and influence of anatomical site and peptic ulcer disease. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 51-56
- 21 Wada A, Ogushi K, Kimura T, Hojo H, Mori N, Suzuki S, Kumatori A, Se M, Nakahara Y, Nakamura M, Moss J, Hirayama T. *Helicobacter pylori*-mediated transcriptional regulation of the human beta-defensin 2 gene requires NF-kappaB. *Cell Microbiol* 2001; 3: 115-123
- 22 Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schroder JM, Harder J. *Pseudomonas aeruginosa*- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 121-127
- 23 Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schroder JM, Stange EF. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 2004; 72: 5750-5758
- 24 Tsutsumi-Ishii Y, Nagaoka I. NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 154-162
- 25 Ohara T, Morishita T, Suzuki H, Masaoka T, Nagata H, Hibi T. Pathophysiological role of human beta-defensins 2 in gastric mucosa. *Int J Mol Med* 2004; 14: 1023-1027

电编 张敏 编辑 张海宁

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

## • 消息 •

### 技法与经验

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

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

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

2 结果

3 讨论 3.1 并发症; 3.2 优点和缺点; 3.3 经验与技巧

4 参考文献

## 转染试剂及幽门螺杆菌对 AGS 细胞形态的影响

邹清华, 曾浚, 孟凡亮, 何利华, 张建中

### ■背景资料

幽门螺杆菌感染与胃炎和胃癌的发生密切相关, CagA蛋白在其致病过程中起重要作用。CagA+的菌株能引起AGS细胞发生蜂鸟状改变。研究CagA引起蜂鸟状改变的机制时经常通过转染试剂将表达CagA的载体转染入AGS细胞, 但不同的转染试剂本身是否会对AGS细胞产生影响, 转染时选择什么类型的转染试剂不会对实验产生影响, 目前尚没有相关研究。

邹清华, 曾浚, 孟凡亮, 何利华, 张建中, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 北京市 102206

邹清华, 女, 1975-11生, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所读博士生, 主要从事幽门螺杆菌与宿主细胞的相互作用的研究。

国家自然科学基金资助项目, No.39870032

通讯作者: 张建中, 102206, 北京昌平流字5号, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所. zhangjianzhong@icdc.cn

电话: 010-61739439

收稿日期: 2005-11-30 接受日期: 2005-12-24

### Effects of transfection reagents and *Helicobacter pylori* on morphology of AGS cells

Qing-Hua Zou, Xun Zeng, Fan-Liang Meng, Li-Hua He, Jian-Zhong Zhang

Qing-Hua Zou, Xun Zeng, Fan-Liang Meng, Li-Hua He, Jian-Zhong Zhang, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.39870032

correspondence to: Professor Jian-Zhong Zhang, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, P.O.Box 5, Changping, Beijing 102206, China. zhangjianzhong@icdc.cn

Received: 2005-11-30 Accepted: 2005-12-24

### Abstract

**AIM:** To investigate the effects of different transfection reagents on the morphology of AGS cells and to explore whether these reagents can induce humming bird type of AGS cells as *Helicobacter pylori* does.

**METHODS:** AGS cells were transfected with polycation transfection reagents (polyethylenimine, Sofast Cell Transfection reagent) and the new generation of lipid transfection reagents (Effectene Transfection Reagent). Then morphological changes of the cells were observed. Meanwhile, AGS cells were infected with *H. pylori* 26695, and then the morphology of the cells was compared with that of the cells transfected with transfection reagents.

**RESULTS:** *H. pylori* 26695 induced humming bird type of AGS cells 4 h after infection. Both polycation transfection reagents also induced humming bird type of AGS cells, and the cells were elongated in shape, which was similar to that induced by *H. pylori* 26695. The humming bird type always appeared whether the cells were transfected with DNA or without DNA at 4 h. The morphological changes were positively related with the dosages of the reagents. The apoptosis of the cells were observed when 10  $\mu$ L reagents were used, and it became severe as the dosage reached 15  $\mu$ L. The new generation of lipid transfection reagents had no effect on the morphology of AGS cells.

**CONCLUSION:** Polycation transfection reagents should not be used in the research of AGS cell morphology. Further study should be performed to find out whether there are some common pathways between the morphology variation induced by *H. pylori* and polycation transfection reagents.

**Key Words:** Transfection reagents; *Helicobacter pylori*; AGS cell morphology

Zou QH, Zeng X, Meng FL, He LH, Zhang JZ. Effects of transfection reagents and *Helicobacter pylori* on morphology of AGS cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14(4): 382-386

### 摘要

**目的:** 探讨不同的转染试剂对AGS细胞形态的影响, 观察这些转染试剂能否像幽门螺杆菌那样引起AGS细胞蜂鸟状改变。

**方法:** 用多聚阳离子转染试剂(多聚乙酰亚胺、梭华-Sofast)和改良的脂类转染试剂(Effectene Transfection Reagent)分别转染AGS细胞, 观察细胞形态的变化。用幽门螺杆菌26695菌株攻击AGS细胞, 观察细胞形态的变化并与经转染试剂作用的细胞进行形态比较。

**结果:** 幽门螺杆菌攻击后4 h能引起AGS细胞发生蜂鸟状改变。两种多聚阳离子转染试剂也均能引起AGS细胞发生蜂鸟状改变, 与幽门

表1 PEI转染时各管所加的成分

| Eppendorf 管编号 |                      | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  |
|---------------|----------------------|----|----|----|----|----|
| A液            | 150 mmol/L NaCl (μL) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
|               | PEI (μL)             | 1  | 5  | 10 | 15 | 5  |
| B液            | 150 mmol/L NaCl (μL) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
|               | pEGFP-N3 (μL)        | 0  | 0  | 0  | 0  | 3  |

螺杆菌引起的细胞形态改变相似, 大部分细胞拉长, 并且不受是否转染DNA的影响. 此种变化在转染4 h时便出现, 与试剂剂量的增加呈正相关. 当PEI的剂量为10 μL时, 细胞出现凋亡, 15μL时凋亡加重. 改良的脂类转染试剂对AGS细胞的形态未产生影响.

**结论:** 在研究引起AGS细胞形态改变的因素时, 不宜选择多聚阳离子转染试剂; 多聚阳离子引起的AGS细胞形态改变与幽门螺杆菌引起的AGS细胞形态改变之间是否存在关系值得进一步研究.

**关键词:** 转染试剂; 幽门螺杆菌; AGS细胞形态

邹清华, 曾浚, 孟凡亮, 何利华, 张建中. 转染试剂及幽门螺杆菌对AGS细胞形态的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(4):382-386  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/382.asp

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是慢性活动性胃炎和消化性溃疡的首要致病因子<sup>[1,2]</sup>, 并与人群胃癌和胃恶性淋巴瘤的发生密切相关<sup>[3-5]</sup>; WHO已将其列为一类致癌物. 细胞毒素相关蛋白A(cytotoxin associated protein A, CagA)是*H. pylori*的一种重要毒力因子<sup>[6-8]</sup>. 编码该蛋白的cagA基因(cytotoxin associated gene A)位于*H. pylori*的cag毒力岛3'末端, 是后者存在的重要标志. 众多实验表明含有cagA基因的*H. pylori*能引起AGS细胞发生蜂鸟状改变, 特征是细胞伸长和扩散<sup>[9-11]</sup>, 而cagA基因的缺失株却不能引起此种改变<sup>[10]</sup>. 因此CagA进入细胞后启动了哪些信号通路而导致AGS细胞发生蜂鸟状改变引起了众多学者的关注. 目前已知CagA蛋白通过幽门螺杆菌的IV型分泌系统进入到宿主细胞中<sup>[12,13]</sup>, 然后被宿主细胞的激酶c-Src酪氨酸磷酸化<sup>[14]</sup>, 磷酸化的CagA激活下游信号转导通路从而引起细胞骨架的改变, 进而引起细胞的病变<sup>[15-18]</sup>. 在研究CagA的作用机制时经常采用基因转染的方式. 可以通过各种转染方式将表达CagA的真核

载体转染入AGS细胞, 进而分析CagA在细胞内的作用方式<sup>[10,19]</sup>. 但不同的转染试剂本身是否会对AGS细胞产生影响尚没有文献报道. 目前, 最常用的转染试剂是脂质体和阳离子聚合物. 因此我们旨在研究阳离子聚合物多聚乙酸亚胺(polyethylenimine, PEI)、梭华-Sofast和改良的脂类转染试剂Effectene Transfection Reagent是否能像幽门螺杆菌那样对AGS细胞产生形态的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** *H. pylori*国际标准菌株26 695, AGS细胞(ATCC CRL1739), RPMI 1640、胰酶(Hyclone), 胎牛血清(PAA, Austria), PEI(sigma), 梭华-Sofast(北京天来医学科技有限公司), Effectene Transfection Reagent(QIAGEN), pEGFP-N3(Clontech, America)稀释成1 g/L.

### 1.2 方法

**1.2.1 *H. pylori*攻击AGS细胞** 用PBS将处于对数生长期的*H. pylori* 26695清洗3遍, 测细菌浓度. 将AGS细胞用PBS清洗1遍, 按细菌与细胞比例为100:1加入细菌, 加入适量的细胞培养液, 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>孵箱中培养4 h, 显微镜下观察细胞形态.

**1.2.2 PEI转染细胞** 将PEI (*M<sub>w</sub>* 50 000)制成10 mmol/L的溶液, 用1 mol/L的HCl调pH值至7.0, 经0.2 μm微孔滤膜除菌, 4℃保存备用. 按表1在5个Eppendorf管中加入相应的试剂.

将A液缓慢加入到B液中, 室温静置10-15 min; 用PBS清洗细胞, 加入2.2 mL无血清RPMI 1640, 将上述制备好的溶液移入6孔板细胞内, 置于50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱内4-6 h; 补加100 mL/L血清, 50 mL/L CO<sub>2</sub>孵育箱孵育直到检测.

**1.2.3 梭华-Sofast转染细胞** 2 μg pEGFP-N3质粒稀释于98 μL 150 mmol/L NaCl, 轻轻混匀. 6 μL梭华-Sofast稀释于94 μL 150 mmol/L NaCl中, 轻轻混匀. 100 μL梭华-Sofast稀释液滴加到DNA稀释液中, 一边滴加一边混匀. 室温孵育15-20 min. 200 μL梭华-Sofast/DNA复合物

## ■ 研发前沿

CagA+幽门螺杆菌能引起AGS细胞发生蜂鸟状改变, 但其机制尚不是很明确. 新一代的脂类转染试剂Effectene Transfection试剂以及多聚阳离子转染试剂因为具有较高的转染效率、对细胞毒性比较低而受到广泛应用. 但此类转染试剂是否适于在AGS细胞中转染尚没有明确报道.



### ■创新盘点

发现多聚阳离子转染试剂本身即能引起AGS细胞发生蜂鸟状改变,因此在研究引起AGS细胞发生蜂鸟状改变的因素时不宜用多聚阳离子类转染试剂.同时此类转染试剂引起AGS细胞发生蜂鸟状改变的机制是否与幽门螺杆菌引起的AGS细胞发生蜂鸟状改变的机制有共同之处值得进一步探讨.

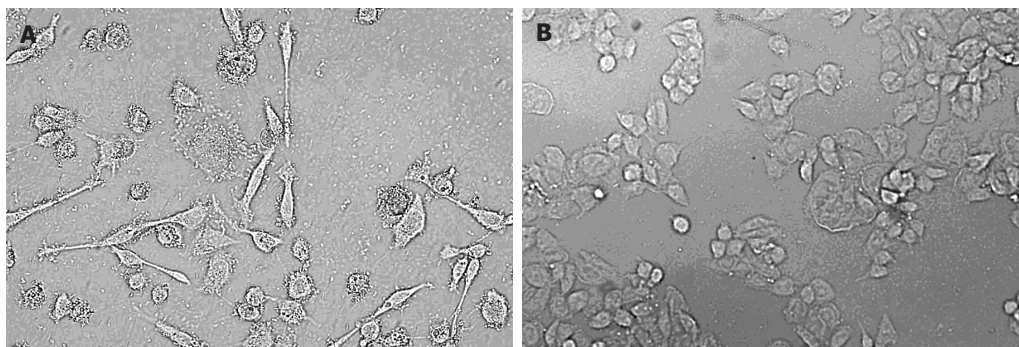


图1 AGS细胞形态学变化. A: *H. pylori* 26 695攻击AGS细胞4 h; B: 未经攻击.

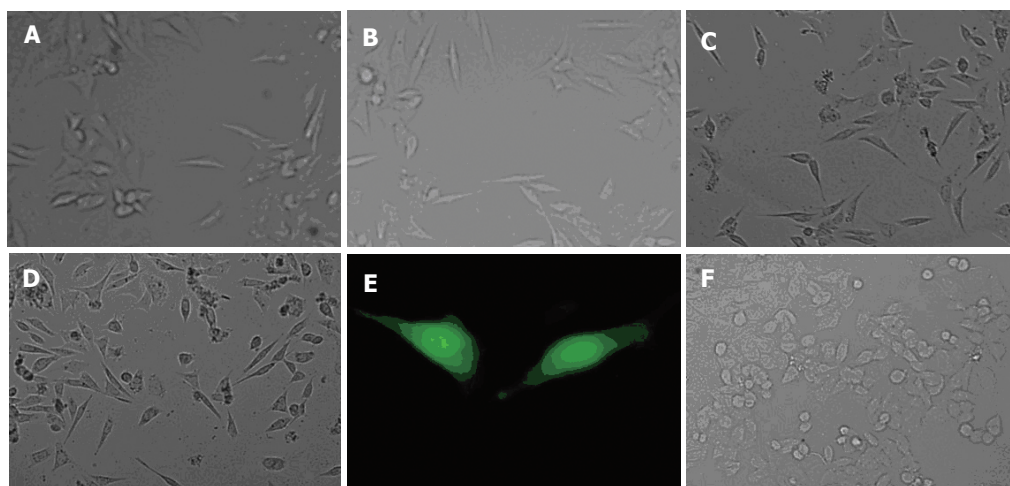


图2 不同剂量的PEI均能引起AGS细胞产生蜂鸟状改变. A: 1  $\mu$ L; B: 5  $\mu$ L; C: 10  $\mu$ L; D: PEI剂量为15  $\mu$ L; E: 转染pEGFP-N3; F: 未经PEI作用.

加到每孔中并轻轻摇动使均匀混合. 放置37 $^{\circ}$ C 50mL/L CO<sub>2</sub>孵育箱孵育24-48 h. 同时做一不加质粒的转染, 观察没有质粒时, 梭华-Sofast对AGS细胞的影响.

**1.2.4 Effectene Transfection Reagent转染细胞** 用buffer EC溶解0.4  $\mu$ g pEGFP-N3, 终体积100  $\mu$ L. 加入3.2  $\mu$ L Enhancer, 轻轻混匀. 15-25 $^{\circ}$ C放置2-5 min. 加入10  $\mu$ L Effectene Transfection Reagent, 轻轻混匀, 15-25 $^{\circ}$ C放置5-10 min. 用PBS清洗细胞, 加入1.6 mL培养液. 向转染混合物中加入0.6 mL培养液, 混匀, 迅速加入细胞中. 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub>孵育箱孵育24-48 h. 同时做一不加质粒的转染, 观察没有质粒时, Effectene Transfection Reagent对AGS细胞的影响.

## 2 结果

**2.1 *H. pylori* 26 695能引起AGS细胞发生蜂鸟状改变** 用*H. pylori* 26 695攻击AGS细胞4 h时, 可见大部分细胞拉长, 出现蜂鸟状改变(图1A), 而未经攻击的AGS细胞形态正常(图1B).

**2.2 在转染和不转染DNA时, PEI均能引起AGS**

细胞发生蜂鸟状改变. 低剂量的PEI(1  $\mu$ L)即能引起AGS细胞发生蜂鸟状改变, 此种变化在转染4 h时便出现, 与PEI剂量的增加呈正相关(图2A-D). 当PEI的剂量为10  $\mu$ L时, 细胞出现凋亡, 15  $\mu$ L时凋亡加重. 在转染质粒时, PEI仍能引起AGS细胞发生蜂鸟状改变(图2E), 而未经PEI转染的细胞形态正常(图2F).

**2.3 阳离子聚合物梭华-Sofast能引起AGS细胞发生蜂鸟状改变.** 为了验证其他的多聚阳离子转染试剂是否会对AGS细胞产生相同的影响, 我们采用了另一种多聚阳离子梭华-Sofast, 发现此试剂无论在转染质粒和不转染质粒时都能使细胞发生蜂鸟状改变, 其作用效果与PEI相似. 图3A显示的是不加质粒时单纯的梭华-Sofast转染试剂引起的蜂鸟状改变, 图3B为未经作用的细胞.

**2.4 Effectene Transfection Reagent不能引起AGS细胞产生蜂鸟状改变.** 为了观察其他类型的转染试剂对AGS细胞的影响, 我们采用了改良的脂类转染试剂Effectene Transfection Reagent, 发现此试剂无论在转染质粒和不转染质粒时均未

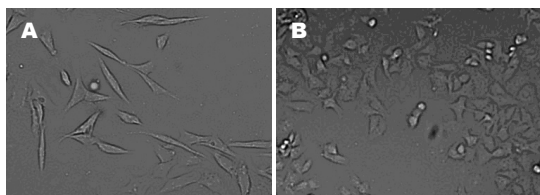


图3 梭华-Sofast转染前后AGS细胞形态学改变. A: 转染后; B: 未经转染.

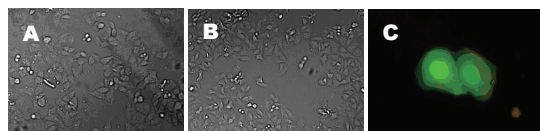


图4 Effectene Transfection Reagent对AGS细胞未产生形态影响. A: 未经作用的细胞; B: 经作用后未转染DNA; C: 转染pEGFP-N3.

引起AGS细胞产生蜂鸟状改变(图4A-C).

### 3 讨论

目前已经有许多证据表明幽门螺杆菌与胃癌的发生有着密切的关系, 而CagA蛋白在幽门螺杆菌的致病性中起着重要的作用. CagA蛋白通过幽门螺杆菌的IV型分泌系统被注入到宿主细胞中, 然后被宿主细胞的c-Src酪氨酸激酶磷酸化<sup>[20]</sup>. Backert *et al*<sup>[10]</sup>发现26 695菌株CagA蛋白中972位的酪氨酸对细胞的蜂鸟状改变起着重要的作用. Mimuro *et al*<sup>[21]</sup>的结果表明CagA与Grb2结合, 激活Ras/MEK/ERK通路, 引起细胞延长和伸展, 产生蜂鸟状改变. 而Higashi *et al*<sup>[22]</sup>的结果表明CagA能与SHP-2结合, 破坏他们之间的结合则不会引起细胞的蜂鸟状改变. 因此, CagA究竟是怎样引起AGS细胞产生蜂鸟状改变的尚有待进一步阐明. 我们发现多聚阳离子转染试剂能与幽门螺杆菌产生相似的作用, 引起AGS细胞产生蜂鸟状改变, 而改良的脂类转染试剂却不能产生这种作用. PEI是近年来发现的一种多聚阳离子化合物<sup>[23]</sup>, 其结构特点为每隔3个原子即出现氨基氮, 构成多聚网状结构, 从而与DNA结合形成颗粒状<sup>[24]</sup>, 与细胞表面的蛋白多糖结合, 通过细胞"内吞作用"进入细胞. PEI-复合体具有质子海绵的特性, 能吸收溶酶体的H<sup>+</sup>, 在复合体中形成酸性环境使核酸酶失活, 保护DNA免受核酸酶的降解<sup>[25]</sup>. 进入细胞后, PEI复合体囊泡肿胀破裂, 将DNA释放到细胞质中. 据文献报道, 1 μg DNA有3 nmoL 磷酸基团, 1 μL PEI工作液中有10 nmoL氨基氮. 通常以氨基氮和磷酸基团的比例来确定DNA和PEI的用量. 当

两者的比例从6:1到9:1, 13:1, 18:1, 20:1时转染效率仅差10倍, 其中9-13:1时最高. 到18:1时未见明显细胞毒性<sup>[22]</sup>. 我们发现低剂量的PEI即能引起AGS细胞产生蜂鸟状改变. 这种结果是否提示多聚阳离子转染试剂引起AGS细胞形态改变的信号通路与幽门螺杆菌引起AGS细胞形态改变的信号通路之间存在共同点, 值得进一步探讨.

同时, 基因转染技术在研究幽门螺杆菌在AGS细胞的致病机制研究中有着广泛的应用. 基因转染是将具生物功能的核酸转移或运送到细胞内并使核酸在细胞内维持其生物功能. 在研究幽门螺杆菌对AGS细胞的毒力因子时, 经常需要将编码此因子的基因连到表达载体上转染入AGS细胞, 观察其对AGS细胞形态的影响. 由于多聚阳离子转染试剂能对AGS细胞产生形态影响, 因此在研究引起AGS细胞形态改变的因素时应尽量避免使用此类转染试剂.

### 4 参考文献

- 1 Nduduba DA, Rotimt O, Otegbeye FM. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal disease: implications for the management of peptic ulcer disease. *Niger Postgrad Med J* 2005; 12: 289-298
- 2 Chomvarin C, Kulsunti Wong P, Mairiang P, Sangchan A, Kulabkhaw C, Chau-in S, Waropastrakul N. Detection of *H pylori* in dyspeptic patients and correlation with clinical outcomes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36: 917-922
- 3 Tokudome S, Samsuria Soeripto WD, Triningsih FX, Suzuki S, Hosono A, Triono T, Sarjadi IW, Miranti IP, Ghadimi R, Moore MA. *Helicobacter pylori* infection appears essential for stomach carcinogenesis: observations in Semarang, Indonesia. *Cancer Sci* 2005; 96: 873-875
- 4 Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-1131
- 5 Suzuki T, Matsuo K, Ito H, Hirose K, Wakai K, Saito T, Sato S, Morishima Y, Nakamura S, Ueda R, Tajima K. A past history of gastric ulcers and *Helicobacter pylori* infection increase the risk of gastric malignant lymphoma. *Carcinogenesis* 2006;
- 6 Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci* 2005; 96: 835-843
- 7 Sozzi M, Tomasini ML, Vindigni C, Zanussi S, Tedeschi R, Basaglia G, Figura N, De Paoli P. Heterogeneity of cag genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *J Lab Clin Med* 2005; 146: 262-270
- 8 Suzuki M, Mimuro H, Suzuki T, Park M, Yamamoto T, Sasakawa C. Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J Exp Med* 2005; 202: 1235-1247
- 9 Su B, Ceponis PJ, Sherman PM. Cytoskeletal rear-

### ■名词解释

蜂鸟状改变: 细胞出现的一种两端拉长的类似于蜂鸟的形态改变.

## ■同行评价

本文研究结果对转染试剂的选择上提供理论依据与指导意义,使对*H pylori*的毒力研究向前迈进一步.研究起点高,材料规范,方法先进,技术难度大,结果可靠,讨论切题,观点明确,代表*H pylori*研究领域的先进性.

- rangements in gastric epithelial cells in response to *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol* 2003; 52: 861-867
- 10 Backert S, Moese S, Selbach M, Brinkmann V, Meyer TF. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 2001; 42: 631-644
- 11 Moese S, Selbach M, Kwok T, Brinkmann V, König W, Meyer TF, Backert S. *Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways. *Infect Immun* 2004; 72: 3646-3649
- 12 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
- 13 Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, Jungblut PR, Naumann M, Meyer TF. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2000; 2: 155-164
- 14 Selbach M, Moese S, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 2002; 277: 6775-6778
- 15 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
- 16 Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, Sasakawa C. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell* 2002; 10: 745-755
- 17 Bach S, Makristathis A, Rotter M, Hirschl AM. Gene expression profiling in AGS cells stimulated with *Helicobacter pylori* isogenic strains (cagA positive or cagA negative). *Infect Immun* 2002; 70: 988-992
- 18 Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T, Higashi H, Hatakeyama M. Focal Adhesion Kinase Is a Substrate and Downstream Effector of SHP-2 Complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 261-276
- 19 Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, Murata-Kamiya N, Azuma T, Hatakeyama M. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 23130-23137
- 20 Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 2002; 43: 971-980
- 21 Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, Sasakawa C. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell* 2002; 10: 745-755
- 22 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
- 23 Demeneix B, Behr JP. Polyethylenimine (PEI). *Adv Genet* 2005; 53: 217-230
- 24 Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7297-7301
- 25 Boussif O, Zanta MA, Behr JP. Optimized galentics improve *in vitro* gene transfer with cationic molecules up to 1 000 fold. *Gene Ther* 1996; 3: 1074-1080

电编 张勇 编辑 张海宁

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

## ● 消息 ●

## 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

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

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

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



# 趋化性细胞因子MIP-1 $\alpha$ 动员DC前体细胞的体内抗胃癌效应

何宋兵, 汪良, 黄瑞, 张雁云

何宋兵, 汪良, 苏州大学附属第一医院普外科 江苏省苏州市 215006

何宋兵, 张雁云, 上海交通大学医学院上海市免疫学研究所 上海市 200025

黄瑞, 苏州大学医学院微生物学教研室 江苏省苏州市 215006  
何宋兵, 男, 1979-12-19 生, 江苏省昆山市人, 汉族, 苏州大学附属第一医院普外科, 硕士研究生, 主要从事消化道肿瘤的基础和临床研究。

通讯作者: 张雁云, 200025, 上海市重庆南路227号, 上海交通大学医学院上海市免疫学研究所. yzhang@sibs.ac.cn

电话: 021-63852705 传真: 021-63852705

收稿日期: 2005-11-30 接受日期: 2005-12-19

## Anti-gastric carcinoma efficacy of macrophage inflammation protein-1 $\alpha$ recruited dendritic cell vaccine in mice

Song-Bing He, Liang Wang, Rui Huang, Yan-Yun Zhang

Song-Bing He, Liang Wang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Song-Bing He, Yan-Yun Zhang, Shanghai Institute of Immunology, Medical College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Rui Huang, Department of Microbiology, Medical College of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Yan-Yun Zhang, Shanghai Institute of Immunology, Medical College of Shanghai Jiao Tong University, 227 South Chongqing Road, Shanghai 200025, China. yzhang@sibs.ac.cn

Received: 2005-11-30 Accepted: 2005-12-19

## Abstract

**AIM:** To study the *in vivo* anti-tumor effects of dendritic cell (DC) precursors after being recruited in the peripheral blood by injection of macrophage inflammation protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) and pulsed by the mouse forestomach carcinoma cell (MFC) lysates.

**METHODS:** B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells were sorted from the peripheral blood of C57BL/6 mice after injection of MIP-1 $\alpha$  via tail vein, and then cultured for 5-6 d in the presence of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-4 (IL-4) and mouse tumor necrosis factor (mTNF- $\alpha$ ). The phenotypes and mixed lymphocyte reaction (MLR) of these cells

were assayed. DC vaccines were prepared after B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells were loaded with MFC tumor antigen, and then were transfused in the mice bearing MFC. The tumor size and the survival of the mice were observed. The mice treated DC vaccine without loading MFC tumor antigen, soluble MFC tumor antigen and phosphate-buffered saline were used as controls.

**RESULTS:** The peripheral blood level of B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells were increased 4 h after MIP-1 $\alpha$  injection, and reached the peak at 48 h, accounting for 13.7%  $\pm$  0.8%. Freshly isolated B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells did not show the features of mature DC, while the ones cultured with mGM-CSF, IL-4, and mTNF- $\alpha$  were phenotypically identical to typical DC, gaining the capacity to stimulate the proliferation of allogenic T cells. 27 days later B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells loading MFC tumor antigen were transfused in the mice challenged with MFC cells, the tumor sizes of experimental groups were 2.7  $\pm$  0.6 and 2.8  $\pm$  0.8 cm<sup>3</sup>, while those of the controls were 23.7  $\pm$  1.7, 26.4  $\pm$  1.9 and 31.2  $\pm$  2.2 cm<sup>3</sup>. The difference between experimental groups and control groups was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Moreover, all the mice in control groups died within 25 days after the first MFC cell challenging, while the survival periods of experimental groups were much longer. After living for 35 d with tumor free and receiving the second MFC cell challenging, the mice in experimental groups were still alive at day 60. The difference between experimental groups and control groups was also statistically significant ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC precursors can rapidly accumulate in the peripheral blood after injection of MIP-1 $\alpha$  in mice. MFC cell lysates-pulsed DC vaccine can promote the anti-tumor effects of T cells *in vivo*.

**Key Words:** Dendritic cells; Macrophage inflammation protein-1 $\alpha$ ; Anti-tumor; Gastric carcinoma

He SB, Wang L, Huang R, Zhang YY. Anti-gastric carcinoma efficacy of macrophage inflammation protein-1 $\alpha$  recruited dendritic cell vaccine in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):387-391

## ■背景资料

近年来,人们对恶性肿瘤的发病、免疫识别及免疫逃避等机制的认识逐渐深入。利用抗肿瘤T细胞作为胃癌的免疫辅助治疗正在兴起。树突状细胞(DC)是功能最强的抗原递呈细胞(APC),是唯一可以激活幼稚T细胞从而启动初次免疫应答的APC。我们设想利用DC强大的抗原摄取能力,在体外获取DC,并负载胃癌细胞抗原制备疫苗,通过DC把胃癌抗原递呈给幼稚T淋巴细胞启动免疫应答,从而可以有效识别和杀灭胃癌细胞达到治疗目的。

## ■研究前沿

目前基于DC的抗肿瘤免疫治疗的研究热点和重点有:如何大量、快速、方便的获取有功能的DC,寻找更具特异性的肿瘤抗原(TSA),如何制备更有效的DC疫苗,如何制定更优化的疫苗回输方式,如何检测疫苗的免疫和临床效应等。

## 摘要

**目的:** 研究趋化性细胞因子巨噬细胞炎症蛋白-1 $\alpha$ (macrophage inflammation protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ )在外周血中快速动员树突状细胞(DC)前体细胞,并荷载小鼠前胃癌(MFC)抗原后,其体内的抗肿瘤免疫效应。

**方法:** B6小鼠尾静脉注射MIP-1 $\alpha$ ,分选出外周血B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞,以GM-CSF、IL-4及mTNF- $\alpha$ 培养5-6 d,检测其表型和混合淋巴细胞反应;B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞荷载MFC抗原后制备成DC疫苗,经皮下回输MFC荷瘤小鼠,观察小鼠瘤体生长和存活时间,检测其体内抗肿瘤效应。未荷载肿瘤抗原的MIP-1 $\alpha$ 动员的胃癌DC疫苗、MFC肿瘤可溶性抗原和PBS缓冲液作为对照。

**结果:** MIP-1 $\alpha$ 注射B6小鼠4 h后外周血中B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞即升高,48 h达到高峰,占外周血单个核细胞(MNC)13.7% $\pm$ 0.8%。新鲜分离的B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞不具有成熟DC的特征,经过细胞因子培养的B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞具有典型的DC表面标志,在混合淋巴细胞反应中具有极强的刺激T细胞增殖的能力。当荷载MFC抗原后制成的DC疫苗皮下回输MFC荷瘤小鼠后,观察至第27天,MIP-1 $\alpha$ 动员的胃癌DC疫苗和骨髓源性的胃癌DC疫苗实验组小鼠的瘤体大小分别为(2.7 $\pm$ 0.6) cm<sup>3</sup>和(2.8 $\pm$ 0.8) cm<sup>3</sup>,两者之间无显著性差异( $P>0.05$ );而对照组小鼠瘤体迅速生长,瘤体大小分别为23.7 $\pm$ 1.7 cm<sup>3</sup>、26.4 $\pm$ 1.9 cm<sup>3</sup>和31.2 $\pm$ 2.2 cm<sup>3</sup>,实验组与对照组之间有显著性差异( $P<0.05$ )。此外,对照组小鼠在荷瘤后25 d内全部死亡,而实验组小鼠的生存期则明显延长,且治疗组小鼠在无瘤存活35 d后,再次接受MFC细胞冲击,继续观察小鼠至60 d仍存活,实验组和对照组的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**结论:** 注射MIP-1 $\alpha$ 可以直接快速动员B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC前体细胞进入小鼠外周血,这些DC前体细胞荷载MFC抗原后制成的胃癌DC疫苗,可激活机体T细胞,产生明显的体内抗肿瘤效应。

**关键词:** 树突状细胞;巨噬细胞炎症蛋白-1 $\alpha$ ;抗肿瘤;胃癌

何宋兵,汪良,黄瑞,张雁云.趋化性细胞因子MIP-1 $\alpha$ 动员DC前体细胞的体内抗胃癌效应.世界华人消化杂志2006;14(4):387-391

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/387.asp>

## 0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DC)是功能最强的专职性抗原递呈细胞(antigen presentation cell, APC),也是迄今发现的唯一能激活未致敏T细胞并建立初次免疫应答的APC,在启动抗肿瘤免疫反应中起关键作用<sup>[1,2]</sup>,近年来已成为研究热点。目前,以从外周血中获取DC最适合于临床,但DC前体细胞在外周血淋巴细胞仅占1%左右<sup>[3]</sup>,无法满足需要。因此,拓展获取DC的新途径是DC生物治疗应用的关键所在。

最近我们用灭活的痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*, *P. acnes*)可动员大量B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC前体细胞进入小鼠外周血中<sup>[4]</sup>,实验证明,这一群细胞即DC前体细胞高表达CC型趋化性细胞因子受体CCR1和CCR5。通过进一步研究我们发现趋化性细胞因子巨噬细胞炎症蛋白-1 $\alpha$ (macrophage inflammation protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ )同样可以动员这群细胞进入小鼠外周血<sup>[5]</sup>。本研究中我们给小鼠注射MIP-1 $\alpha$ 后,动员B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DC前体细胞至外周血,将这些细胞分离后诱导成DC,并荷载肿瘤抗原,制备DC疫苗,以此为基础进行胃癌免疫生物学治疗的小鼠体内实验。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人重组MIP-1 $\alpha$ 为美国ATCC公司产品。鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素4(IL-4)和鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (mTNF- $\alpha$ )为美国R&D公司产品。所有的单克隆抗体(mAb)均购自美国Pharmingen公司。完全培养基为在RPMI 1640培养基中加入100 mL/L的胎牛血清,100 kU/L青霉素,100 mg/L链霉素。免疫磁珠法分离(MACS)细胞所用磁珠抗体及相关装置系Miltenyi Biotec公司产品。流式细胞仪(FACS Aria)购自美国Becton Dickinson公司。♀C57BL/6(B6)、BALB/c小鼠和615小鼠(8-10周龄)购于中科院上海实验动物中心。养殖于上海第二医科大学动物科学部。小鼠前胃癌(mouse forestomach carcinoma, MFC)细胞购于中科院上海生化细胞所。

### 1.2 方法

**1.2.1 DC的体外诱导** B6小鼠尾静脉注射20  $\mu$ g MIP-1 $\alpha$ ,48 h后心脏穿刺获取外周血。用淋巴细胞分离液分离得单个核细胞(MNC),FACS分选出B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞(纯度>99%)。将分选所得细胞( $3\times 10^8$ /L)加入含有细胞因子GM-CSF(4  $\mu$ g/L)

和IL-4(10  $\mu$ g/L)的RPMI 1640完全培养基, 接种于24孔培养板, 37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养3 d后, 加入GM-CSF和mTNF- $\alpha$ (50  $\mu$ g/L)再培养2-3 d. 骨髓DC培养参考文献[6], 取B6小鼠后肢骨, 分离得骨髓MNC. 将细胞用完全培养基重悬后置于培养皿中, 孵育2 h, 去除悬浮细胞. 将贴壁细胞重悬后按照上述条件续贯培养14-17 d.

1.2.2 DC细胞表面标志分析 FACS分析按照我室常规方法进行<sup>[7]</sup>.

1.2.3 混合淋巴细胞反应(MLR) 按我室常规方案进行<sup>[7]</sup>. 简述如下: 无菌条件下取BALB/c小鼠脾脏, 分离得MNC, MACS获取脾脏CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞, 调整细胞浓度至 $3 \times 10^8$ /L, 作为效应T细胞. 各刺激组细胞经丝裂霉素(MMC)在37 $^{\circ}$ C下处理45 min后加入至效应细胞中共培养4 d(37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>), 用MTT法检测细胞增殖.

1.2.4 DC疫苗的制备 MFC细胞用完全培养基常规传代培养, 消化、收集对数生长期的肿瘤细胞, 用PBS(含25 mL/L FCS)离心洗涤、计数. 反复冻融3次所得细胞混悬液以10 000  $g$ 离心30 min, 取上清液作为肿瘤可溶性抗原, -20 $^{\circ}$ C保存备用. 使用前37 $^{\circ}$ C水浴融化后紫外线照射30 min. 在含GM-CSF、IL-4和mTNF- $\alpha$ 的完全培养基中, MIP-1 $\alpha$ 动员的B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞经培养4 d后和骨髓细胞培养10-12 d(37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>)后, 分别加入1 g/L终浓度的胃癌抗原, 共同孵育48 h.

1.2.5 MFC荷瘤小鼠模型的建立 615小鼠腋窝皮下注射 $2 \times 10^{11}$ /L MFC细胞, 建立小鼠前胃癌模型, 观测瘤体的生长情况和小鼠的存活时间.

1.2.6 MIP-1 $\alpha$ 动员的胃癌DC疫苗治疗胃癌荷瘤小鼠 615小鼠(分成5组, 每组8只)在接种MFC细胞后7 d, 以 $1 \times 10^6$  MIP-1 $\alpha$ 动员的胃癌DC疫苗和骨髓源性胃癌DC疫苗注射于肿瘤边缘皮下, 1 wk后按上述方法再次免疫注射一次.  $1 \times 10^6$ 未荷载肿瘤抗原的MIP-1 $\alpha$ 动员的胃癌DC疫苗、500  $\mu$ L MFC肿瘤可溶性抗原和500  $\mu$ L PBS缓冲液作为对照组. 每隔3 d测量皮下肿瘤的大小, 以公式: (肿瘤短径)<sup>2</sup>  $\times$  肿瘤长径  $\times$  0.52来计算肿瘤的大小, 当小鼠瘤体有破溃时, 处死小鼠, 以死亡计数.

**统计学处理** 数据以mean  $\pm$  SD表示, 用SPSS 11.0统计软件进行 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为有统计学意义. 小鼠的生存差异用Kaplan-Meier生存曲线来评估.

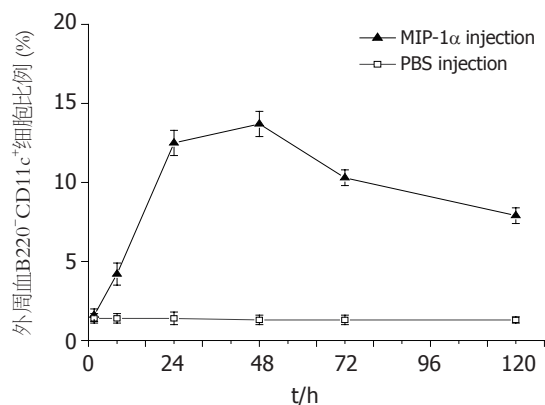


图1 注射MIP-1 $\alpha$ 后小鼠外周血B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞比例的变化.

## 2 结果

2.1 MIP-1 $\alpha$ 动员B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞进入外周血 注射MIP-1 $\alpha$ 或PBS前, B6小鼠外周血MNC中仅见少量B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞( $1.5\% \pm 0.3\%$ ), 但注射MIP-1 $\alpha$  4 h后, 实验组小鼠外周血中B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞含量即开始升高, 24 h细胞数量明显升高, 48 h达到高峰, 72 h后逐渐下降, 而注射PBS的对照组小鼠外周血中B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞的数量未发生变化(图1). 实验结果证实尾静脉注射MIP-1 $\alpha$ 可以快速动员大量B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞进入小鼠外周血循环.

2.2 MIP-1 $\alpha$ 动员的B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞可分化为成熟DC 取注射MIP-1 $\alpha$  48 h后小鼠外周血中分选出的B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞, FACS分析其细胞表面标志, 结果显示其高表达CD11b( $56.70\% \pm 1.05\%$ )分子; 中度表达CD40( $12.30\% \pm 0.47\%$ )分子; 低表达MHC II类分子( $1.71\% \pm 0.11\%$ )、DEC-205( $1.41\% \pm 0.08\%$ )、CD80( $3.10\% \pm 0.16\%$ )和CD86( $2.81\% \pm 0.13\%$ ); 不表达F4/80和CD8 $\alpha$ . 这些细胞经GM-CSF+IL-4培养3-4 d并续以GM-CSF+mTNF- $\alpha$ 再培养3-4 d后, 细胞表面标志出现明显变化, 其MHC II类分子表达明显上调( $69.76\% \pm 1.97\%$ ). 这些细胞在高表达MHC II类分子的同时也高表达DEC-205( $59.64\% \pm 1.62\%$ )、CD80( $47.69\% \pm 1.29\%$ )和CD86( $54.39\% \pm 1.57\%$ ); 中度表达CD40( $35.19\% \pm 0.61\%$ ); 仍不表达F4/80和CD8 $\alpha$ , 与骨髓来源的成熟DC具有类似的表型特征.

注射MIP-1 $\alpha$ 后48 h, 从B6鼠外周血中分离得B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞经GM-CSF、IL-4和mTNF- $\alpha$ 续贯培养5-7 d. 取这些培养的细胞和骨髓来源的DC分别作为刺激细胞, 与BABL/c鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞作混合淋巴细胞反应, 用MTT

## ■创新盘点

本文从趋化性细胞因子入手, 依据趋化性细胞因子及其受体在驱动DC迁移中的作用, 通过注射MIP-1 $\alpha$ 可快速动员DC前体细胞进入小鼠外周血, 并可进一步诱导为成熟DC, 最后通过体内实验证实, MIP-1 $\alpha$ 动员的DC前体细胞荷载肿瘤抗原后可产生明显的抗肿瘤效应.



### ■应用要点

本研究阐明了注射MIP-1 $\alpha$ 能直接快速地动员DC前体细胞进入外周血,为解决阻碍DC进入临床广泛应用的关键性问题,即获得足够数量的DC提供了一条新的思路和途径。并且MIP-1 $\alpha$ 动员的DC负载肿瘤抗原后,制备成胃癌DC疫苗,在小鼠体内可产生明显的抗肿瘤效应。进一步研究胃癌DC疫苗回输机体后的抗胃癌免疫的机制,将对DC抗胃癌免疫治疗的基础和临床应用有重要的意义。

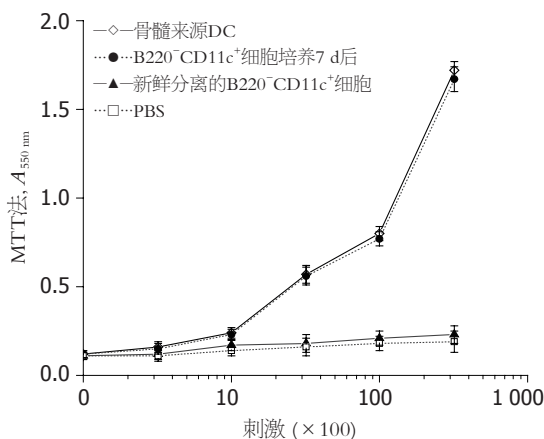


图2 MIP-1 $\alpha$ 动员的B220 $^{+}$ CD11c $^{+}$ 细胞刺激异源性淋巴细胞增殖的能力。

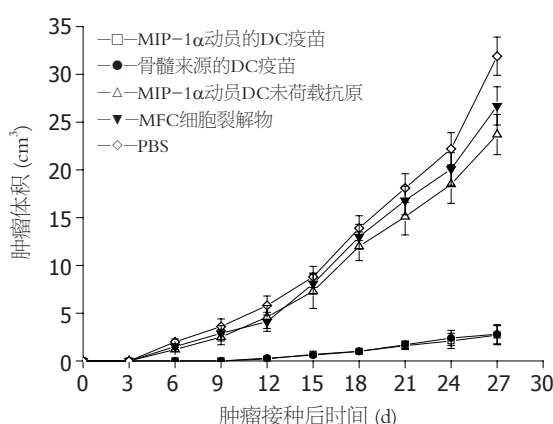


图3 MIP-1 $\alpha$ 动员的DC疫苗对MFC荷瘤小鼠的抑瘤作用。

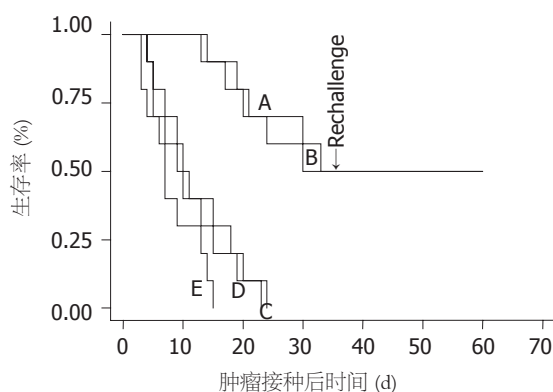


图4 MIP-1 $\alpha$ 动员的DC疫苗治疗荷瘤小鼠的生存曲线及其长期抗肿瘤作用。A: MIP-1 $\alpha$ 动员的DC疫苗; B: 骨髓来源的DC疫苗; C: MIP-1 $\alpha$ 动员DC未负载抗原; D: MFC细胞裂解物; E: PBS。

法检测他们刺激同种异源性T细胞增殖的能力。结果显示新鲜分离的B220 $^{+}$ CD11c $^{+}$ 细胞并不能刺激CD4 $^{+}$ T细胞增殖,而在经过细胞因子GM-CSF+IL-4及后续的GM-CSF+mTNF- $\alpha$ 培养后的MIP-1 $\alpha$ 动员的B220 $^{+}$ CD11c $^{+}$ 细胞则与骨髓来源的DC相当,具有很强的刺激异源性CD4 $^{+}$ T细胞

增殖的能力(图2)。实验结果表明MIP-1 $\alpha$ 动员的B220 $^{+}$ CD11c $^{+}$ 细胞可分化为成熟DC。

2.3 MIP-1 $\alpha$ 动员的胃癌DC疫苗治疗胃癌荷瘤小鼠 荷瘤小鼠接受MIP-1 $\alpha$ 动员的胃癌DC疫苗治疗后的瘤体大小见图3。MIP-1 $\alpha$ 动员的胃癌DC疫苗和骨髓源性的胃癌DC疫苗实验组的小鼠瘤体生长相当缓慢,观察至第27 d,实验组小鼠的瘤体大小分别为(2.7 $\pm$ 0.6)cm $^3$ 和(2.8 $\pm$ 0.8)cm $^3$ ,两者之间无显著性差异;而对照组小鼠瘤体迅速生长,同样观察至第27 d,瘤体大小分别为(23.7 $\pm$ 1.7)cm $^3$ 、(26.4 $\pm$ 1.9)cm $^3$ 和(31.2 $\pm$ 2.2)cm $^3$ ,实验组与对照组之间有显著性差异( $P<0.05$ )。

观察小鼠的存活情况,并记录荷瘤小鼠的生存时间见图4。结果显示对照组小鼠在荷瘤后25 d内全部死亡,而MIP-1 $\alpha$ 动员的胃癌DC疫苗和骨髓源性的胃癌DC疫苗实验组小鼠的生存期则明显延长,且治疗组小鼠在无瘤存活35 d后,再次接受MFC细胞冲击,继续观察小鼠至60 d仍存活,实验组和对照组的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

免疫治疗是现代肿瘤综合治疗的一种重要手段。DC在免疫反应中处于中心调控地位,DC疫苗抗肿瘤作为很有前景的临床抗肿瘤免疫生物学治疗新策略<sup>[1]</sup>,近年来已成为研究热点,并已被广泛用于对感染、肿瘤和自身免疫病等的治疗,展现出良好的应用前景。

抗肿瘤免疫效应通过机体的固有性免疫启动,并由适应性免疫得到加强,而在这过程中DC起到了核心调控作用。其中包括DC前体细胞识别肿瘤分子、DC激活NK/NKT细胞并介导杀伤识别的肿瘤分子、未成熟DC摄取和交叉递呈肿瘤相关抗原(TAA)、激活TAA特异性T细胞以及非特异性分子(如巨噬细胞)、TAA特异性T细胞到达肿瘤部位,杀伤肿瘤细胞等环节<sup>[8]</sup>。

进行以DC为基础的细胞免疫治疗的前提是获得足够量的DC。Marroquin *et al*<sup>[9]</sup>报道注射Flt3配体可以增加将近10倍的组织居留的DC数量,虽然获取这些DC依然困难,但这是首次报道可以在短期内增加DC前体细胞数量的方法。外周血取样容易,临床可操作性强,但是DC前体细胞在外周血中含量很少,因此在临床应用研究中亟待探索以快速简单的方法来增加外周血中的DC前体细胞或未成熟DC。

我们的研究发现, 给小鼠静脉注射MIP-1 $\alpha$ 能直接快速地动员来自骨髓的B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞进入外周血, 这些细胞经过细胞因子GM-CSF、IL-4和mTNF- $\alpha$ 短期培养后即呈现典型的髓系DC的表型, 高表达MHC II类分子、CD11c、DEC205和CD11b等分子, 而CD8 $\alpha$ 和F4/80为阴性。在功能上, 他们与骨髓细胞来源的DC一样, 能有效地刺激异源性T细胞大量增殖。说明MIP-1 $\alpha$ 动员的外周血B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞具有分化为DC的潜能, 是DC的前体细胞。这就为我们解决外周血中DC数量少和需求量大之间的矛盾开辟了新的途径。

获取了一定数量并具有正常功能的DC后, 将DC应用于肿瘤的免疫治疗的关键是DC疫苗的构建。目前常见的构建DC疫苗的方法主要有<sup>[10]</sup>: 肿瘤细胞冻融物冲击致敏DC<sup>[11]</sup>、基因工程肿瘤蛋白抗原或人工合成的肿瘤抗原多肽冲击致敏DC<sup>[12,13]</sup>、基因转染构建DC疫苗<sup>[14]</sup>等。本实验中, 我们通过反复冻融肿瘤细胞即可方便地制成有效的可溶性抗原, 用MIP-1 $\alpha$ 动员的DC荷载胃癌细胞抗原后可致敏小鼠脾脏T细胞, 使其对靶细胞产生明显的特异性杀伤作用, 这为我们进一步开展新的DC抗肿瘤免疫治疗的研究奠定了基础。

用骨髓分离和诱导出的DC用于免疫治疗的方法已经得到大家的公认<sup>[15]</sup>。因此, 本实验中我们收集小鼠的骨髓源性DC前体细胞, 用同样的方法来培养、诱导出成熟DC, 用于和MIP-1 $\alpha$ 动员的DC做功能上的比较。结果发现MIP-1 $\alpha$ 动员的DC和骨髓源性DC在荷载MFC细胞裂解物后, 用于治疗荷瘤小鼠, 均显示了强大的抑瘤作用, 治疗组瘤体生长缓慢, 且在再次接种后仍然未观察到肿瘤的生长, 显示了DC疫苗的长期抗肿瘤效应; 治疗组与对照组小鼠的平均存活期有显著性差异。MIP-1 $\alpha$ 动员的DC和骨髓源性DC疫苗一样, 在荷载肿瘤细胞抗原后, 具有诱导小鼠体内T细胞产生肿瘤特异性的杀伤作用, 对荷瘤小鼠有明显的治疗作用。

总之, 本研究阐明了注射MIP-1 $\alpha$ 能直接快速地动员B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>细胞进入外周血, 这些细胞在体外经过短期培养后可分化为功能正常的成熟DC; 用MIP-1 $\alpha$ 动员的DC荷载肿瘤抗原后, 制备成胃癌DC疫苗, 在小鼠体内可产生明显的抗肿瘤效应。进一步研究胃癌DC疫苗回输机体后的抗胃癌免疫的机制, 将对DC抗胃癌免疫治疗的基础和临床应用有重要的意义。

## 4 参考文献

- 1 Banchemreau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252
- 2 曹雪涛. 树突状细胞的基础与临床研究新进展. 中国免疫学杂志 1998; 14: 161-168
- 3 Marland G, Bakker AB, Adema GJ, Figdor CG. Dendritic cells in immune response induction. *Stem Cells* 1996; 14: 501-507
- 4 Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Murai M, Itakura M, Ishikawa S, Hasegawa G, Naito M, Asakura H, Matsushima K. Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J Exp Med* 2001; 193: 35-49
- 5 吴雨岗, 汪良, 丘陵, 何宋兵, 杨桂林, 万兵, 张雁云. 趋化性细胞因子MIP-1 $\alpha$ 促小鼠外周血DC前体细胞动员的实验研究. 现代免疫学 2005; 25: 191-195
- 6 Zhang Y, Zhang YY, Ogata M, Chen P, Harada A, Hashimoto S, Matsushima K. Transforming growth factor-beta1 polarizes murine hematopoietic progenitor cells to generate Langerhans cell-like dendritic cells through a monocyte/macrophage differentiation pathway. *Blood* 1999; 93: 1208-1220
- 7 Zhang Y, Wang Y, Ogata M, Hashimoto S, Onai N, Matsushima K. Development of dendritic cells *in vitro* from murine fetal liver-derived lineage phenotype-negative c-kit(+) hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 138-146
- 8 Banchemreau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811
- 9 Marroquin CE, Westwood JA, Lapointe R, Mixon A, Wunderlich JR, Caron D, Rosenberg SA, Hwu P. Mobilization of dendritic cell precursors in patients with cancer by flt3 ligand allows the generation of higher yields of cultured dendritic cells. *J Immunother* 2002; 25: 278-288
- 10 Steinman RM, Pope M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest* 2002; 109: 1519-1526
- 11 Zeng Y, Feng H, Graner MW, Katsanis E. Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. *Blood* 2003; 101: 4485-4491
- 12 Sadanaga N, Nagashima H, Mashino K, Tahara K, Yamaguchi H, Ohta M, Fujie T, Tanaka F, Inoue H, Takesako K, Akiyoshi T, Mori M. Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2277-2284
- 13 Brossart P, Stuhler G, Flad T, Stevanovic S, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by *in vitro* induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 1998; 58: 732-736
- 14 Foley R, Tozer R, Wan Y. Genetically modified dendritic cells in cancer therapy: implications for transfusion medicine. *Transfus Med Rev* 2001; 15: 292-304
- 15 Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* 1999; 162: 168-175

## ■同行评价

本文选题科学, 实验设计合理, 讨论条理清楚, 是一篇有一定创新性和实用价值的学术论文。

电编 张敏 编辑 张海宁

# 血小板活化因子受体拮抗剂对幼年大鼠肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的影响

王丽杰, 刘春英, 许玲芬, 高红, 姜卫国, 孙梅

## ■背景资料

胃肠功能障碍与肠屏障功能破坏密切相关, 而紧密连接蛋白ZO-1是肠屏障的重要组成部分。血小板活化因子可损害胃肠黏膜, 故我们应用PAF受体拮抗剂对PAF在幼年大鼠内毒素血症模型中肠黏膜ZO-1的影响作初步研究。

王丽杰, 许玲芬, 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

刘春英, 解放军463医院儿科 辽宁省沈阳市 110042

高红, 中国医科大学附属第二临床学院中心实验室 辽宁省沈阳市 110004

姜卫国, 中国医科大学附属第二临床学院病理科 辽宁省沈阳市 110004

王丽杰, 女, 1968-11-26生, 辽宁省本溪市人, 汉族, 2001年中国医科大学硕士, 目前中国医科大学博士研究生在读, 副主任医师, 主要从事儿科危重症、胃肠功能障碍的研究。

通讯作者: 孙梅, 王丽杰, 110004, 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。wlj682002@sohu.com.cn  
电话: 024-23255060 传真: 024-83955509

收稿日期: 2005-12-20 接受日期: 2006-01-07

## Effect of platelet activating factor receptor antagonist on tight junction associated protein between epithelial cells of intestinal mucosa in young rats

Li-Jie Wang, Chun-Ying Liu, Ling-Fen Xu, Hong Gao, Wei-Guo Jiang, Mei Sun

Li-Jie Wang, Ling-Fen Xu, Mei Sun, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Clinical College of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Chun-Ying Liu, Department of Pediatrics, the 463 Hospital of Chinese People's Liberation Army, Shenyang 110042, Liaoning Province, China

Hong Gao, Central Laboratory, the Second Affiliated Clinical College of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Wei-Guo Jiang, Department of Pathology, the Second Affiliated Clinical College of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Mei Sun, Li-Jie Wang, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Clinical College of China Medical University, 36 Sanhao street, Heping District, Shenyang 110004, China. wlj682002@sohu.com.cn  
Received: 2005-12-20 Accepted: 2006-01-07

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of platelet activating factor (PAF) receptor antagonist on the tight junction associated protein ZO-1 (zonula occludens-1) between epithelial cells of intestinal mucosa in young rats.

**METHODS:** Eighteen day-old Wistar rats were

randomly assigned into lipopolysaccharide (LPS) group, PAF receptor antagonist (prevention and treatment) group and control group. The rats in LPS and control group were intraperitoneally injected with LPS (5 mg/kg) and normal saline (1 mL/kg), while the rats in prevention and treatment group were intraperitoneally injected with PAF receptor antagonist BN52021 (5 mg/kg) 30 min before and after LPS injection. Terminal ileum of each rat was collected for transmission electron microscopy. The expression of ZO-1 was determined by immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) at both protein and mRNA level.

**RESULTS:** Microvilli and tight junctions were intact in control group. Enlargement of tight junctions were observed in LPS group and microvilli were thin, rare or disrupt, and shed. The rough endoplasmic reticulum, mitochondria, and glycogen particles were damaged. The above changes were alleviated in PAF receptor antagonist group. The staining of ZO-1 in the control rats was similar to a honeycomb, which reflected a continuous and uniform distribution localized at the apical portion of cell-to-cell contact of the enterocytes. In LPS group, the signals of ZO-1 were disrupted and irregularly distributed at the outer enterocyte periphery. The content of ZO-1 was obviously lower in LPS group than that in the control group at 6 h (optical density:  $0.1985 \pm 0.0159$  vs  $0.2247 \pm 0.0210$ ,  $P < 0.01$ ; mRNA:  $0.16 \pm 0.02$  vs  $1.18 \pm 0.09$ ,  $P < 0.01$ ). The content of ZO-1 was also significantly decreased in prevention and treatment group in comparison with that in control group at 6 h (optical density:  $0.1992 \pm 0.0087$ ,  $0.2038 \pm 0.0067$  vs  $0.2247 \pm 0.0210$ ,  $P < 0.01$ ; mRNA:  $0.47 \pm 0.08$ ,  $0.53 \pm 0.21$  vs  $1.18 \pm 0.09$ ,  $P < 0.01$ ). Meanwhile, the level of ZO-1 in prevention and treatment group was higher than that in LPS group at different time points, but there were no marked differences.

**CONCLUSION:** PAF may decrease tight junction associated protein ZO-1 and thereby damage the function of intestinal barrier. PAF receptor an-



tagonist can alleviate the degree of the damages to some extent.

**Key Words:** Platelet activating factor; Receptor antagonist; Intestinal barrier; Tight junction; Zonula occludens 1

Wang LJ, Liu CY, Xu LF, Gao H, Jiang WG, Sun M. Effect of platelet activating factor receptor antagonist on tight junction associated protein between epithelial cells of intestinal mucosa in young rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):392-397

## 摘要

**目的:** 探讨血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)受体拮抗剂对肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白ZO-1的影响。

**方法:** 18日龄Wistar大鼠, 随机分为对照组、内毒素组(LPS组)和PAF受体拮抗剂组(预防组和治疗组)。LPS组和对照组分别腹腔注射内毒素(5 mg/kg)和生理盐水(1 mL/kg)。预防组和治疗组分别于每一时相点注射LPS前、后30 min腹腔注射PAF受体拮抗剂BN52021(5 mg/kg)。按时间点分别处死动物, 取回肠用于电镜观察, 免疫组化及RT-PCR检测ZO-1。

**结果:** 电镜下对照组肠微绒毛及细胞间紧密连接未见异常。实验组上皮细胞连接增宽; 微绒毛变细、稀疏, 部分断裂、脱落; 细胞器受损。拮抗剂组改变较实验组减轻。紧密连接蛋白ZO-1正常时均匀一致地分布于小肠上皮细胞连接处的尖端, 呈蜂巢状, 实验组ZO-1分布不均, 染色变淡。免疫组化平均光密度值及RT-PCR结果可见LPS组ZO-1表达明显低于对照组, 6 h表达最低, 光密度从对照组0.224 7降至LPS组0.198 5, ZO-1 mRNA从1.18降至0.16( $P<0.01$ )。预防组及治疗组变化趋势同LPS组, 6 h预防组及治疗组光密度分别为0.199 2和0.203 8, ZO-1 mRNA分别为0.47和0.53, 与对照组相比均有显著差异( $P<0.01$ )。各时相点ZO-1较LPS组高, 预防组较治疗组ZO-1略低, 无统计学差异。

**结论:** PAF可降低肠道紧密连接蛋白ZO-1, 从而损害肠道的屏障功能, 而PAF受体拮抗剂可减轻肠道屏障功能损伤的程度。

**关键词:** 血小板活化因子; 受体拮抗剂; 屏障; 紧密连接; ZO-1

王丽杰, 刘春英, 许玲芬, 高红, 姜卫国, 孙梅. 血小板活化因子受体拮抗剂对幼年大鼠肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(4):392-397

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/392.asp>

## 0 引言

肠源性感染是儿科危重症中胃肠功能障碍的常见病因之一, 其发病机制与肠屏障功能破坏密切相关, 紧密连接蛋白ZO-1是肠屏障的重要组成部分。近年来血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)在胃肠黏膜损害中的作用日益受到重视。由于PAF通过其受体发挥作用, 故我们应用PAF受体拮抗剂对PAF在幼年大鼠内毒素血症模型中对肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白ZO-1的影响作初步研究。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康18日龄Wistar大鼠, 平均体重 $32.21 \pm 6.67$  g, 与母鼠共同饲养, 由中国医科大学附属第二临床学院实验动物中心提供。PAF(1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Sigma公司)。PAF受体拮抗剂BN52021(Ginkgolide B, Sigma公司)。内毒素LPS(lipopolysaccharide,  $O_{55}$ : B<sub>5</sub>脂多糖, Sigma公司)。鼠抗ZO-1紧密连接多聚单克隆抗体(CHEMICON公司)。SP-9000免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。RNA裂解液、总RNA提取试剂盒(上海华美生物工程公司)。TaKaRa试剂盒及DNA Marker(大连宝生物公司)。Primer由上海博亚生物技术有限公司合成。日本电子JEM100CX-II型透射电镜, OLYMPUS-BX41图像采集系统。美国Meta Morph/DP10/BX41软件分析系统。紫外分光光度计UV-1201型(日本)。自动电泳凝胶成像分析仪ALPHAINNOTECH ChemiImager5500(美国)。PTR-100PCR扩增仪(美国)。KODAK ID型凝胶成像分析系统(美国)。

**1.2 方法** 随机分为对照组( $n=8$ )、内毒素组(LPS组)和PAF受体拮抗剂组(预防组和治疗组), 每一时相点(1.5, 3, 6, 24, 48, 72 h)各8只。对照组腹腔注射生理盐水1 mL/kg, LPS组腹腔注射内毒素5 mg/kg(1 mL/kg), 用生理盐水溶解。预防组和治疗组分别于每一时相点注射LPS前、后30 min腹腔注射PAF受体拮抗剂BN52021 5 mg/kg。BN52021用二甲基亚砜配成20 g/L, 用药当天37℃水浴, 再用无菌生理盐水配成5 g/L。用药后各组均放回鼠笼, 继续哺乳, 直至实验结束。按时间点分别处死动物, 距回盲部3 cm处环形切取回肠。

## ■研究前沿

通过PAF受体拮抗剂对ZO-1的影响, 间接证明PAF对肠屏障功能的损害作用。

### ■创新盘点

本文通过在毒素血症模型中应用PAF受体拮抗剂对ZO-1的保护作用,间接证明PAF对肠屏障功能存在损害作用。而其他相关文章多通过细菌移位等证明PAF可损害肠屏障功能。

1.2.1 电镜观察 回肠于25 g/L戊二醛溶液中固定,取1 mm<sup>3</sup>小块若干用10 g/L锇酸双固定,乙醇梯度脱水,环氧树脂Epon812包埋, LKB超薄切片机切片,厚度0.05 μm, 钠、铅双染色,透射电镜下观察。

1.2.2 免疫组织化学技术检测回肠ZO-1蛋白 回肠于40 g/L甲醛溶液中固定,包埋,石蜡切片。免疫组化应用S-P法(过氧化物酶标记的链霉卵白素法, streptavidin/peroxidase)测定ZO-1,按常规S-P法操作步骤进行。鼠抗ZO-1紧密连接多聚单克隆抗体稀释比例1:75。每个时间点选取染色清晰的切片5-8张,于光镜下(×40)随机选取2-3个视野,应用OLYMPUS-BX41图像采集系统, Meta Morph/DP10/BX41软件分析系统测定平均光密度值(optical density average)。

1.2.3 RT-PCR检测回肠ZO-1 mRNA的表达 TRIZOL裂解待测的回肠组织,用酚-氯仿抽提总RNA,逆转录合成cDNA后进行PCR扩增,反应总体积25 μL, ZO-1正义引物序列: 5'-AAT GCT GCT TTA TTGGG-3'; 反义序列: 5'-AGTGGT TGG TGG TCT TCT-3', 扩增长度229 bp。β-肌动蛋白正义引物序列: 5'-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC-3'; 反义序列: 5'-CCA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG-3', 扩增长度690 bp。ZO-1的反应条件: 94℃变性3 min, 然后进行PCR反应共35次循环: 94℃变性45 s, 47.5℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 最后行72℃延伸27 min。β-肌动蛋白PCR反应35次循环: 94℃变性30 s, 55℃退火1 min, 72℃延伸1 min 30 s。取PCR反应产物10 μL加入2 g/L琼脂糖凝胶中电泳,应用计算机凝胶成像分析系统处理软件量化PCR扩增产物。基因相对表达量 = 待测基因光密度值/内参照光密度值。

**统计学处理** 采用SPSS 10.0数据分析软件,所有数据用mean±SD表示,组间比较采用方差分析LSD法(least significant difference),  $P<0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 电镜下病理改变 对照组肠黏膜上皮细胞表面微绒毛排列整齐,柱状上皮细胞结构完整;细胞质内细胞器丰富,结构未见异常;细胞间连接紧密(图1A)。实验组上皮细胞连接增宽;微绒毛变细、稀疏、排列不整、呈倒伏状,部分断裂、脱落;线粒体严重肿胀,嵴肿胀、断裂甚至

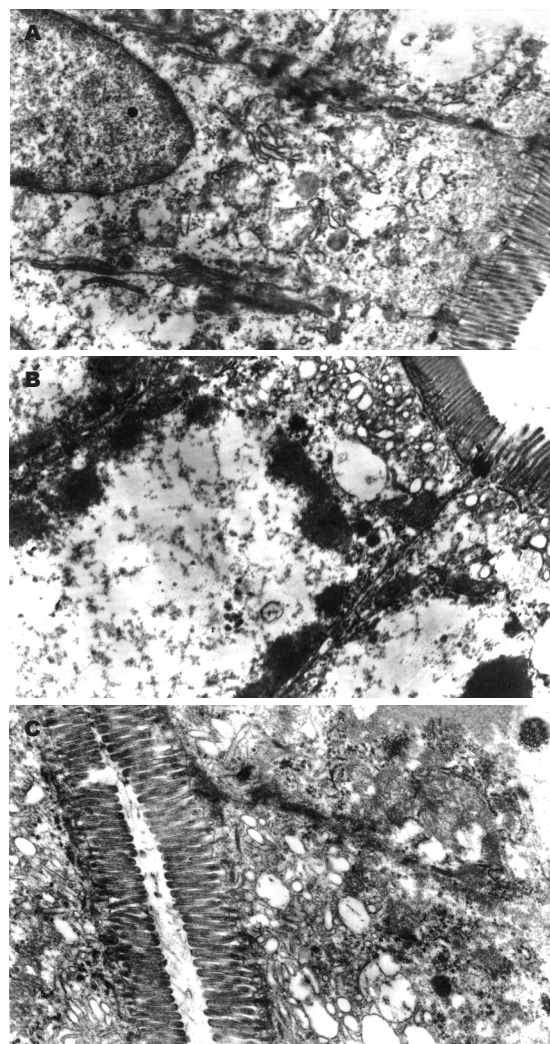


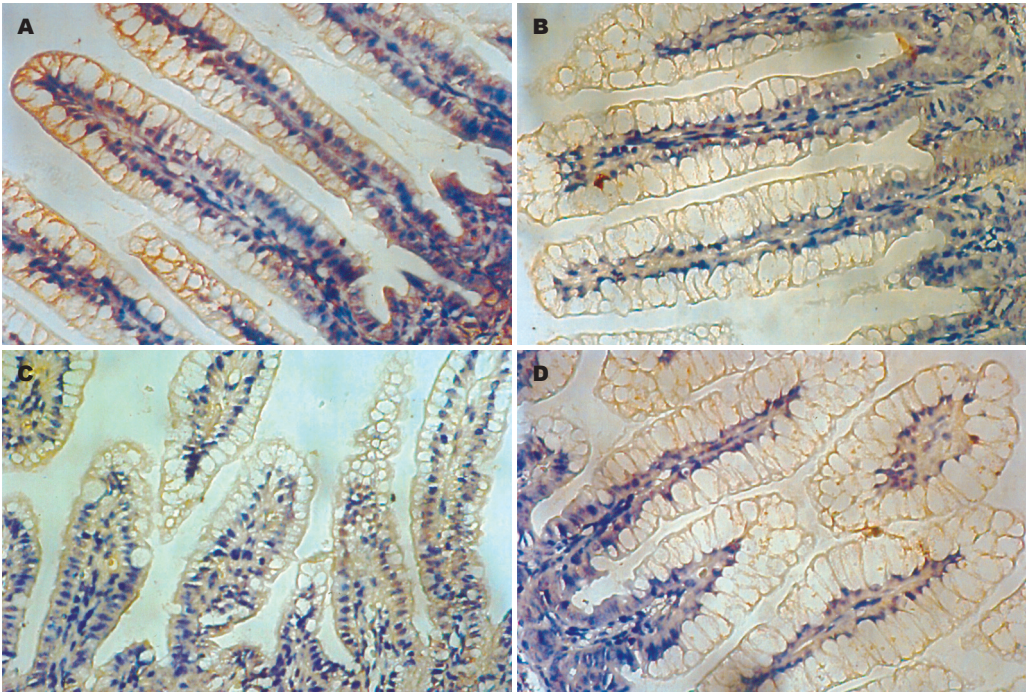
图1 透射电镜下回肠上皮细胞超微结构改变(钠、铅双染色)。A: 正常回肠上皮细胞(×7 200); B: LPS组6 h(×7 200); C: 预防组6 h(×10 000)。

消失,呈空泡变性,内质网扩张,核糖体脱落,染色质浓缩分布在核周边,可见核碎裂。拮抗剂组改变较实验组减轻(图1B-C)。

2.2 ZO-1蛋白在小肠黏膜的表达 紧密连接蛋白ZO-1正常时均匀一致地分布于小肠上皮细胞连接处的尖端,呈蜂巢状(图2A)。实验组ZO-1分布不均,染色变淡(图2B-D)。免疫组化平均光密度值可见LPS组ZO-1蛋白表达明显低于对照组,6 h表达最低,预防组及治疗组变化趋势同LPS组,各时相点ZO-1较LPS组高,预防组较治疗组ZO-1略低,无统计学差异(表1)。

2.3 回肠组织ZO-1 mRNA表达水平 LPS组ZO-1 mRNA水平明显低于对照组( $P<0.01$ ),6 h表达最低,预防组及治疗组变化趋势同LPS组,各时相点ZO-1 mRNA较LPS组高,预防组较治疗组ZO-1 mRNA略低,无统计学差异(表2,图3)。





**■名词解释**  
ZO-1: 膜相关鸟苷酸激酶家族成员之一, 膜周蛋白质, 与膜内蛋白质如occludin和claudin相互作用, 使膜内蛋白质与细胞质和细胞骨架紧密相连, 共同维持紧密连接和肠屏障功能的稳定。

图 2 回肠黏膜ZO-1蛋白表达 (×40). A: 正常; B: LPS组3 h; C: 预防组3 h; D: 治疗组3 h.

表 1 幼鼠各组回肠ZO-1表达平均光密度值变化 (mean ± SD)

| 分组   | ZO-1平均光密度                    |                              |                              |                              |                              |                              |
|------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|      | 1.5 h                        | 3 h                          | 6 h                          | 24 h                         | 48 h                         | 72 h                         |
| LPS组 | 0.2031 ± 0.0091 <sup>b</sup> | 0.2019 ± 0.0125 <sup>b</sup> | 0.1985 ± 0.0159 <sup>b</sup> | 0.2015 ± 0.0155 <sup>b</sup> | 0.2000 ± 0.0108 <sup>b</sup> | 0.2073 ± 0.0056 <sup>a</sup> |
| 预防组  | 0.2108 ± 0.0087 <sup>a</sup> | 0.2082 ± 0.0043 <sup>a</sup> | 0.1992 ± 0.0087 <sup>b</sup> | 0.2022 ± 0.0206 <sup>b</sup> | 0.2031 ± 0.0106 <sup>b</sup> | 0.2197 ± 0.0102              |
| 治疗组  | 0.2199 ± 0.0142              | 0.2144 ± 0.0024              | 0.2038 ± 0.0067 <sup>b</sup> | 0.2034 ± 0.0145 <sup>b</sup> | 0.2103 ± 0.0082              | 0.2108 ± 0.0155 <sup>a</sup> |
| 对照组  | 0.2247 ± 0.0210              | 0.2247 ± 0.0210              | 0.2247 ± 0.0210              | 0.2247 ± 0.0210              | 0.2247 ± 0.0210              | 0.2247 ± 0.0210              |

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组.

表 2 幼鼠各组回肠ZO-1 mRNA表达水平变化 (mean ± SD)

| 分组   | ZO-1 mRNA                |                          |                          |                          |                          |             |
|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|
|      | 1.5 h                    | 3 h                      | 6 h                      | 24 h                     | 48 h                     | 72 h        |
| LPS组 | 0.31 ± 0.24 <sup>b</sup> | 0.32 ± 0.21 <sup>b</sup> | 0.16 ± 0.02 <sup>b</sup> | 0.72 ± 0.24 <sup>b</sup> | 0.97 ± 0.11 <sup>a</sup> | 1.15 ± 0.11 |
| 预防组  | 0.52 ± 0.16 <sup>b</sup> | 0.51 ± 0.08 <sup>b</sup> | 0.47 ± 0.08 <sup>b</sup> | 0.73 ± 0.18 <sup>b</sup> | 0.98 ± 0.12 <sup>a</sup> | 1.08 ± 0.09 |
| 治疗组  | 0.53 ± 0.12 <sup>b</sup> | 0.51 ± 0.17 <sup>b</sup> | 0.53 ± 0.21 <sup>b</sup> | 0.73 ± 0.17 <sup>b</sup> | 1.13 ± 0.16              | 1.17 ± 0.12 |
| 对照组  | 1.18 ± 0.09              | 1.18 ± 0.09              | 1.18 ± 0.09              | 1.18 ± 0.09              | 1.18 ± 0.09              | 1.18 ± 0.09 |

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组.

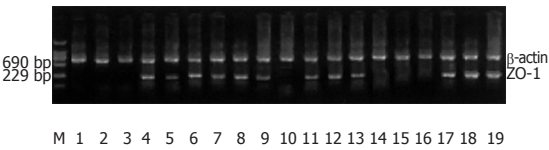


图 3 回肠各组ZO-1 mRNA电泳图. M: Marker; 1-6: LPS组 (1.5, 3, 6, 24, 48, 72 h); 7-12: 预防组; 13-18: 治疗组; 19: 对照组.

**3 讨论**  
胃肠道黏膜的损伤会引起肠道通透性增加、肠道细菌和内毒素移位、释放大量炎性介质等, 其结果可能导致脓毒症、其他器官损伤, 最终导致多系统器官功能衰竭(multiple system organ failure, MSOF). 肠黏膜通透性增高, 为肠腔内毒素及其他毒素吸收入血提供了机会, 也是肠道



## ■同行评价

肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白具有很多重要的生理功能,与IBD、IBS、肠源性感染等疾病的发生关系密切,是临床基础研究的热点之一。本文通过模拟肠源性感染,并应用PAF受体拮抗剂防治,探讨了PAF对紧密连接蛋白表达的影响,研究新颖,选题准确,有一定学术价值。

细菌移位的病理基础。防止细菌移位的屏障由以下几部分构成: (1)肠道连续的黏膜上皮构成的机械屏障; (2)由肠道淋巴样组织细胞网提供的细胞及体液免疫系统; (3)正常的、大量的肠道厌氧菌群,防止致病微生物的过度增生及在肠道黏膜的定植。其中任一部分或几部分遭到破坏,都会造成细菌移位,因此肠道屏障功能备受学者关注<sup>[1-3]</sup>。肠黏膜的机械屏障由肠表面黏液、微绒毛、肠黏膜上皮细胞及其间的紧密连接以及黏膜的特殊结构组成<sup>[4]</sup>。肠上皮细胞间连接由紧密连接、黏附连接、缝隙连接等构成。构成肠上皮细胞间连接的蛋白主要有ZO-1、occludin、cadheren、claudin和 $\beta$ -catenin等<sup>[5-8]</sup>。这些分子直接或间接地与多种细胞内蛋白,特别是骨架蛋白连接构成上皮细胞的紧密连接,主要功能是作为选择性的细胞间屏障,调节各种分子和离子的扩散<sup>[6,9,10]</sup>。ZO-1是膜相关鸟苷酸激酶家族成员之一,与细胞质内的occludin和claudin相互作用<sup>[11-13]</sup>,同时也参与蛋白与蛋白相互作用的信号转导。

研究认为PAF在诸多参与胃肠黏膜损害的炎症介质中可能起到“中心放大”的介导作用<sup>[14]</sup>。腹腔注射LPS,能诱发肠组织产生内源性PAF<sup>[15]</sup>。PAF很可能是内毒素作用的主要效应因子。已有实验证实<sup>[16]</sup>,用PAF和LPS引起的坏死性小肠结肠炎的改变相似,用PAF受体拮抗剂WEB 2170可明显减轻LPS所致的肠坏死。本文电镜结果可见,应用拮抗剂后可明显改变肠道细胞损伤的程度,使细胞器及细胞间连接的损伤较实验组减轻。免疫组化及RT-PCR结果可见,实验组应用内毒素后ZO-1蛋白及mRNA水平均明显降低,6 h内改变明显,随时间推移改变逐渐减轻;应用拮抗剂后ZO-1下降程度较实验组减轻。本文实验结果说明PAF在内毒素血症中可损伤肠道紧密连接蛋白ZO-1,从而损伤肠道的屏障功能,而PAF受体拮抗剂可降低肠道屏障功能损伤的程度。

另外,本文研究结果显示,治疗性应用BN52021较预防性应用效果稍好,其原因可能由于预防性应用BN52021通过阻滞PAF与其受体结合而不能发挥PAF的生物效应,但BN52021不能直接阻滞PAF的合成与释放;而治疗性应用BN52021之所以疗效好是否由于BN52021不仅可直接阻滞已释放的PAF与其受体结合,还可直接中和PAF,有待于进一步研究。另外,PAF的合

成有两条酶促途径<sup>[17]</sup>,是否预防性应用BN52021大多与新生(denovo)途径合成的生理条件下的PAF的受体结合,部分性阻滞其病理功能;而治疗性应用BN52021大多与LPS激活后上调的PAF受体结合,从而阻断其病理功能,这一观点也有待于进一步证实。但总的来说,预防和治疗性应用特异性PAF受体拮抗剂BN52021作为有效的干预措施,可维护肠道免疫屏障功能的稳定,防治肠源性感染以减少对机体的继发损伤。

## 4 参考文献

- 1 武金宝,王继德,张亚历. 肠黏膜屏障研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 619-623
- 2 Zareie M, Riff J, Donato K, McKay DM, Perdue MH, Soderholm JD, Karmali M, Cohen MB, Hawkins J, Sherman PM. Novel effects of the prototype translocating *Escherichia coli*, strain C25 on intestinal epithelial structure and barrier function. *Cell Microbiol* 2005; 7: 1782-1797
- 3 McConnell KW, Coopersmith CM. Epithelial cells. *Crit Care Med* 2005; 33: S520-S522
- 4 岳茂兴. 胃肠道功能障碍及衰竭的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2002; 10: 3-6
- 5 Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81: 1-44
- 6 Mazzon E, Sturniolo GC, Puzzolo D, Frisina N, Fries W. Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum. *Gut* 2002; 51: 507-513
- 7 Simonovic I, Rosenberg J, Koutsouris A, Hecht G. Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cell Microbiol* 2000; 2: 305-315
- 8 Dublineau I, Lebrun F, Grison S, Griffiths NM. Functional and structural alterations of epithelial barrier properties of rat ileum following X-irradiation. *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82: 84-93
- 9 Kimizuka K, Nakao A, Nalesnik MA, Demetris AJ, Uchiyama T, Ruppert K, Fink MP, Stolz DB, Murase N. Exogenous IL-6 inhibits acute inflammatory responses and prevents ischemia/reperfusion injury after intestinal transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 482-494
- 10 Muza-Moons MM, Schneeberger EE, Hecht GA. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 2004; 6: 783-793
- 11 Mitic LL, Schneeberger EE, Fanning AS, Anderson JM. Connexin-occludin chimeras containing the ZO-binding domain of occludin localize at MDCK tight junctions and NRK cell contacts. *J Cell Biol* 1999; 146: 683-693
- 12 Baltes S, Nau H, Lampen A. All-trans retinoic acid enhances differentiation and influences permeability of intestinal Caco-2 cells under serum-free conditions. *Dev Growth Differ* 2004; 46: 503-514
- 13 Weiler F, Marbe T, Scheppach W, Schaubert J. Influence of protein kinase C on transcription of the tight junction elements ZO-1 and occludin. *J Cell Physiol* 2005; 204: 83-86

- 14 Anderson BO, Bensard DD, Harken AH. The role of platelet activating factor and its antagonists in shock, sepsis and multiple organ failure. *Surg Gynecol Obstet* 1991; 172: 415-424
- 15 Shindou H, Ishii S, Yamamoto M, Takeda K, Akira S, Shimizu T. Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A:lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J Immunol* 2005; 175: 1177-1183
- 16 Ewer AK, Al-Salti W, Coney AM, Marshall JM, Ramani P, Booth IW. The role of platelet activating factor in a neonatal piglet model of necrotising enterocolitis. *Gut* 2004; 53: 207-213
- 17 Ikeda O, Egami H, Ishiko T, Ishikawa S, Kamohara H, Hidaka H, Mita S, Ogawa M. Expression of proteinase-activated receptor-2 in human pancreatic cancer: a possible relation to cancer invasion and induction of fibrosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 295-300

电编 张敏 编辑 张海宁

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

## • 消息 •

### 首届北京地坛感染病学术会议

**本刊讯** 为庆祝建院60周年, 北京地坛医院决定于2006-03-02/04在北京召开全国性的“首届北京地坛感染病学术会议”, 预计全国的同行500人参加这次重要的会议. 会议邀请了40余位我国德高望重、年富力强的感染病专家作专题学术讲演.

#### 1 会议征稿内容

这次感染病学术会议征文的内容包括病毒性肝炎、HIV/AIDS、各种传染性疾病和感染性疾病, 抗生素的合理使用, 也包括新发/复燃的传染病. 论文全文和摘要请发到电子信箱: [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn); 或 [hy@genetherapy.com.cn](mailto:hy@genetherapy.com.cn).

#### 2 与会专家名单

首届北京地坛感染病学术会议邀请的专题报告专家(按照汉语拼音排序)有: 白雪帆, 陈智, 陈志海, 成军, 段钟平, 窦晓光, 范小玲, 高志良, 郭利民, 侯金林, 贾继东, 郎振为, 李长青, 李兰娟, 李太生, 李兴旺, 刘沛, 刘庄, 伦文辉, 毛羽, 缪晓辉, 穆毅, 宁琴, 牛俊奇, 任红, 施光峰, 斯崇文, 谭德明, 唐红, 唐小平, 万谟彬, 王风水, 王福生, 王贵强, 王磊, 王玲, 王宇明, 王宪波, 魏红山, 魏来, 翁心华, 谢青, 谢雯, 谢尧, 邢卉春, 徐道振, 杨东亮, 杨钧, 袁正宏, 赵红心, 庄辉.

#### 3 联系方式

首届北京地坛感染病学术会议组织委员会主席为成军教授. 地址: 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 邮编: 100011; 电话: 010-64481639; 传真: 010-64481639. Email: [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn).

欢迎全国感染病学界的各位专家和同仁来北京参加这次盛会.

# 骨髓间充质干细胞在胰腺生理更新和病理再生中的作用

江学良, 李兆申, 崔慧斐

## ■背景资料

受损伤或病变的胰脏可进行自我修复, 胰腺内分泌细胞也常常需要更新, 表明胰腺中可能存在具有分裂能力、并在分裂后进入终末分化的细胞, 尽管已经从胰腺中分离得到了具有分化为胰腺多种细胞的所谓胰腺干细胞, 但相关研究仍处于初级阶段, 对其在胰腺自我更新和损伤修复中所起的作用, 目前还不明确。

江学良, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化科 上海市 200433

崔慧斐, 山东大学药学院 山东省济南市 250014

江学良, 男, 1967-08-26生, 山东省潍坊市人, 汉族, 医学博士, 主编《溃疡性结肠炎》和《溃疡性结肠炎现代诊疗手册》, 副主编专著2部, 《世界华人消化杂志》等8家杂志共同主编和常务编委。主要研究方向为溃疡性结肠炎和消化内镜, 获军队及省部级科技成果奖6项。

通讯作者: 李兆申, 200433, 上海市长海路174号, 第二军医大学长海医院消化科。jiangxueliang678@126.com  
电话: 021-65573144

收稿日期: 2005-12-01 接受日期: 2005-12-24

## Role of bone marrow mesenchymal stem cells in pancreas self-restoration and pathological regeneration

Xue-Liang Jiang, Zhao-Shen Li, Hui-Fei Cui

Xue-Liang Jiang, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Hui-Fei Cui, College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China

Correspondence to: Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. jiangxueliang678@126.com

Received: 2005-12-01 Accepted: 2005-12-24

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) in pancreatic self-restoration and pathological regeneration.

**METHODS:** Sixty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into 5 groups ( $n = 12$ ). Group A acted as the normal negative control without any treatment, and group B received labeled autologous bone marrow MSC only. Group C was induced mild acute pancreatitis by subcutaneous injection of caerulein 20  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{h})$  4 times, and group D was induced severe acute pancreatitis by intraperitoneal injection of L-arginine (2 g/kg) twice. Group E was the stem cell mobilized group treated by injection of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) into rats for 3 d at a dose of 40  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  3 d before the induction of SAP. MSC were stained with Hoechst33258 and transplanted

into their original cavity. Two and eight weeks after transplantation, the rats were sacrificed, and pancreatic tissues were harvested. Samples were snap-frozen and sectioned on a cryostat. The presence of labeled MSC in the cryostat prepared was examined directly by fluorescent microscopy. The positive sections were selected for further immunofluorescence assay. Anti-Cytokeratin(CK)19, anti-glucagon and anti-insulin immunofluorescence staining were performed on the pancreatic sections to determine whether incorporated MSC differentiated into mature pancreatic cells.

**RESULTS:** Frozen section of pancreas in group A didn't appear yellow-green fluorescence. The labeled MSC were detected in normal pancreatic tissues in group B and in injured pancreatic tissues in group C, D and E, especially in group E, which lasted 8 wk. The results of immunofluorescence analysis were as follows: All tests were negative in controls, including spontaneous fluorescence control, fluorescence antibody control and inhibitory control. No positive cells with CK19, insulin and glucagons were visualized in group A and D (died rats). Positive cells with CK19, which differentiated from the labeled MSC, were found in normal pancreas in group B and injured pancreatic models in group C, E and D (survival rats). No positive cells with insulin and glucagons were observed 2 wk after modeling, while the positive cells appeared 8 wk after modeling in group C, D and E.

**CONCLUSION:** The bone marrow MSC participate in pancreatic self-restoration and pathological regeneration.

**Key Words:** Bone marrow mesenchymal stem cells; Acute pancreatitis; Pancreatic stem cells

Jiang XL, Li ZS, Cui HF. Role of bone marrow mesenchymal stem cells in pancreas self-restoration and pathological regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):398-404

## 摘要

**目的:** 探讨骨髓间充质干细胞在胰腺生理更



新和病理再生中的作用.

**方法:** 将60只SD大鼠随机分为5组, 每组12只. A组为正常阴性对照组, 不作任何处理, B组为自体骨髓回输对照组, C组为雨蛙肽致轻度胰腺炎(MAP)模型组, D组为L-精氨酸致重度胰腺炎(SAP)模型组, E组为粒细胞集落因子(G-CSF)预处理组(SAP+GSF): 在造模前3 d, sc G-CSF 40  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 共3 d, 其余处理同D组. 造模前3 d用核染料Hoechst33258标记自体骨髓间充质干细胞(MSC), 并回输到自体骨髓腔. 于骨髓干细胞回输后的2 wk和8 wk, 分批处死大鼠, 采集胰腺, 立即进行冰冻切片, 荧光显微镜下直接观察胰腺组织中是否有呈现黄绿色荧光的细胞, 选择有上述黄绿色荧光的冰冻切片进行免疫荧光染色, 观察有无Cytokeratin 19、胰岛素和胰高血糖素染色呈阳性的细胞.

**结果:** A组的胰腺冰冻切片未见有黄绿色荧光. 造模后2 wk, B、C、E和D组存活大鼠可见标记的MSC出现在正常胰腺组织和损伤胰腺组织中, 在正常胰腺组织中偶见, 而在损伤胰腺组织中多见, 尤以GSF预处理组最多见, C、D、E组一直持续到8 wk仍可见到黄绿色荧光. A和D组死亡大鼠未见Cytokeratin 19、胰岛素和胰高血糖素染色呈阳性的细胞. 造模后2 wk, B、C、E和D组存活大鼠掺入损伤胰腺中的MSC均有分化为Cytokeratin 19染色阳性的细胞, 未见胰岛素和胰高血糖素染色呈阳性的细胞. 造模后8 wk, 胰岛素和胰高血糖素染色呈阳性的细胞在C、D组偶见, E组散见.

**结论:** 自体骨髓间充质干细胞参与胰腺的生理更新和病理再生.

**关键词:** 骨髓间充质干细胞; 胰腺干细胞; 胰腺炎

江学良, 李兆申, 崔慧斐. 骨髓间充质干细胞在胰腺生理更新和病理再生中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(4):398-404  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/398.asp>

## 0 引言

受损伤或病变的胰脏可进行自我修复, 胰腺内分泌细胞也常常需要更新, 表明胰腺中可能存在具有分裂能力、并在分裂后进入终末分化的细胞. 尽管已经从胰腺中分离得到了具有分化为胰腺多种细胞的所谓胰腺干细胞<sup>[1-11]</sup>, 但相关研究仍处于初级阶段. 从胰腺导管上皮、胰岛等多部位所得到的各种胰腺干细胞, 以及肝-胰

细胞间的相互转化<sup>[12-15]</sup>在胰腺自我更新和损伤修复中所起的作用, 目前还不明确.

Ianus *et al*<sup>[16]</sup>的新近报道采用了将GFP基因置于胰岛素启动子下游的转基因小鼠作为骨髓移植的供体, 受体先作了清髓处理, 之后进行骨髓移植. 结果表明, 骨髓来源的细胞出现在胰岛, 还表达胰岛素及 $\beta$ 细胞分化的相关转录因子Glut-2等, 而且该细胞可对葡萄糖的浓度变化作出反应, 并排除细胞融合是骨髓细胞分化为 $\beta$ 细胞的机制. 这是进行异体骨髓移植得到的结果, 自然情况下, 自体骨髓也是胰腺干细胞的另一个居所吗? 我们观察了自体骨髓间充质干细胞(MSC)参与胰腺生理更新和损伤修复的情况.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Hoechst 33258(Sigma公司), Hoechst 33258贮存液(1 g/L, 三蒸水为溶剂, 4℃避光冷藏), 鼠抗Cytokeratin 19单抗, 小鼠抗胰岛素单抗, 小鼠抗胰高血糖素单抗(以上3种抗体均为武汉博士德生物工程有限公司, 工作浓度1:100). 羊抗鼠IgG-CY3(Sigma公司, 工作浓度1:100), L-精氨酸(Sigma公司), 雨蛙素(caerulein, 美国Sigma产品), DMEM(Gibco公司, 用三蒸水配制, 调pH 7.2后除菌过滤, 分装后4℃冷藏), 小牛血清(杭州四季青公司, 用前56℃ 30 min进行灭活, 分装后-20℃贮存), 淋巴细胞分离液(上海华精生物高科技有限公司), 戊巴比妥钠(上海试剂二厂, 进口分装, 以生理盐水为溶剂配制为10 g/L的溶液), 肝素钠(烟台东城生化有限公司, 以无血清DMEM配制, 浓度为 $1\times 10^6$  U/L), 胰酶(Sigma公司, 以无血清DMEM配制成2.5 g/L的溶液), 封片用缓冲甘油(0.5 mol/L pH 9.0的碳酸盐缓冲液与甘油等体积混合). BB5060 Heraeus紫外清洁型细胞培养箱(上海力申科学仪器有限公司), DMIL倒置显微镜(德国Leica公司), CM1850冰冻切片机(德国LEICA), TE300倒置显微镜(日本NIKON公司), Olympus BX60荧光显微镜(日本Olympus公司), Falcon 35 mm塑料培养皿(Becton Dickinson公司). 健康 $\delta$  Sprague-Dawley(SD)大鼠, 体质量180-220 g, 清洁级, 第二军医大学动物实验中心提供. 适应性饲养1 wk后开始实验. 实验前12 h禁食, 自由饮水.

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组** 将大鼠随机分为5组, 每组12只. A组为正常阴性组, 不作任何处理; B组为自体骨髓回输对照组, C组为轻度胰腺炎(MAP)模型组,

### ■ 研发前沿

由于缺乏特异标记, 胰腺干细胞分离培养鉴定都很困难. 对胰腺干细胞来源还不清楚, 骨髓间充质干细胞能否转化为胰腺干细胞尚缺乏直接证据.

## ■相关报道

Ianus *et al* 的新近报道采用了将GFP基因置于胰岛启动子下游的转基因小鼠作为骨髓移植的供体,受体先作了清髓处理,之后进行骨髓移植。结果表明,骨髓来源的细胞出现在胰岛,还表达胰岛素及 $\beta$ 细胞分化的相关转录因子Glut-2等,而且该细胞可对葡萄糖的浓度变化作出反应,并排除细胞融合是骨髓细胞分化为 $\beta$ 细胞的机制。

D组为重度胰腺炎(SAP)模型, E组为粒细胞集落因子(G-CSF)预处理组(SAP+GSF): 在造模前3 d, sc G-CSF 40  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 共3 d, 其余处理同D组。造模前3 d用核染料Hoechst 33258标记自体骨髓MSC, 并回输到自体骨髓腔。观察其在胰腺生理更新和胰腺病理修复中的作用。

1.2.2 骨髓的采集 大鼠待穿刺部位用硫化钠溶液进行脱毛处理。将被毛剪短, 然后用棉球蘸取脱毛剂, 在所需部位涂一薄层, 2-3 min后用温水洗去脱落的被毛, 用纱布擦干即可。在无菌条件下, 以10 mL一次性注射器(事先吸入0.5 mL抗凝液)直接行股骨穿刺, 针头要加用合适的细针栓, 以防针眼堵塞, 待有突破感后拔出针栓, 抽取即可, 抽取骨髓1 mL, 立即注入10 mL无菌离心管中, 1 000 r/min离心10 min, 弃去上层液体, 以无菌PBS离心洗涤3次, 弃上清, 细胞沉淀以PBS充分混匀, 小心叠加于2倍体积的淋巴细胞分离液上, 2 500 r/min离心30 min, 收集骨髓单核细胞层, 再用PBS洗涤两次。

1.2.3 原代骨髓造血干细胞(HSC)和MSC的分离参照Piltenger法<sup>[17]</sup>, 即利用密度梯度离心技术, 收集位于培养基和悬浮液界面上的骨髓单个核细胞, 洗涤后铺板培养。根据MSC与造血干细胞贴壁性能的差异, 将两类细胞分离。

1.2.4 骨髓干细胞的荧光标记和自体骨髓腔回输待标记的MSC, 以无血清的DMEM悬浮细胞加入Hoechst 33258贮存液, 使其终浓度为10  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 于37 $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$ 饱和湿度的 $\text{CO}_2$ 孵箱中孵育15 min, 然后用PBS洗涤5次, 以充分洗去未掺入的染料。将上述标记的骨髓干细胞以约1 mL PBS悬浮, 分别进行自体骨髓腔回输。按上述骨髓穿刺操作刺入骨髓腔, 将标记好的细胞悬液小心注入后, 再注入0.5 mL PBS, 停顿约0.5 min, 拔出穿刺针, 并按压穿刺部位5 min。

1.2.5 胰腺损伤模型的制作 A组: 正常阴性对照组, SD大鼠不做任何操作处理; B组: 自体骨髓回输对照组; 在标记的自体骨髓细胞回输3 d后, C组和D组复制胰腺损伤模型, C组(依据Oruc *et al*<sup>[18]</sup>的方法): 轻度胰腺炎组, 雨蛙肽(caerulein)溶于9 g/L生理盐水中配制成浓度为25 mg/L的caerulein溶液, SD大鼠皮下注射雨蛙肽(caerulein)20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 共4次, 间隔1 h, 注射后自由饮食; D组(根据Tani *et al*<sup>[19]</sup>的方法改进): 重度胰腺炎组, L-精氨酸溶于9 g/L生理盐水中配制成浓度为20 g/L的L-精氨酸溶液, SD大鼠腹腔注射2次L-精氨酸(2.0 g/kg体重), 间隔1 h。

E组: 在造模前3 d, sc G-CSF 40  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 共3 d, 其余处理同D组。

1.2.6 胰腺的冰冻切片和荧光观察 于骨髓干细胞回输后的2 wk和8 wk, 分批处死大鼠。采集胰腺, 立即进行冰冻切片, 荧光显微镜下直接观察胰腺组织中是否有呈现黄绿色荧光的细胞。对照试验: 取A组大鼠的胰腺, 进行冰冻切片, 观察荧光。

1.2.7 胰腺的免疫荧光观察 选择有上述黄绿色荧光的冰冻切片进行免疫荧光染色, 步骤如下: 将冰冻切片以800 mL/L的冷乙醇室温固定10 min, PBS洗涤3次, 每次5 s; 置切片于湿盒中, 分别滴加鼠抗Cytokeratin 19的单抗工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 以PBS洗切片3次, 每次5 s, 滴加羊抗鼠IgG-CY3工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h, 以PBS洗切片3次, 每次5 s, 缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察结果, Cytokeratin 19的特异性荧光染色为红色。对照试验: 自发荧光对照(切片只加PBS, 缓冲甘油封片后, 荧光显微镜下观察); 荧光抗体对照(切片只加二抗羊抗鼠IgG-CY3染色, 缓冲甘油封片后, 荧光显微镜下观察); 抑制试验: 先将二抗羊抗鼠IgG-CY3与一抗Cytokeratin 19的单抗等量混合, 再加在切片上染色, 缓冲甘油封片后, 荧光显微镜下观察。胰岛素的免疫荧光染色和胰高血糖素的免疫荧光染色操作同Cytokeratin 19, 只是换用相应的一抗。

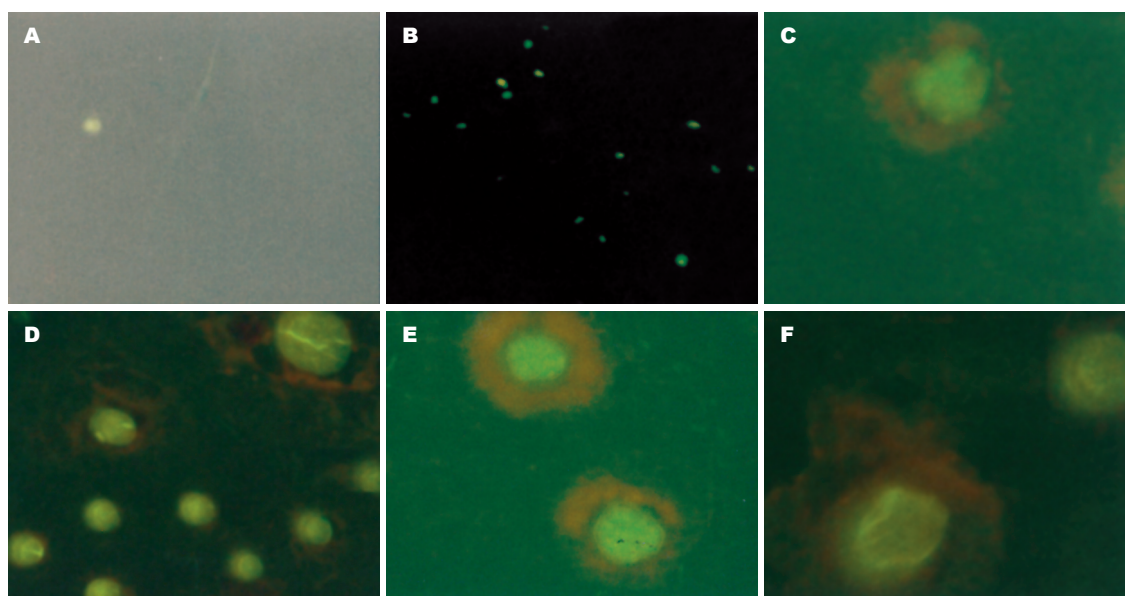
1.2.8 免疫荧光结果判定 - : 切片中未见荧光细胞;  $\pm$ : 切片中偶尔可见荧光细胞, 每个视野中 $\leq 3$ 个荧光细胞; +: 切片可见散在荧光细胞, 每个视野中 $\leq 10$ 个荧光细胞; ++: 切片中可见较多荧光细胞, 每个视野中 $\leq 20$ 个荧光细胞; +++: 切片中可见大量荧光细胞, 每个视野中 $> 20$ 个荧光细胞; ++++: 切片中可见成团荧光细胞, 视野中细胞无法计数。

## 2 结果

2.1 死亡情况 A、B、C组大鼠无死亡, 造模后72 h内D组有4只死亡, E组有1只死亡。

2.2 胰腺冰冻切片的荧光观察 A组(非处理组)的胰腺冰冻切片未见有黄绿色荧光。造模后2 wk, B、C、D(存活大鼠)、E组可见标记的MSC出现在正常胰腺组织和损伤胰腺组织中, 在正常胰腺组织中偶见(图1A), 而在损伤胰腺组织中多见, 尤以GSF预处理组最多见(图1B), D组死亡大鼠中仅偶见, C组和D组存活大鼠、E组一直持续到8 wk仍可见到黄绿色荧光(表1)。





## ■创新盘点

上述相关研究是进行异体骨髓移植得到的结果, 自然情况下, 自体骨髓也是胰腺干细胞的另一个居所吗? 我们观察了自体骨髓间充质干细胞(MSC)参与胰腺生理更新和损伤修复的情况。

图1 自体骨髓MSC在正常和损伤胰腺组织中表达与转化. A: 自体骨髓回输后2 wk, 正常胰腺中偶见MSC阳性细胞( $\times 250$ ); B: 自体骨髓回输后2 wk, 损伤的胰腺组织中MSC细胞多见( $\times 250$ ); C: 自体骨髓回输后2 wk, 正常胰腺中偶见CK19阳性细胞( $\times 400$ ); D: 自体骨髓回输后2 wk, 损伤的胰腺组织中CK19阳性细胞多见( $\times 400$ ); E: 自体骨髓回输后8 wk, 损伤的胰腺组织中偶见胰岛素抗体阳性的细胞( $\times 400$ ); F: 自体骨髓回输后8 wk, 损伤的胰腺组织中偶见胰高血糖素抗体阳性的细胞( $\times 400$ ).

表1 骨髓间充质干细胞在正常胰腺和胰腺炎中的荧光表达

| 组别      | n | MSC | CK19 | 胰岛素表达 | 胰高血糖素表达 |
|---------|---|-----|------|-------|---------|
| 造模后2 wk |   |     |      |       |         |
| A组      | 6 | -   | -    | -     | -       |
| B组      | 6 | ±   | ±    | -     | -       |
| C组      | 6 | +   | +    | -     | -       |
| D组      |   |     |      |       |         |
| 死亡大鼠    | 4 | ±   | -    | -     | -       |
| 存活大鼠    | 2 | ++  | +    | -     | -       |
| E组      |   |     |      |       |         |
| 死亡大鼠    | 1 | +   | -    | -     | -       |
| 存活大鼠    | 5 | +++ | ++   | -     | -       |
| 造模后8 wk |   |     |      |       |         |
| A组      | 6 | -   | -    | -     | -       |
| B组      | 6 | -   | -    | -     | -       |
| C组      | 6 | ±   | +    | ±     | ±       |
| D组      | 6 | +   | +    | ±     | ±       |
| E组      | 5 | +   | +    | +     | +       |

2.3 胰腺的免疫荧光观察结果 对照试验中自发荧光对照, 荧光抗体对照和抑制试验均呈阴性. A和D组死亡大鼠未见Cytokeratin 19、胰岛素和胰高血糖素染色呈阳性的细胞. 造模后2 wk, B、C、E和D组存活大鼠掺入损伤胰腺中的MSC均有分化为Cytokeratin 19染色阳性的细胞(表1), 在正常胰腺组织中偶见(图1C), 而在损伤胰腺组织中多见(图1D), 未见胰岛素和胰高血糖

素染色呈阳性的细胞. 造模后8 wk, 胰岛素和胰高血糖素染色呈阳性的细胞在C、D组偶见, E组散见(图1E-F).

### 3 讨论

个体出生后, 组织损伤修复的细胞来源尚无定论. 一种可能的来源是损伤组织内源性的干细胞样祖细胞, 即已有多种组织分离得到的成体组织干细胞, 如神经<sup>[20-22]</sup>、血管<sup>[23-25]</sup>、皮肤<sup>[26-28]</sup>、肝<sup>[29]</sup>、消化道<sup>[30,31]</sup>等. 另一个可能来源是骨髓, 在组织损伤时迁入其中.

受损伤或病变的胰脏如何进行自我修复, 参与胰腺内分泌细胞更新的细胞源自哪里目前还不明确. 2000年发现胰腺干细胞存在的直接证据, 此后分别从胰腺导管上皮、腺泡细胞和胰岛组织中分离得到了具有分化为胰腺多种细胞类型的胰腺干细胞. 美国哈佛大学医学院 Bonner-Weir *et al*<sup>[5,12]</sup>报道, 90%胰腺切除的大鼠, 残存的胰外分泌腺组织可见明显的增殖, 能够形成新的胰岛和胰腺外分泌组织, 提示胰腺存在干细胞或前体细胞, 在特定因素的诱导下, 能够分化成具有特异功能的细胞. 在胰脏的发生中, 外分泌细胞和内分泌细胞来源于具有导管细胞特征的未分化上皮细胞, 说明胰腺导管细胞可能有干细胞的功能<sup>[1]</sup>. Alison *et al*<sup>[2]</sup>从尚未发病的成年非肥胖糖尿病模型小鼠(NOD鼠)胰腺导管上皮细胞诱导分化得到“产生胰岛的干



### ■应用要点

骨髓间充质干细胞在自然情况下,可以参与内胚层来源的组织—胰腺的生理更新和损伤修复。生理情况下,胰腺更新少、慢,主要由胰腺干细胞补充,病理损伤时,自体骨髓间充质干细胞可随血液循环到达损伤的胰腺,并且转化为胰腺干细胞,参与病理修复。

细胞”(islet producing stem cells, IPSCs),这些干细胞已培养了3 a。由IPSCs可诱导分化得到有功能的胰岛组织。Peck *et al*<sup>[11]</sup>成功地从人和小鼠的胰腺导管上皮分离了干细胞,在体外培养条件下能快速增殖,并失去导管上皮细胞特异性的表型,该细胞在合适的条件下可分化形成胰岛的各种内分泌细胞,具有多向分化潜能,被称为胰腺干细胞。他们是一种嗜碱性的单核细胞,直径约8  $\mu\text{m}$ ,呈圆形,细胞核为圆形或肾形,较大,多含2个核仁。染色质细腻而分散,胞质中不含颗粒,在形态上与小淋巴细胞极为相似,但小淋巴细胞体积较小,染色质浓集,核仁不明显且有细胞器。啮齿动物的资料显示,胰腺外分泌组织(包括腺泡和导管)经体外培养可形成与直接分离导管上皮单独培养相似的结果,提示腺泡细胞可能通过逆分化形成导管上皮细胞<sup>[8]</sup>。大鼠的Langerhans胰岛细胞,包括产生胰岛素的 $\beta$ 细胞及位于胰腺导管的内分泌细胞前体分化成新的胰岛细胞,每隔40-50 d便通过凋亡来更新一次,胰岛营养因子如葡萄糖、胰高血糖素样肽作用于小鼠1-48 h便可使胰岛细胞倍增,由此推测胰岛中可能有胰岛前体细胞存在<sup>[2]</sup>。Offield *et al*<sup>[9]</sup>发现在人及大鼠胰腺中还有表达nestin的胰岛前体细胞存在,即nestin阳性胰岛前体细胞(nestin-positive islet-derived progenitor cells, NIPs),并且这种前体细胞还可被诱导分化为胰岛细胞。NIPs不表达导管细胞标志CK19,所以不是导管细胞;也不表达成熟胰岛细胞标志,但表达胰岛细胞早期分化标志PDX-1。在培养时加入HGF/activin A,在2.5 mmol/L葡萄糖浓度下NIPs形成细胞团,并表达胰岛素、胰高血糖素和GLP-1。另外,动物实验还发现,肝脏细胞和胰腺细胞可以在体内互相转变<sup>[12-15]</sup>。如通过将标记蛋白为IV型胰二肽酶(dipeptidase IV of pancreas, DPPIV)的鼠胰腺上皮细胞前体细胞移植到肝或注入到肝门静脉方法,于移植后6 wk和3 mo分别取材检验发现,胰腺上皮细胞前体细胞转变成了肝细胞,表达肝脏特异性蛋白质,细胞完全融入了肝实质中。把鼠肝脏干细胞大量地移植到老鼠的胰管里,3 mo后,肝脏干细胞转变成了胰脏细胞,并能分泌胰脏特有的消化酶,甚至能形成可分泌胰岛素的细胞。TH、Glu T-2、CK19、PDX01、Kit、波形蛋白(vimentin)和Bcl-2等可作为胰腺干细胞的标记物。

现已发现骨髓中至少有两类多能干细胞参与组织修复,即HSC和MSC。HSC除分化产生血

液细胞和免疫细胞外,还分化产生多种非造血组织<sup>[33-36]</sup>。MSC也同样具有多能性,体内外分化产生骨、软骨、脂肪、肌肉、造血基质等<sup>[37-41]</sup>,而且组织损伤可以促进MSC迁入组织<sup>[42]</sup>。现已表明,造血干细胞和MSC可以分化产生三个胚层来源的细胞<sup>[30,38,40,43]</sup>。Ianus *et al*<sup>[16]</sup>通过将雄性带有GFP基因的骨髓移植给雌鼠后发现,骨髓可以掺入胰腺中,并且分化为有功能的内分泌细胞,而且排除该分化不是由细胞融合引起,提示骨髓有可能是胰腺干细胞的另一个居所<sup>[44]</sup>。

雨蛙素诱导的大鼠MAP模型和L-精氨酸诱导的大鼠SAP模型轻重不同,简便、可靠、重复性及可比性好,适合发病机制和治疗学的研究<sup>[18,19]</sup>。腹腔内分次大剂量注射L-精氨酸是新近建立的一种复制重症急性胰腺炎(SAP)的方法<sup>[45]</sup>,可引起胰腺细胞退变或坏死,死亡率在30%以上。

本实验结果表明,在自然情况下,MSC可出现在正常和损伤的胰腺组织中,但在后者中的数量明显多于前者,这与Prockop *et al*<sup>[46]</sup>的研究一致,即组织损伤可以促进骨髓干细胞的迁入,因为损伤部位可能产生迁移因子引导干细胞到达该部位参与组织修复,例如,参与成体神经再生的神经干细胞(NSC)能从侧脑室区到达大脑的受损部位,已经检测到受损部位邻近区域的细胞大量表达BDNF、NT-4/5、NT-3和trkB受体,这些因子和受体是干细胞迁移的诱导因子。TGF $\alpha$ 不但诱导神经干细胞迁移,还诱导神经干细胞的增殖。本实验中SAP组死亡大鼠中MSC细胞掺入数量明显少于存活大鼠,可能与胰腺坏死严重、血液循环障碍有关。GSF预处理组MSC出现在损伤胰腺中的数量最多,可能与GSF骨髓动员有关,使骨髓干细胞数量增加,满足胰腺更新需要。

本实验免疫荧光的结果说明,造模后2 wk, C、E和D组存活大鼠掺入损伤胰腺中的MSC均有分化为Cytokeratin 19染色阳性的细胞,CK19是胰腺干细胞的分化标志之一,是上皮细胞骨架的组成成分,表达在正常上皮和上皮源性肿瘤组织中,在正常骨髓中无表达<sup>[47]</sup>。这表明骨髓来源的干细胞已完成了“本地化”,成为CK19阳性的细胞-胰腺干细胞,作为后续胰腺生理更新和损伤修复的“后备军”,即归巢至损伤胰腺组织的骨髓干细胞已发生部分分化,具有了导管上皮的分化标志。造模后2 wk, C、E和D组未见胰岛素和胰高血糖素染色呈阳性的细胞,

表明骨髓来源的细胞还未成熟为胰岛功能细胞- $\beta$ 和 $\alpha$ 细胞. 究其原因一方面实验周期短, 而损伤首先刺激胰腺自身原有的干细胞的增殖和分化; 另一方面, 已知干细胞的分化是逐步进行的, 先由干细胞分化为祖细胞, 后者再分化为定向祖细胞, 最后由定向祖细胞进行扩增并分化为成熟的功能细胞. 从本实验结果来看, 造模后 8 wk, 胰岛素和胰高血糖素染色呈阳性的细胞在 C、D 组偶见, E 组散见, 提示贮存在胰腺干细胞库中的骨髓来源干细胞可能进入增殖和分化程序, 并最终成为成熟的胰腺功能细胞.

总之, 骨髓间充质干细胞在自然情况下, 可以参与内胚层来源的组织——胰腺的生理更新和损伤修复. 生理情况下, 胰腺更新少、慢, 主要由胰腺干细胞补充, 病理损伤时, 自体骨髓间充质干细胞可随血液循环到达损伤的胰腺, 并且转化为胰腺干细胞, 参与病理修复.

#### 4 参考文献

- 1 Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, Mytinger J, Cao B, Gates C, Wernig A, Huard J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002; 157: 851-864
- 2 Alison MR, Poulosom R, Forbes SJ. Update on hepatic stem cells. *Liver* 2001; 21: 367-373
- 3 Brittan M, Wright NA. Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. *Gut* 2004; 53: 899-910
- 4 Brittan M, Braun KM, Reynolds LE, Conti FJ, Reynolds AR, Poulosom R, Alison MR, Wright NA, Hodivala-Dilke KM. Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion. *J Pathol* 2005; 205: 1-13
- 5 Bonner-Weir S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* 2000; 141: 1926-1929
- 6 Docherty K. Growth and development of the islets of Langerhans: implications for the treatment of diabetes mellitus. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 641-650
- 7 Dickson LM, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E192-E198
- 8 Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000; 6: 278-282
- 9 Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 1996; 122: 983-995
- 10 Street CN, Sipione S, Helms L, Binette T, Rajotte RV, Bleackley RC, Korbitt GS. Stem cell-based approaches to solving the problem of tissue supply for islet transplantation in type 1 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 667-683
- 11 Peck AB, Chaudhari M, Cornelius JG, Ramiya VK. Pancreatic stem cells: building blocks for a better surrogate islet to treat type 1 diabetes. *Ann Med* 2001; 33: 186-192
- 12 Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7999-8004
- 13 Berger A. Transplanted pancreatic stem cells can reverse diabetes in mice. *BMJ* 2000; 320: 736A
- 14 Githens S, Schexnayder JA, Moses RL, Denning GM, Smith JJ, Frazier ML. Mouse pancreatic acinar/ductular tissue gives rise to epithelial cultures that are morphologically, biochemically, and functionally indistinguishable from interlobular duct cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1994; 30A: 622-635
- 15 Githens S, Schexnayder JA, Desai K, Patke CL. Rat pancreatic interlobular duct epithelium: isolation and culture in collagen gel. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; 25: 679-688
- 16 Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; 111: 843-850
- 17 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
- 18 Oruc N, Ozutemiz AO, Yukselen V, Nart D, Celik HA, Yuce G, Batur Y. Infliximab: a new therapeutic agent in acute pancreatitis? *Pancreas* 2004; 28: e1-e8
- 19 Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, Nakamura T, Fujii M, Fujisawa T, Koide M, Otsuki M. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 367-374
- 20 Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10711-10716
- 21 Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-1779
- 22 Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779-1782
- 23 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 938: 221-229
- 24 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-1918
- 25 Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, Kogler G, Wernet P, Muller HW, Kostering M. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1651-1658
- 26 Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone

#### ■名词解释

干细胞: 是一类具有自我更新和向分化增生能力的原始细胞, 能产生表现型和基因型与自己完全相同的子细胞, 既具有生理性的更新能力, 又具有对损伤与疾病导致的反应与修复功能的细胞.

## ■同行评价

题目能准确反映研究工作的内容, 有一定的特色, 而且实验结果有一定的参考价值。

- 27 Korbaling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 346: 738-746
- 28 Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120: 999-1005
- 29 Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 828-838
- 30 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49
- 31 Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001; 153: 1133-1140
- 32 Janes SM, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 479-491
- 33 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234
- 34 Chien KR, Shimizu M, Hoshijima M, Minamisawa S, Grace AA. Toward molecular strategies for heart disease-past, present, future. *Jpn Circ J* 1997; 61: 91-118
- 35 Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001; 50: 521-533
- 36 Peck AB, Yin L, Ramiya V. Animal models to study adult stem cell-derived, *in vitro*-generated islet implantation. *ILAR J* 2004; 45: 259-267
- 37 Johansson CB, Momba S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96: 25-34
- 38 Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001; 128: 5181-5188
- 39 Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarajah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, Wright NA. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 2001; 195: 229-235
- 40 Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000; 6: 1282-1286
- 41 Grompe M. Pancreatic-hepatic switches *in vivo*. *Mech Dev* 2003; 120: 99-106
- 42 Rao MS, Reddy JK. Hepatic transdifferentiation in the pancreas. *Semin Cell Biol* 1995; 6: 151-156
- 43 McLin VA, Zorn AM. Organogenesis: making pancreas from liver. *Curr Biol* 2003; 13: R96-R98
- 44 Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; 8: 607-612
- 45 Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002; 8: 1011-1017
- 46 Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74
- 47 Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-98

电编 张敏 编辑 张海宁



# 白介素与溃疡性结肠炎

□锁堂, 吴焕淦, 施达仁

□锁堂, 吴焕淦, 上海市针灸经络研究所 上海市 200030  
施达仁, 复旦大学附属肿瘤医院 上海市 200032  
国家自然科学基金资助项目, No. 30371806  
上海市重点学科建设项目资助, No. T0302  
通讯作者: □锁堂, 200030, 上海市宛平南路650号 上海市针灸  
经络研究所. KST8663935@tom.com  
电话: 021-54592009  
收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-12-31

## 摘要

近年来对白介素(interleukin, IL)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的研究取得了很大进展, 我们通过总结整理以前有关IL和UC的文献, 概括出IL的产生和在UC发病及病理变化中的作用机制: IL-1直接介导了UC初期阶段炎症的发生; IL-8、IL-6直接促进炎性细胞过度分泌和/或抑制了炎性细胞的凋亡, IL-2分泌减少导致免疫系统内细胞间网络调节失衡, 使局部炎症介质和自由基释放, 引起细胞毒作用, IL主要通过影响机体整体和/或局部免疫系统的功能介导UC的产生, 并与UC的迁延难愈和反复发作有关。

**关键词:** 白介素; 溃疡性结肠炎

□锁堂, 吴焕淦, 施达仁. 白介素与溃疡性结肠炎. 世界华人消化杂志 2006;14(4):405-411

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/405.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种以直肠、结肠黏膜及黏膜下层炎症为特征的慢性非特异性疾病。目前病因尚不十分明确, 虽然有不同的致病诱因, 但却遵循共同的免疫发病机制。其中细胞因子起着不可忽视的作用, 炎症前细胞因子与抗炎细胞因子之间的平衡失调被视为UC的一个重要发病机制, 成为近10 a来UC研究的热点。大量淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞、中性粒细胞均可在UC的结肠黏膜中被检测到, 而上述免疫细胞的功能是受细胞因子的调节。白介素(interleukin, IL)是其中最主要的具有多种生物活性的一组淋巴因子, 并在免疫细胞的发育、分化、免疫应答及某些细胞的激活过程中有重要调节作用。我们从IL在UC中的作用的角度概括

如下, 以资同仁参考。

## 1 IL-1

IL-1是一种具有多种生物活性并能作用于体内多种组织和器官的细胞因子, 他在炎症及免疫反应中起重要的作用。IL-1有两种形式, 即IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ , 前者主要与细胞膜相关, 后者是其分泌形式。两者具有同等的极为广泛的生物活性, 包括: 免疫增强作用(T和B细胞的活化、与其他细胞因子协同作用和促进细胞因子的基因表达)和致炎作用(诱导发热、中性粒细胞增多, 导致花生四烯酸代谢, 胶原酶合成增加等)。目前认为异常的免疫反应或正常免疫调节的破坏是UC发病的重要环节。IL-1被公认为是单核巨噬细胞产生的并能介导UC发病的细胞因子之一, 主要由巨噬细胞释放, 并反作用于巨噬细胞和T淋巴细胞, 促进IL-2、IL-4、IL-8和INF- $\gamma$ 等的释放导致炎症。他可以产生对中性粒细胞等炎症细胞的趋化作用, 吸引其进入肠道病变部位, 从而引起一系列的肠道病变, 如结肠上皮的损伤、小血管炎、隐窝脓肿等, 最终造成UC的发病。

UC的发病不仅涉及系统免疫功能紊乱, 还存在着肠道黏膜局部免疫功能的异常, 而细胞因子参与免疫反应和炎症过程, 特别是IL-1 $\beta$ 在UC的发病中颇受重视。UC患者的结肠黏膜、外周血中IL-1 $\beta$ 表达均增高。IL-1 $\beta$ 是一种主要由单核巨噬细胞产生的重要细胞因子和多肽调节因子, 具有多向生物学效应, 能通过自分泌或旁分泌刺激其他细胞因子和炎症递质的产生, 诱发抗原提呈细胞(APC)表面免疫分子的表达, 为T淋巴细胞的活化提供第二信号, 促进B细胞的增殖、分化、介导免疫球蛋白的分泌, 由此激活补体, 杀伤细胞及吞噬细胞的活性, 增强细胞免疫和体液免疫介导组织损伤的过程。此外, IL-1 $\beta$ 还能促进血管内皮-白细胞黏附分子的表达, 趋化中性粒细胞等炎性细胞进入肠道病变部位, 从而引起一系列肠道炎症反应和组织破坏, 所以IL-1 $\beta$ 的升高程度可以反映疾病的严重程度<sup>[1]</sup>。

## ■背景资料

不同种类IL有不同的生物学作用, 可介导UC的发生, 加重炎症的程度和使其迁延难愈。在这方面理论研究的基础上, 我们现已成立了国家中医药管理局和上海市科委资助的针灸治疗UC的专病专科, 展开临床治疗研究工作。

## ■同行评价

本文全面介绍了白介素的各种不同的因子对溃疡性结肠炎的关系,文献引用广泛,资料也较全,较新,行文流畅,文章结构合理。

石敏 *et al*<sup>[12]</sup> 研究结果表明,在一定程度上, IL-1 $\alpha$ 具有抗体外培养正常人外周血中性粒细胞(PMN)凋亡,从而延长其存活时间的作用,高剂量IL-1 $\alpha$ 延缓PMN凋亡的作用显著,而低剂量的IL-1 $\alpha$ 作用不明显。一般实验中都以低剂量IL-1 $\alpha$ 注入体内产生效应;加之, IL-1 $\alpha$ 仅在炎症疾病中释放入组织,提示IL-1 $\alpha$ 可能只在严重的疾病中延缓PMN的凋亡,而在正常组织中不起作用。但高剂量IL-1 $\alpha$ 在延缓PMN的凋亡的同时,也可能加剧组织的炎症反应。

Wu *et al*<sup>[13]</sup> 研究显示在生理状态下大鼠脾脏、结肠黏膜内未检测出细胞因子,而UC造模大鼠脾脏、结肠黏膜内IL-1 $\beta$ 等炎性细胞因子水平显著提高,这可能是由于在外来抗原的持续刺激下,大鼠的淋巴、单核-巨噬细胞被激活,而促使细胞因子的表达,脾脏、结肠黏膜IL-1 $\beta$  mRNA表达量基本一致。Sawa *et al*<sup>[14]</sup> 实验结果证实,急性炎症期肠上皮细胞中也出现IL-1 $\beta$  mRNA的表达,而炎症慢性化后上皮细胞中的表达消失。推测在炎症的急性期可能存在IL-1 $\beta$  mRNA表达的细胞多源化或表达的部位从黏膜下层细胞向黏膜表层细胞迁移的现象,从而造成了大量IL-1的产生和其在黏膜表层的释放,导致急性炎症。在实验性结肠炎的产生和发展过程中大多数模型动物的黏膜固有层和黏膜下层单核巨噬细胞均可检出IL-1 $\beta$  mRNA的表达,而且在结肠炎急性期IL-1含量及活性均较其他时期增高。这表明IL-1在炎症初始阶段介导了炎症的发生和发展。

钱立平 *et al*<sup>[15]</sup> 研究发现,溃疡性结肠炎组IL-1 $\beta$ 水平显著高于对照组,受累黏膜的IL-1 $\beta$ 显著高于未受累黏膜,后者又显著高于正常组,随着病情的缓解,IL-1 $\beta$ 水平又显著降低,说明IL-1 $\beta$ 确实参与溃疡性结肠炎的发生、发展过程。比较不同病变程度的IL-1 $\beta$ 水平,发现两组间无显著性差别。许多研究资料<sup>[6-7]</sup>发现IL-1的合成与IL-1受体拮抗剂(IL-1RA)之间的平衡决定IL-1对炎症过程的促进作用,IL-1/IL-1RA的比值与疾病的临床严重程度密切相关。有人报道<sup>[8-9]</sup>IL-1RA可以阻断实验性结肠炎动物模型的形成,并存在量效关系,但在炎症形成后再用IL-1RA则不能改变黏膜病理损伤。因此,仅仅检测IL-1 $\beta$ 尚不足以反映溃疡性结肠炎病情程度。

所以, IL-1对UC的发生、发展起决定性的作用,主要表现在: (1)IL-1在炎症初始阶段介导了炎症的发生和发展。(2)通过自分泌或旁分泌

刺激其他的细胞因子和炎症介质的产生,并且相互作用,影响UC病情变化。

## 2 IL-2

IL-2是具有多种生物学活性的淋巴因子,人IL-2是由低亲合力的2种分子组成,其分子量分别为55 ku和75 ku,两者构成的二聚体即为高亲合力的IL-2R复合物。其中, 55 ku的分子可以从活化的T细胞表面脱落,以溶解状态存在,被称为可溶性IL-2R(sIL-2R)。sIL-2R来自膜IL-2受体(mIL-2R)P55蛋白,而非IL-2R的另一种分泌形式,是一种酶将mIL-2R从细胞表面切割下来而成为sIL-2R。但这种酶目前尚未得到实验证实。sIL-2R是一种免疫抑制物,其作用类似封闭因子,能中和T细胞周围的IL-2,减少机体的自分泌效应。高水平sIL-2R还可以影响B细胞的功能和血清Ig浓度,减低NK细胞活性。因而, sIL-2R水平与一些疾病和机体的免疫状态密切相关。IL-2主要由辅助性T淋巴细胞在抗原或有丝分裂原刺激和IL-1诱导下合成分泌,其作为一种重要的细胞因子,与T细胞、B细胞、单核细胞表面的IL-2受体结合后,能引起T细胞活化、增殖,促进细胞毒T细胞的杀伤作用,增强NK细胞活性,促进B细胞分泌等细胞免疫反应,因此在免疫调节方面具有重要意义。

IL-2水平高低从一个侧面反映了宿主T淋巴细胞活化程度及宿主免疫系统清除自身衰老变性细胞、自体变性和损伤细胞方面的能力大小。据报道<sup>[10]</sup>, 溃疡性结肠炎患者产生的IL-2是正常人的1/4-1/3, CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>均下降,而以辅助性T细胞下降更为明显,提示T细胞免疫机制的失调。IL-2水平与T细胞免疫功能呈正相关,IL-2水平降低,T淋巴细胞免疫清除能力减退,导致肠黏膜溃疡的形成。曾有人<sup>[11]</sup>注射IL-2治疗免疫缺陷性疾病,认为IL-2可减少自身抗体的产生,从而减弱自身免疫反应,减轻组织损伤。细胞因子作为一种免疫调节介质,生物学功能的发挥,需与其特异性受体结合后才能实现。IL-2的异常分泌,导致免疫系统内细胞间网络调节失衡,往往伴有特异性的相应受体的异常。朱萱莹 *et al*<sup>[12]</sup> 选用Freund佐剂成功构建了大鼠UC模型,以IL-2R为指标进行定量测定,结果证实UC模型存在IL-2R活性降低,免疫功能处于抑制状态,研究结果显示UC模型大鼠血清中IL-2含量高低与UC有直接关系。邹阳 *et al*<sup>[13]</sup> 实验观察到UC模型大鼠血清IL-2水平比正常大鼠显著

降低, 通过治疗后随着症状体征的好转, IL-2水平显著升高, 说明随着治疗的进行增强了T细胞介导的细胞免疫和体液免疫功能, 减弱自身免疫反应, 从而减轻组织损伤而趋向愈合. 古学文<sup>[14]</sup>研究的结果表明不同时期UC患者其IL-2及sIL-2R水平有很大的差别, 与正常人比较活动期IL-2最低, 缓解期次之; 而sIL-2R则相反, UC患者活动期sIL-2R水平最高, 缓解期次之. 这预示着UC发病机制可能与血清IL-2降低及sIL-2R升高有密切关系, 且IL-2与sIL-2R水平高低与UC病情活动相关.

从以上关于IL-2的研究可看出, UC患者不仅IL-2的合成、分泌发生了异常, 其sIL-2R亦发生了改变. 因此, sIL-2R不仅可作为UC疾病活动性的一种标志, 而且可在某种程度上反映治疗效果. 因而, IL-2在UC中的作用主要是: (1)IL-2的分泌减少而致T淋巴细胞免疫清除能力减退, 导致肠黏膜溃疡的形成. (2)IL-2的活性降低, 导致免疫系统内细胞间网络调节失衡, 机体免疫功能紊乱. (3)测定血清中IL-2含量可作为临床观察UC患者预后的指标之一.

### 3 IL-4

IL-4是T细胞来源的细胞因子, 具有多种生物学功能, 最令人关注的是其抑制炎症的特性. 主要由激活的淋巴细胞合成, 对淋巴细胞和巨噬细胞发挥免疫调节作用. IL-4抑制人巨噬细胞克隆形成及炎症介质TNF或IL-1的释放, 诱导IL-1RA的产生<sup>[15]</sup>. 正常人十二指肠黏膜的淋巴细胞比外周血淋巴细胞能自发地分泌更多的IL-4, 表明IL-4对维持肠道免疫起重要作用. 用表达IL-4的重组人5型腺病毒载体治疗三硝基苯磺酸(TNBS)诱发的结肠炎, 能明显减轻组织损伤<sup>[16]</sup>.

大量研究资料证实IL-4能抑制单核巨噬细胞产生IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ , 能下调活化的单核巨噬细胞分泌氧自由基的能力, 而且存在剂量效应关系. IL-4还能抑制前列腺素E2和IL-8的产生. 而且, IL-4能诱导IL-1RA产生, 提高IL-1RA/IL-1 $\beta$ 的比例<sup>[17]</sup>. 许多体外细胞培养实验发现UC患者的IL-4分泌细胞数减少, IL-4 mRNA表达及蛋白分泌明显减少<sup>[18-20]</sup>. Mittal *et al*<sup>[6]</sup>实验结果显示, UC组IL-4水平显著低于肿瘤组和正常组, 而且受累黏膜显著低于未受累黏膜, 中度UC显著低于轻度UC. 提示IL-4与UC的发病有关, 而且可作为监测疾病程度的一个指标. 此外, UC组未受累黏膜的IL-4水平与正常组黏膜无显著差别,

意味在UC的早期IL-4水平并无变化, 随着IL-4水平的逐渐降低, 其抑制炎症反应的作用减弱, 导致体内自身的免疫稳态遭到破坏, 从而促使疾病的发展. 经药物治疗后, 缓解组与未缓解组间IL-4水平无差别, 说明IL-4不能用于监测疗效. 处于缓解期的患者仍旧存在免疫系统的失衡, 部分解释了UC患者易反复发作的临床特点.

IL-4在UC中的作用主要是: (1)IL-4分泌减少而使炎症介质释放, 形成溃疡. (2)IL-4活性降低, 使单核巨噬细胞分泌氧自由基的能力增强, 自由基对局部组织毒性作用而致溃疡形成.

### 4 IL-5

IL-5主要由CD<sup>+</sup><sub>4</sub>T细胞产生, 诱导B细胞增殖和分化. UC患者肠黏膜固有层T细胞受CD<sub>2</sub>/CD<sub>28</sub>途径刺激产生IL-5较对照LPT细胞少. 通过TCR/CD<sub>3</sub>/CD<sub>28</sub>或CD<sub>2</sub>/CD<sub>28</sub>刺激UC患者炎症黏膜LPT细胞产生IL-5增多, IL-5的分泌增加与IL-4的分泌增加无关, 说明炎症性肠病两种类型的免疫病理过程特征不同, 与不同的细胞因子分泌形式有关.

### 5 IL-6

IL-6作为细胞因子的核心成员, 近年来发现在炎症反应、免疫调节和自身免疫性疾病的发生中起重要的作用. 其促炎性作用包括: (1)促进B细胞活化、增生、分化为浆细胞, 使免疫球蛋白合成增加. (2)促进T细胞增殖、刺激细胞毒性T细胞反应. (3)促进造血干细胞从G<sub>0</sub>期进入G<sub>1</sub>期, 使粒细胞、单核细胞和巨噬细胞增殖. (4)诱导肝细胞生成急性期蛋白. 一系列研究<sup>[21-24]</sup>发现UC患者血清IL-6浓度明显升高, 且与病变范围和病变严重程度呈正相关, 而且UC患者活动期的病变黏膜IL-6的mRNA和蛋白表达较非病变黏膜、感染性肠道炎症对照和正常对照明显升高, 并和炎症分级呈正相关. Street *et al*<sup>[25]</sup>研究发现IL-6和IL-1 $\beta$ 还可能是胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)-胰岛素样生长因子结合蛋白(IGF binding protein, IGFBP)系统的重要调节子, 说明IL-6和IL-1 $\beta$ 不仅可以促进炎症反应参与UC的发生和发展, 而且还可能影响UC患者IGF-IGFBP系统, 导致其生长发育障碍和营养不良.

IL-6 mRNA阳性信号主要分布在巨噬细胞胞质内, 并且其表达的程度和分布随病变的严重性而增强. IL-6可维持机体免疫并参加炎症反



应,促进巨噬细胞、中性粒细胞的分泌、增殖,他的过度表达常导致机体内环境紊乱,诱发或加重某些疾病,他可影响肠上皮细胞电解质分泌特性,使内皮细胞肿胀,通透性增强,使黏附其上的中性粒细胞涌出并浸润至炎症部位.王伟宁 *et al*<sup>[26]</sup>研究用地高辛标记的寡核苷酸探针检测IL-6 mRNA表达情况,发现34例实验组中28例阳性,6例阴性,正常对照组3例阳性,仅表现为少数巨噬细胞阳性,二者有显著性差异,这与国内外报道一致,说明IL-6在UC活动期中表达增强.贾百灵 *et al*<sup>[27]</sup>研究结果显示UC患者血清IL-6水平明显增高,提示IL-6可能参与UC的病理过程.研究还发现血清IL-6水平高低与病情轻重和病变累及的范围有关,病变缓解后血清IL-6水平明显降低,说明测定血清IL-6水平可反映UC病情,并可作为疗效和判断预后的指标之一.

## 6 IL-8

IL-8又称为促炎症因子,主要由单核巨噬细胞产生,其他如成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞等在一定的刺激条件下也可产生IL-8. IL-8的主要生物学活性是吸引和激活中性粒细胞.中性粒细胞与IL-8接触后发生形态变化,定向游走到反应部位并释放一系列活性产物,这些作用可导致机体局部炎症反应,达到杀菌和损伤细胞的目的.此外,IL-8对嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和淋巴细胞也有一定作用. IL-8能使血管通透性增高,现在研究多认为IL-8是UC发生过程中必不可少的炎症介质,无论是在血清、粪便还是组织中,UC患者的IL-8含量均明显增高.王伟宁 *et al*<sup>[26]</sup>研究中发现UC患者IL-8表达水平明显高于正常对照组,IL-8 mRNA阳性细胞在实验组34例中,有27例为阳性,与正常对照组相比,有明显增高,与国外Imada *et al*<sup>[28]</sup>报道一致,且IL-8 mRNA阳性细胞主要位于黏膜层、隐窝脓肿等区域的巨噬细胞内.研究表明<sup>[29]</sup>UC患者肠黏膜组织和血清中IL-8水平与对照组比较均有显著性升高.屠振兴 *et al*<sup>[30]</sup>研究发现UC患者的血清IL-8含量明显高于正常对照组,且随病变范围的扩大和病变程度的增加而呈增加趋势.2级和3级病变者的血清IL-8含量明显高于0级和1级病变者,0级病变者的含量亦明显高于正常对照者.初发和复发病例的血清IL-8含量无显著差异.5-ASA制剂是目前UC治疗的主要药物,经过2 mo的治疗,患者的肠道病变明显改善,血清

IL-8含量亦明显下降.提示IL-8的变化对UC严重程度和疗效的判断有一定指导意义.

IL-8又是一种很强的中性粒细胞趋化因子,他能促进中性粒细胞的溶酶体及超氧阴离子、白三烯及5-羟色胺的释放,通过增加单核细胞黏附分子的表达,增强其游走能力<sup>[31]</sup>.TNF- $\alpha$ 、IL-6等诱发的UC肠道炎症反应在很大程度上是通过诱导产生IL-8为代表的趋化因子所介导<sup>[32]</sup>,因此IL-8在UC炎症反应的持续与放大中起重要作用,UC患者外周血和结肠黏膜中的IL-8依炎症程度而显著增高<sup>[33]</sup>.UC发生后出现多种细胞因子(包括促炎细胞因子和抗炎细胞因子)的变化,与Ishiguro<sup>[34]</sup>和范恒 *et al*<sup>[35]</sup>关于UC形成说法一致:即某些遗传决定因素使易感个体易于患该病,在感染因子或腔内抗原的作用下,刺激黏膜相关淋巴组织,引起上调的T细胞反应,由此激活各种细胞因子的网络,使局部组织产生炎症反应,并不断放大和持续,引起肠壁的损伤和相应的临床表现.Mittal *et al*<sup>[6]</sup>的研究结果发现,UC组的IL-8水平明显高于肿瘤组和正常组,病变黏膜高于未受累黏膜和正常组黏膜,未受累黏膜又高于正常组黏膜. UC组轻度者低于中度者,其差别有显著性.经治疗缓解的UC组IL-8低于未缓解的,差别有显著意义.虽然引起UC的始发因素尚未明确,但细胞因子的水平异常,引起体内免疫反应过强,持续时间过长,是UC发病的一个重要因素.

总之,IL-8在UC中的作用主要是:(1)IL-8直接参与了疾病的炎症程度,并呈正相关.(2)IL-8起了趋化因子的作用,介导了其他炎性细胞发生炎症反应,促使溃疡的形成.

## 7 IL-10

IL-10又名细胞因子合成抑制因子,由TH2细胞、单核细胞和巨噬细胞产生.他的主要免疫调节作用是在mRNA水平上抑制激活的单核细胞、巨噬细胞、T细胞发挥有效功能,如人IL-10能下调活化的单核细胞和巨噬细胞转录分泌IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 和GCSF. IL-10基因剔除小鼠可自发结肠炎,说明IL-10在维持正常肠道黏膜免疫调节中发挥重要作用.而且用IL-10灌肠治疗UC患者,能明显改善肠道炎症,但联合应用抗炎因子如IL-10加IL-4或IL-13比任何单一因子下调激活的单核细胞释放前炎性因子更有效<sup>[17]</sup>.近年一些研究<sup>[36-37]</sup>通过小鼠IL-10基因敲除途径复制UC模型,这提示UC存在IL-10相

对不足. 霍丽娟 *et al*<sup>[38]</sup>实验结果发现未完全成模组大鼠IL-10较成模组高, 有显著性差异. 所以重组IL-10能使半数UC患者进入缓解期, 迅速愈合炎症的黏膜. 大量研究<sup>[30]</sup>表明UC患者结肠黏膜内IL-10含量减少, 治疗后增加, 与人类UC相似. 目前各种针对IL-10的UC免疫治疗在模型动物和临床试验中均取得了良好效果<sup>[39]</sup>.

## 8 IL-13

IL-13是一种抑炎性细胞因子, 由T淋巴细胞、单核细胞或巨噬细胞产生的具有抗炎效应的一种多效性TH2细胞因子, 能抑制脂多糖(LPS)及TNF诱导单核、巨噬细胞产生多种炎症介质, 包括IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、ICAM-1、IL-2等, 下调多种致炎因子, 如IL-1、IL-8、TNF- $\alpha$ 等的表达<sup>[40]</sup>. 有人研究发现<sup>[41-42]</sup>在UC组织黏膜上存在IL-13的表达, IL-13可阻断UC组织的肠上皮细胞和/或单核/巨噬细胞, 可产生大量炎症细胞因子和炎症介质, 如IL-8、NO等, 提示IL-13可能参与UC的炎症反应和病理形成过程. Luger *et al*<sup>[43]</sup>对大肠细胞系Caco-2细胞和分离的大肠黏膜细胞进行培养, 并用IL-1 $\alpha$ 刺激培养的细胞, 结果发现这两类培养细胞均可产生大量的IL-8, 但用IL-13和IL-4作用后再用IL-1 $\alpha$ 刺激培养的细胞, IL-8分泌显著降低. 说明IL-13等抑炎性细胞因子可减轻肠黏膜的炎症反应性, 降低临床活动性. Vainer *et al*<sup>[44]</sup>研究发现, UC患者病变黏膜多核白细胞、淋巴细胞和巨噬细胞等炎症细胞的浸润程度与IL-13浓度有关. 随着炎症细胞浸润程度的加强, IL-13的浓度逐渐降低, 提示UC病变黏膜中IL-13的降低程度与其炎症程度呈平行关系. 同时发现活动期UC患者肠黏膜组织中IL-13浓度和mRNA表达显著降低. 周宇 *et al*<sup>[45]</sup>研究显示重度UC与轻度UC比较, 血浆IL-13浓度显著降低; 活动期UC比静止期UC血浆IL-13浓度也明显降低; 血浆IL-13的浓度与UC的活动性指标C-反应蛋白有显著的负相关. 说明IL-13参与UC的炎症过程, 检测血浆IL-13可作为临床判断UC患者病变严重程度和活动性指标之一.

## 9 IL-17

IL-17是一相对分子质量为20 000-30 000 ku的糖蛋白, 由活化的记忆性T细胞(CD<sup>+</sup><sub>4</sub>CD<sup>+</sup><sub>45</sub>RO<sup>+</sup>)所产生. IL-17是T细胞诱导和促进炎症发生过程中的一种重要的可溶性因子. 他可促进中性粒细胞的发育成熟, 并且刺激上皮细胞、内皮

细胞及纤维母细胞等产生IL-6、IL-8、粒细胞集落刺激因子和PGE2等炎症介质, 增加纤维母细胞表面细胞间黏附分子I的表达. IL-17可刺激巨噬细胞产生IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6和PGE2等<sup>[10]</sup>. 因此, IL-17在炎症发生过程中起重要的调控作用. 研究表明IL-17属Th1细胞因子, 主要由Th1细胞产生, 可促进补体C<sub>3</sub>等急性期反应蛋白的产生, 诱导炎症反应<sup>[46]</sup>. 我们发现UC病变部位的固有层(LP)CD<sup>+</sup><sub>4</sub>T细胞能自发产生大量的IL-17, 这说明UC的免疫病理过程也有Th1介导的细胞免疫参与. 董恩钰 *et al*<sup>[47]</sup>研究发现UC肠道病变部位的肠黏膜固有层单核细胞(LPMC)分泌IL-6和IL-8均明显高于非病变组织, 而且IL-6的浓度与该部位LP CD<sup>+</sup><sub>4</sub>T分泌的IL-17浓度呈正比, 这可能提示局部肠道组织存在的大量IL-17可促进局部炎症性细胞因子的分泌, 从而导致局部肠道炎症的发生<sup>[48-49]</sup>. 为验证这一假设, 他们在病变部位LPMC细胞培养液中加入抗IL-17单抗进行共同培养, 结果发现抗IL-17抗体能明显抑制IL-6和IL-8的产生而且与抗体的剂量有关, 这提示IL-17在肠道炎症性细胞因子的产生过程中起重要作用, 同时也说明阻断IL-17的产生可能是治疗UC的一种有效的新技术.

## 10 IL-18

IL-18又名干扰素- $\gamma$ 诱生因子, 是由Okamura *et al*<sup>[50]</sup>从中毒性休克小鼠肝脏中克隆而得到的一种应激诱生蛋白. IL-18主要由巨噬细胞样细胞产生, 研究表明, 其由非活性的前体形式合成, 经IL-1 $\beta$ 转化酶转化为成熟的IL-18而发挥生物活性. IL-18具有促进IL-1和GM-CSF产生、诱导Th1细胞产生IFN- $\gamma$ 、诱导TNF- $\alpha$ 和多种趋化因子的基因表达与蛋白质合成等多种生物学功能, 还作为炎症前细胞因子(preinflammation cytokine), 参与多种免疫性疾病的发生. 从UC患者的肠黏膜中可检测到IL-18 mRNA的表达, 且IL-18阳性细胞主要集中于固有层单个核细胞(尤其是巨噬细胞、树突状细胞)和肠上皮细胞; 分泌IL-18的细胞呈弥漫性分布, 主要位于溃疡底部、黏膜表面、隐窝脓肿中. UC的发病与免疫系统调节功能紊乱有关, 在与免疫系统激活相关的炎症性疾病中往往可出现高水平的血清IL-18.

还有人<sup>[51-52]</sup>研究显示UC活动期患者血清IL-18异常增高, 在UC缓解期IL-18仍处于高水平, 推测与UC存在不同程度的免疫激活状态,

激活的巨噬细胞表达或分泌IL-18增多有关。提示血清中IL-18的含量可作为观察UC患者病情的发展和判断预后的重要指标之一;在UC缓解期机体免疫功能仍处于紊乱状态,继续治疗十分必要,对防止UC复发有极其重要意义;同时也提示在今后UC治疗中应注意抑制IL-18的过多产生、释放,以有效地消除肠道慢性炎症,防止UC复发。用抑制巨噬细胞增殖浓度的抗IL-18单抗,有望为顽固性UC的免疫治疗提供新方法。

总之,IL在UC中主要作用有:(1)当其分泌增加时:直接介导了UC初期阶段炎症的发生,主要是IL-1起促炎作用;介导其他细胞因子释放,直接促进炎性细胞过度分泌和/或抑制了炎性细胞的凋亡,引起局部组织毒性反应,这主要是IL-8分泌增加引起的;影响肠上皮细胞电解质分泌紊乱,介导了其他炎性细胞发生炎性反应,主要是IL-6分泌增加引起的。(2)当其分泌减少时:导致免疫系统内细胞间网络调节失衡,使局部炎症介质和自由基的释放,引起细胞毒作用,主要由IL-2分泌减少所引起;抑制炎症反应作用降低,使致炎细胞因子分泌表达增加,主要是IL-4分泌减少所致。IL的分泌减少和增加,最终导致机体和/或局部免疫系统功能紊乱、肠道功能失调,产生炎症和/或毒性反应,形成溃疡,发生UC。当形成UC后继发IL-13, IL-18, IL-17的分泌增加, IL-10的分泌减少,从而造成促炎和抑炎因子之间的平衡紊乱,产生恶性循环,导致UC迁延难愈。IL在UC发病与治疗中的作用是相当复杂的,还需进一步研究,以期找到UC发病的微观病因,为临床治疗提供客观依据。

## 11 参考文献

- Ashwood P, Harvey R, Verjee T, Wolstencroft R, Thompson RP, Powell JJ. Functional interactions between mucosal IL-1, IL-18 and TGF-beta 1 in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2004; 53: 53-59
- 石敏, 吴曙光. 白细胞介素1 $\alpha$ 对多形核白细胞凋亡的抑制作用. *中国药理学通报* 2000; 16: 455-458
- Wu HG, Liu HR, Zhao C, Zhang W, Wu XF, Zhou S, Shi Y, Liu M. Study on differentially expressed genes of ulcerative colitis in the rat treated by herbs-partitioned moxibustion. *Zhongguo Zhenjiu* 2005; 25: 359-365
- Sawa Y, Oshitani N, Adachi K, Higuchi K, Matsumoto T, Arakawa T. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003; 11: 175
- 钱立平, 徐三荣, 林庚金, 丁伟群. 溃疡性结肠炎发病中白介素水平的变化. *复旦学报(医学科学版)* 2001; 28: 330-335
- Mittal RD, Bid HK, Ghoshal UC. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism in patients with inflammatory bowel disease in India. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 827-831
- Ludwiczek O, Vannier E, Borggraefe I, Kaser A, Siegmund B, Dinarello CA, Tilg H. Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: relationship to severity of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 323-329
- Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 204-209
- Ishizuka K, Sugimura K, Homma T, Matsuzawa J, Mochizuki T, Kobayashi M, Suzuki K, Otsuka K, Tashiro K, Yamaguchi O, Asakura H. Influence of interleukin-10 on the interleukin-1 receptor antagonist/interleukin-1 beta ratio in the colonic mucosa of ulcerative colitis. *Digestion* 2001; 63: 22-27
- Monteleone G, MacDonald TT. Manipulation of cytokines in the management of patients with inflammatory bowel disease. *Ann Med* 2000; 32: 552-560
- Tang Y, Zhu JB, Cheng DS, Zhang Y, Cao SQ, Zhou B. Anti-inflammatory effects and immunomodulatory effects of interleukin-2. *Pharmaceutical Biotechnology* 2004; 11: 173-177
- 朱莹莹, 沈洪, 施荣山, 邱召娟. 肠安胶囊治疗大鼠免疫性溃疡性结肠炎的实验研究. *中国中医药科技* 2002; 9: 19-21
- 邹阳, 王兴友, 杨孝芳. 溃疡性结肠炎大鼠IL-2、CD44、CD54的实验研究. *江西医学检验* 2002; 20: 281-283
- 古学文. 溃疡性结肠炎患者血清IL-2及SiL-2R浓度变化的研究. *临床和实验医学杂志* 2003; 2: 153-158
- Katz Y, Nadiv O, Rapoport MJ, Loos M. IL-17 regulates gene expression and protein synthesis of the complement system, C3 and factor B, in skin fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 22-29
- 郭晓东, 关庆. 增加味四逆散对溃疡性结肠炎肝郁大鼠模型血清IL-4 IL-10的影响研究. *中医药学刊* 2004; 22: 659-662
- 丁晓刚. 黄芩汤有效成分对方大鼠实验性溃疡性结肠炎的免疫调节作用. *中医药学刊* 2003; 21: 126-127
- Ten Hove T, The Olle F, Berkhout M, Bruggeman JP, Vyth-Dreese FA, Slors JF, Van Deventer SJ, Te Velde AA. Expression of CD45RB functionally distinguishes intestinal T lymphocytes in inflammatory bowel disease. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 1010-1015
- Berrebí D, Languetin J, Ferkadadi L, Foussat A, De Lagausie P, Paris R, Emilie D, Mougenot JF, Cezard JP, Navarro J, Peuchmaur M. Cytokines, chemokine receptors, and homing molecule distribution in the rectum and stomach of pediatric patients with ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37: 300-308
- Schmit A, Van Gossum A, Carol M, Houben JJ, Mascart F. Diversion of intestinal flow decreases the numbers of interleukin 4 secreting and interferon gamma secreting T lymphocytes in small bowel mucosa. *Gut* 2000; 46: 40-45
- Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005; 28: 187-196
- Kitamura K, Nakamoto Y, Kaneko S, Mukaida N. Pivotal roles of interleukin-6 in transmural inflammation in murine T cell transfer colitis. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 1111-1117
- 邓长生. 溃疡性结肠炎患者白细胞介素-6活性研究. *中*



- 华消化杂志 2001; 21: 223-225
- 24 Raddatz D, Bockemuhl M, Ramadori G. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 547-557
  - 25 Street ME, de'Angelis G, Camacho-Hubner C, Giovannelli G, Ziveri MA, Bacchini PL, Bernasconi S, Sansebastiano G, Savage MO. Relationships between serum IGF-1, IGFBP-2, interleukin-1beta and interleukin-6 in inflammatory bowel disease. *Horm Res* 2004; 61: 159-164
  - 26 王伟宁, 张熙纯, 刘丽. 活动期溃疡性结肠炎发病机制的免疫学探讨. 中国现代医学杂志 2003; 13: 74-78
  - 27 贾百灵, 侯晓华. 白细胞介素-6与溃疡性结肠炎的关系. 胃肠病学和肝病学杂志 2004; 13: 220-221
  - 28 Imada A, Ina K, Shimada M, Yokoyama T, Yokoyama Y, Nishio Y, Yamaguchi T, Ando T, Kusugami K. Coordinate upregulation of interleukin-8 and growth-related gene product-alpha is present in the colonic mucosa of inflammatory bowel. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 854-864
  - 29 Tsukada Y, Nakamura T, Iimura M, Iizuka BE, Hayashi N. Cytokine profile in colonic mucosa of ulcerative colitis correlates with disease activity and response to granulocytapheresis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2820-2828
  - 30 屠振兴, 李兆申, 许国铭, 龚燕芳, 张文俊. 血清白细胞介素-8与溃疡性结肠炎的关系. 胃肠病学 2002; 7: 277-279
  - 31 Indaram AV, Visvalingam V, Locke M, Bank S. Mucosal cytokine production in radiation-induced proctosigmoiditis compared with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1221-1225
  - 32 田力, 黄裕新, 闻勤生, 李艳梅, 赵海峰, 王庆莉. 电针治疗溃疡性结肠炎模型大鼠的作用机制. 世界华人消化杂志 2002; 10: 916-921
  - 33 范恒, 邱明义, 杨胜兰, 梅家俊, 沈关心, 刘松林. 理肠方对溃疡性结肠炎大鼠观察. 中国中西医结合杂志 2004; 12: 155
  - 34 Ishiguro Y. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1999; 34: 66-74
  - 35 范恒, 邱明义, 梅家俊, 沈关心, 刘松林. 理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠组织细胞因子TNF- $\alpha$  IL-6 IL-8 IL-10的影响. 中医药学刊 2004; 22: 1624-1628
  - 36 Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10(-/-) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G829-G833
  - 37 Bene L, Sapi Z, Bajtai A, Buzas E, Szentmihalyi A, Arato A, Tulassay Z, Falus A. Partial protection against dextran sodium sulphate induced colitis in histamine-deficient, histidine decarboxylase knockout mice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39: 171-176
  - 38 霍丽娟, 赵和平. 实验性溃疡性结肠炎大鼠模型的研究. 山西医科大学学报 2004; 35: 467-470
  - 39 Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 620-625
  - 40 Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497
  - 41 Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hilenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129: 550-564
  - 42 Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005; 206: 296-305
  - 43 Luger N, Kucharzik T, Kraft M, Winde G, Sorg C, Stoll R, Domschke W. Interleukin (IL)-13 and IL-4 are potent inhibitors of IL-8 secretion by human intestinal epithelial cells. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 649-655
  - 44 Vainer B, Nielsen OH, Hendel J, Horn T, Kirman I. Colonic expression and synthesis of interleukin 13 and interleukin 15 in inflammatory bowel disease. *Cytokine* 2000; 12: 1531-1536
  - 45 周宇, 叶文桃, 麦海妍, 郭汉城, 王翠霞. 白介素13和一氧化氮在溃疡性结肠炎的作用及意义. 胃肠病学和肝病学杂志 2004; 13: 319-322
  - 46 Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J Immunol* 1999; 162: 1246-1251
  - 47 董恩钰, 王晓娣. 白介素-17在溃疡性结肠炎表达的研究. 中华消化杂志 2001; 21: 673-877
  - 48 Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 65-70
  - 49 Nielsen OH, Kirman I, Rudiger N, Hendel J, Vainer B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 180-185
  - 50 Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nakada Y, Hattori K. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995; 378: 88-91
  - 51 张玲英, 杨明清, 游自立, 张丁丁. 溃疡性结肠炎患者血清IL-18的变化及意义. 现代中西医结合杂志 2002; 11: 586-589
  - 52 张维, 赵志泉, 刘平, 张红杰. IL8、TNF  $\alpha$ 在Hp感染中的作用研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2000; 9: 270-273

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

# 中药治疗急性胰腺炎的主要机制与作用的实验研究进展

张喜平, 王英

## ■背景资料

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床上常见的急腹症, 其治疗一直是医学领域的一大难题. 中医药是祖国的宝库, 开发和利用中药是中华民族的优势. 近年来不少实验研究证实中药对AP有治疗作用, 能明显改善AP的预后. 中药在AP治疗中的介入, 使AP的并发症的发生率、死亡率等明显下降. 中药相对西药而言具有价格便宜、多靶点作用、毒副作用少等诸多优势, 用于治疗AP有很好的前景.

张喜平, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006  
王英, 浙江中医学院 浙江省杭州市 310053  
浙江省中医药卫生计划项目, No.2003C130、No.2004C142  
杭州市重大科技计划项目, No.2003123B19  
杭州市医药卫生重点项目, No.2004Z006  
浙江省医药卫生科技计划项目, No.2003B134  
杭州市科技计划项目, No.2005224  
杭州市医药卫生科技项目, No.2003A004  
通讯作者: 张喜平, 310006, 浙江省杭州市第一人民医院普外科.  
zxp99688@vip.163.com  
电话: 0571-87065701  
收稿日期: 2005-12-08 接受日期: 2005-12-24

## 摘要

急性胰腺炎(AP)是临床上常见的急腹症, 多数为自限性疾病, 少部分患者的病情可能恶化, 并出现器官衰竭或局部并发症, 发展成为重症急性胰腺炎(SAP). 近年来随着人们饮食结构的改变, 胆石症发病率的增高, AP患者数目相对增多, 但AP的发病机制至今尚未完全阐明. 近年来由于对该病认识的不断深入, 外科手术的诸多弊端, 及中药在AP治疗中显示出的独特疗效, 使中药辅助疗法被普遍重视. 我们针对中药治疗AP的主要机制与作用的实验研究进展进行综述, 旨在帮助人们认识中药的多靶点治疗作用和良好的疗效, 促进中药在AP治疗中的普及和推广.

**关键词:** 急性胰腺炎; 中药; 治疗; 机制; 实验研究

张喜平, 王英. 中药治疗急性胰腺炎的主要机制与作用的实验研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(4):412-416  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/412.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床上常见的急腹症, 其发病机制尚未完全明确, 其治疗一直是医学领域的一大难题. 近年来不少实验研究证实中药对AP有治疗作用, 能明显改善AP的预后. 现将中药治疗AP的主要机制与作用的实验研究进展作一综述.

## 1 抑制胰酶

在胰腺炎发病机制中, 各种因素致胰酶激活, 而引起胰腺自身消化仍是AP的发生乃至发展

的核心. 与AP发病相关的胰酶有很多种(胰蛋白酶、弹性蛋白酶、脂酶、淀粉酶、糜蛋白酶、溶酶体酶等), 而关于中药对胰蛋白酶、淀粉酶的作用研究比较多. 很多研究显示单味大黄能抑制胰淀粉酶的分泌<sup>[1-4]</sup>; 我们最近的研究也显示大黄素和黄芩素联用可加强其抑制胰淀粉酶的作用<sup>[5]</sup>. 刘金彪 *et al*<sup>[6]</sup>的研究显示七叶皂甙钠治疗组6 h和12 h腹腔渗液淀粉酶、血清淀粉酶与对照组比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 陈爱华 *et al*<sup>[7]</sup>认为大剂量芸香苷(120 mg/kg)和中剂量芸香苷(60 mg/kg)能降低血清淀粉酶含量, 减轻胰腺损害.

## 2 抑制炎症介质

2.1 抑制炎症细胞因子的过度表达 在AP发病机制的各种学说中, "细胞因子学说"占有重要地位. 与AP相关的致炎性细胞因子主要有肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)等. 炎症细胞因子的过度表达在重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的发病过程中起重要的作用<sup>[8-13]</sup>, 检测血清各炎症细胞因子的浓度变化可作为判断AP严重程度的指标, 其水平与疾病的严重程度、病死率和预后呈明显正相关<sup>[14]</sup>. 大量实验表明, 很多中药可通过降低血中上述细胞因子水平而减轻胰腺病理损伤, 对AP起到治疗作用. 大黄能显著降低血液、腹水中的IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 的含量<sup>[2,4,15,16]</sup>; 雷公藤多甙能强烈抑制单核细胞产生IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 和抑制吞噬细胞的产生<sup>[17,18]</sup>; 丹参可降低血清IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 水平<sup>[19,20]</sup>; 白藜芦醇能抑制SAP模型大鼠血清IL-6、TNF水平<sup>[21]</sup>; 七叶皂甙钠治疗组6 h和12 h TNF- $\alpha$ 与对照组比较差异有显著性意义<sup>[6]</sup>. 汉防己甲素对炎症细胞因子合成的阻断作用的机制可能与降低白细胞cPKC- $\alpha$ 活性, 继而影响钙超载-cPKC- $\alpha$ 活化-NF- $\kappa$ B活化通路有关<sup>[22]</sup>.

2.2 清除氧自由基 近年来大量实验研究证实AP的发病机制与氧自由基所致的损伤有关<sup>[23-26]</sup>. 丙二醛(MDA)是机体通过酶系统和非酶系统产生

氧自由基, 攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化而形成的脂质过氧化物; MDA含量的高低可间接反应机体细胞受氧自由基攻击的严重程度. 超氧化物歧化酶(SOD)对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用, 此酶能清除超氧阴离子自由基, 保护细胞免受损伤. SOD活力的高低能间接反应机体清除氧自由基的能力. 秦大莲 *et al*<sup>[27]</sup>、张铁 *et al*<sup>[28]</sup>、陈海平 *et al*<sup>[29]</sup>的实验研究分别显示粉防己碱、丹参、大黄能通过降低血中损伤性因子MDA含量, 升高保护性因子SOD含量对AP起治疗作用. 对川芎嗪的实验研究, 同样显示其对SAP的治疗作用与其清除氧自由基有关<sup>[30,31]</sup>. 毛卫 *et al*<sup>[32]</sup>发现栀子能减轻SAP时氧自由基及其级联反应对机体造成的损伤.

**2.3 调节一氧化氮(NO)的释放** NO是一种很强的生物活性物质, 其主要作用是传递信息、舒张血管和细胞毒作用. 刘建生 *et al*<sup>[33]</sup>研究显示, AP时血浆NO明显高于正常组, Chen *et al*<sup>[34]</sup>发现, 在诱发AP之前, 使用NO合成酶抑制剂可明显减轻微循环障碍, 且黏附白细胞数与NO水平呈明显正相关, 均认为血浆NO的异常变化是AP发生、发展的主要因素之一. L-精氨酸是NO唯一的供体, 其小剂量能松弛血管平滑肌, 增加毛细血管内皮细胞, 抑制血小板聚集, 阻止白细胞对血管内皮的黏附, 减轻组织炎症, 降低水肿程度<sup>[35]</sup>, 对胰腺有保护作用; 剂量较大时, NO浓度升高对胰腺会有损害<sup>[36]</sup>, 导致多种损伤. 范学良 *et al*<sup>[37]</sup>观察了去氧胆酸钠复制的SAP大鼠血浆NO的变化以及中药大黄、丹参对其影响, 结果表明SAP过程中NO的产生明显增加, 并随病情进展呈上升趋势, 丹参对此有抑制作用. 大黄对SAP时的NO产生则显示出先促进、后抑制的双向作用. 熊进文 *et al*<sup>[38]</sup>的实验显示, 三七总甙对SAP时的NO具有抑制作用, 对SAP有显著的治疗作用.

### 3 改善微循环

微循环障碍是AP的重要发病因素之一<sup>[39]</sup>, 胰腺微循环障碍发生在SAP早期, 胰腺缺血是导致胰腺坏死的始动因素和病变加重的原因<sup>[40]</sup>. 大黄能够通过改善胰腺微循环治疗SAP<sup>[3,41]</sup>. 川芎嗪对SAP的治疗作用也同其稳定TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>的平衡有关<sup>[42]</sup>. 陈爱华 *et al*<sup>[7]</sup>的实验显示芸香苷对AP具有保护作用, 其治疗AP的作用与其抑制PLA<sub>2</sub>、逆转AP过程中的血液流变学异常, 改善微循环障碍有关. 目前对丹参的实验研究比较

多: 丹参可通过调节SAP大鼠脂质炎症介质的代谢, 减少TXA<sub>2</sub>的产生和扩张胰腺微血管, 改善胰腺的血供, 减轻胰腺损伤而起到治疗作用<sup>[43]</sup>. 沙建平 *et al*<sup>[44]</sup>的研究显示丹参改善微循环的作用与其降低黏附分子CD11a/CD18、CD11b/CD18表达有关; 赵晓姜 *et al*<sup>[45]</sup>发现, SAP犬的血液流变性紊乱、炎性介质PAF升高和血管活性物质TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>和ET/NO的平衡失调导致的血循环障碍, 对SAP发生和发展起重要的作用, 复方丹参可通过改变SAP血液流变性、降低PAF的产生和调节TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>和ET/NO的平衡而改善其预后. SAP可并发多脏器的损伤, 丹参对SAP并发胃黏膜、肺脏、肾脏微循环障碍均有改善作用<sup>[46-48]</sup>.

### 4 诱导胰腺腺泡细胞凋亡

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主有序的死亡, 是一种清除不需要的和受创后不能恢复的细胞的生命过程. 胰腺腺泡细胞的凋亡是一种自身保护机制, 机体通过将坏死转化为凋亡以减轻炎症反应. 有研究显示, 在SAP中, 胰腺腺泡细胞的凋亡与胰腺炎的严重程度呈负相关, 诱发胰腺腺泡细胞的凋亡可以减轻胰腺炎的严重程度<sup>[49-55]</sup>. 紫杉醇具有较强的诱导胰腺腺泡上皮细胞凋亡的能力, 在较低剂量范围内紫杉醇可以通过诱导腺泡细胞凋亡的增多, 减轻胰腺炎的严重程度. 但在较高剂量范围内, 紫杉醇可以加重胰腺炎的严重程度<sup>[56]</sup>. 吴彪 *et al*<sup>[57]</sup>的研究显示, 川芎嗪可促进AP大鼠胰腺腺泡细胞的凋亡, 有利于胰腺炎的预后. 余少鸿 *et al*<sup>[16]</sup>也从实验中得出大黄素可诱导已受损的不可恢复的腺泡细胞凋亡, 从而改善大鼠SAP的病情发展. 从凋亡信号传导角度探讨, 单味大黄以及茵陈承气汤对实验性AP的治疗机制, 可能与其诱导凋亡, 调控Bax基因表达增强有关<sup>[58,59]</sup>, 而银杏叶提取物金纳多对胰腺细胞凋亡的抑制可能与其上调凋亡调控基因Bcl-2的表达有关<sup>[60]</sup>.

### 5 阻止钙内流

Ca<sup>2+</sup>在AP发病机制中有非常重要的作用, Ca<sup>2+</sup>与胰蛋白酶原活性肽结合, 可使胰蛋白酶原活化<sup>[61,62]</sup>, PLA<sub>2</sub>通过Ca<sup>2+</sup>的激活破坏膜磷脂, 产生花生四烯酸和PAF, 前者经脂氧化酶及环氧化酶作用生成白三烯、血栓素、前列素等物质进而引起器官损害. 钙超载参与AP的发生与发展, 并且促使大鼠由水肿性胰腺炎向坏死性胰

■研究前沿  
本文重点探讨中药在AP治疗各主要环节的作用机制.



## ■创新盘点

在临床上很多治疗AP行之有效的中药的作用机制尚不明确,不少机制还要通过实验研究验证。本文针对中药治疗AP的主要机制与作用的研究进展进行综述,总结了有关方面新近研究成果,旨在帮助人们认识中药的多靶点治疗作用和良好的疗效,促进中药在AP治疗中的普及和推广。

腺炎转变<sup>[63]</sup>。余晓兵 *et al*<sup>[64]</sup>、王兴鹏 *et al*<sup>[65]</sup>的研究分别表明丹参、川芎嗪对AP大鼠胰腺细胞的保护作用与其抑制钙离子内流等作用有关。余晓兵 *et al*<sup>[64]</sup>用丹参治疗SAP大鼠,结果显示丹参对实验性SAP的治疗作用,与其通过Ca<sup>2+</sup>阻滞作用,抑制了神经元突触后神经递质SP的分泌释放,继而减少胰淀粉酶的分泌,减轻胰腺组织的"自身消化"损伤有关。

## 6 抑制肠道细菌移位

多数学者认为AP后期继发的感染是细菌移位所致,可能与正常肠道内寄生菌群的生态紊乱、某些细菌的过度繁殖、机体的免疫防御机能受到损害及肠黏膜屏障功能破坏和内毒素血症因素有关<sup>[66,67]</sup>。邓群 *et al*<sup>[68]</sup>发现, SAP发病早期肠道菌群即出现紊乱,大肠杆菌、肠杆菌和类杆菌数量呈几何级数增长,生物屏障的保护作用被削弱。大黄通过促进肠运动,能防治SAP时的细菌移位,避免胰腺感染,改善SAP的预后<sup>[69]</sup>。吴承堂 *et al*<sup>[70,71]</sup>认为中药清胰汤可明显减轻SAP的病理和病理生理损害,调整菌群失调,保护肠屏障功能,对防治SAP后肠道细菌移位和肠源性感染具有重要作用。甘遂能增强胃肠道平滑肌张力,促进胃肠道蠕动,阻碍细菌、内毒素移位,降低血液中的内毒素水平<sup>[72]</sup>。此外,三七总苷也可以显著降低SAP大鼠肠道细菌的移位率,从而使生存率明显提高<sup>[73]</sup>。

## 7 保护胰外器官

AP晚期并发多器官功能障碍是其死亡率高的原因之一。李雷 *et al*<sup>[74,75]</sup>探讨了生脉注射液、丹参注射液对SAP早期多器官组织脂质过氧化的影响及其作用机制,研究结果显示在SAP的早期,生脉注射液组大鼠胰、心、肺、肾组织中MDA含量均显著低于模型组,肝组织中MDA含量生脉组与模型组未见明显差异,且肾的病理学损害较模型组明显减轻,表明生脉注射液具有抗SAP早期多器官组织脂质过氧化的作用,以胰腺、心、肺、肾尤为明显,并可明显减轻肾的病理学损害;而其对丹参注射液的研究则显示丹参注射液能升高胰、心、肝肾等组织的SOD活性,降低胰、肝、肾组织的MDA水平,表明丹参提高SAP多器官组织SOD活性而减轻组织脂质过氧化以胰、肝、肾为主。

7.1 保护肺脏 SAP时的微循环障碍是胰腺及胰外器官损害的重要原因之一,而肺脏又是最易受累的胰外器官<sup>[76]</sup>,丹参<sup>[47]</sup>可通过改善微循环

保护肺脏。除微循环障碍外,炎症介质也参与了SAP肺损伤,川芎嗪可抑制SAP大鼠内皮素生成,促进前列环素产生,稳定内皮素及前列环素平衡,从而对合并肺损伤的SAP大鼠起治疗作用<sup>[77]</sup>。

7.2 保护肝脏 有实验证明, AP时在体内脏器受损的发展过程中,肝脏的损害发生最早,发生率高,肝脏损害严重,肝细胞损害的程度与胰腺炎的程度呈正相关<sup>[78]</sup>,肝脏功能是否正常直接影响到远处器官是否受损。李勇 *et al*<sup>[79]</sup>的实验显示血浆IL-6、氧自由基在AP合并肝损伤中明显升高,起损伤作用,而SOD明显降低,其保护作用减弱,川芎嗪能降低IL-6的表达、减少氧自由基的产生而改善微循环,保护细胞钙稳态,使胰腺、肝脏的损伤减轻。另外,刘金彪 *et al*<sup>[80]</sup>通过对AP大鼠静脉注射七叶皂苷钠,测定各组肝组织内能荷及ATP的含量、血清乳酸脱氢酶、谷丙转氨酶和血清蛋白含量等各项指标,并观察胰腺和肝组织的病理变化,结果显示治疗组较AP模型组肝组织内细胞能荷及ATP的含量高,肝功能损害轻,表明七叶皂苷钠减轻胰腺组织损伤的同时,也具有对抗AP时肝脏损伤的作用。

7.3 保护肾脏 SAP常并发多器官功能障碍,其胰外器官损伤中肾功能障碍(胰性肾病)发生率约14%-43%,发展至急性肾功能衰竭后死亡率高达71%-84%<sup>[81]</sup>。SAP肾损害的主要形态学改变表现为不同程度的肾小管上皮细胞变性(主要为水样变性)、坏死,肾小球淤血、缺血,肾小管内出现蛋白管型或红细胞管型,以及中性粒细胞的浸润。由于肾脏的病理形态学变化,导致肾功能损害,成为SAP早期死亡的主要原因。张建新 *et al*<sup>[48]</sup>发现SAP大鼠制模后2 h,丹参治疗组较胰腺炎组肾组织中性粒细胞减少( $P<0.001$ ),12 h后肾组织中性粒细胞浸润明显减少( $P<0.001$ ),2 h及12 h肾组织学损害均明显减轻( $P<0.05$ ),显示丹参对SAP肾损害具有一定的干预作用。

## 8 促进胰腺细胞再生

楼恺娴 *et al*<sup>[82]</sup>通过分析中药大黄素对大鼠AP治疗前后胰腺组织细胞转化因子 $\beta_1$ (TGF $\beta_1$ )的表达、DNA合成及总蛋白含量的影响,从胰腺再生角度探讨大黄素治疗AP的作用机制,认为其机制可能是通过诱导细胞因子TGF $\beta_1$ 基因表达增强,调控细胞增殖和分化,刺激多种细胞外基质成分合成,增加胰组织DNA合成和蛋白含量,参与胰腺细胞修复、再塑过程。

总之, 中药在AP治疗中的介入, 使AP的并发症的发生率、死亡率等明显下降. 中药相对西药而言具有价格便宜、多靶点作用、毒副作用少等诸多优势, 用于治疗AP有很好的前景. 目前, 在临床上很多治疗AP行之有效的中药的作用机理尚不明确, 不少机制还要通过实验研究验证. 因此, 加大对中药治疗AP基础研究的投入, 为很多学者所期盼.

## 9 参考文献

- 1 陈思曾, 林永. 细胞因子与急性胰腺炎病理变化之间关系的研究. 福建医药杂志 2001; 23:10-11
- 2 王昌成, 马兴刚, 徐淮, 朱九成, 王建营, 陈刚英. 血清IL-6、IL-8和TNF- $\alpha$ 在早期诊断重症急性胰腺炎中的价值. 中华急诊医学杂志 2001; 10:252-253
- 3 刘晓红, 赵雪卿, 钱家鸣. 大黄对大鼠急性出血性胰腺炎的影响. 中华消化杂志 2004; 24: 14-17
- 4 Zhao YQ, Liu XH, Ito T, Qian JM. Protective effects of rhubarb on experimental severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1005-1009
- 5 Zhang XP, Li ZF, Liu XG, Wu YT, Wang JX, Wang KM, Zhou YF. Effects of emodin and baicalin on rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2095-2100
- 6 刘金彪, 张鸿日, 刘胜春. 七叶皂甙钠治疗重症急性胰腺炎的实验研究. 河南科技大学学报(医学版) 2004; 22: 3-4
- 7 陈爱华, 司力, 赵维中, 马燕, 陈志武. 芸香苷对急性胰腺炎大鼠血液流变学的影响. 中国药理学通报 2004; 20: 685-689
- 8 De Beaux AC, Ross JA, Maingay JP, Fearon KC, Carter DC. Proinflammatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells from patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 1996; 83: 1071-1075
- 9 郝建宇, 朱佐民, 杨昭徐. 白介素在大鼠急性胰腺炎中的变化. 北京医学 2001; 23: 31-33
- 10 周峰, 王春友. 大鼠急性胰腺炎严重程度与细胞因子表达水平的相关性研究. 中华实验外科杂志 2001; 18: 376
- 11 林瑶光, 覃锦耀, 陈远能, 王瑛, 陆光润. 重症急性胰腺炎血清IL-6、IL-8和T细胞亚群的变化及临床意义. 医师进修杂志 2001; 24: 26-27
- 12 吴泽建, 张阳德, 雷正明, 余少鸿. 大鼠急性坏死性胰腺炎外周血中的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 浓度的动态测定及意义. 中国现代医学杂志 2003; 13: 23-25
- 13 Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175: 76-83
- 14 倪弘, 崔乃强, 吴咸中, 李继坤, 李学杰, 张凤云, 房洁. 大黄对急性胰腺炎大鼠早期的治疗作用. 中国中西医结合外科杂志 1997; 3: 314-316
- 15 黄华, 邹志森. 大黄对急性胰腺炎炎症反应的影响. 海南医学 2003; 14: 67-68
- 16 余少鸿, 雷正明, 张培明, 陈永兵. 大黄素对大鼠重症胰腺炎TNF- $\alpha$ 、IL-6及胰腺腺泡细胞凋亡的影响. 中国中西医结合外科杂志 2003; 9: 209-211
- 17 金忱, 倪泉兴, 张延龄. 雷公藤多甙对急性坏死性胰腺炎免疫调节作用的实验研究. 中华普通外科杂志 2000; 15: 283-285
- 18 王翠娣, 郭玉璞. 雷公藤的有效成分、药理作用及临床应用. 中国中西医结合杂志 1993; 13: 507-508
- 19 方贵龙, 王毅军, 宁刚, 付丽. 中药腹腔灌注治疗大鼠重症急性胰腺炎的细胞因子变化. 天津中医 1998; 15: 181-182
- 20 卢钢, 李勇, 陈少轩, 赵群, 张铁, 杨进强. 重症急性胰腺炎时IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 变化及丹参注射液干预的实验研究. 中华实用中西医杂志 2004; 4: 1967-1971
- 21 黄建勇, 马清涌, 孙青, 刘学民, 徐军. 白藜芦醇治疗重症急性胰腺炎的实验研究. 西安交通大学学报(医学版) 2005; 26: 163-165
- 22 李丽娟, 李永渝, 张红, 黄平. 急性胰腺炎大鼠腹水白细胞cPKC- $\alpha$ 水平的变化及汉防己甲素等的影响. 中国病理生理杂志 2004; 20: 2063-2065
- 23 Sweiry JH, Mann GE. Role of oxidative stress in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1996; 219: 10-15
- 24 Tsai K, Wang SS, Chen TS, Kong CW, Chang FY, Lee SD, Lu FJ. Oxidative stress: an important phenomenon with pathogenetic significance in the progression of acute pancreatitis. *Gut* 1998; 42: 850-855
- 25 Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, Lonovics J. Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1770-1777
- 26 Park BK, Chung JB, Lee JH, Suh JH, Park SW, Song SY, Kim H, Kim KH, Kang JK. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2266-2269
- 27 秦大莲, 余崇林, 李晓冰, 陈美娟, 李万平, 李华, 李亮. 粉防己碱对急性出血坏死性胰腺炎大鼠氧自由基生成的影响. 四川中医 2004; 22: 10-11
- 28 张铁, 陈铁良. 丹参对急性胰腺炎大鼠氧自由基水平的影响. 中国中西医结合外科杂志 2004; 10: 34-36
- 29 陈海平, 李钢, 郑锐渊. 中药合剂AA-3抑制实验性急性胰腺炎大鼠炎症介质的研究. 中国中西医结合外科杂志 2000; 6: 338-340
- 30 王兴鹏, 徐家裕, 袁耀宗, 瞿祖康. 川芎嗪对急性出血坏死性胰腺炎大鼠治疗作用及其机制的研究. 中华消化杂志 1994; 14:34-37
- 31 王兴鹏, 徐家裕, 袁耀宗, 王国良, 巫协宁. 川芎嗪对急性胰腺炎大鼠胰腺细胞保护作用的机制. 中华医学杂志 1996; 76: 860-861
- 32 毛卫, 席力罡, 王晓光. 栀子提取液治疗急性重症胰腺炎的疗效及其对髓过氧化物酶的影响. 肝胆胰外科杂志 2003; 15: 156
- 33 刘建生, 张晓红, 付极. 急性胰腺炎时内皮素和一氧化氮变化及丹参治疗作用研究. 医师进修杂志 2003; 26: 21
- 34 Chen HM, Shyr MH, Lau YT, Hwang TL, Chen MF. Leukocyte-endothelial adherence correlates with pancreatic nitric oxide production in early cerulein-induced pancreatitis in rats. *Shock* 1998; 10: 218-222
- 35 Werner J, Schmidt J, Langer C. Leukocyte-endothelium interaction correlates to the severity of acute pancreatitis. *Pancreas* 1995; 11: 452
- 36 李广阔, 刘续宝, 郭月瑜. 左旋精氨酸对急性胰腺炎的作用. 中华实验外科杂志 1999; 16: 161-163
- 37 范学良, 姜东, 李永渝, 魏玉. 实验性急性胰腺炎时血浆NO的变化及大黄、丹参的影响. 贵阳医学院学报 1997; 22: 231-233
- 38 熊进文, 沈文律, 文军. 急性坏死性胰腺炎时NO变化及三七总甙的治疗作用. 中国中西医结合外科杂志 2004; 10: 192-194
- 39 Sakorafas GH, Tsiotos GG, Sarr MG. Ischemia/Reperfusion-Induced pancreatitis. *Dig Surg* 2000; 17: 3-14
- 40 Kerner T, Vollmar B, Menger MD, Waldner H, Messmer K. Determinants of pancreatic microcirculation in acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* 1996; 62: 165-171
- 41 吴建新, 徐家裕, 袁耀宗. 大黄素与施他宁对重症胰腺炎胰缺血的治疗作用及机制. 中国危重病急救医学 1997; 9: 405,408
- 42 王兴鹏, 徐家裕, 袁耀宗, 瞿祖康. 川芎嗪对急性出血坏死性胰腺炎大鼠治疗作用及其机制的研究. 中华消化杂志 1994; 14: 34-37
- 43 袁正军, 花天放, 夏强, 陈雨强, 刘小弟, 李宝华, 钟福全. 丹参对急性坏死性胰腺炎大鼠脂质炎症介质的影

## ■应用要点

本文不仅能在AP不同发病环节指导读者应用相应的中药治疗, 而且为实验研究者在中药治疗AP机制研究方面提供方向.



# 同行评价

关于传统中药在治疗疾病中的现代生物学机制的探讨,一直是近年来的研究热点。急性胰腺炎病情凶险,病程复杂,中药应用于该病的治疗已有多年,已成为该病治疗不可或缺的一部分,临床上取得了较好的效果。然而,关于中药治疗中的具体生物学机制尚不十分清楚,本文总结了此方面新近研究成果,选题新颖,有着一定的参考价值。

- 响. 上海医学 1999; 22: 57-58
- 44 沙建平, 祝彼得, 徐艳, 陈炫, 赵艳, 刘啸, 芦殿荣, 刘舟. 丹参对兔急性胰腺炎早期中性粒细胞与内皮细胞黏附抑制作用的实验研究. 中国中西医结合急救杂志 2003; 10: 279-281
- 45 赵晓姜, 夏时海, 郭萍, 周渝. 丹参治疗重症急性胰腺炎的血流流变学及其相关指数的实验研究. 微循环学杂志 2001; 11: 31-34
- 46 张建新, 程国祚, 李龙, 瞿建国. 急性坏死性胰腺炎大鼠胃粘膜微循环的动态变化及丹参对其的影响. 江苏医药杂志 2002; 28: 496-498
- 47 张建新, 程国祚, 李龙, 陈吉祥, 张青. 丹参对大鼠急性坏死性胰腺炎并发肺损伤的影响. 中华急诊医学杂志 2002; 11: 101-104
- 48 张建新, 瞿建国, 李龙, 谢喆, 程国祚. 急性坏死性胰腺炎并发肾损害的机制及对丹参的效应. 中华急诊医学杂志 2003; 12: 97-102
- 49 Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1995; 269: 295-304
- 50 Kaiser AM, Saluja AK, Lu L, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Steer ML. Effects of cycloheximide on pancreatic endonuclease activity, apoptosis, and severity of acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1996; 271: C982-C993
- 51 Bhatia M, Wallig MA, Hofbauer B, Lee HS, Frossard JL, Steer ML, Saluja AK. Induction of apoptosis in pancreatic acinar cells reduces the severity of acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 476-483
- 52 Hahm KB, Kim JH, You BM, Kim YS, Cho SW, Yim H, Ahn BO, Kim WB. Induction of apoptosis with an extract of *Artemisia asiatica* attenuates the severity of cerulein-induced pancreatitis in rats. *Pancreas* 1998; 17: 153-157
- 53 Kimura K, Shimosegawa T, Abe R, Masamune A, Satoh A, Takasu A, Koizumi M, Toyota T. Low doses of lipopolysaccharide upregulate acinar cell apoptosis in cerulein pancreatitis. *Pancreas* 1998; 17: 120-126
- 54 金忱, 倪泉兴, 张群华, 张妞, 张延龄. 急性胰腺炎大鼠 TNF- $\alpha$  mRNA、IL-10 mRNA 表达和胰腺细胞凋亡的研究. 中华外科杂志 2001; 39: 626-628
- 55 罗衡桂, 丁应文, 王云. 重症急性胰腺炎的治疗. 中国现代医学杂志 2002; 12: 59
- 56 邵宏伟, 齐清会. 紫杉醇诱导胰腺腺泡细胞凋亡与减轻急性胰腺炎严重度的研究. 中华普通外科杂志 2003; 18: 307-308
- 57 吴彪, 王春友. 细胞凋亡在急性胰腺炎发病中的作用及川芎嗪对其影响. 中国中西医结合外科杂志 2005; 11: 23-26
- 58 潘亮, 袁耀宗, 章永平, 乔敏敏, 翟祖康. 大黄酒诱导急性胰腺炎胰腺细胞凋亡机制的实验研究. 胰腺病学 2002; 2: 214-217
- 59 尚东, 关凤林, 陈海龙, 杨佩满, 辛毅, 刘忠, 聂凤宇, 胡爱萍. 茵陈承气汤对大鼠急性出血坏死性胰腺炎腺泡细胞凋亡及调控基因的影响. 中国中西医结合外科杂志 2002; 8: 70-73
- 60 许利剑, 苗毅, 张平. 银杏叶提取物对重症胰腺炎胰腺细胞凋亡作用机制的探讨. 江苏医药杂志 2003; 29: 502-504
- 61 Mithofer K, Fernandez-del Castillo C, Frick TW, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. Acute hypercalcemia causes acute pancreatitis and ectopic trypsinogen activation in the rat. *Gastroenterology* 1995; 109: 239-246
- 62 Frick TW, Fernandez-del Castillo C, Bimmler D, Warshaw AL. Elevated calcium and activation of trypsinogen in rat pancreatic acini. *Gut* 1997; 41: 339-343
- 63 蒲青凡, 严律南, 沈骥, 刘占培, 谭建三, 左凤琼, 吴兆锋. 胰腺腺泡钙超负荷在诱发大鼠由水肿向坏死性胰腺炎转变中的作用. 中华医学杂志 1999; 79: 143-145
- 64 余晓兵, 陈玉石. 丹参治疗急性坏死性胰腺炎的实验研究. 中华医院感染学杂志 2004; 14: 174-176
- 65 王兴鹏, 徐家裕, 袁耀宗, 王国良, 巫协宁. 川芎嗪对急性胰腺炎大鼠胰腺细胞保护作用的机制. 中华医学杂志 1996; 76: 860-861
- 66 Alverdy J, Aoy E. The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. Evidence for an acquired mucosal immunodeficient state. *Ann Surg* 1991; 214: 719-723
- 67 吴承堂, 黎洁良. 急性坏死性胰腺炎并发感染的机理研究. 中华外科杂志 1998; 36: 230
- 68 邓群, 黎洁良, 陆连荣. 选择性肠道脱污染预防急性坏死性胰腺炎继发感染的实验研究. 中华肝胆外科杂志 2001; 7: 161
- 69 陈晓理, 冉瑞图. 大黄治疗坏死性胰腺炎的机理探讨. 华西医科大学报 1996; 27: 418-421
- 70 吴承堂, 黎洁良, 熊德鑫. 中药清胰汤治疗急性坏死性胰腺炎的实验研究. 中国中西医结合杂志 1998; 18: 236-238
- 71 吴承堂, 黎洁良. 中药清胰汤对犬急性坏死性胰腺炎肠粘膜损伤修复的影响. 中国普外基础与临床杂志 1998; 5: 326-328
- 72 吴飞跃, 韩明, 吕新生. 内毒素对急性出血坏死性胰腺炎早期细菌易位的影响及甘遂治疗作用的实验研究. 中国普通外科杂志 1996; 5: 65
- 73 熊进文, 沈文律, 陈耿臻, 文军, 刘少杰. 中药三七总苷对急性坏死性胰腺炎大鼠肠道细菌易位的影响. 中国普外基础与临床杂志 2004; 11: 505-507
- 74 李雷, 王桂敏, 蒋俊明, 夏庆, 黄宗文, 陈光远. 生脉注射液对重症急性胰腺炎早期多器官组织脂质过氧化物的影响. 中国中医基础医学杂志 2005; 11: 122-124
- 75 李雷, 王桂敏, 蒋俊明, 夏庆, 黄宗文, 陈光远. 丹参对重症急性胰腺炎早期多器官组织脂质过氧化物的影响. 中国中西医结合消化杂志 2005; 13: 1-3
- 76 Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery* 2000; 128: 399-407
- 77 李革, 李哲浩, 金德, 申容硕. 重症胰腺炎并发肺损伤大鼠中前列腺素和内皮素的变化和川芎嗪对其变化的影响. 延边大学医学学报 2000; 23: 107-109
- 78 李海燕, 陈瑞芬. 急性胰腺炎肝脏损害的发生机制. 首都医科大学学报 2002; 23: 281
- 79 李勇, 乜连波, 张学明, 卞钢, 赵群, 范立侨, 赵雪峰, 焦志凯, 张志栋, 于跃明, 马志学, 刘品一. 急性胰腺炎合并肝损伤时 IL-6、氧自由基变化及 IL-2、川芎嗪干预的实验研究. 中国中西医结合外科杂志 2002; 8: 111-114
- 80 刘金彪, 姚榛祥, 刘胜春. 防治急性胰腺炎并发肝损伤的实验研究. 中国普外基础与临床杂志 2004; 11: 498-501
- 81 Pupelis G. Renal failure in acute pancreatitis. Timing of dialysis and surgery. *Przegl Lek* 2000; 57: 29-31
- 82 楼恺嫔, 龚自华, 袁耀宗, 涂水平, 翟祖康, 徐家裕. 大黄酒对急性胰腺炎胰腺组织 TGF  $\beta$  1 表达的影响. 中国中西医结合杂志 2001; 21: 433-436

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁



# 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展

张喜平, 张宇

张喜平, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006  
张宇, 浙江中医学院 浙江省杭州市 310053  
浙江省中医药卫生科技计划项目, No.2003C130,  
No.2004C142  
杭州市重大科技发展计划项目, No.2003123B19  
杭州市医药卫生重点项目, No.2004Z006  
浙江省医药卫生科技计划项目, No.2003B134  
杭州市科技计划项目, No.2005224  
杭州市医药卫生科技项目, No.2003A004  
通讯作者: 张喜平, 310006, 浙江省杭州市第一人民医院普外科.  
zxp99688@vip.163.com  
电话: 0571-87065701  
收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-12-02

## 摘要

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是外科常见的急腹症, 发病迅速, 病情凶险, 而肠道黏膜屏障损伤及其介导的病理改变在其发病过程中起到了非常关键的作用. 当AP引起肠道屏障功能损伤时, 细菌或内毒素可经多途径发生移位, 造成肠道菌群移位(bacterial translocation, BT)和肠源性内毒素血症(gut origin endotoxaemia), 使胰腺组织继发感染, 进而启动全身炎症反应综合征(SIRS)并引起多器官功能障碍综合征(MODS). 研究发现, 微循环障碍、缺血再灌注损伤、炎症介质过度释放以及细胞凋亡等因素可能在肠道黏膜屏障功能损伤机制中起着重要作用, 我们将对这些方面的研究进展进行阐述.

**关键词:** 急性胰腺炎; 屏障损害

张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(4):417-421  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/417.asp>

## 0 引言

近年来, 随着对全身炎症反应综合征(SIRS)、多器官功能障碍综合征(MODS)、细菌移位、肠源性感染等疾病的深入研究, 肠道的黏膜屏障功能逐渐被人们重视. 肠黏膜屏障在防止肠道内致病细菌、毒素等透过肠壁到达肠外, 保持机体内环境稳定等方面起到重要作用<sup>[1-3]</sup>. 在急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)引起肠黏膜屏障功能受损时, 肠黏膜通透性(intestinal permeability, IP)明显增高<sup>[4-8]</sup>, 细菌和内毒素移

位, 引起内皮细胞活化, 炎症介质和细胞因子释放, 启动SIRS并引起MODS<sup>[9,10]</sup>, 此过程又能进一步增加IP, 促使肠道中的细菌和内毒素不断侵入体内形成恶性循环; 另外, 当IP增高到一定程度时, 一些大分子物质如细菌、脂多糖即能穿越受损的肠黏膜向多脏器移位, 引起胰腺组织继发感染<sup>[11-14]</sup>, 进而成为AP患者死亡的主要原因<sup>[15,16]</sup>. 由此可见, 肠道黏膜屏障损伤及其介导的病理改变在AP的发病过程中起到了非常关键的作用. 因此, 进行AP的肠道损害机制的研究进而采取相对应的防治措施, 对于危重患者和手术患者的预后具有重要的影响. 我们将对AP时肠道黏膜屏障损害机制的研究进展进行阐述.

## 1 微循环障碍和缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IR)

在AP的发生、发展过程中, 胰腺组织出血坏死, 磷脂酶A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)、弹力蛋白酶被激活及过度的炎症反应, 诱导产生大量的细胞因子、血管活性物质, 加上某些药物及造影剂的影响, 直接或间接地导致了微循环功能障碍, 包括局部血流量减少, 血流速度减低, 白细胞黏附, 毛细血管通透性增加以及功能性毛细血管密度降低<sup>[17,18]</sup>. 微循环障碍是胰腺及胰外器官损害的重要原因之一<sup>[19,20]</sup>, 而胃肠道又是最容易受累的胰外器官之一<sup>[21,22]</sup>. 最近研究<sup>[23]</sup>发现, 在重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)早期肠血流量即显著减少, 同时还发生肠黏膜组织学损害, 可能是人体在上述严重应激状态下, 神经内分泌系统发生一系列变化, 造成内脏血流重新分布, 引起肠血流量急剧下降所致. 而肠黏膜对缺血、缺氧极为敏感, 随着病程的进展, 循环血量的进一步减少, 以及炎症介质的过度激活<sup>[24]</sup>, 肠血流量更为下降<sup>[25]</sup>, 同时肠黏膜损害进一步恶化. 而王自法 *et al*<sup>[26]</sup>发现, 急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)时大鼠的血液流变学改变非常显著, 表现为血流在低切变率和高切变率下的黏度和血浆黏度升高, 红细胞压积升高, 血沉变慢, 纤维蛋白原显著减少, 上述改

## ■背景资料

急性胰腺炎(AP)是外科常见的急腹症, 发病迅速, 病情凶险, 而肠道屏障损伤及其介导的病理改变如肠道菌群移位(BT)、肠源性内毒素血症、全身炎症反应综合征(SIRS)、多器官功能障碍综合征(MODS)、胰腺组织继发感染等在其发病过程中起到了非常关键的作用.

## ■ 研究前沿

现今对于AP黏膜屏障损害机制的研究主要集中在微循环障碍和缺血再灌注损伤、炎症介质的过度释放、细胞凋亡等方面,本文对这些方面的研究进展进行了阐述。

变使肠道的血流量和微循环灌注减少,毛细血管淤血和微血栓形成,从而造成肠道损伤。

肠缺血再灌注(ischemia/reperfusion, IR)损伤也是肠黏膜屏障功能损害的常见原因<sup>[27,28]</sup>,缺血可造成局部组织不同程度的损伤,再灌注则进一步加剧了组织的损伤。缺血时黄嘌呤氧化酶和次黄嘌呤在组织中堆积,再灌注后氧分子急剧增多而产生大量氧自由基(oxygen free radical, OFR),并造成质膜过氧化而损伤细胞的结构和功能;细胞跨膜离子运输障碍,钙离子超载, cAMP增加,导致细胞凋亡<sup>[29,30]</sup>;内皮因子的局部变化,使局部微血管通透性增加,诱导中性白细胞的黏附和游走,中性白细胞通过释放蛋白酶和自由基造成肠道组织损伤。由此可见,微循环障碍和IR可能是造成AP时肠道黏膜屏障功能损伤的重要原因之一。

## 2 炎症介质的过度释放

AP时炎症介质的过度释放可能是引起肠黏膜损伤的又一重要原因。核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)在炎症介质的过度释放中起着关键作用。NF- $\kappa$ B是一类主要参与炎症分子表达调控的转录因子<sup>[31]</sup>。在静息的细胞中, NF- $\kappa$ B以无活性的形式存在于细胞质之中,当受到一定的刺激后, NF- $\kappa$ B活化并发生核易位,同靶基因启动子或增强子上的 $\kappa$ B位点结合,启动或增强细胞核内相应的细胞因子,黏附分子和趋化因子的表达<sup>[32-39]</sup>,调节炎症和免疫反应<sup>[40]</sup>。AP发生时胰腺局部的炎症介质(TNF- $\alpha$ 、IL-1)、坏死分解产物、内毒素、溶血性磷脂酰胆碱、氧化代谢产物以及一些胰酶是NF- $\kappa$ B的强力激动剂<sup>[41]</sup>,经微循环入血到达肠道,激活肠道效应细胞内的NF- $\kappa$ B,进而产生大量炎症介质<sup>[42]</sup>。

王兴鹏 *et al*<sup>[43]</sup>早期检测ANP大鼠肠黏膜肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA表达,发现较假手术组均明显增高,其中TNF- $\alpha$  mRNA于6 h出现高峰,说明ANP早期肠黏膜即已合成大量炎症介质。肠道局部炎症介质的大量产生虽是对肠腔内细菌和毒素入侵的防御反应,但却造成了肠黏膜的损伤<sup>[44,45]</sup>。IL-1 $\beta$ 作为一种重要的促炎性细胞因子,能通过促进白细胞在血管内皮细胞表面黏附和聚集,以及激活其他炎症介质而发挥作用。PLA<sub>2</sub>通过破坏细胞的脂质细胞膜使细胞坏死而损伤组织。PLA<sub>2</sub>和IL-1 $\beta$ 相互刺激,通过二者所调控的血栓素A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)、血小

板活化因子(PAF)、内皮素-1(ET-1)等炎性介质而造成血管痉挛、白细胞与血小板聚集、血栓形成以及损伤血管内皮细胞,从而加重肠缺血。肠缺血和随之而来的再灌注损伤,又可导致组织细胞损害而释放包括PLA<sub>2</sub>、IL-1 $\beta$ 在内的炎症介质,如此互为因果,最终导致肠黏膜屏障功能损伤<sup>[46]</sup>。SAP时上述激动剂可激活肠黏膜血管内皮细胞使之表达ICAM-1, SAP大鼠12 h肠黏膜组织中的ICAM-1的表达达到高峰,而PMN浸润也最为明显,表明此时黏附分子与炎性粒细胞之间达到最高黏附状态。肠黏膜组织中ICAM-1表达增加介导的PMN在局部组织中聚集、黏附,从而引起炎症反应,此点是SAP时肠黏膜损伤的重要因素之一<sup>[47]</sup>。值得一提的是,肠黏膜屏障损伤后产生内毒素血症,使原本就处于预激活状态的全身免疫系统被内毒素激活,单核/巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞释放大炎症介质(OFR、PLA<sub>2</sub>、PAF、TXA<sub>2</sub>),进一步损伤肠黏膜屏障,导致更多内毒素入血,形成恶性循环<sup>[48,49]</sup>。

## 3 细胞凋亡

肠黏膜屏障稳定的维持依赖于上皮细胞增殖和凋亡之间的平衡。凋亡虽然对于机体来说是一种保护机制,但一旦各种刺激因素引起肠上皮细胞凋亡过度,修复与再生受阻,肠黏膜屏障功能就会产生障碍。Kim *et al*<sup>[50]</sup>发现,沙门杆菌或侵入性大肠杆菌侵入人肠上皮细胞后,细胞发生凋亡; Ikeda *et al*<sup>[51]</sup>发现大鼠小肠IR早期肠上皮脱落细胞多为凋亡细胞,并认为上皮细胞与细胞基质间连接的破坏可能是导致凋亡的主要原因; Swank *et al*<sup>[52]</sup>用IL-1 $\beta$ 、IL-6和ETX刺激人肠上皮细胞系(Caco-2)后,发现该细胞系凋亡比例增加,对大肠杆菌通透性增大。实验证明炎症介质、生长因子的缺乏、细菌毒素、氧自由基及肠缺血一再灌注损伤大鼠,均可发现肠黏膜上皮细胞凋亡增加,同时伴有肠黏膜屏障功能障碍<sup>[53,54]</sup>,且通透性与凋亡指数呈正相关。有研究发现, AP早期阶段的肠上皮细胞凋亡比率明显增加<sup>[55]</sup>,肠上皮细胞凋亡参与了AP肠道黏膜屏障功能障碍的病理过程<sup>[56]</sup>。

AP时肠道上皮细胞凋亡的主要机制如下:(1)内脏血流灌注减少,肠黏膜缺血缺氧,氧自由基大量产生,钙超载。氧自由基可损伤细胞DNA、攻击蛋白质、影响核基因转录。钙离子可裂解DNA、增加胞内cAMP。这些因素共同作用导致细胞凋亡<sup>[57]</sup>;(2)肠蠕动减缓,肠上皮受

损, 细菌黏附并穿过肠上皮, 引起炎症反应及细胞因子(TNF- $\alpha$ 、NO)的产生, 诱导和调控肠上皮细胞凋亡<sup>[51]</sup>; (3)细胞黏附分子表达异常, 致使上皮细胞与细胞基质间连接破坏<sup>[52]</sup>; (4)前述的AP时过度释放的炎症细胞因子如TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ , 均可增加体内外细胞的凋亡<sup>[58,59]</sup>。

另外, 肠Peyer结淋巴细胞凋亡也参与了肠道黏膜屏障功能损伤的过程。肠Peyer结暴露于肠腔, 使其接受肠源性抗原负荷增加。全身炎症反应及NO等这些淋巴细胞凋亡调节因子的产生与释放, 直接或间接诱导淋巴细胞凋亡<sup>[60]</sup>。肠Peyer结中B淋巴细胞分化为浆细胞后, 能吞噬细菌、病毒, 防止细菌移位。淋巴细胞的大量凋亡使肠道免疫屏障破坏, 肠道细菌和内毒素移位, 启动SIRS并引起MODS。

#### 4 肠道营养缺乏

肠道营养状态的下降也是导致肠屏障功能受损的原因之一。肠黏膜上皮细胞在体内得以更新依赖于大量的能源, 其中谷氨酰胺(Gln)、精氨酸是主要“燃料”, 有维持肠道免疫功能、微生态环境、保护黏膜屏障功能的作用<sup>[61]</sup>。AP特别是SAP时, 机体处于高分解状态对能量的需要大量增加, 如果没有及时补足营养或在AP期间禁食, 将促使Gln、精氨酸缺乏, 肠黏膜上皮细胞合成生长因子(如IGF-1)减少, 导致淋巴细胞、巨噬细胞调节功能障碍<sup>[62,63]</sup>, 肠黏膜受损<sup>[64]</sup>。另外长时间全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN)虽然可提供足够的能量及氮源, 但因缺乏肠道黏膜修复代谢所需的营养基质和缺乏食物对消化的刺激, 不可避免地引起肠道黏膜功能受损<sup>[65]</sup>。有研究<sup>[66]</sup>表明, 大鼠经支持TPN治疗1 wk后, 肠屏障功能即受到明显削弱, 若加上失血性休克的打击, 100%发生细菌移位。而早期肠内营养(enteral nutrition, EN)则可能大鼠肠道黏膜屏障具有保护作用<sup>[67,68]</sup>。

#### 5 其他

Leveau *et al*<sup>[69]</sup>最近的研究提示, PAF在胰腺炎相关肠黏膜屏障功能障碍的发展过程中发挥重要作用, 同时其拮抗剂有可能成为一种有潜力的治疗方法。CD44作为细胞外基质主要成分透明质酸的重要配体, 介导细胞与细胞、细胞与基质的连接, 对维持上皮结构的紧密和完整性有重要意义。有研究结果表明<sup>[70]</sup>, SAP大鼠肠黏膜CD44 mRNA表达较对照组明显降低, 结合肠黏

膜损伤、黏膜上皮脱落缺损等病理改变, 推测SAP后CD44表达降低影响了肠上皮细胞间、细胞与基质间的连接以及肠上皮层的修复, 而生长激素(growth hormone, GH)维持肠黏膜上皮结构完整及黏膜免疫功能的作用可能与上调CD44 mRNA表达有关。P物质及其受体如神经激肽-1受体(NK-1R)和神经激肽-2受体(NK-2R)在AP的发生、发展中起到重要作用<sup>[71,72]</sup>。SAP结肠组织中NK-1R和NK-2R的表达水平明显上调, 扰乱了神经激肽的作用环节, 加剧SAP时肠黏膜的损害<sup>[73]</sup>。SAP时大量胰腺炎相关性腹水(pancreatitis associated fluid, PAAF)含有多钟毒性和炎性细胞因子介质。他们被腹膜吸收后亦可能是引起多脏器损害的重要原因之一, 对SAP病情发展有着不可低估的影响。

总之, AP并发肠道损伤是由多因素造成的, 而这些因素在AP发展中构成网络反应, 依靠相互交叉的协同作用造成了对肠道的损害。对这些致病因素的深入研究, 能使我们对AP发病过程有新的认识, 并为其治疗开辟新的途径, 从而改善患者的预后, 因此有着广阔的前景和深远的意义。

#### 6 参考文献

- Garside P, Millington O, Smith KM. The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1029: 9-15
- Harari Y, Weisbrodt NW, Moody FG. Ileal mucosal response to bacterial toxin challenge. *J Trauma* 2000; 49: 306-313
- Kiyono H, Kweon MN, Hiroi T, Takahashi I. The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 145-153
- 吴承堂, 黎洁良. 一氧化氮、内皮素在急性坏死性胰腺炎肠道损伤中的作用. *中国普通外科杂志* 1999; 8: 210-212
- 杨永久, 高乃荣. 内源性一氧化氮对急性坏死性胰腺炎大鼠肠黏膜通透性的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 389-391
- Takahashi Y, Fukushima J, Fukusato T, Shiga J, Tanaka F, Imamura T, Fukayama M, Inoue T, Shimizu S, Mori S. Prevalence of ischemic enterocolitis in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005; 40: 827-832
- Ammori BJ, Fitzgerald P, Hawkey P, McMahon MJ. The early increase in intestinal permeability and systemic endotoxin exposure in patients with severe acute pancreatitis is not associated with systemic bacterial translocation: molecular investigation of microbial DNA in the blood. *Pancreas* 2003; 26: 18-22
- Penalva JC, Martinez J, Laveda R, Esteban A, Munoz C, Saez J, Such J, Navarro S, Feu F, Sanchez-Paya J, Perez-Mateo M. A study of intestinal permeability in relation to the inflammatory response and

#### ■创新盘点

本文着重阐述微循环障碍和缺血再灌注损伤、炎症介质的过度释放、细胞凋亡等因素在AP肠道黏膜屏障功能损伤机制中起到的重要作用。



## ■名词解释

肠源性内毒素血症(gut origin endotoxaemia): AP造成肠道损伤时内毒素可经门静脉、体循环及淋巴系统发生移位,造成内毒素血症。

- 9 Mole DJ, Taylor MA, McFerran NV, Diamond T. The isolated perfused liver response to a 'second hit' of portal endotoxin during severe acute pancreatitis. *Pancreatol* 2005; 5: 475-485
- 10 Closa D, Folch-Puy E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* 2004; 56: 185-191
- 11 de las Heras G, Forcelledo JL, Gutierrez JM, Calvo J, Obaya S, Fernandez Fernandez F, Mayorga M, Agüero J, Pons Romero F. Selective intestinal bacterial decontamination in experimental acute pancreatitis. *Gastroenterol Hepatol* 2000; 23: 461-465
- 12 Kazantsev GB, Hecht DW, Rao R, Fedorak IJ, Gattuso P, Thompson K, Djuricin G, Prinz RA. Plasmid labeling confirms bacterial translocation in pancreatitis. *Am J Surg* 1994; 167: 201-206
- 13 Gloor B, Muller CA, Worni M, Stahel PF, Redaelli C, Uhl W, Buchler MW. Pancreatic infection in severe pancreatitis: the role of fungus and multiresistant organisms. *Arch Surg* 2001; 136: 592-596
- 14 Schwarz M, Thomsen J, Meyer H, Buchler MW, Berger HG. Frequency and time course of pancreatic and extrapancreatic bacterial infection in experimental acute pancreatitis in rats. *Surgery* 2000; 127: 427-432
- 15 Carnovale A, Rabitti PG, Manes G, Esposito P, Pacelli L, Uomo G. Mortality in acute pancreatitis: is it an early or a late event? *JOP* 2005; 6: 438-444
- 16 Furuya T, Soeno T, Komatsu M. Strategy for bacterial translocation in acute pancreatitis. *Nippon Shokabyo Gakkai Zasshi* 2004; 101: 502-509
- 17 Sunamura M, Yamauchi J, Shibuya K, Chen HM, Ding L, Takeda K, Kobari M, Matsuno S. Pancreatic microcirculation in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; 5: 62-68
- 18 Jaworek J, Jachimczak B, Tomaszewska R, Konturek PC, Pawlik WW, Sendur R, Hahn EG, Stachura J, Konturek SJ. Protective action of lipopolysaccharides in rat caerulein-induced pancreatitis: role of nitric oxide. *Digestion* 2000; 62: 1-13
- 19 邹树, 邵洪, 黄大熔, 田伏洲, 尹志良, 李晓军, 汪涛, 高晓美. 腺苷对急性出血坏死性胰腺炎肠道屏障功能保护机制的实验研究. *中国普通外科杂志* 2001; 10: 305-308
- 20 Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery* 2000; 128: 399-407
- 21 Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, Larvin M, McMahon MJ. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *Gastrointest Surg* 2003; 7: 26-35
- 22 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
- 23 张建新, 瞿建国, 程国祚, 李龙, 王旭青. 急性坏死性胰腺炎模型大鼠肠血流量及血清磷脂酶A2、白介素-1 $\beta$ 的变化. *基础医学与临床* 2003; 23: 556-558
- 24 Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock* 2002; 17: 114-119
- 25 Hotz HG, Foitzik T, Rohweder J, Schulzke JD, Fromm M, Runkel NS, Buhr HJ. Intestinal microcirculation and gut permeability in acute pancreatitis: early changes and therapeutic implications. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 518-525
- 26 王自法, 潘承恩, 刘绍浩, 梁国光, 张梅. 急性坏死性胰腺炎血液流变学改变及其意义. *中国普通外科杂志* 2000; 9: 225
- 27 杨凤蕊, 林秀珍. 肠缺血再灌注损伤的研究进展. *中国中西医结合外科杂志* 2002; 8: 319-321
- 28 Chang JX, Chen S, Ma LP, Jiang LY, Chen JW, Chang RM, Wen LQ, Wu W, Jiang ZP, Huang ZT. Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5485-5491
- 29 Fukuyama K, Iwakiri R, Noda T, Kojima M, Utsumi H, Tsunada S, Sakata H, Ootani A, Fujimoto K. Apoptosis induced by ischemia-reperfusion and fasting in gastric mucosa compared to small intestinal mucosa in rats. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 545-549
- 30 程尉新, 金丽娟. 大鼠肠缺血-再灌注早期多个器官内细胞凋亡的研究. *中华创伤杂志* 1998; 14: 381-383
- 31 Suk K, Yeou Kim S, Kim H. Regulation of IL-18 production by IFN gamma and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF-kB pathway in the regulatory processes. *Immunol Lett* 2001; 77: 79-85
- 32 Izumi T, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Li Y, Takemura G, Fujiwara H, Garbers DL, Mochizuki S, Nakao K. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF-kappaB activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2001; 108: 203-213
- 33 Antonelli A, Bianchi M, Crinelli R, Gentilini L, Magnani M. Modulation of ICAM-1 expression in ECV304 cells by macrophage-released cytokines. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27: 978-991
- 34 Ginis I, Jaiswal R, Klimanis D, Liu J, Greenspon J, Hallenbeck JM. TNF-alpha-induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF-kappaB transactivation: the role of NF-kappaB association with p300 adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 142-152
- 35 Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance IK, Hall G, Cross AS, Rogers TB. Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF-kappaB activation and tumor necrosis factor-alpha expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: 872-879
- 36 Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, Evans AJ, Wedin KE, Michael LH, Entman ML. Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia. *Am J Pathol* 2001; 159: 1301-1311
- 37 Moine P, McIntyre R, Schwartz MD, Kaneko D, Shenkar R, Le Tulzo Y, Moore EE, Abraham E. NF-kappaB regulatory mechanisms in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Shock* 2000; 13: 85-91
- 38 Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 307-314
- 39 Omoya T, Shimizu I, Zhou Y, Okamura Y, Inoue H, Lu G, Itonaga M, Honda H, Nomura M, Ito S. Effects of idoxifene and estradiol on NF-kappaB activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver* 2001; 21: 183-191
- 40 Neurath MF, Becker C, Barbulescu K. Role of NFkB

- in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 1998; 43: 856-860
- 41 纪龙, 袁耀宗, 徐家裕. 核因子- $\kappa$ B与急性胰腺炎. 国外医学. 内科学分册 2000; 27: 396-398
  - 42 Grotz MR, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. Intestinal cytokine response after gut ischemia: role of gut barrier failure. *Ann Surg* 1999; 229: 478-486
  - 43 王兴鹏, 王冰嫻, 吴恺, 徐选福, 谢传高, 徐敏. 急性坏死性胰腺炎肠黏膜NF $\kappa$ B介导的细胞因子过度表达及生长激素的作用. 中华肝胆外科杂志 2003; 9: 45-49
  - 44 Wang Z, Castresana MR, Detmer K, Newman WH. An IkappaB-alpha mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Surg Res* 2002; 102: 198-206
  - 45 Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, Luft FC. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2002; 2: 3
  - 46 Liu SJ, McHowat J. Stimulation of different phospholipase A2 isoforms by TNF-alpha and IL-1beta in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1998; 275: H1462-H1472
  - 47 李勇, 来运刚, 广刚, 秦琪瑜, 赵群, 王力利, 杨进强, 张金燕. 重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜ICAM-1表达与黏膜损伤的关系. 基础医学与临床 2004; 24: 69-72
  - 48 阴建兵, 肖江梅, 王永奇, 王世昌. 急性胰腺炎与肠屏障损伤、细菌移位及内毒素血症. 中国煤炭工业医学杂志 2005; 8: 317-320
  - 49 吴泽建, 张阳德, 雷正明, 余少鸿. 大鼠急性坏死性胰腺炎外周血中的TNF- $\alpha$ , IL-6浓度的动态测定及意义. 中国现代医学杂志 2003; 13: 23-25
  - 50 Kim JM, Eckmann L, Savidge TC, Lowe DC, Witthoft T, Kagnoff MF. Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J Clin Invest* 1998; 102: 1815-1823
  - 51 Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, Nomura M, Itoh G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 1998; 42: 530-537
  - 52 Swank GM, Lu Q, Xu DZ, Michalsky M, Deitch EA. Effect of acute-phase and heat-shock stress on apoptosis in intestinal epithelial cells (Caco-2). *Crit Care Med* 1998; 26: 1213-1217
  - 53 Jones BA, Gores GJ. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol* 1997; 273: G1174-G1188
  - 54 Raab S, Leiser R, Kemmer H, Claus R. Effects of energy and purines in the diet on proliferation, differentiation, and apoptosis in the small intestine of the pig. *Metabolism* 1998; 47: 1105-1111
  - 55 Wang X, Wang B, Wu K, Xu M, Gong Z. Growth hormone downregulated the excessive apoptosis of ileal intestinal epithelial cells in rats during the early course of acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25: 205-209
  - 56 Takeyama Y. Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005; 40: 1-10
  - 57 孙备. 细胞凋亡与缺血-再灌注损伤的研究进展. 国外医学. 外科学分册 1998; 25: 325-327
  - 58 Dunger A, Augstein P, Schmidt S, Fischer U. Identification of interleukin 1-induced apoptosis in rat islets using in situ specific labelling of fragmented DNA. *J Autoimmun* 1996; 9: 309-313
  - 59 Liu ZH, Striker GE, Stetler-Stevenson M, Fukushima P, Patel A, Striker LJ. TNF-alpha and IL-1 alpha induce mannose receptors and apoptosis in glomerular mesangial but not endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; 270: C1595-C601
  - 60 Bzowska M, Guzik K, Barczyk K, Ernst M, Flad HD, Pryjma J. Increased IL-10 production during spontaneous apoptosis of monocytes. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2011-2020
  - 61 王兴鹏, 吴恺, 王冰嫻, 徐选福, 徐敏, 龚自华. 谷氨酰胺对急性坏死性胰腺炎大鼠肠道衰竭的治疗作用. 中华内科杂志 2001; 40: 815-818
  - 62 Foitzik T, Kruschewski M, Kroesen AJ, Hotz HG, Eibl G, Buhr HJ. Does glutamine reduce bacterial translocation? A study in two animal models with impaired gut barrier. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14: 143-149
  - 63 Exner R, Weingartmann G, Eliassen MM, Gerner C, Spittler A, Roth E, Oehler R. Glutamine deficiency renders human monocytic cells more susceptible to specific apoptosis triggers. *Surgery* 2002; 131: 75-80
  - 64 Avgerinos C, Delis S, Rizos S, Dervenis C. Nutritional support in acute pancreatitis. *Dig Dis* 2003; 21: 214-219
  - 65 刘俊, 袁正军, 彭志海, 钟福全. 肠内营养减少大鼠急性重症胰腺炎继发感染. 肠外与肠内营养 2001; 8: 224-226
  - 66 黎沾良. 肠道细菌移位和外科重症. 中华外科杂志 1998; 36: 11-12
  - 67 Al-Omran M, Groof A, Wilke D. Enteral versus parenteral nutrition for acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;
  - 68 Marik PE, Zaloga GP. Meta-analysis of parenteral nutrition versus enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *BMJ* 2004; 328: 1407
  - 69 Leveau P, Wang X, Sun Z, Borjesson A, Andersson E, Andersson R. Severity of pancreatitis-associated gut barrier dysfunction is reduced following treatment with the PAF inhibitor lexipafant. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 1325-1331
  - 70 王兴鹏, 王冰嫻, 徐选福, 谢传高, 吴凯, 徐敏. 急性坏死性胰腺炎大鼠肠黏膜CD44 mRNA的表达及生长激素的作用. 中华试验外科杂志 2001; 18: 305-306
  - 71 Maa J, Grady EF, Yoshimi SK, Drasin TE, Kim EH, Hutter MM, Bunnett NW, Kirkwood KS. Substance P is a determinant of lethality in diet-induced hemorrhagic pancreatitis in mice. *Surgery* 2000; 128: 232-239
  - 72 Grady EF, Yoshimi SK, Maa J, Valeroso D, Vartanian RK, Rahim S, Kim EH, Gerard C, Gerard N, Bunnett NW, Kirkwood KS. Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 505-512
  - 73 郑通标, 石欣, 高乃荣, 霍明东, 胡浩霖, 杨永久. NK-1R和NK-2R在急性坏死性胰腺炎结肠组织中的表达. 实用医学杂志 18: 1272-1274

## 同行评价

肠道屏障损害是急性胰腺炎SIRS的后果,也是引起继发感染导致死亡的主要原因.对于此方面的研究予以综述有临床指导意义.

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

# 成体胰腺干细胞基础研究进展

郭欣, 李国立, 黄跃南, 吴德全, 于洪亮, 杨茂鹏, 关文增

## ■背景资料

胰岛素的应用可较好的控制血糖水平, 但却不能预防糖尿病并发症的出现。胰岛移植是彻底根治糖尿病的方法, 却存在供体不足和自身免疫反应的缺乏。胰岛干细胞的研究既可无限增殖获得足够多的胰岛, 又可克服自身免疫缺乏, 是一种较有前途的方法。目前在体外试验中有成功的例子证明干细胞可增殖并分化为产胰岛素细胞。但对干细胞的定位、分子标志物的产生、变化规律及转分化调控机制尚不清楚。

郭欣, 关文增, 吉林大学附属第二医院外科 吉林省长春市 130000

李国立, 黄跃南, 吴德全, 于洪亮, 杨茂鹏, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 郭欣, 150076, 哈尔滨市, 黑龙江省哈尔滨市道里区建国街270号, 哈尔滨市中医医院外科. dr-guoxin@163.com

电话: 0451-86297856

收稿日期: 2005-12-22 接受日期: 2006-01-14

## 摘要

胰岛移植是彻底治疗糖尿病最有希望的方法。然而, 供体的来源不足以及 $\beta$ 细胞自身免疫的存在极大的限制了这种方法的使用。体外增殖与分化有功能内分泌细胞治疗糖尿病成为糖尿病研究的主要焦点。胰腺干细胞研究的进展为细胞治疗提供了一个美好前景。由于对胰腺干细胞的分子标志认识有限, 所以对其鉴定仍有很大的阻力。虽然以现有能力在一定条件下能获得一些胰腺干细胞转化的新生的胰岛, 而胰腺干细胞确切定位于何处、增殖与分化调控机制如何、胰腺含有的干细胞数量等问题都需要进一步得到研究解决。我们主要回顾近期在胰腺干细胞基础研究方面的进展。

**关键词:** 干细胞; 胰岛; 增殖; 转化; 生长因子

郭欣, 李国立, 黄跃南, 吴德全, 于洪亮, 杨茂鹏, 关文增. 成体胰腺干细胞基础研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(4):422-428  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/422.asp>

## 0 引言

糖尿病是严重危害人类健康和生命常见的内分泌代谢性疾病, 近年来其患病率在全球呈现快速增长的趋势, 在大多数国家已成为继心血管疾病和肿瘤之后的第三大疾病。目前几乎所有 I 型糖尿病和部分 II 型糖尿病患者都需要长期注射胰岛素治疗, 常规治疗方案发生全身血管并发症的危险性较高, 而强化治疗方案虽可使糖尿病并发症的危险性降低, 但却不能完全避免其发生, 且容易出现低血糖反应甚至昏迷而危及生命<sup>[1-3]</sup>。2000年, 胰岛移植取得了突破性进展, 来自加拿大Edmonton的研究小组改良了抗免疫排斥的用药方案, 取得连续7例胰岛移植的

成功, 可使 I 型糖尿病患者完全停用胰岛素治疗超过1 a以上<sup>[4]</sup>。然而, Edmonton方案中每次移植的胰岛组织需要来自两个或两个以上的供体胰腺, 且移植后需要长期的抗免疫排斥治疗, 因而限制了胰岛移植的广泛开展。随着胰腺干细胞的研究深入, 他将为胰岛移植提供新的材料来源, 为治疗糖尿病提供新的思路和途径<sup>[5-22]</sup>。从理论上讲, 这种方法可以克服目前胰岛移植面临的两大难题, 即供体来源不足和免疫排斥反应。我们将着重介绍目前对胰腺干细胞的认识和干细胞扩增过程中的一些重要调控因子。

## 1 糖尿病与胰腺干细胞

胰腺由外分泌组织和内分泌组织构成, 其中外分泌腺由产生消化酶的腺泡和输送消化酶到十二指肠的导管组成。内分泌组织即胰岛由四种不同类型的细胞 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 细胞组成, 分别分泌胰高血糖素、胰岛素、生长抑素和胰多肽。生理条件下, 胰岛素控制体内血糖平衡。糖尿病是由多种病因引起的以慢性高血糖为特征的代谢紊乱。高血糖是由于胰岛素分泌或作用的缺陷, 或者两者同时存在而引起。糖尿病分为两种类型即 I、II 型糖尿病, I 型糖尿病患者有 $\beta$ 细胞破坏, 引起胰岛素绝对缺乏, 呈酮症酸中毒倾向。II 型糖尿病患者有胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺陷的现象。对 II 型糖尿病的研究表明,  $\beta$ 细胞减少约40%-60%。仅是 $\beta$ 细胞的数量减少, 而非 $\beta$ 细胞( $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 细胞)无任何改变。常规的胰岛素治疗能给患者提供每日需要的胰岛素, 却不能维持最佳的血糖水平, 从而容易发生高血糖、视网膜病变及心血管疾病等并发症。理想的治疗方案就是将有功能的 $\beta$ 细胞移植到糖尿病患者体内, 从而恢复正常的血糖调控机制。这种治疗方法在临床上已经被证明是成功的, 但其主要缺点是供体组织短缺和自身免疫攻击的复发。

干细胞是一类具有自我更新与增殖分化能力的细胞, 产生自我完全相同的子细胞。在特定条件下, 可分化成不同功能的组织细胞。在出生



后, 干细胞在组织的修复、维持中起到重要作用. 由于这些独特的作用, 干细胞有着巨大的治疗潜力, 成为生物学领域中最具有价值的研究课题之一. 现在已经确定成体干细胞不仅存在于更新较快的组织中, 例如皮肤和肠道, 而且更新较慢的组织中也存在成体干细胞, 如脑和肾. 由于详尽的胰腺干细胞鉴别标志物无法获得, 所以胰腺成为干细胞研究最有争议的组织. 因此, 选择性的扩增胰腺干细胞为治疗糖尿病患者胰岛素不足提供充足的有功能的 $\beta$ 细胞有着非常广阔的前景.

## 2 成体胰腺干细胞的主要来源

导管上皮细胞转化为胰岛发生于胚胎发育过程中和新生机体的早期, 而且成体胰腺的细胞团在胰腺损伤后也可以进行有限的再生和修复. 因此, 人们认为像其他组织一样, 胰腺中一定存在干细胞参与组织的再生与修复. 但目前对于胰腺中转化为胰岛的是干细胞还是祖细胞以及这种细胞存在于胰腺的具体位置有着较大的争议. 有证据表明干细胞存在于导管细胞中, 在器官形成和再生过程中转化、迁移形成新的胰岛<sup>[23,24]</sup>. Bonner-weir *et al*<sup>[25,26]</sup>报道可以将人胰腺导管细胞转化为内分泌细胞. 鼠的胰腺导管上皮细胞经过培养形成含 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 细胞的功能性胰岛<sup>[27]</sup>. 这些内源性胰岛移植到非肥胖型糖尿病鼠模型(NOD模型)内可以逆转糖尿病. Ogata *et al*<sup>[28]</sup>研究证明胚胎的胰腺导管细胞可转化为产胰岛素的细胞, 由导管细胞转化成的类胰岛组织移植到经链脲酶素诱导的裸鼠糖尿病模型体内可以逆转糖尿病. 上述这些证据表明胰腺干细胞来源于导管细胞. 产胰岛素的祖细胞也可能存在于导管细胞, 而转化前的导管细胞有分化的表型. 因此, 很难说他们就是真正的干细胞. 由于这个原因, 人们通常认为他们是祖细胞. 也有人认为胰腺干细胞存在于胰岛或腺泡组织中. Guz *et al*<sup>[29]</sup>报道链脲酶素模型的实验结果有两种可能, 胰岛中祖细胞一种表达Glu-2, 另一种表达胰岛素和生长抑素, 表明祖细胞可能存在于胰岛内, 也可能就是产胰岛素细胞本身. 有报道认为存在于人和鼠胰岛内的巢素蛋白阳性的细胞是激素阴性的非成熟细胞, 他是多潜能的, 在体外可以广泛的增生<sup>[30]</sup>. 另有研究认为在人类和犬科动物的胰腺中对PDX-1、胰岛素、胰高血糖素、生长抑素、波形蛋白阳性而对角蛋白-19、巢素蛋白阴性的小细胞是胰岛生长的祖细

胞<sup>[31]</sup>, 胰岛分泌的研究表明这些细胞对血糖反应性分泌胰岛素. 虽然这篇研究未能给出这些细胞的增生和转化的证据, 但是这些细胞的未成熟表型及他们较少的数量和静止期状态得出了这些细胞是胰岛生长的祖细胞的假设. Suzuki *et al*<sup>[32]</sup>认为胰腺干细胞在发育中的和成体的大鼠中必须表达肝细胞生长因子受体C-Met. 在成体中, 他们在导管和某些腺泡细胞中表达, 这些细胞在体外从单个细胞形成集落细胞并转分化为多倍的胰腺系细胞. 也有报道干细胞可来自组织细胞并被诱导成胰岛类似细胞, 起到调控血糖的作用<sup>[33-36]</sup>.

## 3 成体胰腺上皮细胞转分化的试验模型

成体胰腺中存在干细胞的证据主要是来自于实验条件下诱导的胰岛再生现象. 玻璃纸包埋胰腺刺激导管增生和新的胰岛生成能逆转链脲酶素诱导的糖尿病<sup>[37,38]</sup>, 另一个模型即是部分胰腺导管结扎术<sup>[39]</sup>, 这个实验模型中, 胰岛在被人们认为是胰腺干细胞存在的导管中增生. 还有部分胰腺切除术后(85%-90%的胰腺被切除), 剩余的胰腺中发现 $\beta$ 细胞增生. 在链脲酶素诱导的糖尿病模型中, 链脲酶素特异性破坏 $\beta$ 细胞, 诱导胰腺上皮细胞转化, 在幼体内更加明显<sup>[40]</sup>. 而且, 人们还发现在干扰素 $\gamma$ 转基因鼠中胰腺新生内分泌细胞持续发育. 干扰素 $\gamma$ 是在人促胰岛素因子的调控下表达的. 干扰素 $\gamma$ 转基因鼠显示了导管上皮细胞增生和定位于导管的祖细胞群并向胰岛细胞方向持续再生. 这一过程与胚胎中胰岛的形成过程极为相似, 因此本模型对于研究成体胰腺再生有重大的意义.

## 4 胰腺干细胞的特性

传统观念认为, 成体干细胞的转分化潜力仅局限于干细胞所在的组织中. 然而, 新的证据表明成体干细胞也可以在循环系统中获得并参与各种组织的再生. 转化就是多潜能干细胞跨越细胞系的界限, 生成干细胞所在的组织或器官不存在的细胞. 例如骨髓间质细胞能生成骨骼肌, 神经干细胞能生成血细胞, 心肌、肝细胞和胚胎干细胞或衍生细胞显示在体外可被培养和扩增, 能维持分化为 $\beta$ -胰岛素类似细胞并能纠正高血糖状态<sup>[5,41]</sup>. 成体胰腺干细胞/祖细胞, 甚至存在于胰腺外组织如肝. 体外培养从成人干细胞中衍生的代用胰岛主要来源有三: 基因修饰非内分泌细胞产生、非内分泌干/祖细胞转分

### ■创新盘点

本文收集了近年关于胰腺干细胞研究方面的一些进展内容, 以期对该领域的进展和发展方向有一个较为系统的归纳.

化、胰岛干/祖细胞调控分化而来<sup>[42]</sup>。在体外,腺病毒调节的肝细胞PDX-1的提取能诱导出 $\beta$ 细胞样表型并产生足够的、有活性的胰岛素,降低链脲霉素模型鼠体内的高血糖<sup>[43]</sup>。Baeyens *et al*<sup>[44]</sup>报道表皮生长因子和白血病抑制因子能使外分泌腺组织转化为有功能的 $\beta$ 细胞。最近有报道提出转化实际上就是融合现象的观点,例如:鼠成体骨髓细胞能自发的与胚胎干细胞相互融合,成体干细胞与胚胎干细胞融合是很常见的<sup>[45]</sup>。体内研究证明血液循环系统中的造血干细胞之所以很少见,也可能是细胞融合导致的结果<sup>[46]</sup>。在Ianus *et al*<sup>[47]</sup>的研究中,他将在胰岛素促进因子的调控下选择性的表达报告因子—绿色荧光蛋白的骨髓细胞移植到受体鼠,并在受体鼠的胰腺产生绿色荧光蛋白阳性的产胰岛素细胞。Ianus经过研究后认为,在体内细胞融合不能合理解释成体骨髓源性细胞转化成各种细胞的表型的现象。另有研究表明,成体骨髓细胞在体外能转化为胰岛细胞,将这些细胞移植后可纠正体内的高血糖状态<sup>[48-50]</sup>。与此相反,Mathews *et al*<sup>[51]</sup>报道,骨髓源性内皮祖细胞在胰岛受到损伤时聚集到胰腺,融合后产生有功能的胰岛,但没有证据表明骨髓细胞转化为产胰岛素细胞,这表明细胞功能的提高是由内皮祖细胞诱导的新生血管形成而促进的。Sumi *et al*<sup>[52]</sup>研究显示从鼠胚胎干细胞能分化胰岛类似簇,该类细胞能纠正糖尿病鼠的高血糖状态而不形成畸胎瘤。

至于细胞转化的机制仍未十分清楚。一种可能性就是肝、肠、胰腺的细胞<sup>[53]</sup>,在发育时与内胚层或接近的区域有着共同的祖细胞,在一定的刺激下如组织损坏、生长因子等,他们可以去分化,并转化为完全不同的表型。另一种解释就是成熟组织中含有少量的多潜能干细胞,他们比以前认为的有更多系细胞的可塑性。由于不是所有的组织在刺激下都能发生转化,所以我们有将对转化敏感的细胞亚群做一下分类的必要,也需要判断骨髓细胞或肝细胞是否能转化为 $\beta$ 细胞。最后,我们也需要知道是什么因子在一种组织转化为另一种组织中起作用,即在转化启动时什么信号是必需的。虽然许多的问题仍待解决,但能转化生成替代自我的 $\beta$ 细胞而适于代替糖尿病中损伤的胰岛细胞,这是一种非常有价值的治疗方法<sup>[54,55]</sup>。可以想象如果胰腺外组织能生成对生理信号敏感的产胰岛素细胞,将为移植提供新的 $\beta$ 细胞来源。总之,胰岛干细胞可能不仅存在于导管上皮,也可能存在于胰岛本身,甚至外分泌腺

泡或有显著转化可塑性的胰腺外的组织中<sup>[56]</sup>。

胰腺干细胞真存在于成体胰腺中吗? Dor *et al*<sup>[57]</sup>认为在正常生理条件下, $\beta$ 细胞更新和部分胰腺切除术后的细胞增生都归因于已存在的 $\beta$ 细胞本身的复制,而不是导管细胞或干细胞,这种说法挑战了在成体胰腺干细胞研究领域盛行的假说。此研究中用到的部分胰腺切除术显示很低的再生,且从胰腺干细胞诱导的胰腺再生也较少。而90%胰腺切除术、干扰素 $\gamma$ 转基因模型更适于本实验研究。如果 $\beta$ 细胞能够被诱导并高效复制,将对维持正常血糖有重要意义。因此 $\beta$ 细胞增生的研究和 $\beta$ 细胞复制的分子机制应得到更多的关注。

## 5 胰腺干细胞转化扩增的调控影响因素

重要的转录因子在胰腺发育过程的调控是许多实验室的研究热点,调控胰腺干/祖细胞转化增生的非转录因子也同样引起了研究者的兴趣。Efrat *et al*<sup>[58]</sup>的研究显示啮齿类动物中一定组织来源的衍生细胞能产生胰岛素,并响应生理信号释放胰岛素,而这些衍生细胞表型的改变可被异位表达于细胞中的显性转录因子基因或体内外细胞暴露的分化因子环境所诱导。了解这些因子不仅能提高干/祖细胞的再生,也可以应用于移植的胰岛中促进 $\beta$ 细胞的扩增。

胰高血糖素样肽-1(GLP-1)是一种肠促胰岛素,由肠L细胞生成,能促进胰岛素瘤细胞的增生,刺激II型糖尿病模型鼠中 $\beta$ 细胞的增生和转化。曾报道胚胎干细胞衍生细胞在纠正血糖的同时造成畸胎瘤的形成<sup>[59]</sup>。GLP-1通过诱导导管干/祖细胞转化增生成胰岛内分泌细胞而使 $\beta$ 细胞数量增加<sup>[60]</sup>。Extendin-4是一种长效GLP-1促效剂,刺激导管干/祖细胞转化为 $\beta$ 细胞以及胰腺切除后的大鼠 $\beta$ 细胞的增生。体外研究显示胰高血糖素样肽诱导PDX-1阳性导管细胞转化为胰岛素分泌细胞。GLP-1和extendin-4能使胰腺AR42J细胞转化为产胰高血糖素和产胰岛素细胞<sup>[61]</sup>。

在体外,成纤维细胞生长因子(FGF-10)能诱导胰腺导管上皮细胞增生,因此也可用于扩增干/祖细胞。FGF-10也可在胰腺器官形成早期阶段维持上皮祖细胞的增生能力; FGF-10也可促进上皮细胞的增生和阻止上皮细胞的转化<sup>[62]</sup>。

角质细胞生长因子(KGF)是肝素绑定成纤维生长因子家族的一员,能在体内提高胰腺导管细胞的增生。转基因鼠中 $\beta$ 细胞表达的KGF促进

导管细胞的增生. 而且, KGF能通过激活导管细胞增生和 $\beta$ 细胞转化而诱导胎儿 $\beta$ 细胞扩增. 因此, 在移植的人胎胰腺中 $\beta$ 细胞数目增加<sup>[63]</sup>.

另外, 有研究表明KGF和烟碱能诱导胰岛祖细胞的转化和增生. Chen *et al*<sup>[64]</sup>报道在体外成功应用尼克酰胺与 $\beta$ -巯基丙醇转化骨髓间充质细胞为有功能胰岛 $\beta$ 细胞. 而Shi *et al*<sup>[65]</sup>也在体外联合应用苯丙酸诺龙、全反式维甲酸及一些成熟因子成功诱导大鼠胚胎干细胞衍生为产胰岛素细胞, 该细胞内胰岛素分泌可被血糖浓度调控.

表皮生长因子(EGF)在成体再生的胰腺中诱导, 胰岛中过度表达EGF使胰岛生长紊乱, 也可在体外促进导管细胞生长, EGF也能扩增胚胎胰腺上皮干/祖细胞, 也能抑制上皮干/祖细胞转化为内分泌组织. 在糖尿病鼠中调控EGF/胃泌素可使 $\beta$ 细胞增加<sup>[66]</sup>.

$\beta$ 细胞纤维素(BTC)是表皮生长因子家族的一员, 最初是在胰岛素瘤细胞系中分离出来的, 在胎儿胰腺内分泌祖细胞生长和转化过程中起重要作用, 并使分泌淀粉酶的胰腺AR42J细胞转化为产胰岛素细胞. BTC在动物糖尿病模型中促进胰腺 $\beta$ 细胞再生, 并诱导胰腺祖细胞或胰腺导管细胞生成 $\beta$ 细胞<sup>[67]</sup>. BTC也能增加葡萄糖新陈代谢, 即在链脲酶素糖尿病模型中促进胰岛前体细胞转化为 $\beta$ 细胞.

干细胞生长因子(HGF)能促进 $\beta$ 细胞增生和胎儿及成体胰腺再生. 胰岛过度表达HGF的转基因鼠对链脲酶素诱导的糖尿病有抵抗作用并促进 $\beta$ 细胞增生和胰岛细胞增加. 与Activin-A一起, HGF能诱导AR42J细胞生成产胰岛素细胞. 体外研究表明, HGF在纤维素基质支持下促进 $\beta$ 细胞增生<sup>[68]</sup>. 还有一些研究证明, HGF未成熟细胞向产胰岛素细胞转化.

总之, GLP-1、extendin-4、FGF、BTC、HGF在胰腺导管细胞和胰岛内有益于促进 $\beta$ 细胞再生. 活化素(activin)、转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )家族成员, 在不同类型细胞之间转化及管理胚胎轴式发育和前肠源性器官的功能方面有重要作用. activin-A能促进人胚胎胰腺细胞的转化, 使AR42J细胞转化为内分泌细胞. 经过activin-A和BTC处理的新生鼠导管细胞转化为产胰岛素细胞. 我们已知道干扰素模型鼠的成体胰腺再生时activin及其受体将增加. 而且, 部分胰腺切除术和链脲酶素注射后导管细胞中activin的表达也上调, 说明在成体内activin也参与 $\beta$ 细胞再

生的启动. 特别重要的是, 细胞activin的信号抑制剂如activin结合蛋白和Cripto(表皮生长因子的一种)<sup>[69]</sup>也存在于表皮内. activin及其结合蛋白调控再生胰腺细胞的扩增. 对比转基因鼠, 导管上皮细胞增长1.8倍, 而继发的 $\beta$ 细胞转化却受到抑制. 结果说明, 生长和转化的平衡需要activin信号的精确调控, 且其结合蛋白在胰腺的生长过程中参与促进前体细胞的扩增. 事实也证明, activin结合蛋白在体外胰腺祖细胞的扩增过程中是有作用的. 因此选择性的activin的传导信号有益于祖细胞的扩增. 结合其他, 如EGF和FGF-10, 扩增胚胎胰腺祖细胞同时抑制内分泌细胞的转化, 可得到结论: 细胞增生能抑制内分泌细胞的转化, 因此如果我们抑制内分泌细胞的转化有可能促进细胞增生. 因此, 胰腺祖细胞的生长和转化是由生长因子EGF、FGF、Cripto、activin及其结合蛋白等控制的. 其他因子如间质细胞源性因子- $\alpha$ /CXCR4配体受体体系也在祖细胞的生长及迁移过程中起重要作用. 血管内皮生长因子也促进导管细胞复制及胰岛素分泌. 近来报道生长转化因子-11不调控胰岛前体细胞的生成, 而是调控胰岛的大小及 $\beta$ 细胞的成熟和聚集. conophylline是从热带植物小叶狗牙花中提取出来的新的长春碱类衍生物, 通过与activin-A相似的途径促进胰腺AR42J细胞的转化. 由于conophylline是比activin-A较小的分子, 有较好的组织穿透性. conophylline促进胎鼠胰腺器官形成和胰腺祖细胞的转化, 并促进在体内体外 $\beta$ 细胞的形成<sup>[70]</sup>. 虽然已知许多因子在胰腺祖细胞的转化和生长过程中有重要作用, 但对这些因子之间的关系和胰腺发育过程中的重要转录因子所知甚少. GLP-1是已知的通过诱导胰腺发育必需的胰十二指肠同源异型盒基因(PDX-1)的表达促进 $\beta$ 细胞生长和转化. Extendin-4通过激活腺苷酸环化酶和MAP激酶活性(他们激活PDX-1和HNF3b)促进人胰腺导管细胞转化为内分泌细胞. 已有报道, 胰岛发育过程起重要作用的转录因子Pax4和神经元素3的表达在activin和HGF促进AR42J的细胞转化过程中明显增加<sup>[71]</sup>. 在探索KGF诱导导管祖细胞转化为 $\beta$ 细胞的机制时, Movassat *et al*认为KGF通过促进activin的表达而促进转化. 这是基于在皮肤中KGF使activin的表达增加而得出的结论<sup>[72]</sup>. 很明显, 对于这些重要课题的进一步研究将增加我们对胰腺祖细胞的扩增和转化机制的了解.



总之, 胰腺干细胞的巨大潜能, 为临床上治疗糖尿病展示了一个美好的前景, 但仍需充分了解胰腺干细胞的特性, 其关键环节在于突破胰腺干细胞的标志物, 他是了解细胞生物学的通道. 胰腺干细胞作为供移植替换受损的胰岛组织的能力是无限的, 但在临床运用前如何控制其定向分化、基因修饰和选择、提纯等是广泛开展的重要前提; 另外在临床运用后如何防止移植的干细胞形成胚胎组织瘤, 也是需进一步研讨的内容. 因此, 胰腺干细胞对人类发育生物学的基础研究和临床医学都具有相当重要的意义, 如果一旦攻克胰腺干细胞这个难题, 将会在内分泌界及糖尿病的治疗上产生一次重大革命.

## 6 参考文献

- 1 Yamada S, Kojima I. Regenerative medicine of the pancreatic beta cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 218-226
- 2 Path G, Seufert J. Current status and perspectives of stem cell therapy for the treatment of diabetes mellitus. *Med Klin (Munich)* 2003; 98: 277-282
- 3 Minami K, Okuno M, Miyawaki K, Seino S. Regenerative medicine of the pancreas. *Nippon Rinsho* 2003; 61: 504-508
- 4 Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238
- 5 Kume S. Stem-cell-based approaches for regenerative medicine. *Dev Growth Differ* 2005; 47: 393-402
- 6 Soria B, Roche E, Reig JA, Martin F. Generation of insulin-producing cells from stem cells. *Novartis Found Symp* 2005; 265: 158-167
- 7 Soria B, Bedoya FJ, Martin F. Gastrointestinal stem cells. I. Pancreatic stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G177-G180
- 8 Ben-Yehudah A, Witchel SF, Hyun SH, Chaillet JR, Schatten G. Can diabetes be cured by therapeutic cloning? *Pediatr Diabetes* 2004; 5: 79-87
- 9 Ramiya V, Schatz D. Islet replacement vs. regeneration: hope or hype? *Pediatr Diabetes* 2004; 5: 45-56
- 10 Habener JF. A perspective on pancreatic stem/progenitor cells. *Pediatr Diabetes* 2004; 5: 29-37
- 11 Heit JJ, Kim SK. Embryonic stem cells and islet replacement in diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 2004; 5: 5-15
- 12 Burns CJ, Persaud SJ, Jones PM. Stem cell therapy for diabetes: do we need to make beta cells? *J Endocrinol* 2004; 183: 437-443
- 13 Uzan G. Therapeutic use of stem cells. II. Adult stem cells. *Rev Prat* 2004; 54: 1515-1527
- 14 Csete M. Cellular transplantation. *Anesthesiol Clin North America* 2004; 22: 887-901
- 15 Korec R. From Langerhans islets to pancreas transplantation over the past 30 years: a review with personal contributions. *Cell Tissue Bank* 2004; 5: 177-183
- 16 Montanya E. Islet- and stem-cell-based tissue engineering in diabetes. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 435-440
- 17 Bretzel RG, Eckhard M, Brendel MD. Pancreatic islet and stem cell transplantation: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Panminerva Med* 2004; 46: 25-42
- 18 Street CN, Sipione S, Helms L, Binette T, Rajotte RV, Bleackley RC, Korbitt GS. Stem cell-based approaches to solving the problem of tissue supply for islet transplantation in type 1 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 667-683
- 19 Street CN, Rajotte RV, Korbitt GS. Stem cells: a promising source of pancreatic islets for transplantation in type 1 diabetes. *Curr Top Dev Biol* 2003; 58: 111-136
- 20 Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology* 2003; 398-418
- 21 Ball SG, Barber TM. Molecular development of the pancreatic beta cell: implications for cell replacement therapy. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 349-355
- 22 Guo XM, Wang CY. Recent advances in islet transplantation and pancreatic stem cell research. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2003; 25: 83-87
- 23 Bonner-Weir S, Toschi E, Inada A, Reitz P, Fonseca SY, Aye T, Sharma A. The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. *Pediatr Diabetes* 2004; 5 Suppl 2: 16-22
- 24 Hardikar AA. Generating new pancreas from old. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 198-203
- 25 Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7999-8004
- 26 Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O, Otonkoski T. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* 2003; 52: 2007-2015
- 27 Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000; 6: 278-282
- 28 Ogata T, Park KY, Seno M, Kojima I. Reversal of streptozotocin-induced hyperglycemia by transplantation of pseudoislets consisting of beta cells derived from ductal cells. *Endocr J* 2004; 51: 381-386
- 29 Guz Y, Nasir I, Teitelman G. Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* 2001; 142: 4956-4968
- 30 Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 2002; 143: 3152-3161
- 31 Petropavlovskaya M, Rosenberg L. Identification and characterization of small cells in the adult pancreas: potential progenitor cells? *Cell Tissue Res* 2002; 310: 51-58
- 32 Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 2004; 53: 2143-2152
- 33 Hussain MA, Theise ND. Stem-cell therapy for dia-

- betes mellitus. *Lancet* 2004; 364: 203-203
- 34 Peck AB, Yin L, Ramiya V. Animal models to study adult stem cell-derived, *in vitro*-generated islet implantation. *ILAR J* 2004; 45: 259-267
  - 35 Abraham EJ, Kodama S, Lin JC, Ubeda M, Faustman DL, Habener JF. Human pancreatic islet-derived progenitor cell engraftment in immuno-competent mice. *Am J Pathol* 2004; 164: 817-830
  - 36 Holland AM, Gonez LJ, Harrison LC. Progenitor cells in the adult pancreas. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 13-27
  - 37 Rosenberg L, Brown RA, Duguid WP. A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas. *J Surg Res* 1983; 35: 63-72
  - 38 Rosenberg L, Vinik AI. Induction of endocrine cell differentiation: a new approach to management of diabetes. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 75-83
  - 39 Wang RN, Kloppel G, Bouwens L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 1995; 38: 1405-1411
  - 40 Zysset T, Sommer L. Diabetes alters drug metabolism-*in vivo* studies in a streptozotocin-diabetic rat model. *Experientia* 1986; 42: 560-562
  - 41 Wu F, Jagir M, Powell JS. Long-term correction of hyperglycemia in diabetic mice after implantation of cultured human cells derived from fetal pancreas. *Pancreas* 2004; 29: e23-e29
  - 42 Peck AB, Ramiya V. *In vitro*-generation of surrogate islets from adult stem cells. *Transpl Immunol* 2004; 12: 259-272
  - 43 Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seijffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 2000; 6: 568-572
  - 44 Baeyens L, De Breuck S, Lardon J, Mfopou JK, Rooman I, Bouwens L. In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia* 2005; 48: 49-57
  - 45 Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, Peister A, Wang MY, Prockop DJ. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2397-2402
  - 46 Vassilopoulos G, Russell DW. Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 480-485
  - 47 Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; 111: 843-850
  - 48 Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest* 2004; 84: 607-617
  - 49 Lechner A, Yang YG, Blacken RA, Wang L, Nolan AL, Habener JF. No evidence for significant trans-differentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells *in vivo*. *Diabetes* 2004; 53: 616-623
  - 50 Tessem JS, DeGregori J. Roles for bone-marrow-derived cells in beta-cell maintenance. *Trends Mol Med* 2004; 10: 558-564
  - 51 Mathews V, Hanson PT, Ford E, Fujita J, Polonsky KS, Graubert TA. Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury. *Diabetes* 2004; 53: 91-98
  - 52 Sumi S, Gu Y, Hiura A, Inoue K. Stem cells and regenerative medicine for diabetes mellitus. *Pancreas* 2004; 29: 85-89
  - 53 Blyszczuk P, Wobus AM. Stem cells and pancreatic differentiation *in vitro*. *J Biotechnol* 2004; 113: 3-13
  - 54 Jun HS, Yoon JW. Approaches for the cure of type 1 diabetes by cellular and gene therapy. *Curr Gene Ther* 2005; 5: 249-262
  - 55 Lechner A. Stem cells and regenerative medicine for the treatment of type 1 diabetes: the challenges lying ahead. *Pediatr Diabetes* 2004; 5 Suppl 2: 88-93
  - 56 Shambloot MJ, Clark GO. Cell therapies for type 1 diabetes mellitus. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 269-277
  - 57 Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 2004; 429: 41-46
  - 58 Efrat S. Generation of surrogate beta cells from tissue stem cells. *Curr Diab Rep* 2004; 4: 298-303
  - 59 Fujikawa T, Oh SH, Pi L, Hatch HM, Shupe T, Petersen BE. Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am J Pathol* 2005; 166: 1781-1791
  - 60 Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 2000; 49: 741-748
  - 61 Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM. Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes* 1999; 48: 2358-2366
  - 62 Norgaard GA, Jensen JN, Jensen J. FGF10 signaling maintains the pancreatic progenitor cell state revealing a novel role of Notch in organ development. *Dev Biol* 2003; 264: 323-338
  - 63 Movassat J, Beattie GM, Lopez AD, Portha B, Hayek A. Keratinocyte growth factor and beta-cell differentiation in human fetal pancreatic endocrine precursor cells. *Diabetologia* 2003; 46: 822-829
  - 64 Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3016-3020
  - 65 Shi Y, Hou L, Tang F, Jiang W, Wang P, Ding M, Deng H. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. *Stem Cells* 2005; 23: 656-662
  - 66 Brand SJ, Tagerud S, Lambert P, Magil SG, Tatar-kiewicz K, Doiron K, Yan Y. Pharmacological treatment of chronic diabetes by stimulating pancreatic beta-cell regeneration with systemic co-administration of EGF and gastrin. *Pharmacol Toxicol* 2002; 91: 414-420
  - 67 Yamamoto K, Miyagawa J, Waguri M, Sasada R, Igarashi K, Li M, Nammo T, Moriwaki M, Imagawa A, Yamagata K, Nakajima H, Namba M, Tochino Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Recombinant human betacellulin promotes the neogenesis of beta-cells and ameliorates glucose intolerance in mice with diabetes induced by selective alloxan perfusion. *Diabetes* 2000; 49: 2021-2027

- 68 Beattie GM, Montgomery AM, Lopez AD, Hao E, Perez B, Just ML, Lakey JR, Hart ME, Hayek A. A novel approach to increase human islet cell mass while preserving beta-cell function. *Diabetes* 2002; 51: 3435-3439
- 69 Gray PC, Harrison CA, Vale W. Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5193-5198
- 70 Ogata T, Li L, Yamada S, Yamamoto Y, Tanaka Y, Takei I, Umezawa K, Kojima I. Promotion of beta-cell differentiation by conophylline in fetal and neonatal rat pancreas. *Diabetes* 2004; 53: 2596-2602
- 71 Zhang YQ, Mashima H, Kojima I. Changes in the expression of transcription factors in pancreatic AR42J cells during differentiation into insulin-producing cells. *Diabetes* 2001; 50 Suppl 1: S10-S14
- 72 Beer HD, Gassmann MG, Munz B, Steiling H, Engelhardt F, Bleuel K, Werner S. Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000; 5: 34-39

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

•消息•

## 第一届全国临床营养支持学术会议通知

经中华医学会外科学分会批准,“第十届全国临床营养支持学术会议”将于2006-05在上海召开。本次会议由中华医学会外科学分会营养支持学组主办、复旦大学附属中山医院承办,主要内容为临床营养支持领域的基础和临床实践总结。现将征文要求通知如下:

### 1 征文要求

请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要邮寄到上海市医学院路136号,上海中山医院外科吴国豪收,邮编:200032;同时请用Email将论文全文及摘要发送到prowugh@yahoo.com.cn,注明上海中山医院外科吴国豪收。征文请自留底稿,恕不退稿。

### 2 截稿日期

征文截止日期:2006-03-15。

本次会议举行优秀论文评奖活动,欢迎踊跃投稿。会议向正式代表颁布中华医学会继续教育学分。



# 脾肿瘤的诊治进展

黄跃南, 郭欣, 王夫景, 于洪亮, 杨茂鹏, 王启余, 杨维良

黄跃南, 王夫景, 于洪亮, 杨茂鹏, 杨维良, 哈尔滨医科大学  
附属第二医院普外三科, 黑龙江省哈尔滨市 150086  
郭欣, 哈尔滨市中医医院外科, 黑龙江省哈尔滨市 150076  
王启余, 桦南县医院外科, 黑龙江省桦南县 154000  
通讯作者: 郭欣, 150076, 黑龙江省哈尔滨市道里区建国街副  
270号, 哈尔滨市中医医院外科, dr-guoxin@163.com  
电话: 0451-86297856  
收稿日期: 2005-12-08 接受日期: 2005-12-31

## 摘要

脾肿瘤是临床少见的肿瘤类型, 但其组织成分来源、临床表现复杂多样, 良恶性混杂, 并常有多种来源致病因素交杂, 易被临床医生忽略, 早期又缺乏特殊的临床表现, 因此, 不易早期作出诊断并进行正确治疗。随着各项诊断技术的出现和提高, 特别是分子生物学技术的应用, 使我们对于脾肿瘤的认识逐渐加深, 有助于提高肿瘤的治愈率, 改善预后。我们从脾肿瘤的发病情况、临床表现、诊断及治疗进展几方面对文献进行综述, 对各种辅助检查手段加以评估, 以期早期诊断脾肿瘤并采取恰当的治疗措施, 提高生存率。

**关键词:** 脾肿瘤; 诊断; 治疗

黄跃南, 郭欣, 王夫景, 于洪亮, 杨茂鹏, 王启余, 杨维良. 脾肿瘤的  
诊治进展. 世界华人消化杂志 2006;14(4):429-433  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/429.asp>

## 0 引言

脾脏肿瘤的发病率低, 国内外文献均缺乏大宗病例报道, 良性肿瘤发病率约为0.14%, 恶性肿瘤不超过全部恶性肿瘤的0.64%, 脾脏肿瘤本身也很少引起外科医生注意, 本病早期又缺乏特殊的临床表现, 故不易及时作出正确的诊断及治疗。

## 1 脾肿瘤的发病情况

脾脏是免疫器官, 血运丰富, 肿瘤的发生率低。脾囊肿的超声检查发现率为1/1 500, 42 000例尸检发现32例, 以女性多见, 80%为单发。脾脏原发恶性肿瘤罕见, 有报道在11 707例尸检和68 820例手术标本中仅发现5例脾原发性肿瘤。脾脏原发肿瘤中, 以恶性淋巴瘤为多见, 其次为血管内皮肉瘤、纤维组织肉瘤等, 脾转移瘤的发病情

况大多来源于尸检报告, 其发生率在3.3%-5%之间, 日本近10 a共报道脾转移肿瘤50例<sup>[1]</sup>, 很少发生脾转移可能与以下原因有关: (1)解剖学特异性, 脾脏输入淋巴管少, 脾动脉曲折弯曲, 脾动脉从腹主动脉分支呈锐角, 阻止瘤栓进入; (2)脾经常有节律地收缩, 肿瘤细胞被挤压出去或难以停留; (3)脾具有免疫监视能力, 脾脏为外周免疫器官, 是抗肿瘤抗体产生的重要器官, 具有大量的Tuftsin、FN及 $\gamma$ -干扰素等非特异性抗肿瘤物质, 参与抗肿瘤免疫反应, 并含有大量的记忆性T细胞和辅助性T细胞, 能杀灭抑制肿瘤细胞。脾转移瘤的原发肿瘤多为肺癌、乳腺癌、卵巢癌、恶性黑色素瘤, 其次为中胚层来源肿瘤, 如: 肠、肾肿瘤等<sup>[2]</sup>。一般认为肿瘤发生脾转移时, 50%的病例已有全身性广泛转移。

## 2 脾肿瘤的分类

脾脏肿瘤的分类较复杂, 按组织成分来源分为四种: (1)类肿瘤病变: 包括非寄生虫性囊肿、错构瘤; (2)血管肿瘤: 分为良、恶性; (3)淋巴瘤: 何杰金氏病、非何杰金氏病、类淋巴瘤; (4)非淋巴瘤: 包括脂肪瘤、恶性纤维细胞瘤、恶性畸胎瘤等, 此种分类法主要用于临床。国内学者为确定肿瘤性质、判断来源提出以下分类: (1)血管来源; (2)淋巴组织来源; (3)胚胎组织来源; (4)神经组织来源; (5)其他间叶组织来源: 如纤维组织、脂肪组织及平滑肌组织等; (6)类肿瘤病变: 如创伤性囊肿性假瘤, 炎性假瘤等。脾脏肿瘤良性多于恶性, 良性肿瘤中脾囊肿最为常见, 恶性肿瘤中恶性淋巴瘤多见。临床上判断肿瘤的良、恶性对于治疗和预后至关重要<sup>[3]</sup>。转移肿瘤的来源较为复杂, 有甲状腺癌、卵巢腺癌、恶性胰岛细胞瘤转移复发等<sup>[4-9]</sup>; 外伤性脾损伤胸廓内植入<sup>[10]</sup>或外伤后恶性淋巴瘤, 上皮来源脾囊肿, 脾衬细胞血管瘤伴内脏肿瘤或淋巴瘤, 脾错构瘤, 恶性梭形细胞瘤等<sup>[11-17]</sup>。

## 3 脾肿瘤的临床表现

脾脏位于膈下且被周围骨骼所保护, 其肿瘤早

## ■背景资料

随着各项诊断技术的出现和提高, 特别是分子生物学技术的应用, 使我们对于脾肿瘤的认识逐渐加深, 有助于提高肿瘤的治愈率, 改善预后。B超引导下细针穿刺抽吸活检, 多普勒超声的引进, PET和CT结合应用, 细胞免疫分型、细胞毒性蛋白标志, 免疫组织化学技术的应用等都是进一步研究的重点。

## ■ 相关报道

- 1 Tserkezoglou A, Kontou S, Hatjieleftheriou G, Nikolaidou ME, Plataniotis G, Apostolikas N, Magiakos G. Solitary parenchymal splenic recurrence of ovarian adenocarcinoma: a case report and review of the literature. *Anticancer Res* 2005; 25: 1471-1476
- 2 Khanna A, Koniaris LG, Nakeeb A, Schoeniger LO. Laparoscopic spleen-preserving distal pancreatectomy. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 733-738
- 3 Raval MV, Zemon H, Kumar SS, Brody FJ. Laparoscopic splenectomy for metastatic squamous cell cancer of the neck. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2005; 15: 383-386

期不易被发现,临床表现和肿瘤的性质、部位、大小及脾肿大的程度有直接关系.主要临床表现如下:(1)脾肿大数同时伴有左上腹不适、疼痛及压迫症状,如腹胀、恶心、便秘、呼吸困难等.(2)脾功能亢进与脾肿大有一定关系,但症状与脾肿大程度并不成比例,对于难以解释的脾功能亢进伴脾肿大应高度怀疑肿瘤的存在特别是血管瘤<sup>[18]</sup>.吴福生 *et al*<sup>[19]</sup>曾报道脾结核因炎症刺激可使脾脏增生肿大,导致脾功能亢进.(3)全身症状多见于脾脏恶性肿瘤,表现为低热、贫血、乏力、周身不适、消瘦、恶病质等.杨连粤 *et al*<sup>[20]</sup>曾报道良性肿瘤由于生长速度过快,导致内部缺血坏死,合并感染引起高热.(4)脾肿瘤自发性破裂临床少见,表现为突发腹痛、腹膜炎,可有出血性休克甚至死亡.如果脾破裂伴有早期转移则是预后最差的影响因素<sup>[21]</sup>.自发性脾破裂有继发于嗜血细胞综合征、血管外皮瘤和浆膜多发血管瘤、T细胞白血病等<sup>[22-24]</sup>.一部分可伴发腹腔种植性转移,多见于脾血管瘤、血管肉瘤自发性破裂.而Chen *et al*<sup>[25]</sup>曾报道过较少见的是肝脾 $\gamma\delta$ -T细胞淋巴瘤.也有报道副脾异位至胰腺中<sup>[26]</sup>.

#### 4 脾肿瘤的诊断

随着影像技术的发展,不仅使脾肿瘤的检出率不断提高<sup>[27]</sup>,而且有助于脾脏原发恶性肿瘤的诊断及分型,现列出常用的检查方法.

X线检查:腹部平片可见脾影不规则性增大;胸片可见左膈肌抬高,活动度受限,胸腔积液.

超声波检查常作为诊断的首选方法<sup>[28,29]</sup>,B超以其方便经济无创等优点被广泛应用,其阳性检出率为96.1%,良性病变多表现为单发的局限于脾内的占位性病变,内部回声均匀,多为低回声区,边界清楚,有包膜;恶性病变多表现为单发或多发脾内占位性病变,内部回声不均匀,边界欠清,有的甚至脾外浸润;错构瘤表现为实质性等回声包块<sup>[30]</sup>;脾血管内皮肉瘤显示脾内有多个中等回声增强区,边界清,其内有大小不等的液性暗区及网络状结构.但对于较大包块致脾脏明显增大至右上腹并将胰腺推至后方者<sup>[31]</sup>,较易与胰源性囊肿混淆,彩色多普勒超声可清楚显示两条并行血管(脾动、静脉)从肿物中心发出至外周形成扇形分支,以确定肿物为脾源性<sup>[32]</sup>.多普勒超声的引进,根据脾肿瘤血流强度的变化对肿瘤定性诊断有优势.对于脾错构瘤的诊断不需应用造影剂多普勒超声就可

明确诊断,而CT、MRI却无意义<sup>[33]</sup>.采用组织谐波成像、彩色多普勒显像、彩色多普勒能量图三者相结合的超声检查方案,能初步鉴别脾脏肿瘤的良恶性.动态监测病变的发展,为早期诊断、及时治疗以及治疗方案的选择提供可靠的依据<sup>[34]</sup>.国外学者在B超引导下细针穿刺抽吸活检<sup>[35]</sup>,既可明确诊断,又避免误伤,实践证明是安全、可靠的确诊方法<sup>[36]</sup>.其缺点是超声结果易受操作者技术水平的限制,肠气干扰等因素影响,对邻近脏器是否受累不易判断.因此对肿瘤组织定性诊断最终依赖于病理检查结果.

CT诊断脾脏肿瘤的准确率较高,文献报道其准确率可达90%以上<sup>[37]</sup>,不但能清楚显示病灶范围和毗邻关系,也可发现较小的转移性病灶.吴恩福 *et al*<sup>[38]</sup>提出三步诊断法:(1)是否是肿瘤;(2)是良性肿瘤抑或是恶性肿瘤;(3)可能的病理诊断,以提高CT定性诊断的准确率.特别采用<sup>18</sup>F-脱氧葡萄糖PET/CT<sup>[39]</sup>,对于病变尚未引起局部解剖结构改变之前,PET能较早期发现病灶和CT能解剖定位的优点,对肿瘤的定位诊断、分期和临床决策有重要价值<sup>[40-43]</sup>.

一般认为MRI对脾脏占位性病变的诊断价值并不优于CT,且费用昂贵,多不采用.对于脾肿瘤与周围组织分界不清,难以鉴别者,可给予超顺磁造影剂口服<sup>[44]</sup>和选择性脾动脉造影,其对诊断脾脏肿瘤特别是良恶性的术前鉴别有较高的准确性<sup>[45]</sup>.典型的影像为脾实质缺损,边缘不清,脾动脉分支受压呈弧形,可出现病理动脉分支.在毛细血管相可产生因血管不规则或缺如所致的不均质改变.转移性肿瘤可见血管强直、不规则狭窄、血管腔闭塞及不规则的新生血管形成<sup>[46]</sup>.对比两种分析方法肝脾容量分析法和二维空间分节运动的MRI成像技术,得出结论:前者较后者节省时间<sup>[47]</sup>.

对于脾肿瘤,肝脾及骨髓病理检查具有重要意义.不同瘤细胞的形态特点以及对肝窦、脾红髓与白髓、骨髓的血窦的浸润情况,细胞免疫分型、细胞毒性蛋白标志等,免疫组织化学技术的应用,能全面地对淋巴瘤、特殊类型的白血病进行分类<sup>[48,49]</sup>,有助于化疗药物的应用及结果的判定<sup>[50-59]</sup>.

虽原发性脾脏恶性淋巴瘤的发病率不足恶性淋巴瘤的1%,但仍是脾脏原发性肿瘤最高者<sup>[60]</sup>,原发脾脏恶性淋巴瘤的诊断标准是:(1)临床上首发在左上腹部隐痛及其由于脾肿大所造成的相应的压迫症状;(2)未发现其他部位有受累



的情况; (3)手术中探查肿瘤仅限于脾脏; (4)诊断后其他部位6 mo不出现淋巴瘤。原发性脾脏恶性淋巴瘤的诊断对于指导治疗及预后有重要意义。

## 5 脾肿瘤的治疗

脾脏肿瘤的治疗以手术治疗为首选, 在定性诊断困难, 脾脏恶性淋巴瘤需分型以便制定化疗方案时, 脾切除甚至可以作为诊断性治疗<sup>[61]</sup>。除了明确诊断外, 还可治愈合并的脾功能亢进所导致的贫血, 以及恶性肿瘤导致的脾破裂<sup>[62]</sup>。对于脾囊肿, 特别是巨大、壁薄有压迫症状的囊肿, 应及早手术。Treutner *et al*<sup>[63]</sup>认为脾囊肿直径>2 cm, 就应手术治疗。对于脾血管瘤, 直径大于10 cm近脾包膜或凸出脾包膜; 或近期增大迅速, 症状明显可考虑行脾切除术或脾部分切除术。对于脾脏免疫功能的认识加深, 减少脾切除术后凶险感染的发生机会, 目前多主张如果肿瘤局限于脾的某一部分, 应行脾部分切除术, 一般认为保留脾脏的25%<sup>[64]</sup>即可维持正常功能, 或行正常脾片自体移植术, 以保证脾脏功能。总之, 脾良性肿瘤在保证切除彻底无复发情况下, 尽量保留足够的脾组织以保存脾脏功能。

脾脏恶性肿瘤应采取手术为主的综合治疗。尽量做到早期诊断, 早期治疗, 完整切除脾脏, 同时进行淋巴结的彻底清扫。原发性恶性脾肿瘤的治疗应根据病程选择相应的手术。Ahmann *et al*<sup>[65]</sup>将脾恶性肿瘤分为三期: I 期瘤组织完全局限于脾内; II 期累及脾门淋巴结; III 期累及脾或腹腔内淋巴结。原发性脾恶性肿瘤的治疗应根据病程选择相应的手术, 对于 I 期行单纯脾切除术, II、III 期还应行脾门淋巴结清扫。原发性脾血管瘤恶性程度较高, 较早发生肝、淋巴结转移, 对放、化疗不敏感, 预后极差。而对于脾原发恶性淋巴瘤的治疗, 有人认为<sup>[66]</sup>单纯手术切除和术后进行辅助化疗的预后无明显区别。

随着腹腔镜技术的引进, 脾脏良性病变, 如脾囊肿, 有报道采用腹腔镜下囊肿摘除加网膜填塞术治疗<sup>[67,68]</sup>, 效果满意, 推动脾脏手术治疗向微创方向发展。Raval *et al*<sup>[69]</sup>报道过颈部鳞癌脾转移病例进行腹腔镜检查发现病损仅存在于脾, 因而行腹腔镜脾切除术。而对于恶性肿瘤一般发现较晚, 有增加腹部切口复发可能, 多不采用。因此, 脾脏肿瘤的早期诊断治疗是决定预后的关键<sup>[70]</sup>。

## 6 参考文献

- 1 Tatsuta M, Shiozaki K, Masutani S, Hashimoto K, Imamura H, Ikeda M, Miya A, Ishida H, Kawasaki

- T, Furukawa H, Satomi T, Hoshida Y. Splenic and pulmonary metastases from renal cell carcinoma: report of a case. *Surg Today* 2001; 31: 463-465
- 2 Hadjileontis C, Amplianitis I, Valsamides C, Harisis G, Nepka H, Kafanas A. Solitary splenic metastasis of endometrial carcinoma ten years after hysterectomy. Case report and review of the literature. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25: 233-235
- 3 黄茂华, 卞红强, 魏文琼, 周欣, 李春娣. 小儿原发性脾脏肿瘤13例临床分析. *临床外科杂志* 2002; 10: 356-357
- 4 彭向阳, 戚晓平, 花锦友, 方丽. 甲状腺癌脾转移1例. *中国普通外科杂志* 2002; 11: 266
- 5 Tserkezoglou A, Kontou S, Hatjieleftheriou G, Nikolaidou ME, Plataniotis G, Apostolikas N, Magiakos G. Solitary parenchymal splenic recurrence of ovarian adenocarcinoma: a case report and review of the literature. *Anticancer Res* 2005; 25: 1471-1476
- 6 杨荣华, 吕民生, 梅建民, 聂洪峰. 脾脏错构瘤1例报告. *肿瘤防治研究* 2002; 29: 467
- 7 吴茂铸, 蔡卫东, 郭勇, 应琦, 正武俊. 脾囊性淋巴瘤1例. *医学影像学杂志* 2005; 15: 647
- 8 张伟, 杨爱清, 林琳. 恶性胰岛细胞瘤脾转移1例. *中国普通外科杂志* 1999; 8: 162
- 9 Alaraj AM, Chamoun RB, Dahdaleh NS, Sfeir PM, Miski MS, Otrock ZK, Skaf GS. Thoracic splenosis mimicking thoracic schwannoma: case report and review of the literature. *Surg Neurol* 2005; 64: 185-188
- 10 Papakonstantinou C, Christoforidis E, Vasiliadis K, Kanellos I, Zarogoulidis K. Thoracic splenosis twenty-nine years after traumatic splenectomy mimicking intrathoracic neoplasm. *Eur Surg Res* 2005; 37: 76-78
- 11 王阜光, 王莉, 李景阳. 外伤后脾脏恶性淋巴瘤1例. *中国误诊学杂志* 2005; 5: 1796-1797
- 12 Palmieri I, Natale E, Crafa F, Cavallaro A, Mingazzini PL. Epithelial splenic cysts. *Anticancer Res* 2005; 25: 515-521
- 13 刘亚平, 王生录, 姜小军, 尤丽霞. 脾原发性恶性淋巴瘤1例. *临床肿瘤学杂志* 2003; 8: 76-77
- 14 Mohan V, Jones RC, Drake AJ 3rd, Daly PL, Shakir KM. Littoral cell angioma presenting as metastatic thyroid carcinoma to the spleen. *Thyroid* 2005; 15: 170-175
- 15 杨进源, 周黎明, 雷松, 张毅. 脾脏恶性梭形细胞瘤1例. *中国误诊学杂志* 2005; 5: 2792-2793
- 16 邱云峰, 许世吾, 宋兆东, 杨维良. 脾囊肿11例报告. *中国普通外科杂志* 2002; 11: 243-245
- 17 Ali TZ, Beyer G, Taylor M, Volpe C, Papadimitriou JC. Splenic hamartoma: immunohistochemical and ultrastructural profile of two cases. *Int J Surg Pathol* 2005; 13: 103-111
- 18 汪永录, 周汉高, 林珍梅. 脾海绵状血管瘤2例. *新消化病学杂志* 1997; 5: 261
- 19 吴福生, 董秀志, 滕理送, 马志敏. 脾脏占位性病变. *中国普通外科杂志* 2002; 11: 536-537
- 20 杨连粤, 吕新生, 黄耿文. 原发性脾脏肿瘤的诊断与治疗. *中华肝胆外科杂志* 2001; 7: 331-333
- 21 Valbuena JR, Levenback C, Mansfield P, Liu J. Angiosarcoma of the spleen clinically presenting as metastatic ovarian cancer. A case report and review of the literature. *Ann Diagn Pathol* 2005; 9: 289-292
- 22 Etzion Y, Benharroch D, Saidel M, Riesenber K, Gilad J, Schlaeffer F. Atraumatic rupture of the spleen associated with hemophagocytic syndrome and isolated splenic peliosis. *APMIS* 2005; 113: 555-557
- 23 Yilmazlar T, Kirdak T, Yerci O, Adim SB, Kanat O, Manavoglu O. Splenic hemangiopericytoma and serosal cavernous hemangiomatosis of the adjacent

## ■同行评价

脾脏肿瘤为临床少见疾病, 本文综合国内外相关文献, 对脾肿瘤予以讨论, 有一定实用价值。文章思路清晰、条理清楚、用词准确。不足之处是对于脾肿瘤诊治的进展方面及前沿涉及较少。



- colon. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4111-4113
- 24 Arimura K, Arima N, Kukita T, Inoue H, Arai A, Matsushita K, Taguchi S, Yoshida H, Ozaki A, Kawada H, Akimoto M, Tei C. Fatal splenic rupture caused by infiltration of adult T cell leukemia cells. *Acta Haematol* 2005; 113: 255-257
- 25 Chen JH, Chan DC, Lee HS, Liu HD, Hsieh CB, Yu JC, Liu YC, Chen CJ. Spontaneous splenic rupture associated with hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma. *J Formos Med Assoc* 2005; 104: 593-596
- 26 Kanazawa H, Kamiya J, Nagino M, Uesaka K, Yuasa N, Oda K, Arai T, Nishio H, Nimura Y. Epidermoid cyst in an intrapancreatic accessory spleen: a case report. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11: 61-63
- 27 Coon WW. Surgical aspects of splenic disease and lymphoma. *Curr Probl Surg* 1998; 35: 543-646
- 28 王周锋, 董金娥, 张德玲. B超对脾肿瘤的超声显像诊断. *中国超声诊断杂志*. 2003; 4: 278
- 29 李洪忱, 沙东基. 罕见脾肿瘤4例的超声表现分析. *中国超声诊断杂志* 2002; 3: 106-108
- 30 李智宇, 黄奕华, 覃建章. 脾脏占位性病变的诊治体会. *腹部外科* 2002; 15: 214-215
- 31 Thompson WM, Levy AD, Aguilera NS, Gorospe L, Abbott RM. Angiosarcoma of the spleen: imaging characteristics in 12 patients. *Radiology* 2005; 235: 106-115
- 32 Komatsuda T, Ishida H, Konno K, Hamashima Y, Naganuma H, Sato M, Ishida J, Masamune O. Splenic lymphangioma: US and CT diagnosis and clinical manifestations. *Abdom Imaging* 1999; 24: 414-417
- 33 Nakanishi S, Shiraki K, Yamamoto K, Nakano T, Koyama M, Yano T, Sanda T, Tamaki H, Hirano T, Fukudome K, Ishihara A. Basket pattern blood flow signals discovered in a case of splenic hamartoma by power Doppler ultrasonography. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5235-5238
- 34 卢晓潇, 王薇, 郑笑娟. 组织谐波成像、CDFI及CDE在原发性脾肿瘤鉴别诊断中的应用. *中国医学影像技术* 2004; 20: 1636-1637
- 35 Delacruz V, Jorda M, Gomez-Fernandez C, Benedetto P, Ganjei P. Fine-needle aspiration diagnosis of angiosarcoma of the spleen: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 1054-1056
- 36 Venkataramu NK, Gupta S, Sood BP, Gulati M, Rajawanshi A, Gupta SK, Suri S. Ultrasound guided fine needle aspiration biopsy of splenic lesions. *Br J Radiol* 1999; 72: 953-956
- 37 Lardinois D, Weder W, Hany TF, Kamel EM, Korom S, Seifert B, von Schulthess GK, Steinert HC. Staging of non-small-cell lung cancer with integrated positron-emission tomography and computed tomography. *N Engl J Med* 2003; 348: 2500-2507
- 38 吴恩福, 郑祥武, 李建策, 胡之同. 脾脏肿瘤的CT诊断. *温州医学院学报* 2002; 32: 153-156
- 39 余克凡, 管一晖, 赵军, 左传涛, 戴嘉中, 林祥通. PET/CT在探测脾转移癌中的应用. *中华核医学杂志* 2005; 25: 30-32
- 40 Kluetz PG, Meltzer CC, Villemagne VL, Kinahan PE, Chander S, Martinelli MA, Townsend DW. Combined PET/CT imaging in oncology. Impact on patient management. *Clin Positron Imaging* 2000; 3: 223-230
- 41 Kamel EM, Goerres GW, Burger C, von Schulthess GK, Steinert HC. Recurrent laryngeal nerve palsy in patients with lung cancer: detection with PET-CT image fusion-report of six cases. *Radiology* 2002; 224: 153-156
- 42 Hany TF, Steinert HC, Goerres GW, Buck A, von Schulthess GK. PET diagnostic accuracy: improvement with in-line PET-CT system: initial results. *Radiology* 2002; 225: 575-581
- 43 Yen RF, Wu YW, Pan MH, Tzen KY. Early detection of splenic metastasis of lung cancer by 18F-2-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography. *J Formos Med Assoc* 2005; 104: 674-676
- 44 Santoro L, Santini V, Lollo SD, Valeri A, Colagrande S. Hemolymphangiomas of the spleen: imaging features. *J Comput Assist Tomogr* 2005; 29: 831-833
- 45 彭程, 胡孔旺. 脾脏原发性恶性肿瘤的诊断与治疗. *安徽医科大学学报* 2000; 35: 73-74
- 46 任宏, 石景森, 孙学军, 赵东利, 韩梅荣, 韩玥, 赵冰, 白鸣. 脾脏肿瘤的诊断与治疗. *中华普通外科杂志* 2005; 20: 40-42
- 47 Farraher SW, Jara H, Chang KJ, Hou A, Soto JA. Liver and spleen volumetry with quantitative MR imaging and dual-space clustering segmentation. *Radiology* 2005; 237: 322-328
- 48 Cessna MH, Hartung L, Tripp S, Perkins SL, Bahler DW. Hairy cell leukemia variant: fact or fiction. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 132-138
- 49 Ya-In C, Brandwein J, Pantalony D, Chang H. Hairy cell leukemia variant with features of intrasinusoidal bone marrow involvement. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 395-398
- 50 Vakiani E, Cattoretto G, Colovai AI, Murty VV, Alobeid B, Bhagat G. CD117 expression in diffuse large B-cell lymphomas: fact or fiction? *Pathol Int* 2005; 55: 716-723
- 51 Kim JK, Hahn JS, Kim GE, Yang WI. Three cases of diffuse large B-cell lymphoma presenting as primary splenic lymphoma. *Yonsei Med J* 2005; 46: 703-709
- 52 Takaku T, Miyazawa K, Sashida G, Shoji N, Shimamoto T, Yamaguchi N, Ito Y, Nakamura S, Mukai K, Ohyashiki K. Hepatosplenic alphabeta T-cell lymphoma with myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 2005; 82: 143-147
- 53 Song SY, Ko YH, Ahn G. Mediastinal germ cell tumor associated with histiocytic sarcoma of spleen: case report of an unusual association. *Int J Surg Pathol* 2005; 13: 299-303
- 54 den Hoed ID, Granzen B, Granzen B, Aronson DC, Pauwels P, de Kraker J, van Heurn LW. Metastasis-sized angiosarcoma of the spleen in a 2-year-old girl. *Pediatr Hematol Oncol* 2005; 22: 387-390
- 55 Ercin C, Gurbuz Y, Hacıhanefioglu A, Turgut Karakaya A. Multiple littoral cell angioma of the spleen in a case of myelodysplastic syndrome. *Hematology* 2005; 10: 141-144
- 56 Wei SZ, Liu TH, Wang DT, Cao JL, Luo YF, Liang ZY. Hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3729-3734
- 57 Bilwani F, Usman M, Adil SN, Kakepoto GN, Khurshid MH. Hairy cell leukemia: clinical presentation and long term follow up after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA). *J Pak Med Assoc* 2005; 55: 212-213
- 58 Osuji N, Matutes E, Catovsky D, Lampert I, Wotherspoon A. Histopathology of the spleen in T-cell large granular lymphocyte leukemia and T-cell prolymphocytic leukemia: a comparative review. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 935-941
- 59 Shankar DB, Cheng JC, Kinjo K, Federman N, Moore TB, Gill A, Rao NP, Landaw EM, Sakamoto

- KM. The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis and in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2005; 7: 351-362
- 60 Dachman AH, Buck JL, Krishnan J, Aguilera NS, Buetow PC. Primary non-Hodgkin's splenic lymphoma. *Clin Radiol* 1998; 53: 623-624
- 61 Fritscher-Ravens A, Mylonaki M, Pantes A, Topalidis T, Thonke F, Swain P. Endoscopic ultrasound-guided biopsy for the diagnosis of focal lesions of the spleen. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1022-1027
- 62 Giagounidis AA, Burk M, Meckenstock G, Koch AJ, Schneider W. Pathologic rupture of the spleen in hematologic malignancies: two additional cases. *Ann Hematol* 1996; 73: 297-302
- 63 Treutner KH, Truong S, Schumpelick V. Splenic cyst. Diagnosis, indications and choice of procedure. *Chirurg* 1988; 59: 478-481
- 64 石景森, 杨毅军, 韩玥, 焦兴元, 李国才, 赵凤林. 脾脏占位性病变25例外科治疗经验. *中国实用外科杂志* 1999; 19: 725-726
- 65 Ahmann DL, Kiely JM, Harrison EG Jr, Payne WS. Malignant lymphoma of the spleen. A review of 49 cases in which the diagnosis was made at splenectomy. *Cancer* 1966; 19: 461-469
- 66 Iannitto E, Minardi V, Calvaruso G, Ammatuna E, Florena AM, Mule A, Tripodo C, Quintini G, Abbadessa V. Deoxycoryformycin (pentostatin) in the treatment of splenic marginal zone lymphoma (SMZL) with or without villous lymphocytes. *Eur J Haematol* 2005; 75: 130-135
- 67 Seshadri PA, Poenaru D, Park A. Laparoscopic splenic cystectomy: a case report. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 1439-1440
- 68 Khanna A, Koniaris LG, Nakeeb A, Schoeniger LO. Laparoscopic spleen-preserving distal pancreatectomy. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 733-738
- 69 Raval MV, Zemon H, Kumar SS, Brody FJ. Laparoscopic splenectomy for metastatic squamous cell cancer of the neck. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2005; 15: 383-386
- 70 沈军, 姜宏华, 苏明琪, 全志伟. 脾脏肿瘤的诊断和治疗. *中国普通外科杂志* 2005; 14: 551-552

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

• 消息 •

## 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会 暨第三届全国普通外科主任论坛通知

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行.

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

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

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

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

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

# 血管生成素-2与基质金属蛋白酶-7在大肠癌中的表达及意义

李霞, 朱尤庆, 罗峻, 陶文惠, 黄超, 张金梅

## ■背景资料

肿瘤血管生成前期, 肿瘤靠毛细血管渗透的营养物质维持生长和代谢, 生长缓慢, 其体积不超过2 mm, 可在体内存活数月甚至数年之久。只有在大量促血管生成因素作用下肿瘤内部血管形成, 肿瘤的生长才明显加速。肿瘤细胞侵入血管内, 随血流至特定器官, 出现转移。因此, 血管生成程度可作为多种肿瘤复发、转移和预后的判断标准。

李霞, 朱尤庆, 陶文惠, 黄超, 张金梅, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

罗峻, 武汉大学中南医院病理科 湖北省武汉市 430071

通讯作者: 朱尤庆, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院消化内科, uqing\_zhu@sina.com.cn

电话: 027-67813072

收稿日期: 2005-12-01 接受日期: 2005-12-19

## Clinical significance and expression of angiopoietin-2 and matrix metalloproteinase-7 in human colorectal carcinoma

Xia Li, You-Qing Zhu, Jun Luo, Wen-Hui Tao, Chao Huang, Jin-Mei Zhang

Xia Li, You-Qing Zhu, Wen-Hui Tao, Chao Huang, Jin-Mei Zhang, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Jun Luo, Department of Pathology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. You-Qing Zhu, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China. uqing\_zhu@sina.com.cn

Received: 2005-12-01 Accepted: 2005-12-19

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of angiopoietin-2 (Ang-2) and matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) protein in human colorectal carcinoma, and to explore the relationship between the two proteins and clinical parameters.

**METHODS:** Immunohistochemical technique was used to detect the expression of Ang-2 and MMP-7 protein in 40 colorectal carcinoma and their adjacent normal tissues.

**RESULTS:** The positive rates of Ang-2 and MMP-7 were significantly higher in colorectal carcinoma than those in normal tissues (77.5% vs 40%,  $P = 0.001$ ; 85% vs 35%,  $P = 0.000$ ). The level of Ang-2 expression had no marked correlations with the sex and age of patients as well as the site, size, lymph node metastasis or histological differentiation of colorectal carcinoma (all  $P$

$> 0.05$ ), but it was notably correlated with the invasion depth ( $P = 0.007$ ), distal metastasis ( $P = 0.023$ ) and Dukes' staging ( $P = 0.008$ ). The expression of Ang-2 and MMP-7 were also significantly correlated ( $P = 0.016$ ).

**CONCLUSION:** High expression of Ang-2 protein may play an important role in the progression and metastasis of colorectal carcinoma through up-regulation of MMP-7 expression.

**Key Words:** Angiopoietin-2; Colorectal carcinoma; Matrix metalloproteinase-7

Li X, Zhu YQ, Luo J, Tao WH, Huang C, Zhang JM. Clinical significance and expression of angiopoietin-2 and matrix metalloproteinase-7 in human colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):434-437

## 摘要

**目的:** 研究血管生成素-2(Ang-2)及基质金属蛋白酶-7(MMP-7)蛋白在人大肠癌组织中的表达及其与大肠癌临床病理特征的关系。

**方法:** 应用免疫组化法检测40例大肠癌及其癌旁正常组织中Ang-2及MMP-7蛋白表达水平。

**结果:** 大肠癌组织中Ang-2蛋白表达阳性率为77.5%(31/40), 明显高于癌旁正常组织40%(16/40)( $P = 0.001$ ); Ang-2表达水平与患者性别、年龄及癌组织的部位、大小、分化程度、淋巴结转移无关( $P > 0.05$ ); 与浸润深度、远处转移及Dukes'分期相关(分别为 $P = 0.007$ ,  $P = 0.023$ ,  $P = 0.008$ ); 大肠癌组织MMP-7蛋白表达阳性率为85%(34/40), 明显高于癌旁正常组织35%(14/40)( $P = 0.000$ ), MMP-7蛋白表达阳性率与Ang-2的表达相关( $P = 0.016$ )。

**结论:** Ang-2蛋白可能通过促进MMP-7的表达从而促进了大肠癌的生长及转移。

**关键词:** 血管生成素-2; 基质金属蛋白酶-7; 大肠癌

李霞, 朱尤庆, 罗峻, 陶文惠, 黄超, 张金梅. 血管生成素-2与基



质金属蛋白酶-7在大肠癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(4):434-437  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/434.asp>

## 0 引言

大肠癌的血行转移相当常见,若能降低或消除血行转移,则可明显改善大肠癌患者的预后.新近发现血管生成素(angiotensin, Ang)在血管新生中作用显著,尤其是血管生成素2(angiotensin-2, Ang-2),特异表达于肿瘤边缘的血管重建区,参与肿瘤血管新生的起始及延续过程,影响肿瘤生长及转移.我们应用免疫组化技术,对40例大肠癌及相应癌旁组织Ang-2及MMP-7蛋白表达情况进行了检测,旨在探讨Ang-2在大肠癌发生、发展中的作用及可能的作用机制,为大肠癌的靶向治疗提供理论依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 40例标本取自武汉大学中南医院2004/2005外科手术切除经病理确诊且资料完整的原发性大肠癌病例,所有患者术前未经放疗和化疗.男性患者30例,女性患者10例,年龄36-84岁.其中结肠癌18例,直肠癌22例.癌组织直径: <5 cm 30例; ≥5 cm 10例. Dukes分期: A期4例, B期4例, C期9例, D期23例.组织学分类:高、中分化癌31例,低、未分化癌9例.癌转移情况:有淋巴结转移20例,无淋巴结转移20例;有血行转移23例,无血行转移17例.浸润深度:浸润至肌层11例,浸润至浆膜(包括穿透浆膜)29例.

**1.2 方法** 每例取原发癌组织、切缘正常组织及淋巴结组织,经40 g/L福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm连续切片,分别进行HE染色和免疫组化SP染色(操作按试剂盒说明书进行).兔抗人Ang-2及MMP-7多克隆抗体为武汉博士德生物工程有限公司产品. SP试剂盒购自福建迈新公司.以PBS代替一抗作阴性对照.

Ang-2及MMP-7染色结果判定均根据胞质染色程度和染色细胞百分比进行评分.染色程度:基本不着色者为0分;着色淡者为1分;着色适中者为2分;着色深者为3分.染色细胞百分比:着色细胞占计数细胞<10%为0分;11%-30%为1分;31%-50%为2分;51%-100%为3分,将每张切片着色程度和着色细胞百分比得分相乘,最后得分0-2分者为阴性,≥3分者为阳性<sup>[1]</sup>.

**统计学处理** 采用SPSS 11.5统计软件对数据进行Fisher exact probability test检验,检验水准 $\alpha$

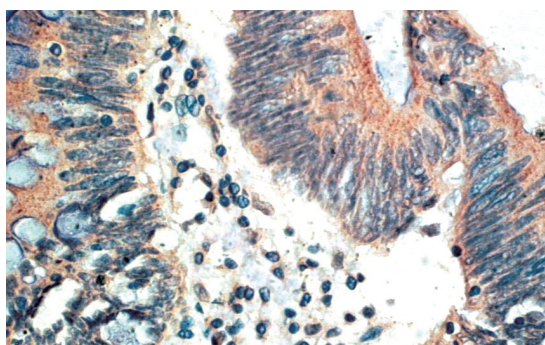


图1 大肠癌组织中Ang-2阳性染色(SP法 ×400).

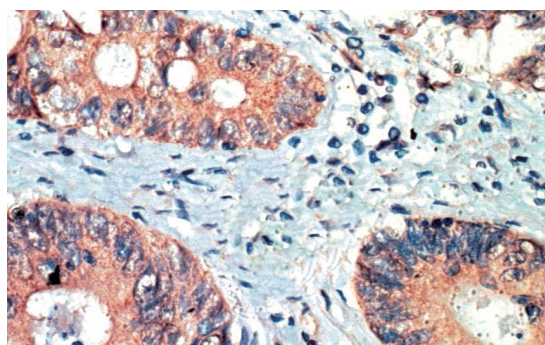


图2 大肠癌组织中MMP-7阳性染色(SP法 ×400).

$= 0.05$ .  $P < 0.05$ 表示有统计学差异性,  $P < 0.01$ 表示有显著差异性.

## 2 结果

**2.1 大肠癌组织及癌旁正常组织中Ang-2及MMP-7蛋白的表达** 大肠癌组织Ang-2蛋白表达阳性率77.5%(31/40),癌旁正常组织Ang-2蛋白表达阳性率40%(16/40).结果表明,Ang-2蛋白在大肠癌组织中表达较正常组织高,两者差异显著( $P = 0.001 < 0.01$ )(图1).大肠癌组织MMP-7蛋白表达阳性率85%(34/40),癌旁正常组织MMP-7蛋白表达阳性率35%(14/40).结果表明, MMP-7蛋白在大肠癌组织中表达较癌旁正常组织高,两者差异显著( $P = 0.000 < 0.01$ )(图2).

**2.2 Ang-2及MMP-7蛋白表达分别与大肠癌临床特征的关系** Ang-2蛋白表达水平与患者性别、年龄及癌的部位、体积、组织分化程度、淋巴结转移无关,与肠壁浸润深度、远处转移及临床分期相关( $P < 0.05$ ). MMP-7蛋白表达水平与患者性别、年龄及癌的部位、体积、组织分化程度、淋巴结转移、肠壁浸润深度、远处转移及临床分期均未见统计学差异( $P > 0.05$ )(表1).

**2.3 Ang-2与MMP-7蛋白表达间的相关性** Ang-2阳性表达组中MMP-7阳性率为93.5%

## ■ 研究前沿

血管生成刺激因子不仅能够刺激血管内皮细胞增殖、迁移、基质蛋白裂解和形成毛细血管结构,而且也可以作用于血管周围基质细胞和血管壁的平滑肌细胞,诱导其分泌和增殖.目前已确定出十几种血管生成刺激因子,包括VEGF家族,EGF/TGF- $\alpha$ , FGF家族, TNF- $\alpha$ , platelet-activating factor(PAF), IL-8, 血管生成素(angiotensin, Ang)等. Ang及其受体是目前研究的热点之一.

## ■创新盘点

目前已发现Ang-2在多种肿瘤组织中均有表达,但国内对Ang-2与大肠癌的研究较少,并且Ang-2的作用机制目前也还不明确。

## ■应用要点

本研究结果为进一步深入研究Ang-2的促血管作用机制奠定了基础,有助于开辟肿瘤抗血管治疗的新途径,同时为判断预后提供有价值的分子指标。

表 1 Ang-2及MMP-7阳性表达与大肠癌临床特征的关系

|            | Ang-2阳性率 (%)  | Ang-2统计分析结果 | MMP-7阳性率 (%)  | MMP-7统计分析结果 |
|------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| 性别         |               |             |               |             |
| 男          | 80% (24/30)   | $P = 0.665$ | 86.7% (26/30) | $P = 0.629$ |
| 女          | 70% (7/10)    |             | 80% (8/10)    |             |
| 年龄         |               |             |               |             |
| <60岁       | 72.7% (16/22) | $P = 0.473$ | 81.8% (18/22) | $P = 0.673$ |
| ≥60岁       | 83.3% (15/18) |             | 88.9% (16/18) |             |
| 癌部位        |               |             |               |             |
| 结肠         | 72.2% (13/18) | $P = 0.705$ | 88.9% (16/18) | $P = 0.673$ |
| 直肠         | 81.8% (18/22) |             | 81.8% (18/22) |             |
| 癌体积        |               |             |               |             |
| <5 cm      | 73.3% (22/30) | $P = 0.404$ | 83.3% (25/30) | $P = 1.000$ |
| ≥5 cm      | 90% (9/10)    |             | 90% (9/10)    |             |
| 组织学分类      |               |             |               |             |
| 高、中分化癌     | 80.6% (25/31) | $P = 0.394$ | 66.7% (6/9)   | $P = 0.115$ |
| 低、未分化癌     | 66.7% (6/9)   |             | 90.3% (28/31) |             |
| 浸润深度       |               |             |               |             |
| 肌层         | 45.5% (5/11)  | $P = 0.007$ | 72.7% (8/11)  | $P = 0.319$ |
| 浆膜(包括穿透浆膜) | 89.7% (26/29) |             | 89.7% (26/29) |             |
| 淋巴转移       |               |             |               |             |
| 无          | 70% (14/20)   | $P = 0.451$ | 75% (15/20)   | $P = 0.182$ |
| 有          | 85% (17/20)   |             | 95% (19/20)   |             |
| 远处转移       |               |             |               |             |
| 无          | 58.8% (10/17) | $P = 0.023$ | 76.5% (13/17) | $P = 0.373$ |
| 有          | 91.3% (21/23) |             | 91.3% (21/23) |             |
| Dukes'分期   |               |             |               |             |
| A/B期       | 37.5% (3/8)   | $P = 0.008$ | 62.5% (5/8)   | $P = 0.082$ |
| C/D期       | 87.5% (28/32) |             | 90.6% (29/32) |             |

(29/31), Ang-2阴性表达组中MMP-7阳性率为55.6%(5/9),二者差异具有统计学意义( $P = 0.016 < 0.05$ )。MMP-7阳性表达可能与Ang-2有关。

## 3 讨论

肿瘤血管是为肿瘤细胞输送氧及营养物质的通道,也是实现肿瘤转移的重要通道之一。许多因素参与肿瘤的血管生成,如各种生长因子及其受体、多种蛋白酶、黏附分子、细胞外基质成分等<sup>[2]</sup>。血管生成素是与血管新生密切相关的一类血管生长调节因子,其中Ang-2可通过降低血管的稳定性,使血管重新进入可塑性强和不稳定状态,在有VEGF存在的情况下促进血管的生成<sup>[3,4]</sup>。

目前已发现Ang-2在多种肿瘤组织中均有表达,如胰腺癌<sup>[5]</sup>,胰腺内分泌瘤<sup>[6]</sup>,脑胶质瘤<sup>[7]</sup>,胃癌<sup>[8]</sup>,肝癌<sup>[9,10]</sup>,黑色素瘤<sup>[11]</sup>等,但国内对Ang-2与大肠癌的研究不多。我们应用免疫组化技术对40例大肠癌组织及其癌旁正常组织中Ang-2

蛋白表达情况进行了检测,结果表明Ang-2在大肠癌组织呈现过表达,与癌旁正常组织相比具有显著差异性( $P < 0.01$ ),提示Ang-2可能在大肠癌的发生、发展中起着重要作用。为了探讨Ang-2蛋白表达在大肠癌演进中的作用,我们进一步分析了Ang-2蛋白表达与大肠癌各临床病理指标的关系。Ang-2表达水平越高,癌组织浸润越深( $P < 0.01$ ),提示Ang-2可能增加癌细胞的侵袭能力,这与Hu *et al*<sup>[7]</sup>的研究结果一致,他们也发现Ang-2在体内外均可增加Tie-2受体缺失的胶质瘤细胞的侵袭能力。有远处转移大肠癌Ang-2表达水平高于无远处转移者( $P < 0.05$ ),Ang-2表达水平与Dukes分期相关,C/D期明显高于A/B期( $P < 0.01$ ),提示Ang-2的过表达可促进癌组织血行转移,影响着大肠癌的发展及预后。这与Nakayama *et al*<sup>[12]</sup>的实验结果一致,他们的实验也证明Ang-2的表达与胃癌的分期及静脉转移有关。此外,Peoch *et al*<sup>[13]</sup>通过小鼠脑胶质瘤模型的研究发现Ang-2的表达与血管生成呈现同

步升高. Etoh *et al*<sup>[14]</sup>对胃癌的研究发现Ang-2转染小鼠与未转染组及空载质粒转染组比较, 转移性更强, 血管形成更多. Ang-2表达越高的胃癌患者, 则涉及更多血管生成, 肿瘤恶性程度越高, 预后越差. 在对非小细胞肺癌的研究中也有人发现Ang-2与5 a生成率相关<sup>[15]</sup>. 因此, Ang-2蛋白表达水平, 有可能成为判断大肠癌的恶性程度及患者预后的指标.

Ang-2的促血管生成机制目前还不太清楚, 有学者认为可能与MMPs有关. MMPs是细胞外基质降解过程中最重要的蛋白水解酶类. MMP-7是MMPs家族中唯一的由上皮肿瘤特异性表达的酶, 可降解VI型胶原、弹力素、层连蛋白等构成基底膜和ECM的成分. 为进一步探讨Ang-2的作用机制, 我们对MMP-7在大肠癌的蛋白表达情况进行了初步分析. 我们的研究数据表明癌组织MMP-7阳性表达显著高于癌旁正常组织( $P<0.01$ ), 提示MMP-7在大肠癌的发生或发展中起着重要作用. 进一步分析未显示MMP7与大肠癌各临床病理指标之间具有统计学相关性, 但有文献报道MMP-7与肿瘤浸润转移密切相关, Adachi *et al*<sup>[16]</sup>报告MMP-7在大肠癌浸润先端癌细胞中的高表达和淋巴结转移、肿瘤分期、预后不良呈正相关. 此差异考虑是由于本实验病例总数太少, 尤其是MMP-7阴性表达病例太少之故.

将Ang-2与MMP-7联系起来分析, 我们发现Ang-2阳性组的MMP-7阳性率高于Ang-2阴性组( $P<0.05$ ), 提示Ang-2可能通过促进MMP-7的表达, 使细胞外基质降解从而降低血管壁的稳定性的. 促MMP-7表达可能是Ang-2促肿瘤血管生成的作用机制. 但Ang-2如何促进MMP-7的表达还有待进一步研究.

总之, Ang-2蛋白在大肠癌的生长转移中可能发挥重要作用, 研究Ang-2与大肠癌侵袭、转移行为间的关系及其作用机制, 有助于我们更进一步深入了解大肠癌生长转移机制, 开辟肿瘤抗血管治疗的新途径, 同时为判断预后提供有价值的分子指标.

#### 4 参考文献

- Ochiumi T, Tanaka S, Oka S, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Haruma K, Chayama K. Clinical significance of angiopoietin-2 expression at the deepest invasive tumor site of advanced colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2004; 24: 539-547
- Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C947-C970

- Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18: 5356-5362
- Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 1998; 78: 1385-1394
- Durkin AJ, Bloomston M, Yeatman TJ, Gilbert-Barness E, Cojita D, Rosemurgy AS, Zervos EE. Differential expression of the Tie-2 receptor and its ligands in human pancreatic tumors. *J Am Coll Surg* 2004; 199: 724-731
- Bloomston M, Durkin A, Yang I, Rojiani M, Rosemurgy AS, Enkmann S, Yeatman TJ, Zervos EE. Identification of molecular markers specific for pancreatic neuroendocrine tumors by genetic profiling of core biopsies. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 413-419
- Hu B, Guo P, Fang Q, Tao HQ, Wang D, Nagane M, Huang HJ, Gunji Y, Nishikawa R, Alitalo K, Cavenue WK, Cheng SY. Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8904-8909
- Sun XD, Liu XE, Wu JM, Cai XJ, Mou YP, Li JD. Expression and significance of angiopoietin-2 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1382-1385
- Mitsuhashi N, Shimizu H, Ohtsuka M, Wakabayashi Y, Ito H, Kimura F, Yoshidome H, Kato A, Nukui Y, Miyazaki M. Angiopoietins and Tie-2 expression in angiogenesis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 37: 1105-1113
- Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, Makuuchi M, Sugimachi K, Wands JR. Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 1999; 103: 341-345
- Pomye J, Zivny JH, Stopka T, Simak J, Vankova H, Necas E. Angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in tumour and non-tumour tissues during growth of experimental melanoma. *Melanoma Res* 2001; 11: 639-643
- Nakayama T, Yoshizaki A, Kawahara N, Ohtsuru A, Wen CY, Fukuda E, Nakashima M, Sekine I. Expression of Tie-1 and 2 receptors, and angiopoietin-1, 2 and 4 in gastric carcinoma; immunohistochemical analyses and correlation with clinicopathological factors. *Histopathology* 2004; 44: 232-239
- Peoch M, Farion R, Hiau A, Le Bas JF, Pasquier B, Remy C. Immunohistochemical study of VEGF, angiopoietin 2 and their receptors in the neovascularization following microinjection of C6 glioma cells into rat brain. *Anticancer Res* 2002; 22: 2147-2151
- Etoh T, Inoue H, Tanaka S, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible *in vivo* regulation via induction of proteases. *Cancer Res* 2001; 61: 2145-2153
- Tanaka F, Ishikawa S, Yanagihara K, Miyahara R, Kawano Y, Li M, Otake Y, Wada H. Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 7124-7129
- Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K. Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* 1999; 45: 252-258

#### ■同行评价

Ang-2与MMP-7均参与大肠癌的发生, 同时MMP-7在大肠癌发生中具有高度特异性. 本文从研究Ang-2与MMP-7两者关系出发, 探讨其与大肠癌的发生与转移的关系, 有一定创新性.



# 重症急性胰腺炎大鼠肺组织中 LIF 的表达变化及意义

滕晓丽, 赵秋, 杜静, 谷华, 覃华

## ■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)是一种严重的全身性疾病,死亡率高达20%-30%。急性肺损伤是SAP最常见且严重的并发症,其发病机制尚未完全阐明。近年来有报道称LIF作为一种促炎症细胞因子参与了炎症反应,然而,目前关于LIF在SAP肺损伤发病机制中的作用尚未见报道。为此,我们通过对实验性SAP肺组织LIF mRNA的研究,探讨LIF在SAP肺损伤发病机制中的作用。

滕晓丽, 赵秋, 杜静, 谷华, 覃华, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

通讯作者: 赵秋, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. dalianmao2121@hotmail.com  
电话: 027-83663611

收稿日期: 2005-12-01 接受日期: 2005-12-19

## Role of leukemia inhibitory factor on lung injury in rats with severe acute pancreatitis

Xiao-Li Teng, Qiu Zhao, Jing Du, Hua Gu, Hua Qin

Xiao-Li Teng, Qiu Zhao, Jing Du, Hua Gu, Hua Qin, Department of Gastroenterology, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. dalianmao2121@hotmail.com

Received: 2005-12-01 Accepted: 2005-12-19

## Abstract

**AIM:** To observe the levels of leukemia inhibitory factor (LIF) in the pulmonary tissues in rats with severe acute pancreatitis (SAP), and to investigate the role of LIF in the progression of SAP and lung injury.

**METHODS:** Thirty-six male Sprague Dawley rats were randomly divided into three groups: normal control ( $n = 6$ ), sham operation ( $n = 6$ ), and SAP ( $n = 24$ ) group. SAP model was induced by retrograde injection of 50 g/L sodium taurocholate into the pancreatobiliary duct. The expression of pulmonary LIF mRNA was detected by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and the expression of LIF protein was detected by immunohistochemistry.

**RESULTS:** The level of pulmonary LIF mRNA expression was increased significantly in SAP group at 3 h in comparison with that in normal control and sham operation group (grey value:  $1.018 \pm 0.065$  vs  $1.451 \pm 0.067$ ,  $1.322 \pm 0.072$ , both  $P < 0.05$ ), and maintained at high levels up to

24 h after modeling ( $0.853 \pm 0.058$ ,  $0.635 \pm 0.064$ ,  $0.582 \pm 0.089$  for 6, 12, and 24 h, respectively,  $P < 0.01$ ). Similarly, the expression of pulmonary LIF protein was also markedly increased in SAP group 3 and 6 h after modeling as compared with that in normal and sham operation group (grey value:  $127.36 \pm 2.76$ ,  $122.53 \pm 2.43$  vs  $159.46 \pm 2.78$ ,  $156.35 \pm 3.12$ , all  $P < 0.05$ ), and maintained at high levels at 12 and 24 h ( $109.37 \pm 2.87$ ,  $102.42 \pm 2.27$ , respectively) ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** LIF acts as a proinflammatory mediator in SAP.

**Key Words:** Severe acute pancreatitis; Leukemia inhibitory factor; Lung injury

Teng XL, Zhao Q, Du J, Gu H, Qin H. Role of leukemia inhibitory factor on lung injury in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):438-441

## 摘要

**目的:** 观察重症急性胰腺炎(SAP)大鼠白血病抑制因子(LIF)在肺组织中表达的时相变化,探讨LIF在SAP病程及肺损伤中的意义。

**方法:** 36只♂SD大鼠随机分为正常对照组(N组,  $n = 6$ )、假手术组(Sham组,  $n = 6$ )和重症急性胰腺炎组(SAP组,  $n = 24$ )。采用胰管逆行灌注50 g/L牛磺胆酸钠的方法复制大鼠SAP模型。用RT-PCR法检测肺组织中LIF mRNA的表达水平,免疫组织化学方法检测LIF在肺组织中的表达变化。

**结果:** SAP组3 h后肺组织LIF mRNA的表达量明显高于对照组和假手术组(灰度值:  $1.018 \pm 0.065$  vs  $1.451 \pm 0.067$ ,  $1.322 \pm 0.072$ ,  $P < 0.05$ ),并且6, 12, 24 h持续升高( $0.853 \pm 0.058$ ,  $0.635 \pm 0.064$ ,  $0.582 \pm 0.089$ ) ( $P < 0.01$ )。同样, SAP组LIF蛋白表达在3和6 h后明显高于对照组和假手术( $127.36 \pm 2.76$ ,  $122.53 \pm 2.43$  vs  $159.46 \pm 2.78$ ,  $156.35 \pm 3.12$ ,  $P < 0.05$ ),并且12, 24 h后也维持在很高的水平( $109.37 \pm 2.87$ ,  $102.42 \pm 2.27$ )。

**结论:** LIF作为促炎症因子参与了SAP肺组织的炎症反应。

**关键词:** 重症急性胰腺炎; 白血病抑制因子; 肺损伤

滕晓丽, 赵秋, 杜静, 谷华, 覃华. 重症急性胰腺炎大鼠肺组织中LIF的表达变化及意义. 世界华人消化杂志. 2006;14(4):438-441  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/438.asp>

## 0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)是一种严重的全身性疾病, 死亡率高达20%-30%。急性肺损伤是SAP最常见且严重的并发症, 其发病机制尚未完全阐明。近年许多研究表明是由多种促炎细胞因子(TNF, IL-1, IL-6, NO, 血小板活化因子等)介导的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)引起的。

白血病抑制因子(LIF)是白介素-6(IL-6)家族中的一个多功能细胞因子, 因其能抑制鼠M1白血病细胞克隆生长和促进其分化而得名。近年来有报道称LIF作为一种促炎症细胞因子参与了炎症反应, 然而, 目前关于LIF在SAP肺损伤发病机制中的作用尚未见报道。为此, 我们通过对实验性SAP肺组织LIF mRNA的研究, 探讨LIF在SAP肺损伤发病机制中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂SD大鼠36只, 清洁级, 180-220 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供。动物以10 g/L戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔内注射麻醉。经腹正中切口进腹, 用一号丝线结扎近肝门处胆管, 将带有四号针头的1 mL注射器穿刺距离胆管开口0.3-0.4 cm处的胆管, 注入50 g/L牛磺胆酸钠(Sigma公司)生理盐水溶液1 mL/kg, 速度为2 mL/min。停留4 min, 去除结扎线, 逐层关腹。对照组仅牵拉胰腺和十二指肠后关腹。术毕, 皮下注射生理盐水4 mL/100 g, 6 h。

随机将大鼠分为3组: 正常对照组(N组,  $n = 6$ )麻醉动物后取材; 假手术组(Sham组,  $n = 6$ )麻醉后开腹轻揉胰腺, 取材; 重症急性胰腺炎组(SAP组,  $n = 24$ ): 分为建模后3, 6, 12, 24 h共4个亚组, 各时点麻醉动物后取材。

于上述时点用戊巴比妥钠麻醉动物, 开腹后取出肺组织。肺组织标本, 均沿纵向剖开取材, 经100 g/L中性福尔马林固定后, 石蜡包埋制成组织蜡块。将石蜡包埋好的组织块, 制成4-5  $\mu\text{m}$ 厚的连续切片, 置于60℃烘箱内烘烤6 h以上备用。

## 1.2 方法

**1.2.1 肺组织LIF抗体检测** 采用免疫组化染色(SP法)。LIF兔抗鼠多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。SP试剂盒和DAB试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。操作步骤为: 按有关试剂的产品说明书进行操作。脱蜡、水化, 滴加30 g/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{L}$ , 38℃ 15 min, 抗原修复液中95℃ 15 min, 依次滴加正常山羊血清封闭液30 min, 一抗40  $\mu\text{L}$  4℃过夜, 二抗37℃ 30 min, 酶标三抗37℃ 30 min。每步骤后均用缓冲液PBS洗涤5 min $\times$ 3次, DAB显色, 苏木素复染, 干燥, 中性树胶封片。阳性细胞为胞质染色呈棕黄色。用TC21000数据图像分析系统进行图像分析, 每组6只动物各取一张切片, 白色为0, 黑色为255, 测出积分光密度和平均光密度, 进行统计学处理。

**1.2.2 肺组织中LIF mRNA的表达** 用RT-PCR检测。采用Trizol(MRC公司)一步法提取肺组织总RNA, 紫外分光光度仪测定RNA浓度。M-MLV逆转录酶试剂(Promega公司), Taq DNA聚合酶(MBI公司), ECL发光试剂(Pierce公司), 梯度PCR仪(Backman公司)。互补DNA(cDNA)的合成采用2  $\mu\text{L}$  M-MuLV逆转录酶反应体系, 42℃反应1 h。LIF引物: 正义5'-GTCAACTGGCTCAACTCAACG-3', 反义5'-CTGGCAGCCCAACTCTTC-3', 扩增片段长度406 bp。 $\beta$ -actin引物: 正义5'-CTTTTGTGCCTTGATAGTTC-3', 反义5'-GAGTCCTTCTGACCCATAC-3', 扩增片段长度265 bp。引物由上海生工生物技术公司合成。PCR反应条件: 94℃ 5 min, 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30个循环。取7  $\mu\text{L}$  PCR反应产物加1  $\mu\text{L}$  10 $\times$ Loading Buffer在15 g/L琼脂糖凝胶上电泳(110 V, 30 min), 紫外透射仪观察, 并用UVP紫外凝胶图像分析仪摄影记录。用TC21000数据图像分析系统分析各条带灰度值, 得LIF/ $\beta$ -actin的灰度比值, 即为LIF mRNA的相对表达值。

**统计学处理** 采用SPSS 11.0分析, 数据均采用mean $\pm$ SD表示, 根据实验要求采用 $t$ 检验, 方差分析进行数据分析,  $P < 0.05$ 认为有显著统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠肺组织LIF mRNA的表达** 通过RT-PCR检测, 经琼脂糖凝胶电泳后, LIF与 $\beta$ -actin基因的RT-PCR产物与理论长度相一致, 正常组、假手

### ■创新盘点

LIF是新近认识的白介素家族中的一个多功能细胞因子, 学术界对LIF的研究主要集中在生殖、免疫和神经方面, 在炎症反应中的研究较少。细胞因子是目前研究重症急性胰腺炎发病机制的热点, 尤其是后期致炎因子的研究。本实验就此建立动物模型深入探讨LIF在SAP发病机制中的作用。

### 同行评价

本研究只检测了LIF一种因子在肺组织中的表达变化,反映了一定的问题,但不足以证实这种变化的机制.讨论条理分明,结论中肯.

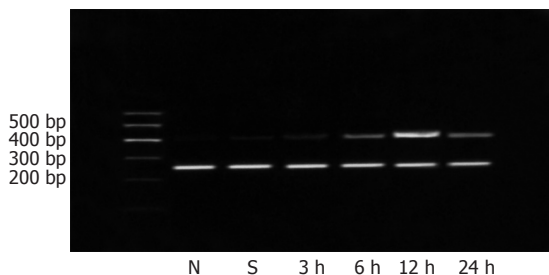


图1 大鼠肺组织LIF mRNA的表达. N: 正常组; S: 假手术组; 3 h, 6 h, 12 h, 24 h: 建模3 h, 6 h, 12 h, 24 h组.

表1 各组LIF mRNA的相对表达

| 分组      | n | 阳性信号灰度 (A, mean $\pm$ SD)      |
|---------|---|--------------------------------|
| 正常组     | 6 | 1.451 $\pm$ 0.067              |
| 假手术组    | 6 | 1.322 $\pm$ 0.072              |
| 建模3 h组  | 6 | 1.018 $\pm$ 0.065 <sup>a</sup> |
| 建模6 h组  | 6 | 0.853 $\pm$ 0.058 <sup>b</sup> |
| 建模12 h组 | 6 | 0.635 $\pm$ 0.064 <sup>b</sup> |
| 建模24 h组 | 6 | 0.582 $\pm$ 0.089 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组和假手术组.

表2 各组LIF免疫组化图像分析结果

| 分组      | n | 阳性信号灰度 (A, mean $\pm$ SD)      |
|---------|---|--------------------------------|
| 正常组     | 6 | 159.46 $\pm$ 2.78              |
| 假手术组    | 6 | 156.35 $\pm$ 3.12              |
| 建模3 h组  | 6 | 127.36 $\pm$ 2.76 <sup>a</sup> |
| 建模6 h组  | 6 | 122.53 $\pm$ 2.43 <sup>a</sup> |
| 建模12 h组 | 6 | 109.37 $\pm$ 2.87 <sup>b</sup> |
| 建模24 h组 | 6 | 102.42 $\pm$ 2.27 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常组和假手术组.

术组均未见明显的LIF表达,建模3, 6, 12, 24 h组均能检测到LIF的表达,其中以12 h组为最明显(图1).我们用LIF/ $\beta$ -actin的灰度比值作为LIF基因的相对表达值,各组LIF mRNA的相对表达见表1,3 h组起,与N组和Sham组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ),6 h组起,与N组和SAP组比较有极显著性差异( $P < 0.01$ ).各组内参 $\beta$ -actin基因的RT-PCR产物在265 bp附近.LIF基因的RT-PCR产物在406 bp附近,N组和Sham组几乎不见LIF基因的RT-PCR产物,12 h组及24 h组则表达明显.

2.2 免疫组化染色(SP法)LIF的表达 各组肺组织中LIF在肺泡细胞和间质细胞胞质中的表达:N组和SAP组的表达呈阴性,从3 h组起,LIF的表达增强,与N组和Sham组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ).6 h组起,与N组和Sham组比较有极显著性差异( $P < 0.01$ ,表2).

### 3 讨论

急性胰腺炎(AP)是临床常见的急腹症,除有局部的病理损伤表现外常伴有明显的全身炎症反应,甚至并发多器官损伤,病死率很高.急性肺损伤是SAP最常见的并发症,并与高死亡率有关<sup>[1,2]</sup>.多种促炎细胞因子(TNF, IL-1, IL-6, NO, 血小板活化因子)等参与的炎症反应是SAP发病的机制之一<sup>[3]</sup>.细胞因子可以通过“扳机样作用”触发炎症介质的“瀑布样级联反应”,使得AP易于从局部病变迅速发展为全身炎症性反应综合征和多器官功能衰竭(MOF).TNF是炎症早期一过性释放的致炎因子<sup>[4]</sup>,针对炎症早期的TNF和其他致炎因子的拮抗剂有一定的疗效,但对于炎症后期所引起的脓毒症却无能为力.许多研究发现确实存在着一种感染后期的炎症介导因子<sup>[3]</sup>.

白血病抑制因子(LIF)是一个多功能的细胞因子,属于细胞因子IL-6家族,能促进细胞的生长、分化,调节钙和骨骼的新陈代谢,介导急性期蛋白和肿瘤机体的恶病质的产生<sup>[4]</sup>.已在活化的T细胞、单核细胞、神经胶质细胞、肝成纤维细胞、骨髓基质细胞、胚胎干细胞、胸腺上皮细胞等多种细胞中发现有LIF的表达<sup>[5]</sup>.正常情况下组织和外周血循环中LIF的表达量极低<sup>[6]</sup>,许多证据表明,炎症介质IL-1, IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$ 以及脂多糖(LPS)等可诱导LIF基因表达<sup>[7]</sup>,抗炎物质可抑制LIF基因的表达,例如:糖皮质激素、IL-4和IL-13<sup>[7,8]</sup>.这些促炎物质可能是通过活化第二信使蛋白激酶(PKC)而刺激细胞产生LIF<sup>[9]</sup>.LIF在正常成年大鼠体内有极低水平的表达,在炎症反应中表达升高<sup>[6,10]</sup>.

Lankisch *et al*<sup>[11]</sup>对死于AP的36例患者进行了深入的研究,发现肺组织学的改变与成人呼吸窘迫综合征(ARDS)一样.Jorens *et al*<sup>[12]</sup>证实在ARDS患者的支气管肺泡灌洗液中LIF表达增高,他提出LIF是ARDS中炎症细胞因子级联中的一员,但LIF在炎症反应中是作为抗炎因子还是促炎因子仍不清楚.LIF可能在一些动物炎症模型中起到了保护的作用.他通过下调TNF的表达来下调诸如LPS引起的急性肺部炎症<sup>[13]</sup>.而且,有报道称LIF可以轻微的保护肺部抵抗氧化毒性<sup>[14,15]</sup>.

现已证实肺组织结构细胞可表达LIF和LIFR,而且IL-1 $\beta$ 和IL-6可以诱导肺组织LIF释放,其中以成纤维细胞表达LIF水平最高,气道平滑肌细胞和肺动脉平滑肌细胞也可检测到高



水平的LIF基因表达, 支气管上皮细胞表达水平较低<sup>[16]</sup>. Fujii *et al*<sup>[17]</sup>和Elias *et al*<sup>[18]</sup>也发现直径小于10  $\mu\text{m}$ 的空气污染微粒(PM10)可诱导人支气管上皮细胞表达LIF, IL-1, TGF- $\beta$ 和呼吸道合胞病毒(RSV)可刺激气道平滑肌细胞产生IL-11及其他IL-6家族细胞因子(IL-6和LIF). 此外, 嗜酸粒细胞、肥大细胞、T细胞等炎症细胞也可表达、合成并释放LIF<sup>[19,20]</sup>.

在本实验中, LIF在建模后开始上升, 到12 h有较高的表达, 至24 h仍维持在较高的水平. SAP大鼠肺组织LIF水平的时相变化以及其作为炎症介质的能力说明他可能作为炎症介质参与了SAP的全身炎症反应. 他可能是早期炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的下游因子, 因为研究显示, TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 都可单独刺激活化的T细胞合成并释放LIF<sup>[7,9]</sup>. 体外实验证明, LIF可明显增强嗜酸粒细胞对血小板活化因子(PAF)和P物质的迁移反应, 诱导嗜酸粒细胞释放颗粒蛋白, 表达活性标记物CD<sub>69</sub><sup>[19]</sup>, 诱导各种细胞产生促炎症细胞因子, 刺激趋化因子合成<sup>[21]</sup>.

LIF可能作为晚期炎症因子参与了SAP的晚期炎症反应, 通过各种途径下调LIF水平或拮抗其作用可能在SAP的炎症调控中具有重要意义. LIF作为晚期炎症介质将成为治疗的新的有希望的靶点.

#### 4 参考文献

- Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol* 2001; 128: 13-16
- Shields CJ, Winter DC, Redmond HP. Lung injury in acute pancreatitis: mechanisms, prevention, and therapy. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8: 158-163
- Gomez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, Cassinello N, Camps B, Vina J, Sastre J. Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1: 393-403
- Szepietowski J, Reich A. Leukaemia inhibitory factor (LIF): structure and biological activity. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2004; 58: 243-251
- Hisaka T, Desmouliere A, Taupin JL, Daburon S, Neaud V, Senant N, Blanc JF, Moreau JF, Rosenbaum J. Expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and its receptor gp190 in human liver and in cultured human liver myofibroblasts. Cloning of new isoforms of LIF mRNA. *Comp Hepatol* 2004; 3: 10
- Brown MA, Metcalf D, Gough NM. Leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 are expressed at very low levels in the normal adult mouse and are induced by inflammation. *Cytokine* 1994; 6: 300-309
- Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 1998; 161: 409-414
- Grosset C, Taupin JL, Lemerrier C, Moreau JF, Reiffers J, Ripoche J. Leukaemia inhibitory factor expression is inhibited by glucocorticoids through post-transcriptional mechanisms. *Cytokine* 1999; 11: 29-36
- Hershko DD, Robb BW, Luo G, Hasselgren PO. Multiple transcription factors regulating the IL-6 gene are activated by cAMP in cultured Caco-2 cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R1140-R1148
- Kerr BJ, Patterson PH. Potent pro-inflammatory actions of leukemia inhibitory factor in the spinal cord of the adult mouse. *Exp Neurol* 2004; 188: 391-407
- Lankisch PG, Rahlf G, Koop H. Pulmonary complications in fatal acute hemorrhagic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1983; 28: 110-116
- Jorens PG, De Jongh R, Bossaert LL, De Backer W, Herman AG, Pollet H, Bosmans E, Taupin JL, Moreau JF. High levels of leukaemia inhibitory factor in ARDS. *Cytokine* 1996; 8: 873-876
- Ulich TR, Fann MJ, Patterson PH, Williams JH, Samal B, Del Castillo J, Yin S, Guo K, Remick DG. Intratracheal injection of LPS and cytokines. V. LPS induces expression of LIF and LIF inhibits acute inflammation. *Am J Physiol* 1994; 267: L442-L446
- Weber MA, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Quesniaux V, Poli V, Stewart CL, Ryffel B. Endogenous leukemia inhibitory factor attenuates endotoxin response. *Lab Invest* 2005; 85: 276-284
- Wang J, Chen Q, Corne J, Zhu Z, Lee CG, Bhandari V, Homer RJ, Elias JA. Pulmonary expression of leukemia inhibitory factor induces B cell hyperplasia and confers protection in hyperoxia. *J Biol Chem* 2003; 278: 31226-31232
- Loewen GM, Tracy E, Blanchard F, Tan D, Yu J, Raza S, Matsui S, Baumann H. Transformation of human bronchial epithelial cells alters responsiveness to inflammatory cytokines. *BMC Cancer* 2005; 5: 145
- Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, Vincent R, Van Eeden SF. Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 265-271
- Elias JA, Wu Y, Zheng T, Panettieri R. Cytokine- and virus-stimulated airway smooth muscle cells produce IL-11 and other IL-6-type cytokines. *Am J Physiol* 1997; 273: L648-L655
- Zheng X, Knight DA, Zhou D, Weir T, Peacock C, Schellenberg RR, Bai TR. Leukemia inhibitory factor is synthesized and released by human eosinophils and modulates activation state and chemotaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 136-144
- Piccinni MP, Scaletti C, Mavilia C, Lazzeri E, Romagnani P, Natali I, Pellegrini S, Livi C, Romagnani S, Maggi E. Production of IL-4 and leukemia inhibitory factor by T cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2431-2437
- Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci* 2002; 22: 6696-6703

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

# 昆明白族儿童幽门螺杆菌感染与HLA-DQA1等位基因的相关性

王美芬, 黄永坤, 郝萍, 戚勤, 文革生, 李海林, 周丽芳

## ■背景资料

*H. pylori*感染与慢性胃炎、消化道溃疡和胃癌等密切相关, 而这些疾病的发生与宿主的免疫遗传因素可能有关。研究*H. pylori*感染与患儿的HLA-DQA1等位基因位多态性的相关性, 寻找与*H. pylori*感染相关的基因, 有助于今后采取可行的免疫防治策略。

王美芬, 黄永坤, 戚勤, 文革生, 李海林, 周丽芳, 昆明医学院第一附属医院儿科 云南省昆明市 650032  
郝萍, 昆明医学院第一附属医院临床医学实验中心 云南省昆明市 650032  
云南省教育厅重点项目基金, No. 04Z065C  
通讯作者: 黄永坤, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院儿科. hykkmyncn@hotmail.com  
收稿日期: 2005-12-08 接受日期: 2005-12-31

## Association between HLA-DQA1 alleles and *H. pylori* infection in Bai-ethnic children from Kunming

Mei-Fen Wang, Yong-Kun Huang, Ping Hao, Qin Qi, Ge-Sheng Wen, Hai-Lin Li, Li-Fang Zhou

Mei-Fen Wang, Yong-Kun Huang, Qin Qi, Ge-Sheng Wen, Hai-Lin Li, Li-Fang Zhou, Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China  
Ping Hao, Experimental Center of Clinical Medicine, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China  
Supported by the Key Project of Education Department of Yunnan Province, No. 04Z065C  
correspondence to: Dr. Yong-Kun Huang, Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital, 295 Xichang Road, Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. hykkmyncn@hotmail.com  
Received: 2005-12-08 Accepted: 2005-12-31

## Abstract

**AIM:** To find the susceptible or resistant genes of *H. pylori* infection in Bai-ethnic children of Kunming, and to explore the immunogenetic mechanism of *H. pylori* infection.

**METHODS:** Polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP) technique was used to detect the allelic distribution of HLA-DQA1 in Bai-ethnic children with or without *H. pylori* infection ( $n = 32, 34$ , respectively) from Kunming. *H. pylori* infection was identified by combination of dot-immunogold filtration assay and immunoblotting technique.

**RESULTS:** The allelic frequency of HLA-DQA1 \*010401 or \*0402 was significantly lower

in children with *H. pylori* infection than that in children without *H. pylori* infection ( $0$  vs  $15\%$ ,  $\chi^2 = 0$ ,  $P = 0.001$ ,  $P_c = 0.014$ ,  $OR = 1.172$ ,  $95\%CI: 1.062-1.294$ ).

**CONCLUSION:** HLA-DQA1\*010401 or \*0402 may be resistant gene of *H. pylori* infection in Bai-ethnic children from Kunming.

**Key Words:** Bai-ethnic children; *Helicobacter pylori*; HLA-DQA1

Wang MF, Huang YK, Hao P, Qi Q, Wen GS, Li HL, Zhou LF. Association between HLA-DQA1 alleles and *H. pylori* infection in Bai-ethnic children from Kunming. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):442-445

## 摘要

**目的:** 探讨昆明白族儿童HLA-DQA1等位基因位点上是否存在幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染的易感基因或抵抗基因, 研究*H. pylori*感染的免疫遗传机制。

**方法:** 应用聚合酶链反应-序列特异性引物(PCR-SSP)方法对应用胶体金标疫渗滤法(DIGFA)和免疫印迹法联合诊断的32例*H. pylori*感染昆明白族儿童(实验组)和34例无*H. pylori*感染的昆明白族儿童(对照组)进行HLA-DQA1基因分型检测。

**结果:** 实验组HLA-DQA1\*010401或\*0402基因频率明显低于对照组, 两组比较差异存在显著性( $0$  vs  $15\%$ ,  $\chi^2 = 0$ ,  $P = 0.001$ ,  $P_c = 0.014$ ,  $OR = 1.172$ ,  $95\%CI: 1.062-1.294$ )。

**结论:** HLA-DQA1\*010401或\*0402基因可能对*H. pylori*感染具有免疫抵抗作用。

**关键词:** 白族儿童; 幽门螺杆菌; HLA-DQA1

王美芬, 黄永坤, 郝萍, 戚勤, 文革生, 李海林, 周丽芳. 昆明白族儿童幽门螺杆菌感染与HLA-DQA1等位基因的相关性. *世界华人消化杂志* 2006;14(4):442-445  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/442.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是世界各地最常见的感染性疾病病原之一, 全球约有50%人口感染了*H pylori*。儿童又是*H pylori*感染的易感人群, 但是*H pylori*感染后大多数无临床症状, 仅极少数表现出明显的临床疾病症状。具体的机制尚不清楚, 许多研究认为这种临床结局的差异除与细菌毒力的高低、环境有关外, 部分可从宿主因素特别是人类白细胞抗原(HLA)免疫反应基因多态性上得到解释<sup>[1-2]</sup>, 即宿主遗传因素可以影响对感染的免疫炎症反应。而HLA-DQA1属于经典的HLA II类基因DQ亚区。近年来, 国内外对人类白细胞抗原的免疫分析显示, HLA-DQA1等位基因分布对*H pylori*感染具有抵抗或易感作用并与临床结局有一定关系, 并在不同种族、民族与地域间存在较大差异<sup>[3-9]</sup>。我们应用先进和成熟的HLA DNA基因分型技术-聚合酶链反应序列特异性引物(PCR-sequence specific primers, SSP)对32例*H pylori*阳性及34例*H pylori*阴性的昆明白族儿童HLA-DQA1等位基因位点进行检测分析, 以探讨昆明白族儿童HLA-DQA1位点上是否存在*H pylori*感染的易感基因或抵抗基因, 了解宿主的免疫遗传差异性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2003-07采用整群抽样方法, 将昆明市某民族小学8-12岁双亲3代均为白族的141例学龄儿童列为研究对象, 且每个研究对象必须符合以下条件: (1)在当地出生且生活4 a以上; (2)无严重的心、肺、脑、肾、皮肤、营养、内分泌疾病及免疫缺陷病史; (3)近4 wk内无抗生素、铋剂、质子泵阻滞剂和激素使用史。

### 1.2 方法

**1.2.1 资料的收集** 征得家长的同意每位儿童采取外周静脉血2 mL于EDTA抗凝管中分离血浆与细胞, 并放置于-70℃冰箱中保存。

**1.2.2 *H pylori*感染的相关检测** 采用金标免疫渗滤法检测141例昆明白族儿童血浆*H pylori*-IgG抗体(试剂盒由福建省蓝波生物技术研究有限公司提供, 批号: 200304016); 根据*H pylori*-IgG抗体检测结果将儿童分为*H pylori*-IgG抗体阳性组(51例)和*H pylori*-IgG抗体阴性组(90例), 从以上两组中各抽起40例儿童血浆采用免疫印迹法进行*H pylori*空泡毒素(CagA)、毒素相关蛋白抗体(VacA)、尿素酶A及B抗体(UreA、

表1 HLA-DQA1基因分型PCR-SSP扩增程序

| 循环数  | 步骤 | 温度 (°C) | 时间 (秒)  |
|------|----|---------|---------|
| 1    | 1  | 96      | 60      |
| 5    | 1  | 96      | 25      |
|      | 2  | 70      | 50      |
|      | 3  | 72      | 45      |
| 21   | 1  | 96      | 25      |
|      | 2  | 65      | 50      |
|      | 3  | 72      | 45      |
| 21   | 1  | 96      | 25      |
|      | 2  | 65      | 50      |
|      | 3  | 72      | 45      |
| 4    | 1  | 96      | 25      |
|      | 2  | 55      | 60      |
|      | 3  | 72      | 120     |
| Hold | 1  | 12      | Forever |

UreB)检测(试剂盒由深圳市伯劳特生物技术研究有限公司提供, 批号: 20050519)。结果判读严格按说明书操作。若两种方法均为阳性者诊断为*H pylori*感染, 列为实验组(32例), 两者均为阴性者诊断为非*H pylori*感染, 列为对照组(34例), 实验组的平均年龄为 $9.98 \pm 1.54$ 岁, 男女之比1:1.45, 对照组平均年龄为 $9.89 \pm 1.34$ 岁, 男女之比1:0.56, 两组年龄、性别无差异性( $P > 0.05$ )。*H pylori*感染的诊断标准: 根据1999-04召开的全国第1次*H pylori*专家共识会议上提出的*H pylori*流行病学诊断标准<sup>[10]</sup>。

**1.2.3 血液基因组DNA制备** 采用血液基因组DNA提取试剂盒(由美国Promega公司提供, 批号 204337), 在常温下快速提取实验组和对照组儿童基因组DNA。提取方法严格按试剂盒所附说明进行。提取的DNA用分光光度仪测定浓度和纯度。纯度应在1.6-1.8之间, 浓度不低于60 mg/L, 提取的DNA放置于-20℃冰箱保存备用。

**1.2.4 HLA-DQA1基因分型** 采用美国HLA-DQA1 SSP Unitray基因分型试剂盒扩增HLA-DQA1基因片段(试剂盒由美国PEL-FREEZE CLINICAL SYSTEMS公司提供, 批号: 003-17283), PCR反应体系为23  $\mu$ L, 扩增程序表1所示: 扩增产物进行含溴乙锭的20 g/L琼脂糖凝胶电泳(条件为150 V, 12 min), 结果判断借助其提供的专用读板纸在凝胶成像仪和紫外灯判读并成像。要求: 除污染对照外, 其他各电泳道内

## ■创新点

本文通过对HLA-DQA1基因分型检测, 发现HLA-DQA1\*010401或\*0402基因可能对*H pylori*感染具有免疫抵抗作用。



### ■同行评价

该研究采用分子生物学的方法证实了昆明白族儿童 *H. pylori* 感染与非 *H. pylori* 感染者相比 HLA-DQA1\*010401 或 \*0402 基因频率明显降低。提示：在 HLA-DQA1 以上两位点，*H. pylori* 感染白族儿童与非感染儿童可能存在免疫遗传学差异。该结果对阐述少数民族儿童 *H. pylori* 感染机制提供了实验依据。

表2 白族儿童 *H. pylori* 感染实验组和对照组 HLA-DQA1 的等位基因频率 (AF)

| HLA-DQA1<br>等位基因 | 实验组 <i>n</i> = 64 |        | 对照组 <i>n</i> = 68 |        | $\chi^2$ | <i>P</i> | <i>P</i> |
|------------------|-------------------|--------|-------------------|--------|----------|----------|----------|
|                  | <i>n</i>          | AF (%) | <i>n</i>          | AF (%) |          |          |          |
| *0101            | 2                 | 3      | 1                 | 1      | 0.406    | 0.524    | —        |
| *010             | 9                 | 14     | 9                 | 13     | 0.019    | 0.089    | —        |
| *0103            | 9                 | 14     | 6                 | 9      | 0.898    | 0.343    | —        |
| *010401/0402     | 0                 | 0      | 10                | 15     | 0        | 0.001    | 0.014    |
| *0201            | 4                 | 6      | 5                 | 7      | 0.063    | 0.802    | —        |
| *030101          | 6                 | 9      | 2                 | 3      | 2.397    | 0.122    | —        |
| *0302            | 11                | 17     | 5                 | 7      | 2.994    | 0.084    | —        |
| *0303            | 6                 | 9      | 9                 | 14     | 0.488    | 0.485    | —        |
| *040101          | 3                 | 4      | 5                 | 7      | 0.411    | 0.521    | —        |
| *040102          | 1                 | 1      | 0                 | 0      | 0        | 0.485    | —        |
| *050101          | 2                 | 3      | 1                 | 1      | 0.406    | 0.524    | —        |
| *0503            | 0                 | 0      | 1                 | 1      | 0        | 1        | —        |
| *0505            | 2                 | 3      | 3                 | 4      | 0.150    | 0.699    | —        |
| *060101          | 9                 | 14     | 11                | 16     | 0.115    | 0.735    | —        |

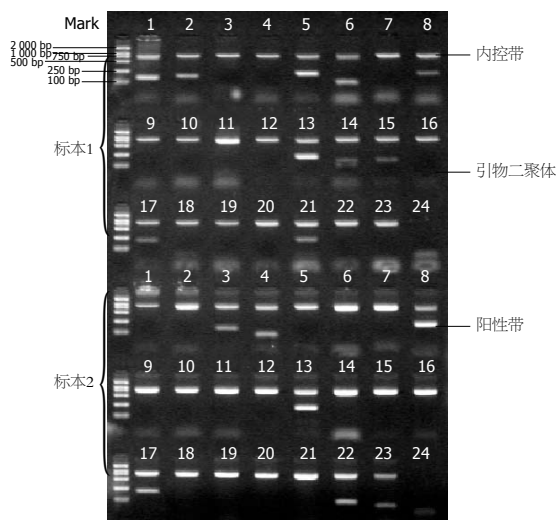


图1 昆明白族儿童 HLA-DQA1 基因分型 PCR-SSP 分型图。标本1: 第1, 2, 5, 6, 8, 13, 14, 15, 17, 21 泳道可见阳性带; 标本2: 第3, 4, 8, 13, 17, 22, 23 泳道可见阳性带。

控带必须存在, 各阳性条带必须与规定的相应分子量对应(图1)。全图共48个泳道, 内控带的分子量为796 bp, 标本1和标本2的第24泳道为污染控制孔, Mark: 由下到上分别是100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1 000 bp、2 000 bp。

**统计学处理** 用直接法统计实验组和对照组 HLA-DQA1 各等位基因的基因频率。样本分布经过Hard-Weinberg平衡检验,  $P > 0.05$ , 组间 HLA-DQA1 等位基因的比较用  $2 \times 2$  表  $\chi^2$  检验。

*P* 值经等位基因多项比较校正(同一位点需比较的等位基因数乘 *P* 值, 即  $P_c$ )

## 2 结果

实验组和对照组 HLA-DQA1 基因位点共检出14种等位基因, 两组等位基因频率(AF)比较(表2)。如表2显示实验组白族儿童 HLA-DQA1\*010401 或 \*0402 等位基因频率较对照组低(0 vs 15%,  $\chi^2 = 0$ ,  $P = 0.001$ ,  $P_c = 0.014$ ,  $OR = 1.172$ , 95%CI = 1.062-1.294)。

## 3 讨论

HLA 抗原系统即主要组织相容性复合物, 全长约4 000 kb, 由一群密切连锁的基因组成, 包括100多个基因座共554个等位基因, 是目前所知人类基因组中最复杂、最具多态性的遗传体系, 他不仅具有个体差异而且还有不同民族的差异。他分为三类基因, 从着丝点一侧起, 依次为II类基因、III类基因和I类基因区域所在。II类基因区又称HLA D区, 长约1 100 kb, 分为DR、DQ、DP、DO、DN、DM等亚区, 其多态性决定于第二外显子区域DNA核苷酸序列。而HLA-DQA基因属DQ区, 编码 $\alpha 1$ 链的则为DQA1基因, 其基因序列已被克隆、测序, 定位于6p21.3。HLA分子具有递呈抗原、参与细胞分化、调节免疫应答、诱导同种免疫应答等作用。

HLA的DNA分型方法很多,各有其特点。目前常用的方法大致可分为五大类:(1)限制性片段长度多态性分析(PCR-RLFP);(2)聚合酶链式反应寡核苷酸探针杂交方法(PCR-SSO);(3)聚合酶链式反应单链构象多态性分析(PCR-SSCP);(4)DNA序列测定(sequencing);(5)序列特异性引物聚合酶链反应技术(PCR-SSP)。

我们采用了PCR-SSP技术对昆明白族儿童实验组和对照组进行HLA-DQA1基因分型,我们发现在实验组中HLA-DQA1\*010401或\*0402等位基因的频率明显比对照组低(0 vs 15%,  $\chi^2 = 0$ ,  $P = 0.001$ ,  $P_c = 0.014$ ,  $OR = 1.172$ , 95%CI=1.062-1.294),提示该基因在昆明白族儿童中可能为*H pylori*感染的抵抗基因,具有免疫抵抗作用,当其频率降低时,容易发生*H pylori*感染。

目前,HLA基因与*H pylori*感染的易感性问题,国内外学者针对了不同背景人群的研究报道,黄永坤<sup>et al</sup><sup>[5-6]</sup>分别对昆明汉族、彝族儿童*H pylori*感染HLA-DQA1免疫遗传学特征分析发现,HLA-DQA1\*0103基因可能是昆明汉族儿童*H pylori*感染的易感基因,HLA-DQA1\*0302基因可能是昆明彝族儿童抵抗*H pylori*感染的保护基因;Wang <sup>et al</sup><sup>[7]</sup>对广西壮族、仫佬族和越南中部京族儿童*H pylori*感染与HLA-DQA1相关性的研究发现,三个民族中*H pylori*阳性组的HLA-DQA1\*0104基因高于*H pylori*阴性组,DQA1\*0104可能是*H pylori*感染的易感基因,即携带有DQA1\*0104基因者易发生*H pylori*感染。但也有国外学者认为,HLA-DQA1等位基因与*H pylori*感染无关<sup>[11-14]</sup>。这些不同的结果是否提示HLA基因多态性与*H pylori*致病性无必然性联系,还是提示HLA基因多态性与*H pylori*致病性的联系具有种族特异性,需要进一步进行广泛研究。

我们的研究结果与国内外报道不完全相同甚至相反,我们分析认为,首先可能与HLA的多态性在不同的种族、地区人群中差别有关;其次,*H pylori*感染的致病机制是多方面的,仅就免疫因素而言,可能也是多相关基因所致,可能QR、DP的某些基因座也起了一定的作用;第三,由于某些HLA等位基因频率较低,故样本量过小而造成实验误差。因此,有必要扩大样本量并在多个不同种族、不同人群、不同区域进行深入的研究。

**致谢:**感谢昆明医学院第一附属医院临床医学实验中心免疫遗传室的唐睿珠、邵文萍、包群在实验中给予的指导和大力支持。

## 4 参考文献

- 1 Reimer P, Fischbach W, Goebeler ME, Kraus MR, Goldmann S, Muller C, Wilhelm M. Decreased frequency of HLA-B35 in patients with gastric MALT lymphoma. *Ann Hematol* 2004; 83: 232-236
- 2 Gonzalez CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 2002; 100: 249-260
- 3 许春娣, 奚容平, 陈舜年, 杨玉琴, 范丽安, 徐家裕. 幽门螺杆菌感染的患儿人类白细胞抗原-DQA1的免疫学分析. *中华儿科杂志* 2000; 38: 746-749
- 4 Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Perez-Perez GI, Flores-Gutierrez JP, Tijerina-Menchaca R. Association of gastric cancer, HLA-DQA1, and infection with *Helicobacter pylori* CagA+ and VacA+ in a Mexican population. *J Gastroenterol* 2004; 39: 1138-1142
- 5 黄永坤, 戚勤, 李海林, 文革生, 周丽芳. 幽门螺杆菌感染儿童HLA-DQA1免疫遗传学特征分析. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1735-1737
- 6 黄永坤, 戚勤, 郝萍, 文革生, 李海林, 周丽芳. 彝族儿童幽门螺杆菌感染HLA-DQA1免疫遗传学特征分析. *临床儿科杂志* 2004; 22: 652-655
- 7 Wang LL, Tran DB, Lin WX, Jiang HX, Shan QW, Xie XZ, Liang DM. Association of HLA-DQA1 loci with *Helicobacter pylori* infection in children of Guangxi Zhuang, Mulam nationalities, China and central Jing nationality, Vietnam. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2004; 42: 577-580
- 8 Magnusson PKE, Enroth H, Eriksson I, Held M, Nyren O, Engstrand L, Hansson E, Gyllenstein UB. Gastric cancer and human leukocyte antigen: distinct DQ and DR alleles are associated with development of gastric cancer and infection by *Helicobacter pylori*. *Cancer Research* 2001; 61: 2684-2689
- 9 Kawahara Y, Mizuno M, Yoshino T, Yokota K, Oguma K, Okada H, Fujiki S, Shiratori Y. HLA-DQA1\*0103-DQB1\*0601 haplotype and *Helicobacter pylori*-positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 865-868
- 10 全国幽门螺杆菌科组. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. *中华医学杂志* 2000; 80: 394-395
- 11 Perri F, Piepoli A, Quitadamo M, Quarticelli M, Merla A, Bisceglia M. HLA-DQA1 and -DQB1 genes and *Helicobacter pylori* infection in Italian patients with gastric adenocarcinoma. *Tissue Antigens* 2002; 59: 55-57
- 12 Kunstmann E, Hardt C, Crabtree JE, Suerbaum S, Epplen JT. *Helicobacter pylori* infection: CagA-specific antibodies are associated with clinical outcome, but not with HLA class II polymorphisms of the host. *Int J Med Microbiol* 2003; 292: 537-540
- 13 Kunstmann E, Hardt C, Treitz H, Suerbaum S, Faller G, Peitz U, Schmiegell W, Epplen JT. In the European population HLA-class II genes are not associated with *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 49-53
- 14 Quintero E, Pizarro MA, Rodrigo L, Pique JM, Lanas A, Ponce J, Mino G, Gisbert J, Jurado A, Herrero MJ, Jimenez A, Torrado J, Ponte A, Diaz-de-Rojas F, Salido E. Association of *Helicobacter pylori*-related distal gastric cancer with the HLA class II gene DQB10602 and cagA strains in a southern European population. *Helicobacter* 2005; 10: 12-21

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

## <sup>125</sup>I Ni-Ti 合金支架治疗晚期食管癌的配合与护理6例

孙翠萍, 郑剑英, 吕宾, 徐毅

### ■背景资料

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 80%患者确诊时已属中晚期。食管支架植入是解除中晚期食管癌患者吞咽困难的有效手段, 可解除患者的吞咽困难, 但术后有较高的再狭窄发生率, 导致吞咽困难再次发生, 而且不能杀伤肿瘤细胞, 仅作为姑息治疗。碘-125粒子治疗晚期消化道肿瘤疗效明显, 我们采用<sup>125</sup>I粒子附着Ni-Ti合金支架治疗晚期食管癌, 同时采用多方位护理, 观察疗效。

孙翠萍, 吕宾, 徐毅, 浙江中医学院附属医院消化科内镜中心 浙江省杭州市 310006

郑剑英, 淳安县第二人民医院 浙江省杭州市 311719

通讯作者: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市邮电路54号, 浙江中医学院附属医院消化科. lvbin@medmail.com.cn

电话: 0571-87032028

收稿日期: 2005-11-30 接受日期: 2006-01-07

### Nursing care of patient with esophageal nitinol stent and iodine-125 seeds for advanced-stage carcinoma of esophagus

Cui-Ping Sun, Jian-Ying Zheng, Bin Lv, Yi Xu

Cui-Ping Sun, Bin Lv, Yi Xu, Department of Gastroenterology, Center of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Zhejiang Traditional Chinese Medicine College, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Jian-Ying Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Chun'an, Chun'an 311719, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Dr. Bin Lv, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Zhejiang Traditional Chinese Medicine College, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. lvbin@medmail.com.cn

Received: 2005-11-30 Accepted: 2006-01-07

### Abstract

**AIM:** To conclude the clinical experiences of nursing care of patients before and after esophageal nitinol stent and Iodine-125 seeds implantation.

**METHODS:** The implantation of esophageal nitinol stent with Iodine-125 seeds was performed on 6 patients with advanced stage of esophageal carcinoma. Rational nursing strategies, including psychological direction, routine treatment and rehabilitation guidance, etc., were adopted in peri-operation period.

**RESULTS:** Obstruction of the esophagus was got through in all the 6 patients, and success rate of the implantation was 100%. The fearfulness and uncomfortable feelings of the patients during operation were relieved. No significant complications appeared during following up. The lives of all the patients were improved.

**CONCLUSION:** Rational nursing makes the implantation of esophageal stent accepted easily and performed successfully, and can decrease the adverse reactions to some extent.

**Key Words:** Iodine-125 seeds; Esophageal carcinoma; Stent; Nursing

Sun CP, Zheng JY, Lv B, Xu Y. Nursing care of patient with esophageal nitinol stent and iodine-125 seeds for advanced-stage carcinoma of esophagus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):446-449

### 摘要

**目的:** 总结<sup>125</sup>I Ni-Ti合金支架治疗晚期食管癌中护理配合的经验体会。

**方法:** 应用附有<sup>125</sup>I的Ni-Ti合金支架对6例晚期食管癌患者进行置入。采取心理护理、常规护理及术后恢复指导等措施。

**结果:** 6例患者全部解除了梗阻, 支架放置成功率为100%。减少了患者的恐惧与术中不适, 术后随访无严重并发症发生, 精神状态良好, 生活质量得以改善。

**结论:** 使用<sup>125</sup>I Ni-Ti合金支架治疗晚期食管癌, 方法安全, 快捷简便, 加强围手术期护理, 密切观察病情, 可提高手术成功率, 减少术后并发症。

**关键词:** 碘-125粒子; 食管癌; 支架; 护理

孙翠萍, 郑剑英, 吕宾, 徐毅. <sup>125</sup>I Ni-Ti合金支架治疗晚期食管癌的配合与护理6例. *世界华人消化杂志* 2006;14(4):446-449  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/446.asp>

### 0 引言

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 年新发病例占世界新发食管癌病例的50%以上。由于早期诊断滞后, 80%患者确诊时已属中晚期。食管支架植入是解除中晚期食管癌患者吞咽困难的有效手段, 可解除患者的吞咽困难, 但术后有



较高的再狭窄发生率, 导致吞咽困难再次发生, 而且不能杀伤肿瘤细胞, 仅作为姑息治疗<sup>[1]</sup>. 碘-125粒子治疗晚期消化道肿瘤疗效明显<sup>[2-4]</sup>, 为此, 我们采用 $^{125}\text{I}$ 粒子附着Ni-Ti合金支架治疗晚期食管癌. 发现6例患者均收到满意的疗效, 今将其手术相关配合报告如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 本组共6例, 均为男性, 年龄62-79岁, 平均69.5岁, 病程2-11 mo, 平均病程6.5 mo. 患者均为恶性食管癌, 食管贲门癌1例, 均由病理证实为中分化鳞癌. 本组病例均因吞咽困难就诊, 进流质2例, 进半流质2例. 全部患者术前均经X线钡餐造影或内镜检查证实, 确定狭窄的部位、程度、范围、形状以及是否伴有食管气管瘘等.

### 1.2 方法

1.2.1 支架植入 术前准备: 禁食12 h, 术前常规30 min肌注安定、654-2各10 mg、杜冷丁50-100 mg, 20 g/L利多卡因作喉部喷雾麻醉. 使用器械: 电子胃镜, 超滑导丝, Savary扩张管及气管插管、心电监护仪、除颤器、氧气装置、吸痰器等抢救物品.  $^{125}\text{I}$  Ni-Ti合金支架(南京微创公司),  $^{125}\text{I}$ 粒子为外径0.8 mm, 长度4.5 mm的肽壳密封放射源, 射线长度约为1.70-2.0 cm, 半衰期2 mo, 支架长度较狭窄长度长4 cm, 放射粒子按病变范围不同而定. 由放射技术人员将 $^{125}\text{I}$ 粒子安装到支架上, 先确定安装粒子的层数, 每隔1.5 cm安装一层碘粒子(如病变长度为5 cm, 则安装4层碘粒子, 两端各1层, 中段等距离2层, 共4层, 这样可以保证碘粒子完全覆盖病灶段). 每层4粒碘粒子, 以120°间隔安放在同一平面, 2层之间的4粒碘粒子位置相互交错. 支架置入方法: 内镜直视下置入, 与普通捆绑式支架置入方式相同.

1.2.2 护理配合 术前护理配合: (1)患者术前都有不同程度的恐惧心理, 责任护士耐心疏导, 向患者及家属讲清手术的目的、优越性, 即不开刀、痛苦小, 改善症状的同时可对肿瘤进行放射治疗, 讲明手术的步骤及术中配合方法, 从而增强其战胜疾病的信心, 以良好的心理状态接受治疗; (2)保持口腔清洁, 术前嘱患者刷牙, 饭后漱口, 加强饮食指导, 给予高热量、高蛋白、易消化的食物, 并注意饮食卫生; 身体状况较差者同时辅以肠外营养治疗, 增强体质和对手术的耐受性; (3)向患者和家属说明其安全性, 解除

疑虑, 术后注意事项; 术后2 mo内陪护人, 尤其是孕妇及儿童距患者1 m以上.

术中配合: 术者利用内镜刻度确定狭窄长度, 支架长度超过狭窄段长度约4 cm; 助手协助医生经胃镜插入金属导丝至狭窄部位以下, 缓慢退出内镜时助手应同步将导丝缓慢向里推送, 以便保证导丝始终在狭窄以下. 沿导丝插入安装带有支架的支架置入器, 达到预定位置时缓慢释放支架, 然后退出置入器及导丝, 再行胃镜检查支架放置情况, 必要时可用异物钳对支架进行上、下调整以达到最佳位置<sup>[5]</sup>. 术中密切观察患者的脉搏、呼吸的变化, 随时嘱患者放松, 调整体位, 及时清除口腔分泌物; 严重冠心病患者予心电监护, 观察心率、心律及血压.

术后注意事项: 嘱术后不宜进冷食<sup>[6]</sup>, 以免支架收缩滑脱. 术后1 h后进温热流质及无渣半流质, 4 h后酌情进少渣软食, 进食宜细嚼慢咽, 忌粗糙硬性食物<sup>[7]</sup>, 进食后饮温开水, 以冲刷附于支架上的食物, 防止食管被食物阻塞造成患者心理疑虑对治疗不利. 进食时患者取坐位或半坐位, 食物在重力和食道的蠕动下, 可顺利通过狭窄部位, 适当的饮食和体位能有效地防止食物残存在支架部位. 保持正确的体位, 由于食管支架置入后自身不能收缩, 易造成胃内容物返流而引起返流性食管炎, 继之发生食管溃疡, 并发出血及吸入性肺炎. 因此, 术后患者床头应抬高15-30°以防返流.

术后并发症的观察: (1)胸痛: 主要是胸骨后胀痛不适, 为支架复张压迫病变食管所致<sup>[8]</sup>, 术后无胸痛者极少, 疼痛程度轻重不一, 一般在术后3-5 d内可自行缓解, 严重者可给予强痛定100 mg肌肉注射, 慎用杜冷丁. 本组4例均有胸痛, 未予任何处理均自行缓解. (2)出血: 术后出血原因多为扩张治疗食管狭窄段黏膜轻度撕裂出血, 网状支架金属丝的摩擦, 术后进食粗糙食物所致, 因此术后应先进流质, 逐步改为半流质、普食, 术后严密观察血压, 如血压不稳定, 疑有内出血, 应定时观察血压、脉搏, 直至稳定为止. 本组未出现大出血情况. (3)头晕乏力: 主要原因是患者开始对放射线不适应, 也可能放射粒子过多所致. 本组4例均有不同程度头晕乏力, 未经特殊处理在2-3 d后自行缓解. (4)白细胞减少: 患者对放射线极度敏感或放射粒子严重超量, 支架置入1 wk后患者仍感头晕乏力、纳差、精神不济等, 应及时报告医师决定是否需要复查血常规

### ■应用要点

$^{125}\text{I}$  Ni-Ti合金支架植入术前对患者病情需要有充分的了解, 以制定一整套适合患者的护理计划, 做到有的放矢, 术中始终保持导丝在狭窄部位以下, 这是保证手术成功和减少并发症的关键, 因此, 配合者必须注意固定导丝避免导丝位置上移.  $^{125}\text{I}$ 粒子安装在支架覆膜的囊内时, 注意将粒子向囊底推送, 以防止在安装支架过程中粒子的脱落. 安装过程中须注意个人的防护.

规;一般患者约2 wk左右复查血常规,此后可适当延长复查时间.本组无一例发生细胞数异常.(5)穿孔:为最严重的并发症,术后应观察患者有无胸痛、呼吸急促、紫绀、脉快等.本组无一例穿孔.

陪护人员注意事项:尽量保持1 m的距离;尽量缩短与之接触的时间.出院指导:嘱患者生活有规律,保持乐观的心态,饮食合理,注意休息,保证充足的睡眠时间,按医嘱定期复查胸片和就治疗.

## 2 结果

6例患者支架置入全部成功,支架位置正确,术后内镜复查支架膨胀良好,狭窄消失,梗阻症状解除,吞咽困难明显好转,全部恢复正常饮食.随访3-9 mo,无支架移位、脱落和严重并发症出现.其中有1例患者第3 mo左右再次出现吞咽困难,经内镜复查癌组织长出支架下端堵塞食管,再次置入一普通覆膜记忆合金支架后症状缓解;1例于术后6 mo死于冠心病恶性心律失常,存活的5例体质量均有不同程度增加,精神状态好转,生活质量得以全面改善.

## 3 讨论

晚期食道癌患者由于已经失去手术根治意义,临床主要治疗目的是尽可能改善患者生活质量和延长生存时间,目前比较提倡的治疗为置入支架和/或腔内放疗,我们将两种治疗手段结合在一起,简化治疗程序,最大程度地减少患者痛苦,同时又达到临床治疗目的.

我们所用<sup>125</sup>I释放低能的γ射线,能量为27-35 keV,在组织间放射范围为1.70-2.0 cm,半衰期2 mo,这种低能的放射性核素制成的粒子,进行体内放射治疗恶性肿瘤具有以下优点:近距离杀死肿瘤细胞;连续的低剂量率照射抑制了肿瘤细胞的有丝分裂,明显抑制肿瘤的再增殖;增加肿瘤细胞对射线的敏感性<sup>[9-12]</sup>;毒副作用小<sup>[13]</sup>,明显减少了并发症的发生;方法简便、经济<sup>[14]</sup>.前期实验及临床发现患者消化道排泄物放射性完全符合环境辐射安全要求,无需特殊处理,本治疗操作医护人员按照剂量按每周手术2次计算辐射量,远低于我国现代辐射防护规定剂量限值50 MSV,陪护人以12 h/d,距离1.0 m陪护至患者体内辐射衰减结束(约1-1.5 a)计算,该陪护人辐射总量低于一次胸透剂量2 MSV<sup>[15]</sup>,因此,该治疗方式适合临床推广应用.

<sup>125</sup>I治疗的有效性是基于他的放射性,再者患者多为中晚期肿瘤,有不同时间的进食困难,营养不良,患者一般状况较差,心理负担重,表现为恐惧焦虑等,家属也有疑虑.我们在术前耐心向患者及家属介绍该技术的操作方法、疗效、费用、术前、术中、术后的注意事项及如何配合,尽量解除患者及家属的心理压力,确保手术顺利完成.

该治疗方法除对临床医师要求较高,同时护理配合也很重要,术前对患者病情需要有充分的了解,以制定一整套适合患者的护理计划,做到有的放矢,也有助于临床医师及时调整治疗方案,最终提高手术成功率和患者及家属的满意度,减少医疗纠纷.我们体会到术者与助手的默契配合是放置食管支架成功的保证.术中始终保持导丝在狭窄部位以下,这是保证手术成功和减少并发症的关键,因此,配合者必须注意固定导丝避免导丝位置上移.<sup>125</sup>I粒子安装在支架覆膜的囊内时,注意将粒子向囊底推送,以防止在安装支架过程中粒子的脱落.安装过程中须注意个人的防护.

## 4 参考文献

- 1 陆军,孙立军,石梅,韩良辅,王志祥,张歌萌.覆膜支架置入和/或放疗治疗中晚期食管癌.实用放射学杂志 2002;18:609-611
- 2 苏鲁,巴格那,潘洪珍,王伟,洪梅燕,徐艺华,何海武,吴祖荣,赖雪珍,阮海兰,陈芳.消化道癌组织间放疗法2例.世界华人消化杂志 2002;10:513-515
- 3 苏鲁,巴格那,梁武,潘洪珍,王伟,徐艺华,翁敬庵,陈芳,洪梅燕.内镜下<sup>125</sup>碘组织间放射治疗消化道肿瘤的应用研究.中华消化内镜杂志 2003;20:328-330
- 4 谢大业,刘忠,胡国平.肝、胆、胰区肿瘤组织内放射治疗.中国肿瘤 2002;11:646-647
- 5 Davis J. Placement of a wire-mesh stent: a case study. Gastroenterol Nurs 1997;20:20-22
- 6 方建飞,蒋梅芳,俞立农,宋永浩,韩华利.食管癌放射治疗所致食管黏膜炎症的护理.中华护理杂志 1999;34:722-723
- 7 张秀玲.带膜支架在治疗恶性肿瘤食管狭窄中的应用及护理.齐鲁护理杂志 2003;9:737-738
- 8 吕富春,汪应章,吕娜,张万凯,许软成.内镜下置入支架治疗食管贲门狭窄疗效随访.消化内镜杂志 2001;18:241
- 9 Mohiuddin M, Rosato F, Barbot D, Schuricht A, Biermann W, Cantor R. Long-term results of combined modality treatment with I-125 implantation for carcinoma of the pancreas. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992;23:305-311
- 10 Ragde H, Blasko JC, Grimm PD. Brachytherapy for clinically localized prostate cancer: results at 72 and 82 year follow-up. Semin Surg Oncol 1997;13:438-443
- 11 Martinez-Monge R, Nag S, Nieroda CA, Martin EW. Iodine-125 brachytherapy in the treatment of colorectal adenocarcinoma metastatic to the liver.

- Cancer 1999; 85: 1218-1225
- 12 Videtic GM, Gaspar LE, Zamorano L, Fontanesi J, Levin KJ, Kupsky WJ, Tekyi-Mensah S. Use of the RTOG recursive partitioning analysis to validate the benefit of iodine-125 implants in the primary treatment of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 45: 687-692
- 13 罗开元, 李波, 杨嵘, 王明春, 刘文革, 曹卫弘, 黄明龙.  $^{125}\text{I}$ 粒子组织间放射治疗恶性肿瘤的临床应用. *中华医学杂志* 2001; 81: 754-755
- 14 苏鲁, 梁武, 潘洪珍, 徐艺华, 洪梅燕, 赖雪珍, 陈芳. 碘-125粒子支架治疗晚期食管癌的疗效研究. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 316-319
- 15 刘伟琪, 裴永法, 任礼华, 岳麓. 碘-125籽源组织间照射患者和周围人员受照剂量的测量和估算. *中国辐射卫生* 2001; 10: 196-197

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

## • 消息 •

### 更正与说明专栏

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道, 特设“更正与说明”固定专栏, 包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目, 不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明, 而且针对文章的学术水平等进行讨论。在此, 我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》, 给更正与说明栏目投稿。投稿者凭文章的编号, 可免费注册(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/39.doc>)使用中国生物医学基金论文摘要库3年。中国生物医学基金论文摘要库(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)收录了1994-2005年国内发表在1 204种生物医学类期刊总计20万以上的论文摘要。这些论文受国家、军队和省部级自然科学基金、杰出青年基金、重大项目基金资助, 内容丰富、数据准确, 体现了我国生物医学的发展历程、脉络和方向, 可为相关领域广大学者和研究人员了解并掌握当前研究动态、开辟新的研究领域提供思路。

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

## • 消息 •

### 专家门诊

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 邀请本刊编委为专栏撰稿, 每期1-3个专家门诊。写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

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

0 引言; 1 诊断; 2 治疗; 3 特色; 4 门诊时间



# 埃索美拉唑对十二指肠球溃疡合并幽门螺杆菌感染的治疗

谢玉民

## ■背景资料

埃索美拉唑是奥美拉唑的第一个左旋异构体,他同其他奥美拉唑相比,代谢率低、血浆浓度高、达到质子泵起作用的药物多、生物利用度高、在不同个体间的差异小。国内外报道埃索美拉唑明显优于奥美拉唑。本文观察了埃索美拉唑对十二指肠球溃疡合并幽门螺杆菌感染的疗效。

谢玉民的,首都医科大学附属北京天坛医院消化内科 北京市 100050

通讯作者: 谢玉民, 100050, 北京市崇文区天坛西里6号, 天坛医院消化内科. yuer2010@hotmail.com

电话: 010-63057173

收稿日期: 2005-10-20 接受日期: 2005-12-31

## Efficacy of Esomeprazole in treatment of duodenal ulcer complicated with *Helicobacter Pylori* Infection

Yu-Min Xie

Yu-Min Xie, Department of Gastroenterology, Tiantan Hospital, Beijing 100050, China

correspondence to: Yu-Min Xie, 6 Tiantan West Road, Chongwen District, Beijing 100050, China. yuer2010@hotmail.com

Received: 2005-10-20 Accepted: 2005-12-31

## Abstract

**AIM:** To observe the effects of Esomeprazole plus Lifuxing plus Clarithromycin in the treatment of duodenal ulcer complicated with *Helicobacter Pylori* infection.

**METHODS:** Sixty-four patients with duodenal ulcer, who were positive for *Helicobacter Pylori* (*H Pylori*), were randomly assigned to group A ( $n = 32$ ) and B ( $n = 32$ ). The patients in group A were treated with Esomeprazole (40 mg) plus Lifuxing (0.2 g) plus Clarithromycin (0.5 g), while those in group B were treated with Famotidine (20 mg) plus Lifuxing (0.2 g) plus Clarithromycin (0.5 g). At the end of treatment, the cure rate of duodenal ulcer and the rate of *H Pylori* eradication as well as the improvement of clinical symptoms were analyzed.

**RESULTS:** The cure rates of the patients were 100% and 81.3% in group A and B, respectively, and there was significant difference between them ( $P < 0.01$ ). The rate of *H Pylori* eradication were 90.6% and 71.9% in group A and B, respectively, and there also existed significant difference between them ( $P < 0.01$ ). All the patients

in group A had complete improvement of the clinical symptoms (markedly and total effective rate: 100%), which showed a marked difference in comparison with group B (markedly effective rate: 62.5%; total effective rate: 87.5%) ( $P < 0.01$ ), and no significant adverse reactions were observed in both groups.

**CONCLUSION:** Esomeprazole can effectively cure the ulcer of the duodenal bulb, and it can enhance the rate of *H pylori* eradication when combined with antibiotics.

**Key Words:** Esomeprazole; Duodenal ulcer; *Helicobacter pylori*; Famotidine; Efficacy

Xie YM. Efficacy of Esomeprazole in treatment of duodenal ulcer complicated with *Helicobacter Pylori* Infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):450-452

## 摘要

**目的:** 观察埃索美拉唑加利复星、克拉霉素治疗十二指肠溃疡合并幽门螺杆菌(*H Pylori*)感染的临床疗效。

**方法:** 将64例幽门螺杆菌阳性的十二指肠球溃疡患者随机分为治疗组( $n = 32$ )和对照组( $n = 32$ )。治疗组口服埃索美拉唑、利复星、克拉霉素。对照组口服法莫替丁、利复星、克拉霉素。各组疗程结束后复查胃镜,观察溃疡愈合率、*H pylori*清除率和临床症状的改善情况。

**结果:** 治疗组和对照组镜下溃疡愈合率分别为32例(100%)和26例(81.3%)( $P < 0.01$ ); *H pylori*根除率分别为90.6%和71.9%( $P < 0.01$ ); 治疗组显效32例,总有效率100%;对照组显效率20例(62.5%),有效8例(25%),总有效率87.5%,治疗组显效率和总有效率显著高于对照组( $P < 0.01$ )。两组均无明显不良反应。

**结论:** 埃索美拉唑缓解临床症状快,有效促进溃疡愈合,与抗生素联合应用提高*H pylori*清除率。

**关键词:** 埃索美拉唑; 十二指肠球溃疡; 幽门螺杆菌

## 菌; 法莫替丁; 疗效

谢玉民. 埃索美拉唑对十二指肠球溃疡合并幽门螺杆菌感染的治疗. 世界华人消化杂志 2006;14(4):450-452  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/450.asp>

## 0 引言

十二指肠球溃疡约占整个消化性溃疡的80%左右, 有的学者认为人群的10%在其一生中曾患此病. 自质子泵抑制剂应用临床, 消化性溃疡发病率已有下降, 但仍为消化系统的多发病. 十二指肠球溃疡的发病机制复杂, 但与酸和幽门螺杆菌(*H pylori*)感染有关, 过去应用质子泵抑制剂(PPI)治疗取得明显的效果. 目前临床上使用的质子泵抑制剂(除埃索美拉唑外)均为含两种异构体的消旋体混合物(又称手性化合物). 消旋体化合物摄入人体内后, 由于机体内药物代谢的酶和受体可对其中一种异构体有特殊作用, 故两种成分的异构体在药代动力学与药效学上可完全不同. 药理学上将两者中活性强者称为优势构型, 而另一者称为劣势构型<sup>[1]</sup>. 埃索美拉唑是在酸相关性疾病治疗中第一个发展为光学异构体形式的PPI, 即S型异构体埃索美拉唑. 我们用埃索美拉唑治疗十二指肠球溃疡和清除幽门螺杆菌(*H pylori*)取得良好的效果, 现报告如下:

## 1 材料和方法

1.1 材料 我们选择了2003/2005的患者64例, 均具有典型的临床症状. 并经胃镜证实(日本Olympus公司GIF-XQ240胃镜)的十二指肠球溃疡, 溃疡分期在A1-A2期. *H pylori*检测方法为胃窦黏膜组织快速尿素酶试验(pH值指示剂法, 试纸提供为福建三强生物化工有限公司)和胃窦黏膜活检*H pylori*染色(姬姆萨染色)2项均为阳性证实*H pylori*感染, 排除标准是指: 患有胃幽门管溃疡、有DU并发症(如幽门狭窄出血等)、有食管、胃或者球部手术者和其他器质性疾病, 而且近1 mo以来未服用抑酸剂、抗生素等. 64例患者按确诊时间随机(随机号方法)分为治疗组和法莫替丁对照组, 治疗组32例, 其中男24例, 女8例; 年龄21-64岁, 平均年龄 $36 \pm 6$ 岁. 对照组32例, 其中男26例, 女6例; 年龄19-66岁, 平均年龄 $38 \pm 4$ 岁, 两组病例在年龄、性别、临床症状、胃镜检查等方面具有可比性.

1.2 方法 治疗组口服埃索美拉唑(阿斯利康制药

有限公司)40 mg bid+利复星(北京双鹤药业)0.2 g bid+克拉霉素(山东新华制药)0.5 g bid, 疗程1 wk. 然后继续口服埃索美拉唑3 wk(40 mg, qd). 对照组口服法莫替丁(上海信谊制药有限公司)20 mg bid+利复星(北京双鹤药业)0.2 g bid+克拉霉素(山东新华制药)0.5 g bid, 疗程2 wk. 然后服法莫替丁20 mg bid, 连服2 wk为1疗程. 观察项目: 治疗前后化验血、尿常规、肝肾功能、临床症状的变化和药物的不良反应. 疗程4 wk后我们从*H pylori*的清除率, 胃镜下及临床症状进行疗效判断. *H pylori*清除: 复查胃镜时取胃窦黏膜快速尿素酶试验和胃窦黏膜活检*H pylori*染色, 两项均阴性为清除. *H pylori*根除率: 疗程治疗结束停药后1 mo查<sup>13</sup>C呼气试验, 由于复诊率较低, 不足50%, 无法做统计学处理. 未列入观察范围. 胃镜下愈合标准: 痊愈: 镜下溃疡面消失, 溃疡区域已经完全被上皮组织所覆盖. 显效: 镜下溃疡面缩小1/2以上. 有效: 镜下溃疡面缩小1/3. 无效: 镜下溃疡面无变化或加大. 临床疗效判定: 跟踪观察3 d、1 wk、4 wk后腹痛缓解率. 有效: 治疗1 wk后症状重度或中度改善为中度或轻度; 无效: 1 wk内的临床症状无明显改善或加重.

统计学处理 疗程比较用 $\chi^2$ 检.

## 2 结果

2.1 两组上腹痛缓解率的比较 治疗组和对照组3 d、1 wk、4 wk上腹痛缓解的例数分别为30例, 32例, 32例和8例, 12例, 28例. 缓解率分别为: 93.7%, 100%, 100%和25%, 37.5%, 87.5%, 治疗组显著高于对照组( $P < 0.01$ ).

2.2 两组十二指肠球溃疡患者的疗效比较 治疗组上腹痛及临床症状改善的总有效率、胃镜下溃疡愈合率及*H pylori*清除率均高于对照组( $P < 0.01$ )(表1).

2.3 药物不良反应 两组治疗前后检查血、尿常规和肝肾功能, 无明显变化, 未观察到与药物可能有关的任何不良反应.

## 3 讨论

十二指肠球溃疡发病机制复杂, 但发病机制的现代理念包括3方面: (1)没有胃酸就没有溃疡, (2)没有*H pylori*就没有溃疡复发, (3)黏膜屏障健康就不会形成溃疡<sup>[2]</sup>. 另外环境因素、精神因素、遗传因素等亦可造成<sup>[3]</sup>. 欧洲*H pylori*研究组于2000年荷兰会议形成Masstricht2-2000年共

表1 两组疗效比较

| 组别               | n          | 镜下溃疡愈合n (%) |            |         | 临床症状n (%)  |            | <i>H pylori</i> 清除率 |
|------------------|------------|-------------|------------|---------|------------|------------|---------------------|
|                  |            | 痊愈          | 显效         | 显效      | 有效         | 总有效率       |                     |
| 治疗组 <sup>a</sup> | 32 (100%)  | 0           | 32 (100%)  | 0       | 32 (100%)  | 29 (90.6%) |                     |
| 对照组              | 26 (81.3%) | 4 (12.5)    | 20 (62.5%) | 8 (25%) | 28 (87.5%) | 23 (70.9%) |                     |

$P < 0.01$  vs 对照组.

识报告认为: 消化性溃疡合*H pylori*感染应极力推荐治疗, 具有一类支持证据<sup>[4]</sup>. 我国1999年海南三亚全国*H pylori*协作组专家共识认为消化性溃疡合并*H pylori*感染必须根除治疗. 因此消化性溃疡特别是十二指肠球溃疡合并*H pylori*感染, 抑酸与根除*H pylori*至关重要.

现在认为溃疡的发生主要与夜间酸分泌有关. 但是溃疡愈合24 h酸抑制比单纯夜间酸分泌抑制更为重要<sup>[5]</sup>. PPI+克拉霉素+阿莫西林是国内外专家共识推荐的一线治疗方案. 但以往的PPI也存在不足如: 起效慢、夜间酸突破、停药后反弹等. 同时*H pylori*治疗中甲硝唑、阿莫西林等原发和继发耐药有所增加. 我们采用埃索美拉唑+克拉霉素+利复星治疗十二指肠球溃疡合并*H pylori*感染患者取得很好的效果. 埃索美拉唑是一种新的质子泵抑制剂, 是奥美拉唑的左旋异构体, 文献报道单次给药40 mg后, 血浆清除半衰期为48 min, 每天重复给药时为72 min. 两次给药间的药物清除非常完全. 无浓度蓄积现象. 尿中检测到的母体药物浓度<1%, 口服后80%以代谢产物形式从尿中排泄, 剩余的代谢产物从粪便中排出. 单次口服后48 h的总吸收率92%-96%之间<sup>[6]</sup>. 只有一小部分是通过对CYP1C19代谢, 大部分是通过CYP3A4代谢, 因此代谢率低, 血浆浓度高. 埃索美拉唑左旋异构体总的内在清除率低于奥美拉唑和R-异构体, 与奥美拉唑相比, 左旋异构体在肝脏内的"首次通过"代谢率较低, 因此有更多的左旋异构体滞留于血液中, 故到达质子泵起作用的药物量更多<sup>[7]</sup>. 由于奥美拉唑左旋异构体在代谢上的特点和相对更高的生物利用度, 使药物

在不同个体间的差异明显减少, 因此药物疗效的可预知性甚好. 这也是其奥美拉唑左旋异构体优于其他质子泵抑制剂的特点<sup>[8]</sup>. 埃索美拉唑具有更有效的酸抑制能力, 对胃酸分泌的抑制作用明显, 高于奥美拉唑右旋异构体<sup>[9]</sup>. 本试验中埃索美拉唑治疗组镜下溃疡愈合率(100%), 特别是腹痛临床症状缓解率高(100%), 抑酸的缓解疗效更加, *H pylori*的清除率高. 与对照组比较差异均具有显著性. 因此埃索美拉唑+克拉霉素+利复星三者联合可有效促进溃疡的愈合, 改善患者的临床症状和提高*H pylori*的清除率.

#### 4 参考文献

- 1 许国铭, 钟捷. 质子泵抑制剂-基础与临床. 上海: 上海科技教育出版社, 2004: 141
- 2 胡伏莲. 消化性溃疡发病机制的现代观念. 中华消化杂志 2005; 25: 189
- 3 刘文慧. 幽门螺杆菌研究进展. 上海: 科学技术文献出版社, 2001: 188
- 4 Lind T, Veldhuyzen, van zanten S unge. Eradication of helicobacter Pylori using one-week triple therapies combining omeprazole, with two anti microbials the MATCHII Study. *Helicobacter* 1996; 1: 138-144
- 5 李增烈. H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶抑制治疗消化性溃疡. 实用内科学 1993; 13: 394-395
- 6 Hassan AM, Andersson T, Bredberg E. Pharmacokinetics of esomeprazole after oral and intravenous administration of single and repeated doses to healthy subjects. *Eur J clin pharmacol* 2000; 56: 665
- 7 Junghard o, hassan Alin M, hasselgren G. The effect of auc and cmax of esomeprazole on acid secretion and intragastric PH. *Gastroenterology* 2000; 118: A17
- 8 许国铭, 钟捷. 质子泵抑制剂-基础与临床. 上海: 上海科技教育出版社, 2004: 143
- 9 王静, 王铁武, 张燕萍, 李又平. 耐信; 阿莫西林, 痢特灵; 三联法治疗HP阳性十二指肠球溃疡的疗效观察. 宁夏医学杂志 2003; 25: 609

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁



# 慢性乙型肝炎患者血清脂质水平与病理分级分期的关系

洪永孟, 朱幼芙, 吴爱华, 侯金林

洪永孟, 广东省阳江市人民医院感染内科 广东省阳江市 529500  
朱幼芙, 吴爱华, 侯金林, 南方医科大学南方医院感染内科  
广东省广州市 510515

通讯作者: 朱幼芙, 510515, 广东省广州市, 南方医院感染内科  
感染内科. zhuyf0118@163.com

电话: 020-61641960

收稿日期: 2005-11-15 接受日期: 2005-11-30

## Relationship between serum lipid level and pathological grading and staging in chronic hepatitis B patients

Yong-Meng Hong, You-Fu Zhu, Ai-Hua Wu, Jin-Lin Hou

Yong-Meng Hong, Department of Infectious Diseases,  
People's Hospital, Yangjiang 529500, Guangdong Province,  
China

You-Fu Zhu, Ai-Hua Wu, Jin-Lin Hou, Department of In-  
fectious Diseases, Nanfang Hospital, Nanfang Medical Uni-  
versity, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: You-Fu Zhu, Department of Infec-  
tious Diseases, Nanfang Hospital, Nanfang Medical Univer-  
sity, Guangzhou 510515, Guangdong Province,  
China. Zhuyf0118@163.com

Received: 2005-11-15 Accepted: 2005-11-30

### Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between the severity of liver histology and serum lipid level in patients with chronic hepatitis B.

**METHODS:** The serum levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), and very low density lipoprotein-cholesterol (VLDL-C) was measured and compared in 130 chronic hepatitis B patients and 30 healthy controls with automatic biomedical analyzer.

**RESULTS:** The levels of serum lipid were decreased with the enhancement of histological inflammation grading and fibrosis staging, and they were significantly different in patients with G3, G4 grades (for inflammation degree) and S4 stage (for fibrosis degree) than those in the controls ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The levels of serum lipid in patients with G1, G2 grades and S0,

S1, S2, S3 stages had no marked difference with those in the controls.

**CONCLUSION:** The levels of serum lipid are useful for the judgment of the severe hepatic inflammation and prognosis.

**Key Words:** Chronic hepatitis; Serum lipid; Pathological grading and staging

Hong YM, Zhu YF, Wu AH, Hou JL. Relationship between serum lipid level and pathological grading and staging in chronic hepatitis B patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(4):453-456

### 摘要

**目的:** 探讨慢性乙型肝炎肝组织病变严重程度与血清脂质水平的关系。

**方法:** 采用全自动生化分析仪测定130例慢性乙型肝炎患者和30例正常人血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C), 并与慢性乙型肝炎患者肝组织病理分级分期进行对比分析。

**结果:** 慢性乙型肝炎患者血清的脂质水平随着肝组织炎症程度加重、肝组织纤维分期升高而逐渐降低, 较重的肝组织炎症活动程度(G3、G4)、较重的肝组织纤维分期(S4)与对照组比较, 有显著差异( $P < 0.05$ 或 $< 0.01$ ), 较轻的肝组织炎症活动程度(G1、G2)、较轻的肝组织纤维分期(S0、S1、S2、S3)与对照组比较, 差异不显著( $P > 0.05$ )。

**结论:** 测定血清脂质水平对判断较重的慢性肝炎肝组织实质细胞的损害和预后估计有一定的价值。

**关键词:** 慢性肝炎; 血脂; 病理分级分期

洪永孟, 朱幼芙, 吴爱华, 侯金林. 慢性乙型肝炎患者血清脂质水平与病理分级分期的关系. *世界华人消化杂志* 2006;14(4):453-456

### ■背景资料

肝脏是脂类代谢的重要器官, 其病变必然影响脂质代谢的正常进行, 许多研究表明, 测定血清脂质水平对判断病毒性肝炎的病情和预后有一定的参考价值. 但对慢性乙型肝炎不同的肝组织病理进程中, 其血清脂质水平变化的研究仍少见报道.

# ■创新盘点

以往有报道通过生化检查判定肝损害程度与血脂关系,我们通过病理检查,明确肝组织病理分级分期,对肝组织实质细胞的损害程度有更精确的估计,再测定血清脂质水平的变化,分析其关系,可能会有更大的意义。

表 1 130例慢性乙型肝炎炎症分级与血清脂质水平 (mean  $\pm$  SD, mmol/L)

| 组别         | <i>n</i> | TC                           | TG                           | HDL                          | LDL                          | VLDL                         |
|------------|----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| N          | 30       | 4.35 $\pm$ 0.80              | 1.17 $\pm$ 0.26              | 0.55 $\pm$ 0.11              | 1.18 $\pm$ 0.15              | 0.24 $\pm$ 0.05              |
| G1         | 18       | 4.17 $\pm$ 0.75              | 1.12 $\pm$ 0.22              | 0.55 $\pm$ 0.18              | 1.15 $\pm$ 0.14              | 0.22 $\pm$ 0.04              |
| G2         | 44       | 4.12 $\pm$ 0.63              | 1.08 $\pm$ 0.20              | 0.53 $\pm$ 0.12              | 1.14 $\pm$ 0.14              | 0.20 $\pm$ 0.04              |
| G3         | 36       | 3.74 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup> | 0.98 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup> | 0.46 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup> | 0.86 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup> | 0.16 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup> |
| G4         | 32       | 2.88 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup> | 0.92 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup> | 0.45 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> | 0.84 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup> | 0.16 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup> |
| <i>F</i> 值 |          | 7.23                         | 2.85                         | 4.36                         | 5.44                         | 10.26                        |
| <i>P</i>   |          | <0.01                        | <0.05                        | <0.01                        | <0.01                        | <0.01                        |

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组。

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/453.asp>

## 0 引言

肝脏是脂类代谢的重要器官,其病变必然影响脂质代谢的正常进行,许多研究表明,测定血清脂质水平对判断病毒性肝炎的病情和预后有一定的参考价值<sup>[1-4]</sup>。但对慢性乙型肝炎肝组织病变进程中的血清脂质水平变化仍少见报道。我们应用日本Olympus AU800全自动生化分析仪测定了130例慢性乙型肝炎与30例正常人的血清脂质水平,并与肝组织病理分级分期进行分析,现报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 来自2002-09/2005-09在广州南方医院感染内科住院经肝活检确诊的130例慢性乙型肝炎患者,其中男88例,女42例,年龄12-59岁,平均年龄33.3岁,排除HAV、HCV、HDV、HEV重叠感染,凡合并脂肪肝、糖尿病、心血管疾病及免疫系统疾病者予剔除;正常对照组30例,从南方医院体检健康人群中抽取,排除心脑血管疾病、糖尿病、肝肾疾病及其他代谢性疾病,男18例,女12例,平均年龄35.5岁。

### 1.2 方法

1.2.1 血清脂质水平的测定 所有患者于入院后次晨空腹抽血,分离血清后立即送检,采用日本Olympus AU800全自动生化分析仪测定血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL)水平。

1.2.2 病理诊断 采用一秒钟快速肝活检法获取肝组织标本(长度>1.5 cm),40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,连续切成3  $\mu$ m切片。常规行HE染色和网织纤维染色。由两人双盲读片。病理诊断符合2000年西安会议修订《病毒性肝炎防治方案》

的标准<sup>[5]</sup>。

**统计学处理** 数据表示采用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD),数据处理采用SPSS 10.0统计软件,每个观察值的组间比较采用方差分析(*F*检验),然后每组各个观察值与对照组的组间比较采用LSD-*t*检验。

## 2 结果

2.1 血清脂质水平与肝脏炎症分级(表1) 经*F*检验,血清TC、TG、HDL、LDL、VLDL水平在肝组织炎症分级G1、G2、G3和G4之间不相等或不全相等,差异有统计学意义(*P*<0.05或<0.01),经LSD-*t*检验, G3和G4组的血清TC、TG、HDL、LDL、VLDL与对照组比较,差异有统计学意义(*P*<0.05或<0.01)。

2.2 血清脂质水平与肝纤维化分期(表2) 经*F*检验,血清TC、TG、HDL、LDL、VLDL水平在肝纤维化分期S0、S1、S2、S3和S4之间不相等或不全相等,差别有统计学意义(*P*<0.05或<0.01),经LSD-*t*检验, S4组的血清TC、TG、HDL、LDL、VLDL与对照组比较,差别有统计学意义(*P*<0.05或<0.01)。

## 3 讨论

血清脂质水平的测定在心脑血管疾病中的检测有重要意义,而在其他疾病的检测,尤其是肝病的检查,尚不够广泛。肝脏是脂类代谢的中心枢纽,机体脂类代谢正常与否,很大程度取决于肝功能的好坏,肝病时肝细胞的结构和功能均受到不同程度的破坏,势必会影响到脂类的代谢过程,造成血脂水平的异常,其程度与肝脏病变程度密切相关<sup>[6-9]</sup>,因此,血脂分析正在逐渐成为了解慢性肝病患者肝功能状态和病程进展的有临床意义的指标。2000年以后,我国对慢性肝炎采用了新的较为合理的肝组织炎症活动分级和

表 2 130例慢性乙肝血清脂质水平与肝纤维化分期比较 (mean  $\pm$  SD, mmol/L)

| 组别 | n  | TC                           | TG                           | HDL                          | LDL                          | VLDL                         |
|----|----|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| N  | 30 | 4.35 $\pm$ 0.80              | 1.17 $\pm$ 0.26              | 0.55 $\pm$ 0.11              | 1.18 $\pm$ 0.15              | 0.24 $\pm$ 0.05              |
| S0 | 8  | 4.20 $\pm$ 0.78              | 1.15 $\pm$ 0.20              | 0.54 $\pm$ 0.12              | 1.16 $\pm$ 0.14              | 0.23 $\pm$ 0.04              |
| S1 | 23 | 4.18 $\pm$ 0.74              | 1.10 $\pm$ 0.21              | 0.53 $\pm$ 0.12              | 1.12 $\pm$ 0.14              | 0.22 $\pm$ 0.05              |
| S2 | 34 | 4.13 $\pm$ 0.70              | 1.09 $\pm$ 0.19              | 0.52 $\pm$ 0.13              | 1.12 $\pm$ 0.14              | 0.21 $\pm$ 0.04              |
| S3 | 32 | 3.98 $\pm$ 0.66              | 1.08 $\pm$ 0.20              | 0.53 $\pm$ 0.12              | 1.10 $\pm$ 0.14              | 0.20 $\pm$ 0.04              |
| S4 | 23 | 3.05 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup> | 0.94 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup> | 0.43 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> | 0.82 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup> | 0.14 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup> |
| F值 |    | 6.52                         | 3.21                         | 3.96                         | 6.87                         | 11.10                        |
| P  |    | <0.01                        | <0.05                        | <0.01                        | <0.01                        | <0.01                        |

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组.

肝纤维化分期法, 而对这一慢性肝炎分级分期相关的血清脂质水平变化的研究仍报道较少.

我们的结果显示, 130例慢性乙型肝炎肝组织炎症活动程度分级G1、G2、G3、G4的血清脂质水平随分级水平的升高而逐渐降低, 每一项观察指标, 在各组间比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $<0.01$ ). G1、G2组与正常对照组比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ ), G3、G4组与正常对照组比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $<0.01$ ), 提示血清脂质水平在肝组织炎症程度较轻的慢性乙肝患者(G1、G2)并不敏感, 而在肝组织炎症程度为中、重度的慢性乙肝患者(G3、G4)较敏感, 说明肝组织炎症程度为中度以上的慢性乙肝患者血清脂质水平的降低与肝组织炎症坏死的程度是一致的, 而在肝组织炎症程度中度以下的慢性乙肝患者血清脂质水平的降低与肝组织炎症坏死的程度是不一致的. 一方面说明血清脂质水平的变化, 在较轻的肝脏病变并不敏感; 另一方面说明肝脏有较大的潜力, 较轻的肝脏病变并未影响到血脂的合成功能, 肝组织炎症程度为中、重度的肝脏病变时才导致血脂合成所需的酶和转运血脂的载脂蛋白合成减少.

我们的结果还显示, 130例慢性乙型肝炎肝组织纤维化分期的S0、S1、S2、S3、S4期的慢性肝炎患者中, 血清脂质水平随分期水平的升高而逐渐降低, 每一项观察指标, 在各组间比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $0.01$ ). 处于肝纤维化分期的S0、S1、S2、S3期的慢性肝炎患者中, 其血清脂质水平异常并不明显, 与正常组比较无统计学意义( $P>0.05$ ), 而肝纤维化处于S4期的患者血清脂质水平明显降低, 与正常组比较, 差异有统计学意义( $P<0.05$ 或 $<0.01$ ), 一方面, 说明血清脂质水平对反映肝纤维化的程度并不十分敏感; 另一方面, 说明大多慢性乙型肝炎患者的

肝组织炎症活动程度与肝纤维化分期是相适应的, 但又不完全一致<sup>[10]</sup>. 因为炎症活动明显的患者经治疗后炎症容易吸收, 而纤维化却吸收缓慢, 或先有明显的炎症, 经病情反复后逐渐形成纤维化.

最近报道, 影响病毒性肝炎患者血脂水平的因素除了肝脏的功能状态外, 还与感染的病毒类型、病毒基因型以及抗病毒药物治疗有关<sup>[11-15]</sup>. 我们观察的对象均为慢性乙型肝炎患者, 未考虑到病原类型及抗病毒治疗等因素的影响, 其他类型的肝炎病毒感染及抗病毒治疗的肝组织病变程度与血清脂质水平的关系如何仍有待进一步研究.

本研究结果表明, 慢性乙型肝炎患者血清的脂质水平与较重的肝组织炎症活动程度(G3、G4)、较重的肝组织纤维分期(S4)显著相关, 与较轻的肝组织炎症活动程度(G1、G2)、较轻的肝组织纤维分期(S0、S1、S2、S3)却不显著相关. 说明测定血清脂质水平对判断较重的慢性肝炎肝组织实质细胞的损害和预后估计有一定的价值.

#### 4 参考文献

- 1 李玉中, 胡宏, 陈艳君, 许方, 李振国, 刘越坚. 肝病患者血脂变化的临床价值. 大连医科大学学报 2002; 24: 285-287
- 2 孙斌. 肝炎后肝硬化血清脂蛋白测定的临床意义. 海南医学 2003; 14: 9-10
- 3 卢水英. 重型肝炎病人血清载脂蛋白测定及其临床意义. 中国医师杂志 2002; 4: 317-318
- 4 卢艳萍, 卢杰平, 刘长丽. 肝病患者血清载脂蛋白A1和B的变化与临床意义的探讨. 中国实用内科杂志 2000; 20: 362-363
- 5 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 6 穆标. 肝炎后肝硬化血脂变化与Child分级关系的研究. 临床荟萃 2000; 15: 585-586
- 7 高鼎良. 肝硬化患者血清载脂蛋白APO-A-I及APOB与Child分级关系的研究. 中华消化杂志 1999;

#### ■应用要点

对无条件做肝活检或不适宜行肝活检的情况下, 通过血清脂质的检测, 对判断慢性乙型肝炎患者的肝组织实质细胞的损害及预后有一定的参考价值.



- 19: 212-213
- 8 陈国强, 刘建栋, 周永列, 金卫东, 陈永健. 血清脂类测定对各类肝病的诊断价值. 临床检验杂志 1995; 13: 64-65
- 9 骆抗先, 朱幼芙, 张鸿飞, 任星峰, 章廉, 张光曙, 张泰和. 乙型肝炎临床与活体组织病理. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001: 86
- 10 郑春梅, 龙尧, 邓巧娟. 乙型肝炎患者血脂水平与病情和预后关系的探讨. 广东医学院学报 2004; 22: 120-123
- 11 Serfaty L, Andreani T, Giral P, Carbonell N, Chazouilleres O, Poupon R. Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001; 34: 428-434
- 12 Petit JM, Benichou M, Duvallard L, Jooste V, Bour JB, Minello A, Verges B, Brun JM, Gamber P, Hillon P. Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1150-1154
- 13 Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Iino S, Kimura S, Koike K. Serum lipid profile of patients with genotype 1b hepatitis C viral infection in Japan. *Hepatol Res* 2003; 25: 371-376
- 14 Andrade RJ, Garcia-Escano MD, Valdivielso P, Alcantara R, Sanchez-Chaparro MA, Gonzalez-Santos P. Effects of interferon-beta on plasma lipid and lipoprotein composition and post-heparin lipase activities in patients with chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 929-935
- 15 王国宝, 林国英, 胡兵. 慢性肝炎病人血脂变化与病毒病原的关系. 临床军医杂志 2003; 31: 41-42

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

## • 消息 •

### 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知

本刊讯 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议定于2006-03在广东省深圳市召开, 本次会议由中国中西医结合学会主办, 现将有关征文事项通知如下。

#### 1 征文内容

本次会议的征文内容包括: (1)介绍结直肠肛门基础研究的新动态、新进展、新成果; (2)结直肠肛门肿瘤疾病的诊断及治疗的新技术、新成果, 直肠癌扩大根治术式和疗效, 中低位直肠癌保肛手术方法、适应证和效果, 肛管直肠癌会阴肛门重建术的术式、方法、效果; (3)中西医结合治疗结肠慢传输型、出口梗阻型及结肠、直肠、盆腔、盆底解剖生理功能异常等便秘疾病的诊断治疗方法、适应证、临床疗效和经验教训; (4)中西医结合治疗炎症性肠病的经验及手术方式选择; (5)中西医结合预防、治疗肛肠常见疾病的新方法、新经验; (6)采用中西医结合治疗结直肠肛门疾病的临床护理及造口护理的新方法、新经验; (7)肛门、结直肠损伤及异物处理的经验; (8)介绍国内外肛肠疾病检查、治疗的新器械、新设备、新药物。

#### 2 征文要求

文章应有临床实用性, 基础研究应具有科学性和先进性; 全文4 000字以内, 要求寄打印稿(欢迎用软盘或电子信箱投稿), 并附500字以内的摘要一份, 关键词3-5个; 征文稿件请寄: (1)广东省公安边防总队医院(深圳武警医院)肛肠外科柯玮收, 邮编: 518029, 电话: 0755-82699768, 手机: 13714327555, E-mail: kewe1968@126.com; (2)深圳市第二人民医院肛肠科舒洪权收, 邮编: 518039, 电话: 0755-26250353, 手机: 13923803457, E-mail: sssh-hqq66@163.com。

#### 3 其他

本次会议可授予国家级继续教育 I 类学分6分, 会议具体日期及详细地址另行通知。欢迎广大相关领域工作及研究人员参加。

## 进食花椒致严重过敏反应2例

田蕾, 尹悦玲

田蕾, 尹悦玲, 武警总医院过敏门诊 北京市 100039  
通讯作者: 田蕾, 100039, 北京市海淀区永定路69号, 武警总医院过敏门诊. tianleipf@sina.com  
电话: 010-88276715  
收稿日期: 2005-12-08 接受日期: 2005-12-31

### 摘要

本文报道罕见花椒严重过敏病例, 参考患者临床表现, 采用Pharmacia CAP System荧光酶联免疫法进行特异性IgE检查, 结果花椒特异性IgE为强阳性而确诊, 值得临床医生对该病要引起进一步的重视。

**关键词:** 花椒; 严重过敏反应

田蕾, 尹悦玲. 进食花椒致严重过敏反应2例. 世界华人消化杂志 2006;14(4):457-458  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/457.asp>

### 0 引言

进食花椒后引起严重过敏病例在临床罕见, 采用Pharmacia CAP System荧光酶联免疫法进行花椒血清特异性IgE检测确诊未见报道, 现将我们所见进食花椒致严重过敏反应二例报道如下。

### 1 病例报告

例1, 男性, 16岁. 2005-05-03与友人共进晚餐时误食花椒一粒后, 立即发生口唇发麻, 数分钟后出现大小不等的风团, 渐融合成片, 瘙痒难忍, 很快感到恶心、胸闷、心慌、呼吸困难、出冷汗急诊到我院求治. 既往有多次急性荨麻疹病史. 查体: 患者神志不清, 表情淡漠, 体温36.0℃, 脉搏112次/min, 律齐, 脉弱, 呼吸28次/min, 血压8/6 kPa, 全身皮肤可见大小不等融合成片的风团, 口唇肿胀. 诊断: 急性荨麻疹伴过敏性休克. 治疗: 立即皮下注射1 g/L肾上腺素1 mg, 吸氧, 静滴琥珀酸氢化可的松200 mg, 外用炉甘石洗剂等药, 症状逐渐缓解, 生命体征恢复正常. 特异性诊断试验: 根据患者病史选择花椒血清特异性IgE(sIgE)检测, 采用Pharmacia CAP System荧光酶联免疫法, 具体方法及结果分级标准参

见文献[1]. 结果花椒sIgE为IV级.

例2, 女性, 8岁. 2005-08-12晚和家人在餐馆进餐时误食花椒后不久在四肢出现大小不等的风团, 很快波及躯干, 瘙痒明显, 伴有恶心、上腹部不适, 心慌、气短急诊到我院求治. 查体: 患者神志清楚, 表情痛苦, 体温36.2℃, 脉搏102次/min, 律齐, 呼吸26次/min, 血压正常, 全身皮肤可见大小不等的风团, 鲜红色. 诊断: 急性荨麻疹(严重型). 治疗: 立即皮下注射1 g/L肾上腺素0.3 mg, 静滴氢化可的松150 mg, 肌注非那根25 mg等药后症状逐渐缓解. 特异性诊断试验: 方法同上, 结果花椒sIgE为III级.

以上两例检查结果表明花椒是引起该患者临床表现的过敏原, 最后确诊为花椒致严重过敏反应. 嘱今后严格避免再进食花椒.

### 2 讨论

花椒属一种温热类中草药, 辛, 热, 有小毒, 归脾、肾两经. 具有温中止痛、解毒杀虫的功效, 中医常用于治疗脾肾虚汗症. 同时花椒也是一种上等的生活调料品, 无论在大多数华人的日常饮食和餐馆中都极常用, 复习文献绝大多数过敏的食物由牛奶、鸡蛋、鱼、甲壳类、豆类、坚果类及小麦引起, 已报道的花椒过敏较少<sup>[2,3]</sup>, 而采用Pharmacia CAP System荧光酶联免疫法进行血清sIgE检测证实患者的临床表现是由花椒引起, 至今未见报道. 目前, 食物过敏的诊断主要依靠病史、皮肤试验、食物sIgE检测和食物激发试验来作出. 病史可提供必要的信息, 皮肤试验是初步筛选过敏食物的方法, 但有一定危险性, 实验研究证实采用Pharmacia CAP System荧光酶联免疫法对于严重病例的灵敏度及特异度较好, 特别适用于严重过敏者<sup>[1]</sup>. 双盲对照食物激发试验虽然是诊断食物过敏的金标准, 但无法用于严重过敏者. 我们所报道二例患者自述进食花椒后出现了不适, 临床症状发生很快, 我们考虑食物(花椒)所致可能性极大, 选择了花椒血清sIgE检测, 结果证实了花椒是引起患者临床表现的过敏原, 提示临床医生对此要提高警惕.

### 3 参考文献

- 1 张宏誉, 王良录, 荣光生. 应用CAP System检测sIgE的评价. 中华微生物学和免疫学杂志 1996; 16: 6-12
- 2 Metcalfe DD, Astwood JD, Townsend R, Sampson

HA, Taylor SL, Fuchs RL. Assessment of the allergic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1996; 36 Suppl: S165-S186

- 3 赵晓玲, 霍乃会, 顾桂梅. 花椒引起急性荨麻疹伴休克一例. 陕西中医 1997; 18: 521

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

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

## • 消息 •

### 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知

**本刊讯** 为了加快国内肝病学术交流、促进我国肝病学科的发展, 由中华医学会肝病学会、中华肝脏病杂志编辑委员会主办的“第5届全国肝脏疾病学术研讨会议”定于2006-05在辽宁省大连市召开. 届时国内知名肝病专家将就国内外肝病研究的进展及热点问题进行继续教育讲座, 并授予参会代表国家级继续教育 I 类学分. 现将征文通知公布如下:

#### 1 征文内容

(1)病毒性肝炎发病机制的研究进展; (2)病毒性肝炎的治疗策略; (3)乙型病毒性肝炎的长期治疗; (4)丙型肝炎的抗病毒治疗; (5)肝纤维化发病机制研究进展; (6)肝纤维化的防治; (7)肝硬化的规范化治疗; (8)肝细胞癌的病因学研究进展; (9)肝癌的发病机制研究进展; (10)肝癌的早期诊断; (11)肝癌的手术治疗及方案选择; (12)肝癌的非手术治疗; (13)肝癌的生物治疗; (14)自身免疫性肝病的发病机制; (15)自身免疫性肝病的诊断和治疗; (16)肝移植后肝炎复发的诊断预防和治疗; (17)生物人工肝的应用及进展; (18)小儿自身免疫性肝病; (19)肝肾综合征; (20)肝功能衰竭; (21)肝干细胞的研究进展及临床应用; (22)脂肪肝及酒精性肝病; (23)非酒精性脂肪性肝病.

#### 2 征稿要求

参加会议论文要求全文(中文)及500字(词)左右中文摘要各一份, 应包括目的、材料与方法、结果、讨论, 并写清单位、作者姓名及邮编(请自留底稿, 恕不退稿). 凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文, 不再受理.

#### 3 论文寄至地址

400010, 重庆市渝中区临江路74号, 中华肝脏病杂志编辑部收. 请在信封左下角注明“会议征文”. 欢迎用软盘和电子邮件方式投稿. 电子邮件地址: zhgz@vip.163.com. 征文截稿日期: 2006-02-28(以邮戳为准).

欢迎从事肝病临床和基础研究工作的医务人员及科研工作者踊跃投稿, 参加会议.



# 世界华人消化杂志投稿须知

## 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字以内, 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<sub>50</sub>, 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

《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。

《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.

标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP,  $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, Vmax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*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*<sub>max</sub>, *C*<sub>max</sub>, *Vd*, *T*<sub>1/2</sub>, *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<sub>r</sub>* 30 000(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用分子质量, 其单位是ku, “原子量”应改为相对原子质量, 即*A<sub>r</sub>*(*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°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml 应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2°C. BP用kPa, RBC数用×10<sup>12</sup>/L, WBC数用×10<sup>9</sup>/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M<sub>r</sub>*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<sub>2</sub>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<sub>1</sub>、维生素B<sub>2</sub>、维生素B<sub>6</sub>、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<sub>12</sub>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<sup>-3</sup> g与5×10<sup>-7</sup> 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值的文句中, 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<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 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<sup>-6</sup>; 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<sup>2</sup>; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*g*; (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<sup>a</sup>*P* <0.05, <sup>b</sup>*P* <0.01(*P* >0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则<sup>c</sup>*P* <0.05, <sup>d</sup>*P* <0.01; 第三套为<sup>e</sup>*P* <0.05, <sup>f</sup>*P* <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,  $3.5 \pm 0.5$  mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密密度,例如6 347意指6 000分之一的精密密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean  $\pm$  SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$  g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成 $3.6 \pm 0.4$  kg,过多的位数并无意义。又如 $8.4 \pm 0.27$  cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12; 1985年4月,写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 $\leq 100$ ,百分数到个位;  $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$ ,百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

**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)。

**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 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(AMRAC格式),书写要求与中文摘要一致。格式如下:

Abstract

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。

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhu-anwan 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: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ .  $P$ 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. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 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 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴.

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角码. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>. 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 gastroenterology. *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](mailto:wcjd@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95)225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

## 致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈海龙 教授  
大连医科大学附属第一医院

马春红 副教授  
山东大学医学院免疫学研究所

崔云甫 教授  
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

潘秀珍 教授  
福建省立医院消化内科

房殿春 主任医师  
第三军医大学西南医院消化内科

钱会南 副教授  
北京中医药大学

谷俊朝 主任医师  
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

石雪迎 讲师  
北京大学医学部病理学系

纪小龙 教授  
武警总医院病理科

王庆国 教授  
北京中医药大学

江学良 副主任医师  
长海医院研究生公寓201房间

王小众 教授  
福建医科大学附属协和医院消化内科

来茂德 教授  
浙江大学医学院病理学教研室

王兴鹏 教授  
复旦大学第一临床医学院

李岩 教授  
沈阳中国医科大学第二临床学院消化内科

吴梧桐 教授  
中国药科大学生物制药学院

李增山 副教授  
西安第四军医大学病理教研室

于皆平 教授  
湖北医科大学附属第一医院消化内科

李宗芳 教授  
西安交通大学第二医院普通外科

喻荣彬 副教授  
南京医科大学流行病与卫生统计学系

卢绮萍 主任医师  
广州军区武汉总医院普通外科

岳茂兴 教授  
北京解放军第306医院普通外科

吕宾 教授  
浙江中医院附属医院

周士胜 教授  
大连大学医学院医学研究中心