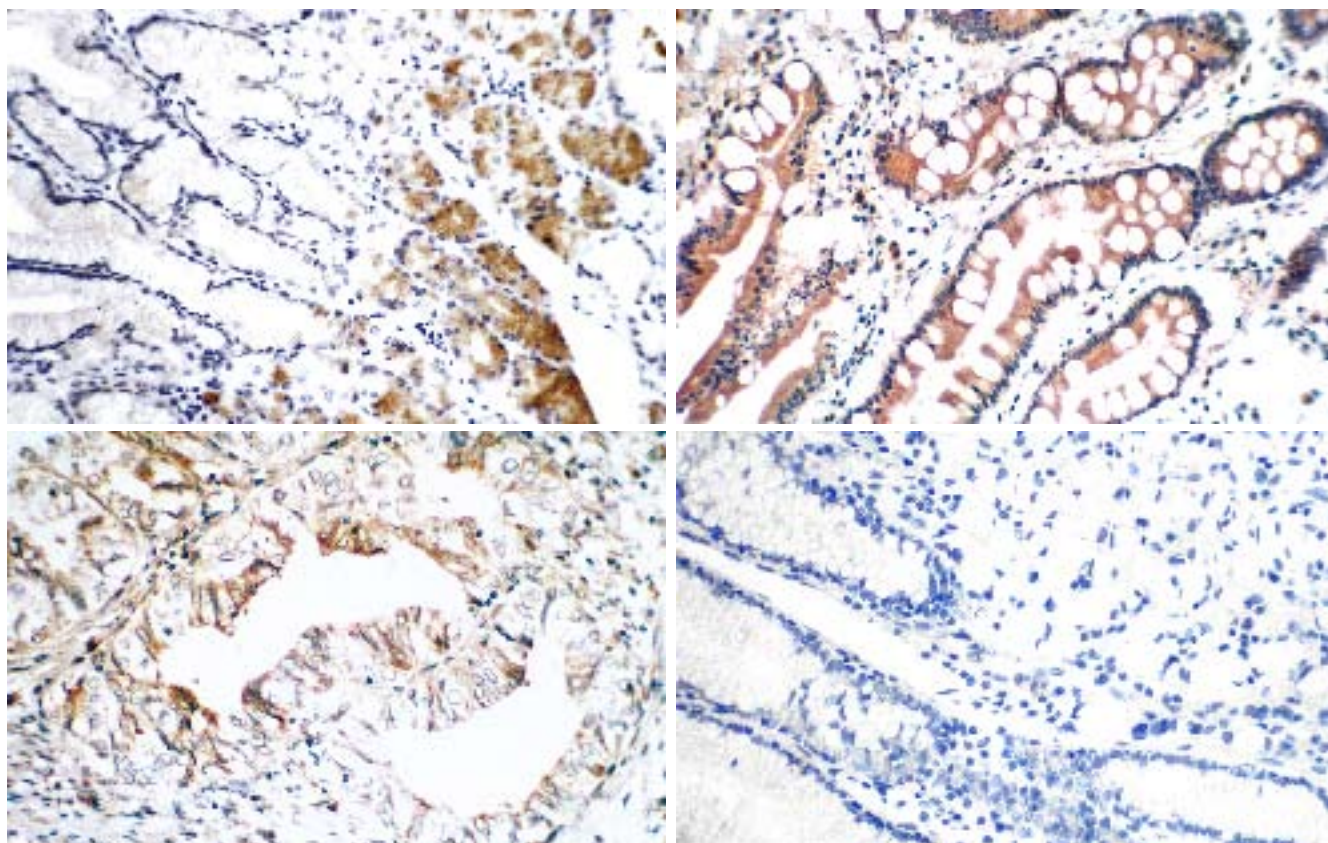


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2007 年 5 月 18 日 第 15 卷 第 14 期 (Volume 15 Number 14)



14/2007

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
黄象谦教授
黄志强教授
裘法祖教授
王宝恩教授
危北海研究员
吴孟超教授
杨春波教授
周殿元教授

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

陈士葆教授
房殿春教授
纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思风教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

成军教授
程英升副教授
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和副教授
王小众教授

编委

白爱平主治医师

白文元教授
白玉贤教授
别平教授
蔡淦教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
曹洁副教授
曹志成院士
苕新明教授
陈国凤主任医师
陈公琰主任医师
陈海龙教授
陈红松副研究员
陈积圣教授
陈建杰教授
陈建荣副教授
陈力教授
陈立波副教授
陈凇教授
陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈强谱教授
陈仕珠主任医师
陈卫昌教授
陈耀凯副教授
陈贻胜教授
陈玉林教授
陈知水教授
陈治水主任医师
陈祖林副教授

程爱国教授
程爱群主任医师
程斌副教授
程红岩教授
程树群副教授
迟宝荣教授
迟强教授
崔乃强教授
崔彦教授
崔毅主任医师
崔云甫教授
代文杰教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
党双锁副教授

邓长生教授
丁士刚主任医师
丁义涛教授
丁佑铭教授
董蕾教授
董明主任医师
杜群副研究员
杜祥教授
樊红副教授
范建高教授
范小玲主任医师
范志宁主任医师
房静远教授
冯红主任医师
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高成新教授
高春芳研究员
高峰教授
高润平教授
高英堂研究员
戈之铮教授
龚国忠教授
龚建平教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
关玉盘教授
管冬元副教授
郭克建教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
韩天权教授
韩新巍教授
郝春秋副教授
郝俊鸣副主任医师
何超教授
何生教授
何生松教授
何裕隆教授
何振平教授
洪天配教授
侯晓华教授

胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄恒青主任医师
黄金华副教授
黄文林教授
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
黄志勇副教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授
季加孚教授
姜波健教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
江家骥教授
蒋龙元副教授
金懋林教授
金瑞教授
匡安仁教授
兰平教授
蓝宇教授
劳绍贤教授
黎乐群教授
李定国教授
李东辉教授
李方儒教授
李国威教授
李华山副主任医师
李继强教授
李健丁教授
李杰副教授
李靖副教授
李军祥教授
李奇林教授
李胜研究员
李淑德教授
李涛主治医师
李小荣教授
李晓宇主任医师
李旭副教授
李延青教授
李永哲副研究员
李玉民教授
李玉明教授
李瑜元教授

李瑗教授
李增山副教授
李兆申教授
李振华教授
李智伟教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
林勇讲师
林志辉教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘冰熔教授
刘成海研究员
刘海林主任医师
刘建教授
刘鲁明教授
刘平教授
刘杞教授
刘铁夫教授
刘颖斌副教授
刘勇钢副主任医师
刘云鹏教授
刘占举教授
刘志苏教授
刘正稳教授
刘作金副教授
龙致贤教授
卢榜裕教授
卢实春教授
鲁华玉研究员
陆才德教授
陆伦根教授
陆云飞教授
禄韶英主治医师
吕明德教授
吕宁主任医师
吕云福教授
吕志武教授
马大烈教授
马金城教授
马力文主任医师
马欣主任医师
茅爱武主任医师
毛高平主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

梅林教授	师英强博士	王石林主任医师	许亚平副教授	张青云研究员
梅铭惠教授	石统东副教授	王晓艳副教授	宣世英教授	张群华教授
孟庆华教授	宋世兵主任医师	王效民教授	闫惠平研究员	张水军教授
宁琴教授	宋于刚教授	王新月教授	严律南教授	张小晋主任医师
倪润洲教授	宋振顺教授	王学美研究员	严以群主任医师	张晓岚教授
牛建昭教授	孙诚谊教授	王怡主任医师	阎晓初副教授	张绪清副教授
牛俊奇教授	孙殿兴主任医师	王正康教授	杨冬华教授	张学教授
欧希龙副教授	孙富强副教授	王志刚副主任医师	杨广顺教授	张肇达教授
潘林娜教授	孙家邦教授	王忠裕教授	杨建民教授	张占卿主任医师
潘兴华副主任医师	孙侃教授	卫洪波教授	杨建勇教授	张志坚教授
潘秀珍教授	孙秀发教授	魏经国教授	杨林副研究员	张宗明教授
彭波副教授	孙学英教授	魏来教授	杨维良教授	赵桂鸣主任医师
彭吉润主任医师	孙延平副主任医师	闻勤生教授	杨希山教授	赵桂珍教授
彭曦副研究员	邰升副教授	吴德全教授	杨尹默教授	赵景民教授
彭心宇教授	谭德明教授	吴河水教授	杨幼林主任医师	赵连三教授
彭志海教授	谭群友副教授	吴建国教授	杨云生教授	赵平副教授
朴熙绪主任医师	谭学瑞教授	吴健雄教授	杨昭徐教授	赵晓晏教授
朴云峰教授	汤恢煥教授	吴金术教授	姚登福教授	赵增仁副主任医师
钱建民教授	汤展宏副教授	吴君主任医师	姚鹏副教授	郑加生主任医师
钱林学主任医师	唐采白副教授	吴萍主任医师	姚树坤教授	郑民华教授
秦波教授	唐芙爱教授	吴晴教授	叶红军主任医师	郑鹏远教授
秦成勇教授	唐霓副研究员	吴泰璜教授	伊力亚尔·夏合丁教授	智发朝教授
秦春宏副主任医师	唐丽安教授	吴晓东教授	阴赅宏研究员	钟德珩教授
秦华东教授	唐世刚教授	吴志勇教授	殷正丰教授	周伯平教授
秦环龙教授	唐文富主治医师	席启主任医师	于恩达教授	周丁华主任医师
秦仁义教授	唐文皓副主任医师	夏建川研究员	于聪慧教授	周国雄主任医师
邱宝安主任医师	唐晓鹏教授	向德兵讲师	于红刚副教授	周士胜教授
邱双健副教授	唐旭东主任医师	肖恩华教授	于健春教授	周伟平教授
邱伟华副主任医师	唐志鹏研究员	谢敏主任医师	于良副教授	周文兴教授
仇毓东副教授	田德安主任医师	谢青教授	于晓峰主任医师	周霞秋教授
裘正军教授	田素礼教授	谢晓华副教授	于颖彦教授	周晓东研究员
曲智威副主任医师	童强主任医师	邢光明教授	于则利教授	周晓武副主任医师
任超世研究员	屠红副研究员	熊斌教授	余宏宇教授	朱传武副主任医师
任粉玉副教授	万军教授	徐爱民副教授	郁宝铭教授	朱春兰主任医师
任建安教授	汪波副主任医师	徐存拴教授	郁正亚副教授	朱立元教授
任建林教授	汪思应教授	徐大华主任医师	喻荣彬副教授	朱人敏教授
邵成浩讲师	王邦茂教授	徐德忠教授	袁伟建教授	庄林主任医师
邵先玉教授	王炳元教授	徐列明教授	曾勇教授	邹小明教授
邵永孚教授	王承党副教授	徐宁志研究员	展玉涛副主任医师	左国营副主任药师
沈洪教授	王春友教授	徐小元教授	张柏和教授	
沈俊教授	王广义教授	徐秀英副教授	张方信主任医师	
沈琳主任医师	王济明教授	徐迎新研究员	张凤春教授	
沈世强教授	王吉耀教授	徐智教授	张国梁主任医师	
沈守荣教授	王健生副教授	许春舫主任医师	张集昌主任医师	
沈薇教授	王凯教授	许戈良教授	张吉翔教授	
沈岩主任医师	王莉瑛教授	许乐主任医师	张锦生教授	
施诚仁教授	王烈主任医师	许玲副教授	张军教授	
施瑞华教授	王鲁副教授	许文燮教授	张明辉副主任医师	

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2007 年 5 月 18 日 第 15 卷 第 14 期 (总第202期)

述 评

1579 肝硬化门脉高压症内科治疗的选择与评价 丁惠国

基 础 研 究

- 1583 肝脏GJIC对大鼠体内肝卵圆细胞增殖的影响
李学东, 傅华群, 李少华, 尚西亮, 邢宏松, 胡鹏
- 1591 人末梢血 $\gamma\delta$ T细胞对消化系统肿瘤细胞的杀伤作用
陈复兴, 刘军权, 冯霞, 王涛, 张娟, 张颂, 陈桂林
- 1596 真核表达载体pcDNA3-CTLA4Ig转染小鼠对移植胰岛功能的影响
赵国华, 孙宏治, 钟鑫平, 张金祥, 许国岩, 赵宁, 程颖, 张佳林, 刘永锋
- 1602 肾母细胞瘤过度表达基因对大鼠肝星状细胞生物学行为的影响
徐冬, 林菊生, 任精华, 陈琼, 姚津剑, 何星星
- 1609 半夏泻心汤抑制DMH/DSS诱导的结肠炎相关性结肠癌的发生
冯娟, 刘莉, 李宇华, 孙阳, 张蓉, 刘振国, 王庆伟, 梅其炳
- 1615 AG490联合健择对人胰腺癌细胞生长的影响
陈钢, 袁正军, 黄陈

临 床 研 究

1622 CHFR和mp53基因编码蛋白在胃癌组织中的表达及临床病理学意义
高余佳, 辛彦, 张赛楠, 张家华, 吴东瑛

文 献 综 述

- 1628 应用蛋白质组学技术筛选胰腺癌生物标志物的研究进展
刘辉, 张海婧, 陈国强, 吕丽艳, 李智立
- 1634 益生菌对炎症性肠病的治疗作用和机制
杨明, 韩真

研 究 快 报

- 1639 胃癌相关基因GCRG213正反向转染和RNA干扰对裸鼠胃癌种植瘤的影响
徐世平, 吴本俨, 王孟薇, 高利利, 伍银桥, 王卫华, 尤纬缔
- 1643 蛇床子素对四氯化碳诱导小鼠脂质过氧化反应的影响
刘建新, 周青, 周俐, 赵海燕, 连其深
- 1646 维生素C和维生素E对小鼠化学性肝损伤的预防性保护作用
孙设宗, 唐微, 胡承江, 孟新云

临 床 经 验

- 1650 NERD患者埃索美拉唑联合莫沙必利与加强生活方式干预对照研究112例
季代金, 黄茂涛, 余宁, 赵悦, 陈勇
- 1654 煤矿工人胃部有关疾病与*H pylori*感染及相关因素的调查
范红敏, 袁聚祥, 张孔来, 徐应军
- 1658 原发性胃淋巴瘤内镜下表现及误诊分析
严瑾, 欧阳钦, 黄丽彬, 杨锦林
- 1662 事件相关电位P₃₀₀和简易智能精神状态检查在轻微型肝性脑病检测中的价值
许统俭, 陈剑群, 董瑞国, 李昕, 耿德勤
- 1665 溃疡性结肠炎患者Th1类细胞因子的表达
庞艳华, 郝建宇, 关玉盘, 郑长青, 张文杰

	1668 肠系膜上动脉狭窄的腔内介入治疗4例 宋盛晗, 张望德, 苑超, 李谈, 原标, 王克勤, 邢彤, 张杨 1673 不同途径注入大黄治疗急性重症胰腺炎 邓彬, 丁岩冰, 严志刚, 王远志, 吴健, 肖炜明
致 谢	1676 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	1590 世界华人消化杂志的同行评价 1601 肝胆胰外科领域新技术研讨会通知 1608 全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事 1614 第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨第四届消化介入新技术研讨会会议及征文通知 1621 中国中西医结合第十九次全国消化病学术会议最后通知 1633 世界华人消化杂志在线办公系统 1638 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报 1645 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 1649 2007年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知 1653 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》 1664 中国学术期刊综合引证报告(2006) 1672 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
封面故事	高余佳, 辛彦, 张赛楠, 张家华, 吴东瑛. CHFR和mp53基因编码蛋白在胃癌组织中的表达及临床病理学意义. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1622-1627 http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1622.asp
国际会议	9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2007-05-18

原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 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 程剑侠

电子编辑 张敏 郭海丽 何基才

责任编辑 张海宁

期刊名称 世界华人消化杂志

主管单位 山西省科学技术厅

主办单位 太原消化病研治中心

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

出版 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局

国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

世界华人消化杂志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。

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

特别声明

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

2007年版权归世界华人消化杂志所有

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

邮发代号 国外代号 国内定价
82-262 M 4481 每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

May 2007 Contents in Brief Volume 15 Number 14

EDITORIAL	1579 Evaluation on treatment of liver cirrhosis with portal hypertension <i>Ding HG</i>
BASIC RESEARCH	1583 Effects of gap junction intercellular communication in rat liver on the proliferation of hepatic oval cells <i>in vivo</i> <i>Li XD, Fu HQ, Li SH, Shang XL, Xing HS, Hu P</i> 1591 Cytotoxic effects of human peripheral blood $\gamma\delta$T cells on the tumor cells of digestive system <i>in vitro</i> <i>Chen FX, Liu JQ, Feng X, Wang T, Zhang J, Zhang S, Chen GL</i> 1596 Preventive effect of pcDNA3-CTLA4Ig plasmid transfection on islet allograft rejection in mice <i>Zhao GH, Sun HZ, Zhong XP, Zhang JX, Xu GY, Zhao N, Cheng Y, Zhang JL, Liu YF</i> 1602 Effect of nephroblastoma overexpressed gene on biological behaviors of rat hepatic stellate cells <i>Xu D, Lin JS, Ren JH, Chen Q, Yao JJ, He XX</i> 1609 Pinelliae Decoction for Purging Stomach-Fire inhibit the incidence of colitis-related colon cancer induced by 1, 2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate <i>Feng J, Liu L, Li YH, Sun Y, Zhang R, Liu ZG, Wang QW, Mei QB</i> 1615 Effect of AG490 combined with gemcitabine on the growth of human pancreatic cancer cells <i>Chen G, Qiu ZJ, Huang C</i>
CLINICAL RESEARCH	1622 Protein expression of checkpoint with fork head associated and ring finger and mutant p53 and their clinicopathological significances in gastric cancer <i>Gao YJ, Xin Y, Zhang SN, Zhang JH, Wu DY</i>
REVIEW	1628 Research progress in screening biomarkers of pancreatic cancer by proteomics techniques <i>Liu H, Zhang HJ, Chen GQ, Lv LY, Li ZL</i> 1634 Therapeutic effect and mechanism of probiotics on inflammatory bowel disease <i>Yang M, Han Z</i>
RAPID COMMUNICATION	1639 Effect of sense or anti-sense GCRG213 fragment and GCRG213 RNA interference on transplanted gastric carcinoma <i>in vivo</i> <i>Xu SP, Wu BY, Wang MW, Gao LL, Wu YQ, Wang WH, You WD</i> 1643 Influence of Osthole on lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride in mice <i>Liu JX, Zhou Q, Zhou L, Zhao HY, Lian QS</i> 1646 Protective effect of vitamin C and E against chemical liver injury in mice <i>Sun SZ, Tang W, Hu CJ, Meng XY</i>
CLINICAL PRACTICE	1650 Efficacy of esomeprazole, mosapride and lifestyle enhancement in the treatment of non-erosive gastroesophageal reflux disease: an analysis of 58 cases and comparative study <i>Ji DJ, Huang MT, Yu N, Zhao Y, Chen Y</i> 1654 A cross-sectional study on the relationship among <i>H pylori</i> infection, some risk factors and gas troduodenal diseases in coal miners <i>Fan HM, Yuan JX, Zhang KL, Xu YJ</i>

	1658 Endoscopic patterns and misdiagnosis of primary gastric lymphoma <i>Yan J, Ou-Yang Q, Huang LB, Yang JL</i> 1662 Value of event-related potential P₃₀₀ and mini-mental state examination in the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy <i>Xu TJ, Chen JQ, Dong RG, Li X, Geng DQ</i> 1665 Expression of Th1 type cytokines in patients with ulcerative colitis <i>Pang YH, Hao JY, Guan YP, Zheng CQ, Zhang WJ</i> 1668 Endovascular interventional treatment of superior mesenteric arteries stenosis <i>Song SH, Zhang WD, Yuan C, Li T, Yuan B, Wang KQ, Xing T, Zhang Y</i> 1673 Treatment of severe acute pancreatitis by different administration route: a comparative analysis <i>Deng B, Ding YB, Yan ZG, Wang YZ, Wu J, Xiao WM</i>
ACKNOWLEDGMENT	1676 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Gao YJ, Xin Y, Zhang SN, Zhang JH, Wu DY.</i> Protein expression of checkpoint with fork head associated and ring finger and mutant <i>p53</i> and their clinicopathological significances in gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(14):1622-1627 http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1622.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

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date May 18, 2007

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

Taiyuan Research and Treatment Center
for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

EDITING

Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wcjd@wcjdnet.com

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY-EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Deputy Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2007 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2007 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

肝硬化门脉高压症内科治疗的选择与评价

丁惠国

丁惠国, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科 北京市 100069

丁惠国, 首都医科大学博士研究生导师, 北京佑安医院肝病消化科主任, 北京中西医结合学会肝病专业委员会委员, 研究方向为慢性肝病及其并发症的基础与临床。

北京市自然科学基金项目, No. 7062032

通讯作者: 丁惠国, 100069, 北京市, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科, dinghuiguo@medmail.com.cn

电话: 010-83997155 传真: 010-63295525

收稿日期: 2007-05-01 接受日期: 2007-05-10

Evaluation on treatment of liver cirrhosis with portal hypertension

Hui-Guo Ding

Hui-Guo Ding, Department of Gastroenterology (hepatology), You'an Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China

Supported by the Natural Science Foundation of Beijing, No. 7062032

Correspondence to: Department of Gastroenterology (hepatology), You'an Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China. dinghuiguo@medmail.com.cn

Received: 2007-05-01 Accepted: 2007-05-10

Abstract

Gastroesophageal variceal bleeding (EVV) is a frequent and life-threatening complication in cirrhotic patients with portal hypertension. Despite advances in endoscopic and pharmacologic treatment for EVV, it remains an unacceptably high mortality and risk of rebleeding. For primary and secondary prevention of EVV, non-surgical treatment strategies are still particularly challenging. Nonselective beta blockade, propranolol, is considered the first choice in the primary prophylaxis of EVV. Somatostatin and its analogue, octreotide, have been used as first-line treatment for EVV. The rate of controlling EVV accounts for 85%-90%, pituitrin, a vasopressin has essentially been abandoned because of side effects. Available treatments for prevention of rebleeding have been recommended, such as the beta blockers, nitrates (especially used in combination with beta blockers), and mechanical therapies such as endoscopic sclerotherapy/

band ligation and transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS). TIPS should not be used as a first-line treatment for EVV, but as a rescue for medical or endoscopic treatment failure. The evaluations on combination of non-surgical treatment for EVV are still not more evidence-based medical trails. The clinical studies on treatment for slight varices and early portal hypertension are positively needed.

Key Words: Portal hypertension; Propranolol; Somatostatin; Transjugular intrahepatic portosystemic shunt; Endoscopic therapy

Ding HG. Evaluation on treatment of liver cirrhosis with portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1579-1582

摘要

心得安推荐作为预防Child A或B级肝硬化患者中-重度静脉曲张初次出血; 生长抑素及其类似物为急性食管胃底静脉曲张出血(EVB)的首选药物, 控制出血疗效85%-90%; 心得安或联合5-单硝异山梨醇、内镜下套扎或硬化剂可作为预防静脉曲张再出血的方法; 经颈静脉肝内门腔分流术(TIPS)仅为Child B或C级患者准备肝脏移植的过度。内科联合治疗方法的评价需要循证医学的证据, 轻度静脉曲张及早期门脉高压的治疗策略仍需要进一步研究。

关键词: 门脉高压症; 心得安; 生长抑素及其类似物; 经颈静脉肝内门腔分流术; 内镜治疗

丁惠国. 肝硬化门脉高压症内科治疗的选择与评价. *世界华人消化杂志* 2007;15(14):1579-1582

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1579.asp>

0 引言

肝硬化门脉高压症是指门静脉压力增加(>15 mmHg), 门静脉系统血流受阻和/或血流量增加, 伴侧支循环形成的一组临床综合征。近20年研究发现, 肝脏储备功能及肝静脉压力梯度(hepatic venous pressure gradient, HVP)是决定

■背景资料

食管胃底静脉曲张出血是肝硬化门脉高压症最严重的常见并发症, 近年来, 非手术治疗取得了很大的进步。但是, 食管胃底静脉曲张再出血率很高, 病死率仍高达20%-30%。因此, 肝硬化门脉高压症仍是目前国外医生面临的重要问题。

■研发前沿

近20 a来,国内外学者在细胞及分子水平较深入地研究了肝硬化门脉高压症的发生、发展机制,为临床治疗提供了新思路 and 药物。但是,临床医生面对这些治疗方法,如何科学、客观、正确的选择?本文提出了一些重要的观点。

食管胃底静脉曲张出血(EVB)的重要因素,如果HVP $G < 10$ mmHg,肝硬化患者不发生静脉曲张;如果HVP $G < 12$ mmHg,可控制门静脉高压相关的并发症^[1-3]。另一方面,门脉高压症的发病机制中存在许多可逆因素,为药物治疗提供了理论基础^[4-5]。因此,理论上讲,长期用药持续降低门脉压力,可能减少门脉高压症相关并发症的发生率,但目前仍无理想的治疗方法。本文概述近年来国内外有关肝硬化门脉高压症内科治疗的方法,临床医生如何正确选择与评价。

1 门脉高压症的生物学基础

门脉高压症发生的细胞分子生物学机制尚未完全阐明。目前认为,肝脏损伤是肝硬化门脉高压症形成的始动因素,而肝窦周细胞及其与血管活性介质间的相互作用是维持肝硬化门脉高压症及其进一步发展的重要因素,也是临床药物治疗的理论基础^[5]。在肝窦周细胞中,活化肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSCs)具有类平滑肌细胞的特性,表达内皮素、血管紧张素及生长抑素等多种血管活性物质的受体^[6]。HSCs的收缩与舒张在调节肝窦阻力及微循环中具有重要作用,与肝硬化门脉高压症的发生、发展有密切关系。近年来,以HSCs为靶点,研究如何调节HSCs的舒缩功能可能是门脉高压症内科治疗的新策略。

2 基本概念与共识^[7-8]

2.1 门脉高压症的治疗目的 (1)控制急性EVB; (2)预防食管胃底静脉曲张首次出血或再次出血; (3)改善肝脏贮备功能。

2.2 基本概念(根据Baveno IV 共识)^[7] (1)静脉曲张出血的诊断:急诊内镜检查(出血48 h内)是唯一可靠的诊断方法。内镜下可见静脉曲张活动性出血(渗血、喷血);曲张静脉血栓或血瘤形成;内镜下除曲张静脉外,无其他病灶; (2)出血控制失败:72 h内出现以下表现定义为控制出血失败。①6 h内输血4单位以上,生命体征不稳定(收缩压 < 70 mmHg,心率 > 100 次/min或心率增加 > 20 次/min; ②间断呕血或/和便血;收缩压降低20 mmHg以上或心率增加 > 20 次/min;继续输血才能维持Hb稳定; ③药物或内镜治疗后新鲜呕血或便血超过2 h;在没有输血的情况下,Hb下降3 g/d上; ④需要改变治疗方法。 (3)静脉曲张再出血:①出血控制后再次有活动性出血的表现:呕血或/和便血;收缩压降低20 mmHg以上或心率

增加 > 20 次/min;在没有输血的情况下,Hb下降3 g/d上; ②早期再出血:出血控制后72 h 6 mo内出现活动性出血; ③迟发性再出血:6 mo后出现活动性出血。

3 门脉高压症内科治疗策略^[7-10]

3.1 药物治疗

3.1.1 生长抑素及其类似物 生长抑素(somatostatin: 商品名为思他宁)在肝脏代谢,正常人半衰期为2-3 min,肝硬化患者半衰期为3-5 min。1982年人工合成了八肽生长抑素(Sandostatin: 商品名为善宁),其半衰期为70-90 min。有关生长抑素及其类似物对肝硬化门脉高压症血液动力学影响的研究报道结果不一致^[3,11]。研究发现,生长抑素及其类似物能降低HVP G 及肝脏血流量,全身动脉压及血管阻力无变化;也有研究发现,尽管生长抑素能减少肝脏血流量,但对HVP G 无影响。我们研究发现^[11],不同剂量善宁均能明显降低门脉压力,门脉血流量参数和门静脉最大血流速度(PFV $_{max}$)降低;octreotide 50 μ g/h组患者停药后48 h,门脉压力无明显回升;而octreotide 25 μ g/h组患者门脉压力逐步回升。生长抑素及其类似物影响门脉高压症血液动力学机制尚不完全清楚;认为通过生长抑素受体亚型抑制肝星状细胞的收缩及血管扩张活性物质的作用,如胰高血糖素、血管活性肠肽、一氧化氮等^[6,11]。控制急性EVB疗效达85%-90%,国内大多数专家推荐将该类药作为首选。对于生长抑素及其类似物控制出血失败者,内科可考虑急诊内镜或三腔二囊管压迫控制急性出血,Child-Pugh A级肝硬化患者还可行急诊外科手术。近10年来,内科药物治疗门脉高压症并发EVB取得了很大的成绩,病死率基本在20%以内。

3.1.2 血管加压素及其类似物 人工合成的血管加压素为9肽,半衰期为10-20 min,较早推荐用于治疗EVB。近来发现,急性出血患者与非出血者比较,血管加压素几乎没有降低HVP G ;同时,出血伴有休克者与不伴休克者比较,血管加压素未明显降低HVP G 。因此,对血管加压素治疗EVB提出疑问。但也有资料表明:门脉高压症循环血管扩张因子增加可能减弱对血管加压素的反应。血管加压素及其类似物通过血管平滑肌V2受体引起血管收缩。多数学者报道,该类药控制首次急性EVB疗效为50%-60%,停药24-48 h再出血率为45%,约1/3患者出现明显的不良反应。国内主要应用垂体后叶素,其疗效与血管加

压素相似, 价格低廉, 在一些基层医院仍作为控制急性EVB的一线药物。

3.1.3 心得安(普萘洛尔) 心得安是一种非选择性 β 受体阻滞药, 用于治疗门脉高压症近30年历史。大量临床研究证实^[1-2,7]: 普萘洛尔可作为预防中-重度静脉曲张首次或及再出血的标准治疗, 不宜作为急性EVB的治疗。普萘洛尔从小剂量开始, 20-40 mg/d, 最大剂量为160 mg/d, 副反应少, 价格低廉。普萘洛尔的反应指标: HVPg降低到12 mmHg以下, 能防止静脉曲张出血; 或心率下降基础心率的25%(不低于55次/min)。禁忌证: (1)Child C级患者: 普萘洛尔通过减少肝动脉血液灌注和门静脉血液灌注而发挥作用, 会因肝脏血液灌注减少而加重肝脏损害; (2)其他禁忌证, 如窦性心动过缓, 支气管哮喘, 慢性阻塞性肺部疾病、低血压、房室传导阻滞等。长期服药后突然停药可引起胃肠道出血; 然而, 没有证据说明这种所谓的反跳性出血是一个严重的问题。对于肝硬化Child A或B级患者, 如果对心得安的反应性差或基础心率低, 可联合应用血管扩张药, 如硝苯吡啶、5-单硝酸异山梨醇等, 但仍需要更多临床循证医学依据。

3.1.4 其他值得期望的药物 包括血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素受体阻断剂^[2-4]。

失代偿期肝硬化患者应用ACEI目的是改善不良的水钠代谢、降低HVPg。近来发现, 肝硬化氮质血症腹水患者多次服伊那普利(enalapril, 10 mg/d), 早期动脉压明显下降, 平均每天尿量增加12%-14%, 尿钠增加40%-50%; 尿PGF₂, 6-酮-PGF_{1 α} 及激肽水平增加。因此, 伊那普利能改善肝硬化氮质血症腹水的肾功能及水钠潴留, 但对HVPg的影响及防治EVB的作用缺少临床研究。

门静脉血管系统存在血管紧张素受体(AT), 其中75%为AT₁亚型, 25%为AT₂亚型。近来研究表明, AT₁受体阻断剂-氯沙坦可显著降低HVPg, 有效地降低门脉压^[12]。Schneider *et al*^[13]洛沙坦(Losartan)用于30例重度食管静脉曲张(HVGP $\geq$ 20 mmHg)和15例中度静脉曲张(HVGP<20 mmHg)的门静脉高压症患者, 25 mg/d, 1 wk后重度组HVGP下降(46.8 $\pm$ 15.5)%, 中度组下降(44.1 $\pm$ 14.7)%, 平均动脉压仅有轻微下降, 对肝、肾无损害, 是预防EBV非常有潜力的一种药物, 但尚需进一步临床研究^[14]。

3.1.5 药物联合应用 由于部分肝硬化门脉高压患者因各种原因对药物无反应或不宜使用, 故需选择联合用药(表1)。

表1 肝硬化门脉高压症治疗药物的选择

推荐药物及方法	
急性出血	一线药物: 生长抑素(思他宁)或其类似物(善宁) 血管加压素/垂体后叶素 + 硝酸甘油/酚妥拉明
预防初 次出血	一线药物: 心得安
预防再 次出血	心得安+5-单硝酸异山梨醇/螺内酯/硝苯吡啶
	一线药物: 心得安
	心得安+5-单硝酸异山梨醇/螺内酯/硝苯吡啶 长效生长抑素类似物、血管紧张素受体拮抗剂

理想的药物至少应具备: 选择性作用内脏血管床, 降低门静脉压; 能维持肝脏有效血液灌注及改善肝功能; 长期甚至终身用药方便, 依从性好。因此, 寻找新的药物、药物优化组合等仍需进一步的基础和临床研究。

3.2 内镜治疗 内镜治疗的目的是控制急性食管静脉曲张出血及尽可能使静脉曲张消失或减轻以防止其再出血。内镜治疗包括硬化剂或组织黏合剂注射治疗(EIS)、内镜下曲张静脉套扎术(EVL)和EIS, EVL治疗EVB分别有50和20 a历史。临床研究证明^[7-8,12], EIS/EVL控制EBV与生长抑素及其类似物相似, 因此在活动性EVB时, 不推荐作为首选。在预防EVB方面, 国外较多临床研究证明, EVL在预防肝硬化患者初次EVB效果与心得安相似。由于国内医疗环境原因, 大多数专家推荐EIS/EVL仅作为防治肝硬化患者再次EVB的方法, EIS/EVL连续3次以上的患者, 其静脉曲张约50%可消失或明显减轻。国内多数学者推荐内镜下组织黏合剂注射仅适合胃底静脉曲张出血, 内镜下激光治疗静脉曲张出血国内外文献报道少, 影响内镜治疗效果的因素, 包括血液动力学、侧枝循环及肝功能等需要多中心联合研究评价。内镜治疗禁忌证: 活动性大出血, 循环状态不稳定者; 肝性脑病不合作者, 患者或家属拒绝签字者。

3.3 放射介入治疗 TIPS介入治疗在短期内明显降低门静脉压, 因此推荐用于治疗EVB^[1,7,10]。(1)适应证: ①难控制的急性EVB; ②多次内镜治疗无效的静脉曲张出血; ③顽固性腹水。(2)禁忌证: ①严重的或快速进展性肝功能衰竭; ②严重的或难以控制的肝性脑病; ③严重出血倾向。TIPS术前多科讨论, 判断手术成功的可能性和存在的风险; 由于TIPS远期效果差。因此, 专家建议该方法是肝移植的过度。近年来, 聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)内膜支架应用于临床, 明显降低了TIPS术后再狭窄及血

■创新盘点

本文就国内外肝硬化门脉高压症临床与基础研究的进展, 结合我国医疗技术水平, 提出了内科治疗的策略及亟待研究的问题。

■应用要点

肝硬化门脉高压症患者预后差, 医生诊治过程中承担的风险大。本文就目前我国医疗环境, 为临床医生如何科学、客观、正确的选择门脉高压症的治疗方法, 以获得最大的疗效, 将风险降至最小, 本文有较重要的参考价值。

■同行评价

本文对肝硬化门脉高压症内科治疗的选择与评价进行了较全面论述,内容重要,新颖。论述思路清晰,论据充分,所提观点可信,具有较高学术价值。

栓形成,远期效果提高,但需要进一步临床对照研究。

食管胃冠状静脉栓塞术治疗EVB已有50多年历史,控制出血率为90%左右。缺点是创伤较大,由于近几年EIS及EVL的普及,经皮经肝胃冠状静脉栓塞术很少开展,不推荐作为EBV的治疗方法。

4 问题与展望

对于轻度静脉曲张的处理意见及是否用药物预防肝硬化患者静脉曲张的发生,目前缺乏可靠的临床对照研究。已有的数据证明,心得安不能预防静脉曲张的发生、发展。因此,多数学者建议,对于明确诊断的肝硬化患者,每年一次内镜检查,了解静脉曲张的情况。HVPg是预测肝硬化门脉高压症是否发生相关并发症及评价降门脉压药物的理想指标,但是HVPg测定创伤较大,临床难常规开展。非常有兴趣的是,2007年欧洲肝脏病年会(EASL)有专家报道,采用无创方法测定肝脏硬度(liver stiffness, LS)可反映HVPg^[15]。因此,测定LS进一步研究门脉高压症发生发展的自然史,随机、对照研究药物、内镜、放射介入及多种联合治疗等方法预防肝硬化患者1 a、2 a等EVB的效果及成本-效益,具有重要的临床价值。

5 参考文献

- 1 Sharara AI, Rockey DC. Gastroesophageal variceal hemorrhage. *N Engl J Med* 2001; 345: 669-681
- 2 Blei AT. Portal hypertension and its complications. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 275-282
- 3 Gonzalez A, Augustin S, Perez M, Dot J, Saperas E,

Tomasello A, Segarra A, Armengol JR, Malagelada JR, Esteban R, Guardia J, Genesca J. Hemodynamic response-guided therapy for prevention of variceal rebleeding: an uncontrolled pilot study. *Hepatology* 2006; 44: 806-812

- 4 Minor MA, Grace ND. Pharmacologic therapy of portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2006; 10: 563-581
- 5 丁惠国, 汪俊韬, 于中麟. 门脉高压症的细胞调节机制. *中华肝脏病杂志* 1998; 6: 121-122
- 6 张娟, 丁惠国, 尤红, 唐淑珍, 尚宏伟, 王兴翠, 贾继东. 生长抑素受体亚型在人肝星状细胞的表达及其临床意义. *首都医科大学学报* 2006; 27: 441-444
- 7 de Franchis R. Evolving consensus in portal hypertension. Report of the Baveno IV consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol* 2005; 43: 167-176
- 8 丁惠国, 于中麟, 胡中杰, 金瑞. 预防食管胃底静脉曲张再出血的内科治疗: 荟萃分析. *中华消化内镜杂志* 2000; 17: 228-229
- 9 Triantos CK, Burroughs AK. Prevention of the development of varices and first portal hypertensive bleeding episode. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 31-42
- 10 Longacre AV, Garcia-Tsao G. A commonsense approach to esophageal varices. *Clin Liver Dis* 2006; 10: 613-625
- 11 卢实春, 孟繁坤, 丁惠国, 张劲光, 丁蕾, 王淑珍. 双倍剂量奥曲肽对肝硬化门脉高压症断流术后患者血液动力学的影响. *中华内科杂志* 2007; 46: 290-293
- 12 Habib A, Sanyal AJ. Acute Variceal Hemorrhage. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2007; 17: 223-252
- 13 Schneider AW, Kalk JF, Klein CP. Effect of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, on portal pressure in cirrhosis. *Hepatology* 1999; 29: 334-339
- 14 Castano G, Viudez P, Riccitelli M, Sookoian S. A randomized study of losartan vs propranolol: Effects on hepatic and systemic hemodynamics in cirrhotic patients. *Ann Hepatol* 2003; 2: 36-40
- 15 The European Association for the Study of the Liver. Cirrhosis and its Complications. *J hepatol (supplement)* 2007; 46: S34-S35

电编 郭海丽 编辑 张海宁

肝脏GJIC对大鼠体内肝卵圆细胞增殖的影响

李学东, 傅华群, 李少华, 尚西亮, 邢宏松, 胡鹏

李学东, 傅华群, 尚西亮, 邢宏松, 胡鹏, 南昌大学第二附属医院肝胆外科 江西省南昌市 330006

李少华, 黑龙江省鸡东中医院普外科 黑龙江省鸡西市 158200

李学东, 医学博士, 主要从事缝隙连接蛋白对干细胞生物学效应研究。

江西省自然科学基金项目, No. 0640112

江西省教育厅科技计划基金项目, No. 061033

江西省科技厅科技计划基金项目, No. 200680

江西省卫生厅中医药科研基金项目, No. 2005A30

昆明制药集团股份有限公司科研基金项目

通讯作者: 傅华群, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院肝胆外科, ncdxfhq@yahoo.com.cn

电话: 0791-6259631

收稿日期: 2007-01-23 接受日期: 2007-02-08

Effects of gap junction intercellular communication in rat liver on the proliferation of hepatic oval cells *in vivo*

Xue-Dong Li, Hua-Qun Fu, Shao-Hua Li, Xi-Liang Shang, Hong-Song Xing, Peng Hu

Xue-Dong Li, Hua-Qun Fu, Xi-Liang Shang, Hong-Song Xing, Peng Hu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Shao-Hua Li, Department of General Surgery, Jidong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jixi 158200, Heilongjiang Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province, No. 0640112; the Scientific Research Project Foundation of Jiangxi Provincial Education Department, No. 061033; the Scientific Research Foundation of Jiangxi Provincial Science and Technology Department, No. 200680; the Scientific Research Foundation of Traditional Chinese Medicine of Jiangxi Provincial Health Department, No. 2005A30; the Scientific Research Foundation of Kunming Pharmaceutical Corporation.

Correspondence to: Hua-Qun Fu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. ncdxfhq@yahoo.com.cn

Received: 2007-01-23 Accepted: 2007-02-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of gap junction intercellular communication (GJIC) in rat liver on the proliferation of hepatic oval cells (HOC) *in vivo*.

METHODS: Male Wistar rats were randomized into control group ($n = 6$), model group and

phenobarbital (PB) group. HOC proliferation was induced in the rats of model group: 9 days of treatment with 2-AAF, 20 mg/kg per day by gavage, interrupted on day 5 to perform a 70% hepatectomy (2-AAF/PH). The rats in PB group were administered with PB (0.8 g/L, till the end of experiment) in drinking water, and on the 8th day they received the same treatment as model group. The rats in model and PB group were sacrificed and necropsied at the 4th hour, on the 4th, 8th, 12th and 16th day (6 rats at each time point) followed hepatectomy. The morphological changes of liver tissues were observed by pathological examination and the proliferation of HOC was counted using immunohistochemistry and morphological recognition. GJIC was confirmed by incision loading/dye transfer (IL/DT), and the levels of CX32 protein and mRNA were detected by immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. The expression of CX43 protein and mRNA were determined by immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR, respectively.

RESULTS: No HOC proliferation was seen in the rat liver of control, 4-hour model and PB group. HOC appeared at portal area in model group on day 4, increased to the peak on day 8, intensely proliferated from the portal spaces and invaded the liver parenchyma on day 12, and decreased on day 16 as compared with day 12. HOC proliferation had a significant increase in PB group (from day 4 to 16) as compared with that in model group. The distance of dye transfer in model group (4 h, 4, 8, 12, 16 d) was significantly reduced in comparison with that in control group, and moreover, it was further decreased in PB group. The signal number of CX32 in the rat liver of model and PB groups were reduced as compared with that in control group ($P < 0.05$), and there was also significant differences between model and PB group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of CX32 mRNA in model group at the 4th hour, on the 4th, 8th, 12th and 16th day was 0.82 ± 0.13 , 0.33 ± 0.11 , 0.51 ± 0.13 , 0.68 ± 0.14 and 1.12 ± 0.18 folds of that in control

■背景资料

缝隙连接蛋白几乎表达于各种组织细胞,介导的缝隙连接细胞间通讯(GJIC)是其参与调节生物学过程的核心。GJIC可调节多种干细胞细胞的生长、增殖及分化过程,但是对肝卵圆细胞(肝干细胞的子代细胞)的作用目前所知尚少。本实验通过抑制肝脏GJIC功能,构建肝卵圆细胞增殖模型,从CX32、CX43表达角度探讨肝脏GJIC对体内肝卵圆细胞的调控。

■研究背景

肝卵圆细胞可分化为肝细胞(表达CX32)及胆管上皮细胞(表达CX43),因而探讨CX32和CX43对肝卵圆细胞分化的影响,可能是阐明肝干细胞分化调控机制的关键。

group, respectively. As compared with that in model group, the level of CX32 mRNA expression in PB group had no statistical difference at the 4th hour ($P > 0.05$), but had a significant increase on day 4 to 16 ($P < 0.05$). The expression of CX43 protein in the liver of model group at the 4th hour, on the 4th, 8th, 12th and 16th day was 1.14 ± 0.17 , 3.87 ± 0.35 , 5.28 ± 0.48 , 2.96 ± 0.33 and 2.12 ± 0.19 folds of that in control group, respectively. As compared with that in model group, the quantity of CX43 protein in PB group had no statistical difference at the 4th hour ($P > 0.05$), but had a significant decrease on day 4 to 16 ($P < 0.05$). The level of CX43 mRNA expression in model group at the 4th hour, on the 4th, 8th, 12th and 16th day was 1.09 ± 0.16 , 2.82 ± 0.23 , 5.46 ± 0.58 , 3.34 ± 0.64 and 0.91 ± 0.11 folds of that in control group, respectively. As compared with that in model group, the level of CX43 mRNA in PB group was increased ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The GJIC of hepatocyte and HOC can be decreased by altering the spatial and temporal expression patterns of CX in rat liver after 2-AAF/PH, which leads to the acceleration of HOC proliferation.

Key Words: Rat; Hepatic oval cell; Connexin; Gap junction intercellular communication; Immunohistochemistry; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot; Incision loading/dye transfer

Li XD, Fu HQ, Li SH, Shang XL, Xing HS, Hu P. Effects of gap junction intercellular communication in rat liver on the proliferation of hepatic oval cells *in vivo*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1583-1590

摘要

目的: 研究肝脏缝隙连接细胞间通讯(GJIC)对大鼠体内肝卵圆细胞(HOC)增殖的影响。

方法: 健康♂Wistar大鼠,随机分成对照组($n = 6$)、模型组、苯巴比妥(Phenobarbital, PB)组。模型组大鼠按每天20 mg/kg剂量灌喂2-AFF,连续4 d,第5天不灌喂行2/3肝切除,术后次日按每天20 mg/kg剂量继续灌喂5 d (2-AFF/PH);PB组予以0.8 g/L PB饮水7 d,第8天按模型组处理,0.8 g/L PB饮水持续至实验结束。模型组、PB组在术后4 h, 4, 8, 12和16 d随机取6只大鼠检测。采用组织病理技术观察肝组织的形态学变化;免疫组化和细胞形态学方法计数HOC;切开标记/染料示踪技术(incision loading/dye transfer, IL/DT)技术确定GJIC;免疫组化及RT-PCR技术检测CX32蛋

白及mRNA表达;免疫组化、Western blot及RT-PCR技术分析CX43蛋白及mRNA水平。

结果: 对照组及模型组和PB组4 h未见HOC增殖。模型组4 d汇管区有HOC增殖反应,8 d HOC增殖达峰值,12 d HOC从汇管区向肝实质内浸润,16 d HOC增殖较12 d减少。与模型组比较PB组4-16 d各时点HOC明显增加($P < 0.01$);IL/DT显示各时点模型组大鼠肝脏GJIC均低于对照组($P < 0.01$),与模型组比较PB组各时点GJIC进一步降低($P < 0.01$);模型组、PB组各时点CX32的表达低于对照组($P < 0.05$),与模型组比较PB组CX32表达在4 h, 12, 16 d时点减少($P < 0.05$),在4, 8 d时点表达增多($P < 0.05$);模型组4 h-16 d时点CX32 mRNA水平分别为对照组的 0.82 ± 0.13 , 0.33 ± 0.11 , 0.51 ± 0.13 , 0.68 ± 0.14 , 1.12 ± 0.18 倍,与模型组比较PB组4 h时点无显著差异($P > 0.05$),4-16 d时点明显升高($P < 0.05$)。模型组4 h-16 d各时点CX43蛋白表达分别为对照组的 1.14 ± 0.17 , 3.87 ± 0.35 , 5.28 ± 0.48 , 2.96 ± 0.33 , 2.12 ± 0.19 倍,与模型组比较PB组CX43蛋白4 h上调($P > 0.05$),4-16 d明显减少($P < 0.05$)。模型组4 h-16 d各时点CX43 mRNA水平分别为对照组的 1.09 ± 0.16 , 2.82 ± 0.23 , 5.46 ± 0.58 , 3.34 ± 0.64 , 0.91 ± 0.11 倍。与模型组比较PB组各时点CX43 mRNA表达上调($P < 0.05$)。

结论: 改变大鼠2-AAF/PH模型肝脏CX32、CX43的时空表达模式,降低肝脏肝细胞及HOC与其偶联细胞的GJIC,可解除HOC生长抑制,促进HOC的增殖。

关键词: 大鼠;肝卵圆细胞;缝隙连接蛋白;缝隙连接细胞间通讯;免疫组化;逆转录-聚合酶链反应;免疫印迹;切开标记/染料示踪技术

李学东,傅华群,李少华,尚西亮,邢宏松,胡鹏. 肝脏GJIC对大鼠体内肝卵圆细胞增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(14):1583-1590

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1583.asp>

0 引言

肝卵圆细胞(hepatic oval cells, HOC)是肝干细胞的子代细胞,对其增殖、分化的研究多集中于细胞因子及细胞外基质的调控^[1-5]。由于缝隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)是细胞间重要的信息交流形式,可调节组织细胞的生长、增殖与分化^[6-8]。本实验采用苯巴比妥(phenobarbital, PB)抑制大鼠肝脏GJIC,并构建HOC增殖模型(2-乙酰氨

基苄喂食+2/3肝切除术2-acetylaminofluorene/two-thirds partial hepatectomy, 2-AAF/PH), 以肝脏GJIC功能为本, 从缝隙连接蛋白(connexin, CX)32, 43表达的角度探讨肝脏GJIC对体内HOC的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂Wistar大鼠, 体质量150 g左右, 由南昌大学医学院动物科学部提供; 苯巴比妥(广东邦民制药有限公司); 2-乙酰氨基苄(2-acetylaminofluorene, 2-AAF; Sigma公司); 聚乙二醇(PEG400, 上海试剂一厂); 小鼠抗大鼠OV-6单克隆抗体(美国S Sell实验室); Mouse anti-human CX43抗体、Mouse anti-human CX32抗体(Santa Cruz公司); 抗小鼠SP试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); Lucifer yellow(LY)、Rhodamine D(Sigma公司); TRIzol(Invitrogen公司); Oligo(dT)₁₅(北京天为时代公司); dNTPs(BM公司); M-MLV逆转录酶(Promega公司); 大鼠CX43, CX32, GADPH引物(上海生工公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物处理及标本采集 大鼠首先随机分成对照组、模型组和PB组。2-AFF用分子量为400 Da的PEG溶解成浓度为4 g/L的溶液, 模型组大鼠每天按20 mg/kg剂量灌喂, 连续4 d, 第5天不灌喂, 在乙醚吸入麻醉下行2/3肝切除, 术后次日按每天20 mg/kg剂量继续灌喂5 d(2-AFF/PH)。PB组大鼠参考文献[9]予以0.8 g/L PB饮水7 d, 第8天按模型组处理, 0.8 g/L PB饮水持续至取材。模型组和PB组大鼠在术后4 h, 4, 8, 12和16 d随机取6只检测。对照组大鼠未预特殊处理, 作正常对照($n = 6$)。大鼠在乙醚吸入麻醉后剖腹, 取0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm的右肝中叶, 置中性缓冲福尔马林液固定, 各行HE染色及免疫组化; 取1.0 cm×1.0 cm×1.0 cm的右肝中叶, 行切开标记/染料示踪技术(incision loading/dye transfer, IL/DT)分析; 剪右肝中叶成50-100 mg的小块若干, 分置液氮保存, 提取总蛋白及RNA。

1.2.2 免疫组织化学染色 石蜡切片经常规脱蜡水化后, 抗原热修复15-20 min; 按SP免疫组化试剂盒说明书操作, 一抗工作液浓度分别为: OV-6 1:80, CX32 1:250, CX43 1:300。磷酸盐(PBS)缓冲液代替一抗做空白对照。

1.2.3 IL/DT 方法参考文献[10-13]在新鲜肝组织表面上滴少许(约200 μL)含有LY(5 g/L)和RhD(5 g/L)染料的PBS缓冲液, 用刀片作3-4个深

1 mm、长7-8 mm的切口, 再于切口内注入少许染料, 室温下染料扩散3 min, 后用PBS洗3次, 每次1 min, 再将组织放入40 g/L福尔马林液内避光过夜, 石蜡包埋, 垂直切口作5 μm厚的石蜡切片, 于免疫荧光显微镜下测量LY的净染色传输距离。

1.2.4 图像分析 每张OV-6免疫组织化学切片选取5个互不重叠且肝卵圆细胞增殖最明显的视野, 在400倍显微镜下对符合肝卵圆细胞特征(体积较小约为肝细胞直径的1/3-1/5, 细胞核呈卵圆形, 胞质较少, 略嗜碱性)且OV-6染色阳性的细胞进行计数, 其平均值作为此标本卵圆细胞增殖的数量; 每张CX32免疫组织化学切片于400倍镜下随机取5个视野, 计算CX32阳性信号数与视野内的肝细胞数之比, 作为该标本CX32的信号数; 每张IL/DT切片随机在免疫荧光显微镜下取5处测量LY和RhD的染色区域。LY的净染色区分分析GJIC。其均值作为GJIC结果。

1.2.5 CX43蛋白Western blot分析 取100 mg肝组织在冰冻下研成粉末, 加入1.0 mL裂解缓冲液匀浆, 12 000 g 4℃, 离心20 min, 取上清液Folin-酚法进行蛋白质的定量-70℃冷冻备用。取50 μg总蛋白加入上样缓冲液煮沸5 min变性, 经SDS-PAGE凝胶电泳, 电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜上; 脱脂奶封闭150 min, 与1:1000稀释的CX43抗体4℃孵育过夜, 再与1:500稀释的二抗孵育2 h, 与化学发光试剂ECL温浴1 min后曝光、显影和定影。X光胶片扫描后, 在医学图形分析系统上进行分析。计算方法为: 所得CX43蛋白带的综合灰度除以对照组样本的综合灰度值即为表达量。

1.2.6 RT-PCR检测肝组织CX32、CX43 mRNA表达 取肝组织50-100 mg, 总RNA提取用TRIzol试剂按说明操作进行。cDNA采用M-MLV RT kit(Promega, USA)试剂盒进行。CX32, CX43和GADPH引物设计利用Primer Premier 5.0软件(PremierBiosoft, CA)设计完成。引物序列及长度见表1。PCR反应条件: 94℃预变性5 min, 94℃变性40 s, 58℃退火45 s(CX32, GADPH), 63℃退火45 s(CX43), 72℃延伸1 min, 30个循环后, 72℃延伸10 min。

统计学处理 数据以mean±SD表示, 组间比较用方差分析。P<0.05被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝组织病理形态学变化 对照组肝

■应用要点

CX及介导的GJIC可为体外修饰肝卵圆细胞实现其定向增殖、分化提供一个关键靶点。

■名词解释

缝隙连接细胞间通讯的选择渗透特性: 缝隙连接细胞间通讯(GJIC)是目前证实相邻细胞间唯一、直接的物质信息交流形势. 允许小分子物质(分子量<1000 Da)在细胞间交换, 从而发挥其生物学效应. 大量实验表明CX形成GJ的通讯能力不仅是被动的物质转运, 而且对交流物质有高选择性. 例如, 利用离子替代实验发现不同的CX通道对阴阳离子渗透能力差别高达10倍以上, 对ATP、IP₃、腺苷、谷光甘肽选择转运能力差别在10-100倍. CX的通道选择渗透特性是其参与调节复杂生物学过程的基础.

表 1 PCR引物序列及产物长度

基因	正义(5'-3')	反义(5'-3')	产物长度(bp)
GADPH	TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTGGC	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	983
CX32	CTGCTCTACCCGGGCTATGC	CAGGCTGAGCATCGGTCGCTCTT	386
CX43	TGGGGGAAAGGCGTGAG	CTGCTGGCTCTGCTGGAAGGT	1275

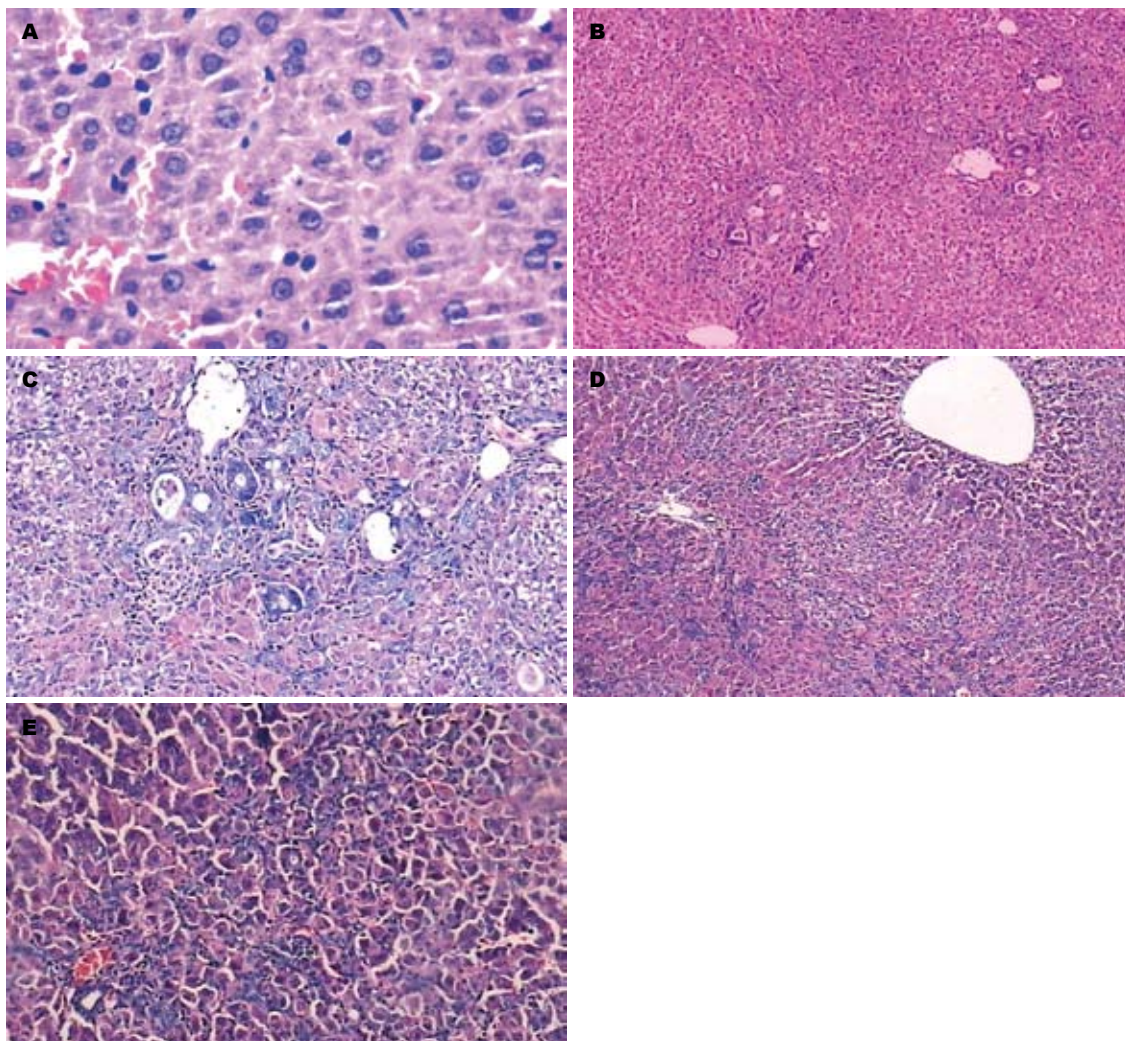


图 1 大鼠肝组织光镜检查结果(A, C, E×100; B, D×40). A: 对照组; B-C: 模型组8 d; D-E: PB组8 d.

组织结构完整, 肝细胞索排列正常, 未见增殖反应. 模型组、PB组4 h肝组织结构无明显破坏及增殖反应. 模型组4, 8 d肝索结构紊乱, 肝细胞水肿、变性坏死, 第4天汇管区有增殖反应, 第8天增殖反应明显, 并向小叶中央区穿插生长; 12 d肝细胞水肿、坏死减轻多由增殖细胞替代, 增生已连成片, 增生反应减少; 16 d仍可见增殖反应. PB组4-16 d也可见肝索结构破坏, 汇管区增殖细胞并向肝内浸润重建损伤肝脏过程, 与模型组比较PB组各时点增殖反应明显, 持续时间长. 增殖细胞体积较小、约为肝细胞直径的

1/3-1/5, 细胞核呈卵圆形, 胞质较少, 略嗜碱性、大小分布不均匀、呈簇状分布, 从汇管区向肝小叶中央浸润(图1).

2.2 HOC的活化、增殖情况 依据OV-6阳性染色和细胞形态学计数HOC. 对照组未见HOC. 模型组、PB组在肝切后4 h无明显HOC增生, 模型组4-16 d各时点HOC数量分别为: 8.20 ± 1.50 , 26.53 ± 1.56 , 16.60 ± 2.30 , 11.10 ± 3.20 个, HOC增殖呈逐渐升高至8 d达峰值后下调趋势. PB组4-16 d各时点HOC数量分别为: 14.20 ± 3.57 , 38.24 ± 5.20 , 28.65 ± 4.87 , 18.58 ± 3.54 个, 与模型组比较

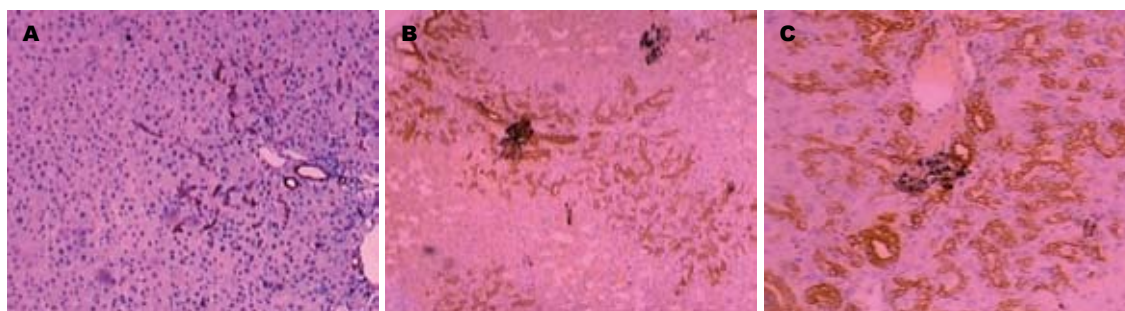


图 2 OV-6免疫组化显示HOC增殖情况($\times 40$). A: 对照组; B: 模型组8 d; C: PB组8 d.

■同行评价

本文探讨了肝脏GJIC对体内肝卵圆细胞增殖的影响, 文章设计合理, 方法先进, 得出了有意义的结论, 有一定创新性和学术价值.

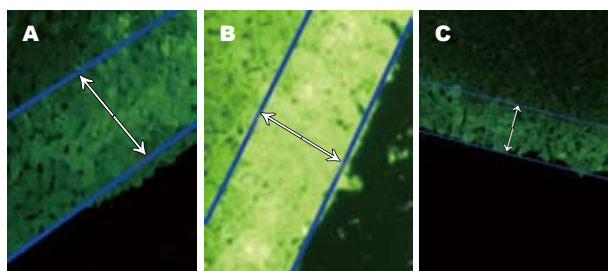


图 3 大鼠肝组织IL/DT结果(A, C $\times 100$; B $\times 200$). A: 对照组; B: 模型组8 d; C: PB组8 d. 白色箭头显示染料传输距离.

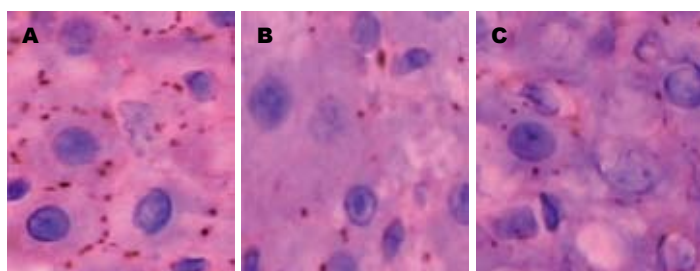


图 4 大鼠肝组织CX32的表达($\times 400$). A: 对照组; B: 模型组8 d; C: PB组8 d.

HOC增殖趋势相似, 但增殖水平高、持续时间长(图2).

2.3 大鼠肝脏GJIC的变化 IL/DT检测结果显示对照组GJIC功能良好, 染料扩散距离大约 $250.0 \pm 5.0 \mu\text{m}$, 约相当于10个肝细胞的直径. 模型组4 h-16 d各时点染料扩散距离低于对照组($P < 0.01$), 分别为: 84.5 ± 3.4 , 60.6 ± 3.3 , 108.6 ± 4.2 , 150.6 ± 2.6 , $199.6 \pm 3.7 \mu\text{m}$, 在4 h明显降低、4 d至低峰、8 d后逐渐恢复. PB组4 h-16 d各时点染料扩散距离与模型组规律相同, 但低于模型组($P < 0.01$), 分别为: 74.3 ± 3.4 , 38.4 ± 2.9 , 88.5 ± 4.3 , 126.7 ± 4.5 , $175.9 \pm 4.8 \mu\text{m}$ (图3).

2.4 大鼠肝脏CX32, CX43蛋白表达 免疫组化显示CX32表达于肝细胞膜上, 对照组每个肝细胞CX32阳性染色信号数为 9.8 ± 1.3 个; 模型组、PB组各时点CX32的表达低于对照组($P < 0.05$), 模型组4 h-16 d各时点分别为: 5.10 ± 0.70 , 2.85 ± 0.39 , 3.19 ± 0.20 , 4.34 ± 0.80 , 7.20 ± 0.68 个, 在4 h表达下调, 4 d至低峰, 8 d后逐渐恢复. 与模型组比较PB组在4 h, 12, 16 d时点CX32表达减少

($P < 0.05$), 在4, 8 d时点CX32表达增多($P < 0.05$), 4 h-16 d各时点分别为: 3.96 ± 0.28 , 3.56 ± 0.20 , 3.68 ± 0.20 , 4.10 ± 0.48 , 6.21 ± 0.42 个(图4).

免疫组化显示CX43表达于汇管区, 伴随HOC数量增加而染色增强. Western blot结果显示对照组大鼠肝组织CX43蛋白水平很低, 模型组、PB组CX43蛋白表达在4 h上调、4 d表达明显、8 d达高峰、12 d后下降, 呈逐渐升高而后逐渐恢复趋势, 模型组4 h-16 d各时点分别为对照组的: 1.14 ± 0.17 , 3.87 ± 0.35 , 5.28 ± 0.48 , 2.96 ± 0.33 , 2.12 ± 0.19 倍, 与对照组比较4 h CX43蛋白的表达上调, 无显著差异($P > 0.05$), 余时间点明显高于对照组($P < 0.01$). PB组各时点CX43蛋白表达上调分别为对照组的: 1.32 ± 0.24 , 2.18 ± 0.20 , 2.97 ± 0.22 , 2.57 ± 0.26 , 1.67 ± 0.27 倍, 与模型组比较4 h上调, 无显著差异($P > 0.05$), 4-16 d表达明显减少($P < 0.05$). 模型组、PB组各时点CX43蛋白印迹呈现程度不同的三条带, 代表了CX43的不同磷酸化状态(P_1 , P_2 是磷酸化CX43, NP为非磷酸化CX43, 图5)^[14].

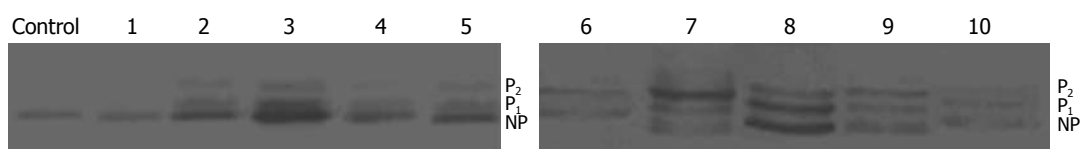


图 5 各组大鼠肝组织CX43水平蛋白印迹图. Control: 对照组; 1-5: 模型组4 h, 4, 8, 12和16 d; 6-10: PB组4 h, 4, 8, 12和16 d.

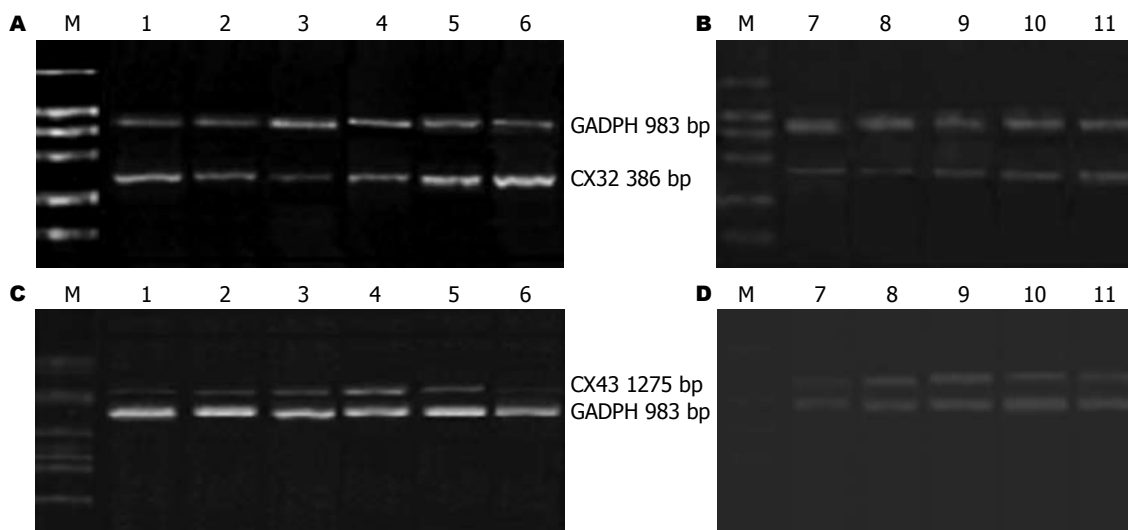


图 6 大鼠肝组织CX32, CX43 mRNA表达琼脂糖电泳凝胶图. A-B: CX32; C-D: CX43; M: marker分子量标记物; 1: 对照组; 2-6: 模型组4 h, 4, 8, 12和16 d; 7-11: PB组4 h, 4, 8, 12和16 d.

2.5 大鼠肝脏CX32, CX43 mRNA的表达 模型组4 h-16 d各时点CX32 mRNA水平分别为对照组的 0.82 ± 0.13 , 0.33 ± 0.11 , 0.51 ± 0.13 , 0.68 ± 0.14 , 1.12 ± 0.18 倍, 在4 h开始下降, 4 d达低峰, 8 d后逐渐恢复, 4 h, 4, 8, 12 d时点明显低于对照组($P < 0.01$), 16 d时点与对照组比较上调($P > 0.05$). PB组4 h-16 d各时点CX32 mRNA分别为对照组的: 0.65 ± 0.14 , 0.46 ± 0.12 , 0.66 ± 0.16 , 0.76 ± 0.15 , 1.42 ± 0.13 倍, 与模型组比较4 h时点无显著差异($P > 0.05$), 4-16 d时点明显升高($P < 0.05$, 图6).

对照组CX43 mRNA表达很低. 模型组4 h-16 d各时点CX43 mRNA分别为对照组的 1.09 ± 0.16 , 2.82 ± 0.23 , 5.46 ± 0.58 , 3.34 ± 0.64 , 0.91 ± 0.11 倍, 即在建模后4 h上调($P > 0.05$), 4 d表达明显升高, 12 d达高峰, 4, 8, 12 d时点明显高于对照组($P < 0.01$), 16 d低于对照组, 但无显著差异($P > 0.05$). PB组4 h-16 d各时点CX43 mRNA分别为对照组的: 1.48 ± 0.14 , 4.34 ± 0.43 , 6.69 ± 0.74 , 5.83 ± 0.57 , 2.74 ± 0.39 倍, 与模型组比较各时点CX43 mRNA表达上调($P < 0.05$), 表现为峰值高, 持续时间长(图6).

3 讨论

细胞作为一个开放的体系, 时刻通过细胞膜

与周围的环境发生着物质、能量和信息的交换, 从而调节细胞正常的生长、增殖、分化过程^[6,15-16]. 目前越来越多的证据显示^[17-21], CX介导的GJIC作为细胞间唯一、直接的信息交流形式可调节多种非肝源干细胞的增殖、分化过程. 但是肝脏GJIC对体内HOC的调控目前尚未见文献报道.

HOC是肝干细胞的子代细胞, 大鼠Solt-Farber(2-AAF/PH)模型是研究HOC应用最多的动物模型之一^[22]. 本实验中, 对照组大鼠肝组织结构完整, 未见增生反应及HOC, 且GJIC功能良好; 模型组大鼠肝索结构紊乱, 肝细胞水肿、变性坏死, 4 d可见HOC增殖, 8 d增殖达到高峰, 12 d后数量逐渐减少. IL/DT结果显示肝脏GJIC 4 h明显降低, 4 d至低峰, 8 d后逐渐恢复. GJIC功能与HOC的增殖趋势相反, 且变化时点早于HOC的增殖. 结果表明肝脏GJIC的功能与HOC的增殖密切相关; PB是肝脏GJIC的抑制剂^[9,23-26], 可进一步下调各时点2-AAF/PH大鼠肝脏的GJIC, 明显增加4-16 d各时点的HOC数量. 结果提示肝脏GJIC的抑制能促进2-AAF/PH大鼠体内HOC增殖.

肝细胞表达CX32, 而HOC表达CX43, 是肝脏GJIC的功能基础. 为了明确模型组、PB组

大鼠肝脏GJIC功能抑制的机制, 免疫组化结果显示模型组、PB组大鼠肝脏CX32蛋白的表达与GJIC趋势相同, Western blot结果显示CX43蛋白的表达与GJIC趋势相反. 表明GJIC下调是CX32表达抑制所致(与CX的细胞特异性表达相关^[27]). 与模型组比较PB组在4, 8 d时点CX32表达增多($P<0.05$, 与高增殖的HOC分化成较多的肝细胞相关), 而肝脏GJIC各时点均低于模型组, 说明PB可能也在CX32的通道门控上抑制大鼠2-AAF/PH肝脏的GJIC; 同步进行的CX32 mRNA检测显示, 模型组、PB组肝脏CX32蛋白与mRNA表达均呈下调趋势, 说明CX32的蛋白下调是由CX32 mRNA转录减少所致; 与模型组比较PB组CX32 mRNA在4 h表达减少($P<0.05$), 4-16 d增加($P<0.05$), 而CX32蛋白表达在4 h, 12, 16 d时点低于模型组, 说明PB能在翻译或翻译后调节大鼠2-AAF/PH肝脏CX32蛋白的表达(机制待明). 模型组、PB组肝脏CX43蛋白和mRNA各时点均呈上调趋势, 说明CX43蛋白的上调是由mRNA转录增加引起的; 与模型组比较, PB组CX43 mRNA 4 h-16 d升高, 而CX43蛋白4-16 d下降, 这种蛋白与mRNA表达的分离现象说明了PB可能在翻译或翻译后抑制2-AAF/PH肝脏的CX43蛋白表达. 抑制GJIC可减少细胞凋亡、分化和生长抑制, 增加细胞增殖^[15]. PB组HOC增殖数较模型组多, 而CX43蛋白表达减少, 说明PB不仅能降低肝细胞与偶联细胞的GJIC, 而且通过抑制HOC的CX43蛋白表达, 减少HOC与偶联细胞的GJIC, 解除HOC生长抑制, 促进HOC的增殖.

CX形成GJ的通讯能力不仅是被动的物质转运, 而且对交流物质有高选择性. 例如, 利用离子替代实验发现不同的CX通道对阴阳离子渗透能力差别高达10倍以上^[28], 不同的CX对ATP、IP₃、腺苷、谷光甘肽选择转运能力差别在10-100倍^[29-31]. CX43, CX32构成的GJ对谷氨酸盐和谷光甘肽转运效率相似, 而CX43对核苷(特别是ADP, ATP)转运比CX32通道快10倍, 二者对核苷转运可产生2-3倍的差异. 因此, 通过调节大鼠2-AAF/PH肝脏CX32及CX43时空表达模式, 改变肝脏对生长信息的整合, 是PB促进体内HOC增殖的关键因素.

总之, 改变大鼠2-AAF/PH模型肝脏CX32, CX43的时空表达模式, 降低肝细胞及HOC与其偶联细胞的GJIC, 可解除HOC生长抑制, 促进HOC的增殖. 因此, 通过基因转染或药物诱

导, 改变HOC或其偶联细胞的GJIC功能, 可调节HOC的增殖、分化过程. GJIC可能是体外修饰HOC实现其定向增殖、分化的一个关键靶点.

4 参考文献

- 1 Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287: 1427-1430
- 2 Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414: 98-104
- 3 Nguyen LN, Furuya MH, Wolfrum LA, Nguyen AP, Holdren MS, Campbell JS, Knight B, Yeoh GC, Fausto N, Parks WT. Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2007; 45: 31-41
- 4 Knight B, Akhurst B, Matthews VB, Ruddell RG, Ramm GA, Abraham LJ, Olynyk JK, Yeoh GC. Attenuated liver progenitor (oval) cell and fibrogenic responses to the choline deficient, methionine supplemented diet in the BALB/c inbred strain of mice. *J Hepatol* 2007; 46: 134-141
- 5 Lim R, Knight B, Patel K, McHutchison JG, Yeoh GC, Olynyk JK. Antiproliferative effects of interferon alpha on hepatic progenitor cells in vitro and in vivo. *Hepatology* 2006; 43: 1074-1083
- 6 Trosko JE, Madhukar BV, Chang CC. Endogenous and exogenous modulation of gap junctional intercellular communication: toxicological and pharmacological implications. *Life Sci* 1993; 53: 1-19
- 7 Yanagiya T, Tanabe A, Hotta K. Gap-junctional communication is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15: 572-582
- 8 Lu F, Gao J, Ogawa R, Hyakusoku H. Variations in gap junctional intercellular communication and connexin expression in fibroblasts derived from keloid and hypertrophic scars. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119: 844-851
- 9 Kolaja KL, Engelken DT, Klaassen CD. Inhibition of gap-junctional-intercellular communication in intact rat liver by nongenotoxic hepatocarcinogens. *Toxicology* 2000; 146: 15-22
- 10 Sai K, Kanno J, Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T. Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1671-1676
- 11 Jeong SH, Habeebu SS, Klaassen CD. Cadmium decreases gap junctional intercellular communication in mouse liver. *Toxicol Sci* 2000; 57: 156-166
- 12 Dagli ML, Yamasaki H, Krutovskikh V, Omori Y. Delayed liver regeneration and increased susceptibility to chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin32 only in the liver. *Carcinogenesis* 2004; 25: 483-492
- 13 Asamoto M, Hokaiwado N, Murasaki T, Shirai T. Connexin 32 dominant-negative mutant transgenic rats are resistant to hepatic damage by chemicals. *Hepatology* 2004; 40: 205-210
- 14 Musil LS, Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 1991; 115: 1357-1374
- 15 Trosko JE, Ruch RJ. Cell-cell communication in

- carcinogenesis. *Front Biosci* 1998; 3: d208-236
- 16 Nicholson BJ. Gap junctions - from cell to molecule. *J Cell Sci* 2003; 116: 4479-4481
- 17 van Herwaarden AE, Schinkel AH. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 10-16
- 18 Trosko JE, Chang CC, Wilson MR, Upham B, Hayashi T, Wade M. Gap junctions and the regulation of cellular functions of stem cells during development and differentiation. *Methods* 2000; 20: 245-264
- 19 Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH. Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1028: 192-201
- 20 Yang SR, Cho SD, Ahn NS, Jung JW, Park JS, Jo EH, Hwang JW, Jung JY, Kim TY, Yoon BS, Lee BH, Kang KS, Lee YS. Role of gap junctional intercellular communication (GJIC) through p38 and ERK1/2 pathway in the differentiation of rat neuronal stem cells. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 291-294
- 21 Trosko JE. From adult stem cells to cancer stem cells: Oct-4 Gene, cell-cell communication, and hormones during tumor promotion. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1089: 36-58
- 22 Paku S, Nagy P, Kopper L, Thorgeirsson SS. 2-acetylaminofluorene dose-dependent differentiation of rat oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies. *Hepatology* 2004; 39: 1353-1361
- 23 Ito S, Tsuda M, Yoshitake A, Yanai T, Masegi T. Effect of phenobarbital on hepatic gap junctional intercellular communication in rats. *Toxicol Pathol* 1998; 26: 253-259
- 24 Ren P, Mehta PP, Ruch RJ. Inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoters in connexin43 and connexin32-expressing liver cells: cell specificity and role of protein kinase C. *Carcinogenesis* 1998; 19: 169-175
- 25 Ren P, Ruch RJ. Inhibition of gap junctional intercellular communication by barbiturates in long-term primary cultured rat hepatocytes is correlated with liver tumour promoting activity. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2119-2124
- 26 Jansen LA, Jongen WM. The use of initiated cells as a test system for the detection of inhibitors of gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis* 1996; 17: 333-339
- 27 李学东, 尚西亮, 傅华群, 黄长文. 三七总皂甙对大鼠肝卵圆细胞增殖肝脏CX/GJIC的影响. *江西医学院学报* 2006; 46: 12-15
- 28 Harris AL. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* 2001; 34: 325-472
- 29 Bevens CG, Kordel M, Rhee SK, Harris AL. Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J Biol Chem* 1998; 273: 2808-2816
- 30 Goldberg GS, Lampe PD, Nicholson BJ. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 457-459
- 31 Nicholson BJ, Weber PA, Cao F, Chang H, Lampe P, Goldberg G. The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 369-378

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价,采用匿名方式.通常每篇文章邀请2-3位专家审阅,至少2人通过方可录用,否则退稿.每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿).文章等级评定:○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚.其中A和B属于很好,C和D不算太好,E是很差,还有一部分是不清楚.

人末梢血 $\gamma\delta$ T细胞对消化系统肿瘤细胞的杀伤作用

陈复兴, 刘军权, 冯霞, 王涛, 张娟, 张颂, 陈桂林

陈复兴, 刘军权, 王涛, 张娟, 张颂, 陈桂林, 徐州解放军第97医院实验科 江苏省徐州市 221004

冯霞, 徐州医学院附属医院实验科 江苏省徐州市 221002

陈复兴, 主任技师, 主要从事肿瘤生物治疗研究。

南京军区医学科学技术研究“十一五”计划课题资助项目, No. 06MA45

通讯作者: 陈复兴, 221004, 江苏省徐州市铜山路226号, 中国人民解放军第97医院实验科. chengfuxin123@126.com

电话: 0516-83349134

收稿日期: 2006-11-30 接受日期: 2007-03-31

Cytotoxic effects of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells on the tumor cells of digestive system *in vitro*

Fu-Xing Chen, Jun-Quan Liu, Xia Feng, Tao Wang, Juan Zhang, Song Zhang, Gui-Lin Chen

Fu-Xing Chen, Jun-Quan Liu, Tao Wang, Juan Zhang, Song Zhang, Gui-Lin Chen, Department of Central Laboratory, the 97th Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Xia Feng, Department of Laboratory, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu Province, China

Supported by the Medical Science and Technology Foundation of Nanjing Military Region during the 11th Five-Year Plan Program, No. 06MA45

Correspondence to: Fu-Xing Chen, Department of Central Laboratory, the 97th Hospital of Chinese PLA, 226 Tongshan Road, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China. chengfuxin123@126.com

Received: 2006-11-30 Accepted: 2007-03-31

Abstract

AIM: To investigate the cytotoxic effects of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells on the tumor cell lines of digestive system.

METHODS: The $\gamma\delta$ T cells in peripheral blood of healthy volunteers were expanded using interleukin-2 (IL-2) and isopentenyl pyrophosphate (IPP) in RPMI 1640 medium. After 10 days, the purity of $\gamma\delta$ T cells was analyzed by flow cytometry. The cytotoxic activity of the purified $\gamma\delta$ T cells against human gastric cancer cells, pancreatic carcinoma cells and hepatocellular carcinoma cells were tested in different effector-to-target ratios.

RESULTS: After peripheral blood mononuclear cells were cultured for 10 days, the $\gamma\delta$ T cells were expanded rapidly from 4.21% to 70.35%. Cytotoxic activities of the purified $\gamma\delta$ T cells against human gastric cancer cells, pancreatic carcinoma cells and hepatocellular carcinoma cells were 61%, 50% and 59% respectively at the effector-to-target cell ratio of 40 : 1. The cytotoxic activities of the attached $\gamma\delta$ T cells on tumor cells were higher than those of the suspended $\gamma\delta$ T (50%, 37% and 37%, respectively) and CIK (45%, 34% and 40%, respectively) cells.

CONCLUSION: The purified human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells show a highly-efficient cytotoxicity against the tumor cells of digestive system. The attached $\gamma\delta$ T cells are more efficient than the suspended $\gamma\delta$ T and CIK cells. $\gamma\delta$ T cells may be another important group of immune effector cells in the adoptive immunotherapy for cancer.

Key Words: $\gamma\delta$ T cells; Cytotoxicity; Digestive system carcinoma; Adoptive immunotherapy

Chen FX, Liu JQ, Feng X, Wang T, Zhang J, Zhang S, Chen GL. Cytotoxic effects of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells on the tumor cells of digestive system *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1591-1595

摘要

目的: 探讨人末梢血扩增的 $\gamma\delta$ T细胞对常见的消化系统肿瘤细胞株的杀伤作用。

方法: 用含IPP和IL-2的RPMI 1640培养基扩增人外周血 $\gamma\delta$ T细胞, 用流式细胞术检测培养10 d的 $\gamma\delta$ T细胞的纯度。用扩增后的 $\gamma\delta$ T细胞与人胃癌细胞株、胰腺癌细胞株和肝癌细胞株按不同效靶比例孵育后进行细胞毒活性测定。

结果: 人末梢血单个核细胞经过培养扩增10 d时 $\gamma\delta$ T细胞迅速从4.21%扩增到70.35%。培养10 d时贴壁生长的 $\gamma\delta$ T细胞对人胃癌细胞株、胰腺癌细胞株和肝癌细胞株均有较强的杀伤活性, 在效靶比例为40 : 1时细胞毒活性分别为61%、50%和59%, 高于悬浮生长的 $\gamma\delta$ T(分别为50%、37%和37%)和CIK(分别为45%、34%和40%)细胞毒活性。

■背景资料

$\gamma\delta$ T细胞只占外周血单个核细胞0.5-5%, 但却是皮肤、小肠、肺和生殖器官等黏膜皮下组织淋巴细胞的主要成分之一, 提示 $\gamma\delta$ T细胞在黏膜免疫中起着重要作用。近年来研究发现 $\gamma\delta$ T细胞以MHC非限制方式杀伤肿瘤细胞在免疫监视中具有重要作用, 同时也是适应性免疫中的起始因子。以往在外周血中培养扩增 $\gamma\delta$ T细胞大多用 $\gamma\delta$ T单克隆抗体法等方法, 这些方法较繁杂, 费用高, 现用小分子非肽抗原可在体外获得大量高纯度的有杀伤功能的 $\gamma\delta$ T细胞, 这为 $\gamma\delta$ T细胞用于临床治疗提供了支持。消化系统的一些肿瘤是我国常见的肿瘤病种, 这些肿瘤细胞常表达 $\gamma\delta$ T细胞杀伤的靶分子, 因此, 我们应用IPP扩增的人外周 $\gamma\delta$ T细胞对胃癌、肝癌和胰腺癌细胞株进行杀伤活性测定, 发现对这些肿瘤细胞有较高的杀伤作用。这为治疗这些肿瘤提供了实验证据。

■ 研究前沿

目前在体外扩增 $\gamma\delta$ T细胞越来越多地采用小分子抗原如磷酸抗原和烷基胺等。这些小分子一是容易洗涤去除,不影响细胞免疫治疗,不产生毒副作用,二是价格比较低。用这些方法扩增的 $\gamma\delta$ T细胞已在体外和体内对多种肿瘤细胞进行了杀伤活性和体内抗肿瘤研究。现已报告用扩增的自身 $\gamma\delta$ T细胞对人胃癌、淋巴瘤和晚期肾癌进行了治疗,治疗初步结果是安全有效的。今后亟待研究的问题是这些小分子抗原在体外扩增的 $\gamma\delta$ T细胞亚群是否一致,是否有选择性增殖某一亚群。对 $\gamma\delta$ T细胞杀伤不敏感的瘤细胞如何增加对 $\gamma\delta$ T细胞杀伤的敏感性如何利用 $\gamma\delta$ T细胞的抗原提呈作用研制肿瘤性疫苗。 $\gamma\delta$ T细胞与其他免疫细胞如树突状细胞、NK细胞等的相互作用和 $\gamma\delta$ T细胞在病毒性疾病中的治疗作用等也是今后研究的重点。

结论: 人末梢血扩增的 $\gamma\delta$ T细胞对消化系统常见的肿瘤细胞有较强的杀伤作用,贴壁生长的 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤细胞的杀伤作用强于悬浮生长的 $\gamma\delta$ T细胞和CIK细胞。 $\gamma\delta$ T细胞将是肿瘤细胞免疫治疗中又一类重要的免疫效应细胞。

关键词: $\gamma\delta$ T细胞; 细胞毒活性; 消化系肿瘤; 过继性免疫治疗

陈复兴, 刘军权, 冯霞, 王涛, 张娟, 张颀, 陈桂林. 人末梢血 $\gamma\delta$ T细胞对消化系统肿瘤细胞的杀伤作用. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1591-1595

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1591.asp>

0 引言

$\gamma\delta$ T细胞是体内固有免疫中的一个重要T细胞群,他广泛分布于消化系统和呼吸系统上皮组织内,末梢血中也有一定数量的 $\gamma\delta$ T细胞。随着对 $\gamma\delta$ T细胞结构和功能研究不断深入,人们发现 $\gamma\delta$ T细胞除了有与 $\alpha\beta$ T细胞类似的一些功能特征外,还有其他的一些独特的功能,如识别抗原不需要MHC分子提呈,直接识别蛋白质和肽类抗原以及非肽类抗原,具有抗原提呈细胞的一些特征,并能通过细胞接触和分泌的细胞因子起免疫调节作用。近几年来,应用 $\gamma\delta$ T细胞基因敲除的小鼠证明, $\gamma\delta$ T细胞在肿瘤免疫监视中具有重要的作用^[1-2]。为此,我们应用新建立的体外快速扩增的末梢血 $\gamma\delta$ T细胞,对消化系统常见的肿瘤细胞进行体外抗肿瘤实验,为 $\gamma\delta$ T细胞用于消化系统肿瘤的治疗提供依据,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640干粉为Gibco公司产品,人AB型血清购自徐州市血站,胎牛血清和淋巴细胞分离液购自中国科学院血液学研究所,Hepes(Amersham公司产品)购于天来生物医学科技有限公司,异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate IPP)购自Sigma公司,IL-2购于北京双鹭股份有限公司,抗人TCR- $\gamma\delta$ -FITC、抗人CD3-PE和抗人CD44-FITC均购自杭州联科生物(Immunotech, France),SGC-7901人胃腺癌细胞株,SW-1190人胰腺癌细胞株和SMMC-7721人肝癌细胞株均购于中国科学院上海细胞生物学研究所。流式细胞分析仪(TACS Calibur)为美国Becton Dickinson公司产品。

1.2 方法 取健康献血者抗凝血100 mL,以1500 r/min离心15 min,吸白细胞层,再经淋巴细胞分离液分离出末梢血单个核细胞(PBMC)。将

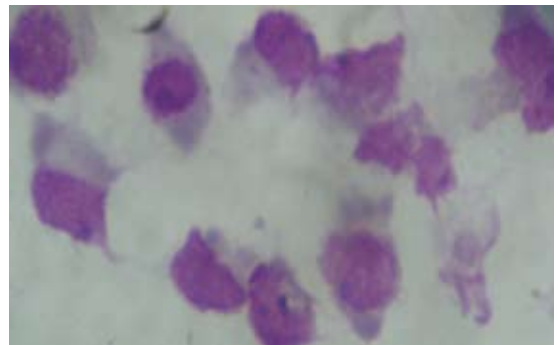


图1 培养10 d时 $\gamma\delta$ T细胞瑞姬氏染色形态。

PBMC洗涤后加入1640培养液(培养液含100 mL/L小牛血清, 50 mL/L人AB型血清, IPP 2 μ g/L, IL-2 10⁵ IU/L)中,调整细胞密度为1 $\times$ 10⁸/L,置75 cm²细胞培养瓶中,于37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养箱中培养,并根据细胞生长情况及时添加培养液。

1.2.1 CIK细胞培养及鉴定 按以往报告的方法进行^[3]。

1.2.2 $\gamma\delta$ T细胞和CIK细胞杀伤活性检测 以乳酸脱氢酶释放法测定细胞杀伤活性^[4],以SGC-7901人胃腺癌细胞株、SW-1190人胰腺癌细胞株和SMMC-7721人肝癌细胞株作为靶细胞并分别配成2 $\times$ 10⁸/L的细胞悬液,按效靶细胞比5:1, 10:1, 20:1, 40:1的比例加入培养10 d时的效应细胞($\gamma\delta$ T细胞和CIK细胞), 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂条件下孵育6 h,收集上清液在全自动生化分析仪(AU1000 Olympus)340 nm波长下测定吸光度(A)值。

杀伤活性 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{效应细胞自然释放组}}) / (A_{\text{靶细胞最大释放组}} - A_{\text{靶细胞自然释放组}}) \times 100\%$

2 结果

2.1 $\gamma\delta$ T细胞培养形态学观察 PBMC在 $\gamma\delta$ T细胞培养液中培养24 h即可见贴壁生长,每个集落约3-6个细胞,48 h后集落开始变大,培养10 d可见大的集落和极少量单个贴壁生长细胞,单个细胞可见细胞呈条梭状,整个集落形态与用TNF培养后的树突状细胞较为相似,也有部分呈悬浮生长的细胞。培养10 d的 $\gamma\delta$ T细胞涂片行瑞姬氏染色发现大多数细胞体积大,呈椭圆或不规则形,细胞核大多为椭圆或圆形,核染质疏松,核膜不规则,有凸起,每个细胞可见1个小核仁,呈深蓝色;胞质丰富,染成蓝灰色,形态不规则,有的像伪足,近核处有淡染现象,也有呈不规则形(图1)。

2.2 $\gamma\delta$ T细胞纯度鉴定 收集培养10 d时的细胞

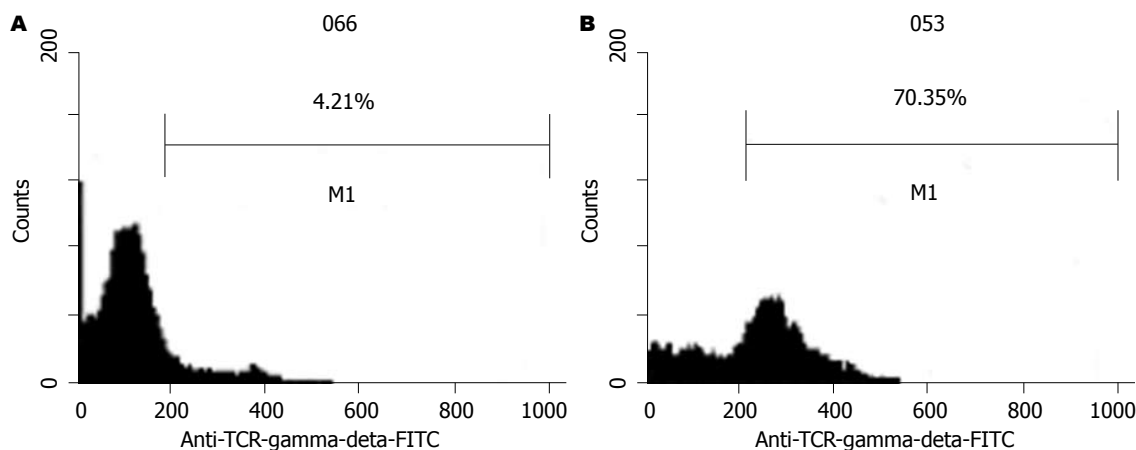


图 2 PBMC 培养后 $\gamma\delta$ T细胞百分率. A: PBMC培养前; B: 培养10 d.

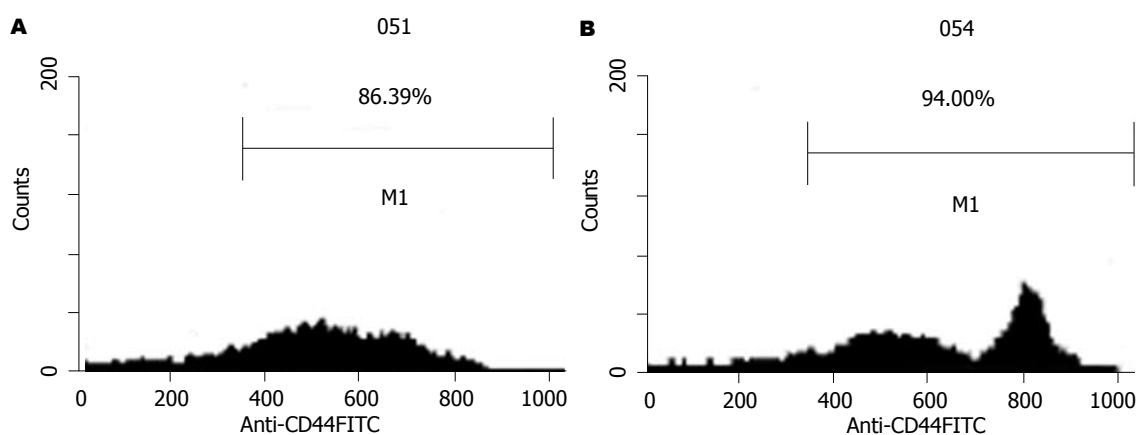


图 3 培养10 d时 $\gamma\delta$ T细胞流式细胞术分析CD44的表达. A: 悬浮 $\gamma\delta$ T细胞; B: 贴壁 $\gamma\delta$ T细胞.

进行mAb荧光标记后经流式细胞术检测并分析结果. PBMC未培养前 $\gamma\delta$ T细胞数为4.21%, 培养10 d时的 $\gamma\delta$ T细胞数为70.35%(图2), 在培养10 d时, 我们分别将悬浮细胞吸出, 并将黏附细胞吹打洗脱, 收集后分别行CD44 mAb荧光标记后进行检测, 结果悬浮生长细胞CD44表达为86.39%, 贴壁生长细胞CD44为94.00%, 从图3可以看出, 贴壁细胞中有一高表达CD44峰.

2.3 $\gamma\delta$ T细胞和CIK细胞对3种消化道肿瘤细胞株的细胞毒性 贴壁生长 $\gamma\delta$ T细胞对3株消化系统肿瘤细胞的杀伤活性要高于悬浮生长的 $\gamma\delta$ T细胞和CIK细胞. 在效靶比为40:1时, 贴壁生长的 $\gamma\delta$ T细胞对SGC-7901, SW-1190和SMMC-7721的杀伤活性分别为61%, 50%和59%, 明显高于悬浮生长的 $\gamma\delta$ T细胞(分别为50%, 37%和37%)和CIK细胞(分别为45%, 34%和40%); 而悬浮生长的 $\gamma\delta$ T细胞在对SGC-7901胃癌细胞的杀伤活性要高于CIK细胞, 对SW-1190胰腺癌细胞的杀伤活性低于CIK细胞, 对SMMC-7721肝癌细胞株的杀伤活性与CIK细胞相同(图4).

3 讨论

自1990年从肺癌肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中分离出 $\gamma\delta$ T细胞, 并发现这些细胞对新鲜的自体肿瘤细胞和K562细胞有高效杀伤活性, 许多作者证实了在直肠癌、肾癌、肝癌和乳腺癌等实体瘤的TIL中存在有 $\gamma\delta$ T细胞, 并具有抗肿瘤作用^[5-8]. 随着研究的不断深入, 人们发现从人外周血中培养的 $\gamma\delta$ T细胞同样具有强而广的抗肿瘤效应^[9-17].

$\gamma\delta$ T细胞杀伤肿瘤细胞的机制与CTL细胞和NK细胞相似, 主要通过穿孔素、颗粒酶和Fas/FasL途径起作用, 然而 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤细胞的识别还不完全清楚, 通常 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤细胞的识别大多数是MHC非限制性的, 主要是通过NKG2D识别肿瘤细胞表达的MICA, MICB, ULBPs, MHC I b类蛋白和F1-ATP合酶以及参与肿瘤浸润和转移相关的单体型层黏连蛋白(MLR)等配体^[18]. Corvaisier *et al*^[10]研究还证实, 对肿瘤细胞的识别还与肿瘤细胞上 $\gamma\delta$ TCR刺激物(如甲羟戊酸途径代谢物-IPP)的产生和

■ 相关报道

Corvaisier *et al*对 $\gamma\delta$ T细胞对自身和异体肿瘤细胞的杀伤机制进行了较详细地研究, 发现对自身肿瘤细胞和异体肿瘤细胞均有杀伤活性, 而自身正常细胞无杀伤作用. 这种杀伤是MHC非依赖性的, 并与肿瘤细胞的 $\gamma\delta$ TCR刺激物的产生和ICAM-1表达密切相关. Kobayashi *et al*最近报告用体外激活的 $\gamma\delta$ T细胞治疗7例晚期肾癌患者, 发现治疗后能明显增加外周血中 $\gamma\delta$ T细胞数, 无毒副作用, 患者能够耐受治疗.

■ 创新盘点

本文应用非肽抗原从PBMC培养 $\gamma\delta$ T细胞, 纯度达70%以上, 并对我国消化系统常见肿瘤细胞进行杀伤活性测定, 发现 $\gamma\delta$ T细胞对3种肿瘤细胞有较强杀伤活性, 并发现贴壁生长的 $\gamma\delta$ T细胞高表达CD44分子, 对肿瘤细胞的杀伤活性也高于悬浮生长的 $\gamma\delta$ T细胞. 这在国内外还未见报告.

■应用要点

肿瘤细胞免疫治疗关键是要联合使用固有免疫细胞和适应性免疫细胞进行治疗,才能将一些肿瘤变异逃逸株进行杀伤清除.固有免疫中的树突状细胞、NKT细胞的培养技术已较成熟,并已应用于临床,而 $\gamma\delta$ T细胞培养技术尚不成熟,本文报告的方法可弥补这方面的不足.有了足够数量的 $\gamma\delta$ T细胞,再与DC、CIK和CD3AK细胞等免疫效应细胞联合应用于肿瘤患者的治疗,必将提高肿瘤细胞免疫治疗的效果.此外,由于 $\gamma\delta$ T细胞高分泌IFN- γ ,以及在抗病毒中的重要作用,因此,他的过继性回输治疗病毒性疾病也将逐步得到应用.

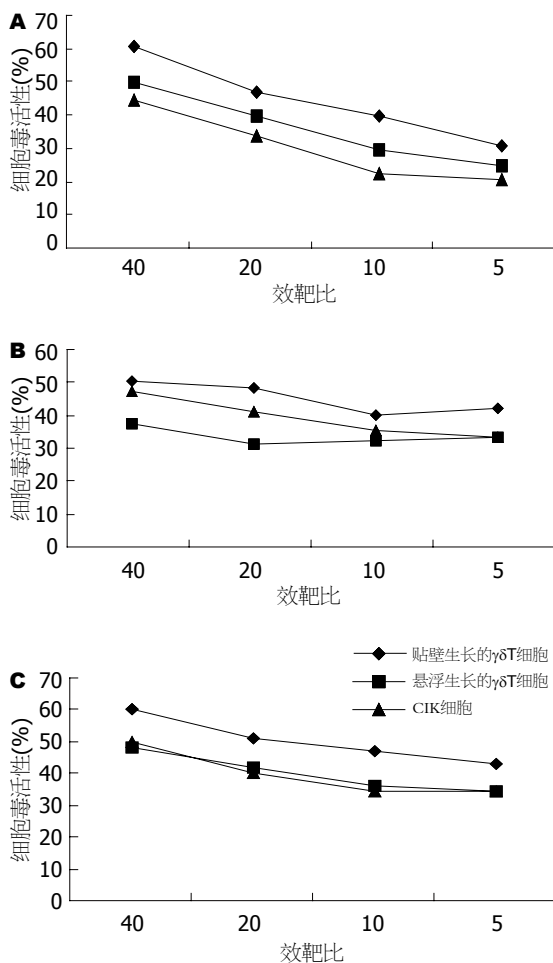


图4 不同效应细胞对消化道肿瘤细胞的杀伤活性. A: SGC-7901胃癌细胞; B: SW-1190胰腺癌细胞; C: SMMC-7721肝癌细胞.

ICAM-1表达密切相关.我们结果也表明,从人外周血分离培养出的 $\gamma\delta$ T细胞对消化道系统常见肿瘤细胞均有较强的杀伤作用,而且贴壁生长的 $\gamma\delta$ T细胞杀伤活性均高于CIK细胞.从图3中可以看出,有部分贴壁细胞高表达CD44,人CD44属于黏附分子家族的跨膜糖蛋白,他能与许多蛋白相结合,高表达CD44的贴壁 $\gamma\delta$ T细胞对几种癌细胞的杀伤活性高于悬浮生长的 $\gamma\delta$ T细胞,这也可能与肿瘤细胞高表达黏附分子受体,使其容易与 $\gamma\delta$ T细胞黏附有关.一些试验证实, $\gamma\delta$ T细胞在体内具有明显的抗癌作用, Kabelitz *et al*^[19]用阿伦磷酸激活的 $\gamma\delta$ T细胞与IL-2一起治疗已接种人肿瘤细胞的SCID小鼠,发现能明显延长生存期. Zheng *et al*^[8]给已建立鼻咽癌的裸鼠注射正常人 $\gamma\delta$ T细胞2次,每次 5×10^7 ,可见肿瘤明显缩小和生存期延长,且与注射次数相关,免疫组化证实肿瘤内有局部坏死,注射的 $\gamma\delta$ T细胞在瘤内聚积.戴梦华 *et al*^[20]胰腺癌外周血经抗人TCR $\gamma\delta$ T mAb包被扩增的 $\gamma\delta$ T细胞注入已建立胰

腺癌的裸鼠腹腔内,发现 $\gamma\delta$ T细胞具有显著的抑瘤作用.朱忆斯 *et al*^[21]用自身外周血培养的 $\gamma\delta$ T细胞治疗4例胃癌术后患者,随访10-25 mo未见复发.最近Kobayashi *et al*^[22]用2甲基-1丁基一焦磷酸激活7例晚期肾癌患者PBMC中 $\gamma\delta$ T细胞,然后进行回输治疗,发现治疗后有6例患者外周血中 $\gamma\delta$ T细胞绝对值增多,治疗未见毒副作用. $\gamma\delta$ T细胞体内应用除直接杀伤肿瘤细胞外,还可以通过与NKT细胞和成熟树突状细胞(DC)相互作用,释放出抗肿瘤免疫中的关键分子IFN- γ 和募集活化淋巴细胞、抗原提呈细胞的趋化性细胞因子来启动抗肿瘤免疫细胞网络,从而实现持续的抗肿瘤免疫应答^[23-26].

以往在体外扩增 $\gamma\delta$ T细胞多采用 $\gamma\delta$ T细胞单克隆抗体固相包被、结核杆菌低分子多肽抗原诱导和HSP70多肽诱导等方法^[12,27-30],这些方法所用的试剂不易购买且价格较贵,难以满足临床治疗需求.我们建立的这一新的培养方法可以在较短时间内培养出满足临床应用的 $\gamma\delta$ T细胞.在知情者同意原则下,我们对部分晚期肿瘤患者进行自身CIK、DC和 $\gamma\delta$ T细胞联合治疗,治疗过的患者除个别患者有一过性发热外,未见有其他毒副作用.由于 $\gamma\delta$ T细胞在病毒性疾病的控制中起着重要的作用,因此用此法在体外培养出大量高纯度的 $\gamma\delta$ T细胞,这也为病毒性急性疾病的综合性细胞免疫治疗提供可能^[31-33].我们在知情同意下,对2名HBV-DNA高负荷患者进行了自身CIK、树突状细胞和 $\gamma\delta$ T细胞联合治疗,患者无毒副反应,近期疗效正在观察之中.

肿瘤免疫编辑理论认为,机体固有免疫和适应性免疫均参与机体的抗肿瘤过程^[34].在免疫逃逸期,部分肿瘤细胞可发生MHC I类分子低表达或缺失,肿瘤抗原缺失或下调和抗原提呈异常等使机体免疫细胞不能对其进行特异性杀伤^[35].因此,在肿瘤免疫均衡期和免疫逃逸期,必须联合固有免疫和适应性免疫中的抗肿瘤效应细胞一起应用,才能达到清除肿瘤的目的.在体外扩增大量的自身具有抗肿瘤活性的 $\gamma\delta$ T细胞回输可以杀伤那些逃逸 $\alpha\beta$ T细胞杀伤的肿瘤,如能与肿瘤特异性CTL, NK细胞, NKT细胞, DC和巨噬细胞等进行综合性细胞免疫治疗,将会明显提高肿瘤患者的细胞免疫治疗效果.

4 参考文献

- 1 Born WK, Reardon CL and O'Brien RL. The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity. *Curr Opin*

- Immunol 2006; 18: 31-38
- 2 Moser B, Brandes M. Gammadelta T cells: an alternative type of professional APC. *Trends Immunol* 2006; 27: 112-118
- 3 陈复兴, 刘军权, 张南征, 巩新建, 张国龙, 徐永茂, 周忠海, 王涛, 黄健. 自身细胞因子诱导的杀伤细胞过继性免疫治疗恶性肿瘤的临床观察. *癌症* 2002; 27: 797-801
- 4 刘军权, 韩慧敏, 陈复兴. 用乳酸脱氢酶试剂盒检测 LAK 细胞活性. *临床医学检验* 1995; 13: 83
- 5 Watanabe N, Hizuta A, Tanaka N, Orita K. Localization of T cell receptor (TCR)-gamma delta + T cells into human colorectal cancer: flow cytometric analysis of TCR-gamma delta expression in tumour-infiltrating lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 167-173
- 6 Mitropoulos D, Kooi S, Rodriguez-Villanueva J, Platsoucas CD. Characterization of fresh (uncultured) tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) and TIL-derived T cell lines from patients with renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 321-327
- 7 Chen J, Niu HT, He W, Ba D. Anti-tumor activity of expanded human tumor infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 2001; 125: 256-263
- 8 Zheng BJ, Chan KW, Im S, Chua D, Sham JS, Tin PC, He ZM, Ng MH. Anti-tumor effects of human peripheral gammadelta T cells in a mouse tumor model. *Int J Cancer* 2001; 92: 421-425
- 9 Viey E, Fromont G, Escudier B, Morel Y, Da Rocha S, Chouaib S, Caignard A. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* 2005; 174: 1338-1347
- 10 Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, Bennouna J, Mosnier JF, Scotet E, Bonneville M, Jotereau F. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol* 2005; 175: 5481-5488
- 11 许凯黎, 陈松华, 葛锡锐, 周瑾, 刘新垣. 人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞选择性增殖及其体内抗肿瘤的特性研究. *肿瘤* 1999; 19: 199-201
- 12 马安伦, 葛海良, 张冬青, 王树军, 周光炎. 一种简单 $\gamma\delta$ T 细胞扩增培养方法及其抗肿瘤生物学功能研究. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2000; 7: 181-183
- 13 陈娟, 何维, 巴德年. 人肿瘤浸润 $\gamma\delta$ T 细胞抗肿瘤活性研究. *免疫学杂志* 2000; 16: 175-178
- 14 Schmidt J, Lienfeld-Toal M, Buchler MW, Marten A. Bisphosphonic acid acts as gamma/delta T cell activating antigen and has direct cytotoxic activity against pancreatic carcinoma cells. *Cancer Cell Int* 4 suppl 1: 25
- 15 Poupot M, Pont F, Fournie JJ. Profiling blood lymphocyte interactions with cancer cells uncovers the innate reactivity of human gamma delta T cells to anaplastic large cell lymphoma. *J Immunol* 2005; 174: 1717-1722
- 16 Raspollini MR, Castiglione F, Rossi Degl'innocenti D, Amunni G, Villanucci A, Garbini F, Baroni G, Taddei GL. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Oncol* 2005; 16: 590-596
- 17 Meeh PF, King M, O'Brien RL, Muga S, Buckhalts P, Neuberg R, Lamb LS Jr. Characterization of the gammadelta T cell response to acute leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1072-1080
- 18 Steinle A, Groh V, Spies T. Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 12510-12515
- 19 Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zoller M. Characterization of tumor reactivity of human V gamma 9V delta 2 gamma delta T cells in vitro and in SCID mice in vivo. *J Immunol* 2004; 173: 6767-6776
- 20 戴梦华, 何维, 赵玉沛, 许春萍. 外周血 $\gamma\delta$ T 细胞在胰腺癌裸鼠过继性免疫治疗中的作用. *中华外科杂志* 2005; 43: 726-729
- 21 朱忆斯, 朱传远, 顾见明, 张学光. 青年胃印戒细胞癌免疫状态及 $\gamma\delta$ T 细胞应用研究. *苏州医学院学报* 1998; 18: 149-151
- 22 Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Osaka Y, Nakazawa H, Uchiyama T, Minato N, Toma H. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 469-476
- 23 Munz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2005; 202: 203-207
- 24 Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, Craft J, Yin Z. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med* 2003; 198: 433-442
- 25 梁辉, 侯著法, 余金妹, 王昀, 王华. DC 细胞刺激 $\gamma\delta$ T 细胞的抗白血病作用. *上海第二医科大学学报* 2002; 22: 97-100
- 26 Shrestha N, Ida JA, Lubinski AS, Pallin M, Kaplan G, Haslett PA. Regulation of acquired immunity by gamma delta T-cell/dendritic-cell interactions. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1062: 79-94
- 27 王克强, 侯彦强, 李雁. 一种简单快速扩增和获取外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的方法. *中国实验血液学杂志* 2004; 12: 372-374
- 28 陈雪华, 马安伦, 张冬青, 王树军, 张笑人, 张惠珍, 葛海良. 一种简单快速的 $\gamma\delta$ T 细胞扩增方法. *上海免疫学杂志* 2000; 20: 47-49
- 29 李新燕, 张学光, 张毅, 李明, M. M. Hallet, B. Klein. 特异性体外扩增人 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞及其生物学特性的研究. *中华医学杂志* 1997; 77: 111-114
- 30 吴俊英, 李柏青, 张学光. APC 在结核杆菌低分子多肽抗原体外激活人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞中的作用. *细胞与分子免疫学杂志* 2001; 17: 492-494
- 31 Agrati C, Alonzi T, De Santis R, Castilletti C, Abbate I, Capobianchi MR, D'Offizi G, Siepi F, Fimia GM, Tripodi M, Poccia F. Activation of Vgamma9Vdelta2 T cells by non-peptidic antigens induces the inhibition of subgenomic HCV replication. *Int Immunol* 2006; 18: 11-18
- 32 Poccia F, Agrati C, Martini F, Capobianchi MR, Wallace M, Malkovsky M. Antiviral reactivities of gammadelta T cells. *Microbes Infect* 2005; 7: 518-528
- 33 Lopez RD. Human gammadelta-T cells in adoptive immunotherapy of malignant and infectious diseases. *Immunol Res* 2002; 26: 207-221
- 34 Schreiber RD. Cancer vaccines 2004 opening address: the molecular and cellular basis of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Cancer Immun* 2005; 5 Suppl 1: 1
- 35 陈复兴, 曹志章, 徐开林. 癌症生物治疗——原理和实践. 第3版. 北京: 人民军医出版社, 2005: 820-831

同行评价

$\gamma\delta$ T 细胞是体内固有免疫中的一个重要 T 细胞群, 其结构和功能受到关注. 因为他有自己独特的功能. 本文通过细胞杀伤试验探讨了人末梢血 $\gamma\delta$ T 细胞对消化系统肿瘤细胞的杀伤作用, 文章新颖性较好, 有应用前景.

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

真核表达载体pcDNA3-CTLA4Ig转染小鼠对移植胰岛功能的影响

赵国华, 孙宏治, 钟鑫平, 张金祥, 许国岩, 赵宁, 程颖, 张佳林, 刘永锋

■背景资料

胰岛移植排斥反应是由MHC II类分子介导的。与胰腺移植相比具有手术简单、并发症少、可重复性好、对全身干预小等优点,但移植术后排斥反应制约了胰岛移植的进一步开展和应用。现代免疫学研究进展表明,共刺激信号系统在同种异体移植排斥反应中起了重要的作用,而最重要的一组共同刺激分子是B7/CD28,如果阻断B7与受体相结合,抑制第二信号的产生,将可能导致T细胞的克隆失活或克隆无反应,诱导免疫耐受。

赵国华, 孙宏治, 钟鑫平, 赵宁, 程颖, 张佳林, 刘永锋, 中国医科大学附属第一医院器官移植科 辽宁省沈阳市 110001
张金祥, 许国岩, 解放军65735部队医院内科 辽宁省丹东市 118002

赵国华, 2006年中国医科大学博士毕业, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的研究。

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 20042096

通讯作者: 赵国华, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院器官移植科。

zgh1975070707@163.com

电话: 024-82001796

收稿日期: 2007-01-30 接受日期: 2007-02-13

Preventive effect of pcDNA3-CTLA4Ig plasmid transfection on islet allograft rejection in mice

Guo-Hua Zhao, Hong-Zhi Sun, Xin-Ping Zhong, Jin-Xiang Zhang, Guo-Yan Xu, Ning Zhao, Ying Cheng, Jia-Lin Zhang, Yong-Feng Liu

Guo-Hua Zhao, Hong-Zhi Sun, Xin-Ping Zhong, Ning Zhao, Ying Cheng, Jia-Lin Zhang, Yong-Feng Liu, Organ Transplant Unit, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Jin-Xiang Zhang, Guo-Yan Xu, Department of Gastroenterology, the 65735th Hospital of Chinese PLA, Dandong 118002, Liaoning Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20042096

Correspondence to: Guo-Hua Zhao, Organ Transplant Unit, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zgh1975070707@163.com

Received: 2007-01-30 Accepted: 2007-02-13

Abstract

AIM: To study the effect of pcDNA3-CTLA4Ig plasmid on islet allograft rejection in mice.

METHODS: C57BL/6 mice were randomly divided into control group, blank group and experiment group (transfected with pcDNA3-CTLA4Ig plasmid). The level of serum CTLA4Ig was detected by Western blot on day 5 after transfection. Blood glucose was examined after operation every other day. Immunohistochemical staining was used to determine the expres-

sion of insulin. ³H-thymidine incorporation was performed to detect the ability of T lymphocyte increment and the levels of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were detected by flow cytometry on day 7 after transplantation.

RESULTS: Five days after transfection, Western blot demonstrated serum expression of CTLA4Ig, and the transfection efficacy was 27.50%. Blood glucose maintained at the normal level for a longer period of time in the experiment group, and on day 7, the proliferation of lymphocytes was markedly decreased ($P < 0.05$). The levels of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were significantly lower in the experiment group than those in the control and blank group (CD4⁺: 14.38% $\pm$ 0.84% vs 20.56% $\pm$ 0.68%, 21.04% $\pm$ 1.14%, $P < 0.05$; CD8⁺: 14.77% $\pm$ 0.92% vs 24.63% $\pm$ 1.30%, 23.84% $\pm$ 1.21%, $P < 0.05$), and the intensity of immunohistochemical staining was also stronger.

CONCLUSION: CTLA4 gene can be transferred into mouse muscular cells by cation liposome and express its products in the serum, which leads to the inhibition of islet allograft rejection by the blockage of B7/CD28 signal pathway.

Key Words: Islets of langerhans transplantation; Rejection; Costimulatory signal; B7/CD28

Zhao GH, Sun HZ, Zhong XP, Zhang JX, Xu GY, Zhao N, Cheng Y, Zhang JL, Liu YF. Preventive effect of pcDNA3-CTLA4Ig plasmid transfection on islet allograft rejection in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1596-1601

摘要

目的: 探讨真核表达载体pcDNA3-CTLA4Ig转染受体小鼠肌细胞后对胰岛移植后排斥反应的影响。

方法: 受体C57BL/6小鼠随机分为对照组、空白转染组和实验组(转染pcDNA3-CTLA4Ig)。Western blot检测受体小鼠血清CTLA4-Ig表达, 观察移植存活时间, 术后7 d取受体肾脏做HE染色及胰岛素免疫组化染色, 采用微量

全血³H-胸腺嘧啶掺入法检测单个核细胞在刀豆蛋白A刺激下的增殖程度, 流式细胞仪检测外周血T细胞亚群表达情况。

结果: 受体小鼠转染5 d后, Western blot检测到血清内有CTLA4Ig表达, 转染效率为27.50%; 实验组小鼠血糖维持正常时间明显延长($P<0.05$); 术后7 d, 转染组单个核细胞在刀豆蛋白A刺激下的增殖程度明显降低($P<0.05$), $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T淋巴细胞表达与对照组和空白转染组相比有显著差异($CD4^+$: $14.38\% \pm 0.84\%$ vs $20.56\% \pm 0.68\%$, $21.04\% \pm 1.14\%$, $P<0.05$; $CD8^+$: $14.77\% \pm 0.92\%$ vs $24.63\% \pm 1.30\%$, $23.84\% \pm 1.21\%$, $P<0.05$), 小鼠肾被膜下胰岛素免疫组化染色强度明显增高。

结论: 利用脂质体法可将pcDNA3-CTLA4Ig转染到活体小鼠肌细胞内并在小鼠体内表达CTLA4Ig, 从而阻断B7/CD28共刺激信号途径, 抑制胰岛移植术后排斥反应。

关键词: 胰岛移植; 排斥反应; 共刺激信号; B7/CD28

赵国华, 孙宏治, 钟鑫平, 张金祥, 许国岩, 赵宁, 程颖, 张佳林, 刘永峰. 真核表达载体pcDNA3-CTLA4Ig转染小鼠对移植胰岛功能的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1596-1601
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1596.asp>

0 引言

胰岛移植是治疗糖尿病的有效手段之一, 但目前临床开展并不理想, 主要原因是免疫排斥反应^[1-5]. 阻断CD28/B7共刺激通路是一个较为理想的无胰岛毒性的特异性免疫抑制方案^[6-10]. 本实验观察真核表达载体pcDNA3-CTLA4Ig是否可以转染受体小鼠肌细胞, 并在小鼠血清中表达CTLA4Ig, 从而抑制受者胰岛移植后的排斥反应。

1 材料和方法

1.1 材料 供体为BALB/C小鼠, 受体为C57BL/6小鼠, 体质量 30 ± 2 g, 年龄8-10周龄, 均为♀, 购自中国医科大学实验动物中心. 随机分为3组, 每组10只. 对照组: 仅进行胰岛移植, 不进行质粒转染; 空白转染组: 将胰岛移植入空质粒pcDNA3转染的小鼠肾被膜下; 实验组: 将胰岛移植入质粒pcDNA3-CTLA4Ig转染的小鼠肾被膜下. 质粒pcDNA3-CTLA4Ig由大连博瑞德生物工程公司构建(质粒结构见图1). 质粒快速大

量提取试剂盒购自V-gene生物公司, 阳性脂质体Lipofectamine2000转染试剂盒购自Invitrogen公司. 胶原酶V型(C-9263)、双硫腺(dithizone, DTZ)、链脲霉素(streptozotocin, STZ)、Ficoll-400均购自Sigma公司. 抗胰岛素抗体购自博士德公司, 即用型第二代免疫组化SP试剂盒、DAB显色剂购自迈新公司. ³H-TdR购自北京原子能研究所. fluorescein isothiocyanate(FITC)标记的CD4和CD8 mAb、Phycoerythrin(PE)标记的CD3 mAb均购自San Diego公司。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3-CTLA4Ig扩增、纯化和鉴定 将质粒与感受态菌按2 μ L : 1 ng的比例混合, 42℃水浴90 s. 而后迅速冰浴, 接种于含有100 mg/L氨苄青霉素的LB液体培养基中, 37℃振荡培养过夜, 收集菌液, 采用无内毒素质粒快速大量提取试剂盒大量抽提质粒. 具体操作步骤参见说明书. 经收集、裂解、层析和洗脱后, 回收质粒. 紫外分光光度仪检测DNA纯度和浓度, 调整浓度为0.5 g/L, 4℃储存备用。

1.2.2 pcDNA3-CTLA4Ig转染小鼠 用阳性脂质体载体Lipofectamine将pcDNA3-CTLA4Ig包裹(超声法混匀)后, 按lipofectamine(10 μ L)与pcDNA3-CTLA4Ig(4 μ g)的混匀液注入小鼠右侧大腿肌肉组织。

1.2.3 Western blot检测血清CTLA4Ig水平 注射5 d后, 取受体小鼠静脉血0.2 mL, 抗凝后离心取上清, 做SDS-PAGE电泳. 取出凝胶置于硝酸纤维素膜上, 用BioRad公司的蛋白质转印系统在转移缓冲液(5 mmol/L Tris, 250 mmol/L甘氨酸, 1 g/L SDS)中, 电泳转印(50 V, 2 h左右). 转印完毕用TBS浸泡10 min, 将膜用TTBS(含50 g/L脱脂奶粉的TBS)室温下封闭1 h, 用TTBS洗膜2次, 每次5 min. 洗膜后, 一抗4℃过夜(1 : 250), TTBS洗5 min 2次. 二抗2 h(1 : 2000), TTBS洗5 min 2次. 加入底物, 反应显色, 分析结果. 连续2次血清呈阳性表达者视为转染成功。

1.2.4 小鼠糖尿病模型的建立 受体小鼠腹腔内注射20 g/L链脲霉素140 mg/kg(Sigma), 注射后2-3 d查空腹血糖, 如连续3 d血糖 >16.8 mmol/L, 模型建立。

1.2.5 小鼠胰岛分离和纯化 供体小鼠10 g/L戊巴比妥4 mL/kg腹腔内注射麻醉, 固定, 开腹, 胰管内灌注冷却胶原酶溶液3-5 mL(胶原酶V型, 1.5 g/L, Sigma), 使胰腺均匀膨胀后迅速取出, 置于盛有5 mL冷胶原酶溶液的容器中, 38±1℃水浴

■ 相关报道

相关文献在阻断CD28分子方面已经有较多的研究报道, 比如在心脏、肝脏、肾脏、角膜以及皮肤等方面, 均取得了一定的抑制排斥反应效果。

■创新盘点

在本实验中,由于胰岛本身是一种不具有分化能力的细胞,一般的转染效率很低,而且直接转染胰岛本身还存在影响胰岛功能的潜在危险,所以本实验不以胰岛细胞作为直接的靶细胞,而采用直接转染受体小鼠肌细胞的方法,取得了良好的转染效果。本实验利用的脂质体转染、直接肌肉注射的方法,具有操作简便、广谱和高效的特点,应用Western blot方法检测血清中CTLA4Ig水平,与以往的双抗体夹心酶联免疫吸附实验(ELISA)相比,具有简便易行,价格便宜的特点,而且结果不受相关因素的影响。

静止消化, 12-15 min后加入冷却Hanks液20 mL终止消化, 1000 r/min离心3 min, 弃上清, 同法洗涤2次后, 400 μ m钢网滤过, 沉淀物行Ficoll不连续密度梯度离心。Ficoll梯度离心柱浓度自下而上依次为250, 230, 205, 110 g/L。4 $^{\circ}$ C 2000 r/min离心10 min, 收集230, 110 g/L层间的胰岛悬液。再用无菌RPMI1640培养液离心漂洗2次, 于倒置显微镜下作平板计数。

1.2.6 胰岛移植 受体小鼠麻醉后, 俯卧位固定经右侧脊柱旁切口暴露右侧肾脏, 于被膜下注入胰岛悬液0.3 mL(约含150胰岛当量), 并作标记。

1.2.7 血糖监测 术后非空腹血糖连续2 d高于11.2 mmol/L, 以第一时间作为移植物受排斥、功能丧失发生的时间, 观察移植胰岛的有功能存活时间。

1.2.8 外周血单个核细胞(PBMC)增殖反应试验 术后第7天, 实验各组动物分别取静脉血0.2 mL, 10 mg/L刀豆蛋白A作为刺激剂, 微量全血 3 H-胸腺嘧啶(3 H-TdR)掺入法检测单个核细胞增殖程度, 液体闪烁计数器监测单个核细胞转化后的闪烁计数值。

1.2.9 CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$ T细胞表达情况 应用流式细胞仪检测移植术后第7天CD4 $^{+}$ 和CD8 $^{+}$ T淋巴细胞的表达。重复管加入PE-anti-CD3抗体、FITC-anti-CD4 mAb和PE-anti-CD8 mAb, 对照管加入PE-羊抗鼠-Ig, 进行免疫标记反应。4 $^{\circ}$ C 30 min, 离心(1000 r/min, 5 min), 弃上清液, 沉淀中加入5 mL PBS液, 离心(1000 r/min, 5 min), 重复洗涤1次, 流式细胞仪进行检测。

1.2.10 病理组织学检查 术后第7天, 分别切取受者小鼠移植局部组织适量, 先做HE染色。然后40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续切片, 微波抗原修复(92-100 $^{\circ}$ C, 3 min), 50 μ L 130 mL/L过氧化氢孵育10 min, 50 μ L抗Insulin-Ab(1:100), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。50 μ L聚合物增强剂(A液), 室温下孵育20 min。50 μ L酶标抗鼠聚合物(B液)室温下孵育30 min, 加入新鲜配置的DAB液, 显微镜下观察3-10 min, 冲洗后苏木素复染。常规脱水透明及封片。

统计学处理 所得数据以mean $\pm$ SD表示, 采用方差分析(其中血糖维持正常时间以mean $\pm$ SE表示, 采用Kruskal-Wallis Test), 所得数据均经SPSS11.5处理, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pcDNA3-CTLA4Ig的鉴定 对含有pcDNA3-

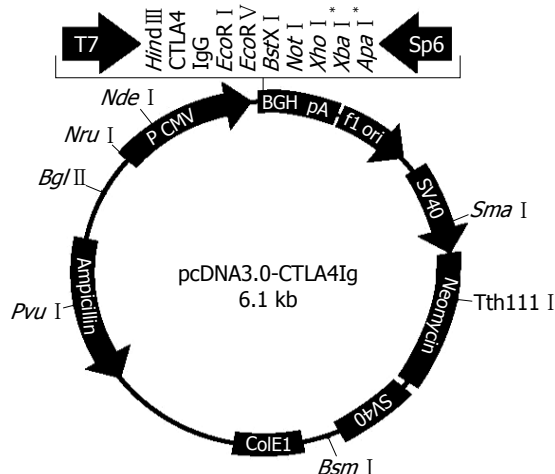


图1 质粒pcDNA3-CTLA4Ig结构示意图。

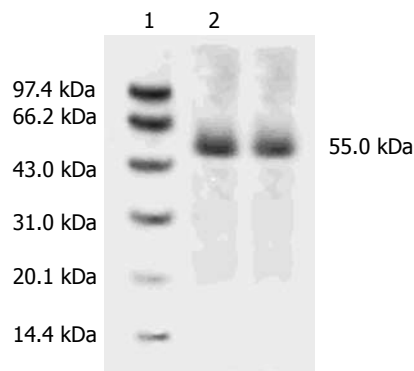


图2 Western blot。1: Marker; 2: 免疫印迹。

CTLA4Ig质粒的LB菌液进行鉴定测序, 目的基因片段大小为694 bp, 测序结果与GenBank上公布的序列完全吻合, 证明质粒构建正确。

2.2 受体小鼠血清CTLA4Ig的表达情况 受体小鼠转染5 d后, SDS-PAGE和Western blot结果显示, 在相对分子质量为55 kDa处出现单一的目的蛋白条带(图2)。转染40只小鼠, 有11只转染成功, 血清内稳定表达CTLA4Ig, 转染效率为27.50%。

2.3 小鼠胰岛移植后血糖维持正常的时间 对照组受体小鼠于胰岛移植后3 d血糖恢复正常, 但在4-8 d时发生排斥, 移植物平均存活时间为6.00 $\pm$ 0.16 d。空白转染组受体小鼠血糖变化与对照组相同, 移植物平均存活时间为5.00 $\pm$ 0.45 d, 两组比较存活时间没有显著性差异($P>0.05$)。转染组于移植后3 d血糖恢复正常, 之后血糖维持正常水平的时间较前两组明显延长, 移植物平均存活时间为19.00 $\pm$ 1.10 d, 与对照组和空白转染组比较, 移植物存活时间有显著性差异($P<0.05$)。

2.4 移植术后外周血T淋巴细胞功能状态 移植术

■应用要点
通过阻断CD28诱导胰岛移植后免疫耐受,有可能达到真正的免疫耐受状态,较以往任何一种抗排斥方法或阻断途径都有更大更广的应用前景.

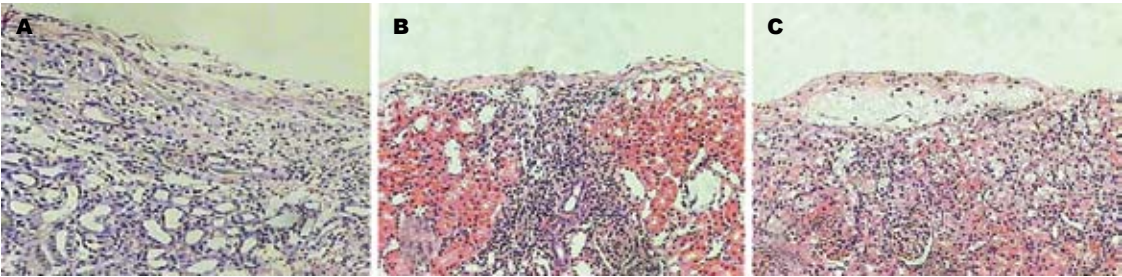


图 3 小鼠肾被膜下移植胰岛HE染色(×200). A: 对照组; B: 空白转染组; C: 转染组.

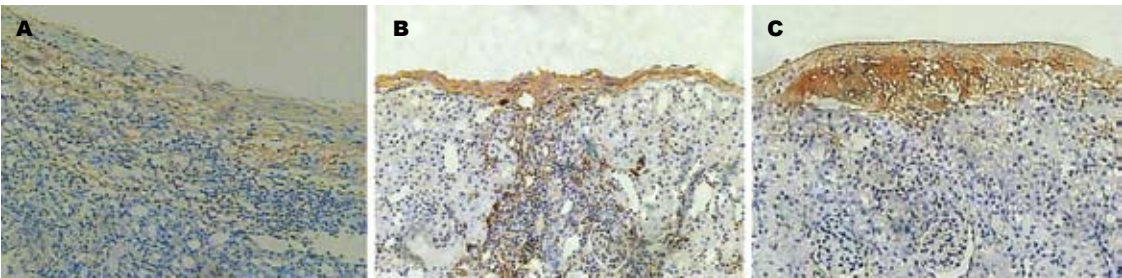


图 4 小鼠肾被膜下移植胰岛Insulin免疫组化染色(×200). A: 对照组; B: 空白转染组; C: 转染组.

后7 d, 对照组、空白转染组和转染组T淋巴细胞增殖实验显示, $^3\text{H-TdR}$ 放射性闪烁计数值(cpm)均值分别为 250.925 ± 3.189 , 249.664 ± 5.937 , 177.219 ± 3.412 次/min. 空白转染组和对照组比较, 转化率没有显著性差异($P>0.05$), 而转染组与前两组比较, 转化率有显著性差异($P<0.05$).

2.5 T淋巴细胞亚群表达情况 术后第7天, 实验各组 CD4^+ , CD8^+ T淋巴细胞平均荧光阳性百分率见表1. 空白转染组和对照组比较, 阳性百分率没有显著性差异($P>0.05$), 而转染组与前两组比较, 阳性百分率有显著性差异($P<0.05$).

2.6 病理组织学结果 转染组小鼠肾被膜下可见有成团的核深染细胞, 核深染、胞质较少, 排列成团但并不形成管腔, 也不具备肾小球的囊壁结构, 周边可见少量的淋巴细胞浸润. 对照组和空白转染组也可见类似结构, 但细胞团中心细胞很少, 周边有大量的淋巴细胞浸润. 转染组小鼠肾被膜下可见上述细胞团染成棕黄色, 呈颗粒状, 证实为有功能的胰岛. 而对照组和空白转染组上述细胞团仅有少量细胞染成棕黄色, 证明上述细胞是移植胰岛但功能丧失(图3-4).

3 讨论

胰岛移植与胰腺移植相比具有手术简单、并发症少、可重复性好、对全身干预小等优点, 但移植术后排斥反应制约了胰岛移植的进一步开展和应用. 现代免疫学研究进展表明^[11-16], 共刺

表 1 各组 CD4^+ , CD8^+ T淋巴细胞表达情况(mean $\pm$ SD, $n = 5$)

分组	各组荧光阳性百分率(%)	
	$\text{CD3}^+\text{CD4}^+$	$\text{CD3}^+\text{CD8}^+$
转染组	14.38 ± 0.84^a	14.77 ± 0.92^a
空白转染组	21.04 ± 1.14	23.84 ± 1.21
对照组	20.56 ± 0.68	24.63 ± 1.30

^a $P<0.05$ vs 空白转染组和对照组.

激信号系统在同种异体移植排斥反应中起了重要的作用, 而最重要的一组共同刺激分子是B7/CD28, 如果阻断B7与受体相结合, 抑制第二信号的产生, 将可能导致T细胞的克隆失活或克隆无反应, 诱导免疫耐受^[17-20].

CTLA4Ig是B7/CD28共刺激信号的特异性阻断剂. 体内、外实验表明^[21-25], CTLA4Ig有很强的免疫抑制作用, 应用CTLA4Ig封闭B7/CD28后, 对心脏、肾脏、肝脏、脾、骨髓、肺脏、角膜和皮肤等同种移植物有明显的保护作用. 因此, 应用CTLA4Ig阻断CD28/B7共刺激通路是一个较为理想的无胰岛毒性免疫抑制方案和潜在的诱导免疫耐受方案. 以往的实验基本都是应用CTLA4Ig在体内来直接封闭B7, 而CTLA4Ig的制备过程本身就比较复杂, 价格比较昂贵, 而且应用CTLA4Ig注射本身存在着单克隆抗体生物活性降低、血浆药物浓度不稳定等问

■名词解释

共刺激信号: 是T淋巴细胞活化过程中的一组必需因子, 包括T细胞表面因子及其配体. CD28表达在T细胞表面, 其配体是B7, 表达在抗原递呈细胞表面.

题. 近年来, 随着分子生物学的发展, 基因合成和基因转染技术的成熟为细胞长期稳定表达某种特殊基因产物提供了可能, 可以人为地合成某种特定基因, 然后转染实验个体, 最终达到治疗目的^[26-28]. Chahine *et al*^[29]和O'Rourke *et al*^[30]分别将含CTLA4Ig的cDNA转染至离体培养的肌细胞和树突状细胞中, 再与胰岛细胞共同移植于小鼠肾被囊下, 观察到肌细胞和树突状细胞作为基因库在移植原位不断表达CTLA4Ig, 且作用于移植物, 明显延长了移植物的存活时间.

在本实验中, 由于胰岛本身是一种不具有分化能力的细胞, 一般的转染效率很低, 而且直接转染胰岛本身还存在影响胰岛功能的潜在危险, 所以本实验不以胰岛细胞作为直接的靶细胞, 而采用直接转染受体小鼠肌细胞的方法, 取得了良好的转染效果, 转染40只小鼠, 11只稳定表达CTLA4Ig, 转染成功率为27.50%. 也有实验成功的利用腺病毒载体和改良HIV病毒的Lenti病毒载体转染胰岛, 但病毒载体存在一些潜在的危险, 如在宿主体内过度复制, 对机体基因组DNA产生不良影响等. 因此我们采用了质粒真核表达载体, 在不增加异种抗原的基础上获得了满意的转染效果, 又避免了腺病毒载体可能对宿主基因造成的不良影响. 本实验利用的脂质体转染、直接肌肉注射的方法, 具有操作简便、广谱和高效的特点, 应用Western blot方法检测血清中CTLA4Ig水平, 与以往的双抗体夹心酶联免疫吸附实验(ELISA)相比, 具有简便易行, 价格便宜的特点, 而且结果不受相关因素的影响.

本实验中, 转染组受体小鼠血糖维持正常时间及移植物存活时间均明显延长, T淋巴细胞转化率明显降低, CD4⁺和CD8⁺ T淋巴细胞平均荧光阳性百分率明显下降. 免疫组化染色结果显示, 转染组小鼠肾被膜下胰岛素颗粒染色强度明显增强, 说明排斥反应受到了明显的抑制.

本实验通过构建的真核表达载体pcDNA3-CTLA4Ig转染小鼠肌细胞, 在小鼠血清中成功的表达了CTLA4Ig, 抑制了同种异体胰岛移植排斥反应, 诱导小鼠自身的免疫耐受状态, 提高了胰岛移植的成功率, 为诱导移植免疫耐受提供了新的途径.

4 参考文献

- Berney T, Ricordi C. Islet cell transplantation: the future? *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 373-378
- Berney T, Buhler L, Caulfield A, Oberholzer J,

- Toso C, Alejandro R, Cooper DK, Ricordi C, Morel P. Transplantation of islets of Langerhans: new developments. *Swiss Med Wkly* 2001; 131: 671-680
- Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, Linsley PS, Bluestone JA. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. *Science* 1992; 257: 789-792
- Pearson TC, Alexander DZ, Winn KJ, Linsley PS, Lowry RP, Larsen CP. Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. *Transplantation* 1994; 57: 1701-1706
- Odorico JS, Sollinger HW. Technical and immunosuppressive advances in transplantation for insulin-dependent diabetes mellitus. *World J Surg* 2002; 26: 194-211
- Miyamoto M. Current progress and perspectives in cell therapy for diabetes mellitus. *Hum Cell* 2001; 14: 293-300
- Hoffmann F, Zhang EP, Pohl T, Kunzendorf U, Wachtlin J, Bulfone-Paus S. Inhibition of corneal allograft reaction by CTLA4-Ig. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997; 235: 535-540
- Sikorski R, Peters R. Tolerating differences. *Science* 1999; 285: 357-358
- Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, Davis TA, Dong Y, Gray GS, Hong X, Thomas D, Fechner JH Jr, Knechtle SJ. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 8789-8794
- Gainer AL, Korbitt GS, Rajotte RV, Warnock GL, Elliott JF. Expression of CTLA4-Ig by biologically transfected mouse islets promotes islet allograft survival. *Transplantation* 1997; 63: 1017-1021
- Schowalter DB, Meuse L, Wilson CB, Linsley PS, Kay MA. Constitutive expression of murine CTLA4Ig from a recombinant adenovirus vector results in prolonged transgene expression. *Gene Ther* 1997; 4: 853-860
- Ferretti G, Felici A, Pino MS, Cognetti F. Does CTLA4 influence the suppressive effect of CD25+CD4⁺ regulatory T cells? *J Clin Oncol* 2006; 24: 5469-5470
- Bugeon L, Wong KK, Rankin AM, Hargreaves RE, Dallman MJ. A negative regulatory role in mouse cardiac transplantation for a splice variant of CD80. *Transplantation* 2006; 82: 1334-1341
- Jen KY, Jain VV, Makani S, Finn PW. Immunomodulation of allergic responses by targeting costimulatory molecules. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6: 489-494
- Chen Z, Stockton J, Mathis D, Benoist C. Modeling CTLA4-linked autoimmunity with RNA interference in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 16400-16405
- Li S, Salgar SK, Thanikachalam M, Murdock AD, Gammie JS, Demetris AJ, Zeevi A, Pham SM. CTLA4-Ig-based conditioning regimen to induce tolerance to cardiac allografts. *J Surg Res* 2006; 136: 238-246
- Chandraker A, Huurman V, Hallett K, Yuan X, Tector AJ, Park CH, Lu E, Zavazava N, Oaks M. CTLA-4 is important in maintaining long-term survival of cardiac allografts. *Transplantation* 2005; 79: 897-903
- Li W, Zheng XX, Kuhr CS, Perkins JD. CTLA4 engagement is required for induction of murine

- liver transplant spontaneous tolerance. *Am J Transplant* 2005; 5: 978-986
- 19 Thiel MA, Steiger JU, O'Connell PJ, Lehnert AM, Coster DJ, Williams KA. Local or short-term systemic costimulatory molecule blockade prolongs rat corneal allograft survival. *Clin Experiment Ophthalmol* 2005; 33: 176-180
- 20 Wu G, Pfeiffer S, Schroder C, Zhang T, Nguyen BN, Lea W, Kelishadi S, Atkinson JB, Schuurman HJ, White DJ, Azimzadeh AM, Pierson RN 3rd. Co-stimulation blockade targeting CD154 and CD28/B7 modulates the induced antibody response after a pig-to-baboon cardiac xenograft. *Xenotransplantation* 2005; 12: 197-208
- 21 Watanabe T, Miyatake T, Kumamoto H, Mafune N, Kubota S, Okamoto H, Murashita T, Uede T, Yasuda K. Adenovirus-mediated CTLA4 immunoglobulin G gene therapy in cardiac xenotransplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 2478-2479
- 22 Lee EN, Kim EY, Lee J, Lee HJ, Lee KW, Joh JW, Lee SK, Lee DS, Lee HH, Kim SJ. Changes in expression of T-cell activation-related molecules and cytokines during tolerance induction in an allogeneic skin transplantation murine model. *Transplant Proc* 2004; 36: 2425-2428
- 23 Shirasugi N, Emmanouilidis N, Pearson TC, Larsen CP. Ability of donor splenocytes with costimulation blockade to induce mixed hematopoietic chimerism and transplantation tolerance. *Transplant Proc* 2004; 36: 2423-2424
- 24 Fernandes JR, Duvivier-Kali VF, Keegan M, Hollister-Lock J, Omer A, Su S, Bonner-Weir S, Feng S, Lee JS, Mulligan RC, Weir GC. Transplantation of islets transduced with CTLA4-Ig and TGFbeta using adenovirus and lentivirus vectors. *Transpl Immunol* 2004; 13: 191-200
- 25 Chen Z, Lu L, Li J, Xiao X, Fung JJ, Qian S. Prolonged survival of heart allografts transduced with AAV-CTLA4Ig. *Microsurgery* 2003; 23: 489-493
- 26 Guo L, Fujino M, Kimura H, Funeshima N, Kitazawa Y, Harihara Y, Tezuka K, Makuuchi M, Suzuki S, Li XK. Simultaneous blockade of co-stimulatory signals, CD28 and ICOS, induced a stable tolerance in rat heart transplantation. *Transpl Immunol* 2003; 12: 41-48
- 27 Stell D, Marshall H, Bradley JA, Bolton EM. CTLA4-Ig abrogates the anti-globulin response and prolongs cardiac allograft survival after anti-CD2 treatment. *Transpl Immunol* 2003; 12: 1-7
- 28 Ansari MJ, Abdi R. Emerging immunomodulatory therapies targeting the co-stimulatory pathways for the prevention of transplant rejection. *IDrugs* 2003; 6: 964-969
- 29 Chahine AA, Yu M, McKernan MM, Stoeckert C, Lau HT. Immunomodulation of pancreatic islet allografts in mice with CTLA4Ig secreting muscle cells. *Transplantation* 1995; 59: 1313-1318
- 30 O'Rourke RW, Kang SM, Lower JA, Feng S, Ascher NL, Baekkeskov S, Stock PG. A dendritic cell line genetically modified to express CTLA4-Ig as a means to prolong islet allograft survival. *Transplantation* 2000; 69: 1440-1446

■同行评价

本文通过构建真核表达载体pcDNA3-CTLA4-Ig转染小鼠肌细胞, 在小鼠血清中成功地表达了CTLA4Ig, 抑制了同种异体排斥反应, 提高了胰岛移植的成功率, 为临床诱导移植免疫耐受性提供了新的途径。

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

肝胆胰外科领域新技术研讨会通知

本刊讯 为了推动肝胆胰外科临床及科研工作的深入开展, 由哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰外科与《World Journal of Gastroenterology》杂志共同举办的国家继续教育项目“肝胆胰外科领域新技术研讨会”拟于2007-08-03/05在哈尔滨召开。届时将邀请日本及国内肝胆胰领域知名专家进行讲座和学术交流, 会议将对活体肝移植供受体手术、肝脏手术、血管技术在肝胆胰手术中的应用、如何提高胰十二指肠手术切除率以及生物人工肝脏等技术的新进展进行深入讨论, 学习该领域国内外先进技术和理念, 促进学术交流和学科发展。与会者将被授予国家I类继续教育学分12分。欢迎各位肝胆胰及相关领域同仁参加。

通讯地址: 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰腺外科 邮编: 150001 联系人: 吴祥松 电话: 0451-53643849-5721, 13633621389. E-mail: wxs417@yahoo.com.cn

收费标准: 500元(含资料费及午间工作餐, 统一安排食宿, 费用自理)。报到日期: 2007-08-02。

肾母细胞瘤过度表达基因对大鼠肝星状细胞生物学行为的影响

徐冬, 林菊生, 任精华, 陈琼, 姚津剑, 何星星

■背景资料

肝纤维化是慢性肝病发展到肝硬化的必经阶段, 其发病机制的研究是肝病攻关的热点课题之一。而肝星状细胞在肝纤维化发生、发展中起主导作用。对肝星状细胞活化过程中相关基因表达的变化进行研究可以有助于更好地了解肝纤维化的致病机制, 为肝纤维化新的治疗方法提供理论依据。

徐冬, 林菊生, 任精华, 陈琼, 姚津剑, 何星星, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
徐冬, 华中科技大学同济医学院硕士生, 主要从事肝胆疾病的研究。

通讯作者: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所。jslin@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83662578 传真: 027-83662578
收稿日期: 2007-01-30 接受日期: 2007-02-13

Effect of nephroblastoma overexpressed gene on biological behaviors of rat hepatic stellate cells

Dong Xu, Ju-Sheng Lin, Jing-Hua Ren, Qiong Chen, Jin-Jian Yao, Xing-Xing He

Dong Xu, Ju-Sheng Lin, Jing-Hua Ren, Qiong Chen, Jin-Jian Yao, Xing-Xing He, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. jslin@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2007-01-30 Accepted: 2007-02-13

Abstract

AIM: To construct recombinant plasmids that can express small interfering RNA (siRNA) targeting nephroblastoma overexpressed gene (NOV) and investigate its effect on the biological behaviors of hepatic stellate cells (HSCs).

METHODS: Hairpin siRNA templates targeting NOV gene were synthesized and cloned into plasmid vector psiRNA-H1neo. Three vector-derived siRNAs (denoted psiRNA1, 2 and 3) and one mocking pconsiRNA (as control) were constructed. The recombinant NOV siRNA plasmids were constructed and identified using restrictive enzyme analysis and DNA sequencing, and then transfected into HSCs by lipofectamine. HSCs were divided into group psiRNA1, psiRNA2, psiRNA3 and pconsiRNA, transfected with the corresponding recombinant plasmids. Blank group consisted of HSCs containing no plasmids.

The expression of NOV and α -smooth muscle actin (α -SMA) were detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. The mRNA expression of type I collagen and type III collagen were detected by semi-quantitative RT-PCR. Cell proliferation was assayed by MTT method and cell apoptosis by flow cytometry.

RESULTS: Restrictive enzyme analysis and DNA sequencing revealed the successful construction of siRNA expression plasmids. Compared with negative control group, extrogenous recombinant plasmid psiRNA2 reduced the mRNA levels of NOV (decreased rate: 73.0% vs 23.2%, $P < 0.05$), type I collagen (decreased rate: 59.8% vs 17.0%, $P < 0.05$), type III collagen (decreased rate: 37.1% vs 6.6%, $P < 0.05$), and inhibit the expression of α -SMA at mRNA level (decreased rate: 51.4% vs 15.1%, $P < 0.05$) and protein level. Compared with non-transfection group, extrogenous recombinant plasmid psiRNA2 significantly decreased the proliferating activity of HSC (24 h: 0.172 ± 0.005 vs 0.318 ± 0.018 , $P < 0.05$; 48 h: 0.296 ± 0.004 vs 0.472 ± 0.029 , $P < 0.05$; 72 h: 0.432 ± 0.024 vs 0.672 ± 0.050 , $P < 0.05$). No obvious changes were found in psiRNA1 group and psiRNA3 group (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: NOV can increase the secretion of extracellular matrix (ECM) and promote the proliferation and activation of HSCs. NOV may be a novel target for gene therapy of liver fibrosis.

Key Words: Nephroblastoma overexpressed gene; Small interfering RNA; Hepatic stellate cell

Xu D, Lin JS, Ren JH, Chen Q, Yao JJ, He XX. Effect of nephroblastoma overexpressed gene on biological behaviors of rat hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1602-1608

摘要

目的: 构建能表达靶向肾母细胞瘤过度表达基因(NOV)的小干扰RNA(siRNA)的重组质

粒,研究NOV对大鼠肝星状细胞(HSC)活化、增殖、凋亡、分泌细胞外基质(ECM)的影响。

方法:以NOV为目的基因,以质粒psiRNA-hH1neo为载体,构建能在真核细胞中表达的靶向NOV的siRNA的重组质粒psiRNA(psiRNA1, 2, 3)和阴性对照重组质粒pconsiRNA。限制性酶切和测序鉴定构建成功后,脂质体介导重组质粒转染HSC,依据转染质粒的不同将HSC分为psiRNA1组、psiRNA2组、psiRNA3组、阴性对照pconsiRNA组,并以未转染重组质粒的HSC为空白对照组。半定量RT-PCR检测HSC的NOV、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I型胶原、III型胶原mRNA表达情况,Western blot检测 α -SMA蛋白表达,MTT法检测细胞增殖,流式细胞仪分析细胞凋亡。

结果:限制性酶切和测序鉴定表明成功构建了NOVsiRNA表达质粒;与阴性对照组相比,转染外源重组质粒psiRNA2的HSC内NOV、 α -SMA的mRNA表达水平下降(73.0% vs 23.2%, 51.4% vs 15.1%, 均 $P<0.05$), I型胶原、III型胶原mRNA表达水平明显下降(59.8% vs 17.0%, 37.1% vs 6.6%, $P<0.05$), α -SMA蛋白表达水平下降。与空白对照组相比,转染外源重组质粒psiRNA2的HSC内HSC增殖活性显著降低(24 h: 0.172 ± 0.005 vs 0.318 ± 0.018 , $P<0.05$; 48 h: 0.296 ± 0.004 vs 0.472 ± 0.029 , $P<0.05$; 72 h: 0.432 ± 0.024 vs 0.672 ± 0.050 , $P<0.05$)。psiRNA1组、psiRNA3组的HSC内NOV mRNA、 α -SMA、I型胶原、III型胶原的表达及HSC增殖活性均无明显下降(均 $P>0.05$)。

结论:NOV可促进HSC增殖、活化及分泌细胞外基质,提示NOV可以作为肝纤维化基因治疗的一个新的靶位点。

关键词:肾母细胞瘤过度表达基因;小干扰RNA;肝星状细胞;半定量RT-PCR

徐冬, 林菊生, 任精华, 陈琼, 姚津剑, 何星星. 肾母细胞瘤过度表达基因对大鼠肝星状细胞生物学行为的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1602-1608
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1602.asp>

0 引言

肝纤维化是肝硬化的前期病理阶段,是肝脏受到慢性损伤时,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)可逆性沉积的创伤愈合过程。肝星状细胞

(hepatic stellate cell, HSC)的活化和增殖是肝纤维化发生的关键环节^[1]。肾母细胞瘤过度表达基因(nephroblastoma overexpressed gene, NOV)是一种胰岛素样生长因子(insulin like growth factor, IGF)结合蛋白(IGF binding proteins, IGFBPs),属于CCN家族的成员^[2-3]。Lee *et al*^[4]研究发现活化的HSC中NOV基因表达上升。但NOV对HSC的作用目前尚无研究。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是一种由小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)诱发的特定基因沉默^[5],基于此的RNAi技术在基因功能研究及基因治疗中发挥了重要作用。本实验构建靶向NOV的siRNA的表达载体,观察其对NOV表达和HSC活化、增殖及表达细胞外基质的影响,以此来研究NOV基因对大鼠HSC生物学行为的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 质粒DNA提取纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司;RNA提取试剂TRIzol购自上海华舜生物工程有限公司;Bbs I和Ase I内切酶、Taq酶购自Fermentas公司;T4DNA连接酶购于TaKaRa公司;M-MLV购自Promega公司;真核细胞转染试剂Lipofectamine2000为Invitrogen公司产品;噻唑蓝购自Amersco公司;小鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,小鼠抗GAPDH mAb购自武汉三鹰生物科技有限公司,辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)购自武汉凌飞科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。HSC由福建医科大学翁山耕教授惠赠^[6]。真核表达载体psiRNA-hH1neo由本实验室留存。

1.2 方法

1.2.1 靶向NOV基因的siRNA表达载体的构建 根据RNAi软件分析,设计寡核苷酸片段,以consiRNA为阴性对照,序列如表1。单链寡核苷酸片段由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,经过退火、连接、转化、筛选、Ase I酶切鉴定后,并进一步DNA测序证实这些阳性克隆的正确性。

1.2.2 HSC培养与形态学观察 大鼠HSC系rHSC-99是从正常Wistar大鼠分离出来的一个HSC系。细胞于37℃快速复苏,接种于玻璃培养瓶中,于50 mL/L二氧化碳、95%潮湿空气的二氧化碳培养箱里培养,24 h细胞完全贴壁后换液,以后每3-4 d换1次培养液,每隔4-8 h用

■ 研发前沿

肾母细胞瘤过度表达基因(NOV)表达产物是一种低亲和力胰岛素样生长因子结合蛋白,在正常HSC中无表达,近来研究发现在活化的HSC中NOV基因表达,并且随着HSC活化程度的上升NOV表达上升,但NOV在活化的HSC中的作用尚不明。需要进一步研究。

■创新盘点

肝星状细胞活化在肝纤维化过程中起主导作用。肝星状细胞活化、凋亡相关基因是目前肝纤维化研究中的热点。本文研究了NOV与肝星状细胞生物学性状之间的关系,发现NOV可促进肝星状细胞的活化,增强肝星状细胞的增殖能力,增加I型胶原、III型胶原mRNA的表达。

表 1 siRNA序列表

名称	序列	目标起始位置
ConsiRNA正义链	5'-TCCCAGCCTCCAAACTGTGAGTCTCTCCACCAGAGACTCACAGTTTGGAGGCTT-3'	
ConsiRNA反义链	5'-CAAAAAGCCTCCAAACTGTGAGTCTCTGGTGGAGAGACTCACAGTTTGGAGGCTT-3'	
siRNA1正义链	5'-TCCCAGTTCCAGAGGGAGACAACCTGTCCACCACAGTTGTCTCCCTCTGGAACCT-3'	292
siRNA1反义链	5'-CAAAAAGTTCCAGAGGGAGACAACCTGTGGTGGACAGTTGTCTCCCTCTGGAACCT-3'	
siRNA2正义链	5'-TCCCAGAAATCCATCCACCTACAGTTCCACCAACTGTAGGTGGATGGATTCTT-3'	795
siRNA2反义链	5'-CAAAAAGAAATCCATCCACCTACAGTTGGTGGAACTGTAGGTGGATGGATTCTT-3'	
siRNA3正义链	5'-TCCCAGCTGCTGTACGCCCTTCAATACCACCTATTGAAGGGCGTACAGCAGCTT-3'	878
siRNA3反义链	5'-CAAAAAGCTGCTGTACGCCCTTCAATAGGTGGTATTGAAGGGCGTACAGCAGCTT-3'	

表 2 引物序列表

引物名称	引物序列	扩增片段长度(bp)	退火温度(°C)
NOV上游引物	5'-ATGGTTCCAGAGGGAGACAA-3'	647	52.8
NOV下游引物	5'-CCTGGCAAAACACTGAAACTC-3'		
α -SMA上游引物	5'-TGTGCTGGACTCTGGAGATG-3'	292	54
α -SMA下游引物	5'-GATCACCTGCCCATCAGG-3'		
GAPDH上游引物	5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'	177	53
GAPDH下游引物	5'-GGATGCAGGGATGATGTTC-3'		
I型胶原上游引物	5'-GAGGCATAAAGGGTCATCGTG-3'	715	54
I型胶原下游引物	5'-GAACCTTCGCTTCCATACTCG-3'		
III型胶原上游引物	5'-CATTGCTGGAGTTGGAGGTG-3'	704	50
III型胶原下游引物	5'-GTCTCATGGCCTTGCGTGTT-3'		

OlympusCKX41相关倒置显微镜进行观察,待细胞长满单层,经胰蛋白酶消化并传代。

1.2.3 细胞瞬时转染 细胞分5组: HSC分别用重组质粒psiRNA1, psiRNA2, psiRNA3和pconsiRNA转染细胞,设未转染组为空白对照。转染前1 d,用胰蛋白酶消化液消化细胞并计数,将HSC细胞按每孔 3×10^5 浓度接种到6孔细胞培养板,同时按每孔 3×10^3 浓度接种到96孔细胞培养板,应用真核细胞转染试剂Lipofectamine2000转染,6孔板,每孔转染4.0 μ g重组质粒,96孔板每孔转染0.2 μ g重组质粒。

1.2.4 MTT法检测HSC增殖 96孔细胞培养板内每组设8个复孔,同时另设8个复孔不加细胞作为调零孔,均在转染24, 48和72 h后测定。测定时分别在每孔加入5 g/L噻唑蓝20 mL,再培养4 h,弃去上清后加入二甲基亚砷(DMSO) 200 μ L,振荡10 min后,用酶标仪(波长490 nm)测定HSC吸光度(A)。

1.2.5 RNA抽提及RT-PCR分析 6孔细胞培养板内细胞转染后48 h,按TRIzol说明书抽提细胞总RNA,溶于20 μ L DEPC-H₂O,测A₂₆₀/A₂₈₀值,计算

RNA浓度。取2 μ g RNA,按Promega公司M-MLV说明书操作行逆转录。反应条件: 42°C 60 min, 95°C 5 min,以所得cDNA为模板行PCR,按Fermentas公司Taq酶说明书操作,引物序列如下(表2)。

反应条件: PCR循环94°C 45 s,退火温度30 s, 72°C 45 s, 30个循环; 72°C 7 min。扩增产物于20 g/L琼脂糖凝胶中电泳,应用JS2380自动图像凝胶分析仪(上海培清公司),分析每条带的光密度值和所占的百分比,并和GAPDH比较,计算各组细胞的基因表达差异。

1.2.6 蛋白质抽提及Western blot分析 收集6孔板内细胞用冰PBS漂洗3次,离心,弃上清液,加蛋白裂解液[含50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 150 mmol/L NaCl, 1 mL/L TritonX-100, 10 g/L NaDeoxycholate, 1 g/L SDS, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF及蛋白酶抑制剂]抽提细胞蛋白,用Bradford法测蛋白浓度。取40 μ g蛋白样本放沸水震荡水浴5 min,以100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 α -SMA和GAPDH蛋白,转蛋白至硝酸纤维素膜; 50 g/L脱脂奶粉封闭2 h; 一抗

[α -SMA小鼠mAb(1:100稀释); GAPDH小鼠mAb(1:1000稀释)]4℃孵育过夜; TBS-T(含2 mL/L Tween20, 20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH7.4)洗膜3次, 每次10 min; 二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠IgG 1:2000稀释)37℃孵育1 h, TBS-T洗膜3次, 每次10 min, 应用DAB显色, 处理后观察结果. 应用JS2380自动图像凝胶分析仪(上海培清公司)对DAB显色结果进行扫描分析, 以GAPDH为内参照.

1.2.7 siRNA对HSC凋亡的影响 收集转染后的细胞, 用预冷的PBS液洗涤2次, 然后用-20℃预冷的700 mL/L乙醇固定过夜, PBS重悬, 用10 mg/L PI和5 g/L RNase在室温下避光进行DNA染色, 采用FACS流式细胞仪检测细胞凋亡, 数据采用ModFit软件分析.

统计学处理 数据资料用mean±SD表示, 采用SPSS11.0进行方差分析, 以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 NOVsiRNA表达载体的构建和鉴定 经双酶切纯化的线性质粒psiRNA-hH1neo与退火形成的双链siRNA插入片段按一定的比例连接, 连接后转入DH5 α , 经卡那霉素板行蓝白斑筛选, 筛选出的阳性克隆抽提质粒, 内切酶Ase I酶切分析鉴定为psiRNA1, psiRNA2, psiRNA3, pconsiRNA(图1), 结果显示与预期完全一致, 测序结果进一步显示目的片段插入psiRNA-hH1neo载体中, 所测序列与合成序列吻合(测序结果未显示).

2.2 HSC中NOV基因mRNA表达 RT-PCR检测NOV mRNA表达, 经计算机灰度扫描及与内参比较分析显示, 与空白对照组相比, 在转染psiRNA1, psiRNA2, psiRNA3, pconsiRNA后48 h HSC内NOV mRNA分别下降37.8%, 73.0%, 42.5%, 23.2%. 与阴性对照组相比, psiRNA2组内NOV mRNA明显下降($P<0.05$), 而psiRNA1组、psiRNA3组内NOV mRNA下降不明显($P>0.05$)(图2).

2.3 HSC中 α -SMA表达的检测 RT-PCR及Western blot结果经计算机灰度扫描并与内参照(GAPDH)比较分析显示, 与空白对照组相比, 在转染psiRNA1, psiRNA2, psiRNA3, pconsiRNA后48 h HSC内 α -SMA mRNA分别下降25.7%, 51.4%, 27.2%, 15.1%(图3). 转染psiRNA2组 α -SMA蛋白表达较空白对照组下降40%(图4). 与阴性对照组相比, psiRNA2组内 α -SMA mRNA明显下降

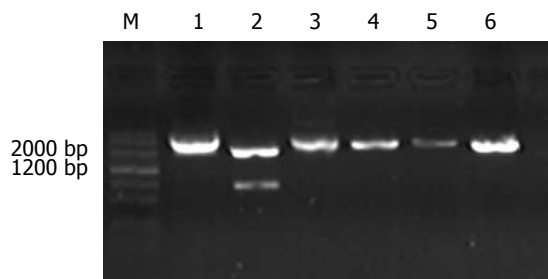


图1 Ase I酶切重组siRNA. M: Marker 3; 1: psiRNA-hH1neo; 2: psiRNA-hH1neo酶切后; 3: psiRNA1酶切后; 4: psiRNA2酶切后; 5: psiRNA3酶切后; 6: pconsiRNA酶切后.

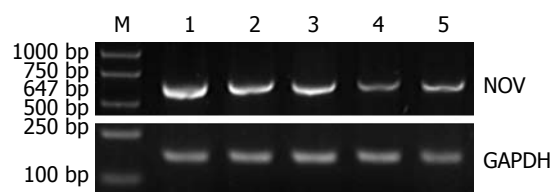


图2 HSC中NOV mRNA表达. M: Marker DL2000; 1: 空白组; 2: 转染pconsiRNA组; 3: 转染psiRNA1组; 4: 转染psiRNA2组; 5: 转染psiRNA3组.

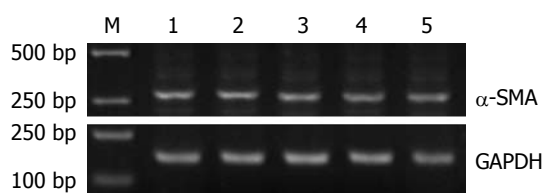


图3 α -SMA mRNA表达. M: Marker DL2000; 1: 空白组; 2: 转染pconsiRNA组; 3: 转染psiRNA1组; 4: 转染psiRNA2组; 5: 转染psiRNA3组.

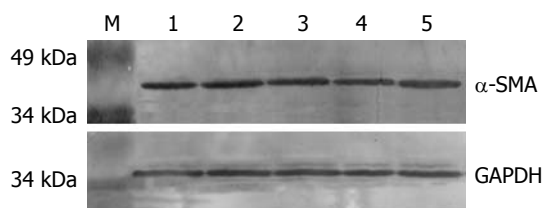


图4 α -SMA蛋白表达. M: 预染蛋白分子量标准; 1: 空白组; 2: 转染pconsiRNA组; 3: 转染psiRNA1组; 4: 转染psiRNA2组; 5: 转染psiRNA3组.

($P<0.05$), 而psiRNA1组、psiRNA3组内 α -SMA mRNA下降不明显(均 $P>0.05$).

2.4 MTT检测HSC增殖 转染psiRNA2组细胞增殖活性显著低于空白对照组($P<0.05$), 且在转染后24 h时siRNA2抑制细胞增殖活性的能力最强; 转染pconsiRNA、psiRNA1和psiRNA3组细胞增殖活性与空白对照组相比没有显著改变(均 $P>0.05$)(表3).

应用要点

本研究结果表明肾母细胞瘤过度表达基因(NOV)能促进肝星状细胞的活化、增殖, 增加细胞外基质的表达, 表明NOV基因在肝纤维化发展中起促进作用. 本实验为NOV在肝星状细胞中作用机制的进一步研究提供了实验依据, 为肝纤维化的研究提供了一条新思路, 同时为肝纤维化的基因治疗提供了新靶点.

■名词解释

肾母细胞瘤过度表明基因(NOV): 人NOV基因定位于常染色体8q24.1, 其编码产物是一种低亲和力胰岛素样生长因子结合蛋白, 属于CCN家族的成员, 目前研究发现其能调节细胞内钙离子水平, 并能抑制某些肿瘤的生长。

表 3 siRNA沉默NOV基因对HSC增殖的影响(mean $\pm$ SD, $n = 8$)

分组	吸光度(A)		
	24 h	48 h	72 h
空白	0.318 $\pm$ 0.018	0.472 $\pm$ 0.029	0.672 $\pm$ 0.050
pconsiRNA	0.256 $\pm$ 0.030	0.440 $\pm$ 0.011	0.575 $\pm$ 0.041
psiRNA1	0.215 $\pm$ 0.005	0.401 $\pm$ 0.018	0.473 $\pm$ 0.019
psiRNA2	0.172 $\pm$ 0.005 ^a	0.296 $\pm$ 0.004 ^a	0.432 $\pm$ 0.024 ^a
psiRNA3	0.210 $\pm$ 0.034	0.381 $\pm$ 0.007	0.469 $\pm$ 0.0137

^a $P < 0.05$ vs 空白对照组.

2.5 流式细胞仪分析细胞凋亡 流式细胞术分析表明, 与空白对照组相比, 转染pconsiRNA, psiRNA1, psiRNA3和psiRNA2的HSC凋亡均不显著。

2.6 I, III型胶原mRNA的表达 RT-PCR结果经计算机灰度扫描并与内参照(GAPDH)比较分析显示, 与空白对照组相比, 在转染psiRNA1, psiRNA2, psiRNA3, pconsiRNA后48 h I型胶原mRNA分别下降19.4%, 59.8%, 34.1%, 17.0%, III型胶原mRNA分别下降17.2%, 37.1%, 9.2%, 6.6%。与阴性对照组相比, psiRNA2组内I, III型胶原mRNA明显下降($P < 0.05$), 而psiRNA1组、psiRNA3组内I, III型胶原mRNA下降不明显(均 $P > 0.05$)(图5)。

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病发展到肝硬化的必经阶段, 在致病因素消除后可以发生逆转^[7], 其发病机制的研究是肝病攻关的热点课题之一。HSC在肝纤维化发生、发展中起主导作用。在各种致病因素作用下, 静止期HSC被激活并增殖, 转化为肌成纤维样母细胞, 合成和分泌ECM上调, 同时合成和释放大量的基质金属蛋白酶抑制因子, 使间质胶原酶等蛋白酶活性降低, ECM降解减少, 最终导致ECM积聚而发生肝纤维化乃至肝硬化^[1]。

NOV是一种低亲和力胰岛素样生长因子结合蛋白, 其效应有胰岛素样生长因子依赖性和胰岛素样生长因子非依赖性^[8]。目前研究发现NOV可调节细胞内钙离子水平^[9-10], 并对某些肿瘤有抑制生长作用。Lee *et al*^[4]研究发现在活化的HSC中NOV基因表达上升。Northern analysis表明NOV mRNA在培养的鼠HSC中表达上升。并观察发现在CCL4诱导的及胆管结扎导致的鼠肝纤维化模型中NOV mRNA上调, RT-PCR表明与正常肝组织相比, 人NOV mRNA在纤维化的肝组织中增加。在人或鼠的肝纤维化中NOV蛋

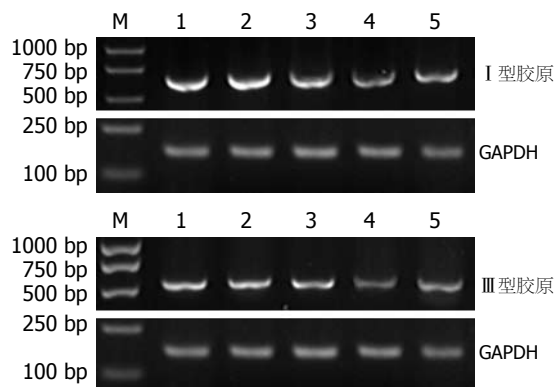


图 5 I型胶原、III型胶原mRNA表达。M: Marker DL2000; 1: 空白组; 2: 转染pconsiRNA组; 3: 转染psiRNA1组; 4: 转染psiRNA2组; 5: 转染psiRNA3组。

白的表达主要位于导管增生区或纤维隔HSC中。但NOV在活化的HSC中的作用尚不明了。

RNAi现象是指内源性或外源性双链RNA(dsRNA)介导细胞内的mRNA发生特异性降解, 导致靶基因的表达沉默, 产生相应的功能表型缺失^[5]。RNAi具有自我扩增性, 能够在细胞间传代, 甚至将效应传到下一代^[11]。最近研究表明, 无论在体内还是体外RNAi比反义寡核苷酸更具有优势效应^[12-13]。

早期siRNA多为化学合成, 目前的研究中较多的使用基于载体表达的方法制备siRNA。根据研究物种的不同, 可选用特异的RNA多聚酶识别的启动子, 目前已用于哺乳动物RNAi研究的载体常用的启动子有T7, H1, U5, U6启动子等。这些表达载体, 在瞬时稳定地转染了哺乳动物细胞后, 可以持续的表达siRNA。这一类基于载体制备的siRNA能够在细胞内持续表达, 因此可以比直接转染siRNA更持久^[14-16]。可将插入序列设计成含基因特异序列的反转重复序列, 他在体内表达后自发形成小发夹RNA(smallhairpinRNAs, shRNA), shRNA继而被

加工成siRNA样分子, 执行基因特异的沉默^[17]. 本实验构建了针对NOV的siRNA的真核表达载体, 并把其转染入HSC细胞内, 结果证实这些载体可以在转染的HSC中高效表达, RT-PCR结果显示siRNA2抑制靶基因表达的效果最明显, 而siRNA1和siRNA3抑制效果不明显, 这可能是因为靶基因上siRNA作用位点选择不当, 并且不是所有的siRNA都能够接近靶序列RNA, 有些序列包埋于靶RNA的二级结构或折叠区域, 而另一些则与蛋白质形成紧密的复合物, 阻碍了对靶基因序列的识别^[18].

肝星状细胞活化过程中伴随着 α -平滑肌肌动蛋白表达增加^[19], 检测 α -平滑肌肌动蛋白表达是鉴定HSC激活或判定HSC活化状态的一种有效方法. 本实验中转染psiRNA2的HSC与转染其他质粒的相比 α -SMA的mRNA及蛋白表达明显下降, 表明siRNA2能明显抑制HSC的活化, 由此可推论NOV在HSC的活化中可以起一定的促进作用.

I型胶原及III型胶原是细胞外基质的主要成分. 胶原蛋白在正常肝脏内约占蛋白总量的5%-20%, 肝纤维化时可增加至50%左右. 肝纤维化时发现5种主要胶原蛋白, 其中以I、III型为主, 肝纤维化早期以III型为主, 后期以I型为主^[20-21]. 在肝纤维化过程中I、III型胶原是肝纤维间隔的重要来源. RT-PCR结果显示siRNA2沉默NOV基因对大鼠HSC I型胶原、III型胶原mRNA表达有明显抑制作用. 这表明NOV基因可促进活化的HSC表达细胞外基质.

Maillard *et al*^[22]研究发现, 在前列腺细胞转化过程, 随着NOV表达增多, 细胞的增殖能力增强. Glukhova *et al*^[23]在肾细胞癌的研究中发现随着NOV表达上升, 癌细胞的分级增高, 并且在SCID小鼠中的成瘤能力增强. 本实验MTT结果证实了siRNA2降低HSC增殖活性, 表明NOV基因能增强HSC增殖能力. 但Gupta *et al*^[24]研究发现在G59神经胶质瘤细胞系中导入NOV基因降低了细胞的增殖能力和致瘤性. 同时NOV基因表达在不同类型的组织中可以不同, 如在骨肉瘤中表达升高, 在尤文氏肉瘤中不确定, 而在横纹肌肉瘤中则降低^[25], 在尤文氏肉瘤中随着NOV表达增多, 细胞的增殖能力减弱, 但转移及侵袭性增强^[26]. 这些研究结果表明NOV的生物学效应也许与效应细胞种类有关. 本实验表明NOV可促进HSC的活化及增殖, 增加I型胶原、III型胶原mRNA的表达, NOV可以作为肝

纤维化基因治疗的一个靶位点.

4 参考文献

- 1 Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
- 2 Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT Jr, Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 12981-12986
- 3 Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev* 1999; 20: 189-206
- 4 Lee SH, Seo GS, Park YN, Sohn DH. Nephroblastoma overexpressed gene (NOV) expression in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1391-1400
- 5 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251
- 6 冷希圣, 翁山耕, 李涛, 魏玉华, 彭吉润, 杜如昱. 大鼠肝星状细胞系的建立及其生物学特性的研究. *解剖学报* 2003; 34: 269-274
- 7 Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. *J Gastroenterol* 1997; 32: 424-430
- 8 Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, Plassiart G, Brisac M, Crochet J, Perbal B. Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 10-21
- 9 Li CL, Martinez V, He B, Lombet A, Perbal B. A role for CCN3 (NOV) in calcium signalling. *Mol Pathol* 2002; 55: 250-261
- 10 Lombet A, Planque N, Bleau AM, Li CL, Perbal B. CCN3 and calcium signaling. *Cell Commun Signal* 2003; 1: 1
- 11 Paroo Z, Corey DR. Challenges for RNAi in vivo. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 390-394
- 12 Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1000-1004
- 13 Aoki Y, Cioca DP, Oidaira H, Kamiya J, Kiyosawa K. RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 96-102
- 14 Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 5515-5520
- 15 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
- 16 Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1443-1448
- 17 Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6047-6052

■同行评价

本文研究了肾母细胞瘤过度表达基因对大鼠肝星状细胞生物学行为的影响, 内容新颖, 具有一定的意义.

- 18 Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 691-699
- 19 Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, Friedman SL. Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1992; 24: 193-203
- 20 Van Eyken P, Sciort R, Desmet VJ. Expression of the novel extracellular matrix component tenascin in normal and diseased human liver. An immunohistochemical study. *J Hepatol* 1990; 11: 43-52
- 21 Gulubova MV, Stoyanov HD, Julianov AE, Vasilev IV, Stoyanova II, Hadjipetkov PB. Immunohistochemical detection of collagen type III and IV in relation with transformation of Ito cells in liver sinusoids of patients with reactive biliary hepatitis. *Acta Histochem* 1999; 101: 213-228
- 22 Maillard M, Cadot B, Ball RY, Sethia K, Edwards DR, Perbal B, Tatoud R. Differential expression of the ccn3 (nov) proto-oncogene in human prostate cell lines and tissues. *Mol Pathol* 2001; 54: 275-280
- 23 Glukhova L, Angevin E, Lavialle C, Cadot B, Terrier-Lacombe MJ, Perbal B, Bernheim A, Goguel AF. Patterns of specific genomic alterations associated with poor prognosis in high-grade renal cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 130: 105-110
- 24 Gupta N, Wang H, McLeod TL, Naus CC, Kyurkchiev S, Advani S, Yu J, Perbal B, Weichselbaum RR. Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). *Mol Pathol* 2001; 54: 293-299
- 25 Manara MC, Perbal B, Benini S, Strammiello R, Cerisano V, Perdichizzi S, Serra M, Astolfi A, Bertoni F, Alami J, Yeger H, Picci P, Scotlandi K. The expression of ccn3(nov) gene in musculoskeletal tumors. *Am J Pathol* 2002; 160: 849-859
- 26 Benini S, Perbal B, Zambelli D, Colombo MP, Manara MC, Serra M, Parenza M, Martinez V, Picci P, Scotlandi K. In Ewing's sarcoma CCN3(NOV) inhibits proliferation while promoting migration and invasion of the same cell type. *Oncogene* 2005; 24: 4349-4361

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

本刊讯 为提高我国消化内镜诊疗技术的整体水平,《中华消化内镜杂志》编辑部拟于2007-08在新疆乌鲁木齐市召开“全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会”,邀请消化和消化内镜专家作有关专题学术报告.会议将出论文汇编,并授予继续教育 I 类学分,《中华消化内镜杂志》将择优刊登应征论文.

1 征文内容

征文内容包括消化系统疾病的内镜(食管镜、胃镜、十二指肠镜、小肠镜、大肠镜、肠道镜、腹腔镜、超声内镜等)诊疗技术;内镜外科的临床应用及进展;食管、胃、肠、肝胆、胰腺疾病的基础研究、临床诊治及其进展(炎症、溃疡、出血、肿瘤、异物等);消化系统疾病的中医、中西医结合治疗及其进展;消化内镜消毒及护理技术,消化系统疾病的急诊护理.

2 征文要求

应征文章按《中华消化内镜杂志》稿约要求撰写打印,并寄3000字以内全文及500字以内的论文摘要各一份;已投《中华消化内镜杂志》尚未发表的稿件,请注明稿号.应征文章经单位推荐盖公章后,寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收.邮编:210003.信封左下脚注“征文”字样,同时汇寄审稿费10元.请自留底稿,恕不退稿.截稿日期2007-05-31.有关会议的具体事项另行通知.联系电话:025-83472831, 86086091.

半夏泻心汤抑制DMH/DSS诱导的结肠炎相关性结肠癌的发生

冯娟, 刘莉, 李宇华, 孙阳, 张蓉, 刘振国, 王庆伟, 梅其炳

冯娟, 刘莉, 李宇华, 孙阳, 张蓉, 刘振国, 王庆伟, 梅其炳, 第四军医大学药理学教研室 陕西省西安市 710032

冯娟, 硕士, 主要从事中药药理方面的研究.

通讯作者: 梅其炳, 710032, 陕西省西安市, 第四军医大学药理学教研室, qbmei@fmmu.edu.cn

电话: 029-84774555

收稿日期: 2007-02-02 接受日期: 2007-03-06

Pinelliae Decoction for Purging Stomach-Fire inhibit the incidence of colitis-related colon cancer induced by 1, 2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate

Juan Feng, Li Liu, Yu-Hua Li, Yang Sun, Rong Zhang, Zhen-Guo Liu, Qing-Wei Wang, Qi-Bing Mei

Juan Feng, Li Liu, Yu-Hua Li, Yang Sun, Rong Zhang, Zhen-Guo Liu, Qing-Wei Wang, Qi-Bing Mei, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Qi-Bing Mei, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. qbmei@fmmu.edu.cn

Received: 2007-02-02 Accepted: 2007-03-06

Abstract

AIM: To observe the inhibitory effects of Pinelliae Decoction for Purging Stomach-Fire (PDPSF) on the development from colitis to colon cancer.

METHODS: A total of 65 male ICR mice were randomly divided into normal group, model group and PDPSF groups with different doses. Except 10 mice in normal group, the other mice were given a single intraperitoneal injection of 1, 2-dimethylhydrazine (DMH) at the dose of 20 mg/kg body weight. One week after the injection, the animals were given 20 g/L dextran sodium sulfate (DSS) in drinking water for 7 consecutive days. Except the 20 mice in model group, 10 of the remaining survived 30 mice were administered orally with PDPSF at doses of

100, 200 and 400 mg/kg, respectively, once daily for 11 weeks. In the 20th week, all the mice were sacrificed, and the colon was removed, weighted and fixed with 40 g/L formalin for HE staining.

RESULTS: In the 20th week, rectal prolapse was investigated in 40% mice in model group, and the occurrence rate of carcinoma was 85%. However, no rectal prolapse was found in the mice received PDPSF treatment, and the occurrence rate of carcinoma was 20%, 10% and 10% when PDPSF was used at the doses of 100, 200 and 400 mg/kg. After induction of DMH/DSS, the splenic index was significantly increased (6.50 ± 4.08 mg/g vs 4.25 ± 3.39 mg/g, $P < 0.01$), while the thymus index was markedly decreased (0.60 ± 0.33 mg/g vs 0.71 ± 0.29 mg/g, $P < 0.05$) in comparison with that in the control group. PDPSF remarkably resisted the atrophy of thymus gland and splenic enlargement. Pathological examination showed that PDPSF had stopped colitis from developing into colonic carcinoma.

CONCLUSION: PDPSF can suppress colon carcinogenesis induced by DMH/DSS, indicating that effective therapy for ulcerative colitis might help to inhibit colon cancer development.

Key Words: Pinelliae Decoction for Purging Stomach-Fire; Ulcerative colitis; Colon cancer; 1, 2-dimethylhydrazine; Dextran sodium sulfate

Feng J, Liu L, Li YH, Sun Y, Zhang R, Liu ZG, Wang QW, Mei QB. Pinelliae Decoction for Purging Stomach-Fire inhibit the incidence of colitis-related colon cancer induced by 1, 2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1609-1614

摘要

目的: 观察半夏泻心汤对DMH/DSS诱导的结肠炎向结肠癌转变的抑制作用.

方法: ♂ ICR小鼠65只, 随机分为正常组、模型组和半夏泻心汤3个剂量(100, 200, 400 mg/

■背景资料

半夏泻心汤出自《伤寒论》, 一般认为本方是有效的胃肠道黏膜保护剂和良好的免疫调节剂. 日本学者野村麻乃曾用半夏泻心汤治疗TNBS诱导的大鼠溃疡性结肠炎取得良好疗效, 本实验观察半夏泻心汤对1, 2-二甲肼(DMH)/右旋葡聚糖苷钠(DSS)诱导的结肠炎向结肠癌的转变, 以期为临床使用半夏泻心汤阻滞溃疡性结肠炎癌变提供理论依据.

■同行评价

结肠癌的发病率在美国等西方国家较高,中国也有上升趋势,研究预防结肠癌的发生是一项非常有意义的工作,尤其是应用中医经方来预防该疾病的发生,更是光大中医的优势,因此,本文有应用价值。

kg)给药组。采用腹腔注射1, 2-二甲胂20 mg/kg及饮用含20 g/L的右旋葡聚糖苷钠复制结肠炎相关的小鼠结肠癌。除模型组20只小鼠,其余30只存活小鼠在出现第二次便血时分别口服给予半夏泻心汤100, 200和400 mg/kg进行治疗,1次/d,共11 wk。实验第20周,乙醚麻醉处死小鼠,截取结肠,称重;记录结肠肿瘤数目,取结肠做HE染色;摘取脾脏、胸腺称重。

结果:在实验第20周,40%的模型组小鼠出现脱肛,成癌率为85%。半夏泻心汤3个剂量组则未见脱肛小鼠,100 mg/kg组成癌率为20%,200和400 mg/kg成癌率为10%。DMH/DSS诱导的结肠癌小鼠脾脏指数显著升高(6.50 ± 4.08 mg/g vs 4.25 ± 3.39 mg/g, $P < 0.01$),而胸腺指数则明显降低(0.60 ± 0.33 mg/g vs 0.71 ± 0.29 mg/g, $P < 0.05$),与对照组相比有显著性差异。半夏泻心汤可明显的对抗结肠癌小鼠胸腺的萎缩($P < 0.05$),而对脾脏的增大也有明显的治疗作用($P < 0.01$)。病理结果表明,半夏泻心汤成功的将小鼠结肠停留在炎症状态,阻止了结肠炎向结肠癌的转变。

结论:半夏泻心汤能够显著地抑制结肠炎向结肠癌的转变,结肠炎的有效治疗是防止结肠癌发生的重要措施。

关键词:半夏泻心汤;结肠炎;结肠癌;1, 2-二甲胂;右旋葡聚糖苷钠

冯娟, 刘莉, 李宇华, 孙阳, 张蓉, 刘振国, 王庆伟, 梅其炳. 半夏泻心汤抑制DMH/DSS诱导的结肠炎相关性结肠癌的发生. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1609-1614
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1609.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因复杂的消化道疑难病,在西方国家的发病率高达234/10万,在我国也呈逐年上升趋势。由于结肠炎症反复发作,迁延不愈,25 a以上病程癌变率高达40%^[1]。研究报道表明,慢性炎症的反复损伤、修复、增生、引起基因突变,从而引起细胞癌变,大约有20%的人类癌症来源于慢性炎症^[2]。据报道,上海市的结肠癌发病率、病死率均明显升高。在众多恶性肿瘤中,其病死率已跃居第2位。因此,对于结肠炎症的有效治疗是阻止结肠炎向结肠癌演变的重要手段,采用非甾体类抗炎药可以有效的延缓结肠炎向结肠癌的转变,但是此类药物长期使用有很多副作用,是否可以常规的用于阻止结肠炎的癌变,尚

存在很多争论^[3-4]。Vanamala *et al*^[5]采用柚柑有效成分通过抗炎作用显著的阻滞了氧化偶氮甲烷(azoxy-methane, AOM)引起的结肠炎向结肠肿瘤的发展。近年来越来越多的报道显示,中医复方治疗溃疡性结肠炎疗效好,副作用少,而且可长期使用。半夏泻心汤出自《伤寒论》,由君药半夏和生姜,臣药黄芩与黄连,佐使人参、炙甘草和大枣组成,因其对消化系统疾病的可靠疗效,被誉为“调和脾胃”的祖方,一般认为本方是有效的胃肠道黏膜保护剂和良好的免疫调节剂^[6]。日本学者野村麻乃^[7]曾用半夏泻心汤治疗三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitro-benzene sulfonic acid, TNBS)诱导的大鼠溃疡性结肠炎取得良好疗效,本实验观察半夏泻心汤对1, 2-二甲胂(DMH)/右旋葡聚糖苷钠(DSS)诱导的结肠炎向结肠癌的转变,以期为临床使用半夏泻心汤阻滞溃疡性结肠炎癌变提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ 5周龄CD-1(ICR)小鼠65只,购于上海斯莱克实验动物中心。小鼠购回后饲养在第四军医大学实验动物中心。5只一组,饲养于代谢笼内,给予自由饮水、饲以普通的颗粒饲料。饲养环境控制在:湿度(50%±10%),光照(12 h照明,12 h黑暗交替),温度(23±2℃)。适应饲养7 d后,随机分为正常组10只、模型组和半夏泻心汤3个剂量给药组,共55只。每天观察动物的一般行为,每周记录动物摄食量及动物体质量,并观察动物的尿液。1, 2-二甲胂(DMH),购于Sigma公司,右旋葡聚糖苷钠(DSS),分子量为36 000-50 000,购于美国ICN公司。

1.2 方法

1.2.1 半夏泻心汤提取物制备 半夏泻心汤由半夏、生姜、黄芩、黄连、人参、炙甘草和大枣组成。依据半夏泻心汤的组方剂量,严格按照《伤寒论》的配比,将7味药混合打粉,提取回流3次,每次2 h,合并提取液,浓缩,干燥、打粉,备用。

1.2.2 小鼠结肠炎相关结肠癌模型的复制 小鼠结肠炎相关结肠癌模型的复制依据文献[8-10]方法。将65只ICR小鼠随机分为2大组,即:生理盐水组(10只)和模型组(55只)。将DMH溶于生理盐水中,使其终浓度为20 mg/kg,用0.25 mol/L NaOH调整pH值至6.5,腹腔注射给予小鼠。1 wk后,在模型组和半夏泻心汤组小鼠的饮水中添加DSS(20 g/L),给予小鼠连续饮用7 d。所有存活

表 1 半夏泻心汤对DMH/DSS诱导小鼠结肠癌脾脏、胸腺变化的影响(mean $\pm$ SD)

药物	体质量(g)	脾脏质量(mg)	脾脏指数(mg/g)	胸腺质量(mg)	胸腺指数(mg/g)
盐水对照组	48.12 $\pm$ 4.02	194.20 $\pm$ 121.30	4.25 $\pm$ 3.39	34.50 $\pm$ 15.44	0.71 $\pm$ 0.29
DMH+DSS	48.96 $\pm$ 4.81	296.75 $\pm$ 187.37	6.50 $\pm$ 4.08 ^b	32.75 $\pm$ 15.44	0.60 $\pm$ 0.33 ^a
DMH+DSS+PDPSF 100 mg/kg	45.46 $\pm$ 2.11	155.50 $\pm$ 105.77 ^d	4.42 $\pm$ 1.37	31.30 $\pm$ 22.01	0.73 $\pm$ 0.45
DMH+DSS+PDPSF 200 mg/kg	44.37 $\pm$ 3.62	198.78 $\pm$ 61.58 ^d	4.48 $\pm$ 1.00	33.72 $\pm$ 19.68 ^c	0.76 $\pm$ 0.53
DMH+DSS+PDPSF 400 mg/kg	47.68 $\pm$ 3.95	207.88 $\pm$ 150.08 ^d	4.36 $\pm$ 3.25	35.76 $\pm$ 12.83 ^c	0.75 $\pm$ 0.28

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 盐水对照组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs DMH+DSS.

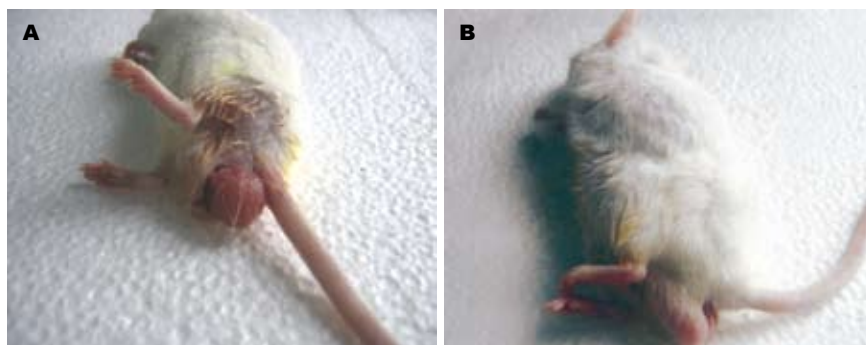


图 1 DMH+DSS引起小鼠脱肛, 半夏泻心汤100, 200和400 mg/kg均能阻止小鼠脱肛. A: 脱肛小鼠; B: 未脱肛小鼠.

小鼠(50只)按常规饲养, 在小鼠出现第二次便血时, 即给予DMH后的第9周, 按体质量随机将模型小鼠分为4组, 即: 模型组(20只)和半夏泻心汤组: 100, 200, 400 mg/kg(各10只, 剂量由人用量换算过来). 半夏泻心汤灌胃给予小鼠, 每天1次, 共11 wk.

1.2.3 小鼠结肠癌模型指标评价 实验第20周, 乙醚麻醉小鼠. 剪开小鼠腹腔, 在冰浴中从肛门向上截取结肠8 cm, 用生理盐水冲洗后, 滤纸吸干, 称体质量. 记录结肠肿瘤数目, 取结肠约1 cm浸泡于40 g/L甲醛固定液中24 h. 组织包蜡后切片, 以备做HE染色. 摘取脾脏、胸腺称体质量.

统计学处理 数据用SPSS11.0软件处理, 结果采用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示.

2 结果

2.1 半夏泻心汤对DMH/DSS诱导小鼠结肠癌脱肛率的影响 腹腔给予小鼠20 mg/kg DMH后, 5只小鼠死亡, 由于DMH有严重的肝毒性, 解剖死亡小鼠, 发现其肝脏萎缩明显. 给予20 g/L DSS后, 小鼠在第4周出现血便. 同时体质量有所下降(无显著性差异, 数据未列出), 血便出现1 wk后消失. 第9周小鼠再次出现血便, 分别给予小鼠半夏泻心汤100, 200和400 mg/kg. 模型组小鼠在第20周, 40%的小鼠出现脱肛, 而半夏泻心汤三个剂量组则未见脱肛小鼠(图1).

2.2 半夏泻心汤对DMH/DSS诱导小鼠结肠癌脾脏、胸腺变化的影响 DMH/DSS诱导的结肠癌小鼠, 脾脏指数显著升高, 而胸腺指数则明显降低, 与对照组相比有显著性差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$). 半夏泻心汤对脾脏的增大有治疗作用, 也可明显的对抗结肠癌小鼠胸腺的萎缩($P<0.01$ 或 $P<0.05$)(表1).

2.3 半夏泻心汤对DMH/DSS诱导小鼠结肠癌结肠重量、成瘤率和肿瘤数量的影响 DMH/DSS引起的小鼠结肠炎在经过20 wk的变化, 20只小鼠有17只(85%)小鼠结肠出现1-20个不等的小肿瘤, 其余3只未形成肿瘤的小鼠, 结肠充血增厚. 而半夏泻心汤治疗的小鼠, 100 mg/kg组10只小鼠仅有2只出现结肠肿瘤, 而且肿瘤数目明显减少. 200和400 mg/kg组每10只小鼠仅有1只出现结肠肿瘤, 肿瘤数目仅有1个(表2, 图2). 病理结果表明, DMH/DSS组细胞排列紊乱、浸润性生长, 边界模糊, 诊断为腺瘤样增生; 半夏泻心汤三个剂量组黏膜缺失, 炎症细胞广泛浸润, 呈典型炎症改变, 成功地将小鼠结肠停留在炎症状态, 阻止了结肠炎向结肠癌的转变(图3).

3 讨论

Virchow's在1863的预言肿瘤是慢性炎症的最终结果已经被越来越多的实验证实^[1]. 慢性炎症的反复发作引起组织增生, 基因突变, 最终导致细

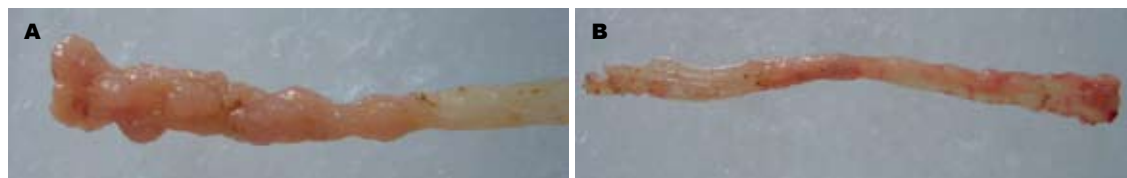


图 2 半夏泻心汤对DMH/DSS诱导小鼠结肠癌形成的影响. A: DMH/DSS导致小鼠结肠出现1-20个不等的小腺瘤; B: 半夏泻心汤(PDPSF)治疗后, 结肠肿瘤数目显著减少.

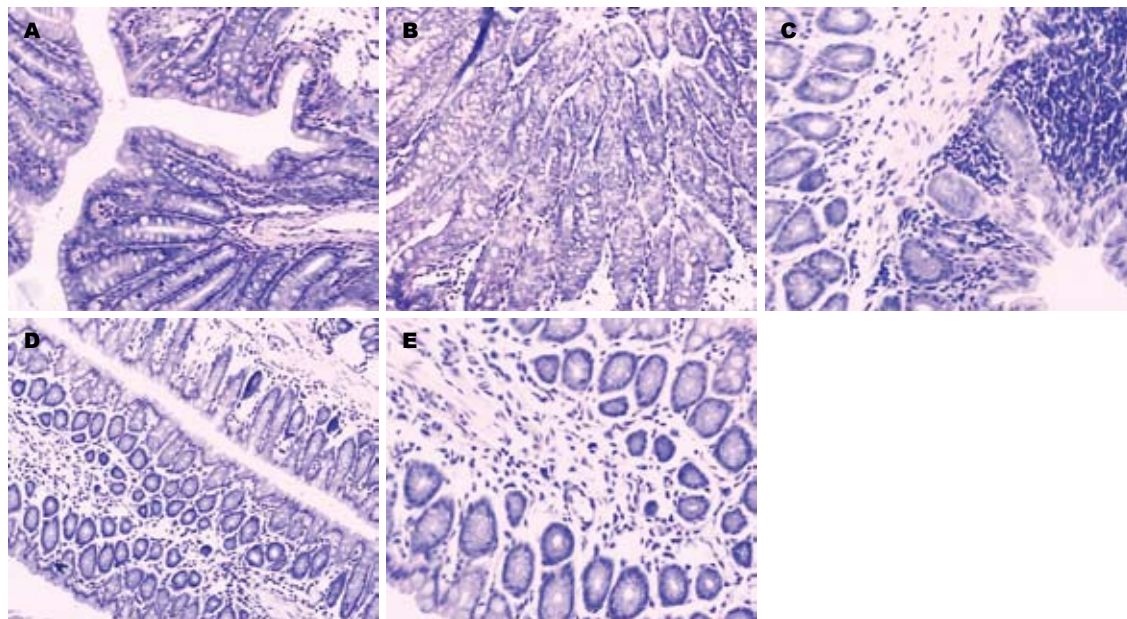


图 3 正常组、DMH/DSS组及半夏泻心汤治疗组小鼠结肠病理变化($\times 200$). A: 盐水对照组; B: DMH/DSS模型组; C: 半夏泻心汤100 mg/kg; D: 半夏泻心汤200 mg/kg; E: 半夏泻心汤400 mg/kg.

表 2 半夏泻心汤对DMH/DSS诱导小鼠结肠癌结肠重量、成瘤率的影响

药物	体质量(g)	结肠质量(mg)	结肠指数(mg/g)	肿瘤数目	成瘤率
生理盐水	48.12 $\pm$ 4.02	212.30 $\pm$ 70.13	5.12 $\pm$ 1.24	0	0
DMH+DSS	48.96 $\pm$ 4.81	480.25 $\pm$ 265.07 ^b	10.14 $\pm$ 6.27	1-20	85%(17/20)
DMH+DSS+PDPSF 100 mg/kg	45.46 $\pm$ 2.11	218.70 $\pm$ 81.26	5.26 $\pm$ 0.71	1-3	20%(2/10)
DMH+DSS+PDPSF 200 mg/kg	44.37 $\pm$ 3.62	207.00 $\pm$ 36.92	4.70 $\pm$ 0.90	1	10%(1/10)
DMH+DSS+PDPSF 400 mg/kg	47.68 $\pm$ 3.95	225.40 $\pm$ 33.29	4.73 $\pm$ 0.79	1	10%(1/10)

^b $P < 0.01$ vs 盐水对照组.

胞癌变^[12], 因此慢性炎症的治疗是降低癌症发生率的重要手段. 溃疡性结肠炎病因复杂, 临床表现为结肠黏膜水肿增生、炎症、溃疡形成, 迁延不愈, 直至发生癌变^[13]. 研究表明, 结肠炎发病机制主要与免疫失调、肠道菌群紊乱, 以及基因易感等因素密切相关^[14]. 一般认为结肠炎的治疗应从肠道黏膜保护、抗菌消炎、调节免疫等多方面入手. 但目前尚无特异性的治疗措施, 世界各国正在致力于结肠炎治疗药物的研究, 但

是进展缓慢. 中医复方的多靶点治病特点给临床治疗结肠炎带来了希望.

半夏泻心汤是国内外研究较多的中药经验方, 疗效确切, 是消化系统疾病的治疗良方, 被称为“调和脾胃”的祖方^[15-18]. 实验表明, 半夏泻心汤可降低应激性胃溃疡大鼠的溃疡指数、抑制局部溃疡组织的炎性渗出、减少白细胞浸润; 升高胃黏蛋白量、调节胃液中表皮生长因子的含量以及调节胃黏膜细胞增殖^[19-21]. 半夏泻

心汤水溶部分所含多糖和皂苷(人参多糖和人参皂苷具有显著的抗溃疡作用)可能是本方胃肠道保护作用的有效成分之一。此外, 甘草具有抗炎和促进溃疡愈合作用, 黄酮苷可能是其有效成分; 半夏具有抗炎作用, 其机制可能与其糖皮质激素样作用有关^[22]。因此半夏泻心汤治疗溃疡性结肠炎的原因之一可能与其影响肠道黏膜修复动力学有关。临床采用抗生素治疗溃疡性结肠炎具有一定疗效, 表明溃疡性结肠炎的发病与细菌感染有一定联系。虽然没有试验报道半夏泻心汤可调节肠道菌群的紊乱, 但临床试验表明半夏泻心汤具有显著的抗幽门螺旋菌的活性^[23-24]; 实验报道黄连、黄芩和甘草配伍, 抗菌作用增强^[25-26]; 干姜的醇提物具有显著的抗菌、抗炎活性。以上试验提示半夏泻心汤具有抑制肠道致病菌的物质基础, 但是尚未见试验报道, 因此其抗菌的药效物质基础可能是半夏泻心汤治疗溃疡性结肠炎的作用靶点之二。溃疡性结肠炎的发病机制研究表明, 结肠炎可能是由于CD4⁺T细胞功能紊乱而导致肠道免疫亢进, 破坏T细胞亚型CD4⁺/CD45RB^{high}和CD4⁺/CD45RB^{low}对肠道独特的免疫调节作用, 从而增加肠黏膜的通透性, 激活巨噬细胞和淋巴细胞, 释放一系列的细胞因子和炎性介质, 破坏细胞因子网络平衡, 导致机体免疫平衡失调。因此免疫调节剂治疗溃疡性结肠炎的研究成为目前结肠炎治疗药物研究的热点, 但尚无有效的免疫调节剂面世。试验表明半夏泻心汤对机体具有免疫调节作用: 其煎液能升高脾脏指数和吞噬率, 对NK细胞的活性呈现出双向调节作用。方中人参能提高机体对疾病的抵抗能力, 调节机体机能状态; 大枣具有免疫增强作用; 甘草的甙元糖蛋白具有免疫抑制作用。我们的实验研究也表明, 大黄多糖具有免疫调节作用, 能促进脾细胞增殖^[27], 对抗TNBS诱导结肠炎大鼠升高的CD4⁺T细胞的数目和蛋白表达^[28]。因此半夏泻心汤治疗溃疡性结肠炎的作用靶点之三可能与其对机体的免疫调节有关。

总之, 半夏泻心汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制可能与肠道黏膜损伤修复, 肠道致病菌的抑制和机体免疫的调节等多靶点作用相关, 与本方所具有的多层次药效物质基础相关, 因此, 半夏泻心汤有效的阻止了结肠炎向结肠癌的发展。

4 参考文献

- Cheng H, Sitrin MD, Satchidanand SK, Novak JM. Colonic squamous cell carcinoma in ulcerative colitis: Report of a case and review of the literature. *Can J Gastroenterol* 2007; 21: 47-50
- Hanada T, Kobayashi T, Chinen T, Saeki K, Takaki H, Koga K, Minoda Y, Sanada T, Yoshioka T, Mimata H, Kato S, Yoshimura A. IFN γ -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *J Exp Med* 2006; 203: 1391-1397
- Wang WH, Huang JQ, Zheng GF, Lam SK, Karlberg J, Wong BC. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1784-1791
- Garber K. Aspirin for cancer chemoprevention: still a headache? *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 252-253
- Vanamala J, Leonardi T, Patil BS, Taddeo SS, Murphy ME, Pike LM, Chapkin RS, Lupton JR, Turner ND. Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1257-1265
- 裴丽霞, 金小晶, 沈洪. 半夏泻心汤实验研究进展. 实用中医内科杂志 2006; 20: 465-466
- 野村麻乃. 半夏泻心汤对自身免疫性结肠炎模型大鼠的作用及其有效成分. 国外医学·中医中药分册 2005; 27: 186
- Wang JG, Wang DF, Lv BJ, Si JM. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2958-2962
- Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tanaka T. Beta-Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 2005; 96: 69-76
- 李宇华, 刘莉, 冯娟, 王庆伟, 孙阳, 曹蔚, 王志鹏, 张蓉, 刘振国, 梅其炳. 一种结肠炎相关的结肠癌模型的复制. 世界华人消化杂志 2007; 15: 234-239
- Rhodes JM, Campbell BJ. Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends Mol Med* 2002; 8: 10-16
- Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 221-233
- Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G7-17
- 王志鹏, 张蓉, 刘莉, 梅其炳, 刘琳娜. 大黄多糖对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞和外周血中性粒细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 29-34
- 张胜, 吴春福, 陈立江, 车轶. 半夏泻心汤药理研究最新进展. 中国中药杂志 2001; 26: 437-439
- 王光明, 周蓉. 半夏的中药药理研究进展. 中医导报 2007; 13: 97-99
- 谭达全, 邓冰湘, 郭春秀. 半夏泻心汤君药刍议. 新中医 2006; 38: 79-80
- 赵琰, 王庆国. 半夏泻心汤实验研究现状述评. 北京中医药大学学报 2000; 23: 42-44
- 刘喜平, 李沛清, 席时燕, 李雪萍, 梁涛. 半夏泻心方配伍与诱导BGC-823细胞凋亡关系的血清药理学研究. 中医杂志 2006; 47: 134-137
- 王庆国, 李宇航, 牛欣, 赵琰, 周冠芬, 贾玉森, 张冬梅, 钟相根. 半夏泻心汤及其拆方对慢性胃溃疡大鼠表皮生长因子的影响. 中国中西医结合急救杂志 2001; 8: 137-139
- 李宇航, 王庆国, 牛欣, 赵琰, 王新月, 贾玉森, 杨美娟, 赵丽云, 张冬梅, 钟相根. 半夏泻心汤及其拆方对慢性胃溃疡大鼠胃粘膜细胞增殖活性的影响. 北京中医药

- 大学学报 2001; 24: 30-33
- 22 沈雅琴, 张明发, 朱自平, 王红武. 半夏的抗腹泻和抗炎作用. 中药药理与临床 1998; 14: 29-31
- 23 莫莉, 皮明钧, 伍参荣, 郭春秀. 半夏泻心汤及其拆方对幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜CD4、CD8表达的影响. 湖南中医学院学报 2006; 26: 8-15
- 24 姜惟, 顾武军, 周春祥. 半夏泻心汤对慢性胃炎合并幽门螺杆菌感染大鼠血清IL-2、IL-4的影响. 中国中医基础医学杂志 2005; 11: 750-752
- 25 严梅杭, 高晓山, 刘林祥, 陈馥馨, 杨桦, 宋红月, 王旭华, 易红. 黄连与黄芩、甘草配伍前后对金黄色葡萄球菌生长抑制作用的观察. 中国中药杂志 1998; 23: 375-377
- 26 宋小莉, 牛欣, 司银楚. 基于BP神经网络的半夏、生姜、甘草三泻心汤配伍研究. 中国临床药理学与治疗学 2005; 10: 527-531
- 27 贾敏, 梅其炳, 杨铁虹, 刘莉, 姚秀娟. 唐古特大黄多糖对小鼠脾细胞增殖的作用. 细胞与分子免疫学杂志 2002; 18: 502-503
- 28 Liu L, Wang ZP, Xu CT, Pan BR, Mei QB, Long Y, Liu JY, Zhou SY. Effects of Rheum tanguticum polysaccharide on TNBS-induced colitis and CD4+T cells in rats. World J Gastroenterol 2003; 9: 2284-2288

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨第四届 消化介入新技术研讨会会议及征文通知

本刊讯 第七届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会是卫生部“十年百项”适宜技术推广、上海市重大医学成果转化及国家级继续医学教育项目, 为进一步提升国内消化系统疾病尤其是消化道恶性病变介入诊治的技术水平, 我们联合上海同仁医院、山东省立医院和山东省医学影像研究所, 定于2007-09-21/25在山东省济南市举办第七届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会, 参会者可获得国家级一类继续医学教育学分12分. 会议将以专题讲座、论文交流、操作演示及研讨沙龙多种形式相结合, 安排相关学科的著名专家着重介绍消化道病变内镜治疗、介入放射学治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗的新理论、新技术和新方法.

1 征文内容

包括消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等. 消化系统良性病变如门静脉高压、胆道结石、消化道出血等的内镜及介入新技术应用. 消化病诊治边沿交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验、个案报告等各类稿件.

2 征文要求

专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文. 论著需1000字以内的标准论文摘要, 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内. 所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文, 优秀论文将安排在国家级杂志上发表. 所有稿件一律要求电脑打印(WORD格式), 邮寄者需附软盘; 特别鼓励用E-mail投稿(用附件WORD格式). 截稿日期: 2007-07-31. 征集疑难病例: 会议将安排专门时间研讨疑难病例, 欢迎与会代表将临床中遇到的疑难病例带到会上讨论. 通信地址: 山东省立医院消化科张春清收, 济南市经五路纬七路324号, 邮编: 250021. 联系电话: 0531-85186350, 86701337; 传真: 0531-87902348; E-mail: zhchqing@medmail.com.cn.

AG490联合健择对人胰腺癌细胞生长的影响

陈 钢, 裘正军, 黄 陈

陈钢, 裘正军, 黄陈, 上海交通大学附属第一人民医院普外科 上海市 200080

陈钢, 2001年毕业于南京医科大学, 2004年考入上海交通大学医学院硕士研究生, 主要从事胰腺癌的基础和临床研究。

通讯作者: 裘正军, 200080, 上海市, 上海交通大学附属第一人民医院普外科, qiuwryb@online.sh.cn

电话: 021-63240090-3092

收稿日期: 2007-03-06 接受日期: 2007-03-23

Effect of AG490 combined with gemcitabine on the growth of human pancreatic cancer cells

Gang Chen, Zheng-Jun Qiu, Chen Huang

Gang Chen, Zheng-Jun Qiu, Chen Huang, Department of General Surgery, the Affiliated First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Zheng-Jun Qiu, Department of General Surgery, the Affiliated First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China. qiuwryb@online.sh.cn

Received: 2007-03-06 Accepted: 2007-03-23

Abstract

AIM: To investigate the effect of Janus kinase (JAK) specific inhibitor AG490 combined with gemcitabine on the proliferation of human pancreatic cancer cell line SW1990 and STAT3 signal transduction pathway as well as their mechanisms.

METHODS: Human pancreatic cancer cell line SW1990 was divided into control group, AG490-treated group, gemcitabine-treated group and AG490 + gemcitabine-treated group. After 48 hours, the proliferation of SW1990 cells was detected by MTT assay. Flow cytometry was used to examine cell apoptosis. The expression of STAT3, Cyclin D1, Bcl-xL and Bax were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: The proliferation of SW1990 cells was significantly lower in AG490 or gemcitabine group than that in control group (2.20 ± 0.25 , 2.30 ± 0.220 vs 3.78 ± 0.42 , $P < 0.05$), but the apoptosis rate was markedly higher ($35.40\% \pm 3.08\%$, $34.64\% \pm 1.38\%$ vs $16.49\% \pm 1.45\%$, $P <$

0.05). Moreover, the proliferation (1.49 ± 0.15) and apoptosis ($43.80\% \pm 1.57\%$) had notable difference between AG490+gemcitabine group and AG490 or gemcitabine group. After 48 hours, AG490 remarkably down-regulated the expression of p-STAT3 ($13.83\% \pm 0.64\%$ vs $79.87\% \pm 1.43\%$, $P < 0.05$), and the expression of Cyclin D1 (mRNA: $15.63\% \pm 0.59\%$ vs $43.83\% \pm 0.64\%$, $P < 0.05$; protein: $17.50\% \pm 0.92\%$ vs $49.87\% \pm 1.27\%$, $P < 0.05$), Bcl-xL (mRNA: $13.93\% \pm 0.21\%$ vs $75.70\% \pm 0.46\%$, $P < 0.05$; protein: $34.17\% \pm 1.70\%$ vs $83.93\% \pm 0.80\%$, $P < 0.05$) and Survivin (mRNA: $58.27\% \pm 0.42\%$ vs $82.93\% \pm 1.68\%$, $P < 0.05$; protein: $13.23\% \pm 1.03\%$ vs $18.60 \pm 1.08\%$, $P < 0.05$) were also decreased in comparison with that in control group; however, Bax expression was increased (mRNA: $10.33\% \pm 1.18\%$ vs $5.43\% \pm 0.70\%$, $P < 0.05$; protein: $13.07\% \pm 1.04\%$ vs $6.23\% \pm 2.40\%$, $P < 0.05$). There was no difference between gemcitabine and control group.

CONCLUSION: Blockade of STAT3 signal pathway inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of SW1990 cells. AG490 combined with gemcitabine shows a synergic effect, which provides a new therapeutic approach for pancreatic cancer therapy.

Key Words: Pancreatic cancer; Signal transducers and activators of transcription 3; AG490; Proliferation; Apoptosis; MTT assay; Flow cytometry; Western blot; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Chen G, Qiu ZJ, Huang C. Effect of AG490 combined with gemcitabine on the growth of human pancreatic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1615-1621

摘要

目的: 探讨Janus激酶(JAK)特异性抑制剂AG490联合化疗药物健择对人胰腺癌细胞系SW1990的生长增殖及STAT3转导通路的影响和其机制。

方法: 人胰腺癌细胞系SW1990分为对照组、AG490组、健择组及AG490+健择处理组。培养48 h后, MTT法检测细胞增殖状态, 流式细

■背景资料

胰腺癌是致死性最强的人类肿瘤之一, 占男性肿瘤死亡的第5位, 女性第6位, 由于其起病隐匿, 较少特异性症状和体征, 胰腺癌患者手术切除率不到20%, 术后复发率和转移率高。健择(吉西他滨)是胰腺癌化疗的一线药物, 但如何提高化疗的效果和减少耐药性是临床需要解决的重要问题。

■ 研发前沿

自从1985年Slamon教授通过与HER-2/neu癌基因的发现者Axel Ullrich博士合作,确立了HER-2/neu与浸润性乳腺癌患者预后的关系,从而为肿瘤的分靶治疗奠定了基础。目前肿瘤的分靶治疗是肿瘤治疗的研究热点。最新研发的一种酪氨酸酶抑制剂Lapatinib,在体外试验中显示了对多种人类肿瘤细胞有活性。AG490作为酪氨酸酶抑制剂,也在多种肿瘤中证实能抑制肿瘤细胞增殖,促进凋亡。

胞仪检测细胞凋亡, Western blot和RT-PCR检测STAT3, Cyclin D1, Bcl-xL, Bax, Survivin的表达情况。

结果: AG490组和健择组的细胞增殖明显低于对照组(2.20 ± 0.25 , 2.30 ± 0.220 vs 3.78 ± 0.42 , $P < 0.05$), 凋亡率明显高于对照组($35.40\% \pm 3.08\%$, $34.64\% \pm 1.38\%$ vs $16.49\% \pm 1.45\%$, $P < 0.05$)。并且, AG490+健择组细胞增殖(1.49 ± 0.15)明显低于明显低于AG490或健择组($P < 0.05$), 而凋亡率($43.80\% \pm 1.57\%$)则明显高于AG490或健择组($P < 0.05$)。AG490处理SW1990 48 h后, p-STAT3表达明显低于对照组($13.83\% \pm 0.64\%$ vs $79.87\% \pm 1.43\%$, $P < 0.05$), 同时Cyclin D1(mRNA: $15.63\% \pm 0.59\%$ vs $43.83\% \pm 0.64\%$, $P < 0.05$; 蛋白: $17.50\% \pm 0.92\%$ vs $49.87\% \pm 1.27\%$, $P < 0.05$), Bcl-xL(mRNA: $13.93\% \pm 0.21\%$ vs $75.70\% \pm 0.46\%$, $P < 0.05$; 蛋白: $34.17\% \pm 1.70\%$ vs $83.93\% \pm 0.80\%$, $P < 0.05$)和Survivin(mRNA: $58.27\% \pm 0.42\%$ vs $82.93\% \pm 1.68\%$, $P < 0.05$; 蛋白: $13.23\% \pm 1.03\%$ vs $18.60\% \pm 1.08\%$, $P < 0.05$)表达也明显降低, 而Bax的表达则明显增高(mRNA: $10.33\% \pm 1.18\%$ vs $5.43\% \pm 0.70\%$, $P < 0.05$; 蛋白: $13.07\% \pm 1.04\%$ vs $6.23\% \pm 2.40\%$, $P < 0.05$), 健择处理组上述指标与对照组相似。

结论: 阻断STAT3信号转导通路可以抑制人胰腺癌细胞增殖, 促进其凋亡, 健择联合AG490能起协同作用。AG490联合健择可能为胰腺癌治疗提供新的思路。

关键词: 胰腺肿瘤; 信号转导与转录激活因子3; AG490; 增殖; 凋亡; MTT法; 流式细胞术; 免疫印迹; 逆转录-聚合酶链反应

陈钢, 裴正军, 黄陈. AG490联合健择对人胰腺癌细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1615-1621
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1615.asp>

0 引言

STAT3是信号转导与转录激活因子家族(signal transducers and activators of transcription, STATs)家族的一员。多种细胞外信号, 如生长因子, 细胞因子, 非受体酪氨酸激酶, G蛋白等, 都可通过直接或间接激活JAK激活STAT3。研究表明STAT3在头颈部鳞状细胞癌^[1]、恶性黑色素瘤^[2]、前列腺癌^[3]、胰腺癌^[4]、胃癌^[5]等多种肿瘤组织与细胞系中异常表达和激活, 并与肿瘤的增殖分化、细胞凋亡、血管生成、侵袭转移

和免疫逃避密切相关^[6,8]。本课题前期研究已在胰腺癌组织中发现磷酸化STAT3(p-STAT3)和Cyclin D1均过表达^[9], 用AG490阻断STAT3转导通路可抑制人胰腺癌细胞增殖, 促进细胞凋亡, 并且AG490的剂量与其作用成正相关^[10]。本实验探讨AG490联合健择对高表达STAT3的人胰腺癌细胞系SW1990的生长增殖的影响和其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM细胞培养基、小牛血清、胰蛋白酶购自Hyclone公司, 噻唑蓝(MTT)购自Sigma公司。STAT3, p-STAT3第一抗体(针对705位酪氨酸磷酸化位点)均购自Cell Signal公司, Bcl-xL, Bax, Survivin, Cyclin D1第一抗体购自武汉博士德公司。细胞核蛋白抽提试剂盒购自ActiveMotif公司, RIPA细胞裂解液、辣根过氧化物酶结合的第二抗体和电化学发光(ECL)试剂盒购自Santa Cruz公司。JAK特异性抑制剂AG490购自Calbiochem公司, 健择(Gemcitabine, 吉西他滨)由美国礼来公司提供。人胰腺癌细胞系SW1990 购自ATCC。细胞在含100 mL/L小牛血清、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM完全培养基内, 37℃ 50 mL/L CO₂饱和湿度孵箱中培养。细胞单层贴壁生长, 至70%-80%融合时以2.5 g/L胰蛋白酶消化传代。

1.2 方法 分4组: 对照组: 细胞于无血清培养液中培养48 h; AG490组: 细胞于加入AG490的无血清培养液中培养48 h; 健择组: 细胞于加入健择的无血清培养液中培养48 h; AG490+健择组: 细胞于同时加入AG490和健择的无血清培养液中培养48 h。溶液中含等量DMSO, 各组DMSO体积分数不超过0.1%。其中AG490和健择的浓度参照前期实验根据量效曲线选择药物浓度AG490: 40 μmol/L; 健择: 0.4 μmol/L^[10-11]。

1.2.1 MTT法检测细胞增殖 取对数生长期细胞, 制成单细胞悬液, 按 5×10^3 个/孔(每孔100 μL)接种于96孔板, 贴壁生长后, 无血清培养细胞18-20 h, 使细胞同步化。分别加入AG490, 健择和同时加同浓度的AG490联合健择, 每组设8个平行孔, 对照组加无血清培养基, 继续培养48 h后, 每孔加入浓度为5 g/L的MTT 20 μL, 继续培养4 h, 吸弃上清液, 每孔加入150 μL DMSO, 振荡10 min, 用酶标仪测定490 nm波长处每孔的光密度(A)值, 细胞增殖率为48 h与0 h的A₄₉₀的相对比值, 绘制图。

表 1 AG490和健择对STAT3和相关基因mRNA表达的影响(mean $\pm$ SD, %)

	Control	AG490	gemcitabine	AG490+gemcitabine
STAT3	73.67 $\pm$ 0.71	73.23 $\pm$ 0.70	73.40 $\pm$ 0.26	73.37 $\pm$ 0.72
Cyclin D1	43.83 $\pm$ 0.64	15.63 $\pm$ 0.59 ^a	43.63 $\pm$ 0.64	15.87 $\pm$ 0.15 ^{ac}
Bcl-xL	75.70 $\pm$ 0.46	13.93 $\pm$ 0.21 ^a	75.83 $\pm$ 1.75	13.80 $\pm$ 0.72 ^{ac}
Bax	5.43 $\pm$ 0.70	10.33 $\pm$ 1.18 ^a	5.20 $\pm$ 0.87	10.37 $\pm$ 0.64 ^{ac}
Survivin	82.93 $\pm$ 1.68	58.27 $\pm$ 0.42 ^a	82.10 $\pm$ 1.93	57.83 $\pm$ 1.17 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 健择组。

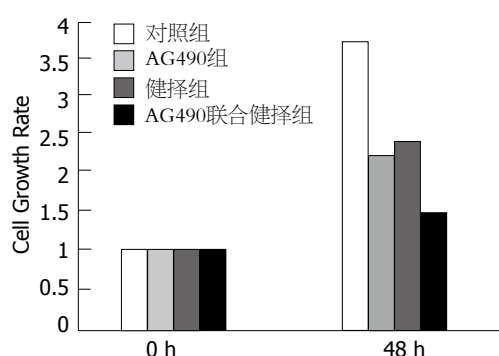


图 1 AG490和健择对人胰腺癌细胞增殖的影响。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 各组处理细胞48 h后, 收集细胞, 制成单细胞悬液, 调整细胞数量为 $1 \times 10^5/L$ 。4℃条件下500 r/min离心5 min, 弃上清。加入1500 μL A溶液(胰酶消化液)充分作用, 再加入1500 μL B溶液(胰酶抑制酶液)5 min, 胶乳1500 μL C溶液(PI-碘化丙锭)作用15 min以上。200目尼龙网过滤, 上机做采样分析。

1.2.3 Western blot检测蛋白表达 各组细胞培养48 h后, 提取细胞蛋白。总蛋白提取: 参照Santa Cruz公司提取方法进行。细胞核蛋白提取参照ActiveMotif公司提取方法进行。分别将相同含量的蛋白样品和 $2 \times$ 上样缓冲液等体积混合, 100℃水中煮沸5 min使蛋白变性。SDS-PAGE电泳后电转移至硝酸纤维素膜上。5 g/L脱脂奶粉封闭后, 加入1:1000稀释的第一抗体, 4℃孵育过夜, TBS洗膜后, 加入1:2000稀释的第二抗体, 室温60 min, TBS洗膜后, ECL增强发光, X线曝光5 min。以 β -actin蛋白作内参照, 以BANDSCAN图像分析软件进行光密度积分值分析。

1.2.4 RT-PCR检测各基因表达 各组细胞培养48 h后按照TRIzol说明书分别抽提细胞总RNA, 紫外分光光度仪定量。取2 μg 总RNA按试剂盒步骤逆转录为cDNA。PCR经优化反应条件, 总体系

为50 μL , 其中10 $\times$ Buffer 5 μL , MgCl₂ 5 μL , 10 mmol/L dNTP 1 μL , primer(10 mol/L)各1 μL , Taq酶0.6 U, cDNA 2 μL , 补足水至50 μL 反应条件为94℃变性5 min, 变性94℃ 30 s, 退火58℃ 30 s, 延伸72℃ 30 s, 循环30次, 终末延伸72℃ 10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶(含5 g/L溴化乙锭)电泳分离, 紫外灯下观察并拍照。凝胶成像系统分析条带灰度值, 并与GAPDH相比较计算结果。

统计学处理 实验重复3次, 独立完成。实验数据用mean $\pm$ SD表示, 应用SPSS11.5统计学软件, 采用单因素方差(ANOVA)分析及双变量相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 AG490和健择对SW1990细胞增殖的影响 AG490, 健择, 及AG490联合健择作用SW1990 48 h后, 细胞增殖率分别为 2.20 ± 0.25 , 2.30 ± 0.22 , 1.485 ± 0.15 , 明显低于对照组(3.78 ± 0.42 , $P < 0.05$), 并且AG490联合健择后细胞增殖率明显低于AG490或健择组($P < 0.05$)(图1)。

2.2 AG490和健择对SW1990细胞凋亡的作用 AG490组和健择组凋亡比例分别为 $35.40\% \pm 3.08\%$ 和 $34.64\% \pm 1.38\%$, 明显高于对照组的 $16.49\% \pm 1.45\%$ ($P < 0.05$); 而AG490联合健择组凋亡比例 $43.80\% \pm 1.57\%$ 明显高于单独AG490组或健择组($P < 0.05$)(图2)。

2.3 AG490和健择对SW1990细胞中STAT3, p-STAT3, Cyclin D1, Bcl-xL, Bax, Survivin表达的影响 AG490或AG490联合健择作用48 h后SW1990细胞中Cyclin D1, Bcl-xL, Survivin的mRNA表达明显低于对照组和健择组($P < 0.05$), 而Bax的mRNA表达是明显增强的($P < 0.05$), 健择组则与对照组相似($P > 0.05$)(表1, 图3A)。AG490组和AG490联合健择组中的p-STAT3, Cyclin D1, Bcl-xL, Survivin的蛋白表达明显低

■ 相关报道

Toyonaga *et al*使用AG490处理胰腺癌细胞, 发现AG490能显著抑制高表达STAT3细胞株Panc1和Kp4细胞的生长增殖。马向涛 *et al*用AG490联合5-Fu, 处理结肠癌细胞, 发现两者联合在抑制结肠癌细胞增殖, 促进癌细胞凋亡方面能起到协同作用。

■创新盘点

本实验用特异性的酪氨酸酶抑制剂AG490联合健择处理高表达STAT3细胞株SW1990, 观察对癌细胞增殖凋亡的影响, 并探讨其机制. 其结果对指导临床胰腺癌治疗有一定意义.

于对照组和健择组($P<0.05$), Bax蛋白表达明显增强($P<0.05$); 健择组与对照组各指标相似($P>0.05$)(表2, 图3B).

3 讨论

JAK/STATs信号转导通路与细胞增殖、分化及凋亡密切相关, STAT3的异常活化可导致细胞异常增殖和恶性转化. STAT3是近年来研究异常活跃的核转录因子, 在细胞因子等的作用下, JAK活化后诱导STAT3酪氨酸磷酸化激活形成p-STAT3, 2个分子p-STAT3形成二聚体进入细胞核, 与目的基因的启动子区域结合, 调节靶基因转录^[12-13]. 研究表明在多种肿瘤组织和细胞中存在STAT3的异常活化和过表达, 并上调与细胞增殖、细胞凋亡、血管生成和侵袭转移等相关基因的表达, 在肿瘤的发生和发展中起重要作用, 目前STAT3已被定义为癌基因, 成为肿瘤研究中的热点之一^[7].

α -氨基-(3, 4-羟基)N-苄苯乙烯胺(AG490)是JAK2的特异性拮抗剂, 是一种PTK抑制物^[14]. 有资料^[15]证实人脐静脉内皮细胞在可溶性白介素6(IL-6)受体 α 的诱导下可表达相关癌基因蛋白 α , 将AG490作用于人脐静脉内皮细胞, 能特异性阻断JAK2信号转导通路, 内皮细胞中生长相关癌基因蛋白 α 的表达受到抑制. 许多研究均表明AG490可以明显抑制STAT3的活性, 抑制肿瘤细胞的增殖和诱导细胞凋亡. Ni *et al*^[16]发现前列腺癌细胞中STAT3异常激活, 而使用AG490可阻断STAT3活化, 抑制前列腺癌细胞的体外增殖力和体内致癌性. Burke *et al*^[17]发现乳腺癌细胞株MAD-MB-468和卵巢癌细胞株Caov-3和MDAH2774中, AG490均可抑制STAT3的持续活化, 而诱导乳腺癌细胞凋亡. Toyonaga *et al*^[18]分别使用AG490和显性失活(dominant negative)STAT3处理胰腺癌细胞, 发现AG490能显著抑制高表达STAT3细胞株Panc1和Kp4细胞的生长增殖. 本研究发现在人胰腺癌细胞株SW1990中存在p-STAT3的过表达, AG490作用48 h后p-STAT3表达下调, 明显抑制细胞增殖, 并可诱导细胞凋亡, 提示AG490可以通过抑制STAT3的激活而抑制细胞的增殖, 诱导细胞凋亡. 我们还发现健择联合AG490可以起到协同作用, 其抑制人胰腺癌细胞增殖, 促进凋亡的作用强于单用健择. 健择主要作用于S期, 使细胞停滞于S期产生细胞毒

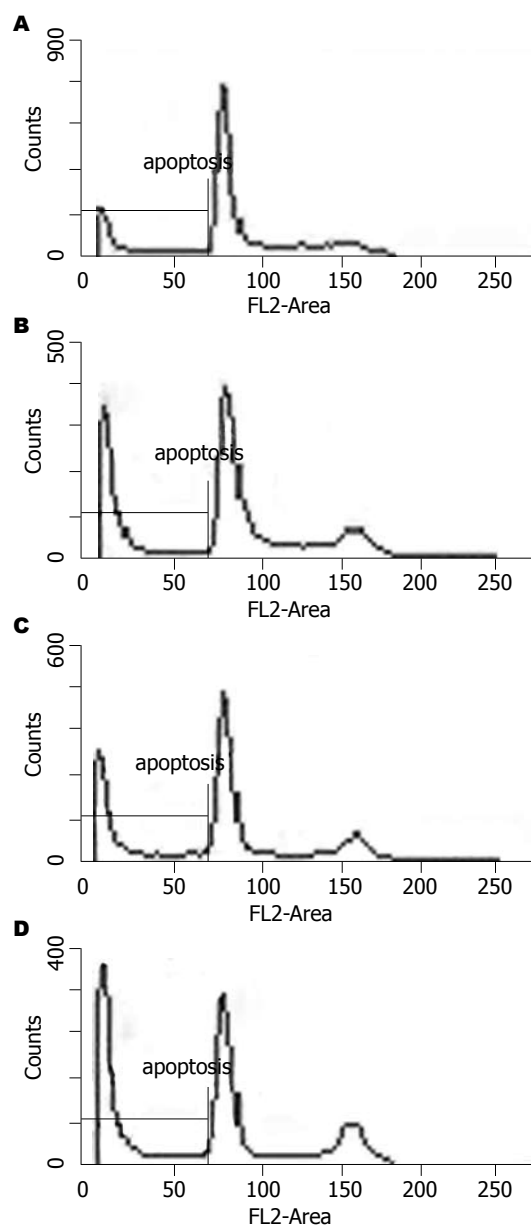


图2 AG490和健择对SW1990细胞凋亡的影响. A: 对照组; B: AG490组; C: 健择组; D: AG490组联合健择组.

性^[19]. 而Tomita *et al*^[20]发现AG490通过改变p53, p21, Pim-1, c-Myc, Cyclin D2, Cdk4的表达阻滞ATL(adult T-cell Leukemia)细胞周期于G1期. Chun *et al*^[21]发现联合使用Gefitinib(一种特异性的细胞周期阻滞剂, 通过抑制EGFR的磷酸化阻滞细胞周期于G1期)和健择, 其促头颈部癌细胞株UMSCC-1凋亡的作用优于单用健择; 并且先用健择培养24 h后用Gefitinib的效果优于先用Gefitinib培养24 h再加健择. 他们认为其机理可能是因为健择作用于细胞周期的S期而Gefitinib则阻滞细胞周期于G1, 先用健择后用Gefitinib可以起到协同作用; 而先用Gefitinib后

表 2 AG490和健择对各蛋白表达的影响(mean $\pm$ SD, %)

	Control	AG490	gemcitabine	AG490+gemcitabine
p-STAT3	79.87 $\pm$ 1.43	13.83 $\pm$ 0.64 ^a	80.40 $\pm$ 0.36	13.07 $\pm$ 0.90 ^{ac}
Cyclin D1	49.87 $\pm$ 1.27	17.50 $\pm$ 0.92 ^a	49.07 $\pm$ 1.44	17.53 $\pm$ 1.01 ^{ac}
Bcl-xL	83.93 $\pm$ 0.80	34.17 $\pm$ 1.70 ^a	84.20 $\pm$ 1.25	35.07 $\pm$ 0.45 ^{ac}
Bax	6.23 $\pm$ 2.40	13.07 $\pm$ 1.04 ^a	6.13 $\pm$ 2.78	13.17 $\pm$ 1.00 ^{ac}
Survivin	18.60 $\pm$ 1.08	13.23 $\pm$ 1.03 ^a	18.53 $\pm$ 1.60	12.90 $\pm$ 1.40 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 健择组.

■应用要点

本实验结果表明联合应用AG490和健择可以起到协同作用, 这对临床提高胰腺癌治疗效果, 减少化疗耐药性有一定的提示作用. 研究STAT3信号转导通路可能为治疗胰腺癌提供新的思路.

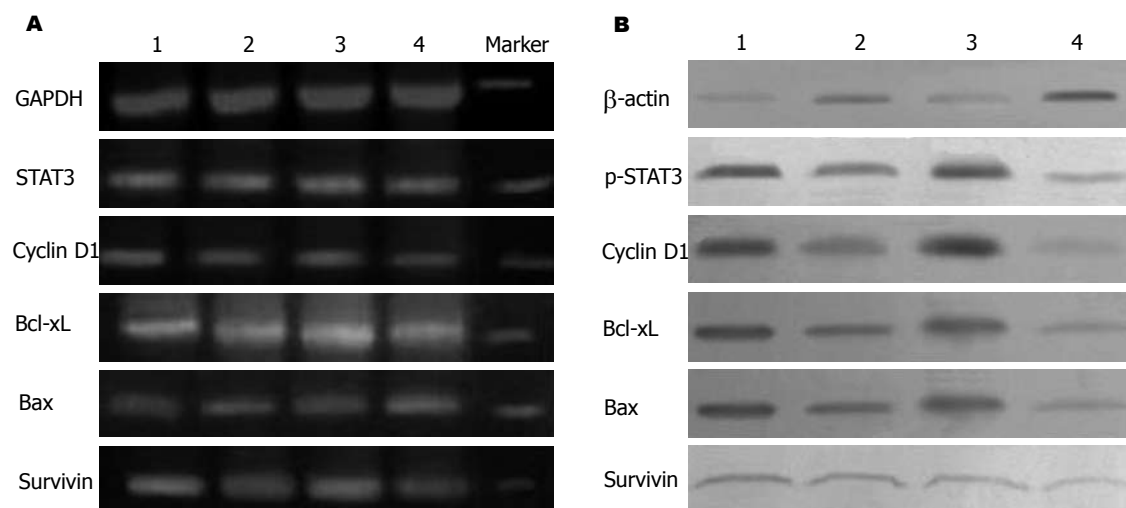


图 3 AG490和健择对个基因和蛋白表达的影响. A: 基因; B: 蛋白.

用健择则使细胞大都阻滞于G1期, 因而未能增强健择的化疗效果. 本实验结果与Patrick *et al*的结果相似, 其机理可能也与AG490和健择作用于细胞不同周期有关.

本研究进一步研究了AG490和健择抑制胰腺癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡的分子机制, 发现AG490作用SW1990细胞48 h后, 细胞周期素Cyclin D1的mRNA和蛋白表达下调, 而健择没有这种作用, 表明阻断STAT3活化可通过下调Cyclin D1的表达而抑制SW1990细胞的增殖. 本研究也发现用AG490培养细胞48 h后, p-STAT3的表达明显下调, Bcl-xL, Survivin mRNA和蛋白表达明显下调, Bax的表达则上调, 而细胞凋亡百分比明显升高, 健择对这些基因表达无明显作用. STAT3正是通过对抗凋亡基因Bcl-xL、Mcl-1、Survivin等调控而增强细胞抵抗凋亡的能力, 促进其恶性转化^[22-23]. Leslie *et al*^[24]在乳腺癌中发现Cyclin D1和STAT3的高表达, 用STAT3-C可上调Cyclin D1 mRNA的表达, 并且发现Cyclin D1启动子上存在STAT3的结合位

点. Amin *et al*^[25]使用显性负性STAT3抑制间变性大细胞淋巴瘤细胞的STAT3表达, 可显著下调Bcl-xL, Survivin等抗凋亡基因的表达, 诱导细胞凋亡. Gritsko *et al*^[26]发现在对化疗耐受的高危人乳腺癌患者中, Survivin表达的增加与STAT3的增加是直接相关的($P = 0.001$), STAT3可直接结合并调节Survivin启动子, 并且直接的阻断STAT3的信号通路则抑制了Survivin的表达. Nielsen *et al*^[27]发现在蕈样肉芽肿肿瘤期细胞中用AG490在抑制STAT3表达的同时, Bcl-xL的表达下调, Bax的表达则上调. Bhardwai *et al*^[28]则发现用白藜芦醇作用于多发性骨髓瘤细胞, 通过抑制STAT3, 进而抑制了Cyclin D1, Bcl-xL, Survivin, 上调了Bax, 促进骨髓瘤细胞的凋亡, 抑制了增殖. 可见AG490可能正是通过抑制STAT3的活化, 改变STAT3下游Cyclin D1, Bcl-xL, Bax, Survivin等基因的表达, 进而抑制人胰腺癌细胞的增殖, 促进凋亡的.

本研究初步探讨了AG490联合健择对高表达STAT3的人胰腺癌细胞系SW1990生长增

同行评价

该文研究了AG490联合健择对人胰腺癌细胞生长的影响,该实验选题符合该领域的研究热点,设计科学、合理,作者掌握了相关的实验基础理论和专门实验技术,统计处理符合统计学方法,结论可靠,为胰腺癌的治疗提供新思路,有参考价值。

殖的作用,结果表明AG490联合健择可进一步增强AG490阻断STAT3转导通路的作用抑制人胰腺癌细胞的增殖,促进其凋亡。说明联合AG490和健择可能可以提高对胰腺癌的化疗效果,提高疗效。但STAT3转导通路的异常激活及协同作用的机制还需进一步研究,研究STAT3信号转导通路可能为治疗胰腺癌提供新的思路。

参考文献

- Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, Johnson DE, Huang L, He Y, Kim JD. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4227-4232
- Kortylewski M, Jove R, Yu H. Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24: 315-327
- Lee SO, Lou W, Qureshi KM, Mehraein-Ghomi F, Trump DL, Gao AC. RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Prostate* 2004; 60: 303-309
- Scholz A, Heinze S, Detjen KM, Peters M, Welzel M, Hauff P, Schirner M, Wiedenmann B, Rosewicz S. Activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) supports the malignant phenotype of human pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2003; 125: 891-905
- Yu LF, Cheng Y, Qiao MM, Zhang YP, Wu YL. Activation of STAT3 signaling in human stomach adenocarcinoma drug-resistant cell line and its relationship with expression of vascular endothelial growth factor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 875-879
- Jing N, Tweardy DJ. Targeting Stat3 in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2005; 16: 601-607
- Haura EB, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 315-324
- Hsieh FC, Cheng G, Lin J. Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 292-299
- 裘正军, 刘辰, 胡宏慧, 曹俊. STAT3和Cyclin D1在胰腺癌中的表达及其临床意义. *胰腺病学* 2005; 5: 24-27
- 黄陈, 裘正军, 刘辰, 孙红成. 阻断STAT3信号转导通路对人胰腺癌细胞生长的影响. *肿瘤* 2006; 26: 414-417
- 要洁, 林晨, 冯奉仪, 张雪燕, 付明, 梁萧, 吴世凯, 董梅, 宋海峰, 钱海利, 杨莹. 人胰腺癌吉西他滨耐药细胞系的建立及耐药特性的检测. *实用肿瘤杂志* 2005; 20: 199-203
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98: 295-303
- Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277: 1630-1635
- Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway. *J Immunol* 2001; 166: 3491-3498
- Matsumiya T, Imaizumi T, Itaya H, Shibata T, Yoshida H, Sakaki H, Kimura H, Satoh K. Production of growth related oncogene protein-alpha in human umbilical vein endothelial cells stimulated with soluble interleukin-6 receptor-alpha: role of signal transducers, janus kinase 2 and mitogen-activated kinase kinase. *Life Sci* 2002; 70: 3179-3190
- Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC. Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 1225-1228
- Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK, Lin J. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 7925-7934
- Toyonaga T, Nakano K, Nagano M, Zhao G, Yamaguchi K, Kuroki S, Eguchi T, Chijiwa K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Blockade of constitutively activated Janus kinase/signal transducer and activator of transcription-3 pathway inhibits growth of human pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2003; 201: 107-116
- McGinn CJ, Shewach DS, Lawrence TS. Radiosensitizing nucleosides. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1193-1203
- Tomita M, Kawakami H, Uchihara JN, Okudaira T, Masuda M, Matsuda T, Tanaka Y, Ohshiro K, Mori N. Inhibition of constitutively active Jak-Stat pathway suppresses cell growth of human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology* 2006; 3: 22
- Chun PY, Feng FY, Scheurer AM, Davis MA, Lawrence TS, Nyati MK. Synergistic effects of gemcitabine and gefitinib in the treatment of head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 981-988
- Kanda N, Seno H, Konda Y, Marusawa H, Kanai M, Nakajima T, Kawashima T, Nanakin A, Sawabu T, Uenoyama Y, Sekikawa A, Kawada M, Suzuki K, Kayahara T, Fukui H, Sawada M, Chiba T. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene* 2004; 23: 4921-4929
- Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP Jr. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* 2001; 107: 351-362
- Leslie K, Lang C, Devgan G, Azare J, Berishaj M, Gerald W, Kim YB, Paz K, Darnell JE, Albanese C, Sakamaki T, Pestell R, Bromberg J. Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res* 2006; 66: 2544-2552
- Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, Lin Q, Fujio Y, Kunisada K, Leventaki V, Das P, Rassidakis GZ, Cutler C, Medeiros LJ, Lai R. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene* 2004; 23: 5426-5434
- Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, Nam S, Eweis I, Diaz N,

- Sullivan D, Yoder S, Enkemann S, Eschrich S, Lee JH, Beam CA, Cheng J, Minton S, Muro-Cacho CA, Jove R. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 11-19
- 27 Nielsen M, Kaestel CG, Eriksen KW, Woetmann A, Stokkedal T, Kaltoft K, Geisler C, Ropke C, Odum N. Inhibition of constitutively activated Stat3 correlates with altered Bcl-2/Bax expression and induction of apoptosis in mycosis fungoides tumor cells. *Leukemia* 1999; 13: 735-738
- 28 Bhardwaj A, Sethi G, Vadhan-Raj S, Bueso-Ramos C, Takada Y, Gaur U, Nair AS, Shishodia S, Aggarwal BB. Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through down-regulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood* 2007; 109: 2293-2302

电编 何基才 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国中西医结合第十九次全国消化病学术会议最后通知

本刊讯 由中国中西医结合学会消化专业委员会主办、河北医科大学第二医院承办的中国中西医结合第十九次消化学术会议,定于2007-07-27/29日将在河北省石家庄市中山宾馆召开。2007-27全天报道,2007-28/29日为大会专题报告与学术交流。大会将邀请多位国内外知名专家作专题学术报告,并进行学术论文交流。参加会议的正式代表将授予国家I类继续教育学分7分[2007-3-3-027(国)]。参加会议的每位代表收取会务费700元(包括餐费和资料费等)欢迎广大从事中西医结合基础与临床工作者、消化内、外科、胃肠、肝胆科、消化内镜的医务人员以及研究生等踊跃投稿积极参加。现将本次学术会议征文的有关事项通知如下。

1 征文内容

(1)有关消化系统疾病包括食管、胃、肠、肝、胆、胰等中西医结合诊疗、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)中西医结合对脾胃学说与脾虚证研究进展;(5)当前消化疾病的最新诊断与治疗技术的临床应用与进展。

2 征文要求

论文应具有科学性、先进性、实用性和真实性。文字表达准确、精练、通顺。大会论文摘要800-1000字左右,具有目的、方法、结果、结论。来稿最好以Email形式发送;或以A4纸5号字打印并附软盘或光盘一份,寄送至下列单位:(1)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疾病专业委员会)邮编:150080 收件人:李春雷 贾云 电话:0451-57752440或86632450 传真:0451-86603878; Email: czs.xiaohua@163.com或211zyke@163.com; (2)石家庄市和平西路215号河北医科大学第二医院消化内科 蒋树林 孙玉凤副教授, 邮政编码: 050000, 联系电话: 0311-87222301; 87222951; Email: zxyjhxh@yahoo.com.cn(特别提醒:此为新注册信箱,原信箱因故不可使用),截稿日期2007-06-30。

来稿请注明“中西医结合消化会征文”字样,并用楷体写清楚作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码、便捷联系电话和E-mail信箱。欢迎采用Word格式E-mail投稿。入选论文将编入《中国中西医结合消化学术会议论文汇编》。优秀论文将推荐至《中国中西医结合消化杂志》《世界华人消化杂志》等杂志。

CHFR和mp53基因编码蛋白在胃癌组织中的表达及临床病理学意义

高余佳, 辛彦, 张赛楠, 张家华, 吴东瑛

■背景资料

CHFR是一个新的有丝分裂前期检查点基因, 在一些肿瘤中存在失活或低表达, 提示其异常可能参与癌的发生。但迄今CHFR蛋白表达与胃癌的关系少有报道。本研究检测胃癌组织中CHFR和mP53蛋白的表达, 探讨二者异常与胃癌发生的关系及意义。

高余佳, 辽宁省肿瘤医院内六科 辽宁省沈阳市 110042
辛彦, 张赛楠, 张家华, 吴东瑛, 中国医科大学附属一院肿瘤研究所第四研究室 辽宁省沈阳市 110001
高余佳, 2005-2008年中国医科大学肿瘤学博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤临床及基础研究, 现任职于辽宁省肿瘤医院。
国家自然科学基金资助项目, No. 30371607
教育部博士点专项基金资助项目, No. 20040159021
通讯作者: 辛彦, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属一院肿瘤研究所第四研究室。
yxin@mail.cum.edu.cn
电话: 024-24116843
收稿日期: 2007-04-09 接受日期: 2007-04-22

Protein expression of checkpoint with fork head associated and ring finger and mutant p53 and their clinicopathological significances in gastric cancer

Yu-Jia Gao, Yan Xin, Sai-Nan Zhang, Jia-Hua Zhang, Dong-Ying Wu

Yu-Jia Gao, the Sixth Department of Internal Medicine, Cancer Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110042, Liaoning Province, China

Yan Xin, Sai-Nan Zhang, Jia-Hua Zhang, Dong-Ying Wu, the Fourth Laboratory of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30371607, and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Education Ministry, No. 20040159021

Correspondence to: Professor Yan Xin, the Fourth Laboratory of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yxin@mail.cum.edu.cn

Received: 2007-04-09 Accepted: 2007-04-22

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the expression of checkpoint with fork head associated and ring finger (CHFR) and P53 protein in gastric cancer (GC) and the clinicopathologic characteristics, and to explore the correlated molecular mechanism of CHFR and p53 genes in gastric carcinogenesis.

METHODS: Five paraffin blocks of tissue mi-

croarray were constructed using a Tissue Array Machine (Steve Leighton Beecher Instruments, USA), including 151 cases of primary GC (101 cases with matched normal mucosa, intestinal metaplasia or dysplasia). Envision immunohistochemical method was employed to detect the protein expression of CHFR and mutant p53 in GC and precancerous tissues mentioned above.

RESULTS: The positive rate of CHFR protein expression in GC (49.67%, 75/151) was significantly lower than that in normal gastric mucosa (85.25%, 52/61) ($P < 0.05$). The down-regulation or absence of mitotic checkpoint CHFR protein expression was correlated with the sex of GC patients. The absent rate of CHFR protein expression in the female GC patients was significantly higher than that in the male GC ones (64% vs 43.56%, $P < 0.05$). The absent rates was also significantly different between GC patients of Borrmann III + IV and I + II types (57.14% vs 34.78%, $P < 0.05$). In the present study, though CHFR protein expression showed no significant difference among various histological types of GC, the absent rate of CHFR protein expression was the highest (71.43%) in signet ring cell carcinoma. The absent expression of CHFR protein was not related to the depth of invasion and lymph node metastasis of GC. In addition, no correlation was found between the expression of CHFR and P53 protein expression in GC ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Down-regulation or absence of mitotic checkpoint CHFR protein expression is frequent events in GC and may take a part in gastric carcinogenesis. Abnormal expression of CHFR may be of more importance in the development of female patients and diffuse-type GC.

Key Words: Checkpoint with fork head associated and ring finger; Mutant p53; Gastric Cancer; Immunohistochemistry

Gao YJ, Xin Y, Zhang SN, Zhang JH, Wu DY. Protein expression of checkpoint with fork head associated and ring finger and mutant p53 and their clinicopathological significances in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1622-1627

摘要

目的: 观察CHFR和P53蛋白的表达与胃癌临床病理学特征的关系, 探讨其在胃癌发生发展过程中的作用及相关的分子机制。

方法: 利用组织芯片制作仪(美国), 构建成5个包括151例胃癌及101例与其配对的正常胃黏膜、肠化生或不典型增生的组织芯片蜡块。采用Envision免疫组化二步法检测151例胃癌及101例配对癌旁胃黏膜组织中CHFR蛋白和P53蛋白的表达。

结果: CHFR蛋白在非癌胃黏膜组织中阳性表达率为85.25%(52/61), 在胃癌组织中阳性表达率显著降低(49.67%, 75/151, $P<0.05$); CHFR表达下调或缺失与胃癌患者的性别显著相关, 女性患者胃癌组织中CHFR表达缺失率显著高于男性患者(64% vs 43.56%, $P<0.05$)。Borrmann III+IV型胃癌组织中CHFR表达缺失率显著高于Borrmann I+II型胃癌(57.14% vs 34.78%, $P<0.05$)。虽然不同组织学类型胃癌之间CHFR的表达无统计学差异, 但本研究发现胃印戒细胞癌组CHFR表达缺失率最高(71.43%)。胃癌组织中CHFR蛋白的表达缺失与肿瘤浸润深度、淋巴结转移以及mP53蛋白表达未见显著相关性($P>0.05$)。

结论: 有丝分裂前期检查点CHFR基因表达下调或缺失在胃癌中是频发事件, 可能参与胃癌的发生, 其与女性、弥漫浸润型胃癌发生发展的关系可能更为密切。

关键词: CHFR基因; 突变型p53; 胃癌; 免疫组化

高余佳, 辛彦, 张赛楠, 张家华, 吴东瑛. CHFR和p53基因编码蛋白在胃癌组织中的表达及临床病理学意义. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1622-1627

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1622.asp>

0 引言

CHFR(checkpoint with fork head associated and ring finger)是Scolnick *et al*^[1]于2000年发现的一个新的有丝分裂前期检查点基因, 定位于12q24.33, 其编码产物为664个氨基酸的蛋白质。细胞存在有丝分裂应激时, CHFR通路激活引起p1k1的泛素化并降解, 控制Cdc2激酶的活性, 延迟染色体凝集和中心体分离, 阻止细胞于有丝分裂前期。其表达增强细胞对应激的生存能力。已有研究发现, CHFR基因在一些肿瘤中存在失活或低表达, 提示CHFR基因异常可能参与最初的癌变过程^[2-4], 与肿瘤的发生关系密切^[5-6]。胃

癌的发生发展过程中既有抑癌基因的突变, 又涉及有癌基因的激活^[7-8], 其中p53突变频率最高^[8-9]。但迄今CHFR蛋白表达与胃癌的关系国内外少有报道。本研究通过检测胃癌组织中有丝分裂前期检查点CHFR基因和肿瘤抑制基因p53编码蛋白的表达状态, 探讨二者表达与胃癌发生的关系及意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2003-12/2004-05中国医科大学附属第一医院肿瘤科及辽宁省肿瘤外科手术切除胃癌标本151例, 平均年龄60岁。术前未放化疗。男性101例, 女性50例(其中 ≤ 50 岁者18例)。临床病理分期: 早期1例, 中期7例, 晚期143例。大体Borrmann分型: I+II型46例, II+IV型105例。组织学类型(按胃癌组织学分型标准): 乳头状腺癌1例; 管状腺癌124例, 其中高分化腺癌11例, 中分化腺癌38例, 低分化腺癌75例; 未分化癌2例; 印戒细胞癌7例(女性3例); 黏液腺癌17例。151例胃癌标本中, 有相应癌旁黏膜者101例, 其中36例可观察到癌旁黏膜肠上皮化生, 4例可观察到癌旁黏膜不典型增生。伴有淋巴结转移者118例, 不伴有淋巴结转移者33例。每例分别取癌组织、肠上皮化生、不典型增生、正常胃黏膜组织, 40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 制作常规病理切片行HE染色以确定其病理诊断及目标病变定位。

1.2 方法 利用组织芯片制作仪(美国), 根据上述定位的目标病变从组织蜡块中穿取目标组织(组织样品直径为1 mm), 构建成5个胃癌及其癌前病变的组织芯片蜡块, 行4 μ m连续切片, 其中1张行常规HE染色, 其他保存备CHFR和P53蛋白免疫组化染色用。采用GBI公司推出的免疫组化检测二步法, Immuno-Bridge+试剂盒, 鼠抗人CHFR单克隆抗体(工作浓度1:75)和鼠抗人P53单克隆抗体分别购自Abnova公司和北京中杉金桥生物技术有限公司。用PBS代替一抗作阴性对照。CHFR和mP53蛋白免疫染色阳性信号均定位于细胞核, 呈棕黄色颗粒, 每个标本随机观察2个有代表性的高倍视野, 每个视野计数100个细胞确定其染色强度并取平均值, 阳性细胞数 $\leq 20\%$ 为阴性(-), 阳性细胞数 $>20\%$ 为阳性(+).

统计学处理 利用计算机软件SPSS10.0进行数据处理, 统计方法采用 χ^2 检验和Spearman等级相关检查。 $P<0.05$ 视为有显著性统计学差异。

2 结果

2.1 CHFR蛋白在胃癌组织中的表达 正常胃黏膜

■应用要点

胃癌组CHFR蛋白的阳性表达率显著低于正常胃黏膜及肠上皮化生 $P<0.05$ 。Borrmann III+IV型胃癌中CHFR蛋白阳性表达率显著低于I+II型胃癌 $P<0.05$; 女性胃癌CHFR蛋白阳性表达率显著低于男性胃癌 $P<0.05$ 。提示, CHFR基因启动区CPG岛甲基化导致其蛋白表达下调可能是胃黏膜癌变过程中的早期分子事件且与女性、弥漫浸润型胃癌发生发展的关系可能更为密切。

■同行评价

本文为回顾性研究,总体设计尚可,文中所研究的CHFR和mp53基因编码蛋白为胃癌临床诊断提供了一定参考价值。

表 1 CHFR蛋白表达与胃癌及其癌前病变临床病理因素之间的关系

分组	n	CHFR蛋白表达			χ^2	P
		阴性(n)	阳性(n)	阳性率(%)		
年龄					0.055	>0.05
≤50岁	39	19	20	51.28		
>50岁	112	57	55	49.11		
性别					5.587	<0.05
女	50	32	18	36		
男	101	44	57	56.44		
组织性质					52.240	<0.005
正常胃黏膜	61	9	52	85.25		
肠化生	36	0	36	100		
不典型性增生	4	1	3	75		
胃癌	151	76	75	49.67		
胃癌						
大体分型					6.397	<0.05
I+II	46	16	30	65.22		
III+IV	105	60	45	42.86		
组织学分型					5.270	>0.05
乳头状腺癌	1	0	1	100		
高分化腺癌	11	4	7	63.64		
中分化腺癌	38	19	19	50		
低分化腺癌	75	39	36	48		
未分化癌	2	0	2	100		
黏液腺癌	17	9	8	47.06		
印戒细胞癌	7	5	2	28.57		
侵袭深度					0.0003	>0.05
黏膜层、肌层	8	4	4	50		
穿出肌层	143	72	71	49.65		
伴淋巴结转移					3.296	>0.05
阳性	118	64	54	45.76		
阴性	33	12	21	63.64		

及肠上皮化生黏膜CHFR蛋白阳性表达率分别为85.25%(52/61)和100%(36/36)(图1A-B),胃癌组织中CHFR蛋白阳性表达率(49.67%, 75/151)显著低于正常胃黏膜和肠上皮化生(图1C-D), $P<0.05$ 。不典型增生组因例数少未做统计学处理。CHFR蛋白表达与胃癌的组织学类型未见相关($P>0.05$)。CHFR蛋白表达阳性率在浸润局限于黏膜层及肌层组(50%, 4/8)与穿出肌层组(49.65%, 71/143)之间未见显著差异($P>0.05$)。Borrmann III+IV型胃癌中CHFR蛋白阳性表达率(42.86%)显著低于I+II型胃癌(65.22%), $P<0.05$; 女性胃癌蛋白CHFR阳性表达率(36%, 18/50)显著低于男性胃癌(56.44%, 57/101) $P<0.05$ (表1)。

2.2 胃癌组织中CHFR和mP53蛋白表达的关系
本组资料胃癌组织中mP53蛋白阳性表达率为67.42%(60/89)。44例mP53阳性胃癌中CHFR阳

性率(47.73%, 21/44)高于mP53阴性组(33.33%, 10/30), 但二者之间的差异无统计学意义($\chi^2 = 1.518, P>0.05$)(表2, 图2)。

3 讨论

CHFR是一种新的在人类癌症中灭活的检查点基因, 在用微管毒素治疗的癌细胞中可延迟染色体浓集。研究表明, CHFR是Plk1的泛素连接酶并且在哺乳动物细胞中, 主要通过抑制cyclin B₁进入细胞核、保持Aurora A、Aurora B、plk1和cyclin B₁/cdc2灭活及与p38应激激酶相互作用阻止细胞进入有丝分裂前期^[10-12]。最近, Oh *et al*^[13]鉴定了USP7(也被称为HAUSP), 一种分解多聚泛素链和/或泛素前体并能与CHFR相互作用的蛋白。他在体内外能去除自动泛素的CHFR的泛素部分, 导致CHFR在细胞内的

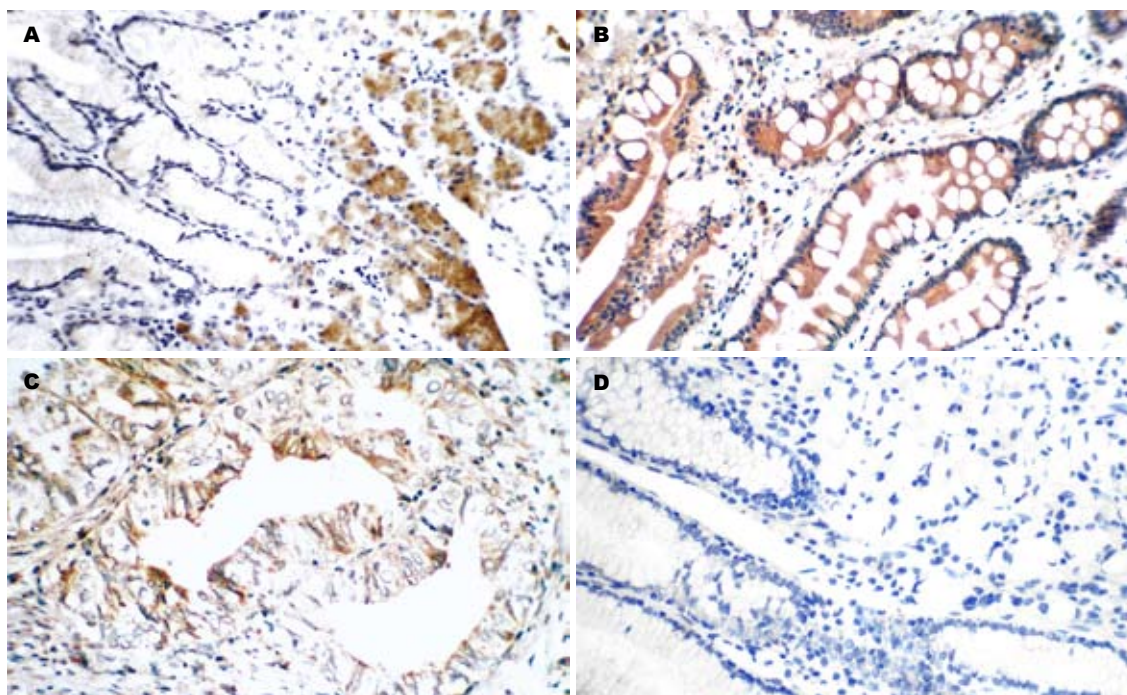


图 1 胃黏膜组织CHFR蛋白表达(Envision二步法×200). A: 正常胃黏膜CHFR蛋白呈阳性表达; B: 肠化生CHFR蛋白呈强阳性表达; C: 胃高分化腺癌CHFR蛋白呈弱阳性表达; D: 弥漫浸润性生长的胃印戒细胞癌CHFR蛋白呈阴性表达.

积累. 这一研究结果表明USP7介导的CHFR去泛素化致其累积可能对于CHFR激活是一个关键的调节步骤, 并且在CHFR介导的细胞周期进程和肿瘤抑制的调解方面可能发挥着重要作用. CHFR在正常人组织中普遍表达, 而在人类肿瘤中发现CHFR表达缺失. 在消化道肿瘤中, CHFR表达由于CPG岛高甲基化所沉默^[14-19]. Milne *et al*^[20]研究结果显示, 在174例胃癌中CHFR蛋白表达缺失率为33%, 且其表达缺失与弥漫型胃癌显著相关($P = 0.001$). 许多研究已证实, 在胃癌中CHFR基因异常甲基化是频发事件并且发现DNA甲基化与CHFR表达下调有关^[21-24], 提示CHFR的DNA甲基化在胃癌中CHFR的转录沉默方面发挥着主要作用. 在胃癌中由DNA甲基化所致的CHFR灭活可能导致染色体的不稳定性. 另外, 为了探讨是否CHFR的下调直接导致肿瘤发生, Yu *et al*^[11]制作了敲除CHFR的鼠, CHFR缺乏的鼠是易患癌症的, 产生自发性肿瘤并在用二甲苯并蒽处理后增加皮肤肿瘤的发病率. CHFR+/-鼠肿瘤发生率是介于CHFR+/+和CHFR-/-之间的发生率. 在CHFR-/-鼠中较高的死亡率和肿瘤发生率表明CHFR是重要的肿瘤抑制基因. CHFR在体内与Aurora A相互作用并在体内外泛素化Aurora A. 总之, 这些结果表明CHFR是一种抑癌基因, CHFR通过调解Aurora

表 2 胃癌组织中CHFR和mP53蛋白表达的关系

mP53 蛋白表达	n	CHFR蛋白表达		阳性率(%)	χ^2	P
		-	+			
-	30	20	10	33.33	1.518	>0.05
+	44	23	21	47.73		
合计	74	43	31	41.89		

A的表达水平和维持基因组的稳定而起作用并且推断CHFR-Aurora A通路的破坏促进肿瘤发生也支持染色体不稳定在人类能导致肿瘤发生的假说. 本组研究发现, 在151例胃癌中, CHFR蛋白表达缺失率为50.33%, 胃癌组CHFR蛋白的阳性表达率明显低于正常胃黏膜及肠上皮化生组($P < 0.05$), 提示胃癌发生过程中CHFR蛋白表达发生了下调, 推测可能与CHFR基因缺失或突变相关, 也可能在转录水平或转录后水平受到特异地调控, 而使蛋白表达受到抑制. 但CHFR蛋白表达与胃癌的分化程度、组织学类型、肿瘤浸润深度、及淋巴结转移未见显著性差异($P > 0.05$), 提示CHFR蛋白表达缺失与胃癌的发生关系密切, 可能是胃黏膜癌变过程中的早期分子事件.

胃癌发病率存在年龄、性别和种族差异, 随年龄增加, 发病率也随之增加. 在50-70岁左右达高峰, 随后快速下降, 小于30岁的病倒较

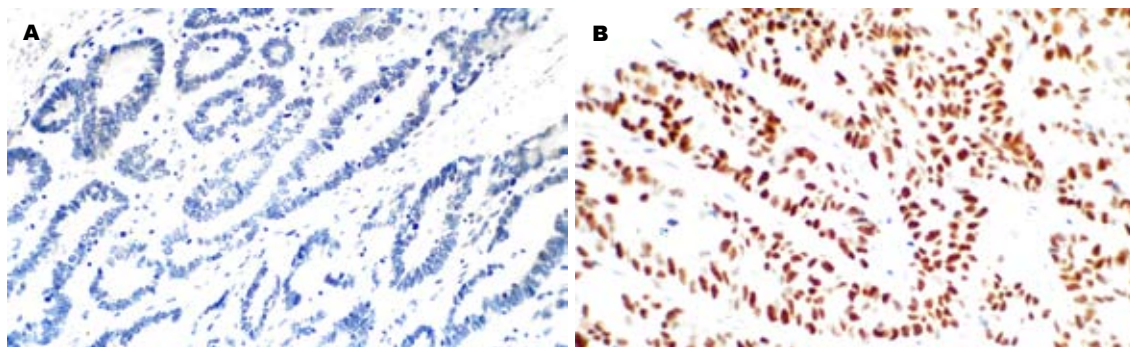


图2 胃癌组织中CHFR和mP53蛋白表达(Envision二步法x200). A: 胃中-低分化腺癌CHFR蛋白呈阴性表达; B: 胃低分化腺癌mP53蛋白呈阳性表达.

少. 男女性别之间胃癌发病率存在差异, 男性发病率约为女性的2倍. 但在<40岁的低年龄组中, 女性胃癌发病率却超过男性^[25]. 女性胃癌的组织学以黏液腺癌, 低分化腺癌及印戒细胞癌居多; 大体分型以BorrmannIII型和IV型多见. 胃印戒细胞癌多起源于黏膜固有层中腺体颈部未分化干细胞, 好发于中青年女性, 大体分型以BorrmannIII型和IV型多见, 侵袭力强, 易在胃壁浸润性生长; 恶性度高, 易发生卵巢、子宫颈转移^[26-27]. 本研究50例女性胃癌中, 年龄≤50岁的占36%(18/50); 印戒细胞癌7例(其中3例为女性), 均为BorrmannIII型和IV型. 低分化癌24例, 黏液腺癌5例, 印戒细胞癌3例. 以往文献报道^[26-28], 女性弥漫浸润型胃癌的发生发展与雌激素受体异常表达有关. 本研究发现, 在各种组织学类型胃癌中, 印戒细胞癌CHFR蛋白阳性表达率(28.57%)是最低的; 女性CHFR蛋白阳性表达率(36%)显著低于男性(56.44%), $P<0.05$; BorrmannIII+IV型CHFR蛋白阳性表达率(42.86%)显著低于I+II型(65.22%), $P<0.05$. 上述结果提示, CHFR在胃癌组织中表达的异常下调与女性弥漫浸润型胃癌的发生发展之间可能存在某种内在的联系, 但CHFR与雌激素受体水平及雌激素代谢的关系及具体机制尚有待深入探讨.

p53基因是一种抑癌基因, 分野生型和突变型. 野生型p53基因通过打开他的效应器如14-3-3S、GADD45和P21Cip1基因能抑制cdc2-cyclin B活性, 延迟DNA损伤的细胞从G2期到M期; 具有抑制癌细胞的增殖和促进癌细胞凋亡的作用. 而突变型p53则相反, 具有抑制癌细胞凋亡和促进癌细胞增殖的作用, 促进组织恶性转化的活性^[29-30]. p53基因异常与胃黏膜细胞的癌变过程密切相关. 胃癌组织中存在p53基因突

变, 导致其编码蛋白的功能异常从而参与胃癌的发生发展^[31-32]. 本组实验显示, CHFR蛋白表达在胃癌中下调或缺失, mP53蛋白表达增加. 其作用机制与细胞周期调控有关, 推测CHFR蛋白表达下调或缺失与p53突变共同参与胃癌的发生发展. 但本组研究结果CHFR与mP53蛋白表达未见明显的相关性. 说明二者的异常可能主要受不同的上游调控机制的影响, 提示CHFR基因和mp53基因可能通过不同的途径和机制参与胃癌的发生.

4 参考文献

- 1 Scolnick DM, Halazonetis TD. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* 2000; 406: 430-435
- 2 Mizuno K, Osada H, Konishi H, Tatematsu Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Fujii Y, Takahashi T. Aberrant hypermethylation of the CHFR prophase checkpoint gene in human lung cancers. *Oncogene* 2002; 21: 2328-2333
- 3 Corn PG, Summers MK, Fogt F, Virmani AK, Gazdar AF, Halazonetis TD, El-Deiry WS. Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of the mitotic stress checkpoint gene Chfr in colorectal and non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2003; 24: 47-51
- 4 Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y, Ishiguro H, Shinoda N, Sato A, Kimura M, Koyama H, Toyama T, Nishiwaki T, Kudo J, Terashita Y, Konishi S, Sugiura H, Fujii Y. Chfr expression is downregulated by CpG island hypermethylation in esophageal cancer. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1695-1699
- 5 Corn PG, Heath EI, Heitmiller R, Fogt F, Forastiere AA, Herman JG, Wu TT. Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of E-cadherin in esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2765-2769
- 6 Toyota M, Sasaki Y, Satoh A, Ogi K, Kikuchi T, Suzuki H, Mita H, Tanaka N, Itoh F, Issa JP, Jair KW, Schuebel KE, Imai K, Tokino T. Epigenetic inactivation of CHFR in human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7818-7823
- 7 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol*

- 2006; 12: 192-198
- 8 Hofler H, Becker KF. Molecular mechanisms of carcinogenesis in gastric cancer. *Recent Results Cancer Res* 2003; 162: 65-72
- 9 Xi YG, Ding KY, Su XL, Chen DF, You WC, Shen Y, Ke Y. p53 polymorphism and p21WAF1/CIP1 haplotype in the intestinal gastric cancer and the precancerous lesions. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2201-2206
- 10 Summers MK, Bothos J, Halazonetis TD. The CHFR mitotic checkpoint protein delays cell cycle progression by excluding Cyclin B1 from the nucleus. *Oncogene* 2005; 24: 2589-2598
- 11 Yu X, Minter-Dykhouse K, Malureanu L, Zhao WM, Zhang D, Merkle CJ, Ward IM, Saya H, Fang G, van Deursen J, Chen J. Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation. *Nat Genet* 2005; 37: 401-406
- 12 Matsusaka T, Pines J. Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol* 2004; 166: 507-516
- 13 Oh YM, Yoo SJ, Seol JH. Deubiquitination of Chfr, a checkpoint protein, by USP7/HAUSP regulates its stability and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 615-619
- 14 Hamilton JP, Sato F, Greenwald BD, Suntharalingam M, Krasna MJ, Edelman MJ, Doyle A, Berki AT, Abraham JM, Mori Y, Kan T, Mantzur C, Paun B, Wang S, Ito T, Jin Z, Meltzer SJ. Promoter methylation and response to chemotherapy and radiation in esophageal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 701-708
- 15 Sakai M, Hibi K, Kanazumi N, Nomoto S, Inoue S, Takeda S, Nakao A. Aberrant methylation of the CHFR gene in advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1854-1857
- 16 Morioka Y, Hibi K, Sakai M, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y, Ito K, Nakao A. Aberrant methylation of the CHFR gene is frequently detected in non-invasive colorectal cancer. *Anticancer Res* 2006; 26: 4267-4270
- 17 Hibi K, Nakao A. Highly-methylated colorectal cancers show poorly-differentiated phenotype. *Anticancer Res* 2006; 26: 4263-4266
- 18 Morioka Y, Hibi K, Sakai M, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y, Ito K, Nakao A. Aberrant methylation of the CHFR gene in digestive tract cancer. *Anticancer Res* 2006; 26: 1791-1795
- 19 Brandes JC, van Engeland M, Wouters KA, Weijenberg MP, Herman JG. CHFR promoter hypermethylation in colon cancer correlates with the microsatellite instability phenotype. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1152-1156
- 20 Milne AN, Sitarz R, Carvalho R, Polak MM, Ligtenberg M, Pauwels P, Offerhaus GJ, Weterman MA. Molecular analysis of primary gastric cancer, corresponding xenografts, and 2 novel gastric carcinoma cell lines reveals novel alterations in gastric carcinogenesis. *Hum Pathol* 2007; 38: 903-913
- 21 Homma N, Tamura G, Honda T, Jin Z, Ohmura K, Kawata S, Motoyama T. Hypermethylation of Chfr and hMLH1 in gastric noninvasive and early invasive neoplasias. *Virchows Arch* 2005; 446: 120-126
- 22 Koga Y, Kitajima Y, Miyoshi A, Sato K, Sato S, Miyazaki K. The significance of aberrant CHFR methylation for clinical response to microtubule inhibitors in gastric cancer. *J Gastroenterol* 2006; 41: 133-139
- 23 Yoshida K, Hamai Y, Suzuki T, Sanada Y, Oue N, Yasui W. DNA methylation of CHFR is not a predictor of the response to docetaxel and paclitaxel in advanced and recurrent gastric cancer. *Anticancer Res* 2006; 26: 49-54
- 24 Kang HC, Kim IJ, Park JH, Shin Y, Park HW, Ku JL, Yang HK, Lee KU, Choe KJ, Park JG. Promoter hypermethylation and silencing of CHFR mitotic stress checkpoint gene in human gastric cancers. *Oncol Rep* 2004; 12: 129-133
- 25 Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 1-9
- 26 Yang XF, Yang L, Mao XY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. Pathobiological behavior and molecular mechanism of signet ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of the stomach: a comparative study. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 750-754
- 27 Tokunaga A, Kojima N, Andoh T, Matsukura N, Yoshiyasu M, Tanaka N, Ohkawa K, Shirota A, Asano G, Hayashi K. Hormone receptors in gastric cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983; 19: 687-689
- 28 Zhao XH, Gu SZ, Liu SX, Pan BR. Expression of estrogen receptor and estrogen receptor messenger RNA in gastric carcinoma tissues. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 665-669
- 29 Semenza GL. VHL and p53: tumor suppressors team up to prevent cancer. *Mol Cell* 2006; 22: 437-439
- 30 Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Komine C, Yokoyama T. Deregulation of the TP53/p14ARF tumor suppressor pathway in low-grade diffuse astrocytomas and its influence on clinical course. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4884-4890
- 31 Nishikura K, Watanabe H, Iwafuchi M, Fujiwara T, Kojima K, Ajioka Y. Carcinogenesis of gastric endocrine cell carcinoma: analysis of histopathology and p53 gene alteration. *Gastric Cancer* 2003; 6: 203-209
- 32 Gonda G, Bajtai A, Nagy P, Szanto I, Kiss J. Quantitative analysis of p53 expression and cell proliferation in gastric carcinomas. An immunohistochemical study. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 273-276

电编 郭海丽 编辑 张海宁

应用蛋白质组学技术筛选胰腺癌生物标志物的研究进展

刘辉, 张海婧, 陈国强, 吕丽艳, 李智立

■背景资料

本文简述蛋白质组学相关技术及筛选胰腺癌生物标志物的研究进展。

刘辉, 张海婧, 陈国强, 吕丽艳, 李智立, 中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所 北京市 100005
北京市自然科学基金资助项目, No. 7062042
通讯作者: 李智立, 100005, 北京市, 中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所. lizhili@ibms.pumc.edu.cn
电话: 010-65296475
收稿日期: 2007-01-29 接受日期: 2007-04-03

Research progress in screening biomarkers of pancreatic cancer by proteomic techniques

Hui Liu, Hai-Jing Zhang, Guo-Qiang Chen, Li-Yan Lv, Zhi-Li Li

Hui Liu, Hai-Jing Zhang, Guo-Qiang Chen, Li-Yan Lv, Zhi-Li Li, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China
Supported by Natural Science Foundation of China, No. 7062042

Correspondence to: Zhi-Li Li, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China. lizhili@ibms.pumc.edu.cn
Received: 2007-01-29 Accepted: 2007-04-03

Abstract

Pancreatic cancer is one kind of devastating diseases. Those patients without nonspecific symptoms at early stage had mostly lost the opportunity of surgical therapy when pancreatic cancer was detected at advanced stage. Rapid growth of proteomic technologies provides possibilities to study etiopathogenesis, and screen early diagnostic and prognosis biomarkers of pancreatic cancer. In this paper, the application of proteomic techniques in cell lines, tissues, serum and pancreatic juice from patients with pancreatic cancer is reviewed briefly.

Key Words: Proteomics; Pancreatic cancer; Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; Mass spectrometry; Electrospray ionization; Matrix-assisted laser desorption/ionization

Liu H, Zhang HJ, Chen GQ, Lv LY, Li ZL. Research progress in screening biomarkers of pancreatic cancer by proteomic techniques. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1628-1633

摘要

胰腺癌是一种十分凶险的恶性肿瘤。胰腺癌早期症状不明显, 临床确诊的患者多已处于中晚期, 大多失去手术治疗机会。蛋白质组技术的快速发展为研究胰腺癌发病机制、发现早期诊断和预后的生物标志物提供了可能。本文就蛋白质组学技术在胰腺癌细胞系、组织、血清和胰液等方面的应用作一综述。

关键词: 蛋白质组学; 胰腺癌; 双向凝胶电泳; 质谱; 电喷雾电离; 基质辅助激光解析电离

刘辉, 张海婧, 陈国强, 吕丽艳, 李智立. 应用蛋白质组学技术筛选胰腺癌生物标志物的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(14):1628-1633

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1628.asp>

0 引言

胰腺癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一。在西方国家他是第四大恶性肿瘤, 5 a存活率不足1%^[1]; 在中国是第六大恶性肿瘤, 5 a存活率1%-3%^[2]。近年来发病率呈现明显上升趋势。虽然现阶段诊断胰腺癌的标志物CA19-9^[3-5], CA50, CA125, CA242, K-ras^[6-8], p53^[9-11], CD44v6和端粒酶^[12-16]等已在临床中应用, 但无论是利用单个或是组合标志物进行胰腺癌早期诊断, 其检测灵敏性和准确性都不高。蛋白质组学技术^[17-21]的迅速发展, 为攻克胰腺癌等重大疾病提供了可能。本文就蛋白质组学技术在胰腺癌方面的研究成果作一综述。

1 蛋白质组学技术

蛋白质组(proteome)一词最早由澳大利亚学者Wilkins *et al*^[22]于1994年提出, 并首次出现在1995年的Biotechnology and Genetic Engineering Reviews杂志上, 指的是由一个基因组(genome)或一个细胞、组织表达的所有蛋白质。蛋白质组学(proteomics)是在蛋白质水平上定量、动态、整体性地研究生物体。他旨在阐明生物体全部蛋白质的表达模式及功能模式, 其内容包

括蛋白质的定性鉴定、定量检测、细胞内定位、相互作用研究等, 最终揭示蛋白质功能, 是基因组DNA序列与基因功能之间的桥梁. 当前蛋白质组学的研究策略主要有: “bottom-up”策略^[23-24], 他是指从细胞、组织、体液中提取出的蛋白质混合物酶切后得到更为复杂的多肽混合物, 经多维高效液相色谱分离后进行串联质谱鉴定获得肽段序列信息, 再搜索蛋白数据库和人工释图确定最后的鉴定结果^[25-28], 虽然此方法相对简单, 但是也有不足: (1)由于蛋白酶解产生大量的肽段, 致使原始样品的复杂性显著增高; (2)不同实验室之间很难获得高重复性; (3)蛋白质的鉴定依赖于对少数肽段的分析, 可能导致蛋白质修饰信息的丢失. “bottom-up”适合于研究mRNA是单顺反子的微生物^[29]. “top-down”策略, 即对蛋白质混合物分离后在蛋白水平上直接分析^[30-32], 当前有几种因素限制这种策略的广泛应用: (1)目前的分离技术还不能把较复杂的蛋白混合物分离成单个蛋白质组分后进行质谱鉴定; (2)现阶段质谱直接鉴定的蛋白质分子质量最大能到229 kDa^[33]; (3)自动化程度低; (4)费用高、耗费时间. 鉴于以上几点的限制, 当前一种常见折中办法是对蛋白质混合物预先分离后, 每组组分酶切后在多肽水平分析. 此方法适合于研究存在复杂的剪接体变化和翻译后修饰的真核生物蛋白质组^[29].

双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)^[34-36]、质谱(mass spectrometry, MS)^[37]技术是当前分离鉴定蛋白质的两大支柱技术, 在很多文献中已有详细介绍本文不做赘述. 随着科学技术的不断进步, 出现了许多新的蛋白质组学技术, 如表面增强激光解吸飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF MS)^[38]技术; 同位素标记相对和绝对定量(isobaric tag for relative and absolute quantitation, iTRAQ)^[39]技术是近年来新开发的一种蛋白质组学定量研究技术, 可对复杂样本进行相对和绝对定量研究, 具有较好的定量效果和较高的重复性, 适合差异蛋白质组学研究. 这些新技术的出现有力的推动了蛋白质组学技术在临床医学研究中的广泛应用. 多维色谱(multidimensional chromatography)^[40-42]分离技术的概念由Giddings提出, 指把不同分离机理的色谱技术有机结合在一起的分离模式, 与一维色谱分离模式相比其优点是大大地提高了

峰容量, 适用于样品复杂程度高的蛋白质组学研究. 多维色谱是有不同分离原理的色谱组合而成^[43]: 如(1)离子交换色谱/反相液相色谱; (2)体积排阻色谱/反相液相色谱; (3)亲和液相色谱/反相液相色谱等.

2 蛋白质组学技术在胰腺癌研究中的应用

2.1 胰腺癌细胞系蛋白质组研究 Moller *et al*^[44]在不同浓度柔红霉素条件下孵育细胞系(EPP85-181P)72 h. 细胞暴露在这种药物环境中导致17种蛋白上调表达, 其中12种蛋白被鉴定. 3种蛋白显示出强烈的浓度依赖调节, 细胞角蛋白7(cytokeratin 7)、细胞角蛋白19(cytokeratin19)和分化相关基因产物1(differentiation related gene product 1). Cecconi *et al*^[45-46]使用酶抑制剂曲古抑菌素-A(trichostatin-A)和5-氮-2'-脱氧胞嘧啶核苷(5-aza-2'-deoxycytidine)进行胰腺癌细胞培养, 发现与细胞凋亡相关的新蛋白. 其结果与观测的trichostatin-A和5-aza-2'-deoxycytidine通过影响细胞周期停滞和细胞凋亡抑制细胞生长的结果相吻合. Tseng *et al*^[47]建立了一株耐5-氟尿嘧啶的细胞系, 通过2-DE的方法观察到差异蛋白, 鉴定了其中的一些蛋白, 他们属于膜联蛋白家族. Imamura *et al*^[48]建立了一株敲除Smad4基因的胰腺癌细胞系, 通过2-DE的方法研究了经TGF- β 处理与未经TGF- β 处理的胰腺癌细胞蛋白表达的差异, 并鉴定了13个表达量差异大于1.3倍的蛋白, 包括参与细胞骨架调节、细胞周期调节、细胞增殖的蛋白. 这种方法的成功应用使检测未知通路中新的靶分子成为可能.

2.2 胰腺组织蛋白质组研究 Hu *et al*^[49]使用2-DE的方法建立了人的胰腺蛋白质数据库, 他包括302个蛋白质. 在这些蛋白中30%属于酶, 具有各种催化活性, 这与胰腺的生理作用一致. 这个研究小组还对胰腺癌和癌旁附近的正常组织进行了2-DE的比较分析^[50]. 结果发现在癌组织中有70个蛋白表达上调, 而在正常组织中有41个蛋白表达上调, 其中大部分是胰腺外分泌产生的支持胰腺正常功能的蛋白质, 如淀粉酶、脂肪酶、肽酶等. 在胰腺癌中表达上调的蛋白反映了他们在恶性肿瘤中的作用, 如增殖活性、黏连性消失、获得活动性和转移性. 癌组织中表达上调的组织蛋白酶D和fascin经免疫组化方法得到确认. Shen *et al*^[51]通过应用2-DE的方法分析了胰腺癌与邻近正常组织以及慢性胰腺炎患者胰腺组织与非胰腺疾病患者的胰腺组织.

■ 研发前沿

目前蛋白质组学技术被广泛用于胰腺癌早期诊断标志物的筛选. 研究表明血清/血浆样本是获得肿瘤生物标志物最佳资源之一, 但由于血清/血浆的成分极其复杂, 利用目前技术方法获得高特异性和高敏感性的标志物仍面临较大挑战.

■创新盘点

本文较为详细列出蛋白质组学技术的局限性和胰腺癌生物标志物筛选的样本选择。

鉴定了在胰腺癌中有差异表达的40个蛋白,包括一组抗氧化蛋白、伴侣蛋白、钙依赖结合蛋白、细胞外基质蛋白。其中7个调节蛋白经蛋白印记法或免疫组化法得到确认。以上两个研究使用了完整的胰腺组织。Shekouh *et al*^[52]利用激光捕获显微切割(laser capture microdissection)技术富集非恶性和恶性胰腺导管上皮细胞后进行2-DE, 获得了4个差异表达的蛋白(annexinIII, lactate dehydrogenase, trypsin和S100A6)。S100A6的差异表达得到免疫组化方法确认。在正常胰腺细胞中S100A6不表达或弱表达, 在80%低分化和中等分化肿瘤细胞中S100A6表达。该蛋白属于S100蛋白家族, S100蛋白家族中某些蛋白与各种疾病相关, 包括癌症的发展和转移。Chen *et al*^[53]使用ICAT(isotope-coded affinity tag)标记技术^[54]对胰腺癌组织和正常组织进行定量蛋白质谱研究, 定量分析了656个特异性蛋白, 其中151个蛋白差异表达量相差2倍以上。其中大部分调节蛋白在细胞生理活动、上皮和肿瘤细胞的细胞外基质相互作用的通讯系统中发挥作用。

2.3 胰腺液蛋白质组研究 Wandschneider *et al*^[55]通过分析不同条件下胰液的2-DE图谱, 研究不同胰酶抑制剂、不同浓度以及不同的pH范围对胰液分析结果的影响。研究结果表明: (1)在pH4以下的蛋白质很少, 大部分蛋白存在于pH4-7之间, pH10以上的蛋白也很少; (2)未加入胰酶抑制剂的2-DE图与加入胰酶抑制剂的2-DE图中的差异蛋白被后继试验证实为蛋白降解产物; (3)加入不同胰酶抑制剂的胰液2-DE图表明PMSF抑制剂的效果较好。Gronborg *et al*^[56]采用1-DE和LC-MS/MS(liquid chromatography tandem mass spectrometry)方法对取自3例胰腺癌患者的未加任何胰酶抑制剂的胰液进行分析, 分别鉴定出76, 63, 115个蛋白。由3例样本确定170个蛋白质, 胰液中正常组分如胰淀粉酶和胰脂肪酶等, 异常组分中过量表达的癌相关蛋白如脂皮质素1(lipocortin I)和CEACAM5等, 以及在胰液中首次报道的azurocidin和防卫素R-3(defensin R-3)。值得一提的是鉴定出一个与肝癌-小肠-胰腺/胰腺炎(hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated-protein HIP/PAP)相关的新蛋白PAP-2。PAP-2和HIP/PAP的相关性为85%, HIP/PAP在胰腺癌患者的血清和胰液中都显著上调, 并且胰液中的含量比血清中高1000倍, 可能为胰腺癌标志物的候选物。Rosty *et al*^[57]使用SELDI技术分析了22例胰液标本, 其中15例为胰腺

癌, 7例为其他胰腺疾病, 发现有一个分子质量为16.5 kDa的蛋白在67%(10/15)胰腺癌患者的胰液标本中存在, 而对照组胰液标本中的阳性率仅为17%(1/7)。进一步鉴定认为这种蛋白是肝癌-小肠-胰腺/胰腺炎-相关蛋白1(hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated-protein 1, HIP/PAP-1)。使用ELISA方法定量检测了HIP/PAP-1在43例患者(包括28例胰腺癌和15例胰腺其他疾病)胰液标本中的含量, 发现HIP/PAP-1在胰腺癌患者胰液中的含量(143.75-235.52 mg/L)显著高于对照组患者胰液中的含量(6.04±7.59 mg/L), 研究结果表明检测胰液中HIP/PAP-1的含量将可能有助于胰腺癌的诊断。Chen *et al*^[53]使用ICAT的方法综合研究了胰液蛋白质谱, 并且定量鉴定了胰腺癌差异表达的蛋白。通过对胰腺癌患者的胰液与正常人的胰液A组, 胰腺炎患者的胰液与正常人的胰液B组以及正常人的胰液与正常人的胰液C组进行分析, 共鉴定出136个蛋白, 其中20个蛋白在3组样品中存在, 40个蛋白在胰腺炎和胰腺癌的样品中存在, 34个蛋白在正常和胰腺癌的样品中存在。最终鉴定了在胰腺癌胰液中差异表达2倍以上的21个蛋白。需要注意的是在一对正常胰液的比较中发现有15个差异表达在2倍以上蛋白, 这种变化在进一步的分子标志物的评估中需要认真考虑。在他们的另一研究中^[58], 依然使用ICAT的方法定量研究胰液, 通过对1例胰腺癌胰液与11例正常胰液配对: 1例正常胰液与10例混合的正常胰液、1例胰腺癌胰液与10例混合的正常胰液比较研究, 总共鉴定105个蛋白, 在胰腺癌胰液与10例混合的正常胰液比较中显示30个蛋白定量差异在2倍以上, 其中有15个蛋白是首次发现与胰腺癌相关, IGFBP-2(insulin-like growth factor binding protein-2)是其中之一并使用蛋白质印迹方法验证。

2.4 胰腺癌血清蛋白质组研究 Koopmann *et al*^[59]应用SELDI技术在两种不同的芯片上[(weak cation exchange, immobilized metal affinity capture coupled with copper (IMAC-Cu²⁺))]分析来自胰腺癌、非恶性胰腺疾病和健康对照的180个血清样本, 有两个具有显著差异的质谱峰, 其灵敏性和特异性分别达到78%和97%。在另一个独立的研究中^[60], 经阴离子交换分离后使用IMAC-Cu²⁺芯片分析了103个来自胰腺癌和非胰腺癌患者的血清, 其灵敏性100%, 特异性93.5%。虽然在这两个研究中观察到的质谱峰有差异, 但是都

存在一个共同的质谱峰, 其质荷比为 m/z 3967, 他是否为同一个蛋白, 仍需其他方法进行验证. Hong *et al*^[61]利用2-DE、蛋白质印迹和质谱技术结合的方法分析了102例血清样本, 其中36例胰腺癌、18例慢性胰腺炎、33例非胰腺肿瘤和15例健康对照, 在一特殊类型(a particular tumor type)胰腺癌中鉴定出可诱导体液免疫反应产生自身抗体的钙网织蛋白1和2. Honda *et al*^[62]应用SELDI技术在两种不同的芯片[(weak hydrophobic (H50), cationic (CM10)]上分析了245例血清样本, 其中113例肿瘤样本、6例胰腺囊肿样本、5例慢性胰腺炎样本和121例正常对照样本. 在肿瘤与正常样本比较中有4个质谱峰 m/z 8766, 17 272, 28 080和14 779差异在2倍以上. 这组质谱峰与CA19-9联合检测29例胰腺癌患者有100%的敏感性, 但是在检测39例正常对照时产生6例假阳性. 这一组蛋白是否可以用于临床筛查有待进一步检验.

3 展望

蛋白质组学已经成为生命科学领域研究热点之一, 并形成临床蛋白质组学分支. 在蛋白质组学研究策略普遍被接受的同时, 也应该清醒地认识到蛋白质组学技术现阶段还不是一种完美的工具, 在当前技术条件的限制下, 还有一些问题等待解决. 例如在生物样品的制备与处理过程中, 由于生物样品极其复杂, 如血清含有上千种性质各异的物质如蛋白质、核酸、脂类和代谢产物等, 如何消除生物基质的干扰; 如何解决高丰度蛋白对低丰度蛋白的掩盖; 如何避免电喷雾过程中的离子抑制现象和电化学反应等问题显得非常重要^[63-64]. 胰腺癌早期无典型临床表现, 上腹疼痛需要鉴别的疾病甚多, 易发生误诊误治, 故寻找高特异性和高敏感性的胰腺早期诊断的标志物具有重要的临床意义和社会意义. 胰腺癌具有极强的隐蔽性, 因此血液中的特殊生物分子将有可能成为胰腺癌早期诊断标志物, 但是由于血液成分极其复杂, 多种分析和分离技术的有机结合才有可能从血液样本中获得胰腺癌早期诊断标志物.

4 参考文献

- 1 Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, Bassi C, Falconi M, Pederzoli P, Dervenis C, Fernandez-Cruz L, Lacaine F, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Friess H, Buchler MW. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised

- controlled trial. *Lancet* 2001; 358: 1576-1585
- 2 Guo X, Cui Z. Current diagnosis and treatment of pancreatic cancer in China. *Pancreas* 2005; 31: 13-22
- 3 Chang CY, Huang SP, Chiu HM, Lee YC, Chen MF, Lin JT. Low efficacy of serum levels of CA 19-9 in prediction of malignant diseases in asymptomatic population in Taiwan. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 1-4
- 4 Lowe D, Lee J, Schade R, Chaudhary A. Patient with markedly elevated CA 19-9 not associated with malignancy. *South Med J* 2006; 99: 306-308
- 5 Kilic M, Gocmen E, Tez M, Ertan T, Keskek M, Koc M. Value of preoperative serum CA 19-9 levels in predicting resectability for pancreatic cancer. *Can J Surg* 2006; 49: 241-244
- 6 Marchese R, Muleti A, Pasqualetti P, Bucci B, Stigliano A, Brunetti E, De Angelis M, Mazzoni G, Tocchi A, Brozzetti S. Low correspondence between K-ras mutations in pancreatic cancer tissue and detection of K-ras mutations in circulating DNA. *Pancreas* 2006; 32: 171-177
- 7 Campman SC, Fajardo MA, Rippon MB, Kraegel SA, Ruebner BH. Adenosquamous carcinoma arising in a mucinous cystadenoma of the pancreas. *J Surg Oncol* 1997; 64: 159-162
- 8 Wu X, Lu XH, Xu T, Qian JM, Zhao P, Guo XZ, Yang XO, Jiang WJ. Evaluation of the diagnostic value of serum tumor markers, and fecal k-ras and p53 gene mutations for pancreatic cancer. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 170-174
- 9 Gerdes B, Ramaswamy A, Ziegler A, Lang SA, Kersting M, Baumann R, Wild A, Moll R, Rothmund M, Bartsch DK. p16INK4a is a prognostic marker in resected ductal pancreatic cancer: an analysis of p16INK4a, p53, MDM2, an Rb. *Ann Surg* 2002; 235: 51-59
- 10 Kawahira H, Kobayashi S, Kaneko K, Asano T, Ochiai T. p53 protein expression in intraductal papillary mucinous tumors (IPMT) of the pancreas as an indicator of tumor malignancy. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 973-977
- 11 Bergan A, Gladhaug IP, Schjolberg A, Bergan AB, Clausen OP. p53 accumulation confers prognostic information in resectable adenocarcinomas with ductal but not with intestinal differentiation in the pancreatic head. *Int J Oncol* 2000; 17: 921-926
- 12 Ohuchida K, Mizumoto K, Yamada D, Yamaguchi H, Konomi H, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M. Quantitative analysis of human telomerase reverse transcriptase in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2066-2069
- 13 Mishra G, Zhao Y, Sweeney J, Pineau BC, Case D, Ho C, Blackstock AW, Geisinger K, Howerton R, Levine E, Shen P, Ibdah J. Determination of qualitative telomerase activity as an adjunct to the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by EUS-guided fine-needle aspiration. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 648-654
- 14 Murakami Y, Uemura K, Sasaki T, Hayashidani Y, Sudo T, Sueda T. Long-term survival of pancreatic cancer patient diagnosed by positive telomerase activity of pancreatic juice. *Surgery* 2005; 138: 962-963
- 15 Mizumoto K, Tanaka M. Detection of telomerase activity in patients with pancreatic cancer. *Methods Mol Med* 2005; 103: 199-205
- 16 Vezzosi D, Bouisson M, Escourrou G, Laurell H,

■应用要点

胰腺癌具有极强的隐蔽性, 因此血液中的特殊生物分子将有可能成为胰腺癌早期诊断标志物, 但是由于血液成分极其复杂, 多种分析和分离技术的有机结合才有可能从血液样本中获得胰腺癌早期诊断标志物.

- Selves J, Seguin P, Pradayrol L, Caron P, Buscail L. Clinical utility of telomerase for the diagnosis of malignant well-differentiated endocrine tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 63-67
- 17 Geisow MJ. Proteomics: one small step for a digital computer, one giant leap for humankind. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 206
- 18 Persidis A. Proteomics. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 393-394
- 19 Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 1998; 19: 1853-1861
- 20 Blobel G, Wozniak RW. Proteomics for the pore. *Nature* 2000; 403: 835-836
- 21 DeWitt N. Proteomics get complex. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 626
- 22 Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphrey-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996; 13: 19-50
- 23 McDonald WH, Yates JR 3rd. Shotgun proteomics and biomarker discovery. *Dis Markers* 2002; 18: 99-105
- 24 Wolters DA, Washburn MP, Yates JR 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* 2001; 73: 5683-5690
- 25 Leung KY, Wait R, Welson SY, Yan JX, Abraham DJ, Black CM, Pearson JD, Dunn MJ. A reference map of human lung MRC-5 fibroblast proteins using immobilized pH gradient-isoelectric focusing-based two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2001; 1: 787-794
- 26 Wait R, Gianazza E, Eberini I, Sironi L, Dunn MJ, Gemeiner M, Miller I. Proteins of rat serum, urine, and cerebrospinal fluid: VI. Further protein identifications and interstrain comparison. *Electrophoresis* 2001; 22: 3043-3052
- 27 Davidsson P, Paulson L, Hesse C, Blennow K, Nilsson CL. Proteome studies of human cerebrospinal fluid and brain tissue using a preparative two-dimensional electrophoresis approach prior to mass spectrometry. *Proteomics* 2001; 1: 444-452
- 28 Piubelli C, Galvani M, Hamdan M, Domenici E, Righetti PG. Proteome analysis of rat polymorphonuclear leukocytes: a two-dimensional electrophoresis/mass spectrometry approach. *Electrophoresis* 2002; 23: 298-310
- 29 Guerrero IC, Kleiner O. Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci Rep* 2005; 25: 71-93
- 30 Champion KM, Arnott D, Henzel WJ, Hermes S, Weikert S, Stults J, Vanderlaan M, Krummen L. A two-dimensional protein map of Chinese hamster ovary cells. *Electrophoresis* 1999; 20: 994-1000
- 31 Poutanen M, Salusjarvi L, Ruohonen L, Penttila M, Kalkkinen N. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass mapping and nanospray liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry sequence tag analysis for high sensitivity identification of yeast proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001; 15: 1685-1692
- 32 Shaw AC, Gevaert K, Demol H, Hoorelbeke B, Vandekerckhove J, Larsen MR, Roepstorff P, Holm A, Christiansen G, Birkelund S. Comparative proteome analysis of Chlamydia trachomatis serovar A, D and L2. *Proteomics* 2002; 2: 164-186
- 33 Han X, Jin M, Breuker K, McLafferty FW. Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. *Science* 2006; 314: 109-112
- 34 O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; 250: 4007-4021
- 35 Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975; 26: 231-243
- 36 Scheele GA, Palade GE. Studies on the guinea pig pancreas. Parallel discharge of exocrine enzyme activities. *J Biol Chem* 1975; 250: 2660-2670
- 37 Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207
- 38 Tang N, Tornatore P, Weinberger SR. Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev* 2004; 23: 34-44
- 39 Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3: 1154-1169
- 40 Giddings JC. Two-dimensional separations: concept and promise. *Anal Chem* 1984; 56: 1258A-1260A, 1262A, 1264A passim
- 41 Davis JM, Giddings JC. Statistical theory of component overlap in multicomponent chromatograms. *Anal Chem* 1983; 55: 418-424
- 42 Davis JM, Giddings JC. Statistical method for estimation of number of components from single complex chromatograms: theory, computer-based testing, and analysis of errors. *Anal Chem* 1985; 57: 2168-2177
- 43 Issaq HJ, Chan KC, Janini GM, Conrads TP, Veenstra TD. Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 817: 35-47
- 44 Moller A, Malerczyk C, Volker U, Stoppler H, Maser E. Monitoring daunorubicin-induced alterations in protein expression in pancreas carcinoma cells by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2002; 2: 697-705
- 45 Cecconi D, Astner H, Donadelli M, Palmieri M, Missiaglia E, Hamdan M, Scarpa A, Righetti PG. Proteomic analysis of pancreatic ductal carcinoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Electrophoresis* 2003; 24: 4291-4303
- 46 Cecconi D, Scarpa A, Donadelli M, Palmieri M, Hamdan M, Astner H, Righetti PG. Proteomic profiling of pancreatic ductal carcinoma cell lines treated with trichostatin-A. *Electrophoresis* 2003; 24: 1871-1878
- 47 Tseng JF, Willett CG, Fernandez-del Castillo C, Ryan DP, Clark JW, Zhu AX, Rattner DW, Winkelmann JL, Warshaw AL. Patients undergoing treatment for pancreatic adenocarcinoma can mount an effective immune response to vaccinations.

- Pancreatology* 2005; 5: 67-74
- 48 Imamura T, Kanai F, Kawakami T, Amarsanaa J, Ijichi H, Hoshida Y, Tanaka Y, Ikenoue T, Tateishi K, Kawabe T, Arakawa Y, Miyagishi M, Taira K, Yokosuka O, Omata M. Proteomic analysis of the TGF-beta signaling pathway in pancreatic carcinoma cells using stable RNA interference to silence Smad4 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 289-296
 - 49 Hu L, Evers S, Lu ZH, Shen Y, Chen J. Two-dimensional protein database of human pancreas. *Electrophoresis* 2004; 25: 512-518
 - 50 Lu Z, Hu L, Evers S, Chen J, Shen Y. Differential expression profiling of human pancreatic adenocarcinoma and healthy pancreatic tissue. *Proteomics* 2004; 4: 3975-3988
 - 51 Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D. Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cancer Res* 2004; 64: 9018-9026
 - 52 Shekhouh AR, Thompson CC, Prime W, Campbell F, Hamlett J, Herrington CS, Lemoine NR, Crnogorac-Jurcevic T, Buechler MW, Friess H, Neoptolemos JP, Pennington SR, Costello E. Application of laser capture microdissection combined with two-dimensional electrophoresis for the discovery of differentially regulated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 2003; 3: 1988-2001
 - 53 Chen R, Pan S, Brentnall TA, Aebersold R. Proteomic profiling of pancreatic cancer for biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 523-533
 - 54 Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 994-999
 - 55 Wandschneider S, Fehring V, Jacobs-Emeis S, Thiesen HJ, Lohr M. Autoimmune pancreatic disease: preparation of pancreatic juice for proteome analysis. *Electrophoresis* 2001; 22: 4383-4390
 - 56 Gronborg M, Bunkenborg J, Kristiansen TZ, Jensen ON, Yeo CJ, Hruban RH, Maitra A, Goggins MG, Pandey A. Comprehensive proteomic analysis of human pancreatic juice. *J Proteome Res* 2004; 3: 1042-1055
 - 57 Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 2002; 62: 1868-1875
 - 58 Chen R, Pan S, Yi EC, Donohoe S, Bronner MP, Potter JD, Goodlett DR, Aebersold R, Brentnall TA. Quantitative proteomic profiling of pancreatic cancer juice. *Proteomics* 2006; 6: 3871-3879
 - 59 Koopmann J, Zhang Z, White N, Rosenzweig J, Fedarko N, Jagannath S, Canto MI, Yeo CJ, Chan DW, Goggins M. Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 860-868
 - 60 Bhattacharyya S, Siegel ER, Petersen GM, Chari ST, Suva LJ, Haun RS. Diagnosis of pancreatic cancer using serum proteomic profiling. *Neoplasia* 2004; 6: 674-686
 - 61 Hong SH, Misek DE, Wang H, Puravs E, Giordano TJ, Greenson JK, Brenner DE, Simeone DM, Logsdon CD, Hanash SM. An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 5504-5510
 - 62 Honda K, Hayashida Y, Umaki T, Okusaka T, Kosuge T, Kikuchi S, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, Hirohashi S, Yamada T. Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. *Cancer Res* 2005; 65: 10613-10622
 - 63 McLuckey SA, Stephenson JL Jr. Ion/ion chemistry of high-mass multiply charged ions. *Mass Spectrom Rev* 1998; 17: 369-407
 - 64 Mora JF, Van Berkel GJ, Enke CG, Cole RB, Martinez-Sanchez M, Fenn JB. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2000; 35: 939-952

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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.

益生菌对炎症性肠病的治疗作用和机制

杨明, 韩真

■背景资料

炎症性肠病包括溃疡性结肠炎和克罗恩病。IBD的病因涉及遗传、环境和免疫三方面以及三者之间的相互作用。临床研究发现, 正常细菌的数量减少, 若给患者补充正常细菌即益生菌, 使肠道内菌群失调得到纠正, 可使病情缓解。本文将益生菌对炎症性肠病的治疗作用和机制作一综述。

杨明, 韩真, 皖南医学院弋矶山医院消化内科 安徽省芜湖市 241000

通讯作者: 韩真, 241000, 安徽省芜湖市, 皖南医学院弋矶山医院消化内科. hanzhen1028@hotmail.com
电话: 0553-5739316

收稿日期: 2007-03-14 接受日期: 2007-03-23

Therapeutic effect and mechanism of probiotics on inflammatory bowel disease

Ming Yang, Zhen Han

Ming Yang, Zhen Han, Department of Gastroenterology, Yijishan Hospital Affiliated to Wannan Medical College, Wuhu 241000, Anhui Province, China

Correspondence to: Zhen Han, Department of Gastroenterology, Yijishan Hospital Affiliated to Wannan Medical College, Wuhu 241000, Anhui Province, China. hanzhen1028@hotmail.com

Received: 2007-03-14 Accepted: 2007-03-23

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) includes ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Many studies demonstrate an involvement of intestinal microflora in the pathogenesis of IBD. Tissue damages can result from dysregulated immune response to intestinal bacteria in genetically susceptible individuals. Therefore, alteration of the intestinal microflora may represent a feasible therapeutic approach for IBD. Probiotics can change the proportion of intestinal microflora, improve the function of intestinal epithelial barrier, prevent intestinal bacterial translocation and alleviate the inflammation degree. In this article, we reviewed the effect of probiotics in the treatments of IBD and its mechanism.

Key Words: Probiotics; Inflammatory bowel disease; Intestinal microflora

Yang M, Han Z. Therapeutic effect and mechanism of probiotics on inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1634-1638

摘要

炎症性肠病包括溃疡性结肠炎和克罗恩病。炎

症性肠病患者肠道内存在菌群失调, 若给患者补充正常细菌即益生菌, 使肠道内菌群失调得到纠正, 可使病情缓解。益生菌能改变肠道菌群比例、转化某些肠内物质、提高肠上皮的屏障功能、防止肠细菌易位以及通过调节细胞因子减轻炎症。本文对益生菌以上作用及机制作一综述。

关键词: 益生菌; 炎症性肠病; 肠道菌群

杨明, 韩真. 益生菌对炎症性肠病的治疗作用和机制. *世界华人消化杂志* 2007;15(14):1634-1638

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1634.asp>

0 引言

炎症性肠病(IBD)包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD)。自从1859年首次报道UC以来, 这种疾病的病因学方面的研究少有进展。目前认为, IBD的病因涉及遗传、环境和免疫三方面以及三者之间的相互作用。临床研究发现, 正常细菌的数量减少, 若给患者补充正常细菌即益生菌, 使肠道内菌群失调得到纠正, 可使病情缓解。益生菌是含有生理性活菌或死菌(包括其组分和代谢产物)的生物制品, 经口服或其他途径摄入, 旨在改善黏膜表面的微生物群与酶的平衡, 或刺激机体特异性或非特异性免疫机制。1989年Fuller^[1]将益生菌定义为: 经饮食摄取的能促进宿主机体微生态平衡的活微生物。本文就益生菌对炎症性肠病的治疗作用和机制作一简要综述。

1 益生菌对炎症性肠病的治疗作用

益生菌虽有百余年历史, 但真正应用于临床还是最近几十年才开始。Kruis *et al*^[2]在327例UC患者维持治疗中比较美沙拉嗪(mesalazine)和益生菌的治疗效果。两组患者分别口服美沙拉嗪500 mg 3次/d和埃希杆菌Nissle1917 1次/d, 疗程12 mo。两组的复发率、缓解天数及疾病活动指数相接近, 说明益生菌治疗可取得与抗炎药物相似的疗效, 且无药物副作用。予18例活动期UC患者长双歧杆菌和菊粉、寡果糖治疗1 mo后, 治疗组

的乙状结肠镜评分降低, 而安慰剂组无改善, 治疗组临床症状改善^[3]. 传统药物治疗无反应的34例轻、中度活动期UC患者接受6 wk的一种新近生产的益生菌制剂VSL#3治疗, 缓解率为53%, 24%患者有反应. 说明VSL#3对UC有一定的治疗作用^[4].

慢性贮袋炎是溃疡性结肠炎回直肠吻合术后的难治性并发症, 被认为是炎症性肠病的第3种类型, 其病因不明, 可能与细菌过度生长和双歧杆菌、乳杆菌减少有关^[5]. Gionchetti *et al*^[6]应用VSL#3维持治疗慢性贮袋炎, 他们将40例临床和内镜下均缓解的慢性贮袋炎患者分为两组, 一组口服益生菌制剂VSL#3, 6 g/d; 另一组口服安慰剂. 服药9 mo后, VSL#3组仅3例复发, 而安慰剂组20例全部复发, 提示益生菌可有效地用于慢性贮袋炎缓解期的维持治疗. Mimura *et al*^[7]得到了类似的结果.

很多学者也研究了益生菌对CD的治疗效果. Schultz *et al*^[8]将11个处于中度活动期的CD患者随机分成两组, 分别接受乳酸杆菌GG(LGG-CM)和安慰剂治疗6 mo, 治疗组和对照组的缓解期中位数分别是16±4 wk和12±4.3 wk, 统计学无差异. 75例CD儿童在维持治疗时接受LGG治疗2 a. 其平均缓解时间LGG组9.8 mo, 安慰剂组11 mo, 复发率LGG组为31%, 安慰剂组为17%, 与安慰剂比较无差异^[9]. 法国GETAID工作组也得到了类似的结果^[10]. 他们将98个行肠切除的CD患者随机分成两组, 分别接受乳酸杆菌johnsonii strain LA1和安慰剂治疗6 mo, 内镜下复发率分别是49%和64%, 临床症状上复发人数分别是4和3, 两组间差异无显著性, 乳酸杆菌johnsonii strain LA1对CD患者无明显的治疗效果.

IBD是一种自身免疫性疾病, 有全身多个系统损害, 伴有一系列肠外表现, 包括硬化性胆管炎、关节炎、慢性肝炎等. 某些益生菌能减轻某些肠外表现. Karimi *et al*^[11]用益生菌复合制剂VSL#3治疗饱受关节痛之苦的静止期IBD患者, 这些患者的关节痛病史均超过2 wk. 关节痛强度采用Ritchie Articular评分标准和直观类比标度评分. 29人中有16人完成了试验, 根据评分标准, 有10人关节痛症状有了明显改善. 遗憾的是, 该研究没有设立对照组, 以及未能阐明其可能机制, 尚需进一步研究.

总之, 益生菌治疗IBD的疗效是有限的, 从目前的资料看, 其作用主要体现在对贮袋炎和UC缓解期的维持治疗, 对CD的疗效不明确. 可

能原因是: (1)菌株特异性: 不同的菌株对IBD可能作用不同, 例如大肠埃希杆菌nissle比乳酸杆菌和双歧杆菌更能刺激外周血单核细胞释放细胞因子^[12]; (2)与肠道不同部位的细菌含量不同有关, 大肠内细菌数量比空回肠多, 益生菌对UC的疗效优于CD可能与此有关^[13]; (3)UC和CD发病机制可能不一样.

2 益生菌对炎症性肠病的作用机制

2.1 益生菌能改变肠道菌群比例、转化某些肠内物质 IBD患者存在肠道菌群比例失调. UC患者急性期肠杆菌、肠球菌和小梭菌增加, 而双歧杆菌和乳酸杆菌减少, 缓解期拟杆菌和双歧杆菌较急性期明显上升, 而小梭菌数量下降; 急性期CD患者肠杆菌和酵母菌增加, 而双歧杆菌和乳杆菌下降, 缓解期双歧杆菌有回升, 但仍明显低于正常, 缓解期与急性期相比双歧杆菌的数量有明显差异^[14]. 某些益生菌能改变肠道菌群比例, 予IBD患者补充益生菌能增加肠道内的有益菌, 减少有害菌, 促使失调的肠道菌群正常化^[15]. Madsen *et al*^[16]发现, 给已患结肠炎的大鼠大肠重新定植乳杆菌reuteri后, 大鼠的结肠炎明显减轻, 黏膜黏附和易位的细菌比例明显下降, 说明肠道菌群比例已趋于正常, 其机制可能是通过竞争性抑制发挥作用. Macfarlane *et al*^[17]运用细菌学检验和直肠活组织检查方法发现UC患者肠内双歧杆菌数量明显减少. 他们设计了一个随机对照实验, 用含有双歧杆菌的合生元给处于活动期的UC患者口服, 为期1 mo, 在实验开始前和结束后用细菌学检验和直肠活组织检查方法检查患者肠内细菌比例. 结果发现定植在肠黏膜上的双歧杆菌明显增加.

乳酸盐是结肠内发酵的中间产物, 可以代谢成短链脂肪酸. 而高乳酸盐产物与IBD等疾病引起的大肠功能紊乱有关. Hashizume *et al*^[18]将12只无特异性致病菌的雄性斯普拉-道来大鼠(Sprague-Dawley rats)以寡聚果糖(100 g/kg)喂养, 在肠道内转化成乳酸盐. 持续喂养后第2天大便中乳酸盐的分泌量都大于30 mmol/kg. 第4天将12只大鼠随机分成两组, 一组($n=5$)以M.elsdenil JCM1772喂养3 d, 另一组以普通鼠食作为对照. 结果实验组的乳酸盐分泌量明显低于对照组, 而代之以丁酸盐的分泌量明显增加.

IBD患者罹患肾结石的危险度是普通人的10-100倍, 其原因是肠源性尿草酸盐过多. 某些益生菌能限制肠内草酸盐的吸收. Lieske *et al*^[19]

■研发前沿

如何选择最佳菌株、选用适宜的剂量和疗程; 微生物制剂发挥作用的机制; 进行大规模、多中心、随机、双盲和前瞻性临床试验; 每一种益生菌作用的分子机制的进一步研究.

■同行评价

本文详细叙述了益生菌治疗炎症性肠病的作用机制,有一定的参考价值。

将由各种原因导致的尿草酸盐过多的10个病人连续3 mo口服乳杆菌制剂,剂量每月增加一次,同时收集24 h尿量计算每个月尿草酸盐的平均浓度,第4个月不服药物,发现1 mo后平均尿草酸盐排泄量下降19%($P<0.05$),2 mo后下降了24%($P<0.05$),但是第3个月后有上升,第4个月又下降20%。因此他们得出结论:益生菌能影响尿草酸盐的排泄从而减少尿石的形成。

2.2 益生菌能提高肠上皮的屏障功能、防止肠细菌易位 Garcia-Urkia *et al*^[20]将32只成年Wistar鼠的十二指肠空肠曲到盲肠上10 cm的80%小肠全部切除,造成实验性短肠综合症(SBS),然后用标准鼠食和自来水喂养。10 d后,随机分成两组,对照组14只,实验组18只。实验组每天加饲双歧杆菌Lactis。实验结束时将大鼠全部处死。将大鼠肠系膜淋巴结、外周血、门静脉血样本分别进行培养。结果对照组90%发生了细菌易位,而实验组的发生率只有44%,差异具有显著性。他们由此得出结论,口服双歧杆菌Lactis能减少实验性短肠综合症细菌易位的发生。Osman *et al*^[21]将60只斯普拉-道来大鼠随机分成6组,前7 d分别以生理盐水和5种益生菌菌种喂养,后7 d继续上述制剂外,在大鼠饮水中加入5%右旋糖酐硫酸酯钠(DSS)以诱发结肠炎。将大鼠处死后取结肠病理。结果显示,与对照组相比,5个实验组的炎症明显减轻,且易位到肠系膜淋巴结的细菌菌落数明显低于对照组。

肠道屏障功能受损,通透性增高,肠腔内的抗原、内毒素等促炎症物质进入肠黏膜固有层,诱发免疫反应。益生菌能调节肠道上皮细胞间的连结,改善肠上皮的物理屏障功能。益生菌通过对底物和肠上皮微绒毛上的脂质和蛋白质多糖受体结合位点的竞争排除病原。拮抗致病菌的黏附定植^[22]。Madsen *et al*^[23]研究发现,VSL#3复合制剂中的一种或几种菌属能释放一种可溶性蛋白质,提高肠上皮的物理屏障功能。IL-10基因缺陷鼠体内和体外结肠甘露醇灌注实验均证实肠黏膜上皮通透性增高。经过4 wk VSL#3治疗后,甘露醇流量完全正常。他们应用VSL#3作用于单层肠上皮细胞T84,能显著提高细胞抗沙门氏菌侵袭的能力。用培养过VSL#3的条件培养液作用于单层肠上皮细胞T84,也可见到上述效应,说明一种可溶性因子被释放作用于上皮细胞。该因子对热不稳定,能被蛋白酶水解,提示可能是一种蛋白质。Tao *et al*^[24]发现乳酸杆菌GG(LGG-CM)分泌的一种可溶性蛋白质能引

起肠上皮细胞热休克蛋白(Hsp)表达增多,包括Hsp70和Hsp25。这种诱导作用持续时间很短,但上皮细胞能持续表达Hsp,提示信号转导途径参与其中。实验证实LGG-CM通过激活MAPKs途径而调节肠上皮细胞Hsp表达,p38和JNK的抑制剂能阻断Hsp的表达。Hsp能保护肠上皮细胞免于氧应激,保持肠上皮细胞完整性。

2.3 益生菌能调节细胞因子减轻炎症 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)是一种主要由活化的单核-巨噬细胞所产生的具有多种生物活性的细胞因子,可使白细胞在炎症局部聚集,刺激单核细胞、血管内皮细胞等产生细胞因子,诱导细胞因子合成并产生级联反应,最终导致组织的炎症损伤。Peran *et al*^[25]使用能释放谷胱甘肽的发酵乳杆菌治疗IBD,发现其主要通过降低结肠内TNF- α 水平和诱导氮氧合酶的表达,从而调节NO等炎症反应介质产生,改善炎症症状。霍利娟 *et al*^[26]应用益生菌和SASP治疗UC模型大鼠,发现肠黏膜中的IL-1 β mRNA和TNF- α mRNA均较模型组显著下降,说明益生菌可能通过抑制炎症因子的表达,在一定程度上达到缓解炎症,且与SASP同样起到治疗UC的作用。两歧双歧杆菌BCN4能抑制大鼠肠道IFN- γ , MCP-1的产生,同时使大鼠IBD临床症状明显减轻^[27]。Dalmasso *et al*^[28]研究发现,酵母菌boulardii能使分泌IFN- γ 的Th1淋巴细胞局限于肠系膜淋巴结内,同时CD4⁺淋巴细胞的数量及其分泌的IFN- γ 也减少。乳杆菌的一种亚型B21060能抑制CD4⁺淋巴细胞和单核细胞的增殖而不影响细胞因子的水平^[29]。由此可见,益生菌可能通过改变T淋巴细胞的迁移、增殖、抑制Th1淋巴细胞的浸润和前致炎因子的扩增发挥抗炎作用。

TNF- α , IL-1 β 表达是由NF- κ B调控的^[30]。UC鼠模型的结肠黏膜中巨噬细胞和上皮细胞核因子NF- κ B表达较正常对照明显增强,且其表达与炎症严重程度呈正相关。NF- κ B可能是免疫调节的中心环节^[31]。UC模型小鼠口服双歧杆菌能够减少小鼠结肠黏膜中NF- κ B的表达^[32]。

TLR家族是一个物种进化中的保守家族,在结构上具有高度同源性,每个TLR成员都是模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR),能够识别某种高度保守的结构基序,即病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)。Lee *et al*^[33]将活的、死的和照射灭活的益生菌饲于TLR-2, TLR-4, TLR-9和MyD88的基因敲除IBD模型小鼠,研究表明,益

生菌能够减轻TLR-2, TLR-4基因敲除小鼠结肠炎症的严重程度, 对于TLR-9, MyD88基因敲除小鼠则无这种作用. 喂给小鼠益生菌DNA也能减轻小鼠结肠炎症的严重程度, 而喂给小鼠甲基化DNA、小牛胸腺DNA、DNA酶处理的益生菌则无效. 接下来的研究中, 他们发现细菌DNA通过TLR-9诱导免疫细胞产生I型干扰素介导抗炎效应, I型干扰素中和抗体消除了抗炎效应, 反之重组基因产物INF- β 模拟TLR-9诱导的抗炎效应. 他们由此得出结论, 益生菌的这种保护作用主要是其自身DNA介导的, 与其代谢产物和定植能力关系不大. 细菌DNA通过TLR-9诱导免疫细胞产生I型干扰素, 而I型干扰素则可以阻止肠上皮屏障的破坏, 起到抗炎的作用.

目前看来, 信号转导过程与益生菌有关, 包括通过抑制蛋白酶体介导的NF- κ B的调节, HSP的诱导及激活. 最具挑战性的发现是: 益生菌的有益作用可以通过其DNA、分泌的可溶性因子介导产生; TLR-9可能介导了益生菌与免疫细胞间的相互作用.

总之, 由于引起IBD的细菌抗原尚不清楚, 所以到目前为止, 人们还很难去设计抗原特异性的免疫治疗. 利用益生菌的生物活性拮抗致病菌的作用, 给IBD治疗提供了一种新的思路. 但在临床实际应用中存在不少问题: 如何选择最佳菌株、选用适宜的剂量和疗程都是益生菌治疗IBD需要考虑的事情; 缺乏对微生态制剂的认识和使用经验, 尤其是大规模、多中心、随机、双盲和前瞻性临床试验少, 评价种类也少; 微生态制剂发挥作用确切的机制尚有待于进一步阐明; 每一种益生菌作用机制需进一步研究; 没有一项研究验证益生菌制剂的最小有效剂量; 目前关于益生菌对IBD的治疗作用的临床试验较少, 且样本量较小, 还需进一步行大样本临床试验^[34]. 我们相信随着对益生菌治疗炎症性肠病实用价值的深入研究, 人类终究会发现应用便捷、安全而有效的微生态治疗方法.

3 参考文献

- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365-378
- Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, Kascak M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53: 1617-1623
- Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'neil DA, Macfarlane GT. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005; 54: 242-249
- Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1539-1546
- Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119: 305-309
- Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003; 124: 1202-1209
- Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 2004; 53: 108-114
- Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor RB, Vanderhoof JA, Rath HC. *Lactobacillus* GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2004; 4: 5
- Bousvaros A, Guandalini S, Baldassano RN, Botelho C, Evans J, Ferry GD, Goldin B, Hartigan L, Kugathasan S, Levy J, Murray KF, Oliva-Hemker M, Rosh JR, Tolia V, Zholudev A, Vanderhoof JA, Hibberd PL. A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus* GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 833-839
- Marteau P, Lemann M, Seksik P, Laharie D, Colombel JF, Bouhnik Y, Cadot G, Soule JC, Bourreille A, Metman E, Lerebours E, Carbonnel F, Dupas JL, Veyrac M, Coffin B, Moreau J, Abitbol V, Blum-Sperisen S, Mary JY. Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. *Gut* 2006; 55: 842-847
- Karimi O, Pena AS, van Bodegraven AA. Probiotics (VSL#3) in arthralgia in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease: a pilot study. *Drugs Today (Barc)* 2005; 41: 453-459
- Helwig U, Lammers KM, Rizzello F, Brigidi P, Rohleder V, Caramelli E, Gionchetti P, Schrenzenmeir J, Foelsch UR, Schreiber S, Campieri M. *Lactobacilli*, *bifidobacteria* and *E. coli* nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5978-5986
- 周俊, 台卫平, 张玫. 益生菌对炎症性肠病的治疗作用. *胃肠病学* 2006; 11: 633-636
- Laake KO, Bjornekleit A, Aamodt G, Aabakken L, Jacobsen M, Bakka A, Vatn MH. Outcome of four weeks' intervention with probiotics on symptoms and endoscopic appearance after surgical reconstruction with a J-configured ileal-pouch-anal-anastomosis in ulcerative colitis. *Scand J*

- Gastroenterol* 2005; 40: 43-51
- 15 Kuhbacher T, Ott SJ, Helwig U, Mimura T, Rizzello F, Kleessen B, Gionchetti P, Blaut M, Campieri M, Folsch UR, Kamm MA, Schreiber S. Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut* 2006; 55: 833-841
 - 16 Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999; 116: 1107-1114
 - 17 Macfarlane S, Furrie E, Kennedy A, Cummings JH, Macfarlane GT. Mucosal bacteria in ulcerative colitis. *Br J Nutr* 2005; 93 Suppl 1: S67-72
 - 18 Hashizume K, Tsukahara T, Yamada K, Koyama H, Ushida K. Megasphaera elsdenii JCM1772T normalizes hyperlactate production in the large intestine of fructooligosaccharide-fed rats by stimulating butyrate production. *J Nutr* 2003; 133: 3187-3190
 - 19 Lieske JC, Goldfarb DS, De Simone C, Regnier C. Use of a probiotic to decrease enteric hyperoxaluria. *Kidney Int* 2005; 68: 1244-1249
 - 20 Garcia-Urquia N, Asensio AB, Zubillaga Azpiroz I, Zubillaga Huici P, Vidales C, Garcia-Arenzana JM, Aldazabal P, Eizaguirre I. Beneficial effects of Bifidobacterium lactis in the prevention of bacterial translocation in experimental short bowel syndrome. *Cir Pediatr* 2002; 15: 162-165
 - 21 Osman N, Adawi D, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G. Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of Lactobacillus and Bifidobacterium. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 320-327
 - 22 Korzenik JR, Podolsky DK. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 197-209
 - 23 Madsen KL, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD, Fedorak RN. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 262-270
 - 24 Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC, Schneewind O, Chang EB, Petrof EO. Soluble factors from Lactobacillus GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1018-1030
 - 25 Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Adrio JL, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. Lactobacillus fermentum, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 737-746
 - 26 霍丽娟, 赵和平. 益生菌对溃疡性结肠炎大鼠结肠粘膜中IL-1和TNF- α 表达的影响. *山西医科大学学报* 2004; 35: 341-343, 349
 - 27 Kim N, Kunisawa J, Kweon MN, Eog Ji G, Kiyono H. Oral feeding of Bifidobacterium bifidum (BGN4) prevents CD4(+) CD45RB(high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin Immunol* 2007; 123: 30-39
 - 28 Dalmaso G, Cottrez F, Imbert V, Lagadec P, Peyron JF, Rampal P, Czerucka D, Groux H, Foussat A, Brun V. Saccharomyces boulardii inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology* 2006; 131: 1812-1825
 - 29 Peluso I, Fina D, Caruso R, Stolfi C, Caprioli F, Fantini MC, Caspani G, Grossi E, Di Iorio L, Paone FM, Pallone F, Monteleone G. Lactobacillus paracasei subsp. paracasei B21060 suppresses human T-cell proliferation. *Infect Immun* 2007; 75: 1730-1737
 - 30 Palanki MS. Inhibitors of AP-1 and NF-kappa B mediated transcriptional activation: therapeutic potential in autoimmune diseases and structural diversity. *Curr Med Chem* 2002; 9: 219-227
 - 31 Marco ML, Pavan S, Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr Opin Biotechnol* 2006; 17: 204-210
 - 32 崔海宏, 陈村龙, 王继德, 杨玉捷, 孙勇, 王亚东, 赖卓胜. 双歧杆菌影响溃疡性结肠炎患者肠黏膜的研究. *中华内科杂志* 2003; 42: 554-557
 - 33 Lee J, Rachmilewitz D, Raz E. Homeostatic effects of TLR9 signaling in experimental colitis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1072: 351-355
 - 34 Santosa S, Farnworth E, Jones PJ. Probiotics and their potential health claims. *Nutr Rev* 2006; 64: 265-274

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

本刊讯 为推动期刊出版事业的繁荣和发展,中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅共同组织了2006年度期刊质量评估工作.此次参评的为2005年度山西省出版的196种期刊,其中,社科期刊110种、科技期刊86种.评估结果如下:一级(优秀)期刊共88种,其中社科期刊42种,科技期刊46种,包括世界胃肠病学杂志和世界华人消化杂志;二级期刊共103种,其中社科期刊64种,科技期刊39种;三级期刊共5种,其中社科期刊4种,科技期刊1种.(中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅 2007-01-30)

胃癌相关基因GCRG213正反向转染和RNA干扰对裸鼠胃癌种植瘤的影响

徐世平, 吴本俨, 王孟薇, 高利利, 伍银桥, 王卫华, 尤纬缔

徐世平, 吴本俨, 王孟薇, 高利利, 伍银桥, 王卫华, 尤纬缔,
中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
国家自然科学基金资助项目, No.30370635
通讯作者: 吴本俨, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院南楼消化科. benyanwu@vip.sina.com
电话: 010-66939443
收稿日期: 2007-04-04 接受日期: 2007-04-21

Effect of sense or anti-sense GCRG213 fragment and GCRG213 RNA interference on transplanted gastric carcinoma *in vivo*

Shi-Ping Xu, Ben-Yan Wu, Meng-Wei Wang, Li-Li Gao,
Yin-Qiao Wu, Wei-Hua Wang, Wei-Di You

Shi-Ping Xu, Ben-Yan Wu, Meng-Wei Wang, Li-Li Gao,
Yin-Qiao Wu, Wei-Hua Wang, Wei-Di You, Department
of Gastroenterology, South Building, General Hospital of
Chinese PLA, Beijing 100853, China
Supported by National Natural Science Foundation of
China, No. 30370635
Correspondence to: Dr. Ben-Yan Wu, Department of Gas-
troenterology, South Building, General Hospital of Chinese
PLA, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853,
China. benyanwu@vip.sina.com
Received: 2007-04-04 Accepted: 2007-04-21

Abstract

AIM: To investigate the influence of sense or anti-sense GCRG213 fragment and GCRG213 RNA interference (RNAi) on transplanted gastric cancer *in vivo*.

METHODS: Gastric carcinoma cell line MKN45 at logarithmic growth phase was subcutaneously inoculated in 20 athymic mice. After tumor formation, the adeno-associated virus (AAV) containing sense or anti-sense GCRG213 fragment and GCRG213 RNA interference fragment was injected into tubercles. Meanwhile, empty and normal saline control groups were designed. All the mice were killed 2 weeks after injection. Tumors were weighted and the expression of GCRG213 mRNA was detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.

RESULTS: Three weeks after inoculation of MKN45 cells, small tumor tubercles came into formation. The weights of tumor tissues were 5.12 ± 1.02 , 1.22 ± 0.46 , 0.81 ± 0.37 , 3.13 ± 0.69 and 3.45 ± 0.87 g in sense, anti-sense, RNAi, empty and normal saline group, and the mRNA expression of GCRG213 were 0.406 ± 0.013 , 0.211 ± 0.021 , 0.087 ± 0.015 , 0.312 ± 0.050 and 0.283 ± 0.061 in the above groups, respectively.

CONCLUSION: Target genes including sense or anti-sense GCRG213 and RNAi fragment can be effectively expressed *in vivo* through AAV vector. Increased or decreased GCRG213 expression can promote or inhibit growth of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer related gene GCRG213; Adeno-associated virus; Small interfering RNA; Gene transfection; Transplanted gastric cancer

Xu SP, Wu BY, Wang MW, Gao LL, Wu YQ, Wang WH, You WD. Effect of sense or anti-sense GCRG213 fragment and GCRG213 RNA interference on transplanted gastric carcinoma *in vivo*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1639-1642

摘要

目的: 观察胃癌相关基因GCRG213体内正、反向转染和RNA干扰对裸鼠胃癌种植瘤的影响。

方法: 将对数生长期的胃癌细胞株MKN45接种到裸鼠皮下, 成瘤后用制备好的分别含GCRG213正、反义克隆和RNAi片段的腺相关病毒分别在肿瘤局部注射, 以空病毒和生理盐水对照, 继续喂养2 wk后处死, 取肿瘤测量重量, 并用半定量RT-PCR检测肿瘤组织GCRG213mRNA表达水平。

结果: 裸鼠接种MKN45细胞3 wk左右皮下形成肿瘤结节。肿瘤组织重量在正向转染组为 5.12 ± 1.02 g、反向组 1.22 ± 0.46 g、RNAi组 0.81 ± 0.37 g、空病毒组 3.13 ± 0.69 g、生理盐水组 3.45 ± 0.87 g; 各组GCRG213 mRNA表达水平依次分别为 0.406 ± 0.013 , $0.211 \pm$

■背景资料

胃癌相关基因GCRG213是我们实验室筛选出的1条在肠型胃癌、癌旁和正常组织间差异表达的新基因, 初步研究表明: 用其正义克隆转染人胃癌细胞系MKN45细胞后, 能增加细胞的生长速度和成瘤性, 用反义克隆转染或RNA干扰后则能抑制细胞的生长速度和成瘤性, 是1种可能的胃癌促进因子。腺相关病毒(AAV)载体是目前唯一没有引起人类宿主任何病理反应的载体, 有望成为人体基因治疗和基因功能研究最理想的载体工具。为了进一步在体研究GCRG213功能, 我们包装了含其正、反义克隆和特异性RNAi片段的3种AAV, 并行裸鼠体内注射, 为以后的研究奠定了基础, 同时也为胃癌基因治疗提供了有益的尝试。

■同行评价

该文选题新颖, 研究方法先进, 数据客观, 结论对于探索胃癌的发病机制具有较高的学术价值, 而且对于胃癌的基因治疗也提供了有益的尝试。

0.021, 0.087 ± 0.015 , 0.312 ± 0.050 , 0.283 ± 0.061 。

结论: 三种腺相关病毒分别有效地介导了GCRG213正、反义克隆和RNAi片段的体内表达, 提高或降低了GCRG213 mRNA的表达水平, 促进或抑制了胃癌种植瘤的生长。

关键词: 胃癌相关基因GCRG213; 腺相关病毒; 小干扰RNA; 基因转染; 胃癌种植瘤

徐世平, 吴本严, 王孟薇, 高利利, 伍银桥, 王卫华, 尤经纬. 胃癌相关基因GCRG213正反向转染和RNA干扰对裸鼠胃癌种植瘤的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1639-1642
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1639.asp>

0 引言

胃癌的发生发展是多基因变异累积的过程. 本实验室应用荧光标记的DDRT-PCR筛选出1条在肠型胃癌组织、癌旁及正常组织间差异表达的新基因GCRG213^[1]. 初步研究表明, 用其正义克隆转染人胃癌细胞系MKN45细胞后, 能增加细胞的生长速度和成瘤性, 用反义克隆转染或RNA干扰后则能抑制细胞的生长速度和成瘤性^[2-3]. 为了进一步研究GCRG213的体内功能, 我们用包装好的分别含GCRG213正、反义克隆和特异性RNAi片段的三种腺相关病毒行裸鼠体内注射, 观察对胃癌种植瘤生长的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 5周龄雌性裸鼠均购自解放军总医院动物实验中心, 体质量18-20 g. 包含GCRG213正、反向克隆的腺相关病毒rAAV-GCRG213-s, rAAV-GCRG213-a(滴度均为 4×10^{13} v.g./L)和包含GCRG213特异性RNAi片段的腺相关病毒rAAV-U6-shRNA(滴度为 5×10^{15} v.g./L)均有本实验室制备并保存. rAAV-GFP腺相关病毒(滴度为 5×10^{15} v.g./L)由北京本元正阳公司惠赠. MKN45细胞系本实验室保存. RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 建立胃癌种植瘤模型 5周龄雌性裸鼠20只, 随机分成5组, 每组4只, 无菌环境下饲养3 d后准备接种. 取对数生长期MKN45细胞, 2.5 g/L胰酶消化后, $1 \times \text{PBS}$ 洗涤, 制成浓度为 1×10^{10} /L的单细胞悬液, 在每只裸鼠左后肢皮下注射0.2 mL MKN45细胞。

1.2.2 病毒局部注射 将病毒均稀释成滴度为 $2 \times$

10^{14} v.g./L, 待裸鼠皮下有小的瘤结节形成时, 每组裸鼠分别在肿瘤局部注射0.2 mL相应病毒或生理盐水. A组(空白组): 注射0.2 mL生理盐水; B组(空病毒对照组): 注射rAAV-GFP腺相关病毒; C组(正向转染组): 注射rAAV-GCRG213-s腺相关病毒; D组(反向转染组): 注射rAAV-GCRG213-a腺相关病毒; E组(shRNA干扰组): 注射rAAV-U6-shRNA腺相关病毒. 注射后裸鼠继续在无菌环境下饲养2 wk, 观察肿瘤大小变化及裸鼠存活状况。

1.2.3 取肿瘤组织 2 wk后将裸鼠引颈处死, 剥离种植瘤块, 滤纸吸干后测量肿瘤大小并称重, 部分组织液氮保存, 拟行RT-PCR检测GCRG213 mRNA表达水平的变化。

1.2.4 组织总RNA提取及鉴定 称取50-100 mg组织, 加入1 mL TRIzol试剂, 组织体积不超过TRIzol试剂体积的10%. 匀浆后室温孵育5 min, 加0.2 mL氯仿, 剧烈震荡15 s, 室温孵育2-3 min. 4°C 12 000 g离心15 min. 移出上清, 加0.5 mL异丙醇, 室温孵育10 min. 4°C 12 000 g离心10 min. 移去上清, 用冷的750 mL/L乙醇洗一次. 4°C 7500 g离心5 min, 回收RNA沉淀, 溶解于100 μL DEPC水中使用, 或置于乙醇中 -70°C 保存备用. 取5 μL RNA样品, 以10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析, 紫外灯下观察rRNA, 28S, 18S, 5S的带型和强度. 总RNA用双蒸水1:40稀释后测其 $A_{260/280}$ 比值以及有无残留蛋白。

1.2.5 半定量RT-PCR检测GCRG213 mRNA表达 取RNA 5 μg 进行逆转录反应, 然后各自取cDNA 1 μL 用于PCR反应. GCRG213基因引物序列如下: P1: 5'-AACTGCAGATGCAACAAGAA-3', P2: 5'-CGGGATCCAAGTTTTGAGTGAG-3'. 以 $\beta 2$ -microglobulin为内参照, 引物序列如下: P1 5'-GCTATCCAGCGTACTCCAAAGA-3', 5'-AGAGCTACCTGTGGAGCAACCT-3'. 引物由上海博亚生物工程公司合成, 反应条件: 94°C 2 min. 94°C 30 s, 51°C 30 s, 72°C 30 s, 32个循环. 72°C 延伸7 min. 取5 μL 扩增产物, 以10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析. 产物电泳后经凝胶分析软件(Bandscan)分析其灰度值, 结果以产物与内参照的比值表示。

2 结果

2.1 胃癌种植瘤模型及肿瘤生长状况 裸鼠皮下接种MKN45细胞后, 3 wk左右皮下形成肉眼可见的肿瘤结节, 局部注射病毒后, 裸鼠生长良好,

未出现1例死亡.继续喂养2 wk后处死裸鼠,剥离瘤块,滤纸吸干后称重. A, B, C, D, E五组肿瘤重量分别为(mean $\pm$ SD, g) 3.45 ± 0.87 , 3.13 ± 0.69 , 5.12 ± 1.02 , 1.22 ± 0.46 , 0.81 ± 0.37 , 同A组和B比较, C组的裸鼠肿瘤生长更快($P<0.05$), 而D组和E组的裸鼠肿瘤生长较慢($P<0.05$).

2.2 肿瘤组织总RNA的提取 肿瘤组织提取的总RNA(图1), 分光光度计测量 $A_{260/280} = 1.7-1.85$, 电泳清晰显示28S, 18S和5S条带.

2.3 RT-PCR结果 A, B, C, D, E五组肿瘤组织中GCRG213 mRNA表达水平(与内参照比值)分别为 0.283 ± 0.061 , 0.312 ± 0.050 , 0.406 ± 0.013 , 0.211 ± 0.021 , 0.087 ± 0.015 , 同A组和B组比较C组的裸鼠GCRG213 mRNA表达水平相对较高, 而D组和E组的裸鼠肿瘤GCRG213 mRNA表达水平相对较低, 结果说明注射病毒后正、反向克隆得到了有效表达, shRNA片段也有效抑制了目的基因的表达(图2).

3 讨论

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 我国是胃癌发病率较高的地区, 尽管目前我国胃癌的发病率有下降趋势, 但其发病率和死亡率仍位居前列^[4-5]. 探索疾病发生的相关机制, 寻找更为有效的治疗手段仍是我们努力的方向.

GCRG213是我们实验室发现的1条胃癌相关新基因, 既往的研究表明^[2-3]GCRG213可能是一种新发现的恶性肿瘤形成促进因子. 由于既往的实验主要是体外实验, 为了进一步研究GCRG213在体内表达水平的变化对肿瘤的影响, 我们选用腺相关病毒载体进行了GCRG213正、反义克隆和特异性RNAi片段的包装, 结果表明, 用病毒进行裸鼠种植瘤局部注射后, 成功实现了基因的局部表达, 同注射了空病毒组比较, 正向表达组促进了肿瘤的发展, GCRG213 mRNA表达水平升高; 反向表达组和RNAi组减缓了肿瘤的发展速度, GCRG213 mRNA表达水平降低. 结果再次证实了GCRG213是一个促癌因子, 当然本实验裸鼠数量有限, 对实验的进一步扩大将有助于对结果的更深入观察, GCRG213的促癌机制和对体内其他相关基因的影响也有待进一步研究. 本实验也为胃癌的基因治疗提供了有益的尝试. 随着生物技术的发展, AAV载体成为目前载体工具研究的热点. 在用于人类基因治疗常用病毒载体中, AAV载体是目前唯一没有引起人类宿主任何病理反应的

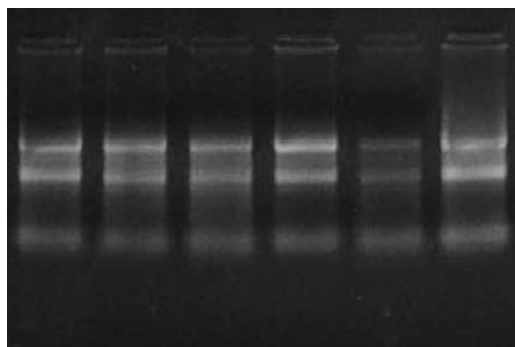


图1 裸鼠肿瘤组织提取总RNA电泳图.

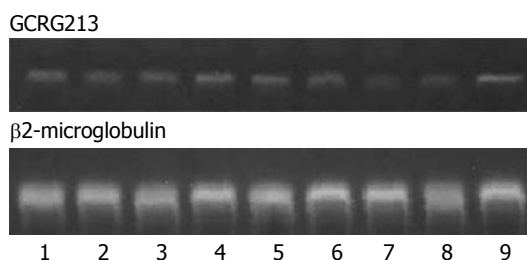


图2 裸鼠肿瘤组织GCRG213 mRNA表达水平. 1-2: D组; 3-4: B组; 5-6: A组; 7-8: E组; 9: C组.

载体^[6]. 作为体内实验一种理想的基因治疗的病毒载体, AAV具有使用安全、不致病、可以定点整合到第19号染色体上、可以感染分裂和非分裂细胞、宿主范围广、携带的外源基因可长期稳定表达等优点^[7-9]. rAAV携带的外源基因除了以整合的形式长期表达以外, 还可以染色体外附加体的形式短暂表达. 这取决于转导的细胞类型、细胞的代谢和增殖状态以及所采用的转导条件. rAAV向体内靶组织注射后, 逐渐由单链的载体基因组转变成高分子量的双链串联体, 伴随着外源基因的表达逐渐增强, 在数周内表达达到稳定状态. 外源基因的长期表达既可以来自整合于染色体的串联体, 也可以来自附加体形式的串联体, 这两种情况同时存在. 在小鼠肝脏中, rAAV的单链基因组在5 wk内逐渐消失, 代之以双链、高分子量串联体的逐渐增加. 这种串联体在约5%的细胞中是整合形式的, 其余则是以附加体形式存在的^[8]. 因此, AAV有望成为人体基因治疗和基因功能研究最理想的载体工具. 本实验显示裸鼠局部注射病毒数达到 $10^{10}-10^{11}$ v.g., 未出现任何不良反应, 生长状况良好, 反应了腺相关病毒良好的安全性, 同时用该病毒成功实现了基因的体内表达, 对肿瘤的生长产生了抑制或促进作用, 也说明用病毒进行体内目的基因的正、反向表达和RNA干扰都

是可行的. Mahendra *et al*^[10]已经用rAAV介导的sFlt21抑制肿瘤血管的生成, Veldwijk *et al*^[11]也在肉瘤细胞系中用rAAV2介导自杀基因来进行基因治疗的研究, 都显示了rAAV应用于临床的广阔前景.

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由与靶序列同源的双链RNA所诱导的特异性的转录后基因沉默现象, 它具有高效性、特异性的特点, 已成为基因治疗和基因功能研究领域新的热点. 典型的转染外源合成的siRNA在转染7 d以后或者10次细胞分裂后会从mRNA抑制中恢复^[12]. 然而用shRNA载体转染的细胞将经历长期稳定的mRNA抑制作用. 从而提供了比转染化学合成的siRNA更经济有效的方法. 如果能用病毒包装含目的基因特异性的shRNA进行体内感染并有效表达, 无疑是基因治疗的一种理想的方法. 由于RNAi的高效表达需要有特异性的U6启动子^[13-14], 我们构建的包含U6启动子和特异性RNAi片段的rAAV-U6-shRNA腺相关病毒体内注射后成功实现了RNAi片段的有效表达, 也将为更多的基因干预和基因的功能研究提供有效的载体工具.

4 参考文献

- 1 Wang GS, Wang MW, Wu BY, Liu XB, You WD, Yang XY. A gene encoding an apurinic/aprimidinic endonuclease-like protein is up-regulated in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1196-1201
- 2 高利利, 吴本俨, 王孟薇, 黄海力, 伍银桥, 尤纬缔, 王卫华. 胃癌相关基因GCRG213正反义真核表达载体的构建及鉴定. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1453-1457
- 3 高利利, 吴本俨, 王孟薇, 王珊, 黄海力, 伍银桥, 尤纬缔, 王卫华. 胃癌相关基因GCRG213真核表达载体的构建及其对胃癌细胞生长特性的影响. *解放军医学杂志* 2006; 31: 881-884
- 4 赵金扣, 刘爱民, 武鸣, 圣龙贵, 陈娟, 顾小平, 王建军, 覃玉, 陆健. 江苏省大丰市1999-2004年主要恶性肿瘤发病死亡分析. *中国肿瘤* 2005; 14: 577-579
- 5 张薇, 项永兵, 刘振伟, 方茹蓉, 阮志贤, 孙璐, 高立峰, 金凡, 高玉堂. 1973-1999年上海市区老年人恶性肿瘤发病趋势分析. *中华老年医学杂志* 2005; 24: 701-704
- 6 Flotte TR. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* 2004; 11: 805-810
- 7 Rabinowitz JE, Samulski RJ. Building a better vector: the manipulation of AAV virions. *Virology* 2000; 278: 301-308
- 8 Xu R, Sun X, Tse LY, Li H, Chan PC, Xu S, Xiao W, Kung HF, Krissansen GW, Fan ST. Long-term expression of angiostatin suppresses metastatic liver cancer in mice. *Hepatology* 2003; 37: 1451-1460
- 9 Wang H, Shayakhmetov DM, Leege T, Harkey M, Li Q, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Lieber A. A capsid-modified helper-dependent adenovirus vector containing the beta-globin locus control region displays a nonrandom integration pattern and allows stable, erythroid-specific gene expression. *J Virol* 2005; 79: 10999-11013
- 10 Mahendra G, Kumar S, Isayeva T, Mahasreshti PJ, Curiel DT, Stockardt CR, Grizzle WE, Alapati V, Singh R, Siegal GP, Meleth S, Ponnazhagan S. Antiangiogenic cancer gene therapy by adeno-associated virus 2-mediated stable expression of the soluble FMS-like tyrosine kinase-1 receptor. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 26-34
- 11 Veldwijk MR, Berlinghoff S, Laufs S, Hengge UR, Zeller WJ, Wenz F, Fruehauf S. Suicide gene therapy of sarcoma cell lines using recombinant adeno-associated virus 2 vectors. *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 577-584
- 12 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 13 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
- 14 Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6047-6052

电编 何基才 编辑 王晓瑜

蛇床子素对四氯化碳诱导小鼠脂质过氧化反应的影响

刘建新, 周青, 周俐, 赵海燕, 连其深

刘建新, 周青, 周俐, 赵海燕, 连其深, 赣南医学院药理学教研室 江西省赣州市 341000
国家自然科学基金资助项目, No. 30560172
江西省自然科学基金资助项目, No. 0640005
2005年江西省中医药科研计划, No. 2005A55
通讯作者: 刘建新, 341000, 江西省赣州市医学院路1号, 赣南医学院药理学教研室. jianxingliu@yahoo.com.cn
电话: 0797-8269773 传真: 0797-8269600
收稿日期: 2007-01-18 接受日期: 2007-02-13

Influence of Osthole on lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride in mice

Jian-Xin Liu, Qing Zhou, Li Zhou, Hai-Yan Zhao, Qi-Shen Lian

Jian-Xin Liu, Qing Zhou, Li Zhou, Hai-Yan Zhao, Qi-Shen Lian, Department of Pharmacology, Gannan Medical College, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30560172, and Natural Science Foundation of Jiangxi Province, No. 0640005, and Jiangxi Province Administration of Tradition Chinese Medicine, No. 2005A55
Correspondence to: Jian-Xin Liu, Department of Pharmacology, Gannan Medical College, 1 Yixueyuan Road, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China. jianxingliu@yahoo.com.cn
Received: 2007-01-18 Accepted: 2007-02-13

Abstract

AIM: To study the anti-lipid peroxidation effect of Osthole during acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl_4) in mice.

METHODS: Forty Kunming mice were randomly and equally divided into normal control group, model group, Osthole-I group (treated with 50 g/kg Osthole) and Osthole-II group (treated with 100 g/kg Osthole). Except those in the normal control group, the mice in the other groups were intraperitoneally injected with 1 g/L CCl_4 (peanut oil solution). Sixteen hours later, the serum were collected for the detection of superoxide dismutase (SOD) activity and total antioxidation capacity (T-AOC), and the liver tissues were sampled for the measurement of malondialdehyde (MDA) content, nitric oxide (NO) level and T-AOC.

RESULTS: In comparison with model group, Osthole at the dose of 50 g/kg markedly en-

hanced the level of NO ($F = 6.171$, $P = 0.01$); however, Osthole at the dose of 100 g/kg significantly decreased MDA content ($F = 3.547$, $P = 0.04$), increased the level of NO ($F = 3.698$, $P = 0.009$) and T-AOC ($P = 0.000$) in liver tissues, and elevated SOD activity ($F = 4.797$, $P = 0.04$) and T-AOC ($F = 3.103$, $P = 0.02$) in serum.

CONCLUSION: Osthole has the effect of anti-lipid peroxidation.

Key Words: Osthole; Carbon tetrachloride; Lipid peroxidation

Liu JX, Zhou Q, Zhou L, Zhao HY, Lian QS. Influence of Osthole on lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1643-1645

摘要

目的: 研究蛇床子素(Ost)对四氯化碳(CCl_4)诱导小鼠脂质过氧化反应的影响。

方法: 40只昆明种小鼠随机平均分为4组: 正常对照组、模型组、Ost治疗1组(50 g/kg)、Ost治疗2组(100 g/kg)。除对照组外, 其余各组腹腔注射1 g/L CCl_4 花生油溶液。16 h后分别测定血清SOD和T-AOC及肝组织MDA, NO和T-AOC。

结果: 与模型组相比, 50 g/kg Ost显著升高肝组织NO含量($F = 6.171$, $P = 0.01$); 100 g/kg Ost显著降低 CCl_4 中毒小鼠肝组织中MDA含量($F = 3.547$, $P = 0.04$), 升高NO($F = 3.698$, $P = 0.009$)和T-AOC($P = 0.000$)以及血清中提高SOD活性($F = 4.797$, $P = 0.04$)和T-AOC($F = 3.103$, $P = 0.02$)。

结论: 蛇床子素有抗脂质过氧化作用。

关键词: 蛇床子素; 四氯化碳; 脂质过氧化

刘建新, 周青, 周俐, 赵海燕, 连其深. 蛇床子素对四氯化碳诱导小鼠脂质过氧化反应的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(14):1643-1645
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1643.asp>

■背景资料

氧自由基可能是许多病理过程的共同中间环节之一, 体内自由基的生成和清除处于相对平衡, 体内过剩自由基的产生及引发的脂质过氧化反应, 将促进细胞损伤和机体衰老, 并引发多种疾病. 本实验室曾报道蛇床子素的抗氧化作用和肝损伤的保护作用, 本文的目的是进一步肯定蛇床子素对脂质过氧化损伤的保护作用。

■创新盘点

本研究发现蛇床子素对肝损伤机体的脂质过氧化物含量、机体抗氧化防御体系的整体状态有不同程度的影响。

0 引言

蛇床子素(osthole, Ost)作为一种香豆素广泛存在于当归、白芷、补骨脂、羌活、独活等伞形科植物中,也是这些植物中线型呋喃香豆素的代表,他的化学名为7-甲氧基-8-异戊烯基香豆素(7-methoxy-8-[3-methylpent-2-enyl]coumarin)。我们曾报道Ost具有Ca²⁺拮抗作用和抗炎、抗氧化、抗凝血、肝损伤的保护等作用^[1-6]。有关其作用机制未见报道,本研究以CCl₄制备小鼠脂质过氧化损伤模型,通过体内自由基发生体系进一步研究了蛇床子素提取液的抗氧化作用,并对可能的作用机制进行了探讨,进一步肯定蛇床子素对脂质过氧化损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 昆明种小鼠,体质量20±2 g,雌雄兼用,江西省实验动物中心提供。Ost由成都龙泉高科天然药业有限公司提供。实验前用N-2甲基甲酰胺溶解,吐温-80助溶,生理盐水稀释至所需浓度使用。溶剂对照液含N-2甲基甲酰胺:吐温-80:生理盐水等于(1:1:8);丙二醛、一氧化碳、超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒,由南京建成生物工程研究所提供。丙二醛(MDA)含量用硫代巴比妥酸比色法测定,T-AOC和SOD活性用黄嘌呤氧化酶法测定,NO含量用硝酸还原酶法测定。722N可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司,KDC-2046低速冷冻离心机,合肥科大创新股份有限公司中佳分公司。

1.2 方法 小鼠40只,随机分为对照组、模型组、治疗1组、治疗2组。对照组和模型组均腹腔注射生理盐水10 mL/kg,治疗1组腹腔注射Ost 50 g/kg,治疗2组腹腔注射Ost 100 g/kg,各组均每天给药一次,连续15 d。各组小鼠处死前禁食,自由饮水。除对照组外,其余各组分别于第14天给药后2 h,腹腔注射1 g/L CCl₄食用油溶液10 mL/kg一次。16 h后断头取血,以8192 g离心5 min,分离血清,分别测定SOD和T-AOC。取出肝脏组织用生理盐水制成10%肝匀浆,测定MDA,NO和T-AOC。具体步骤均按各试剂盒说明操作。

统计学处理 使用SPSS11.0统计软件包,所有数据用mean±SD表示,采用方差分析的Post Hoc检验,*P*<0.05为差异有显著性。

2 结果

与对照组比较,模型组小鼠肝组织中MDA含量

表 1 各小组肝组织的MDA, NO, T-AOC水平的变化(mean ± SD, *n* = 10)

分组	MDA(nmol/g)	NO(μmol/g)	T-AOC(kU/g)
Control	7.47 ± 1.66 ^a	1.61 ± 0.442 ^b	2.51 ± 0.20 ^d
Model	22.73 ± 14.23	1.01 ± 0.42	1.80 ± 0.64
治疗1组	21.13 ± 20.08	1.33 ± 0.49	2.41 ± 0.62 ^a
治疗2组	10.84 ± 5.61 ^a	1.59 ± 0.35 ^b	2.71 ± 0.38 ^d

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01, ^d*P*<0.01 vs 模型组。

表 2 各小组血清的SOD, T-AOC水平的变化(mean ± SD, *n* = 10)

分组	SOD(μU/L)	T-AOC(kU/L)
Control	444.44 ± 55.89 ^b	24.78 ± 4.50 ^b
Model	219.07 ± 44.18	18.69 ± 5.52
治疗1组	231.82 ± 62.49	23.14 ± 2.57
治疗2组	363.59 ± 74.99 ^a	24.05 ± 6.24 ^a

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 模型组。

显著升高,NO、T-AOC水平显著降低(*P*<0.05),血清中的SOD和T-AOC水平也相应降低;治疗蛇床子素高、低浓度组小鼠组织中MDA含量均明显低于模型组(*P*<0.05),NO、T-AOC水平明显高于模型组(*P*<0.05)同时,血清中SOD和T-AOC水平也明显高于模型组。蛇床子素预处理的小鼠在CCl₄攻击下表现出:肝组织MDA含量有明显抑制,对SOD、NO、T-AOC水平具有显著提高作用,这些达到对照小鼠的水平(表1-2)。

3 讨论

氧自由基可能是许多病理过程的共同中间环节之一,自由基学说认为:体内自由基的生成和清除处于相对平衡,若此平衡被破坏,体内过剩自由基的产生及引发的脂质过氧化反应,将促进细胞损伤和机体衰老,并引发多种疾病^[7],CCl₄在体内经肝活化生成多种自由基(如·CCl₃和·OOCCL₃等),后者直接作用于质膜上的多不饱和脂肪酸,发生脂质过氧化反应,生成大量的MDA,可严重损伤细胞并加速细胞和机体衰老^[8]。另外·CCl₃还可抑制细胞膜和微粒体膜上钙泵的活性,使Ca²⁺内流增加,造成肝细胞脂质过氧化性损伤,从而引起中毒死亡^[9]。体内自由基来源分内源性和外源性,肝脏是外源性过氧化物在体内转化和排泄的主要场所。因此,MDA在血清、肝组织中的含量间接反应了脂质过氧化损伤的程度^[10-11]。SOD是动物机体内重要的抗

氧化酶类,其作用是清除自由基和过氧化物,从而降低脂质过氧化物的生成并加速其清除,减少其对细胞和组织的损伤。T-AOC,即机体抗氧化防御体系的整体状态,包括酶促和非酶促两个部分,前者主要包括超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽转移酶等,后者如维生素E、维生素C、胡萝卜素等。体内T-AOC、SOD活性越高,自由基清除速度越快^[12]。NO在不同原因所致的肝损伤中所起作用是不同的。在CCl₄诱导小鼠急性肝损伤中,CCl₄抑制NO的产生可明显地增加肝内的脂质过氧化,而NO对急性肝损伤则可改善微循环,维持肝脏血液灌流,防止血栓形成,灭活氧自由基^[12],可防止肝细胞凋亡^[13],从而减轻肝脏损伤,起保护作用。

本实验研究显示,小鼠经CCl₄致毒后,肝组织MDA含量较对照组显著增加,表明CCl₄诱发脂质过氧化反应模型复制成功。而预先采用蛇床子素提取液治疗的小鼠,肝组织MDA含量较模型组显著降低,NO水平及T-AOC值明显升高,同时血清中SOD含量及T-AOC水平明显升高。表明蛇床子素有抗脂质过氧化作用,其机制可能发生在多个环节:(1)减少自由基、活性氧的生成;(2)改善微循环;(3)增加SOD活性;提高T-AOC。从而加速自由基、活性氧的清除。本实验室曾报道蛇床子素能抑制细胞钙内流,具有保护受损的细胞作用^[3],但是否在化学物质CCl₄诱发的肝损伤中通过抑制钙内流这一途径减轻肝肿胀尚须进一步研究。

4 参考文献

- 1 刘建新,连其深.蛇床子素的药理学研究进展.时珍国医国药 2005; 16: 1235-1237
- 2 连其深,周俐,叶和杨,朱遵平,刘建新,曾靖.蛇床子素抗炎作用的实验研究.赣南医学院学报 1999; 19: 165-168
- 3 周俐,上官珠,连其深,周青,曾靖.蛇床子素抗心律失常作用实验研究.现代应用药学 1996; 13: 11-13
- 4 刘建新,周俐,周青,杨庆春,张文平.蛇床子素对小鼠实验性肝损伤的保护作用.中药药理与临床 2006; 22: 21-22
- 5 周俐,刘建新,周青,桂荣燕.蛇床子素抗凝血作用.中药药理与临床 2006; 22: 42-43
- 6 Liu J, Zhang W, Zhou L, Wang X, Lian Q. Anti-inflammatory effect and mechanism of osthole in rats. *Zhong Yao Cai* 2005; 28: 1002-1006
- 7 Liu W, Liu XJ, Yu Q, Zhao J, Lei ZL, Li L. A study on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in patients with tuberculous pleurisy. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2003; 26: 781-784
- 8 冯大明,王双,唐雅玲,杨永宗,朱刚直,颜迪忠.水蓼衣提取物对CCl₄诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用.世界华人消化杂志 2005; 13: 1098-1101
- 9 牛晓峰,贺浪冲,范特,李延.黄珠子草有效成分短叶苏木酚及8,9-单环氧短叶苏木酚对大鼠肝损伤的保护作用.中国中药杂志 2006; 31: 1529-1532
- 10 张剑平,魏红山,刘顺爱,郭晶晶,张黔英,石小红,张四平,刘志英,冯鑫,吕洪波.依那普利对CCl₄急性肝损伤大鼠抗氧化功能的影响.世界华人消化杂志 2004; 12: 2638-2641
- 11 贾凤兰,赵琦,张祝琴,阮明,邱飞婵,邱永祥,李雪婷,张宝旭.1,3-二苯-1,3-丙二酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用.中国新药杂志 2006; 15: 26-29
- 12 Muscara MN, Wallace JL. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. *Am J Physiol* 1999; 276: G1313-1316
- 13 Li J, Billiar TR. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 1999; 276: G1069-1073

■同行评价

本文作者采用蛇床子素对小鼠预处理,继用CCl₄诱导小鼠脂质过氧化损伤,发现蛇床子素显著降低CCl₄作用下小鼠肝组织中MDA含量,升高NO和T-AOC、以及提高血清中SOD活性和T-AOC。由此推论,蛇床子素有抗脂质过氧化作用。蛇床子素来自一些中草药,然而其化学结构清楚,比较容易探索其防治肝损伤的机制,因而研究方向值得肯定。研究内容具有实用价值。

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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。

维生素C和维生素E对小鼠化学性肝损伤的预防性保护作用

孙设宗, 唐微, 胡承江, 孟新云

■背景资料

我国的肝炎发病率较高, 近年来乙醇性肝损伤有逐年增加的趋势, 各种原因引起的肝损伤, 自由基引起的氧化应激是公认原因之一, VE和VC能够有效的清除自由基, 具有较强的抗氧化作用, 探讨增加食物中VC和VE对实验性肝损伤的预防性保护及其作用机制, 可进一步拓展VE和VC在临床上的应用。

孙设宗, 唐微, 郧阳医学院生化与免疫学实验室 湖北省十堰市 442000

胡承江, 郧阳医学院病理学教研室 湖北省十堰市 442000

孟新云, 郧阳医学院医疗保健中心 湖北省十堰市 442000

郧阳医学院中青年基金项目, No. 2005ZQY02

通讯作者: 孙设宗, 442000, 湖北省十堰市人民南路30号, 郧阳医学院生化与免疫学实验室, sunshezhun@yahoo.com.cn

电话: 0719-8875324

收稿日期: 2006-07-20 接受日期: 2006-08-10

Protective effect of vitamin C and E against chemical liver injury in mice

She-Zong Sun, Wei Tang, Cheng-Jiang Hu, Xin-Yun Meng

She-Zong Sun, Wei Tang, Laboratory of Biochemistry and Immunity, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Cheng-Jiang Hu, Department of Pathology, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Xin-Yun Meng, Healthcare Department of Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Supported by the Middle-aged and Young Talent Project of Yunyang Medical College, No. 2005ZQY02

Correspondence to: She-Zong Sun, Laboratory of Biochemistry and Immunity, Yunyang Medical College, 30 Renmin South Road, Shiyan 442000, Hubei Province, China. sunshezhun@yahoo.com.cn

Received: 2006-07-20 Accepted: 2006-08-10

Abstract

AIM: To find out the protective effect of vitamin C (VC) and vitamin E (VE) against chemical liver injury caused by carbon tetrachloride (CCl_4).

METHODS: A total of 60 Kunming rats were randomly divided into 5 groups: control group, model group, VC-treated group, VE-treated group, and VC plus VE group. After 10 days of treatment, 1.5 mL/L CCl_4 were injected into all the mice except those in control group to induce liver injury. Finally, the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and tissue contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) were examined. The morphological changes of liver tissues were observed under light microscope.

RESULTS: VC and VE significantly decreased

the levels of serum ALT and AST (2277.12 ± 1187.90 , 2163.76 ± 1412.11 nkat/L vs 4527.07 ± 1019.37 nkat/L, $P < 0.01$), and tissue content of MDA (4.37 ± 0.49 , 3.26 ± 0.71 $\mu\text{mol/g}$ vs 9.25 ± 2.74 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$). Under microscope, liver injury was greatly decreased in VC and VE group, especially in VC + VE group.

CONCLUSION: Both VC and VE can prevent liver tissues from chemical injury, and combined use presents a better effect.

Key Words: Vitamin C; Vitamin E; Liver injury; Protective effect

Sun SZ, Tang W, Hu CJ, Meng XY. Protective effect of vitamin C and E against chemical liver injury in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1646-1649

摘要

目的: 探讨维生素C(VC)和维生素E(VE)对 CCl_4 引起化学性肝损伤的预防性保护作用。

方法: 昆明种小鼠60只随机分5组, 设正常对照组、病理模型组、VC保护组、VE保护组、VC+VE保护组, 饲养10 d, 除正常对照组外, 其余各组ip 1.5 mL/L CCl_4 致小鼠化学性肝损伤, 测定小鼠血清中ALT, AST及肝细胞中MDA, GSH, SOD, HE染色光镜下观察肝细胞形态变化。

结果: VC和VE保护组能显著降低血清中ALT和AST(2277.12 ± 1187.90 , 2163.76 ± 1412.11 nkat/L vs 4527.07 ± 1019.37 nkat/L, $P < 0.01$)以及肝细胞中脂质过氧化物MDA的含量(4.37 ± 0.49 , 3.26 ± 0.71 $\mu\text{mol/g}$ vs 9.25 ± 2.74 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$)。镜下观察肝损伤明显减轻, 体外抗氧化实验能显著性的抑制脂质过氧化物MDA生成, 联合应用有协同效应。

结论: VC和VE对化学性肝损伤有预防性保护作用。

关键词: 维生素C; 维生素E; 肝损伤; 预防性保护

孙设宗, 唐微, 胡承江, 孟新云. 维生素C和维生素E对小鼠

鼠化学性肝损伤的预防性保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1646-1649
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1646.asp>

0 引言

肝炎是一种严重危害人们身体健康的传染病之一, 我国是肝炎高发区. 据调查统计, 仅乙型肝炎表面抗原的检出率达10.09%^[1], 近年来酒精性肝损伤也呈现不断增加的趋势^[2], 尽管各种肝炎所致肝损伤的机制尚不十分清楚, 但氧化应激是公认的起始原因之一. 资料表明Vitamin C(VC)和Vitamin E(VE)能清除活性氧自由基以及脂质过氧化自由基^[3-5]. 但VC, VE对小鼠化学性肝损伤预防性保护作用研究很少, 我们在昆明种小鼠饲料中加入VC, VE, 用四氯化碳(CCl₄)诱导化学性肝损伤, 探讨VC, VE对化学性肝损伤预防性保护作用, 为进一步拓展VC, VE在临床上的应用和保健提供实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 昆明种3月龄小鼠60只, 雌雄各半, 体重28-36 g, 本院动物中心供给. 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物工程公司), VE和VC(浙江医药股份有限公司新昌制药厂), 其余为国产分析纯生化试剂. ZS83-1型内切式组织匀浆机(浙西机械厂), MDF-382E型超低温冰箱(Sony公司), 752型分光光度计(上海第二光学仪器厂), RA-50半自动生化分析仪(Technicon公司).

1.2 方法 60只小鼠随机分5组, 每组雌雄各半共12只, 分笼饲养. 正常对照组: 常规饲料, 自由饮水; 病理造模组: 常规饲料, 自由饮水; VE保护组: 自由饮水, 常规饲料中加VE(250 mg/kg饲料); VC保护组: 自由饮水, 常规饲料中加VC(1500 mg/kg饲料)^[6], 由于VC极易氧化, 应少量多次配制, -20℃冰箱中保存, 使用前取出至室温喂养; VE+VC保护组: 自由饮水, 饲料中加VC和VE. 预防性饲养10 d, 第11天正常对照组腹腔注射豆油溶液, 其余各组腹腔注射1.5 mL/L CCl₄豆油溶液(10 mL/kg体重)^[7], 24 h各组小鼠眼球取血后处死小鼠, 分离血清测定各组的ALT和AST. 取出肝脏后立即取肝小叶约0.2 g固定, 按常规方法切片, HE染色, 观察肝细胞形态变化. 其余肝脏置冰生理盐水中洗净血液, 用滤纸吸去水分称质量, 用PBS按1:10稀释冰浴下匀浆, 4000 r/min离心5 min, 取上清液用双缩脲法

测肝匀浆中蛋白质含量. 按试剂盒要求测MDA, GSH, SOD的含量. 取上述各组肝匀浆(4 g蛋白/L)0.25 mL置相应的试管中, 除正常对照组外, 其余各组加6 mmol/L FeSO₄ 40 μL, 60 mmol/L H₂O₂ 40 μL, pH7.4的PBS缓冲液500 μL, 正常对照组加PBS补充容量至等量. 各管置37℃水浴中保温25 min启动反应产生脂质过氧化物, 加150 mL/L的三氯醋酸1.0 mL结束反应, 6.7 g/L的硫代巴比妥酸溶液1.0 mL, 500 mL/L的冰醋酸1.0 mL, 置沸水中20 min取出, 冷却后离心用752分光光度计测532 nm的A值, 测定MDA含量^[5]. 计算VC, VE对脂质过氧化物MDA产生的抑制率, 抑制率计算方法按文献[8].

统计学处理 用SPSS10.0软件进行方差分析.

2 结果

2.1 VE, VC对CCl₄肝损伤小鼠血清ALT, AST的影响 病理造模组与正常对照组比较, 能显著性的升高血清中ALT和AST的活性($P<0.01$), 说明CCl₄所致肝损伤模型是成功的. 与病理造模组比较, VE或VC组, 都能显著的降低血清中ALT和AST的活性($P<0.01$), 联合应用与单独应用比较有协同效应($P<0.05$, 表1).

2.2 VE, VC对CCl₄肝损伤小鼠肝组织中MDA, SOD, GSH含量的影响 病理造模组与正常对照组比较, 能显著性的升高肝细胞中MDA的含量, 说明CCl₄可导致急性肝损伤. 饲料中加入VC, VE能显著降低肝细胞中MDA的含量($P<0.01$). VE组和VC组, 与模型组和对照组比较各组之间SOD, GSH并无显著性差异, 虽然SOD是清除自由基主要的酶, GSH可提供还原当量参与自由基的清除; 实验表明, 增加饲料中的VE、VC, SOD和GSH的含量不一定升高, 但均可显著降低脂质过氧化物MDA的含量. 相反模型组则有代偿性升高的趋势. 提示VC, VE可能具有对抗自由基的生成或直接清除自基的作用(表1).

2.3 VE, VC对体外诱导脂质过氧化物MDA产生的抑制作用 将肝匀浆中加入6 mmol/L FeSO₄ 50 μL, 10 mmol/L H₂O₂ 50 μL, 在保温过程中可诱导脂质过氧化物的生成, 氧化对照组A₅₃₂为0.697, 明显高于空白对照组(0.359), 说明诱导肝匀浆产生脂质过氧化物是成功的, 饲料中加入VE, VC小鼠肝匀浆, 与氧化对照组比较可明显的抑制脂质过氧化物的生成, A₅₃₂显著降低, VE, VC应用对脂质氧化产物MDA生成的抑制率分别为76.18%±9.03%和73.26%±9.89%, 联合

■相关报道

本课题组前期已进行了镁离子、VE和VC对肝损伤保护作用的研究, 实验表明镁离子可对抗自由基的生成, 直接清除自由基有作用, 增加抗氧化酶的活性, 与VC和VE联合应用有协同作用, 研究成果已在相关核心期刊上发表. (注: 该研究课题已申报2007年省级科研项目, 已通过审批, 可了解本课题组的后续研究.)

■创新盘点

本研究证明VE和VC能够增加机体的抗氧化能力有效的对抗和清除自由基,降低肝损伤时升高的ALT和AST稳定细胞膜的结构,降低MDA的含量。目前有资料报道VC和VE可增加机体的免疫力,可改善红细胞膜的流动性,提高淋巴细胞增殖活性,但其作用机制尚需进一步探讨。

表 1 VC, VE对CCl₄肝损伤小鼠ALT, AST, MDA, SOD和GSH含量的影响(mean ± SD, n = 12)

分组	ALT(nkat/L)	AST(nkat/L)	MDA(μmol/g pro)	GSH(mg/g pro)	SOD(nkat/mg pro)
正常对照	656.29 ± 290.89	1398.11 ± 325.73	5.146 ± 1.50	32.71 ± 7.52	2378.95 ± 788.99
病理造模组	4527.07 ± 1019.37 ^b	3835.43 ± 751.65 ^b	9.25 ± 2.74 ^b	34.8 ± 6.08	2649.36 ± 700.80
VE保护组	2163.76 ± 1412.11 ^d	2029.07 ± 622.12 ^d	3.26 ± 0.71 ^d	28.88 ± 9.75	2372.14 ± 547.94
VC保护组	2277.12 ± 1187.90 ^d	2461.32 ± 609.62 ^d	4.37 ± 0.49 ^d	33.75 ± 6.44	2454.65 ± 552.94
VC+VE保护组	1446.12 ± 1041.64 ^a	1593.98 ± 731.97 ^a	2.98 ± 0.68 ^a	31.26 ± 5.92	2410.31 ± 472.09

^aP<0.05 vs VC, VE保护组; ^bP<0.01 vs 正常对照; ^dP<0.01 vs 病理造模组。

应用抑制率为81.06%±10.61%(表2), 体外实验证明VE, VC可对抗自由基生成, 抑制脂质过氧化物MDA产生, 联合应用抑制作用加强。

2.4 VE, VC对CCl₄肝损伤形态改变的影响 光学显微镜下观察正常对照组: 肝小叶内的肝细胞胞质致密、红染, 肝细胞索、肝窦结构清晰; 病理造模组: 肝小叶内的肝细胞胞质广泛疏松淡染, 有较多灶状气球样变性、凝固性坏死及炎性细胞浸润; VC, VE保护组: 肝小叶内的肝细胞仅见轻度疏松化及少量炎性细胞浸润。

3 讨论

CCl₄对肝细胞所致化学性肝损伤, 其毒性主要是通过脂质过氧化作用引起肝损伤^[8]。CCl₄进入机体后由肝微粒体细胞色素P₄₅₀代谢, 生成三氯甲基自由基(·CCl₃)、氯离子自由基(·Cl)攻击肝细胞膜上磷脂分子引起脂质过氧化, 导致脂质过氧化产物MDA升高; 此外, 在·CCl₃起动的过氧化连锁反应中, 尚可产生毒性更强的超氧阴离子(O₂⁻)和氢氧阴离子(OH·)自由基, 自由基与肝微粒体脂质和蛋白质发生共价结合, 损伤肝细胞膜结构与功能的完整性, 从而使胞质内的可溶性酶如ALT, AST等渗入血液中, 引起肝细胞内酶活性降低, 影响物质代谢, 细胞呼吸受影响ATP产生减少, 最后导致肝细胞气球样变^[9], 严重时可引起肝细胞变性坏死。本研究表明, CCl₄所致化学性肝损伤, 通过脂质过氧化作用产生过量的自由基广泛的损伤肝细胞, 导致模型组小鼠MDA, ALT, AST显著升高, 肝小叶内的肝细胞胞质广泛疏松淡染, 有较多的灶状气球样变性、及炎性浸润。VE和VC保护组, 可显著降低(P<0.01)小鼠肝匀浆中MDA的含量和血清中ALT, AST的含量; VE, VC对体外诱导脂质过氧化物MDA产生, 有显著性的抑制作用, 其抑制率分别为73.26%和76.18%, 联合应用抑制率为81.06%; HE染色, 光学显微镜观察肝细胞形态

表 2 VE, VC对体外诱导脂质过氧化物MDA产生的抑制作用(mean ± SD, n = 12)

分组	A ₅₃₂	抑制率(%)
空白对照	0.359 ± 0.056	
氧化对照组	0.697 ± 0.071	
VC组	0.187 ± 0.069	73.26 ± 9.89
VE组	0.166 ± 0.063	76.18 ± 9.03
VC+VE组	0.135 ± 0.074	81.06 ± 10.61

损伤程度明显减轻; 表明VE, VC对化学性肝损伤有预防性保护作用。GSH, SOD虽然是生物体内重要清除自由基的还原当量和酶, 但本研究GSH, SOD各组之间的变化无显著性差异, 说明VC, VE有效的清除CCl₄所致化学性肝损伤产生的自由基, 使细胞内产生的自由基处于较低的水平。而病理模型组SOD则有升高的趋势, 可能是模型组由于急性肝损伤产生较多的自由基, 当还未损伤DNA时则可诱导SOD的合成, 引起SOD代偿性升高。VE作为脂溶性抗氧化剂主要存在于质膜中, 能与不饱和脂肪酸竞争脂质过氧基, 有效的阻断自由基连锁反应, 终止脂质过氧化过程。VC抗氧化作用的机制一方面能有效清除O₂⁻, H₂O₂, OH·, LOO·等自由基^[10], 可中断自由基的连锁反应, 减少自由基对膜的攻击, 从而降低体内脂质过氧化物MDA的含量, 是机体内广谱抗氧化物质。另外VC还能够促进Se的吸收^[10], 而Se是GSH-Px的辅酶; VC还可保持VE的还原状态, 间接性的增加抗氧化作用, VC, VE联合应用有协同效应。

总之, 在小鼠饲料中增加VC, VE能有效的对抗和清除自由基, 终止脂质过氧化过程, 对CCl₄所致化学性肝损伤有预防性保护作用。提示人们在日常生活中注意提高膳食中VC, VE的含量, 对各种氧化应激所致肝损伤有预防性保护作用。

4 参考文献

- 1 杨婧. 某高校新生乙型肝炎病毒感染状况. 中国学校卫生 2004; 25: 624-625
- 2 黄琼, 黄俊明, 陈瑞仪, 赵敏, 杨国光. 大豆、枸杞子、山楂复合提取物对小鼠化学性肝损伤的保护作用. 营养学报 2003; 25: 208-211
- 3 Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 535-543
- 4 Andersen HR, Andersen O. Effects of dietary alpha-tocopherol and beta-carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. *Pharmacol Toxicol* 1993; 73: 192-201
- 5 杨敬华, 徐兆发, 尹忠伟, 于佳明, 孙炜, 李晶. 维生素C和维生素E对汞毒性的拮抗作用. 中国公共卫生 2004; 20: 453-454
- 6 周显青, 李胜利, 王晓辉, 乔欣. 维生素C多聚磷酸脂对小鼠肝质过氧化物和抗氧化酶的影响. 动物学报 2004; 50: 370-374
- 7 汪求真, 马爱国, 孙永叶, 薛美兰, 张秀珍, 梁惠. 大剂量维生素E对大鼠抗氧化和DNA损伤的影响. 营养学报 2005; 27: 467-470
- 8 杨建雄, 原江峰, 李发荣. 柿叶黄酮的体外抗氧化作用研究. 营养学报 2003; 25: 215-217
- 9 Waterfield CJ, Turton JA, Scales MD, Timbrell JA. Reduction of liver taurine in rats by beta-alanine treatment increases carbon tetrachloride toxicity. *Toxicology* 1993; 77: 7-20
- 10 孙永叶, 马爱国, 张秀珍, 韩秀霞. 维生素C缺乏对豚鼠抗氧化能力及红细胞膜流动性的影响. 卫生研究 2005; 34: 329-330

■同行评价

本文采用四氯化碳诱导小鼠形成化学性肝损伤模型, 采用抗氧化剂维生素C和维生素E进行预防性保护, 有一定的临床价值.

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知

本刊讯 为促进国内肝脏移植领域的交流与合作, 为拟开展肝脏移植的同道提供技术支持, 提高我国肝移植的技术水平, 推动肝移植的健康发展, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心将于2007-08-29/09-02与世界华人消化杂志社合作举办“原位肝移植新技术及进展”学习班, 由中山大学器官移植研究所所长陈规划教授主持, 并邀请海内外肝移植知名专家授课, 就目前我国肝移植存在的重点和难点问题以及近几年来肝移植技术的新进展进行学术讲座.

中山大学附属第三医院肝脏移植中心是广东省器官移植研究所和中山大学器官移植研究所挂靠单位, 也是广东省卫生厅重点专科和广东省器官移植学会主任委员单位. 目前, 已开展近1000例肝脏移植术, 术后1 a生存率超过80%, 居国内领先水平. 本中心已举办三期肝脏移植技术学习班, 并协助国内60余家单位开展了肝脏移植术. 本项目为2007年国家级继续医学教育项目, 项目编号为: 2007-04-10-024, 授予 I 类学分14分. 授课内容主要涉及肝脏移植手术技巧、高危受者的麻醉管理、重症感染病人的无肝素化持续血液净化治疗、个体化免疫抑制方案、术后随访管理系统、抗乙型肝炎治疗新策略、西罗莫司及超声造影技术在肝脏移植中的应用等方面. 学习对象为省级、地市级医院的医护人员.

收费标准: 培训费900元/人(统一安排食宿, 费用自理)

通讯地址: 广州市天河路600号, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心 邮编: 510630 联系人: 汪根树 电话: 020-87595523 传真: 020-87595523 E-mail: chengying_827@163.com.

NERD患者埃索美拉唑联合莫沙必利与加强生活方式干预对照研究112例

季代金, 黄茂涛, 余宁, 赵悦, 陈勇

■背景资料

NERD是内镜下无食管黏膜损伤的一种疾病, NERD约占GERD的60%-70%。GERD的发病机制除与抗反流机制下降、反流物攻击增强有关外, 还与神经、社会心理因素、生活方式等具有相关性。与RE相比, NERD患者对各种PPI的治疗反应较差。新近文献报告, 生活方式干预可增加反流性食管炎疗效, 但未见有对NERD进行相关研究的报告。作者对112例NERD患者, 在使用埃索美拉唑联合莫沙必利治疗的基础上, 加强了生活方式干预, 取得较好的临床效果。本病在药物治疗控制症状的基础上, 积极介入生活方式干预, 加强了医患之间的沟通, 能提高患者的依从性, 更好地促使患者按照医嘱治疗, 可更有效地改善NERD患者的临床症状, 值得临床推广应用。

季代金, 黄茂涛, 余宁, 赵悦, 陈勇, 中国人民解放军第452医院消化内科 四川省成都市 610021
通讯作者: 季代金, 610021, 四川省成都市, 中国人民解放军第452医院消化内科. jidaijin@163.com
电话: 028-85399452-97313
收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-03-06

Efficacy of esomeprazole, mosapride and lifestyle enhancement in the treatment of non-erosive gastroesophageal reflux disease: an analysis of 58 cases and comparative study

Dai-Jin Ji, Mao-Tao Huang, Ning Yu, Yue Zhao, Yong Chen

Dai-Jin Ji, Mao-Tao Huang, Ning Yu, Yue Zhao, Yong Chen, Department of Digestive Diseases, the 452nd Hospital of Chinese PLA, Chengdu 610021, Sichuan Province, China.

Correspondence to: Dai-Jin Ji, Department of Digestive Diseases, the 452nd Hospital of Chinese PLA, Chengdu 610021, Sichuan Province, China. jidaijin@163.com
Received: 2007-01-15 Accepted: 2007-03-06

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effects of lifestyle enhancement on patients with non-erosive gastroesophageal reflux disease (NERD) based on the combined treatment of esomeprazole and mosapride.

METHODS: A total of 112 NERD patients were divided into control group ($n = 54$) and test group ($n = 58$). All the patients were given esomeprazole (40 mg, qd) and mosapride (5 mg, tid) for 8 weeks. Besides, the lifestyle in test group was enhanced (adjusting lifestyle, diet, mental status and movement intensity). Chi-square test was conducted to compare the efficacy between the two groups.

RESULTS: In the test group, notable efficacy was found in 42 cases, effectivity in 12 cases, and inefficacy in 4 cases and the total effective rate was 93.10% (54/58). In the control group,

notable efficacy was observed in 26 cases, effectivity in 18 cases, and inefficacy in 10 cases are ineffective, and the total effective rate was 81.84% (44/54). There was significant difference between the two groups ($\chi^2 = 7.39, P < 0.01$).

CONCLUSION: On the basis of treatment by esomeprazole and mosapride, lifestyle enhancement can improve the compliance and clinical symptoms of NERD patients.

Key Words: NERD; Esomeprazole; Mosapride; Lifestyle enhancement

Ji DJ, Huang MT, Yu N, Zhao Y, Chen Y. Efficacy of esomeprazole, mosapride and lifestyle enhancement in the treatment of non-erosive gastroesophageal reflux disease: an analysis of 58 cases and comparative study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1650-1653

摘要

目的: 探讨NERD患者在埃索美拉唑联合莫沙必利治疗的基础上, 介入加强生活方式干预的疗效。

方法: 112例NERD患者分为对照组($n = 54$)和试验组($n = 58$)。所有病例均采用埃索美拉唑(40 mg, qd)联合莫沙必利(5 mg, tid)治疗8 wk, 实验组同时进行加强干预治疗, 如生活方式调整、饮食调整、心理干预及运动调养等。采用 χ^2 检验比较两组疗效。

结果: 实验组58例中显效42例, 有效12例, 无效4例, 总有效率93.10%(54/58); 对照组54例中显效26例, 有效18例, 无效10例, 总有效率81.84%(44/54)。两组比较具有显著的差异性($\chi^2 = 7.39, P < 0.01$)。

结论: 在药物治疗控制症状的基础上, 积极介入生活方式干预, 加强了医患之间的沟通, 能提高患者的依从性, 可更有效地改善NERD患者的临床症状。

关键词: 非糜烂性食管反流病; 埃索美拉唑; 莫沙

必利; 生活方式干预

季代金, 黄茂海, 余宁, 赵悦, 陈勇. NERD患者埃索美拉唑联合莫沙必利与加强生活方式干预对照研究112例. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1650-1653

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1650.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)根据有无内镜下食管黏膜损伤分为非糜烂性胃食管反流病(non-erosive gastroesophageal reflux disease, NERD)和反流性食管炎(reflux esophagitis, RE). NERD是指存在典型的胃食管反流症状, 但无内镜下食管黏膜损伤的一种疾病, NERD约占GERD的60%-70%^[1]. GERD的发病机制除与抗反流机制下降、反流物攻击增强有关外, 还与神经、社会心理因素、生活方式等具有相关性^[2-3]. 已有研究提示^[4-7], 与RE相比, NERD患者对各种质子泵抑制剂PPI的治疗反应较差. 文献报告, 埃索美拉唑和抗焦虑抑郁药物联合治疗GERD优于单药治疗^[8], 生活方式干预可增加反流性食管炎疗效^[8-9], 但未见有对NERD进行相关研究的报告. 作者对112例NERD患者, 在使用埃索美拉唑联合莫沙必利治疗的基础上, 加强了生活方式干预, 取得较好的临床效果, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2004-12/2006-12我院就诊的148例NERD患者为研究对象. 患者均有不同程度的反流相关症状(如烧心、反酸、胸骨后或后背心疼痛、口中酸苦味等). 所有病例均经胃镜检查除外RE(RE诊断标准参照2003年济南会议制定的反流性食管炎诊断和治疗指南^[10]). 将符合上述条件的所有患者按照就诊顺序进行编号, 按照预设计随机分为两组: 实验组73例; 对照组75例. 实验过程中, 由于多种原因部分患者退出(因其他疾病需要中断治疗, 治疗过程中因其他疾病加用其他药物, 治疗过程中患者因事出差, 部分患者治疗4 wk后好转而自行停药等), 故被剔除, 选择坚持完8 wk的112例患者进行总结. 其中普通治疗组(对照组)54例: 男38例, 女16例, 年龄19-68(平均 38.65 ± 9.75)岁; 加强干预治疗组(实验组)58例: 男40例, 女18例, 年龄20-67(平均 39.25 ± 8.35)岁. 两组患者年龄、性别、主要症状等均无明显差异.

1.2 方法 所有患者均给予埃索美拉唑镁肠溶片(耐信片, 阿斯利康)40 mg, qd, 枸橼酸莫沙必利分散片(新络纳片, 大西南)5 mg, tid, 观察疗程均为8 wk. 所有完成实验的患者治疗期间均不再加用其他药物.

1.2.1 生活方式干预方法 对照组除口服的药物、疗程相同外, 给予普通康复指导, 如嘱患者注意休息, 避免刺激性食物, 禁忌吸烟饮酒, 坚持服药等. 干预组在对照组药物治疗的基础上, 介入生活方式干预. 要求患者每周来医院随访1次, 除了解患者的病情、家庭情况外, 还指导患者进行生活方式的调整, 发放健康教育资料. 从第3周起发放病情追踪卡, 了解患者的遵医行为和临床症状改善的情况. 发现问题及时进行针对性的指导和帮助. 具体干预内容参照文献[9]改良: (1)生活方式的调整: 进食后不要立即平卧, 夜晚睡前2 h内最好不再进食, 睡眠时将床头抬高约20-30 cm, 改变不良睡姿; 不要过度弯腰、穿紧身衣裤, 扎腰带不要太紧等; 生活要有规律, 尽可能按时进餐和休息, 保证有充足的睡眠时间及睡眠质量; 肥胖者要求积极锻炼身体, 减轻体质量; 每次烧心、反酸、胸痛等症状发作时, 喝少许温开水, 以冲洗被烧灼过的食管黏膜; 鼓励适当分次多饮水, 每次饮水量不宜超过200 mL; 避免吃过冷、过热、过硬、过咸等食物, 进食宜细嚼慢咽; 尽可能避免使用降低食管括约肌张力、可能诱导反流的药物, 如茶碱、异丙肾上腺素、多巴胺、安定等药物; (2)饮食调养: 宜少量多餐, 避免高脂、过酸、强刺激性的饮食, 避免进食咖啡、巧克力及饮酒、喝浓茶等; 饮食中少用肥肉、奶油及烹调油, 以煮、炖、烩、蒸为主, 少吃油炸食品; 宜吃新鲜蔬菜、瘦肉、蛋、鱼等, 适当进食多种水果(以非酸性水果较好), 以增加多种维生素的摄入, 伴有腹胀的患者少食牛奶、豆制品等易产气食品; (3)心理干预: 建立良好医患关系, 充分了解每位患者病情变化、性格特征、习惯嗜好、生活现状, 甚至家属状况等, 以便采取针对性的指导; 让患者充分了解自己的病情, 扮演合理的角色, 避免角色强化; 根据患者的工作生活状况和习惯嗜好, 指导患者采用音乐疗法、电视疗法、宣泄疗法、放松疗法等保持良好心境, 舒缓紧张、焦虑、抑郁的情绪, 以减轻心理压力, 避免情绪变化使病情反复; 引导家属积极配合参与, 给予患者安慰、关心、支持和鼓励, 为患者营造一个温馨、祥和的家庭氛围. 不要让患者家

■同行评价

本研究体现了当今研究的热点, 对生活方式干预进入结果统计, 较为新颖, 有参考价值.

属认为此病不严重, 没有治疗的必要, 从而淡化治疗; (4)运动调养: 适当参加体育锻炼, 根据患者所处环境及生活条件, 可选择慢跑、散步、健身操、太极拳、游泳等运动, 以增强患者体质; 重视季节变化和气候变化对病情的影响, 注意避免过度受凉、受热。

1.2.2 观察方法 详细询问患者遵医行为和反流相关症状及发生频度, 详细询问患者胃食管反流相关症状, 根据烧心、反酸、胸痛、口中酸苦味症状严重程度及发生频度进行症状记分^[4]。根据症状不同程度积分分别为0、1、2、3、4分, 0分指无症状; 1分症状轻微可以忍受; 2分介于1分、3分之间; 3分症状明显, 不能忍受, 需休息和药物治疗。根据症状发生频度不同记录为0、1、2、3分, 0分指无症状; 1分症状每月发生; 2分症状每周发生; 3分症状每天发生。将各级症状所占的百分比和症状频度分级的积分相乘, 为症状总分。

1.2.3 疗效判定 症状评定标准: (1)显效: 临床症状总分降低80%以上; (2)有效: 临床症状总分降低50%-80%; (3)无效: 临床症状总分降低50%以下。总有效率(%) = [(显效+有效)/实验例数] × 100%。

统计学处理 采用 χ^2 检验(SPSS6.0软件)。

2 结果

干预组58例中, 显效42例, 有效12例, 无效4例, 总有效率93.10%; 对照组54例中, 显效26例, 有效18例, 无效10例, 总有效率81.48%(表1)。干预组的疗效明显优于对照组($P<0.01$)。

3 讨论

在GERD发病机制中, 一过性下食管括约肌松弛(TLESR)、下食管括约肌压力降低(LESP)和食管裂孔疝3个因素起着重要作用^[11], 其中TLESR是目前公认的胃食管反流的主要机制^[5]。食管对胃内反流物清除功能减弱是引起GERD的另一重要因素。50% GERD患者存在胃排空延缓, 胃排空延缓使近端胃扩张, 易诱发TLESR, 导致胃食管反流。下食管括约肌(LES)由交感神经和迷走神经共同支配, 其中迷走神经通路在TLESR引起反流的机制中起重要作用。食管高敏感性在GERD患者中较为普遍^[12-13]。有研究表明^[14], 社会心理因素可以影响一部分GERD患者的症状。非心源性胸痛(NCCP)与焦虑和抑郁有关, 烧心的严重程度与主要生活事件有关, 这一表现可

表 1 两组患者治疗8 wk后症状改善情况比较

分组	n	显效	有效	无效	总有效率(%)
干预组	58	42	12	4	93.10
对照组	54	26	18	10	81.48

$\chi^2 = 7.39, P<0.01$ 。

能与应激诱发的高敏感性相关^[2,5]。因此, 治疗该病的有效措施可能是如何提高LES张力、降低胃酸、减少胃食管反流、促进胃酸排向下消化道。研究提示^[12], 与RE相比, NERD患者的不典型反流症状发生率更高, 反流的强弱并非惟一因素, 重要的是食管防御机制的差别, NERD并不是GERD的病损轻微阶段, 而是一种异质性疾病。所以, 抑制胃酸分泌和消化道促动力剂是治疗GERD有效的方法, 质子泵抑制剂(PPI)已成为治疗该疾病的首选药物^[6-7,13]。但是, 不同的PPI疗效是有差别的, 埃索美拉唑是纯左旋异构体的PPI, 研究报告其疗效优于奥美拉唑等^[6]。尽管如此, 还有部分患者治疗效果不满意。而且在治疗有效的患者中停药后有相当一部分患者症状复发。

NERD发病可能与神经精神因素更相关, 所以如何减轻患者的心理紧张因素, 提高患者的依从性显得非常重要。故本实验在选用有效的PPI+消化道促动力剂治疗的基础上, 给予加强心理干预治疗, 加强了与患者的沟通, 减轻了患者心理因素, 提高了患者的依从性, 从而进一步提高了疗效。本组结果显示, 干预组患者治疗8 wk后, 对改善烧心、反酸、打胸痛和口中酸苦味症状等症状的效果优于对照组($P<0.01$)。提示应用上述有效药物治疗的基础上, 再加强生活方式干预, 对治疗NERD可起到很好的协同作用^[6,7,15]。其主要原因可能是: (1)生活方式调整及饮食调养, 不仅提高了食管下端下段括约肌功能及食管清除酸性能力, 又避免了各种引起腹内压过高状态, 减少胃内容物反流入食管, 减轻胃酸、胃蛋白酶对食管黏膜损伤, 因此可有效地防止反流; (2)NERD属心身疾病, 心理因素对疾病的影响相当重要, 当情绪紧张、焦虑、抑郁时可影响迷走神经和内分泌系统而增加胃酸的分泌和抑制胃功能的运动。因此, 情绪乐观、心胸开阔, 并适当运动调养时, 可促进胃肠蠕动及排空, 也可有效防止反流而利于NERD的康复。

总之, 本病在药物治疗控制症状的基础上,

积极介入生活方式干预, 加强了医患之间的沟通, 能提高患者的依从性, 更好地促使患者按照医嘱治疗, 可更有效地改善NERD患者的临床症状, 值得临床推广应用。

4 参考文献

- 1 张文洁, 杨冬华. 非糜烂性胃食管反流病的研究现状. 中华内科杂志 2004; 43: 69-70
- 2 Chen M, Xiong L, Chen H, Xu A, He L, Hu P. Prevalence, risk factors and impact of gastroesophageal reflux disease symptoms: a population-based study in South China. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 759-767
- 3 汤玉茗, 袁耀宗. 胃食管反流病发病机制若干进展. 国际消化病杂志 2006; 26: 96-98
- 4 Kusano M, Shimoyama Y, Kawamura O, Maeda M, Kuribayashi S, Nagoshi A, Zai H, Moki F, Horikoshi T, Toki M, Sugimoto S, Mori M. Proton pump inhibitors improve Acid-related dyspepsia in gastroesophageal reflux disease patients. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1673-1677
- 5 Tack J. Recent developments in the pathophysiology and therapy of gastroesophageal reflux disease and nonerosive reflux disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 454-460
- 6 Robinson M. Review article: the pharmacodynamics and pharmacokinetics of proton pump inhibitors—overview and clinical implications. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 6: 1-10
- 7 Dean BB, Gano AD Jr, Knight K, Ofman JJ, Fass R. Effectiveness of proton pump inhibitors in nonerosive reflux disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 656-664
- 8 钟英强, 许哲, 郭佳念. 埃索美拉唑和氟哌噻吨美利曲辛治疗伴有抑郁或焦虑的非糜烂性胃食管反流病. 中华消化杂志 2006; 26: 444-447
- 9 陈妙萍, 吴康英. 生活方式干预对反流性食管炎疗效的影响. 广东医学院学报 2005; 23: 463-464
- 10 中华医学会消化内镜学分会. 反流性食管炎诊断和治疗指南(2003年). 中华消化内镜杂志 2004; 21: 221-222
- 11 张珊珊, 王智峰, 刘玉兰. 非糜烂性胃食管反流病发病机制的研究. 中国实用内科杂志 2005; 25: 525-527
- 12 Labenz J, Nocon M, Lind T, Leodolter A, Jaspersen D, Meyer-Sabellek W, Stolte M, Vieth M, Willich SN, Malfertheiner P. Prospective follow-up data from the ProGERD study suggest that GERD is not a categorical disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2457-2462
- 13 Madan K, Ahuja V, Kashyap PC, Sharma MP. Comparison of efficacy of pantoprazole alone versus pantoprazole plus mosapride in therapy of gastroesophageal reflux disease: a randomized trial. *Dis Esophagus* 2004; 17: 274-278
- 14 Chey WD. Endoscopy-negative reflux disease: concepts and clinical practice. *Am J Med* 2004; 117 Suppl 5A: 36S-43S
- 15 Metz DC, Inadomi JM, Howden CW, van Zanten SJ, Bytzer P. On-demand therapy for gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 642-653

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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》2007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人员及科教人员、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。

煤矿工人胃部有关疾病与*H pylori*感染及相关因素的调查

范红敏, 袁聚祥, 张孔来, 徐应军

■背景资料

煤矿工人作为一个特殊的职业人群, 他们的平均文化水平低, 卫生保健知识贫乏, 人群中不良嗜好如吸烟、饮酒等的人数比例较高, 尤其是井下工人工作环境恶劣、持续劳动时间长、饮食不规律, 又有特殊的职业暴露, 造成了该人群特殊的疾病谱。而消化系统疾病多为长期的慢性疾病, 严重威胁着煤矿工人的健康。

范红敏, 张孔来, 中国医学科学院基础医学研究所/中国协和医科大学基础医学院 北京市 100005

袁聚祥, 徐应军, 华北煤炭医学院预防医学系 河北省唐山市 063000

通讯作者: 袁聚祥, 063000, 河北省唐山市建设南路57号, 华北煤炭医学院预防医学系. fhm01@sohu.com

电话: 0315-3725719 传真: 0315-3725312

收稿日期: 2007-01-24 接受日期: 2007-03-06

A cross-sectional study on the relationship among *H pylori* infection, some risk factors and gastroduodenal diseases in coal miners

Hong-Min Fan, Ju-Xiang Yuan, Kong-Lai Zhang, Ying-Jun Xu

Hong-Min Fan, Kong-Lai Zhang, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences; School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Ju-Xiang Yuan, Ying-Jun Xu, Department of Preventive Medicine, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Ju-Xiang Yuan, Department of Preventive Medicine, North China Coal Medical College, 57 Jianshe South Road, Tangshan 063000, Hebei Province, China. fhm01@sohu.com

Received: 2007-01-24 Accepted: 2007-03-06

Abstract

AIM: To search for the risk factors that influences the prevalence rate of gastroduodenal diseases in coal miners, and to seek protection for the health of coal miners.

METHODS: A total of 340 coal miners from three coalmines were chosen by the method of stratified random cluster sampling. Face to face interview was conducted to fill the unified questionnaire. Gastroendoscopy were performed in 306 subjects to detect the situation of gastroduodenal diseases according to Sydney system of diagnosis. At the same time, mucosal biopsies were taken according to the regulated location for *H pylori* culture and pathological examination. Blood samples were obtained to detect the anti-*H pylori* U-IgG by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The prevalence rate of gastroduodenal diseases in coal miners was 77.8% (68.5% in ground coal miners, 80.7% in underground miners). The prevalence rate of gastroduodenal diseases was 85.0% in coal miners with *H pylori* infection, and 58.6% in those without *H pylori* infection; it was 79.5% in coal miners who drank alcohol and 66.7% in those who didn't drink.

CONCLUSION: Alcohol-drinking, career, and *H pylori* infection were risk factors of gastroduodenal diseases, and dust exposure was also a risk factor in underground coal miners.

Key Words: Coal miners; Gastroduodenal disease; *H pylori* infection

Fan HM, Yuan JX, Zhang KL, Xu YJ. A cross-sectional study on the relationship among *H pylori* infection, some risk factors and gastroduodenal diseases in coal miners. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1654-1657

摘要

目的: 了解煤矿工人胃部有关疾病的患病情况, 探讨煤矿工人胃部有关疾病与*H pylori*感染及相关因素关系。

方法: 用分层随机整群抽样方法选取340名煤矿工人进行问卷调查。采用细菌培养法和ELISA法检测*H pylori*感染; 疾病诊断按胃镜及病理学规定标准进行; 资料分析采用 χ^2 检验, Logistic回归分析等。

结果: 煤矿工人胃部有关疾病的患病率为77.8%, 其中井下工人的患病率为80.7%, 井上工人的为68.5%; *H pylori*感染者的胃部有关疾病的患病率为85.0%, 非感染者的患病率为58.6%; 饮酒者胃部有关疾病的患病率为79.5%, 非饮酒者的患病率为66.7%。

结论: 煤矿工人胃部有关疾病发病的危险因素主要是饮酒和*H pylori*感染, 井下工人特有的职业危险因素为粉尘暴露。

关键词: 煤矿工人; 胃部有关疾病; 幽门螺杆菌感染

范红敏, 袁聚祥, 张孔来, 徐应军. 煤矿工人胃部有关疾病与*H pylori*感染及相关因素的调查. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1654-1657
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1654.asp>

0 引言

慢性胃炎、消化道溃疡、胃癌等胃部有关疾病是煤矿工人的常见病、多发病, 其发病率远远高于一般人群, 且发病年龄大多在青壮年时期, 不仅损害患者本人的健康状况, 而且严重影响社会的劳动生产率^[1]. 大量的研究表明, 影响胃部有关疾病发生的因素有吸烟、饮酒、饮食习惯、遗传因素、个人性格、精神状态和*H pylori*感染等. 在特殊的职业人群中, 特殊的职业暴露可能是危险因素之一. 文献报道粉尘等职业暴露可能影响胃部有关疾病的发生^[2]. 消化系统疾病多为长期慢性疾病, 严重威胁着煤矿工人的健康, 也影响到煤炭工业的生产. 因此为了了解煤矿工人胃部有关疾病的患病情况 & 影响因素, 尤其是与*H pylori*感染状况的关系, 以便采取有针对性的预防和控制措施, 我们进行了煤矿工人胃部有关疾病与*H pylori*感染及相关因素的现况调查.

1 材料和方法

1.1 材料 根据我国煤炭工业分布的特点及胃癌发病率的高低, 用典型抽样的方法选择了山东兖州、河北开滦、辽宁铁法下属的3个煤矿, 在每个煤矿内按照分层随机整群抽样方法选取5个不同工种班组的煤矿工人作为本次研究的对象.

1.2 方法 采用《煤矿工人胃幽门螺杆菌感染与相关消化道疾病防治》调查表进行调查. 由同一位胃镜医师使用同一台Olympus P-20型胃镜对调查对象进行检查, 做出胃镜诊断, 之后按规定的取材部位分别采集用于幽门螺杆菌培养和病理诊断的黏膜标本. 调查的同时采集血液标本5 mL用于ELISA法检测抗*H pylori* U-IgG抗体. 细菌培养采用100 mL/L羊血布氏琼脂培养基, 7 d后观察结果并鉴定. 病理诊断由一位病理学教授光镜下观察做病理诊断. 血清学检测(ELISA)采用中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所研制的纯化尿素酶试剂盒做*H pylori* U-IgG抗体的检测, 具体操作方法严格按照使用说明书的规定进行, 其敏感性为98%, 特异性为96%.

统计学处理 全部调查资料经复核后进行整

理分组归类, 采用Excel建库, 用SAS 6.12软件进行单因素 χ^2 分析、分层分析及多因素Logistic回归分析.

2 结果

本次研究对象共340人, 其中306人完成了胃镜、病理检查和*H pylori*培养. 在306例煤矿工人中, 井上工人73例, 井下工人233例. 调查对象的年龄在20-61岁之间, 30-40岁年龄组煤矿工人所占比重较大, 井上、井下工人的年龄构成差别无显著性($P = 0.124$). 调查对象中, 初中文化程度所占比例较大, 井上、井下工人的文化程度构成不同, 差异有显著性 ($P = 0.024$).

2.1 煤矿工人胃部有关疾病患病情况 煤矿工人是一个特殊的职业人群, 由于其特殊的工作条件和工作环境, 有胃部有关疾病症状的人数比例较高. 本次对306例煤矿工人进行了胃镜检查 and 病理学检查, 按国际公认的胃炎和消化性溃疡诊断标准诊断, 煤矿工人的胃部有关疾病的患病率为77.8% (238/306), 其中慢性胃炎的患病率为46.7% (143/306), 消化性溃疡的患病率为3.6% (11/306). 煤矿工人胃部有关疾病以慢性胃炎为主.

2.2 煤矿工人胃部有关疾病与*H pylori*感染及相关影响因素 在本次研究中, 调查了胃部有关疾病的影响因素, 包括个人嗜好、社会经济状况、*H pylori*感染、职业因素、既往病史、现病史、胃病家族史等. 在进行煤矿工人的胃部有关疾病与影响因素之间关系的分析时, 结果表明差异有显著性因素有*H pylori*感染状态、饮酒等.

2.2.1 *H pylori*感染与胃部有关疾病之间的关系 大量文献报道, *H pylori*感染与胃部有关疾病关系密切^[3-4]. *H pylori*感染可增加胃部有关疾病患病的危险性. 在本次研究中, *H pylori*感染按科研诊断标准进行诊断. 将各种胃部有关疾病归为一大类, 在煤矿工人中分析*H pylori*感染与胃部有关疾病之间的关系. *H pylori*感染者的患病率比非感染者高(表1).

考虑到年龄的混杂作用, 对年龄进行调整后观察*H pylori*感染与胃部有关疾病的关系. 调整后, *H pylori*感染者的患病率与非感染者之间差异有显著性. 按*H pylori*感染和非感染两组工人合并的年龄构成进行标化后, *H pylori*感染组的标化患病率为84.7%, 非感染组的标化患病率为58.3%, *H pylori*感染组的患病率仍高于非感染组.

■研究前沿

慢性胃炎、消化道溃疡、胃癌等胃部有关疾病是煤矿工人的常见病、多发病, 其发病率远远高于一般人群, 且发病年龄大多在青壮年时期, 严重影响煤矿工人的身心健康. 在特殊的职业人群中, 胃部有关疾病与特殊的职业暴露及*H pylori*感染的关系是目前流行病研究的热点之一.

■相关报道

国内外研究结果表明, 长期大量饮酒者胃炎和消化性溃疡的患病率上升, 患萎缩性胃炎的危险性增加. 粉尘暴露可能是危险因素之一, 如果同时暴露于粉尘和*H pylori*感染, 则患病的危险性明显增加. 还有噪声也会影响胃酸的分泌, 进而影响胃部有关疾病的发生. *H pylori*感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌密切相关. 本次调查结果表明饮酒、职业暴露和*H pylori*感染均是煤矿工人胃部有关疾病的危险因素, 与国内外研究报道一致.

■创新盘点

目前针对煤矿工人胃部有关疾病的影响因素,尤其是与 $H. pylori$ 感染关系及防制措施的研究,国内外研究报道较少.为了了解煤矿工人慢性胃炎或消化性溃疡的患病率及其 $H. pylori$ 感染状态,探讨危险因素,以便采取有针对性的防制措施,本课题组进行了此项研究.

表 1 煤矿工人胃部有关疾病的影响因素

因素		胃部有关疾病		合计	患病率(%)	χ^2	P
		有	无				
$H. pylori$ 感染	阳性	200	43	243	82.3	15.0	0.001
	阴性	38	25	63	60.3		
	合计	238	68	306	77.8		
饮酒	饮	210	51	264	79.5	3.48	0.062
	不饮	28	14	42	67.7		
	合计	238	68	306	77.8		
职业	井上工人	50	23	73	68.5	4.78	0.029
	井下工人	188	45	233	80.7		
	合计	238	68	306	77.8		

2.2.2 饮酒与胃部有关疾病之间的关系 煤矿工人有饮酒嗜好,饮酒也是造成其胃部有关疾病患病率较高的原因之一.对饮酒与胃部有关疾病之间的关系进行分析,饮酒者胃部有关疾病患病率高于不饮酒者,但差异无显著性(表1).按年龄分层后观察饮酒对胃部有关疾病的作用,饮酒者的患病率与不饮酒者之间差异有显著性.按饮酒和非饮酒两组工人合并的年龄构成进行标化后,饮酒组的标化患病率为78.3%,非饮酒组的标化率为65.3%,饮酒组的患病率仍比不饮酒组高.

2.2.3 职业与胃部有关疾病之间的关系 煤矿工人包括井下工人和井上工人.井下工人和井上工人的工作环境和条件明显不同.职业别煤矿工人胃部有关疾病的患病情况(表1).井下工人的胃部有关疾病的患病率(80.7%)高于井上工人的(68.5%).

为了控制年龄的混杂作用,按年龄分层分析职业与上消化道疾病之间的联系,井下工人的上消化道疾病患病率仍比井上工人高.按井下和井上两组工人合并的年龄构成进行标化后,井上工人的标化患病率为68.6%,井下工人的标化率为80.4%,井下工人的患病率仍高于井上工人,两者差别有显著性($P=0.045$).

2.2.4 井下职业因素与胃部有关疾病之间的关系 井下工人有着其特殊的工作环境和条件.本次研究除了调查了井上工人和井下工人共同的暴露因素外,还对井下工人可能的职业危险因素如井下工种、井下工作年限、井下工作环境、潮湿原因、环境温度等进行了调查.结果表明只有井下工种与胃部有关疾病之间有联系,未发现其他职业因素的危险作用.井下工种包括采煤、掘进、运输和机电等.根据工种特征,

表 2 井下工种与胃部有关疾病之间的关系

井下工种	胃部有关疾病		合计	患病率(%)
	有	无		
慢采煤或掘进	145	25	170	85.3
其他	43	20	63	68.3
合计	188	45	233	80.7

$$\chi^2 = 8.56, P = 0.003.$$

将采煤或掘进归为一类,其他工种归为一类,分析井下工种与胃部有关疾病之间的关系(表2).结果表明采煤或掘进工种工人的胃部有关疾病的患病率高于其他工种.

2.3 煤矿工人胃部有关疾病影响因素的Logistic逐步回归分析 煤矿工人胃部有关疾病的发生、发展受多种因素的影响.为了控制混杂因素,在单因素 χ^2 分析的基础上,又进行了多因素的Logistic逐步回归分析,结果表明影响煤矿工人胃部有关疾病发病的因素有年龄、饮酒、井下工种、家族史(表3).

3 讨论

本次调查研究采用国内外公认的各种诊断标准,其中胃镜检查难度大,由于采取了一系列措施,使受检率达90%,从而保证了研究资料的真实性和可靠性.本次研究将胃镜诊断和病理诊断作为疾病诊断的依据,保证了诊断结果的可靠性.

煤矿工人作为一个特殊的职业人群,他们的平均文化水平低,卫生保健知识贫乏,人群中不良嗜好如吸烟、饮酒等的人数比例较高,尤其是井下工人工作环境恶劣、持续劳动时间长、饮食不规律,又有特殊的职业暴露,造成了该人群特殊的疾病谱^[1].而消化系统疾病多为长

■应用要点

本次研究表明煤矿工人的患病率明显比一般人群高.将煤矿工人尤其是井下工人作为该病的高危人群采取必要的防制措施,可产生巨大的经济效益和社会效益.

表 3 煤矿工人胃部有关疾病影响因素的Logistic逐步回归分析结果

因素	ν	β	SE(β)	χ^2	<i>P</i>	OR	95%CI
INTERCPT	1	5.2223	1.1025	22.4352	0.0001		
年龄	1	1.1158	0.5384	4.2955	0.0382	3.05	1.06–8.76
饮酒	1	1.3865	0.4571	9.1987	0.0024	4.00	1.63–9.80
职业	1	1.7907	0.4716	14.4186	0.0001	5.99	2.38–15.11
井下工种	1	2.2527	0.4865	21.4381	0.0001	9.51	3.67–24.69

■同行评价

本文属于流行病学调查, 证明煤矿工人胃部疾病与*H pylori*感染有关, 有流行病学价值。

期的慢性疾病, 严重威胁着煤矿工人的健康。本次研究结果表明煤矿工人胃部有关疾病患病率为77.8%, 其中以慢性胃炎和消化性溃疡为主, 患病率分别为53.2%和3.6%, 均比一般人群高。一般人群胃部有关疾病的患病率分别为38%和2.5%。本次研究结果亦表明, 井下工人的胃部有关疾病患病率为80.7%, 比井上工人的患病率高。

一般人群中, 影响胃部有关疾病患病的因素较多, 如吸烟、饮酒、饮食不规律、*H pylori*感染等。在特殊的职业人群中, 特殊的职业暴露也可能是原因之一。姚沛 *et al*^[2]调查某单位男性职工胃部有关疾病患病情况时发现, 长期大量饮酒者胃炎和消化性溃疡的患病率为12.86%, 显著高于长期少量饮酒者的患病率。国外也有研究报道重度饮酒增加患萎缩性胃炎的危险性。本次调查结果表明饮酒、职业暴露和*H pylori*感染均是煤矿工人胃部有关疾病的危险因素, 与国内外研究报道一致。

粉尘暴露可能是危险因素之一, 这可能与煤矿工人将肺和呼吸道清除的可吸入粉尘吞咽至消化道有关^[3]。如果同时暴露于粉尘和*H pylori*感染, 则患病的危险性明显增加^[4]。还有噪声也会影响胃酸的分泌, 进而影响胃部有关疾病的发生^[5]。本次研究结果表明井下工人的胃部有关疾病的患病率高于井上工人。这除了与井上、井下工人的饮酒状态不同有关外, 还与其特殊的职业暴露有关。井下工人中从事采煤或掘进工作者胃部疾病患病率高于其他工种, 差异有显著性。煤矿工人职业暴露与胃部有关疾病的关系还有待进一步研究确证。

*H pylori*是一种定植在胃黏膜组织上皮细胞内的微需氧革兰氏阴性杆菌。自从1983年澳大利亚学者Warren对*H pylori*进行了报道后, 各

国学者对*H pylori*感染进行了广泛深入的研究^[6]。研究结果表明, *H pylori*感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌密切相关^[7-9]。本次研究结果亦表明煤矿工人胃部有关疾病的发生与*H pylori*感染有关。

针对煤矿工人胃部有关疾病发病的危险因素采取健康教育、加强防尘、服用免疫制剂等措施降低煤矿工人胃部有关疾病的患病率, 保护煤矿工人的身体健康。

4 参考文献

- 1 Swaen GM, Meijers JM, Slangen JJ. Risk of gastric cancer in pneumoconiotic coal miners and the effect of respiratory impairment. *Occup Environ Med* 1995; 52: 606-610
- 2 姚沛, 张冠卿, 赵桂芬, 郭德民. 饮酒与消化性溃疡和胃炎的关系. *华人消化杂志* 1998; 6: 191
- 3 Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut* 1997; 40: 701-703
- 4 Ekstrom AM, Eriksson M, Hansson LE, Lindgren A, Signorello LB, Nyren O, Hardell L. Occupational exposures and risk of gastric cancer in a population-based case-control study. *Cancer Res* 1999; 59: 5932-5937
- 5 Tomei F, Papaleo B, Baccolo TP, Persechino B, Spano G, Rosati MV. Noise and gastric secretion. *Am J Ind Med* 1994; 26: 367-372
- 6 Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1: 1273-1275
- 7 Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 1-241
- 8 Hellstrom PM. This year's Nobel Prize to gastroenterology: Robin Warren and Barry Marshall awarded for their discovery of *Helicobacter pylori* as pathogen in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3126-3127
- 9 Magalhaes Queiroz DM, Luzzza F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2006; 11 Suppl 1: 1-5

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

原发性胃淋巴瘤内镜下表现及误诊分析

严瑾, 欧阳钦, 黄丽彬, 杨锦林

■背景资料

原发性胃淋巴瘤是一种令消化科医生和肿瘤科医生都很感兴趣的疾病, 该病所表现出来的有一些有别于其他恶性肿瘤的特质, 引发了人们对他的研究热潮。他在胃内表现形态多样, 病理分型复杂, 预后差异很大, 部分低度恶性的淋巴瘤与幽门螺旋杆菌密切相关, 根除幽门螺旋杆菌可获得60%-80%的完全缓解率, 开创了抗生素治疗肿瘤的新纪元。但由于该病病理形态复杂, 长期以来没有统一的病理诊断标准, 制约了临床医生对该病的进一步认识, 以至于漏诊及误诊率均很高。本文从该病的胃镜表现方面进行探讨, 同时对误诊病例的胃镜表现, 以期提高临床内镜医生对该病的鉴别能力, 提高术前确诊率, 使胃淋巴瘤患者的“保胃治疗”方案得以实现。

严瑾, 欧阳钦, 黄丽彬, 杨锦林, 四川大学华西医院消化内科
四川省成都市 610041

通讯作者: 严瑾, 610041, 四川成都国学巷37号, 四川大学华西医院消化内科. yanwj@hotmai.com
电话: 028-85422389

收稿日期: 2007-01-22 接受日期: 2007-02-13

Endoscopic patterns and misdiagnosis of primary gastric lymphoma

Jin Yan, Qin Ou-Yang, Li-Bin Huang, Jin-Lin Yang

Jin Yan, Qin Ou-Yang, Li-Bin Huang, Jin-Lin Yang, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Jin Yan, Department of Gastroenterology, West China hospital of Sichuan University, 37 Guoxue Alley, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. yanwj@hotmai.com

Received: 2007-01-22 Accepted: 2007-02-13

Abstract

AIM: To improve the diagnosis level of primary gastric lymphoma by observing the endoscopic patterns and analyzing the reasons of misdiagnosis.

METHODS: A total of 51 primary gastric lymphoma diagnosed by endoscopic biopsy and 27 pseudo-diagnosed "lymphoma" by endoscopy were included in this study. The endoscopic patterns of the two groups were compared and analyzed with Mann-Whitney U rank-sum test.

RESULTS: Primary gastric lymphomas were mainly ulcer type (33/51, 65%) and nodule type (12/51, 23.5%). The 27 suspected gastric lymphomas were mainly nodule type (13/27, 48%) and bulky mucosa type (10/27, 37%). There was significant difference between two groups in endoscopic patterns ($P < 0.001$). However, there was no significance in movements and texture ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Endoscopic patterns of primary gastric lymphoma present polytypism. It is important for the avoidance of misdiagnosis to acquaint its endoscopic presentation and combine

with deep and multi-spot biopsy.

Key Words: Primary gastric lymphoma; Endoscopic patterns; Misdiagnosis

Yan J, Ou-Yang Q, Huang LB, Yang JL. Endoscopic patterns and misdiagnosis of primary gastric lymphoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(14):1658-1661

摘要

目的: 对内镜下原发性胃淋巴瘤的形态进行分析, 以期提高内镜对胃淋巴瘤的诊断率。

方法: 收集近两年我院通过胃镜活检确诊的原发性胃淋巴瘤51例及内镜拟诊的“胃淋巴瘤”27例, 比较其内镜特点, 并采用Mann-Whitney U秩和检验进行比较。

结果: 51例确诊的原发性胃淋巴瘤以溃疡型33例(65%)和结节型12(23.5%)为主。27例拟诊组患者以结节型13例(48%)和黏膜粗大型10例(37%)为主, 内镜下病变形态有显著性差异($P < 0.001$)。而在病变的蠕动性及活检质地方面没有显著性差异($P > 0.05$)。

结论: 原发性胃淋巴瘤的内镜下形态具有多型性, 提高对其内镜下表现的认识并结合多取及深取活检对原发性胃淋巴瘤的术前确诊具有重要的意义。

关键词: 原发性胃淋巴瘤; 内镜表现; 误诊

严瑾, 欧阳钦, 黄丽彬, 杨锦林. 原发性胃淋巴瘤内镜下表现及误诊分析. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1658-1661
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1658.asp>

0 引言

在胃的恶性肿瘤中, 除了最常见的胃癌以外, 排在第2位的应该算胃淋巴瘤。据统计, 原发性胃淋巴瘤占胃恶性肿瘤的比例可达2%-8%左右^[1-2], 近年来随着诊断水平的提高以及对该疾病认识的深入, 确诊为原发性胃淋巴瘤的例数还有明显增加的趋势^[3]。但由于胃淋巴瘤的内镜下表现

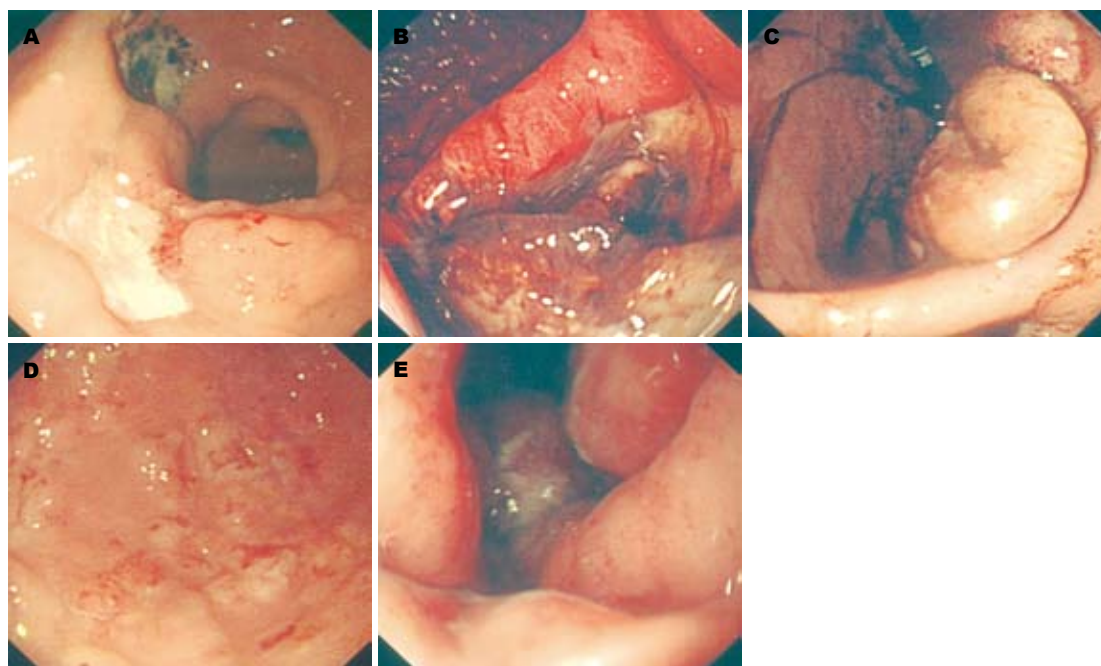


图 1 胃淋巴瘤的内镜下形态分型. A-B: 溃疡型; C: 肿块型; D: 小结节或息肉型; E: 黏膜粗大型.

同行评价

本文作者通过回顾性总结已经确诊胃淋巴瘤的病例, 并从胃镜初诊疑似胃淋巴瘤病例追踪分析结果, 论述角度具有一定新意, 为探索淋巴瘤内镜学诊断提供了新的分析思路.

形态多样且不典型, 恶性淋巴细胞浸润程度较深, 活检也有一定难度, 因此术前误诊率较高. 国外有文章曾报道45例胃淋巴瘤患者, 有37例是通过手术后确诊, 只有8例患者在术前通过胃镜活检确诊^[4]. 由于近年来人们逐渐认识到该病预后比胃癌好, 不仅对放化疗敏感, 而且其中的MALT淋巴瘤采用单纯的抗幽门螺旋杆菌治疗也能获得60%-80%的完全缓解率. 因此对于无穿孔、梗阻等并发症的胃淋巴瘤患者目前多主张采用“保胃治疗”^[5-9]. 胃镜检查+活检是术前确诊胃淋巴瘤最重要的检查方法.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-10/2006-09我院内镜中心的62 000例次胃镜检查中, 通过活检共明确诊断胃淋巴瘤51例. 同时有27例患者胃镜拟诊为“胃淋巴瘤”.

1.2 方法 我们将电脑库中的内镜图片及描述资料提出进行回顾性分析, 总结该病的内镜下特点; 同时62 000例次胃镜检查中, 有42份内镜诊断拟诊胃淋巴瘤, 除去其中15例是既往已确诊为胃淋巴瘤来进行复查的以外, 有27例是内镜医生通过内镜下病变的形态而高度怀疑胃淋巴瘤的, 追踪其最终的病理结果, 统计内镜与病理诊断的符合率并分析误诊的原因.

统计学处理 统计各项指标的比例. 采用SPSS12.0软件包对确诊胃淋巴瘤组与疑诊胃淋巴瘤组胃镜特点的比较采用Mann-Whitney U秩和检验.

2 结果

2.1 病理确诊的胃淋巴瘤的特点 51例胃淋巴瘤的病理分型(按2001年WHO诊断标准^[10]): MALT淋巴瘤9例, Burkitt淋巴瘤1例, 淋巴瘤母细胞淋巴瘤1例, T细胞淋巴瘤1例, 弥漫性大B细胞淋巴瘤39例.

2.1.1 病变形态 胃镜下胃淋巴瘤的形态具有多样性. 根据朱正贤 *et al*^[11]的研究, 将胃淋巴瘤的内镜下形态以其主要表现类型大致分为以下4类: (1)溃疡型(图1A-B): 溃疡型占了胃淋巴瘤的绝大多数共33例(65%), 特别是有29例为巨大溃疡型(直径超过2 cm), (2)粗大型(图1C): 肿块型5例(10%), 均为巨大肿块, 3例为单发, 2例为多发; (3)小结节或息肉型12例(图1D), 占23.3%, 为累及多个部位的形态不一大小不均的多发结节或息肉样改变; (4)黏膜粗大型1例(2%)(图1E), 为胃黏膜广泛肿胀狭窄, 表面糜烂.

2.1.2 质地、蠕动性和病变部位 有49份内镜报告中提及活检质地, 其中质地硬20例(41%), 质地韧11例(22%), 质地脆10例(20%), 质地软8例(16%). 有两份报告提到活检时病变有软有硬, 具有多形性的特点. 有19份内镜报告描述了病变的蠕动性, 除了2例描述蠕动尚可以以外, 其余17例均描述蠕动差、消失或胃腔狭窄. 26例为单一病变(多为巨大溃疡型), 其余25例为多发病变(结节型或多个溃疡型), 病变累及胃腔的多个解剖部位. 胃体为胃淋巴瘤最常累及的部位, 有

表 1 淋巴瘤确诊组与疑诊组内镜表现对比表

分组	形态(n)				蠕动性			活检质地				
	溃疡型	肿块型	小结节型	黏膜肿胀型	好	差	未描述	硬	韧	脆	软	未描述
确诊组(51例)												
MALT淋巴瘤	4	0	4	1	1	6	2					
非MALT淋巴瘤	29	5	8	0	1	11	30					
总计	33	5	12	1	2	17	32	20	11	10	8	2
疑诊组(27例)	3	1	13	10	2	14	11	4	7	7	5	4

34例(67%)病变累及了胃体, 比较常见的部位为胃底体交界或胃窦体交界部位. 有8例在检查中发现有活动性出血.

2.1.3 胃镜初步诊断的结论 回顾性分析这51例最后经病理活检证实为胃淋巴瘤的病例, 其胃镜初步诊断仅有3例考虑为淋巴瘤; 有27例(53%)初步诊断提出“胃新生物性质待定”, 对该疾病的恶性倾向做出了明确的判断; 其余21例初步诊断为结节(或溃疡)性质待定, 没有明确判断疾病的良恶性.

2.2 内镜疑诊的胃淋巴瘤的特点

2.2.1 病变形态 其余24例显示: 腺癌18例, 慢性炎症6例. 回顾这27例的内镜表现: 溃疡型3例(11.1%); 肿块型1例(3.7%); 结节型13例(48%); 黏膜粗大型10例(37%).

2.2.2 质地和蠕动性 有23份报告提及病变质地, 其中软5例(21.7%); 韧7例(30%); 硬4例(17.4%); 脆7例(30.4%). 有16份报告提及蠕动性, 其中蠕动好仅2例; 蠕动差14例.

2.2.3 两组特点比较 从形态、质地、蠕动性这3个方面对两组进行比较发现(表1), 两组病变的形态差异有显著性($P<0.001$), 确诊淋巴瘤组以溃疡型和小结节型为主, 而疑诊组以大结节及黏膜粗大型为主. 其余两项指标——质地和蠕动性在两组间差异没有显著性, P 分别为0.188和0.698. 其中MALT淋巴瘤组和疑诊组比较, 病变形态之间也有显著性差异($P<0.05$, 图2).

2.2.4 我院2004-10/2006-9通过外科手术和胃镜活检共确诊胃淋巴瘤58例, 其中胃镜+活检确诊51例, 术前确诊率达到了88%.

3 讨论

所谓原发性胃淋巴瘤是指原发于胃内, 而符合以下条件的淋巴瘤: (1)体表淋巴结无病变; (2)血液白细胞计数正常; (3)纵隔淋巴结无病变; (4)诊断时胃及其所属淋巴结以外的部位无肉

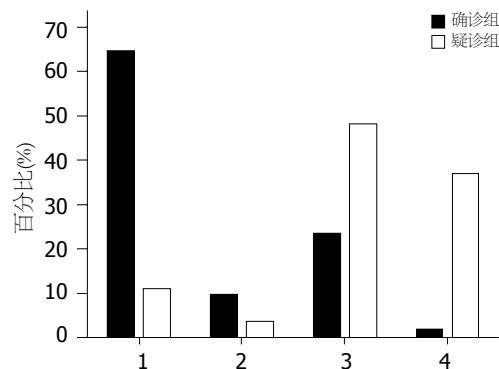


图 2 确诊组与疑诊组内镜下大体形态比较. 1: 溃疡型; 2: 肿块型; 3: 结节型; 4: 黏膜粗大型.

眼可见病变; (5)肝脾正常. 在研究过程中我们发现, 我们对原发性胃淋巴瘤内镜下表现的认识与实际情况有着较大的出入: 一方面后来经病理活检确诊的淋巴瘤, 在其初次内镜检查时没能做出淋巴瘤的判断, 其次内镜疑诊的胃淋巴瘤最后经病理确诊却多半并不符合淋巴瘤的诊断, 而以低分化胃癌为主. 从既往的文献中我们得到的经验是: 有两种镜下形态对胃淋巴瘤的诊断具有特征性意义^[11]: 其一是广泛的多发的结节样、铺路石样或小息肉样病变, 伴胃壁僵硬, 动度减小; 其二是粗大的黏膜皱襞、僵直、表面糜烂, 不能为充气所展平. 文献中还特别指出第1种类型对淋巴瘤具有特别的意义, 因在胃癌中未能发现此种改变, 因此具有鉴别意义^[12-14]. 在我们所统计的内镜疑诊病例中, 绝大多数镜下形态都是这两种类型(85%), 说明我们的内镜医生对胃淋巴瘤形态的表现是遵照上述文献来进行判断的. 但遗憾的是通过追踪病理结果, 除了3例符合淋巴瘤的诊断以外, 其余24例中18例(75%)是腺癌, 尤其是10例低分化腺癌在内镜下也常呈现出与淋巴瘤类似的多型性、结节样改变的特点, 同时低分化腺癌也和淋巴瘤一样具有黏膜下浸润的生长方式, 因此也常出现黏膜粗大肿胀的形态. 从我们的研究发现,

以上两种病变形态似乎并不具有特征性, 而且因为在我国, 胃癌发病率明显高于胃淋巴瘤, 在病变形态表现为以上两种类型时内镜疑诊淋巴瘤应更慎重。

确诊的51例淋巴瘤的内镜下表现以溃疡型占绝大多数, 而这种类型也是很难与胃癌相鉴别的。经过仔细分析图片, 我们发现某些淋巴瘤的溃疡周边较多见不规则结节, 且活检质地以硬为主(占41%), 甚至有些取材时感觉像石头一样坚硬, 有些仔细的内镜医生甚至描述在多个不同的病变部位取材时感觉质地有明显差异。以巨大溃疡为表现形式的多为进展较快, 恶性程度较高的淋巴瘤, 而MALT淋巴瘤以溃疡型和结节型各占一半, 且其溃疡型多为多发、散在、不规则、结节基础上出现的较浅的溃疡, 与文献报道的结果较吻合^[15]。最近同济医科大学Hu *et al*^[16]报道了31例胃MALT淋巴瘤的临床和内镜研究结果, 他也指出当内镜下胃淋巴瘤表现为深大溃疡的时候, 很难与胃癌相鉴别, 内镜初次正确诊断的阳性率只有29%。国外文献报道内镜初次疑诊胃淋巴瘤的阳性率只达到27%。但对于该病变的恶性倾向可达到60%左右的正确判断率^[1], 与我们报道的53%差别不大。尽管如此, 内镜检查仍是确诊胃淋巴瘤的重要检查方法。通过提高内镜医生对淋巴瘤病变的认识, 必要时辅以超声内镜的扫描^[17], 通过多取深取活检, 再结合病理科的形态学表现及免疫组化的方法, 胃淋巴瘤的术前确诊率是可以进一步提高的。

4 参考文献

- 1 Kelesis NG, Vassilopoulos PP, Tsamakidis KG, Bai MG, Avital S, Rosenthal RJ. Is gastroscopy still a valid diagnostic tool in detecting gastric MALT lymphomas? A dilemma beyond the eye. *Mucosa-associated lymphoid tissue. Surg Endosc* 2003; 17: 469-474
- 2 Ferrucci PF, Zucca E. Primary gastric lymphoma pathogenesis and treatment: what has changed over the past 10 years? *Br J Haematol* 2007; 136: 521-538
- 3 Hjermsstad MJ, Hollender A, Warloe T, Karlsen KO, Ikonomo I, Kvaloy S, Nome O, Holte H. Quality of life after total or partial gastrectomy for primary gastric lymphoma. *Acta Oncol* 2006; 45: 202-209
- 4 Butkeviciene L, Dubinskiene L, Verbiene I. Diagnosis of malignant lymphoma of the stomach. *Medicina (Kaunas)* 2002; 38: 172-175
- 5 Curcio A, Bertelli R, Gentilini P, Ronconi S, Saragoni L, Vagliasindi A, Mura G, Mazza P, Framarini M, Verdecchia GM. Multimodal treatment of gastric MALT lymphoma: our experience. *Suppl Tumori* 2005; 4: S77-78
- 6 Ferrucci PF, Zucca E. Primary gastric lymphoma pathogenesis and treatment: what has changed over the past 10 years? *Br J Haematol* 2007; 136: 521-538
- 7 Hjermsstad MJ, Hollender A, Warloe T, Karlsen KO, Ikonomo I, Kvaloy S, Nome O, Holte H. Quality of life after total or partial gastrectomy for primary gastric lymphoma. *Acta Oncol* 2006; 45: 202-209
- 8 Rodriguez-Sanjuan JC, Garcia RA, Trugeda S, de la Torre F, Llorca J, Gomez-Fleitas M. Do current indications for surgery of primary gastric lymphoma exist? *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 180-188
- 9 Jezersek Novakovic B, Vovk M, Juznic Setina T. A single-center study of treatment outcomes and survival in patients with primary gastric lymphomas between 1990 and 2003. *Ann Hematol* 2006; 85: 849-856
- 10 Chan JK. The new World Health Organization classification of lymphomas: the past, the present and the future. *Hematol Oncol* 2001; 19: 129-150
- 11 朱正贤, 陈德珍, 李蜀华. 纤维胃镜对诊断原发性胃淋巴瘤的价值. *华西医讯* 1989; 4: 173-176
- 12 Fork FT, Haglund U, Hogstrom H, Wehlin L. Primary gastric lymphoma versus gastric cancer. An endoscopic and radiographic study of differential diagnostic possibilities. *Endoscopy* 1985; 17: 5-7
- 13 Taal BG, den Hartog Jager FC, Tytgat GN. The endoscopic spectrum of primary non-Hodgkin's lymphoma of the stomach. *Endoscopy* 1987; 19: 190-192
- 14 Aoun JP, Moukarbel N, Khoury S. Endoscopic patterns of primary gastric MALT lymphoma. *J Med Liban* 1998; 46: 131-135
- 15 Andriani A, Zullo A, Di Raimondo F, Patti C, Tedeschi L, Recine U, Caruso L, Bonanno G, Chiarenza A, Lizzani G, Miedico A, Romanelli A, Costa A, Linea C, Marrone C, Mirto S, Mistretta A, Montalbano L, Restivo G, Vinci M, Bibas M, Hassan C, Stella F, Cottone M, Morini S. Clinical and endoscopic presentation of primary gastric lymphoma: a multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 721-726
- 16 Hu C, Yi C, Dai X. Clinical study of 31 patients with primary gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 722-726
- 17 Hoepffner N, Lahme T, Gilly J, Menzel J, Koch P, Foerster EC. Value of endosonography in diagnostic staging of primary gastric lymphoma (MALT type). *Med Klin (Munich)* 2003; 98: 313-317

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

事件相关电位P₃₀₀和简易智能精神状态检查在轻微型肝性脑病检测中的价值

许统俭, 陈剑群, 董瑞国, 李 昕, 耿德勤

■背景资料

MHE是慢性肝病
患者临床上无脑
病症状, 常规精神
和神经功能检查
正常, 仅能用精细
的智力测验和/或
神经电生理检测
才能发现的肝性
脑病。此类患者虽
看似正常, 但操作
能力和应急能力
均降低, 使从事高
空、机械、驾驶
等工种的患者易
发生意外, 因而对
轻微型肝性脑的
研究具有重大意
义。但国内对此研
究报道较少。

许统俭, 陈剑群, 董瑞国, 李昕, 耿德勤, 徐州医学院附属医院消化科 江苏省徐州市 221006

通讯作者: 许统俭, 221006, 江苏省徐州市淮海西路99号, 徐州医学院附属医院消化科. xzxtj@sina.com

电话: 0516-85802493

收稿日期: 2006-12-11 接受日期: 2007-01-10

Value of event-related potential P₃₀₀ and mini-mental state examination in the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy

Tong-Jian Xu, Jian-Qun Chen, Rui-Guo Dong, Xin Li, De-Qin Geng

Tong-Jian Xu, Jian-Qun Chen, Rui-Guo Dong, Xin Li, De-Qin Geng, Department of Digestology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Tong-Jian Xu, Department of Digestology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, Jiangsu Province, China. xzxtj@sina.com

Received: 2006-12-11 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To estimate the value of event related potential (ERP) P₃₀₀ and mini-mental state examination (MMSE) in the detection of minimal hepatic encephalopathy (MHE).

METHODS: ERP P₃₀₀ and somatosensory evoked potential (SEP) were examined, and MMSE were performed in 30 posthepatic cirrhosis patients, and the occurrence of hepatic encephalopathy (HE) was observed 1 year after examination.

RESULTS: Abnormal ERP P₃₀₀ occurred in 21 patients (70.0%), while abnormal SEP occurred in 11 (36.7%). MMSE scores less than 27 were found in 13 (43.3%) cases, and both or either abnormality of ERP P₃₀₀ and MMSE were observed in 22 (73.3%). Ten cases (33.3%) were found with abnormality of both ERP P₃₀₀ and MMSE. After 1 year, of the 17 patients with abnormality of ERP P₃₀₀ and/or MMSE, 12 cases developed clinical hepatic encephalopathy, while of the 6 patients

without abnormal ERP P₃₀₀ and MMSE, only 1 case developed clinical hepatic encephalopathy. There was significant difference between them (70.6% vs 16.7%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: ERP P₃₀₀ and MMSE were sensitive and reliable to evaluate the occurrence of MHE in liver cirrhosis.

Key Words: Liver cirrhosis; Event related potential P₃₀₀; MMSE; Minimal hepatic encephalopathy

Xu TJ, Chen JQ, Dong RG, Li X, Geng DQ. Value of event related potential P₃₀₀ and mini-mental state examination in the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1662-1664

摘要

目的: 评价事件相关电位P₃₀₀和智能精神状态检查(MMSE)诊断轻微型肝性脑病(MHE)的价值。

方法: 30例肝炎后肝硬化患者进行事件相关电位P₃₀₀和脑诱发电位检查及MMSE检测, 并观察1 a后临床肝性脑病(HE)的出现情况。

结果: 事件相关电位P₃₀₀异常21例(70.0%), 体感诱发电位(SEP)异常11例(36.7%), MMSE得分<27(提示有认知功能障碍)13例(43.3%), 事件相关电位P₃₀₀和/或MMSE异常22例(73.3%), 两者均异常10例(33.3%), 追踪观察1 a的23位患者中, 17例事件相关电位P₃₀₀和/或MMSE异常患者出现临床肝性脑病12例, 两者均无异常的6例患者中, 出现临床肝性脑病1例, 两者比较有显著性差异(70.6% vs 16.7%, $P < 0.05$)。

结论: 事件相关电位P₃₀₀和MMSE可作为判断肝硬化失代偿期是否发生轻微型肝性脑病的一种敏感又可靠的方法。

关键词: 肝硬化; 事件相关电位P₃₀₀; 智能精神状态检查; 肝性脑病

许统俭, 陈剑群, 董瑞国, 李昕, 耿德勤. 事件相关电位P₃₀₀和简易智能精神状态检查在轻微型肝性脑病检测中的价值. *世界华人消化杂志* 2007;15(14):1662-1664
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1662.asp>

0 引言

轻微型肝性脑病(minimal hepatic encephalopathy, MHE)是指慢性肝病病人无明显肝性脑病临床表现和血生化检测异常, 仅能通过精细的智能精神状态检查和/或电生理检测才能诊断的肝性脑病^[1]. 此概念自1978年由Rikker *et al*提出后愈来愈受到医学界的重视. 此类患者虽看似正常, 但操作能力和应急能力均降低, 使从事高空、机械、驾驶等工种的患者易发生意外, 因而对轻微型肝性脑病的研究具有重大意义^[2]. 但国内对此研究报道较少. 听觉事件相关电位(ERP)之P₃₀₀是诱发电位的晚成分, 为最敏感的诱发电位^[3], 与注意、认识、判断及思维等高级神经活动相关, 可作为高级神经活动功能评价的客观检测手段^[4]. 本研究对30例肝硬化患者进行了事件相关电位P₃₀₀和体感诱发电位检测及简易智能精神状态检查, 并追踪1 a, 观察临床肝性脑病(HE)的出现情况, 以探讨ERP之P₃₀₀及简易智能精神状态检查对轻微型肝性脑病的诊断价值.

1 材料和方法

1.1 材料 肝硬化组, 肝硬化失代偿期患者30例, 为2004-2005住院的肝炎后肝硬化患者, 符合1995年全国病毒性肝炎防治方案的肝炎后肝硬化的诊断标准, 有酗酒史、神经系统疾病及听力障碍者除外. 其中男21例, 女9例, 年龄26-64(平均51.2)岁, 按Pugh改良的Child肝功能分级. A级8人, B级9人, C级13人. 正常对照组28例, 男18例, 女10例, 年龄26-68(平均54.3)岁, 查体正常, 无肝病、肝病、糖尿病及脑血管疾病的志愿者. 文化程度, 肝硬化组: 小学4例、中学18例、大学8例, 对照组: 小学5例、中学16例、大学9例.

1.2 方法 使用日本光电公司Neuro Peak5304K型四道诱发电位仪. 电极位置参照国际脑电学会10/20标准安放. 听觉事件相关电位P₃₀₀测定: 记录电极置于FZ和CZ, 靶刺激20%, 非靶刺激占80%, 患者计数靶刺激个数与实际次数的误差不超过3次, 测试至少重复2次. 观察P₃₀₀波幅(峰-峰值)和潜伏期. 体感诱发电位(SEP)测定: 观察各波潜伏期, 波幅及峰间潜伏期. 以任一种异常超过我院神经电生理室标准均值±2.5作为异常, 如有2种以上异常, 则以改变明显者为判断标准. 同时对30例患者予简易智能精神状态检查量表(MMSE), 包括定向力、记忆力、注意力、计算力、回忆能力、语言能力等方法, 提问并打分.

统计学处理 采用 χ^2 检验.

表 1 肝硬化患者(ERP)P₃₀₀测定结果

Child 分级	<i>n</i>	P ₃₀₀ 消失 (<i>n</i>)	波幅 降低	潜伏期 延长	异常率 (%)
A	8	0	1	1	25.0
B	9	2	4	1	77.8
C	13	5	4	3	92.3
总计	30	7	9	5	70.0

2 结果

听觉事件相关电位P₃₀₀测定结果异常者21例(70%), 主要表现为P₃₀₀完全消失、波幅低矮、潜伏期延长. 其中P₃₀₀完全消失7例, 波幅低平9例, 潜伏期延长5例(表1). 随肝功能Child分级增加, ERP P₃₀₀异常率增加($\chi^2 = 11.04, P < 0.01$)体感诱发电位(SEP)测定异常共11例, 异常率36.7%, 其中潜伏期延长4例, 波幅低矮5例, 峰间时程延长2例. 30例患者中MMSE得分<27(提示有认知功能障碍)有13例(43.3%). 事件相关电位P₃₀₀和/或MMSE异常22例(73.3%), 两者均异常10例(33.3%), 30例患者追踪1 a, 其中失访7例, 完成随访23例, P₃₀₀和/或MMSE异常17例, 出现临床肝性脑病12例(70.6%), P₃₀₀和MMSE检测均无异常6例, 出现HE 1例(16.7%), 两者比较有显著性差异($\chi^2 = 5.25, P < 0.05$).

3 讨论

MHE是慢性肝病患者临床上无脑病症状, 常规精神和神经功能检查正常, 仅能用精细的智力测验和/或神经电生理检测才能发现的肝性脑病^[5]. 1978年Githin报道肝硬化患者虽然表面完全健康, 但心理测试发现MHE的发生率达60%-70%, 由于MHE患者有心理障碍、智力低下, 反应能力降低, 判断能力降低, 而临床上又无脑病症状, 常规精神神经检查不易被发现, 因而不能进行常规治疗和随访^[6].

事件相关电位P₃₀₀是一种特殊的诱发电位, P₃₀₀是ERP中峰潜伏期在300 ms左右的晚期正向波, 为信号加工特有电位. P₃₀₀电位对反映轻度认知功能障碍很敏感^[7]. 目前认为P₃₀₀内源成分与人的注意、记忆、判断、思维、认知、感觉及推理等高级神经活动功能有关, 是测定注意、记忆、智能等高级心理活动的客观指标^[4]. Kugler *et al*的研究中指出, 肝硬化患者无论有无临床脑病, P₃₀₀潜伏期都明显延长. 随肝性脑病的加重, P₃₀₀潜伏期延长更加明显, 其振幅逐渐变小, 最终P₃₀₀波消失^[8]. 事件相关电位P₃₀₀潜伏时的测定能

■创新盘点

本文通过对肝硬化患者进行事件相关电位P₃₀₀和体感诱发电位检测及简易智能精神状态检查, 提高其检出率, 说明应用事件相关电位P₃₀₀和简易智能精神状态检查是MHE诊断的一种有效客观的联检手段, 从而早发现轻微型肝性脑病, 及时治疗.

■同行评价

本研究内容在诊断肝性脑病时早于临床诊断,有高度敏感性,是指导临床诊断和治疗的一项有意义的指标。

正确反应患者的大脑认知水平及心理活动^[9],潜伏期与肝代谢能力有关,肝代谢能力减退越严重,认知障碍程度也越重。对无临床脑病的肝硬化患者, P_{300} 检出异常率为78%,而心理学测验异常率仅为41%,可见 P_{300} 成分对检出MHE及早期临床肝性脑病有高度敏感性。我们对30例肝硬化患者进行事件相关电位 P_{300} 检查,发现其异常率为70%;且随Child肝功能分级增加, P_{300} 异常率亦增高,与文献报道基本一致。另外我们还发现肝硬化患者 P_{300} 异常率(70%)高于体感诱发电位(SEP)的异常率(36.7%),我们应用事件相关电位 P_{300} 和简易智能精神状态检查联合检测,并追踪随访1 a, MHE阳性率为70.6%,说明应用事件相关电位 P_{300} 和简易智能精神状态检查是MHE诊断的一种有效客观的联检手段。MHE所产生的躯体、精神症状及由之引起的功能限制是慢性肝病患者生活质量下降的最主要的原因,而 P_{300} 电位作为判断大脑高级功能的客观指标,能及时反映肝病患者的认知状况,对认知功能受损患者及时进行心理治疗和心理干预,可通过控制应激源

或情绪而增加机体的免疫功能,从而降低肝性脑病的发病率和提高其生活质量^[10]。

4 参考文献

- 1 李运泽, 韦武合. 事件相关电位 P_{300} 对老年人轻微肝性脑病的诊断意义. 中国老年学杂志 2006; 26: 1558-1559
- 2 钟碧慧, 陈湖, 袁育红, 任明, 胡品津. 探讨心理测验和脑诱发电位检测亚临床型肝性脑病的价值. 胃肠病学和肝病学杂志 1999; 8: 139-140
- 3 贾林, 张美华. 肝性脑病的定义、命名、诊断和定量标准修订方案的新进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 2008-2010
- 4 李运泽, 林洪全, 陈勇昌. 肝硬化患者事件相关电位 P_{300} 检查的临床意义. 中华消化杂志 2001; 21: 366-367
- 5 李运泽, 陈勇昌, 林洪全. 脑诱发电位对亚临床肝性脑病的诊断意义. 广西医科大学学报 2002; 19: 70-71
- 6 王波, 胡乐明, 冀子中, 杨志宏, 杨亚平, 袁秀兰. 肝硬化失代偿期与事件相关电位 P_{300} 及脑干听觉诱发电位相关性探讨. 临床肝胆病杂志 2001; 17: 99-100
- 7 邓咏梅, 刘玉兰. 亚临床肝性脑病的检测. 国外医学内科学分册 2000; 27: 529-532
- 8 刘龙民, 陈建杰. 亚临床肝性脑病的临床检测与诊断. 胃肠病学和肝病杂志 2002; 11: 10-13
- 9 帅杰, 达四平. P_{300} 及脑电功率谱用于肝硬化病人脑功能的研究. 脑与神经疾病杂志 2003; 11: 43-44
- 10 王夏红, 李六一, 穆俊林. 亚临床肝性脑病患者的认知状况及其 P_{300} 电位研究. 中国民康医学杂志 2004; 16: 737-738

电编 何基才 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

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

溃疡性结肠炎患者Th1类细胞因子的表达

庞艳华, 郝建宇, 关玉盘, 郑长青, 张文杰

庞艳华, 郝建宇, 关玉盘, 首都医科大学附属北京朝阳医院
消化内科 北京 100020

郑长青, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市
110004

张文杰, 武汉大学中南医院医学科学研究中心 湖北省武汉市
430020

通讯作者: 庞艳华, 100020, 北京市朝阳区白家庄路8号, 首都医
科大学附属北京朝阳医院消化内科. yanhuapang@yahoo.com
电话: 010-85231502

收稿日期: 2007-04-11 接受日期: 2007-04-18

Expression of Th1 type cytokines in patients with ulcerative colitis

Yan-Hua Pang, Jian-Yu Hao, Yu-Pan Guan,
Chang-Qing Zheng, Wen-Jie Zhang

Yan-Hua Pang, Jian-Yu Hao, Yu-Pan Guan, Department of
Gastroenterology, Chaoyang Hospital Affiliated to Capital
University of Medical Sciences, Beijing 100020, China
Chang-Qing Zheng, Department of Gastroenterology,
Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University,
Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Wen-Jie Zhang, Medical Research Center, Zhongnan Hos-
pital of Wuhan University, Wuhan 430020, Hubei Province,
China

Correspondence to: Yan-Hua Pang, Department of
Gastroenterology, Chaoyang Hospital Affiliated to
Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020,
China. yanhuapang@yahoo.com

Received: 2007-04-11 Accepted: 2007-04-18

Abstract

AIM: To explore the expression of Th1 type cytokines, interleukin-12 (IL-12) and interferon- γ (IFN- γ), in ulcerative colitis (UC), and to investigate the mechanism of UC at molecular level.

METHODS: Thirty UC patients diagnosed with colonoscopy and mucosal biopsy were enrolled in this study and 20 healthy volunteers were used as controls. IL-12 and IFN- γ mRNA expression were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The serum levels of IL-12 and IFN- γ were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: The expression of IL-12 mRNA in UC patients (light, moderate and severe degree)

was significant higher than that in controls (0.51 ± 0.09 , 0.59 ± 0.07 , 0.66 ± 0.06 vs 0.25 ± 0.03 , $P < 0.05$), but no difference was found in IFN- γ mRNA expression between the two groups. The level of serum IL-12 was not markedly different between UC patients and controls ($P > 0.05$), while IFN- γ were not detectable in both groups.

CONCLUSION: IL-12 may play an important role in the pathogenesis of UC.

Key Words: Ulcerative colitis; Interleukin-12; Interferon- γ ; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Enzyme-linked immunosorbent assay

Pang YH, Hao JY, Guan YP, Zheng CQ, Zhang WJ. Expression of Th1 type cytokines in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1665-1667

摘要

目的: 检测Th1类细胞因子IL-12, IFN- γ 在溃疡性结肠炎(UC)中的表达, 从分子水平上探讨UC的发病机制。

方法: 选取通过结肠镜诊断并经病理证实的患者UC 30例, 正常对照者20例。用RT-PCR方法检测Th1类细胞因子IFN- γ 和IL-12 mRNA表达, 用双抗体夹心ELISA法检测血清IL-12, IFN- γ 的水平。

结果: UC组(轻、中、重度)IL-12 mRNA表达较正常对照组显著增加(0.51 ± 0.09 , 0.59 ± 0.07 , 0.66 ± 0.06 vs 0.25 ± 0.03 , $P < 0.05$), 而IFN- γ 与正常对照组相比, 表达无显著差异($P > 0.05$)。UC组和正常对照组IL-12的血清浓度差异没有显著性($P > 0.05$), IFN- γ 未达到可检测浓度。

结论: IL-12在UC的发病中可能起重要作用。

关键词: 溃疡性结肠炎; IL-12; IFN- γ ; 逆转录聚合酶链式反应; 酶联免疫试验

庞艳华, 郝建宇, 关玉盘, 郑长青, 张文杰. 溃疡性结肠炎患者Th1类细胞因子的表达. 世界华人消化杂志

■背景资料

Th细胞的研究近来进展迅速, 而有研究发现免疫反应异常在溃疡性结肠炎的发病中起重要作用, 主要效应细胞为Th1和Th2细胞, 关于它们的具体作用, 研究者意见不一。

■同行评价

本文研究思路清晰, 结合分子水平来研究临床疾病, 对进一步探讨UC的发病机制有很大意义.

2007;15(14):1665-1667

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1665.asp>

0 引言

免疫反应异常在溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)的发病中起重要作用. CD4⁺T细胞是免疫应答的重要效应细胞, 分为Th1和Th2细胞, Th1细胞表达 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子 β (tumor necrosis factor- β , TNF β), 而Th2细胞表达IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10和IL-13^[1-2]. 一般而言, Th1细胞因子有促炎作用, 而Th2细胞因子则发挥抗炎作用. 在对UC的免疫学发病机制研究中, 研究者们意见不一. Lakatos^[3]认为UC与Th2细胞密切相关, Sawa *et al*^[4]认为UC是Th1和Th2共同作用的结果. UC究竟与Th1或Th2何者更为密切相关还有待研究. 我们检测了UC患者结肠黏膜和外周血中Th1类细胞因子IL-12, IFN- γ 的表达, 旨在探讨UC的发病机制.

1 材料和方法

1.1 材料 UC患者30例, 经结肠镜检查确诊并经病理证实, 诊断符合2000年成都会议标准^[5], 年龄26-69岁. 正常对照组20例, 年龄25-51岁. 取每例患者直肠或乙状结肠部位的活检组织, 置于液氮罐中, 每例抽取全静脉血5 mL, 离心取血清, 均置于-70℃保存备用. 所有引物上海博亚生物技术有限公司合成, ELISA试剂盒购于上海森雄实业有限公司.

1.2 方法

1.2.1 提取组织RNA, 用反转录法合成cDNA, RT-PCR法检测IL-12和IFN- γ 的表达 PCR反应体系为50 μ L, 含cDNA模板2 μ L、PCR缓冲液5 μ L、50 mol/L dNTP混合物、10 μ mol/L上下游引物和Taq DNA聚合酶0.5 μ L. PCR反应参数为94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共30个循环. 72℃延伸10 min, 4℃终止反应. 取5 μ L PCR扩增产物以12 g/L琼脂糖进行凝胶电泳, 用图像分析仪进行分析.

1.2.2 采用双抗体夹心ELISA法测血清IL-12和IFN- γ 的水平 具体检测程序如下: 建立标准曲线: 设标准孔8孔, 每孔中各加入样品稀释液100 μ L, 第1孔加入标准样品100 μ L, 混匀后用加样器吸出100 μ L, 移至第2孔. 如此反复作对倍稀释至第7孔, 最后, 从第7孔中吸出100 μ L弃去, 使之体积均为100 μ L. 第8孔为空白对照. 加样: 待测样品孔中每孔各加入样品稀释液及待测样品

表 1 IFN- γ 和IL-12的表达

细胞因子	对照组	轻度UC	中度UC	重度UC
IFN- γ	0.64 $\pm$ 0.04	0.65 $\pm$ 0.03	0.70 $\pm$ 0.03	0.77 $\pm$ 0.05
IL-12	0.25 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.09 ^a	0.59 $\pm$ 0.07 ^a	0.66 $\pm$ 0.06 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

各50 μ L. 将反应板置37℃ 2 h. 洗板: 用洗涤液将反应板充分洗涤4次, 在滤纸上印干. 每孔中加入第一抗体工作液50 μ L. 将反应板充分混匀后置37℃ 1 h, 洗板. 每孔加酶标抗体工作液100 μ L. 将反应板置37℃ 1 h, 洗板. 每孔加入底物工作液100 μ L, 置37℃暗处反应5-10 min. 每孔加入1滴终止液混匀. 在492 nm处测吸光值 A_{492} . 用标准物浓度与 A_{492} 值计算出标准曲线的直线回归方程, 将样品的 A_{492} 值代入方程式求出样品浓度.

统计学处理: 采用单因素方差分析, 用SPSS10.0统计软件分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 IL-12 mRNA 和IFN- γ 的表达 UC组IL-12的表达较正常对照组增加($P < 0.05$), 而IFN- γ 与正常对照组相比, 差异无显著性($P > 0.05$), IL-12和IFN- γ 在轻中重度UC中差异都无显著性($P > 0.05$, 表1).

2.2 外周血IL-12和IFN- γ 的检测 UC组和正常对照组, IL-12的浓度分别为23.32 $\pm$ 7.86 ng/L和27.97 $\pm$ 10.75 ng/L, 两者差异没有显著性($P > 0.05$). IFN- γ 在两组中都未达到可检测浓度.

3 讨论

在正常状态下, 体内的Th1和Th2处于动态平衡, 两者相互制约, 从而维持机体内环境的稳定. 如果由于某种原因导致Th1/Th2失衡, 比如Th1反应亢进或Th2反应减弱, 组织器官就可能发生炎症. IL-12是细胞免疫中非常重要的因子^[6], 由活化的单核-巨噬细胞、树突状细胞等抗原呈递细胞产生, 能促进Th1细胞的分化和增殖, IL-12还可刺激自然杀伤细胞(NK细胞)和T细胞产生包括IFN- γ 在内的多种细胞因子. IL-12和IFN- γ 作为前炎症因子都对Th1反应提供了重要信号. 我们的实验结果表明UC组肠黏膜IL-12 mRNA的表达较正常对照组增加, 这与Nielsen *et al*^[7]的研究结果一致, 说明IL-12参与了UC的发病. IFN- γ 主要由T细胞和NK细胞产生, 有广泛的免疫调节作用, Th1是产生IFN- γ 的主要细胞. IFN- γ

主要通过两种途径促进Th1分化: (1)通过阻止Th2的分化而使Th1的分化占优势; (2)在抗原致敏过程中, IFN- γ 和IL-12直接调节Th1的分化^[8]. Stevceva *et al*^[9]用类似人类UC的IL-4缺乏小鼠模型检测IFN- γ , 认为IFN- γ 在急性炎症结肠组织的含量高. Camoglio *et al*^[10]用免疫组化法检测UC患者IFN- γ 和IL-4的表达, 结果二者均未有显著性升高. Watanabe *et al*^[11] Northern杂交及定量PCR法在CD组织中检测到IFN- γ , 而未受刺激的自身外周血单核细胞(PBMC)、正常对照及炎症对照组肠黏膜固有层单个核细胞(LPMC)未能检出IFN- γ . 对于IFN- γ 在Th1细胞的发展中是否必需这个问题一直有争论. Bot *et al*^[12]发现在完全缺乏IL-4时, T细胞在IL-12存在的情况下开始向Th1分化, 此时不需要IFN- γ . 我们的实验结果提示IFN- γ 在UC的发病中的作用不明显, IL-12可能在IFN- γ 不升高的情况下诱导了Th1细胞.

近年来, 对Th细胞的研究进展迅速, 人们已经认识到细胞因子、T细胞受体、转录因子等共同调节着Th1/Th2分化方向. 但是, Th1/Th2整个通路的调节是很复杂的过程, 对整个通路的初始调节和最重要的调节以及对UC免疫机制的最终阐明都有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-573
- 2 Jankovic D, Sher A, Yap G. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 403-409
- 3 Lakatos L. Immunology of inflammatory bowel diseases. *Acta Physiol Hung* 2000; 87: 355-372
- 4 Sawa Y, Oshitani N, Adachi K, Higuchi K, Matsumoto T, Arakawa T. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003; 11: 175-179
- 5 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001; 21: 236-239
- 6 Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 933-944
- 7 Nielsen OH, Kirman I, Rudiger N, Hendel J, Vainer B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 180-185
- 8 金伯泉. 细胞和分子免疫学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2001: 399
- 9 Stevceva L, Pavli P, Husband A, Ramsay A, Doe WF. Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice. *Genes Immun* 2001; 2: 309-316
- 10 Camoglio L, Te Velde AA, Tigges AJ, Das PK, Van Deventer SJ. Altered expression of interferon-gamma and interleukin-4 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998; 4: 285-290
- 11 Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, Aiso S, Hibi T, Ishii H. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 1995; 95: 2945-2953
- 12 Bot A, Smith KA, von Herrath M. Molecular and cellular control of T1/T2 immunity at the interface between antimicrobial defense and immune pathology. *DNA Cell Biol* 2004; 23: 341-350

电编 郭海丽 编辑 程剑侠

肠系膜上动脉狭窄的腔内介入治疗4例

宋盛哈, 张望德, 苑超, 李谈, 原标, 王克勤, 邢彤, 张 扬

■背景资料

肠系膜上动脉(SMA)狭窄致肠缺血是临床较少见的疾病, 由于对本病的认识不足, 常导致诊断的延误。传统的治疗方法以外科手术为主, 主要是血管转流术及动脉内膜剥脱术等。血管腔内介入治疗技术(PTA及支架植入术)为本病的治疗提供了新途径, 但国内报道较少, 应用的经验不多。

宋盛哈, 张望德, 苑超, 李谈, 原标, 王克勤, 邢彤, 张 扬, 首都医科大学附属北京朝阳医院 北京市 100020

通讯作者: 宋盛哈, 100020, 北京市朝阳区白家庄路8号, 首都医科大学附属北京朝阳医院血管外科, ssh0212@sina.com.cn
电话: 010-85231886

收稿日期: 2007-03-05 接受日期: 2007-03-31

Endovascular interventional treatment of superior mesenteric arteries stenosis

Sheng-Han Song, Wang-De Zhang, Chao Yuan, Tan Li, Biao Yuan, Ke-Qin Wang, Tong Xing, Yang Zhang

Sheng-Han Song, Wang-De Zhang, Chao Yuan, Tan Li, Biao Yuan, Ke-Qin Wang, Tong Xing, Yang Zhang, Chaoyang Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing, 100020, China

Correspondence to: Sheng-Han Song, Department of Vascular Surgery, Chaoyang Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, 8 Baijiazhuang, Chaoyang District, Beijing 100020, China. ssh0212@sina.com.cn

Received: 2007-03-05 Accepted: 2007-03-31

Abstract

AIM: To discuss the diagnosis and treatment of ischemic enteropathy resulted from superior mesenteric arteries (SMA) stenosis and evaluate the safety and efficacy of endovascular interventional technique for SMA stenosis.

METHODS: Four cases with SMA stenoses were treated with percutaneous transluminal balloon angioplasty (PTA) and stent placement. During 3 to 32 months of following up, we observed the efficacy of endovascular interventional technique for SMA stenosis as well as the prognosis of patients.

RESULTS: PTA and stent placement were technically successful in all the cases. Among the 4 cases, 3 cases were implanted 1 stent respectively and 1 case was implanted 2 stents. After procedure, the symptoms were relieved in 3 cases within 1 week and their body weights increased to the ideal level during 3 to 6 months. The remaining one case obtained conspicuous alleviation of abdominal pain, but she still had the intermittent abdominal discomfort and her

body weight didn't increased markedly. One patient died from acute myocardial infarction in the 32th month after procedure and didn't have recurrent symptoms when she was alive. During the following up, re-stenosis didn't occur in all the cases which assessed by duplex sonography.

CONCLUSION: Computerized tomographic angiograms, magnetic resonance angiograms (MRA) and selective angiogram of SMA are important methods for the diagnosis of SMA stenosis. Stent-assisted angioplasty is safe and effective in the therapy of mesenteric arterial occlusive diseases, with a low incidence of complications and high technical success rate, especially fit for the patients with high surgical risk.

Key Words: Superior mesenteric arteries stenosis; Ischemic enteropathy; Diagnosis; Endovascular interventional treatment

Song SH, Zhang WD, Yuan C, Li T, Yuan B, Wang KQ, Xing T, Zhang Y. Endovascular interventional treatment of superior mesenteric arteries stenosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(14):1668-1672

摘要

目的: 探讨肠系膜上动脉(SMA)狭窄所致缺血性肠病的诊断和治疗方法, 评估腔内介入治疗的安全性及临床效果。

方法: 4例SMA狭窄患者通过介入治疗技术行SMA球囊扩张(PTA)及腔内支架植入术, 术后随访了3-32 mo, 观察腔内治疗的效果以及预后情况。

结果: 4例患者支架植入均成功, 3例采用1枚支架, 1例采用2枚支架。有3例在术后1 wk内症状消失, 恢复良好。最快者术后当天腹痛消失, 第2天肠梗阻即解除。3例患者在术后3 mo至6 mo内体质量恢复至接近正常。1例虽然术后症状较前明显缓解, 但仍有间歇腹部不适, 体质量恢复不明显。1例患者在术后32 mo死于突发心肌梗死, 其生前症状未复发。随访期间复查腹部血管超声未发现SMA再狭窄。

结论: 腹部血管CTA, MRA及选择性血管造影对确诊SMA狭窄致肠缺血具有重要意义. 血管腔内技术应用于肠系膜血管疾病的治疗, 是一种安全有效的方法, 具有创伤小, 恢复快等特点.

关键词: 肠系膜上动脉狭窄; 肠缺血; 诊断; 腔内介入治疗

宋盛晗, 张望德, 苑超, 李谈, 原标, 王克勤, 邢彤, 张杨. 肠系膜上动脉狭窄的腔内介入治疗4例. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1668-1672

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1668.asp>

0 引言

肠系膜上动脉(SMA)狭窄致肠缺血是临床较罕见的疾病, 多由动脉硬化狭窄及血栓形成所致. 临床上表现为慢性腹痛, 餐后腹痛, 消化不良, 体质量减轻等^[1]. 急性血栓形成时, 可致急性肠道缺血, 表现为腹痛急性加重以及急、慢性肠梗阻等症状. 由于对本病的认识不足, 常导致诊断的延误. 传统的治疗方法以外科手术为主, 主要是血管转流术及动脉内膜剥脱术等^[1,8-10]. 血管腔内介入治疗是近年来发展很快的新技术, 为本病的治疗提供了新途径, 但国内报道较少, 关于其治疗效果及预后尚有争论, 我们报道4例SMA狭窄患者采用腔内介入治疗的经验体会.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-05/2006-11采用血管腔内技术共治疗了4例SMA狭窄患者, 男1例, 女3例, 年龄68-75(平均71.3)岁. 病程1-42(平均14) mo. 合并疾病有冠心病2例, 高血压3例, 糖尿病及糖尿病性肾病1例, 腹主动脉及下肢动脉粥样硬化狭窄2例, 颈动脉硬化狭窄1例, 真性红细胞增多症1例, 陈旧性脑梗塞2例, 陈旧性心肌梗塞1例. 4例均有慢性腹痛, 饱食后腹痛病史. 表现为餐后30 min至1 h出现上腹部疼痛不适, 以致对进食产生恐惧. 所有病例均有明显的体质消瘦, 3例患者有便血及黑便史; 2例因呕吐及肠梗阻入院. 查体: 腹软, 均有上腹部或脐周压痛, 有2例可闻及腹部血管杂音. 实验室检查: 3例有不同程度的低蛋白血症和血红蛋白降低; Doppler血管超声初步筛查提示3例发现或怀疑有SMA狭窄; 我们常规行腹部增强CT血管重建, 其中3例有明确的SMA狭窄, 并有1例伴有腹腔动脉狭窄, 所有患者在肠系膜上、下动脉之间均出现明显的Riolan动脉侧支循环, 另外还提示有结肠水肿增

厚, 剩下的1例因血管重建图像有伪影, SMA显示不清, 而经保守治疗腹痛症状缓解不明显, 于是行腹主动脉及选择性SMA血管造影得以确诊, 在明确诊断的同时行PTA及支架植入; CT和动脉造影发现SMA狭窄的程度从大约70%至99%不等; 有3例行上消化道内镜检查发现有浅表性胃炎, 1例有胃溃疡; 3例行结肠镜者发现有缺血性肠病表现; 其他常规检查未发现明显异常.

1.2 方法 SMA球囊扩张及支架植入术: 术前3 d口服阿斯匹林0.3 g/d并给予保护胃黏膜药物; 术中采用Seldinger技术行股动脉穿刺, 经导丝引入7F动脉鞘, 将造影导管沿腹主动脉送至SMA开口附近, 行腹主动脉正、侧位造影和选择性SMA造影, 确定SMA狭窄部位和长度; 静脉给予肝素30 mg, 全身肝素化后, 以导引导管结合超滑导丝选择进入SMA, 通过狭窄处后保留导丝, 先以直径3 mm的小球囊行预扩张, 然后经导引导管植入直径和长度合适的球囊扩张式支架, 准确定位后加压充盈球囊使支架扩张, 再次造影确认狭窄是否解除, 根据情况, 有的病例可能需要植入第2枚支架; 支架开通后, 经导管向SMA内缓慢注入罂粟碱30 mg, 以解除可能的血管痉挛. 4例患者共植入4枚Palmaz球囊扩张式支架(美国Cordis公司), 1枚wallstent自膨式支架(美国Boston科学公司), 其中3枚支架直径是6 mm, 2枚支架直径是7 mm. 术中平均操作时间为58(40-90) min.

术后给予低分子肝素抗凝治疗7-10 d, 并口服波立维75 mg/d, 2 mo后改为阿斯匹林0.1 g/d, 一般建议服用6 mo以上, 若无禁忌症可长期口服. 出院前复查腹部血管超声, 以后每隔3-6 mo定期复查.

2 结果

4例患者中有3例于SMA狭窄处各植入1枚支架, 有1例在植入第1枚支架时发生前跳, 又于狭窄处植入第2枚支架, 所有病例经造影证实支架开通良好, 血流通畅, SMA狭窄解除, 其远端分支血管显影良好, 技术成功率为100%. 1例术后穿刺部位发生小血肿, 未予特殊处置后自行吸收, 其余患者没有并发症发生. 4例患者于术后3-5(平均4.2) d出院.

所有病例术后随访了3-32(平均11.3) mo, 3例在术后1 wk内症状消失, 饮食逐渐恢复正常, 最快者术后当天腹痛消失, 第2天肠梗阻即解

■ 相关报道

早期由于介入技术及导管和支架材料性能的限制等, 应用血管腔内技术治疗SAM狭窄的效果不尽如人意. 近年来随着影像学 and 介入技术的飞速发展, 支架结构和材料的改进以及治疗经验的增多, 对血管腔内技术治疗SAM狭窄持肯定态度的报道不断增多.

■应用要点

把握好腔内治疗的适应症,熟练掌握血管腔内技术是其安全应用的基础。选用合适的导丝及导管,能够选择进入肠系膜上动脉并通过狭窄部是关键所在,然后根据病变血管情况选择合适的球囊扩张式支架。

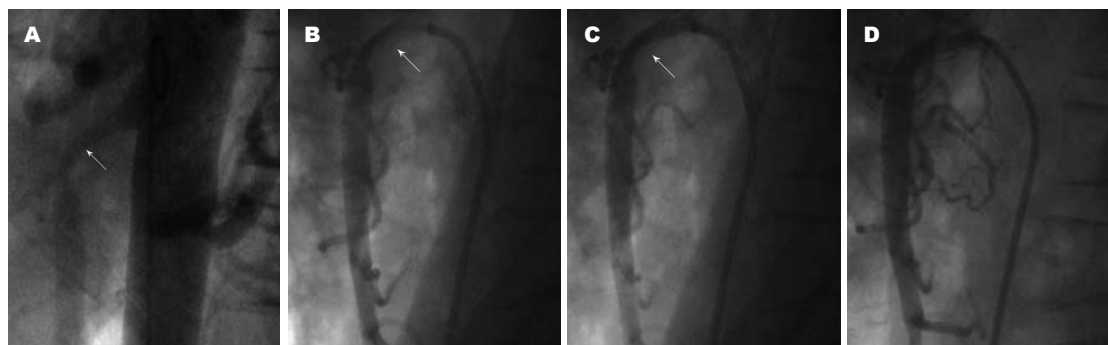


图1 男性,70岁,腹部不适感2 a,餐后腹痛6 mo,肠梗阻5 d入院,腔内介入治疗。A:腹主动脉侧位造影示肠系膜上动脉主干长约1.2 cm狭窄,狭窄程度约70%;B:行选择性肠系膜上动脉造影示动脉狭窄情况;C:以直径6 mm的球囊行动脉狭窄部扩张后,效果不佳,仍有>50%以上的狭窄;D:植入1枚直径6 mm的Palmaz球囊扩张式支架后造影显示狭窄解除。术后当天患者腹痛消失,第2天肠梗阻即解除。

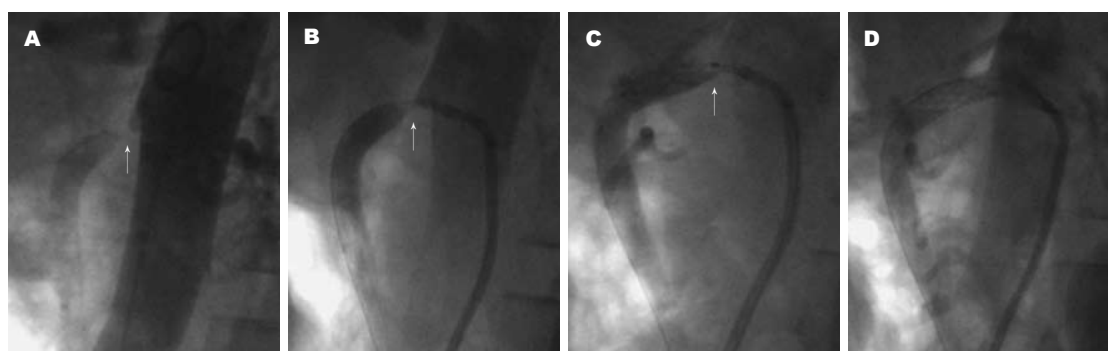


图2 女性,74岁,慢性腹痛、餐后痛3 a,间断便血1 mo,肠梗阻2 d,腔内介入治疗。A:腹主动脉侧位造影示肠系膜上动脉起始部重度狭窄,接近闭塞;B:行选择性肠系膜上动脉造影示动脉狭窄情况;C:植入1枚直径7 mm的Palmaz球囊扩张式支架后发生前跳,支架未完全覆盖狭窄段;D:植入第2枚支架后造影显示狭窄完全解除,术后第5天患者腹痛及肠梗阻完全消失,便潜血转为阴性。

除。2例术前有腹部血管杂音者术后均消失。3例患者在术后3 mo至6 mo内体质量增加了4-11.5 (平均7) kg。1例虽然术后症状较前明显缓解,进食增加,但体质量恢复不明显。1例患者在术后32 mo死于突发心肌梗死,生存期间腹痛症状未复发。随访期间复查腹部血管超声,均未发现SMA再狭窄征象(图1-2)。

3 讨论

慢性SMA狭窄所致肠缺血因其发病率低及对本病认识不足,常被误诊为其他疾病,如胆囊炎、上消化道溃疡、胰腺炎等。患者常常得不到及时正确的诊治。其特征性临床表现为三联症:(1)餐后上腹疼痛;(2)体质量减轻;(3)腹部血管杂音。患者因餐后引发腹部疼痛而恐惧和拒绝进食,以致明显消瘦、体质量减轻和营养不良^[1-4]。

腹部血管多普勒超声因其简便、无创的特点,成为筛选SMA狭窄的重要方法。但其只能查看主干血管近端病变,且受操作者经验等因素影响较大。增强CT尤其是血管三维重建

技术的应用,大大提高了CT对缺血性肠系膜病变的诊断价值^[5-6]。我们也对此类患者常规进行了腹部CT血管成像(CTA)检查,发现其能准确反映病变的部位和程度,而且所有4例患者均发现在肠系膜上、下动脉之间出现粗大的侧支循环-Riolan动脉,为本病特征性表现,具有诊断意义。因此增强CT已成为诊断肠系膜血管缺血性疾病的主要手段。渐有取代血管造影的趋势。MRA与CTA类似,也是良好的诊断方法^[6-7]。

肠系膜血管造影被公认为诊断肠系膜动脉狭窄或闭塞的金标准。但关键是要考虑到本病的可能,对于CT或核磁诊断不清,症状不缓解而患者尚没有腹膜炎等剖腹探查的指征时,应及时行腹主动脉及肠系膜上动脉正、侧位造影进一步确诊,在造影的同时还可以进行PTA和支架介入治疗。

当患者出现肠道缺血症状时,应考虑采取外科手术或血管腔内技术治疗。如不及时治疗,可能进展为重度营养不良或肠坏死,危及生命。对

于无症状的SMA狭窄, 是否应外科干预或介入治疗, 目前尚有争议, 一般认为, 狭窄率>70%者也应考虑手术或腔内治疗. 传统的治疗方法为SMA与腹主动脉或髂动脉的血管转流术或SMA动脉内膜剥脱术等, 术后症状缓解率约为80%. 但本病患者一般均为高龄, 且有多种并发症, 文献报道手术死亡率6-9%, 其他手术相关并发症发生率16-22%^[9-10], 因此外科手术中及术后的高风险令医生及患者多有顾虑.

1980年Furrer *et al*^[11]首先报道了采用PTA方法成功治疗肠系膜动脉狭窄的病例. 但由于诊断技术、介入技术及导管和支架材料性能的限制等, 其应用并未广泛开展. 近年来随着影像学和介入技术的飞速发展, 支架结构和材料的改进, 支架输送系统的细型化以及介入治疗经验的增多, 对于血管腔内技术治疗SAM狭窄持肯定态度的报道不断增多^[1-4,12-14]. 与传统的手术方法对比而言, 血管腔内介入治疗的技术成功率高, 而并发症发生率很低, 术后8 h即可下地活动, 术后2-3 d即可出院, 这对于高龄且有多种并发症的患者, 其治疗的安全性较开腹血管重建手术具有无可比拟的优势. 本组患者平均年龄71.8岁, 均有多种并发症, 而术中仅用局部麻醉, 生命体征平稳, 术后恢复良好, 平均术后4.2 d出院, 充分反映其优势所在. 国外一些报道也认为其渐有取代手术治疗之趋势^[1-4,12-14]. 本组采用PTA加支架植入术成功治疗了4例患者. 我们的经验表明: 选择进入肠系膜上动脉并通过狭窄部是介入治疗关键所在. 只要动脉未完全闭塞, 经耐心操作, 仔细选择, 介入治疗多可完成. 本组技术成功率为100%. 有1例SMA与腹主动脉成角过小, 又有重度狭窄, 以常规方法反复操作导丝均无法进入, 几乎要放弃而改行手术, 后以导引导管结合猪尾导管, 以0.018英寸细导丝终于进入并通过了SMA狭窄部, 完成了治疗. 另外我们大多采用球囊扩张式支架, 其具有定位准确, 支架扩张释放时稳定性好等优点, 较适合于SMA开口部位病变. 在操作中, 我们发现有些动脉狭窄部位组织比较坚韧, 因此支架长轴中点应置于狭窄最严重处, 否则也可能发生支架的前跳及后缩, 甚至有后缩突出或掉入腹主动脉发生意外的可能. 我们有1例在植入第1枚支架时发生前跳, 又于狭窄处植入第2枚支架, SAM狭窄才得以解除. 选择支架的直径主要根据狭窄远近段血管的直径确定, 4例患者共植入5枚支架, 其中3枚支架直径是6 mm, 2枚支架直径

是7 mm.

目前的研究中, 多数学者认为腹腔动脉3支血管中至少有2支主干有狭窄或闭塞才会出现症状. 但我们临床观察的结果表明, 单独SMA严重狭窄, 即可引起明显的临床症状, 行介入治疗, 可获得显著的疗效. 本组有3例为单独的SAM狭窄, 造影及CTA检查未发现腹腔动脉和肠系膜下动脉主干及分支有明显的狭窄. 有1例为腹腔动脉及SMA同时有严重狭窄, 仅行SAM支架植入, 术后症状即完全缓解. Sharafuddin *et al*^[4]也认为若有包括SMA的多支血管病变, 如SMA和腹腔干同时有严重狭窄, 则以治疗SMA狭窄为主, 若SMA狭窄完全解除, 则临床症状大多可以缓解. 而且研究也表明, 腹腔干短而细, 支架放置有一定困难; 另外由于腹腔干起始部受中弓韧带压迫的机率较大, 不易扩张, 植入支架后由于动脉弹性回缩易使支架受压, 甚至塌陷, 或刺激内膜增生导致术后再次狭窄的机率增高^[4,15]. 因此我们不建议同时行SMA及腹腔动脉支架植入.

支架植入后, 应密切观察患者的全身状况、腹部症状和体征, 如腹痛无缓解或缓解后又加重, 则警惕是否已出现肠缺血坏死, 如出现腹膜炎体征, 则须及时行剖腹探查术, 以免延误病情, 危及生命.

介入治疗的并发症主要有动脉夹层、破裂, 穿刺处血肿、假性动脉瘤, 以及SMA支架植入后再狭窄或闭塞等. 我们认为, 当SMA为重度狭窄时, 以直径3 mm左右小球囊行预扩张, 有助于支架的输送、放置及防止动脉出现夹层或破裂. 支架植入后再狭窄的发生与局部血栓形成、内膜增生及动脉硬化进展有关, 术后还需应用抗栓药物如: 低分子肝素、肠溶阿司匹林、波立维等, 需要注意观察出血性并发症. 我们术前及术后常规给予惠加强及泰胃美口服保护胃黏膜, 预防消化道出血, 监测凝血指标变化, 本组未有出血性并发症. 有1例术后腹股沟区穿刺部位发生小血肿, 未予特殊处置而自行吸收. 如此低的并发症发生率与文献报道相当, 较外科手术具有明显优势.

很多新近的研究结果表明, SAM支架植入术后其早、中期的临床症状缓解率和血管开通率与外科手术相当, 而长期的支架开通率仍低于手术治疗. SMA支架植入后发生再狭窄, 大多可通过再次介入治疗使支架开通^[1-4,12-14]. 本组病例支架植入后的早、中期的结果令人满意, 而长期结果尚需进一步随访观察.

■同行评价

该篇文章用微创的方法治疗肠系膜上动脉狭窄, 具有重要的临床实用价值, 论文书写规范, 科学性较强.

总之,腹部血管CTA、MRA及选择性血管造影对确诊SMA狭窄致肠缺血具有重要意义。血管腔内介入技术(PTA及支架植入术)应用于SMA狭窄的治疗,是一种安全有效的方法,其近期疗效与手术治疗相当,且具有技术成功率高,并发症发生率低的优点,相对于外科治疗的高风险,对于高龄及有多种并发症疾病的患者具有很大的优势,可能成为该疾病治疗领域的一个重要方向。

4 参考文献

- 1 Sreenarasimhaiah J. Chronic mesenteric ischemia. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2007; 10: 3-9
- 2 Silva JA, White CJ, Collins TJ, Jenkins JS, Andry ME, Reilly JP, Ramee SR. Endovascular therapy for chronic mesenteric ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 944-950
- 3 Landis MS, Rajan DK, Simons ME, Hayeems EB, Kachura JR, Sniderman KW. Percutaneous management of chronic mesenteric ischemia: outcomes after intervention. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 1319-1325
- 4 Sharafuddin MJ, Olson CH, Sun S, Kresowik TF, Corson JD. Endovascular treatment of celiac and mesenteric arteries stenoses: applications and results. *J Vasc Surg* 2003; 38: 692-698
- 5 Hellinger JC. Evaluating mesenteric ischemia with multidetector-row CT angiography. *Tech Vasc Interv Radiol* 2004; 7: 160-166
- 6 Shih MC, Hagspiel KD. CTA and MRA in mesenteric ischemia: part 1, Role in diagnosis and differential diagnosis. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188: 452-461
- 7 Laissy JP, Trillaud H, Douek P. MR angiography: noninvasive vascular imaging of the abdomen. *Abdom Imaging* 2002; 27: 488-506
- 8 Park WM, Cherry KJ Jr, Chua HK, Clark RC, Jenkins G, Harmsen WS, Noel AA, Panneton JM, Bower TC, Hallett JW Jr, Gloviczki P. Current results of open revascularization for chronic mesenteric ischemia: a standard for comparison. *J Vasc Surg* 2002; 35: 853-859
- 9 Sivamurthy N, Rhodes JM, Lee D, Waldman DL, Green RM, Davies MG. Endovascular versus open mesenteric revascularization: immediate benefits do not equate with short-term functional outcomes. *J Am Coll Surg* 2006; 202: 859-867
- 10 Falkensammer J, Oldenburg WA. Surgical and medical management of mesenteric ischemia. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2006; 8: 137-143
- 11 Furrer J, Gruntzig A, Kugelmeier J, Goebel N. Treatment of abdominal angina with percutaneous dilatation of an arteria mesenterica superior stenosis. Preliminary communication. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1980; 3: 43-44
- 12 Lim RP, Dowling RJ, Mitchell PJ, Vrazas JI, Thomson KR, Tress BM. Endovascular treatment of arterial mesenteric ischaemia: a retrospective review. *Australas Radiol* 2005; 49: 467-475
- 13 Brown DJ, Schermerhorn ML, Powell RJ, Fillinger MF, Rzucidlo EM, Walsh DB, Wyers MC, Zwolak RM, Cronenwett JL. Mesenteric stenting for chronic mesenteric ischemia. *J Vasc Surg* 2005; 42: 268-274
- 14 AbuRahma AF, Stone PA, Bates MC, Welch CA. Angioplasty/stenting of the superior mesenteric artery and celiac trunk: early and late outcomes. *J Endovasc Ther* 2003; 10: 1046-1053
- 15 陆清声, 景在平. 腹腔干狭窄. 中国现代普通外科进展 2004; 7: 65-66

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 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。

不同途径注入大黄治疗急性重症胰腺炎

邓彬, 丁岩冰, 严志刚, 王远志, 吴健, 肖炜明

邓彬, 丁岩冰, 严志刚, 王远志, 吴健, 肖炜明, 扬州市第一人民医院消化内科 江苏省扬州市 225001
通讯作者: 邓彬, 225001, 江苏省扬州市泰州路45号, 扬州市第一人民医院消化内科. brightlyq@sina.com.cn
电话: 0514-2225289
收稿日期: 2007-01-15 接受日期: 2007-02-13

Treatment of severe acute pancreatitis by different administration route: a comparative analysis

Bin Deng, Yan-Bing Ding, Zhi-Gang Yan, Yuan-Zhi Wang, Jian Wu, Wei-Ming Xiao

Bin Deng, Yan-Bing Ding, Zhi-Gang Yan, Yuan-Zhi Wang, Jian Wu, Wei-Ming Xiao, the First People's Hospital of Yangzhou City, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Bin Deng, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Yangzhou City, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China. brightlyq@sina.com.cn
Received: 2007-01-15 Accepted: 2007-02-13

Abstract

AIM: To compare the efficacy of rude rhubarb in the treatment of severe acute pancreatitis (SAP) by nasogastric or nasojejunal feeding.

METHODS: SAP patients were divided into group A ($n = 20$) and B ($n = 23$) randomly. Based on comprehensive treatment, the patients in group A were given rude rhubarb by nasogastric feeding, while those in group B were given rude rhubarb by nasojejunal feeding. The APACHE-II score and Balthazar CT score on the 7th and 14th day were observed, and the level of serum C-reactive protein (CRP) and amylase and the intestinal function were also detected.

RESULTS: On day 7, the APACHE-II score in group B was significantly lower than that in group A (3.76 ± 2.82 vs 4.58 ± 2.07 , $P < 0.05$), but Balthazar CT score had no marked difference between the two groups ($P > 0.05$). On day 14, both the APACHE-II score and Balthazar CT score were not notably different between group A and B ($P > 0.05$). The recovery time of CRP and intestinal function had significant differences

between group B and A (8.3 ± 1.7 vs 9.1 ± 3.6 , $P < 0.05$; 6.2 ± 2.9 vs 8.5 ± 2.3 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: Application of rude rhubarb by nasojejunal feeding can more effectively control the systemic inflammation in SAP and shorten the course of disease.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Rude rhubarb; Nasojejunal feeding; Nasogastric feeding

Deng B, Ding YB, Yan ZG, Wang YZ, Wu J, Xiao WM. Treatment of severe acute pancreatitis by different administration route: a comparative analysis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(14):1673-1675

摘要

目的: 对比研究经胃管和鼻空肠管不同途径给予大黄治疗急性重症急性胰腺炎的治疗效果。

方法: SAP患者43例随机分为A组($n = 20$)和B组($n = 23$)。在综合治疗基础上A组给予胃管注入大黄, B组给予鼻空肠管注入大黄, 观察患者住院7、14 d时APACHE-II评分, Balthazar CT积分以及CRP及血淀粉酶, 肠道功能恢复时间。

结果: 治疗7 d时B组APACHE-II评分较A组有明显降低(3.76 ± 2.82 vs 4.58 ± 2.07 , $P < 0.05$), Balthazar CT积分无明显差别($P > 0.05$); 治疗14 d时A组与B组APACHE-II评分、Balthazar CT积分均无明显差别($P > 0.05$); B组CRP及肠道功能恢复时间较A组有明显缩短(8.3 ± 1.7 vs 9.1 ± 3.6 , $P < 0.05$; 6.2 ± 2.9 vs 8.5 ± 2.3 , $P < 0.01$)。

结论: 鼻空肠管途径应用大黄能更有效地地控制急性重症胰腺炎的全身炎症反应, 缩短病程。

关键词: 重症急性胰腺炎; 大黄; 鼻空肠管; 胃管

邓彬, 丁岩冰, 严志刚, 王远志, 吴健, 肖炜明. 不同途径注入大黄治疗急性重症胰腺炎. 世界华人消化杂志 2007;15(14):1673-1675
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1673.asp>

■背景资料

急性胰腺炎是临床常见的急腹症, 而其中约20%是重症急性胰腺炎(SAP), 有较高的死亡率。近年来经鼻空肠管进行肠内营养以及应用中药大黄治疗SAP在临床实践中已经得到肯定。

■应用要点

本研究初步证实鼻空肠管途径应用大黄能更有效地控制急性重症胰腺炎的全身炎症反应, 缩短病程。

0 引言

急性重症急性胰腺炎(SAP)占急性胰腺炎发病率的20%-30%, 病情凶险, 可产生局部并发症和导致重要脏器的功能衰竭, 其病死率达10%-15%^[1-4]。近年来随着对其发病机制的逐渐认识, 新的药物和技术在SAP治疗中广泛应用, 综合治疗方案不断完善, 其中鼻空肠管放置和中药大黄的治疗作用和地位得到肯定^[5-9]。传统应用大黄多通过胃管注入, 而此种方式给药是否会刺激胰腺分泌, 造成负面影响尚不可知, 通过鼻空肠管注入大黄是否比传统给药方式具有优越性尚未见报道。我们通过对2003-2006年我院收治的43例SAP患者进行随机对照研究, 对比分析经过胃管和鼻空肠管不同途径给予大黄治疗SAP, 评价其治疗效果。

1 材料和方法

1.1 材料 入选标准: (1)符合2003年拟订的《中国急性胰腺炎诊治指南(草案)》关于SAP的诊断标准^[10], CT分级为D, E级, APACHE-II评分 ≥ 8 ; (2)年龄30-70岁之间; (3)发病24 h内就诊。排除标准: (1)孕妇; (2)治疗时间短于14 d患者; (3)淀粉酶不升高SAP患者。符合标准患者随机分为2组, A组(20例)为胃管注入大黄组, B组(23例)为鼻空肠管注入大黄组, 2组患者入院时年龄、性别、体重、肝肾功能、血糖、血C反应蛋白(CRP)以及CT分级等指标无统计学差异。

1.2 方法 入选患者均给予基础综合治疗, 包括: (1)重症监护, 禁食、胃肠减压; (2)补液, 纠正水电解质酸碱平衡紊乱; (3)应用胰腺外分泌和胰酶抑制剂; (4)静脉应用抗生素预防感染; (5)血管活性物质的应用(丹参等); (6)营养支持, 包括输注胶体物质(白蛋白、血浆)和补充微量元素、维生素; (7)应用免疫增强剂。大黄药液制备方法: 生大黄30 g沸水300 mL浸泡, 冷却至37℃。A组患者予每8 h胃管注入大黄一次, 每次100 mL, 闭管1 h; B组患者在内镜引导下将鼻空肠管置入屈氏韧带下, 通过鼻空肠管注入大黄, 同样每8 h一次, 每次100 mL。

观测指标: (1)住院7 d及14 d APACHE-II评分; (2)住院7 d及14 d Balthazar CT积分; (3)CRP及血淀粉酶恢复时间; (4)肠道功能恢复时间(以听到肠鸣音为判断肠道功能恢复标准)。

统计学处理 计数资料以mean $\pm$ SD表示, 组间比较采用One-way ANOVA(SPSS10.0)进行。

2 结果

2.1 治疗7 d及14 d APACHE-II评分 治疗7 d时

表1 CRP、血淀粉酶及肠道功能恢复恢复时间(mean $\pm$ SD)

分组	CRP 恢复时间(d)	血淀粉酶 恢复时间(d)	肠道功能 恢复时间(d)
A组	9.1 $\pm$ 3.6	6.2 $\pm$ 3.4	8.5 $\pm$ 2.3
B组	8.3 $\pm$ 1.7 ^a	5.5 $\pm$ 2.7	6.2 $\pm$ 2.9 ^b

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs A组。

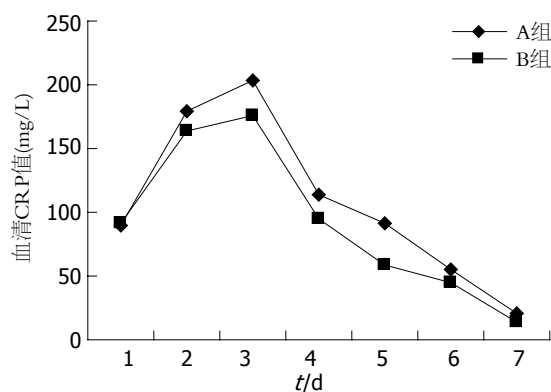


图1 血清CRP变化趋势。

B组APACHE-II评分较A组有明显降低(3.76 $\pm$ 2.82 vs 4.58 $\pm$ 2.07, $P<0.05$); 14 d时A, B组APACHE-II评分无明显差别(3.19 $\pm$ 1.97 vs 3.12 $\pm$ 2.24, $P>0.05$)。

2.2 治疗7 d及14 d Balthazar CT积分 治疗7 d时A, B组Balthazar CT积分无明显差别(2.33 $\pm$ 0.30 vs 2.63 $\pm$ 0.25, $P>0.05$); 治疗14 d时A, B组Balthazar CT积分无明显差别(1.84 $\pm$ 0.32 vs 1.63 $\pm$ 0.41, $P>0.05$)。

2.3 CRP、血淀粉酶及肠道功能恢复恢复时间与A组比较, B组CRP恢复时间有明显缩短($P<0.05$); A组与B组比较, 血淀粉酶恢复时间无明显差别($P>0.05$); 与A组相比, B组肠道功能恢复时间有明显缩短($P<0.01$)(表1)。A, B组发病1 wk内血清CRP随时间变化趋势如图1。

3 讨论

急性胰腺炎发生初期, 局部炎症促使大量的炎症介质、毒素释放入血, 从而启动并扩大局部炎症反应产生全身的过度炎症反应, 造成全身多种器官损伤, 而肠道黏膜损伤, 除了导致肠道屏障功能减弱, 引起肠道细菌和内毒素的移位外, 尚可使肠道巨噬细胞和淋巴组织细胞激活, 造成免疫紊乱, 以致细胞因子和炎症介质大量释放, 引发“瀑布样级联反应”, 被认为是SAP由局部炎症到全身炎症反应, 最终造成多器官功能不全综合

征(MODS)发生或加重的重要中间环节^[2,13-16].

中药大黄在传统医学中有通便导滞、泻火凉血、活血祛瘀之功效,近年来大量实验表明,大黄可通过降低血液、腹水中的炎性细胞因子IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α 的水平而减轻胰腺病理损伤,并能降低血中炎性介质丙二醛(MDA)含量,升高保护性因子超氧化物歧化酶(SOD)含量对急性胰腺炎(AP)起到治疗作用,另外大黄还可发挥以下药理作用: (1)促进大肠蠕动; (2)维护肠道屏障功能,防治肠菌易位; (3)利胆、松弛Oddi括约肌; (4)抑制胰酶分泌; (5)改善微循环,防治微血栓形成等. 因此,应用大黄已经成为临床治疗SAP的重要手段^[12].

传统方法应用大黄多通过胃管或口服给药,而胰酶“自身消化”为急性胰腺炎的启动机制,胰腺分泌受复杂的神经内分泌激素调节,有头相,胃相,和肠相分泌,无论是口服或胃管注入药物均可能不同程度的刺激头相、胃相胰酶分泌,与AP的治疗常规胰腺“休息”理论相悖. 有研究表明肠内刺激距幽门越远对胰腺分泌的影响越弱,90 cm以上时对胰腺的分泌无明显影响,近年来通过鼻空肠管进行肠内营养已经成为SAP的基本治疗策略,鼻空肠管给药也将成为SAP治疗的重要方法,而目前尚缺乏这方面的对比评价研究^[5,14,17]. 通过本研究我们发现在SAP病程的初期,与通过胃管应用大黄相比,通过鼻空肠管应用大黄可更为迅速有效的降低血清CRP和血淀粉酶水平,促进肠道功能恢复,治疗7 d时APACHE-II评分较通过胃管应用大黄患者有一定程度改善,提示鼻空肠管途径应用大黄能更有效地控制全身炎症反应,可能与药物直接作用于肠道黏膜,更为有效的发挥其药理作用,并且减少促胰酶激素分泌等因素有关. 而治疗14 d时两种不同给药方式患者APACHE-II评分和CT评分并无明显差别,可能与SAP的自然病程及常规治疗方法的积极作用有关.

本文为鼻空肠管途径应用大黄治疗SAP的初步探讨,而胃肠激素、炎性细胞因子等在SAP

发生发展以及药物治疗过程中的变化机制有待于进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 Gloor B, Muller CA, Worni M, Martignoni ME, Uhl W, Buchler MW. Late mortality in patients with severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2001; 88: 975-979
- 2 Vege SS, Chari ST, Petersen BT, Baron TH, Munukuti N, Bollineni S, Rea JR. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography-induced severe acute pancreatitis. *Pancreatology* 2006; 6: 527-530
- 3 Gullo L, Migliori M, Olah A, Farkas G, Levy P, Arvanitakis C, Lankisch P, Beger H. Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. *Pancreas* 2002; 24: 223-227
- 4 巫协宁. 重症胰腺炎的规范治疗和治疗策略. *中华消化杂志* 2001; 21: 300-302
- 5 Zhao G, Wang CY, Wang F, Xiong JX. Clinical study on nutrition support in patients with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2105-2108
- 6 秦环龙, 苏振东, 高琦, 林擎天. 早期肠内营养支持对犬重症急性胰腺炎肠道屏障功能的影响. *肠外与肠内营养* 2002; 9: 31-33
- 7 Mao EQ, Tang YQ, Zhang SD. Effects of time interval for hemofiltration on the prognosis of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 373-376
- 8 方雪玲, 方强, 崔巍, 骆建军, 蔡洪流. 生大黄对脓毒症患者肠道屏障功能的影响. *中华急诊医学杂志* 2006; 15: 927-929
- 9 满晓华, 李兆申, 屠振兴, 贾一韬, 龚燕芳. 大黄素对急性胰腺炎大鼠胰腺核因子- κ B活化的影响. *中华消化杂志* 2005; 25: 586-589
- 10 刘晓红, 赵零卿, 钱家鸣. 大黄对大鼠急性出血性胰腺炎的影响. *中华消化杂志* 2004; 24: 14-17
- 11 陈海平, 李钢, 郑锐渊. 中药合剂AA-3抑制实验性急性胰腺炎大鼠炎性介质的研究. *中国中西医结合外科杂志* 2000; 6: 338-340
- 12 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). *中华内科杂志* 2004; 43: 236-238
- 13 Bhatia M, Brady M, Shokuh S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000; 190: 117-125
- 14 Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5: 132-144
- 15 McKay CJ, Buter A. Natural history of organ failure in acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 111-114
- 16 刘晓臣, 彭燕. 肠屏障功能障碍与重症急性胰腺炎. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3131-3135
- 17 Pandol SJ. Acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 481-486

■同行评价

本文对比研究了经胃管和鼻空肠管不同途径给予大黄治疗急性重症胰腺炎的治疗效果,有一定的新意,得出的结果对临床具有指导意义.

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授
南昌大学第一附属医院消化内科

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院 院长办公室

程爱国 教授
华北煤炭医学院附属医院外科

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

党双锁 副教授
西安交通大学医学院附属第二医院感染科

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化疾病研究所

傅春彬 主任医师
吉化集团公司总医院一院消化内科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

季加孚 教授
北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院外科

李晓宇 主任医师
航天中心医院 院长办公室

李增山 副教授
第四军医大学病理教研室

林胜璋 副教授
温州医学院附属二院肝胆胰外科

刘宝瑞 教授
南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

刘海林 主任医师
上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

刘斯奇 教授
中国科学院北京蛋白质研究中心

刘铁夫 教授
哈尔滨医科大学附属四院消化病诊疗中心

刘作金 副教授
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

潘兴华 副主任医师
成都军区昆明总医院病理实验科

秦成勇 教授
山东省立医院消化内科

沈柏用 副教授
上海市交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

孙诚谊 教授
贵阳医学院附属医院 院长办公室

魏经国 教授
第四军医大学唐都医院放射科

吴健雄 教授
中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院研究所肿瘤医院腹部外科

许玲 副教授
第二军医大学长征医院中医科

杨昭徐 教授
首都医科大学附属北京天坛医院消化科

周学文 教授
辽宁中医学院附属医院消化内科

朱春兰 主任医师
黑龙江省医院附属消化病医院消化二科