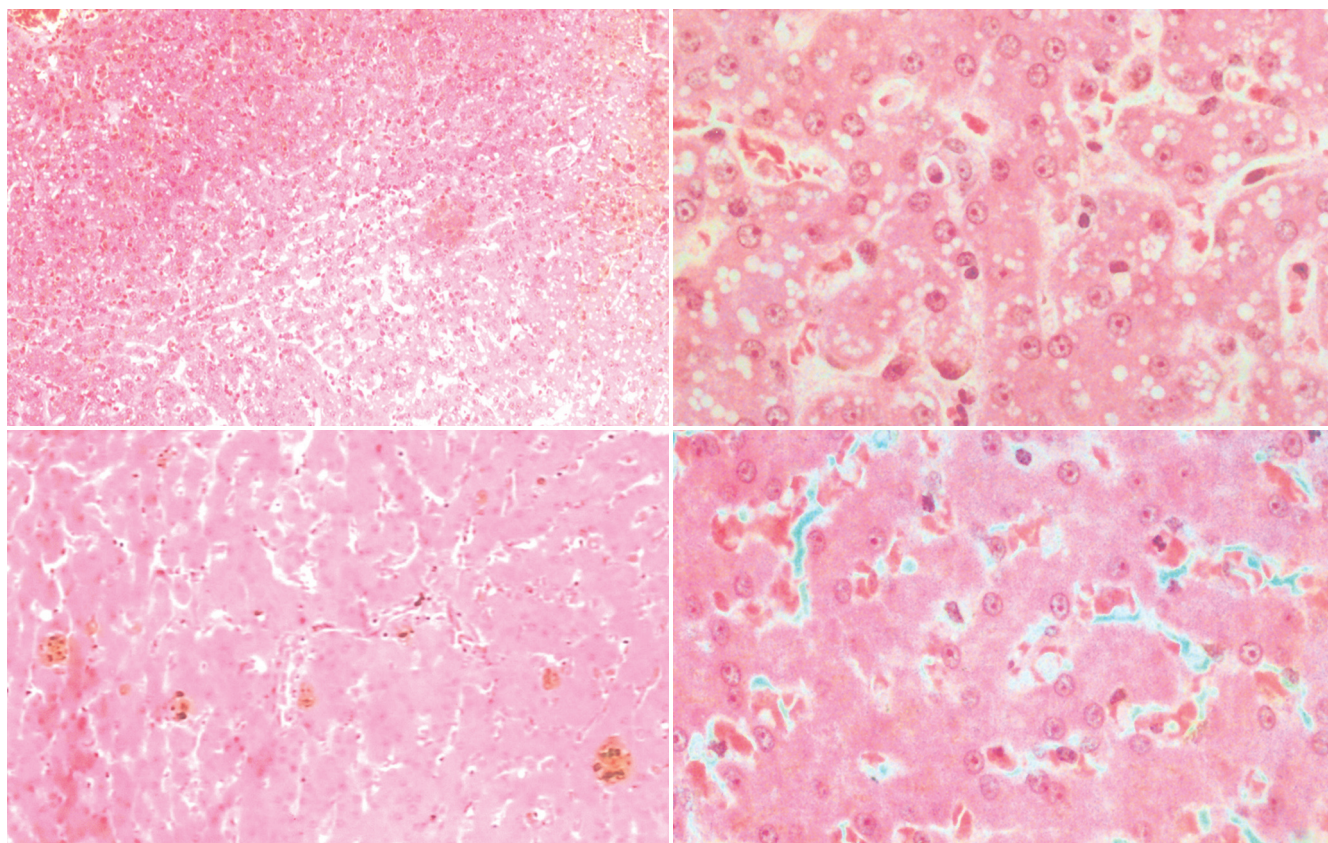


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2007 年 1 月 8 日 第 15 卷 第 1 期 (Volume 15 Number 1)



1 / 2007

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
江学良主任医师	上海
李岩教授	沈阳
刘连新教授	哈尔滨
吕宾教授	杭州
罗和生教授	武汉
聂青和副教授	西安
王小众教授	福州

编委

白爱平主治医师	广州
别平教授	重庆
白文元教授	石家庄
白玉贤教授	哈尔滨
蔡淦教授	上海
蔡开琳副教授	武汉
曹浩副教授	上海
曹志成院士	香港
陈光教授	长春
陈海龙教授	大连
陈红松副教授	北京
陈积圣教授	广州
陈克能主任医师	北京

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
陈亚军教授	北京
陈耀凯副教授	重庆
陈贻胜教授	福州
陈知水教授	武汉
陈治水主任医师	哈尔滨
陈祖林副教授	重庆
程爱国教授	唐山
程红岩教授	上海
程树群副教授	上海
迟宝荣教授	长春
崔云甫教授	哈尔滨
代文杰教授	哈尔滨
戴冬秋教授	沈阳
党双锁副教授	西安
邓长生教授	武汉
董蕾教授	西安
杜群副研究员	广州
杜雅菊主任医师	哈尔滨
樊红副教授	南京
范建高教授	上海
樊晓明主任医师	上海
范志宁主任医师	南京
房静远教授	上海
房林副教授	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
高泽立副教授	上海
葛海燕教授	上海
戈之铮教授	上海
龚国忠教授	长沙
龚建平教授	重庆
巩鹏副教授	大连
谷俊朝主任医师	北京
关玉盘教授	北京
管冬元副教授	上海
郭克建教授	沈阳
郭晓钟教授	沈阳
郭新宁教授	银川
韩天权教授	上海
郝春秋副教授	西安
郝纯毅教授	北京
郝俊鸣副主任医师	北京
何超教授	杭州
何裕隆教授	广州
何振平教授	重庆

洪天配教授	北京
侯晓华教授	武汉
黄恒青主任医师	福州
黄金华副教授	广州
黄晓东副主任医师	武汉
黄颖秋教授	本溪
黄裕新教授	西安
黄志勇副教授	武汉
季国忠副教授	南京
季加孚教授	北京
姜慧卿教授	石家庄
蒋龙元副教授	广州
金瑞教授	北京
匡安仁教授	成都
兰平教授	广州
蓝宇教授	北京
劳绍贤教授	广州
李定国教授	上海
李东辉教授	厦门
李方儒教授	天津
李国威教授	西安
李继强教授	上海
李靖副教授	重庆
李军祥教授	北京
李奇林教授	广州
李胜研究员	济南
李涛主治医师	北京
李晓宇主任医师	北京
李旭副教授	广州
李延青教授	济南
李永哲副研究员	北京
李瑗教授	南宁
李玉民教授	兰州
李增山副教授	西安
李兆申教授	上海
李志霞教授	北京
李宗芳教授	西安
梁力建教授	广州
林胜璋副教授	温州
林勇讲师	上海
刘宝瑞教授	南京
刘彬彬副研究员	上海
刘冰熔教授	哈尔滨
刘成海研究员	上海
刘改芳主任医师	石家庄
刘海林主任医师	上海
刘平教授	上海
刘杞教授	重庆
刘绍能主任医师	北京
刘铁夫教授	哈尔滨
刘颖斌副教授	杭州
刘占举教授	郑州
刘正稳教授	西安
刘作金副教授	重庆
龙致贤教授	北京

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2007 年 1 月 8 日 第 15 卷 第 1 期 (总第189期)

述 评

1 慢乙肝母婴传播阻断和治疗策略的建议 郑鹏远, 唐芙爱, 卢高峰, 白经修

基 础 研 究

- 7 蒙古沙鼠幽门螺杆菌相关性胃炎Sonic hedgehog基因、IL-1 β 及TNF- α 的表达
李忠武, 刘鲁英, 田萌萌, 游伟程, 李吉友
- 14 血红素氧合酶的干预对糖尿病大鼠结肠动力障碍的影响
吴高珏, 林琳, 张红杰, 李学良, 罗云, 王美峰
- 22 缬草波春诱导MKN-45胃癌细胞凋亡
叶建明, 胡品津, 易粹琼, 薛存宽, 呼闯营, 陈凤鸣, 钱伟
- 29 食用白酒灌胃后大鼠胃黏膜的抗损伤作用
秦咏梅, 周力, 孙屹峰, 张永宏, 侯玉龙, 张国林
- 34 bFGF促进人大肠癌LoVo细胞增殖的信号转导机制
周颖, 王桂玲

临 床 研 究

- 39 肝癌组织巨噬细胞移动抑制因子的表达及对肿瘤细胞增殖和血管形成的影响
关泉林, 于晓辉, 霍永忠, 李波
- 46 肠易激综合征精神心理因素、肠黏膜肥大细胞及5-羟色胺的变化
陈文科, 邹益友, 李富军, 罗丹

文 献 综 述

- 51 幽门螺杆菌与DNA错配修复系统 吴莹, 姜政
- 56 钙离子信号调节亲环素配体研究进展 程勇前, 成军

研 究 快 报

- 61 小鼠对乙型肝炎病毒小基因嵌合DNA疫苗免疫应答
张建军, 杨向东, 史小玲, 袁志平, 王超
- 64 结肠途径治疗对高温中暑狗肝脏的保护作用
姚欣, 冯子坛, 白启轩, 吉丽, 贾昭, 吴颖, 刘文格, 孙蓉
- 69 番石榴叶提取物对三硝基苯磺酸诱导大鼠结肠炎结肠组织的保护作用
廖泽云, 李玉山, 姜锦林

临 床 经 验

- 72 丹参对急性胰腺炎患者血浆内皮素和P-选择素变化的影响
周晓娜, 胡静
- 75 血小板计数对细菌性肝脓肿患者预后判定的临床价值
张彩凤, 韩宇, 刘竹娥, 夏永华
- 78 肝后腔静脉成形术行原位肝移植103例
王轩, 陆雷, 张斌, 李增才, 郑以山, 许正昌
- 82 进展期大肠癌患者术中应用化疗药物外周血CEA、CA19-9的检测及临床意义
杨茂鹏, 于洪亮, 王夫景, 黄跃南, 杨维良
- 86 洛铂、氟尿嘧啶与亚叶酸钙联合化疗的临床毒副作用
周宏锋, 张玉新, 程黎阳, 丁洪亮
- 88 糖尿病与结直肠癌患病危险关系的调查分析
胡水清, 汤哲, 张玫
- 92 大肠癌组织中端粒酶催化亚单位的表达及临床意义
王飞海, 张银龙, 郑瑾滢, 张伟, 郑志强
- 95 希罗达术前化疗对结直肠癌组织TP/PD-ECGF表达和血管生成的影响
余细球

病例报告	99 猝死型胰腺炎误诊分析3例 张碎虎, 谷未强, 李亚娟
会议纪要	6 第二届国家级慢性乙型肝炎生物免疫治疗及病毒性肝炎新进展研讨会会议纪要
附录	101 世界华人消化杂志投稿须知
致谢	106 致谢世界华人消化杂志编委
消息	13 2005年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表 21 中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于2005年世界华人消化杂志指标检索报告 28 2007中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知 45 中华医学会第七次全国消化系统疾病学术会议征文通知 50 中国学术期刊综合引证报告(2006) 68 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 77 世界华人消化杂志在线办公系统 81 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知 98 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》 100 世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版
封面故事	姚欣, 冯子坛, 白启轩, 吉丽, 贾昭, 吴颖, 刘文格, 孙蓉. 结肠途径治疗对高温中暑狗肝脏的保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(1):64-68 http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/64.asp
国际会议	9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com

 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 2007-01-08 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 中文编辑 潘伯荣 张焕兰 王晓瑜 电子编辑 张敏 李琪 本期责任编辑 张海宁	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: wjgd@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。 2007年版权归世界胃肠病学杂志社所有
ISSN 1009-3079 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

World Chinese Journal of Digestology

January 2007 Contents in Brief Volume 15 Number 1

EDITORIAL	1 Prevention of vertical transmission and treatment of chronic hepatitis B <i>Zheng PY, Tang FA, Lu GF, Bai JX</i>
BASIC RESEARCH	7 Expression of Sonic hedgehog gene, interleukin-1β, tumor necrosis factor-α in gastric epithelium of mongolian gerbils after <i>H pylori</i> inoculation <i>Li ZW, Liu LY, Tian MM, You WC, Li JY</i> 14 Effect of interference in heme oxygenase on colonic dysfunction of diabetic rats <i>Wu GJ, Lin L, Zhang HJ, Li XL, Luo Y, Wang MF</i> 22 Valepotriate-induced apoptosis of gastric cancer cell line MKN-45 <i>Ye JM, Hu PJ, Yi CQ, Xue CK, Hu CY, Chen FM, Qian W</i> 29 Adaptive cytoprotection of gastric mucosa in rats after intragastric administration of edible alcohol <i>Qin YM, Zhou L, Sun YF, Zhang YH, Hou YL, Zhang GL</i> 34 Signal transduction mechanism of basic fibroblast growth factor in promoting the growth of colorectal cancer LoVo cell line <i>Zhou Y, Wang GL</i>
CLINICAL RESEARCH	39 Expression of macrophage migration inhibitory factor and its effect on cell proliferation and angiogenesis in human liver cancer <i>Guan QL, Yu XH, Huo YZ, Li B</i> 46 Changes of psychosocial factors, enteric mucosal mast cells and 5-hydroxytryptamine in irritable bowel syndrome <i>Chen WK, Zou YY, Li FJ, Luo D</i>
REVIEW	51 Relationship between <i>Helicobacter pylori</i> and DNA mismatch repair system <i>Wu Y, Jiang Z</i> 56 Research progress in calcium-modulating cyclophilin ligand <i>Cheng YQ, Cheng J</i>
RAPID COMMUNICATION	61 Immunologic response to a hepatitis B virus small gene chimeric DNA vaccine in mice <i>Zhang JJ, Yang XD, Shi XL, Yuan ZP, Wang C</i> 64 Effects of colon hydrotherapy on liver injury induced by hyperthermia in dogs <i>Yao X, Feng ZT, Bai QX, Ji L, Jia Z, Wu Y, Liu WG, Sun R</i> 69 Protective effect of guava leaf extract on colonic tissues with ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats <i>Liao ZY, Li YS, Jiang JL</i>
CLINICAL PRACTICE	72 Influence of <i>Salvia miltiorrhiza</i> on the changes of plasma endothelin and P-selectin in patients with acute pancreatitis <i>Zhou XN, Hu J</i> 75 Value of platelet count in the prognosis of patients with pyogenic liver abscess <i>Zhang CF, Han Y, Liu ZE, Xia YH</i>

	78 Suprahepatic venacavaplasty in liver transplantation: an analysis of 103 cases <i>Wang X, Lu L, Zhang B, Li ZC, Zhen YS, Xu ZC</i> 82 Detection of serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in patients with progressive colon cancer and its clinical significance <i>Yang MP, Yu HL, Wang FJ, Huang YN, Yang WL</i> 86 Clinical observation on adverse reaction of combination chemotherapy of lobaplatin, fluorouracil and calcium leucovorin <i>Zhou HF, Zhang YX, Cheng LY, Ding HL</i> 88 Investigation on the risks of colorectal cancer in patients with diabetes mellitus <i>Hu SQ, Tang Z, Zhang M</i> 92 Detection of human telomerase reverse transcriptase in colorectal cancer and its clinical significance <i>Wang FH, Zhang YL, Zheng JY, Zhang W, Zheng ZQ</i> 95 Preoperative administration of xeloda on the angiogenesis and expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in colorectal cancer <i>Yu XQ</i>
CASE REPORT	99 Missed diagnosis of pancreatitis resulting in sudden death: an analysis of 3 cases <i>Zhang SH, Gu WQ, Li YJ</i>
MEETING MINUTES	6 Meeting minutes for the 2nd national conference of chronic hepatitis B immunobiological therapy and new progress in viral hepatitis
APPENDIX	101 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
ACKNOWLEDGMENT	106 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Yao X, Feng ZT, Bai QX, Ji L, Jia Z, Wu Y, Liu WG, Sun R.</i> Effects of colon hydrotherapy on liver injury induced by hyperthermia in dogs Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(1):64-68 http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/64.asp
INTERNATIONAL MEETINGS	9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com

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 January 8, 2007

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: wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2007 by The WJG Press

慢乙肝母婴传播阻断和治疗策略的建议

郑鹏远, 唐芙爱, 卢高峰, 白经修

郑鹏远, 唐芙爱, 卢高峰, 白经修, 郑州大学第二附属医院消化科 河南省郑州市 450014

郑鹏远, 郑州大学第二附属医院消化科教授, 博士生导师, 主要从事幽门螺杆菌及慢乙肝研究。

河南省卫生厅医学创新人才工程项目, No. 2004-45

河南省科技厅科技攻关项目, No. 0324410006

通讯作者: 郑鹏远, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化科. medp7123@yahoo.com

电话: 0371-65261035

收稿日期: 2006-10-18 接受日期: 2006-11-16

Prevention of vertical transmission and treatment of chronic hepatitis B

Peng-Yuan Zheng, Fu-Ai Tang, Gao-Feng Lu, Jing-Xiu Bai

Peng-Yuan Zheng, Fu-Ai Tang, Gao-Feng Lu, Jing-Xiu Bai, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, He'nan Province, China

Supported by the Innovation Talent Project from Health Department of He'nan Province, No. 2004-45, and the Key Item from Science and Technology Department of He'nan Province, No. 0324410006

Correspondence to: Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, He'nan Province, China. medp7123@yahoo.com

Received: 2006-10-18 Accepted: 2006-11-16

Abstract

Vertical transmission is the main path of hepatitis B virus (HBV) infection in patients with chronic hepatitis B (CHB). According to the development history of embryo and the possible mechanism of vertical transmission, it's supposed that the effective method to prevent vertical transmission should be immunoprophylaxis in both mother and baby. Pregnant woman with positive HBsAg should receive monthly injection of 200 IU hepatitis B immunoglobulin (HBIG, or 400 IU once if HBV DNA is positive) from the 16th week after pregnancy (at from the 20th week). The newborn child should receive combined immunization (active/passive), namely injection of 200 IU HBIG within 24 hours (better within 6 hours) after birth, and one more repeat after 2 weeks. HBV vaccination should be carried out at the same time in order to acquire

the best protection result. The treatment of CHB mainly depends on antiviral therapy, and systemic immunization may also contribute to the efficacy of antiviral drugs. A simple classification method of CHB was suggested according to serum HBV DNA level in this article, which could be easily used in clinical practice.

Key Words: Chronic hepatitis B; Vertical transmission; Immunotherapy

Zheng PY, Tang FA, Lu GF, Bai JX. Prevention of vertical transmission and treatment of chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):1-6

摘要

慢性乙型肝炎患者感染HBV的主要途径为母婴传播, 根据胎儿发育史, 从分析母婴传播的可能机制入手, 提出阻断母婴传播的措施应当是母婴共同进行免疫预防, 即HBsAg(+)孕妇应从妊娠第16周开始, 最迟不应晚于20 wk, 应进行每月1次的乙肝免疫球蛋白200 IU肌注(若HBV DNA阳性也可以用400 IU/次), 直至分娩; 娩出的新生儿应进行主动-被动联合免疫, 即娩出24 h(最好6 h)内注射乙肝免疫球蛋白200 IU, 2 wk后再重复一次, 并同时接种疫苗, 以期得到最佳保护效果。慢性乙型肝炎治疗以抗病毒为主, 同时兼顾提高机体免疫的疗法, 并提出以HBV DNA定量为基础的慢乙肝简单分类方法, 便于推广应用。

关键词: 慢性乙型肝炎; 母婴传播; 免疫治疗

郑鹏远, 唐芙爱, 卢高峰, 白经修. 慢乙肝母婴传播阻断和治疗策略的建议. *世界华人消化杂志* 2007;15(1):1-6

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎病毒感染的自然病程漫长, 可持续30-50 a, 并多在青壮年时期发病, 是我国常见慢性传染病之一。人感染乙型肝炎病毒后, 病毒持续6 mo仍未被清除称为慢性HBV感染。慢性HBV感染者约有30%-50%是通过母婴传播形成

■背景资料

慢性乙型肝炎(CHB)患者感染HBV的主要途径是母婴传播, 故阻断母婴传播是预防CHB的重要环节。对CHB治疗目前多以抗病毒药物为主, 由于这类药物需长期应用, 给患者造成较大经济负担, 且病毒耐药株的出现又使患者不愿意使用, 故提高阻断母婴传播效率预防CHB较为理想。

■应用要点

本文从胎儿发育及宫内感染不同时期相结合分析HBV长期携带者的不同情况,依其产生机制,提出可行的阻断方案,并提出在CHB治疗中要兼顾到免疫治疗的作用,更深入细致地研究、完善免疫治疗方案,以指导临床采用更加合理的措施防治CHB。

的,感染时年龄越小,成为慢性携带者的机率越高^[1],因此采取阻断母婴传播的有效措施对慢性乙型肝炎的控制有重要意义。

1 HBV母婴传播阻断的策略分析

HBV感染的自然史一般可分为3个时期,即免疫耐受期、免疫清除期和非活动或低复制期^[2-3]。母婴传播是慢性乙肝病毒感染的主要途径,我国的HBV携带者30%-50%是母婴传播形成的^[4],这包括种系传播和宫内传播^[5]。种系传播为带有HBV DNA的生殖细胞(HBV DNA可穿过透明带和卵膜,进入卵母细胞并整合到染色体上^[6]。正常人的活精子捕获的外源性HBV DNA,主要存在于精子头的膜部和核心部中,与乙肝患者精子内HBV DNA分布位置一致,感染HBV DNA的精子仍可穿过透明带,顺利完成受精过程)。随受精卵的分裂而不断分裂增殖,将HBV直接传给胎儿^[7-11]。胚胎学研究认为妊娠第7周造血干细胞自卵黄囊迁移至肝脏,开始B细胞发育,后又迁移至骨髓,至18 wk后B细胞就由骨髓产生,直至终生。胚胎8-9 wk就有B细胞离开骨髓进入发育中的淋巴结。而T细胞的干细胞自妊娠8 wk从肝、脾、骨髓随血流进入胸腺,至11-12 wk胸腺小叶结构及皮、髓质分界开始明显,胸腺内有大量干细胞,其迅速分裂增殖逐渐发育成熟,成为有功能的T细胞。胸腺内95%以上T细胞由于对自身抗原的免疫性克隆清除作用而死亡,仅少量成熟T细胞向胸腺髓质移动而后离开胸腺进入次级淋巴管,20 wk胸腺发育成熟。免疫耐受性诱导从第10周T细胞发育开始,16-18 wk完成^[12-13]。此时免疫细胞唯一可接触到的抗原为自身抗原,也包括了随生殖细胞而带来的HBV DNA的表达产物(若HBV DNA不表达则可能随着细胞分裂逐渐被清除)。据此可以推断,种系传播而感染HBV的新生儿免疫细胞由于经过与自身抗原结合、激活而发生凋亡过程,对HBV DNA的表达产物也不能识别而获得耐受性,其出生时血清学检查应为HBV DNA阳性、HBsAg阳性、HBeAg阳性(或阴性),抗HBe和抗HBc则由于免疫细胞无法识别产生免疫应答而呈阴性。故也就不会引起肝细胞损害,肝功能检测正常,肝组织学检查正常,成为慢性HBV携带者^[2]。这类患者不需治疗,但若HBV DNA过度增殖,可给与核苷类似物治疗,抑制其HBV DNA合成,减少体内HBV数量。

宫内传播包括血源性和细胞源性传播,其

机制为:(1)先兆早产引起胎盘微血管破裂,致含HBV的母血进入胎儿血循环^[14];(2)HBV经胎盘细胞表面的CD16介导进入胎盘细胞,感染了胎盘组织的HBV,随妊娠时间延长,HBV逐层“细胞转移”,渐接近胎儿,孕中晚期滋养层变薄,绒毛-血管膜通透性升高,HBV更易突破胎盘屏障,感染胎儿,故越接近分娩、母婴传播率越高^[15-18];(3)母血中感染HBV的PBMIC也可穿透胎盘屏障感染胎儿^[19-22],这可以解释母亲血清HBV DNA阴性的新生儿却能发生宫内感染,甚至仅表现为PBMIC中HBV DNA(+)的现象;(4)分娩时由外伤或HBV感染的产道分泌物、羊水等感染胎儿^[23-25]。产程中感染的胎儿,出生时血清学HBV检测可以为阴性,但2-4 mo后可发展为HBsAg(+);从孕早期至足月分娩,胎盘感染胎儿有逐渐增加趋势,HBV经胎盘感染胎儿的时间示胎肝组织中HBV DNA存在,大约在孕28 wk以后,但也有少数在孕早期HBV已感染蜕膜细胞(24例HBsAg阳性,孕40-90 d的孕妇中有1例孕50 d蜕膜细胞受感染)。6例孕中期引产的胎盘中有1例胎盘(孕19 wk)蜕膜细胞、绒毛滋养层、绒毛间质细胞受感染,并且突破胎盘屏障的最后一道防线,即绒毛毛细血管内皮细胞,导致胎儿发生宫内感染,从而证实HBV经胎盘感染胎儿的时间可能发生在孕中期;而随着妊娠发展至孕晚期,由于滋养层逐渐变得很薄,形成绒毛-血管膜,使HBV更易突破胎盘屏障而感染胎儿,19例(孕38-43 wk)孕妇足月分娩时期胎盘绒毛毛细血管内皮细胞在分娩时已感染HBV,其中6例新生儿发生宫内感染,从而表明HBV经胎盘感染胎儿时间主要在孕晚期^[26]。据胚胎学分析妊娠18 wk后胎儿对病毒性感染才有可能反应,这是因为正常胎儿出生前不具备对付周围抗原的免疫反应,母体IgG自第18周开始通过胎盘,以保证胎儿被动获得抗体IgG,以防御来自妊娠母体的抗原攻击,这种抗体对胎儿接触非来自母体的抗原起不到防御作用。胎儿B细胞只能产生IgM,婴儿出生后3 mo才能合成IgG^[12],故自妊娠18 wk至新生儿出生3 mo内,由于其无法合成IgG,对HBV感染则不发生反应或反应很弱,导致免疫耐受。故经宫内传播而感染HBV的婴儿出生时血清学检查与种系传播而感染HBV的婴儿一样,为慢性HBV携带者。婴儿出生3 mo后,由于自己已有合成IgG能力,4 mo基本上可满足需要,2-3岁即可达成人水平。故对妊娠18 wk以后所感染的HBV(即孕中晚期感染的HBV),胎儿

在母体内不予应答,直至出生3 mo后才可开始产生应答.血清学检查HBV DNA(+)、HBsAg(+)、HBeAg(+)、抗HBe(+或-)、抗HBc(+),有了免疫应答就有了肝损害,依HBV量的多少,免疫应答水平的高低表现为转氨酶升高或正常,肝组织学检查正常或轻度异常,故对HBsAg(+)母亲所产婴儿,应争取在出生后4-6 mo时进行第二次血清学检查.二次检查皆为HBV DNA(+)、HBsAg(+)、HBeAg(+)、抗HBc(-)、抗HBe(-)者,可能是种系传播或孕18 wk前感染的HBV,由于经过自身抗原的阴性克隆清除,对体内存在的HBV无法识别,而形成真正的免疫耐受.这种患者多数体内HBV随细胞多次分裂已逐渐消除,或者存量很少.假如少数患者HBV DNA较高,则只能抗病毒治疗,利用免疫疗法是无效的,其处理同种系传播的患者.第一次血清学检查为HBV DNA(+)、HBsAg(+)、HBeAg(+)、抗HBc(-)、抗HBe(-),第二次检查时抗HBe或/和抗HBc(+)的患者,可见机体对HBV已发生免疫反应,可能是孕18 wk后至出生时感染了HBV即孕中晚期经宫内传播而感染的HBV,以后利用抗病毒治疗或免疫治疗都是有效的.这就为卫生工作者提出了一个建议,对HBsAg(+)母亲的婴儿在刚出生和出生后4-6 mo内进行二次HBV的血清学检查,以便为以后的治疗作准备(因3 mo龄时才具有合成IgG能力,故以推迟1 mo为宜).

1岁以内婴儿HBsAg阳性率为3%-4%,可能大部分为垂直传播.1-4岁幼儿HBsAg检出率为8%-12%,增长的部分来自水平传播.婴幼儿HBV水平传播是垂直传播的2倍,这主要是母子密切接触所致.其表现为出生时HBV DNA(-),4-6月龄检查时则HBV DNA(+),HBsAg(+),抗HBe(+或-),抗HBc(+),其发展情况同孕晚期以后感染HBV的婴儿,对抗病毒及免疫治疗皆有效果.由于HBV经胎盘感染胎儿的时间可能在孕中晚期,而孕早中期感染的HBV常易被清除,极少发生宫内感染^[26-27],尽管极少,但为了提高阻断母婴传播的有效率,免疫阻断选择时间应在16-18 wk,即从妊娠第4个月起,每月注射HBIg 3334-6668 nkat,最迟不能晚于20 wk(特别是有过劳、摔倒等使胎盘震动史者),以达到更高的新生儿保护率,这方面国内已有不少报道.乙肝疫苗接种阻断母婴传播安全有效,但仍有20%-30%的新生儿接种后未产生抗体,其原因可能是宫内感染,HBV变异,小儿免疫功能不健全.其中宫内感染是接种失败的主要原因^[28-29].

利用乙肝疫苗联合乙肝免疫球蛋白进行免疫,母婴传播阻断的失败率也有25%,按每年约26万新生儿经此途径感染HBV计算,这对我国来讲仍是一个很大的数字(6-7万人).故对HBV DNA阳性孕妇在不影响胎儿发育的前提下,尽可能早的(16 wk)应用乙肝免疫球蛋白或/和乙肝疫苗联合免疫,最大限度的降低母血中HBV数量仍不失为一种暂时可行的办法^[30-31].但这方面的工作很少有人涉及,特别是对胎儿发育影响的研究还较少.

由于乙肝免疫球蛋白能迅速提供高浓度HBV抗体以中和病毒,如结合乙肝疫苗的主动免疫可对产程中、后期的HBV传播起到有效阻断作用^[32].因此应用乙肝疫苗及乙肝免疫球蛋白的主动-被动联合免疫是加强对HBV携带者的母亲所生婴儿保护的一项有效措施.美国、加拿大、日本、荷兰、澳洲等国家的一些免疫、卫生机构已推荐联合免疫,甚至作为常规免疫策略用于预防围产期HBV的母婴传播^[33].我国目前推荐的方法是:新生儿出生24 h以内(最好6 h以内)注射乙肝免疫球蛋白1667 nkat或200 nkat,2 wk后再重复一次.并在不同部位注射酵母乙肝疫苗10 μ g (CHO乙肝疫苗为20 μ g)^[34-35].联合免疫主要对HBsAg/HBeAg双阳性母亲的婴儿,而在HBV高流行区,亦有建议对所有HBsAg阳性母亲的婴儿均进行联合免疫.结果显示了较单用乙肝疫苗更好地保护效果,其可有效降低围产期HBV传播造成的慢性携带状态,推迟出生后感染的发生.我国上海、浙江等地已开始实施.主被动联合免疫也可用于阻断HBV父婴间的传播^[36].

尽管乙肝疫苗与乙肝免疫球蛋白联合免疫之应用对阻断母婴传播已获巨大成功,但仍有10%-15%免疫预防失败,因这种免疫仅对产道和产后HBV感染者有效,对宫内感染者无效.故学者们提出对HBsAg阳性孕妇使用乙肝免疫球蛋白,以提高母婴阻断率.其所用方法较多,目前较为流行的是从孕28 wk开始,每4 wk注射乙肝免疫球蛋白一次,每次3334 nkat,共3次^[21].从987例生于HBsAg阳性无症状母亲产前多次肌注乙肝球蛋白的新生儿中,注射组高危新生儿宫内感染率为5.7%,对照组为14.3%,显示出明显差异.经1 a随访32例宫内感染儿HBV标志转阴,可能与主被动联合免疫近期无效而远期转阴率高有关.母亲与新生儿共同联合阻断,使母婴传播阻断率达95%,这是目前最高的免疫保护

■同行评价

本文内容丰富,层次清晰,观点鲜明,贴近临床,对各层面的从事肝病临床和科研工作者都有较大参考意义.

措施^[37]。也有人从孕16, 20 wk开始应用乙肝免疫球蛋白的报道, 剂量为1667-3334-6668 nkat, 每月1次, 于分娩前1 mo每2 wk 1次, 等等。总之方法未统一^[38-42]。有皮疹、关节痛、恶心、中枢神经系统症状等不良反应, 但可用药物控制, 未见严重不良反应及影响胎儿发育的报道。故说明乙肝免疫球蛋白的应用还是安全的, 但仍须更多病例、更深入的研究。据我们分析, 应从16 wk开始应用乙肝免疫球蛋白为宜, 每月1次, 每次3334 nkat, 直至分娩^[43]。这是因为母体IgG从第18周可以通过胎盘, 以保证胎儿获得抗体, 且已有孕19 wk已发生宫内感染的报道, 故在考虑不影响胎儿发育的前提下, 以较早应用为佳。

然而, 有些学者考虑到乙肝免疫球蛋白为异体蛋白, 有抗原性, 可引起过敏反应, 特别是乙肝免疫球蛋白使用会加速HBsAg “a” 表位基因变异的原因(此变异可导致HBV基因型改变, 使目前所用HBsAg检测试剂失效, 影响目前乙肝疫苗预防效果, 导致乙肝大流行)。而不推荐HBV感染的孕妇使用乙肝免疫球蛋白^[44]。从文献报道分析, 这种S基因a抗原决定簇的变异是在长期高水平的免疫压力下, 诱导产生的逃逸突变, 与乙肝免疫球蛋白使用时间、剂量有关。停药后突变株能回复为野生株, 且突变株分泌有感染力病毒颗粒的能力明显低于野生株(仅为20%), 稳定性也下降, 不至于引起突变株流行。且阻断母婴传播所用乙肝免疫球蛋白的剂量远远低于肝移植者(166 700 nkat/次, 所用总剂量在肝移植术后第1, 2年为1 333 600-2 000 400 nkat/年), 故不必担心乙肝免疫球蛋白用于阻断母婴间HBV传播所带来的负面影响^[45]。

2 慢乙肝治疗策略分析

随着小儿的发育, 免疫系统功能日趋完善, 识别HBV能力增强, 出现免疫系统与HBV相互作用, 即进入免疫清除期, 表现为转氨酶升高, 肝脏病理学改变, 此期应以抗病毒治疗为主, 同时也可兼顾扶持机体免疫功能, 处理原则可参考“慢性乙型肝炎防治指南”。但对12岁以下, 特别是6岁以下儿童, 抗病毒治疗药物应用应慎重, 可试用拉米夫定^[3], 也可以应用免疫治疗^[46-47]。

经过免疫清除期后, HBV量明显减少, 转氨酶复常, 机体免疫功能占优势, 慢乙肝相对静止, 进入残留整合期。此期可不予治疗, 但应注意保护免疫功能, 必要时用些支持免疫功能的药物, 以保持机体免疫系统随时监视、清除HBV, 防

止CHB再发作。根据慢乙肝防治指南的意见, 对HBV携带者建议进行肝组织学检查是较理想的, 但实际操作中很难实施, 由于这部分患者HBV DNA(+), 对周围人有威胁, 包括发现的隐匿性CHB患者, 其心理负担较重, 应予合理治疗, 特别是免疫治疗还是可行的^[46]。而对非活动性HBsAg携带者不必治疗, 定期随访即可。

总之, 我们认为CHB治疗应从二方面入手: 一是抗病毒药物治疗, 有效杀灭抑制HBV, 另一方面通过免疫治疗提高机体对HBV的识别能力, 主要依靠机体自身免疫细胞杀灭抑制HBV, 在适当情况下二者应当兼顾, 不可片面强调一方。即要纠正目前治疗CHB主要靠抗病毒药物治疗, 而忽略免疫治疗这一倾向。故加强免疫治疗方法的更深入研究, 确是当务之急^[48-51]。

据此, 根据我国国情, 依据大多数农村及城镇社区的实际情况, 对CHB治疗中可进行简单分类如下: 依血清学HBV DNA(PCR法)定量分为(1)HBV DNA(-)者: 若ALT持续正常1 a以上, 则为非活动性HBsAg携带者, 嘱其注意身体保健, 防止免疫力低下, 定期追踪观察即可。若ALT异常, 大多可能是非病毒所致, 但应排除其他病毒所致的ALT升高, 可给予保肝降酶治疗, 维持ALT正常后, 复查HBV DNA仍为阴性, 即转变为非活动性HBsAg携带者; (2)HBV DNA(+)者: 若ALT $\geq$ 1333.6 nkat/L, 则参考“指南”进行以首选干扰素为主的抗病毒治疗, 也可辅以免疫治疗以提高疗效。若ALT $<$ 1333.6 nkat/L可进行免疫治疗, 但也可以阿德福韦, 恩替卡韦作抗病毒治疗。若ALT正常1 a以上, 为慢性HBV携带者可进行免疫治疗或严密追踪观察不予治疗, 动员其肝穿, 依病理检查结果决定是否治疗。在CHB治疗过程中还应注意: 若DNA过高, 为防止应答反应过强引起重型肝炎, 可于免疫治疗前给与核苷类似物以部分抑制病毒, 使血清HBV DNA $\leq$ 10⁹ copies/L再开始免疫治疗较为安全。对出现HBeAg(-)者, 有条件应进行HBV变异检测。若有变异配合恩替卡韦、阿德福韦等治疗较好。对有干扰素适应症者一定要首选干扰素正规治疗, 以减少肝癌发生。CHB患者每2 a做肝纤维化指标检测, 异常者进行抗纤维化治疗。对乙型肝炎肝硬化的处理参照“指南”中意见。

3 参考文献

- 1 吴君. 乙型肝炎病毒感染的综合性预防. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1135-1138
- 2 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎

- 炎防治指南. 中华肝病杂志 2005; 13: 881-891
- 3 拉米夫定临床应用专家组. 2004年拉米夫定临床应用专家共识. 中华肝病杂志 2004; 12: 425-428
- 4 韩国荣, 余敏敏, 沈玲, 唐引荣, 唐讯, 吴岷岷, 张小燕. 孕妇及婴儿联合免疫阻断乙型肝炎病毒宫内传播的临床研究. 中华围产医学杂志 2004; 7: 8-10
- 5 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 213
- 6 Huang TH, Zhang QJ, Xie QD, Zeng LP, Zeng XF. Presence and integration of HBV DNA in mouse oocytes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2869-2873
- 7 罗祎, 姚珍薇. 乙型肝炎病毒垂直传播机制的研究进展. 中华肝病杂志 2006; 14: 638-640
- 8 苏桂栋, 苏建新, 王军. 乙型肝炎病毒父-婴传播途径的研究近况. 中国实用妇科与产科杂志 2003; 19: 568-569
- 9 Ali BA, Huang TH, Xie QD. Detection and expression of hepatitis B virus X gene in one and two-cell embryos from golden hamster oocytes in vitro fertilized with human spermatozoa carrying HBV DNA. *Mol Reprod Dev* 2005; 70: 30-36
- 10 叶峰, 李淑红, 陈天燕, 岳亚飞, 张树林. 乙型肝炎病毒在患者卵巢中的表达. 中华肝病杂志 2005; 13: 937-938
- 11 熊小芳, 黄天华, 谢东庆, 王晓梅, 陈桂兰. 精子携带的HBV DNA在小鼠早期胚胎中的复制与表达. 癌变·畸变·突变 2005; 17: 175-178
- 12 刘斌, 高英茂. 人体胚胎学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 536-554
- 13 何维. 医学免疫学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 177-187
- 14 Zhang SL, Yue YF, Bai GQ, Shi L, Jiang H. Mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 437-438
- 15 李铁钢, 王素萍, 李淑珍, 王效军, 冯永亮, 薛淑莲, 双洁玉, 渠轶群. HBsAg阳性孕妇胎盘HBV感染状况及危险因素. 中国公共卫生 2005; 21: 165-166
- 16 Xu DZ, Yan YP, Zou S, Choi BC, Wang S, Liu P, Bai G, Wang X, Shi M, Wang X. Role of placental tissues in the intrauterine transmission of hepatitis B virus. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 981-987
- 17 Wang Z, Zhang J, Yang H, Li X, Wen S, Guo Y, Sun J, Hou J. Quantitative analysis of HBV DNA level and HBeAg titer in hepatitis B surface antigen positive mothers and their babies: HBeAg passage through the placenta and the rate of decay in babies. *J Med Virol* 2003; 71: 360-366
- 18 崔恒春, 闫永平, 邵中军, 徐德忠, 门可, 徐剑秋, 李军. 免疫预防后HBeAg与HBV宫内感染分析. 中国公共卫生 2006; 22: 824-826
- 19 归巧娣, 岳亚飞, 李淑红, 张芬. 乙型肝炎表面抗原与乙型肝炎e抗原阴性孕妇乙型肝炎病毒宫内感染的研究. 中华妇产科杂志 2005; 40: 99-102
- 20 冯永亮, 王素萍, 史晓红, 王效军, 李铁钢. PBMC中HBV cccDNA与HBV宫内感染关系的研究. 现代预防医学 2005; 32: 192-194
- 21 韩晓兵, 岳亚飞, 白桂芹, 李淑红, 石紫云. 新生儿外周血单个核细胞乙型肝炎病毒DNA检测的临床意义. 中华儿科杂志 2005; 43: 434-437
- 22 王素萍, 李铁钢, 魏俊妮, 史晓红, 李淑珍, 冯永亮, 王效军. 乙型肝炎病毒宫内感染相关因素的研究. 中华妇产科杂志 2005; 40: 670-672
- 23 岳亚飞, 姜翔, 石磊, 黎丽芳, 洗宝水, 余幼莲, 陈广丰. 乙型肝炎病毒宫内感染机理的研究. 中华妇产科杂志 2004; 39: 224-226
- 24 魏俊妮, 王素萍, 冯丽萍, 双杰玉. HBsAg阳性孕妇细胞转运意义的研究. 中国公共卫生 2005; 21: 536-538
- 25 许红梅, 刘作义. 乙型肝炎病毒母婴传播及其阻断. 实用儿科临床杂志 2005; 20: 835-837
- 26 闫永平, 徐德忠, 王文亮, 刘斌, 刘志华, 门可, 张景霞, 徐剑秋. 胎盘乙型肝炎病毒感染与宫内传播的关系. 中华妇产科杂志 1999; 34: 392-395
- 27 马宁生, 朱敏, 应红华, 林益平. 孕妇产前进行免疫阻断与新生儿乙型肝炎基因疫苗免疫效果关系的研究. 中国实用儿科杂志 2006; 21: 29-31
- 28 常文辉, 徐德忠, 闫永平, 杜可军, 门可, 张景霞, 王敬军, 徐剑秋, 张恩娣, 刘晨, 孙凤梅. 乙型肝炎表面抗原阳性孕妇妊娠早期绒毛细胞乙型肝炎病毒感染状况的研究. 中华妇产科杂志 2005; 40: 376-379
- 29 朱启镛. 第二届阻断HBV母婴传播和乙型肝炎疫苗与临床应用学术会议纪要. 中华传染病杂志 2002; 20: 259-260
- 30 刘海英, 马玉燕, 崔保霞, 戴旻笙, 杨洁. 孕妇乙肝免疫球蛋白被动免疫阻断HBV母婴垂直传播作用机理的研究. 现代妇产科进展 2002; 11: 128-130
- 31 Li XM, Yang YB, Hou HY, Shi ZJ, Shen HM, Teng BQ, Li AM, Shi MF, Zou L. Interruption of HBV intrauterine transmission: a clinical study. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1501-1503
- 32 Koyama T, Matsuda I, Sato S, Yoshizawa H. Prevention of perinatal hepatitis B virus transmission by combined passive-active immunoprophylaxis in Iwate, Japan (1981-1992) and epidemiological evidence for its efficacy. *Hepatol Res* 2003; 26: 287-292
- 33 朱冰, 梁晓峰. 乙型肝炎免疫球蛋白与乙型肝炎疫苗联合免疫预防围产期乙型肝炎病毒传播. 中国计划免疫 2006; 12: 312-314
- 34 孙莲英, 庞志钊, 张文英, 江永珍, 余陶, 王俊明, 张勇, 刘崇柏. 不同剂量重组乙型肝炎疫苗(酵母)阻断乙型肝炎病毒母婴传播的研究. 中国计划免疫 2006; 12: 262-263
- 35 朱启镛. 重视乙型肝炎病毒母婴传播的阻断. 中华肝病杂志 2003; 11: 199
- 36 杨静, 邵兴兰, 尤世刚. 乙肝免疫球蛋白阻断HBV父婴、母婴传播的观察. 现代预防医学 2006; 33: 806-813
- 37 朱启镛, 于广军, 吕晴, 俞蕙, 顾新焕, 张秀珍, 董左权. 阻断乙型肝炎病毒宫内传播的随机对照研究. 中华儿科杂志 2002; 40: 478-480
- 38 王海霞, 阴其玲, 万宝美. 不同方法注射乙肝免疫球蛋白阻断HBV宫内传播的研究. 现代预防医学 2006; 33: 145-146
- 39 岳亚飞, 李银姬, 张树林. 孕妇主动与被动联合免疫预防乙型肝炎病毒宫内感染的临床研究. 中华围产医学杂志 2000; 3: 3-5
- 40 肖小敏, 何明娇, 肖昕, 陈新, 叶志海, 孟钊, 徐玉苑, 李耘. 孕期应用乙型肝炎免疫球蛋白对预防乙型肝炎病毒垂直传播的预防作用. 实用儿科临床杂志 2005; 20: 563-564
- 41 周海云. 乙型肝炎人免疫球蛋白的应用研究. 中国生物制品学杂志 2006; 19: 544-547
- 42 王安辉, 门可, 闫永平, 徐德忠, 卢娟, 王雪萍, 张景霞. 乙型肝炎免疫球蛋白阻断胎盘滋养细胞感染乙型肝炎病毒的实验研究. 中华妇产科杂志 2006; 41: 165-168
- 43 李小毛. HBV母婴传播阻断与免疫策略. 中国实用妇科与产科杂志 2005; 21: 381-382
- 44 刘崇柏, 苏崇鳌. 对乙型肝炎免疫球蛋白阻断母婴围产期传播的浅见. 中国计划免疫 2006; 12: 148-150
- 45 陈素清, 朱启镛. 乙型肝炎免疫球蛋白在乙型肝炎防治中的研究进展. 肝脏 2005; 10: 155-157
- 46 郑鹏远, 白蓉, 姜海山, 唐芙爱, 白经修, 司方明, 琚新, 徐建强. HBsAg疫苗冲击树突状细胞联合乙肝免疫球

- 蛋白对慢性乙型肝炎及HBV携带者的疗效. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1735-1738
- 47 郑鹏远, 娄海山, 王永红, 唐芙爱, 白蓉, 司方明, 白经修, 琚新. 特异性免疫治疗母婴传播所致慢性乙型肝炎23例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1824-1827
- 48 高新生, 林菊生. 过继免疫疗法在慢性乙型肝炎治疗上的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2778-2782
- 49 张定凤. 乙型肝炎的治疗面临新的挑战. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 481-483
- 50 Barouch DH, Letvin NL, Seder RA. The role of cytokine DNAs as vaccine adjuvants for optimizing cellular immune responses. *Immunol Rev* 2004; 202: 266-274
- 51 任粉玉, 朴熙绪, 任淑子, 裴海成. 慢性乙型肝炎的疫苗治疗免疫学机制的探讨. 临床肝胆病杂志 2005; 21: 83-84

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 会议纪要 •

第二届国家级慢性乙型肝炎生物免疫治疗及病毒性肝炎 新进展研讨会会议纪要

本刊讯 第二届国家级慢性乙型肝炎生物免疫治疗及病毒性肝炎新进展研讨会于2006-12-08/12-10在美丽的绿城河南郑州举办, 会议由郑州大学第二附属医院消化科主办, 会议荣幸地邀请到四川大学华西医院赵连三教授、北京大学第一医院王贵强教授、上海第二军医大学长征医院缪晓辉教授等国内著名肝病专家作精彩学术报告, 来自全国各地的200余名消化科、肝病科、传染科代表参会并进行了广泛交流, 河南省卫生厅、医学会有关领导到会祝贺, 郑州大学第二附属医院消化科博士生导师郑鹏远教授主持会议并就慢性乙肝生物免疫治疗、拉米夫定、阿德福韦等药物对慢乙肝患者外周血树突状细胞功能的影响等作了精彩报告. 会议就慢性乙型肝炎(CHB)的生物免疫治疗和抗病毒治疗、母婴传播阻断、治疗型疫苗以及孕妇、儿童等特殊人群的乙肝抗病毒治疗等问题进行了交流与探讨.

虽然有关乙肝治疗性疫苗的研究已经有了长足的进展, 成为医疗界和广大患者共同关注的热点, 但仍然处于试验阶段; 此外, 治疗性疫苗的安全性问题也是人们关注的焦点. 在成为可以让广大患者使用的疫苗之前, 还需要进行大量和长期的工作, 必须通过严格的临床试验研究评审程序, 估计, 治疗性乙肝疫苗的正式上市至少还需要5-10 a, 甚至更长的时间; 现有治疗性疫苗的疗效尚属有限, 并且有待重复验证. 即使治疗性乙肝疫苗最终成功上市, 也只能与现有的抗HBV药物互为补充, 不可能取而代之; 所以, 当前应当告知患者对此采取冷静的科学态度. 利用乙肝疫苗与免疫佐剂或联合DC制成特异性DC疫苗, 在CHB治疗中已取得较好效果. 这说明从提高CHB患者免疫功能为出发点的CHB特异性免疫治疗途径, 增强CHB患者的T细胞应答是有效的、可行的. 无论对HBeAg阴性或阳性的CHB及慢性HBV携带者皆可试用. 乙型肝炎母婴传播问题也是本次会议的热点之一, 判断孕妇注射HBIG是否能提高母婴传播的阻断效果, 无论肯定或否定的意见, 最终均须以循证医学的临床证据为准绳, 以高质量的证据服人. 因此, 就HBV感染母婴传播阻断相关课题的学术争鸣, 积极推动开展多中心、大样本、严格设计的随机对照试验, 是达成同行共识, 推动临床医学进步的唯一途径.

本次会议内容丰富, 资料详实, 涉及面广, 对广大肝病专家尤其是基层医生具有重要的参考和指导作用. 会议指出慢性乙肝的治疗目标是长期抑制病毒, 延缓疾病进展; 大多数慢性乙肝患者需要长期抗病毒治疗才能实现治疗目标; 长期抗病毒治疗需要正确的耐药管理策略, 生物免疫治疗是慢性乙肝抗病毒治疗的有益补充. 并决定与广大基层医院建立科研联系, 利用其丰富的病例进行乙肝相关科研协作, 同时加强对基层医生的临床和科研能力培训. (卢高峰 郑鹏远 郑州大学第二附属医院消化科)

蒙古沙鼠幽门螺杆菌相关性胃炎Sonic hedgehog基因、IL-1 β 及TNF- α 的表达

李忠武, 刘鲁英, 田萌萌, 游伟程, 李吉友

李忠武, 刘鲁英, 田萌萌, 李吉友, 北京肿瘤医院病理科, 北京大学临床肿瘤学院 北京市 100036
游伟程, 北京市肿瘤防治研究所流行病学研究室, 北京大学临床肿瘤学院 北京市 100036
李忠武, 医学博士, 主要从事胃癌及胃癌癌前病变研究.
国家基础研究973项目, No. 1998051203
通讯作者: 李吉友, 100036, 北京市海淀区阜成路52号, 北京肿瘤医院病理科, 北京大学临床肿瘤学院. lijyou@263.net
电话: 010-88196331
收稿日期: 2006-10-08 接受日期: 2006-10-25

Expression of Sonic hedgehog gene, interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α in gastric epithelium of mongolian gerbils after *H pylori* inoculation

Zhong-Wu Li, Lu-Ying Liu, Meng-Meng Tian, Ji-You Li, Wei-Cheng You, Ji-You Li

Zhong-Wu Li, Lu-Ying Liu, Meng-Meng Tian, Ji-You Li, Department of Pathology, Beijing Cancer Hospital; Peking University School of Oncology, Beijing 100036, China
Wei-Cheng You, Department of Epidemiology, Institute of Tumor Prevention and Therapy; Peking University School of Oncology, Beijing 100036, China
Supported by the National Basic Research Priorities Program (973 Program), No. 1998051203
Correspondence to: Ji-You Li, Department of Pathology, Beijing Cancer Hospital; Peking University School of Oncology, Beijing 100036, China. lijyou@263.net
Received: 2006-10-08 Accepted: 2006-10-25

Abstract

AIM: To investigate the expression of morphogene Sonic hedgehog (Shh), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in gastric epithelium of mongolian gerbils after *H pylori* inoculation and their correlations with the pathologic changes of *Helicobacter pylori* related gastritis.

METHODS: A total of 50 male mongolian gerbils were inoculated with *H pylori* and another 50 gerbils served as controls. The levels of Shh, IL-1 β and TNF- α mRNA expression were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the level of Shh protein expression was examined by immunohistochem-

istry 4, 12, 24, 36 and 48 weeks after inoculation.

RESULTS: As compared with those in the controls, both the expression levels of Shh mRNA and protein were decreased significantly at the 36th ($t = 3.24, P < 0.05; Z = 4.84, P < 0.001$) and 48th week ($t = 3.01, P < 0.05; Z = 4.65, P < 0.001$) after *H pylori* inoculation. Furthermore, the level of Shh mRNA expression was negatively correlated with the expression of IL-1 β mRNA, TNF- α mRNA and the grade of gastritis, respectively ($r = -0.372, P < 0.01; r = -0.301, P < 0.05; r = -0.397, P < 0.001$). Similarly, the level of Shh protein expression was negatively correlated with the expression of IL-1 β mRNA, TNF- α mRNA and the grade of gastritis ($r = -0.321, P < 0.05; r = -0.313, P < 0.05; r = -0.371, P < 0.001$) respectively.

CONCLUSION: After *H pylori* infection, the expression of IL-1 β and TNF- α is increased and positively correlated with the grade of gastritis, and while the expression of Shh is decreased and negatively correlated with the expression of IL-1 β , TNF- α and gastritis grades.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Sonic hedgehog; Interleukin-1 β ; Tumor necrosis factor- α ; Atrophic gastritis

Li ZW, Liu LY, Tian MM, You WC, Li JY. Expression of Sonic hedgehog gene, interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α in gastric epithelium of mongolian gerbils after *H pylori* inoculation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):7-13

摘要

目的: 研究形态基因Sonic hedgehog (Shh)以及IL-1 β 和TNF- α 在*H pylori*相关性胃炎中表达的相关性及作用。

方法: 蒙古沙鼠50只给予悉尼菌株灌胃造成*H pylori*感染模型, 另设50只蒙古沙鼠作为对照. 应用RT-PCR的方法对沙鼠胃黏膜组织中的Shh, IL-1 β 以及TNF- α mRNA表达水平进行检测; 应用免疫组化的方法对于Shh蛋白

■背景资料

幽门螺杆菌(*H pylori*)感染是非萎缩性胃炎、萎缩性胃炎和肠上皮化生发生的重要因素. Sonic hedgehog(Shh)基因在胃肠道黏膜的发育以及维持黏膜的结构、形态、功能中发挥重要的作用, 有研究报道, Shh基因在*H pylori*感染后表达下调. 在*H pylori*感染后, IL-1 β 和TNF- α 显著上调, 并可能通过抑制胃酸分泌而引发相应的病理学变化。

■研究前沿

关于Shh基因的研究主要侧重于如前列腺癌、基底细胞癌、乳腺癌、胃肠道等肿瘤的研究以及胃肠道等器官的发育两方面。IL-1 β 和TNF- α 是*H pylori*相关性胃炎中重要的前炎症性细胞因子。

进行细胞定位以及半定量分析其表达水平。

结果: *H pylori*灌胃36和48 wk后, Shh mRNA表达水平明显降低(0.28 vs 0.48, $t = 3.24$, $P < 0.05$; 0.18 vs 0.45, $t = 3.01$, $P < 0.05$)。Shh mRNA表达水平与IL-1 β , TNF- α mRNA表达之间以及与炎症分级之间呈显著负相关($r = -0.37$, $P < 0.01$; $r = -0.30$, $P < 0.05$; $r = -0.39$, $P < 0.001$)。Shh蛋白主要表达于胃体壁细胞胞质中, *H pylori*灌胃36和46 wk, 表达Shh抗原的阳性细胞数明显减少($Z = 4.84$, $P < 0.001$; $Z = 4.57$, $P < 0.001$)。Shh蛋白的表达与IL-1 β mRNA, TNF- α mRNA的表达以及慢性炎症分级之间也呈显著负相关($r = -0.321$, $P < 0.05$; $r = -0.313$, $P < 0.05$; $r = -0.371$, $P < 0.001$)。

结论: 蒙古沙鼠胃黏膜感染*H pylori*后, IL-1 β 和TNF- α 表达上调, 并与炎症程度呈显著正相关; Shh表达下调, 并与炎症分级及IL-1 β 和TNF- α 表达呈显著负相关。

关键词: 幽门螺杆菌; Sonic hedgehog基因; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α ; 萎缩性胃炎

李忠武, 刘鲁英, 田萌萌, 游伟程, 李吉友. 蒙古沙鼠幽门螺杆菌相关性胃炎Sonic hedgehog基因、IL-1 β 及TNF- α 的表达. 世界华人消化杂志 2007;15(1):7-13
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/7.asp>

0 引言

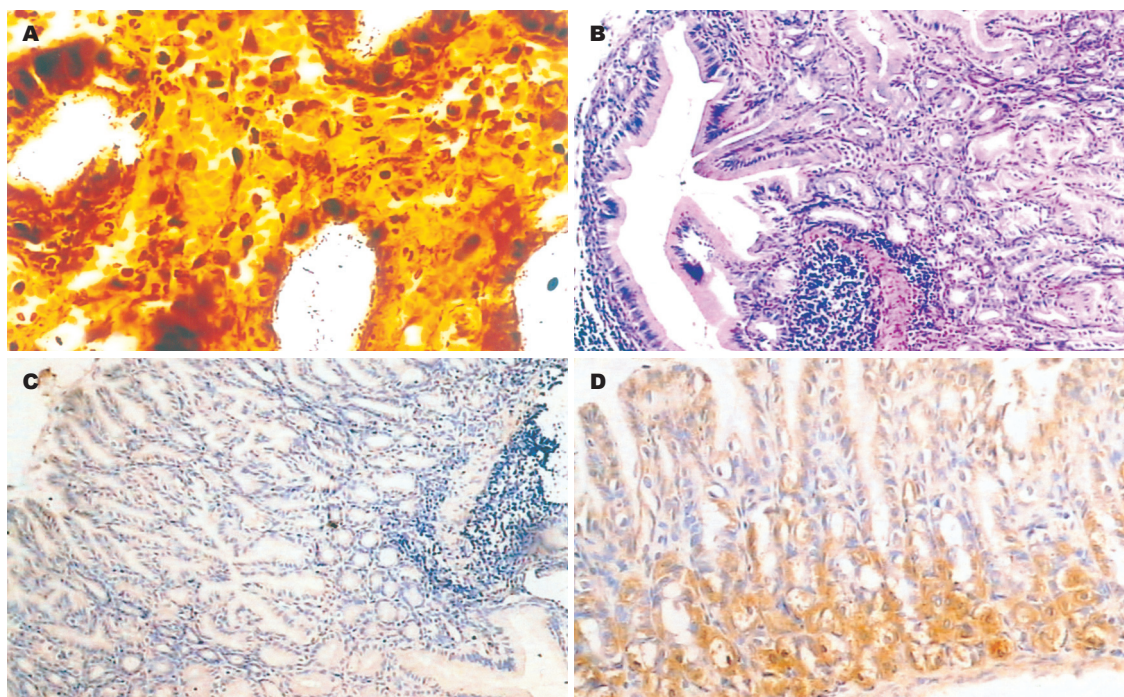
幽门螺杆菌(*H pylori*)感染是非萎缩性胃炎、萎缩性胃炎和肠上皮化生发生的重要因素^[1-7]。*H pylori*的毒力因子如cagA, vacA以及babA等与这些病变密切相关^[8-14], 但他们引发的宿主反应以及上述病变的发病机制仍在探讨中。Sonic hedgehog(Shh)基因在胃肠道黏膜的发育以及维持黏膜的结构、形态、功能中发挥重要的作用。Shh基因敲除的小鼠, 胃黏膜上皮被能分泌碱性磷酸酶的肠上皮所取代^[15]。有研究发现, Shh基因在萎缩性胃炎及肠上皮化生中表达下调^[16]。这些结果提示, Shh基因可能在萎缩性胃炎及肠上皮化生病变中发挥着重要作用。另外, Dimmler et al^[17]在体外实验发现, 低pH值环境促进Shh基因在胃癌细胞系23132中的表达; 而在pH值升高的情况下, Shh基因的表达明显下调。IL-1 β 和TNF- α 是胃酸分泌强有力的抑制因子, 引起胃内pH值升高^[18-26], IL-1 β 和TNF- α 与Shh基因表达水平之间可能存在一定的联系, 而这种联系可能在萎缩性胃炎以及肠上皮化生的发病过程中

发挥着重要的作用。我们以蒙古沙鼠经口灌服*H pylori*造成*H pylori*感染模型为实验对象, 检测IL-1 β 和TNF- α 与Shh基因在*H pylori*相关性胃炎中的表达, 分析其表达水平与*H pylori*相关性胃炎分级的相关性及Shh表达与IL-1 β 和TNF- α 表达之间的相关性, 探讨其在非萎缩性胃炎、萎缩性胃炎及肠上皮化生发生中可能的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 无菌6周龄SPF级♂蒙古沙鼠100只, 由浙江医学科学院提供, 随机分为对照组和实验组两组, 每组各50只。禁食水12 h后, 实验组沙鼠给予(10^{15} CFU/L)*H pylori*(SS1, 悉尼菌株)悬浮液0.8 mL灌胃, 共3次, 每次间隔24 h; 对照组沙鼠只用相应的*H pylori*培养液灌胃。分别于灌胃后4, 12, 24, 36和48 wk股动脉放血处死对照组及实验组沙鼠各5只。将胃组织标本剪成两半, 一半固定于中性甲醛用于HE, Warthin-Starry银染及免疫组化染色, 另一半保存在-70℃冰箱用于RT-PCR检测。

1.2 方法 胃组织石蜡切片厚度5 μ m, HE染色显微镜观察, 按新悉尼标准对慢性胃炎的分级进行评判, 分为轻度、中度、重度3级。Warthin-Starry银染用以判断*H pylori*的感染状态。免疫组化: 切片常规脱蜡至水; 浸泡于3 mL/L过氧化氢中10 min以消除内源性过氧化物酶; 将切片放入枸橼酸钠(0.01 mol/L, pH 6.5)抗原修复液中, 微波加热至100℃并维持10 min, 自然冷却; PBS清洗3遍; 滴加Shh抗体(1:100; sc1194, Santa Cruth, Calif, USA), 4℃过夜; 滴加羊抗兔二抗(111-035-003, Jackson, USA), 37℃孵育30 min; DAB(00-214, Zymed, USA)显色, 镜下控制显色时间, 充分水洗, 苏木素复染细胞核; 计数阳性区5个高倍视野($\times 400$)下Shh表达阳性的细胞数, 用求得平均值表示Shh蛋白表达情况。另按TRIzol(15596-026, Invitrogen, USA)试剂盒说明提取总RNA; 紫外分光光度计测定总RNA浓度及纯度; 应用逆转录试剂盒(A3500, Promega, USA)逆转录合成cDNA。具体的步骤如下: 取总RNA 0.5 g/L, 在70℃条件下使其充分变性10 min, 然后将变性的RNA 2 μ L, 4 μ L MgCl₂(25 mmol/L), 10 $\times$ RT Buffer 2 μ L, dNTP混合物(10 mmol/L) 2 μ L, RNA酶抑制剂0.5 μ L, 250 nkat逆转录酶, 随机引物0.5 μ g充分混合, 42℃孵育60 min, 95℃ 5 min充分灭活逆转录酶。PCR反应体系为: 无菌蒸馏水16.25 μ L,



■ 相关报道

Shiotani A *et al*报道Shh蛋白主要表达于人胃体腺壁细胞中, 而且该蛋白的表达下调与萎缩及肠化病变严重程度之间存在显著正相关. Suzuki *et al*的研究结果显示, 蒙古沙鼠在*H. pylori*感染后51 wk, Shh基因表达显著下调, 而且该基因的表达与壁细胞的丢失及腺颈部细胞的分化受阻呈显著正相关. Beales IL *et al*报道IL-1 β 和TNF- α 是胃酸分泌强有力的抑制因子.

图1 蒙古沙鼠*H. pylori*灌胃. A: Warthin-Starry银染; B: 36 wk胃黏膜固有层可见囊性扩张的腺体; C: 48 wk Shh蛋白表达减弱; D: 对照组Shh蛋白主要表达于胃体壁细胞胞质中.

表1 Shh, IL-1 β , TNF- α , β -actin的引物序列及相应PCR反应中的退火温度

基因	引物序列	退火温度	PCR产物
IL-1 β	F 5'-CTGAAAGCTCTCCACCTC-3'	54.0 $^{\circ}$ C	542 bp
	R 5'-CTTTGAACAGAATGTGCC-3'		
TNF- α	F 5'-CCATCGGACGGGCTGTACCTC-3'	66.0 $^{\circ}$ C	274 bp
	R 5'-CTCGGCGCTGAGTCGGTCTC-3'		
Shh	F 5'-GGCAGATACGAAGGGAAGAT-3'	66.2 $^{\circ}$ C	261 bp
	R 5'-ACCGCTCGGCCCTCGTAGTG-3'		
β -actin	F 5'-GCACCACACCTTCTACAATGAG-3'	66.0 $^{\circ}$ C	164 bp
	R 5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'		

10 $\times$ Buffer 5 μ L, MgCl₂(25 mmol/L) 2.0 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 1.0 μ L, Taq聚合酶(Promega, Madison, WI)83.35 nkat, cDNA模板1.0 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 特异退火温度40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 经30个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min. 产物于20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色(10 mg/L)后, 通过美国Alphamager 2200凝胶成像系统对目的电泳条带进行图像分析; Shh, IL-1 β , TNF- α 目的条带与 β -actin灰度的比值代表该基因的mRNA表达水平; Shh, IL-1 β , TNF- α , β -actin特异性引物及其退火温度详见表1.

统计学处理 采用SPSS 11.5统计学软件对数据进行处理. 两组之间Shh mRNA以及Shh蛋白表达情况的比较分别采用*t*检验和Wilcoxon秩和

检验; 实验组不同时间点IL-1 β , TNF- α mRNA表达情况的比较采用方差分析; 各基因表达与胃炎分级之间的相关性分析采用Spearman秩相关检验, 双侧 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义.

2 结果

Warthin-Starry银染镜下观察发现, 实验组沙鼠*H. pylori*感染均为阳性(图1A). 对照组沙鼠胃黏膜仅见少量的炎症细胞浸润. 在实验组中, *H. pylori*灌胃4 wk后, 5只沙鼠胃黏膜固有层均可观察到轻度炎症细胞浸润, 以淋巴细胞和少量单核细胞为主, 中性粒细胞少见. 炎症反应以胃体与胃窦移行区为著. *H. pylori*灌胃24, 36 wk后, 沙鼠胃黏膜可见重度慢性胃炎表现, 并伴有淋

■创新盘点

以往研究只侧重于Shh基因表达或宿主免疫反应与形态学变化单方面的研究,而本实验将Shh基因以及IL-1 β , TNF- α 的表达结合在一起,研究了在*H. pylori*感染后不同阶段,形态基因Shh以及宿主免疫反应动态变化,并初步探讨了萎缩性胃炎和肠上皮化生的发病机制。

表 2 蒙古沙鼠*H. pylori*胃炎新悉尼标准炎症分级和Shh, IL-1 β , TNF- α mRNA表达情况

		4 wk	12 wk	24 wk	36 wk	48 wk
炎症分级	实验组	1.00(0-3)				
		1.0	1.4	2.0	2.4	2.8
	对照组	0-3	0-3	0-3	0-3	0-3
		0.25(0-3)				
mRNA表达	Shh	0.25	0.25	0	0	0
		0-3	0-3	0-3	0-3	0-3
	IL-1 β	0.65 $\pm$ 0.045	0.54 $\pm$ 0.036	0.47 $\pm$ 0.037	0.28 $\pm$ 0.035 ^a	0.18 $\pm$ 0.026 ^a
	TNF- α	1.14 $\pm$ 0.043	1.13 $\pm$ 0.053	1.23 $\pm$ 0.044	1.31 $\pm$ 0.045 ^c	1.33 $\pm$ 0.056 ^c
		0.64 $\pm$ 0.037	0.67 $\pm$ 0.035	0.68 $\pm$ 0.026	0.74 $\pm$ 0.043 ^c	0.75 $\pm$ 0.036 ^c

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs *H. pylori*灌胃后4, 12, 24 wk.

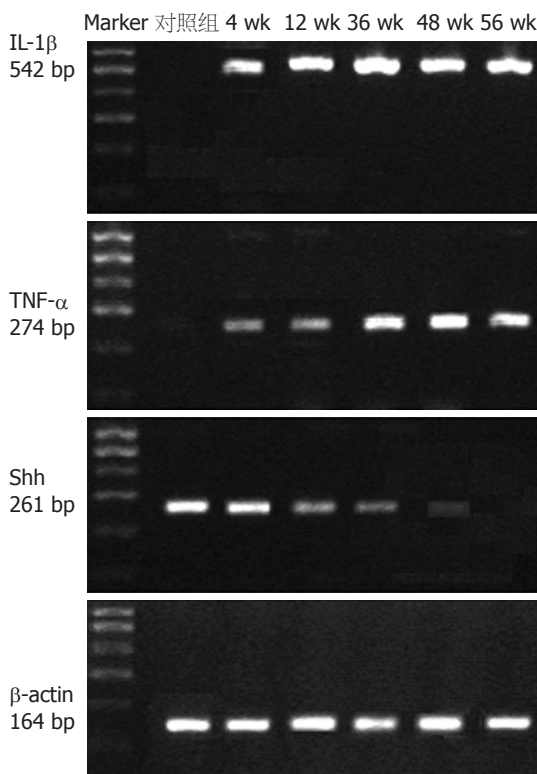


图 2 蒙古沙鼠*H. pylori*胃炎IL-1 β , TNF- α , Shh及 β -actin mRNA的表达。

巴滤泡形成。*H. pylori*灌胃48 wk后,沙鼠胃黏膜除大量淋巴细胞浸润为特征的重度慢性胃炎改变外,还可见囊性扩张的腺体(图1B)。对照组及实验组炎症分级见表2。

对照组沙鼠胃黏膜组织IL-1 β , TNF- α mRNA的表达均为阴性。实验组沙鼠胃黏膜组织在*H. pylori*灌胃后4 wk即可观察到IL-1 β , TNF- α mRNA表达(图2)。*H. pylori*灌胃后36, 48 wk后,IL-1 β , TNF- α mRNA表达水平较*H. pylori*灌胃后

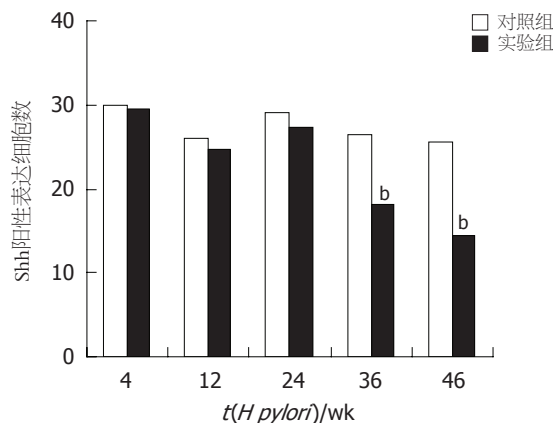


图 3 蒙古沙鼠*H. pylori*胃炎Shh蛋白表达的比较。^b $P < 0.001$ vs 对照组, Wilcoxon秩和检验。

4, 12, 24 wk显著升高(表2)。IL-1 β , TNF- α mRNA的表达与慢性炎症的分级呈显著正相关($r_s = 0.433$, $P < 0.01$, $r_s = 0.456$, $P < 0.01$, 表3)。

Shh mRNA以及蛋白的表达之间显著正相关($r_s = 0.431$, $P < 0.01$)。Shh mRNA表达水平在*H. pylori*灌胃4, 12, 24 wk呈下降的趋势,但是并未达到统计学意义。与对照组相比,*H. pylori*灌胃后36和48 wk, Shh mRNA表达水平显著降低($t = 3.240$, $P < 0.05$; $t = 3.812$, $P < 0.05$, 表2)。Shh mRNA的表达与IL-1 β mRNA, TNF- α mRNA的表达以及慢性炎症分级之间均呈显著负相关($r = -0.372$, $P < 0.01$; $r = -0.301$, $P < 0.05$; $r = -0.397$, $P < 0.001$, 表3)。免疫组化结果显示, Shh主要表达于胃体腺壁细胞的胞质中。灌胃后4, 12, 24 wk的实验组与对照组相比,表达Shh阳性细胞数没有统计学差异。灌胃后第36和第48周,实验组表达Shh抗原的阳性细胞数较同一时间点对照组明显减少($Z = 4.843$, $P < 0.001$; $Z = 4.657$, $P < 0.001$,

表 3 蒙古沙鼠*H. pylori*胃炎Shh, IL-1 β , TNF- α 表达以及胃炎分级之间的相关性

	Shh mRNA	IL-1 β mRNA	TNF- α mRNA	炎症分级
Shh mRNA		$r_s = -0.372, P < 0.01$	$r_s = -0.301, P < 0.05$	$r_s = -0.397, P < 0.001$
Shh protein	$r_s = 0.431, P < 0.01$	$r_s = -0.321, P < 0.05$	$r_s = -0.313, P < 0.05$	$r_s = -0.371, P < 0.001$
IL-1 β mRNA	$r_s = -0.372, P < 0.01$		$r_s = 0.422, P < 0.01$	$r_s = 0.433, P < 0.01$
TNF- α mRNA	$r_s = -0.301, P < 0.05$	$r_s = 0.422, P < 0.01$		$r_s = 0.456, P < 0.01$

Spearman秩相关检验.

图1C-D及图3). Shh蛋白的表达与IL-1 β mRNA, TNF- α mRNA的表达以及慢性炎症分级之间呈显著负相关($r = -0.321, P < 0.05$; $r = -0.313, P < 0.05$; $r = -0.371, P < 0.001$, 表3).

3 讨论

本研究结果显示, IL-1 β , TNF- α mRNA在*H. pylori*灌胃后4 wk就有所表达, 而且与慢性胃炎的分级正相关. 这表明IL-1, TNF- α 在*H. pylori*相关性胃炎的早期就发挥作用. 有研究表明, IL-1, TNF- α 与NF- κ B可以形成自我激活的循环联系, 并且与NF- κ B所调控的下游众多趋化因子如: IL-8, MCP-1, RANTES和MIP-1 α 等共同构成复杂的细胞因子网络, 增强和放大*H. pylori*感染后胃黏膜的炎症反应, 加重胃黏膜的损伤^[27].

Shh基因是胃肠道发育过程中有着重要作用的形态基因. Shh与其特异性受体Patched(Ptc)结合以后, 可以移除Ptc对另一种转录蛋白Smoothered(Smo)的抑制作用, 并最终通过Gli家族发挥转录调控作用. 有研究表明, Shh蛋白主要表达于胃体腺壁细胞中, 在*H. pylori*感染阳性的患者, Shh蛋白表达明显下调, 而且该蛋白的表达下调与萎缩及肠化病变严重程度之间存在显著正相关^[16]. Suzuki *et al*^[28]的研究结果显示, 蒙古沙鼠在*H. pylori*感染后51 wk, Shh基因表达显著下调, 而且该基因的表达与壁细胞的丢失及腺颈部细胞的分化受阻呈显著正相关. 在本实验中, 虽未观察到明显的萎缩及肠化等病变, 但是Shh mRNA以及蛋白的表达在*H. pylori*灌胃后36和48 wk显著下调, 且与IL-1 β , TNF- α mRNA的表达以及胃黏膜的炎症反应分级之间存在着显著负相关. 有研究表明, IL-1 β 和TNF- α 是胃酸分泌强有力的抑制因子^[18-26]. 而胃内pH值对于Shh基因表达至关重要, 在pH值升高的情况下Shh基因表达明显下调^[17]. 所以本实验中Shh基因的表达下调可能与IL-1 β 和TNF- α 抑制胃酸

分泌, 胃内的pH值升高有关.

本实验结果显示, Shh基因主要表达于沙鼠胃体黏膜壁细胞胞质中, 这与以往研究报道一致^[28]. 壁细胞通过Shh-Ptc信号通路在调节主细胞以及胃腺体其他细胞的分化、维持其功能方面发挥着重要作用^[29-30]. 与以往的研究结果不同的是, 在本实验中, 形态基因Shh表达在萎缩性胃炎与肠上皮化生发生之前就已经发生改变. Canfield *et al*^[31]发现, 敲除壁细胞的转基因小鼠, 其主细胞系的分化也会受到抑制. 我们发现, Shh基因显示表达下调, 可能会影响到胃黏膜腺体的其他成分(如主细胞等)在受到炎症损伤后的再生, 从而不利于胃黏膜腺体修复而发生萎缩. 另外, 有研究表明, Shh基因敲除的小鼠, 其胃黏膜上皮细胞被肠上皮细胞所取代^[15]. 所以, Shh基因在*H. pylori*感染后的表达下调, 还可能是肠上皮化生发生的重要原因之一. 因而, Shh基因表达下调, 也有可能成为预测萎缩性胃炎以及肠上皮化生发生的一个重要的生物标记物. 本研究结果显示, *H. pylori*感染蒙古沙鼠胃黏膜, IL-1 β 和TNF- α 等前炎症性细胞因子的表达上调, 并与炎症程度正相关; 同时发现, 形态基因Shh表达下调, 并与炎症分级及IL-1 β 和TNF- α 等前炎症性细胞因子的表达水平呈显著负相关, 这可能与IL-1 β 和TNF- α 抑制胃酸的分泌相关. Shh的表达下调, 可能是萎缩性胃炎和肠化生的先驱, 他发生于组织学上出现萎缩性胃炎和肠上皮化生病变之前, 即Shh的表达下调继之可能导致萎缩性胃炎和肠化生的发生, 这有待于进一步研究证实.

4 参考文献

- 1 Leodolter A, Ebert MP, Peitz U, Wolle K, Kahl S, Vieth M, Malfertheiner P. Prevalence of *H. pylori* associated "high risk gastritis" for development of gastric cancer in patients with normal endoscopic findings. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5509-5512
- 2 Perry S, Sanchez L, Yang S, Haggerty TD, Hurst

■应用要点

本实验中, Shh表达在*H. pylori*感染后下调, 可能与IL-1 β 和TNF- α 抑制胃酸的分泌相关. 而Shh基因表达下调, 有可能作为预测萎缩性胃炎以及肠上皮化生发生的一个重要的生物标记物.

■名词解释

hedgehog基因: 是一种分泌性的分子, 他能通过自我剪切而形成活性N末端再经过二分子一胆固醇修饰而发挥作用。脊椎动物体内存在三种hedgehog基因的同分异构体, 分别为Sonic hedgehog(Shh), Desert hedgehog(Dhh), Indian hedgehog(Ihh)。Shh的相关报道最多, 他与中枢神经系统、四肢、肺脏、胃、牙齿的发育相关。Dhh和Ihh则分别与生殖系统以及骨骼系统的发育相关。

■同行评价

本文对蒙古沙鼠幽门螺杆菌相关性胃炎的研究方法先进, 结论可靠, 有理论价值和使用价值, 具有国内领先水平。

- P, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and risk of gastroenteritis. *J Infect Dis* 2004; 190: 303-310
- 3 Prinz C, Schwendy S, Volland P. *H pylori* and gastric cancer: shifting the global burden. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5458-5464
- 4 Trautmann K, Stolte M, Miehlke S. Eradication of *H pylori* for the prevention of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5101-5107
- 5 Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE. *H pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5599-5605
- 6 Beyer BC, Heiss MM, Simon EH, Gruetzner KU, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW, Allgayer H. Urokinase system expression in gastric carcinoma: prognostic impact in an independent patient series and first evidence of predictive value in preoperative biopsy and intestinal metaplasia specimens. *Cancer* 2006; 106: 1026-1035
- 7 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-789
- 8 Rad R, Prinz C, Neu B, Neuhofer M, Zeitner M, Volland P, Becker I, Schepp W, Gerhard M. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa. *J Infect Dis* 2003; 188: 272-281
- 9 Broutet N, Moran A, Hynes S, Sakarovitch C, Megraud F. Lewis antigen expression and other pathogenic factors in the presence of atrophic chronic gastritis in a European population. *J Infect Dis* 2002; 185: 503-512
- 10 Beswick EJ, Pinchuk IV, Suarez G, Sierra JC, Reyes VE. *Helicobacter pylori* CagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD74 and stimulates procarcinogenic events. *J Immunol* 2006; 176: 6794-6801
- 11 Murakami K, Kodama M, Fujioka T. Latest insights into the effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2713-2720
- 12 Leung WK, Chan MC, To KF, Man EP, Ng EK, Chu ES, Lau JY, Lin SR, Sung JJ. *H. pylori* genotypes and cytokine gene polymorphisms influence the development of gastric intestinal metaplasia in a Chinese population. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 714-720
- 13 Ohnita K, Isomoto H, Honda S, Wada A, Wen CY, Nishi Y, Mizuta Y, Hirayama T, Kohno S. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric inflammation in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1549-1553
- 14 Rad R, Dossunbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, Gerhard M, Prinz C. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2004; 53: 1082-1089
- 15 Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 2000; 127: 2763-2772
- 16 Shiotani A, Iishi H, Uedo N, Ishiguro S, Tatsuta M, Nakae Y, Kumamoto M, Merchant JL. Evidence that loss of sonic hedgehog is an indicator of *Helicobacter pylori*-induced atrophic gastritis progressing to gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 581-587
- 17 Dimmler A, Brabletz T, Hlubek F, Hafner M, Rau T, Kirchner T, Faller G. Transcription of sonic hedgehog, a potential factor for gastric morphogenesis and gastric mucosa maintenance, is up-regulated in acidic conditions. *Lab Invest* 2003; 83: 1829-1837
- 18 Takashima M, Furuta T, Hanai H, Sugimura H, Kaneko E. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Gut* 2001; 48: 765-773
- 19 Beales IL, Calam J. Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut* 1998; 42: 227-234
- 20 Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology* 2002; 123: 92-105
- 21 Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 449-490
- 22 Troost E, Hold GL, Smith MG, Chow WH, Rabkin CS, McColl KE, El-Omar EM. The role of interleukin-1beta and other potential genetic markers as indicators of gastric cancer risk. *Can J Gastroenterol* 2003; 17 Suppl B: 8B-12B
- 23 Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, Castro Alves C, Campos ML, Van Doorn LJ, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 364-371
- 24 Muramatsu A, Azuma T, Okuda T, Satomi S, Ohtani M, Lee S, Suto H, Ito Y, Yamazaki Y, Kuriyama M. Association between interleukin-1beta-511C/T polymorphism and reflux esophagitis in Japan. *J Gastroenterol* 2005; 40: 873-877
- 25 Klausz G, Buzas E, Scharek P, Tiszlavicz L, Gyulai Z, Fulop AK, Falus A, Mandi Y. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric inflammation and local cytokine production in histamine-deficient (histidine decarboxylase knock-out) mice. *Immunol Lett* 2004; 94: 223-228
- 26 Hopman WP, de Jong DJ, Naber AH, Jansen JB. Tumour necrosis factor alpha antibody affects gastrin release in Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 522-525
- 27 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
- 28 Suzuki H, Minegishi Y, Nomoto Y, Ota T, Masaoka T, van den Brink GR, Hibi T. Down-regulation of a morphogen (sonic hedgehog) gradient in the gastric epithelium of *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *J Pathol* 2005; 206: 186-197
- 29 van den Brink GR, Hardwick JC, Tytgat GN, Brink MA, Ten Kate FJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Sonic hedgehog regulates gastric gland morphogenesis in man and mouse. *Gastroenterology* 2001; 121: 317-328

- 30 van den Brink GR, Hardwick JC, Nielsen C, Xu C, ten Kate FJ, Glickman J, van Deventer SJ, Roberts DJ, Peppelenbosch MP. Sonic hedgehog expression correlates with fundic gland differentiation in the adult gastrointestinal tract. *Gut* 2002; 51: 628-633
- 31 Canfield V, West AB, Goldenring JR, Levenson R. Genetic ablation of parietal cells in transgenic mice: a new model for analyzing cell lineage relationships in the gastric mucosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2431-2435

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2005 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表¹

代码	期刊名称	总被引频次	学科内排名	影响因子	学科内排名
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	2665	1	1.062	5
G803	肝脏	369	17	0.428	15
G257	临床内科杂志	383	16	0.289	22
G855	临床消化病杂志	173	24	0.163	28
G261	临床心血管病杂志	589	13	0.289	22
G293	临床血液学杂志	256	22	0.340	19
G662	内科急危重症杂志	134	27	0.172	27
G190	世界华人消化杂志	2079	4	0.485	14
G800	胃肠病学	271	20	0.324	20
G326	胃肠病学和肝病学杂志	292	19	0.282	24
G083	心肺血管病学杂志	154	25	0.192	26
G419	血管病学进展	297	18	0.238	25
G260	心脏杂志	394	15	0.355	17
G610	胰腺病学	137	26	0.589	11
G234	中国动脉硬化杂志	670	12	0.662	10
G267	中国实用内科杂志	1167	8	0.312	21
G444	中国体外循环杂志	68	28	0.354	18
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	415	14	0.563	12
G633	中国血液净化	229	23	0.391	16
G231	中华肝脏病杂志	2014	5	1.573	1
G155	中华内分泌代谢杂志	1249	7	0.981	6
G156	中华内科杂志	2409	3	0.903	7
G161	中华肝脏病学杂志	1003	9	1.077	4
G211	中华糖尿病学杂志	859	11	1.209	3
G285	中华消化内镜杂志	934	10	0.782	9
G168	中华消化杂志	1645	6	0.798	8
G892	中华心律失常学杂志	269	21	0.514	13
G170	中华心血管病学杂志	2622	2	1.272	2
	平均值	849		0.593	

¹中国科技期刊引证报告/潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2006. 10

血红素氧合酶的干预对糖尿病大鼠结肠动力障碍的影响

吴高珏, 林琳, 张红杰, 李学良, 罗云, 王美峰

■背景资料

糖尿病胃肠功能紊乱的发病机制目前仍不清楚, 临床也缺乏有效治疗手段。因此研究糖尿病胃肠动力障碍的发生机制, 为寻找该病新的治疗方法提供理论基础, 具有十分重要的社会和经济意义。

吴高珏, 林琳, 张红杰, 李学良, 罗云, 王美峰, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

吴高珏, 南京医科大学硕士研究生在读, 主要从事胃肠动力性疾病方面的研究。

江苏省“135工程”医学重点人才基金项目, No. 苏卫科教[2003]19号

江苏省自然科学基金项目, No. BK2004158

通讯作者: 林琳, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科. lin9100@yahoo.com.cn

电话: 025-83718836-6920

收稿日期: 2006-10-10 接受日期: 2006-11-02

Effect of interference in heme oxygenase on colonic dysfunction of diabetic rats

Gao-Jue Wu, Lin Lin, Hong-Jie Zhang, Xue-Liang Li, Yun Luo, Mei-Feng Wang

Gao-Jue Wu, Lin Lin, Hong-Jie Zhang, Xue-Liang Li, Yun Luo, Mei-Feng Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by the Fund from “135 Project” for the Key Talents of Health and Science Education Department of Jiangsu Province, No[2003]19, and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2004158

Correspondence to: Dr. Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lin9100@yahoo.com.cn

Received: 2006-10-10 Accepted: 2006-11-02

Abstract

AIM: To investigate the effect of heme oxygenase (HO) interference on the colonic dysfunction in rats with diabetes mellitus (DM).

METHODS: DM model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) in Sprague and Dawley rats. Six weeks later, the diabetic rats were validated to be suffered with gastrointestinal dysfunction using charcoal (Indian ink) propulsion experiment. Then the rest rats were randomly divided into 4 groups, named group A (normal control), B (diabetic rats without interference), C (diabetic rats administrated with Hemin, the inducer of HO) and D [diabetic rats administrated with zinc protoporphyrin IX (ZnPP IX), the inhibitor of HO]. The weight and blood glucose of the rats were

tested. Three more weeks later, the motilities of the strips isolated from the proximal and distal colon were recorded. The level of HO in the colon was also detected by immunohistochemistry and Western blot.

RESULTS: The model of diabetic rats suffered with gastrointestinal dysfunction was successfully duplicated. Administration of Hemin or ZnPP IX had no effect on the weight or blood glucose of diabetic rats ($P > 0.05$). There was no significant difference in HO-2 expression of the distal colon between the diabetic rats with or/and without interference ($P > 0.05$). But in comparison with the controls, HO-2 expression of the proximal colon in group B, C or D was significantly declined (Western blot: 1.20 ± 0.09 , 1.08 ± 0.11 , 1.10 ± 0.08 vs 1.66 ± 0.14 , $P < 0.05$). The colonic expression of HO-1 was not significantly different between group A and B (Western blot: proximal 0.22 ± 0.02 vs 0.22 ± 0.03 ; distal 0.23 ± 0.03 vs 0.23 ± 0.03 ; both $P > 0.05$), but HO-1 expression was markedly higher in group C (proximal 0.66 ± 0.09 ; distal 0.47 ± 0.07) than that in the former two groups ($P < 0.05$); the expression of HO-1 was hardly found in group D. In comparison with those in group B, the gastrointestinal propulsion rate ($54.4\% \pm 2.9\%$ vs $63.0\% \pm 1.2\%$, $P < 0.05$), spontaneous contraction frequencies, amplitudes, and reaction to acetylcholine of colonic smooth muscles were dramatically declined in group C ($P < 0.05$), while those (gastrointestinal propulsion rate: $72.5\% \pm 2.6\%$ vs $63.0\% \pm 1.2\%$, $P < 0.05$) in group D were markedly improved (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: HO interference has no effect on the body weight or blood glucose of diabetic rats. The induction of HO-1 may aggravate the decline of colonic motility in diabetic rats, while HO-1 blockage may improve the declined colonic motility.

Key Words: Heme oxygenase; Colonic dysfunction; Diabetes mellitus; Hemin; Zinc protoporphyrin IX

Wu GJ, Lin L, Zhang HJ, Li XL, Luo Y, Wang MF. Effect of interference in heme oxygenase on colonic

dysfunction of diabetic rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(1):14-21

2007;15(1):14-21

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/14.asp>

摘要

目的: 探讨血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)的干预对糖尿病(diabetes mellitus, DM)大鼠结肠动力障碍的影响。

方法: 链脲佐菌素ip建立DM模型, 饲养6 wk时以碳沫推进实验证实DM大鼠存在胃肠慢传输运动后, 所有大鼠分为正常对照组、DM未干预组、DM+Hemin组[予HO诱导剂正铁血黄素(Hemin)]及DM+ZnPP组[予HO阻滞剂锌原卟啉(zinc protoporphyrin IX, ZnPP IX)]; 监测体质量、血糖。饲养9 wk时再测胃肠推进率, 离体肌条实验记录结肠平滑肌条自发收缩反应及对Ach的反应性, Western blot及免疫组化检测近、远端结肠HO的表达。

结果: 6 wk时DM大鼠胃肠慢传输运动模型建立。HO干预对DM大鼠体质量、血糖无影响($P>0.05$)。9 wk时Western blot示DM未干预组(1.20 ± 0.09)、DM+Hemin组(1.08 ± 0.11)及DM+ZnPP组(1.10 ± 0.08)近端结肠HO-2表达无显著差异($P>0.05$), 但均较正常对照组(1.66 ± 0.14)显著减少($P<0.05$); 各实验组远端结肠HO-2表达无差异。正常对照组与DM未干预组近、远端结肠HO-1的表达无差异(Western blot示HO-1/ α -tubulin: 近端结肠 0.22 ± 0.02 vs 0.22 ± 0.03 ; 远端结肠 0.23 ± 0.03 vs 0.23 ± 0.03 , $P>0.05$); DM+Hemin组结肠HO-1的表达(近端结肠 0.66 ± 0.09 ; 远端结肠 0.47 ± 0.07)较前两组显著增多($P<0.05$); DM+ZnPP组结肠HO-1基本无表达。DM+Hemin组胃肠推进指数($54.4\%\pm2.9\%$ vs $63.0\%\pm1.2\%$, $P<0.05$)、结肠平滑肌条自发收缩频率、波幅和对Ach的反应性较DM未干预组显著下降($P<0.05$), 而DM+ZnPP组胃肠推进指数($72.5\%\pm2.6\%$ vs $63.0\%\pm1.2\%$, $P<0.05$)、结肠平滑肌条自发收缩频率、波幅和对Ach的反应性较DM未干预组明显改善($P<0.05$)。

结论: HO干预(诱导或阻断), 对DM大鼠体质量、血糖无影响。诱导HO-1使DM大鼠慢传输型结肠动力障碍加重, 而阻断HO-1可能改善DM大鼠慢传输型结肠动力障碍。

关键词: 血红素氧合酶; 糖尿病; 结肠动力障碍; 正铁血黄素; 锌原卟啉

吴高珏, 林琳, 张红杰, 李学良, 罗云, 王美峰. 血红素氧合酶的干预对糖尿病大鼠结肠动力障碍的影响. 世界华人消化杂志

0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)胃肠动力障碍是糖尿病极为常见的并发症, 发病率达70%^[1-2]。病理生理特点是胃肠张力和收缩力下降、蠕动减慢、排空延迟^[3]。便秘可见于25%左右的DM患者^[4], 成为糖尿病胃肠动力障碍突出症状之一。有关DM胃肠动力障碍的机制尚不完全清楚。近年来, 气体信使一氧化碳(carbon monoxide, CO)作为一种胃肠道抑制性神经递质^[5], 在胃肠动力障碍性疾病中的作用受到重视。内源性CO主要由血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)催化血红素分解产生, 人体内HO有3种同工酶, 即: HO-1, HO-2和HO-3。本研究借助糖尿病大鼠胃肠动力障碍模型, 对胃肠道HO进行干预, 探讨HO在糖尿病结肠动力障碍中的作用及其病理生理意义。

1 材料和方法

1.1 材料 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ), 正铁血黄素(Hemin), 锌原卟啉(zinc protoporphyrin IX, ZnPP IX), 乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)购自美国Sigma公司; c-kit兔抗鼠多克隆抗体(sc-168), HO-1兔抗鼠多克隆抗体(sc-10789), HO-2兔抗鼠多克隆抗体(sc-11361)购自美国Santa Cruz Biotechnology公司; SP免疫组化试剂盒购自福州迈新生物公司; 多道水平高感度离体器官实验系统(日本国立医学生理研究所), RM6240生物信号采集处理系统(成都仪器厂), Indian墨水购自南京晚晴化玻仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病模型的建立和实验分组 ♂ SD大鼠(上海斯莱克公司), 体质量200-250 g, SPF环境饲养。DM模型建立: 大鼠按60 mg/kg体质量一次性ip STZ^[6-7], 3 d后尾静脉采血测血糖, 血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 并能维持1 wk以上, 确定为DM模型建立成功。血糖 <16.7 mmol/L者剔除实验。正常对照组一次性ip等量的柠檬酸缓冲液。所有进入实验的大鼠均每周监测记录血糖和体质量变化。实验分组: 第一阶段: 饲养6 wk时, 随机选取DM大鼠和正常大鼠各8只, 行碳沫推进实验, 确认有无胃肠动力障碍。第二阶段: 剩余大鼠分为正常对照组($n=8$), DM未干预组($n=8$), DM+Hemin组($n=8$)和DM+ZnPP组($n=8$)。自饲养6 wk起予以干预: (1)DM+Hemin

■ 研发前沿

糖尿病结肠动力障碍是糖尿病极为常见的并发症, 其发病机制目前仍不清楚。近来CO/HO体系在胃肠动力障碍性疾病中的病理生理作用已成为研究热点。

■ 相关报道

CO/HO体系在神经、心血管、呼吸、泌尿等系统已有较多的报道,已有对以上系统HO干预的研究,且关于其在胃肠道的表达及与相关疾病的关联也有较多报道。

表 1 大鼠(9 wk)体质量、血糖值及胃肠推进指数($n = 8$)

分组	体质量(g)	血糖(mmol/L)	胃肠推进指数(%)
正常对照组	564.38 ± 37.75	5.03 ± 0.41	71.8 ± 2.0
DM未干预组	300.63 ± 50.21 ^a	25.91 ± 2.94 ^a	63.0 ± 1.2 ^a
DM+Hemin组	302.25 ± 45.36 ^a	26.55 ± 1.85 ^a	54.4 ± 2.9 ^{ac}
DM+ZnPP组	300.25 ± 48.44 ^a	26.39 ± 2.27 ^a	72.5 ± 2.6 ^c

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs DM未干预组。

组: 6 wk起隔日ip Hemin 30 μ mol/kg 3 wk后处死; (2)DM+ZnPP组: 6 wk起隔日ip ZnPP IX 10 μ mol/kg 3 wk后处死(Hemin和ZnPP IX均以0.1 mol/L NaOH溶液溶解,再以0.1 mol/L磷酸盐缓冲液调pH至7.4); (3)正常对照组和DM未干预组: 均6 wk起隔日ip 0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4) 3 wk后处死。分别采集各组大鼠近端、远端结肠各长0.5 cm。

1.2.2 碳末推进实验(胃肠推进指数) 所有大鼠监测血糖、体质量。处死前行碳末推进实验: 禁食12 h后,给予Indian墨水(10 mL/kg)灌胃,30 min后将大鼠颈椎脱臼处死,剖腹取出全部胃肠道,测量并计算无张力下胃肠推进指数(墨水前端至幽门括约肌距离/幽门括约肌至肛门距离 $\times 100\%$)^[8]。

1.2.3 离体平滑肌条实验 处死大鼠后,按常规分别取近端结肠纵行肌肌条(longitudinal muscle of proximal colon, LMPC)、近端结肠环行肌肌条(circular muscle of proximal colon, CMPC)、远端结肠纵行肌肌条(longitudinal muscle of distal colon, LMDC)和远端结肠环行肌肌条(circular muscle of distal colon, CMDC),各长7 mm、宽1 mm^[9];肌条固定于浴槽中,与张力换能器相连,给予0.5 g的预张力,持续灌流含950 mL/L O₂+50 mL/L CO₂的37℃恒温Kreb液,以“RM6240生物信号采集系统”记录平滑肌条自发性等长收缩活动,测定近、远端结肠纵、环行肌条平均波幅、收缩频率;在平滑肌条自发收缩稳定后,在浴槽中加入10⁻² mol/L Ach,记录肌条反应情况,测定运动指数(即加入Ach后反应曲线的曲线下面积)。

1.2.4 Western blot测定结肠组织HO-1和HO-2表达 HO-1: 结肠组织提取的蛋白样品80 μ g, SDS-PAGE凝胶电泳分离后,90 V电转膜1.5 h,将蛋白转印至PVDF膜。50 g/L脱脂奶粉于室温封闭2 h,加入1:150稀释的HO-1兔抗鼠多克隆抗体,

4℃孵育过夜。TBST洗膜后,加1:10 000 HRP标记羊抗兔单克隆二抗(Vector公司),室温孵育1 h, TBST洗膜,加入化学发光剂至膜上1 min,最后曝光、显影。HO-2: 方法同上,上样量为30 μ g,一抗为HO-2兔抗鼠多克隆抗体,以1:500稀释。所得图片扫描入计算机, GIS凝胶图像处理系统软件对目标条带及内参(α -tubulin)条带进行灰度扫描分析。

1.2.5 免疫组化(SP法)及结果判断 常规固定、包埋、切片、梯度脱蜡、染色。HO-1一抗浓度为1:30, HO-2一抗浓度为1:50,苏木素衬染胞核,阳性结果判断: 显微镜下胞质出现棕黄色片状或颗粒状物为阳性反应。每张切片选择5个高倍视野($\times 400$ 倍),应用Leica RX250型图像分析系统进行定量灰度扫描, Qwin软件分析并自动计算HO-1和HO-2阳性细胞面积。

统计学处理 所有数据录入SPSS 11.0统计软件包,以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,进行单因素方差分析,组间比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 大鼠体质量、血糖值、胃肠推进指数 第一阶段(6 wk): DM建模6 wk后。(1)体质量(g): DM大鼠(258.38 $\pm$ 52.35)较对照组(436.38 $\pm$ 19.87)显著下降($P < 0.05$); (2)血糖(mmol/L): DM大鼠(25.95 $\pm$ 2.71)较对照组(4.73 $\pm$ 0.42)显著升高($P < 0.05$); (3)胃肠推进指数: DM大鼠(61.4% $\pm$ 3.7%)较对照组(71.9% $\pm$ 4.3%)显著减低($P < 0.05$),证实糖尿病胃肠慢传输型动力障碍模型建立^[10]。

第二阶段(9 wk): DM建模6 wk并干预3 wk后: (1)DM未干预组大鼠较正常对照组体质量显著下降,血糖显著升高,胃肠推进指数显著减低($P < 0.05$); (2)DM+Hemin组及DM+ZnPP组大鼠体质量、血糖较DM未干预组无显著差异

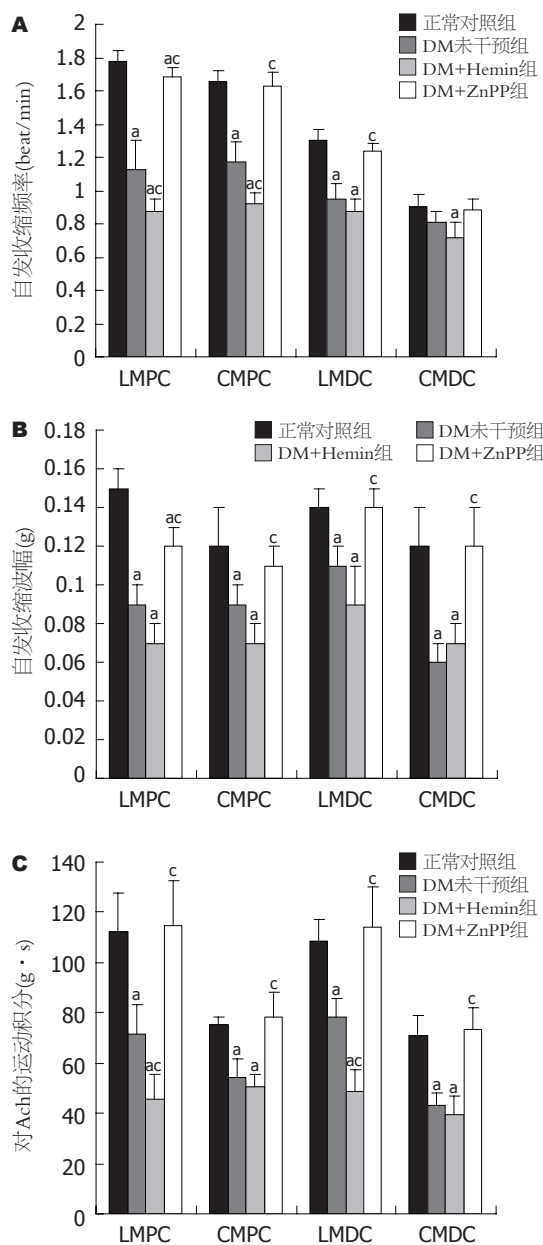


图1 近、远端结肠平滑肌条。A: 自发收缩频率; B: 自发收缩波幅; C: 对ACh的运动积分。LMPC: 近端结肠纵行肌; CMPC: 近端结肠环行肌; LMDC: 远端结肠纵行肌; CMDC: 远端结肠环行肌; * $P<0.05$ vs 正常对照组; [†] $P<0.05$ vs DM未干预组。

($P>0.05$); 胃肠推进指数: DM+Hemin组较DM未干预组显著减低($P<0.05$); 而DM+ZnPP组较DM未干预组明显改善($P<0.05$), 且与正常对照组无显著差异($P>0.05$, 表1)。

2.2 各组大鼠(9 wk)近、远端结肠平滑肌条自发收缩的频率、波幅及运动指数 DM未干预组大鼠较正常对照组显著降低($P<0.05$); DM+Hemin组较DM未干预组更加降低, 尤以近端结肠为显著($P<0.05$); 而DM+ZnPP组则较DM未干预组有明显改善($P<0.05$), 部分指标已达到正常对照组

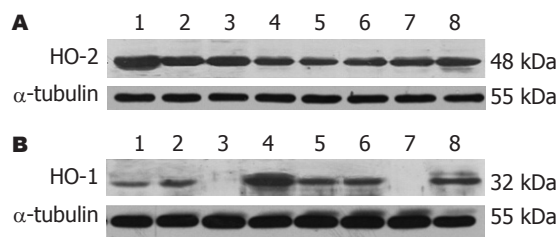


图2 实验各组大鼠近、远端结肠HO-2和HO-1的表达(Western blot)。A: HO-2; B: HO-1。1: 正常对照组近端结肠; 2: DM未干预组近端结肠; 3: DM+ZnPP近端结肠; 4: DM+Hemin近端结肠; 5: 正常对照组远端结肠; 6: DM未干预组远端结肠; 7: DM+ZnPP远端结肠; 8: DM+Hemin远端结肠。

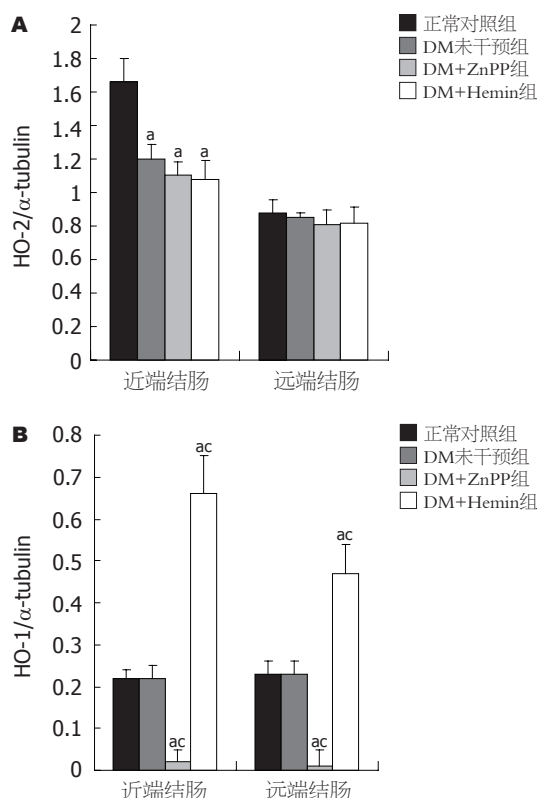


图3 Western blot灰度扫描分析(灰度值之比)。A: HO-2/α-tubulin; B: HO-1/α-tubulin。* $P<0.05$ vs 正常对照组; [†] $P<0.05$ vs DM未干预组。

水平($P>0.05$, 图1)。

2.3 Western blot检测各组大鼠(9 wk)近、远端结肠HO-1和HO-2的表达 HO-2: 近端结肠: DM未干预组、DM+Hemin组及DM+ZnPP组HO-2的表达无显著差异($P>0.05$), 但均较对照组显著减少($P<0.05$)。远端结肠: 各实验组HO-2的表达无显著差异($P>0.05$, 图2A, 图3A); HO-1: 正常对照组与DM未干预组近、远端结肠HO-1的表达无显著差异($P>0.05$), DM+Hemin组近、远端结肠HO-1的表达较前两组显著增多($P<0.05$), 且尤以

创新盘点

本研究首次对结肠HO进行干预, 并综合运用分子生物学及机能学的实验方法, 验证了干预的有效性及其对糖尿病大鼠结肠动力产生的显著影响。

■应用要点

本研究对HO的干预显著影响了糖尿病大鼠的结肠动力, 这一发现有望为糖尿病胃肠功能障碍开拓新的治疗靶点.

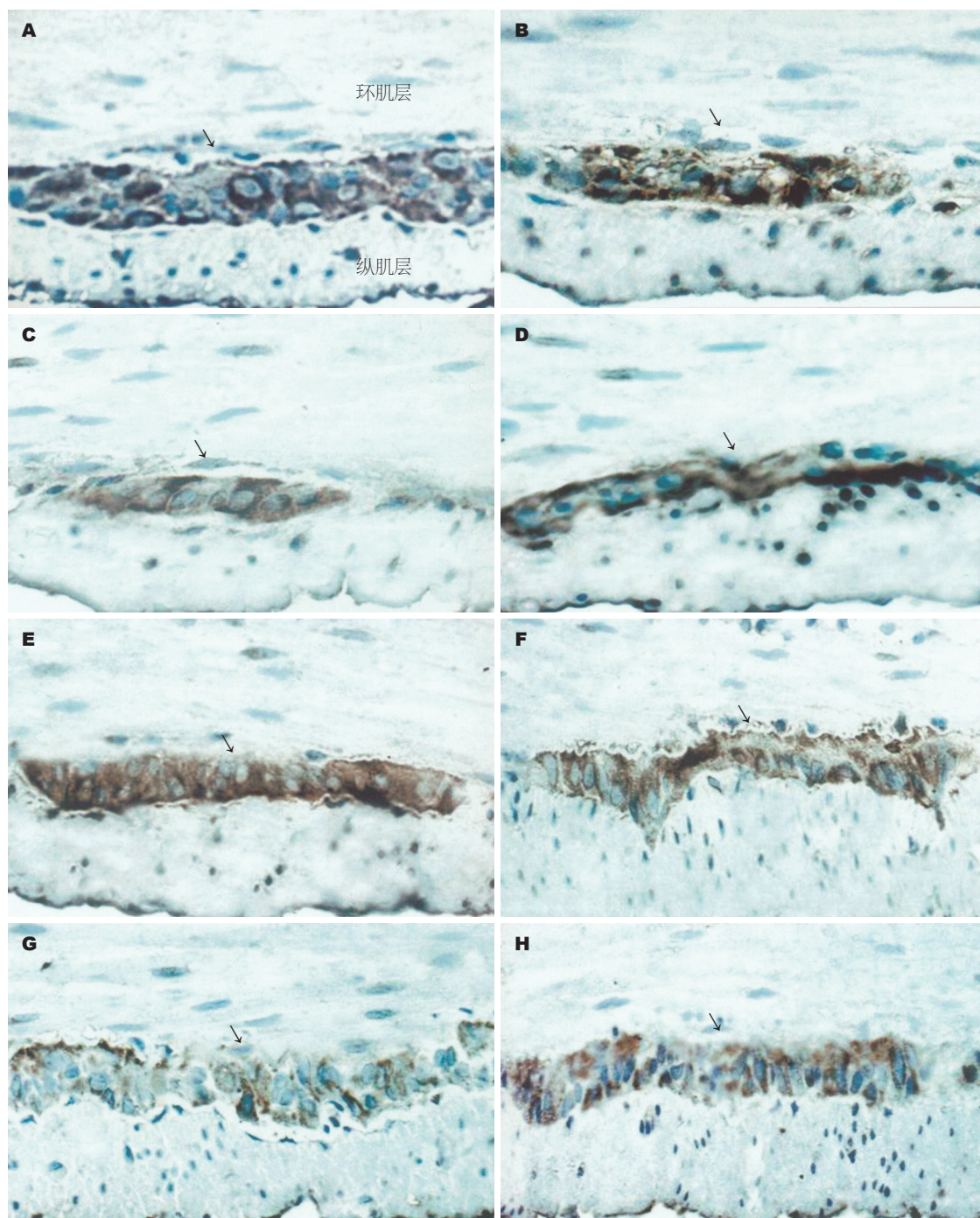


图4 实验各组大鼠近、远端结肠HO-2的表达($\times 400$ 倍). A: 正常对照组近端结肠; B: DM未干预组近端结肠; C: DM+ZnPP组近端结肠; D: DM+Hemin组近端结肠; E: 正常对照组远端结肠; F: DM未干预组远端结肠; G: DM+ZnPP组远端结肠; H: DM+Hemin组远端结肠.

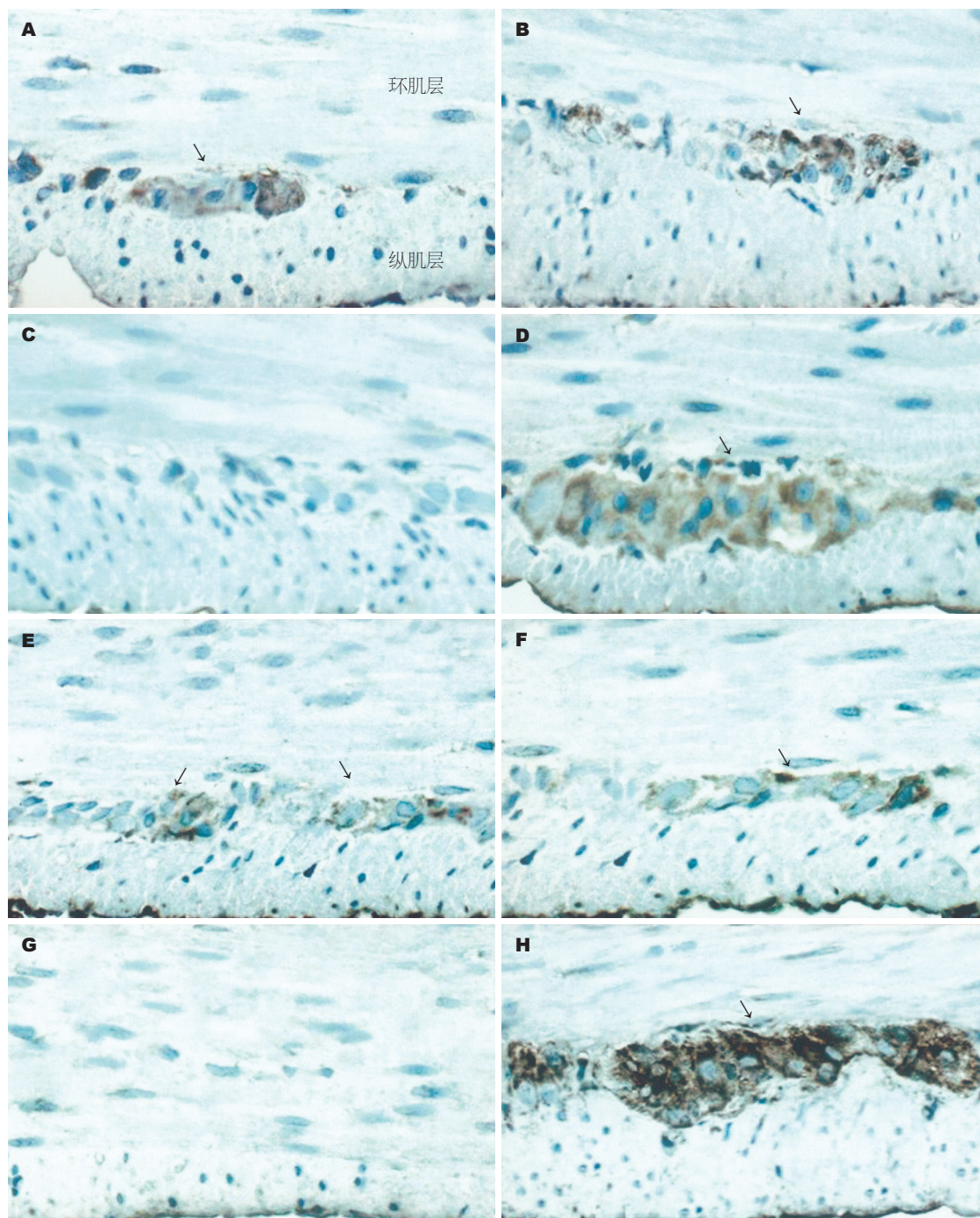
近端结肠显著; DM+ZnPP组近、远端结肠HO-1基本均无表达(图2B, 图3B).

2.4 免疫组化检测各组大鼠(9 wk)近、远端结肠HO-1和HO-2的分布和表达 HO-1和HO-2阳性细胞主要分布于结肠肌间神经丛和黏膜下神经丛, 尤以肌间神经丛为著, 环肌和纵肌内亦有少量分布. 免疫组化显示, 各实验组大鼠(9 wk)近、

远端结肠HO-1和HO-2的表达情况与Western blot的结果相似(图4-5).

3 讨论

糖尿病结肠动力障碍是糖尿病常见的并发症之一, 严重影响人们的生活质量. 该病以腹胀和便秘为主要临床表现, 以结肠张力和收缩力低



■名词解释

血红素氧合酶 (HO): 在体内分布广泛, 血红素在其作用下生成胆绿素、内源性CO和 Fe^{2+} 。CO是继NO后发现的又一具有重要生理作用的气体分子, 作为胃肠道抑制性的神经递质, CO通过活化鸟苷酸环化酶介导平滑肌舒张, 且大多数学者认为CO在胃肠道肌层是个超极化因子。

图 5 实验各组大鼠近、远端结肠HO-1的表达($\times 400$ 倍)。A: 正常对照组近端结肠; B: DM未干预组近端结肠; C: DM+ZnPP组近端结肠; D: DM+Hemin组近端结肠; E: 正常对照组远端结肠; F: DM未干预组远端结肠; G: DM+ZnPP组远端结肠; H: DM+Hemin组远端结肠。

下、蠕动减慢、排空延迟^[11]为病理生理特点。目前, DM胃肠动力障碍的机制尚不完全清楚, 可能与自主神经、Cajal间质细胞及胃肠平滑肌病变、高血糖和激素分泌异常等多种因素有关^[12-14], 临床缺乏有效的治疗手段。HO有3个同工酶, 为诱导型HO-1、结构型HO-2和HO-3。生理情况下, HO-2在胃肠道分布较丰富^[15], HO-1

表达较少^[16], 但在疾病、损伤等情况下(包括血红素、内毒素、紫外线、重金属和NO等)可诱导HO-1的表达升高, 这些诱导剂的共同特征是可以产生氧化应激。HO-3不能分解血红素, 其作用尚不清楚^[17]。在胃肠道, HO主要产生于神经元、神经纤维、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、Cajal间质细胞中^[18-20]。目前研究认为, 在

■同行评价

本文用血红素氧合酶干预观察对糖尿病大鼠结肠动力障碍的影响,发现HO的干预可以影响糖尿病结肠动力改变,阻滞HO-1能改善糖尿病结肠动力障碍,而诱导HO-1则加重结肠动力障碍,有较高的学术价值。

DM较长的病程中,上述细胞逐步发生不同程度的病变^[14,21]。本实验中所观察到的DM未干预组近端结肠HO-2的表达较正常对照组减少,与上述产生HO的细胞随DM病程进展而逐步病变的过程相符,但这一改变在DM未干预组远端结肠却不甚明显。而对于HO-1,本实验发现,DM未干预组HO-1表达并未下降,可能是DM病程中(或者某一阶段)发生了氧化应激^[22],诱导HO-1生成,使病变轻或残余的HO表达细胞代偿性的产生一定的HO-1;但如果DM病程继续延长,HO-1将发生怎样的变化,有待进一步研究。

我们应用Hemin和ZnPP IX分别作为HO的诱导剂和阻滞剂^[23-25], Western blot和免疫组化结果显示, DM+Hemin(HO的诱导剂)组结肠HO-1的表达较正常对照组和DM未干预组显著增多,而DM+ZnPP(HO的阻滞剂)组近、远端结肠HO-1基本无表达,证实了本实验对HO的干预是成功的。但HO-2作为结构型HO,表达不易受到干预的影响,文献认为仅肾上腺皮质激素能诱导其生成,本实验以小剂量Hemin对HO-2干预作用不明显,与文献结果相符;本实验中,无论DM+Hemin组或DM+ZnPP组,HO-2的表达较DM未干预组均无显著差异,以小剂量ZnPP IX对HO-2进行干预,作用不明显,其机制不详。以往我们的实验提示,DM大鼠建模6 wk后,开始出现胃肠推进率下降^[26],本实验再次证实糖尿病大鼠建模6 wk后,胃肠慢传输型动力障碍已经出现。在DM大鼠已产生胃肠慢传输运动的基础上,我们以Hemin和ZnPP IX对DM大鼠进行干预。在DM+Hemin组,结肠HO-1的表达显著增多,尤以近端结肠更为显著;碳末推进实验及离体平滑肌条实验均证实结肠慢传输型动力障碍较DM未干预组进一步加重,同样以近端结肠更为显著。这与Kadinov *et al*^[27]在体外以Hemin对豚鼠HO-1进行诱导,使胃平滑肌条兴奋性下降的结果一致,且他们发现,HO的阻滞剂锡原卟啉IX(Sn-protoporphyrin IX, SnPP IX)可阻断这一现象。同时,本实验发现DM+ZnPP组,近、远端结肠HO-1的表达被阻滞,而其结肠慢传输型动力障碍较DM未干预组明显改善,胃肠推进率及离体平滑肌条实验均提示其结肠动力已恢复到与正常对照组相似的水平。

研究认为,血红素在HO的作用下降解产生内源性CO。在胃肠道,内源性CO作为一种非胆碱能、非肾上腺素能抑制性神经递质,主要通过cGMP途径介导胃肠道平滑肌舒张,即CO与

鸟苷酸环化酶中血红素基团上的铁原子结合,激活该酶,增加细胞内cGMP的生成,降低胞质中的Ca²⁺,介导平滑肌舒张^[28-30],胃肠运动减慢。本实验中,干预HO-1,使内源性CO这一抑制性神经递质的生成发生变化,进而影响DM结肠运动的改变,提示CO可能是DM大鼠结肠慢传输动力障碍的重要机制之一。

总之,HO的干预可以影响糖尿病结肠动力,阻滞HO-1可能改善糖尿病结肠动力障碍,而诱导HO-1则加重结肠动力障碍。至于HO的干预是否还通过其他机制影响糖尿病结肠动力仍有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Troncon LE, Lopes RP, Simao MN, Iquegami M, Rosa-e-Silva L, Nobre-e-Souza MA, Foss MC. Frequency of digestive symptoms in Brazilian patients with Diabetes Mellitus. *Rev Assoc Med Bras* 2001; 47: 157-164
- 2 Ko GT, Chan WB, Chan JC, Tsang LW, Cockram CS. Gastrointestinal symptoms in Chinese patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999; 16: 670-674
- 3 Iida M, Ikeda M, Kishimoto M, Tsujino T, Kaneto H, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Watarai T, Yamasaki Y, Hori M. Evaluation of gut motility in type II diabetes by the radiopaque marker method. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 381-385
- 4 Talley NJ, Young L, Bytzer P, Hammer J, Leemon M, Jones M, Horowitz M. Impact of chronic gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus on health-related quality of life. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 71-76
- 5 Johnson RA, Johnson FK. The effects of carbon monoxide as a neurotransmitter. *Curr Opin Neurol* 2000; 13: 709-713
- 6 Yi CR, Wei ZQ, Deng XL, Sun ZY, Li XR, Tian CG. Effects of coffee and caffeine on bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 1037-1043
- 7 Nicolau J, Souza DN, Nogueira FN. Activity, distribution and regulation of phosphofructokinase in salivary gland of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Pesqui Odontol Bras* 2006; 20: 108-113
- 8 乔娴, 刘劲松, 吴汉妮, 侯晓华. 糖尿病大鼠胃肠运动障碍的实验研究. *胃肠病学和肝病杂志* 1998; 9: 242-244
- 9 周吕, 柯美云. 胃肠动力学基础与临床. 北京: 科学出版社 1999: 294-295
- 10 Zhang Y, Zhang K, Luo J, Qi H. Changes of ultrastructure characteristics of Cajal interstitial cell in intestinal tract of diabetic rats. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2002; 41: 310-312
- 11 Jung HK, Kim DY, Moon IH, Hong YS. Colonic transit time in diabetic patients-comparison with healthy subjects and the effect of autonomic neuropathy. *Yonsei Med J* 2003; 44: 265-272
- 12 El-Salhy M. Neuroendocrine peptides of the gastrointestinal tract of an animal model of human type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 1998; 35:

- 194-198
- 13 Koch KL. Diabetic gastropathy: gastric neuromuscular dysfunction in diabetes mellitus: a review of symptoms, pathophysiology, and treatment. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1061-1075
- 14 Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Vanderwinden JM, Takakura R, Kinoshita K, Miyagawa J, Chen H, Miyazaki Y, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 666-670
- 15 Chen Y, Lui VC, Sham MH, Tam PK. Distribution of carbon monoxide-producing neurons in human colon and in Hirschsprung's disease patients. *Hum Pathol* 2002; 33: 1030-1036
- 16 Barton SG, Rampton DS, Winrow VR, Domizio P, Feakins RM. Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study. *Cell Stress Chaperones* 2003; 8: 329-334
- 17 McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997; 247: 725-732
- 18 Miller SM, Reed D, Sarr MG, Farrugia G, Szurszewski JH. Haem oxygenase in enteric nervous system of human stomach and jejunum and co-localization with nitric oxide synthase. *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 121-131
- 19 Piotrowska AP, Solari V, de Caluwe D, Puri P. Immunocolocalization of the heme oxygenase-2 and interstitial cells of Cajal in normal and aganglionic colon. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 73-77
- 20 Oates PS, West AR. Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4281-4295
- 21 Guo C, Quobatar A, Shangguan Y, Hong S, Wiley JW. Diabetic autonomic neuropathy: evidence for apoptosis in situ in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 335-345
- 22 Shin CS, Moon BS, Park KS, Kim SY, Park SJ, Chung MH, Lee HK. Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care* 2001; 24: 733-737
- 23 Huang TY, Tsai PS, Wang TY, Huang CL, Huang CJ. Hyperbaric oxygen attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury involves heme oxygenase-1. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49: 1293-1301
- 24 Huang XL, Ling YL, Ling YQ, Zhou JL, Liu Y, Wang QH. Heme oxygenase-1 in cholecystokinin-octapeptide attenuated injury of pulmonary artery smooth muscle cells induced by lipopolysaccharide and its signal transduction mechanism. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1789-1794
- 25 Iwasashi H, Suzuki M, Unno M, Utiyama T, Oikawa M, Kondo N, Matsuno S. Inhibition of heme oxygenase ameliorates sepsis-induced liver dysfunction in rats. *Surg Today* 2003; 33: 30-38
- 26 陈娟, 林琳, 许新芳, 张红杰, 林征. 血红素氧合酶-2在糖尿病大鼠结肠组织中的表达及意义. 南京医科大学学报(自然科学版) 2006; 26: 14-16
- 27 Kadinov B, Itzev D, Gagov H, Christova T, Bolton TB, Duridanova D. Induction of heme oxygenase in guinea-pig stomach: roles in contraction and in single muscle cell ionic currents. *Acta Physiol Scand* 2002; 175: 297-313
- 28 Rattan S, Chakder S. Influence of heme oxygenase inhibitors on the basal tissue enzymatic activity and smooth muscle relaxation of internal anal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 1009-1016
- 29 Kwon S, Chung S, Ahn D, Yeon D, Nam T. Mechanism of carbon monoxide-induced relaxation in the guinea pig ileal smooth muscle. *J Vet Med Sci* 2001; 63: 389-393
- 30 姜柳琴, 林琳. 血红素氧合酶/一氧化碳体系在胃肠道的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1612-1616

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于 2005年世界华人消化杂志指标检索报告

本刊讯 2005年度《世界华人消化杂志》的总被引频次为2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位. 2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位. 《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46. (世界胃肠病学杂志社2006-10-27)

缬草波春诱导MKN-45胃癌细胞凋亡

叶建明, 胡品津, 易粹琼, 薛存宽, 呼闯营, 陈凤鸣, 钱伟

■背景资料

缬草波春是一种从纯中药神农缬草中所提取的化合物, 国外80-90年代一些体外实验表明, 缬草波春的活性成分二氢缬草酸酯(didrovaltrate)缬草三酯(valtrate)及其代谢降解产物缬草醛(baldrinal)对肝细胞癌细胞、Kreb's II 腹水癌细胞、骨髓造血祖细胞(CFU-GM, CFU-Eos)和人T2淋巴细胞有抑制作用, 是否对胃癌细胞有抑制作用及作用机制如何未见报道。本文课题组前期研究发现, 缬草波春对S-180腹水癌、结肠癌、肝癌有明显抑制作用, 本研究通过Caspase抑制剂、P53和Survivin对缬草波春诱导凋亡的影响, 探讨其机制, 为临床寻找价廉、有效和毒副作用小的新药提供理论依据。

叶建明, 中山大学博士后流动站, 中山市人民医院消化内科 广东省中山市 528402

胡品津, 中山大学附属第一医院消化内科 广东省广州市 510080

易粹琼, 呼闯营, 陈凤鸣, 钱伟, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化科 湖北省武汉市 430020

薛存宽, 华中科技大学同济医学院老年医学研究所 湖北省武汉市 430077

叶建明, 医学博士, 副主任医师, 2004年中山大学博士后流动站进站博士, 主要从事消化系统肿瘤研究。

通讯作者: 叶建明, 528402, 广东省中山市石岐区孙文中路2号, 中山市人民医院消化内科。 yjm3839@sina.com

电话: 0760-8840528

收稿日期: 2006-08-08 接受日期: 2006-10-18

Valepotriate-induced apoptosis of gastric cancer cell line MKN-45

Jian-Ming Ye, Pin-Jin Hu, Cui-Qiong Yi, Cun-Kuan Xue, Chuang-Ying Hu, Feng-Ming Chen, Wei Qian

Jian-Ming Ye, Postdoctoral Station of Sun Yat-Sen University; Department of Gastroenterology, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528402, Guangdong Province, China

Pin-Jin Hu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Cui-Qiong Yi, Chuang-Ying Hu, Feng-Ming Chen, Wei Qian, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430020, Hubei Province, China

Cun-Kuan Xue, Institution of Geriatric Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, Hubei Province, China

Correspondence to: Jian-Ming Ye, Postdoctoral Station of Sun Yat-Sen University; Department of Gastroenterology, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528402, Guangdong Province, China. yjm3839@sina.com

Received: 2006-08-08 Accepted: 2006-10-18

Abstract

AIM: To study the apoptosis of gastric cancer cell line MKN-45 induced by valepotriate and its relationship with the expression of Caspase, P53, and Survivin.

METHODS: Gastric cancer cell line MKN-45 was divided into 4 groups, named group A (control), B (treated with Caspase-3, -8 and -9 inhibitors), C (treated with valepotriate) and D (treated with inhibitory agents plus valepotriate), respectively. The apoptosis rates of MKN-45 cells

were tested by fluorescence activated cell sorter (FACS) at different time (24, 48 and 72 h) in each group. After exposure to different concentrations of valepotriate for different time (12, 24, 48 and 72 h), MKN-45 cells were collected and the RNA was extracted by tripure agent. The mRNA expression of Survivin was assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), while the protein expression of P53 and Survivin were detected by immunohistochemical methods 24 hours after exposure to different concentrations of valepotriate (50 and 100 mg/L).

RESULTS: The apoptosis rates of MKN-45 cells were not significantly different between group A and B at 24, 48 and 72 h ($P > 0.05$). The apoptosis rates were significantly higher in MKN-45 cells exposed to valepotriate plus Caspase-3 inhibitor or Caspase-9 inhibitor for 24, 48 and 72 h than those in group A (24 h: 5.73%, 5.41% vs 4.38%, $P < 0.01$; 48 h: 6.88%, 6.32% vs 4.35%, $P < 0.01$; 72 h: 7.72%, 8.62% vs 4.54%, $P < 0.01$), but lower than those in group C (24 h: 5.73%, 5.41% vs 8.14%, $P < 0.01$; 48 h: 6.88%, 6.32% vs 12.31%, $P < 0.01$; 72 h: 7.72%, 8.62% vs 26.41%, $P < 0.01$). The apoptosis rates of MKN-45 cells exposed to valepotriate plus Caspase-8 inhibitor for 24, 48 and 72 h were notably increased in comparison with those in group A (8.02% vs 4.38%, $P < 0.01$; 11.05% vs 4.35%, $P < 0.01$; 24.86% vs 4.54%, $P < 0.01$), but was not significantly different from those in group C ($P > 0.05$). Valepotriate down-regulated the expression of Survivin mRNA in MKN-45 cells in both concentration- and time-dependent manner. Valepotriate also down-regulated the expression of Survivin protein but up-regulated the expression of P53 protein in MKN-45 cells in a concentration-dependent way.

CONCLUSION: Valepotriate-induced apoptosis of MKN-45 cells is correlated with the high expression of P53 protein and low expression of Survivin mRNA and protein, and it can be inhibited by Caspase-3 inhibitor or Caspase-9 inhibitor, but not by Caspase-8 inhibitor.

Key Words: Valepotriate; Apoptosis; Caspase inhibitor; Survivin; P53

Ye JM, Hu PJ, Yi CQ, Xue CK, Hu CY, Chen FM, Qian W. Valopatriate-induced apoptosis of gastric cancer cell line MKN-45. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):22-28

摘要

目的: 研究缬草波春诱导胃癌细胞凋亡, 探讨其诱导凋亡与半胱氨酸酶(Caspase)及生存素(Survivin) mRNA、P53蛋白、Survivin蛋白表达的关系。

方法: 以100 mg/L的缬草波春作用于加Caspase-3抑制剂、Caspase-8抑制剂、Caspase-9抑制剂和未加Caspases抑制剂培养的MKN-45细胞24, 48和72 h, 用流式细胞仪分别检测细胞凋亡率; 不同浓度的缬草波春(5, 10, 25, 50, 100 mg/L)作用MKN-45细胞不同时间(24, 48, 72 h)后, 用tripure提取液提取细胞RNA, 用RT-PCR法, 检测Survivin mRNA的表达。不同浓度缬草波春(50和100 mg/L)作用MKN-45胃癌细胞株24 h后, 用免疫组化的方法, 检测P53蛋白和Survivin蛋白的表达。

结果: 单用Caspase抑制剂组, 作用24, 48和72 h对MKN-45细胞凋亡率无明显影响, 与对照组比较差异无显著意义。Caspase-3抑制剂、Caspase-9抑制剂与缬草波春联合应用后24, 48和72 h使MKN-45细胞凋亡率高于对照组(24 h: 5.73%, 5.41% vs 4.38%, $P<0.01$; 48 h: 6.88%, 6.32% vs 4.35%, $P<0.01$; 72 h: 7.72%, 8.62% vs 4.54%, $P<0.01$), 低于缬草波春组(24 h: 5.73%, 5.41% vs 8.14%, $P<0.01$; 48 h: 6.88%, 6.32% vs 12.31%, $P<0.01$; 72 h: 7.72%, 8.62% vs 26.41%, $P<0.01$), 与对照组及缬草波春组比较差异均有显著意义($P<0.01$)。Caspase-8抑制剂与缬草波春联合应用后24, 48和72 h MKN-45细胞凋亡率明显增加, 与对照组比较差异有显著意义(8.02% vs 4.38%, $P<0.01$; 11.05% vs 4.35%, $P<0.01$; 24.86% vs 4.54%, $P<0.01$), 与单用缬草波春组比较差异无显著意义。缬草波春降低MKN-45胃癌细胞株Survivin mRNA的表达, 并有浓度依赖性和时间依赖性, 而且使MKN-45胃癌细胞株P53蛋白表达增加, Survivin蛋白表达降低, 均有浓度依赖性。

结论: 缬草波春可诱导MKN-45细胞凋亡, 其作用可部分被Caspase-3, Caspase-9抑制剂所抑制, 但不能被Caspase-8抑制剂所抑制。缬草波春诱导MKN-45胃癌细胞株凋亡与P53蛋白表达提高及Survivin mRNA和Survivin蛋白低表达降低有关。

关键词: 缬草波春; 细胞凋亡; 半胱氨酸酶抑制剂; 生存素; P53

叶建明, 胡品津, 易粹琼, 薛存宽, 呼闯营, 陈凤鸣, 钱伟. 缬草波春诱导MKN-45胃癌细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2007;15(1):22-28

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/22.asp>

0 引言

缬草波春是一种从纯中药神农缬草中所提取的化合物, 主要含二氢缬草酸酯(didrovaltrate)缬草三酯(valtrate)及一些萜烯类成分。体外实验表明, 缬草波春的活性成分didrovaltrate, valtrate及其代谢降解产物缬草醛(baldrinal)对肝细胞癌细胞、Kreb's II腹水癌细胞、骨髓造血祖细胞(CFU-GM, CFU-Eos)和人T2淋巴细胞有抑制作用。我们的前期研究发现, 缬草波春对S-180腹水癌、结肠癌、肝癌有明显抑制作用, 动物实验显示, 毒副作用较小, 无明显骨髓抑制作用。半胱氨酸酶(Caspase)是细胞凋亡的重要信号分子, 是执行细胞凋亡的主要酶类, 绝大部分细胞凋亡依赖Caspase的存在。我们通过Caspase抑制剂研究缬草波春诱导凋亡的途径是否依赖Caspase。生存素(Survivin)是新近发现的凋亡抑制因子, 而P53是重要的抗癌因子, 参与化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡的过程。我们试图通过Caspase抑制剂对缬草波春诱导MKN-45胃癌细胞凋亡的影响及缬草波春诱导MKN-45胃癌细胞凋亡P53蛋白、Survivin mRNA及Survivin蛋白的表达阐明其诱导凋亡的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 缬草波春由华中科技大学同济医学院老年医学研究所提供。取缬草波春1 g, 吐温-80 2 g和生理盐水100 mL混合, 4℃冰箱保存备用。MKN-45胃癌细胞由华中科技大学同济医学院协和医院中心实验室提供。Caspase抑制剂购自日本MBL公司, 为多肽类抑制剂, 分别为Caspase-3抑制剂(Z-DEVD-FMK)、Caspase-8抑制剂(Z-IETD-FMK)、Caspase-9抑制剂(Z-LEHD-FMK)。先用高纯度DMSO重构成10 10 mmol/L原液, 再用含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640稀释成2 mmol/L浓度备用。Annexin-V-FITC Kit购自奥地利BenderMedSystems公司。流式细胞仪为B.D公司产品。TRIpure分离试剂购自美国Roche Diagnostic Corp. Ultrasensitive™ S-P超敏试剂盒, 产品编号Kit-9701/9702/9703。

■创新盘点

本研究发现, 缬草波春诱导MKN-45胃癌细胞株凋亡与P53蛋白表达提高及Survivin mRNA和Survivin蛋白低表达降低有关。

购自福州迈新生物技术开发有限公司. Survivin Ab-2(Line4F7), 鼠单抗0.5 mL, 浓度为200 mg/L, 购自美国Labvision公司.

1.2 方法

1.2.1 Caspase抑制剂对缬草波春诱导MKN-45细胞凋亡的影响 取对数生长期MKN-45细胞, 消化后用含100 mL/L FBS的RPMI 1640培养基制成细胞悬液, 接种于6孔板中, 每孔2 mL, 使细胞成指数生长后, 更换新鲜培养基. 1组为对照组, 加等量RPMI 1640培养基. 2组每孔加Caspase抑制剂, 使Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK和Z-LEHD-FMK浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ ^[3]. 3组分别每孔加入缬草波春使其浓度为100 mg/L. 4组每孔同时加上上述浓度的Caspase抑制剂和缬草波春. 分别培养24, 48和72 h, 每24 h更换1次培养基及药物. 终止培养后上流式细胞仪检测、分析.

1.2.2 Survivin RT-PCR引物设计 Survivin引物: 上游引物: 5'-ACCAAGGGTTAATTCTTCA-3', 下游引物: 5'-AGGACCACCGCATCTC-3', 目的片段长度254 bp; β -actin引物: 上游引物: 5'-GGACCTGACTGACTACCTC-3', 下游引物: 5'-TCATCTCCTGCTTGCTG-3', 目的片段长度540 bp. 细胞RNA提取: MKN-45细胞悬液2 mL分别加入10 mL玻璃瓶, 待玻璃瓶底铺满后, 换液并分组. 对照组加等量RPMI 1640培养液, 其余加缬草波春使其浓度分别为5, 10, 25, 50及100 mg/L, 分别培养24, 48及72 h. 到规定培养时间后, 消化、离心收集细胞, 加入TRIpure液0.5 mL. 取溶于TRIpure液中细胞裂解液离心(1000 r/min), 液体分成3层, 取第1层总RNA 4 μg 于一支0.2 mL离心管中, 65-70 $^{\circ}\text{C}$ 保温5 min, 离心数秒, 放置冰浴中. 按规定的程序进行RT-PCR. PCR产物行1.5%琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察.

1.2.3 Survivin蛋白和P53蛋白的测定 (1)细胞涂片制备: 6孔培养板每孔先放入已消毒玻片, 加入含MKN-45细胞的培养液2 mL及浓度分别为50和100 mg/L的缬草波春, 对照组加入同体积的RPMI 1640培养液, 分别培养24及48 h. (2)UltrasensitiveTMS-P免疫组化染色: 试剂盒用生物素标记的第二抗体与链霉素抗生物素蛋白连接的过氧化物酶及底物色素混合来测定细胞和组织中的Survivin蛋白和P53蛋白抗原.

统计学处理 所得数据以mean $\pm$ SD表示, 数据处理用SPSS11.0统计软件, 组间比较用方差分析(F 检验), 与对照组比较用 t 检验.

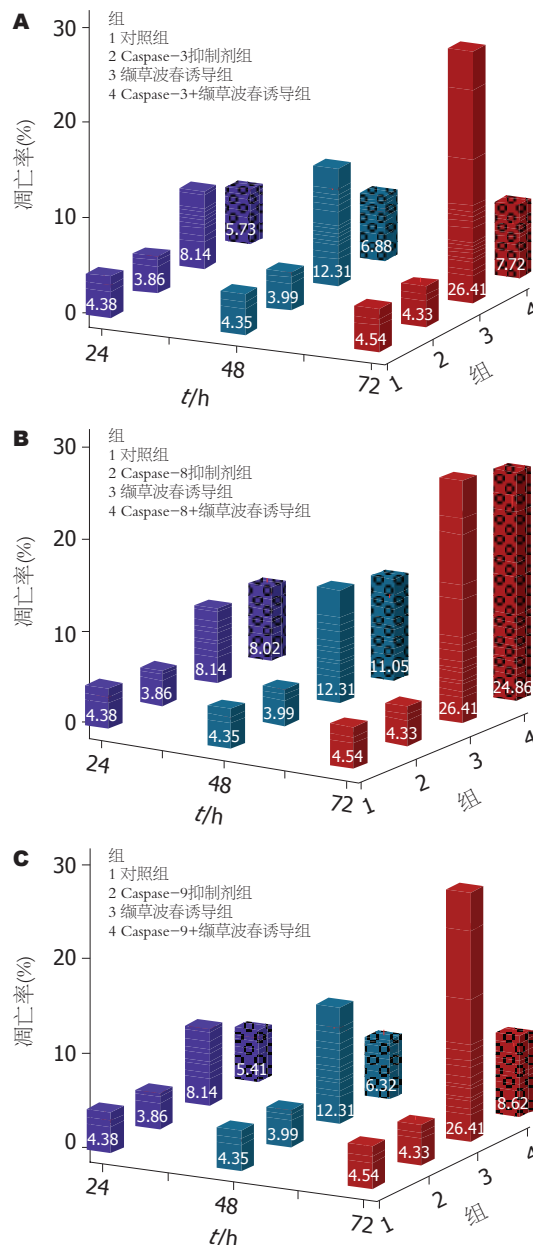


图1 Caspase-3, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK抑制剂对缬草波春诱导MKN-45细胞凋亡的影响. A: Caspase-3; B: Z-IETD-FMK; C: Z-LEHD-FMK.

2 结果

2.1 Caspase抑制剂对缬草波春诱导MKN-45细胞凋亡的影响 Caspase-3抑制剂和缬草波春共同作用的凋亡率低于缬草波春组, 高于对照组, 比较差异有显著意义($P<0.01$, 图1A). Caspase-8抑制剂和缬草波春共同作用的凋亡率高于对照组, 差异有显著意义($P<0.01$), 与缬草波春组比较无显著差异($P>0.05$, 图1B). 图1C与图1A类似.

2.2 缬草波春对MKN-45胃癌细胞Survivin mRNA表达的影响 缬草波春能降低MKN-45胃癌细胞Survivin mRNA的表达, 并有时间依赖性

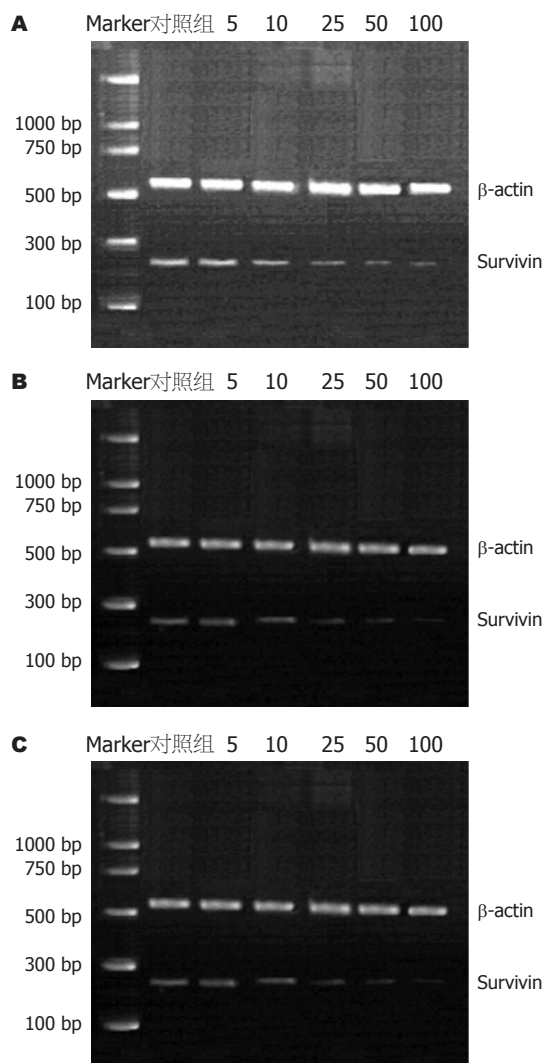


图 2 不同浓度缬草波春(mg/L)作用MKN-45细胞株24, 48, 及72 h Survivin的表达. A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h.

和浓度依赖性(图2).

2.3 缬草波春对MKN-45胃癌细胞P53蛋白和Survivin蛋白表达的影响

2.3.1 P53的表达 P53蛋白主要在细胞核内表达, 对照组表达不明显, 而从低浓度(50 mg/L)组到高浓度(100 mg/L)组表达也随浓度增加而增强(图3).

2.3.2 Survivin的表达 Survivin的表达主要在胞质, 对照组表达最强, 随缬草波春浓度的增加Survivin的表达而减弱(图4).

3 讨论

Caspase抑制剂包括肽类抑制剂、生物性抑制剂和凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis protein, IAPs)^[1-3]. 本实验所用为肽类抑制剂. 目前认为, 诱导细胞凋亡主要有Caspase依赖途径

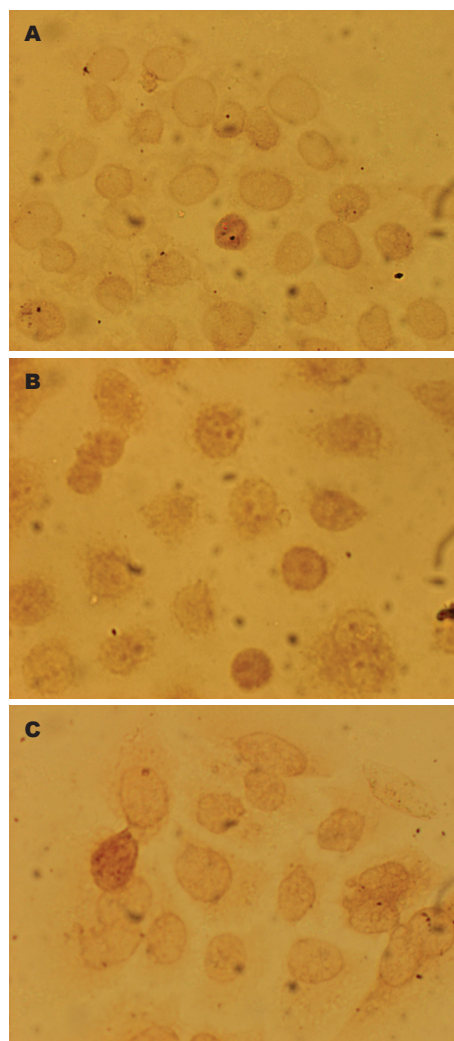


图 3 缬草波春作用MKN-45细胞24 h后P53的表达($\times 400$). A: 对照组; B: 50 mg/L组; C: 100 mg/L组.

和非Caspase依赖途径, 而以Caspase依赖途径为主, Caspase激活有外源性和内源性两条途径^[4-7]. 在外源性途径中, 细胞膜表面的TNF家族受体(Fas)接受外源性刺激信号后, 通过胞质中的蛋白网络传导至上游的启动子蛋白-Caspase-8, 激活启动凋亡程序^[8-9]. 内源性途径的特点是线粒体的参与. 在接受包括DNA损伤在内的各种有害刺激时, 线粒体释放细胞色素C, 细胞色素C可和Apaf-1结合并使之活化, 活化的Apaf-1可以结合并激活Caspase-9, 导致内源性细胞凋亡过程的启动^[10-11]. 活化的Caspase-8和Caspase-9裂解后可激活Caspase-3和下游众多的Caspase, 下游的蛋白酶级联反应是外源和内源途径的共同途径, 其中主要的效应分子是Caspase-3. 当然, 激活Caspase-9及Caspase-3最终还是会激活Caspase-8, 形成正反馈回路, 产

■同行评价

文章是在以往系列工作的基础上的进一步延伸, 具有较高的理论意义.

生级联反应. 整个凋亡激活信号通路十分复杂, 不同信号分子之间相互联系, 不能绝然分开. 本研究显示, 流式细胞学检测发现缬草波春诱导MKN-45细胞凋亡可被Caspase-3抑制剂、Caspase-9抑制剂抑制, 而不被Caspase-8抑制剂抑制. 说明, 缬草波春诱导MKN-45细胞凋亡与Caspase有关, 通过启动内源性凋亡途径实现的, 与外源性凋亡途径无关. 而缬草波春诱导MKN-45细胞凋亡被Caspase-3抑制剂、Caspase-9抑制剂所抑制是不完全的, 可能还有其他途径参与, 有待更深入的研究.

P53是一种肿瘤抑制蛋白, 他控制大多数动物的细胞数, 在组织中广泛表达, 起着稳定染色体、DNA的作用. 当细胞的DNA受到辐射、药物等因素损伤时, P53的N-末端会因磷酸化而影响其和DNA, HDM2结合的能力, 从而被激活, 诱导细胞生长停滞、细胞衰老、分化、细胞凋亡及介导DNA修复. 若损伤的细胞处于G₁期, P53触发细胞周期限制点. 如果细胞已进入S期, P53触发细胞凋亡. P53还通过上调Bax及IGF-BP-3, 抑制Bcl-2, Survivin表达, 从而调控细胞凋亡, 行使抑癌基因功能^[12-14]. 临床上许多肿瘤的发生多是因为P53功能的丧失, 最主要的方式是基因突变, 其他原因有Rb, p16, BRCA1, BRCA2等抑癌基因异常, 同时P53抑癌蛋白的过度表达或P53的共刺激因子的缺乏也可引起P53抑癌功能丧失^[15-17]. 新近发现的ASPP蛋白家族对P53家族的抑癌功能也有重要的影响^[18-20]. 野生型P53蛋白表达的恢复有利于诱发肿瘤细胞的凋亡^[21].

Survivin是新近发现的一个凋亡抑制因子, 是凋亡抑制蛋白家族(IAPs)成员, 正常组织除甲状腺和胎盘表达外均不表达, 在癌组织呈高表达^[22]. Survivin可能的抑癌机制是: Survivin含有IAP家族特有的BIR片段, 通过其本身的BIR结构和Caspase-9结合, 抑制Caspase-9的促凋亡功能; 通过与SMAC(second mitochondria activator of caspase)结合间接促进XIAP的凋亡抑制作用; IAP家族成员之间协同作用; 与P53竞争与Caspase-9的结合; 抑制下游效应分子Caspase-3和Caspase-7^[23-28]. 有实验发现, Survivin下调Survivin基因表达水平可以降低肿瘤细胞凋亡的阈值, 并且其表达与肿瘤细胞的耐药性有关, 其表达下调可增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[29]. Survivin的表达与P53有密切的关系, 目前普遍认为, 野生型P53可抑制Survivin mRNA和蛋白的表达. 转染实验发现, 野生型P53的表达

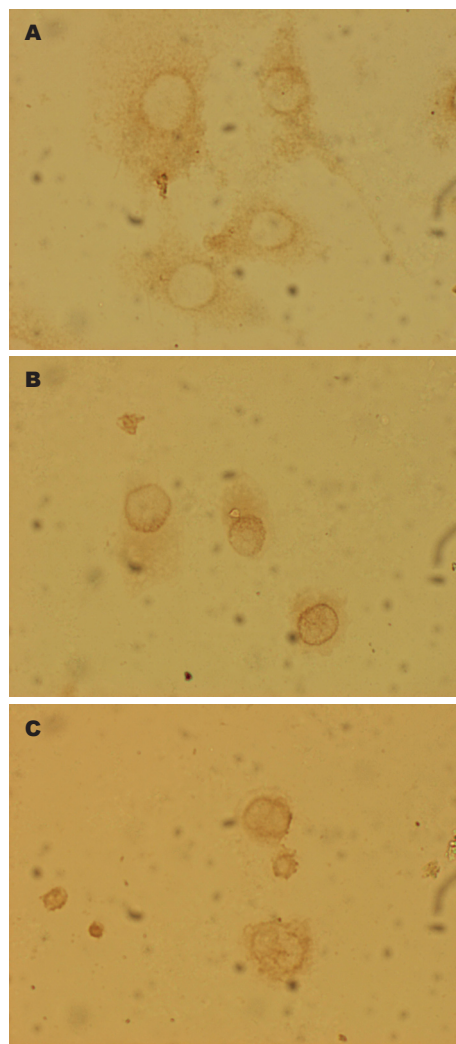


图4 缬草波春作用MKN-45细胞24 h后Survivin的表达($\times 400$). A: 对照组; B: 50 mg/L组; C: 100 mg/L组.

在许多细胞中对Survivin启动子有强烈的抑制作用^[30]. 外源性Survivin的过表达能减低P53诱导的凋亡, 且具有量效关系, 提示Survivin的丧失参与了P53依赖的凋亡旁路^[31]. 免疫学研究提示, P53与Survivin启动子结合, 其结合位点与E2F转录因子连接位点重叠. Mirza *et al*^[32]认为, 基因缺失和突变都不是Survivin转录受抑的原因, P53对Survivin启动子内染色质的修饰才是真正的原因.

我们发现, 野生型P53蛋白主要表达在胞核内, 缬草波春使MKN-45胃癌细胞野生型P53蛋白表达增强, 并与浓度有相关性, 100 mg/L明显强于50 mg/L. Survivin mRNA在MKN-45胃癌细胞有强表达, 加用缬草波春后, 表达下降, 表达的强弱与时间与浓度呈负相关, Survivin蛋白的表达与Survivin mRNA是一致的. P53蛋白表达的上调, 一方面可加强bax等的促凋亡作

用, 另一方面可抑制Survivin, bcl-2的表达, 促进凋亡发生. Survivin mRNA和Survivin蛋白的均表达降低, 说明Survivin蛋白表达降低主要是由于Survivin mRNA表达降低所致. P53高表达与Survivin蛋白低表达的关系, 可能受P53调节有关, 还有可能缬草波春直接通过某种途径促使Survivin mRNA表达降低, 使Survivin蛋白低表达, 也有可能P53的高表达是由于Survivin蛋白低表达所致, 具体机制有待进一步研究. P53高表达可增加胃癌细胞株对药物的敏感性, 启动细胞凋亡机制, 诱导细胞生长停滞. Survivin蛋白表达减弱能使抑制Caspase-3, Caspase-7和Caspase-9的功能减弱, 增加胃癌细胞株对药物的敏感性, 从而促进凋亡. 缬草波春诱导的MKN-45胃癌细胞被Caspase-3和Caspase-9所抑制证实了上述推测.

4 参考文献

- Vyas S, Juin P, Hancock D, Suzuki Y, Takahashi R, Triller A, Evan G. Differentiation-dependent sensitivity to apoptogenic factors in PC12 cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 30983-30993
- Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* 2001; 2: REVIEWS3009
- Tao L, Jiao X, Gao E, Lau WB, Yuan Y, Lopez B, Christopher T, RamachandraRao SP, Williams W, Southan G, Sharma K, Koch W, Ma XL. Nitrate inactivation of thioredoxin-1 and its role in postischemic myocardial apoptosis. *Circulation* 2006; 114: 1395-1402
- Imajoh M, Sugiura H, Oshima S. Morphological changes contribute to apoptotic cell death and are affected by caspase-3 and caspase-6 inhibitors during red sea bream iridovirus permissive replication. *Virology* 2004; 322: 220-230
- Zhang Y, Bhavnani BR. Glutamate-induced apoptosis in neuronal cells is mediated via caspase-dependent and independent mechanisms involving calpain and caspase-3 proteases as well as apoptosis inducing factor (AIF) and this process is inhibited by equine estrogens. *BMC Neurosci* 2006; 7: 49
- Muhlethaler-Mottet A, Balmas K, Auderset K, Joseph JM, Gross N. Restoration of TRAIL-induced apoptosis in a caspase-8-deficient neuroblastoma cell line by stable re-expression of caspase-8. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 195-199
- Cheema ZF, Santillano DR, Wade SB, Newman JM, Miranda RC. The extracellular matrix, p53 and estrogen compete to regulate cell-surface Fas/Apo-1 suicide receptor expression in proliferating embryonic cerebral cortical precursors, and reciprocally, Fas-ligand modifies estrogen control of cell-cycle proteins. *BMC Neurosci* 2004; 5: 11
- 贾震易, 秦环龙. 整合素与肠上皮细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1419-1421
- Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 259-264
- Brown NM, Martin SM, Maurice N, Kuwana T, Knudson CM. Caspase inhibition blocks cell death and results in cell cycle arrest in cytokine deprived hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2006
- Ranaldi R, Palma S, Tanzarella C, Lascialfari A, Cinelli S, Pacchierotti F. Effect of p53 haploinsufficiency on melphalan-induced genotoxic effects in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutat Res* 2006
- Nam NH, Parang K. Current targets for anticancer drug discovery. *Curr Drug Targets* 2003; 4: 159-179
- Smith DM, Gao G, Zhang X, Wang G, Dou QP. Regulation of tumor cell apoptotic sensitivity during the cell cycle (Review). *Int J Mol Med* 2000; 6: 503-507
- Perrone G, Vincenzi B, Santini D, Verzi A, Tonini G, Vetrani A, Rabitti C. Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density (MVD) and clinicopathological features in colon cancer. *Cancer Lett* 2004; 208: 227-234
- Braun K, Ehemann V, Waldeck W, Pipkorn R, Corban-Wilhelm H, Jenne J, Gissmann L, Debus J. HPV18 E6 and E7 genes affect cell cycle, pRB and p53 of cervical tumor cells and represent prominent candidates for intervention by use peptide nucleic acids (PNAs). *Cancer Lett* 2004; 209: 37-49
- Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju TM, Ojala PM, Meek D, Laiho M. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 2004; 5: 465-475
- Wen VW, Wu K, Baksh S, Hinshelwood RA, Lock RB, Clark SJ, Moore MA, Mackenzie KL. Telomere-Driven Karyotypic Complexity Concurs with p16INK4a Inactivation in TP53-Competent Immortal Endothelial Cells. *Cancer Res* 2006; 66: 10691-10700
- Liu ZJ, Lu X, Zhong S. ASPP-Apoptotic specific regulator of p53. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 77-80
- Slee EA, Lu X. The ASPP family: deciding between life and death after DNA damage. *Toxicol Lett* 2003; 139: 81-87
- 李彦, 姜政. ASPP蛋白家族的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2527-2530
- Fricke E, Hermannstadter C, Keller G, Fuchs M, Brunner I, Busch R, Hofler H, Becker KF, Lubert B. Effect of wild-type and mutant E-cadherin on cell proliferation and responsiveness to the chemotherapeutic agents cisplatin, etoposide, and 5-fluorouracil. *Oncology* 2004; 66: 150-159
- Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001; 276: 3238-3246
- Kominsky DJ, Bickel RJ, Tyler KL. Reovirus-induced apoptosis requires mitochondrial release of Smac/DIABLO and involves reduction of cellular inhibitor of apoptosis protein levels. *J Virol* 2002; 76: 11414-11424
- 张生君, 王小众. HBx对肝细胞凋亡的双向调控及机制. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2424-2428
- Chandele A, Prasad V, Jagtap JC, Shukla R, Shastri PR. Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance

- in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia* 2004; 6: 29-40
- 26 Beltrami E, Plescia J, Wilkinson JC, Duckett CS, Altieri DC. Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 2077-2084
- 27 肖军, 邓长生, 朱尤庆. 大肠腺癌组织Survivin蛋白的表达意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 540-543
- 28 Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40: 1117-1123
- 29 Blanc-Brude OP, Mesri M, Wall NR, Plescia J, Dohi T, Altieri DC. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2683-2692
- 30 Shi Y. Survivin structure: crystal unclear. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 620-623
- 31 Okada H, Bakal C, Shahinian A, Elia A, Wakeham A, Suh WK, Duncan GS, Ciofani M, Rottapel R, Zuniga-Pflucker JC, Mak TW. Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *J Exp Med* 2004; 199: 399-410
- 32 Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002; 21: 2613-2622

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2007 中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知

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

1 征文内容

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

2 投稿要求及截稿日期

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

3 联系方式

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

食用白酒灌胃后大鼠胃黏膜的抗损伤作用

秦咏梅, 周力, 孙屹峰, 张永宏, 侯玉龙, 张国林

秦咏梅, 孙屹峰, 侯玉龙, 张国林, 新乡医学院第一附属医院
消化内科 河南省新乡市 453100

周力, 张永宏, 贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市
555000

秦咏梅, 2006年贵阳医学院硕士, 副主任医师, 主要从事消化系
统疾病的临床研究.

通讯作者: 秦咏梅, 453100, 河南省新乡市, 新乡医学院第一附
属医院消化内科. yongmeiqin120@126.com

收稿日期: 2006-09-30 接受日期: 2006-10-25

Adaptive cytoprotection of gastric mucosa in rats after intragastric administration of edible alcohol

Yong-Mei Qin, Li Zhou, Yi-Feng Sun,
Yong-Hong Zhang, Yu-Long Hou, Guo-Lin Zhang

Yong-Mei Qin, Yi-Feng Sun, Yu-Long Hou, Guo-Lin
Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated
Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453100,
He'nan Province, China

Li Zhou, Yong-Hong Zhang, Department of Gastroen-
terology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College,
Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Correspondence to: Yong-Mei Qin, Department of Gas-
troenterology, the Affiliated Hospital of Xinxiang Medical
College, Xinxiang 453100, He'nan Province,
China. yongmeiqin120@126.com

Received: 2006-09-30 Accepted: 2006-10-25

Abstract

AIM: To observe the response to edible alcohol-induced injury and expression of prostaglandin E_2 (PGE_2), transforming growth factor- α ($TGF-\alpha$) in gastric mucosa of rats.

METHODS: A total of 36 Sprague Dawley rats were divided group A, B, and C, intragastrically treated with edible alcohol (530 ± 20 mL/L), ethanol (530 mL/L), and normal saline at 5 mL/kg once every other day, respectively. The rats were killed at 1 week and 1 month after treatment, and the extent of mucosal injury was evaluated. Immunohistochemistry was used to examine the mucosal expression of $TGF-\alpha$ protein. Another 36 rats were selected and treated as the method mentioned above, and the level of PGE_2 in gastric mucosa was determined by enzyme linked immunosorbent assay.

RESULTS: The most severe gastric mucosal injury was found in group C, then in group B, and the rats in group A were found with the mildest mucosal injury. The scores for mucosal injury were significantly different among group A, B and C 1 week (26.5 ± 6.4 vs 40.5 ± 8.1 vs 69.3 ± 4.3 , all $P < 0.05$) and 1 month (34.8 ± 8.0 vs 54.8 ± 8.0 vs 74.8 ± 3.1 , $P < 0.05$) after treatment. The level of mucosal PGE_2 was increased significantly in group A and B as compared with that in group C 1 wk after treatment (15.7 ± 1.4 , 14.6 ± 1.9 ng/L vs 18.5 ± 2.7 ng/L, $P < 0.05$), but there was no difference between group A and B. One month after treatment, the level of PGE_2 was decreased in group A, not different from that in group C, but there was obvious difference between the former two groups and group B (15.7 ± 1.4 , 14.6 ± 1.9 ng/L vs 18.5 ± 2.7 ng/L, $P < 0.05$). The expression of $TGF-\alpha$ was significantly lower in group A and B than that in group C 1 week after treatment (both $P = 0$), but no difference was found between group A and B. $TGF-\alpha$ expression was significantly different among group A, B, and C 1 month after treatment ($P = 0.013$, 0.001 , and 0 , respectively). The level of PGE_2 and the expression of $TGF-\alpha$ were notably different between 1 week and 1 month in group A and C, but not in group B.

CONCLUSION: Appropriate stimulus with edible alcohol and ethanol may lead to adaptive cytoprotection in gastric mucosa through up-regulation of PGE_2 and $TGF-\alpha$.

Key Words: Gastric mucosa; Edible alcohol; Adaptive cytoprotection; Prostaglandin E_2 ; Transforming growth factor- α

Qin YM, Zhou L, Sun YF, Zhang YH, Hou YL, Zhang GL. Adaptive cytoprotection of gastric mucosa in rats after intragastric administration of edible alcohol. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):29-33

摘要

目的: 观察食用白酒灌胃后, 大鼠胃黏膜对无水乙醇损伤的反应及前列腺素 E_2 (PGE_2)、转化生长因子 α ($TGF-\alpha$)的表达情况.

■背景资料

胃黏膜保护机制是胃肠基础研究的热点之一. 食用白酒参与对胃黏膜的刺激损伤. 然而适量饮酒, 绝大多数人胃黏膜仍能保持正常的形态、结构与功能, 即使发生损伤也可不同程度的自行修复.

■ 研发前沿

胃黏膜保护作用由多种因素介导, 这些因素相互作用, 形成复杂的网络体系。前列腺素 E_2 (PGE $_2$), 转化生长因子 α (TGF- α)等参与黏膜损伤后的修复过程。

方法: SD大鼠36只, 分别采用食用白酒530 $\pm$ 20 mL/L(A组), 乙醇530 mL/L(B组)、生理盐水(C组)按5 mL/kg隔日给大鼠灌胃, 在1 wk末、1 mo末处死动物, 对比观察胃黏膜的Guth积分; 用免疫组织化学方法测定胃黏膜中TGF- α 的表达强度。另取36只大鼠, 按以上相同处理后用酶联免疫方法测定胃黏膜中PGE $_2$ 水平。

结果: 胃黏膜损伤程度由轻到重依次为A, B, C组, A, B, C组1 wk Guth积分分别为26.5 $\pm$ 6.4, 40.5 $\pm$ 8.1, 69.3 $\pm$ 4.3, 两两比较均有统计学差异($P<0.05$); A, B, C组1 mo Guth积分分别为34.8 $\pm$ 8.0, 54.8 $\pm$ 8.0, 74.8 $\pm$ 3.1, 两两比较均有统计学差异($P<0.05$)。1 wk A, B组胃黏膜组织内PGE $_2$ 水平与C组相比明显增高(17.2 $\pm$ 1.8, 16.6 $\pm$ 1.1 ng/L vs 13.0 $\pm$ 1.5 ng/L, $P<0.05$), A组与B组相比无差异($P>0.05$); 1 mo后A组PGE $_2$ 值下降, 与C组相比无差异($P>0.05$), 而A, C组与B组相比均有差异(15.7 $\pm$ 1.4, 14.6 $\pm$ 1.9 ng/L vs 18.5 $\pm$ 2.7 ng/L, $P<0.05$)。TGF- α 表达1 wk A, B组与C组有统计学差异(均 $P=0$), A组与B组无差异; 1 mo A, B, C组两两比较有差异($P=0.013, 0.001, 0$)。PGE $_2$ 水平、TGF- α 表达强度1 wk与1 mo比较, 在A, C组差异有统计学意义($P<0.05$); B组前后无差异。

结论: 食用白酒及乙醇对胃黏膜均可产生抗损伤作用; 同时胃黏膜PGE $_2$ 水平增高、TGF- α 表达增强, PGE $_2$, TGF- α 在胃黏膜适应性保护过程中起到重要作用。

关键词: 食用白酒; 胃黏膜; 适应性保护; 前列腺素 E_2 ; 转化生长因子 α

秦咏梅, 周力, 孙屹峰, 张永宏, 侯玉龙, 张国林. 食用白酒灌胃后大鼠胃黏膜的抗损伤作用. 世界华人消化杂志 2007;15(1):29-33

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/29.asp>

0 引言

目前认为胃黏膜保护是指黏膜能耐受经常接触的各种损伤因子, 而结构与功能不受明显伤害的现象^[1]。受到刺激的胃黏膜可启动某些内在的防御机制, 增强其对各种损害因素作用的抵抗力, 即产生适应性细胞保护作用。有些学者认为慢性饮酒能增强黏膜防御机制^[2]。本研究旨在观察大鼠胃饲食用白酒、乙醇后对无水乙醇胃损伤的适应性保护情况, 黏膜保护因子——前列腺素 E_2 (PGE $_2$)、转化生长因子 α (transforminggro

wthfactor, TGF- α)的表达情况及其在此过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 9周龄健康♂SD系大鼠36只(购于河南医科大学实验动物中心), 体质量为220-280 g, 经1 wk的喂养适应期后, 开始进行实验。食用白酒530 $\pm$ 20 mL/L(贵州茅台); 无水乙醇(分析醇); PGE $_2$ 酶免疫测定试剂盒(美国BIB生物制品公司); TGF- α 免疫组化染色试剂盒及DAB试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); 酶联免疫检测仪(博赛Biocell-02, 奥地利); IDA-2000高清晰度数码显微图像分析系统(中国科学院空海科技发展有限公司)。

1.2 方法 36只大鼠随机分为3组, 对照组12只, 给予生理盐水, 实验组A 12只, 给予茅台530 $\pm$ 20 mL/L, 实验组B 12只, 给予乙醇530 mL/L, 实验前禁食12 h, 自由饮水, 活动不受限。按5 mL/kg剂量, 隔日1次直接空腹灌胃, 灌胃量及方法参见文献[3-5], 但略有改动。于7 d末、30 d末分2批全部处死动物, 处死前2 h空腹胃内灌入无水乙醇2 mL。

1.2.1 胃黏膜损伤测定 大鼠处死后, 取出胃体, 沿胃大弯剪开, 40 g/L多聚甲醛冲洗后, 将全胃浸入40 g/L多聚甲醛溶液中固定30 min, 平展在平板上, 肉眼观察胃黏膜改变, 用直尺及放大镜测定病变大小并按Guth积分标准计算^[6]损伤指数(UI)。制成切片, 进行苏木精-伊红染色观察组织病理学改变。

1.2.2 免疫组化ABC法检测TGF- α 实验方法参见文献[7]。以细胞质中有棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。每张切片随机选择8个视野胃黏膜在高倍镜下进行观察。应用IDA-2000显微图像分析系统(新乡医学院生命科学院形态学教研室提供), 对选取视野内免疫组化阳性信号, 进行平均灰度分析, 计算模型组与对照组胃组织TGF- α 灰度积分值(灰度积分值与染色面积和强度成反比, 表达越强灰度积分值越低)。

1.2.3 酶联免疫吸附测试胃黏膜PGE $_2$ 另取36只大鼠, 分成A, B, C 3组, 灌胃剂量及处置方法同前。胃黏膜中抽取PGE $_2$ 方法参见文献[8-9]。按PGE $_2$ EIASA试剂盒说明测定, 测得A值, 据标准曲线求得其含量, 胃黏膜中PGE $_2$ 含量表示为ng/L。

统计学处理 采用SPSS 12.0分析软件包进行统计学分析, 所有数据用mean $\pm$ SD表示, 组间比

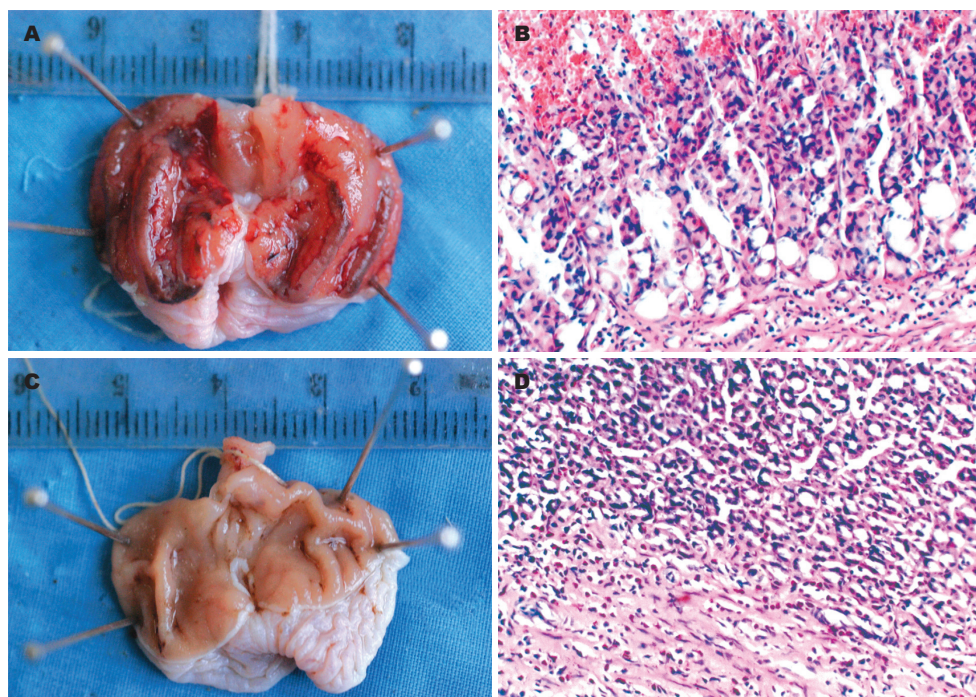


图1 各组大鼠的病理学观察. A: C组1 wk大体观; B: C组1 wk $\times 200$ 倍; C: A组1 wk大体观; D: A组1 wk $\times 200$ 倍.

■创新盘点

本文将乙醇和食用白酒对胃黏膜的损伤从形态学、组织学及细胞因子的影响等多方位、多层次进行对比研究. 为研究食用白酒对胃黏膜的影响提供实验数据, 对胃黏膜自身防御机制提供直接证据.

较采用 q 检验, 组内比较采用 t 检验. $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 组织病理学 对照组(盐水组)1 wk大鼠肉眼可见胃黏膜不完整, 广泛线状、片状糜烂及出血, 黏膜表面明显水肿. 1 mo可见较多点片状黑色烧灼样改变. 光镜下可见损伤侵入黏膜全层, 大量上皮细胞脱落, 腺体结构破坏, 中性粒细胞全层浸润; 1 mo组部分病变深度超过黏膜肌层, 形成浅溃疡. 实验组A(白酒组)全胃黏膜较完整, 点片状糜烂、出血和水肿. 1 mo可见散在黑色烧灼点样变. 光镜下损伤局限于黏膜表层, 较多上皮细胞脱落, 固有层可见较多的中性粒细胞浸润(图1). 实验组B(乙醇组)胃黏膜欠完整, 较多点、片状糜烂, 黏膜表面水肿, 可见片状黑色烧灼样改变. 光镜下部分上皮细胞脱落, 部分主细胞、壁细胞肿胀, 腺体结构大部完整, 部分被破坏, 固有层可见较多的中性粒细胞浸润, 一些淋巴细胞及嗜酸性粒细胞.

2.2 TGF- α 的免疫组化结果 生理盐水组TGF- α 在胃腺颈部、基底部细胞都有表达, 呈弱阳性(图2); 在白酒组、乙醇组胃腺颈部、基底部强阳性表达细胞多见, 图像半定量分析见表1.

2.3 UI积分、TGF- α 、PGE₂在胃黏膜的表达 灌胃1 wk后处死大鼠各组胃黏膜UI积分比较: A组

与B组、A组与C组、B组与C组差异有统计学意义, P 值分别为0.002, 0, 0. TGF- α 比较: A组与C组、B组与C组差异有统计学意义, P 值均为0; A组与B组无统计学差异, P 值为0.304. PGE₂比较: A组与C组、B组与C组差异有统计学意义, P 值分别为0, 0.001; A组与B组无统计学差异, P 值为0.477. 灌胃1 mo后处死大鼠, 各组胃黏膜UI积分比较: A组与B组、B组与C组、A组与C组差异有统计学意义, P 值均为0. TGF- α 比较: A组与B组、A组与C组、B组与C组差异有统计学意义, P 值分别为0.013, 0.001, 0. PGE₂比较: A组与B组、B组与C组差异有统计学意义, P 值分别为0.005, 0.034; A组与C组无统计学差异, P 值为0.366. TGF- α 组内1 wk与1 mo比较: A组的 P 值为0.033, B组的 P 值为0.117, C组的 P 值为0.049. PGE₂组内1 wk与1 mo比较: A组的 P 值为0.032, B组的 P 值为0.144, C组的 P 值为0.009.

3 讨论

既往研究证实, 弱刺激作用于胃黏膜后, 常导致内源性PGs, TGF- α , NO及三叶肽合成增加, 并通过刺激感觉传入神经, 增加黏膜血流量及黏膜细胞的增殖及移行能力; 重复强刺激作用于胃黏膜则增强黏膜EGF, TGF- α 及EGFR表达, 使黏膜的增殖、修复能力明显增加, 加强抗损伤能力. 前者称为适应性保护, 后者称为耐受性保

■名词解释

胃黏膜保护:指黏膜能耐受经常接触的各种损伤因子,而结构与功能不受明显伤害的现象。分为适应性保护与耐受性保护。

表 1 灌胃1 wk, 1 mo后处死大鼠胃黏膜UI积分、TGF- α 、PGE₂表达情况

分组	1 wk			1 mo		
	UI	TGF- α	PGE ₂ (ng/L)	UI	TGF- α	PGE ₂ (ng/L)
茅台A	26.5 $\pm$ 6.4	83.7 $\pm$ 2.7	17.2 $\pm$ 1.8	34.8 $\pm$ 8.0	89.5 $\pm$ 5.0	15.7 $\pm$ 1.4
乙醇B	40.5 $\pm$ 8.1	85.4 $\pm$ 3.6	16.6 $\pm$ 1.1	54.8 $\pm$ 8.0	82.3 $\pm$ 2.7	18.5 $\pm$ 2.7
N-S C	69.3 $\pm$ 4.3	94.5 $\pm$ 2.1	13.0 $\pm$ 1.5	74.8 $\pm$ 3.1	99.5 $\pm$ 5.0	14.6 $\pm$ 1.9

护。本实验中, A, B组预先给予530 mL/L食用白酒、乙醇刺激胃黏膜, 1 wk后再用无水乙醇强刺激, 与对照组相比, 实验组黏膜损伤程度明显减轻, 3组之间Guth积分均有差异($P<0.01$), 其中食用白酒组病变最轻。前人研究发现, 在一定范围内, 随弱刺激强度的增加, 其屏障破坏程度即增大, 适应性细胞保护作用效应增强, 但往往有一最佳弱刺激强度, 引发的适应性保护作用最大。推测同等浓度的食用白酒刺激强度优于乙醇, 530 mL/L乙醇刺激强度超出该范围, 保护作用减弱。本实验中, 胃饲1 mo后, 进行抗损伤实验, 保护作用仍存在, 实验组与对照组相比损伤积分差异显著($P<0.01$)。总之, 不管是1 wk或是1 mo, 实验组胃黏膜大部完整, 腺体结构基本不被破坏, 食用白酒、乙醇刺激后均可产生抗损伤作用。

Robert曾做一系列实验, 先给大鼠胃饲200 mL/L乙醇、0.075 mol/L NaOH、0.35 mol/L HCl、40-50 g/L NaCl、5 mmol/L牛黄酸盐等物质后, 可以明显减轻随后给予的致坏死物质(强刺激), 如无水乙醇、0.2 mol/L NaOH、0.6 mol/L HCl、200 g/L NaCl、80 mmol/L牛黄酸盐等所致的胃黏膜损伤^[10]。

许多学者对胃黏膜适应性保护发生机制进行了探讨。Robert认为弱刺激增加了内源性PGs合成; Uehigashi *et al*^[11]采用细胞淘洗技术、梯度离心方法证实50 mL/L乙醇可刺激胃黏膜内肥大细胞合成PGs, 与适应性细胞保护有关。吴作艳 *et al*^[12]研究发现, 乙醇连续刺激大鼠胃黏膜, 使PGE含量增加, 起到适应性细胞保护作用, 而胃黏膜损伤是PGE, NO, ET作用失衡的结果。刘春英 *et al*^[13]在内毒素诱发的幼鼠急性胃黏膜损伤过程中发现, 增加胃黏膜PGE₂浓度后, 胃黏膜损伤减轻。本实验中PGE₂值变化复杂, 1 wk内530 mL/L白酒与乙醇可同等程度引起PGE₂增加; 1 mo处死, 食用白酒组该值不再增高, 反而略有下降, 与盐水组无差异($P>0.05$), 与乙醇组有差异($P<0.01$)。对于盐水组, 1 mo与1 wk相比, PGE₂

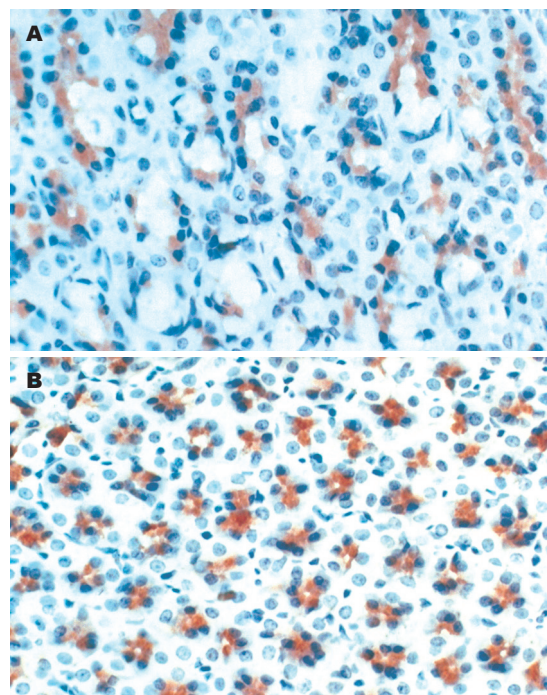


图 2 TGF- α 在细胞质的表达($\times 400$)。A: C组弱阳性表达; B: A组阳性表达。

值增高显著($P<0.01$), 考虑1 mo组处死前灌入无水乙醇后, 黏膜损伤很重, PGE₂值2-3 h内迅速增高。乙醇组前后无差异($P>0.05$)。由此得出预先刺激黏膜后, PGE₂值增高, 再给予强刺激后, 黏膜损伤明显减轻, 实验组PGE₂值高, 进一步说明其在适应性保护中起重要作用。随时间延长, 乙醇组黏膜损伤较重者, 该值相应较高或增高, 仍具有抗损伤作用。PGE₂是由花生四烯酸在环氧合酶作用下合成。炎症部位该因子合成以COX-2诱导为主, 而COX-2与胃癌的形成关系密切。黏膜保护是一多因素、多水平、多环节的综合过程, 大鼠胃黏膜在白酒长期、慢性刺激下, 是否产生其他因子抑制PGE₂产生, 或可能所选用的白酒在自然发酵过程中产生一些复杂的化合物, 抑制了COX-2的活性, 使PGE₂合成减少, 这些机制有待于进一步研究。

TGF- α 在正常的胃黏膜表层细胞, 腺颈部

细胞及基底部细胞均有表达, 通过自分泌、旁分泌或内分泌发挥作用. TGF- α 参与内皮结构重建, 促进上皮细胞增殖及黏液生成, 增加胃黏膜微循环, 在受损胃黏膜修复及维持完整性中起重要作用. 本实验中, 实验组A、B胃腺颈部、基底部强阳性表达细胞多见, 对照组多为弱阳性表达细胞. 图像半定量分析差异有统计学意义. 实验组该因子表达增强, 胃饲1 wk食用白酒组与乙醇组之间无差异($P>0.05$), 1 mo后两组之间出现差异($P<0.05$), 乙醇组表达较强. 说明530 mL/L乙醇刺激强度较大, 反复作用后, 黏膜损伤较重, 该因子的高表达使黏膜的增殖及修复能力明显增加, 表现为耐受性保护. Tarnawski *et al*^[14]实验发现, 大鼠胃饲500 mL/L乙醇连续4 d, 组织学检查小凹区、胃腺颈区高度明显增加, 黏膜及胃壁厚度增加, 免疫组化染色黏膜EGF, TGF- α , EGFR表达明显增加, 胃黏膜产生耐受性. 胡义亭 *et al*^[15]临床研究发现, 消化性溃疡活动期患者血清、胃液中TGF- α 水平显著低于正常对照组, 认为TGF- α 合成与释放减少, 削弱黏膜的防御能力, 促进溃疡的发生, 而在溃疡愈合期, 该值明显增加, 提示TGF- α 促进溃疡愈合. 李点玲 *et al*^[16]临床研究发现 $H. pylori$ 胃溃疡患者胃黏膜TGF- α 值高于 $H. pylori$ 胃溃疡患者, 认为 $H. pylori$ 感染引起胃黏膜炎症反应, 诱导TGF- α 等肽类生长因子表达, 参与炎症愈合过程并促进黏膜再生修复.

有学者认为, 弱刺激造成表浅上皮细胞损伤后, 可以在损伤部位形成一碱性保护层——黏液盖, 可以减轻随后给予的腔内强刺激的刺激作用, 起到一种物理屏障作用, 并增强了黏膜修复能力及表浅上皮的快速整复过程. 有研究发现200 mL/L乙醇、50 g/L NaCl可增加黏附黏液层厚度, 并可减轻无水乙醇对黏液层的破坏作用^[17].

胃黏膜适应性保护是一个抗损伤和修复的过程, 多种物质均参与其中. 王伟 *et al*^[18]将这些因素概括为: 抗微生物肽、细胞因子、生长因子、Ghrelin以及短链脂肪酸和谷胺酰胺等营养物质. 食用白酒鼻饲后黏膜能够对抗无水乙醇的损伤, PGE₂, TGF- α 参与黏膜的适应性保护过程, 同时与CGRP介导GMBF的增加. 黏膜防御机制进一步增强. 但经此处理后黏膜能否降低胃 $H. pylori$ 的感染率, 或对其产生适应性, 有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 李兆申, 湛先保, 许国铭. 胃黏膜损伤与保护—基础与临床. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 31
- 2 Tanaka K, Nishimoto K, Tomisato W, Tsutsumi S, Hoshino T, Tsuchiya T, Mizushima T. Adaptive cytoprotection induced by pretreatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 210-217
- 3 姚永莉, 徐波, 宋于刚. 大鼠胃损伤适应性作用的观察. *胃肠病学和肝病学杂志* 2004; 13: 108-110
- 4 Ko JK, Cho CH, Lam SK. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2503-2508
- 5 李卫星, 杜军, 田苏平, 顾洛, 戈应滨. 慢性饮酒大鼠胃黏膜的适应性细胞保护作用. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2002; 22: 322-325
- 6 Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979; 76: 88-93
- 7 王炳元, 吴作艳, 张健, 曹艳雪, 赵迎庆. 胃黏膜对慢性乙醇刺激适应性机制的初步探讨. *中国医科大学学报* 2004; 33: 115-117
- 8 孙为豪, 陈洪, 欧希龙, 俞谦, 曹大中, 俞婷. 质子泵抑制剂的胃黏膜保护作用与环氧化酶-2表达. *中国药理学通报* 2002; 18: 661-664
- 9 陈铁楼, 蔺世龙, 刘景昌, 许恒, 许兵. 高压氧对快速减压应激损伤动物脑组织PGs的作用研究. *海军医学杂志* 2003; 24: 97-99
- 10 Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Davis JP, Field SO, Hanchar AJ. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins. *Am J Physiol* 1983; 245: G113-121
- 11 Uehigashi Y, Yakabi K, Nakamura T. Pretreatment with mild irritant enhances prostaglandin E2 release from isolated canine gastric mucosal mast cells. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1384-1389
- 12 吴作艳, 李岩, 田丰. 乙醇对大鼠胃黏膜慢性损伤及适应性细胞的保护作用. *中华消化杂志* 2006; 26: 59-60
- 13 刘春英, 王丽杰, 孙梅, 赵恂, 胡月, 赵雅娟, 李军. PGE₂在内毒素诱导的幼鼠急性胃黏膜损伤中的变化及PAF受体拮抗剂对其影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 163-166
- 14 Tarnawski A, Lu SY, Stachura J, Sarfeh IJ. Adaptation of gastric mucosa to chronic alcohol administration is associated with increased mucosal expression of growth factors and their receptor. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1992; 193: 59-63
- 15 胡义亭, 甄承恩, 邢国章, 张曼利, 张建新, 王鼎鑫, 卢亚敏. 消化性溃疡患者转化生长因子 α 、表皮生长因子和前列腺素E₂的关系. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 43-47
- 16 李点玲, 张桂英. 瘦素和TGF- α 在幽门螺杆菌感染慢性胃炎和胃溃疡患者胃黏膜内的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2795-2798
- 17 Ninomiya K, Kitano S, Yoshida T, Bandoh T, Baatar D, Tsuboi S. Impaired adaptive cytoprotection to ethanol-induced damage in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1254-1260
- 18 王伟, 孙梅. 胃肠黏膜抗损伤和修复新进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2355-2359

■同行评价

本文研究结果对大鼠胃黏膜保护和抗损伤提供了有意义的实验数据, 有利于该领域的深入研究和发

展, 也为进一步在人体验证提供了初步资料. 文章立

题依据充分、创

新性强.

电编 张敏 编辑 张焕兰

bFGF促进人大肠癌LoVo细胞增殖的信号转导机制

周颖, 王桂玲

■背景资料

近年来, 肿瘤的发生与细胞生长因子关系已日益受到重视。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)作为一种细胞丝裂原和促血管生成因子, 在许多肿瘤的生长中起着重要的作用, 研究证明bFGF与多种肿瘤发生密切相关。

周颖, 王桂玲, 中国医科大学基础医学院细胞生物学教研室
辽宁省沈阳市 110001

周颖, 医学硕士, 助教, 主要从事肿瘤细胞信号转导方面的研究。

通讯作者: 王桂玲, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学基础医学院细胞生物学教研室. wanggl2000@163.com

电话: 024-23256666-5347

收稿日期: 2006-09-28 接受日期: 2006-10-18

Signal transduction mechanism of basic fibroblast growth factor in promoting the growth of colorectal cancer LoVo cell line

Ying Zhou, Gui-Ling Wang

Ying Zhou, Gui-Ling Wang, Department of Cell Biology, Basic Medical College of China Medical University, Shenyang 11001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Gui-Ling Wang, Department of Cell Biology, Basic Medical College of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wanggl2000@163.com

Received: 2006-09-28 Accepted: 2006-10-18

Abstract

AIM: To investigate the activity of protein kinase B (PKB) and the expression of Cyclin A in colorectal cancer LoVo cell line after treatment of basic fibroblast growth factor (bFGF), and to further analyze the signal transduction mechanism of bFGF in regulating the growth of LoVo cells via PI3-K/PKB pathway.

METHODS: Colorectal cancer cell line LoVo was cultured *in vitro* using routine method, and then treated with bFGF, LY294002 (inhibitor of PI3-K), and bFGF plus LY294002, respectively. MTT assay was used to determine the proliferation of LoVo cells; PKB activity in LoVo cells was measured by (γ -³²P)ATP incorporation assay; Cyclin A mRNA expression was examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); Cyclin A protein expression was detected by Western blot.

RESULTS: The activity of PKB was increased in LoVo cells after bFGF treatment at different time, but it was decreased by LY294002 pre-

treatment [704.32 ± 12.35 pmol/(mg · min) vs 1352.79 ± 19.85 pmol/(mg · min), $P < 0.05$]. The expression of Cyclin A was significantly increased at both protein and mRNA levels in the cells treated by bFGF, but the up-regulation of Cyclin A was obviously inhibited by LY294002 pre-treatment.

CONCLUSION: Via PI3-K/PKB pathway, bFGF can regulate the transcriptional activity of Cyclin A and modulate its expression in LoVo cells, which may promote the proliferation of colorectal cancer cells.

Key Words: Basic fibroblast growth factor; Protein kinase B; Cyclin A; Colorectal cancer

Zhou Y, Wang GL. Signal transduction mechanism of basic fibroblast growth factor in promoting the growth of colorectal cancer LoVo cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):34-38

摘要

目的: 通过改变碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)作用于LoVo细胞的时间, 检测PKB活性和Cyclin A的表达情况, 进一步研究bFGF通过PI3-K/PKB通路调控大肠癌细胞生长的信号转导机制。

方法: MTT法分析bFGF对LoVo细胞增殖程度的影响; (γ -³²P)ATP掺入法检测大肠癌LoVo细胞株中PKB的活性; RT-PCR法检测大肠癌LoVo细胞株中Cyclin A的表达; Western blot法检测bFGF作用LoVo细胞后Cyclin A的表达。

结果: bFGF以不同时间作用于LoVo细胞时, 通过(γ -³²P)ATP掺入法检测发现其可提高细胞PKB活性, PI3-K的抑制剂LY294002预处理后再施加bFGF, 可显著降低PKB的活性, 两者相比差异显著 [704.32 ± 12.35 pmol/(mg · min) vs 1352.79 ± 19.85 pmol/(mg · min), $P < 0.05$]. bFGF刺激LoVo细胞时Cyclin A蛋白和Cyclin A mRNA表达均高于其他各施加因素组, 而PI3-K的抑制剂LY294002组的Cyclin A蛋白和Cyclin A mRNA明显降低。

结论: bFGF刺激大肠LoVo细胞后可通过依赖PI3-K/PKB途径调节Cyclin A的转录活性, 促进其表达, 进而促进细胞增殖。

关键词: 碱性成纤维细胞生长因子; 蛋白激酶B; Cyclin A; 大肠癌

周颖, 王桂玲. bFGF促进人大肠癌LoVo细胞增殖的信号转导机制. 世界华人消化杂志 2007;15(1):34-38
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/34.asp>

0 引言

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)作为一种细胞丝裂原和促血管生成因子, 在许多肿瘤的生长中起着重要的作用^[1-2]. 他对神经胶质瘤、白血病、肺癌、肝癌等细胞具有促增殖分化的功能, 但对大肠癌细胞这方面的研究报道很少. 目前认为, bFGF不仅可以促进肿瘤血管的生成, 在肿瘤的发生、发展中起着重要作用, 而且对肿瘤细胞具有促增殖作用^[3]. 大肠癌是常见恶性肿瘤之一, 手术治疗仍是大肠癌首选治疗方法. 但相当一部分在发现时已出现浸润或转移, 即便手术切除之后仍有复发, 对放疗和化疗的治疗效果亦不甚理想. 关于bFGF通过PI3-K/PKB信号途径调控大肠癌细胞生长的具体机制仍不清楚^[4]. 我们通过改变bFGF作用于LoVo细胞的时间, 检测PKB活性和Cyclin A的表达情况, 进一步研究bFGF通过PI3-K/PKB通路调控大肠癌细胞生长的信号转导机制, 以抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡, 这为治疗大肠癌提供了新思路.

1 材料和方法

1.1 材料 LoVo细胞株购自中科院上海细胞所; DMEM培养基(Gibco/brl公司); 小牛血清(华美生物工程公司); 扶济复(重组人bFGF, 北京双鹭药业有限公司); LY294002(美国Sigma公司); TRILzol(Life-Technology公司); Cyclin A(美国NeoMarkers公司)及PKB(SANTA CRUZ)一抗, 羊抗鼠及兔抗羊辣根过氧化物酶标记的二抗和ECL试剂盒(北京中山生物技术公司), TaKaRa RNA PCR试剂盒(大连宝生物工程有限公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将低温冷冻的大肠癌LoVo细胞株常规方法制成均匀细胞悬液($8 \times 10^7/L$) $37^\circ C$, 50 mL/L CO_2 孵箱中培养. 24 h换液密度达到 10^6 个以上时收集对数生长期细胞, 以 $6 \times 10^7/L$ 接种

于培养瓶, 每24 h换液一次.

1.2.2 实验分组及施加实验因素 将培养的大肠癌细胞按随机原则分为: (1)空白对照(作为bFGF及LY294002组的对照); (2)bFGF组: 观察bFGF对细胞的作用; (3)LY294002组: 观察LY294002对细胞的作用; (4)bFGF+LY294002组: 观察bFGF及LY294002同时施加时对细胞的作用.

1.2.3 MTT比色 胰酶消化处于对数增殖期的细胞, 以 5×10^3 个细胞/孔接种于96孔板, 在 $37^\circ C$, 50 mL/L CO_2 , 及饱和湿度的条件下恒温密闭培养. 按分组要求加入肝素8 μL (2 g/L)和含有不同浓度的bFGF培养液, 使各孔终体积均为200 μL . 将96孔板放回孵箱, 3 d后倾出培养液, 每孔加MTT溶液(5 g/L)20 μL . 继续孵育4 h, 每孔加入150 μL DMSO, 振荡10 min, 用酶联免疫检测仪读取每孔A值(测量波长600 nm, 参考波长570 nm), 绘制细胞生长曲线, 根据公式 $B/A \times 100\%$ 计算细胞的增殖、抑制率(A, B分别为对照组和实验组的光密度值). 实验重复3次, 每浓度均设3孔.

1.2.4 (γ - ^{32}P)ATP掺入法检测大肠癌LoVo细胞株中PKB的活性 实验分组: 根据预实验结果确定对LoVo细胞不同浓度bFGF处理时间为4 h, bFGF浓度分别为0, 25, 50, 75, 100 $\mu g/L$. 进行3次重复测定, 对结果进行统计学处理. PKB活性测定方法: 将 $-70^\circ C$ 保存的样品取出融化, 超声波处理30 s, 离心(35 000 g, 60 min), 上清液用于胞液PKB测定, 沉淀用150 μL 匀浆缓冲液溶解后, 作膜性PKB测定. 反应完成后取25 μL 在Whatman P81强阳离子交换滤纸上, 放入75 mmol/L磷酸溶液终止反应, 并用此磷酸液反复洗3次, 每次2 min, 取出晾干, 放入预装有9 mL蒸馏水的液闪瓶中, 液闪仪测定cpm数. PKB比活性计算方法: $PKB比活性 = (CPM数 - 本底CPM数) / 总放射性 \times ATP浓度 / 时间(min) / 蛋白量$.

1.2.5 RT-PCR检测Cyclin A的表达 细胞总RNA提取, 在设定条件下进行逆转录反应. PCR扩增后的产物, 取8 μL 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 凝胶成像仪扫描摄影, 用 β -actin作为参照标化各组中Cyclin A的含量.

1.2.6 Western blot检测Cyclin A的表达 收集细胞, 进行裂解, 蛋白定量采用考马斯亮蓝定量法. 取各组细胞40 μg 总蛋白上样于100 g/L SDS-PAGE电泳分离后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 转印膜在封闭液中封闭过夜. 分别用Cyclin A和GAPDH一抗, $37^\circ C$ 孵育2 h, 洗膜, 加上兔抗羊和

■ 研发前沿

肿瘤细胞信号转导特别是细胞生长因子与肿瘤发生的信号转导更是该领域的研究热点, bFGF通过PI3-K/PKB通路调控大肠癌细胞生长的信号转导机制是其中之一.

■创新盘点

目前国内外关于bFGF在大肠癌组织中的表达及临床意义的研究较多,而关于bFGF通过PI3-K/PKB信号途径调控大肠癌细胞生长的具体机制研究不多还不清楚.本文通过改变bFGF作用于LoVo细胞的时间,检测PKB活性和Cyclin A的表达情况,进一步研究bFGF通过PI3-K/PKB通路调控大肠癌细胞生长的信号转导机制.

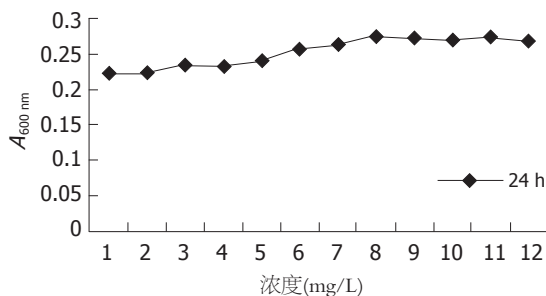


图1 MTT法分析施加不同浓度bFGF 24 h后对LoVo细胞的影响.

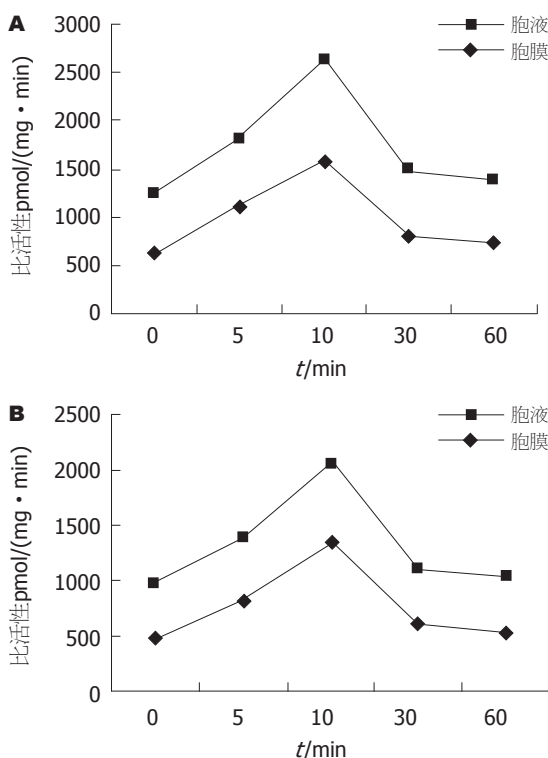


图2 bFGF处理不同时间对LoVo细胞和LY294002预处理的LoVo细胞PKB活性的影响.

羊抗鼠辣根过氧化物酶标二抗, 孵育1 h, TTBS洗2次, TBS洗1次. 化学发光试剂ECL A液和B液等量混合, 按0.125 mL/cm²膜面积点于转印膜上, 室温孵育1 min, 倾掉ECL, 保鲜膜覆盖后置暗盒中曝光40 s至1 min, 冲洗胶片, 可重复曝光. X光片扫描成像, 经凝胶自动分析成像系统分析各样品灰度值.

统计学处理 根据分析采用SPSS 10.0软件包中进行统计处理, *t*检验来判断差异的统计学意义, *P*<0.05具有显著性.

2 结果

2.1 bFGF对LoVo细胞增殖程度的影响 (1)12 h *A*值变化不明显, 24 h细胞开始随浓度增大而增加

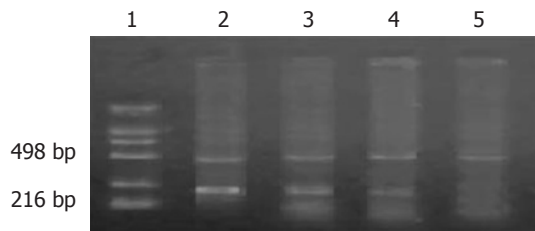


图3 LoVo细胞中Cyclin A的表达. 1: Marker; 2: bFGF; 3: bFGF+LY294002; 4: LY294002; 5: 饥饿细胞.

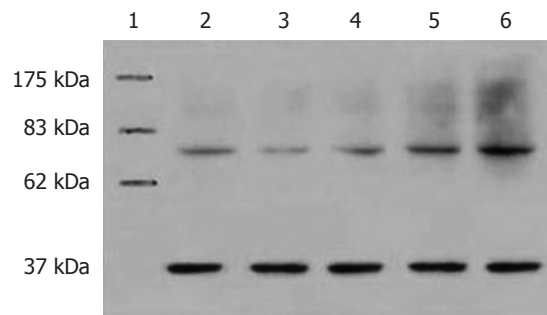


图4 Western blot法检测LoVo细胞施加不同因素后Cyclin A蛋白的表达情况. 1: Marker; 2: 正常培养细胞; 3: 饥饿细胞; 4: LY294002; 5: bFGF+LY294002; 6: bFGF.

(图1), 36 h细胞数随着浓度加大而下降, 48 h细胞数量下降更加明显; (2)48, 36 h第一个空白孔*A*值相似, 12, 24 h第一个空白孔*A*值相似, 两个*A*值差异显著, 这说明此细胞的增殖周期为30 h左右.

2.2 bFGF对LoVo细胞PKB活性的影响 当采用外源性bFGF(50 μg/L)以不同时间作用于LoVo细胞时, 通过(γ -³²P)ATP掺入法检测发现, 其可提高细胞PKB活性(图2A). LY294002(100 nmol/L)预处理1 h后再施加bFGF, 可显著降低PKB的活性, 单因素方差分析表明, LY294002预处理组和未做预处理组之间差异有显著性[704.32 ± 12.35 pmol/(mg · min) vs 1352.79 ± 19.85 pmol/(mg · min), *P*<0.05], 说明bFGF可通过PI3-K调控PKB的活性(图2B).

2.3 RT-PCR检测bFGF对LoVo细胞Cyclin A mRNA表达的影响 当外源性bFGF(50 μg/L)以不同时间作用于LoVo细胞时, Cyclin A表达增加, 在30 min时达到高峰, 与未处理相比升高1倍, 用LY294002预处理1 h后施加bFGF, 发现Cyclin A表达减少, 说明, bFGF可通过PI3-K调节Cyclin A表达增加(图3).

2.4 Western blot检测LoVo细胞施加不同因素后Cyclin A蛋白的表达情况 bFGF刺激LoVo细胞

时Cyclin A蛋白表达都高于其他各施加因素组, LY294002抑制组蛋白明显降低(图4), 从而也证实bFGF引起LoVo细胞Cyclin A的蛋白表达是通过PKB之途径而介导。

3 讨论

关于FGF的细胞内转导通路虽然早有报道^[1-2], 但至今为止, 人们对其调节仍然没有统一认识。bFGF作为一种细胞有丝分裂原和促血管生成因子, 可以直接刺激内皮细胞的增生, 促进内皮细胞产生蛋白酶, 调节内皮细胞的迁移, 从而促进肿瘤血管生成, 在许多肿瘤的生长中起着重要的作用^[3-5]。bFGF不仅可以促进肿瘤血管的生成, 而且对肿瘤细胞有促增殖的作用。许多研究表明, bFGF能够促进细胞恶性转化及肿瘤形成^[6-10]。

蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, PKB是磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol3-Kinase, PI3-Kinase)的直接下游靶蛋白, PKB就成为信号转导深入研究的焦点^[11]。PKB在蛋白质和脂类合成、葡萄糖代谢与运输、细胞周期、凋亡和肿瘤转化等方面发挥重要的作用, 处于多个信号转导通路的交叉点, 成为生长因子介导的PI3-K信号转导通路中的重要组成因子^[22-27], 尤为重要的是PKB介导细胞存活而且在恶性肿瘤发生中也是关键的因素^[12-13]。PKB蛋白的过度活化可使细胞发生恶性转化, 在不同的肿瘤如胰腺癌、甲状腺癌、大肠癌、卵巢癌和乳腺癌等均发现PKB的过度活化, 提示PKB在肿瘤细胞恶性行为中起重要的作用^[14-19]。体外实验发现, 不仅PKB水平在人肺癌癌前病变细胞和肺癌细胞中明显高于正常支气管上皮细胞, 而且PKB在前两者中处于持续活化状态, 在后者中却处于非活化状态, 提示PKB在肺癌的发生过程中可能起重要作用^[20-21]。

本实验研究表明, 当采用外源性bFGF(50 μ g/L)以不同时间作用于LoVo细胞时, 通过(γ -³²P)ATP掺入法检测发现, 其可提高细胞PKB活性。而PI3-K的抑制剂LY294002预处理1 h后再施加bFGF^[32], 可显著降低PKB的活性, 单因素方差分析表明, LY294002预处理组和未做预处理组之间差异有显著性, 说明bFGF可通过PI3-K调控PKB的活性。随着对细胞周期调控认识的不断深入, 出现了“癌症可能是一类细胞周期性疾病”的观点! 因为, 在多种肿瘤细胞都存在着若干细胞周期调控因子的改变。而肿瘤的发生、

发展和恶变与细胞周期调控失控密切相关。周期素是一类存在于细胞周期的不同阶段, 能够活化CDK的蛋白, 是细胞得以通过细胞周期的各个阶段所必需的。Cyclin A是一类在哺乳动物细胞S期和G₂/M期两个调节点均起重要作用的蛋白。Cyclin A在S期可以检测到, 在进入G₂期含量增加, 是细胞增殖的有用标记物^[28-29]。在多种肿瘤中可检测到周期素A表达的增加, 提示与肿瘤增殖状态密切相关^[30-31]。

我们采用外源性bFGF处理LoVo细胞, 显示bFGF能促进Cyclin A mRNA水平的提高, 导致Cyclin A的表达增加。已知Cyclin A属S期和G₂期达峰值^[28-29], PI3-K抑制剂LY294002预处理的细胞, 经bFGF刺激后, 在各时间点Cyclin A mRNA水平均下降, 同时Cyclin A表达水平也降低, 表明bFGF对LoVo细胞周期素A表达的影响是通过影响其转录活性实现的, 而且这种调节作用依赖于PI3-K/PKB途径。我们通过体外实验证明, PI3-K/PKB途径可介导bFGF对LoVo细胞的促增殖作用, 通过调节Cyclin A的转录活性促进其表达而促进细胞增殖。进一步的体内研究如能证实内源性bFGF通过PI3-K/PKB途径影响Cyclin A表达, 将为在信号转导通路的不同水平上的肿瘤治疗提供新思路和新方法。

4 参考文献

- 1 Tsang M, Friesel R, Kudoh T, Dawid IB. Identification of Sef, a novel modulator of FGF signalling. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 165-169
- 2 Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 263-267
- 3 Dow JK, deVere White RW. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology* 2000; 55: 800-806
- 4 Lundin L, Ronnstrand L, Cross M, Hellberg C, Lindahl U, Claesson-Welsh L. Differential tyrosine phosphorylation of fibroblast growth factor (FGF) receptor-1 and receptor proximal signal transduction in response to FGF-2 and heparin. *Exp Cell Res* 2003; 287: 190-198
- 5 Fenig E, Kanfi Y, Wang Q, Beery E, Livnat T, Wasserman L, Lilling G, Yahalom J, Wieder R, Nordenberg J. Role of transforming growth factor beta in the growth inhibition of human breast cancer cells by basic fibroblast growth factor. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 70: 27-37
- 6 Jang JH, Chung CP. A novel splice variant of fibroblast growth factor receptor 2 in human leukemia HL-60 cells. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29: 133-137
- 7 Zhao J, Miao J, Zhao B, Zhang S, Yin D. Suppressing Akt phosphorylation and activating Fas by safrrole

■应用要点

研究bFGF通过PI3-K/PKB通路调控大肠癌细胞生长的信号转导机制, 以抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡, 这为治疗大肠癌提供了新思路。

同行评价

本文目的明确,行文流畅,各部分内容简洁明了,理论价值较高。

- oxide inhibited angiogenesis and induced vascular endothelial cell apoptosis in the presence of fibroblast growth factor-2 and serum. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 1603-1613
- 8 林瑶光, 韦良宏. 大肠癌和大肠腺瘤COX-2和bFGF表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2199-2202
- 9 周红凤, 吴瑾, 王翠华, 张波, 刘丹, 王雯, 赵宁. 胃癌组织与血清中VEGF和bFGF的表达意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2087-2092
- 10 Zhang B, Cao H, Rao GN. Fibroblast growth factor-2 is a downstream mediator of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling in 14,15-epoxyeicosatrienoic acid-induced angiogenesis. *J Biol Chem* 2006; 281: 905-914
- 11 Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296: 1655-1657
- 12 孙晓杰, 黄常志. PI3K-Akt信号通路与肿瘤. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 306-311
- 13 Chou CH, Wei LH, Kuo ML, Huang YJ, Lai KP, Chen CA, Hsieh CY. Up-regulation of interleukin-6 in human ovarian cancer cell via a Gi/PI3K-Akt/NF-kappaB pathway by lysophosphatidic acid, an ovarian cancer-activating factor. *Carcinogenesis* 2005; 26: 45-52
- 14 Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, Smyrk TC. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002; 23: 201-205
- 15 Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbavar FF, Bray MR, Snow BE, Ayala R, Danino M, Karlan BY, Slamon DJ. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 196-206
- 16 Chun KH, Kosmeder JW 2nd, Sun S, Pezzuto JM, Lotan R, Hong WK, Lee HY. Effects of deguelin on the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 291-302
- 17 Zinda MJ, Johnson MA, Paul JD, Horn C, Konicek BW, Lu ZH, Sandusky G, Thomas JE, Neubauer BL, Lai MT, Graff JR. AKT-1, -2, and -3 are expressed in both normal and tumor tissues of the lung, breast, prostate, and colon. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2475-2479
- 18 Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, Troyer DA, Prihoda T, Bedolla R, Kreisberg JL. Immunohistochemical demonstration of phospho-Akt in high Gleason grade prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1168-1171
- 19 Kandasamy K, Srivastava RK. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4929-4937
- 20 Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 2001; 61: 3986-3997
- 21 Milburn CC, Deak M, Kelly SM, Price NC, Alessi DR, Van Aalten DM. Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem J* 2003; 375: 531-538
- 22 Gonzales M, Bowden GT. The role of PI 3-kinase in the UVB-induced expression of c-fos. *Oncogene* 2002; 21: 2721-2728
- 23 Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 2001; 276: 9817-9824
- 24 Jee SH, Chu CY, Chiu HC, Huang YL, Tsai WL, Liao YH, Kuo ML. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 1169-1175
- 25 Chaudhary LR, Hruska KA. Inhibition of cell survival signal protein kinase B/Akt by curcumin in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 2003; 89: 1-5
- 26 Maffucci T, Piccolo E, Cumashi A, Iezzi M, Riley AM, Saiardi A, Godage HY, Rossi C, Broggin M, Iacobelli S, Potter BV, Innocenti P, Falasca M. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by inositol pentakisphosphate results in antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res* 2005; 65: 8339-8349
- 27 Dobashi Y, Shoji M, Jiang SX, Kobayashi M, Kawakubo Y, Kameya T. Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *Am J Pathol* 1998; 153: 963-972
- 28 Dobashi Y, Jiang SX, Shoji M, Morinaga S, Kameya T. Diversity in expression and prognostic significance of G1/S cyclins in human primary lung carcinomas. *J Pathol* 2003; 199: 208-220
- 29 Ohashi R, Gao C, Miyazaki M, Hamazaki K, Tsuji T, Inoue Y, Uemura T, Hirai R, Shimizu N, Namba M. Enhanced expression of cyclin E and cyclin A in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 2001; 21: 657-662
- 30 Shih HC, Shiozawa T, Kato K, Imai T, Miyamoto T, Uchikawa J, Nikaido T, Konishi I. Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex steroid receptors in endometrial carcinoma: positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator. *Hum Pathol* 2003; 34: 471-478
- 31 Akli S, Zheng PJ, Multani AS, Wingate HF, Pathak S, Zhang N, Tucker SL, Chang S, Keyomarsi K. Tumor-specific low molecular weight forms of cyclin E induce genomic instability and resistance to p21, p27, and antiestrogens in breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 3198-3208
- 32 Semba S, Itoh N, Ito M, Harada M, Yamakawa M. The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1957-1963

电编 张敏 编辑 王晓瑜

肝癌组织巨噬细胞移动抑制因子的表达及对肿瘤细胞增殖和血管形成的影响

关泉林, 于晓辉, 霍永忠, 李波

关泉林, 兰州大学第一医院肿瘤外科 甘肃省兰州市 730000
于晓辉, 兰州军区兰州总医院消化科 甘肃省兰州市 730030
霍永忠, 广东省中医院普外科 广东省广州市 510120
李波, 四川大学华西医院普外科 四川省成都市 610041
关泉林, 2005年四川大学临床医学博士, 副教授, 主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究.

通讯作者: 李波, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院普外科. cdlibo@medmail.com
收稿日期: 2006-04-08 接受日期: 2006-04-29

Expression of macrophage migration inhibitory factor and its effect on cell proliferation and angiogenesis in human liver cancer

Quan-Lin Guan, Xiao-Hui Yu, Yong-Zhong Huo, Bo Li

Quan-Lin Guan, Department of Tumor Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Xiao-Hui Yu, Department of Gastroenterology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Yong-Zhong Huo, Department of General Surgery, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Bo Li, Department of General Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Bo Li, Department of General Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. cdlibo@medmail.com
Received: 2006-04-08 Accepted: 2006-04-29

Abstract

AIM: To determine the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its effect on cell proliferation and angiogenesis.

METHODS: The protein expression of MIF, interleukin-8 (IL-8), and vascular endothelial factor (VEGF) as well as microvessel density (MVD) were examined by immunohistochemistry in HCC tissues ($n = 40$), cancer-adjacent liver tissues ($n = 40$) and normal liver tissues ($n = 10$). At the same time, real time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) was used to detect the mRNA

levels of MIF, VEGF and IL-8. After human hepatocarcinoma cell line Bel-7402 was treated with recombinant MIF (rMIF), cell proliferation was detected by MTT assay and the secretion levels and mRNA expression of VEGF and IL-8 were examined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and RQ-PCR, respectively.

RESULTS: The positive rates of MIF, IL-8 and VEGF in HCC tissues were significantly higher than those in normal liver tissues (72.5% vs 30.0%, 67.5% vs 20.0%, 62.5% vs 30.0%, all $P < 0.01$). The expression of MIF and IL-8 were markedly correlated with VEGF expression ($r = 0.271$, $P < 0.05$) and MVD ($r = 0.284$, $P < 0.05$). VEGF concentration in the supernatant of Bel-7402 cells was higher (900.00 ± 264.58 ng/L) than that in the controls (180 ± 50 ng/L) at the 24th hour after rMIF treatment ($P < 0.01$). However, there was no significant variation in IL-8 concentration ($P > 0.05$). The post-treatment level of VEGF mRNA was 6.86 times as high as that without treatment ($P < 0.05$), and there was no significant change in IL-8 mRNA expression ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The over-expression of MIF plays a crucial role in the angiogenesis of liver cancer and the roles of MIF and IL-8 may be realized via VEGF.

Key Words: Liver cancer; Macrophage migration inhibitory factor; Vascular endothelial factor; Interleukin-8; Microvessel density; Immunohistochemistry; Real time quantitative polymerase chain reaction

Guan QL, Yu XH, Huo YZ, Li B. Expression of macrophage migration inhibitory factor and its effect on cell proliferation and angiogenesis in human liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):39-45

摘要

目的: 研究巨噬细胞移动抑制因子(MIF)在原发性肝癌中的表达及对肝癌细胞增殖和血管形成的影响.

■背景资料

原发性肝癌(PLC)的高转移性和高复发性是影响其预后的主要因素. 深入研究原发性肝癌,包括肝细胞性肝癌(HCC)的转移复发机制和积极探索有效的抗复发治疗措施等是当前原发性肝癌诊治中的重点和难点. 最新的研究表明,肝癌的生长和代谢需要持续的血管生成;肝癌的血管新生化与其生长、浸润转移、分期及预后有着密切联系,探索原发性肝癌血管新生化的机制及抗血管生成策略是肝癌基础与临床研究领域的热点.

■ 研发前沿

肿瘤血管形成受正负调节因子的调节,正调节因子主要包括: VEGF, bFGF, pIGF等,他们起刺激和启动血管形成的作用. 负调节因子包括各种抑素. VEGF是作用最强、最重要的促血管内皮细胞生长因子,近几年针对EGFR, VEGF的靶向治疗已取得喜人的疗效,但仍有其局限性,多靶点治疗是将来发展的方向.

方法: 免疫组化法检测40例肝癌、癌旁组织和10例正常肝组织中MVD及MIF, IL-8和VEGF蛋白的表达情况, RQ-PCR检测MIF, IL-8和VEGF的mRNA表达水平. MTT法检测人重组MIF(rMIF)对Bel-7402肝癌细胞株增殖的影响, 酶联免疫吸附试验(ELISA)和实时定量聚合酶链反应(RQ-PCR)检测VEGF和IL-8的分泌和mRNA的表达.

结果: MIF, VEGF和IL-8在肝癌组织中均高表达(72.5%, 67.5%, 62.5%), 经 χ^2 检验, 与正常组织相比(30.0%, 20.0%, 30.0%), 差异具有显著性($P<0.01$). MIF和IL-8的表达与VEGF的表达呈正相关($r=0.271$, $P<0.05$), 并且与MVD显著相关($r=0.284$, $P<0.05$). rMIF和Bel-7402共培养24 h后, 上清中VEGF含量为 900 ± 265 ng/L, 对照组为 180 ± 50 ng/L($P<0.01$), 而IL-8含量改变无明显的变化($P>0.05$); 实验组肝癌细胞株VEGF mRNA表达量是对照组的6.86倍($P<0.05$); 而IL-8 mRNA是对照组的1.23倍($P>0.05$).

结论: MIF是一种血管生成因子, MIF和IL-8的参与肿瘤血管形成有可能是通过VEGF发挥作用.

关键词: 肝癌; 巨噬细胞移动抑制因子; 血管内皮生长因子; 白细胞介素-8; 微血管密度; 免疫组织化学; 实时定量聚合酶链反应

关泉林, 于晓辉, 霍永忠, 李波. 肝癌组织巨噬细胞移动抑制因子的表达及对肿瘤细胞增殖和血管形成的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(1):39-45

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/39.asp>

0 引言

巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种来源于活化T淋巴细胞和巨噬细胞的细胞因子, 在机体的炎症反应中起炎症介质的作用. 近年来, 研究发现, MIF在有些肿瘤发展和演进的过程中也起非常重要的作用, 他可能涉及肿瘤细胞的分化、增殖及肿瘤血管的生成, 抑制肿瘤细胞的凋亡. 由于目前尚未发现MIF的受体分子, 因而还不了解MIF促进肿瘤细胞信号传导的作用机制, 他可能涉及肿瘤细胞的分化、增殖及肿瘤血管的生成, 抑制肿瘤细胞的凋亡. 并且, 在一些癌前病变中也呈高表达, 提示MIF有可能成为一种肿瘤标记物和预测肿瘤发生的检测指标. 有文献报道MIF可明显上调IL-8, TGF- β 和VEGF, 提示MIF可能

是通过上调这些血管生长因子, 促进肿瘤微血管的形成, 以实现肿瘤细胞的恶性增殖. MIF在原发性肝癌的作用报道较少, 我们探讨了MIF在肝癌发生、发展及血管生成中的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-04/12新鲜的原发性肝癌及癌旁组织标本40例, 男33例, 女7例, 年龄27-75(中位51.5)岁. 以上标本均术中取材, 取一小部分立即液氮保存, 然后在-80℃冰箱冻存; 并取10例正常肝组织(肝移植的供肝无乙肝、丙肝等肝病背景)为对照, 余肝癌组织送病理科行常规病理组织学检查, 所有标本均经病理科确诊为肝癌. 所有患者术前未经介入、放射及射频等治疗. 查阅病历, 收集临床及病理组织学资料. TNM采用国际抗癌联盟(UICC)的分期方法及日本肝癌研究组进一步归纳将肝癌分为4期, 其中I期1例, II期15例, III期14例和IV期11例. 肿瘤Edmondson分级: I-II级23例, III-IV级17例; 伴有肝硬化33例; 合并门静脉癌栓11例; HBsAg阳性36例; 肿瘤直径 ≤ 5 cm 5例, > 5 cm 25例, 多发10例; AFP ≥ 400 $\mu\text{g/L}$ 者24例, < 400 $\mu\text{g/L}$ 者16例. 肝细胞癌37例, 为混合性肝癌2例, 腺癌1例. 人肝癌细胞系Bel-7402细胞由四川大学华西医院传染科实验室提供, 常规培养传代, 待细胞长满培养瓶底的70%-80%时备用. 免疫组织化学采用SABC法. MIF一抗采用鼠抗人MIF mAb(Santa Cruz), 工作浓度2 mg/L. VEGF一抗采用鼠抗人VEGF mAb(武汉博士德公司), 工作浓度4 mg/L. IL-8一抗采用鼠抗人IL-8 mAb(Santa Cruz), 工作浓度2 mg/L. CD34一抗采用鼠抗人CD34 mAb(武汉博士德公司), 工作浓度2 mg/L. 用PBS缓冲液替代各种第一抗体做为阴性对照. 人MIF的上下游引物及探针: 正义链: 5'-CTGCACAGCATCGGCAAGAT-3'; 反义链: 5'-AGTTGATGTAGACCCTGTCC-3'; TaqMan: 5'-CAGCAGGCCGCACAGCAGCTT-3'; 扩增产物片段为112 bp. 人VEGF的上下游引物及探针: 正义链: 5'-GCAGATCATCACGAAGTGGT-3'; 反义链: 5'-TGAAGATGTACTCGATCTCATCA-3'; TaqMan: 5'-CCC TGGTGGACATCTTCCAGG-3'; 扩增产物片段为125 bp. 人IL-8的上下游引物及探针: 正义链: 5'-CAAACCTTTCCACCCCAAAT-3'; 反义链: 5'-CAAACCTTTCCACCCCAAAT-3'; TaqMan: 5'-CTCTGTCTGGACCCCAAAGGA-3', 扩增产物片段为169 bp. 人GAPDH的上下游引物及探针:

正义链: 5'-GGGTGTGAACCATGAGAAGT-3';
反义链: 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACCT-3';
TaqMan: 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAGC-3';
扩增产物片段为180 bp(大连宝生物)。

1.2 方法

1.2.1 实时定量PCR 取-80℃冷冻保存的组织, 采用TRIzol试剂(美国MRC公司), 提取组织的总RNA, 按试剂盒操作说明操作。提取的总RNA经10 g/L琼脂糖凝胶电泳结果, 可见28 S, 18 S, 5 S三条带, 无DNA污染条带, 无明显降解条带, 表明提取的总RNA纯度较高。RNA的逆转录采用RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(立陶宛MBI公司), 按试剂盒操作说明操作。将cDNA进行常规PCR扩增, 扩增条件(略), 常规PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 目的条带清晰, 且没有杂带, 说明引物设计合成无误, 可以进行荧光定量PCR(FTC2000, 加拿大枫岭公司)。制定标准曲线, 扩增条件如下: 94℃ 1 min, 94℃ 10 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共45 cycles。45循环的扩增反应结束后, 系统将采集到的每一循环反应时的各反应管的荧光强度增长指数(DRn)进行分析绘制每一反应管的扩增动力学曲线。根据动力学曲线确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值时的扩增循环数(Ct值), 根据Ct值与标准模板初始拷贝的对数值作图, 得到该样品的标准曲线。将逆转录得到的cDNA样品中各取5 μL, 加入和上面完全相同的反应体系中, 在同样的反应条件下行PCR扩增。收集数据, 绘制动力学曲线, 测定各样品的Ct值与标准曲线进行比较, 得出待测样品的相对拷贝数。在PCR反应过程中, 设定无cDNA样品的空白管作为阴性对照。依据参考文献的计算方法对荧光定量PCR所得数据计算相对拷贝数后行方差分析 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{肿瘤组织目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{肿瘤组织目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{正常肝组织}}$; 标化后的目的基因的相对表达比^[1] = $1.9^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.2.2 MTT比色试验 将肝癌细胞株Bel-7402稀释成 0.5×10^8 个/L, 以每孔200 μL接种于96孔板, 培养24 h待细胞贴壁后, 更换培养液。各实验组加入不同浓度的人重组MIF(rMIF)(R&D System公司), 以不加药物组作为对照, 每组设3个复孔。分别于加药后24, 48, 72 h, 加入MTT 20 μL, 继续培养4 h, 加入DMSO 150 μL震荡溶解10 min, 使结晶充分溶解。空白对照调零, 选择595 nm波长在酶联免疫检测仪上, 测定各孔的光吸收值(A值), 以时间为横轴, A值为纵轴, 绘制细胞生长曲线。

1.2.3 酶联免疫吸附试验 在实验组中加入终浓度为200 μg/L的rMIF, 继续培养24 h, 吸取细胞培养上清500 μL, 12 000 g, 离心5 min以除去上清液中的细胞碎片。每组设3个复孔。人VEGF ELISA试剂盒和IL-8 ELISA试剂(武汉博士德生物公司), 按试剂盒操作说明操作。用酶标仪在450 nm测定A值, 将TBM空白显色孔设为对照。所有的标准品和样品的吸收值减去零孔的吸收值后, 在坐标纸上画出曲线, 以吸光值作为纵坐标, 以浓度作为横坐标。另在实验组中加入终浓度为200 μg/L的rMIF, 共培养24 h, 收获细胞, 提取总RNA, 进行VEGF mRNA和IL-8 mRNA的RQ-PCR检测(引物序列、实验方法、步骤和计算统计方法同前)。

统计学处理 结果以均数±标准差(mean±SD)表示, 采用SPSS 11.0统计软件进行分析, 相关变量采用方差分析, *t*检验, 相关性检验采用Pearson, χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性标准。

2 结果

2.1 肝癌组织中MIF, VEGF和IL-8的表达 MIF在肝癌和癌旁组织及正常肝组织中的阳性表达率分别为72.5%, 90.0%和30.0%; VEGF的阳性表达率分别为67.5%, 87.5%和20.0%; IL-8的阳性表达率分别为62.5%, 82.5%和30.0%, 经 χ^2 检验, 均具有统计学意义($P < 0.01$)。以CD34标记的微血管密度(MVD)值在肝癌的组织中计数值范围为0-16.71, 中位数为5.68。经Pearson相关分析, 肝癌组织中MIF, VEGF和IL-8的表达与MVD具有相关关系($r = 0.284, P < 0.05$)。MIF和VEGF的表达与肿瘤的分化程度有关($P < 0.05$); MIF和IL-8的表达同肿瘤有无包膜形成有关($P < 0.05$), 而且IL-8的表达与肿瘤的大小有关($P < 0.05$); 并且MIF和IL-8的表达与VEGF的表达呈正相关($r = 0.271, P < 0.05$)。经RQ-PCR检测, MIF mRNA在肝癌和癌旁组织表达分别是正常肝组织的3.22和6.52倍, VEGF mRNA在肝癌和癌旁组织表达分别是正常肝组织3.78和4.64倍, IL-8 mRNA在肝癌和癌旁组织表达分别是正常肝组织3.39和5.62倍, 经*t*检验, 均具有统计学意义($P < 0.05$)(表1)。

2.2 rMIF对人肝癌细胞的影响 rMIF在50 μg/L组, 24 h对肝癌细胞的生长影响不明显($P > 0.05$), 48 h后肝癌细胞的生长逐渐增加($P < 0.05$), 随着浓度的增加和作用时间的延长, 肝癌细胞的生长明显增加, 在72 h最为显著, 肝细胞的生长

■相关报道

MIF不仅是免疫和炎症反应中必要成分, 也可在肿瘤细胞中表达, 并且与较差的预后和较高的肿瘤转移危险性密切相关, MIF在许多肿瘤中表达, 如淋巴瘤、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肝和肺癌。有实验证明MIF是诱导乳腺癌细胞增殖和抑制P53功能的关键的细胞因子。Benedetti发现IL-8像VEGF一样可显著刺激HDMEC增生, 说明IL-8在肿瘤细胞和内皮细胞的生长过程中起重要作用, IL-8和VEGF共同作用时可起协同效应, 使凋亡细胞的数量减少50%。进一步通过细胞实验发现, MIF的刺激增强了癌细胞VEGF的分泌水平, 同时也上调了VEGF mRNA表达MIF在癌组织的高表达, 说明有可能促进肝癌细胞的增殖和血管形成, 有报道MIF与肝癌和胃癌的血管形成有关。

■创新盘点

肝癌的血管生成促进因子有多种,如血管内皮生长因子(VEGF)、血小板源性生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)、表皮细胞生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、血管趋化素、前列腺素E₁、E₂及胰岛素样生成因子等,其中以VEGF作用最强。肝癌血管生成促进因子与抑制因子以及他们之间的相互作用关系仍需进一步深入研究。本文重点研究了MIF、IL-8和VEGF对肝癌中的作用及对血管形成的影响以及他们之间的相互作用。

表 1 原发性肝癌组织MIF、VEGF和IL-8的表达与部分临床病理特点的关系

项目	n	MIF		VEGF		IL-8	
		蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
性别							
男	33	22 ^a	3.65 ± 2.43	23	12.21 ± 1.89	22	5.00 ± 4.62
女	7	7	2.07 ± 1.02	4	12.57 ± 1.72	7	4.39 ± 3.70
年龄							
≥60	15	12	2.77 ± 2.06	10	12.13 ± 1.89	11	4.67 ± 2.61
<60	25	17	3.74 ± 2.43	17	12.36 ± 1.85	18	4.40 ± 4.44
分化							
I - II	21	12 ^a	4.50 ± 2.64 ^a	9 ^a	13.05 ± 1.86 ^a	10	4.24 ± 2.74
III - IV	19	17	2.13 ± 0.91	18	11.42 ± 1.44	17	4.79 ± 4.81
大小							
≤5 cm	5	2	2.30 ± 0.98	4	11.10 ± 0.22	3	9.10 ± 5.73 ^a
>5 cm	25	20	3.22 ± 2.23	15	12.46 ± 1.91	16	3.70 ± 3.41
多发	10	5	4.30 ± 2.83	8	12.40 ± 2.01	7	4.20 ± 1.99
分期							
I	1	0		1		0	
II	15	9	3.73 ± 2.32	8	12.77 ± 1.80	7	4.77 ± 4.49
III	14	12	2.53 ± 1.77	10	11.90 ± 1.93	11	3.87 ± 3.88
IV	11	8	4.22 ± 2.99	8	12.22 ± 1.86	9	4.39 ± 1.80
包膜							
有	12	6 ^a	3.65 ± 2.43	6	12.19 ± 1.44	7	6.27 ± 4.40 ^a
无	28	23	3.24 ± 2.30	21	12.32 ± 2.03	23	3.65 ± 3.26
癌栓							
有	11	8	3.40 ± 12.65	9	12.2 ± 31.66	7	3.77 ± 3.04
无	29	21	3.36 ± 2.23	18	12.29 ± 1.93	29	4.78 ± 4.09
肝硬化							
有	33	23	3.49 ± 2.42	22	12.46 ± 1.70	20	4.85 ± 4.03
无	7	6	2.86 ± 1.87	5	11.43 ± 2.37	5	2.86 ± 2.12
AFP							
≥400 mg/L	26	16	3.79 ± 2.43 ^a	19	12.19 ± 1.53	17	5.21 ± 5.09
<400 mg/L	14	13	2.61 ± 1.95	8	12.43 ± 2.38	10	4.12 ± 2.98
HBSAg							
阳性	36	25	3.58 ± 2.35	23	12.39 ± 1.65	26	3.96 ± 0.66
阴性	4	4	1.50 ± 0.58	4	11.25 ± 3.30	3	2.36 ± 1.18

^aP<0.05.

与对照组相比有显著的差异($P<0.01$)。rMIF与Bel-7402肝癌细胞共24 h后,培养上清中VEGF含量为 900 ± 265 ng/L,对照组为 180 ± 50 ng/L,经 t 检验,具有统计学意义($P<0.01$); IL-8含量为 39 ± 22 ng/L,对照组为 47 ± 34 ng/L,经 t 检验,无统计学意义($P>0.05$)。rMIF刺激Bel-7402肝癌细胞24 h后,经RQ-PCR检测,实验组肝癌细胞VEGF mRNA表达是对照组的6.86倍($P<0.05$); IL-8 mRNA的表达是对照组的1.23倍($P>0.05$);说明rMIF刺激后,肝癌细胞VEGF mRNA表达上调,而IL-8 mRNA的表达无明显变化。

3 讨论

MIF不仅是免疫和炎症反应中必要成分,也可在肿瘤细胞中表达,并且与较差的预后和较高的肿瘤转移危险性密切相关^[2-3]。MIF在许多肿瘤中表达,如淋巴瘤^[4]、前列腺癌^[5-6]、乳腺癌^[7]、结肠癌^[8]、肝^[9]和肺癌^[2]等。我们的研究证实,MIF在肝癌组织和癌旁组织分别有72.5%和90.0%表达,明显高于正常肝组织($P<0.001$);肝癌组织和癌旁组织的mRNA分别是正常肝组织的3.22和6.52倍($P<0.01$),肝癌组织MIF mRNA水平明显低于癌旁组织,癌旁组织的MIF mRNA是癌组

织的2.03倍, 存在明显差异($P<0.05$), 这与肝癌的核酸代谢旺盛密切相关, 说明MIF有可能参与肿瘤的生长和增殖. MIF是一种炎症因子, 在促进各种炎症疾病的病理过程中, MIF促进细胞生长的特性是其重要的机制. 有实验证明MIF是诱导乳腺细胞增殖和抑制P53功能的关键的细胞因子^[10]. MIF在癌组织的高表达, 并且与MVD相关, 说明有可能促进肝癌细胞的增殖和血管形成, 有报道MIF与肝癌和胃癌的血管形成有关^[11-12].

VEGF主要由癌细胞产生, 并启动了肿瘤血管生长, 癌细胞可通过自分泌途径促进癌组织内血管的生成^[13-14]. 已有VEGF能强烈诱导血管形成及刺激HCC复发转移的实验研究报告^[15-16]. IL-8属于趋化因子CXC基因家族, 是一种多功能的细胞因子. 他在许多肿瘤中都表达, 如乳腺癌^[17]、胃癌^[18]、胰腺癌^[19]和肝癌^[20]. IL-8以旁分泌方式与白细胞和血管内皮细胞表面的CXCR受体结合, 促使白细胞趋化进入肿瘤组织和引起内皮细胞增殖形成新生血管, 从而加速肿瘤生长和转移^[21]. 我们发现, 肝癌组织和癌旁组织VEGF和IL-8表达高于正常肝组织, 并且与MVD相关, 表明VEGF和IL-8有可能参与肝癌的增殖和血管形成. 我们还发现, MIF mRNA和IL-8 mRNA的表达与VEGF mRNA表达呈正相关($P<0.05$), 这说明MIF和IL-8参与肿瘤血管的形成有可能是通过VEGF实现的. 有实验发现, MIF在多形性成神经胶质细胞瘤明显高表达, 在体外实验发现, 缺氧和低血糖状态能明显上调MIF的表达和促进血管形成, 同时MIF的表达同VEGF的表达明显相关^[22-23]. 肝癌细胞可以产生IL-8, 是肝癌的一种血管生成因子^[24]. 我们的实验未证实MIF mRNA和IL-8 mRNA表达的相互关系. 肝癌的血管形成和增殖是多种细胞因子相互作用的结果, 从我们的实验可以说明MIF和IL-8上调肝癌细胞VEGF的表达, 二者协同作用, 促进血管的形成和肿瘤增殖.

Benedetti *et al*^[25]发现IL-8像VEGF一样可显著刺激HDMEC增生, 说明IL-8在肿瘤细胞和内皮细胞的生长过程中起重要作用, IL-8和VEGF共同作用时可起协同效应, 使凋亡细胞的数量减少50%. 进一步通过细胞实验发现, MIF的刺激增强了癌细胞VEGF的分泌水平, 同时也上调了VEGF mRNA表达; 但是IL-8的分泌水平和mRNA的表达未见明显上调, 可能与这种肝癌细胞不分泌或者仅分泌极微量的IL-8, 或者是通过其他信号转导途径分泌其他细胞因子而发挥作

用. 但也有文献报道, MIF能刺激肝癌细胞分泌IL-8, 促进肝癌细胞的侵袭和转移, 认为MIF与肝癌的转移和血管生成有关^[13]. 肿瘤血管形成受正负调节因子的调节, 正调节因子主要包括: VEGF, bFGF, pIGF等, 他们起刺激和启动血管形成的作用. 负调节因子包括各种抑素. 近年来认为MIF是具有血管生成因子功能的炎症因子, 许多肿瘤血管生成前都有MIF的过表达, 因而对肿瘤细胞转移过程中的微血管形成具有重要的作用. MIF作用于肿瘤细胞表面的受体, 使其分泌VEGF, 从而促进血管内皮的形成. MIF还可以上调其他细胞因子的, 如TGF- β , PDGF的表达, 并与其共同作用促进肿瘤的增殖和血管的形成, Shimizu *et al*^[26]采用背侧气囊技术在人黑色素瘤模型也证实MIF抗体对肿瘤血管形成的抑制作用, 说明MIF在肿瘤相关的血管形成中起着重要的作用^[27]. Chesney *et al*^[28]将同源的B淋巴细胞注入syngeneic小鼠体内, 观察在MIF多克隆中和抗体缺乏/存在的情况下肿瘤的生长情况, 结果发现, MIF的免疫中和抗体在肿瘤生长的初始阶段明显影响肿瘤生长的大小; 然后用反义核算技术抑制肿瘤形成部位MIF的形成, 取得了和MIF特异性抗体一样的抑瘤效果, 抑制MIF的反义核酸几乎完全抑制了肿瘤的生长. 进一步研究发现, MIF的中和抗体不是抑制肿瘤细胞的增殖, 而是抑制内皮细胞的生长. 说明MIF是内皮细胞增殖和肿瘤血管生成的必需因子.

我们研究MIF, VEGF和IL-8的表达与肝癌临床病理特点的关系, 结果表明, MIF和VEGF的表达与肿瘤的分化程度有关, 提示MIF和VEGF与肿瘤的分化、发展有关, 说明他们能够成为反映恶性肿瘤生物学行为及预后的重要生物学标记物; MIF和IL-8的表达同肿瘤的包膜形成有关, 提示癌细胞MIF和IL-8的表达可能影响了癌细胞间的黏附性, 使癌细胞更加容易相互分离移动, 向周围邻近组织及周围血管侵袭, 促进肿瘤向远处转移或肝内播散. 而且IL-8的表达与肿瘤的大小有关, 说明参与肿瘤的增殖与血管的形成^[29].

MIF作用特征之一是在许多生物学现象里呈钟型的剂量依赖曲线, 如抑制巨噬细胞的迁移, 这就说明高低浓度的MIF都可以对细胞的生长起到调节作用. 我们采用不同浓度的MIF对体外培养的肝癌细胞的生长影响进行研究, 结果表明, 低浓度的就可以促进肝癌细胞的生长增殖, 并且随着剂量增加和时间的延长其生长增

■应用要点

目前, 针对抑制肿瘤血管新生的药物有许多优点, 如这类制剂作用广泛, 可用于多种肿瘤, 不诱导肿瘤细胞的耐药性, 可多次重复应用, 副作用少等. 因此对抑制生成因子的研究无疑已成为当前研究的新热点. 随着对其的进一步深入研究, 有可能增加肿瘤治疗有效的途径.

■同行评价

作者采用免疫组化法和RQ-PCR检测40例肝癌、癌旁组织和10例正常肝组织中MVD, MIF, IL-8, VEGF蛋白和mRNA表达, 并以MTT法检测rMIF对Bel-7402肝癌细胞株增殖, 以ELISA和RQ-PCR检测VEGF和IL-8的分泌和mRNA表达。文章科学性、创新性和可读性能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究水平。

殖逐渐增强, 说明MIF能够促进肿瘤细胞的增殖和生长。

所以有理由推断, 在生长因子诱导细胞增殖的作用中, MIF是生长因子依赖型血管生成的介质, 可能是通过刺激肿瘤细胞分泌VEGF发挥作用。MIF有可能用作肝癌治疗的一种新的靶点。

4 参考文献

- 1 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- 2 Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, Ogura S, Isobe H, Dosaka-Akita H, Ogata A, Shindoh M, Ohbuchi T, Kawakami Y. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2000; 89: 334-341
- 3 del Vecchio MT, Tripodi SA, Arcuri F, Pergola L, Hako L, Vatti R, Cintorino M. Macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and combination endocrine treatment-related changes. *Prostate* 2000; 45: 51-57
- 4 Nishihira J, Ishibashi T, Fukushima T, Sun B, Sato Y, Todo S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 995: 171-182
- 5 Meyer-Siegler K, Hudson PB. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology* 1996; 48: 448-452
- 6 Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Vera PL. Further evidence for increased macrophage migration inhibitory factor expression in prostate cancer. *BMC Cancer* 2005; 5: 73
- 7 Bando H, Matsumoto G, Bando M, Muta M, Ogawa T, Funata N, Nishihira J, Koike M, Toi M. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 389-396
- 8 Akbar SM, Abe M, Murakami H, Tanimoto K, Kumagi T, Yamashita Y, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis; relevance to pathogenesis. *Cancer Lett* 2001; 171: 125-132
- 9 Ren Y, Tsui HT, Poon RT, Ng IO, Li Z, Chen Y, Jiang G, Lau C, Yu WC, Bacher M, Fan ST. Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 107: 22-29
- 10 Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 1999; 190: 1375-1382
- 11 Hira E, Ono T, Dhar DK, El-Assal ON, Hishikawa Y, Yamanoi A, Nagasue N. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 588-598
- 12 Shun CT, Lin JT, Huang SP, Lin MT, Wu MS.

Expression of macrophage migration inhibitory factor is associated with enhanced angiogenesis and advanced stage in gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3767-3771

- 13 An FQ, Matsuda M, Fujii H, Matsumoto Y. Expression of vascular endothelial growth factor in surgical specimens of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 153-160
- 14 El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, Nabika T, Nagasue N. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998; 27: 1554-1562
- 15 Huang GW, Yang LY, Lu WQ. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: Impact on neovascularization and survival. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1705-1708
- 16 李立人, 施公胜, 孙超. PCNA和VEGF在肝细胞肝癌中的表达意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 560-561
- 17 Benoy IH, Salgado R, Van Dam P, Geboers K, Van Marck E, Scharpe S, Vermeulen PB, Dirix LY. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7157-7162
- 18 Kitadai Y, Haruma K, Mukaida N, Ohmoto Y, Matsutani N, Yasui W, Yamamoto S, Sumii K, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E. Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2735-2740
- 19 Miyamoto M, Shimizu Y, Okada K, Kashii Y, Higuchi K, Watanabe A. Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 47: 47-57
- 20 Kubo F, Ueno S, Hiwatashi K, Sakoda M, Kawaida K, Nuruki K, Aikou T. Interleukin 8 in human hepatocellular carcinoma correlates with cancer cell invasion of vessels but not with tumor angiogenesis. *Ann Surg Oncol* 2005; 12: 800-807
- 21 Ferrer FA, Patschenko AG, Miller LJ, Anderson K, Grunnet M, McKenna PH, Kreutzer D. Angiogenesis and neuroblastomas: interleukin-8 and interleukin-8 receptor expression in human neuroblastoma. *J Urol* 2000; 164: 1016-1020
- 22 Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, Otterson MF, Ota DM, Luger N, Domschke W, Binion DG. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 2003; 278: 8508-8515
- 23 Tomiyasu M, Yoshino I, Suemitsu R, Okamoto T, Sugimachi K. Quantification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3755-3760
- 24 Akiba J, Yano H, Ogasawara S, Higaki K, Kojiro M. Expression and function of interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2001; 18: 257-264
- 25 Benedetti S, Erwin G, Meir V. Role of interleukin-8

- as a survival factor for cultured endothelial cells. *Proceedings of American association of cancer. Research* 2001; 42: #4
- 26 Shimizu T, Abe R, Nakamura H, Ohkawara A, Suzuki M, Nishihira J. High expression of macrophage migration inhibitory factor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 751-758
- 27 Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, Une Y, Todo S. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med* 1998; 4: 707-714
- 28 Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med* 1999; 5: 181-191
- 29 Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003; 170: 3369-3376

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中华医学会第七次全国消化系疾病学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会消化病学分会定于2007-05月上旬在山东省济南市召开第七次全国消化系疾病学术会议. 现将会议的征文内容及有关事项通知如下.

1 征文内容

消化系统疾病的流行病学、基础及临床(包括内镜诊断和治疗)研究. 因会议论文交流将按下列组别进行分会场交流, 故务必请在下列8个组别中选择1个您认为适合的交流组别, 并在论文摘要的右下角上标明.(1)功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); (2)幽门螺杆菌及其相关疾病; (3)胰腺疾病; (4)肝胆疾病; (5)胃肠道肿瘤; (6)炎症性疾病; (7)胃肠激素; (8)其他.

2 征文要求

请提供800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者的姓名、单位和邮政编码. 并提供电脑打印稿(附软盘), 经所在的单位审查盖章后寄至中华医学会学术会务部刘亚君收(北京东四西大街42号 邮编 100710), 信封上请注明会议名称. 请最好同时通过本次会议专用网站(网址: www.assimilation2007.com)邮寄电子文稿和报名. 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, 不予受理. 截稿日期: 2007-02-28(以当地邮戳为准)

肠易激综合征精神心理因素、肠黏膜肥大细胞及5-羟色胺的变化

陈文科, 邹益友, 李富军, 罗丹

■背景资料

肠易激综合征是由腹痛或腹部不适伴排便异常组成的一组肠功能障碍性综合征, 无任何器质性或异常的生化指标。该病是胃肠病中最常见的疾病之一, 发病率甚高, 但其发病原因和发病机制至今尚不完全明了。

陈文科, 北京大学深圳医院消化内科 广东省深圳市 518036
邹益友, 李富军, 中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410078

罗丹, 江门市中心医院消化内科 广东省江门市 529030

陈文科, 2005年中南大学湘雅医院硕士, 医师。

通讯作者: 邹益友, 410078, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院消化内科, zouyiyou1957@163.com

电话: 0731-4327106 传真: 0731-4327348

收稿日期: 2006-10-09 接受日期: 2006-10-25

Changes of psychosocial factors, enteric mucosal mast cells and 5-hydroxytryptamine in irritable bowel syndrome

Wen-Ke Chen, Yi-You Zou, Fu-Jun Li, Dan Luo

Wen-Ke Chen, Department of Gastroenterology, Shenzhen Hospital of Beijing University, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China

Yi-You Zou, Fu-Jun Li, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China

Dan Luo, Department of Gastroenterology, Central Hospital of Jiangmen City, Jiangmen 529030, Guangdong Province, China

Correspondence to: Yi-You Zou, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China. zouyiyou1957@163.com

Received: 2006-10-09 Accepted: 2006-10-25

Abstract

AIM: To explore the roles of psychosocial factors, enteric mucosal mast cells (MC) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the pathogenesis of irritable bowel syndrome (IBS).

METHODS: Hamilton anxiety scale (HAMA) and Hamilton depression scale (HAMD) were used to evaluate the psychosocial status of 27 IBS patients and controls. Immunohistochemistry was used to examine the number of mucosal MC in ileocecal junction (ICJ), and the content of mucosal 5-HT in ICJ was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC) with an electrochemical detector. The relationship among the scores of HAMA and HAMD, the number of MC and the concentration of 5-HT were analyzed.

RESULTS: The scores of HAMA (18.26 ± 6.23) and HAMD (20.93 ± 6.96) in IBS patients were significantly higher than those in the controls (9.15 ± 4.91 , 9.89 ± 5.31) ($P < 0.05$). The number of mucosal MC and the percentage of degranulated MC in ICJ were significantly higher in patients with constipation predominant IBS (C-IBS) ($22.1 \pm 6.5/\text{HP}$, $35.4\% \pm 7.1\%$) and diarrhea-predominant IBS (D-IBS) ($28.4 \pm 7.3/\text{HP}$, $42.3\% \pm 10.1\%$) than those in the controls ($15.6 \pm 6.9/\text{HP}$, $24.8\% \pm 7.2\%$) ($P < 0.05$), and they were also significantly higher in D-IBS patients than those in C-IBS patients ($P < 0.05$). The concentration of ileocecal mucosal 5-HT in C-IBS ($2669 \pm 920 \text{ ng/g}$) and D-IBS ($2628 \pm 906 \text{ ng/g}$) patients was markedly higher than that in the controls ($1893 \pm 984 \text{ ng/g}$) ($P < 0.05$), and it was not significantly different between D-IBS and C-IBS patients ($P > 0.05$). The scores of HAMA and HAMD were positively correlated with the number of MC ($r = 0.784$, 0.711) and the percentage of degranulated MC ($r = 0.842$, 0.860) in ICJ mucosa of IBS patients ($P < 0.01$), but not with the concentration of mucosal 5-HT ($P > 0.05$). The concentration of mucosal 5-HT was not correlated with the number of mucosal MC and the percentage of degranulated MC ($P > 0.05$).

CONCLUSION: IBS patients show the abnormal psychosocial status, increased number of MC, elevated percentage of degranulated MC and enhanced 5-HT in ICJ. The abnormal psychosocial factors are correlated with the increased number and degranulation of mucosal MC.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Pathogenesis; Psychosocial factors; Mast cell; 5-hydroxytryptamine

Chen WK, Zou YY, Li FJ, Luo D. Changes of psychosocial factors, enteric mucosal mast cells and 5-hydroxytryptamine in irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):46-50

摘要

目的: 探讨精神心理因素、肠黏膜肥大细胞

(MC)及5-羟色胺(5-HT)变化在肠易激综合征(IBS)发病机制中的作用。

方法:应用汉密尔顿焦虑量表(HAMA)和汉密尔顿抑郁量表(HAMD)分别对27例IBS患者和27例对照者进行精神心理因素评分。应用免疫组化法检测回盲部肠黏膜MC含量。应用高效液相色谱法检测回盲部肠黏膜5-HT含量。应用直线相关分析焦虑抑郁评分、回盲部肠黏膜MC数目和脱颗粒比率、5-HT浓度之间的关系。

结果:IBS组焦虑抑郁评分HAMA (18.26 ± 6.23)和HAMD (20.93 ± 6.96)总分均明显高于对照组(9.15 ± 4.91 , 9.89 ± 5.31), 差异有显著性($P < 0.05$)。IBS组回盲部肠黏膜MC数目、MC脱颗粒比率便秘型($22.1 \pm 6.5/\text{HP}$, $35.4\% \pm 7.1\%$)和腹泻型($28.4 \pm 7.3/\text{HP}$ 和 $42.3\% \pm 10.1\%$)明显高于对照组($15.6 \pm 6.9/\text{HP}$ 和 $24.8\% \pm 7.2\%$), 差异有显著性($P < 0.05$), 其中腹泻型较便秘型明显升高($P < 0.05$)。IBS组回盲部肠黏膜5-HT浓度便秘型和腹泻型明显高于对照组(2669 ± 920 , $2628 \pm 906 \text{ ng/g}$ vs $1893 \pm 984 \text{ ng/g}$, $P < 0.05$), 其中便秘型和腹泻型相比无显著性差异($P > 0.05$)。IBS患者焦虑抑郁评分与回盲部肠黏膜MC数目、MC脱颗粒比率呈正相关性($r_{\text{HAMA}} = 0.784$, 0.842 , $r_{\text{HAMD}} = 0.711$, 0.860 , $P < 0.01$), 与回盲部肠黏膜5-HT浓度无明显相关性($P > 0.05$)。IBS患者回盲部肠黏膜5-HT浓度与MC数目、MC脱颗粒比率之间无明显相关性($P > 0.05$)。

结论:IBS精神心理因素异常, 回盲部肠黏膜MC含量及活化比例增高, 5-HT浓度增高。精神心理因素异常与肠黏膜MC含量增加及肠黏膜MC的脱颗粒有关。

关键词:肠易激综合征; 发病机制; 心理因素; 肥大细胞; 5-羟色胺

陈文科, 邹益友, 李富军, 罗丹. 肠易激综合征精神心理因素、肠黏膜肥大细胞及5-羟色胺的变化. 世界华人消化杂志 2007;15(1):46-50

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/46.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是胃肠病中最常见的疾病之一, 发病率甚高, 但其发病原因和发病机制至今尚不完全明了。目前的研究认为, IBS的发生与胃肠动力、内脏感知、精神心理因素异常和肠道感染、脑-肠轴

之间的神经内分泌免疫网络功能紊乱有关^[1]。神经内分泌免疫机制是近年来研究的热点。现已证明, IBS患者的精神心理异常高于一般人。最近研究发现, 精神心理应激可促进下丘脑释放促肾上腺皮质激素释放因子, 能明显诱发IBS患者腹部症状, 促进人和鼠的结肠运动、黏液分泌、黏膜通透性及肥大细胞(MC)释放炎性介质, 提示精神心理刺激可通过肠道免疫内分泌等影响其功能。我们研究IBS患者焦虑、抑郁积分和结肠黏膜MC、5-HT的含量变化的关系, 探讨他们在IBS发病机制中的作用, 为精神心理因素与脑-肠轴的关系提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2004-08/2005-02门诊的IBS患者27例, 其中腹泻型(D-IBS)14例, 便秘型(C-IBS)13例, 平均年龄40.3(17-62)岁, 男12例, 女15例。符合Rome II标准, 且无器质性疾病的“警戒”表现, 大便秘结+潜血、腹部B超、肠镜等检查缺乏可解释症状的形态学改变和生化异常。对照组为无长期腹痛、腹胀、便秘、腹泻等消化道症状的健康体检者、志愿者或单纯痔疮患者27例, 平均年龄37.0(19-56)岁, 男13例, 女14例。所有IBS患者和11例对照者进行了结肠镜检查, 均取回盲部黏膜4-5块, 1块用40 g/L中性福尔马林液固定18 h后, 经系列乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋, 用于检测肥大细胞; 其余几块在生理盐水中稍漂洗后, 滤纸吸干, 精密分析天平称质量后迅速置于-70℃冰箱保存, 用于5-HT检测。鼠抗人MC类胰蛋白酶抗体、抗鼠/兔即用型快速免疫组化MaxVision™检测试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。5-HT对照品购自Sigma公司。乙腈(色谱纯)购自迪马公司。Olympus电子结肠镜, Olympus CX21型光学显微镜, 日本岛津公司LC-6A型液相色谱仪、L-ECD-6A电化学检测器。

1.2 方法 由两名经过专门培训的医生对所有IBS患者和对照者针对汉密尔顿焦虑量表(HAMA, 由Hamilton于1959年编制, 包括14个项目)、汉密尔顿抑郁量表(HAMD, 由Hamilton于1960年编制, 用24项版本)中的问题进行交谈, 根据患者的回答以及表现作出综合评定, 给予评分。总分是能较好地反映焦虑抑郁程度的指标, 即病情越轻, 总分愈低; 病情愈重, 总分愈高。肥大细胞检测: 石蜡标本常规连续切片, 采用免疫组化方法染色MC(参照试剂说明书)。每张切片随机选5

■研究前沿

目前的研究认为, IBS的发生与胃肠动力、内脏感知、精神心理因素异常和肠道感染、脑-肠轴之间的神经内分泌免疫网络功能紊乱有关。精神心理因素与脑-肠轴之间的神经内分泌免疫网络之间的互动机制是近年研究来的热门课题, 而肠道中重要的免疫细胞——肥大细胞和神经介质5-HT是其中的研究热点。

■创新亮点

通过研究IBS患者精神心理因素和结肠黏膜肥大、5-HT的含量变化的关系,探讨他们在IBS发病机制中的相互作用,此为本研究的一大亮点。

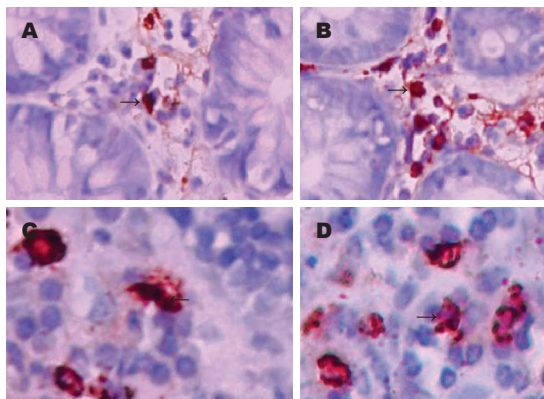


图1 结肠黏膜MC染色(DAB×400). A: 正常人; B: IBS; C: 正常脱颗粒; D: IBS脱颗粒。

个高倍视野(40×10),计数MC总数及脱颗粒MC数. MC计数以平均每高倍视野的MC个数表示,脱颗粒MC比率则以脱颗粒MC数占总MC数的比值表示. 5-HT检测采用高效液相电化学法测定,工作电压0.75 V. 高效液相电化学法最终结果为黏膜所含的5-HT质量,5-HT质量与黏膜质量相比,即为5-HT浓度(ng/g黏膜组织)。

统计学处理 所有实验数据均以均数±标准差表示,用SPSS 11.0软件包进行统计. 两个样本均数之间的比较采用 t 检验,多个样本均数之间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),焦虑抑郁评分、MC数目和脱颗粒比率、5-HT浓度之间关系采用Pearson直线相关分析, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 焦虑抑郁评分 IBS组HAMA(18.26±6.23)和HAMD(20.93±6.96)总分均明显高于对照组(9.15±4.91和9.89±5.31),差异有显著性($P<0.05$)。

2.2 MC免疫组化 光学显微镜下MC呈卵圆形或椭圆形,散在于黏膜腺体之间,并以小血管周围多见,胞质呈棕褐色,细胞核不着色;其中边界模糊,细胞周围有点、片状棕黄着色者为脱颗粒MC(图1). IBS组回盲部黏膜MC数目、脱颗粒比率均较对照组明显增多,差异有显著性($P<0.05$);其中腹泻型较便秘型明显增多,差异有显著性($P<0.05$,表1)。

2.3 5-HT检测结果 IBS组回盲部黏膜5-HT浓度与对照组相比明显增高,差异有显著性($P<0.05$);其中便秘型和腹泻型相比无显著性差异($P>0.05$,表1)。

表1 IBS患者回盲部黏膜MC和5-HT

分组	<i>n</i>	MC/HP	脱颗粒MC (%)	5-HT浓度 (ng/g)
IBS组便秘型	13	22.1±6.5 ^a	35.4±7.1 ^a	2669±920 ^a
IBS组腹泻型	14	28.4±7.3 ^{a,c}	42.3±10.1 ^{a,c}	2628±906 ^a
对照组	11	15.6±6.9	24.8±7.2	1893±984

^a $P<0.05$ vs 对照组; ^c $P<0.05$ vs 便秘型。

表2 焦虑抑郁评分与MC、5-HT的关系

指标	MC数目	MC脱颗粒比率	5-HT浓度
HAMA评分			
<i>r</i>	0.784	0.842	0.166
<i>P</i>	0.000	0.000	0.408
HAMD评分			
<i>r</i>	0.711	0.860	0.217
<i>P</i>	0.000	0.000	0.278
5-HT浓度			
<i>r</i>	0.091	0.056	
<i>P</i>	0.651	0.780	

2.4 焦虑抑郁评分与MC含量和5-HT浓度的关系 Pearson直线相关分析表明,IBS患者焦虑抑郁评分与回盲部肠黏膜MC数目、MC脱颗粒比率呈正相关性($P<0.01$),与回盲部肠黏膜5-HT浓度无明显相关性($P>0.05$,表2). IBS患者回盲部肠黏膜肥大细胞数目、肥大细胞脱颗粒比率与5-HT之间无明显相关性(P 均 >0.05 ,表2)。

3 讨论

国内外研究显示,心理社会因素与IBS密切相关,心理社会因素的异常可影响该病的发生、发展和预后^[2-5]. HAMA, HAMD心理量表是国际心理学界公认的进行心理客观、量化测定的具有权威性的标准量表,我们采用其来评定IBS患者的精神心理因素. 结果显示,IBS患者的焦虑、抑郁评分明显高于对照组,与国内外文献报道一致^[6-7],说明IBS患者有明显的精神心理异常. 已有研究表明,情绪或应激可以改变结肠和小肠运动,并且可以提高胃肠道内脏感觉的敏感性,在功能性胃肠疾病发病机制中起重要作用^[8]. MC表面有多种受体表达,当细胞受体与其识别的特异性抗原结合时,可被激活而发生特征性化学和形态改变,称为过敏性脱颗粒,能引起生物活性介质的通道开放,释放生物活性介质^[9-10].

■应用要点

精神心理因素异常与肠黏膜肥大细胞含量增加及肠黏膜肥大细胞的脱颗粒有关,为探讨精神心理因素与脑-肠轴之间的神经内分泌免疫网络之间的关系提供了新的依据。

肥大细胞释放的生物活性介质包括: 生物胺、酶、花生四烯酸及代谢产物、腺苷、神经肽、细胞因子等. 他们作用既广泛又复杂多样: 可使微血管平滑肌和通透性发生改变、使肠道平滑肌收缩和舒张状态发生改变、调节腺体分泌功能、调节机体免疫状态、使痛觉敏感性发生改变等^[11]. 我们发现, IBS患者回盲部黏膜MC数目与MC脱颗粒比率均明显高于对照组, 其中腹泻型明显高于便秘型. 与O'Sullivan *et al*^[12]、董文珠 *et al*^[13]、王静 *et al*^[14]的研究报道一致. 我们观察到的MC数量多于以往报道, 可能与采用其特异的鼠抗人MC类胰蛋白酶抗体标识MC有关. 这是目前国际上检测MC数目和活性的最先进方法, 与传统的HE、阿尔新蓝染色、醛品红-橙黄G特染法有所不同, 具有更高的特异性和敏感性. IBS患者MC增多和活性增强可解释: IBS肠道高反应状态、肠道平滑肌运动异常、IBS患者食物不耐受等现象^[15-16].

5-HT是广泛存在于中枢神经系统和胃肠道的一种单胺类神经递质, 具有多种生物学功能, 参与胃肠运动、摄食、睡眠、情绪、认知及生殖等在内的多种生理功能调控. 近年来其在IBS发病机制中的作用倍受关注. 5-HT的调节胃肠运动和内脏感觉功能以及与精神情志的关系可能与IBS的病理生理关系密切^[17-22]. 有不少研究者发现^[23-26], IBS患者血液中5-HT含量较对照组升高, 但肠黏膜中5-HT含量的研究不多, 且不一致. 因此检测肠黏膜中5-HT的浓度, 对于进一步认识5-HT在IBS发病机制中的作用具有重要意义. 我们发现, IBS患者结肠回盲部黏膜5-HT含量增高, 与李兆申 *et al*^[27]报道的结肠黏膜内分泌5-HT的EC数量明显增加一致, 提示结肠黏膜5-HT含量升高与IBS发病可能相关.

有研究表明, 焦虑和抑郁情绪积分与肠运转的时间有相关性^[28]. 焦虑和抑郁情绪还可降低患者对内脏痛觉的阈值, 使患者对正常的生理运动感知为异常的疾病症状. 精神心理因素对胃肠道运动、感觉的影响是通过神经内分泌免疫网络来实现的. 目前的研究认为, MC很可能是在神经和免疫机制之间担当沟通作用的重要免疫细胞, 而5-HT是一种广泛存在于中枢神经系统和胃肠道的重要神经递质. 我们的研究表明, IBS患者焦虑抑郁总积分和回盲部肠黏膜MC数目、MC脱颗粒比率之间具有正相关性. 这一现象可能与促肾上腺皮质激素释放因子和神经紧张素有关^[29-31]. 这提示精神心理异常对

胃肠道的运动、感觉功能的影响可能与肠黏膜MC含量增加及诱导消化道的MC脱颗粒这一机制有关. 但焦虑、抑郁总积分和回盲部肠黏膜5-HT浓度之间无明显相关性, 可解释为5-HT只是调节胃肠功能的多种重要神经递质中一种, IBS患者胃肠功能失调是多种神经递质综合作用的结果, 但也可能与本实验检测例数较少, 实验样本不能代表总体有关, 有待扩大样本量进一步研究证实.

4 参考文献

- 1 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- 2 Smith RC, Greenbaum DS, Vancouver JB, Henry RC, Reinhart MA, Greenbaum RB, Dean HA, Mayle JE. Psychosocial factors are associated with health care seeking rather than diagnosis in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1990; 98: 293-301
- 3 Drossman DA, Creed FH, Olden KW, Svedlund J, Toner BB, Whitehead WE. Psychosocial aspects of the functional gastrointestinal disorders. *Gut* 1999; 45 Suppl 2: II25-30
- 4 李瑜元. 精神心理异常与功能性胃肠疾病的关系. *中华医学杂志* 1999; 79: 799-800
- 5 江汉龙, 钟世顺, 张振书. 肠易激综合征临床筛查312例. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 411-413
- 6 Lydiard RB, Falsetti SA. Experience with anxiety and depression treatment studies: implications for designing irritable bowel syndrome clinical trials. *Am J Med* 1999; 107: 65S-73S
- 7 何剑琴, 王伟岸, 胡品津, 陈为. 肠易激综合征患者睡眠质量特征. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 744-747
- 8 Heymann-Monnikes I, Arnold R, Florin I, Herda C, Melfsen S, Monnikes H. The combination of medical treatment plus multicomponent behavioral therapy is superior to medical treatment alone in the therapy of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 981-994
- 9 Church MK, Clough GF. Human skin mast cells: *in vitro* and *in vivo* studies. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 83: 471-475
- 10 McKay DM, Bienenstock J. The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol Today* 1994; 15: 533-538
- 11 Bradding P, Holgate ST. Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 31: 119-133
- 12 O'Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, Harman I, Bountra C, McLaren A, O'Morain CA. Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 449-457
- 13 董文珠, 李兆申, 邹多武, 许国铭, 邹晓平, 朱爱勇, 尹宁, 龚燕芳. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞与P物质的相关性. *中华内科杂志* 2003; 42: 611-614
- 14 王静, 梁列新, 张志雄, 李国华, 钱伟, 侯晓华. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 382-384
- 15 Coelho AM, Fioramonti J, Bueno L. Mast cell degranulation induces delayed rectal allodynia in rats: role of histamine and 5-HT. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 727-737
- 16 Addolorato G, Marsigli L, Capristo E, Caputo F,

■名词解释

脑-肠轴是将认知和情感中枢与神经内分泌、肠神经系统和免疫系统相联系的双向交通通路, 胃肠道活动的信息经脑-肠轴传入到中枢神经系统并由中枢神经系统经此途径调控.

■同行评价

本研究阐明精神心理因素异常在IBS中的发病可能与肠黏膜肥大细胞及其活化增高以及5-HT浓度增高有关,对IBS的发病机制提供了有关的实验依据,有利于IBS的研究和防治。文章立题有依据,病例收集尚规范,精神心理测评和试验正规,结果可靠,有理论价值。

- Dall'Aglio C, Baudanza P. Anxiety and depression: a common feature of health care seeking patients with irritable bowel syndrome and food allergy. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 1559-1564
- 17 Kuemmerle JF, Murthy KS, Grider JR, Martin DC, Makhlouf GM. Coexpression of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors coupled to distinct signaling pathways in human intestinal muscle cells. *Gastroenterology* 1995; 109: 1791-1800
- 18 Grider JR, Foxx-Orenstein AE, Jin JG. 5-Hydroxytryptamine₄ receptor agonists initiate the peristaltic reflex in human, rat, and guinea pig intestine. *Gastroenterology* 1998; 115: 370-380
- 19 Taiwo YO, Levine JD. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. *Neuroscience* 1992; 48: 485-490
- 20 Ebersberger A, Anton F, Tolle TR, Zieglsangberger W. Morphine, 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor antagonists reduce c-fos expression in the trigeminal nuclear complex following noxious chemical stimulation of the rat nasal mucosa. *Brain Res* 1995; 676: 336-342
- 21 Richardson BP, Engel G, Donatsch P, Stadler PA. Identification of serotonin M-receptor subtypes and their specific blockade by a new class of drugs. *Nature* 1985; 316: 126-131
- 22 Kozlowski CM, Green A, Grundy D, Boissonade FM, Bountra C. The 5-HT₃ receptor antagonist alosetron inhibits the colorectal distention induced depressor response and spinal c-fos expression in the anaesthetized rat. *Gut* 2000; 46: 474-480
- 23 Bearcroft CP, Perrett D, Farthing MJ. Postprandial plasma 5-hydroxytryptamine in diarrhoea predominant irritable bowel syndrome: a pilot study. *Gut* 1998; 42: 42-46
- 24 张川, 李定国, 王彝康, 陆汉明. 肠易激综合征患者5-羟色胺含量的变化. 上海第二医科大学学报 2001; 21: 66-68
- 25 王凌豪, 凌奇荷. 肠易激综合征患者乙状结肠粘膜内5-羟色胺含量的临床研究. 临床消化病杂志 1993; 5: 58-60
- 26 詹丽杏, 许国铭, 李兆申, 邹多武, 金震东, 屠振兴. 肠易激综合征患者活动期和缓解期血浆5-HT、5-HIAA的变化. 第二军医大学学报 2003; 24: 152-154
- 27 李兆申, 詹丽杏, 邹多武, 许国铭, 满晓华, 叶熙亭. 肠易激综合征患者分泌5-羟色胺的肠嗜铬细胞形态及功能的改变. 中华消化杂志 2004; 24: 94-97
- 28 Gorard DA, Gomborone JE, Libby GW, Farthing MJ. Intestinal transit in anxiety and depression. *Gut* 1996; 39: 551-555
- 29 Castagliuolo I, Lamont JT, Qiu B, Fleming SM, Bhaskar KR, Nikulasson ST, Kornetsky C, Pothoulakis C. Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. *Am J Physiol* 1996; 271: G884-892
- 30 Miyata K, Ito H, Fukudo S. Involvement of the 5-HT₃ receptor in CRH-induced defecation in rats. *Am J Physiol* 1998; 274: G827-831
- 31 Castagliuolo I, Leeman SE, Bartolak-Suki E, Nikulasson S, Qiu B, Carraway RE, Pothoulakis C. A neurotensin antagonist, SR 48692, inhibits colonic responses to immobilization stress in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12611-12615

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

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

幽门螺杆菌与DNA错配修复系统

吴莹, 姜政

吴莹, 姜政, 重庆医科大学附属第一医院消化科 重庆市 400016

通讯作者: 姜政, 400016, 重庆市, 重庆医科大学附属第一医院消化科. jianggooddoctor@mail.china.com

电话: 023-68891218

收稿日期: 2006-09-29 接受日期: 2006-10-18

Relationship between *Helicobacter pylori* and DNA mismatch repair system

Ying Wu, Zheng Jiang

Ying Wu, Zheng Jiang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Correspondence to: Zheng Jiang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. jianggooddoctor@mail.china.com

Received: 2006-09-29 Accepted: 2006-10-18

Abstract

Helicobacter pylori infection causes the defect of mismatch repair (MMR) in eucaryotes, and microsatellite instability (MSI) in gastric epithelial cells, which increases the spontaneous mutation of relative genes, and finally results in the susceptibility to tumors in human bodies. DNA MMR can prevent the excessive proliferation of mutant cells and development of tumors by correcting mismatched bases, which occur in the process of duplication and recombination, and inducing apoptosis of the cells in which DNA had been seriously impaired. The majority of the mutation in mismatch repair gene is the gene mutation in which substitution exceeds the absence or insertion of the single basic group. In MMR, hMLH1 and hMSH2 gene are the main controlling genes. Current research showed that *H pylori* infection might lead to functional defect of MMR, which had played an important role in the development of gastric carcinomas. In this article, we reviewed the correlations between *H pylori* infection and DNA mismatch repair system.

Key Words: Mismatch repair; Microsatellite instability; *Helicobacter pylori*; Mutation; Tumor

Wu Y, Jiang Z. Relationship between *Helicobacter pylori* and DNA mismatch repair system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):51-55

摘要

*H pylori*感染导致了真核细胞错配修复(mismatch repair, MMR)系统的缺陷, 在胃上皮细胞中引起微卫星不稳定(microsatellite instable, MSI), 使相关基因自发突变率增加, 最终可导致机体对肿瘤的易感. DNA错配修复功能通过纠正复制或重组过程中出现的错配碱基、诱导DNA严重受损的细胞发生凋亡, 从而阻止突变细胞过度增殖以及肿瘤的发生. 在错配修复基因突变中, 绝大部分是点突变, 以单个碱基的替代大于碱基的缺失或插入, 其中hMLH1和hMSH2基因是DNA错配修复系统的主要控制基因. 研究表明*H pylori*的感染及其导致的错配修复系统功能缺陷在胃癌的发生、发展中起着主导作用.

关键词: 错配修复; 微卫星不稳定; 幽门螺杆菌; 突变; 肿瘤

吴莹, 姜政. 幽门螺杆菌与DNA错配修复系统. 世界华人消化杂志 2007;15(1):51-55

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/51.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是上消化道疾病的主要致病菌, 在我国普通人群的感染率高达50%-80%, 并仍以每年1%-2%的速度增加, 每年新增感染病例超过1200万人. *H pylori*的感染不但与B型胃炎和消化性溃疡的发生有密切关系, 而且与肠道的MALT淋巴瘤和胃癌的发生也有重要关系, 已被世界卫生组织国际癌症研究机构列为第一类致癌原^[1-5]. 虽然*H pylori*致癌机制一直是研究的热点, 但其结果至今进展缓慢. 随着分子生物学的飞速发展, *H pylori*基因组和蛋白质组学研究的深入, 给广大科研工作者带来了曙光. 最近研究发现, 肿瘤的发生与DNA错配修复系统的缺陷有关, 表现

■背景资料

最近研究发现肿瘤的发生与DNA错配修复系统的缺陷有关, 而*H pylori*感染可以直接导致胃黏膜细胞DNA错配修复系统的缺陷, 这为阐明*H pylori*致癌机制奠定了基础.

■研发前沿

hMLH1和hMSH2是DNA错配修复的主要控制基因,其表达的失活与该启动子区高甲基化有关,研究胃癌组织中hMLH1、hMSH2的表达与DNA甲基化的关系,是目前的研究热点及重点。

为hMSH2和hMLH1蛋白以及其他错配修复系统蛋白的数量减少以及相对应的mRNA减少^[6-10],而*H. pylori*感染可以直接导致胃黏膜细胞DNA错配修复系统的缺陷,这为阐明*H. pylori*致癌机制奠定了基础^[11]。

自1970年代在大肠杆菌中发现MutHLS途径的DNA错配修复(mismatch repair, MMR)系统以来,人们对MMR系统在人类肿瘤发生中的作用及作用机制进行了大量的研究,取得了令人瞩目的成就。大家知道,肿瘤是由基因突变引起,基因突变可由微生物、致癌剂等引起,也可由DNA代谢过程中的碱基错配引起,为保证遗传物质的完整性和稳定性,细胞有许多防止基因突变的系统,而这些系统包括:(1)切除修复;(2)损伤碱基的直接修复;(3)错配修复;(4)重组修复;(5)跨损伤DNA合成。而MMR基因能纠正由于DNA重组和复制产生的碱基错配。MMR系统不仅通过纠正由于DNA重组和复制产生的碱基错配而保持基因组的稳定和真实,而且还通过诱导DNA受到严重损伤细胞的凋亡而消除由突变细胞生长而形成的癌变^[12-14],如果发生错配修复基因的突变,则将导致患癌的风险率大大的提高^[15],因此本文就MMR及其与*H. pylori*关系的研究进展作一综述。

1 MMR基因的结构与生物学特性

MMR是细胞复制后一种修复机制,起着维持DNA复制保真度、控制基因突变的作用,在修复反应过程中,通过对模板链与新生链甲基化程度差异的识别来完成。目前发现参与错配修复功能的基因有9个:即hMSH2, hMSH3, hMSH4, hMSH5, hMSH6(GTBP), hMLH1, hMLH3, hPMS1和hPMS2,前5个与大肠杆菌Muts同源,后4个与MutL同源。人类和大肠杆菌MMR系统存在差异,大肠杆菌Muts和MutL蛋白质形成同源二聚体,而人类则形成异源二聚体。其中hMSH2和hMLH1在遗传性非息肉性大肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)以及肠道的其他恶性肿瘤中有较高比例的突变率^[16]。

hMSH2是第一个被分离得到的人类MMR基因,该基因与*E. coli* MutS高度同源,为重要的DNA错配修复基因,其产物参与甲基导向错配修复途径,起识别DNA错配并启动修复反应的作用。人的hMSH2位于染色体2p21-22上,其基因组DNA全长约73 kb,含16个外显子,其中第3

外显子最长,有279 bp, 11外显子最短,仅98 bp。cDNA全长3111 bp, 含有2727 bp的开放读码框架,翻译后编码一种由909个氨基酸残基组成的蛋白质,其氨基酸序列有41%与酵母MSH2相同,高度保守区同源性达85%,最保守区位于573-764氨基酸序列处。而hMLH1于1994年被克隆,为*E. coli* MutL的高度同源基因,人的hMLH1位于染色体3p21.3-23上,其基因组DNA全长约58 kb,含19个外显子, cDNA有2268 bp的开放读码框架,编码由756个氨基酸残基组成的蛋白质,与酿酒酵母的MLH1高度同源,其氨基酸产物同源性达41%,保守区同源性51%^[17]。体外实验表明, hMSH2蛋白能与DNA双链中的G-T, A-C错配特异性地结合,还能与(CA)_n及含14个碱基的IDL型错配结合。目前已证实hMSH2以复合蛋白质的形式与错配进行结合,这种错配结合因子是由两种不同的蛋白质组成的异源二聚体,能够特异性地识别并结合错配的DNA序列,而hMLH1则以形成多聚复合物的方式参与错配修复反应,可能与细胞烷化剂耐受及细胞周期检验点有关。

2 MMR功能缺陷致癌机制

DNA通常是以A和T, G和C之间通过氢键互补而形成稳定的双螺旋结构,当双螺旋DNA之间的配对碱基由于各种因素的作用而发生配对错误时,就形成了DNA错配。MMR基因是生物进化过程中的保守基因,具有修复DNA碱基错配,增强DNA复制忠实性,维持基因组稳定性,降低自发性突变的功能。DNA错配修复通过纠正复制或重组过程中出现的错配碱基、诱导DNA严重受损的细胞发生凋亡,使细胞基因组的稳定性提高近1000倍。人类MMR蛋白在进化过程中是高度保守的,在双链特异性错配修复和错配修复依赖性凋亡信号传导起始过程中发挥重要作用。MMR编码基因的失活可导致基因组的不稳定,特别是在一些简单的核苷酸重复序列,并导致一些肿瘤的发生。错配修复基因突变怎样引起肿瘤仍不清楚,可能与下述原因有关:一方面使DNA复制过程中含简单重复序列的同源顺序发生遗传重组而出现简单重复序列长度的变异,表现为肿瘤细胞中的微卫星DNA不稳定;另一方面,MMR缺陷会使发生在某些原癌基因和抑癌基因中的突变得快速积累,并最终影响到正常细胞的增殖调控^[18-20]。总之,错配修复功能缺陷可能通过以下三条途径促进肿瘤的发生与

■相关报道

Nan *et al*对110例胃癌患者以及220例健康对照者进行了研究,结果发现hMLH1启动子超甲基化与MSI密切相关,MSI阳性患者hMLH1启动子甲基化率达到了71.4%,因此作者提出MMR可能参与了胃癌的发生。

发展.

2.1 增加癌基因和/或抑癌基因的突变率 基于肿瘤细胞中如此高频率的基因突变,有学者认为肿瘤细胞应该具有突变子表型,使得基因突变事件不断放大与积累,导致大量的错误信息遍布整个基因组,从而引起基因组内由1-6个核苷酸的大量简单重复序列即微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI),使相关基因自发突变率增加,引起各种相应的功能紊乱,最终导致机体对肿瘤的易感^[21-24].微卫星DNA是由1-6个核苷酸组成,具有高度多态性的简单串联重复序列,其重复可达10-50次,广泛分布于原核和真核生物基因组中,在真核细胞中最常见的微卫星序列为(CA)_n,重复的单位可以完全相同,可以是具有间隔的重复单位.从基因结构分析知道,微卫星序列位于启动子、基因编码区、内含子区域、内含子与外显子的交接区,因此认为对启动子、重组位点或DNA拓扑酶结合位点具有调控作用.如果错配修复功能缺陷,常常导致微卫星的不稳定^[25-26],同时也导致肿瘤对化疗药物的耐受^[27-28].因此有学者认为肿瘤的发生可能是:错配修复功能缺陷→细胞突变子表型→癌基因、抑癌基因突变→肿瘤的形成.这在遗传性非息肉性大肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)、胃癌、胰腺癌以及乳腺癌等肿瘤中得到证实.

2.2 重要的功能基因发生遗传不稳定 错配修复功能缺陷除了导致微卫星序列不稳定外,更为重要的是使一些重要的功能基因发生遗传不稳定.细胞的生长是由细胞生长因子和细胞生长抑制因子的调控来实现的,这些因子通过与细胞膜上的相关受体结合而启动细胞内的信号传递链.肿瘤的发生可通过上调细胞生长刺激因子来完成,也可以通过下调细胞生长抑制因子来促使肿瘤的发生.

2.3 通过化学物质使细胞损伤导致肿瘤的发生 在正常的情况下,当细胞受到环境致癌物如多环芳烃(PAHs)、二恶英(TCDD)以及其他矿物质等致命损伤后,错配修复机制可以有效识别其错配,引起一系列切除和再合成,最终由于造成DNA双链缺口使DNA复制受阻而导致细胞凋亡.当错配修复功能缺陷时,细胞在受到PAHs, TCDD以及其他矿物质等致命损伤后,细胞不会停顿在G₂期进行修复或发生凋亡,而是继续复制,使大量错误信息在细胞内不断积累,最终导致细胞恶变,研究发现肠道中确实存在PAHs等

烷化剂,由于对其耐受,错配修复功能缺陷的细胞具有生长的优势,从而使其更容易出现突变,加速肿瘤的发生^[29].

3 MMR与胃癌

肿瘤的发生过程中,表型遗传修饰对肿瘤相关基因的表达起调控作用,主要有总基因组甲基化水平降低,癌基因的低甲基化和抑癌基因的高甲基化及抑癌基因的低乙酰化.其中,DNA错配修复基因的失活与基因的甲基化紊乱密切相关,hMLH1和hMSH2是DNA错配修复的主要控制基因,其表达的失活与该启动子区高甲基化有关,胃癌的发生也不例外^[30-31].在人散发性肿瘤中,胃癌具有较高的MSI,MMR的突变可导致MSI的产生,因此MMR系统与胃癌之间存在密切的关系^[32],同时错配修复蛋白hMLH1和hMSH2减少或丧失也提示肿瘤患者预后不良^[33].研究证实,在胃癌MSI阳性的肿瘤中存在MMR基因的突变,有学者探讨了hMLH1启动子甲基化与胃癌的关系,结果显示hMLH1启动子高甲基化达到76.9%,而且证实hMLH1启动子甲基化与hMLH1转录失活及大部分MSI阳性胃癌中MMR缺陷有密切的关系.Nan *et al*^[34]对110例胃癌患者以及220例健康对照者进行了研究,结果发现hMLH1启动子超甲基化与MSI密切相关,MSI阳性患者hMLH1启动子甲基化率达到了71.4%,因此作者提出MMR可能参与了胃癌的发生.

4 *H pylori*与MMR

*H pylori*是上消化道疾病的主要致病菌,动物实验表明*H pylori*能够导致蒙古沙鼠胃癌的发生,已被世界卫生组织国际癌症研究机构列为第一类致癌原.而*H pylori*是怎样导致肿瘤的发生,其确切机制目前还不清楚.最近研究表明*H pylori*感染可直接导致胃黏膜细胞DNA错配修复系统的缺陷,从而导致复制差错阳性,表现为微卫星不稳定.Park *et al*^[35]研究认为*H pylori*的感染导致了错配修复系统的缺陷,在胃上皮细胞中引起了MSI,这就代表了*H pylori*早期致癌作用中基因突变、积累的一个重要机制.在对60例胃炎及消化性溃疡患者*H pylori*感染根治前后的研究中发现,根除*H pylori*之后,胃黏膜上皮细胞hMLH1和hMSH2表达与根治前相比显著性地增加,而未根除*H pylori*的患者,其错配修复蛋白则没有任何改变,说明*H pylori*感染干扰了DNA

■应用要点

研究证实,*H pylori*的感染及其导致的错配修复系统缺陷在胃癌的发生、发展中起了一定作用,这为预防肿瘤发生、发展和为肿瘤的基因治疗提供了可靠的分子生物学理论依据.同时,随着人们对MMR缺陷与肿瘤发生的关系的进一步认识,对hMLH1和hMSH2等错配修复蛋白的检测将有望应用于临床,作为胃癌的早期诊断指标之一,从而为肿瘤学的临床应用开辟一个新的领域.

■名词解释

1 DNA错配修复系统(DNA mismatch repair system, MMR): 由特异修复DNA碱基错配的酶分子组成, 是细胞复制后一种修复机制, 起着维持DNA复制保真度、控制基因突变的作用, 在修复反应过程中, 通过对模板链与新生链甲基化程度差异的识别来完成。目前发现参与错配修复功能的基因有9个: 即hMSH2, hMSH3, hMSH4, hMSH5, hMSH6(GTBP), hMLH1, hMLH3, hPMS1和hPMS2。

2 微卫星不稳定(MSI): 是指由于复制错误, 引起的简单重复序列的增加或丢失, 造成微卫星基因的突变。微卫星基因是由1-6个核苷酸组成, 具有高度多态性的简单串联重复序列, 其重复可达10-50次, 广泛分布于原核和真核生物基因组中, 在真核细胞中最常见的微卫星序列为(CA)_n, 重复的单位可以完全相同, 可以是具有间隔的重复单位。

错配修复系统, 而根除*H pylori*之后, DNA错配修复系统至少部分是可以逆转的。Ma *et al*^[36]探讨了胃癌患者*H pylori*感染与hMLH1和hMSH2相互作用及其机制, 在癌组织中, *H pylori*感染组hMLH1和hMSH2表达率分别是77.2%和56.8%, 而未感染组87.5%和81.3%; 在癌周围组织中, *H pylori*感染组hMLH1和hMSH2表达率分别是86.4%和29.5%, 而未感染组96.9%和43.8%; 在胃炎的黏膜中, *H pylori*感染组hMLH1和hMSH2表达率分别是88.5%和38.5%, 而未感染组则是91.7%和50.5%。因此作者认为*H pylori*感染引起了hMLH1和hMSH2低表达是*H pylori*致癌的分子基础。Kim *et al*^[37]通过胃癌细胞株分别与*H pylori*、细菌浸液、空肠弯曲杆菌或大肠杆菌共培养探讨了*H pylori*感染对错配修复蛋白表达及mRNA的影响, 结果显示, 与*H pylori*培养的细胞株呈剂量依赖性降低错配修复蛋白的表达, 上述现象也见于共培养的热敏感*H pylori*产物, 因此作者认为*H pylori*感染导致了错配修复蛋白的减少, 推测与*H pylori*诱导的错配修复基因mRNA的减少有关。大量的实验表明, *H pylori*感染导致胃上皮细胞错配修复系统的缺陷, 表现为hMSH2和hMLH1蛋白以及其他错配修复系统蛋白的减少以及相对应的mRNA减少, 这就增加了胃上皮细胞发生突变积累的可能性以及发生胃癌的危险性。

5 展望

肿瘤的发生是多因素综合作用的结果, 而*H pylori*的感染及其导致的错配修复系统缺陷在胃癌的发生、发展中起着主导作用, 因此为预防肿瘤发生、发展和为肿瘤的基因治疗提供可靠的分子生物学理论依据。在预防和根治*H pylori*感染方面, 取得了显著的效果, 采用三联或四联药物根除*H pylori*感染可达到60%-95%, 随着近年来基因工程技术、疫苗技术的发展以及*H pylori*基因组、蛋白质组学的研究进一步深入, *H pylori*疫苗的研究也取得长足进步, 为彻底根除*H pylori*感染及其相关性疾病预防奠定了基础。同时随着对MMR系统深入研究的进行, 人们对MMR缺陷与肿瘤发生的关系、对hMLH1和hMSH2等错配修复蛋白检测的意义也有了更进一步的了解和深刻的认识, 相信不久的将来, 将找到一些特异性强、敏感性高和相对简便的实验方法来筛查高危人群等, 实现对肿瘤的早期预防、早期诊断、早期治疗的目的, 为肿瘤学的临床应

用开辟一个新的领域。

6 参考文献

- 1 Satomi S, Yamakawa A, Matsunaga S, Masaki R, Inagaki T, Okuda T, Suto H, Ito Y, Yamazaki Y, Kuriyama M, Keida Y, Kutsumi H, Azuma T. Relationship between the diversity of the cagA gene of *Helicobacter pylori* and gastric cancer in Okinawa, Japan. *J Gastroenterol* 2006; 41: 668-673
- 2 Con SA, Valerin AL, Takeuchi H, Con-Wong R, Con-Chin VG, Con-Chin GR, Yagi-Chaves SN, Mena F, Brenes Pino F, Echandi G, Kobayashi M, Monge-Izaguirre M, Nishioka M, Morimoto N, Sugiura T, Araki K. *Helicobacter pylori* CagA status associated with gastric cancer incidence rate variability in Costa Rican regions. *J Gastroenterol* 2006; 41: 632-637
- 3 Kuipers EJ, Sipponen P. *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric cancer. *Helicobacter* 2006; 11 Suppl 1: 52-57
- 4 Gwack J, Shin A, Kim CS, Ko KP, Kim Y, Jun JK, Bae J, Park SK, Hong YC, Kang D, Chang SH, Shin HR, Yoo KY. CagA-producing *Helicobacter pylori* and increased risk of gastric cancer: a nested case-control study in Korea. *Br J Cancer* 2006; 95: 639-641
- 5 Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 449-490
- 6 Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2979-2990
- 7 Vasavi M, Ponnala S, Gujjari K, Boddu P, Bharatula RS, Prasad R, Ahuja YR, Hasan Q. DNA methylation in esophageal diseases including cancer: special reference to hMLH1 gene promoter status. *Tumori* 2006; 92: 155-162
- 8 Quaresima B, Faniello MC, Baudi F, Crugliano T, Cuda G, Costanzo F, Venuta S. *In vitro* analysis of genomic instability triggered by BRCA1 missense mutations. *Hum Mutat* 2006; 27: 715
- 9 Yamamoto Y, Matsuyama H, Kawauchi S, Furuya T, Liu XP, Ikemoto K, Oga A, Naito K, Sasaki K. Biological characteristics in bladder cancer depend on the type of genetic instability. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2752-2758
- 10 Aya M, Yashiro M, Nishioka N, Onoda N, Hirakawa K. Carcinogenesis in the remnant stomach following distal gastrectomy with Billroth II reconstruction is associated with high-level microsatellite instability. *Anticancer Res* 2006; 26: 1403-1411
- 11 Yao Y, Tao H, Park DI, Sepulveda JL, Sepulveda AR. Demonstration and characterization of mutations induced by *Helicobacter pylori* organisms in gastric epithelial cells. *Helicobacter* 2006; 11: 272-286
- 12 Lazaris AC, Zargiannos A, Kavantzias N, Zervas A, Giannopoulos A, Nakopoulou L. MLH1 mismatch repair gene product is associated with apoptotic potential of urothelial bladder carcinomas. *Anticancer Res* 2006; 26: 1535-1542
- 13 Wang JY, Edelmann W. Mismatch repair proteins as sensors of alkylation DNA damage. *Cancer Cell* 2006; 9: 417-418
- 14 Jun SH, Kim TG, Ban C. DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *FEBS J* 2006; 273:

- 1609-1619
- 15 Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG, Van Vliet CM, Smith L, Mead LJ, Macrae FA, St John DJ, Jass JR, Giles GG, Hopper JL, Southey MC. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 489-498
- 16 Lopez de Saro FJ, Marinus MG, Modrich P, O'Donnell M. The beta sliding clamp binds to multiple sites within MutL and MutS. *J Biol Chem* 2006; 281: 14340-14349
- 17 Baek MJ, Kang H, Kim SE, Park JH, Lee JS, Paik YK, Kim H. Expression of hMLH1 is inactivated in the gastric adenomas with enhanced microsatellite instability. *Br J Cancer* 2001; 85: 1147-1152
- 18 Wada-Hiraike O, Yano T, Nei T, Matsumoto Y, Nagasaka K, Takizawa S, Oishi H, Arimoto T, Nakagawa S, Yasugi T, Kato S, Taketani Y. The DNA mismatch repair gene hMSH2 is a potent coactivator of oestrogen receptor alpha. *Br J Cancer* 2005; 92: 2286-2291
- 19 Park IJ, Kim HC, Kim JS, Yu ES, Yu CS, Kim JC. Correlation between hMLH1/hMSH2 and p53 protein expression in sporadic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 450-454
- 20 Youn CK, Cho HJ, Kim SH, Kim HB, Kim MH, Chang IY, Lee JS, Chung MH, Hahm KS, You HJ. Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 137-147
- 21 房殿春, 周晓东, 罗元辉, 王东旭, 鲁荣, 杨仕明, 刘为纹. 胃癌微卫星不稳定性与抑癌基因杂合缺失. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 479-481
- 22 赵成海. 错配修复缺陷, 微卫星不稳定与胃癌. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1384-1388
- 23 康燕婕, 王林娜, 张振科. 胃癌中微卫星不稳定性及DNA错配修复系统. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 1139-1140
- 24 李建华, 石先哲, 吕申, 刘敏, 王朝晖, 刘丽娜, 姜静, 许国旺. 胃癌微卫星不稳定与错配修复蛋白表达的缺失. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1774-1777
- 25 Helmle KE, Otto CJ, Constantinescu G, Honore LH, Andrew SE. Variable MLH1 promoter methylation patterns in endometrial carcinomas of endometrioid subtype lacking DNA mismatch repair. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 1089-1096
- 26 Burgart LJ. Testing for defective DNA mismatch repair in colorectal carcinoma: a practical guide. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 1385-1389
- 27 Pors K, Patterson LH. DNA mismatch repair deficiency, resistance to cancer chemotherapy and the development of hypersensitive agents. *Curr Top Med Chem* 2005; 5: 1133-1149
- 28 Fedier A, Poyet C, Perucchini D, Boulikas T, Fink D. MLH1-deficient tumor cells are resistant to lipoplatin, but retain sensitivity to lipoxal. *Anticancer Drugs* 2006; 17: 315-323
- 29 Takahashi Y, Kondo K, Hirose T, Nakagawa H, Tsuyuguchi M, Hashimoto M, Sano T, Ochiai A, Monden Y. Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. *Mol Carcinog* 2005; 42: 150-158
- 30 程中华, 房静远, 杨丽, 陈紫, 陆嵘, 朱红音, 顾伟齐, 陈晓宇, 彭延申, 施尧. hMSH2在胃癌组织中的表达及其与DNA甲基化之间的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1731-1733
- 31 肖桂珍, 刘希双. 胃癌和癌前病变中错配修复基因hMLH1的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2093-2097
- 32 Bacani J, Zwingerman R, Di Nicola N, Spencer S, Wegrynowski T, Mitchell K, Hay K, Redston M, Holowaty E, Huntsman D, Pollett A, Riddell R, Gallinger S. Tumor microsatellite instability in early onset gastric cancer. *J Mol Diagn* 2005; 7: 465-477
- 33 Uehara H, Miyamoto M, Kato K, Cho Y, Kurokawa T, Murakami S, Fukunaga A, Ebihara Y, Kaneko H, Hashimoto H, Murakami Y, Shichinohe T, Kawarada Y, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. Deficiency of hMLH1 and hMSH2 expression is a poor prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2005; 92: 109-115
- 34 Nan HM, Song YJ, Yun HY, Park JS, Kim H. Effects of dietary intake and genetic factors on hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3834-3841
- 35 Park DI, Park SH, Kim SH, Kim JW, Cho YK, Kim HJ, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Cho EY, Kim EJ, Chae SW, Sohn JH, Sung IK, Sepulveda AR, Kim JJ. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the expression of DNA mismatch repair protein. *Helicobacter* 2005; 10: 179-184
- 36 Ma JM, Wang ZH, Liu M, Wang M, Zhang Y, Lu S, Liu LN, Xu GW. Expression of hMSH2 and hMLH1 in stomach cancer and their correlation with *Helicobacter pylori* infection. *Ai Zheng* 2004; 23: 535-539
- 37 Kim JJ, Tao H, Carloni E, Leung WK, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2002; 123: 542-553

同行评价

本文研究了幽门螺杆菌与DNA错配修复系统之间的关系, 选题新颖, 科学价值较高, 具有一定的指导意义。

电编 张敏 编辑 张焕兰

小鼠对乙肝病毒小基因嵌合DNA疫苗免疫应答

张建军, 杨向东, 史小玲, 袁志平, 王超

张建军, 泸州医学院附属医院感染病科 四川省泸州市 646000
张建军, 杨向东, 泸州医学院附属医院分子医学中心实验室 四川省泸州市 646000
史小玲, 泸州医学院附属医院传染与免疫研究室 四川省泸州市 646000
袁志平, 宜宾市第二人民医院肿瘤科 四川省宜宾市 644000
王超, 山东省疾病预防控制中心 山东省济南市 2500014
四川省卫生厅资助项目, No. 000111
通讯作者: 张建军, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院感染病科. zhangjianjun2535@163.com
收稿日期: 2006-09-21 接受日期: 2006-10-11

Immunologic response to a hepatitis B virus small gene chimeric DNA vaccine in mice

Jian-Jun Zhang, Xiang-Dong Yang, Xiao-Ling Shi, Zhi-Ping Yuan, Chao Wang

Jian-Jun Zhang, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Jian-Jun Zhang, Xiang-Dong Yang, Central Laboratory for Molecular Medicine, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Xiao-Ling Shi, Department of Infectious Diseases and Immunology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Zhi-Ping Yuan, Department of Oncology, the Second People's Hospital of Yibin City, Yibin 644000, Sichuan Province, China
Chao Wang, Shandong Provincial Center for Disease Prevention and Control, Ji'nan 2500014, Shandong Province, China
Supported by Sichuan Provincial Bureau of Health, No. 000111
Correspondence to: Jian-Jun Zhang, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. zhangjianjun2535@163.com
Received: 2006-09-21 Accepted: 2006-10-11

Abstract

AIM: To investigate the immunologic response to pcHBV-CD80, a hepatitis B virus (HBV) small gene chimeric DNA vaccine containing CD80, in mice.

METHODS: Five randomly divided mouse groups were inoculated twice at a 2-week interval by intramuscular injection with pcHBV-CD80 (containing HBV-preS₂ 120-134, core 47-56, core 57-76, core 170-180 and human CD80

genes), pcHBV (containing HBV-preS₂ 120-134, core 47-56, core 57-76 and core 170-180 genes), pcDNA-CD80 (containing human CD80 gene), pcDNA3.1(empty plasmid), and normal saline, respectively. The levels of specific antibodies, interferon- γ (IFN- γ) and the rate of lymphocyte transformation in the mice were detected.

RESULTS: Both plasmids pcHBV-CD80 and pcHBV induced the production of specific antibodies, and the levels of anti-preS₂ and anti-HBc were not significantly different between the former two groups (anti-preS₂: 15125.52 nkat/L vs 14463.56 nkat/L; anti-HBc: 7607.35 nkat/L vs 7711.21 nkat/L; both $P > 0.05$). However, pcHBV-CD80 had a higher efficacy in increasing the production of γ -IFN (1266.7 ng/L vs 986.3 ng/L, $P < 0.01$) and lymphocyte transformation rate than pcHBV did.

CONCLUSION: HBV small gene chimerical DNA vaccine containing CD80 can stimulate the specific humoral and cellular immunologic responses in mice.

Key Words: Chimeric DNA vaccine; Small gene; CD80 molecule; Hepatitis B virus

Zhang JJ, Yang XD, Shi XL, Yuan ZP, Wang C. Immunologic response to a hepatitis B virus small gene chimeric DNA vaccine in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):61-63

摘要

目的: 探讨含CD80的乙肝病毒小基因嵌合DNA疫苗的免疫应答.

方法: 以乙肝病毒小基因嵌合DNA疫苗 pcHBV-CD80(含CMV启动子、HBV-preS₂片段、HBV-C片段和CD80)、pcHBV (含CMV启动子、HBV-preS₂片段、HBV-C片段), 以及质粒pcDNA-CD80、pcDNA3.1和生理盐水, im免疫小鼠2次(间隔2 wk), 末次接种后2 wk时检测特异性抗体、 γ -IFN水平和淋巴细胞转化率.

结果: 质粒pcHBV-CD80和pcHBV免疫后均

■背景资料

我国现在HBV感染者多达1.2亿, 部分感染者可能演变为肝纤维化、肝硬化和肝癌. 机体对外周血循环中乙肝病毒的清除, 主要依靠抗-HBs; 而要彻底清除受感染肝细胞内的HBV, 则需要针对C抗原的细胞免疫功能, 即CTLs的功能. 乙肝病毒感染慢性化或持续感染的成因, 在病毒方面, 主要是基因变异(包括S区和/或C区)导致的免疫逃避; 宿主方面的因素比较复杂, 包括HBV特异性T细胞克隆排除、病毒基因产物引起的免疫耐受、CTLs细胞不能到达之部位发生的感染等. 其中, 免疫耐受是主要原因. 所以, 打破乙肝病毒免疫耐受, 应该是彻底治愈乙肝病毒感染的有效途径.

■创新盘点

以往对乙型肝炎DNA疫苗的研究重点,在于筛选有效的目的基因,以及目的基因与细胞因子嵌合后的免疫增强效应。本文采用基因重组技术,将乙肝小基因与协同刺激信号CD80基因融合,构建成融合乙肝DNA疫苗,旨在提高乙肝DNA疫苗的免疫效果,可望通过基因免疫,获得免疫原性强、以低剂量即可有效刺激机体产生T细胞和B细胞应答、安全可靠的新型乙肝DNA疫苗。

可检测到特异性的抗体,抗-preS₂在pcHBV-CD80组和pcHBV组分别为15125.52 nkat/L和14463.56 nkat/L;抗-HBc在pcHBV-CD80组和pcHBV组分别为7607.35 nkat/L和7711.21 nkat/L,两组间无明显差异;但pcHBV-CD80更能增加γ-IFN的产生(1266.7 ng/L vs 986.3 ng/L, $P<0.01$),并增强免疫小鼠的激淋巴细胞转化。

结论: 含CD80的乙肝病毒小基因嵌合DNA疫苗可诱导特异性的体液免疫和细胞免疫应答。

关键词: 嵌合DNA疫苗; 小基因; CD80分子; 乙型肝炎病毒

张建军, 杨向东, 史小玲, 袁志平, 王超. 小鼠对乙肝病毒小基因嵌合DNA疫苗免疫应答. 世界华人消化杂志 2007;15(1):61-63 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/61.asp>

0 引言

机体彻底清除受感染肝细胞内的乙肝病毒(HBV),需要针对C抗原的细胞免疫功能,即CTLs的功能^[1]。我们选择已经明确之HBV preS₂区主要编码B细胞表位的基因,与C区T细胞表位编码基因相嵌合,构建了小基因DNA疫苗,再将共刺激因子CD80嵌合新型的疫苗,免疫小鼠后,研究该新型疫苗在小鼠中的体液免疫和细胞免疫应答情况。

1 材料和方法

1.1 材料 嵌合乙肝小基因DNA疫苗pcHBV和pcHBV-CD80由本室构建,经测序确认前者含编码HBV-preS₂ 120-134, Core 47-56, Core 57-76, Core 170-180位多肽的嵌合基因,后者含上述基因和人CD80基因(另文发表);6 wk龄、清洁级的健康小鼠C57BL/6N,由泸州医学院实验动物中心提供,体质量18-22 g。随机分为(1)pcHBV-CD80疫苗组;(2)pcHBV组;(3)pcDNA-CD80组;(4)空载体pcDNA3.1组和(5)空白对照组;每组10只,雌雄各半;抗-preS₂和抗-HBc EIA检测试剂盒购自北京肝炎试剂研制中心;IFN-γ检测试剂盒由晶美公司提供;MTT细胞增殖试验试剂盒购自Roche公司。

1.2 方法 取纯化后的质粒DNA 10 μL稀释至含9 g/L NaCl溶液的3 mL比色皿中,以生理盐水为空白对照,以 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 为纯度合格要求,稀释质粒DNA至1.0 g/L, -20℃保存备用。第(1)、

表 1 IFN-γ的检测结果(mean ± SD, ng/L)

组别	疫苗	IFN-γ
(1)	pcHBV-CD80	1266.7 ± 102.4 ^a
(2)	pcHBV	986.3 ± 86.3 ^b
(3)	pcDNA-CD80	533.6 ± 55.9 ^c
(4)	pcDNA3.1	165.8 ± 39.5 ^e
(5)	生理盐水	144.3 ± 24.9

^a $P<0.01$ vs 其他各组; ^b $P<0.05$ vs (3)(4)(5)组; ^c $P<0.05$ vs (4), (5)组; ^e $P>0.05$ vs (5)组。

(2)、(3)、(4)组每只小鼠两侧股四头肌共注射100 μL(每侧50 μL)相应质粒DNA,第(5)组即空白对照组同法注射100 μL生理盐水;2 wk后同法加强免疫一次。

1.2.1 抗-preS₂、抗-HBc和IFN-γ的检测 末次免疫后2 wk处死小鼠,心脏采血,3000 r/min离心30 min分离血清, -20℃冻存,按北京肝炎试剂研制中心的抗-preS₂和抗-HBc EIA检测试剂盒进行检测,方法按说明书进行。IFN-γ的检测,按晶美公司ELISA检测试剂盒说明书操作。

1.2.2 脾淋巴细胞转化实验 于免疫后的第5周,每组随机抽取5只小鼠,无菌取脾,常规方法制备脾细胞悬液,用1640液调细胞浓度至 1×10^6 /L时,作ConA(5 mg/L)刺激,并以单纯1640培养液作对照孔;MTT(5 mg/L)染色,测 A_{570} ,计算刺激指数(SI): $SI = \text{ConA刺激孔}A_{570} / \text{对照孔}A_{570}$ 。

统计学处理 组间计量资料采用校正 t 检验,双侧检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 诱导小鼠抗-preS₂、抗-HBc和IFN-γ的产生 免疫后第2周,抗-preS₂在(1)和(2)组分别可检测到 $15\ 125.52 \pm 377.24$ nkat/L和 $14\ 463.56 \pm 331.07$ nkat/L;抗-HBc在(1)和(2)组分别可检测到 7607.35 ± 428.59 nkat/L和 7711.21 ± 312.90 nkat/L,两组抗体滴度无显著差异;而(3)、(4)、(5)组未检测到相应抗体。IFN-γ的产生,在不同的组间,出现比较大的差别:(1)组平均值高达1266.7 ng/L, (2)组也平均产生了986.3 ng/L, (3)组平均533.6 ng/L, (4)组和(5)较低(表1)。

2.2 淋巴细胞转化实验结果 (1), (2), (3), (4)和(5)组的淋巴细胞转化实验刺激指数均值分别为 4.914 ± 0.667 、 3.421 ± 0.352 、 2.353 ± 0.264 、 1.356 ± 0.135 和 1.313 ± 0.198 , (1)组与其他各组有显著性差异; (2)组与(3), (4)和(5)有显著性差异; (3)组与(4)和(5)有显著性差异;而(4)和(5)间无差异。

3 讨论

1970年代, 乙型肝炎(HB)病毒(HBV)的发现和HB的肆虐, 催生了HBV疫苗. 30余年来, HBV疫苗的种类已由最初单一血源HBV疫苗发展为目前的多种基因重组HBV(rHBV)疫苗^[1-3], 而用于免疫治疗研究的, 则多为核酸疫苗(DNA疫苗).

蛋白质抗原抗原提呈细胞摄取后, 将被降解成8-12个氨基酸的短肽, 这些短肽带有不同的抗原表位, 分别与MHC I类和MHC II类分子结合并被提呈到细胞表面, 与MHC I类分子结合的短肽激活CD8⁺T细胞(CTL), 与MHC II类分子结合的短肽激活CD4⁺T细胞, 而分泌到细胞外的抗原则被表达相应抗体的B细胞捕捉, 并在Th细胞分泌淋巴因子的刺激下转化为浆细胞, 大量分泌抗体. 人体感染HBV后, 血清中病毒主要依靠特异性保护抗体, 即抗-HBs清除, 而肝细胞中的病毒, 则需要特异性细胞毒淋巴细胞(CTLs)来清除, 主要是针对HBcAg的CTLs^[4-5]. 根据这个原理, 治疗慢性HBV感染的疫苗, 应该满足既能诱导体液免疫、又能激发细胞免疫. DNA疫苗, 或核酸疫苗, 应用于慢性HBV感染治疗的研究, 已经取得了初步的效果. DNA疫苗可以明显增强受试者的细胞免疫应答^[6-7]. 而只含有HBcAg第18-27位氨基酸的疫苗, 也能诱导明显的T细胞应答^[5], 说明只含有B细胞表位和T细胞表位的疫苗, 能够取代大分子的亚组分疫苗. 本研究选择含编码HBV-preS₂ 120-134, Core 47-56, Core 57-76, Core 170-180位多肽^[8]的嵌合基因, 所构建的DNA疫苗, 在小鼠体内, 能够诱导出特异性抗体, 也能有效刺激 γ -IFN和淋巴细胞转化. 国内赫兢等研究也发现, HBV preS₂核酸疫苗的免疫接种效果, 比S核酸疫苗好^[9].

有研究显示, 与乙肝疫苗强应答者相比, 无、弱应答者外周血单个核细胞(PBMC)体外对外源性rHBsAg刺激的增殖反应明显低

下, PBMC 共刺激分子CD80, CD86的表达显著降低, IL-12和IL-10的产生均有所减少, 说明rHBsAg诱导的免疫应答中, 共刺激信号以及促进TH1细胞和TH2细胞增殖分化的细胞因子都明显不足^[10]. 向机体APC细胞提供CD80分子, 增加表达, 应该是解决该问题的思路之一. 本研究所构建的嵌合DNA疫苗pcHBV-CD80, 尽管在诱生抗体水平, 与无CD80质粒间无差异, 但其IFN- γ 水平、淋巴细胞转化方面, 明显优于无CD80质粒. 本研究显示, preS₂区主要编码B细胞表位的基因, 与C区T细胞表位编码基因, 以及CD80嵌合的新型疫苗, 能够有效诱导机体体液免疫和细胞免疫应答.

4 参考文献

- 1 洪源, 成军. 肝炎病毒DNA疫苗的研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 221-222
- 2 陈仕珠, 高建宏. 乙肝病毒疫苗的类型及其免疫原性和安全性. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2696-2700
- 3 洪源, 成军, 董菁, 李克, 王琳, 王刚, 刘妍. 乙型肝炎病毒HBsAg重组疫苗与表面抗原DNA疫苗诱导H-2b小鼠免疫应答的实验研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 137-140
- 4 梁扩寰, 李绍白. 肝脏病学. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 496
- 5 Huang CF, Lin SS, Ho YC, Chen FL, Yang CC. The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 97-106
- 6 Shata MT, Pfahler W, Brotman B, Lee DH, Tricoche N, Murthy K, Prince AM. Attempted therapeutic immunization in a chimpanzee chronic HBV carrier with a high viral load. *J Med Primatol* 2006; 35: 165-171
- 7 Thermet A, Rollier C, Zoulim F, Trepo C, Cova L. Progress in DNA vaccine for prophylaxis and therapy of hepatitis B. *Vaccine* 2003; 21: 659-662
- 8 Engler OB, Dai WJ, Sette A, Hunziker IP, Reichen J, Pichler WJ, Cerny A. Peptide vaccines against hepatitis B virus: from animal model to human studies. *Mol Immunol* 2001; 38: 457-465
- 9 赫兢, 辛绍杰, 毛远丽, 貌盼勇, 沈宏辉, 杨健洋, 徐军, 孔维. 前S₂抗原对乙型肝炎DNA疫苗免疫应答的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2196-2198
- 10 黄茵, 陈智, 徐承槐, 黄茵, 陈智, 徐承槐, 李敏伟, 蔡玲斐, 金建华. 乙肝疫苗无、弱应答与B72CD28及IL-12、IL-10的相关性. 免疫学杂志 2002; 18: 452-455

■同行评价

本文研究的内容是重要的, 也比较新, 通过研究得出了一定的数据与结果, 提供了有意义的信息. 本文具有科学性与一定的创新性.

电编 李琪 编辑 张焕兰

钙离子信号调节亲环素配体研究进展

程勇前, 成 军

■背景资料

CAML作为亲环素B的结合蛋白于1994年被首次发现, 目前已经报道多种与其相互作用的蛋白, 并证实其在钙离子信号转导、细胞凋亡、免疫调节以及病毒感染等方面具有重要作用。

程勇前, 中国人民解放军302医院病毒性肝炎研究室 北京市100039

程勇前, 军事医学科学院在读博士研究生 北京市100850

成军, 北京地坛医院 北京市100011

通讯作者: 程勇前, 100039, 北京市, 中国人民解放军302医院病毒性肝炎研究室. cheng.yq@126.com

电话: 010-66933392

收稿日期: 2006-10-09 接受日期: 2006-10-18

Research progress in calcium-modulating cyclophilin ligand

Yong-Qian Cheng, Jun Cheng

Yong-Qian Cheng, Department of Viral Hepatitis, the 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Yong-Qian Cheng, Doctor in Reading, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Jun Cheng, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100039, China

Correspondence to: Yong-Qian Cheng, Department of Viral Hepatitis, the 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China. cheng.yq@126.com

Received: 2006-10-09 Accepted: 2006-10-18

Abstract

Calcium-modulating cyclophilin ligand (CAML) is a ubiquitous protein that has been implicated in signal transduction, cell apoptosis, immune regulation and virus infection, although its role and mechanism of action are unknown. Many proteins, including transmembrane activator and CAML interactor, epidermal growth factor receptor, angiotensin 1 receptor-associated protein, immediate early gene X-1 protein, p56^{Lck}, fibrocystin (coded by PKHD1), and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protein, have been proved to be interacting with CAML. In this article, the recent development of CAML-associated study is reviewed.

Key Words: Calcium-modulating cyclophilin ligand; Signal transduction; Interaction; Progress

Cheng YQ, Cheng J. Research progress in calcium-modulating cyclophilin ligand. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):56-60

摘要

钙离子信号调节亲环素配体(CAML)作为亲

环素B的结合蛋白于1994年被首次发现, 尽管其具体作用机制目前还不十分清楚, 但许多研究已证实其在T细胞受体及钙离子信号转导、细胞凋亡、免疫调节以及病毒感染等方面具有重要作用。目前已经报道与其相互作用的蛋白主要有: 跨膜激活剂及钙调亲环素配体相互作用分子(transmembrane activator and CAML interactor, TACI)、EGF受体, 血管紧张素II型受体相关蛋白(AT1 receptor-associated protein, ATRAP)、人立早基因(immediate early gene X-1, IEX-1)、淋巴细胞特异蛋白酪氨酸激酶(p56^{Lck})、常染色体隐性遗传性多囊肾疾病的相关基因PKHD1编码的蛋白fibrocystin, 以及霍普金氏肉瘤相关疱疹病毒K7蛋白(KSHV)等。本文就CAML相关研究进展作简要综述。

关键词: 钙离子信号调节亲环素配体; 信号转导; 相互作用; 进展

程勇前, 成军. 钙离子信号调节亲环素配体研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(1):56-60

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/56.asp>

0 引言

钙离子信号调节亲环素配体(Ca²⁺-modulating cyclophilin ligand, CAML)是1994年Bramet *et al*^[1]在利用酵母双杂交技术研究人亲环素B(cyclophilin B)的相互作用蛋白时克隆到的一个新基因。尽管其具体作用机制目前还不十分清楚, 但自该基因被克隆并命名以来, 许多研究证实其在T细胞受体及钙离子信号转导、细胞凋亡、免疫调节以及病毒感染等方面具有重要作用^[2-6]。CAML基因定位于人类5号染色体q23^[7], 由891个核苷酸组成, CAML cDNA仅含一个888 bp的开放读码框架, 编码1个含296个氨基酸的蛋白。推测其C末端有3个大于20个氨基酸的疏水区, 分别位于189-228, 238-258, 267-287位氨基酸。因此推测CAML是一个膜内在蛋白, 其大部分多肽在胞质面, 与其钙离子调节和转运作用一致^[1]。激光共聚焦显微镜研究显示,

CAML的亚细胞分布主要在细胞核周围^[8]. 用免疫显微镜观察到CAML分布在整个细胞质的小泡样结构中. Northern blot分析证实, CAML可以在所有组织中表达, 在睾丸和大脑中表达水平最高^[1].

Lee *et al*^[9]研究证实, 大鼠CAML cDNA含有一个可编码294个氨基酸的开放度码框架. CAML在物种间高度保守, 与人、小鼠和鸡的同源性分别为85%, 89%和69%. 在星型胶质细胞、小胶质细胞和神经元的基因表达资料显示, CAML的mRNA和蛋白在这些中枢神经系统的细胞中组成型表达.

1 CAML在钙离子信号转导中的作用

T细胞受体(TCR)活化后通过多种途径引起T细胞基因表达的改变和细胞功能的变化, 主要的途径有Ca²⁺、G蛋白、MAPK等^[10-14]. 在Ca²⁺途径中, TCR活化后通过接头蛋白的作用将磷脂酶γ(PLCγ)调动到近膜区, 在蛋白酪氨酸激酶(PTK)的作用下发生酪氨酸磷酸化并被活化. PLCγ作用于膜磷脂成分PIP₂产生IP₃和DAG, IP₃与内质网上相应的受体结合, 促进细胞内钙库释放, 使细胞内Ca²⁺水平升高. 升高的Ca²⁺水平进而可以诱导钙调蛋白(CaM)的活性. CaM激活一种Ca²⁺/钙调蛋白依赖的丝/苏氨酸酯酶, 即钙调磷酸酶(calcineurin), 钙调磷酸酶作用于激活淋巴细胞核因子(NF-AT), 使转录因子在Ca²⁺存在的条件下转位到核内, 发挥调节转录的功能. 免疫抑制剂环孢霉素和FK506可以通过抑制钙调磷酸酶的作用抑制机体的免疫功能. CaM还可以通过诱导CaM激酶 II 的活性, 参与IL-2基因表达的调控.

CAML作为亲环素B的结合蛋白而被首次发现, 亲环素是免疫抑制药物环孢霉素A的作用靶, 当环孢霉素A与亲环素结合时, 环孢霉素A结合并灭活关键的信号中介钙调磷酸酶. 阻止来源于T细胞受体的钙离子依赖的信号, 从而阻止T细胞的活化. CAML可以与亲环素B相互作用, 但不能与亲环素A, C, FKBP12或钙调磷酸酶A亚基相互作用^[1]. CAML在Jurkat T细胞中过量表达时, 可通过激活T细胞特异的转录因子NF-AT和NF-IL2A, 特异性的诱导来自IL-2增强子的转录. 但CAML激活的NF-AT活性需要佛波酯(PMA)对蛋白激酶C(PKC)的外源刺激, 而TCR介导的活性足以激活钙离子和PKC信号通路. 提示CAML在钙离子信号通路中发生作用位于

TCR和PKC下游. 进一步研究显示, 位于细胞表面受体相关的酪氨酸激酶Fyn及Lck下游. 环孢霉素A, FK506是钙调磷酸酶的特异抑制剂, 免疫抑制剂量的这两种药物可以完全消除CAML介导的活性, 提示CAML并不直接作用于NF-AT, 而是位于钙调磷酸酶的上游. 很显然CAML是钙信号转导途经的新的参与者, 无论环孢霉素是否存在^[1].

通过流式细胞仪分析显示, CAML过表达细胞中的钙离子, 与对照相比基线水平明显增高, 提示CAML能通过引起钙离子内流而激活钙调神经磷酸酶. 因此CAML过表达激活钙离子依赖的信号通路是通过引起钙离子内流, 而不是直接结合并活化钙调神经磷酸酶^[1]. 即: TCR→CAML→钙离子内流→钙调神经磷酸酶→NF-AT激活→IL-2表达. 为确定CAML蛋白的活性残基, Holloway *et al*^[15]将CAML的10个不同片段的缺失突变体分别插入真核表达质粒, 并分别转染到Jurkat T细胞中. 检测缺失突变的CAML对NFAT的激活作用, 结果提示缺失CAML的N末端一半以及C末端7个氨基酸对NFAT活性无明显影响, 但是, 缺失C末端46个氨基酸将明显消除对NFAT的激活作用. 该片段启动NFAT也是通过激活钙调磷酸酶. 用流式细胞仪检测细胞内钙离子浓度. 结果提示, 含240-289氨基酸残基的缺失体转染细胞后可以增加细胞内钙离子浓度. 由此证实位于C末端的第2, 3个疏水的跨膜区域(240-289氨基酸)是CAML的最小活性片段.

Holloway *et al*^[15]对CAML基因的结构功能分析表明, CAML的第2, 3跨膜结构域对调节钙离子内流是必需的和足够的. 推测CAML疏水的C末端形成其效应结构域, 而N末端的亲水结构域发挥调节作用. 由于含240-289氨基酸残基的小肽不可能作为酶催化产生一个更小的二级信号, 他们设想CAML的这个区域直接作为一个与其他蛋白质相互作用的位点, 并由此激活这条通路上的下一级信号, CAML的下一级信号目前还不清楚, 但推测应该包括一些特点, 例如, 作为肌醇磷酸受体, 或内质网钙离子泵, 或推测的细胞内钙离子渗漏通道. 由于240-289氨基酸残基的疏水特性, 可能CAML本身是细胞内钙离子通道的一部分. 利用不连续蔗糖梯度分离细胞抽提物和间接免疫荧光观察显示, CAML与肌浆网/内质网Ca²⁺/ATP酶-2和钙网蛋白共同定位于膜结合胞质小泡. 限制酶消化分析显示, CAML亲水的氨基末端位于胞质^[16]. 这将有利于CAML

■研发前沿

本文课题组研究发现HCV NS4A可以与CAML相互作用, 如果二者相互作用也将影响HCV感染细胞的凋亡过程, 将为进一步揭示HCV感染慢性化机制提供新的思路, 并为抗HCV感染慢性化的治疗提供新的靶点.

■名词解释

亲环素: 是免疫抑制药物环孢霉素A的作用靶, 当环孢霉素A与亲环素结合时, 环孢霉素A结合并灭活关键的信号中介钙调磷酸酶, 阻止来源于T细胞受体的钙离子依赖的信号, 从而阻止T细胞的活化。

与其他蛋白在胞质中相互作用。CAML蛋白在Jurkat细胞中过表达时可激活钙离子内流。尽管CAML显示直接参与膜激活剂和CAML相互作用细胞表面受体引发的钙离子依赖信号, 但其作用机制仍不清楚。NF-AT的激活需要钙离子内流信号^[17], 这个信号通常来自于TCR的刺激, thapsigargin是一种Ca²⁺/ATPase泵抑制剂, 可以模仿TCR的作用^[18]。CAML过表达可以增加细胞内Ca²⁺/ATP酶抑制剂thapsigargin的敏感性, 耗竭细胞内thapsigargin敏感的钙池。这些资料显示, CAML可能通过激活容积性钙离子内流而引发钙离子信号, 从而刺激转录因子。由于CAML在哺乳动物组织中广泛表达, 他可能是钙离子储存的重要调节因子^[16]。

Tovey *et al*^[8]在NIH3T3细胞, 对照和CAML表达细胞显示对钙离子动员激动剂ATP的浓度依赖的反应, CAML的表达降低了细胞对钙离子动员激动剂ATP的敏感性, 在低ATP浓度时, 只能观察到局部钙离子释放。与对照相比, 表达CAML的细胞, 钙离子波振幅明显降低, 获得全面的钙离子波需要较高浓度的ATP。与以前研究提示, CAML导致细胞内钙池耗竭相一致。CAML不影响局部的钙离子信号, 提示CAML并不直接影响钙离子释放通道。

2 目前已鉴定的CAML相互作用蛋白

CAML蛋白包括亲水的N末端、C末端以及3个推测的跨膜区, N末端朝向胞质, 是与其他分子相互作用的部位^[19-20,22,24,27], 目前已经报道的与其相互作用的蛋白主要有: 跨膜激活剂及钙调亲环素配体相互作用分子(transmembrane activator and cAMP interactor, TACI)、EGF受体, 血管紧张素 II, I 型受体相关蛋白(AT1 receptor-associated protein, ATRAP)、人立早基因(immediate early gene X-1, IEX-1)、淋巴细胞特异蛋白质酪氨酸激酶(p56^{Lck})、常染色体隐性遗传性多囊肾疾病的相关基因PKHD1编码的蛋白fibrocystin, 以及霍普金氏肉瘤相关疱疹病毒K7蛋白(KSHV)等。1997年von Bulow *et al*^[19]用酵母双杂交技术筛选了细胞内与CAML相互作用的蛋白, 发现跨膜激活因子和CAML相互作用因子(transmembrane activator and CAML-interactor, TACI)可以与CAML相结合, 他们的相互作用可以引起钙离子依赖的转录因子NF-AT的活化。提示CAML与TACI可能存在于共同的信号转导通路中。TACI属于肿瘤坏死因子受体超家族, 位于

细胞膜表面, 可以直接与CAML相互作用, 从而使NF-AT活化。由于CsA和FK506以及细胞外钙离子的耗竭均可以阻断TACI对NF-AT的活化, 故TACI活化NF-AT需要通过依赖钙离子的钙调磷酸酶。通过缺失突变分析证实, TACI羧基末端126个氨基酸与CAML氨基末端201个氨基酸为二者相互作用所必需。

CAML在Jurkat细胞中过表达是NF-AT活化的共诱导因素。在转染了TACI特异抗体的Jurkat细胞, TACI与其抗体的交联可以使NF-AT, AP-1和NF-κB活化。TACI诱导NF-AT的活性可以被CAML突变体阻止, 提示CAML是信号中介者。Tran *et al*^[20]研究CAML基因缺失的小鼠, 发现小鼠早期胚胎发育过程中需要CAML基因, 但对细胞生存能力无明显影响。CAML缺失细胞对表皮生长因子(EGF)的增殖反应被明显削弱。尽管EGF诱导的信号激活和表皮生长因子受体(EGFR)内化通常不需要CAML, 但内化的EGFR再循环到胞质膜将受到明显影响, 从而减少了EGFR在细胞表面的聚集。CAML以配体依赖的方式与EGFR的激酶区域相互作用。二者具体结合部位为CAML氨基末端1-189位氨基酸残基, 及EGFR的激酶区域(683-958位氨基酸残基)。免疫荧光染色分析显示, 在未用EGF处理细胞, EGFR分布在细胞表面, 而CAML分布在胞质内质网区域, 而用EGF处理后可以观察到, EGFR在胞质内分布明显增多, 并且与CAML重叠, 说明二者可能在EGFR内化后在细胞质内发生相互作用。因此他们认为CAML参与EGFR的信号转导, 他可能在细胞对EGF刺激后的长期增殖反应的受体再循环过程中发挥作用。Kumar *et al*^[21]证实与调节细胞凋亡和细胞生长有关的人立早基因IEX-1可以与CAML相互作用, 虽然未报道二者相互作用的具体位点, 但依然认为CAML与调节细胞凋亡有关。

血管紧张素 II (Ang II) 在心血管生理及疾病中有重要作用, Guo *et al*^[22]利用酵母双杂交技术筛选发现血管紧张素 II, I 型受体(AT1)相关蛋白(ATRAP)可以与CAML相互作用。二者相互作用的位点是CAML的1-189位氨基酸和ATRAP的40-82位氨基酸。二者的相互作用部位在细胞内质网小泡。敲除ATRAP基因将增强NF-AT活性, ATRAP在细胞中过表达将降低Ang II 或CAML诱导的NFAT转录活性。这些研究显示, CAML是Ang II 调节钙调磷酸酶-NF-AT信号途径活性的的重要诱导者, CAML与ATRAP的相互作用可能

介导Ang II在血管生理中的作用. 尽管CAML在免疫系统中的生理作用仍不清楚, 但Tran *et al*^[23]研究显示, CAML对外周血T淋巴细胞的成熟十分重要. 灭活小鼠胸腺细胞中的CAML将减少双阳性及单阳性胸腺细胞的数量, 并且阳性选择减少, 而阴性选择增加. p56^{Lck}是由lck基因编码的分子量为56 kDa的单链分子, 属于以p60v-src/c-src为代表的蛋白酪氨酸激酶家族成员. 目前发现, p56^{Lck}相对特异地存在于淋巴细胞中, 尤其是成熟的静止T淋巴细胞中. p56^{Lck}可能在T细胞活化信号转导以及分化调节过程中起着重要的作用. 进一步研究显示CAML可以与p56^{Lck}相互作用, 并且调节其在静止T细胞及TCR刺激的T细胞中的亚细胞定位. CAML缺失细胞p56^{Lck}及ZAP-70磷酸化增强, IL-2产生增加, 并且对TCR刺激后的细胞凋亡更加敏感. 因此, CAML是胸腺选择过程中T细胞生存的基本中介者, CAML缺失将下调p56^{Lck}信号. Nagano *et al*^[24]利用酵母双杂交技术发现CAML可以与fibrocystin相互作用, fibrocystin是目前认为与常染色体隐性遗传性多囊肾疾病的相关基因PKHD1编码的蛋白, 利用缺失突变分析发现, CAML的N末端53个氨基酸与fibrocystin的C末端紧邻跨膜区的144个氨基酸是二者相互作用的具体位点. 二者共同定位于细胞基体及纤毛结构, 推测与细胞钙离子浓度调节有关.

3 CAML对病毒感染的意义

在病毒感染时, 感染细胞能成为宿主免疫反应的靶子, 或者通过细胞凋亡作为限制病毒复制的防御机制^[25-26]. 为对抗宿主防御机制, 病毒也有精密的机制搅乱凋亡过程. Feng *et al*^[27]鉴定了一个新的抗凋亡蛋白: KSHV K7蛋白. KSHV K7蛋白在细胞裂解复制过程中表达. KSHV K7基因编码一个小的线粒体膜蛋白, 他的表达可以有效抑制多种致凋亡因子所引起的凋亡. 酵母双杂交结果显示K7与细胞内CAML结合, 与CAML相似, K7的表达明显增强细胞内针对凋亡刺激的细胞内钙离子浓度的反应动力学和幅度. 突变分析显示K7抑制凋亡需要与CAML的相互作用. 提示K7通过作用于CAML从而增加胞质钙离子反应, 从而保护细胞的线粒体损伤和细胞凋亡. 这是一个新的抗病毒策略, KSHV线粒体K7蛋白针对细胞内钙离子调节蛋白赋予细胞对凋亡的抵抗, 从而使病毒完成裂解细胞的复制, 并且保持在宿主细胞中的持续感染.

线粒体膜电位的丧失发生在细胞凋亡的早期, 为验证K7与CAML相互作用对细胞凋亡的影响, 他们构建了pTracer-GFP/K7载体, 将pTracer-GFP及pTracer-GFP/K7通过电穿孔转染入BJAB细胞, 在不同时间加入细胞凋亡诱导剂, 之后加入四甲基罗丹明甲酯(TMRM), 用流式细胞仪检测线粒体膜电位的改变. 发现K7的表达可以阻止由TG诱导所导致的线粒体膜电位丧失, 而不能阻止由Ca²⁺载体A23187诱导所导致的线粒体膜电位丧失. TG主要通过抑制内质网/肌浆网Ca²⁺-ATPase(SERCA)引起胞质内钙离子浓度增高, 而Ca²⁺载体A23187则主要通过对胞质膜钙离子通道的抑制引起胞质内钙离子浓度增高, 从而导致细胞凋亡. 缺失突变分析显示CAML的N末端1-160个氨基酸, 与K7蛋白N末端的22-74个氨基酸为二者相互作用所必需. 转染了K7或CAML的细胞均可抑制TG诱导导致的细胞线粒体膜电位丧失, 而共转染了K7与CAML的细胞并未显示抗凋亡作用增强, 提示细胞内源的CAML对与K7相互作用已是足够的. 并且, 突变分析显示, 与CAML没有相互作用的K7蛋白N末端75-126个氨基酸转染细胞后并不能抑制TG诱导导致的细胞线粒体膜电位丧失, 由此证实, K7蛋白与CAML的相互作用对抑制凋亡诱导剂所致的细胞线粒体膜电位丧失是必需的. 提示K7通过作用于CAML明显增强细胞内针对凋亡刺激的细胞内钙离子浓度的反应动力学和幅度, 这种对胞质钙离子浓度的早期调节保护细胞了的线粒体损伤和细胞凋亡.

我们新近研究发现, 丙型肝炎病毒非结构蛋白4A(HCV NS4A)可以与CAML相互作用, 二者相互作用之后对细胞功能及其抗病毒机制的影响正在进一步研究之中. 如果二者相互作用引发细胞内钙离子浓度及线粒体膜电位改变, 进而影响HCV感染细胞的凋亡过程, 将为进一步揭示HCV感染慢性化机制提供新的思路, 并为抗HCV感染慢性化的治疗提供新的靶点.

4 参考文献

- 1 Bram RJ, Crabtree GR. Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature* 1994; 371: 355-358
- 2 Salzer U, Grimbacher B. Monogenetic defects in common variable immunodeficiency: what can we learn about terminal B cell differentiation? *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18: 377-382
- 3 Diaz-de-Durana Y, Mantchev GT, Bram RJ, Franco A. TACI-BLyS signaling via B-cell-dendritic cell cooperation is required for naive CD8+ T-cell

■同行评价

钙离子信号调节亲环素配体是1994年Bram *et al*在利用酵母双杂交技术研究人亲环素B的相互作用蛋白时克隆到的一个新基因. 研究证实其在钙离子信号转导、细胞凋亡、免疫调节以及病毒感染等方面具有重要作用, 本文内容较新, 有学术价值.

- priming *in vivo*. *Blood* 2006; 107: 594-601
- 4 Boya P, Pauleau AL, Poncet D, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Kroemer G. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1659: 178-189
- 5 Liu W, Szalai A, Zhao L, Liu D, Martin F, Kimberly RP, Zhou T, Carter RH. Control of spontaneous B lymphocyte autoimmunity with adenovirus-encoded soluble TACI. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1884-1896
- 6 Wang H, Marsters SA, Baker T, Chan B, Lee WP, Fu L, Tumas D, Yan M, Dixit VM, Ashkenazi A, Grewal IS. TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice. *Nat Immunol* 2001; 2: 632-637
- 7 Bram RJ, Valentine V, Shapiro DN, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG. The gene for calcium-modulating cyclophilin ligand (CAMLG) is located on human chromosome 5q23 and a syntenic region of mouse chromosome 13. *Genomics* 1996; 31: 257-260
- 8 Tovey SC, Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ, Bram RJ. Calcium-modulating cyclophilin ligand desensitizes hormone-evoked calcium release. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 97-100
- 9 Lee SJ, Drabik K, Benveniste EN. Cloning of rat calcium-modulating cyclophilin ligand. *DNA Seq* 2001; 12: 209-213
- 10 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2001: 586-587
- 11 Savignac M, Moreau M, Leclerc C, Paulet P, Druet P, Pelletier L. Calcium-dependent pathways involved in the production of cytokines in lymphocytes. *J Soc Biol* 2001; 195: 309-317
- 12 Ballard DW. Molecular mechanisms in lymphocyte activation and growth. *Immunol Res* 2001; 23: 157-166
- 13 Tasken K, Skalhegg BS, Tasken KA, Solberg R, Knutsen HK, Levy FO, Sandberg M, Orstavik S, Larsen T, Johansen AK, Vang T, Schrader HP, Reinton NT, Torgersen KM, Hansson V, Jahnsen T. Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1997; 31: 191-204
- 14 Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 259-274
- 15 Holloway MP, Bram RJ. A hydrophobic domain of Ca²⁺-modulating cyclophilin ligand modulates calcium influx signaling in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 8549-8552
- 16 Holloway MP, Bram RJ. Co-localization of calcium-modulating cyclophilin ligand with intracellular calcium pools. *J Biol Chem* 1998; 273: 16346-16350
- 17 Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, Rao A. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 1993; 365: 352-355
- 18 Kirby MS, Sagara Y, Gaa S, Inesi G, Lederer WJ, Rogers TB. Thapsigargin inhibits contraction and Ca²⁺ transient in cardiac cells by specific inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* 1992; 267: 12545-12551
- 19 von Bulow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science* 1997; 278: 138-141
- 20 Tran DD, Russell HR, Sutor SL, van Deursen J, Bram RJ. CAML is required for efficient EGF receptor recycling. *Dev Cell* 2003; 5: 245-256
- 21 Kumar R, Lutz W, Frank E, Im HJ. Immediate early gene X-1 interacts with proteins that modulate apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 1293-1298
- 22 Guo S, Lopez-Illasaca M, Dzau VJ. Identification of calcium-modulating cyclophilin ligand (CAML) as transducer of angiotensin II-mediated nuclear factor of activated T cells (NFAT) activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 12536-12541
- 23 Tran DD, Edgar CE, Heckman KL, Sutor SL, Huntoon CJ, van Deursen J, McKean DL, Bram RJ. CAML is a p56Lck-interacting protein that is required for thymocyte development. *Immunity* 2005; 23: 139-152
- 24 Nagano J, Kitamura K, Hujer KM, Ward CJ, Bram RJ, Hopfer U, Tomita K, Huang C, Miller RT. Fibrocystin interacts with CAML, a protein involved in Ca²⁺ signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 880-889
- 25 Zhu LX, Liu J, Ye Y, Xie YH, Kong YY, Li GD, Wang Y. A candidate DNA vaccine elicits HCV specific humoral and cellular immune responses. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2488-2492
- 26 Chen S, Wang YM. Genetic evolution of structural region of hepatitis C virus in primary infection. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 686-693
- 27 Feng P, Park J, Lee BS, Lee SH, Bram RJ, Jung JU. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus mitochondrial K7 protein targets a cellular calcium-modulating cyclophilin ligand to modulate intracellular calcium concentration and inhibit apoptosis. *J Virol* 2002; 76: 11491-11504

电编 张敏 编辑 潘伯荣

结肠途径治疗对高温中暑狗肝脏的保护作用

姚欣, 冯子坛, 白启轩, 吉丽, 贾昭, 吴颖, 刘文格, 孙蓉

■背景资料

肝脏是中暑患者最易损伤的部位之一, 目前中暑肝损伤尚无有效的治疗方法。临床上治疗中暑肝损伤主要是降温、支持、对症治疗, 但死亡率仍高。

姚欣, 冯子坛, 白启轩, 吉丽, 贾昭, 吴颖, 刘文格, 孙蓉, 白求恩国际和平医院消化内科 河北省石家庄市 050082

通讯作者: 姚欣, 050082, 河北省石家庄市中山西路398号, 白求恩国际和平医院消化内科. xinyaoyongpeng@126.com

收稿日期: 2006-09-24 接受日期: 2006-10-26

Effects of colon hydrotherapy on liver injury induced by hyperthermia in dogs

Xin Yao, Zi-Tan Feng, Qi-Xuan Bai, Li Ji, Zhao Jia, Ying Wu, Wen-Ge Liu, Rong Sun

Xin Yao, Zi-Tan Feng, Qi-Xuan Bai, Li Ji, Zhao Jia, Ying Wu, Wen-Ge Liu, Rong Sun, Department of Gastroenterology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China

Correspondence to: Xin Yao, Department of Gastroenterology, Bethune International Peace Hospital, 398 Zhongshan West Road, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China. xinyaoyongpeng@126.com

Received: 2006-09-24 Accepted: 2006-10-26

Abstract

AIM: To investigate the effect of colon hydrotherapy on the liver injury induced by hyperthermia in dogs.

METHODS: After the dog models of heat stroke were set up, the dogs were randomly divided into two groups, receiving colon hydrotherapy and conventional therapy, respectively. Cooling time as well as serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) levels before heat stroke, 6, 24 and 48 h after heat stroke were determined. The dogs were sacrificed 48 h after heat stroke. The contents of liver MDA and SOD were also measured and pathological changes were observed by light and electron microscopy.

RESULTS: In compared with those in conventional therapy group, the cooling time of dogs in colon hydrotherapy group was decreased ($t = 5.39, P < 0.01$), accompanied with reduced ALT, AST, MDA and elevated SOD at the 24th ($t = 3.46, P < 0.01; t = 3.74, P < 0.01; t = 2.43, P < 0.05; t = 2.44, P < 0.05$) and 48th ($t = 3.33, P < 0.01;$

$t = 2.97, P < 0.05; t = 3.32, P < 0.01; t = 4.34, P < 0.01$) after heat stroke. The content of liver MDA was decreased ($t = 4.08, P < 0.01$) while that of SOD was increased ($t = 6.52, P < 0.01$) in colon hydrotherapy group. The values of LDH were similar between the two groups ($P > 0.05$). Light microscopy showed that hepatocellular cholestasis, fatty changes and focal necrosis were lessened, accompanied by lessened congestion of sinus hepaticus and decreased inflammatory cells in colon hydrotherapy group. In addition, ultrastructural observation showed that fusion of mitochondrial cristae and degranulation of rough endoplasmic reticulum were decreased in colon hydrotherapy group.

CONCLUSION: Colon hydrotherapy is a more rapid cooling technique than conventional therapy, and it can promote the decrease of serum enzymes and relieve the hepatic injury induced by lipid peroxidation and pathological lesion.

Key Words: Colon hydrotherapy; Dogs; Hyperthermia; Liver disease

Yao X, Feng ZT, Bai QX, Ji L, Jia Z, Wu Y, Liu WG, Sun R. Effects of colon hydrotherapy on liver injury induced by hyperthermia in dogs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):64-68

摘要

目的: 探讨结肠途径治疗对高温中暑狗肝脏的保护作用。

方法: 建立高温中暑狗的动物模型, 将狗随机分为两组(肠疗组、常规组), 比较两组的降温时间, 测定两组中暑前、中暑后6, 24, 48 h的血谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平。中暑后48 h处死狗, 测定肝脏MDA和SOD含量, 并行肝脏光镜和电镜病理学检查。

结果: 与常规组相比, 肠疗组降温时间明显缩短($t = 5.39, P < 0.01$); 血ALT, AST, MDA在中暑后24 h ($t = 3.46, P < 0.01; t = 3.74, P < 0.01;$

$t = 2.43, P < 0.05$)和48 h ($t = 3.33, P < 0.01$; $t = 2.97, P < 0.05$; $t = 3.32, P < 0.01$)均明显降低, 血SOD在中暑后24 h ($t = 2.44, P < 0.05$)和48 h ($t = 4.34, P < 0.01$)明显增高; 肝脏MDA明显下降($t = 4.08, P < 0.01$), SOD明显升高($t = 6.52, P < 0.01$). 两组血LDH各时间点均无显著性差异. 病理学检查光镜下可见肠疗组肝细胞淤胆、脂肪变性、坏死等损害较常规组明显减轻, 肝窦充血减轻, 炎细胞浸润较少. 电镜下见肠疗组线粒体嵴融合及粗面内质网脱颗粒现象较常规组减轻.

结论: 结肠途径治疗可加快高温中暑狗降温速度, 促进血清酶恢复, 减轻肝脏脂质过氧化损伤和病理损害, 对高温中暑狗肝脏具有保护作用.

关键词: 结肠途径治疗; 狗; 高温; 肝脏疾病

姚欣, 冯子坛, 白启轩, 吉丽, 贾昭, 吴颖, 刘文格, 孙蓉. 结肠途径治疗对高温中暑狗肝脏的保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(1):64-68

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/64.asp>

0 引言

中暑是环境高温和/或剧烈体力活动时, 因热作用而引起的一种急性热致疾病. 重症中暑可导致多器官、系统的功能不全或衰竭, 死亡率可高达10%-75%^[1]. 其中, 肝脏是中暑患者最易损伤的部位之一, 几乎所有的中暑患者都有肝组织损伤^[1]. 近年研究表明, 中暑时多器官功能损伤与高热的细胞毒作用、细胞因子过度释放、内毒素血症、凝血异常等因素复杂的交互作用有关^[2-9]. 实验及临床研究证明, 结肠途径治疗可以降温, 清除肠腔病原体及其毒素, 清除促炎因子, 减轻内毒素血症^[10-12], 而其对高温中暑的治疗作用尚未见报道. 本实验旨在探讨结肠途径治疗对高温中暑狗肝脏是否具有保护作用, 以期为其应用于临床提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 普通级杂种狗由白求恩国际和平医院实验动物中心提供, 体质量13-16 kg, 雌雄不限. 8803型电子测温仪, 购自台湾衡欣科技股份有限公司. Clean Master型结肠途径治疗机, 购自北京智立医学仪器公司. 丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自南京建成生物工程研究所. 谷丙转氨酶、谷草转氨酶、乳酸脱氢酶测定试剂盒购自北京九强公司.

1.2 方法

1.2.1 建立中暑动物模型 参照White *et al*^[13]方法并加以改进, 14只杂种狗动物随机分为2组: 中暑结肠途径治疗组(肠疗组)7只, 中暑常规治疗组(常规组)7只. 在本实验室常温下饲养1 wk后开始实验. 术前12 h禁食, 自由饮水. 2组狗以20 g/L的硫喷妥钠15-20 mg/kg静脉麻醉后, 行气管插管, 呼吸机辅助呼吸, 将狗置于恒温恒湿箱中(本实验室自制), 箱内气象条件: 温度42℃, 湿度60%-70%, 并同时应用电子测温仪监测深部鼻腔温度, 以此反映动物脑的温度^[14]. 待狗深部鼻腔温度达43℃后, 降低箱内温度, 使此温度维持43℃达10 min. 之后将狗取出.

1.2.2 降温方法 2组狗均置于温度23℃, 湿度65%的室温下降温, 常规组给予冰袋置于大动脉处(颈部两侧、两侧腋窝、腹股沟)降温, 肠疗组应用进行结肠途径治疗降温. 结肠途径治疗液组成: 甘露醇200 g, 葡萄糖100 g, 加去离子水至20 000 mL, 液体温度经结肠治疗系统控制在37-38℃之间. 将探头插入直肠10 cm, 进水管缓慢插入60 cm至升结肠, 调节注水速度为200 mL/min. 2组狗从恒温恒湿箱中取出后立即行冰袋降温或结肠途径治疗, 待狗体温下降至38℃时降温结束. 分别记录2组的降温时间. 2组狗麻醉清醒后, 均解除外固定, 自由饮用50 g/L葡萄糖水, 每日观察并记录一般情况. 肠疗组第一次结肠途径治疗后间隔24, 48 h行第2, 3次治疗, 每次治疗时间为100 min. 2组狗中暑前(0 h)及中暑后6, 24, 48 h采集静脉血5 mL, 并于第3次结肠途径治疗结束后处死. 定位切取狗肝右叶组织标本, 部分肝脏标本放入10 g/L甲醛固定用于普通光镜检查, 部分肝脏标本放入40 g/L戊二醛固定用于电镜检查, 部分肝脏标本以无菌生理盐水漂洗后-20℃保存, 用于MDA和SOD测定.

1.2.3 血清学指标的测定 血液凝固后, 1000 r/min离心10 min, 分离血清于-20℃保存. 采用全自动生化分析仪测定ALT, AST, LDH. 应用黄嘌呤氧化酶法测定SOD活力, 硫代巴比妥酸法测定MDA活力, 具体操作参照试剂盒说明书进行.

1.2.4 肝脏MDA, SOD测定 取冻存肝组织, 称质量、剪碎、匀浆, 测定方法同前, 具体操作参照试剂盒说明书进行.

1.2.5 组织病理学检测 将部分肝组织标本, 剪成大小约0.5 cm×1 cm×1 cm, 放入10 g/L甲醛, 固定24-48 h, 然后脱水、透明、石蜡包埋, 切片, 切成约5 μm厚, HE染色. 将部分肝组织标本, 以

■创新盘点

文献报道结肠途径治疗可降温和改善肝功能, 但未见治疗中暑的报道. 本文研究结肠途径治疗对高温中暑肝脏是否具有保护作用.

■应用要点

结肠途径治疗不仅可降温,而且对高温中暑肝脏具有保护作用;操作简便,无副作用,适合临床推广应用。

表 1 肠疗组和常规组降温速度的比较(mean ± SD)

分组	造模前温度(°C)	降温时间(min)	降温速度(°C/min)
肠疗组	37.60 ± 0.72	92.88 ± 9.50 ^b	0.049 ± 0.005 ^b
常规组	37.53 ± 0.44	123.43 ± 11.60	0.037 ± 0.003

^b $P < 0.01$ vs 常规组。

快刀切成大小约0.1 cm × 0.1 cm × 0.1 cm, 放入40 g/L戊二醛中, 固定72 h, 送透射电镜检查。

统计学处理 应用SPSS11.0统计软件进行统计学分析, 计量资料以mean ± SD表示, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较 中暑后观察48 h, 2组狗均无死亡。中暑后24 h, 2组狗均有不同程度的精神萎靡、懒动、反应迟钝、不思饮水现象, 中暑后48 h, 肠疗组大部分(5/7)基本恢复正常, 常规组部分(2/7)基本恢复。常规组1例出现四肢肌张力增高, 去大脑强直, 给予对症治疗后未恢复, 余动物未出现明显神经系统异常。

2.2 降温速度的比较 与常规组相比, 肠疗组降温时间缩短, 降温速度加快, 差异有统计学意义($P < 0.01$)(表1)。

2.3 血清学指标的比较 狗高温中暑后, ALT, AST, LDH, MDA均较中暑前升高, SOD下降。与常规组相比, 肠疗组24和48 h ALT, AST, MDA均明显降低($P < 0.05$), 血SOD明显增高($P < 0.05$), 2组LDH各时间点均无显著性差异($P > 0.05$)(表2)。

2.4 肝脏MDA, SOD比较 与常规组相比, 肠疗组肝脏MDA明显下降($1.680 \pm 0.129 \mu\text{mol/g}$ 蛋白 vs $2.269 \pm 0.359 \mu\text{mol/g}$ 蛋白), SOD明显升高($8724.23 \pm 907.96 \mu\text{kat/g}$ 蛋白 vs $6659.05 \pm 1386.91 \mu\text{kat/g}$ 蛋白), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 肝脏病理 肉眼观常规组中3只狗肝脏出现散在黄色变性与暗红色淤血, 呈红黄相间改变, 肝脏大小、质地正常。肠疗组肝脏颜色、质地、大小正常。光镜下见常规组肝小叶结构正常存在, 肝细胞肿胀, 弥漫性脂肪变性, 部分肝细胞胞质疏松, 染色浅淡, 呈水样变性, 部分肝细胞出现淤胆, 并可见少数肝细胞凝固性坏死。肝窦明显充血, 炎细胞浸润, 部分毛细胆管及小胆管可见淤胆。肠疗组仅有肝细胞轻度肿胀, 少数肝细胞出现淤胆、脂肪变性, 未见坏死。肝窦充血

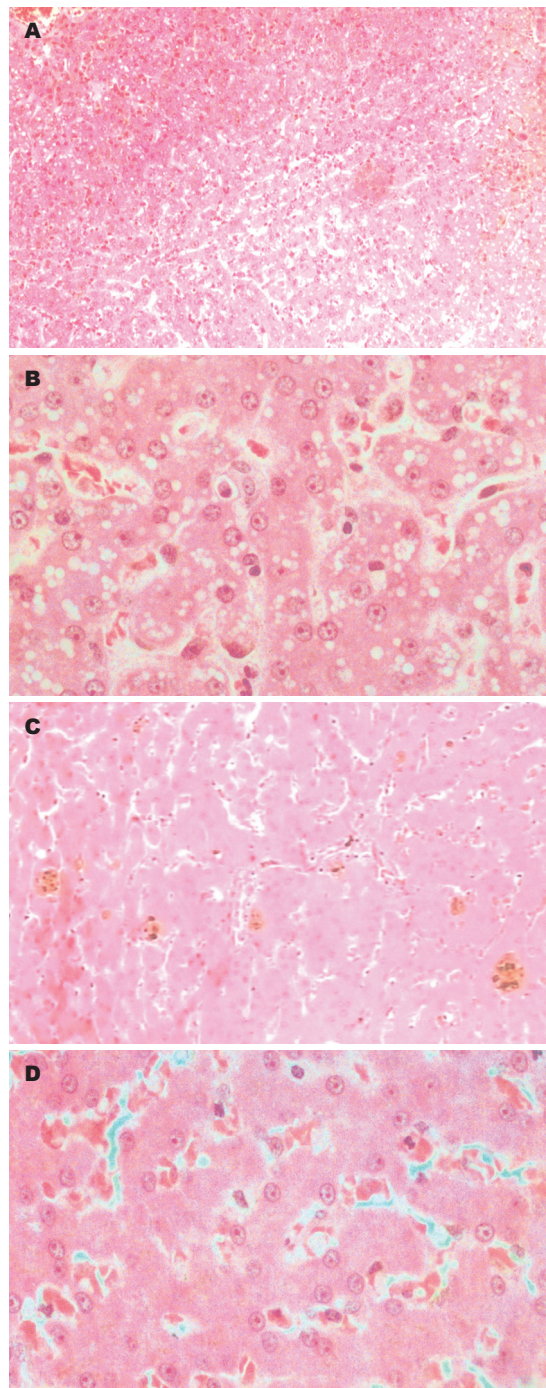


图 1 肝组织光镜下病理变化(HE)。A: 模型组(×100); B: 模型组(×200); C: 治疗组(×100); D: 治疗组(×200)。

减轻, 炎细胞浸润较少(图1)。电镜下可见常规组线粒体肿胀, 嵴几乎全部融合、消失, 变成均质物质, 粗面内质网有重度脱颗粒现象。肠疗组线粒体仍呈肿胀状态, 部分嵴融合, 粗面内质网存在轻度脱颗粒现象(图2)。

3 讨论

中暑是一种以高热、意识障碍为特点的常见的临床急症, 可能导致多器官、系统的功能不全

表 2 肠疗组和常规组ALT, AST, LDH, MDA, SOD的比较(mean $\pm$ SD)

项目	分组	0 h	6 h	24 h	48 h
ALT	肠疗组	978.70 $\pm$ 136.03	3462.53 $\pm$ 683.97	2445.66 $\pm$ 552.78 ^b	2695.71 $\pm$ 641.96 ^b
(nkat/L)	常规组	874.01 $\pm$ 193.71	3486.36 $\pm$ 752.98	5608.29 $\pm$ 2353.8	6051.21 $\pm$ 2588.85
AST	肠疗组	807.33 $\pm$ 112.52	3519.7 $\pm$ 1094.72	2931.59 $\pm$ 723.14 ^b	4334.2 $\pm$ 1321.93 ^a
(nkat/L)	常规组	936.31 $\pm$ 292.89	3767.42 $\pm$ 1138.73	5308.23 $\pm$ 1518.64	7727.71 $\pm$ 2721.54
LDH	肠疗组	2702.87 $\pm$ 733.65	6308.43 $\pm$ 2093.25	4360.37 $\pm$ 1498.47	5008.17 $\pm$ 1148.29
(nkat/L)	常规组	2731.55 $\pm$ 791.83	7172.93 $\pm$ 1927.22	5517.77 $\pm$ 488.43	6675.17 $\pm$ 1829.87
MDA	肠疗组	6.45 $\pm$ 0.64	7.27 $\pm$ 0.54	7.00 $\pm$ 1.19 ^a	6.53 $\pm$ 0.83 ^b
(μ mol/L)	常规组	6.48 $\pm$ 0.69	8.12 $\pm$ 1.14	8.36 $\pm$ 0.89	8.02 $\pm$ 0.86
SOD	肠疗组	1214.24 $\pm$ 161.87	1146.56 $\pm$ 97.35	1154.06 $\pm$ 68.35 ^a	1218.24 $\pm$ 114.52 ^b
(μ kat/L)	常规组	1207.57 $\pm$ 126.53	1007.03 $\pm$ 146.86	1010.87 $\pm$ 139.03	988.36 $\pm$ 80.52

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 常规组.

或衰竭. 肝脏是中暑患者最易损伤的部位之一, 在重症中暑中后期, 肝损伤常给患者带来致命性打击^[15-16]. 中暑肝损伤的病理机制目前尚不清楚, 但高温的直接损伤、缺血、缺氧、宿主的炎症反应等因素引起一系列恶性事件可能起到关键作用^[14,16-17]. 临床上治疗中暑肝损伤主要是快速降温和支持、对症治疗^[1]. 快速、有效的降温对降低中暑死亡率非常重要^[13]. 本研究发现, 与常规治疗相比, 结肠途径治疗可使高温中暑狗降温时间明显缩短, 降温速度明显加快, 改善动物一般情况. 同时, 与灌胃、腹腔内灌洗、静脉快速输液等其他中心降温方法相比, 操作简便、无副作用、患者无不适感, 因此, 更适用于临床.

血清酶ALT, AST和LDH的升高是中暑的主要临床特征之一, 又是临床判断肝功能及中暑患者预后的重要指标^[1,18-19]. 本研究发现, 狗高温中暑后, 血ALT, AST, LDH较中暑前明显升高, 肠疗组24和48 h ALT, AST均较常规组明显降低($P < 0.05$). Aizeer *et al*^[19]研究发现, 最有用的判断预后的指标是LDH, 在死亡组和较快恢复组差异最显著. 本研究中肠疗组和常规组LDH各时间点均无显著性差异, 48 h观察2组全部存活, 表明2组在预后上无明显差异, 与Aizeer *et al*研究结果一致. SOD活力及MDA含量的测定, 可间接反映氧自由基的产生和他所引起的组织细胞损伤程度. 2002年Yang *et al*^[20]首次报道了中暑后机体存在氧化应激损伤, 其原因亦与氧化系统和抗氧化系统失衡有关, 并发现大鼠中暑后脑、肝和心脏组织脂质超氧阴离子产生增加, 总SOD量减少. 本研究发现, 狗高温中暑后, 血

同行评价

本研究立意较新颖, 思路清晰, 以观察结肠途径对高温中暑狗肝脏是否具有保护作用为主要目的, 有一定创新.

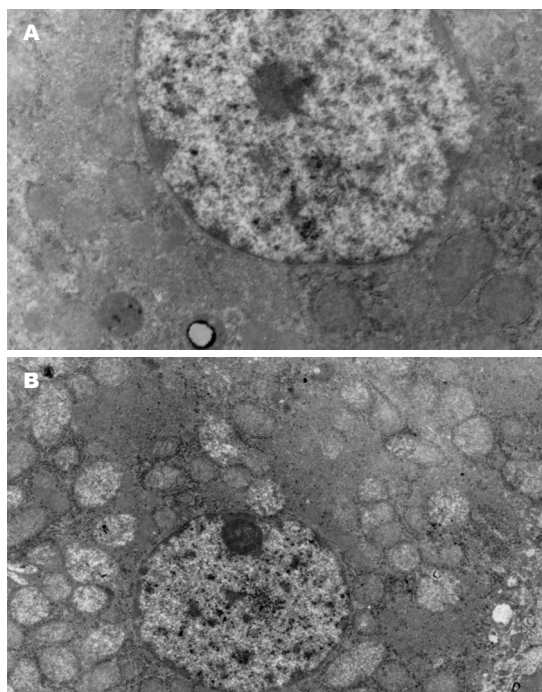


图 2 肝组织电镜下病理变化. A: 模型组; B: 治疗组.

MDA亦出现升高, SOD下降. 与常规组相比, 肠疗组24和48 h血和肝脏MDA均明显升高, SOD明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 病理组织学检查光镜下可见肠疗组肝细胞淤胆、脂肪变性、坏死等损害较常规组明显减轻, 肝窦充血减轻, 炎细胞浸润较少. 电镜下亦见肠疗组线粒体嵴融合及粗面内质网脱颗粒现象较常规组减轻. 结肠途径治疗可加快高温中暑狗降温速度, 清除肠腔病原体及其毒素, 清除促炎因子, 减轻内毒素血症^[10-12], 促进血清酶恢复, 减轻肝脏脂质过氧化损伤和病理损害, 对高温中暑狗肝脏具有保护作用.

致谢: 本文承白求恩医学院基础部生理教研室刘卫老师指导, 在此表示感谢。

4 参考文献

- Hassanein T, Razack A, Gavalier JS, Van Thiel DH. Heatstroke: its clinical and pathological presentation, with particular attention to the liver. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1382-1389
- Bouchama A, al-Sedairy S, Siddiqui S, Shail E, Rezeig M. Elevated pyrogenic cytokines in heatstroke. *Chest* 1993; 104: 1498-1502
- Bouchama A, Hammami MM, Al Shail E, De Vol E. Differential effects of *in vitro* and *in vivo* hyperthermia on the production of interleukin-10. *Intensive Care Med* 2000; 26: 1646-1651
- Suzuki K, Yamada M, Kurakake S, Okamura N, Yamaya K, Liu Q, Kudoh S, Kowatari K, Nakaji S, Sugawara K. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2000; 81: 281-287
- Hall DM, Buettner GR, Oberley LW, Xu L, Matthes RD, Gisolfi CV. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H509-521
- Moldoveanu AI, Shephard RJ, Shek PN. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol* 2000; 89: 1499-1504
- 李晓芳. 严重烧伤后胃肠道功能障碍的机制和防治. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 888-893
- Song Y, Shi Y, Ao LH, Harken AH, Meng XZ. TLR4 mediates LPS-induced HO-1 expression in mouse liver: role of TNF-alpha and IL-1beta. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1799-1803
- Fan N, Yang GS, Lu JH, Yang N, Zhang HB. Oral administration of geranylgeranylacetone plus local somatothermal stimulation: a simple, effective, safe and operable preconditioning combination for conferring tolerance against ischemia-reperfusion injury in rat livers. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5725-5731
- 吉丽, 冯子坛, 白启轩, 于兰. 结肠清洁联合善宁治疗重症急性胰腺炎时促炎因子的变化. *胰腺病学* 2006; 6: 30-32
- 于兰, 冯子坛, 吉丽, 白启轩. 结肠灌洗联合善宁治疗重症急性胰腺炎犬对血浆内毒素水平及肠道细菌易位的影响. *胰腺病学* 2006; 6: 112-113
- 刘玉翠, 孙迪, 刘祥忠, 杨景云. 结肠途径治疗机辅助治疗急性黄疸性肝炎的临床研究. *中国微生态学杂志* 2004; 16: 226-227
- White JD, Kamath R, Nucci R, Johnson C, Shepherd S. Evaporation versus iced peritoneal lavage treatment of heatstroke: comparative efficacy in a canine model. *Am J Emerg Med* 1993; 11: 1-3
- 茅志成, 郭堂春. 现代中暑诊断治疗学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2000: 136-140
- Hadad E, Ben-Ari Z, Heled Y, Moran DS, Shani Y, Epstein Y. Liver transplantation in exertional heat stroke: a medical dilemma. *Intensive Care Med* 2004; 30: 1474-1478
- Lubanda H, Novak F, Trunecka P, Urbanek P, Onderkova R, Zak A. Acute liver failure related to the syndrome of exertional heatstroke. *Cas Lek Cesk* 2004; 143: 336-338
- Seferova RI, Manenkova ID, Avetisova NL. Intracellular oxidative-reductive processes in tissues in hyperthermia. *Patol Fiziol Eksp Ter* 1993; 25-27
- 程鲁京, 王沐沂, 韦学义, 王卉. 中暑患者血清中酶的变化及其对病情的诊断价值. *中国急救医学* 2000; 20: 720-721
- Alzeer AH, el-Hazmi MA, Warsy AS, Ansari ZA, Yrkendi MS. Serum enzymes in heat stroke: prognostic implication. *Clin Chem* 1997; 43: 1182-1187
- Yang CY, Lin MT. Oxidative stress in rats with heatstroke-induced cerebral ischemia. *Stroke* 2002; 33: 790-794

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者. (世界胃肠病学杂志社2007-01-08)

番石榴叶提取物对三硝基苯磺酸诱导大鼠结肠炎结肠组织的保护作用

廖泽云, 李玉山, 姜锦林

廖泽云, 李玉山, 湖北民族学院医学院生理学教研室 湖北省恩施市 445000

姜锦林, 湖北民族学院附属医院 湖北省恩施市 445000

通讯作者: 廖泽云, 445000, 湖北省恩施市, 湖北民族学院医学院. lzy121192004@126.com

电话: 0718-8235239

收稿日期: 2006-06-05 接受日期: 2006-06-30

Protective effect of guava leaf extract on colonic tissues with ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats

Ze-Yun Liao, Yu-Shan Li, Jin-Lin Jiang

Ze-Yun Liao, Yu-Shan Li, Department of Physiology, Medical College of Hubei Institute for Nationalities, Enshi 44500, Hubei Province, China

Jin-Lin Jiang, the Affiliated Hospital of Medical College of Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, Hubei Province, China

Correspondence to: Ze-Yun Liao, Department of Physiology, Medical College of Hubei Institute for Nationalities, Enshi 44500, Hubei Province, China. lzy121192004@126.com

Received: 2006-06-05 Accepted: 2006-06-30

Abstract

AIM: To explore the protective effect of guava leaf water extract on the colonic tissues with ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) as well as its mechanism in rats.

METHODS: Rat model of ulcerative colitis was established by clyster of TNBS. After treatment with guava leaf extract for 2 weeks, the colon mucosal damage index (CMDI) was evaluated. The activity of myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD), the content of malondialdehyde (MDA) in colon tissues, and the levels of tumor necrosis factor (TNF), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in serum were examined.

RESULTS: Guava leaf extract (200, 500, 800 mg/kg) decreased the values of CMDI (2.62 ± 0.47 , 2.06 ± 0.54 , 1.83 ± 0.43 vs 3.15 ± 0.39 ; $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), the activity of MPO (2240.78 ± 479.26 , 2078.42 ± 377.91 , 1748.85 ± 236.71 nkat/g vs 2695.37 ± 624.79 nkat/g; $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), the contents of MDA (2.16 ± 0.41 , 1.97 ± 0.35 , 1.96 ± 0.30 $\mu\text{mol/g}$ vs 2.66 ± 0.65 $\mu\text{mol/g}$; $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), and the levels of TNF (2.65 ± 0.40 , 2.51 ± 0.47 , 2.21 ± 0.41 $\mu\text{g/L}$ vs 3.30 ± 0.63 $\mu\text{g/L}$; $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), IL-8 (1.20 ± 0.33 , 1.05 ± 0.24 , 0.92 ± 0.13 $\mu\text{g/L}$ vs 1.53 ± 0.38 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$) and IL-10 (39.36 ± 9.65 , 50.26 ± 11.32 , 59.68 ± 13.65 ng/L vs 30.74 ± 12.91 ng/L, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), but increased the activity of SOD (3618.06 ± 538.44 , 3756.92 ± 577.45 , 4197.51 ± 375.74 nkat/g vs 2663.37 ± 603.79 nkat/g, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$) in a dose-dependent manner.

CONCLUSION: Guava leaf extract can relieve the inflammatory reaction and colonic injury in colitis rats by immunoregulation, anti-oxidation and wound repair.

Key Words: Guava leaf extract; Anti-oxidation; Immunoregulation; Colitis; Rat

Liao ZY, Li YS, Jiang JL. Protective effect of guava leaf extract on colonic tissues with ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):69-71

摘要

目的: 研究番石榴叶提取物对大鼠结肠炎组织损伤的保护作用及其机制。

方法: 用健康Wistar大鼠建立大鼠结肠炎模型, 灌胃用药2 wk后, 评价大鼠结肠黏膜损伤指数(CMDI), 检测结肠组织髓过氧化物酶(MPO)及超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量和细胞肿瘤因子(TNF)、白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-10(IL-10)水平。

结果: 不同剂量番石榴叶提取物(200, 500, 800 mg/kg)灌胃均能不同程度降低模型大鼠CMDI(2.62 ± 0.47 , 2.06 ± 0.54 , 1.83 ± 0.43 vs 3.15 ± 0.39 ; $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), MPO活性(2240.78 ± 479.26 , 2078.42 ± 377.91 , 1748.85 ± 236.71 nkat/g vs 2695.37 ± 624.79 nkat/g; $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), MDA含量(2.16 ± 0.41 , 1.97 ± 0.35 , 1.96 ± 0.30 $\mu\text{mol/g}$ vs 2.66 ± 0.65 $\mu\text{mol/g}$; $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 以及TNF(2.65 ± 0.40 , 2.51 ± 0.47 , 2.21 ± 0.41 $\mu\text{g/L}$ vs 3.30 ± 0.63 $\mu\text{g/L}$; $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), IL-8(1.20 ± 0.33 , 1.05 ± 0.24 , 0.92 ± 0.13 $\mu\text{g/L}$ vs 1.53 ± 0.38 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)和IL-10(39.36 ± 9.65 , 50.26 ± 11.32 , 59.68 ± 13.65 ng/L vs 30.74 ± 12.91 ng/L, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)的水平, 但提高了SOD活性(3618.06 ± 538.44 , 3756.92 ± 577.45 , 4197.51 ± 375.74 nkat/g vs 2663.37 ± 603.79 nkat/g, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)呈剂量依赖性。

■背景资料

溃疡性结肠炎是一种病程迁延、容易复发、较难治疗的疾病, 其机制涉及免疫异常, 是一种自体免疫性疾病, 并与变态反应及遗传因素等有关。免疫异常、氧自由基作用在炎症性肠病的发病机制中占有重要地位。当前中西医都无特效的药物, 但是研究证明单味中药对实验动物TNBS与乙醇诱发的结肠炎的病理生理过程有明显影响。

■创新盘点

以往中药对溃疡性结肠炎研究主要集中在临床用药观察疗效方面,由于溃疡性结肠炎的机制涉及免疫异常,是一种自体免疫性疾病,并与变态反应及遗传因素等有关,故本实验研究了番石榴叶对炎症性结肠炎的抗损伤保护作用,以及免疫异常与氧自由基在炎症性肠病的发病机制中的作用。

0.43 vs 3.15 ± 0.39 , $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), MPO活性(2240.78 ± 479.26 , 2078.42 ± 377.91 , 1748.85 ± 236.71 nkat/g vs 2695.37 ± 624.79 nkat/g $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 减少MDA含量(2.16 ± 0.41 , 1.97 ± 0.35 , 1.96 ± 0.30 , $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 提高SOD活性(3618.06 ± 538.44 , 3756.92 ± 577.45 , 4197.51 ± 375.74 nkat/g vs 2663.37 ± 603.79 , $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 降低TNF(2.65 ± 0.40 , 2.51 ± 0.47 , 2.21 ± 0.41 $\mu\text{g/L}$ vs 3.30 ± 0.63 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), IL-8(1.20 ± 0.33 , 1.05 ± 0.24 , 0.92 ± 0.13 $\mu\text{g/L}$ vs 1.53 ± 0.38 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), IL-10(39.36 ± 9.65 , 50.26 ± 11.32 , 59.68 ± 13.65 ng/L vs 30.74 ± 12.91 ng/L, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)水平,且与用药剂量呈一定量效关系。

结论: 番石榴叶提取物通过拮抗氧化、免疫调节、损伤修复作用缓解结肠炎大鼠炎症反应,减轻结肠损伤。

关键词: 番石榴叶提取物; 抗氧化作用; 调节免疫; 结肠炎; 大鼠

廖泽云, 李玉山, 姜锦林. 番石榴叶提取物对三硝基苯磺酸诱导大鼠结肠炎结肠组织的保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(1):69-71

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/69.asp>

0 引言

番石榴叶又名鸡矢茶,是桃金娘科植物番石榴的嫩叶,其性平味干涩,功用收敛止泻,主要成分含蒽萜苷、槲皮素、石榴酸、石榴苷、鞣酸及挥发油等^[1]。现代药理研究表明,番石榴叶具有抗菌、抗病毒作用^[2-3],且对消化系统有解痉、增强胃肠蠕动的作用^[4]。因番石榴叶具有收敛止泻作用,民间习用其嫩叶煎水口服治疗小儿腹泻。为了探讨番石榴叶对炎症性肠炎是否有抗损伤保护作用,我们通过建立大鼠结肠炎模型,用不同剂量番石榴叶灌胃给药,进行了相关实验研究,观察番石榴叶对炎症性肠炎的保护作用及其机制如下。

1 材料和方法

1.1 材料 番石榴叶水提取物:以下简称提取物(生药含量1 kg/L),选番石榴叶用水煎煮3次,过滤后浓缩成1 kg/L的浓度即得,由湖北民族学院附属医院中医系制剂室完成。2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)为美国Sigma公司产品;5-氨基水

杨酸(5-ASA)原料药由国怡药业有限公司提供;MPO, SOD, MDA检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;TNF, IL-8试剂盒由解放军总医院科技开发中心放免所提供;IL-10试剂盒由深圳晶美生物工程公司提供;Aeroset 09D05-01全自动生化分析仪(美国);TL-16G型高速冷冻离心机(上海实验仪器厂生产);GC-1200 r放射免疫计数器(中国安徽科大创新股份有限公司)。健康Wister大鼠,雌雄兼用,体质量250-270 g,由湖北省动物实验中心提供。

1.2 方法 大鼠禁食24 h后(饮水照常),将溶于500 mL/L乙醇的TNBS按100 mg/kg,体积0.25 mL/只,用导管(直径4 mm)经肛门插入结肠内约8 cm灌肠1次,建立结肠炎模型^[5]。实验设正常组、模型组、阳性药物对照组(5-ASA, 100 mg/kg)、不同剂量番石榴叶给药组(灌服番石榴剂量分别为200, 500, 800 mg/kg),从制备模型7 d后开始灌胃给药,每日1次,共14 d。正常组与模型组均给予等量生理盐水灌胃。实验完成后处死动物,参照文献[6]方法及标准评价CMDI,评分标准为:0 = 无损伤;1 = 轻度充血,水肿,表面光滑,无糜烂或溃疡;2 = 充血水肿,黏膜粗糙呈颗粒状,有糜烂或肠黏连;3 = 高度充血水肿,黏膜表面有坏死及溃疡形成,溃疡最大纵径<1 cm,肠壁增厚或表面有坏死及炎症;4 = 在3分基础上溃疡最大纵径>1 cm,或全肠壁坏死。结肠标本常规石蜡包埋,切片,HE染色,光镜观察。尾动脉采血放免法检测TNF, IL-8, IL-10。另取新鲜结肠组织,用预冷的生理盐水冲洗除去血液,滤纸吸干称质量,加9倍生理盐水,在低温(冰水)中用玻璃研磨器研磨制成100 mL/L的组织匀浆,高速离心取上清液低温(3℃)保存待测,MPO, MDA, SOD按试剂盒说明书进行。

统计学处理 实验数据采用SPSS for Windows 10.0软件进行t检验统计处理。

2 结果

2.1 病理学及炎症反应 模型组大鼠结肠黏膜充血水肿,大量炎性细胞浸润,肠壁增厚,黏膜表面有明显坏死及溃疡形成,腺体中杯状细胞减少。而不同剂量的番石榴叶提取物用药组以上病理组织表现明显缓解。CMDI, MPO活性在模型组大鼠升高,而不同剂量番石榴叶给药组(200, 500, 800 mg/kg)与5-ASA(100 mg/kg)灌胃不同程度降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),且番石榴叶给药组呈现一定量效关系(表1)。

■应用要点

随着深入研究中药对炎症性肠病的抗损伤保护作用,以及免疫异常与氧自由基在炎症性肠病的发病机制中的作用机制的明确,有可能开辟中西医结合治疗溃疡性结肠炎的一个有效的途径。

表 1 番石榴叶提取物对结肠炎大鼠炎症反应、氧自由基和免疫功能的影响 (mean ± SD, n = 10)

分组	mg/kg	CMDI	MPO(nkat/g)	MDA(μmol/g)	SOD(nkat/g)	TNF(μg/L)	IL-8(μg/L)	IL-10(ng/L)
正常组		0.00 ± 0.00	733.98 ± 117.86	1.73 ± 0.24	4505.90 ± 624.29	1.79 ± 0.31	0.59 ± 0.17	88.31 ± 16.62
模型组		3.15 ± 0.39 ^d	2695.37 ± 624.79 ^d	2.66 ± 0.65 ^d	2663.37 ± 603.79 ^d	3.30 ± 0.63 ^d	1.53 ± 0.38 ^d	30.74 ± 12.91 ^d
5-ASA组	100	1.71 ± 0.28 ^b	1729.01 ± 236.55 ^b	1.86 ± 0.49 ^b	4067.31 ± 746.48 ^b	2.19 ± 0.35 ^b	0.83 ± 0.16 ^b	67.32 ± 10.36 ^b
给药组	200	2.62 ± 0.47 ^a	2240.78 ± 479.26 ^a	2.16 ± 0.41 ^a	3618.06 ± 538.44 ^a	2.65 ± 0.40 ^a	1.20 ± 0.33 ^a	39.36 ± 9.65 ^a
	500	2.06 ± 0.54 ^b	2078.42 ± 377.91 ^b	1.97 ± 0.35 ^b	3756.92 ± 577.45 ^b	2.51 ± 0.47 ^b	1.05 ± 0.24 ^b	50.26 ± 11.32 ^b
	800	1.83 ± 0.43 ^b	1748.85 ± 236.71 ^b	1.96 ± 0.30 ^b	4197.51 ± 375.74 ^b	2.21 ± 0.41 ^b	0.92 ± 0.13 ^b	59.68 ± 13.65 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 模型组; ^dP<0.01 vs 对照组.

2.2 结肠炎大鼠氧自由基和免疫功能 与模型组比较, 不同剂量番石榴叶给药组(200, 500, 800 mg/kg)与5-ASA(100 mg/kg)灌胃均降低结肠组织中MDA含量, 升高SOD活性, 且番石榴叶给药组中、大剂量作用显著($P<0.01$, 表1). 与对照组比较, 模型组大鼠血清中TNF, IL-8水平明显升高, IL-10明显降低($P<0.01$); 经过2 wk的灌胃用药, 模型组大鼠血清TNF, IL-8水平降低, IL-10明显升高($P<0.05$, $P<0.01$, 表1).

3 讨论

TNBS与乙醇诱发大鼠结肠炎的主要机制为乙醇破坏结肠黏膜屏障, TNBS渗入结肠与大分子物质结合, 形成全抗原引起肠壁一系列免疫应答与炎症反应, 因其发病机制及病理表现与人类炎症性肠炎非常相似^[7]. 免疫异常、氧自由基作用在炎症性肠病的发病机制中占有重要地位. 本实验采用TNBS与乙醇诱发大鼠结肠炎模型后, 发现大鼠血清中的促炎因子与抗炎因子水平变化明显, 结肠组织中MDA含量明显升高、SOD活性降低, 证明了免疫异常与氧自由基在炎症性肠病的发病机制中起重要作用.

我们观察到, 番石榴叶组组织病理损伤程度明显缓解, 且呈一定剂量效应, 显示采用番石榴叶提取液灌胃用药可明显减轻模型组大鼠结肠损伤, 缓解炎症反应, 表现出抗炎、抗损伤的保护作用; 实验中番石榴叶提取液灌胃用药能降低结肠炎模型组大鼠代谢产生的脂质过氧化物MDA含量, 升高重要抗氧化酶SOD活性, 表现出抗氧化特性, 从而抑制结肠组织中的脂质过氧化反应, 保护组织细胞. 免疫异常在炎症性肠病的发病机制中起重要作用, 而细胞因子实质

上是维持免疫细胞功能协调运转, 相互联络的“信使”, 其促炎因子与抗炎因子间的失衡是导致结肠免疫损伤的主要因素, 实验结果显示, 番石榴叶提取物灌胃能明显降低模型组大鼠TNF, IL-8及升高IL-10水平, 足以表明其对免疫异常有一定调节恢复作用, 从而缓解结肠免疫损伤与炎症反应.

总之, 番石榴叶提取物通过免疫调节及抗脂质过氧化作用, 对大鼠结肠炎结肠损伤进行修复, 抑制结肠炎大鼠炎症反应, 对结肠炎具有抗损伤保护作用. 番石榴为野生植物资源, 果实富含蛋白质、维生素、糖类、非挥发性的有机酸、矿物质及芳香化合物等, 番石榴嫩叶可制茶, 常喝能清热解毒、防治肠炎和腹泻等^[8], 具有很高的营养食用价值和药用价值, 开发利用前景广阔.

4 参考文献

- 1 黄泰康, 丁志遵, 赵守训. 现代本草纲目. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 1843-1844
- 2 魏练波, 吕瑞和, 陈宝田. 番石榴叶体外抗轮状病毒的实验研究. 国外医学微生物分册 1996; 3: 3
- 3 蔡玲斐, 徐迎. 番石榴叶提取物对常见细菌的体外抗菌作用. 医药导报 2005; 24: 1095-1097
- 4 谢宗万, 余友岑. 全国中草药名鉴(上册). 北京: 人民卫生出版社, 1996: 882-887
- 5 Hibi T, Ogata H, Sakuraba A. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2002; 37: 409-417
- 6 梅俏, 于皆平, 许建明, 顶立. 褪黑素对结肠炎大鼠免疫功能的影响. 世界华人消化杂志 2002; 10: 193-196
- 7 Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, Panetta J, Morris CJ, Blake DR. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut* 1996; 39: 407-415
- 8 刘建林, 夏明忠, 袁颖. 番石榴的综合利用现状及发展前景. 中国林副特产 2005; 60-62

电编 张敏 编辑 潘伯荣

■同行评价

本文研究了番石榴叶提取物对三硝基苯磺酸诱导大鼠结肠炎结肠组织的保护作用, 有一定创新性.

丹参对急性胰腺炎患者血浆内皮素和P-选择素变化的影响

周晓娜, 胡静

■背景资料

近年来,有研究表明胰腺血液循环障碍可诱发AP和促使MAP发展成为SAP。在AP的发病过程中,胰腺微循环障碍作为一种持续的损伤机制贯穿于AP的整个发展过程。丹参因具有活血化淤、改善微循环的特点而被用于AP的治疗。

周晓娜, 胡静, 河北医科大学附属医院石家庄市第一医院消化内科 河北省石家庄市 050017

石家庄市科技发展项目, No. 051201443

通讯作者: 周晓娜, 050017, 河北省石家庄市范西路36号, 河北医科大学附属医院石家庄市第一医院消化内科. hbzhj@163.net
电话: 0311-86919593

收稿日期: 2006-09-09 接受日期: 2006-10-11

Influence of Salvia miltiorrhiza on the changes of plasma endothelin and P-selectin in patients with acute pancreatitis

Xiao-Na Zhou, Jing Hu

Xiao-Na Zhou, Jing Hu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shijiazhuang City, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Supported by the Science and Technology Development Foundation of Shijiazhuang City, No. 051201443

Correspondence to: Xiao-Na Zhou, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shijiazhuang City, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China. hbzhj@163.net

Received: 2006-09-09 Accepted: 2006-10-11

Abstract

AIM: To explore the changes of plasma endothelin and P-selectin as well as the effects of Salvia miltiorrhiza (SM) in patients with acute pancreatitis (AP).

METHODS: A total of 82 patients with acute pancreatitis were divided into group A ($n = 40$) and B ($n = 42$), treated with general method and SM, respectively. Another 20 normal individuals were used as normal controls. The levels of plasma endothelin (ET) and P-selectin were measured by radioimmunoassay.

RESULTS: The levels of ET and P-selectin in patients with severe acute pancreatitis (SAP) were significantly higher than those in the cases with mild acute pancreatitis (MAP) and normal controls (ET: 147.56 ± 10.65 ng/L vs 85.13 ± 9.47 , 52.27 ± 6.23 ng/L, $P < 0.01$; P-selectin: 85.32 ± 6.21 μ g/L vs 30.01 ± 4.82 , 10.26 ± 2.57 μ g/L, P

< 0.01), and the levels of ET and P-selectin were positively correlated in SAP ($r = 0.705$, $P < 0.01$). After treatment, the levels of ET and P-selectin in group B were obviously decreased as compared with those before treatment (ET: 69.77 ± 7.65 ng/L vs 100.54 ± 11.41 ng/L, $P < 0.01$; P-selectin: 4.07 ± 4.75 μ g/L vs 54.52 ± 9.79 μ g/L, $P < 0.01$). The average in-hospital time of group B was distinctly shorter than that of group A (9.76 ± 1.77 d vs 14.27 ± 2.55 d, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Endothelin and P-selectin may be involved in the pathogenesis of AP, and SM is effective in the treatment of AP.

Key Words: Pancreatitis; Endothelin; P-selectin; Salvia miltiorrhiza

Zhou XN, Hu J. Influence of Salvia miltiorrhiza on the changes of plasma endothelin and P-selectin in patients with acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(1):72-74

摘要

目的: 观察急性胰腺炎(AP)患者血浆内皮素(ET)和P-选择素的变化特点及丹参对其的影响。

方法: 将82例AP患者随机分为一般治疗组40例和丹参组42例,同时以健康体检者20例作对照组。A组用基础治疗, B组用基础治疗+丹参。采用放射免疫法分别测定血浆ET和P-选择素。

结果: 重症急性胰腺炎(SAP)组ET和P-选择素显著高于轻型急性胰腺炎(MAP)组和正常组(147.56 ± 10.65 ng/L vs 85.13 ± 9.47 , 52.27 ± 6.23 ng/L, $P < 0.01$; 85.32 ± 6.21 μ g/L vs 30.01 ± 4.82 , 10.26 ± 2.57 μ g/L, $P < 0.01$)。SAP组ET和P-选择素呈显著正相关($r = 0.705$, $P < 0.01$)。AP患者经一般治疗后ET和P-选择素的水平较治疗前差异无显著性($P > 0.05$)。丹参组治疗后较治疗前ET及P-选择素水平明显下降(69.77 ± 7.65 ng/L vs 100.54 ± 11.41 ng/L, $P < 0.01$; 4.07 ± 4.75 μ g/L vs 54.52 ± 9.79 μ g/L, $P < 0.01$),

平均住院日与一般治疗组相比明显缩短(9.76 ± 1.77 d vs 14.27 ± 2.55 d, $P < 0.01$).

结论: 血浆内皮素和P-选择素参与了AP的发病过程, 丹参对AP具有一定的治疗作用.

关键词: 胰腺炎; 内皮素; P-选择素; 丹参

周晓娜, 胡静. 丹参对急性胰腺炎患者血浆内皮素和P-选择素变化的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(1):72-74
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/72.asp

0 引言

急性胰腺炎(AP)的发生与发展不完全取决于胰酶的消化, 而与胰腺微循环障碍及炎性介质造成的多脏器损害有关. 在AP的发病过程中, 胰腺微循环障碍作为一种持续的损伤机制贯穿于AP的整个发展过程^[1-2]. 近年来, 胰腺微循环障碍在AP发病过程中的作用越来越受到重视^[3]. AP时胰腺血流的变化与胰腺炎的严重程度有关, 重型急性胰腺炎(SAP)时胰腺血流量明显降低, 在轻型胰腺炎(MAP)时, 早期胰腺血流量上升, 其后随着病情变化发展而降低, 故缺血是AP的始发和加重因子^[4]. 本实验测定了AP患者血浆内皮素(ET)和P-选择素水平的变化及丹参对其的治疗作用.

1 材料和方法

1.1 材料 本院住院患者82例, 符合我国AP的临床诊断标准^[5]. 其中男46例, 女36例, 年龄22-70岁. 全部病例以平行对照设计原理分为一般治疗组(A组)40例和丹参组(B组)42例, 同时以健康体检者20例作对照组(C组), 其中男11例, 女9例, 年龄26-60岁. 两组的病情严重程度经APACHE评分分别为 10.68 ± 2.01 , 11.49 ± 2.73 , 经 t 检验差异无显著性($P > 0.05$), 具有可比性. MAP组: 60例, 其中男31例, 女29例, 年龄22-68岁. SAP组: 22例, 其中男15例, 女7例, 年龄29-70岁.

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 所有病例均从肘正中静脉采血, 取空腹静脉血6 mL, 首次采血于患者住院后24 h内完成, 治疗7 d后重复采血.

1.2.2 治疗方法 一般治疗组: 住院后即给予禁食水、胃肠减压、 H_2 受体阻滞剂、止痛、抗感染及营养支持. 丹参组: 在上述治疗基础上, 丹参注射液250 mL, 每日2次静点.

1.2.3 检测方法 ET和P-选择素放射免疫试剂盒购自北京北方生物技术研究所, 按试剂盒说明

表 1 入院24 h内各组患者血浆ET和P-选择素的测定结果(mean $\pm$ SD)

分组	n	ET(ng/L)	P-选择素(μ g/L)
N组	20	52.27 ± 6.23	10.26 ± 2.57
MAP组	60	85.13 ± 9.47^b	30.01 ± 4.82^b
SAP组	22	147.56 ± 10.65^{bd}	85.32 ± 6.21^{bd}

^b $P < 0.01$ vs N组; ^d $P < 0.01$ vs MAP组.

表 2 治疗前后患者血浆ET和P-选择素的测定结果(mean $\pm$ SD)

分组	ET (ng/L)	P-选择素 (μ g/L)	住院日 (d)
一般治疗组			14.27 ± 2.55
治疗前	101.43 ± 12.54	50.14 ± 10.65	
治疗后	95.74 ± 11.78	45.75 ± 10.77	
丹参组			9.76 ± 1.77^d
治疗前	100.54 ± 11.41	54.52 ± 9.79	
治疗后	69.77 ± 7.65^b	4.07 ± 4.75^b	

^b $P < 0.01$ vs 本组治疗前; ^d $P < 0.01$ vs 一般治疗组.

操作.

统计学处理 所有数据均用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 采用 t 检验、直线相关分析.

2 结果

2.1 急性胰腺炎时患者血浆ET和P-选择素的变化 急性胰腺炎时血浆ET和P-选择素较正常组(C组)明显升高($P < 0.01$); 增高程度与急性胰腺炎病情程度有关. SAP组ET和P-选择素显著高于MAP组和正常组($P < 0.01$, 表1). SAP组ET和P-选择素呈显著正相关($r = 0.705$, $P < 0.01$).

2.2 一般治疗组及丹参组治疗急性胰腺炎前后患者血浆ET和P-选择素的变化 急性胰腺炎治疗后7 d, 一般治疗组治疗后血浆ET和P-选择素的水平与治疗前比较差异无显著性($P > 0.05$); 丹参治疗组治疗后血浆ET和P-选择素的水平与治疗前比较均明显下降($P < 0.01$, 表2).

3 讨论

ET主要由血管内皮细胞分泌释放的血管活性多肽, 具有强烈收缩血管作用, 是迄今所知最强的血管收缩物质, 其血管收缩效应发生缓慢而作用持久. 夏时海 *et al*^[6]于2001年发现急性出血坏死性胰腺炎大鼠ET明显升高, 大量临床实验也证实AP患者较健康人血浆内皮素水平有显著增

■创新盘点

本文解释了丹参对急性胰腺炎治疗的部分机制, 为临床治疗急性胰腺炎提供了较为有效的治疗方法.

■同行评价

丹参对急性胰腺炎患者血浆内皮素和P-选择素变化的影响,解释了丹参对急性胰腺炎治疗的部分机制,在临床中具有实用价值。文章目的明确,方法清晰,数据可靠,可读性强。

高^[7]。Foitzik *et al*^[8]发现,ET使水肿性胰腺炎小鼠血管收缩、胰腺毛细血管血流量减低,将过度表达ET的转基因鼠和同窝普通鼠制作的SAP模型比较,前者的胰腺毛细血管血流量更低,胰腺细胞坏死更多,说明ET是促进微循环衰竭,使水肿性胰腺炎发展成为坏死性胰腺炎的重要因子。SAP时ET-1 mRNA高表达导致ET-1过度生成并与胰腺损伤有关,丹参能抑制胰腺ET-1 mRNA的过度表达,从而对胰腺起保护作用^[9]。ET受体拮抗剂可以减轻缺血再灌注损伤,改善微循环^[10]。本研究结果表明,MAP患者血浆ET轻度增加,而SAP患者显著增高2-3倍,并远高于MAP患者。AP患者ET含量增加,尤其是SAP患者增高更明显。可能为ET一方面通过其缩血管作用保证其他脏器的血供,另一方面,引起胰腺血管收缩,胰腺组织缺血缺氧,导致出血坏死。

胰腺微循环紊乱是发病的始动因素之一。作为全身性的炎症反应性疾病,细胞因子、细胞黏附分子、氧自由基在AP病理生理机制中的作用日益受到学术界的重视。P-选择素是细胞黏附分子家族中的一员,介导炎症细胞与内皮细胞以及活化的血小板与单核细胞、中性粒细胞的黏附,为特异性的血小板活化标志物。选择素很有可能在引发AP组织损害中起关键作用^[11]。本研究结果表明,P-选择素与AP患者病情程度密切相关,监测P-选择素含量有助于AP患者病情轻重的判别。在AP时,不仅ET产生增加,NO合成减少导致胰血管持续性收缩,甚至痉挛,使胰组织严重缺血坏死,而且与血小板活化、聚集及血栓形成是分不开的。并且证实ET和P-选择素呈正相关关系,共同参与了AP缺血的病理生理过程。

丹参具有活血化淤、抗凝、抑制血小板黏附、聚集^[12]和钙拮抗剂作用,有效降低细胞聚集指数,调节血液黏稠度,改善血液流变性^[13],提高心肌抗缺氧能力,提高心肌收缩力,从而增加胰腺血流量,改善胰腺缺血情况,并抑制溶酶体酶

释放和中性粒细胞趋化作用,防止AP时微循环障碍的进一步发展^[14]。AP患者经丹参治疗后血浆ET和P-选择素明显下降,这可能是其发挥治疗作用的另一方面的机制。

4 参考文献

- 1 刘全芳, 李少华. 生长抑素类似物对急性胰腺炎大鼠胰腺微血流的影响及作用. 微循环学杂志 1996; 6: 3-5
- 2 王兴鹏, 王国良, 巫协宁, 袁耀宗, 徐家裕. 急性胰腺炎血循环障碍的意义. 世界华人消化杂志 1997; 5: 55-56
- 3 Schmidt J, Ebeling D, Ryschich E, Werner J, Gebhard MM, Klar E. Pancreatic capillary blood flow in an improved model of necrotizing pancreatitis in the rat. *J Surg Res* 2002; 106: 335-341
- 4 Halonen KI, Pettila V, Leppaniemi AK, Kempainen EA, Puolakkainen PA, Haapiainen RK. Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med* 2002; 30: 1274-1279
- 5 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). 中华消化杂志 2004; 24: 190-192
- 6 夏时海, 赵晓晏, 郭萍. 急性出血坏死性胰腺炎胰腺血循环障碍的实验研究. 重庆医学 2001; 30: 415-417
- 7 Zeng XH, Zhu SQ, Zhang XM, Luo WJ, Li SW. Plasma endothelin and nitric oxide levels in patients with acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 140-142
- 8 Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin mediates local and systemic disease sequelae in severe experimental pancreatitis. *Pancreas* 2001; 22: 248-254
- 9 张莹, 石承先, 黄平, 任娟娟, 李玉祥. 丹参对重症急性胰腺炎内皮素-1mRNA的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 35-38
- 10 Witzigmann H, Ludwig S, Armann B, Gabel G, Teupser D, Kratzsch J, Pietsch UC, Tannapfel A, Geissler F, Hauss J, Uhlmann D. Endothelin(A) receptor blockade reduces ischemia/reperfusion injury in pig pancreas transplantation. *Ann Surg* 2003; 238: 264-274
- 11 Lundberg AH, Granger DN, Russell J, Sabek O, Henry J, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Quantitative measurement of P- and E-selectin adhesion molecules in acute pancreatitis: correlation with distant organ injury. *Ann Surg* 2000; 231: 213-222
- 12 李鲁扬, 唐占府, 孔令钧. 复方丹参注射液对冠心病患者血小板活化率的影响. 山东中医杂志 2001; 20: 204-205
- 13 张喜平, 李志军. 丹参治疗急性胰腺炎的机制. 世界华人消化杂志 2005; 17: 2122-2124
- 14 赵晓晏, 夏时海, 郭萍, 周渝. 丹参治疗重症急性胰腺炎的血液流变学及其相关指标的实验研究. 微循环学杂志 2001; 11: 31-34

电编 张敏 编辑 王晓瑜

血小板计数对细菌性肝脓肿患者预后判定的临床价值

张彩凤, 韩宇, 刘竹娥, 夏永华

张彩凤, 韩宇, 刘竹娥, 夏永华, 新乡医学院第一附属医院消化科 河南省卫辉市 453100

通讯作者: 张彩凤, 453100, 河南省卫辉市, 新乡医学院第一附属医院消化科. zhangcaifeng666@163.com
电话: 0373-4402216

收稿日期: 2006-09-30 接受日期: 2006-10-18

Value of platelet count in the prognosis of patients with pyogenic liver abscess

Cai-Feng Zhang, Yu Han, Zhu-E Liu, Yong-Hua Xia

Cai-Feng Zhang, Yu Han, Zhu-E Liu, Yong-Hua Xia, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui 453100, He'nan Province, China

Correspondence to: Cai-Feng Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui 453100, He'nan Province, China. zhangcaifeng666@163.com

Received: 2006-09-30 Accepted: 2006-10-18

Abstract

AIM: To study the relationship between platelet count and the prognosis of patients with pyogenic liver abscess.

METHODS: A total of patients with pyogenic liver abscess were diagnosed by computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI) and liver punctures, and the average focus size was 6.54 cm in diameter. Blood routine examination was performed everyday, combined with B-ultrasonography every three days. The relationship between the dynamic changes of platelet count and the prognosis of pyogenic liver abscess patients was analyzed.

RESULTS: Within one week, 43 (38.39%) patients were found with maximal platelet count more than or equal to $400 \times 10^9/L$, and 22 patients (19.64%) with platelet count less than $400 \times 10^9/L$. More than one week, 29 patients (25.89%) were with maximal platelet count more than or equal to $400 \times 10^9/L$, 18 patients (16.07%) with platelet count less than $400 \times 10^9/L$. Thrombocytosis occurred quickly in the patients in hospital less than one week, whose maximal platelet count

was more than or equal to $400 \times 10^9/L$, and their clinical symptoms were improved remarkably as compared with those of patients in hospital more than one week, with maximal platelet count less than $400 \times 10^9/L$ ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Pyogenic liver abscess patients, in whom thrombocytosis occurs in short time, have a favorable prognosis. Blood count is an important indicator for the prognosis of Pyogenic liver abscess.

Key Words: Thrombocytosis; Pyogenic liver abscess; Prognosis

Zhang CF, Han Y, Liu ZE, Xia YH. Value of platelet count in the prognosis of patients with pyogenic liver abscess. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(1):75-77

摘要

目的: 研究血小板计数对细菌性肝脓肿患者预后判定的临床价值。

方法: 经肝脏CT或MRI平扫加增强和肝脏穿刺确诊的细菌性肝脓肿(平均直径为6.54 cm)患者($n = 112$), 入院后每天1次血常规, 3天1次B超, 应用血小板的动态检测研究细菌性肝脓肿患者的预后。

结果: 血小板计数1 wk内达到最高值 $\geq 400 \times 10^9/L$ 共43(38.39%)例, $< 400 \times 10^9/L$ 共22(19.64%)例, > 1 wk达到最高值 $\geq 400 \times 10^9/L$ 共29(25.89%)例, $< 400 \times 10^9/L$ 共18(16.07%)例。血小板计数1 wk内达到高峰值的患者预后明显优于 > 1 wk的患者($P < 0.05$), $\geq 400 \times 10^9/L$ 的患者预后明显优于 $< 400 \times 10^9/L$ 的患者($P < 0.05$)。

结论: 血小板计数可作为衡量细菌性肝脓肿预后的重要指标之一。

关键词: 细菌性肝脓肿; 血小板; 预后

张彩凤, 韩宇, 刘竹娥, 夏永华. 血小板计数对细菌性肝脓肿患者预后判定的临床价值. 世界华人消化杂志 2007;15(1):75-77
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/75.asp>

■背景资料

本文作者在临床工作中发现许多细菌性肝脓肿患者会出现血小板的改变, 就收集了相关资料, 并进行前瞻性的研究。目前关于血小板和消化系统疾病的研究较少, 而且研究方向单一, 主要在治疗上, 本文重点是把血小板和细菌性肝脓肿联系起来, 利用血小板的改变了解患者的预后。

■同行评价

本研究的创意新颖,有实际意义,希望作者能在后续研究中检测细菌性肝脓肿患者血清中某些细胞因子(IL-1, IL-8, IFN-5等),如确实升高,将使该文章更完整,更具有科学性。

表 1 血小板计数在1 wk内达到高峰值的细菌性肝脓肿患者的预后

血小板的最高值($\times 10^9/L$)	住院时间(d)	退热时间(d)	肝脓肿愈合时间(d)	临床明显改善时间(d)
7 d内 ≥ 400 ($n = 43$) ^a	6.97 $\pm$ 1.22	5.23 $\pm$ 1.16	5.46 $\pm$ 0.87	3.25 $\pm$ 1.36
7 d内 < 400 ($n = 22$) ^c	15.3 $\pm$ 3.96	13.4 $\pm$ 2.53	14.6 $\pm$ 1.57	7.56 $\pm$ 2.35
7 d后 ≥ 400 ($n = 29$) ^e	9.11 $\pm$ 1.27	7.71 $\pm$ 1.12	7.78 $\pm$ 1.34	5.12 $\pm$ 0.95
7 d后 < 400 ($n = 18$)	18.36 $\pm$ 3.25	15.37 $\pm$ 2.64	16.68 $\pm$ 1.75	9.78 $\pm$ 3.21

^a $P < 0.05$ vs 7 d内 $< 400 \times 10^9/L$ 和7 d后 $\geq 400 \times 10^9/L$ 患者; ^c $P < 0.05$ vs 7 d后 $\geq 400 \times 10^9/L$ 患者; ^e $P < 0.05$ vs 7 d后 $< 400 \times 10^9/L$ 患者。

0 引言

目前,国内外学者对细菌性肝脓肿患者预后,特别是关于预后判定的临床指标研究较少,他们的研究主要集中在治疗方法及病原学上。本研究重在从血小板的动态检测来了解细菌性肝脓肿患者的预后。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-06/2006-06我院消化科细菌性肝脓肿患者112例(经肝脏CT或MRI平扫加增强和肝脏穿刺确诊的一个细菌性肝脓肿(平均直径为6.54 cm),男50例,女62例,15-78(平均49.5)岁。

1.2 方法

1.2.1 用药方法 入院后根据经验使用甲硝唑(100 mL, iv, bid)、左氧氟沙星(0.2 g, iv, bid),肝功受损患者(ALT > 1333.6 nkat/L),加保肝药,禁用影响血小板药物。

1.2.2 观察指标 入院后每天一次血常规,3 d一次B超,记录预后(住院时间、肝脓肿愈合时间、退热时间、临床症状明显改善时间)及血小板的改变。

统计学处理 采用SPSS 10.0软件包进行数据处理,实验结果以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,各组间比较用 t 检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

住院期间通过对血小板计数的动态观察,血小板计数1 wk内达到最高值 $\geq 400 \times 10^9/L$ 43(38.39%)例, $< 400 \times 10^9/L$ 22(19.64%)例, > 1 wk达到最高值 $\geq 400 \times 10^9/L$ 29(25.89%)例, $< 400 \times 10^9/L$ 18(16.07%)例。血小板计数1 wk内达到高峰值的患者预后明显优于 > 1 wk的患者($P < 0.05$), $\geq 400 \times 10^9/L$ 的患者预后明显优于 $< 400 \times 10^9/L$ 的患者($P < 0.05$, 表1)。

3 讨论

肝脏和骨髓是全身性感染常受累的器官,细菌

性肝脓肿是肝脏受累的表现,骨髓受累的具体表现在于外周血中出现有形成分异常,尤其是血小板对细菌毒素较为敏感^[15]。血小板在感染性疾病中可能起着重要作用,他涉及血管舒张以及血管收缩性物质的释放,可引起或加重器官功能障碍的潜在可能^[8,10-11]。本研究通过检测血小板计数了解细菌性肝脓肿患者预后。

感染时机体受到细菌毒素刺激后通过单核巨噬细胞系统激活生化免疫途经,产生TNF,进一步刺激IL-1、IL-8、IFN-5、血小板激活因子、前列腺素等具有生物效应物质,使机体处于应激状态,血小板释放增加^[1-5,9,16],同时,血小板重新分布。继发性血小板增多的原因包括手术、感染、肿瘤和慢性炎症等,可能与骨髓功能紊乱、巨核细胞、血小板生成素(TPO)、髓外造血系统及感染时IL-1、IL-6合成增加相关^[2-6,11]。

本研究通过对细菌性肝脓肿患者血小板计数的动态检测,发现46(41.1%)例患者住院前1 wk内血小板峰值 $> 400 \times 10^9/L$ 的患者住院时间、退热时间、肝脓肿愈合时间和临床症状改善时间都明显短于迟缓升高患者,住院费用也较低,提示细菌性肝脓肿患者血小板计数在短期内迅速升高,预后较好,否则预后较差。细菌性肝脓肿患者在发病过程中,血小板计数可能先出现一个逐渐降低的过程,而后出现高峰期,继而恢复正常,可能与骨髓功能紊乱、血小板的重新分布、血小板生成素(TPO)、髓外造血系统及IL-6等炎症因子的作用相关^[3,12]。若细菌性肝脓肿患者血小板计数迅速达到峰值,提示机体免疫功能较好,对炎症刺激的反应较好,预后好。本研究提示血小板能够比较正确、敏感反映细菌性肝脓肿患者的病情与预后,可作为1个监测指标。对血小板在短期内升高不明显甚至降低的患者,给予增强机体免疫力药物,可能会缩短患者的住院时间、退热时间、肝脓肿

的愈合时间及临床症状的改善时间, 这可以作为将来的一个研究方向。

在本研究中, 没有发现细菌性肝脓肿患者继发血小板增多症引起血栓形成等并发症, 不需特殊处理, 国内一些学者^[1,6,14]也持相同观点。但若发现血小板计数持续升高不降2 mo以上, 可能合并其他疾病, 应进一步行相关检查^[4,7,13]。

4 参考文献

- 1 Andrew I, Schafer, M.D. Thrombocytosis. *N Engl J Med* 2004; 350: 1211-1219
- 2 Mesa RA, Hanson CA, Li CY, Yoon SY, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Diagnostic and prognostic value of bone marrow angiogenesis and megakaryocyte c-Mpl expression in essential thrombocythemia. *Blood* 2002; 99: 4131-4137
- 3 Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, Theurl I, Widder W, Molnar C, Ludwiczek O, Atkins MB, Mier JW, Tilg H. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001; 98: 2720-2725
- 4 Teofili L, Pierconti F, Di Febo A, Maggiano N, Vianelli N, Ascani S, Rossi E, Pileri S, Leone G, Larocca LM, De Stefano V. The expression pattern of c-mpl in megakaryocytes correlates with thrombotic risk in essential thrombocythemia. *Blood* 2002; 100: 714-717
- 5 肖文秀, 赵祥文, 黄健宝, 胥志跃. 急性感染患儿危重病例评分与血小板数量关系. *小儿急救医学* 2002; 9: 151-152
- 6 曹兰芳, 徐凌云, 李琳, 陆伟蓉. 56例小儿继发性血小板增多症的临床分析. *中国当代儿科杂志* 2001; 3: 413-414
- 7 陈德昌, 李红江, 毛居卫, 杨兴易. 血小板及骨髓象变化在危重病临床监测中的意义. *中华急诊医学杂志* 2002; 11: 40-42
- 8 王洪霞, 刘健. 血小板在脓毒症中的作用. *医学综述* 2005; 11: 455-456
- 9 万建华, 赵金满, 宋建. 细菌性肝脓肿致病菌及耐药性分析138例. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1367-1369
- 10 Akca S, Haji-Michael P, de Mendonca A, Suter P, Levi M, Vincent JL. Time course of platelet counts in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002; 30: 753-756
- 11 Ishiguro A, Suzuki Y, Mito M, Shimbo T, Matsubara K, Kato T, Miyazaki H. Elevation of serum thrombopoietin precedes thrombocytosis in acute infections. *Br J Haematol* 2002; 116: 612-618
- 12 Jun DW, Moon JY, Baeg SH, Choi HS, Sohn JH, Lee OY, Yoon BC, Lee MH, Lee DH, Kee CS. A clinical study of pyogenic liver abscess at two different local hospitals. *Korean J Hepatol* 2005; 11: 250-260
- 13 Chang CM, Ko WC, Lee HC, Chen YM, Chuang YC. *Klebsiella pneumoniae* psoas abscess: predominance in diabetic patients and grave prognosis in gas-forming cases. *J Microbiol Immunol Infect* 2001; 34: 201-206
- 14 Lee CJ, Jung DS, Jung SH, Baik JH, Lee JH, Cho YR, Go BS, Lee SW, Han SY, Lee DH. Comparison of liver abscess between diabetic patients and non-diabetic patients. *Korean J Hepatol* 2005; 11: 339-349
- 15 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: 392-397
- 16 何云, 王宇明, 何燕, 袁凤仪, 丁健. 血小板活化因子对体外培养肝细胞的作用. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 894-895

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息。(世界胃肠病学杂志社 2007-01-08)

肝后腔静脉成形术行原位肝移植103例

王 轩, 陆 雷, 张 斌, 李增才, 郑以山, 许正昌

■背景资料

肝移植已被公认为是治疗终末期肝病的最有效方法, 但肝移植手术操作难度大, 对术者技术要求高, 是影响肝移植手术推广的主要因素之一。

王轩, 陆雷, 张斌, 李增才, 郑以山, 许正昌, 解放军81医院肝移植中心 江苏省南京市 210002

通讯作者: 王轩, 210002, 江苏省南京市杨公井34标34号, 解放军81医院肝移植中心. wangxucn2002@hotmail.com
电话: 025-80864033 传真: 025-84458291
收稿日期: 2006-09-28 接受日期: 2006-10-26

Suprahepatic venacavaplasty in liver transplantation: an analysis of 103 cases

Xuan Wang, Lei Lu, Bin Zhang, Zeng-Cai Li, Yi-San Zhen, Zheng-Chang Xu

Xuan Wang, Lei Lu, Bin Zhang, Zeng-Cai Li, Yi-San Zhen, Zheng-Chang Xu, Liver Transplantation Center, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xuan Wang, Liver Transplantation Center, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. wangxucn2002@hotmail.com
Received: 2006-09-28 Accepted: 2006-10-26

Abstract

AIM: To explore the values of suprahepatic venacavaplasty (cavaplasty) in liver transplantation.

METHODS: The new orthotopic liver transplantation procedure combined with cavaplasty was conducted in 103 patients.

RESULTS: There were no perioperative deaths in this study. The median operative and anhepatic-phase time in cavaplasty group (6.8 ± 0.8 h and 52.6 ± 14.5 min, respectively) were significantly shorter than those in classic and modified piggyback groups (7.4 ± 0.6 h, 86.5 ± 7.1 min; 7.9 ± 0.6 h, 78.4 ± 7.94 min) reported recently by other data, and blood loss was also less in cavaplasty group (2960 ± 1120 mL) than those in latter two groups (4662 ± 913 mL; 4441 ± 1072 mL). Post-operative acute renal failure occurred in 30 cases (29.1%), similar to that in classic group but higher than that in modified piggyback group. All the patients with acute renal failure recovered within 3 to 4 weeks.

CONCLUSION: Cavaplasty can simplify the

resection procedure of the diseased liver and implantation of new liver, and reduce the operative time and blood loss during transplantation process, indicating that cavaplasty is safe, and should be clinically recommended.

Key Words: Orthotopic liver transplantation; Suprahepatic venacavaplasty; Piggyback transplantation

Wang X, Lu L, Zhang B, Li ZC, Zhen YS, Xu ZC. Suprahepatic venacavaplasty in liver transplantation: an analysis of 103 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):78-81

摘要

目的: 探讨肝移植新术式肝后腔静脉成形术在原位肝移植中的应用价值。

方法: 应用改良肝移植新术式肝后腔静脉成形术行原位肝移植103例, 观察其手术所用时间、无肝期、术中出血量及并发症等。

结果: 本组无1例发生围手术期死亡。肝后腔静脉成形术手术所用时间及无肝期(6.8 ± 0.8 h, 52.6 ± 14.5 min)显著短于同期报告资料经典式肝移植(7.4 ± 0.6 h, 86.5 ± 7.1 min)以及改良背驮式肝移植(7.9 ± 0.6 h, 78.4 ± 7.94 min)。术中出血量(2960 ± 1120 mL)也显著少于改良背驮式(4662 ± 913 mL)和经典式肝移植(4441 ± 1072 mL)。肝后腔静脉成形术后肾功能不全发生率为29.1%(30/103), 与经典式肝移植相近, 比改良背驮式高, 但均能在术后3-4 wk内恢复正常。

结论: 肝移植新术式肝后腔静脉成形术能简化病肝切除和新肝植入的手术操作, 缩短手术时间, 减少术中出血, 值得临床进一步推广应用。

关键词: 肝移植; 肝后腔静脉成形术; 背驮式

王轩, 陆雷, 张斌, 李增才, 郑以山, 许正昌. 肝后腔静脉成形术行原位肝移植103例. *世界华人消化杂志* 2007;15(1):78-81

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/78.asp>

0 引言

随着肝脏移植技术的日渐成熟, 肝移植已成为治疗良性终末期肝病及早中期肝癌的最有效方法^[1-3]。目前肝移植手术方式虽经多种改良, 但临床最常用的肝移植手术方式仍主要为经典式^[4]和改良背驮式^[5]二种, 两者均有手术操作复杂、耗时较长的缺点。自2003-04/2006-05我院移植中心应用Wu *et al*^[6]改进的腔静脉成形术行同种异体原位全肝移植103例, 效果满意, 现总结报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 患者103例, 男性89例, 女性14例, 年龄21-69(平均46.8)岁。原发性肝癌合并肝硬化53例, 肝炎后肝硬化42例, 慢性重型肝炎8例。7例有脾切除及门奇断流手术史, 9例有肝癌手术切除史。肝功能分级: Child-Pugh A级8例, B级19例, C级76例。

1.2 方法

1.2.1 供肝切取与修整 供肝采用单独肝脏灌洗切取或腹内脏器联合灌洗切除法。供体主动脉和肠系膜上静脉插管、UW液灌注后快速获取肝肾。供肝平均热缺血时间为 4.9 ± 3.1 min, 冷缺血时间为 8.5 ± 3.8 h。供受体ABO血型相同或相容。供肝修整后, 沿供肝下腔静脉后壁正中自上向下剪开, 长度约4-5 cm备用。

1.2.2 病肝切除 第一肝门及肝周韧带的游离同经典肝移植。近第一肝门处离断门静脉, 用下腔静脉阻断钳分别阻断肝下下腔静脉及肝上下腔静脉, 等待病人血压平稳后, 沿下腔静脉由下向上分离结扎部分肝短静脉, 用剪刀贴病肝将病肝从下腔静脉前壁剪下, 贯通三支肝静脉开口, 修剪并适当扩大下腔静脉前壁开口, 形成一宽大的倒“三角形”开口, 使其与供肝修整时形成的开口相匹配, 同时检查并修补下腔静脉前壁破损处。用三根3-0 prolene分别从三个角将供受体下腔静脉对应部分血管壁固定, 按顺序连续缝合腔静脉的三个边。门静脉, 肝动脉及胆道重建与经典肝移植相同。

统计学处理 采用SPSS11.0软件进行统计学处理。计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差别有显著性意义。

2 结果

应用肝后腔静脉成形术连续行人同种异体肝移

植术103例, 无围手术期死亡。术后发生胆漏2例, 经积极处理后痊愈。术中采用静脉转流2例, 余均未转流。手术所用时间、无肝期、术中出血量(表1)与同期采用经典原位肝移植及改良背驮式肝移植报告资料^[7]相比, 有显著性差别($P < 0.01$)。术后无1例发生血管并发症, 肾功能损害发生30例, 与经典肝移植相似, 比改良背驮式肝移植高, 但肾功能损害均能在3-4 wk内恢复。

3 讨论

经典式和改良背驮式肝移植是目前临床应用最广的二种肝脏移植术式^[8]。将肝后下腔静脉连同病肝整块切除的经典式肝移植具有切除范围广, 切除肿瘤完全的优点, 也是以往应用较多的一种肝移植术式。但由于他在术中需要阻断下腔静脉血液的回流, 使无肝期血流动力学发生显著变化, 同时在将肝后下腔静脉从后腹膜游离出时, 创面大, 出血多, 并易损伤肾上腺静脉致顽固性大出血。因而经典式肝移植的应用受到一定程度限制^[9]。针对其缺点, Calne在1968年首先提出不需要阻断下腔静脉的背驮式肝移植, 并在1989年由Tzakis *et al*^[10]将其成功应用于成人肝移植。由于背驮式肝移植保留了受体肝后下腔静脉, 具有术中不阻断下腔静脉血液回流, 血流动力学稳定, 对肾功能影响较小, 出血相对较少这一优点, 近年来该术式被广泛应用于临床。但背驮式肝移植也有其明显不足之处, (1)该术式在切除病肝时需要将肝后下腔静脉与病肝完全分离, 结扎所有肝短血管, 手术难度相对大, 所需时间较长; (2)血管重建需要在部分阻断的下腔静脉上进行, 手术操作相对较为困难; (3)由于其流出道重建的特殊性, 移植术后较易出现流出道梗阻的问题^[11-13]。为解决这一问题, 近年来许多学者提出改良背驮式肝移植, 即采用将三支肝静脉整形后与供肝腔静脉吻合的方式^[14]。但由于三支肝静脉不在同一水平面, 整形技术要求较高, 技术欠缺易形成共同开口过长或扭曲, 而且手术操作在供肝与膈下这一狭窄区域进行, 血管缝合较为困难, 因此改良背驮式肝移植手术难度较大, 也并不能完全杜绝肝静脉回流不畅的问题。而由Wu *et al*^[6]创建的肝后腔静脉成形肝移植术, 在保留经典式和背驮式肝移植优点的基础上, 大大简化了肝移植手术操作难度, 同时又减少了肝移植并发症的发生。肝后腔静脉成形肝移植

■应用要点

腔静脉成形肝移植术将传统的经典式和背驮式肝移植两种术式的优点结合在一起, 既降低了手术的难度、缩短了手术时间, 又减少了术中出血, 同时还不增加术中及术后并发症的发生, 值得临床进一步推广应用。

同行评价

本文报道了103例行肝后腔静脉成型术的原位肝移植,是国内报告病例数最多的一组病例。该文还与经典原位肝移植和改良背驮肝移植进行了对比分析,肝后腔静脉成型术具有简化肝移植手术过程,缩短手术时间,降低了肝脏流出道梗阻发生率等优点。该论文具有临床实用性,可读性较好,对我国肝移植的临床实践具有一定的科学价值。

表 1 肝移植三种不同术式手术资料比较 (mean $\pm$ SD)

手术方式	n	手术时间 (h)	无肝期 (min)	术中出血 (mL)	移植后相关肾衰 (n) ¹	血管并发症 (n)
腔静脉成形	103	6.8 $\pm$ 0.8	52.6 $\pm$ 14.5	2960 $\pm$ 1120	30	0
改良背驮式	37	7.9 $\pm$ 0.6 ^a	78.4 $\pm$ 7.9 ^a	4662 $\pm$ 913 ^a	7	4
经典式	77	7.4 $\pm$ 0.6 ^a	86.5 $\pm$ 7.1 ^b	4441 $\pm$ 1072 ^a	22	2

^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$ vs 腔静脉成形组。¹移植相关性肾衰指术前肾功能正常者术后血肌酐 $\geq 132 \mu\text{mol/L}$ 和或血尿素氮 $\geq 18 \text{ mmol/L}$, 术前肾功能不正常者, 术后血清肌酐或血尿素氮增加50%以上。

术具有以下特点: (1)病肝切除时不需逐一结扎第三肝门所有肝短静脉及肾上腺静脉,从而降低手术切除病肝难度,病肝切除后,在直视及无血状态下逐一缝扎保留的下腔静脉壁破口,使病肝切除变得较为容易,手术时间缩短;(2)手术保留受体肝后下腔静脉,从而减少了手术创面和术中出血,又同时不需要行肝下下腔静脉吻合,缩短了腔静脉吻合时间,即缩短了肝移植手术时间;(3)受体腔静脉前壁经整形而形成的宽大的倒“三角形”开口与供肝下腔静脉后壁缺口吻合既保证移植肝流出道顺畅,又使得在植入新肝时原来较为困难的腔静脉吻合变得较为容易。由于该术式的上述特点,使得肝移植手术难度大大降低,同时又缩短了手术时间及无肝期,术中出血和输血量均有明显下降。本组103例平均手术时间及无肝期分别为 $6.8 \pm 0.8 \text{ h}$ 和 $52.6 \pm 14.5 \text{ min}$,与同期报告数据^[3]相比,有显著性差别。此外,由于该术式在切除病肝时是将病肝连同部分腔静脉前壁一起切除,因此,此种术式特别适合于再次肝移植。当然该术式仍存在切除病肝时需要将腔静脉阻断这一缺点,术中对麻醉要求相对较高,但实践证明,只要患者术前心肺功能正常,术中应用适当的血管活性药物,维持适度的血压,患者完全能耐受1-2 h腔静脉完全阻断时间。而且术后发生的肾功能损害也是一过性的^[15],经过积极治疗及适当调整抗排斥药物用量,绝大部分患者肾功能均能在短时间内恢复正常。本组103例患者中绝大多数(101/103)均能耐受下腔静脉完全阻断,未采用静脉转流,仅有2例因术前已有严重肾功能损害,术中采用静脉转流。移植术后移植肝相关肾功能损害发生率与经典式肝移植术后发生率相当,比改良背驮式高,但术后所改发生的30例肾功能损害经治疗后肌酐均能于术后3-4 wk内恢复到正常值以下,与相关资料相比,并没有显著增加其他术后并发症。由此可见,肝后腔静脉成形术既降低了手术难度,又缩短了手术时间,减

少术中出血,是一种值得临床推广的新术式。

参考文献

- Blum HE. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7391-7400
- Marsh JW, Geller DA, Finkelstein SD, Donaldson JB, Dvorchik I. Role of liver transplantation for hepatobiliary malignant disorders. *Lancet Oncol* 2004; 5: 480-488
- Gerbes AL, Gulberg V. Progress in treatment of massive ascites and hepatorenal syndrome. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 516-519
- Remiszewski P, Zieniewicz K, Krawczyk M. Early results of orthotopic liver transplantations using the technique of inferior vena cava anastomosis. *Transplant Proc* 2006; 38: 237-239
- Wang HZ, Dong JH, Wang SG, Bie P, Cai JX, Lu Q. Modified hepatic outflow tract reconstruction in piggyback liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 206-210
- Wu YM, Voigt M, Rayhill S, Katz D, Chenhsu RY, Schmidt W, Miller R, Mitros F, Labrecque D. Suprahepatic venacavaplasty (cavaplasty) with retrohepatic cava extension in liver transplantation: experience with first 115 cases. *Transplantation* 2001; 72: 1389-1394
- 丁国善, 傅志仁, 傅宏, 王正昕, 施晓敏, 倪之嘉, 张建军, 李先兴, 郭闻渊. 肝移植手术方式探讨. *移植杂志* 2004; 2: 54-58
- Miyamoto S, Polak WG, Geuken E, Peeters PM, de Jong KP, Porte RJ, van den Berg AP, Hendriks HG, Slooff MJ. Liver transplantation with preservation of the inferior vena cava. A comparison of conventional and piggyback techniques in adults. *Clin Transplant* 2004; 18: 686-693
- Fagiuali S, Mirante VG, Pompili M, Gianni S, Leandro G, Rapaccini GL, Gasbarrini A, Naccarato R, Pagliaro L, Rizzetto M, Gasbarrini G. Liver transplantation: the Italian experience. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 640-648
- Tzakis A, Todo S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation with preservation of the inferior vena cava. *Ann Surg* 1989; 210: 649-652
- Navarro F, Le Moine MC, Fabre JM, Belghiti J, Cherqui D, Adam R, Pruvot FR, Letoublon C, Domergue J. Specific vascular complications of orthotopic liver transplantation with preservation of the retrohepatic vena cava: review of 1361 cases. *Transplantation* 1999; 68: 646-650
- Dhillon AP, Burroughs AK, Hudson M, Shah N, Rolles K, Scheuer PJ. Hepatic venular stenosis after

- orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994; 19: 106-111
- 13 Ng SS, Yu SC, Lee JF, Lai PB, Lau WY. Hepatic venous outflow obstruction after piggyback liver transplantation by an unusual mechanism: report of a case. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5416-5418
- 14 Elola-Olaso AM, Gonzalez EM, Diaz JC, Garcia Garcia I, Usera MA, Romero J, Perez-Saborido B, Fraile M, Manrique A. Hepatic vein reconstruction in living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3891-3892
- 15 Cabezuelo JB, Ramirez P, Rios A, Acosta F, Torres D, Sansano T, Pons JA, Bru M, Montoya M, Bueno FS, Robles R, Parrilla P. Risk factors of acute renal failure after liver transplantation. *Kidney Int* 2006; 69: 1073-1080

电编 李琪 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

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

1 征文内容和要求

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

2 学习班招收对象

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

3 联系方式

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

进展期大肠癌患者术中应用化疗药物外周血CEA、CA19-9的检测及临床意义

杨茂鹏, 于洪亮, 王夫景, 黄跃南, 杨维良

■背景资料

大肠癌术后肝脏的转移是患者死亡的主要原因, 有关文献报道, 对于进展期大肠癌患者, 即使行根治性切除手术后, 肿瘤复发和转移仍很常见, 大肠癌术后复发率达20%左右。

杨茂鹏, 于洪亮, 王夫景, 黄跃南, 杨维良, 哈尔滨医科大学第二临床附属医院普外三科 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 王夫景, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第二临床附属医院普外三科。

yangmaopeng_yd2@163.com

电话: 0451-86605575

收稿日期: 2006-10-22 接受日期: 2006-11-02

Detection of serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in patients with progressive colon cancer and its clinical significance

Mao-Peng Yang, Hong-Liang Yu, Fu-Jing Wang, Yue-Nan Huang, Wei-Liang Yang

Mao-Peng Yang, Hong-Liang Yu, Fu-Jing Wang, Yue-Nan Huang, Wei-Liang Yang, the Third Department of General Surgery, the Second Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Correspondence to: Fu-Jing Wang, the Third Department of General Surgery, the Second Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China. yangmaopeng_yd2@163.com

Received: 2006-10-22 Accepted: 2006-11-02

Abstract

AIM: To observe the pre- and post-operational changes of serum carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) in patients with progressive colon cancer and their clinical significances.

METHODS: The serum levels of CEA and CA19-9 were detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 60 patients (30 cases received chemotherapy during operation while 30 cases did not) diagnosed with colon cancer and 30 normal volunteers.

RESULTS: The serum levels of CEA and CA19-9 were significantly higher in all the cancer patients before operation than those in the normal controls (60.73 ± 25.99 mg/L vs 2.67 ± 1.643 mg/L, $P < 0.01$; 112.73 ± 78.76 kU/L vs 14.6 ± 6.68 kU/L, $P < 0.01$).

CEA and CA19-9 levels were rapidly decreased in the patients received chemotherapy (7 d post-operation: 7.96 ± 3.32 mg/L, 29.34 ± 11.05 kU/L, $P < 0.01$ vs pre-operation), but they were not significantly decreased in the patients without chemotherapy (7 d: post-operation: 34.23 ± 20.59 mg/L, 88.12 ± 32.28 kU/L, $P > 0.05$ vs pre-operation).

CONCLUSION: Detection of CEA and CA19-9 in the peripheral blood confirms that portal vein continuous chemotherapy and great volume of intraperitoneal chemotherapy are effective in preventing postoperative metastasis of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Intraperitoneal chemotherapy; Carcinoembryonic antigen; Carbohydrate antigen 19-9

Yang MP, Yu HL, Wang FJ, Huang YN, Yang WL. Detection of serum carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 in patients with progressive colon cancer and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):82-85

摘要

目的: 检测大肠癌患者术中应用化疗药物后, 手术前后血清CEA和CA19-9的变化, 确定其对预防大肠癌微转移, 降低术后复发率和死亡率的临床意义。

方法: 采用ELISA方法测定30例术中应用化疗药物大肠癌患者及30例术中未应用化疗药物大肠癌患者手术前后外周血中CEA和CA19-9含量的变化, 同时选用30例非肿瘤人群作为正常对照。

结果: 60例大肠癌患者(Duck C期)术前外周血中CEA, CA19-9均值高于正常值(60.73 ± 25.99 mg/L vs 2.67 ± 1.643 mg/L, $P < 0.01$; 112.73 ± 78.76 kU/L vs 14.6 ± 6.68 kU/L, $P < 0.01$)。30例术中应用化疗药物的大肠癌患者手术后血清CEA、CA19-9下降较快(术后7 d: 7.96

± 3.32 mg/L, 29.34 ± 11.05 kU/L, $P < 0.01$ vs 术前), 术中未应用化疗药物组的大肠癌患者术后血清CEA和CA-199下降缓慢(术后7 d: 34.23 ± 20.59 mg/L, 88.12 ± 32.28 kU/L, $P > 0.05$ vs 术前).

结论: 通过定量检测大肠癌患者外周血CEA和CA19-9的含量, 证明手术中温热灌注化疗+动脉化疗以及术后联合化疗的辅助治疗是十分必要的, 对预防大肠癌微转移, 降低术后复发率和死亡率的有重要的临床意义.

关键词: 大肠癌; 术中化疗; 癌胚抗原; 糖类抗原19-9

杨茂鹏, 于洪亮, 王夫景, 黄跃南, 杨维良. 进展期大肠癌患者术中应用化疗药物外周血CEA、CA19-9的检测及临床意义. 世界华人消化杂志 2007;15(1):82-85
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/82.asp>

0 引言

大肠癌是我国常见恶性肿瘤之一, 其发病率呈逐年上升趋势^[1], 虽然包括外科手术在内的治疗方法有了很大的进步, 但是大肠癌患者实行了根治性手术后, 仍会有相当一部分的患者不可避免的出现复发情况, 大肠癌根治术后5 a生存率一直徘徊在45%-55%之间^[2]. 治疗失败的主要原因是复发和转移, 肝脏是大肠癌最常见的转移部位. 半数以上的大肠癌患者死亡时存在肝转移, 约40%大肠癌患者发生异时性的肝转移^[3], 这严重影响了大肠癌患者手术后的生存率. 手术过程中应用化疗药物可以直接杀伤癌细胞, 减少微转移, 对降低大肠癌患者术后复发率和死亡率具有重要意义^[4]. 我们运用ELISA方法, 对健康人群及术中应用温热化疗+动脉化疗药物+术后常规化疗组的大肠癌患者和术中未应用化疗药物仅术后常规化疗组的大肠癌患者手术前后外周血CEA和CA19-9水平进行动态观察, 其结果对评价手术效果、术后疗效的观察及预后的判断有重要的临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-02/2005-09我院实行大肠癌根治术, 有确切病理诊断的患者60例(全部选用Duck C期患者且无术中并发症死亡, 否则标本弃用), 腺癌30例, 腺鳞癌16例, 印戒细胞癌8例, 未分化细胞癌6例; 男33例, 女27例, 平均年龄55岁; 选择同期非肿瘤人群30例作为对照组. 采用间接酶联

免疫吸附试验(ELISA)检测血清CEA, CA199的含量, 使用仪器: ESECSYS1010自动酶标仪及配套试剂盒(由瑞士罗氏公司提供).

1.2 方法 将受试者分为A对照组: 选择同期非肿瘤人群30例作为对照组; B实验组: 30例患者在术中直肠癌根治术的基础之上, 行术中温热化疗+术中动脉化疗+术后常规化疗, 术中静滴表阿霉素40 mg+亚叶酸钙200 mg, 切除肿瘤前, 从支配所切除肠管的动脉中注入丝裂霉素8 mg+氟尿嘧啶脱氧核苷0.15 g, 切除肿瘤后, 腹腔内注入45℃蒸馏水1000 mL+氟尿嘧啶脱氧核苷0.15 g, 留置20 min后吸出; C实验组: 30例患者在术中根治术的基础上仅术后应用常规化疗药物, 每位患者取术前3天、术后第7天和第30天(应用术后常规化疗药物之前)的外周新鲜血液各5 mL, 取材后, 标本迅速离心, 保留血清, 并置于-80℃冰箱保存, 之后使用ESECSYS1010自动酶标仪及相应配套的试剂盒, 采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中CEA, CA19-9的含量. CEA和CA19-9阳性标准分别为 $>5 \mu\text{g/L}$ 和 $>37 \text{ kU/L}$.

统计学处理 采用 χ^2 检验和 t 检验进行统计学分析.

2 结果

2.1 血清CEA及CA 19-9的测定结果 60例大肠癌患者手术前CEA和CA19-9的含量分别为 60.73 ± 25.99 mg/L和 112.73 ± 78.76 kU/L均值高于对照组A($P < 0.01$), 术后B实验组: 30例患者术中应用温热化疗+术中动脉化疗后, 术后第7天患者血清CEA和CA19-9的含量分别为 7.96 ± 3.32 mg/L和 29.34 ± 11.05 kU/L, 与手术前比较差异有显著性($P < 0.01$), 第30天患者血清当中CEA, CA19-9的含量分别为 2.99 ± 2.45 mg/L和 17.62 ± 7.29 kU/L, 与手术前比较差异有显著性($P < 0.01$), 术后C实验组: 30例患者术中未应用化疗药物, 仅常规腹腔冲洗, 术后第7天患者血清当中CEA和CA19-9的含量分别为 34.23 ± 20.59 mg/L和 88.12 ± 32.28 kU/L, 与手术前比较无显著性差异($P > 0.05$), 第30天患者血清当中CEA和CA19-9的含量分别为 9.97 ± 3.29 mg/L和 44.54 ± 20.22 kU/L两者比较有显著差异性($P < 0.05$, 表1).

2.2 大肠癌患者手术前后血清CEA和CA19-9阳性率及转阴性率的比较 术前血清CEA和CA19-9的阳性率分别为85.0%和81.6%, B组术中化疗后术后第7天, 血清CEA, CA19-9的阳

■同行评价

本文研究了进展期大肠癌患者术中应用化疗药物外周血CEA、CA19-9的检测及临床意义,思路正确,设计基本合理,具有一定临床应用价值。

表 1 大肠癌患者手术前后血清CEA和CA19-9含量 (mean ± SD)

分组	n	CEA (mg/L)	CA19-9 (U/mL)
术前	60	60.73 ± 25.99	112.73 ± 78.76
应用化疗药物组			
术后第7天	30	6.96 ± 3.32	29.34 ± 11.05
术后第30天	30	2.99 ± 2.45	17.62 ± 7.29
未应用化疗药物组			
术后第7天	30	34.23 ± 20.59	88.12 ± 32.28
术后第30天	30	9.97 ± 3.29	43.54 ± 20.22
非肿瘤对照组	30	2.67 ± 1.64	14.60 ± 6.68

表 2 大肠癌患者手术前后及手术中应用与未应用化疗药物血清CEA和CA19-9阳性率及转阴性率的比较

分组	n		阳性例数 (%)		阴性例数 (%)	
	CEA	CA19-9	CEA	CA19-9	CEA	CA-199
术前	60	60	51 (85.0)	49 (81.6)	9 (30.0)	11 (36.7)
应用化疗药物组						
术后第7天	30	30	9 (30.0)	6 (20.0)	21 (70.0)	24 (80.0)
术后第30天	30	30	3 (10.0)	1 (3.3)	27 (90.0)	29 (96.7)
未应用化疗药物组						
术后第7天	30	30	24 (80.0)	21 (70.0)	6 (20.0)	9 (30.0)
术后第30天	30	30	13 (43.3)	12 (40.0)	17 (56.7)	18 (60.0)

性率分别30.0%和20.0%,与术前相比差异显著($P<0.05$),术后第30天血清CEA, CA19-9的阳性率分别10.0%和3.3%,术前相比差异显著($P<0.01$),而C组组术中未应用化疗药物术后第7天血清CEA, CA19-9的阳性率分别80.0%和70.0%,与术前相比无显著差异($P>0.05$),术后第30天血清CEA, CA19-9的阳性率分别43.3%和40%,术前相比差异不显著($P>0.05$,表2)。

3 讨论

在大肠癌的辅助诊断中,CEA和CA19-9都是常见的肿瘤标志。有关研究发现,在检测到的复发病状、体征或影像学改变出现前,就可检测到血清CEA和CA19-9水平的持续升高,尤以CEA为更早,也就是说,在出现临床症状之前,结肠癌细胞已分泌相应的分子标志物,如CEA和CA19-9等。所以本实验对CEA和CA19-9的水平动态监测,其结果有助于对术后出现升高的患者加以重视,更早的发现复发情况。

大肠癌术后肝脏的转移是患者死亡的主要原因^[5],有关文献报道对于进展期大肠癌患者,即使行根治性切除手术后,肿瘤复发和转移仍很常见,大肠癌术后复发率达20%左右^[6]。造成大肠癌术后复发和转移的主要原因:一是术前已经存在的血液及淋巴的亚临床微转移,术后进一步发展为转移灶;二是手术时不可避免的

创伤所导致的肿瘤细胞经过淋巴管或静脉血扩散;三是手术中不适当的刺激挤压导致肿瘤细胞进入血液进而发生远处转移^[7],大肠的血液回流具有特殊性,其静脉回流主要是通过肠系膜静脉入门静脉系,继而进入肝脏。而肝脏又是恶性细胞良好的捕获器,恶性细胞一旦被捕获,就再也无法循环,因而,肝脏成为其转移的主要靶器官^[8]。对肿瘤转移的研究发现,大肠癌早期,哪怕是Dukes A的患者已有部分血液中检出癌细胞^[9]。研究发现,胃癌患者腹腔脱落游离癌细胞检出率高达43.13%-55.18%^[10]。手术操作和刺激可进一步增加癌细胞的脱落,而腹腔低渗温热化疗+术中动脉化疗+术后常规化疗可降低复发率,提高生存率^[11]。

本研究可见,60例大肠癌患者(Duck C期)手术前后血清CEA及CA19-9水平作比较:(1)大肠癌患者手术前CEA及CA19-9的含量均值高于对照组($P<0.01$),B实验组:术中温热化疗+术中动脉化疗,术后第7天患者血清中CEA及CA19-9的含量与手术前比较差异有显著性($P<0.01$),第30天患者血清当中CEA和CA19-9的含量与手术前比较差异有显著性($P<0.01$),此结果说明,术中温热化疗+术中动脉化疗后,术后血清CEA及CA19-9水平下降十分明显,这对大肠癌术后预防复发和转移具有重要意义;(2)C实验组:术中未应用化疗药物,仅常规腹腔冲

洗, 术后第7天患者血清当中CEA及CA19-9的含量与手术前比较无显著性差异($P>0.05$), 第30天患者血清当中CEA及CA19-9的含量与手术前比较差异有显著性($P<0.05$), 结果说明, 术中未应用化疗药物, 术后血清CEA及CA19-9水平下降十分缓慢, 这说明术前、术中或术后已经存在的血液及淋巴的亚临床微转移, 术后有可能进一步发展为转移灶; (3)术前血清CEA, CA19-9的阳性率分别为85.0%和81.6%, B实验组术中化疗后术后第7天, 血清CEA, CA19-9的阳性率分别30.0%和20.0%与术前相比差异显著($P<0.05$), 术后第30天血清CEA及CA19-9的阳性率分别10.0%和3.3%术前相比差异显著($P<0.01$), 而C组术中未应用化疗药物术后第7天血清CEA, CA19-9的阳性率分别80.0%和70.0%与术前相比无显著差异($P>0.05$), 术后第30天血清CEA和CA19-9的阳性率分别43.3%和40%术前相比无显著差异($P>0.05$), 此结果说明, 对于Dukes C期的大肠癌患者术中未应用化疗药物, 将大大增加了大肠癌术后复发和转移的危险性^[12]. 临床研究证明, 手术+术中化疗防治肿瘤术后肝转移的效果优于单纯手术^[13], 热能直接导致的肿瘤细胞杀伤作用本质上不同于放疗造成的细胞死亡, 热疗可以达到闭塞肿瘤血管、破坏或抑制肿瘤新生血管达到抗肿瘤作用, 除能直接杀伤癌细胞和增强放射敏感性外, 还可促进化疗药物的细胞毒作用. 所以热疗不仅可以促进化疗药物进入肿瘤组织内, 而且使不同抗癌药物产生协同作用, 从而有效降低腹腔内种植及复发率, 降低病死率. 临床研究证实, 45℃蒸馏水在腹腔内留置20-30 min, 能杀死近80%的癌细胞^[14], 所以, 本文采用此方法, 达到了最佳效果. 我们还通过术中门静脉和肠腔内化疗, 以提高门静脉系统抗癌药物浓度, 减少癌细胞扩散和(或)肝转移, 从而减少了肝转移率、提高了生存率. 万德森 *et al*^[15]在术中进行肠腔化疗后测定肠系膜静脉及周围静脉血药浓度, 证实前者血药浓度可高达杀死癌细胞的浓度, 肠腔内化疗可使Dukes C期患者生存率有所提高. 这些研究表明, 大肠癌的肝转移主要是通过门静脉发生的, 通过阻断门静脉途径, 可有

效的防治大肠癌的术后复发转移.

总之, 术中温热化疗+动脉化疗在治疗大肠癌、预防肝转移和肿瘤复发、降低患者病死率等方面明显优于单纯术后化疗. 因本组病例有限, 其确切临床效果有待进一步证实, 还需要对患者进行长期监测、长期随访.

4 参考文献

- 1 吕伟, 张超. 大肠癌基因治疗的现状和进展. 中国癌症杂志 2004; 14: 482-485
- 2 雷静, 青晓, 杨顺蓉, 谭榜宪. 大肠癌化疗进展. 肿瘤研究与临床 2005; 17: 427-430
- 3 Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg* 1993; 80: 205-209
- 4 卢献平, 李宝金, 陈声乐, 吕斌, 蒋宁一. 化疗及导向化疗治疗大肠癌与癌细胞凋亡. 研究世界华人消化杂志 1999; 7: 332-334
- 5 Seya T, Tanaka N, Shinji S, Yokoi K, Koizumi M, Teranishi N, Yamashita K, Tajiri T, Ishiwata T, Naito Z. Lumican expression in advanced colorectal cancer with nodal metastasis correlates with poor prognosis. *Oncol Rep* 2006; 16: 1225-1230
- 6 Gutt CN, Kim ZG, Schemmer P, Krahenbuhl L, Schmedt CG. Impact of laparoscopic and conventional surgery on Kupffer cells, tumor-associated CD44 expression, and intrahepatic tumor spread. *Arch Surg* 2002; 137: 1408-1412
- 7 骆成玉, 李世拥, 赵丹宁. 大肠癌术后血播散的动态追踪检测. 中华普通外科杂志 2001; 16: 118-119
- 8 Elias D, Blot F, El Otmany A, Antoun S, Lasser P, Boige V, Rougier P, Ducreux M. Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy. *Cancer* 2001; 92: 71-76
- 9 宰守峰, 王简, 郭明, 谢振斌. 进展期大肠癌患者术中腹腔内低渗温热灌注化疗的临床研究. 中原医刊杂志 2005; 12: 41-42
- 10 何建苗, 蒲永东, 曹志宇, 朱志东, 杨波, 董立国, 赵学伟. 胃癌患者腹腔游离癌细胞的监测与腹腔灌注化疗. 中国普外基础与临床杂志 2002; 9: 156-158
- 11 张立, 姜朝晖, 方旭东, 洪宇. 胃癌患者术中腹腔低渗热灌注化疗的长期预后观察. 中华胃肠外科杂志 2004; 7: 289-291
- 12 张思奋, 罗湛滨, 吴文江, 何晶, 范小华. 大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1790-1791
- 13 杜卫东, 袁祖荣, 沈达明, 乔伟伟, 黄春锦, 唐健雄, 程爱群, 张赣生, 王一倩, 于晓峰, 竺越. 血管抑素基因联合氟尿嘧啶腹腔化疗预防大肠癌术后肝转移的实验. 世界华人消化杂志 2005; 12: 22-24
- 14 魏志刚, 卿三华. 腹腔热灌注化疗治疗胃癌. 世界华人消化杂志 2006; 14: 134-137
- 15 万德森, 王东梅. 直肠癌围手术期的辅助化疗. 国外医学肿瘤分册 2003; 30: 44

电编 李琪 编辑 王晓瑜

洛铂、氟尿嘧啶与亚叶酸钙联合化疗的临床毒副作用

周宏锋, 张玉新, 程黎阳, 丁洪亮

■背景资料

目前, 结直肠癌以FOLFOX作为一线化疗方案, FOLFOX4是国际公认的标准方案, 但毒副反应较大。洛铂是第三代的铂类抗癌药, 临床前研究结果表明, 他与顺铂的抗癌活性相似, 但肾毒性和胃肠道反应较轻, 且可能对部分顺铂耐药的肿瘤有效。将洛铂替换FOLFOX4方案中草酸铂以降低化疗的毒副作用成为符合逻辑的推理, 国内几家大医院已开始对新方案进行初步的临床研究, 对其疗效和安全性还有待进一步观察。

周宏锋, 张玉新, 程黎阳, 丁洪亮, 广州军区广州总医院普通外科 广东省广州市 510010

通讯作者: 周宏锋, 510010, 广东省广州市荔湾区流花路111号, 广州军区广州总医院普通外科. zhouhf69@hotmail.com
电话: 020-36653547 传真: 020-36222793
收稿日期: 2006-08-07 接受日期: 2006-11-13

Clinical observation on adverse reaction of combination chemotherapy of lobaplatin, fluorouracil and calcium leucovorin

Hong-Feng Zhou, Yu-Xin Zhang, Li-Yang Cheng, Hong-Liang Ding

Hong-Feng Zhou, Yu-Xin Zhang, Li-Yang Cheng, Hong-Liang Ding, Department of General Surgery, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China
Correspondence to: Hong-Feng Zhou, Department of General Surgery, General Hospital of Guangzhou Military Command, 111 Liuhua Road, Liwan District, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China. zhouhf69@hotmail.com
Received: 2006-08-07 Accepted: 2006-11-13

Abstract

AIM: To evaluate the adverse reaction of combination chemotherapy of obaplatin, fluorouracil and calcium leucovorin.

METHODS: Combination chemotherapy of obaplatin, fluorouracil and calcium leucovorin was used in 26 colorectal cancer patients after operation, and a total of 30 courses were completed. The adverse reaction was evaluated according to the standard from World Health Organization.

RESULTS: The adverse reactions that occurred frequently were myelosuppression and gastrointestinal tract reaction. The decrease of white cell and platelet count was significant in myelosuppression. Of the 30 treatment courses, white cell count was decreased to grade I or II in 18 courses (60.0%), and grade III in 2 courses (6.7%); Thrombocytopenia of grade I or II achieved in 20 courses (66.7%), and grade III in 3 courses (10.0%). Nausea was the dominant gastrointes-

tinal tract reaction, which covered a percentage of 16.7%, and vomiting occurred in only 3.3% of the cases.

CONCLUSION: Combination of lobaplatin, fluorouracil and calcium leucovorin is safe in post-operative chemotherapy.

Key Words: Adverse reaction; Combination chemotherapy; Lobaplatin; Fluorouracil; Calcium leucovorin

Zhou HF, Zhang YX, Cheng LY, Ding HL. Clinical observation on adverse reaction of combination chemotherapy of lobaplatin, fluorouracil and calcium leucovorin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):86-87

摘要

目的: 观察和评价洛铂、氟尿嘧啶与四氢叶酸钙联合化疗的毒副作用。

方法: 应用洛铂、氟尿嘧啶与四氢叶酸钙联合化疗结、直肠癌术后患者26例, 共30个疗程, 按WHO标准评定毒副反应。

结果: 毒副作用以骨髓抑制及胃肠道反应为主, 其中骨髓抑制以白细胞和血小板减少最为明显。30个疗程中, 白细胞减少 I - II 级有18次 (60.0%), III 级有2次 (6.7%); 血小板减少 I - II 级为20次 (66.7%), III 级为3次 (10.0%)。胃肠道反应主要是恶心, 占16.7%, 发生呕吐者只占3.3%。

结论: 洛铂、氟尿嘧啶与四氢叶酸钙联合使用是一个较为安全的化疗方案。

关键词: 毒副作用; 联合化疗; 洛铂; 氟尿嘧啶; 四氢叶酸钙

周宏锋, 张玉新, 程黎阳, 丁洪亮. 洛铂、氟尿嘧啶与亚叶酸钙联合化疗的临床毒副作用. *世界华人消化杂志* 2007;15(1):86-87
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/86.asp>

0 引言

FOLFOX4方案是国际公认的结肠癌辅助化疗的标准方案^[1], 洛铂(lobaplatin)是第三代的铂类

抗癌药^[2], SFDA去年批准上市的一类抗肿瘤新药. 对于洛铂的疗效及毒副作用国内外已有文献[3-7]报道. 我科2006-02/04以来将洛铂替换FOLFOX4方案中的草酸铂作为结肠癌辅助化疗的新方案, 共治疗了30个疗程, 对其毒副作用进行了观察, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 全组26例患者, 男21例, 女5例, 年龄32-78(平均56.3±18.4)岁, 均为结、直肠癌术后患者, 近1 mo未进行化疗或放疗. 其中22例完成了1个疗程治疗, 4例完成了2个疗程治疗.

1.2 方法 洛铂50 mg/m²静脉滴注2 h以上, 第1天; 四氢叶酸钙200 mg/m²静脉滴注2 h以上, 第1天和第2天; 氟尿嘧啶400 mg/m²静脉推注, 然后600 mg/m²持续静脉输注22 h以上, 第1天和第2天; 每2 wk重复. 毒副反应判断标准按WHO标准评定^[8].

2 结果

30个疗程中毒副作用以骨髓抑制及胃肠道反应为主. 其中骨髓抑制以白细胞和血小板最为明显. 血红蛋白降低 I - II级为26.7%, III级为3.3%. 白细胞减少 I - II级为60.0%, III级为6.7%. 血小板减少 I - II级为66.7%, III级为10.0%. 胃肠道反应主要是恶心, 占16.7%, 发生呕吐者只占3.3%(表1).

3 讨论

洛铂是第三代的铂类抗癌药, 国外的文献报道其与顺铂的抗癌活性相似, 但肾毒性和胃肠道反应较轻, 且可能与顺铂有部分非交叉性耐药^[9]. 本临床观察发现, 洛铂、氟尿嘧啶与四氢叶酸钙联合化疗的毒副作用以骨髓抑制及胃肠道反应为主. 其中以白细胞和血小板减少尤为明显, 是主要的剂量限制性因素, 与文献[3-4,10]报道一致. 因白细胞、血小板以化疗结束后2 wk降倒最低, 而此时患者都已出院, 因此2 wk后一定要求患者复查血象, 根据结果采取措施, 防止感染和出血. 本组病例在化疗前常规使用止吐剂, 发生恶心的有16.7%, 发生呕吐者只有1例, 占3.3%, 较文献报道低^[1]. 呕吐的1例患者是因为化疗开始2 h后才使用止吐剂. 因此化疗前常规使用止吐剂是有必要的. 肝、肾毒性及周围神经毒性则较少发生. 因此洛铂、氟尿嘧啶与四氢叶酸钙联合使用是一个较为安全的化疗方案. 本化疗方案因治疗病例较少, 随访时间较短, 国内外

表 1 洛铂、氟尿嘧啶与四氢叶酸钙联合化疗毒副作用(n)

毒副反应	WTO分级				
	0	I	II	III	IV
血红蛋白降低	21	6	2	1	0
白细胞减少	10	13	5	2	0
血小板减少	7	10	10	3	0
出血	30	0	0	0	0
谷丙转氨酶升高	28	2	0	0	0
恶心呕吐	24	5	1	0	0
腹泻	30	0	0	0	0
尿素氮升高	28	2	0	0	0
头发	29	1	0	0	0
周围神经	30	0	0	0	0

尚无大宗病例报道, 疗效有待进一步观察^[11].

4 参考文献

- 孙元珏, 赵晖, 郭跃武, 林峰, 蔡讯, 唐晓春, 汤丽娜, 姚阳. 草酸铂及羟基喜树碱联合亚叶酸钙和氟尿嘧啶治疗进展期结直肠癌的比较. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1889-1894
- McKeage MJ. Lobaplatin: a new antitumour platinum drug. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; 10: 119-128
- 姜文奇, 林桐榆, 徐瑞华, 管忠震. 乐铂单药治疗肺癌的临床研究. 浙江肿瘤 1998; 4: 241-242
- 冯光丽, 廖美琳, 赵家美, 张心敏, 陈智伟, 白皓, 钟华. 乐铂单药治疗42例原发性支气管肺癌. 中国癌症杂志 2000; 10: 306-309
- Gietema JA, de Vries EG, Sleijfer DT, Willemse PH, Guchelaar HJ, Uges DR, Aulenbacher P, Voegeli R, Mulder NH. A phase I study of 1,2-diamminomethyl-cyclobutane-platinum (II)-lactate (D-19466; lobaplatin) administered daily for 5 days. *Br J Cancer* 1993; 67: 396-401
- Gietema JA, Veldhuis GJ, Guchelaar HJ, Willemse PH, Uges DR, Cats A, Boonstra H, van der Graaf WT, Sleijfer DT, de Vries EG. Phase II and pharmacokinetic study of lobaplatin in patients with relapsed ovarian cancer. *Br J Cancer* 1995; 71: 1302-1307
- 姜文奇, 林桐榆, 徐瑞华, 管忠震. 乐铂单药治疗乳腺癌的 II 期临床研究. 实用癌症杂志 1998; 13: 294-295
- 刘福坤, 祁晓平, 陈彻, 许哲, 李国立, 黎介寿. 直肠癌根治术联合放化疗的临床疗效比较. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1000-1002
- Harstrick A, Bokemeyer C, Scharnofk M, Hapke G, Reile D, Schmoll HJ. Preclinical activity of a new platinum analogue, lobaplatin, in cisplatin-sensitive and -resistant human testicular, ovarian, and gastric carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993; 33: 43-47
- 魏嘉, 王立峰, 刘宝瑞. 5-FU相关的药物疗效及毒性预测分子研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1889-1893
- Galanski M, Jakupiec MA, Keppler BK. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr Med Chem* 2005; 12: 2075-2094

■同行评价

本临床观察发现, 洛铂、氟尿嘧啶与四氢叶酸钙联合使用是一个较为安全的化疗方案, 属 I 期临床研究报告, 有一定的学术意义.

电编 张敏 编辑 张焕兰

糖尿病与结直肠癌患病危险关系的调查分析

胡水清, 汤哲, 张玫

■背景资料

近年来结直肠癌在我国的发病率逐年增加, 严重危害人民的健康。国外学者通过对结直肠癌的流行病学研究发现, 其患病与糖尿病关系密切。目前我国糖尿病患者亦逐渐增多, 故为进一步明确国人糖尿病与结直肠癌患病的关系, 本研究采用病例对照的方法, 研究分析结直肠癌患病与糖尿病相关因素的关系, 为进行前瞻性队列研究探讨结直肠癌病因学以及做好结直肠癌的一级预防提供思路。

胡水清, 汤哲, 张玫, 首都医科大学宣武医院消化内科 北京市 100053

通讯作者: 胡水清, 100053, 北京宣武区长椿街45号, 首都医科大学宣武医院消化内科. wangrongxin@sina.com

电话: 010-83198899-8860

收稿日期: 2006-10-13 接受日期: 2006-11-04

Investigation on the risks of colorectal cancer in patients with diabetes mellitus

Shui-Qing Hu, Zhe Tang, Mei Zhang

Shui-Qing Hu, Zhe Tang, Mei Zhang, Department of Gastroenterology, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China

Correspondence to: Shui-Qing Hu, Department of Gastroenterology, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China. wangrongxin@sina.com

Received: 2006-10-13 Accepted: 2006-11-04

Abstract

AIM: To investigate the influences of DM-associated factors on the pathogenesis of colorectal cancer (CRC), and clarify whether diabetes mellitus (DM) is a risk factor of CRC.

METHODS: A case-control study was performed to compare 364 colorectal cancer patients (198 colon cancer patients and 166 rectal cancer patients) with 733 controls (patients without cancer), with respect to their family history of CRC and DM, personal DM history, habits of smoking and drinking, cholesterol and triglyceride levels.

RESULTS: The value of odds ratio (OR) in patients with DM history was 1.72 and that in patients with family DM history was 1.64. The value of OR in DM patients with family CRC history was 3.23, significantly higher in DM patients without family CRC history (OR = 1.57). After further analysis, the rate of DM patients with/without family CRC history was always higher than that in the controls. Logistic analysis showed that the age, gender, DM history, coronary heart disease, hypertension, smoking, drinking, and blood lipid had no marked re-

lationship with colorectal cancer, but DM and family CRC history were correlated with the occurrence of colorectal cancer (OR = 2.99, $P < 0.01$; OR = 1.79, $P < 0.01$).

CONCLUSION: DM is an independent risk factor of CRC. Routine examination for CRC is recommended for DM patients to make earlier diagnosis of CRC and improve the prognosis of patients.

Key Words: Diabetes mellitus; Colorectal cancer; Epidemiology; Risk factor

Hu SQ, Tang Z, Zhang M. Investigation on the risks of colorectal cancer in patients with diabetes mellitus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):88-91

摘要

目的: 了解糖尿病(DM)与结直肠癌患病的关系, 明确糖尿病相关因素对结直肠癌发病的影响。

方法: 采用病例对照的方法分析同时期住院的结直肠癌($n = 364$)与非肿瘤患者($n = 733$)与糖尿病相关因素的关系及差异。对比分析两组患者的糖尿病患病情况、糖尿病家族史、结直肠癌家族史、并发病情况、吸烟、饮酒等生活行为以及血脂水平等方面的差异。

结果: 结直肠癌组糖尿病患者患结直肠癌的危险度是非糖尿病患者的1.72倍, 有糖尿病家族史者患结直肠癌的危险度也明显增加(OR = 1.64); 有结直肠癌家族史的糖尿病患者患结直肠癌的风险度(OR = 3.23)高于无结直肠癌家族史的糖尿病患者(OR = 1.57); 但通过进一步分层分析表明无论患者有无结直肠癌家族史, 结直肠癌组糖尿病患者所占比例均高于对照组。多因素回归分析显示: 年龄、性别、糖尿病家族史、冠心病、高血压、吸烟、饮酒及血脂对结直肠癌没有显著影响; 糖尿病及结直肠癌家族史对结直肠癌患病具有显著影响(OR = 2.99, $P < 0.01$; OR = 1.79, $P < 0.01$)。

结论: 糖尿病与结直肠癌患病存在一定的相

关性, 糖尿病增加了患结直肠癌的风险性, 其是结直肠癌患病的独立危险因素。

关键词: 结直肠癌; 糖尿病; 流行病学; 危险因素

胡水清, 汤哲, 张玫. 糖尿病与结直肠癌患病危险关系的调查分析. 世界华人消化杂志 2007;15(1):88-91

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/88.asp>

0 引言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是结肠癌(colon cancer)和直肠癌(rectal cancer)的统称。近年来, 我国的发病率逐年增加, 严重危害人民的健康。据中国恶性肿瘤死亡率抽样调查报告, 结直肠癌居第5位^[1]。以往的研究表明结直肠癌发病与遗传因素、食物中的脂肪、肉食以及体力活动等关系密切^[2-3]。但国外学者近年来通过对结直肠癌的流行病学研究发现, 其患病还与糖尿病(diabetes mellitus, DM)关系密切^[4-8]。目前我国糖尿病患者亦逐渐增多, 成为非常常见的慢性病, 但国内对糖尿病与结直肠癌的关系研究甚少。为进一步明确国人糖尿病与结直肠癌患病的关系, 本研究采用病例对照的方法, 研究分析结直肠癌患者与糖尿病相关因素的关系, 为进行前瞻性队列研究探讨结直肠癌病因学以及做好结直肠癌的一级预防提供思路。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-09/2005-12在首都医科大学宣武医院住院的结直肠癌患者364例, 其中结肠癌198例, 直肠癌166例, 男220人(60.44%), 女144人(39.56%), 年龄26-95(平均64.12)岁。随机选择同时期骨、眼、耳鼻喉、普外、泌尿外、心内、呼吸、肾科住院的非肿瘤患者733例作为对照组, 主要包括骨科疾病(21.29%, 主要为外伤、骨折或椎间盘突出、狭窄等), 外科疾病(23.12%, 主要为急性阑尾炎、泌尿系结石、前列腺增生、肾损伤、肾囊肿、腹股沟疝、胆囊结石等), 眼科、耳鼻喉科疾病(26.05%, 包括白内障、青光眼、眼部及额面部外伤、扁桃体切除、咽炎、鼻中隔弯曲等), 内科疾病(29.54%, 包括泌尿系感染、肺炎、支气管炎、高血压、冠心病等), 其中男441例(60.16%), 女292例(39.84%), 年龄34-96(平均61.73)岁。

1.2 方法 采用病例对照研究的方法分析结直肠癌组和对照组与糖尿病相关因素的关系及差异。对比分析两组患者的糖尿病患病情况、糖

表 1 结直肠癌组和对照组一般情况的比较

分组	结直肠癌组 (n = 364)	对照组 (n = 733)	P
男/女	218/146	441/292	0.93
身高(cm)	161.36 ± 15.64	162.51 ± 16.36	0.43
体质量(kg)	63.48 ± 11.09	66.33 ± 11.93	0.35
平均年龄(岁)	64.12 ± 12.38	61.73 ± 12.44	0.09
吸烟	115(31.59%)	271(36.97%)	0.08
饮酒	76(20.88%)	180(24.56%)	0.20
合并高血压	83(22.80%)	166(22.65%)	1.00
合并冠心病	36(9.89%)	100(13.64%)	0.09
甘油三酯水平 (mmol/L)	1.33 ± 1.10	1.48 ± 0.85	0.12
胆固醇水平 (mmol/L)	4.13 ± 1.10	4.55 ± 1.23	0.08

尿病家族史、结直肠癌家族史、并发病情况、吸烟、饮酒等生活行为以及血脂水平等方面的差异。评估标准: (1)结直肠癌的诊断: 所有结直肠癌患者均经手术或活体病理组织检查明确诊断; (2)结直肠癌家族史的确定: 只有患者的一级亲属中有患结直肠癌者才确定为有结直肠癌家族史; (3)糖尿病家族史的确定: 只有患者的一级亲属中有患糖尿病者才确定为有糖尿病家族史; (4)糖尿病的诊断: 由医师询问糖尿病诊断时间、诊断医院、用药史及血糖控制情况, 诊断医院至少为二级以上医院, 诊断标准参照美国糖尿病协会(ADA)1997年提出的诊断标准, 即症状+空腹血浆葡萄糖(FPG) ≥ 7.0 mmol/L, 或随机血糖 ≥ 11.1 mmol/L, 或口服葡萄糖耐量试验(OGTT)2HPG ≥ 11.1 mmol/L。

统计学处理 样本均数的比较采用 t 检验; 单因素分析用 χ^2 检验, 多因素分析采用Logistic回归分析。并计算各暴露因素对结直肠癌发生的比数比(OR值)估计相对危险度及95%可信区间(95%CI)。

2 结果

2.1 一般情况的比较 结直肠癌组和对照组在身高、体质量、年龄、吸烟率、饮酒率、血脂水平(甘油三酯和胆固醇)及并发病(高血压和冠心病)等方面无显著性差异(表1)。

2.2 糖尿病患病情况及糖尿病家族史比较 结直肠癌组364人中患糖尿病者104人, 占28.57%, 对照组733人患糖尿病者138人, 占18.83%, 两组比较有显著性差异($P < 0.01$), 提示有糖尿病者患结直肠癌的危险度增加(OR值为1.72)。此外, 在结

■应用要点

本研究通过病例对照的方法研究分析结直肠癌患者与糖尿病相关因素的关系, 结果显示糖尿病史是结直肠癌患病的独立危险因素。故应将糖尿病患者群作为结直肠癌的高危人群之一, 定期进行普查和筛查, 争取做到肿瘤的早期发现、早期治疗。

■名词解释

胰岛素样生长因子(IGF): 共有2种, 即胰岛素样生长因子-1(IGF-1)及胰岛素样生长因子-2(IGF-2), 前者主要存在于成人, 后者主要存在于胎儿, 其生理作用主要是: 促有丝分裂作用和诱导细胞分化, 若IGF-1水平增高, 将导致细胞过度分裂增殖, 进而大大增加肿瘤发生的几率, 并减少肿瘤细胞的凋亡, 循环中IGF-1的作用主要通过IGF-1结合蛋白(IGFBP)来调节, IGFBP可阻断IGF-1与其受体结合而抑制IGF的促有丝分裂作用, 目前已发现来源于不同组织的6种IGFBP, IGF-1主要与IGFBP-3结合后对某些生理机能起调控作用, 上述各种过程的失衡将促使细胞增殖失控, 进而导致恶变。

表 2 结直肠癌患者糖尿病史及糖尿病家族史的比较

分组	结直肠癌组(<i>n</i> = 364)	对照组(<i>n</i> = 733)	OR值	95%CI	<i>P</i>
糖尿病					
有	104(28.57%)	138(18.83%)	1.72	1.29–2.31	<0.01, $\chi^2 = 13.43$
无	260(71.43%)	595(81.17%)			
糖尿病家族史					
有	36(9.89%)	46(6.28%)	1.64	1.04–2.59	<0.05, $\chi^2 = 4.59$
无	328(90.11%)	687(93.72%)			

表 3 结直肠癌家族史及糖尿病史与结直肠癌危险性关系的分析

分组	结直肠癌组(<i>n</i> = 364)	对照组(<i>n</i> = 733)	OR值	95%CI	<i>P</i>
有结直肠癌家族史					
有DM	20(39.22%)	5(16.67%)	3.23	1.06–9.81	<0.05, $\chi^2 = 4.50$
无DM	31(60.78%)	25(83.33%)			
无结直肠癌家族史					
有DM	84(26.84%)	133(18.92%)	1.57	1.15–2.15	<0.01, $\chi^2 = 8.08$
无DM	229(73.16%)	570(81.08%)			

表 4 结直肠癌患病的多因素分析

因素	回归系数	OR值	95%CI
年龄(岁)	0.30	1.03	0.58–2.77
性别(男 = 0, 女 = 1)	-0.10	0.91	0.47–3.88
结直肠癌家族史(有或无) ^b	1.82	2.99	1.97–5.03
糖尿病家族史(有或无)	0.27	1.03	0.47–2.23
糖尿病(有或无) ^b	0.54	1.79	1.37–2.50
冠心病(有或无)	0.39	1.46	0.99–2.64
高血压(有或无)	0.21	1.24	0.60–3.13
饮酒(有或无)	0.35	1.42	0.97–2.05
吸烟(有或无)	0.36	1.33	0.73–2.52
胆固醇(mmol/L)	-0.35	0.70	0.42–1.13
甘油三脂(mmol/L)	-0.33	0.74	0.50–1.21

^b*P*<0.01.

直肠癌组, 有糖尿病家族史的比例为9.89%, 显著高于对照组(6.28%), 有糖尿病家族史者患结直肠癌的OR值为1.64(表2).

2.3 结直肠癌家族史对糖尿病与结直肠癌患病关系的影响分析 结直肠癌家族史是结直肠癌患病的危险因素, 进一步分层分析结直肠癌家族史对糖尿病与结直肠癌患病关系的影响, 结果表明无论患者有无结直肠癌家族史, 结直肠癌组糖尿病患者所占比例均高于对照组, 但有结直肠癌家族史的糖尿病患者患结直肠癌的风险度更高, OR值为3.23, 高于无结直肠癌家族史的

糖尿病患者(OR值为1.57)(表3).

2.4 结直肠癌患病的多因素分析 为排除多因素间的相互干扰, 将年龄(老年与非老年)、性别、吸烟、饮酒、高血压史、冠心病史、糖尿病史、糖尿病家族史、结肠癌家族史、甘油三脂及胆固醇等因素代入Logistic多因素回归分析, 显示结肠癌家族史、糖尿病是结直肠癌患病的独立危险因素(表4).

3 讨论

本研究通过对我院住院的364例结直肠癌患者

和同期住院的733例非肿瘤患者调查分析发现, 结直肠癌组糖尿病患者所占比例(28.57%)明显高于对照组(18.83%), 提示糖尿病可能是患结直肠癌的危险因素之一, 风险比分析显示, 糖尿病患者患结直肠癌的危险度是非糖尿病患者的1.72倍($OR = 1.72$, 95%CI = 1.29-2.31), 与Levi *et al*^[4]和Yang *et al*^[5]的报道一致。另外, 有糖尿病家族史者患结直肠癌的风险度亦高于无糖尿病家族史患者($OR = 1.64$, 95%CI = 1.04-2.59)。结直肠癌家族史是结直肠癌患病的危险因素, 有结直肠癌家族史的糖尿病患者患病风险度($OR = 3.23$)高于无结直肠癌家族史的糖尿病患者($OR = 1.53$), 但本文通过进一步分层分析表明, 无论患者有无结直肠癌家族史, 结直肠癌组糖尿病患者所占比例均高于对照组, 与Levi *et al*^[4]及Sandhu *et al*^[6]的调查结果一致, 进一步证实了糖尿病与结直肠癌的相关性, 结直肠癌家族史可增加糖尿病患者结直肠癌的患病率。另外为排除多因素间的相互干扰, 本研究进行Logistic多因素回归分析, 结果显示结直肠癌家族史、糖尿病史是结直肠癌患病的独立危险因素, 而糖尿病家族史为非独立危险因素, 可能与其他因素协同作用增加了患结直肠癌的风险。

糖尿病增加结直肠癌患病的可能机制如下: 胰岛素抵抗是2型糖尿病发病机制的主要环节, 他将直接或间接导致高胰岛素血症, 刺激胰岛素样生长因子-1(IGF-1)的增高。胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP), 尤其是IGFBP-3, 可与IGF-1结合而抑制IGF-1的生理作用^[9]。已有实验发现, 大部分糖尿病患者群中IGF-1水平较正常人高, 而IGFBP-3较正常人低; 检测血浆IGF-1和IGFBP-3水平对估计糖尿病患者群恶性肿瘤的发生率有重要意义^[10]。IGF-1同其受体结合后可抑制细胞凋亡, 促进分化, 结直肠癌的发生起源于分子水平突变的累积, 而IGF-1通过加快细胞周转率而加速了分子水平突变的累积^[10]。目前已有研究表明, 在结直肠癌黏膜中IGF-1水平较临近非肿瘤组织高, 且与正常结肠黏膜相比, 结直肠癌中的IGF-1受体亦表达过度, 这种过度表达与肿瘤分级、分期与转移密切相关^[11], 同时进一步证实了IGF-1在结直肠癌发病中的作用。此外, 糖尿病患者免疫功能紊乱及糖尿病性胃肠动力

障碍等在肿瘤发病中也起到一定作用, 更详尽的机制还有待进一步研究。

总之, 糖尿病增加了患结直肠癌的风险性, 我们可将糖尿病患者群作为结直肠癌的高危人群之一, 定期进行普查和筛查, 争取做到肿瘤的早期发现、早期治疗。但本调查的研究对象为住院人群, 采用的是病例对照的方法, 肿瘤患病风险因素分析是通过横断面的数据, 通过现象得出初步结论, 不能充分说明糖尿病与结直肠癌发病的因果关系。故有待今后进行大样本的社区人群的前瞻性和纵向研究, 以进一步明确糖尿病与结直肠癌患病的关系。

4 参考文献

- 1 李连弟, 鲁凤珠, 张思维, 牧人, 孙秀娣, 皇甫小梅, 孙杰, 周有尚, 欧阳宁慧, 饶克勤, 陈育德, 孙爱明, 薛志福, 夏毅. 中国恶性肿瘤死亡率20年变化趋势和近期预测分析. 中华肿瘤杂志 1997; 19: 3-9
- 2 陈婕, 李君, 徐三平, 宋军. 湖北地区结直肠癌与生活习性的相关性研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 105-107
- 3 王双双, 关景明, 范玉晶. 大肠癌发病的相关因素. 世界华人消化杂志 2005; 13: 534-536
- 4 Levi F, Pasche C, Lucchini F, La Vecchia C. Diabetes mellitus, family history, and colorectal cancer. *J Epidemiol Community Health* 2002; 56: 479-480
- 5 Yang YX, Hennessy S, Lewis JD. Type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 587-594
- 6 Sandhu MS, Luben R, Khaw KT. Self reported non-insulin dependent diabetes, family history, and risk of prevalent colorectal cancer: population based, cross sectional study. *J Epidemiol Community Health* 2001; 55: 804-805
- 7 Will JC, Galuska DA, Vinicor F, Calle EE. Colorectal cancer: another complication of diabetes mellitus? *Am J Epidemiol* 1998; 147: 816-825
- 8 Nilsen TI, Vatten LJ. Prospective study of colorectal cancer risk and physical activity, diabetes, blood glucose and BMI: exploring the hyperinsulinaemia hypothesis. *Br J Cancer* 2001; 84: 417-422
- 9 Komninou D, Ayonote A, Richie JP Jr, Rigas B. Insulin resistance and its contribution to colon carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 396-405
- 10 Reinmuth N, Fan F, Liu W, Parikh AA, Stoeltzing O, Jung YD, Bucana CD, Radinsky R, Gallick GE, Ellis LM. Impact of insulin-like growth factor receptor-I function on angiogenesis, growth, and metastasis of colon cancer. *Lab Invest* 2002; 82: 1377-1389
- 11 Weber MM, Fottner C, Liu SB, Jung MC, Engelhardt D, Baretton GB. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas. *Cancer* 2002; 95: 2086-2095

■同行评价

本文选题实用、摘要简练、方法路线可行、结论合理, 为结直肠癌的早期诊疗提供参考。

电编 张敏 编辑 张焕兰

大肠癌组织中端粒酶催化亚单位的表达及临床意义

王飞海, 张银龙, 郑瑾滢, 张伟, 郑志强

■背景资料

端粒酶催化亚单位(hTERT)是端粒酶的主要逆转录酶部分, hTERT表达也是重获端粒酶活性的限速步骤。因此, hTERT与肿瘤的关系非常密切, hTERT有望成为新的肿瘤诊断的标志物, 但国内对于hTERT在大肠癌中表达及与临床病理类型、淋巴结转移和复发关系的研究尚未见报道。

王飞海, 张银龙, 郑瑾滢, 张伟, 郑志强, 温州医学院附属第二医院普通外科 浙江省温州市 325027

通讯作者: 王飞海, 325027, 浙江省温州市, 温州医学院附属第二医院普通外科. jzx0847@sina.com.cn

收稿日期: 2006-10-24 接受日期: 2006-11-10

Detection of human telomerase reverse transcriptase in colorectal cancer and its clinical significance

Fei-Hai Wang, Yin-Long Zhang, Jin-Ying Zheng, Wei Zhang, Zhi-Qiang Zheng

Fei-Hai Wang, Yin-Long Zhang, Jin-Ying Zheng, Wei Zhang, Zhi-Qiang Zheng, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Fei-Hai Wang, Department of General Department, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, 109 Xueyuan Road, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China. jzx0847@sina.com.cn
Received: 2006-10-24 Accepted: 2006-11-10

Abstract

AIM: To investigate the role of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in the multistep colorectal carcinogenesis and assess its relationship with clinicopathologic types, lymph node metastasis and relapse of tumors.

METHODS: The levels of hTERT expression were detected by immunohistochemistry in colorectal cancers ($n = 45$), colorectal adenomas ($n = 16$) and normal tissues ($n = 10$). The relationship between the expression of hTERT and its clinicopathologic type, lymph node metastasis and relapse of tumors were analyzed.

RESULTS: The levels of hTERT expression in colorectal carcinomas were significantly higher than those in the adenomas and normal tissues (77.8% vs 12.5%, 0, both $P < 0.05$). The expression of hTERT was correlated with lymph node metastasis ($r = 5.2$, $P < 0.05$). The time to relapse in patients with metastasis was notably increased as compared with that in ones without metastasis (34 ± 5 vs 20 ± 6 mo, $P < 0.05$).

CONCLUSION: hTERT is highly expressed in colorectal cancer, and immunohistochemical determination is effective in the diagnosis and metastasis prediction of colorectal cancer.

Key Words: Telomerase reverse transcriptase; Colorectal cancer; Relapse; Metastasis; Immunohistochemistry

Wang FH, Zhang YL, Zheng JY, Zhang W, Zheng ZQ. Detection of human telomerase reverse transcriptase in colorectal cancer and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):92-94

摘要

目的: 探讨端粒酶催化亚单位(hTERT)在大肠癌患者中的表达情况及与临床病理类型、淋巴结转移和复发之间的关系。

方法: 免疫组化法测定大肠癌组织($n = 45$)、腺瘤组织($n = 16$)及正常大肠黏膜($n = 10$) hTERT表达情况, 并将hTERT表达情况与大肠癌临床病理类型、淋巴结转移和肿瘤复发之间的关系进行总结。

结果: 大肠癌患者癌组织中的hTERT阳性率为77.8%, 显著高于腺瘤组(2/16)和正常大肠黏膜组(0/10), 有显著性差异($P < 0.05$)。hTERT表达强度与淋巴结转移呈高度相关性($r = 5.2$, $P < 0.05$)。大肠癌复发转移平均时间阳性组为 34 ± 5 mo, 阴性组为 20 ± 6 mo, 差异有显著性($P < 0.05$)。

结论: hTERT在大肠癌组织中有高表达, hTERT免疫组化检测结果可以作为大肠癌早期诊断和淋巴结转移的一个重要参考指标。

关键词: 端粒酶催化亚单位; 大肠癌; 复发; 转移; 免疫组化

王飞海, 张银龙, 郑瑾滢, 张伟, 郑志强. 大肠癌组织中端粒酶催化亚单位的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2007;15(1):92-94
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/92.asp>

0 引言

端粒酶是一种核糖核蛋白酶, 广泛存在于肿瘤细胞中. 在肿瘤的发生、发展过程中起着重要的作用. 端粒酶催化亚单位(hTERT)是端粒酶的主要逆转录酶部分, hTERT表达也是重获端粒酶活性的限速步骤. 因此, hTERT与肿瘤的关系非常密切, hTERT有望成为新的肿瘤诊断的标志物、疗效的判定参数、治疗的新靶点及判定肿瘤预后有价值的指标. 目前, 国内对于hTERT在大肠癌中表达及与临床病理类型、淋巴结转移和复发关系的研究尚未见报道. 因此, 我们采用免疫组织化学法检测大肠癌组织中的hTERT表达, 并结合临床随访资料进行分析, 旨在探讨hTERT在大肠癌患者中的表达情况及与临床病理类型、淋巴结转移和复发之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠癌、腺瘤及对照肠黏膜标本均为我院1998-06/1999-12住院患者的手术标本. 其中大肠癌45例, 腺瘤型息肉16例, 另取10例正常黏膜作为对照. 其中男39例, 女32例, 年龄35-69岁. 兔抗人hTERT抗体试剂盒购自CN Biosciences公司, SP试剂盒购自福州迈新公司.

1.2 方法 用链霉菌抗生素蛋白-过氧化酶(SP)法, 兔抗人hTERT抗体试剂盒购自CN Biosciences公司, 实验步骤按试剂盒说明进行, 磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照. 结果判断: 显微镜下观察, 细胞无棕色反应或背景同空白对照者为(-); 细胞呈淡棕黄色或阳性细胞率<25%者为(+); 细胞呈棕黄色颗粒或阳性细胞率占25%-50%者为(++); 细胞呈深棕黄色颗粒或阳性细胞率>50%者为(+++). 结合临床资料, 统计45例大肠癌患者癌组织hTERT表达与临床病理类型、淋巴结转移之间的关系(肿瘤大小、分化程度、Duke分期和淋巴结转移情况). 大肠癌组织hTERT表达与癌肿复发的关系根据35例患者随访资料, 分别比较hTERT表达阴性或阳性组大肠癌患者复发情况(复发率和复发时间).

统计学处理 率的比较采用 χ^2 的确切概率法, 均数的比较采用 t 检验, 对等级资料的比较采用秩和检验.

2 结果

45例大肠癌患者癌组织中的hTERT阳性率为77.8%(35/45), 16例腺瘤患者组织的hTERT阳性率为12.5%(2/16), 10例正常肠黏膜的hTERT阳

表1 大肠癌中hTERT表达与临床病理类型、淋巴结转移之间的关系

	hTERT阳性表达				χ^2	P值
	-	+	++	+++		
肿瘤大小						
<3	2	3	4	3	1.35	0.510
3-6	4	5	5	7		
>6	4	4	1	3		
肿瘤分化程度						
高分化	2	5	1	3	1.27	0.531
中分化	6	3	7	2		
低分化	2	4	7	3		
Duke分期						
I	1	6	0	4	4.60	0.100
II	4	7	2	4		
III	5	4	0	1		
IV	0	1	4	0		
淋巴结转移						
+	8	8	9	10	8.79	0.003
-	2	2	3	3		

性率为0, 3组间hTERT表达率有显著差异($\chi^2 = 34.8$, $P = 0.000$). 35例大肠癌患者hTERT阳性表达患者中, (+)表达12例, (++)表达5例, (+++)表达18例, 2例腺瘤患者hTERT阳性表达, 皆为(+), 正常对照组hTERT无表达(图1). 大肠癌患者癌组织hTERT表达强度与肿瘤的大小、分化程度、Duke分期无相关性, 但是hTERT表达强度与淋巴结转移呈相关性, 即淋巴结阳性组hTERT表达越强(表1). 癌组织hTERT表达与复发的关系为复发转移率阳性组37.1%, 阴性组为30%, 两组差异无统计学意义($\chi^2 = 0.265$, $P = 0.606$); 复发转移平均时间阳性组为 34 ± 5 mo, 阴性组为 20 ± 6 mo, 差异有显著性($P < 0.05$), 表明hTERT与大肠癌术后复发时间有关系, hTERT阳性者预后较阴性者差, 复发时间较短.

3 讨论

端粒酶作为肿瘤发生、发展过程中一个重要的分子生物学标志在肿瘤诊断及预后判断上所起的作用已受到广泛重视^[1]. 大量文献报道, hTERT在结肠癌、肝癌等组织中有表达^[2-5], 尤其在大肠癌中有较高的阳性率, 并认为其是大肠癌预后判断的一个重要参考指标^[6], 但目前hTERT表达与大肠癌临床病理类型、淋巴结转移及肿瘤复发之间的关系尚未见报道. 因此我们应用免疫组化的方法对大肠癌患者、腺瘤患者及正常大肠黏膜标本中hTERT表达进行检

■应用要点

hTERT表达可作为大肠癌早期诊断或鉴别诊断的指标, 对于hTERT表达阳性的大肠息肉腺瘤患者, 应加强随访和采取积极的手术治疗.

■同行评价

本文实验对照设计合理可靠, 统计学处理方法使用恰当, 结论较明确, 实验证据较充足, 有一定实用性和可读性, 但创新性欠佳。

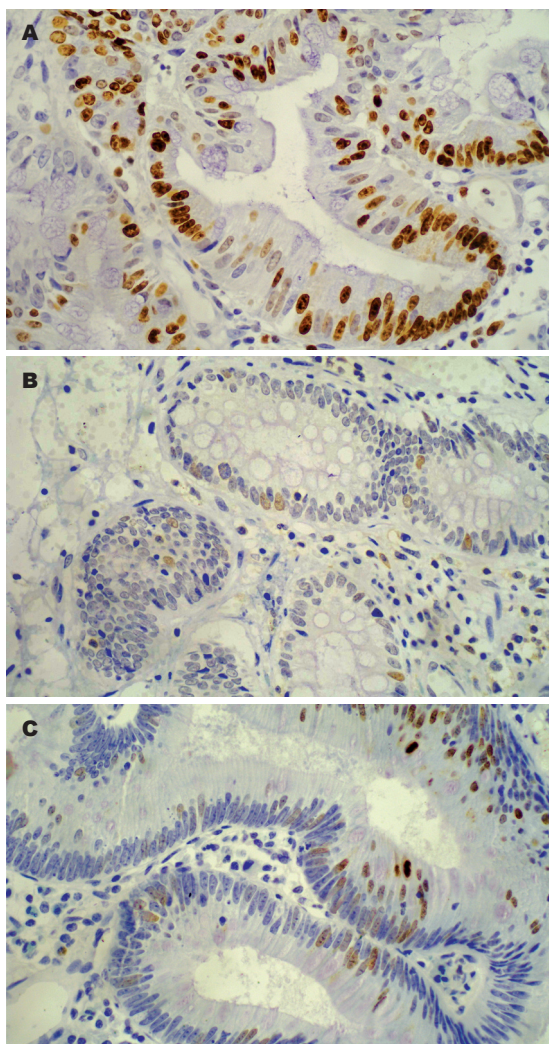


图1 端粒酶表达(SP×400)。A: 癌组织; B: 腺瘤; C: 正常肠黏膜。

测, 并结合临床随访资料进行分析, 进一步探讨hTERT表达与临床病理类型、淋巴结转移和肿瘤复发之间的关系。我们的研究结果发现, 大肠癌患者癌组织中的hTERT阳性率显著高于腺瘤组和正常大肠黏膜组, 有显著差异($P<0.05$)。大

肠腺瘤患者中hTERT阳性表达为12.5%, 而正常大肠黏膜无表达, 这可能与腺瘤处于癌前病变有关, 因此, hTERT表达的检测可做为大肠癌早期诊断或鉴别诊断的指标, 对于hTERT表达阳性的大肠息肉腺瘤患者, 加强随访和采取积极的手术治疗。我们进一步结合临床病理资料发现, 大肠癌患者癌组织hTERT表达强度与肿瘤的大小、分化程度、Duke分期无相关性, 但是hTERT表达强度与淋巴结转移呈高度相关性, 即淋巴结阳性组hTERT表达强。而且, hTERT阳性者预后较阴性者差, 复发时间较短。因此, 我们认为, hTERT免疫组化检测结果可以作为大肠癌早期诊断和淋巴结转移的一个重要参考指标, 对hTERT表达阳性大肠癌患者应该加强随访。

4 参考文献

- 1 Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2696-2701
- 2 Liu JL, Ge LY, Zhang GN. Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase expression in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 465-467
- 3 Fu XH, Zhang JS, Zhang N, Zhang YD. Combination of telomerase antisense oligonucleotides simultaneously targeting hTR and hTERT produces synergism of inhibition of telomerase activity and growth in human colon cancer cell line. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 785-790
- 4 Wang W, Luo HS, Yu BP. Expression of NF-kappaB and human telomerase reverse transcriptase in gastric cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 177-181
- 5 Chen CJ, Kyo S, Liu YC, Cheng YL, Hsieh CB, Chan DC, Yu JC, Harn HJ. Modulation of human telomerase reverse transcriptase in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 638-642
- 6 李峰, 孟荣贵, 傅传刚, 金国祥, 喻德洪. 结直肠癌中端粒酶催化亚单位的表达及其在预后判断中的意义. *中华胃肠外科杂志* 2004; 7: 154-155

电编 张敏 编辑 王晓瑜

希罗达术前化疗对结直肠癌组织TP/PD-ECGF表达和血管生成的影响

余细球

余细球, 深圳市罗湖区人民医院消化内科 广东省深圳市 518000

通讯作者: 余细球, 518001, 广东省深圳市罗湖区友谊路47号, 罗湖区人民医院消化内科. yuxiqiu0001@hotmail.com

电话: 0755-82203083-1533

收稿日期: 2006-08-01 接受日期: 2006-08-22

Preoperative administration of xeloda on the angiogenesis and expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in colorectal cancer

Xi-Qiu Yu

Xi-Qiu Yu, Department of Gastroenterology, Luohu Hospital of Shenzhen City, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xi-Qiu Yu, Department of Gastroenterology, Luohu Hospital of Shenzhen City, Shenzhen 518001, Guangdong Province, China. yuxiqiu0001@hotmail.com

Received: 2006-08-01 Accepted: 2006-08-22

Abstract

AIM: To investigate the effect of capecitabine (xeloda) by preoperation administration on the microvessel density (MVD) and expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor (TP/PD-ECGF) in patients with colorectal cancer.

METHODS: Immunohistochemical staining of CD34 and TP/PD-ECGF monoclonal antibodies was performed in 32 colorectal cancer patients with preoperative xeloda chemotherapy and 25 cases without chemotherapy (served as controls), and then the expression of TP/PD-ECGF and MVD were analyzed.

RESULTS: The positive rate of TP/PD-ECGF expression in patients with chemotherapy was significantly lower than that in the controls (31.2% vs 60.0%, $P < 0.05$). As compared with that in the controls, the value of MVD in patients with chemotherapy was markedly different (20.7

± 8.5 vs 42.3 ± 7.8 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Preoperation chemotherapy of xeloda can decrease the activity of TP/PD-ECGF and inhibit the angiogenesis in colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor; Microvessel density; Xeloda

Yu XQ. Preoperative administration of xeloda on the angiogenesis and expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(1):95-98

摘要

目的: 探讨术前希罗达化疗对结直肠癌胸苷磷酸化酶/血小板衍化内皮细胞生长因子(TP/PD-ECGF)表达、肿瘤组织微血管密度(MVD)的影响。

方法: 对32例术前应用希罗达化疗的和25例未做术前化疗的结直肠癌标本, 进行TP/PD-ECGF、CD34免疫组织化学标记, 检测其TP/PD-ECGF表达及微血管密度MVD。

结果: 术前化疗组TP/PD-ECGF阳性表达率显著低于对照组(31.2% vs 60%, $P < 0.05$); MVD值在术前化疗组与对照组分别为 20.7 ± 8.5 和 42.3 ± 7.8 , 两者差异有显著性($P < 0.05$)。

结论: 希罗达术前化疗能使TP/PD-ECGF活性降低, 抑制结直肠癌肿瘤血管生成。

关键词: 结直肠癌; 胸苷磷酸化酶/血小板衍化内皮细胞生长因子; 微血管密度; 希罗达

余细球. 希罗达术前化疗对结直肠癌组织TP/PD-ECGF表达和血管生成的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(1):95-98
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/95.asp>

0 引言

希罗达(N^4 -戊氧基碳酸-5'-脱氧-5-氟胞嘧啶)是

■背景资料

肿瘤微血管密度与肿瘤的发生、发展及转归关系密切, 术前化疗即新辅助化疗是恶性肿瘤综合治疗手段之一。希罗达是结直肠癌辅助化疗的一线抗癌药物, 本实验通过术前口服希罗达后肿瘤微血管密度的改变, 从肿瘤血管行为学方面研究希罗达术前化疗对治疗结直肠癌的意义。

■同行评价

目前, capecitabine 在临床已得到广泛应用, 对TP和血管生成的影响也有较多研究成果, 因此本文学术价值一般, 可供临床参考。

一种新型口服氟化嘧啶类抗肿瘤药物。他以完整形式通过胃肠道, 经过肝脏和肿瘤中三种酶催化的一系列反应转化为5-氟尿嘧啶(5-FU)。首先由肝脏中的羧酸酯酶转化为5'-脱氧-5-氧胞嘧啶(5-DFCR), 然后由胞苷脱氨酶的作用下转化为5'-脱氧-5-氟尿嘧啶(5-DFUR), 最后由肿瘤组织含量较高的胸苷磷酸化酶(thymidine phosphorylase, TP)转化为5-FU, 从而发挥抗肿瘤作用^[1]。而胸苷磷酸化酶与血小板衍化内皮细胞生长因子(platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF)是同一物质, 是促血管生长因子之一, 能够刺激内皮细胞生长和趋化。有报道证实, TP/PD-ECGF在多种实体瘤中表达增高, 且与肿瘤微血管生长密切相关^[2]。我们应用免疫组织化学方法, 检测希罗达术前化疗组与对照组结直肠癌组织中的TP/PD-ECGF表达和肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD), 探讨术前希罗达化疗对结直肠癌组织TP/PD-ECGF表达与血管形成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-08/2004-08我院收治的结直肠癌患者57例。术前化疗组32例, 结肠癌14例, 直肠癌18例; 男25例, 女7例, 年龄33-67(中位43)岁。对照组25例, 结肠癌14例, 直肠癌11例; 男20例, 女5例, 年龄36-70(中位45)岁。两组患者术前均经病理确诊, 术后有病理诊断证实, 其中管状腺癌39例、乳头状腺癌6例、黏液腺癌7例、印戒细胞癌3例、未分化癌2例。两组年龄、肿瘤分期、分化程度、转移等方面统计学上均具有可比性。实验组术前口服希罗达1250 mg/m², 每日2次, 连续1 wk后手术; 对照组术前不进行任何化疗或放疗。

1.2 方法 手术切除新鲜标本经40 g/L甲醛固定、石蜡包埋, 常规HE染色法及免疫组织化学SP法标记CD34和TP/PD-ECGF。采用DAB染色。SP试剂盒、鼠抗人TP/PD-ECGF mAb、鼠抗人CD34 mAb, 均购自北京中山生物试剂公司。TP/PD-ECGF染色后主要定位于细胞质, 呈黄色, 偶有胞核染色。TP/PD-ECGF表达阳性根据细胞染色强度和染色细胞所占面积两者积分来判断。染色强度积分为: 不染色 = 0; 轻度染色 = 1; 中度染色 = 2; 强染色 = 3。染色面积分为: 无细胞染色 = 0; <25%细胞染色 = 1; 25%-50%细胞染色 = 2; >50%细胞染色 = 3。若两种积分之和>2, 则为TP/PD-ECGF表达阳性, ≤2则为表达阴性^[3]。

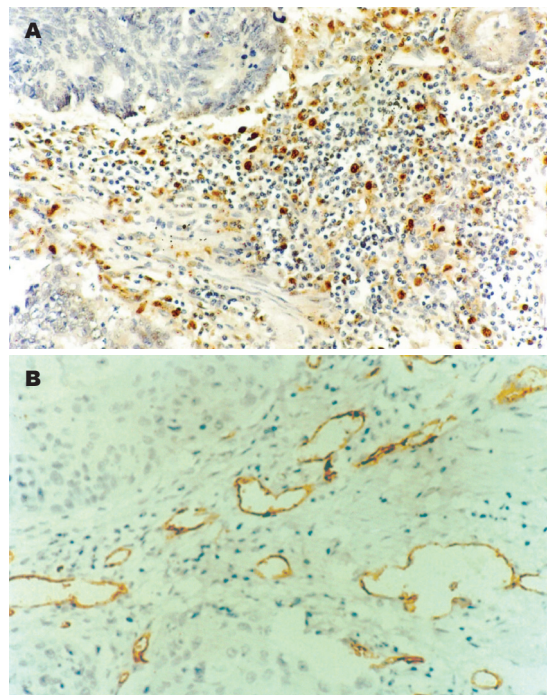


图1 结直肠癌组织TP和CD34阳性(SP×200)。A: TP; B: CD34。

CD34⁺染色后定位于内皮细胞胞质, 呈棕褐色。先用低倍镜(×40倍)扫视整个切片以寻找高血管密度区即“热点”区, 再转到高倍镜(×200倍)下通过计算机显微图像分析系统在监视器上计数微血管数目。取3个热点区微血管数量的平均值作为每例的微血管数。微血管判断不以红细胞的出现来确定是否为血管, 也不以是否出现管腔来计数血管。凡染成棕黄色、数个内皮细胞或内皮细胞簇作为一个血管计数, 凡管腔大于8个红细胞大小、带有肌层的血管均不计数^[4]。

统计学处理 TP/PD-ECGF表达为计数资料, 采用 χ^2 检验。微血管密度MVD为计量资料以mean±SD表示, 显著性检验采用t检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 TP/PD-ECGF表达 以肿瘤浸润前沿的肿瘤细胞多见而肿瘤中心的细胞团少有阳性表达或呈弱阳性表达(图1A)。术前化疗组TP/PD-ECGF表达阳性率(10/32, 31.2%)较对照组(15/25, 60.0%)明显降低($P<0.05$)。

2.2 微血管密度MVD 结直肠癌组织中微血管内皮细胞均为CD34⁺染色阳性, 呈棕褐色。微血管呈圆形或椭圆形, 多见于肿瘤间质(图1B)。术前化疗组 MVD值明显低于对照组, 其差异具显著

性(20.7 ± 8.5 vs 42.3 ± 7.8 , $P < 0.05$).

3 讨论

氟化嘧啶类抗肿瘤药5-FU作为静脉化疗药临床上得到广泛应用,但其不良反应限制了对许多患者的使用.近年来,氟化嘧啶类药物的研制和临床应用都取得了相当大的成就,抗肿瘤活性不断提高,毒副作用逐渐减轻,特别是氟铁龙、希罗达等具选择特异性的新药的应用,因其巧妙的结构设计和独特的活化机制,成功的提高了抗肿瘤的特异性.尤其是希罗达(卡培他滨, capecitabine)是一种对肿瘤细胞有选择性活性的口服细胞毒制剂.作为一种肿瘤内激活的口服药物,希罗达对抗肿瘤选择性高,特异性强而引起肿瘤化疗界的广泛重视^[5].希罗达是5-FU的前体物质,在TP酶作用下才转化为5-FU而发挥抗肿瘤作用.一般认为癌细胞增殖旺盛,核酸合成活跃,TP酶的活性高,故TP酶在肿瘤组织异常增高,高于正常组织3-10倍^[6],且其活性增高往往预示预后不良^[7].正由于TP酶具有特异的组织分配特性,即在肿瘤组织中的活性均高于正常组织,因此希罗达也在肿瘤组织局部分解活跃,从而显示出希罗达的选择特异性抗肿瘤作用^[8],TP酶与PD-ECGF为同一物质,而后者有促血管生长作用.5-FU与胸腺嘧啶结构相似,故TP/PD-ECGF酶能催化抗嘧啶代谢药5-FU和2-脱氧-核糖-1-磷酸反应生成5'-氟-2'-脱氧尿苷(5'-FduR);其最终代谢产物使DNA合成障碍.因2-脱氧-核糖-1-磷酸是TP/PD-ECGF酶降解产物之一,也有促血管生成作用,故氟尿嘧啶类化疗药有双重功能:阻断DNA合成,消除潜在血管生长因子^[9].据报道称肿瘤PD-ECGF与肿瘤微血管密度密切相关,且TP/PD-ECGF可致肿瘤组织微血管密度增加及肿瘤组织凋亡减少^[10-11],因此TP也是重要的肿瘤预后因子之一^[12].希罗达能够选择性的在肿瘤组织高的TP酶的作用下转化为5-FU,发挥了双重功效,既减少TP酶活性,从而减少肿瘤血管增生,同时又抑制肿瘤细胞DNA合成,也降低了对正常组织的毒性作用,为肿瘤联合化疗及抗血管增生提供机会.

我们也发现,术前希罗达化疗后TP表达阳性率31.2%明显低于对照组60.0%,且其肿瘤组织的MVD值 20.7 ± 8.5 也低于对照组MVD值 42.3 ± 7.8 .说明术前希罗达化疗能降低大肠癌组织的TP活性,减弱其血管增生作用,从而减少肿瘤微血管的增生.我们还发现,无论实验组或对

照组,其TP阳性组MVD值总高于TP阴性组,其差异有统计学意义.表明TP/PD-ECGF与结直肠癌微血管形成密切相关,是大肠癌血管形成与维持的重要因子.从免疫组织化学染色图片上,与Okada *et al*^[13]观察到的一样,我们也发现,TP/PD-ECGF阳性染色主要见于肿瘤浸润边缘的癌细胞,而肿瘤中心的癌细胞团少有阳性染色,而CD34⁺标记的微血管其分布亦具异质性,即肿瘤间质尤其肿瘤浸润前缘的微血管较肿瘤内部密集,肿瘤间质中的巨噬细胞、内皮细胞、淋巴细胞也有阳性染色.肿瘤微血管主要积聚于肿瘤组织间质.这进一步说明,位于肿瘤组织间质的TP/PD-ECGF与肿瘤组织的微血管形成有密切关系.同时我们发现,希罗达的毒副作用相对较轻,主要表现为恶心、腹泻、手足综合征等,无III、IV度以上不良反应.

已知细胞或生长因子如白介素-1、bFGF和IFN- α 能上调PD-ECGF的TP酶活性,肿瘤微环境的低氧和低pH也有一定影响.故希罗达可能通过其抗肿瘤毒性而使白介素-1、肿瘤坏死因子等减少或通过改变肿瘤低氧、pH而下调TP活性,从而抑制肿瘤微血管增生^[14].总之,希罗达是一新型的口服氟化嘧啶类抗代谢作用的药物.其作用于依赖TP酶,而TP酶又具有独特的具酶活性的促血管生成作用.故TP酶能增强希罗达的抗肿瘤作用.希罗达以其独特的结构与活化机制,使其有别于5-FU而成为有选择性抗肿瘤作用,提高了肿瘤的活性,减低了毒副作用,成功地提高了抗肿瘤特异性.近年来临床上屡见报道希罗达有效治疗其他化疗药或5-FU化疗失败的结直肠癌或乳腺癌患者^[15].因此检测TP酶活性可以有效指导化疗.且希罗达可口服,依从性好,副作用少,对于TP酶高的肿瘤,尤其是消化道肿瘤应用希罗达有独特疗效,从抗肿瘤生长及抗血管增生方面是理想的化疗药物.

4 参考文献

- 1 Schmoll HJ, Arnold D. Update on capecitabine in colorectal cancer. *Oncologist* 2006; 11: 1003-1009
- 2 Jiang LN, Yu SY, Xiong HH, Zhang MX. Expression of thymidine phosphorylase in cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004; 26: 297-299
- 3 Mattern J, Koomagi R, Volm M. Biological characterization of subgroups of squamous cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1459-1463
- 4 Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 169-180
- 5 Toi M, Atiqur Rahman M, Bando H, Chow LW.

- Thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial-cell growth factor) in cancer biology and treatment. *Lancet Oncol* 2005; 6: 158-166
- 6 Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I, Ishitsuka H. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1274-1281
- 7 余细球, 邓长生, 朱尤庆, 程芳洲. 大肠癌组织胸苷磷酸化酶/血小板衍生内皮细胞生长因子的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1197-1199
- 8 Koizumi W, Saigenji K, Nakamaru N, Okayasu I, Kurihara M. Prediction of response to 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) in patients with inoperable advanced gastric cancer by immunostaining of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor. *Oncology* 1999; 56: 215-222
- 9 Shuai XM, Han GX, Wang GB, Chen JH. Cyclin D1 antisense oligodeoxynucleotides inhibits growth and enhances chemosensitivity in gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1766-1769
- 10 Osaki M, Sakatani T, Okamoto E, Goto E, Adachi H, Ito H. Thymidine phosphorylase expression results in a decrease in apoptosis and increase in intratumoral microvessel density in human gastric carcinomas. *Virchows Arch* 2000; 437: 31-36
- 11 Okamoto E, Osaki M, Kase S, Adachi H, Kaibara N, Ito H. Thymidine phosphorylase expression causes both the increase of intratumoral microvessels and decrease of apoptosis in human esophageal carcinomas. *Pathol Int* 2001; 51: 158-164
- 12 Ma T, Zhu ZG, Ji YB, Zhang Y, Yu YY, Liu BY, Yin HR, Lin YZ. Correlation of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase with sensitivity of gastrointestinal cancer cells to 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 172-176
- 13 Okada K, Yokoyama K, Okihara K, Ukimura O, Kojima M, Miki T, Takamatsu T. Immunohistochemical localization of platelet-derived endothelial cell growth factor expression and its relation to angiogenesis in prostate. *Urology* 2001; 57: 376-381
- 14 Tsuneyoshi K, Haraguchi M, Hongye Z, Gotanda T, Tachiwada T, Sumizawa T, Furukawa T, Baba M, Akiyama SI, Nakagawa M. Induction of thymidine phosphorylase expression by AZT contributes to enhancement of 5'-DFUR cytotoxicity. *Cancer Lett* 2006; 244: 239-246
- 15 Delord JP, Pierga JY, Dieras V, Bertheault-Cvitkovic F, Turpin FL, Lokiec F, Lochon I, Chatelut E, Canal P, Guimbaud R, Mery-Mignard D, Cornen X, Mouri Z, Bugat R. A phase I clinical and pharmacokinetic study of capecitabine (Xeloda) and irinotecan combination therapy (XELIRI) in patients with metastatic gastrointestinal tumours. *Br J Cancer* 2005; 92: 820-826

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2007 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。

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: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、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、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》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,出版日期每月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。

猝死型胰腺炎误诊分析3例

张碎虎, 谷未强, 李亚娟

张碎虎, 谷未强, 李亚娟, 北京市昌平区中医医院急救中心
北京市 102200

通讯作者: 张碎虎, 102200, 北京市昌平区昌平镇东环路, 北京市昌平区中医医院急救中心. doctorzsh@sina.com
电话: 010-80102499 传真: 010-69742196

收稿日期: 2006-09-08 接受日期: 2006-10-11

摘要

本文通过3例猝死型胰腺炎的发病过程及病理特点, 分析了猝死型胰腺炎临床特征: (1)发病至死亡时间短暂; (2)无明显诱发因素; (3)无胰腺炎特异性体征; (4)胰腺病理改变比较轻微; (5)胰头部胰腺坏死与呼吸骤停可能相关。

关键词: 猝死; 胰腺炎; 误诊

张碎虎, 谷未强, 李亚娟. 猝死型胰腺炎误诊分析3例. 世界华人消化杂志 2007;15(1):99-100

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/99.asp>

0 引言

猝死型胰腺炎或称重症急性坏死性胰腺炎, 是一进展极为迅猛、凶险, 可在极短时间内产生休克、呼吸困难或抽搐, 病死率为100%的疾病。其发生率约占急性出血坏死性胰腺炎的20%^[1], 占猝死病例的10%左右^[2]。由于病因复杂, 发病机制尚未完全明了, 临床多无典型的症状和体征, 因此诊断多在尸检后明确^[3]。本文对2006-01/08在我院急救中心发生的3例猝死型胰腺炎进行分析。

1 病例报告

1.1 例1 患者, 男性, 52岁, 于凌晨1点就诊。急诊前1 h无诱因出现上腹部不适、恶心伴腹泻、呕吐两次。当地医院行心电图(ECG)检查提示正常后转入我院急诊科。查体: 体温(T) 36.6℃、脉搏(P) 89次/min、血压(BP) 130/80 mmHg, 心肺正常, 腹平软, 全腹无明显压痛及反跳痛, 移动性浊音阴性。辅助检查: 白细胞(WBC) $6.4 \times 10^9/L$, 淋巴细胞(L) 26%, 中性粒细胞(N) 74%; 血淀粉酶3050.6 nkat/L, 尿淀粉酶6634.7 nkat/L, 便常规未见异常。临床诊断: 急性胃肠炎。给予山莨菪

碱10 mg肌注, 法莫替丁40 mg、硫酸依替米星150 mg静脉滴注治疗4 h后, 患者在行腹部平片检查过程中突然出现呼吸停止。立即心肺复苏(cardiopulmonary resuscitation, CPR)2 h无效死亡。病理检查结果: 胰头部部分组织坏死, 可见出血及少量中性粒细胞浸润(LYS⁺), 大部分肺内充满淡粉染水肿液。

1.2 例2 患者, 男性, 56岁。入院前, 患者夜间2点睡眠中感上腹部不适伴恶心、呕吐。无放射痛及其他伴随症状。既往体健。查体: T 36.8℃, P 86次/min, BP 140/80 mmHg, 心肺正常。腹平软, 腹部按压后自觉症状缓解, 移动性浊音阴性。辅助检查: WBC $7.6 \times 10^9/L$, L 32%, N 68%; 血淀粉酶4034.1 nkat/L, 尿淀粉酶8101.6 nkat/L。急诊诊断急性胃炎。给予VitB₆ 200 mg、胃复安10 mg静脉注射。2 h后患者突然出现呼吸停止, CPR抢救30 min未获成功, 患者死亡。病理检查提示: 胰头部可见小灶性出血, 局部胰腺组织可见不同程度坏死、皂化。部分肺间质充血、水肿。

1.3 例3 患者, 女性, 48岁。夜间11点出现持续性上腹胀痛, 持续发作2 h不缓解, 伴恶心。既往体健。查体: T 36.5℃, P 90次/min, BP 170/100 mmHg。心肺正常。腹平软, 上腹部有压痛, 无反跳痛, 移动性浊音阴性。辅助检查: CPK 2750.6 nkat/L, AST 433.42 nkat/L, 肌钙蛋白T(TnT) 0.1 mg/L; 血淀粉酶2733.9 nkat/L, 尿淀粉酶4884.3 nkat/L。心电图检查正常。初步诊断: 腹主动脉夹层瘤。给予硝普钠持续静滴、补液、对症治疗。4 h后患者突然出现呼吸停止。经CPR抢救30 min未能成功。病理结果: 胰头部胰腺组织有小片状分布凝固性坏死, 被膜下及坏死区边缘有中性粒细胞浸润。部分肺间质水肿, 肺泡内充满淡粉色水肿液。

2 讨论

猝死型胰腺炎的发生率约占急性出血坏死性胰腺炎的20%^[1], 占猝死病例的10%^[2], 而其中38%-42%起病时无任何诱发因素^[4]。因目前临床发生猝死的第一位原因仍是心血管疾病^[5-6], 特

■背景资料

胰腺炎发生猝死的比例较高, 但人们对这种疾病认识仍然不足, 误诊率较高, 应就其发生机制、临床分型作进一步探讨。

■同行评价

本文选题较好,国内相关报道很少,具有一定的临床指导意义,但尚需完善。

别是具有心血管疾病病史和诱发因素的患者极易被误诊为心源性猝死(sudden cardiac death, SCD);加之临床医务人员对猝死型胰腺炎的重视程度不够,猝死型胰腺炎死前未被明确诊断者达80%^[7]。所以,猝死型胰腺炎容易被急诊科医师漏诊和误诊。目前,猝死型胰腺炎发生猝死的机制仍不十分明确,可能与胰腺在坏死时释放多种活性物质有关,这些物质引起人体一系列损害和抑制全身组织器官功能活动的反应,这种复杂的反应可能导致猝死型胰腺炎患者发生猝死^[8]。

总结本组病例有如下临床特点:(1)发病急骤;(2)3例患者均为壮年男女,既往体健;(3)发病前无明显诱发因素;(4)症状和体征均不典型;(5)猝死均发生于夜间;(6)猝死首先表现为呼吸骤停;(7)病变均局限于胰腺头部,胰腺坏死的病理表现比较轻微,肺组织有轻微改变,其余组织和器官无明显的病理改变。

本组病例临床显示,猝死型胰腺炎与呼吸骤停密切相关,但其机制仍需进一步探讨。从本组尸检病理显示,猝死型胰腺炎死者的肺脏结构改变比较轻微,而且我们的观察结果与国外报道相一致^[9]。这就表明,猝死型胰腺炎对呼吸的抑制作用可能是通过呼吸中枢发挥作用。已有资料证明,猝死型胰腺炎与急性呼吸窘迫综合征(ARDS)显著相关。Enquist *et al*^[10]报道有49.3%猝死型胰腺炎发生ARDS; Renner *et al*^[7]报道了入院7 d内死亡的猝死型胰腺炎中有80.9%有肺充血和肺水肿。Interiano *et al*^[11]首先报道ARDS见于22%的猝死型胰腺炎中,并对其发生机制做出初步的分析。作者认为胰腺炎在胰腺坏死时胰蛋白酶抑制剂的减少使胰蛋白酶激活激肽系统而损伤肺血管;活性胰蛋白酶可促使

微血管内纤维蛋白凝固形成微血栓;肺局部游离脂肪酸增加而损伤肺泡膜,增加磷脂酶A2活性,从而导致肺萎缩^[12]。从本组病例中还可以推测出:(1)发生于胰腺头部的胰腺炎与呼吸骤停有一定的关系;(2)胰头部胰腺炎猝死率可能高于胰腺体部和尾部。这些推测也需临床进一步证实。

3 参考文献

- 1 顾倬云,张国华,陈乐真.急性胰腺炎死亡病例研究.中华外科杂志 1991; 29: 315-318
- 2 Lankisch PG, Schirren CA, Kunze E. Undetected fatal acute pancreatitis: why is the disease so frequently overlooked? *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 322-326
- 3 Di Paolo M, Marradi I. Haemorrhagic complication of acute necrotizing pancreatitis presenting with sudden death. *J Clin Forensic Med* 2006; 13: 271-273
- 4 Wilson C, Imrie CW. Deaths from acute pancreatitis: why do we miss the diagnosis so frequently? *Int J Pancreatol* 1988; 3: 273-281
- 5 Silver MD. Cardiovascular Pathology. Vol2 First Edition. New York: Churchill livingstone. 1983: 1179
- 6 李山,唐小玲,李志尚.225例老年人猝死尸检分析.实用老年医学 1995; 9: 172-173
- 7 Renner IG, Savage WT 3rd, Pantoja JL, Renner VJ. Death due to acute pancreatitis. A retrospective analysis of 405 autopsy cases. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 1005-1018
- 8 Gu ZY. Deaths due to acute pancreatitis. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1991; 29: 315-318, 335
- 9 Cohen MH, Rotsztain A, Bowen PJ, Shugoll GI. Electrocardiographic changes in acute pancreatitis resembling acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1971; 82: 672-677
- 10 Enquist IF, Gliedman ML. Gross autopsy findings in cases of fatal acute pancreatitis. *AMA Arch Surg* 1958; 77: 985-991
- 11 Interiano B, Stuard ID, Hyde RW. Acute respiratory distress syndrome in pancreatitis. *Ann Intern Med* 1972; 77: 923-926
- 12 Steinberg W, Tenner S. Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 1994; 330: 1198-1210

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版

本刊讯 《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式,自1995年起,发表的文章可以在线免费阅读全文(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>).自2003-04-15至今2006-11-27,电子版的点击次数为13708834,平均每天点击10409次。总下载次数166750,平均每天下载126次。(世界胃肠病学杂志社2007-01-08)

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年度《世界华人消化杂志》的总被引频次为2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位。2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46。

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(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃

《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.

ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或 $T_{1/2}^1$, 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*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), $T_{\max}$, $C_{\max}$, *Vd*, $T_{1/2}$ *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD 改为*M_r* 30 000或30kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°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(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M_r*明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一

律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10⁻³ g与5×10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

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χ²; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*ν*; (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^a*P* <0.05, ^b*P* <0.01(*P* >0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^c*P* <0.05, ^d*P* <0.01; 第三套为^e*P* <0.05, ^f*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±

0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度,例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean $\pm$ SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如3 614.5 $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成3.6 $\pm$ 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)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码。格式如:张旭晨,梅立新,承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如:张旭晨,男,1966-02-26生,河北省定县人,汉族。1994年北京中医药大学硕士,讲师。主要从事消化系统疾病的病理研究。

3.5 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如:通讯作者:马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅,方便检索,英文题名以不超过10个实词为宜,应与中文题名一致。

作者 署名一般不超过8人。作者姓名汉语拼音拼写法规定为:先名,后姓;首字母大写,双名之间用半字线“-”分开,多作者时姓名间加逗号。格式如:“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者,后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-

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。

Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致。格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征。如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准。如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨, 高瑞丰, 李炳庆, 马连生, 梅立新, 吴玉珍, 刘凤芹, 廖振林. 胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. *世界华人消化杂志* 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的

研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表 图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 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 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码。如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文

献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方). 按顺序编号装订, 并考入磁盘内. 在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. 参考文献格式如下:

- 1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部, 所有来稿均需接受同行审阅.

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的. 投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名

单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员. 审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理. 录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬).

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 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光盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

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

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献.

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>. 邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社.

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95)225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

蔡开琳 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

陈凇 教授
中国人民解放军总医院普通外科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

程英升 副教授
上海交通大学附属第六人民医院放射科、上海交通大学影像医学研究所

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

龚国忠 教授
中南大学湘雅二医院肝病研究中心

谷俊朝 主任医师
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

黄金华 副教授
中山大学肿瘤医院影像介入科

季国忠 主任医师
南京医科大学第二附属医院消化科

李定国 教授
上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

李靖 副教授
第三军医大学新桥医院肝胆外科

李涛 主治医师
北京大学人民医院肝胆外科

李永哲 副教授
北京协和医院检验科

刘铁夫 教授
哈尔滨医科大学附属第四医院消化科

聂青和 副教授
第四军医大学唐都医院传染病科、全军感染病诊疗中心

潘秀珍 教授
福建省立医院消化研究室

邱双健 副教授
复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

宋振顺 教授
第四军医大学西京医院肝胆外科

孙诚谊 教授
贵阳医学院附属医院院长办公室

汪波 副主任医师
北京大学第一医院急诊科

王健生 副教授
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

杨维良 主任医师
哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

杨希山 教授
广东省中医药局

姚登福 教授
南通大学附属医院分子医学中心

郁宝铭 教授
上海市第八人民医院结直肠中心

周士胜 教授
大连大学医学院医学研究中心