世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3351-3356
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

加强对消化系统危重病急症的认识与救治

李奇林, 熊 俊

李奇林, 熊俊, 南方医科大学珠江医院急诊科 广东省广州市 510282
李奇林, 南方医科大学珠江医院急诊科主任、教授、主任医师, 主要从事危重急症的救治、急性中毒、突发公共卫生事件救援等方面的研究.
通讯作者: 李奇林, 510282, 广东省广州市工业大道中253号, 南方医科大学珠江医院急诊科. liqilin_12381238@163.com
电话: 020-61643641
收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-08-22

Improving understanding and treatment of critical digestive system diseases

Qi-Lin Li, Jun Xiong

Qi-Lin Li, Jun Xiong, Department of Emergency, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
Correspondence to: Qi-Lin Li, Department of Emergency, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. liqilin_12381238@163.com
Received: 2007-05-18 Revised: 2007-08-22

Abstract
The structure and function of the digestive system are complex and changeable, therefore it is readily susceptible to invasion and injury. The digestive system is closely interrelated with many important organs, and thus misdiagnosis is very common, and in about 50% of cases, critical digestive system diseases cannot be successfully treated in a timely manner. Critical illness often leads to gastrointestinal mucosa dysfunction and an imbalance of the intestinal microflora, which may cause multiple organ dysfunction syndrome. Therefore, it is important to improve the understanding and treatment of critical digestive system diseases. First, we need to fully recognize the structure and function of the digestive system. Second, we must improve the diagnosis of critical digestive system diseases and reduce misdiagnosis. Finally, we need to monitor and preserve the functions of intestinal microflora.

Key Words: Digestive system; Multiple organ dysfunction syndrome; Critical Disease

Li QL, Xiong J. Improving understanding and treatment of critical digestive system diseases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3351-3356

摘要
由于消化系统的结构和功能复杂多变, 易受各种有害因素侵袭与损伤, 且与毗邻器官紧密相联, 临床常可见危重急症误诊, 故50%以上的危重急症得不到及时救治. 危重病常致胃肠黏膜屏障功能障碍, 肠道微生态平衡失调, 从而导致多脏器功能不全综合征. 由此可见加强对消化系统危重病急症的认识与救治是十分重要的. 首先要充分认识消化系统结构与功能特点; 二是要提高对消化系统危重病急症诊断水平, 减少误诊, 早诊治, 早抢救是提高消化系统危重病急症存活率的基础; 三是要十分重视危重病急症救治中的胃肠黏膜屏障功能的监测与保护.

关键词: 消化系统; 多器官功能障碍综合征; 危重病急症

李奇林, 熊俊. 加强对消化系统危重病急症的认识与救治. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3351-3356
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3351.asp

■背景资料
由于消化系统的结构和功能复杂多变, 易受各种有害因素侵袭与损伤, 且与毗邻器官紧密相联, 临床常可见危重急症误诊, 故50%以上的危重急症得不到及时救治. 危重病常致胃肠黏膜屏障功能障碍, 肠道微生态平衡失调, 从而导致多脏器功能不全综合征. 但由于消化道症状的复杂性和非特异性, 常常会导致误诊情况的发生, 延误患者的病情. 因此, 加强对消化系统危重病急症的认识与救治是十分重要的.

0 引言
消化系统疾病包括食管、胃、肠、肝、胆、胰以及腹膜、肠系膜、网膜等脏器的疾病. 消化系统疾病属于常见病. 由于消化系统的结构和功能复杂多变, 受各种有害因素侵袭与损伤的机会较多, 且与毗邻器官紧密相联, 故危重急症较为常见, 误诊时有发生. 虽然医学科学技术进步迅速, 但社会生活环境复杂, 饮食卫生难以得到保证, 消化系统常常是人体抵御疾病的第1道防线, 加之保健、救治措施还不能满足需要, 50%以上的危重急症还得不到及时合理的抢救, 病情严重者可危及患者的生命. 因此, 处理消化系统危急重症是否及时正确, 对患者的预后至关重要.

危重病常致胃肠屏障功能障碍, 肠道微生态平衡失调, 细菌和内毒素进入血液循环导致

■研发前沿
胃肠道屏障功能和胃肠道免疫功能的保护已经逐渐引起人们的研究兴趣.

炎症介质控性释放而引起全身炎症反应综合征(SIRS), 从而导致多脏器功能不全综合征. 而大量临床和实验室研究资料表明, 除消化系统危重急症外, 在其他系统疾病导致的多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)中, 胃肠道同样具有关键作用, 是MODS的启动器官[1], 这一现象往往被人们所忽视. 因此加强对消化系统危重病急症的认识与救治是十分重要的.

1 充分认识消化系统结构与功能特点

消化和吸收是人体获得能源、维持生命的重要功能. 食物在胃肠道内经过一系列复杂的消化分解过程, 成为小分子物质, 被肠道吸收, 肝脏加工变为体内物质, 供全身组织利用. 其余未被吸收和无营养价值的残渣构成粪便, 被排出体外. 这个过程要求具有完整的消化系统.

由于消化道两端均直接开口于体外, 其黏膜常常需要接纳体外的各种物质. 因此, 接触病原体、致癌物质和有毒物质的机会很多. 如果机体发生免疫和其他防御功能减弱等情况, 容易发生感染、炎症、损伤, 甚至肿瘤等. 消化系统疾病的发病率较高可能与此有关. 胃癌、食管癌、肝癌、结肠癌、胰腺癌均是常见的恶性肿瘤, 在全身恶性肿瘤的发生率中占了很大的比例. 胃肠道与肝脏含有大量单核-巨噬细胞, 构成消化道的免疫保护屏障, 保护胃肠道不受外来致病因子的侵袭. 当这种功能受损时即可出现相应的疾病.

消化道是继呼吸道之后的第二大黏膜表面, 占有面积250-400 m^2. 人的一生中约有60吨的食物从胃肠道经过, 他是维持机体健康所必需的, 但同时也对胃肠道完整性及整个机体造成威胁, 由此决定了胃肠道的如下特点: 肠道上皮细胞快速更新、上皮结构特殊、表面被大量分泌物覆盖、存在正常菌群及复杂的胃肠免疫系统等, 以保证正常的胃肠功能及机体健康. 胃肠道有3大屏障实现其功能.

1.1 *生物屏障-正常菌群* 现在的观点认为人体携带的微生物主要在肠道, 胃肠中的微生物量占人体总微生物量的78%, 肠道正常菌群种类繁多, 共有400余种. 肠道的优势菌群是专性厌氧菌, 约占肠道细菌总数的99%, 需氧菌和兼性厌氧菌占1%. 分析正常人的粪便菌群发现, 拟杆菌、双歧杆菌、优杆菌及消化球菌是肠道中的优势菌, 乳酸杆菌、大肠杆菌、链球菌数量仅为中等. 肠道细菌在肠道黏膜表面呈层次分布: 肠黏膜表面为双歧杆菌、厌氧乳酸杆菌, 中层为类杆菌、韦荣氏链球菌, 近肠腔的表层为大肠杆菌、肠球菌. 肠道细菌与肠黏膜上皮细胞上的特异性受体结合, 形成组分相当固定的正常菌膜结构, 可以形成一种防止外袭菌定植于肠道的定植抗力, 用来抵御外籍菌对机体的侵袭. 正常情况下肠道菌群还是某些免疫细胞的刺激剂, 激活机体免疫系统防御外袭菌的侵袭. 人类肠道正常菌群中的某些细菌如腐物寄生菌也可产生大量的免疫调节物质, 参与机体非特异性免疫反应.

1.2 *机械屏障-非特异性黏膜屏障* 肠道非特异性黏膜屏障是指肠道靠其基本结构的物理和化学特性阻止和杀灭有害物质的特性, 包括肠道的酸碱环境、黏膜层、完整的上皮细胞层、正常的胃肠蠕动等. 黏膜屏障可以覆盖上皮表面, 保护上皮细胞不受肠腔渗透压的影响和有害物质的毒害. 肠上皮细胞层通过不断更新过程中产生的碎片和肠上皮细胞与上皮外周的紧密连接组成屏障将外界与机体内环境分开, 防止许多大分子物质包括细菌和抗原进入体内, 同时减少体内液体和电解质漏入肠腔. 胃肠动力系统保证胃肠道在正常情况下处于一种连续的、规律的、各部位相互协调的定向运动状态, 他的正常运行保证了食物运送、吸收. 食物残渣和有害物质包括粘附于黏膜上的细菌及时从体内排除, 保证了肠道内环境的稳定.

1.3 *免疫屏障-肠道相关性淋巴组织(GALT)* 肠道是体内含淋巴组织最多的器官. 肠道相关性淋巴组织(GALT)指聚集在聚合淋巴结、固有层及散在于上皮和固有层的肠淋巴组织的总称, 他含有占体内总免疫效应细胞40%的免疫细胞, 其中包括淋巴细胞、上皮内淋巴细胞、肥大细胞、吞噬细胞. 这些细胞参与体内的免疫调节, 具有抗原提呈、释放炎性介质及产生特异性抗体等作用. GALT约占人体总体液免疫的80%, 细胞免疫的50%[2].

1.4 *肠道屏障功能在多器官功能障碍综合征中的作用* 越来越多的研究表明, 肠道屏障功能障碍时, 通过肠道细菌、内毒素移位以及肠道局部炎症介质释放入血循环, 诱导全身过度、失控、自毁的炎症反应, 参与远隔器官损伤及MODS的发生和发展.

肠道是一个大的细菌库, 含有10^{12}-10^{13}的细菌, 每克粪便含细菌约10^{10}-10^{12}. 如此大量的细

菌其产生的毒素也是巨大的, 但肠道却有选择的只吸收机体所需要的养分和物质, 不发生疾病, 依靠的就是肠黏膜的屏障功能. 任何因素导致此屏障组成破坏, 均可发生细菌及内毒素易位(BT)[3-4].

健康机体肠腔内的细菌与肠黏膜和整个机体之间构成了微生态平衡(婴儿出生后数日肠道菌群即达到正常定植). 二者任何一个环节的改变将破坏这平衡, 即造成疾病状态, 如整体健康状况的损害(免疫屏障的损害)、肠黏膜结构的破坏(机械屏障的损伤)和肠腔内细菌过度生长(生物屏障的破坏). 另外, 胃酸及胃肠道所有消化液以及其他黏膜上皮分泌的生物活性物质也参入肠黏膜屏障的组成, 也有人将其称之为化学屏障[3].

1.4.1 *危重症时胃肠屏障损伤、肠道细菌移位*: 在生理状态下胃肠道的血供为心输出量的20%-25%, 其血管床的血液量占全身总量的30%, 其中75%分布于肠, 小肠血流量为0.4 mL/(min·g), 仅相当于心和脑血流量的一半[5]. 而肠道黏膜的血流量为肌层的2-4倍. 因此, 肠道黏膜对血流量减少更敏感, 易受损害, 同时对缺氧也高度敏感. 在多发性创伤、脓毒症、休克和热力损伤后肠道低灌注状态下, 肠黏膜受损, 尤其是肠黏膜微循环逆流更易使绒毛受到缺血的打击. 肠黏膜通透性增加, 出现细菌移位. Moore *et al*[6-7]认为, 细菌移位导致早期难治性休克, 再灌注后的肠道是促炎症反应递质的来源, 这些递质使早期的全身炎症反应扩大并引起早期多器官功能衰竭(MOF). 肠道低灌注还引起胃和小肠的梗阻, 后者又进一步加重肠道功能的损害, 以致近段小肠成了脓毒症相关性MOF的病原体和毒素的存贮库. 后期的感染引起肠道功能的恶化, 肠道细菌、内毒素移位可进一步激活单核巨噬细胞系统过量地合成和释放炎性递质.

1.4.2 *肠道屏障功能障碍参与MODS的发病过程*: 胃肠道屏障损伤可导致持续的肠源性细菌、内毒素血症而致MODS的发生、发展, 故有人称胃肠道是MODS发生的“动力部位”. 在此过程中, 内毒素除直接造成器官功能损害外, 更重要的是激活白细胞系统(PMN、单核细胞、淋巴细胞、血小板、内皮细胞和组织细胞等), 激活纤溶、凝血和激肽系统, 启动细胞因子的链锁级联反应, 导致大量细胞因子和炎性介质的释放, 造成微循环障碍, 组织细胞缺氧, 并通过多种途径造成远隔部位组织和器官损伤, 参与MODS发病过程.

生理功能完整的肠黏膜对肠道中的细菌和内毒素构成屏障作用. 在创伤和感染等应激情况下, 肠道的屏障功能受到削弱或损害, 可使大量细菌和内毒素经由门静脉和肠系膜淋巴系统侵入血循环, 造成肠源性内毒素血症和细菌移位, 并在一定条件下激发细胞因子和其他炎症递质的连锁反应, 引起全身多个器官的损害. 肠源性内毒素能调节枯否细胞活动, 使之释放能调节肝细胞功能的内源性递质. 而肝脏的网状内皮系统在清除从门静脉来的细菌或内毒素中起重要作用, 其损害后使肠源性细菌或内毒素可以到达全身循环而增加肠屏障功能衰竭对全身的影响. 肠道细菌移位的淋巴途径是由肠壁小淋巴管到达肠系膜淋巴结, 再经胸导管进入体循环. Magnotti *et al*[8-9]研究表明, 肠系膜淋巴能成为肠源性炎症递质的通路, 包括中性粒细胞的刺激、CDllb表达的增加和内皮细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的增加. 在动物实验中, 失血性休克前肠系膜淋巴的移除将不再使肺脏受到再灌注损伤. 他们的研究结果表明是肠系膜的淋巴液而不是门静脉的血液增加了肠内皮细胞的损伤, 从而推测肠系膜淋巴液中含有导致全身炎症反应综合征(SIRS)进展并最终致MOF的关键递质. Adams *et al*[10]发现大鼠在创伤失血性休克后肠道淋巴液进入血循环会启动中性粒细胞的呼吸爆发(respiratory burst). 而若预先将淋巴管结扎处理, 则这一过程被阻止而使肺得到保护.

2 提高对消化系统危重病急症诊断水平, 减少误诊

消化系统疾病诊断一般不难, 但临床上不少疾病都可出现恶心、呕吐、腹痛、腹泻等表现, 容易产生混淆而导致误诊, 尤其是腹痛. 急性腹痛是临床患者中最常见的主诉之一, 病因很多. 常涉及内科, 外科、妇产科等, 有时准确诊断很困难, 甚者会危及患者生命. 因此, 对这类患者不仅要求医生全面了解急性腹痛的各种病因及临床表现, 而且要求医生能尽快作出一个准确的诊断以便及时、正确的治疗, 否则会延误患者诊治, 极易引起医患纠纷.

正确的诊断必须建立在认真收集临床资料包括病史、体征、常规化验及其他特殊检查结果, 并进行全面与综合分析的基础上, 而医生需有较广博的临床基础知识包括生化、免疫、影

■**创新盘点**
本文对消化道的功能与特点进行了阐述, 结合消化道危重急症的发病机制、诊断要点和救治中容易忽视的一些问题进行了探讨, 论述了消化道在危重急症发病中的中心地位.

■应用要点
本文可以增加读者对于消化道危重急症的认识和处理能力, 减少临床对于消化道危重急症的误诊误治, 提高消化道危重病急症的治疗效果.

像诊断、病理生理等方面的知识技能和应急反应能力.

消化系统疾病的诊断首先必须排除致命性的疾病引起的消化系统症状. 消化系统疾病最常见的症状是腹痛, 临床上有4种致命性的腹痛. 一是急性下壁心梗. 急性心肌梗死导致腹部疼痛的原因是: (1)急性心肌梗死时, 牵涉痛反射到腹部而不是胸部; (2)迷走神经受坏死心肌刺激, 兴奋性增高; (3)部分患者心肌梗死尤其是右室梗死时, 以右心衰为主要表现, 出现胃肠道淤血、腹部胀痛及其他症状; (4)急性心肌梗死时, 心排出量降低, 引起组织灌注不足[11]; (5)急性心肌梗死时, 冠脉和腹内脏反射引起消化道症状. 因此, 中老年人以腹痛为首发症状就诊时应排除心肌梗死. 二是急性出血坏死性胰腺炎. 急性出血坏死性胰腺炎疼痛的特点是: (1)疼痛多位于中上腹部, 与体位有关, 以仰卧位为甚, 坐位和向前倾可减轻; (2)多呈持续性钝痛、钻痛或绞痛, 常阵发性加剧; (3)每于腹痛发生不久呕吐即出现. 确诊主要依靠血、尿淀粉酶, 腹穿和B超. 三是宫外孕破裂出血. 凡是育龄妇女有腹痛征象均应检查尿HCG排除宫外孕情况. 四是腹主动脉瘤破裂. 患者常在短时间内出现进行性心功能不全, 甚至发生休克, 产生高排、低灌注、充血综合征, 病情进展迅速, 后果严重. 因此一旦怀疑有腹主动脉瘤破裂, 应尽快行X线检查确诊, 尽快手术治疗.

其次, 其他危重病症时出现消化系统症状要全面分析, 去伪存真, 及时作出正确的诊断. 应及时发现消化系统的危重病症出现的其他系统表现. 如有研究发现, 重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)80%的死亡病例与SAP继发感染有关[11]. SAP可通过多种途径损伤心脏, 引起心功能改变、心律失常、心源性休克、中毒性心肌炎、心包炎、心肌梗死等[12]. SAP伴有中枢神经系统症状且在病程早期出现被认为是胰性脑病(pancreatic encephalopathy, PE), 主要表现为定向力障碍、烦躁、妄想、幻觉、意识不清或反应迟钝、表情淡漠、抑郁等神经精神症状. 在SAP患者发病率中占18%, 且死亡率高达67%[13]. SAP并发肾损害高达53.9%, 病死率高达50%[14].

最后, 造成急腹症误诊的原因主要是医务人员缺乏详细的病史询问, 对病情观察及病情发展分析不仔细, 临床的知识面较狭窄, 不善于应用辅助检查来协助诊断, 对辅助检查的结果缺乏科学的分析, 不能有机的结合临床资料进行综合分析. 如将大叶性肺炎误诊为胃十二指肠穿孔或急性胆绞痛等, 带状疱疹误诊为外科急腹症, 急性心肌梗死误诊为急性胃炎. 笔者曾会诊1例以急性胃炎行内镜检查时出现心律失常和心源性休克, 经心电图及心肌酶学检查证实为广泛前壁心肌梗死. 另外, 患者及家属对自己的病情叙述不清, 有的因为经济问题不接受医师提出的必要辅助检查而延误诊断也是误诊的一个重要原因.

3 救治危重病急症值得重视的几个问题

近些年来, 随着危重病的深入研究, 人们逐渐认识到胃肠道是机体最大的细菌及毒库, 是许多感染的发生地, 不仅是消化系统危重病急症, 而且其他系统的危重病急症与胃肠的关系也非常密切. 已有学者称胃肠道为MODS的“始动器官”. 因此在救治危重病急症中要加强对胃肠功能的维护, 特别是对胃肠屏障功能的保护.

3.1 胃肠功能与胃肠屏障保护问题

3.1.1 胃肠道屏障功能损害在危重病发病中的意义: 胃肠道屏障功能损害在MODS中的作用日益受到重视, 生理情况下人体有3道生理屏障阻止和清除进入体内的细菌和毒素. 在严重创伤、休克、感染等许多病理情况下, 可造成胃肠黏膜屏障功能损害, 导致胃肠道内的细菌移位和内毒素吸收, 诱发白细胞系统释放大量炎性介质和细胞因子, 引起全身炎症反应综合征(SIRS)和MODS.

在大量的临床病例观察中发现: (1)重危患者无论其原发病因是否感染, 在其整个病程过程中, 均可能出现感染, 而且感染的细菌大都为肠道正常菌丛. (2)白血病、骨髓移植和严重烧伤患者尽管置于无菌隔离病房, 仍然有很高的感染率, 其细菌培养表明感染菌种基本是肠道居留菌. (3)上述患者给予静脉抗生素或SDD(selected digestive decontmamination, 选择性消化道去污染)疗法可显著降低感染的发生率. (4)过度应用广谱抗生素可导致“二重感染”[3,15-16]. (5)有胃肠功能障碍的危重病患者MODS发生率和病死率高于无胃肠功能障碍的危重病患者[17].

同时, 在动物实验中也发现, (1)小肠和结肠细胞增生快, 覆盖面积广, 故能量需求高, 代谢快[18]. (2)免疫学研究发现肠道存在大量黏膜内淋巴细胞、Peyer小结、分泌性IgA, 淋巴滤泡和系膜淋巴结等(统称为GALT), 在受到应激刺激时, 会发生剧烈地免疫反应[2]. (3)大量实验研究

发现肠黏膜上皮吞噬细菌和细菌越过上皮进入其他组织(即细菌易位)的现象, 说明了肠黏膜屏障的客观存在[3]. (4)给予同样肠外营养的动物, 切除肠道的动物较之未切除者, 对创伤和打击耐受性强、存活时间长、感染率低[19]. (5)无菌动物对应激刺激耐受较普通动物好, 感染发生率低[19].

因此, 可以认为, 胃肠道是机体应激反应和危重症发病的中心环节之一. 在治疗危重病急症的过程中, 必须注意维护胃肠黏膜屏障功能的完整, 防止胃肠功能障碍.

3.1.2 *胃肠黏膜屏障功能保护措施*: 寻求保护胃肠功能, 阻止因胃肠黏膜屏障功能障碍导致的多脏器损伤的方法, 是防治危重病急症和MODS的关键. 目前对于胃肠黏膜屏障功能保护的研究主要集中在以下方面. (1)胃管注入胃肠黏膜保护剂: 以往对于胃肠功能障碍传统采用抑酸剂及胃肠动力药, 效果较差. 应用抑酸剂使胃酸降低, 过度碱化, 反而促使胃肠道细菌过度繁殖, 导致细菌易位, 引起肠源性肺损伤、肠源性脓毒血症加剧MODS的发展[20]. 因此如无应激性胃肠出血, 我们不建议使用抑酸剂. 黏膜保护剂思密达可与黏蛋白结合成特殊黏膜保护层, 可防止肠道菌群的移位, 吸附胃肠毒素. (2)尽早肠内营养: 早期肠内营养尤其是带有免疫调节成分如精氨酸、多不饱和脂肪酸、核糖核酸、谷氨酰胺等的营养物质可防止肠黏膜萎缩, 减少肠内细菌移位和脓毒性并发症的发生[21]. 在腹部手术后如果病情容许, 宜尽早肠内营养. 南京军区总医院黎介寿院士指出: “当胃肠道能够被安全使用时, 使用他”. 危重患者在应激状态下, 胃肠黏膜屏障功能更易受损, 更易发生细菌及内毒素易位, 增加肠源性感染与MODS的发生率. 而肠内营养的优势在于其有助于维持胃肠黏膜细胞的结构和功能完整, 减少内毒素释放与细菌易位, 保持胃肠道固有菌丛正常生长, 防止发生菌群失调, 刺激sIgA以及胃酸与蛋白酶的分泌, 从而维护其机械、免疫应激状态下与生物屏障, 刺激消化性激素分泌, 促进胃肠蠕动, 增加内脏血流, 改善胃肠道血流灌注与氧供应. (3)补充特殊营养物质如膳食纤维、谷胺酰氨、精氨酸等: 谷胺酰胺作为短链脂肪酸的前体, 在维持小肠运动和结肠黏膜的结构和功能中起到重要作用, 可防止细菌穿过小肠, 增进结肠血流, 保护胃肠黏膜屏障. 短链脂肪酸是结肠黏膜的重要能源物质, 而且他可转化为包括谷胺酰氨在内的多种氨基酸, 增加肠道血流量和刺激胰腺分泌, 预防肠黏膜萎缩, 减少肠道细菌易位[22].

谷胺酰氨是肠道的主要能量来源, 占70%以上, 肠道也是谷胺酰氨最主要的消耗器官. 大量研究表明, 谷胺酰氨能促进氮平衡, 保持胃肠黏膜完整, 防止细菌易位和肠道毒素进入血液.

精氨酸是一种半必须氨基酸, 应激状态下有降低蛋自质分解, 调节免疫, 提高巨噬细胞的杀菌力和减少肠道细菌易位. (4)大黄粉胃管注入或灌肠: 中医理论认为大黄有攻下泻火、荡涤肠胃、清热解毒和凉血行淤等功能, 其主要成分是大黄素、大黄酸、芦荟等. 研究表明, 大黄能保护胃肠黏膜上皮细胞间的紧密连接, 提高危重症患者胃肠黏膜内pH值, 改善胃肠黏膜的血流灌注, 降低胃肠黏膜的通透性, 抑制胃肠道细菌易位, 降低内毒素含量, 又能促进胃肠蠕动, 保护胃肠黏膜屏障, 对危重症患者胃肠功能的维护起到重要作用[23]. 大黄还可减轻毛细血管的通透性, 改善其脆性, 并能增加血小板含量, 促进血液凝固, 对消化道出血有止血作用. (5)大剂量维生素C: 应用维生素C作为氧自由基清除剂, 能降低应激状态下大量氧自由基产生, 对危重症患者来说是有益的. 从胃肠功能维护上看, 有动物实验表明, 维生素C对烫伤后大鼠胃肠黏膜屏障有明显保护作用, 为危重症患者肠源性感染的防治提供一个重要方法[24]. (6)丹参配合肠内营养: 徐杰[25]发现, 丹参抗氧化和肠内营养的协同作用不仅可以提供患者的营养底物, 同时有利于减少机体的氧化应激, 保护肠道的屏障功能, 从而减缓疾病的进展, 提高疾病的治疗效果.

3.2 *维持机体内环境稳定* 处理好酸碱失调, 有利于维持血压的稳定和细胞的正常代谢, 调整电解质失衡, 尤其是血液中钾离子和钠离子浓度的稳定.

3.3 *关注肝肾功能* 当肝肾功能受损, 可造成机体毒素排泄障碍, 免疫功能下降, 凝血机制障碍, 水电解质代谢紊乱. 救治过程中避免使用对肝肾功能有损害的药物, 防止肝功能衰竭, 尽早做好“三利”: 利胆、利尿、利便和“三防”: 防出血、防感染、防内环境紊乱.

3.4 *注意血糖的变化* 危重病出现血糖增高可造成机体感染机会增加和脑、肺、心等重要器官的损害, 重点是观察血糖变化, 用好胰岛素, 调节血糖.

3.5 *用好中医中药* 通腑攻下法, 代表中药, 大黄,

■**名词解释**

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS): 指严重创伤、感染(休克、重型胰腺炎)、急性中毒或病理产科等原发病发生24 h后, 同时或序贯发生两个或两个以上脏器功能失常的临床综合征. 患者在发生MODS前机体原有器官功能基本良好, 功能损害属可逆性, 一旦发病机制阻断, 器官功能可望恢复.

■同行评价
本文既有理论方面的归纳, 又有临床实践经验的总结, 具有很好的参考价值和较强的可读性.

可改善胃肠的微循环, 又可将残留在胃肠黏膜的毒素及时排出. 清热解毒法, 代表中药, 血必静、痰热清、醒脑静等, 可清除血液中的毒素和感染并发症引起的高热不退等. 活血祛瘀法, 代表中药复方丹参注射液, 可改善微循环障碍, 实践中防治急性肾功能衰竭有较好的疗效. 补气补阴扶正法, 代表药有生脉注射液, 对中毒性心肌炎引起的低血压和机体抵抗力低下有较好的帮助.

4 参考文献

1 Border JR. Multiple systems organ failure. *Ann Surg* 1992; 216: 111-116
2 Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K, Krajci P, Kvale D, Rognum TO, Scott H, Sollid LM. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 1989; 97: 1562-1584
3 MacFie J. Enteral versus parenteral nutrition: the significance of bacterial translocation and gut-barrier function. *Nutrition* 2000; 16: 606-611
4 Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996; 20: 411-417
5 Landow L, Andersen LW. Splanchnic ischaemia and its role in multiple organ failure. *Acta Anaesthesiol Scand* 1994; 38: 626-639
6 Moore FA. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 1999; 178: 449-453
7 Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Weisbrodt NW, Moore FA. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001; 15: 1-10
8 Magnotti LJ, Upperman JS, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock. *Ann Surg* 1998; 228: 518-527
9 Zallen G, Moore EE, Tamura DY, Johnson JL, Biffl WL, Silliman CC. Hypertonic saline resuscitation abrogates neutrophil priming by mesenteric lymph. *J Trauma* 2000; 48: 45-48
10 Adams JM, Hauser CJ, Adams CA Jr, Xu DZ, Livingston DH, Deitch EA. Entry of gut lymph into the circulation primes rat neutrophil respiratory burst in hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 2001; 29: 2194-2198
11 Wyncoll DL. The management of severe acute necrotising pancreatitis: an evidence-based review of the literature. *Intensive Care Med* 1999; 25: 146-156
12 张喜平, 戴金, 陈汉卿. 重症急性胰腺炎心脏损伤临床表现与机制研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 611-617
13 Ding X, Liu CA, Gong JP, Li SW. Pancreatic encephalopathy in 24 patients with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 608-611
14 葛海燕, 王敖川. 急性重症胰腺炎并发症的防治. 普外临床 1994; 9: 295-297
15 Wilmore DW, Smith RJ, O'Dwyer ST, Jacobs DO, Ziegler TR, Wang XD. The gut: a central organ after surgical stress. *Surgery* 1988; 104: 917-923
16 Naaber P, Smidt I, Tamme K, Liigant A, Tapfer H, Mikelsaar M, Talvik R. Translocation of indigenous microflora in an experimental model of sepsis. *J Med Microbiol* 2000; 49: 431-439
17 时兢, 宋秀琴, 陆荣国, 俞娅芬, 陈鸣宇, 衡军峰, 王烨. 危重病患者胃肠功能障碍与预后关系的临床研究. 中国综合临床 2005; 21: 1095-1096
18 MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, Sudworth P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 1999; 45: 223-228
19 Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29: 189-201
20 Doig CJ, Sutherland LR, Sandham JD, Fick GH, Verhoef M, Meddings JB. Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 444-451
21 Tazuke Y, Wasa M, Shimizu Y, Wang HS, Okada A. Alanyl-glutamine-supplemented parenteral nutrition prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2003; 27: 110-115
22 McAndrew HF, Lloyd DA, Rintala R, van Saene HK. Intravenous glutamine or short-chain fatty acids reduce central venous catheter infection in a model of total parenteral nutrition. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 281-285
23 陈德昌, 景炳文, 杨兴易, 宋志芳, 严鸣, 赵良, 单红卫, 余康龙, 张翔宇, 马钧. 大黄对危重症患者胃肠道的保护作用. 中国危重病急救医学 2000; 12: 87-90
24 陈德昌, 景炳文. 大剂量维生素C对肠粘膜屏障保护作用的实验研究. 中国急救医学 1994; 14: 8-11
25 徐杰. 危重病患者肠黏膜屏障的变化与肠内营养. 中国中西医结合急救杂志 2004; 11: 385-387

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3357-3359
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

非幽门螺杆菌非NSAID药物相关性溃疡

张小晋

张小晋, 北京积水潭医院消化内科 北京市 100035
张小晋, 主任医师, 中国医科大学毕业, 主要从事消化内科, 专于胃肠疾病、肝病及内窥镜诊治.
通讯作者: 张小晋, 100035, 北京西城区新街口东街31号, 北京积水潭医院. zhangxiaojin1030@yahoo.com.cn
电话: 010-58517188
收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-08-26

Peptic ulcer disease not related to *Helicobacter pylori* or non-steroidal anti-inflammatory drugs

Xiao-Jin Zhang

Xiao-Jin Zhang, Department of Gastroenterology, Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China
Correspondence to: Xiao-Jin Zhang, Beijing Jishuitan Hospital, 31 Xinjiekou East Street, Xicheng District, Beijing 100035, China. zhangxiaojin1030@yahoo.com.cn
Received: 2007-05-18 Revised: 2007-08-26

Abstract

Helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely accepted as the most important factors in the pathogenesis of peptic ulcers. However, the proportion of *H pylori*-negative peptic ulcers without intake of NSAIDs appears to have increased in recent years. The reason is partly related to a decreased prevalence of *H pylori* among the population and more effective eradication of the bacterium, and it is also related to the defense measures for NSAIDs. The etiological factors involved in peptic ulcer disease not caused by *H pylori* or NSAIDs include altered acid secretion, abnormal gastric emptying, defective mucosal defense mechanisms, psychological stress, smoking, genetic predisposition and other chronic diseases. The main therapeutic measures include anti-secretory drugs and mucosal protectants.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Non-steroid anti-inflammatory drugs; Peptic ulcer

Zhang XJ. Peptic ulcer disease not related to *Helicobacter pylori* or non-steroidal anti-inflammatory drugs. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3357-3359

摘要

幽门螺旋杆菌(*H pylori*)和非甾体类抗炎药(NSAIDs)已被公认为消化性溃疡的两个最主要的病因. 近年来, 越来越多的临床证据表明, 非*H pylori*和非NSAID溃疡的发生比例正在逐渐增加. 这可能与*H pylori*感染率的降低以及临床规范的根除*H pylori*治疗有关, 同时也与使用NSAIDs时注意防范其对胃肠道的损害有关. 非*H pylori*和非NSAIDs溃疡病与胃酸分泌变化、胃排空异常、胃黏膜防御机制下降、应激、吸烟、遗传以及其他慢性疾病有关. 在治疗上抑制胃酸, 保护胃黏膜仍然是主要的手段. 对这类溃疡病治疗上应更积极.

关键词: 幽门螺杆菌; 非甾体类抗炎药; 消化性溃疡

张小晋. 非幽门螺杆菌非NSAID药物相关性溃疡. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3357-3359
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3357.asp

■背景资料
幽门螺旋杆菌(*H pylori*)和非甾体类抗炎药(NSAIDs)已被公认为消化性溃疡的两个最主要的病因. 近年来, 越来越多的临床证据表明, 非*H pylori*和非NSAID溃疡的发生比例正在逐渐增加. 本文阐述这一类溃疡的流行病学、病因、发病机制和治疗等方面的研究情况.

0 引言

消化性溃疡病的病因目前还不是很清楚. 近年来多认为胃酸分泌异常和幽门螺杆菌(*H pylori*)感染引起的炎症是发生溃疡病的主要病因. 还有一部分溃疡病是应用非甾体类抗炎(NSAID)药引起. 目前李益农 *et al*[1]根据病因将溃疡病分为*H pylori*相关性溃疡(*H pylori* associated ulcer), NSAID引起的溃疡(NSAID-induced ulcer)和非*H pylori*非NSAID溃疡, 这有利于指导临床诊断和治疗. 本文就非*H pylori*非NSAID溃疡的流行病学、病因、发病机制和临床的处理等相关问题进行讨论.

1 流行病学

有证据表明, 随着*H pylori*感染率的下降, 非*H pylori*非NSAID溃疡占消化性溃疡的比例正在逐渐增加[2]. 美国一项回顾性分析表明, 在未使用NSAID的溃疡病患者中, 47%白人和22%的非白人*H pylori*检测结果阴性, 而这组患者溃疡病总发病率为39%[3]. 另一份材料分析表明, 在美国复发性十二指肠球部溃疡患者中, 非*H pylori*

■同行评价
本文论述全面, 内容丰富, 层次清楚, 有一定的科学意义.

非NSAID溃疡占20%[4]. 还有一份荟萃分析指出, 52%的十二指肠溃疡和47%的胃溃疡不是由于*H pylori*感染引起[5]. 美国Ciociola *et al*[6]回顾性荟萃分析6个临床试验的2910个病例的结果指出, 大约有27%的溃疡患者是非*H pylori*感染和非NSAID引起的. 西班牙Arroyo *et al*[7]的一项调查发现, 在西班牙不同地区754例消化性溃疡病的患者中, 非*H pylori*感染和非NSAID的十二指肠溃疡占1.6%, 胃溃疡占4.1%. 日本Nishikawa *et al*[8]分析了398例胃、十二指肠溃疡病例, 非*H pylori*感染非NSAID溃疡仅占1.4%. 香港一项较大规模的前瞻性研究发现977例上消化道出血的患者中, 非*H pylori*感染非NSAID的患者占4.1%[9]. Yakoob *et al*[10]的一组回顾性分析资料表明, 217例溃疡患者中, 非*H pylori*感染和非NSAID的患者62例, 占这组患者的29%. 人群中*H pylori*感染率的不同可以解释这种*H pylori*感染非NSAID溃疡病发病率具有明显的东西方地域差异. 我国目前尚没有这方面的流行病学数据. 崔春吉 *et al*[11]报告了一组330例胃溃疡患者的内镜分析, 其中*H pylori*阴性患者146例, 占44.24%, 而且病因多样化.

随着临床医师对*H pylori*感染和服用NSAID药物引起的溃疡病的深入认识, 和根除*H pylori*感染规范治疗在临床的广泛应用以及对服用NSAID预防措施的加强, 这两种主要病因引起的溃疡病正在逐渐减少. 相应的临床诊断非*H pylori*感染非NSAID的溃疡病患者的比率将有所增加, 在临床的诊断、治疗上应引起高度的重视.

2 病因

幽门螺旋杆菌感染和非甾体抗炎药是引起溃疡的主要病因已经得到共识, 但并非所有溃疡病均为这两种原因所致. 上述的流行病学资料提示, 还应该考虑一些相对少见的其他因素. 在所有已经明确的引起溃疡病的病因除外后的溃疡病, 被称为所谓的“特发性溃疡病”. 目前认为所谓的“特发性溃疡病”的发病是以下几种致病因子相互作用的结果[12]. (1)应激状态: 包括身体的应激(激烈运动、颅脑损伤、烧伤等), 心理的应激(高度紧张、剧烈悲痛、情绪不良等), 机械损伤(胃结石、异物等), 胃肠道严重的感染, 营养的严重缺乏等[12-13]. (2)高酸分泌: 胃泌素瘤; 卓-艾氏综合征(Zollinger-Ellison syndrome)等. (3)胃动力障碍: 常见的是胆汁反流、还有胃排空异常(加快、减慢等). (4)其他较常见病因: 吸烟(吸烟者溃疡病率与吸烟量呈正相关)、饮酒、遗传因素等[2,12,14]. (5)其他慢性疾病: 如克隆氏病、甲状旁腺功能亢进、Billroth Ⅱ胃大部切除术后的胃窦旷置综合征、肺气肿、冠心病、动脉硬化、慢性肝病等.

3 发病机制

无论何种病因引起的溃疡病, 其发病机制和病理生理基础一直被认为是胃黏膜的攻击因子和防御因子失去平衡所致, 即溃疡病发病的“天平学说”. 目前认为无单一致病模式, 是多种因素综合作用的结果. “无酸, 无溃疡”仍然是共识和治疗溃疡病的基础. (1)应激状态: 人在应激状态下可通过神经内分泌系统增加胃酸的分泌, 同时又影响胃肠道黏膜的血液营养供应, 减弱胃黏膜的防御功能从而引起溃疡病. 如临床上经常遇到一些患者(包括运动员)在过度劳累或终日处于紧张状态时出现消化道溃疡甚至出血. (2)胃动力障碍: 目前认为, 幽门功能异常, 十二指肠内容物返流到胃内, 其中胆酸(尤其是脱氧胆酸)、溶血磷脂酰胆碱和抑肽酶, 均能对胃黏膜造成直接损伤而导致溃疡. 胃排空障碍可以使食糜在胃窦潴留, 刺激胃窦G细胞分泌胃泌素增加, 胃泌素又刺激胃壁细胞分泌盐酸, 从而增加攻击因子对胃黏膜的损伤作用. 相反, 胃排空过快, 也可导致胃酸对胃黏膜的损伤加剧[12]. (3)吸烟和饮酒: 烟草中含有的尼古丁成分有损伤胃黏膜的作用, 长期吸烟还可使胃酸分泌过多, 使胆汁返流进入胃而破坏胃黏膜, 抑制胰分泌HCO_3^-, 中和胃酸的能力下降, 并可造成黏膜中前列腺素含量降低, 而前列腺素有保护胃肠道黏膜的作用. 酒精可刺激胃酸分泌, 对胃黏膜也有直接损伤作用. 有饮酒嗜好同时又经常吸烟者, 更易发生溃疡病. (4)遗传: 溃疡病患者家庭中的再发率风险高, 单卵双胞胎同时发生溃疡的几率在50%以上, 在十二指肠溃疡患者中O型血较其他血型多见. (5)其他慢性疾病的影响: 患肺气肿的患者, 十二指肠溃疡发生率比正常人高3倍. 冠心病、动脉硬化会造成胃黏膜供血不佳, 可影响溃疡的愈合. 肝硬化患者由于门静脉高压所致的消化性溃疡发生率是普通人群的2-3倍, 乙肝病患者表面抗原阳性, 胃溃疡发病率高达33%.

4 治疗

Quan *et al*[12]指出, 非*H pylori*感染非NSAID溃疡的患者, 出现并发症的机率更高, 所以治疗上要更积极, 有时需要长期维持治疗. 上文提到的“无酸, 无溃疡”仍然是治疗溃疡病的基础. 抑

制胃酸是治疗的基本方法和主要手段. 胃黏膜保护剂可以保护胃及十二指肠黏膜屏障, 加强黏膜防御功能, 也是消化性溃疡病治疗的重要手段. 还可辅以促进胃动力药的治疗. (1)抑酸药: 目前认为, 在抑制胃酸的治疗中, 质子泵抑制剂(PPIs)是首选药物, 其治疗目的主要是充分抑制胃酸分泌以促进溃疡愈合及预防复发[5]. 剂量可因病情而异, 但不能少于常规剂量(如奥美拉唑40-80 mg/d, 埃索美拉唑40-80 mg/d, 兰索拉唑30-60 mg/d). H_2-受体拮抗剂(H_2-RA)也是经常选择的抑酸药物, 但随着抑酸疗程的延长胃壁细胞对其敏感性会逐渐下降. 一般睡前服用单剂量H_2-RA(如西咪替丁800 mg, 雷尼替丁300 mg, 法莫替丁40 mg, 尼扎替丁300 mg)6-8 wk, 大部分溃疡病可以愈合. PPIs则可使溃疡愈合时间缩短至上述的1/2或1/3. (2)胃黏膜保护剂: 胶体铋剂、硫糖铝、前列腺素、替普瑞酮(施维舒)、生长抑素、表皮生长因子等可以中和胃酸, 改进胃黏膜血流, 促进胃液中重碳酸盐、糖蛋白等防御因子的分泌, 促进前列腺素和合成, 有强烈的吸附作用等, 提高胃黏膜屏障对攻击因子的防御作用. 大量临床资料已经充分显示, 胃黏膜保护剂可使溃疡愈合质量提高, 并使其复发率明显降低. (3)胃肠动力药物等: 在胃动力障碍, 胆汁反流为主要病因的患者中, 在应用降低胃酸药物的同时, 必须同时应用促胃肠动力药物, 以促进胃内食物的排空, 增加食管下括约肌的张力, 以减少反流. 常用的药物有: 甲氧氯普胺(胃复安), 多潘立酮(吗丁啉), 西沙必利, 莫沙必利, 替加色罗等. 铝碳酸镁可在酸性环境下结合胃内胆汁酸, 持续阻止胆酸和胃蛋白酶对胃黏膜的损伤, 迅速中和胃酸, 增强胃黏膜保护因子的作用[15]. 另外, 熊去氧胆酸能抑制胆酸的合成, 服用后胆汁中大量的胆酸排出, 使胃液中的胆酸、石胆酸、脱氧胆酸含量明显降低, 使胆汁对胃黏膜的损伤减少, 因此也可以应用. (4)原发病治疗: 如消除和缓解身体和精神上的应激状态, 戒烟戒酒, 手术清除胃泌素瘤. 积极治疗引起溃疡病的心脏疾病、呼吸系统疾病、门脉高压症、克隆氏病、甲状旁腺功能亢进等原发病有利于溃疡病的痊愈[16].

由于对消化性溃疡发病机制的深入研究, 目前非*H pylori*非NSAID溃疡正在引起重视和关注, 在诊断和治疗上也有进一步的研究和认识. 由于治疗药物的不断发展, 内科治疗溃疡病, 特别是对非*H pylori*非NSAID溃疡可以取得良好的疗效.

5 参考文献

1 李益农, 陆星华. 消化内镜学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2004: 351

2 李晓波, 张德中. 非幽门杆螺菌非NSAID溃疡. 国外医学•消化系疾病分册 2003; 23: 355-356

3 Jyotheeswaran S, Shah AN, Jin HO, Potter GD, Ona FV, Chey WY. Prevalence of Helicobacter pylori in peptic ulcer patients in greater Rochester, NY: is empirical triple therapy justified? *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 574-578

4 Laine L, Hopkins RJ, Girardi LS. Has the impact of Helicobacter pylori therapy on ulcer recurrence in the United States been overstated? A meta-analysis of rigorously designed trials. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1409-1415

5 Freston JW. Review article: role of proton pump inhibitors in non-H. pylori-related ulcers. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15 Suppl 2: 2-5

6 Ciociola AA, McSorley DJ, Turner K, Sykes D, Palmer JB. Helicobacter pylori infection rates in duodenal ulcer patients in the United States may be lower than previously estimated. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1834-1840

7 Arroyo MT, Forne M, de Argila CM, Feu F, Arenas J, de la Vega J, Garrigues V, Mora F, Castro M, Bujanda L, Cosme A, Castiella A, Gisbert JP, Hervas A, Lanas A. The prevalence of peptic ulcer not related to Helicobacter pylori or non-steroidal anti-inflammatory drug use is negligible in southern Europe. *Helicobacter* 2004; 9: 249-254

8 Nishikawa K, Sugiyama T, Kato M, Ishizuka J, Komatsu Y, Kagaya H, Katagiri M, Nishikawa S, Hokari K, Takeda H, Asaka M. Non-Helicobacter pylori and non-NSAID peptic ulcer disease in the Japanese population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 635-640

9 Chan HL, Wu JC, Chan FK, Choi CL, Ching JY, Lee YT, Leung WK, Lau JY, Chung SC, Sung JJ. Is non-Helicobacter pylori, non-NSAID peptic ulcer a common cause of upper GI bleeding? A prospective study of 977 patients. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 438-442

10 Yakoob J, Jafri W, Jafri N, Islam M, Abid S, Hamid S, AliShah H, Shaikh H. Prevalence of non-Helicobacter pylori duodenal ulcer in Karachi, Pakistan. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3562-3565

11 崔春吉, 金海燕, 裴风郁. 幽门螺杆菌阴性胃溃疡146例内镜分析. 吉林医学 2001; 22: 103-104

12 Quan C, Talley NJ. Management of peptic ulcer disease not related to Helicobacter pylori or NSAIDs. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2950-2961

13 Davidson G, Kritas S, Butler R. Stressed mucosa. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2007; 59: 133-142; discussion 143-146

14 于皆平, 沈志祥, 罗和生. 实用消化病学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2007: 248

15 陈灏珠. 实用内科学. 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1869-1875

16 Tomassetti P, Campana D, Piscitelli L, Mazzotta E, Brocchi E, Pezzilli R, Corinaldesi R. Treatment of Zollinger-Ellison syndrome. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5423-5432

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3360-3366
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

中药降脂颗粒对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏瘦素受体mRNA及P-JAK2/P-STAT3的影响

马赞颂, 柳 涛, 郑培永, 邢练军, 季 光

■背景资料
随着人民生活水平的提高, 脂肪肝的发病率逐年上升. 然而, 现代医学对NAFLD的病理机制尚不清楚, 亦无理想的防治药物, 而中医药对防治NAFLD具有较好的疗效, 越来越被广大患者所接受.

马赞颂, 柳涛, 郑培永, 邢练军, 季光, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科 上海中医药大学脾胃病研究所 上海市 200032
马赞颂, 上海中医药大学2004级医学硕士, 从事中医药防治慢性肝病的研究.
教育部新世纪优秀人才支持计划, 上海市中药现代化专项资助项目, No. 05DZ19702-4
国家自然科学基金资助项目, No. 30772802
通讯作者: 季光, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科, 上海中医药大学脾胃病研究所. jiliver@vip.sina.com
电话: 021-64868999 传真: 021-64286261
收稿日期: 2007-07-13 修回日期: 2007-10-23

Effect of Jiangzhi granules on expression of leptin receptor mRNA, P-JAK2 and P-STAT3 in rats with non-alcoholic fatty liver disease

Zan-Song Ma, Tao Liu, Pei-Yong Zheng, Lian-Jun Xing, Guang Ji

Zan-Song Ma, Tao Liu, Pei-Yong Zheng, Lian-Jun Xing, Guang Ji, Department of Gastroenterology, Institute of Spleen and Stomach Diseases, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Supported by: Shanghai Chinese Medicine Modernization Special Purpose Program, Supporting Project for Elitists in New Century of the Ministry of Education, No. 05DZ19702-4; National Natural Science Foundation of China, No. 30772802
Correspondence to: Dr. Guang Ji, Department of Gastroenterology, Institute of Spleen and Stomach Diseases, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 Wanping South Road, Shanghai 200032, China. jiliver@vip.sina.com
Received: 2007-07-13 Revised: 2007-10-23

Abstract

AIM: To study the effect of Jiangzhi granules on non-alcoholic fatty liver disease in rats, and on the expression of leptin receptor mRNA, P-JAK2 and P-STAT3 in the liver.

METHODS: Sixty-eight male Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: blank group (n = 8), fed a normal diet; Model group (n = 60), fed high fat diet, Fifty-eight rats in Model group were randomly divided into five groups: control group (n = 10), Jiangzhi granules low-dose group (n = 12), Jiangzhi granules moderate dose group (n = 12), Jiangzhi granules high-dose group (n = 12) and Dongbao Gantai (DB) group (n = 12). We examined the effect of traditional Chinese medicine and DB on liver/body weight ratio, expression of leptin receptor mRNA (RT-PCR), P-JAK2 (Western blotting), P-STAT3 (Western blotting), triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) in liver tissue.

RESULTS: In the low-, moderate- and high-dose groups, Jiangzhi granules significantly reduced liver lipid (TG, TC) levels, improved steatosis, reduced hepatitis, and significantly reduced the high level of serum leptin (193.02 ± 23.8 ng/L, 163.97 ± 31.38 ng/L, 147.83 ± 17.59 ng/L *vs* 317.22 ± 39.26 ng/L, P < 0.01), improved leptin resistance, increased expression of leptin receptor mRNA (1.87 ± 0.06, 2.20 ± 0.04, 2.78 ± 0.04 *vs* 1.50 ± 0.05, P < 0.01), P-JAK2 (119.88 ± 2.98, 123.45 ± 0.68, 124.34 ± 3.42 *vs* 113.15 ± 1.27, P < 0.01) and P-STAT3 (94.15 ± 0.78, 100.18 ± 3.33, 101.94 ± 2.20 *vs* 89.06 ± 0.69, P < 0.01).

CONCLUSION: Jianghzhi granules effectively improve liver function, hepatitis and steatosis. Jiangzhi granules can increase expression of leptin receptor mRNA, p-JAK2 and p-STAT3 in liver tissue.

Key Words: Jiangzhi granules; Dongbao Gantai; Non-alcoholic fatty liver disease; Leptin; Leptin receptor mRNA; P-JAK2; P-STAT3

Ma ZS, Liu T, Zheng PY, Xing LJ, Ji G. Effect of Jiangzhi granules on expression of leptin receptor mRNA, P-JAK2 and P-STAT3 in rats with non-alcoholic fatty liver disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3360-3366

摘要

目的: 观察降脂颗粒对非酒精性脂肪肝大鼠的治疗作用及其对血清瘦素、肝组织瘦素受体mRNA、P-JAK2/P-STAT3蛋白含量表达的影响.

方法: 将60只SD♂大鼠, 随机分为空白组(正

常饮食)和造模组(高脂饮食). 待造模成功后将造模组大鼠随机分为模型对照组、降脂颗粒低、中、高剂量组和东宝甘泰组. 治疗4 wk后行肝组织生化和病理学检测, 并同时应用ELISA试剂盒检测血清瘦素, RT-PCR法检测肝组织瘦素受体mRNA表达, 应用Western blot检测肝组织P-JAK2和P-STAT3蛋白的表达.

结果: 低、中、高剂量组降脂颗粒能明显降低非酒精性脂肪肝大鼠模型肝脂(TG和TC)水平, 改善脂肪变性, 降低肝脏炎症反应, 并能明显降低血清瘦素高水平状态(193.02±23.8 ng/L, 163.97±31.38 ng/L, 147.83±17.59 ng/L *vs* 317.22±39.26 ng/L, $P<0.01$), 改善瘦素抵抗, 同时增加瘦素受体mRNA的表达(1.87±0.06, 2.20±0.04, 2.78±0.04 *vs* 1.50±0.05, $P<0.01$), 增加肝组织P-JAK2和P-STAT3蛋白的含量(119.88±2.98, 123.45±0.68, 124.34±3.42 *vs* 113.15±1.27, $P<0.01$; 94.15±0.78, 100.18±3.33, 101.94±2.20 *vs* 89.06±0.69, $P<0.01$).

结论: 降脂颗粒对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏脂质和炎症有较好的治疗作用, 其可能机制是改善瘦素抵抗, 增加肝脏瘦素受体mRNA表达及P-JAK2, P-STAT3蛋白含量.

关键词: **降脂颗粒**; **东宝甘泰**; **非酒精性脂肪肝**; Leptin; **瘦素受体** mRNA; P-JAK2; P-STAT3

马赞颂, 柳涛, 郑培永, 邢练军, 季光. 中药降脂颗粒对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏瘦素受体mRNA及P-JAK2/P-STAT3的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3360-3366
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3360.asp

0 引言

肝脏是脂肪代谢的主要场所, 非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是肝脏脂肪代谢异常所导致的肝内三酰甘油(triacylglyceride, TG)蓄积过多的一种病理状态[1]. 该病与中心性肥胖、2型糖尿病、代谢综合征(肥胖、血脂障碍、胰岛素抵抗和高血压等)多囊卵巢综合征以及高三酰甘油血症等密切相关[2]. 目前认为该病的发病机制主要是"二次打击学说", 第一次打击是胰岛素抵抗引起的脂肪在肝细胞的沉积, 第二次打击是在脂肪沉积的基础上的脂质过氧化、氧化应激和异常的细胞因子等参与的炎症反应形成脂肪性肝炎. 最近有临床研究显示, leptin在NAFL、肥胖、非酒精性脂肪性肝炎患者中血清水平升高[3-5]. 动物实验也提示leptin在NAFL、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎中表达增高, 在促进炎症、促进肝纤维化中起主要作用[6-8]. 然而, 其确切机制尚不清楚. 现代医学尚无特效药物治疗该病. 因此, 寻找治疗NAFLD的有效药物亦是当务之急. 降脂颗粒系龙华医院院内制剂, 全方由绞股兰15 g、虎杖15 g、丹参9 g、茵陈9 g、干荷叶6 g五味中药组成, 长期应用于临床, 安全而有效. 我们通过高脂饮食诱导NAFLD大鼠模型, 观察降脂颗粒对NAFLD大鼠的治疗作用及其对血清瘦素、肝组织瘦素受体mRNA、P-JAK2、P-STAT3蛋白含量表达的影响, 探讨降脂颗粒治疗NAFLD的可能机制.

■研发前沿
Leptin在非酒精性脂肪性肝中的作用日益受到大家的重视. 大部分临床和实验研究显示, leptin在非酒精性脂肪性肝、非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化中表达升高. 本实验结果与此一致, 并探讨降脂颗粒对肝脏瘦素受体及其相关信号的影响.

1 材料和方法

1.1 *材料* 清洁级♂SD大鼠68只, 体质量180±30 g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司. 胆固醇, 购于国药集团化学试剂有限公司. TG和TC试剂盒购于南京建成生物工程研究所, leptin试剂盒购于上海森雄科技生物有限公司, RT-PCR试剂盒购于上海申能博彩生物科技有限公司, P-JAK2和P-STAT3试剂盒购于Santa Cruz公司, 降脂颗粒(绞股兰15 g, 虎杖15 g, 丹参9 g, 茵陈9 g, 干荷叶6 g)上海龙华医院提供, 东宝甘泰片, 通化东宝药业股份有限公司.

1.2 *方法* 大鼠适应性饲养1 wk, 按体质量随机分为造模组60只, 空白对照组8只. 造模组给予高脂饲料[9](880 g基础饲料+100 g猪油+20 g胆固醇/kg), 空白组给予普通饲料, 自由饮食饮水. 第4, 8周各处死1只造模组大鼠做肝脏病理HE染色, 以判断造模情况. 造模组大鼠随机分成降脂颗粒低(12只)、中(12只)、高剂量组(12只)、东宝甘泰组(12只)和模型对照组(10只). 降脂颗粒低、中、高剂量组分别以降脂颗粒干膏粉0.414 g, 0.828 g, 1.656 g/kg每日ig; 东宝甘泰组以0.15片/kg每日ig; 空白对照组及模型对照组分别给予等量的5 g/L CMC液. 治疗4 wk后取下肝脏, 称质量, 备检. 制备肝组织匀浆, 比色法测定肝脏TC和TG. 石蜡切片, HE染色, 光镜下观察肝脂肪变性和炎症程度. 肝细胞脂肪变性程度判断标准参照Diehl法[10], 炎症活动度计分标准参考1981年Knodell提出的慢性肝炎组织学活动指数(HAI)[11], 并结合王泰龄 *et al*[12]提出的慢性肝炎炎症活动度计分方案. 血清瘦素水平检测严格按照leptin ELISIA试剂盒说明书操作.

1.2.1 *肝脏瘦素受体mRNA测定*: 取肝组织100

■创新盘点
有研究显示提升瘦素水平是治疗脂肪肝的有效途径. 本实验则认为血中瘦素水平升高是致脂肪肝的危险因素, 提示降脂颗粒可以降低血瘦素水平, 并首次研究降脂颗粒对肝脏瘦素受体及P-JAK2和P-STAT3的影响.

mg按照TRIzol Reagent液说明书提取总RNA, 然后用紫外分光光度计定量. 按照试剂盒说明书进行cDNA的逆转录. 总RNA经RT反应后进行PCR扩增, leptin receptor (LR) mRNA上游序列: CAGGCAACACTGAAGGGAAGACG, 382 bp, 下游序列: CATCATCTGTGACTTCCATACGC 822 bp; β-actin上游序列: TGTGATGGTGGGTATGGGTCAGAAG, 207 bp, 下游序列: TCACGGTTGGCCTTAGGGTTCAGAG, 431 bp. 采用AMV 49 μL体系, 1st strand cDNA 10×PCR Buffer各5 μL, dNTP 1 μL, 目的基因正负链各2 μL, β-actin正负链各2 μL, Taq酶1 μL, DEPC H_2O 29 μL. 反应条件为: 95℃预变性5 min, 95℃ 30 s, 59℃ 40 s, 72℃ 1 min, 30次循环, 72℃延伸10 min. PCR产物加样于20 g/L琼脂糖凝胶, 上样量10 μL, 6×DNA loading Buffer 2 μL, 电压150 V, 电泳35 min, 紫外灯下观察, 凝胶分析系统拍照. 用密度扫描仪对特异性条带进行密度扫描, 测得其灰度值, 与相应的β-actin灰度之比表示leptin receptor mRNA的相对水平.

1.2.2 肝组织P-JAK2和P-STAT3蛋白含量的检测: 抗原蛋白提取后采用紫外分光光度计进行蛋白质定量. 取总蛋白50 μg, 加等量SDS凝胶加样缓冲液, 100℃变性3 min, 100 g/L十二烷基硫酸钠一聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳后, 采用半干式电转移仪(Bio-Rad公司), 参照厂家提供程序进行转膜. 转移结束后, 室温下用含50 g/L脱脂奶粉的PBS封闭2 h, 然后分别加入鼠抗人P-JAK2或P-STAT3 mAb(购自Santa Cruz公司, 工作浓度1∶1000)室温下振荡1 h, 再加入1∶5000稀释的二抗(HRP-GAMG购自Bio-Rad公司)室温下孵育1 h, 放射自显影: 曝光5 min, 用密度扫描仪进行密度扫描, 测得其灰度值, 与相应的β-actin灰度之比表示其蛋白含量.

统计学处理 计量资料以mean±SD表示, 组间比较采用方差分析; 等级资料采用秩和检验, 用SPSS12.0软件包进行数据统计.

2 结果

空白组大鼠精神充沛, 灵活好动, 饮食正常, 皮毛整洁. 模型组大鼠精神萎靡, 性情较温顺, 不喜动, 皮毛凌乱欠光泽. 用药组均有不同程度的活动减少, 饮食减少, 皮毛欠光泽.

2.1 对NAFLD大鼠肝脏指数的影响 高脂饮食可诱导大鼠NAFLD模型, 表现为模型大鼠肝质量增加, 肝脏指数明显升高(4.20±0.20 *vs* 2.54±0.23), 各组均能明显降低脂肪肝大鼠的肝脏指数(3.87±0.43, 3.64±0.25, 3.58±0.29), 与模型组比较有显著差异(P<0.05, P<0.01, P<0.01). 降脂颗粒高剂量组明显优于东宝甘泰组(3.88±0.39, P<0.05)和低剂量组(P<0.05).

2.2 肝脏病理学观察 空白对照组肝脏肉眼观察呈鲜红色, 边缘锐利, 表面光滑. 模型组肉眼见肝脏体积增大, 边缘变钝, 颜色呈土黄色, 质软, 与周围组织有粘连, 切面油腻状. 给药组部分肝脏接近正常, 表面呈浅黄色, 油腻状减轻, 指压有弹性. 正常对照组大鼠肝组织切片HE染色未见明显异常. 模型组大鼠所有标本的肝组织切片均可见弥漫性肝细胞脂肪变性, 主要为大泡性脂肪变性, 也有部分小泡性脂肪变性, 同时肝小叶内和汇管区有以大量单个核细胞为主的炎性细胞浸润, 以小叶内炎症为主, 部分大鼠肝组织小叶内坏死灶融合成片. 用药组肝脏病理有不同程度的改善, 轻度至中度脂肪变为主, 肝细胞形态大致正常, 大小较一致, 肝内脂肪滴减少, 散在分布, 核圆位于细胞中央. 在抗炎方面, 降脂颗粒组与东宝甘泰组具有统计学的差异(P<0.05, 图1, 表1).

2.3 对NAFLD大鼠肝脏脂质的影响 模型组大鼠肝脏TG、TC明显升高. 各用药组均能降低肝组织TG和TC水平(P<0.01, P<0.05), 降脂颗粒中、高剂量组明显优于东宝甘泰组(P<0.01). 在肝组织TG方面, 降脂颗粒高剂量组优于中、低剂量组(P<0.05, P<0.01), 中剂量组优于低剂量组(P<0.05), 高中低三组呈一定的量效关系(表1).

2.4 降脂颗粒对血清瘦素的影响 降脂颗粒和东宝甘泰均能明显降低NAFLD大鼠血清瘦素水平(P<0.01). 降脂颗粒中、高剂量组明显优于东宝甘泰组(P<0.01), 高剂量组优于低剂量组(P<0.01, 表2). LR mRNA在正常空白组肝组织呈高水平表达, 模型组肝组织LR mRNA呈低水平表达, 东宝甘泰及降脂颗粒各剂量均可增加LR mRNA的表达(P<0.01), 降脂颗粒高剂量组优于其他各组(P<0.01), 降脂颗粒中剂量组优于东宝甘泰组及降脂颗粒低剂量组(P<0.01, 表2, 图2).

2.5 降脂颗粒对肝组织P-JAK2和P-STAT3的影响 模型组大鼠肝组织P-JAK2和P-STAT3的蛋白含量均较正常组大鼠表达为低(P<0.05). 各用药组均可增加P-JAK2和P-STAT3的蛋白含量(P<0.05), 降脂颗粒高剂量组明显优于东宝甘泰组和低剂量组(P<0.01, P<0.05, 表3, 图3).

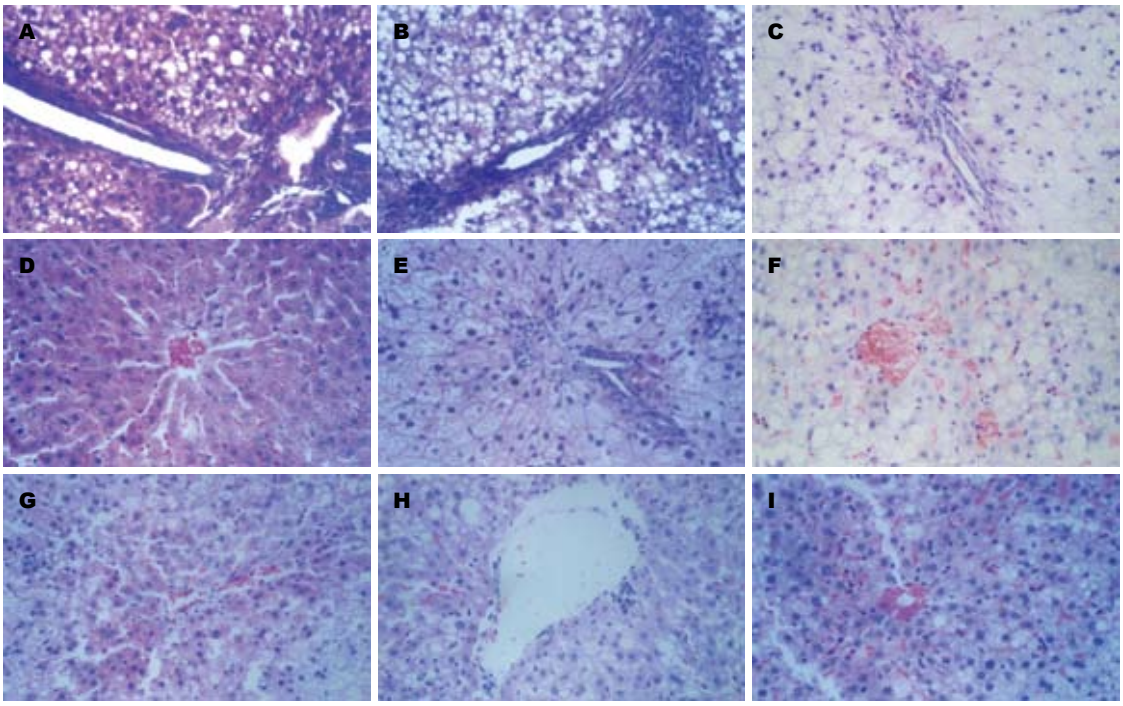


图 1 大鼠肝脏组织病理学(HE × 400). A: 模型组4 wk; B: 模型组8 wk; C: 模型组12 wk; D: 空白组; E: 模型组; F: 东宝甘泰组; G: 低剂量组; H: 中剂量组; I: 高剂量组.

■应用要点

本文结果提示leptin在非酒精性脂肪性肝中表达升高而肝组织瘦素受体mRNA表达降低, 中药降脂颗粒有降低leptin提高肝组织瘦素受体mRNA的作用. 实验表明, 降脂颗粒可增加P-JAK2和P-STAT3蛋白的含量, 提示降脂颗粒可能对瘦素JAK2/STAT3信号通路存在调节作用, 这为我们对瘦素的认识和中药的应用提供了新的内容.

3 讨论

NAFLD目前发病机制尚未完全搞清楚, 多数学者认为其与肥胖、糖尿病、高血压、高脂血症等胰岛素抵抗相关的代谢综合征有密切关系. 新近的研究显示, NAFLD常伴有胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和高胰岛素血症, 并与机体对瘦素(leptin)的敏感性降低有关[13]. 瘦素是机体脂肪组织的主要调节因子, 由脂肪组织释放入血, 通过血液循环分布到全身各种组织(主要分布于骨骼肌、脂肪组织、外周淋巴组织、中枢神经系统、胃肠道和肝脏等处), 并与其相应受体相结合, 通过Janus家族酪氨酸激酶/信号转导与转录激活因子(JAK/STAT). 其中最主要是通过JAK2/STAT3途径[14-15]产生生物学效应, 发挥其控制食物摄入和调节能量代谢的作用[16-17]. 目前研究认为, 瘦素参与肝脏内糖及脂肪代谢主要是通过调控肝脏磷酸烯醇式丙酮酸梭激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)的基因表达和糖异生的效率, 促进肝脏对乳酸的摄取, 刺激肝糖原产生; 同时通过蛋白激酶A激活肉毒碱脂酰转移酶, 影响肝脏的脂肪代谢. 瘦素能通过减少摄食(减少约50%)及提高机体能量消耗即加强肝脏脂肪代谢而降低三酰甘油[18-19], 提示瘦素在脂肪肝治疗中具有重要作用. 然而, 现有研究结果表明, 非酒精性脂肪肝患者普遍存在

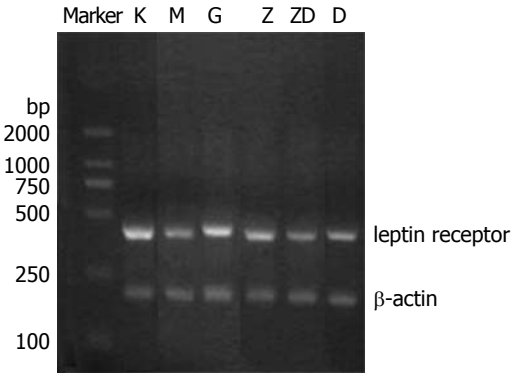


图 2 降脂颗粒对NAFLD大鼠肝组织瘦素受体mRNA表达的影响. K: 空白组; M: 模型组; G-ZD: 高, 中, 低剂量组; D: 东宝甘泰组.

瘦素抵抗. 瘦素抵抗通过上调固醇调节元件结合蛋白-1(sterol regulatory element binding protein-1, SREBP-1)基因的表达, 使瘦素特异性抑制肝脏脂酰辅酶A去饱合酶-1(stearoyl-CoA desaturase-1 SCD-1)mRNA表达的能力下降[20-21], 促进肝内脂质合成, 导致脂肪肝的发生发展.

Tobe *et al*[22]在研究血浆瘦素水平与脂肪肝关系的实验中发现, 脂肪肝患者血浆瘦素水平明显高于对照组, 而且与转氨酶的升高平行. 经多元回归分析表明, 瘦素是脂肪肝发生的独立危险因素, 瘦素水平与BMI、血清胆固醇、低密度脂蛋白(LDL)、三酰甘油水平相关. 而且, 肥

■同行评价
本文实验设计合理，思路清晰，分析有据，科学性和可读性较强.

表 1 降脂颗粒对非酒精性脂肪肝大鼠脂肪变，病理炎症和肝脏脂质的影响

分组	*n*	脂肪变	病理炎症	肝脏TC(mmol/L)	肝脏TG(mmol/L)
空白组	8	0^{b}	0^{b}	1.98 ± 0.53^{b}	0.11 ± 0.04^{b}
模型组	10	3.10 ± 0.57	1.50 ± 0.71	9.19 ± 1.03	0.75 ± 0.07
东宝甘泰组	12	2.50 ± 0.67^{a}	0.92 ± 0.67^{a}	7.94 ± 1.17^{a}	0.67 ± 0.12^{a}
低剂量组	12	2.42 ± 0.52^{a}	0.58 ± 0.67^{b}	6.90 ± 1.26^{bc}	0.58 ± 0.09^{bc}
中剂量组	12	2.42 ± 0.67^{a}	0.42 ± 0.52^{b}	5.83 ± 1.52^{bde}	0.51 ± 0.07^{bde}
高剂量组	12	2.00 ± 0.60^{bc}	0.33 ± 0.49^{bc}	5.61 ± 1.35^{bde}	0.43 ± 0.12^{bdfg}

$^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$ *vs* 模型组; $^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$ *vs* 东宝甘泰组; $^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$ *vs* 低剂量组; $^{g}P<0.05$ *vs* 中剂量组.

表 2 降脂颗粒对非酒精性脂肪肝大鼠血清瘦素和瘦素受体mRNA的影响(mean ± SD)

分组	*n*	leption(ng/L)	LR mRNA/β-actin(*n* = 3)
空白组	8	131.12 ± 17.23^{b}	3.13 ± 0.04^{b}
模型组	10	317.22 ± 39.26	1.50 ± 0.05
东宝甘泰	12	213.56 ± 19.97^{b}	1.93 ± 0.04^{b}
低剂量	12	193.02 ± 23.8^{b}	1.87 ± 0.06^{b}
中剂量	12	163.97 ± 31.38^{bdf}	2.20 ± 0.04^{bdf}
高剂量	12	147.83 ± 17.59^{bdf}	2.78 ± 0.04^{bdfh}

$^{b}P<0.01$ *vs* 模型组; $^{d}P<0.01$ *vs* 东宝甘泰组; $^{f}P<0.01$ *vs* 低剂量组; $^{h}P<0.01$ *vs* 中剂量组.

表 3 降脂颗粒对非酒精性脂肪肝大鼠肝组织P-JAK2、P-STAT3表达的影响(灰度值, mean ± SD, *n* = 3)

分组	P-JAK2	P-STAT3
空白组	127.32 ± 3.52^{b}	105.19 ± 2.52^{b}
模型组	113.15 ± 1.27	89.06 ± 0.69
东宝甘泰	118.37 ± 1.25^{a}	96.00 ± 1.01^{b}
低剂量	119.88 ± 2.98^{bc}	94.15 ± 0.78^{b}
中剂量	123.45 ± 0.68^{bc}	100.18 ± 3.33^{bcf}
高剂量	124.34 ± 3.42^{bce}	101.94 ± 2.20^{bdf}

$^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$ *vs* 模型组; $^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$ *vs* 东宝甘泰组; $^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$ *vs* 低剂量组.

胖时，瘦素的有效生物学作用明显下降，而胰岛素水平则明显升高，出现胰岛素抵抗. 瘦素抵抗可能参与肝脏脂肪变性的形成[23-24].

近年来，有学者研究了瘦素抵抗的机制. 瘦素是通过与其受体结合来传递其调节能量代谢的信号，当受体表达异常时，可引起瘦素抵抗. Bartek *et al*[25]发现脂肪肝患者血清中的瘦素和游离瘦素受体水平均显著增高，提示瘦素与其受体结合可能存在障碍. 肝组织瘦素受体mRNA变异或表达异常，使受体功能下调时，血清中的瘦素不能发挥生理作用，从而产生瘦素抵抗[26]. 有研究表明，瘦素受体或受体后缺陷的存在[27-28]即瘦素JAK2/STAT3信号转导发生障碍，使瘦素不能发挥生物学效应从而产生瘦素抵抗.

我们的实验结果表明，模型组大鼠血清瘦素浓度显著高于正常对照组. 然而，尽管模型组动物体内有很高的瘦素水平，还是发生了脂质代谢紊乱、NAFLD，表明机体对瘦素的作用不敏感或反应性降低，存在瘦素抵抗. 降脂颗粒组及西药东宝甘泰组血清瘦素水平与模型组相比均有不同程度的下降，具有显著的统计学差异. 伴随着血清瘦素水平的下降，脂肪代谢明显得到改善，脂肪肝程度也明显减轻，得到了肝脏脂质及病理结果的证实，说明降脂颗粒可以改善NAFLD大鼠体内的瘦素抵抗，增强瘦素的敏感性. 我们推测降脂颗粒有可能对瘦素受体以及JAK2、STAT3的磷酸化产生影响，因此我们测定了肝脏瘦素受体mRNA和P-JAK2、P-STAT3的表达情况，以证实我们假说的合理性. 我们的结果表明，模型组大鼠肝组织瘦素受体mRNA表达较正常对照组明显减弱，各用药组大鼠肝组织瘦素受体mRNA表达均较模型组为高，尤以降脂颗粒组为显著，与东宝甘泰组相比具有统计差异. 我们推测高瘦素血症对瘦素受体的表达

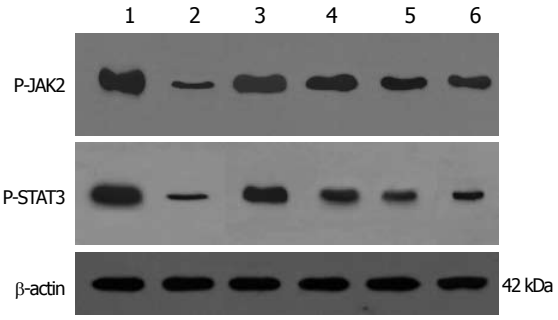


图 3 降脂颗粒对NAFLD大鼠肝组织P-JAK2和P-STAT3表达的影响. 1: 空白组; 2: 模型组; 3: 高剂量组; 4: 中剂量组; 5: 低剂量组; 6: 东宝甘泰组.

有负反馈调节作用. 这与有关报道一致[29].

为了研究降脂颗粒对瘦素JAK2/STAT3表达的影响, 我们对P-JAK2和P-STAT3的含量进行了测定, 这是因为瘦素生物学效应的发挥, 必须与瘦素受体结合后使JAK2和STAT3磷酸化[30], 才能使信号转导下去发挥瘦素的生物效应. 进一步实验表明, 降脂颗粒可以增加P-JAK2和P-STAT3蛋白的含量, 与模型组比较有显著性差异, 提示降脂颗粒可能对瘦素JAK2/STAT3信号通路存在调节作用. 目前, 国内外尚无有关非酒精性脂肪肝肝组织瘦素JAK2/STAT3信号通路的报道. 我们首次进行了这方面的探索, 当然, 还有很多内容亟需进一步深入研究.

4 参考文献

1 曾民德. 脂肪肝. 中华消化杂志 1999; 19: 120-122

2 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844-1850

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

4 Valtuena S, Numeroso F, Ardigo D, Pedrazzoni M, Franzini L, Piatti PM, Monti L, Zavaroni I. Relationship between leptin, insulin, body composition and liver steatosis in non-diabetic moderate drinkers with normal transaminase levels. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 283-290

5 Javor ED, Ghany MG, Cochran EK, Oral EA, DePaoli AM, Premkumar A, Kleiner DE, Gorden P. Leptin reverses nonalcoholic steatohepatitis in patients with severe lipodystrophy. *Hepatology* 2005; 41: 753-760

6 Balasubramaniyan V, Nalini N. Effect of hyperleptinaemia on chronic ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2006; 20: 129-136

7 Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr* 2006; 95: 273-281

8 赵文霞, 段荣章, 苗明三, 李建国, 叶放. 赤芍对大鼠脂肪肝模型胰岛素抵抗及瘦素影响的实验研究. 四川中医 2005; 23: 33-34

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

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

11 Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435

12 王泰龄, 刘霞, 周元平, 何静雯, 张晶, 李宁章, 段钟平, 王宝恩. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案. 中华肝脏病杂志 1998; 6: 195-197

13 Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379

14 Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002; 35: 762-771

15 Rizk NM, Stammsen D, Preibisch G, Eckel J. Leptin and tumor necrosis factor-alpha induce the tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription proteins in the hypothalamus of normal rats in vivo. *Endocrinology* 2001; 142: 3027-3032

16 Larsson H, Elmstahl S, Berglund G, Ahren B. Evidence for leptin regulation of food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4382-4385

17 Flynn MC, Plata-Salaman CR. Leptin (OB protein) and meal size. *Nutrition* 1999; 15: 508-509

18 Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 2002; 297: 240-243

19 Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, DePaoli AM, Taylor SI, Gorden P, Shulman GI. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest* 2002; 109: 1345-1350

20 Tobe K, Suzuki R, Aoyama M, Yamauchi T, Kamon J, Kubota N, Terauchi Y, Matsui J, Akanuma Y, Kimura S, Tanaka J, Abe M, Ohsumi J, Nagai R, Kadowaki T. Increased expression of the sterol regulatory element-binding protein-1 gene in insulin receptor substrate-2(-/-) mouse liver. *J Biol Chem* 2001; 276: 38337-38340

21 Cohen P, Friedman JM. Leptin and the control of metabolism: role for stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1). *J Nutr* 2004; 134: 2455S-2463S

22 Tobe K, Ogura T, Tsukamoto C, Imai A, Matsuura K, Iwasaki Y, Shimomura H, Higashi T, Tsuji T. Relationship between serum leptin and fatty liver in Japanese male adolescent university students. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3328-3335

23 Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36: 403-409

24 Campillo B, Sherman E, Richardet JP, Bories PN. Serum leptin levels in alcoholic liver cirrhosis: relationship with gender, nutritional status, liver function and energy metabolism. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55: 980-988

25 Bartek J, Bartos J, Galuska J, Galuskova D, Stejskal D, Ivo K, Ehrmann J, Ehrman J Jr, Chlup R. Expression of ob gene coding the production of the hormone

leptin in hepatocytes of liver with steatosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2001; 145: 15-20
26 Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 89-104
27 Carpenter LR, Farruggella TJ, Symes A, Karow ML, Yancopoulos GD, Stahl N. Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6061-6066
28 Crouse JA, Elliott GE, Burgess TL, Chiu L, Bennett L, Moore J, Nicolson M, Pacifici RE. Altered cell surface expression and signaling of leptin receptors containing the fatty mutation. *J Biol Chem* 1998; 273: 18365-18373
29 赵彩彦, 李丽, 李建梅, 邓卓军, 刘敬稳, 李燕红. 非酒精性脂肪性肝病大鼠肝组织瘦素受体表达的变化. 中国组织化学与细胞化学杂志 2005; 14: 613-617
30 Guo F, Bakal K, Minokoshi Y, Hollenberg AN. Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology* 2004; 145: 2221-2227

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

世界华人消化杂志个性化服务订购活动

本刊讯 为了满足读者的多样化需求, 解决一些作者因为资金不足而导致订阅印刷版的困难, 自2007年开始, 世界华人消化杂志(*WCJD*), 推出以下个性化服务策略来为广大读者服务.

1 精彩专家述评专辑印刷版杂志

*WCJD*旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail发送精彩专家述评PDF; (2)2007年底将精彩专家述评专辑一本挂号邮寄用户收. 定价: 50元/年.

2 *WCJD*电子杂志

*WCJD*旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒PDF电子杂志(1-36期). 定价: 180元/年.

3 *WCJD*网络版杂志

*WCJD*旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒网络版杂志(1-36期). 定价: 160元/年.

4 *WCJD*印刷版杂志

*WCJD*印刷版1-36期. 定价: 864元/年.

5 订购信息

邮政编码, 姓名, 地址, 部门, 机构名称, E-mail, 手机号.

6 汇款的方式

邮局汇款: 世界胃肠病学杂志社收, 100023, 北京市2345信箱. 附言注明订购的内容.
银行汇款: 户名: 北京百世登生物医学科技有限公司; 开户银行: 中国工商银行北京商务中心区支行国贸大厦分理处; 账号: 0200041609020180741. 附言注明: 订购的内容和发票的抬头.

总之, *WCJD*将尽自己的最大努力, 满足广大读者的需求, 同时欢迎更多个性化服务的意见和建议E-mail发至: h.n.zhang@wjgnet.com. 谢谢!(**世界胃肠病学杂志社** 2007-09-30).

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3367-3371
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

苦参碱对四氯化碳所致小鼠慢性肝纤维化肝组织一氧化氮合酶表达的干预及意义

马宁芳, 黄宏森, 张 超, 郭晓珍, 李叶莉, 郭晓才

马宁芳, 郭晓才, 广州医学院组织学与胚胎学教研室 广东省广州市 510182
黄宏森, 张超, 郭晓珍, 李叶莉, 广州医学院第一临床学院2004级双语班 广东省广州市 510182
马宁芳, 医学博士, 副教授, 从事肝脏的基础与临床研究.
广州医学院归国留学启动基金资助项目, No. 2006GD051
通讯作者: 马宁芳, 510182, 广东省广州市, 广州医学院组织学与胚胎学教研室. maningfang@yahoo.com.cn
电话: 020-81340319
收稿日期: 2007-07-04 修回日期: 2007-10-10

Inhibitory effects of matrine on the expression of inducible nitric oxide synthase during hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice

Ning-Fang Ma, Hong-Seng Huang, Chao Zhang, Xiao-Zhen Guo, Ye-Li Li, Xiao-Cai Guo

Ning-Fang Ma, Xiao-Cai Guo, Department of Histology and Embryology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China
Hong-Seng Huang, Chao Zhang, Xiao-Zhen Guo, Ye-Li Li, Bilingualism Class, Grade 2004, the First Clinical Institute of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China
Supported by: the Returned Overseas Foundation of Guangzhou Medical College, No. 2006GD051
Correspondence to: Ning-Fang Ma, Department of Histology and Embryology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China. maningfang@yahoo.com.cn
Received: 2007-07-04 Revised: 2007-10-10

Abstract

AIM: To study the effects of matrine on the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver injury in mice.

METHODS: Fifty mice were randomly divided into four groups: CCl_4 group (group A, n = 15), CCl_4 + matrine group (group B, n = 15), matrine control group (group C, n = 10), and saline control group (group D, n = 10). Mice in each group were sacrificed at 4 and 8 weeks, and the liver pathology was estimated by hematoxylin and eosin (HE) staining. The expression of iNOS in liver tissues of every group was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The animals in group A at 4 weeks developed slight steatosis and obvious inflammation. Prolonged CCl_4 administration enhanced liver damage and pronounced steatosis, as well as spotty necrosis, which were mostly observed in the portal area. There was structural damage to the hepatic lobules in group A at 8 wk. Liver structure obviously improved in group B at all time points. The liver structure in groups C and D was integrated and clear. The score of iNOS-IR hepatocytes in group A was significantly higher than that in group B (2.20 ± 0.12 *vs* 1.20 ± 0.02, $P < 0.01$; 1.2 ± 0.06 *vs* 0.60 ± 0.02, $P < 0.01$). No iNOS-IR hepatocytes were detected in groups C and D.

CONCLUSION: iNOS is involved in CCl_4-induced hepatic fibrosis in mice. Matrine inhibits expression of iNOS in injured hepatocytes and relievs CCl_4-induced liver injury.

Key Words: Inducible nitric oxide synthase; Hepatic fibrosis; Matrine; Immunohistochemistry

Ma NF, Huang HS, Zhang C, Guo XZ, Li YL, Guo XC. Inhibitory effects of matrine on the expression of inducible nitric oxide synthase during hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3367-3371

摘要

目的: 研究苦参碱对四氯化碳(CCl_4)所致的小鼠慢性肝纤维化肝组织诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达的干预及意义.

方法: 将健康昆明小鼠50只, 随机分为4组: CCl_4组(A组, n = 15)、CCl_4+苦参碱治疗组(B组, n = 15)、生理盐水对照组(C组, n = 10)、苦参碱对照组(D组, n = 10). 各组分别于造模4 wk、8 wk后取材, 常规HE染色法观察比较不同组别小鼠肝组织病理变化, 免疫组化方法检测各组肝组织内iNOS的表达.

■背景资料
临床实验显示苦参碱具有良好的保护肝细胞、减轻肝纤维化等作用, 其确切机制不明了. 研究表明诱生型NOS(iNOS)与肝细胞损伤有关, 苦参碱与iNOS之间关系如何目前未见相关报道.

■研究前沿
各种致病因素所致的肝细胞变性、坏死在肝纤维化形成过程中起较强的刺激和诱导作用, 寻找合适的靶点保护肝细胞是抗肝纤维化的关键, 是目前研究的热点之一.

结果: A组小鼠4 wk肝组织出现脂肪变, 随CCl_4给药时间延长, 肝组织损伤加重, 第8周出现空泡样变及点状坏死, 多见于门管区, 小叶结构紊乱. B组各时间点肝组织结构较A组有明显改善, 肝细胞坏死和脂肪变性程度显著减轻. C组、D组肝小叶结构完整, 肝细胞结构清晰. 免疫组化结果显示, A组、B组各时间点受损肝细胞均有iNOS表达, A组与B组iNOS表达分值相比差异有显著性(2.20±0.12 *vs* 1.20±0.02, P<0.01; 1.2±0.06 *vs* 0.60±0.02, P<0.01). C组、D组肝细胞iNOS表达阴性.

结论: iNOS参与CCl_4诱导的小鼠肝慢性纤维化损伤. 苦参碱可通过干预受损肝细胞iNOS表达, 有效降低CCl_4所致肝脏损伤.

关键词: 诱生型一氧化氮合酶; 肝纤维化; 苦参碱; 免疫组化

马宁芳, 黄宏森, 张超, 郭晓珍, 李叶莉, 郭晓才. 苦参碱对四氯化碳所致小鼠慢性肝纤维化肝组织一氧化氮合酶表达的干预及意义. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3367-3371
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3367.asp

0 引言

肝纤维化(fibrosis)是多种慢性肝病发展致肝硬化的必经阶段. 现有的研究表明肝纤维化的病理过程是可逆的. 因此在肝脏受损的早期阶段进行合理治疗, 有望逆转肝纤维化进程, 进而缓解乃至治愈肝纤维化, 防止肝硬化的形成[1]. 肝损伤是肝纤维化的启动因素, 各种致病因素如乙肝病毒、乙醇、血吸虫、化学毒物等所致的肝细胞变性、坏死在肝纤维化形成过程中起到较强的刺激和诱导作用, 故寻找合适的治疗靶点以保护肝细胞是抗肝纤维化的关键. 一氧化氮(nitric oxide, NO)为一种多生物活性物质. 机体内NO合成酶(NOS)具有诱生型(iNOS)和结构型(cNOS)两种. 内毒素和某些细胞因子如白细胞介素(IL-1), 肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)等可诱导iNOS合成分泌大量NO[2]. 临床资料及动物实验结果显示, 血液中高浓度的NO与肝细胞损伤有关[3], 但NO如何介导肝的慢性病变过程, 目前很少报道. 苦参碱(matrine)是苦参及其同属植物苦豆子等的主要有效成分, 临床实验显示其具有良好的保护肝细胞、减轻肝纤维化等作用[4-5]. 现有的研究认为苦参碱作用机制可能与抑制HSC活化, 促进氧自由基清除等有关[6-7]. 我们观察了小鼠肝纤维化形成过程中肝组织iNOS的表达水平及苦参碱对iNOS表达的干预作用, 以进一步理解肝纤维化的病理机制并探讨阻断肝纤维化发展的可能途径. 已知TGF-β1与肝损伤、肝纤维化密切相关[8], 本文以其做为肝损伤参考指标.

1 材料和方法

1.1 *材料* 清洁级健康成年昆明小鼠50只, 雌雄各半, 体质量25-28 g, 购于中山大学医学院实验动物中心(SCXK粤2004-0011). 苦参碱注射液为广州明兴制药有限公司产品(5 g/L), 四氯化碳(CCl_4, 500 mL/瓶)为上海化学试剂一厂产品, 粟米油市售, 兔抗iNOS多克隆抗体、兔抗TGF-β1多克隆抗体为Santa Cruz产品, 兔两步法(非生物素)检测试剂盒(Non-Biotin HRP Detection System)及DAB显色试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品.

1.2 *方法* 将CCl_4溶于食用粟米油中, 配成500 mL/L以备用.

1.2.1 *造模及分组*: 将所有小鼠随机分为4组: CCl_4组(A组, n = 15), 苦参碱治疗组(B组, n = 15), 苦参碱对照组(C组, n = 10)及正常对照组(D组, n = 10). 所有小鼠饲养1 wk后, A组及B组小鼠轮替背部皮下及四肢内侧注射500 mL/L的CCl_4粟米油混悬液, 首次注射CCl_4原液(6 mL/kg体质量), 隔4 d后sc 500 mL/L CCl_4-粟米油6 mL/kg体质量, 2次/wk, 共8 wk. C组、D组单纯采用同体积的粟米油sc. 在造模的同时, B组及C组分别加用100 mg/kg体质量苦参碱ip, 1次/d. A组、B组造模过程中分别死亡小鼠5只和2只, C、D两组无小鼠死亡. 4 wk末、8 wk末分别于腹腔麻醉下取小鼠中叶肝组织, 置于40 g/L中性甲醛固定, 常规方法制做肝石蜡切片备用, HE染色, 光学显微镜下观察比较肝组织病理改变.

1.2.2 *免疫组化方法*: 按试剂盒说明肝组织切片依次经过60℃烤箱熔蜡、二甲苯脱蜡、酒精梯度水化、30 mL/L过氧化氢溶液封闭、枸橼酸缓冲液修复抗原、正常山羊血清封闭等步骤后, 加一抗(兔抗iNOS 1∶100或兔抗TGF-β1)4℃冰箱过夜, 次日取出切片PBS冲洗3次, 依次加二抗(山羊抗兔)孵育、PBS冲洗DAB显色, 苏木素复染、脱水, 中性树胶固定封片. 阴性对照用PBS代替一抗. 根据iNOS及TGF-β1阳性细胞反应强度及百分比设定免疫组化反应级别: 0级(阳性细胞数<5%, 着色浅淡), 1级(阳性细胞数5%-20%, 淡棕色), 2级(阳性细胞数20%-50%, 棕黄色), 3级(阳性细胞数>50%, 深棕色). 采用双盲计分法

表 1 各组肝细胞iNOS及TGF-β1表达均值(mean ± SD)

分组	iNOS		TGF-β1	
	4 wk(*n*)	8 wk(*n*)	4 wk(*n*)	8 wk(*n*)
A	2.20 ± 0.12(5)[b]	1.2 ± 0.06(5)[b]	2.60 ± 0.24(5)[b]	1.40 ± 0.16(5)[b]
B	1.20 ± 0.02(5)	0.60 ± 0.02(8)	1.60 ± 0.14(5)	1.00 ± 0.02(5)
C	0(5)[bd]	0(5)[bd]	0.20 ± 0.02(5)[bd]	0.20 ± 0.02(5)[bd]
D	0(5)[bd]	0(5)[bd]	0.20 ± 0.01(5)[bd]	0(5)[bd]

[b]$P<0.01$ *vs* B组; [d]$P<0.01$ *vs* A 组.

由专业技术人员统计各组切片iNOS及TGF-β1表达均值(每张切片随机选取5个视野).

统计学处理 使用SPSS10软件对数据进行统计学处理, 组间均数比较采用方差分析, 两组间比较采用LSD-*t*检验, $P<0.05$表示统计学上差异有显著性.

2 结果

2.1 肝组织病理学变化 A组4 wk肝组织肉眼未见明显改变, 8 wk肝脏表面有细颗粒感, 质地较硬. HE染色镜下可见4 wk肝组织汇管区及中央静脉周围有炎细胞浸润, 肝细胞出现脂肪变. 8 wk肝组织出现点状或灶状坏死, 多见于界板区, 小叶结构紊乱. 门脉区及坏死区纤维组织增生, 有假小叶形成. B组肝脏色泽、大小、质地、表面光滑度较A组有明显改善, 4 wk肝组织结构破坏不明显, 肝细胞坏死和脂肪变性程度显著减轻. 8 wk肝组织中央静脉和汇管区有少量纤维索延伸, 间隔较薄, 无完全间隔形成(图1). C组、D组各时间点肝组织表面光滑, 质脆软. 镜下可见肝小叶结构完整, 中央静脉周围有放射状排列的肝细胞索, 彼此连接成网状. 肝细胞呈多边形, 界限清楚, 胞质丰富, 两组间结构无明显差别.

2.2 各组肝组织iNOS及TGF-β1表达 A组各时间点肝实质内均可见iNOS免疫阳性细胞, 4 wk iNOS表达于肝枯否氏细胞及肝细胞胞质内, 呈棕色颗粒状. 8 wk肝脏实质内同样可见iNOS免疫阳性细胞, 界板及坏死肝组织周围肝细胞呈高表达. B组iNOS免疫阳性细胞数量及总体反应强度均低于A组, 与A组各时间点相比差异有显著性(1.20±0.02 *vs* 2.20±0.12, $P<0.01$; 0.60±0.02 *vs* 1.2±0.06, $P<0.01$; 图2, 表1). C组、D组肝组织内iNOS表达为阴性. TGF-β1免疫组化显示, A组4 wk肝细胞有广泛的TGF-β1表达, 8 wk肝细胞TGF-β1表达减弱. B组各时间点TGF-β1中、轻度表达, 而C组、D组肝细胞TGF-β1表达为弱阳性或阴性(表1).

3 讨论

CCl_4诱导肝纤维化是较为成熟的肝毒模型, 在肝硬化动物实验中广泛应用. 研究表明, 各种慢性致肝损伤因素通过诱导肝星状细胞(HSC)的增殖与活化, 使细胞外基质(ECM)合成与降解代谢失衡、肝脏内胶原纤维过度增生和广泛沉积, 形成肝纤维化. 此过程涉及细胞、细胞因子和ECM等多因素间相互作用和调节, 但不论何种原因引起的肝纤维化, 最终都将因ECM的大量沉积使肝组织结构破坏而影响肝脏功能[9]. 在多种器官纤维化的研究中, 转化生长因子-β(TGF-β1)是研究得最多、也是作用最强的致纤维化因子[10-11]. 在哺乳动物中, TGF-β可分为TGF-β1, TGF-β2和TGF-β3 3种亚型[12], 其中TGF-β1的生物学活性最明显. 在生理状态下, TGF-β1主要由淋巴细胞、巨噬细胞和血小板表达分泌, 组织间质细胞也有不同程度的表达, 而实质细胞则不表达, 但在器官慢性炎症或纤维化时, 实质细胞也启动TGF-β1表达[8], 故我们将TGF-β1作为肝损伤的一个观察指标. 由于肝脏的内源性生物素含量较高, 为避免假阳性, 本实验免疫组化采用两步法非生物素检测系统. 结果显示, A组各时间点肝细胞均有较强的表达, 但8 wk肝细胞TGF-β1表达比 4 wk减弱, 可能与8 wk大量的肝细胞坏死有关. B组TGF-β1中轻度表达, 而C组、D组肝细胞TGF-β1表达为弱阳性或阴性.

国内外学者从化学药物、细胞因子及其受体拮抗剂、基因治疗等方面对抗纤维化药物进行了广泛的探索, 但大多由于副作用及安全性问题而难以在临床广泛应用. 我国的抗肝纤维化研究结果表明, 苦参碱有较好的药理活性和抗纤维化作用[6-7]. 目前认为苦参碱抗肝纤维化的作用与其抑制HSC激活、抑制肝内胶原合成有关, 但确切机制仍不明了. 本文组织学检测结果显示, CCl_4组小鼠肝组织出

■**同行评价**
本文整体设计基本合理, 数据可信, 具有一定的参考价值.

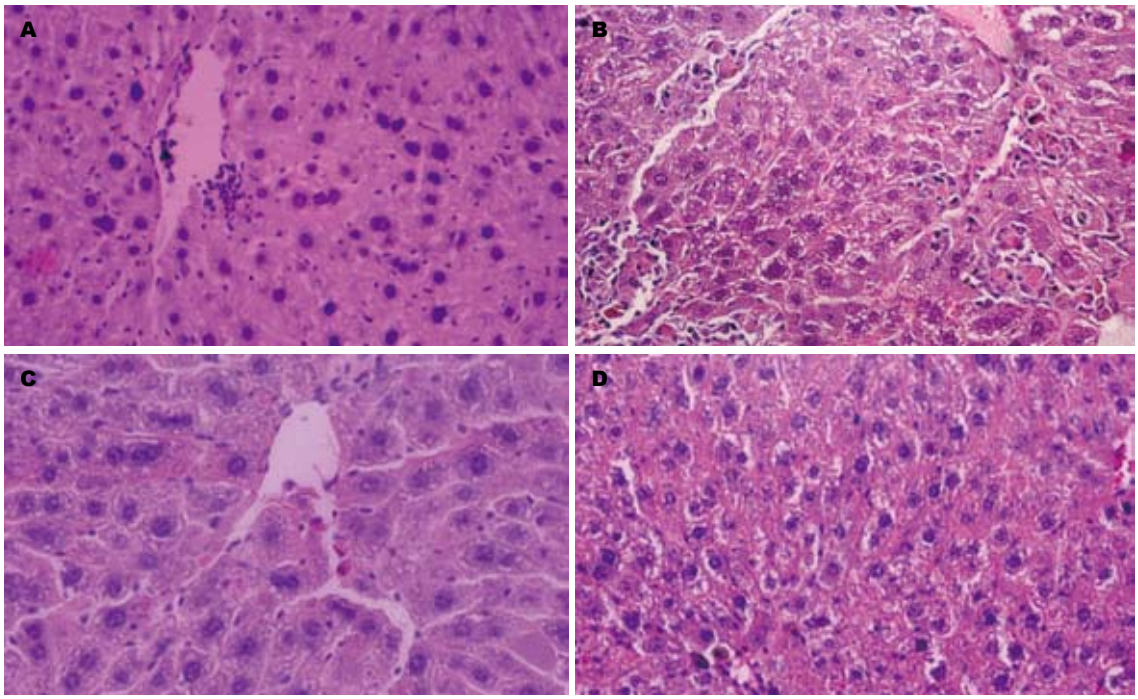


图 1 不同组别小鼠肝脏结构(H&E染色, ×200). A: A组4 wk肝组织; B: A组8 wk肝组织; C: B组4 wk肝组织; D: B组8 wk肝组织.

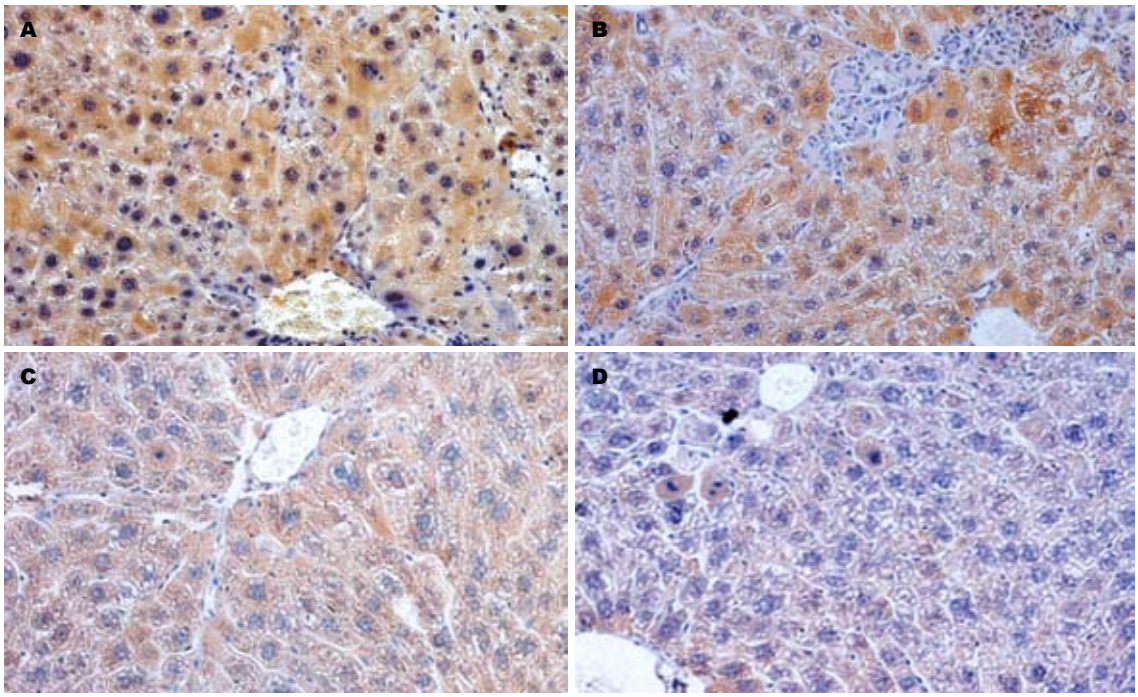


图 2 不同组别小鼠肝组织iNOS免疫组化反应(×200). A: A组4 wk肝组织; B: A组8 wk肝组织; C: B组4 wk肝组织; D: B组8 wk肝组织.

现明显的病理改变, 随CCl_4给药时间的延长肝组织损伤程度加重, 出现纤维组织增生和假小叶形成. 而给予苦参碱ip后, B组各时间点肝组织结构较A组有明显改善, 肝损伤程度减轻, 表明苦参碱对CCl_4诱导的小鼠肝纤维化有良好的干预作用. NO是一种新型生物信使分子, 由NOS催化L-精氨酸生成. 肝脏有两种NOS类型, 原生型(cNOS)和诱生型(iNOS). 前者由内皮细胞产生, 合成NO的生物效应以生理状态下细胞间信息传递为主. 后者由肝脏多种细胞在内毒素及某些细胞因子诱导下产生, 合成大量具有细胞毒性作用的NO, 参与各

种肝病的病理过程[3]. 临床资料显示, 在肝硬化患者血清中, 呼出气体中的一氧化氮水平明显升高, 且NO水平与内毒素水平有显著相关性[13-14], 提示肝病患者体内NO生物合成机制被激活是其肝细胞损伤的重要机制之一. 细胞培养实验显示, 肝脏枯否氏细胞在外界因素刺激下可产生大量的NO, 已知巨噬细胞释放的NO可通过抑制靶细胞线粒体中三羧酸循环、电子传递和细胞DNA合成等途径, 发挥杀伤靶细胞的效应[15]. 在肝损伤动物模型体内iNOS mRNA和NO的细胞来源问题说法不一. 在CCl_4作用后, 肝脏枯否氏细胞产生NO, 胆管结扎致肝损害甚至肝纤维化时肝脏所有非实质细胞均产生NO, 即肝脏在不同损伤程度及不同类型损害时其iNOS表达各异[16-18]. 我们用CCL_4诱导小鼠慢性肝纤维化过程中发现, 除了枯否氏细胞表达iNOS外, 肝细胞自身也有明显的iNOS表达, 且iNOS的表达水平与肝脏的损伤程度成正比, 提示肝细胞高表达的iNOS与肝纤维化发生有关. 受损肝细胞合成的NO与枯否细胞分泌的细胞因子及HSC的激活和增殖之间有何内在关系值得深入探讨. 苦参碱ip后能显著降低受损肝细胞iNOS表达, 减轻肝细胞损伤, 表明苦参碱抗肝纤维化的作用与其抑制受损肝细胞iNOS的活性、减少NO合成有关, 提示血清NO水平可作为判断苦参碱治疗肝纤维化、肝硬化疗效的参考指标.

4 参考文献

1 Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46: 443-446

2 Chen T, Zamora R, Zuckerbraun B, Billiar TR. Role of nitric oxide in liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 519-526

3 Nadler EP, Dickinson EC, Beer-Stolz D, Alber SM, Watkins SC, Pratt DW, Ford HR. Scavenging nitric oxide reduces hepatocellular injury after endotoxin challenge. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G173-181

4 Shi GF, Li Q. Effects of oxymatrine on experimental hepatic fibrosis and its mechanism in vivo. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 268-271

5 Zhang JP, Zhang M, Zhou JP, Liu FT, Zhou B, Xie WF, Guo C. Antifibrotic effects of matrine on in vitro and in vivo models of liver fibrosis in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 183-186

6 沈镭, 陆伦根, 曾民德, 李继强, 茅益民, 贾一韬, 杨文卓. 氧化苦参碱注射液对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化治疗作用. 肝脏 2003; 8: 35-36

7 卢清, 张清波, 张继明, 尹有宽, 邬祥惠. 氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞旁分泌活化途径的抑制作用. 肝脏 2004; 9: 31-33

8 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99

9 Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 2003; 200: 504-515

10 Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001; 34: 859-867

11 Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2345-2349

12 Mercado-Pimentel ME, Runyan RB. Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 146-156

13 Goh BJ, Tan BT, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide synthase and heme oxygenase expressions in human liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 588-594

14 Sarela AI, Mihaimeed FM, Batten JJ, Davidson BR, Mathie RT. Hepatic and splanchnic nitric oxide activity in patients with cirrhosis. *Gut* 1999; 44: 749-753

15 Kesherwani V, Sodhi A. Differential activation of macrophages in vitro by lectin Concanavalin A, Phytohemagglutinin and Wheat germ agglutinin: production and regulation of nitric oxide. *Nitric Oxide* 2007; 16: 294-305

16 刁同进, 李又林, 赵晓东, 李冬梅, 姚晓平, 杨甲梅, 吴孟超. 一氧化氮在大鼠异种肝移植急性排异中的作用及其黄递酶组化研究. 肝胆胰外科杂志 2000; 12: 193-197

17 Rockey DC, Chung JJ. Regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide during hepatic injury and fibrogenesis. *Am J Physiol* 1997; 273: G124-130

18 McNaughton L, Puttagunta L, Martinez-Cuesta MA, Kneteman N, Mayers I, Moqbel R, Hamid Q, Radomski MW. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 17161-17166

编辑 李军亮 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3372-3376
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

黏附分子在沙利度胺所致大鼠肝纤维化中的作用机制

肖艳菊, 罗和生, 吕 鹏

■背景资料
沙利度胺由于其重要的抗炎, 免疫调节及抗血管生成作用, 近年来受到重视, 沙利度胺可以下调黏附分子和选择素, 而肝损伤时会表达细胞间黏附分子, 利用之以及只可用来治疗肝纤维化.

肖艳菊, 罗和生, 吕鹏, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
肖艳菊, 硕士, 主要从事消化道疾病的基础与临床的研究.
通讯作者: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. luotang@public.wh.hb.cn
收稿日期: 2007-06-27 修回日期: 2007-10-18

Effects of thalidomide on adhesion molecules in rat liver fibrosis

Yan-Jiu Xiao, He-Sheng Luo, Peng Lv

Yan-Ju Xiao, He-Sheng Luo, Peng Lv, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. luotang@public.wh.hb.cn
Received: 2007-06-27 Revised: 2007-10-18

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effects and mechanism of thalidomide on hepatic fibrosis in rats.

METHODS: Liver fibrosis in rats was induced by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride for 4 weeks. The rats were killed at 2, 4 and 6 wk after treatment with 100 mg/kg intragastric thalidomide. Liver fibrosis score was assessed under the light microscope by H&E staining. Serum hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen type Ⅲ (PCⅢ) and collagen type Ⅳ were detected by radioimmunoassay. Expression of ICAM-1, VCAM-1 and E selectin were examined by immunohistochemistry. mRNA levels for ICAM-1, VCAM-1, and E selectin was detected by reverse-transcriptase polymerase chain reaction.

RESULTS: Compared with the liver fibrosis group, fibrosis score in thalidomide-treated rats (4 or 6 wk) was obviously improved ($P < 0.05$). Serum HA (176.6 ± 7.5 μg/L, 173.8 ± 6.7 μg/L *vs* 486.9 ± 12.4 μg/L), LN (38.4 ± 5.8 μg/L, 34.7 ± 7.3 μg/L *vs* 84.5 ± 5.2 μg/L), PCⅢ (44.3 ± 5.5 μg/L, 40.2 ± 6.1 μg/L *vs* 65.0 ± 5.6 μg/L) and collagen Ⅳ (31.8 ± 6.7 μg/L, 30.4 ± 5.7 μg/L *vs* 55.6 ± 6.5 μg/L) in rats treated with thalidomide for 4 or 6 wk were significantly lower than those in rats with liver fibrosis ($P < 0.05$). Expression of ICAM-1, VCAM-1 and E selectin protein and mRNA was significantly reduced in thalidomide-treated rats, compared with that in rats with liver fibrosis ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Thalidomide can reverse liver fibrosis in rats via down-regulation of the expression of ICAM-1, VCAM-1 and E selectin.

Key Words: Liver fibrosis; Thalidomide; Cell adhesion molecule

Xiao YJ, Luo HS, Lv P. Effects of thalidomide on adhesion molecules in rat liver fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3372-3376

摘要

目的: 观察沙利度胺对大鼠实验性肝纤维化的治疗效果并探讨其作用机制.

方法: 四氯化碳腹腔注射制备大鼠肝纤维化模型后, 应用沙利度胺(100 mg/kg) ig分别治疗2、4、6 wk作为动态观察时相点. HE染色观察肝组织病理变化, 放射免疫法检测血清透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)和Ⅳ型胶原(CⅣ)的表达, 免疫组织化学法检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和E-选择素(E-selectin)蛋白质的表达, 逆转录聚合酶链反应法检测ICAM-1、VCAM-1和E-selectin mRNA的表达.

结果: 与肝纤维化组相比, 沙利度胺治疗4 wk、6 wk能显著降低大鼠肝组织纤维化积分, 显著降低血清HA(176.6±7.5 μg/L, 173.8±6.7 μg/L *vs* 486.9±12.4 μg/L)、LN(38.4±5.8 μg/L, 34.7±7.3 μg/L *vs* 84.5±5.2 μg/L)、PCⅢ(44.3±5.5 μg/L, 40.2±6.1 μg/L *vs* 65.0±5.6 μg/L)、CⅣ(31.8±6.7 μg/L, 30.4±5.7 μg/L *vs* 55.6±6.5 μg/L)的含量($P<0.05$), 沙利度胺治

疗2 wk, 4 wk, 6 wk组均可显著降低ICAM-1、VCAM-1和E-selectin蛋白和mRNA的表达(P<0.05).

结论: 沙利度胺可通过下调ICAM-1、VCAM-1和E-selectin表达水平而发挥抗肝纤维化作用.

关键词: 肝纤维化; 沙利度胺; 细胞黏附分子

肖艳菊, 罗和生, 吕鹏. 黏附分子在沙利度胺所致大鼠肝纤维化中的作用机制. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3372-3376
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3372.asp

■研发前沿
本文研究了沙利度胺可通过下调ICAM-1、VCAM-1和E-selectin表达水平而发挥抗肝纤维化作用, 对沙利度胺老药新用有一定的科研意义.

0 引言

肝损伤时内皮细胞表型发生改变, 从而表达细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、E-选择素(E-selectin)等, 能黏附中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞或Kupffer细胞, 加重炎症和免疫损伤[1-3]. 沙利度胺可以下调黏附分子和选择素, 可利用这一机制用来治疗肝纤维化.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: ♂Wistar大鼠, SPF级, 体质量85-95 g, 由湖北省实验动物研究中心提供, 许可证号: SCXK(鄂)2003-0005. 自由饮水, 饲以条杆状动物饲料.

1.1.2 主要试剂: 沙利度胺(常州制药厂有限公司产品)与生理盐水配成1%溶液. 四氯化碳(郑州试剂二厂产品), 国产分析纯, 与食用花生油按1∶6比例配成溶液. 透明质酸(hyaluronic acid, HA), 层粘连蛋白(laminin, LN), Ⅲ型前胶原(procollagen Type Ⅲ, PCⅢ), Ⅳ型胶原(Collagen Type Ⅳ, CⅣ)放免试剂盒为上海海军医学研究所产品; 小鼠抗大鼠ICAM-1抗体为美国Santa Cruz公司产品; 兔抗大鼠VCAM-1抗体、E-selectin抗体为武汉博士德生物工程公司产品; SP试剂盒为福建迈新公司产品; TRIzol RNA抽提试剂为美国Invitrogen公司产品; M-MLV逆转录酶为美国Promega公司产品; Taq DNA聚合酶为日本TaKaRa公司产品.

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理: 将65只大鼠随机分为两组, 正常对照组(N组)10只和模型组55只. 模型组均用四氯化碳花生油溶液按2 mL/kg ip, 每周3次, N组ip等量的纯花生油. 4 wk后, 模型组中大鼠死亡5只, 存活50只, 随机处死其中8只作为A组, 见肝纤维化模型形成, 取血清及新鲜肝组织速冻保存. 模型组中其他42只随机分成治疗组32只和自动逆转组(B组)10只. 正常对照组和自动逆转组改用等量的生理盐水ig, 6 wk后处死. 治疗组大鼠改用沙利度胺溶液100 mg/kg体质量ig, 在2 wk、4 wk和6 wk末随机处死12、10和10只, 作为C、D和E组, 取血清及新鲜肝组织速冻保存.

1.2.2 肝脏病理学检查: 每只大鼠均取肝右叶的肝组织进行HE染色观察肝纤维化程度(S). S分期参考2000年西安会议修订的病毒性肝炎防治方案. S0期的积分为0, S1期的积分为1, 依次类推.

1.2.3 放射免疫法检测血清HA、LN、PCⅢ和CⅣ的表达: 操作严格按试剂盒使用说明进行.

1.2.4 免疫组织化学法检测ICAM-1、VCAM-1和E-selectin的表达: 使用S-P法, DAB显色, 具体步骤参照试剂盒说明书进行. ICAM-1、VCAM-1和E-selectin的阳性表达位于胞质或胞膜. 每例随机观察5个高倍视野(400倍), 每个视野计数1000个细胞, 记录阳性细胞的百分比.

1.2.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法测定肝组织ICAM-1、VCAM-1、E-selectin mRNA的表达: 取肝组织100 mg, 加入TRIzol 1 mL, 一步法提取总RNA, 标本均经紫外分光光度计测定其纯度及含量. 取总RNA 1 μg, 逆转录成cDNA. 取1 μL cDNA用于PCR的扩增. 引物由上海赛百盛生物工程公司合成. 序列为: ICAM-1(385 bp): 上游, 5'-CTGCAGAGCACAAACAGCAGAG-3'; 下游, 5'-AAGGCCGCAGAGCAAAAGAAGC-3'; VCAM-1(283 bp); 上游, 5'-TAAGTTACACAGCAGTCAAATGGA-3'; 下游, 5'-CACATACATAAATGCCGGAATCTT-3'; E-selectin(506 bp): 上游, 5'-CAACGTGCACGTTTGACTGT-3'; 下游, 5'-AGGTCAAGGCTTGAACACTG-3'; GAPDH(309 bp): 上游, 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'; 下游, 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'. PCR反应体系为25 μL, 反应条件为: ICAM-1(94℃ 60 s, 55℃ 60 s, 72℃ 60 s, 32个循环), VCAM-1(95℃ 60 s, 55℃ 60 s, 72℃ 60 s, 32个循环), E-selectin(94℃ 30 s, 53℃ 45 s, 72℃ 60 s, 35个循环), GAPDH(94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35个循环). 看家基因GAPDH作为内参照. PCR产物进行15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙淀染色, 法国Vilber Lourmat凝胶成像分析系统照相及测定条带的面积和灰度值. 以目的条带的面积×灰度值/GAPDH条带的面积×灰度值的

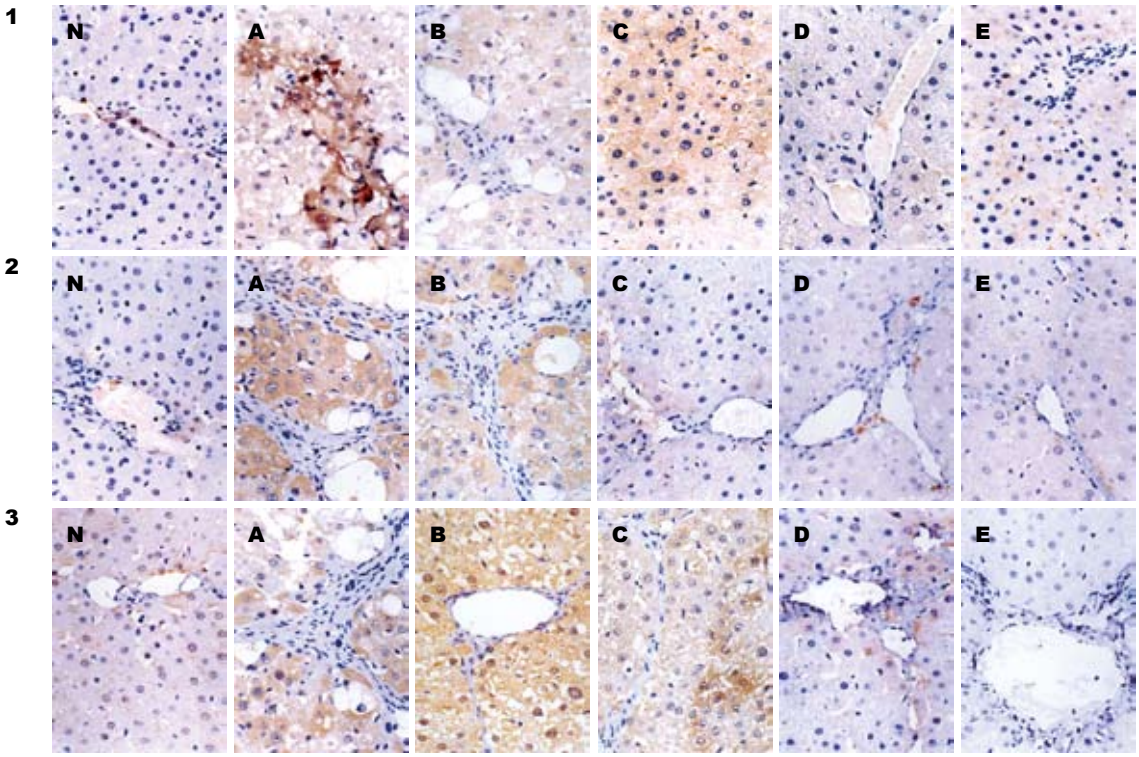


图 1 大鼠肝组织ICAM-1、VCAM-1、E-selectin蛋白的表达(S-P, ×400). 1: ICAM-1; 2: VCAM-1; 3: E-selectin.

比值代表mRNA的表达水平.

统计学处理 全部数据采用SPSS11.5软件进行统计分析. 实验数据均以mean+SD表示, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肝脏病理学变化 光镜下正常对照组肝脏形态学基本正常. 模型组可见灶状坏死, 伴炎性细胞浸润, 小叶结构紊乱, 肝内有纤维性间隔形成, 形成稳定的完全性中心-中心和(或)中心-门静脉性纤维间隔并存的肝纤维化. 治疗组(4 wk组、6 wk组)大鼠肝纤维化程度较模型组明显减轻, 表现为肝组织坏死不明显, 汇管区少量纤维组织增生, 向小叶内延伸. 肝纤维化组较正常组肝纤维化积分显著升高($P<0.05$). 自动逆转组较模型组肝纤维化积分有所降低, 但差别无统计学意义($P>0.05$). 沙利度胺治疗4 wk组、6 wk组肝纤维化积分较肝纤维化组显著降低($P<0.05$, 表1).

2.2 血清HA、LN、PCⅢ和CⅣ含量的变化 肝纤维化组血清HA、LN、PCⅢ和CⅣ水平均显著高于正常组($P<0.05$). 自动逆转组血清HA、LN、PCⅢ和CⅣ水平较肝纤维化组有所降低, 但无显著性差异($P>0.05$). 使用沙利度胺治疗后, 治疗4 wk, 6 wk组大鼠的血清HA、LN、PCⅢ和CⅣ浓度较肝纤维化组和治疗2 wk组均显著降低($P<0.05$, 表2).

表 1 大鼠肝纤维化程度及积分检测结果(mean ± SD)

分组	n	S0	S1	S2	S3	S4	肝纤维化积分
N	10	10	0	0	0	0	0.00 ± 0.00
A	8	0	0	2	6	0	2.75 ± 0.46[a]
B	10	0	0	4	6	0	2.60 ± 0.52[a]
C	12	0	2	4	6	0	2.33 ± 0.78[a]
D	10	0	3	6	1	0	1.60 ± 0.52[ceg]
E	10	0	5	5	0	0	1.50 ± 0.53[ceg]

[a]$P<0.05$ *vs* N; [c]$P<0.05$ vs A; [e]$P<0.05$ *vs* B; [g]$P<0.05$ *vs* C.

2.3 肝组织ICAM-1、VCAM-1和E-selectin蛋白的表达 正常组大鼠肝组织仅血管内皮细胞有少量ICAM-1表达, 肝窦周细胞表达较弱, 肝细胞及胆管上皮细胞无表达. 肝纤维化组大鼠肝组织ICAM-1表达较正常组明显增加, 除肝窦周细胞、血管内皮细胞ICAM-1表达增强, 肝细胞也出现ICAM-1的表达, ICAM-1阳性细胞多分布在汇管区周围、肝小叶内炎性细胞浸润区和坏死灶内. VCAM-1、E-选择素同样在正常组大鼠几乎无表达, 在肝纤维化时的表达和分布与ICAM-1类似(图1).

表 2 各组大鼠血清肝纤维化标志物检测结果(mean ± SD, μg/L)

分组	*n*	HA	LN	PC Ⅲ	C Ⅳ
N	10	109.8 ± 7.1	29.1 ± 4.0	7.2 ± 0.7	23.9 ± 7.0
A	8	486.9 ± 12.4[a]	84.5 ± 5.2[a]	65.0 ± 5.6[a]	55.6 ± 6.5[a]
B	10	483.7 ± 14.4[a]	81.4 ± 6.2[a]	63.6 ± 6.3[a]	52.9 ± 6.6[a]
C	12	481.1 ± 13.3[a]	80.3 ± 5.5[a]	61.4 ± 5.6[a]	52.5 ± 6.9[a]
D	10	176.6 ± 7.5[ceg]	38.4 ± 5.8[ceg]	44.3 ± 5.5[ceg]	31.8 ± 6.7[ceg]
E	10	173.8 ± 6.7[ceg]	34.7 ± 7.3[ceg]	40.2 ± 6.1[ceg]	30.4 ± 5.7[ceg]

[a]*P*<0.05 *vs* N; [c]*P*<0.05 *vs* A; [e]*P*<0.05 *vs* B; [g]*P*<0.05 *vs* C.

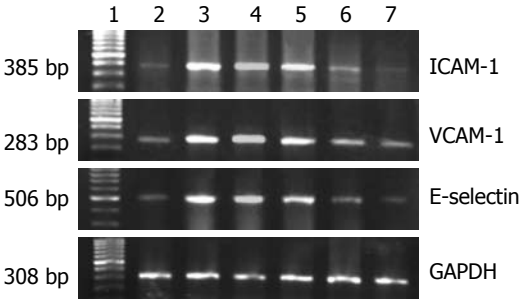


图 2 各组大鼠肝组织ICAM-1、VCAM-1、E-selectin mRNA的表达. 1: marker; 2: 正常对照组; 3: 肝纤维化组; 4: 自动逆转组; 5: 沙利度胺治疗2 wk组; 6: 沙利度胺治疗4 wk组; 7: 沙利度胺治疗6 wk组.

肝纤维化组大鼠肝组织ICAM-1、VCAM-1、E-selectin阳性细胞百分数显著高于正常组(P<0.05). 自动逆转组大鼠肝组织ICAM-1、VCAM-1、E-selectin阳性细胞百分数较肝纤维化组大鼠有所降低, 但无显著性差异(P>0.05). 各治疗组ICAM-1、VCAM-1、E-selectin阳性细胞百分数较肝纤维化组显著减少(P<0.05), 且治疗4 wk、6 wk组ICAM-1、VCAM-1和E-selectin的表达下降较治疗2 wk组更为显著(P<0.05, 表3).

2.4 肝组织ICAM-1、VCAM-1和E-selectin mRNA的表达 肝纤维化组大鼠ICAM-1、VCAM-1和E-selectin mRNA水平较正常组明显升高(P<0.05). 自动逆转组大鼠肝组织ICAM-1、VCAM-1和E-selectin mRNA较肝纤维化组大鼠有所降低, 但无显著性差异(P>0.05). 各治疗组的ICAM-1、VCAM-1和E-selectin mRNA水平较肝纤维化组显著下降(P<0.05), 且治疗4 wk、6 wk组ICAM-1、VCAM-1和E-selectin mRNA水平较治疗2 wk组下降更为显著(P<0.05, 图2, 表3).

表 3 大鼠肝组织ICAM-1、VCAM-1和E-selection蛋白及mRNA检测结果(mean ± SD, %)

分组	*n*	ICAM-1	VCAM-1	E-selectin
蛋白				
N	10	3.0 ± 0.7	2.4 ± 0.8	2.3 ± 0.8
A	8	60.8 ± 6.4[a]	83.8 ± 9.5[a]	76.1 ± 0.4[a]
B	10	57.6 ± 7.1[a]	80.3 ± 9.4[a]	74.7 ± 7.5[a]
C	12	49.6 ± 6.8[ace]	20.8 ± 6.5[ace]	64.2 ± 8.6[ace]
D	10	8.1 ± 0.8[aceg]	9.0 ± 1.0[aceg]	11.8 ± 1.4[aceg]
E	10	7.9 ± 0.7[aceg]	8.9 ± 1.1[aceg]	7.0 ± 1.0[aceg]
mRNA				
N	10	0.35 ± 0.07	0.58 ± 0.08	0.26 ± 0.06
A	8	1.51 ± 1.11[a]	1.24 ± 0.10[a]	1.37 ± 0.12[a]
B	10	1.47 ± 0.11[a]	1.21 ± 0.10[a]	1.28 ± 0.11[a]
C	12	1.33 ± 0.10[ace]	1.16 ± 0.24[ace]	1.16 ± 0.11[ace]
D	10	0.69 ± 0.09[aceg]	0.75 ± 0.10[aceg]	0.42 ± 0.11[aceg]
E	10	0.60 ± 0.10[aceg]	0.67 ± 0.11[aceg]	0.36 ± 0.11[aceg]

[a]*P*<0.05 *vs* N; [c]*P*<0.05 *vs* A; [e]*P*<0.05 *vs* B; [g]*P*<0.05 *vs* C.

3 讨论

沙利度胺曾被广泛用于治疗失眠症和妊娠反应. 近年研究发现, 沙利度胺致畸作用的证据并不充分, 而且由于他重要的抗炎、免疫调节及抗血管生成作用, 近年来又重新受到重视, 对其作用机制的认识和临床适应症的研究进一步深入[4-5]. Yeh *et al*[6]证实沙利度胺能够治疗致死性的肝脏坏死性炎症, 促进肝硬化的恢复. Muriel *et al*[7]在大鼠CCl_4肝硬化模型中同时给予沙利度胺, 发现羟脯胺酸含量显著降低、肝脏组织学改变减轻、胶原带变细, 提示沙利度胺可以防止CCl_4引起的炎症和纤维化.

我们的研究发现, 与肝纤维化组相比, 自动逆转组大鼠肝组织病理学和血清肝纤维化指标HA、LN、PCⅢ、CⅣ的浓度均无明显变化, 但是沙利度胺治疗4 wk组、6 wk组可显著改善大鼠肝组织病理学变化, 显著降低血清肝纤维化指标HA、LN、PCⅢ、CⅣ的含量, 表明沙利度胺可以有效地逆转实验性大鼠肝纤维化. 使用沙利度胺4 wk时作用明显, 但是使用6 wk与使用

■同行评价
本文立题新颖, 选用指标先进, 数据准确, 设计方法合理, 对沙利度胺老药新用有一定的科研意义.

4 wk并无显著性差异, 表明沙利度胺治疗肝纤维化存在明显的时间窗.

肝星状细胞(HSC)的活化和增殖是肝纤维化发生的中心事件. 研究发现, 静息的HSC不表达ICAM-1, 而活化的HSC则可增加ICAM-1基因表达及其表达产物. 这从细胞水平上提示ICAM-1的表达与HSC的活化及肝纤维化的发生密切相关. 炎症细胞表面的LFA-1、MAC-1与靶细胞膜上的ICAM-1结合, 从而导致肝细胞和窦周细胞损伤而致纤维化. VCAM-1可能不仅促进中性粒细胞, 而且也促进单核细胞及T淋巴细胞浸入肝实质, 与炎症的发生及发展有密切的关系. E-selectin参与外周血白细胞与血管内皮细胞黏附过程的起始黏附. 肝组织血管内皮细胞表达的E-selectin可介导炎性细胞和免疫细胞的浸润, 引起肝组织炎症, 促使肝星状细胞激活, 故可促进纤维化的发生及发展.

本实验发现, 在正常组和模型组大鼠肝组织中均有ICAM-1、VCAM-1和E-selectin mRNA的表达, 但模型组的表达强度显著增加. 模型组大鼠肝组织ICAM-1、VCAM-1、E-选择素蛋白表达较正常组明显增加, 除肝窦周细胞、血管内皮细胞表达增强, 肝细胞也出现阳性表达, 说明黏附分子的表达增强可能与肝纤维化的发病机制有关. Teo[8]发现, 沙利度胺可以减少TNF-α诱导的人脐静脉内皮细胞上的细胞表面黏附分子ICAM-1、VCAM-1和E-selectin的表达密度. Geitz *et al*[9]也证实, ICAM-1、VCAM-1和E-selectin参与中性粒细胞和内皮细胞黏附的瀑布效应, 沙利度胺可阻断这些黏附分子的上调. 本研究发现, 使用沙利度胺治疗实验性大鼠肝纤维化, 可明显减弱ICAM-1、VCAM-1、E-selectin mRNA和蛋白的表达, 且随着沙利度胺作用时间的延长, 抑制ICAM-1、VCAM-1、E-selectin表达的作用逐步增强, 呈一定的时间效应关系. 本实验观察到ICAM-1、VCAM-1、E-selectin mRNA表达与蛋白表达的水平一致, 说明其转录和翻译在同一水平. 沙利度胺对大鼠肝纤维化的治疗作用可能是通过同时下调ICAM-1、VCAM-1和E-selectin的转录和翻译水平来实现的.

此项研究表明, 沙利度胺可通过下调ICAM-1、VCAM-1和E-selectin表达水平而发挥抗纤维化作用. 这将有助于揭示沙利度胺治疗肝纤维化的机制, 也为肝纤维化的治疗提供新的思路.

4 参考文献

1 Huang YS, Wu JC, Chan CY, Chao Y, Chang FY, Lee SD. Circulating intercellular adhesion molecule-1 in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* (*Taipei*) 1999; 62: 487-495

2 Ho JW, Poon RT, Tong CS, Fan ST. Clinical significance of serum vascular cell adhesion molecule-1 levels in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2014-2018

3 Cervello M, Virruso L, Lipani G, Giannitrapani L, Soresi M, Carroccio A, Gambino R, Sanfililippo R, Marasa L, Montalto G. Serum concentration of E-selectin in patients with chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 345-351

4 Rajkumar SV. Current status of thalidomide in the treatment of cancer. *Oncology* (*Williston Park*) 2001; 15: 867-874; discussion 877-879

5 Eleutherakis-Papaiakovou V, Bamias A, Dimopoulos MA. Thalidomide in cancer medicine. *Ann Oncol* 2004; 15: 1151-1160

6 Yeh TS, Ho YP, Huang SF, Yeh JN, Jan YY, Chen MF. Thalidomide salvages lethal hepatic necroinflammation and accelerates recovery from cirrhosis in rats. *J Hepatol* 2004; 41: 606-612

7 Muriel P, Fernandez-Martinez E, Perez-Alvarez V, Lara-Ochoa F, Ponce S, Garcia J, Shibayama M, Tsutsumi V. Thalidomide ameliorates carbon tetrachloride induced cirrhosis in the rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 951-957

8 Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *AAPS J* 2005; 7: E14-19

9 Geitz H, Handt S, Zwingenberger K. Thalidomide selectively modulates the density of cell surface molecules involved in the adhesion cascade. *Immunopharmacology* 1996; 31: 213-221

编辑 何燕 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3377-3384
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

应用基因芯片技术筛选肝硬化相关基因

黄东凤, 黄介飞, 张 弘, 黄晓平, 鲍柏军, 魏 群, 华婷琰

黄东凤, 黄介飞, 张弘, 黄晓平, 鲍柏军, 魏群, 华婷琰, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001
黄东凤, 硕士研究生, 主要从事消化系肿瘤基础及临床研究.
江苏省卫生厅医学科研资助项目, No. H200330
通讯作者: 黄介飞, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科. jiefeihuang@163.com
电话: 0513-85806629 传真: 0513-85519820
收稿日期: 2007-04-10 修回日期: 2007-10-23

Screening hepatocirrhosis-related genes by GeneChip

Dong-Feng Huang, Jie-Fei Huang, Hong Zhang, Xiao-Ping Huang, Bai-Jun Bao, Qun Wei, Ting-Yan Hua

Dong-Feng Huang, Jie-Fei Huang, Hong Zhang, Xiao-Ping Huang, Bai-Jun Bao, Qun Wei, Ting-Yan Hua, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: the Health Department of Jiangsu Province, No. H200330
Correspondence to: Dr. Jie-Fei Huang, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. jiefeihuang@163.com
Received: 2007-04-10 Revised: 2007-10-23

Abstract

AIM: To ascertain the effectiveness of GeneChip for screening hepatocirrhosis-related genes.

METHODS: Total RNA was isolated from tissues of two cases of hepatic cirrhosis and one normal liver by the TRIzol method, and then purified, reverse-transcribed to cDNA incorporating biotin-labeling probe, hybridized with GeneChip (covering 18 400 transcripts, representing 14 500 distinct genes). Picture signals of fluorescence in gene array were scanned and compared by computer analysis of differential expression of the genes in two tissues.

RESULTS: Same differentially expressed genes were 1424 (9.82%) and same up regulated and down regulated genes were 980 and 444 respectively, in two hepatic cirrhosis and tissue specimens one normal liver tissue specimen. These genes were initially classified according to their function, and further analysis showed they played an important role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis.

CONCLUSION: The analysis of gene expression profile of hepatic cirrhosis using GeneChip can rapidly select associated abnormal genes, while further analysis of the obtained genes can help to elucidate the pathogenesis of hepatic cirrhosis.

Key Words: GeneChip; Hepatic cirrhosis; Gene expression

Huang DF, Huang JF, Zhang H, Huang XP, Bao BJ, Wei Q, Hua TY. Screening hepatocirrhosis-related genes by GeneChip. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3377-3384

摘要

目的: 探讨基因表达谱芯片技术在筛查肝硬化相关基因群表达中的作用.

方法: 按TRIzol法抽提肝硬化及正常肝脏组织总RNA, 分离纯化两种组织的mRNA. 经逆转录合成掺入生物素标记的cDNA合成探针, 与基因芯片(涵盖18 400个转录本, 代表14 500个明晰的基因)杂交, 扫描芯片荧光信号图像, 计算机分析, 比较二种组织基因表达谱差异.

结果: 2例肝硬化组织与正常肝脏组织相比, 有1424条基因(9.82%)共同表达差异, 其中共同上调基因980条和共同下调基因444条. 对1424条共同差异表达基因作了初步功能分类, 这些基因与肝硬化的发病机制存在相关性.

结论: 基因表达谱芯片技术可以筛选出肝硬化表达异常的相关基因群, 对其进一步研究有助于认识肝硬化的发病机制.

关键词: 基因芯片; 肝硬化; 基因表达谱

黄东凤, 黄介飞, 张弘, 黄晓平, 鲍柏军, 魏群, 华婷琰. 应用基因芯片技术筛选肝硬化相关基因. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3377-3384
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3377.asp

■背景资料
各种病因尤其乙肝所致的肝脏损伤都可引起局部的炎症, 继而成纤维细胞增生并由此导致肝内细胞外基质异常沉积形成肝纤维化, 肝纤维化进一步发展为肝硬化. 肝硬化早期无症状, 不易诊断, 且肝硬化与肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关, 被视为肝癌的癌前病, 严重危害人们健康; 目前对肝硬化尚缺乏有效的诊断治疗手段, 因此, 阐明肝硬化发生的分子机制并寻求有效的治疗方法具有重要的临床意义, 对肝硬化的研究就成为近20年世界医学攻关的一个热点.

■研发前沿
基因芯片技术, 可同时检测成百上千个基因的表达, 已被成功地应用于基因功能研究的各个领域. 进行大规模基因表达已成为研究病理生理过程的卓有成效的方法. 有关基因芯片技术研究肝硬化发病机制的研究报道却比较少.

0 引言

各种病因所致的肝脏损伤都可引起局部的炎症, 继而成纤维细胞增生并由此导致肝内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)异常沉积形成肝纤维化, 肝纤维化可进一步发展为肝硬化. 目前对肝硬化尚缺乏有效的治疗手段, 因此对肝硬化的研究成了近20年世界医学攻关的一个热点. 阐明肝硬化的发生机制并寻求有效的治疗方法具有重要的临床意义. 本实验主要通过基因表达谱芯片技术检测肝硬化和正常肝脏组织中基因群表达的不同, 筛选出相关的基因群, 为进一步深入研究其在肝硬化的发生、发展中的作用提供新的线索.

1 材料和方法

1.1 材料 2例肝硬化标本由南通大学附属医院手术活检组织提供, 1例正常肝组织由上海生物芯片有限公司-生物芯片上海国家工程研究中心提供. 分别于标本切取后立刻(10 min内)将所取组织放入液氮中冻存备用, 所有标本均由病理证实.

所用基因芯片为美国Affymetrix公司的U133 A 2.0基因表达谱芯片, 由上海生物芯片有限公司-生物芯片上海国家工程研究中心提供. Affymetrix U133 A 2.0基因表达谱芯片涵盖了18 400个转录本(RNA), 代表了145 00个明晰的基因.

1.2 方法 按TRIzol试剂使用说明书提取总肝RNA. 肝组织中加入TRIzol试剂后, 于冰浴中匀浆, 加入氯仿、异丙醇, 离心, 抽提总RNA. 用琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的28S和18S比例, 以评估总RNA的完整性; 紫外分光光度计测定260 nm和280 nm的吸收峰计算总RNA的纯度. 按QIAGEN Oligotex Direct mRNA kit提供的操作手册提取Poly(A)+mRNA. 按要求取1-8 μg总RNA反转录得到cDNA, 纯化双链DNA, 并将其片段化处理. 严格按QIAGEN RNeasy Total RNA Isolation kit试剂盒提供的操作手册纯化生物素标记的cRNA. 用分光光度计分析RNA浓度. 芯片使用前需平衡至室温, 杂交炉中45℃, 60 r/min预杂交芯片10 min. 加等体积处理好的杂交液, 然后在杂交炉中45℃, 60 r/min杂交芯片16 h. 把杂交好的芯片进行洗脱、染色, 最后扫描芯片. 用Affymetrix扫描仪扫描芯片后, GCOS1.2软件读取、处理数据. 差异基因筛选标准: change为Increase或Marginal Increase, log ratio(实验组和对照组比值取log2后的值)≥1, 实验组(肝硬化)Detection为Present的为上调基因; 为Decrease或Marginal Decrease, log ratio≤-1, 对照组(正常组)Detection为Present的为下调基因.

表 1 RNA样品的基本信息

实验编号	样品编号	RNA浓度(g/L)	cRNA A值
A	肝硬化1	1.311	1.93
B	肝硬化2	2.312	1.98
C	正常肝组织	1.806	1.94

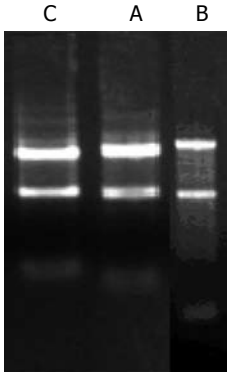


图 1 RNA的琼脂糖凝胶电泳检测图. A: 肝硬化1; B: 肝硬化2; C: 正常肝组织.

统计学处理 经Affymetrix扫描仪扫描芯片后, 用Affymetrix公司的GCOS1.2软件读取、处理数据.

2 结果

2.1 基因芯片样品总RNA的质量鉴定 所抽提的总RNA, 经分光光度计检测A_{260}, A_{280}的吸光度, 确定样品的浓度和纯度. 算得A_{260}/A_{280}均>1.9, 表明所提取总RNA纯度较高, 而且没有蛋白质和DNA残留. RNA样品的具体信息见表1. 经10 g/L甲醛变性琼脂糖凝胶电泳后, 18S和28S电泳条带清晰, 28S条带无明显降解(图1), 说明总RNA质量完好, 结果合格, 可以进行芯片实验.

2.2 基因芯片检测结果 2例基因芯片检测结果显示, 符合质控标准, 信号强度达到要求, 5'/3'比值正常. 正常肝组织cRNA、肝硬化组织cRNA分别与含18 400条转录本的芯片杂交.

图2(A-B)以散点图的形式描述了肝硬化组织/正常肝组织对应的18 400条转录本的信号平均强度. 按差异显著性标准筛选出在肝硬化组织中共同差异表达基因有1424条, 占筛选项基因总数的9.82%. 其中上调表达的基因有980条, 下调表达的基因有444条.

2.3 2例肝硬化组织中共同差异表达的基因 2例肝硬化组织中共同差异表达的基因有980条基因上调和444条基因下调. 对共同差异表达为上

表 2 肝硬化组织中共同差异表达的部分上调和下调基因

功能分类		GenBank ID	基因名称	基因代码	染色体定位	Signal log Ratio
上调	抗氧化活性相关	NM_006793	peroxiredoxin 3	PRDX3	chr10q25–q26	1.1
		M12523	白蛋白	ALB	chr4q11–q13	2.3
	凋亡或肿瘤相关	NM_004396	DEAD(Asp–Glu–Ala–Asp)box多肽5	DDX5	chr17q21	2.1
		NM_003292	活化MET致癌基因已易位的启动子区	TPR	chr1q25	3.4
		NM_007315	信号传导子及转录激活子1	STAT1	chr2q32.2	2.3
		NM_000245	met原癌基因	MET	chr7q31	1.2
		NM_000596	胰岛素样生长因子结合蛋白1	IGFBP1	chr7p13–p12	6.4
		NM_003299	肿瘤排斥抗原(gp96)1	TRA1	chr12q24.2–q24.3	1.6
		BC002704	信号传导子及转录激活子1, 91 kDa	STAT1	chr2q32.2	2.8
		NM_021960	髓样细胞非白血性白血病序列1	MCL1	chr1q21	1.7
	结合蛋白相关	NM_004539	天冬酰胺酰–tRNA合成酶	NARS	chr18q21.2–q21.3	1.8
		NM_003472	DEK致癌基因	DEK	chr6p23	2.1
		NM_005381	核仁素	NCL	chr2q12–qter	1
		NM_004859	笼形蛋白重肽(Hc)	CLTC	chr17q11–qter	1
		NM_018834	基质蛋白3	MATR3	chr5q31.2	1.6
		NM_002156	热休克蛋白60 kDa 1	HSPD1	chr2q33.1	1.3
		NM_006585	伴侣素封闭物TCP1, 亚单位8	CCT8	chr21q22.11	2.3
		NM_003144	信号序列受体, α	SSR1	chr6p24.3	1.7
	代谢相关	NM_004539	天冬酰胺酰–tRNA合成酶	NARS	chr18q21.2–q21.3	1.8
		NM_004939	DEAD(Asp–Glu–Ala–Asp)盒多肽1	DDX1	chr2p24	1.4
		NM_005154	泛素特异蛋白酶8	USP8	chr15q21.2	2
		N54448	热应激反应蛋白12	HRSP12	chr8q22	1.4
		NM_004728	DEAD(Asp–Glu–Ala–Asp)盒多肽21	DDX21	chr10q21	2.1
		NM_001239	细胞周期蛋白H	CCNH	chr5q13.3–q14	1.9
		NM_006910	视网膜母细胞瘤结合蛋白6	RBBP6	chr16p12.2	4.9
		NM_015675	DNA–损伤诱导生长停滞β	GADD45B	chr19p13.3	2
	酶活性调节相关	NM_002734	蛋白激酶, cAMP–依赖调节子I型α	PRKAR1A	chr17q23–q24	2
		NM_002923	G蛋白信号系统调节子2	RGS2	chr1q31	2.4
		NM_000293	磷酸化酶激酶激酶β	PHKB	chr16q12–q13	1.7
		NM_012294	Rap鸟嘌呤核苷酸交换因子5	RAPGEF5	chr7p15.3	2.3
		NM_001735	补体成分5	C5	chr9q33–q34	1.6
		NM_014495	血管生成素–类似物3	ANGPTL3	chr1p31.1–p22.3	2.3
	分子马达相关	BF432550	肌球蛋白IB	MY01B	chr2q12–q34	2
	营养储备相关	NM_005637	染色体18滑膜肉瘤易位	SS18	chr18q11.2	2.5
	分子功能退化相关	NM_012433	剪接因子3b, 亚单位1	SF3B1	chr2q33.1	2.6
		NM_003092	核内小分子核糖核蛋白多肽B	SNRPB2	chr20p12.2–p11.22	1.6
		NM_005872	乳房癌放大序列2	BCAS2	chr1p21–p13.3	1.6
	信号传导相关	NM_000245	met原癌基因	MET	chr7q31	1.2
		NM_007315	信号传导子及转录激活子1	STAT1	chr2q32.2	2.3
		NM_002296	核纤层蛋白B受体	LBR	chr1q42.1	1.5
		NM_001166	颗粒症病毒IAP(基因)重复封闭物2	BIRC2	chr11q22	1.7
		NM_004124	神经胶质成熟因子β	GMFB	chr14q22.2	1.2
		NM_001338	柯萨奇病毒和腺病毒受体	CXADR	chr21q21.1	1.5
		AL096842	线粒体肿瘤抑制基因1	MTUS1	chr8p22	1.1
	结构分子相关	NM_004859	笼形蛋白重肽(Hc)	CLTC	chr17q11–qter	1
		NM_018834	基质蛋白3	MATR3	chr5q31.2	1.6
		NM_000971	核糖体蛋白L7	RPL7	chr8q21.11	1.3
		NM_002291	层粘连蛋白β1	LAMB1	chr7q22	2.5
	转录调控相关	NM_000971	核糖体蛋白L7	RPL7	chr8q21.11	1.3
		NM_014739	BCL2–关联转录因子1	BCLAF1	chr6q22–q23	2
		NM_001964	早期生长应答1	EGR1	chr5q31.1	3

■创新盘点

本文利用美国Affymetrix公司U133 A 2.0基因表达谱芯片基因芯片技术检测肝硬化差异基因的表达并进行了功能分类. 基因初步功能共分16类.

■应用要点
本文应用基因芯片技术从2例肝硬化组织中筛选出共同差异表达的基因中上调基因980条和下调基因444条，为阐明肝硬化复杂的生物学特性与基因表达之间可能存在内在联系及对肝硬化机制进一步研究及进行干预治疗提供了可能.

		NM_005935	髓样/淋巴样或混合性白血病易位子2	MLLT2	chr4q21	1.6
		NM_001310	cAMP应答元件结合蛋白-类似物2	CREBL2	chr12p13	1.8
		NM_016614	TRAF和TNF受体相关蛋白	TTRAP	chr6p22.3-p22.1	1.6
	翻译调控相关	NM_014670	基本亮氨酸拉链和W2域1	BZW1	chr2q33	1.7
		NM_001412	性连锁真核翻译起始因子1A	EIF1AX	chrXp22.12	1.3
		NM_015904	真核翻译起始因子5B	EIF5B	chr2p11.1-q11.1	3.2
		NM_004730	真核翻译终止因子1	ETF1	chr5q31.1	2.7
		NM_024863	转录延伸因子A(SII)-类似物4	TCEAL4	chrXq22.2	1.8
		NM_002453	线粒体翻译起动因子2	MTIF2	chr2p14-p16	1.8
	物质运输相关	NM_001829	氯化物途径3	CLCN3	chr4q33	1.2
		NM_004896	空泡的蛋白质分选26	VPS26	chr10q21.1	1.3
		NM_003715	小囊泡停靠蛋白质p115	VDP	chr4q21.1	1.8
		NM_002223	肌醇1, 4, 5-三磷酸根受体2型	ITPR2	chr12p11	2
下调	凋亡或肿瘤相关	NM_005022	抑制蛋白1	PFN1	chr17p13.3	-1.9
		NM_002634	阻抑蛋白	PHB	chr17q21	-1.2
		NM_005745	B-cell受体相关蛋白31	BCAP31	chrXq28	-1.1
		NM_004343	钙网织蛋白	CALR	chr19p13.3-p13.2	-1.4
		NM_000358	转化生长因子β	TGFBI	chr5q31	-1.6
		NM_002011	纤维母细胞生长因子受体4	FGFR4	chr5q35.1-qter	-1
		NM_005538	抑制素βC	INHBC	chr12q13.1	-2.7
		NM_018468	早老素增强子2同系物	PSENEN	chr19q13.12	-1.5
	结合蛋白相关	X07868	胰岛素样生长因子 II	IGF II	chr11p15.5	-1.4
		NM_003752	真核翻译起始因子3, 亚单位8	EIF3S8	chr16p11.2	-1.3
		NM_004343	钙网织蛋白	CALR	chr19p13.3-p13.2	-1.4
		NM_001916	细胞色素c-1	CYC1	chr8q24.3	-1.3
		NM_003321	线粒体的Tu翻译延伸因子	TUFM	chr16p11.2	-1.2
		NM_005538	抑制素βC	INHBC	chr12q13.1	-2.7
		NM_014868	环指蛋白10	RNF10	chr12q24.31	-1.1
	代谢相关	NM_002065	谷氨酸氨连接酶(谷氨酰胺合酶)	GLUL	chr1q31	-3.5
		NM_001428	烯醇酶1	EN01	chr1p36.3-p36.2	-1.2
		NM_006623	磷酸甘油酸脱氢酶	PHGDH	chr1p12	-1.2
		NM_000075	周期素依赖性蛋白激酶4	CDK4	chr12q14	-1.3
		NM_004390	组织蛋白酶H	CTSH	chr15q24-q25	-1.7
		NM_005035	线粒体的DNA定向RNA多聚酶	POLRMT	chr19p13.3	-1.1
		NM_001069	微管蛋白, β2	TUBB2	chr6p25	-1.3
		NM_000060	生物素化物酶	BTD	chr3p25	-1
	细胞周期相关	NM_002950	(内质网)核糖体结合糖蛋白I	RPN1	chr3q21.3-q25.2	-1.6
		NM_001916	细胞色素c-1	CYC1	chr8q24.3	-1.3
		NM_000244	多发性内分泌腺瘤综合征I	MEN1	chr11q13	-1.2
		NM_001150	膜内氨酰氨基肽酶	ANPEP	chr15q25-q26	-1.2
	酶活性调节相关	NM_001320	酪蛋白激酶2β-多肽	CSNK2B	chr6p21-p12|6p21.3	-1
		NM_004491	糖皮质激素受体DNA结合因子1	GRLF1	chr19q13.3	-1.8
		NM_004127	G蛋白途径抑制子1	GPS1	chr17q25.3	-1.8
	分子马达相关	NM_004082	动力蛋白激活蛋白1	DCTN1	chr2p13	-1.2
		NM_001614	肌动蛋白γ1	ACTG1	chr17q25	-1
	分子功能退化相关	NM_004343	钙网织蛋白	CALR	chr19p13.3-p13.2	-1.4
	信号传导相关	NM_002840	蛋白酪氨酸磷酸酶受体型F	PTPRF	chr1p34	-1.1
		NM_005745	B-cell 受体相关蛋白31	BCAP31	chrXq28	-1.1
		NM_014748	分选连接蛋白17	SNX17	chr2p23-p22	-2.1
		NM_002205	纤维连接因子受体α多肽	ITGA5	chr12q11-q13	-1.7
		NM_002162	细胞间黏附分子3	ICAM3	chr19p13.3-p13.2	-1.1
		NM_004633	白介素1受体, II型	IL1R2	chr2q12-q22	-1.8
		NM_000024	肾上腺素能的β-2-受体表面	ADRB2	chr5q31-q32	-1
	结构分子相关	NM_001614	肌动蛋白γ1	ACTG1	chr17q25	-1

	NM_004927	线粒体核糖体蛋白L49	MRPL49	chr11q13	−1.3
	NM_002949	线粒体核糖体蛋白蛋白L12	MRPL12	chr17q25	−1
转录调控相关	NM_001428	烯醇酶1	EN01	chr1p36.3−p36.2	−1.2
	NM_004491	糖皮质激素受体DNA结合因子1	GRLF1	chr19q13.3	−1.8
	NM_003195	转录延伸因子A(SII), 2	TCEA2	chr20q13.33	−2.6
	NM_005693	细胞核受体亚科1, 团H, 成员3	NR1H3	chr11p11.2	−1.3
	NM_000457	肝细胞核因子4, α	HNF4A	chr20q12−q13.1	−2.1
翻译调控相关	NM_003752	真核翻译起始因子3, 亚单位8	EIF3S8	chr16p11.2	−1.3
	NM_003321	线粒体的Tu翻译延伸因子	TUFM	chr16p11.2	−1.2
	NM_004927	线粒体核糖体蛋白L49	MRPL49	chr11q13	−1.3
物质运输相关	NM_006148	LIM and SH3蛋白1	LASP1	chr17q11−q21.3	−1
	NM_001916	细胞色素c−1	CYC1	chr8q24.3	−1.3
	NM_002631	磷酸葡萄糖酸脱氢酶	PGD	chr1p36.3−p36.13	−1.9
	NM_006623	磷酸甘油酸脱氢酶	PHGDH	chr1p12	−1.2
	NM_006066	乙醛还原酶	AKR1A1	chr1p33−p32	−1.1
	NM_003365	泛醇−细胞色素C还原酶核心蛋白I	UQCRC1	chr3p21.3	−1.4

■名词解释

基因表达谱: 常被称为是某一生理或病理现象的分子图像, 研究对象是细胞中的mRNA的稳定水平, 可以从RNA水平探讨基因与疾病的关系, 直接筛选表达差异的基因.

调的基因初步功能共分16类. 在2例组织中发现共同上调的包括抗氧化活性相关基因、凋亡或肿瘤相关基因、结合蛋白相关基因、代谢相关基因、细胞周期相关基因、酶活性调节相关基因、分子马达相关基因、营养储备相关基因、分子功能退化相关基因、信号传导相关基因、结构分子相关基因、转录调控相关基因、翻译调控相关基因和物质运输相关基因. 在2例组织中未发现共同上调的包括分子伴娘调控相关基因、未知分子功能相关基因. 对其中部分分类基因列表如表1. 而对共同差异表达为下调的基因初步功能分类(共分16类), 在未发现共同下调的较共同上调的增加了抗氧化活性相关基因, 对其中部分分类基因列表如表1.

很多基因具有多功能, 参与细胞周期, 信号传导, 结合蛋白, 转录, 翻译, 凋亡. 这些基因均至少参与两种不同的细胞活动过程. 对其中部分分类基因列表如表2.

3 讨论

众所周知, 肝硬化的发生、发展是一个复杂的多因素、多步骤的过程, 是许多肿瘤相关基因表达失常或多种基因失活所致. 因此肝硬化组织中相关基因及基因组的变化研究显得更为重要. 本实验中我们采用了美国Affymetrix公司的U133 A 2.0基因表达谱芯片, 检测到肝硬化组织与正常肝脏组织间有1424条(9.82%)存在差异表达的基因, 其中上调表达的基因有980条, 下调表达的基因有444条.

这些差异基因初步分为16类, 包括抗氧化活性相关、凋亡或肿瘤相关、结合蛋白相关、代谢相关、细胞周期相关、酶活性调节相关基因等. 我们的结果表明, 肝硬化的发生发展是一个多基因参与的复杂变化过程, 涉及到许多相关基因群的变化.

首先, 肝纤维化是指慢性肝病晚期的组织学变化, 是一种在损害因子持续作用下渐进的病理过程. 以ECM增加为特征, 同时伴有肝实质的广泛破坏、再生, 导致肝小叶和肝血管结构的紊乱, 是继发于包括慢性乙型(丙型)病毒肝炎等几乎所有的慢性肝病, 最终发展形成肝硬化. HSC(肝星状细胞)是肝纤维化ECM的主要来源细胞. 生长因子在调控HSC形态演变及功能变化中起的作用更是日益受到重视[1]. HSC的激活是肝纤维化发生发展的中心环节, 可分为“启动阶段”和“持久化阶段”. 在“启动阶段”, 肝细胞受损后释放丝裂原, 旁分泌作用于HSC, 引起HSC的增殖, 并使肝细胞生长丧失接触抑制. 随后活化的枯否(Kupffer)细胞、内皮细胞及血小板释放细胞因子, 如转化生长因子(TGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肝细胞生长因子(HGF)等, 促进HSC激活转化为肌成纤维细胞(MFB), 继而进入激活的“持久化阶段”, HSC维持激活状态并产生纤维化. 其中肝细胞生长因子随肝纤维化进程逐渐升高, 在早期有促进肝细胞再生, 具有抗纤维化作用. HGF最初是从血浆中获得, 是一种来源于肝脏间质细胞, 亦可由肝外组织产生, 是强烈的肝细胞增殖刺激因子. Stoker *et al*[2]发现成纤维细胞分泌一种能促进上皮细胞集落扩散的细胞因子, 称为离散因子(SF). 通过对这两种细胞因子的结构和功能的

■同行评价
本文设计合理，实验结果丰富可信，有一定的参考价值.

表 3 肝硬化组织中共同差异表达且具有多功能的部分上调和下调基因

功能分类	GenBank ID	基因名称	基因代码	染色体定位	Signal Log Ratio
上调	NM_004396	DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp) box多肽5	DDX5	chr17q21	2.1
	NM_007315	信号传导子及转录激活子1	STAT1	chr2q32.2	2.3
	NM_003299	肿瘤排斥抗原(gp96)1	TRA1	chr12q24.2-q24.3	1.6
	NM_021960	髓样细胞非白血性白血病序列1	MCL1	chr1q21	1.7
	NM_000596	胰岛素样生长因子结合蛋白1	IGFBP1	chr7p13-p12	6.4
	NM_007315	信号传导子及转录激活子1, 91 kDa	STAT1	chr2q32.2	2.3
	NM_003292	活化MET致癌基因已易位的启动子区	TPR	chr1q25	3.4
	NM_000700	膜联蛋白A1	ANXA1	chr9q12-q21.2| 9q12-q21.2	3.2
	NM_003810	肿瘤坏死因子超家族, 成员10	TNFSF10	chr3q26	1.2
	NM_006910	视网膜母细胞瘤结合蛋白6	RBBP6	chr16p12.2	4.9
	BC004490	v-fos FBJ鼠骨肉瘤病毒致瘤基因同系物	FOS	chr14q24.3	6.6
	NM_004859	笼形蛋白重肽(Hc)	CLTC	chr17q11-qter	1
	NM_002156	热休克蛋白60 kDa 1(伴侣素)	HSPD1	chr2q33.1	1.3
	NM_003472	DEK致癌基因(DNA结合)	DEK	chr6p23	2.1
下调	NM_002634	阻抑蛋白	PHB	chr17q21	-1.2
	X07868	胰岛素样生长因子 II	IGF II	chr11p15.5	-1.4
	NM_004343	钙网织蛋白	CALR	chr19p13.3-p13.2	-1.4
	NM_001916	细胞色素c-1	CYC1	chr8q24.3	-1.3
	NM_002997	多配体1	SDC1	chr2p24.1	-1.4
	NM_001654	v-raf鼠肉瘤3611病毒致瘤基因同系物	ARAF	chrXp11.4-p11.2	-1.6
	NM_000075	周期素依赖性蛋白激酶4	CDK4	chr12q14	-1.3
	NM_030662	促分裂原活化蛋白激酶激酶2	MAP2K2	chr19p13.3	-1.2
	NM_001328	C末端结合蛋白1	CTBP1	chr4p16	-1.2
	NM_004364	CCAAT/增强子结合蛋白α	CEBPA	chr19q13.1	-1.5
	NM_003156	间质相互作用分子1	STIM1	chr11p15.5	-1
	NM_001654	v-raf鼠肉瘤3611病毒致瘤基因同系物	ARAF	chrXp11.4-p11.2	-1.6
	NM_001150	膜内氨酰氨基肽酶	ANPEP	chr15q25-q26	-1.2

研究, 发现HGF和SF为同一物质[3]. HGF/SF通过与细胞膜上特异受体即原癌基因c-Met[4]编码的一种跨膜酪氨酸蛋白激酶结合, 引起酪氨酸蛋白激酶活化, 激活细胞内多个信号级联反应, 如磷脂酰肌醇3激酶、磷脂酶c、Ras-GTP激酶活性蛋白, 是一种多效性生长因子, 并非肝特异性生长因子, 能刺激多种类型细胞分化、增殖、再生、运动、迁移扩散及形态的发生[5-8]. cMet是原癌基因, 其编码的蛋白, 是一类具有自主性磷酸化活性的跨膜受体. HGF与cMet结合后激活受体发生自身磷酸化, 进而导致多种底物蛋白磷酸化, 从而引起细胞内一系列信号传导, 最终发挥HGF/SF的生物学功能, 除引起正常细胞的生物学行为外, 还可以刺激肿瘤细胞的离散、增殖、血管形成、转移、侵袭等[9-10]. 在既往的关于cMet的研究中, 大多数集中于结肠直肠癌、甲状腺癌、鼻咽癌、肺癌、乳腺癌、肝癌等恶性肿瘤[11-15]. 魏文芸 *et al*[16]报道显示, 在慢性肝病、肝硬化、肝癌的患者中, HGF的水平有所增高, 以肝硬化的血清HGF的增高最为显著, 显著高于慢性肝病组和肝癌组($P<0.001$), 并与肝硬化病理变化相符合. 肝硬化主要病理变化是肝细胞坏死, 肝间质细胞增生, 而HGF在肝脏主要是由肝间质细胞所分泌. Kim *et al*[17]发现静止HSC未检测到c-Met表达, 培养3 d后表达增加. Cramer *et al*[18]也在体内外实验研究中发现, 活化HSC能表达c-Met. 在肝纤维化过程中, 间质细胞低表达转为高表达, HGF不仅作用于正常上皮细胞, 而且作用于病理情况下由间质细胞转化而成的肌成纤维细胞, 促进纤维化. 而现有不少实验报道[19-20], HGF在受损早期即明显升高并有抗纤维化作用. 在本实验中HGF、c-Met、TPR(已易位的活化MET癌基因启动子)全部上调, 与部分报道一致, 部分不一致. 推断HGF、c-Met、TPR在肝纤维化不同时段发挥一定作用, 且作用可能不同. 因此, HGF/SF可能成

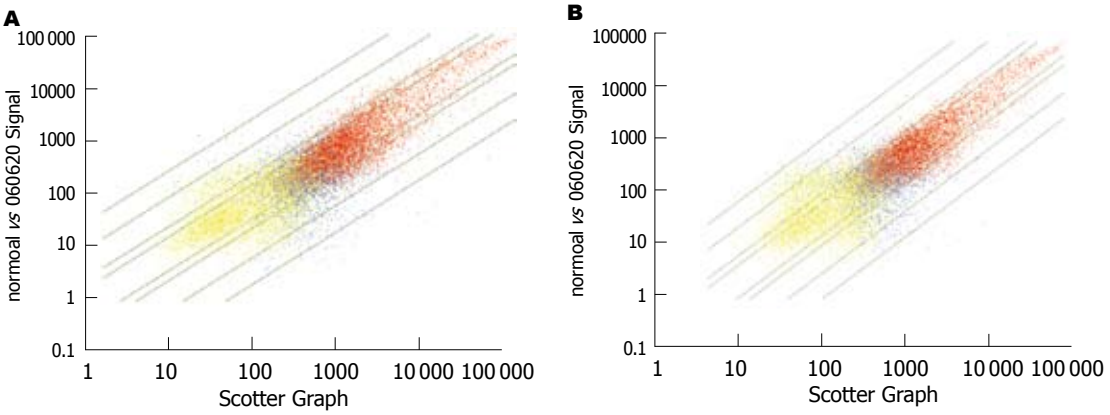


图 2 基因表达散点图. A: 肝硬化1/正常肝, X轴为正常肝信号值, Y轴为肝硬化1信号值; B: 肝硬化2/正常肝, X轴为正常肝信号值, Y轴为肝硬化2信号值. 图中红色的点为两组中该基因的Detection(检出结果)均为Present(被检出), 蓝色的为两组中有一个值不是Present的, 而黄色的点为两组均为Absent(未被检出).

为肝硬化早期诊断指标及潜在治疗靶点, 而其在肝硬化向肝癌转变过程中的作用有待进一步研究.

在我们筛选出的共同差异表达基因中, 还有一些基因在肝硬化组织中参与细胞内信号传递和基因表达调控等多种细胞过程, 如STAT1、DDX5等. STAT(signal transducer and activator of transcription)是一类新型细胞内信号传递和基因表达调控因子家族, 由9个成员构成. 自从在干扰素对培养细胞基因转录诱导研究中发现该家族以来, 他一直是细胞因子研究领域的热点. 他与炎症、肿瘤、免疫性疾病的关系日益受到人们的重视[21]. 其家族成员参与许多细胞因子、生长因子的信号转导, 调节人体免疫反应、炎症反应和细胞的生长、分化等. 近年来研究发现, STAT具有强烈的抑制细胞凋亡、促进细胞增殖的作用, 参与人类恶性肿瘤的发生、发展和演变. 细胞因子通过JAK/STAT途径, 激活STAT而诱导目的基因表达[22]. 在正常生理状态下, STAT的激活仅持续数分钟至几小时, 对于正常细胞的生理功能, 如胚胎发育、器官形成、免疫功能的完善、细胞的生长、分化等, 起着关键性作用[23]. STAT1(signal transducer and activator of transcription 1)位于染色体chr2q32.2, 多种细胞因子可以诱导STAT1的激活, 主要包括干扰素(IFN)、表皮生长因子(EGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、白介素-6(IL-6)等[24]. 亦有研究认为, STAT1通过调节iNOS及NO的表达发挥其在炎症反应中的作用[25]. 有研究发现[26], 在博莱霉素(BLM)致大鼠肺纤维化模型中, 其肺泡巨噬细胞(AM)内存在STAT1的异常活化. 提示BLM组的AM内存在STAT1的异常活化; 异常活化的STAT1可引起包括ICAM-1及STAT1本身在内的多种STAT1依赖性免疫反应基因的表达增加, 增加表达的ICAM-1可诱导炎性细胞在肺内募集, 分泌细胞因子, 引起肺部炎症反应, 参与肺泡炎及随后的肺纤维化的形成. 本实验中STAT1上调, 可能是因为肝脏慢性炎症激活JAK/STAT信号通路或STAT信号通路引起级联反应, 促进肝纤维化形成.

目前, 基因芯片技术我们正在被广泛地应用于对肝硬化复杂的发生、发展过程的研究及通过基因表达谱的分析来认识肝硬化的发病机制, 为肝硬化的诊断和治疗提供了科学依据. 本研究结果表明, 共有16类基因群1424条基因在肝硬化组织中异常表达, 表明肝硬化中很可能存在互相协调共同表达的基因群. 因此利用基因表达谱芯片技术对肝硬化进行基因群水平研究, 筛选在肝硬化相关的多个环节上起重要作用的分子和起关键调节作用的基因, 以揭示肝硬化在基因水平上的本质, 为肝硬化的早期诊断和早期治疗提供理论依据.

4 参考文献

1 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835

2 Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 1987; 327: 239-242

3 Gherardi E, Stoker M. Hepatocytes and scatter factor. *Nature* 1990; 346: 228

4 Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991; 251: 802-804

5 Gohda E. Function and regulation of production of

hepatocyte growth factor (HGF). *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2002; 119: 287-294, 309
6 Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 915-925
7 Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373: 699-702
8 Bahary N, Zon LI. Development. Endothelium--chicken soup for the endoderm. *Science* 2001; 294: 530-531
9 Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura N. Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. *J Biol Chem* 1996; 271: 3615-3618
10 Parr C, Jiang WG. Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its activator, inhibitors and the c-Met receptor in human cancer cells. *Int J Oncol* 2001; 19: 857-863
11 Herynk MH, Stoeltzing O, Reinmuth N, Parikh NU, Abounader R, Laterra J, Radinsky R, Ellis LM, Gallick GE. Down-regulation of c-Met inhibits growth in the liver of human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2003; 63: 2990-2996
12 Mineo R, Costantino A, Frasca F, Sciacca L, Russo S, Vigneri R, Belfiore A. Activation of the hepatocyte growth factor (HGF)-Met system in papillary thyroid cancer: biological effects of HGF in thyroid cancer cells depend on Met expression levels. *Endocrinology* 2004; 145: 4355-4365
13 Qian CN, Guo X, Cao B, Kort EJ, Lee CC, Chen J, Wang LM, Mai WY, Min HQ, Hong MH, Vande Woude GF, Resau JH, Teh BT. Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 589-596
14 Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, Hansen M, Schaefer E, Naoki K, Lader A, Richards W, Sugarbaker D, Husain AN, Christensen JG, Salgia R. Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 1479-1488
15 Jiang WG, Grimshaw D, Lane J, Martin TA, Abounader R, Laterra J, Mansel RE. A hammerhead ribozyme suppresses expression of hepatocyte growth factor/scatter factor receptor c-MET and reduces migration and invasiveness of breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2555-2562
16 魏文芸, 潘柏申, 刘康达. 血清中肝细胞生长因子的检测与肝硬化发病相关性分析. 中华检验医学杂志 2004; 27: 104-105
17 Kim WH, Matsumoto K, Bessho K, Nakamura T. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am J Pathol* 2005; 166: 1017-1028
18 Cramer T, Schuppan D, Bauer M, Pfander D, Neuhaus P, Herbst H. Hepatocyte growth factor and c-Met expression in rat and human liver fibrosis. *Liver Int* 2004; 24: 335-344
19 刘芳, 徐启勇, 叶燕青. 肝细胞生长因子在肺纤维化模型中的表达及意义. 武汉大学学报(医学版) 2005; 26: 408-411
20 Takemura M, Furuta N, Nakamura S, Okuno M, Seishima M, Noma A, Sugihara J, Murakami N, Sugiyama H, Moriwaki H. Determination and clinical significance of human hepatocyte growth factor in serum. *Rinsho Byori* 1992; 40: 1168-1172
21 范贤明, 张玲, 张世波. STAT和PCNA在肺癌组织中的表达及其临床意义. 泸州医学院学报 2005; 28: 7-10
22 Schindler CW. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest* 2002; 109: 1133-1137
23 Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002; 109: 1143-1148
24 Wormald S, Zhang JG, Krebs DL, Mielke LA, Silver J, Alexander WS, Speed TP, Nicola NA, Hilton DJ. The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling. *J Biol Chem* 2006; 281: 11135-11143
25 Salonen T, Sareila O, Jalonen U, Kankaanranta H, Tuominen R, Moilanen E. Inhibition of classical PKC isoenzymes downregulates STAT1 activation and iNOS expression in LPS-treated murine J774 macrophages. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 790-799
26 Fan XM, Wang ZL, Li ZH. STAT1 activation and STAT1-dependent immune-response gene ICAM-1 expression in alveolar macrophages of rats suffered from interstitial pulmonary fibrosis. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2003; 19: 3-6

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3385-3389
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

靶向cyclinE小干扰RNA对肝癌HepG2细胞增殖和凋亡的影响

田雪飞, 黄 燕, 朱 才, 肖 竺, 郭永良

田雪飞, 肖竺, 郭永良, 湖南中医药大学中西医结合学院 湖南省长沙市 410208
黄燕, 朱才, 中南大学湘雅医院感染科 湖南省长沙市 410008
田雪飞, 2001年湖南中医药大学中医内科学博士研究生毕业, 2004年中南大学湘雅医院内科学博士后流动站出站, 副教授, 从事肝癌的中医药防治研究.
湖南省自然科学基金资助项目, No. 06JJ4054
湖南省教育厅青年资助项目, No. 05B036
通讯作者: 田雪飞, 410208, 湖南省长沙市含浦科教园区象嘴路, 湖南中医药大学中西医结合学院. windsame@163.com
电话: 0731-8458070 传真: 0731-8458071
收稿日期: 2007-07-20 修回日期: 2007-10-29

Effects of small RNA interference to target cyclinE gene on apoptosis and proliferation of HepG2 hepatocellular carcinoma cells

Xue-Fei Tian, Yan Huang, Cai Zhu, Zhu Xiao, Yong-Liang Guo

Xue-Fei Tian, Zhu Xiao, Yong-Liang Guo, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China
Yan Huang, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 06JJ4054 and the Youth Project of Hunan Province Office of Education, No. 05B036
Correspondence to: Dr. Xue-Fei Tian, Department of Integrative Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China. windsame@163.com
Received: 2007-07-20 Revised: 2007-10-29

Abstract

AIM: To design pSilencer3.1-H1hygro plasmid expressing small interfering RNA (siRNA) that targets the coding region of cyclinE, and to evaluate the inhibitory effect of this siRNA on HepG2 cells after transfection.

METHODS: pSilencer3.1-H1hygro vector of the siRNA based on the coding region of cyclinE was constructed. The plasmid and liposome metafectene were cotransfected into HepG2 cells, which overexpressed cyclinE. Cell proliferation and apoptosis were assessed by MTT assay and flow cytometry, respectively, and expression of cyclinE was detected by RT-PCR and Western blotting.

RESULTS: The plasmid expressing siRNA targeted on the coding region of cyclinE was successfully constructed. Expression of cyclinE mRNA and protein was suppressed by up to 79% and 65%, respectively.

CONCLUSION: siRNA targeted on cyclinE can silence cyclinE overexpression, and subsequently suppress proliferation and promote apoptosis of HepG2 cells.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; cyclinE; RNA interference

Tian XF, Huang Y, Zhu C, Xiao Z, Guo YL. Effects of small RNA interference to target cyclinE gene on apoptosis and proliferation of HepG2 hepatocellular carcinoma cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3385-3389

摘要

目的: 以cyclinE基因编码区为靶位, 构建表达小干扰RNA(siRNA)的质粒载体, 观察转染后对HepG2细胞的影响.

方法: 针对cyclinE基因序列构建表达siRNA的真核表达载体pSilencer3.1-H1hygro, 利用脂质体Metafectene转染cyclinE基因高表达的肝癌细胞株HepG2. 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率, MTT法检测细胞增殖活性, RT-PCR和Western blot法观察转染后细胞cyclinE基因表达.

结果: 成功构建了表达siRNA的真核质粒载体, 转染后cyclinE基因mRNA及蛋白表达水平分别下降了79%和65%.

结论: 靶向cyclinE基因的siRNA可有效沉默HepG2细胞高表达的cyclinE基因, 从而抑制肝癌细胞的增殖并促进凋亡.

关键词: 肝癌; 细胞周期蛋白E; RNA干扰

■背景资料
癌基因的高表达是HCC患者病情进展的重要原因. cyclinE基因在肝癌细胞HepG2中整个细胞周期高表达. 目前肝癌基因治疗有基因在肝癌组织中表达的特异性不高, 靶向性不强及毒副作用等不足, RNAi技术以其高特异性, 高效率等优点, 已成为抗肿瘤研究的热点.

■研发前沿
本文采用siRNA表达框架构建siRNA表达载体，以cycleE为靶基因设计短片段双链RNA(siRNA)使之发生基因沉默.

田雪飞, 黄燕, 朱才, 肖竺, 郭永良. 靶向cyclinE小干扰RNA对肝癌HepG2细胞增殖和凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3385-3389
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3385.asp

0 引言

细胞周期蛋白E(cyclinE)基因表达的cyclinE蛋白可与细胞周期依赖性激酶2(cyclin dependent kinase 2, CDK2)结合形成cyclinE-CDK2复合物, 在G_1晚期调控细胞从G_1期进入S期[1]. cyclinE的表达随细胞周期波动出现精确的周期性合成与降解, 从而保持基因复制的稳定性[2]. cyclinE的过表达使细胞过多从G_1期进入S期, 导致细胞恶性增殖. Reynolds *et al*报道肝细胞癌组织中cyclinE呈过表达现象[3], 并与晚期肝癌患者总生存率及病情的恶化预后相关[4]. 我们利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术, 设计了靶向cyclinE的短片段双链RNA(small interfering RNA, siRNA)表达质粒载体, 并观察转染后对cyclinE高表达的肝癌细胞株HepG2的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株HepG2由本研究室引进并保存, 含H_1启动子的转录载体pSlilencer3.1-H1hygro质粒购自Ambion公司, 真核绿色荧光蛋白表达载体pEGFP质粒由中南大学湘雅医院朱才博士馈赠, 转化受体菌为*E.coli* DH5α菌株. 脂质体转染试剂Metafectene为德国Biontex公司产品, 大量质粒提取试剂盒为德国Qiagen公司产品, TRIzol RNA提取试剂为美国Gibco公司产品, 小量质粒提取试剂盒、RT-PCR相关试剂及引物合成为大连宝生物工程有限公司产品, 鼠抗人cyclinE mAb及羊抗人actin mAb为美国Santa Cruz公司产品, 蛋白质分子量标准、化学增强发光试剂盒、辣根过氧化物酶标记的抗鼠二抗为美国Cell Signaling Technology公司产品.

1.2 方法

1.2.1 靶位的选择及siRNA的设计及表达载体的构建: siRNA设计原则参照文献[5]. siRNA干扰作用靶点对应于人cyclinE基因编码区71-90 nt(GenBank序列号No. XM_049430). 靶位序列为GCAGGATCCAGATGAAGAA, 经Blast分析, 未发现同源序列. siRNA表达载体插入序列: 上游限制位点为*Bam*HⅠ, 下游限制位点为*Hin*dⅢ, Loop序列为TTCAAGACG. 人工合成各单链DNA片段, 退火形成发夹状siRNA DNA双链, 插入到pSilencer3.1-H1hygro的*Bam*HⅠ和*Hin*dⅢ之间. 重组体转化大肠杆菌DH5α, 筛选hygro抗性克隆, 提取质粒并测序鉴定. 另外合成非同源无义序列作为无义siRNA对照组. siRNA真核表达载体的构建及鉴定由武汉晶赛公司完成(图1).

1.2.2 质粒转染: 待细胞生长融合达60%-80%后, 表达siRNA的pSilencer3.1-H1 hygro质粒与脂质体Metafectence共转染, 混合比例为1∶4(质量/体积), 转染步骤按说明书进行. 转染后6 h, 换为含100 mL/L小牛血清(FBS)的DMEM培养基. 建立两个试验对照组, 即无义siRNA组和空白质粒组. Metafectence的转染效果评价: 含绿色荧光蛋白的表达质粒pEGFP转染HepG2细胞, 转染后培养72 h, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞, 荧光显微镜观察细胞, 随机选取10个视野, 荧光细胞数与总细胞数之比为转染效率.

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡: 转染后培养72 h, 胰酶消化细胞, 1000 r/min离心5 min, 弃上清, 750 mL/L乙醇4℃固定24 h. 调整细胞浓度为10^9/L, 取1 mL细胞悬液, PBS洗2次, 加入PBS染色液(PI 50 mg/L, RNase 100 mg/L), 4℃避光染色30 min, 上机检测.

1.2.4 细胞生长、增殖抑制试验: 向24孔板中分别接种细胞数约为1×10^4的HepG2细胞, 置50 mL/L CO_2中培养, 分别于24 h, 48 h, 72 h检测每组(每组5个孔)每个孔的细胞总数, 取5个孔的平均值, 根据上述数据绘制细胞生长曲线图. 取对数生长期转染后HepG2细胞接种96孔板, 每孔接种5×10^3个细胞, 分别于培养24 h, 48 h, 72 h后每孔加入5 g/L MTT 10 μL, 37℃条件下继续培养4 h, 弃上清, 每孔加入二甲基亚砜(DMSO)100 μL, 酶标仪波长490 nm处检测吸光度*A*值, 试验重复3次. 按下列公式计算细胞抑制率: 细胞生长抑制率 = (对照孔*A*值–试验孔*A*值)/对照孔*A*值×100%.

1.2.5 cyclinE mRNA及蛋白表达检测: 转染后培养72 h, 收集细胞. 总RNA提取按TRIzol试剂盒说明进行, 紫外分光光度计测定总RNA浓度与纯度, -70℃保存备用. 逆转录取2 μL总RNA, 10 mmol/L Oligo dT 1 μL, 用DEPC水补至总体积12 μL后70℃ 5 min, 冰上骤冷后加入5×Buffer 4 μL, 20 mU/L RNA酶抑制剂1 μL, 10 mmol/L dNTP 2 μL, 200 mU/L M-MLV 1 μL, 37℃反应60 min, 94℃灭活5 min. PCR序列根据GenBank中人cyclinE、β-actin cDNA序列进行设计(表1). 细胞总蛋白提取: 1×10^6个细胞用PBS洗涤3-4次后, 加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-

表 1 PCR引物序列、反应条件及扩增的目的片段大小

基因	引物序列	PCR反应条件	目的片段大小
cyclinE	CGTTGCTTCACTTCTCCT	94℃ 1 min, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s	369 bp
	GAAGGGCTTCAACTGTTCC	35 cycles	
β-actin	CAAAGACCTGTACGCCAACA		255 bp
	GAAGCATTTGCGGTGGAC		

表 2 转染后培养72 h cyclinE siRNA对肝癌细胞HepG2生长周期及凋亡的影响(mean ± SD, n = 3)

分组	G_0–G_1期(%)	S期(%)	G_2–M期(%)	Sub–G_1期(%)
空白质粒	58.97 ± 2.27	16.23 ± 1.84	22.93 ± 1.04	1.87 ± 0.21
无义siRNA	57.93 ± 2.05	17.63 ± 1.07	22.27 ± 1.16	2.17 ± 0.15
cyclinE siRNA	62.33 ± 1.15	7.37 ± 0.50[b]	10.13 ± 0.95[b]	20.17 ± 0.72[b]

[b]P<0.01 *vs* 空白质粒组和无义siRNA组.

HCl, 1 mmol/L EDTA, 2% SDS, 5 mmol/L DTT, 10 mmol/L PMSF)200 μL, 冰上放置30 min裂解, 最大功率脉冲超声粉碎30 s, 13 000 r/min离心30 min去除细胞碎片, 留含总蛋白的上清液, Bradford法测定蛋白浓度, Western blot检测cyclinE的表达. PCR及Western blot条带应用Eagle Eye Ⅱ图像分析处理系统分析结果.

统计学处理 实验数据用mean±SD表示, 采用单因素方差分析处理, 组间两两比较采用SNK-q检验. 全部数据经SPSS10.0统计软件处理, P<0.05表示差异有显著性.

2 结果

2.1 细胞周期及凋亡 空白质粒与无义siRNA两组间各期细胞所占比例均无统计学差异(P>0.05). cyclinE siRNA组中S期、G_2-M期细胞所占比例与空白质粒及无义siRNA两组比较明显下降, 统计学差异显著(P<0.01). 凋亡细胞(Sub-G_1期)所占比例明显高于空白质粒及无义siRNA两组, 差异有统计学意义(P<0.01, 表2).

2.2 siRNA抑制HepG2细胞增殖作用 与空白质粒及无义siRNA组比较, cyclinE siRNA转染后48 h、72 h, HepG2细胞数显著减少(P<0.01)(图2A). 从MTT法检测的生长抑制率结果也可以看出, 转染后24 h三组间差异无统计学意义, 转染后48 h, cyclinE siRNA组生长抑制率开始增加, 转染后72 h则显著高于空白质粒及无义siRNA组(P<0.01)(图2B). 空白质粒与无义siRNA转染对HepG2细胞均无明显生长抑制作用, 两组间差异无统计学意义(P>0.05).

2.3 siRNA对HepG2细胞cyclinE表达的抑制

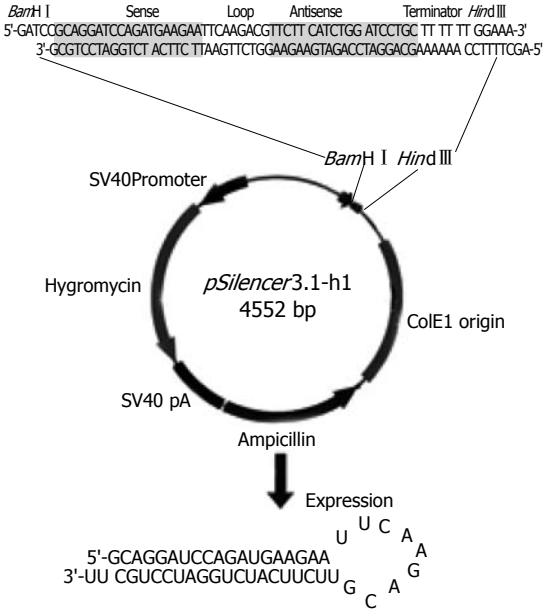


图 1 cyclinE siRNA设计示意图.

HepG2细胞转染表达cyclinE siRNA的质粒后72 h, 与空白质粒及无义siRNA组比较, RT-PCR检测结果显示HepG2细胞中cyclinE mRNA表达水平显著降低(P<0.01), 下降了79%(图3, 表3), Western blot检测结果也显示CyclinE蛋白表达含量明显减少(P<0.01), 比空白质粒组相比, 下降了65%以上(图4, 表3). 而siRNA对cyclinE表达无抑制作用.

3 讨论

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床常见的恶性肿瘤之一.

癌基因的高表达是HCC患者病情进展的重要原因[6], 因此, 如何将正常或治疗基因导入靶

■**创新盘点**
本文采用RNAi技术特异性地抑制肝癌癌基因, 癌相关基因或突变基因的过度表达, 有望成为临床HCC基因治疗的新手段.

■应用要点
本文应用的以cycleE为靶基因设计的siRNA表达框架构建siRNA表达载体转染后可通过抑制肝癌细胞增殖，促进肝癌细胞的凋亡而发挥抗肿瘤作用.

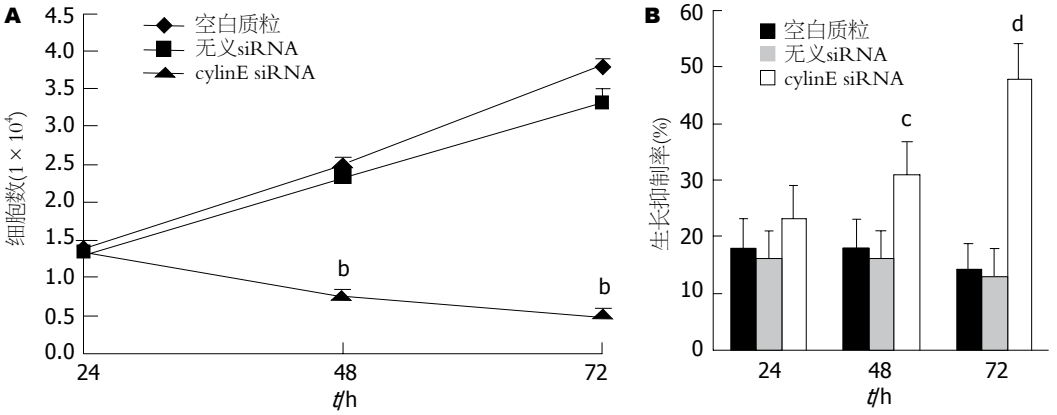


图 2 cyclinE siRNA对肝癌细胞HepG2的生长抑制作用. A: $^{b}P<0.01$ *vs* 空白质粒及无义siRNA组比较; B: $^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$ *vs* 空白质粒及无义siRNA组比较.

细胞纠正缺陷基因的表达，已成为HCC基因治疗的探索热点. 但肝癌基因治疗面临的难题之一是目的基因在肝癌组织中表达的特异性不高，靶向性不强，有的基因产物可引起全身严重的毒副作用[7]. 相对于基因敲除技术长期抑制基因功能，RNAi使基因表达暂时降低或抑制，基因组的信息仍保持完整. 已有研究证明siRNA能抑制多种癌基因表达，因此可设计针对特定癌基因的siRNA阻止肝癌的形成与进展，如靶向原癌基因Bcl-2[8]，p28GANK[9]，surviving[10]，以及新一类癌基因，凋亡调控基因Mcl-1[11]等. RNAi技术的应用为肝癌基因治疗提供了广阔的临床应用前景.

cyclinE定位于人19q12-13，含有一个与CDKs相互作用的细胞周期素盒. 通常cyclinE在G_1期合成，S期至峰值后逐渐消失，G_2-M期不表达，而在肝癌细胞HepG2中可在整个细胞周期表达. cyclinE可与CDK2结合形成复合物，促进细胞G_1-S期进程，使细胞进入S期后就不再依赖于细胞外促生长因子而顺序完成整个细胞周期[2]. 虽然Li *et al*[12]采用化学合成siRNA瞬时转染cyclinE高表达的肝癌细胞株，也获得了明显的基因沉默效果，但采用siRNA表达框架构建siRNA表达载体更有利于进行稳定表达siRNA和长效抑制的研究. 从转染到细胞的DNA模板中在体内转录得到siRNAs，从而不需要直接进行RNA的操作，故能提高siRNA的稳定性[13]，并可使siRNA的体内实验维持较长时间的基因沉默[14]. 本研究设计靶向cyclinE编码区基因的siRNA，构建了cyclinE siRNA的真核表达质粒，可高特异性地下调癌基因表达，使转染后HepG2细胞cyclinE mRNA及蛋白表达水平分别下降79%和65%. 对细胞增殖活性的进一步检测显示，

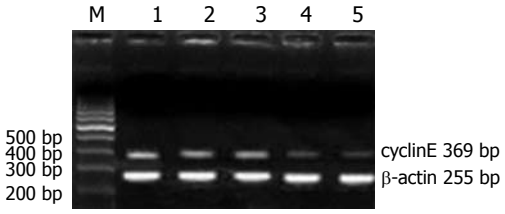


图 3 RT-PCR 扩增肝癌细胞HepG2 cyclinE基因表达.

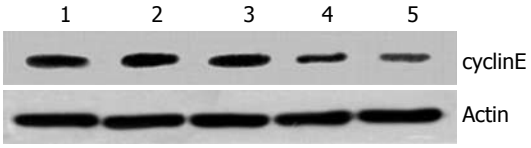


图 4 Western blot检测肝癌细胞HepG2 CyclinE蛋白表达.

表 3 转染后培养72 h肝癌细胞HepG2 cyclinE mRNA与蛋白表达(mean ± SD, *n* = 6)

分组	mRNA表达	蛋白表达
空白质粒	0.53 ± 0.05	0.99 ± 0.04
无义siRNA	0.52 ± 0.06	1.01 ± 0.04
cyclinE siRNA	0.11 ± 0.01[b]	0.36 ± 0.08[b]

[b]P <0.01 *vs* 空白质粒组和无义siRNA组.

cyclinE基因沉默使细胞生长抑制率明显增高，促进细胞凋亡，细胞S期，G_2-M期比例减少，使细胞周期阻滞于G_0-G_1期. 空白对照和无义siRNA均无抑制作用，表明siRNA作用具有序列特异性. 结果表明，cyclinE基因高表达具有促进肝癌细胞增殖恶变的作用，抑制cyclinE基因可达到抑制肝癌细胞增殖的效果. 此外，我们曾在靠近编码区末端选择靶位点设计siRNA，下调cyclinE基因表达的效果并不明显，推测siRNA的基因沉默效果除了严格遵从编码碱基的选择设计原则外，可能还与基因编码区域的选择靶点相关.

尽管近年来在HCC的手术治疗及介入治疗等方面取得了长足进步, 但其总体疗效仍不尽人意. 可重新激活抑癌基因的DNA甲基化抑制剂5-氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR), 由于缺乏特异性, 细胞毒性以及可能激活“沉默”的癌基因等原因使临床应用受到限制[15]. 病毒介导的基因治疗方法的靶向特异性与安全性尚待进一步考证. RNAi技术以其高特异性, 高效率等优点, 已成为抗肿瘤研究的热点. 其在肝癌研究中的应用也不断拓展, 如沉默癌基因过表达相关的信号传导通路Wnt/beta-catenin[16], 设计靶向尿激酶型血浆酶原激活物(u-PA)、骨桥蛋白(Osteopontin)等的siRNA降低肝癌细胞的侵袭转移能力[17-18], 钙黏蛋白T(T cadherin)在肝癌中基因功能的探索[19], 甚至对非编码(nc)RNAs的遗传物质进行研究等[20]. 采用RNAi技术特异性地抑制肝癌癌基因, 癌相关基因或突变基因的过度表达, 有望成为临床HCC基因治疗的新手段.

4 参考文献

1 Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 2002; 299: 35-55

2 Berger C, Pallavi SK, Prasad M, Shashidhara LS, Technau GM. Cyclin E acts under the control of Hox-genes as a cell fate determinant in the developing central nervous system. *Cell Cycle* 2005; 4: 422-425

3 Ohashi R, Gao C, Miyazaki M, Hamazaki K, Tsuji T, Inoue Y, Uemura T, Hirai R, Shimizu N, Namba M. Enhanced expression of cyclin E and cyclin A in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 2001; 21: 657-662

4 Kohzato N, Dong Y, Sui L, Masaki T, Nagahata S, Nishioka M, Konishi R, Tokuda M. Overexpression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 is correlated with development of hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 2001; 21: 27-39

5 Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 326-330

6 Cha C, Dematteo RP. Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 25-37

7 Ekerfelt C, Ernerudh J, Bunikis J, Vrethem M, Aagesen J, Roberg M, Bergstrom S, Forsberg P. Compartmentalization of antigen specific cytokine responses to the central nervous system in CNS borreliosis: secretion of IFN-gamma predominates over IL-4 secretion in response to outer surface proteins of Lyme disease Borrelia spirochetes. *J Neuroimmunol* 1997; 79: 155-162

8 Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, Arai M, Saisho H. Enhanced sensitivity of human hepatoma cells to 5-fluorouracil by small interfering RNA targeting Bcl-2. *DNA Cell Biol* 2005; 24: 805-809

9 Li H, Fu X, Chen Y, Hong Y, Tan Y, Cao H, Wu M, Wang H. Use of adenovirus-delivered siRNA to target oncoprotein p28GANK in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2005; 128: 2029-2041

10 Lu X, Zheng Q, Xiong J. Effect of siRNA targeting survivin gene on the biological behavior of hepatocellular carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005; 25: 48-50, 58

11 Schulze-Bergkamen H, Fleischer B, Schuchmann M, Weber A, Weinmann A, Krammer PH, Galle PR. Suppression of Mcl-1 via RNA interference sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards apoptosis induction. *BMC Cancer* 2006; 6: 232

12 Li K, Lin SY, Brunicardi FC, Seu P. Use of RNA interference to target cyclin E-overexpressing hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 3593-3597

13 Lu PY, Xie F, Woodle MC. In vivo application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. *Adv Genet* 2005; 54: 117-142

14 Scherr M, Morgan MA, Eder M. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem* 2003; 10: 245-256

15 Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463

16 Sangkhathat S, Kusafuka T, Miao J, Yoneda A, Nara K, Yamamoto S, Kaneda Y, Fukuzawa M. In vitro RNA interference against beta-catenin inhibits the proliferation of pediatric hepatic tumors. *Int J Oncol* 2006; 28: 715-722

17 Salvi A, Arici B, Alghisi A, Barlati S, De Petro G. RNA interference against urokinase in hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Tumour Biol* 2007; 28: 16-26

18 朱晓群, 叶青海, 雷科峰, 陈洁, 钦伦秀. 特异性小干扰性RNA降低骨桥蛋白基因表达对肝癌细胞侵袭性的影响. 中华肿瘤杂志 2006; 28: 404-407

19 Riou P, Saffroy R, Chenailler C, Franc B, Gentile C, Rubinstein E, Resink T, Debuire B, Piatier-Tonneau D, Lemoine A. Expression of T-cadherin in tumor cells influences invasive potential of human hepatocellular carcinoma. *FASEB J* 2006; 20: 2291-2301

20 Panzitt K, Tschernatsch MM, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier HM, Buck CR, Denk H, Schroeder R, Trauner M, Zatloukal K. Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology* 2007; 132: 330-342

■**同行评价**
本文内容新颖, 结构严谨, 分析有据, 有较强的可读性.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3390-3394
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

黄芩甙对肝癌细胞BEL-7402抗黏附作用中细胞凋亡和细胞周期的改变

郭 昱, 郭 霞, 姚金锋, 崔东来, 姚树坤

■背景资料
黄芩甙是黄芩的主要有效成分之一, 近年来发现其具有抗肿瘤作用, 表现为抑制肿瘤细胞增殖, 对其抗肿瘤机制尚不甚清楚. 本研究旨在观察黄芩甙对肝癌细胞黏附、细胞凋亡及细胞周期的影响, 探讨三者之间的关系.

郭昱, 姚金锋, 崔东来, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000
郭霞, 姚树坤, 河北医科大学第四医院消化内科 河北省石家庄市 050011
郭昱, 副主任医师, 主要从事肝癌中药治疗的研究.
通讯作者: 郭昱, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院. guoyu123123@sina.com
电话: 0311-87222951
收稿日期: 2007-07-30 修回日期: 2007-10-24

Effect of baicalin on adhesion, apoptosis and cell cycle of hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402

Yu Guo, Xia Guo, Jin-Feng Yao, Dong-Lai Cui, Shu-Kun Yao

Yu Guo, Jin-Feng Yao, Dong-Lai Cui, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Xia Guo, Shu-Kun Yao, Department of Gastroenterology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China
Correspondence to: Dr. Yu Guo, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. guoyu123123@sina.com
Received: 2007-07-30 Revised: 2007-10-24

Abstract

AIM: To investigate the effect of baicalin on adhesion, apoptosis and cell cycle of hepatocellular carcinoma (HCC) cell line BEL-7402, and to discuss the relationship between them.

METHODS: HCC cell line BEL-7402 adhesion assay was conducted in a Boyden chamber. Expression of integrin β_1 and E-cd proteins of cell line BEL-7402 was determined by flow cytometry (FCM). The effects of baicalin on cell cycle and apoptosis were also observed by FCM. Changes in morphology and ultrastructure were observed by inverted microscopy and electron microscopy.

RESULTS: The adhesion capacity was 52.38 ± 3.83, 35.63 ± 2.32 and 26.58 ± 1.13 at 5, 10 and 20 mg/L baicalin, respectively, and was lower than that in the control group (84.32 ± 6.74; $P < 0.05$). In the treated group, the HCC cells became smaller and remained round with relatively fewer pseudopods, and microvilli were fewer and shorter. After treatment with 5, 10 and 20 mg/L baicalin, expression of integrin β_1 was decreased (354.07 ± 18.17, 319.44 ± 15.21 and 291.49 ± 12.88 *vs* 407.54 ± 20.58; $P < 0.05$), and expression of E-cd was increased significantly (335.5 ± 20.18, 376.4 ± 22.36 and 393.8 ± 25.68 *vs* 251.72 ± 12.34, $P < 0.05$). G_0/G_1 phase cells were significantly increased as baicalin concentration increased, and S phase cells were decreased. Baicalin induced BEL-7402 cell apoptosis, in a concentration-dependent manner.

CONCLUSION: Baicalin inhibits cell adhesion, accompanied by increased apoptosis and major changes in the cell cycle of HCC cell line BEL-7402.

Key Words: Baicalin; Hepatocellular carcinoma; Adhesion; Apoptosis; Cell cycle

Guo Y, Guo X, Yao JF, Cui DL, Yao SK. Effect of baicalin on adhesion, apoptosis and cell cycle of hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3390-3394

摘要

目的: 研究黄芩甙对人肝癌BEL-7402细胞系黏附、细胞凋亡及细胞周期的影响, 探讨三者之间的关系.

方法: 应用细胞培养技术培养BEL-7402细胞, 不同浓度黄芩甙处理肝癌细胞, 通过Boyden小室模型测定其黏附力, 同时观察细胞形态, 流式细胞术测定肝癌细胞integrinβ_1、E-cd表达的改变及细胞凋亡率.

结果: 5, 10, 20 mg/L黄芩甙处理组细胞黏附力与对照组相比均有显著降低(52.38±3.83, 35.63±2.32, 26.58±1.13 *vs* 84.32±6.74, $P<0.05$). 对照组表现出纤维母细胞样形态, 伸

出形态各异的伪足. 而黄芩甙组细胞形态较圆, 伪足数目相对较少, 电镜下显示细胞微绒毛明显减少, 甚至消失. 5, 10, 20 mg/L黄芩甙组细胞integrinβ_1表达较对照组降低(354.07±18.17, 319.44±15.21, 291.49±12.88 *vs* 407.54±20.58; $P<0.05$), E-cd的表达则增加(335.5±20.18, 376.4±22.36, 393.8±25.68 *vs* 251.72±12.34, $P<0.05$). 黄芩甙作用后, 随黄芩甙浓度增加肝癌细胞G_0/G_1期比例逐步增高, S期细胞减少, 同时细胞凋亡率增加.

结论: 黄芩甙对肝癌BEL-7402细胞发挥抗黏附作用, 其机制可能与抑制黏附分子E-cd的表达, 促进integrinβ_1表达有关. 在抗黏附的同时细胞周期发生改变, 细胞凋亡增多.

关键词: 黄芩甙; 肝细胞癌; 黏附; 凋亡; 细胞周期

郭昱, 郭霞, 姚金锋, 崔东来, 姚树坤. 黄芩甙对肝癌细胞BEL-7402抗黏附作用中细胞凋亡和细胞周期的改变. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3390-3394

http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3390.asp

0 引言

肿瘤细胞的侵袭与转移是恶性肿瘤的基本特征, 肿瘤的侵袭转移是涉及多步骤、多环节的极复杂过程. Liotta *et al*从分子水平将这一过程分为黏附、降解、运动三步. 恶性肿瘤细胞在侵袭和转移过程中, 与宿主组织成分发生多次黏附, 抗黏附治疗与其他包括化疗在内的治疗联合应用, 不但可以产生协同作用, 降低用药剂量, 而且可以在多个环节上阻断肿瘤的侵袭和转移, 弥补彼此之间的不足.

黄芩甙是从唇形科植物黄芩中提取、分离出来的一种黄酮类化合物, 是黄芩的主要有效成分之一, 具有解热、降压、利胆、保肝、镇静、抗菌等药理作用. 近年来随着国际上对黄芩甙研究的持续升温以及认识的逐步深入, 发现黄芩甙具有抗肿瘤作用, 表现为抑制癌细胞增殖, 促进癌细胞凋亡[1-2]. 我们在体外观察了黄芩甙对肝癌细胞BEL-7402黏附、细胞凋亡及细胞周期的影响, 探讨三者之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌BEL-7402细胞株由河北医科大学细胞室冻存, 黄芩甙购自四川世坤植化有限公司, Matrigel基质为美国Becton Dickinson公司产品, Boyden小室为Coster公司产品, 兔多抗和羊抗鼠FITC-IgG为北京中山生物技术有限公司产品, 上皮钙黏附素(E-cd)单抗和抗β1-整合素(integrinβ_1)为Santa公司产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组: 人肝癌BEL-7402细胞株常规培养于含10 g/L小牛血清、100 U/L青霉素、100 μg/L链霉素的RPMI 1640培养液中, 在37℃、50 mL/L CO_2培养箱内培养. 实验分为4组: 黄芩甙5 mg/L组, 黄芩甙10 mg/L组, 黄芩甙20 mg/L组, 对照组(只加培养基). 药物作用48 h, 收集细胞, 做以下检查. 每组设3个复孔.

1.2.2 黏附测定: 本研究引入Matrigel基质胶, 模拟体外黏附模型中细胞外基质(ECM)的作用, 观察黄芩甙对肝癌细胞黏附力的影响. 96孔培养板覆以Matrigel 100 μg/孔, 胶干后, 加入预处理的细胞悬液50 μL(5×10^5/孔), 37℃摇床100 r/min, 作用30 min. 每孔加无血清RPMI 1640培养液150 μL及MTT(1 g/L)50 μL, 37℃继续作用4 h. 弃上清, 每孔加入100 μL DMSO原液, 10 min后上酶标仪, 在490 nm单波长下测定*A*值. 细胞黏附率 = (试验组*A*值/对照组*A*值)×100%. 将对照组与处理组细胞置于倒置显微镜下观察. 生长在盖玻片上的细胞, 10 mg/L黄芩甙处理组及空白对照组, 作用48 h, 取出盖玻片, 用PBS洗3遍, 25 g/L戊二醛4℃前固定2 h, 10 g/L锇酸后固定, 系列乙醇脱水, 扫描电镜下观察.

1.2.3 Integrinβ_1、E-cd的测定: 取单细胞悬液1×10^9/L, 加入鼠抗人mAb工作液0.1 mL, 室温孵育30 min, 加入PBS 10 mL洗涤一次. 弃上清, 加入羊抗鼠FITC-IgG二抗工作液100 μL, 避光室温孵育30 min. 加入PBS 10 mL, 500 r/min离心2 min. 弃上清以除去未结合的荧光二抗. 上机检测前加入PBS 0.1 mL经500目铜网过滤后, 采用美国Beckman Coulter公司生产的Epics-XLⅡ流式细胞仪测定integrin and E-cd的含量, 激发光源为15 mW氩离子激光器, 激发波长为488 nm. 应用Expo 32 ADC进行免疫荧光数据分析, 以均道值表示蛋白含量.

1.2.4 细胞周期测定: 将细胞进行同步化处理24 h后, 换含小牛血清的新鲜培养液, 待细胞长至80%融合时, 收获细胞, PBS洗2次, 700 mL/L乙醇固定, 然后用碘化丙啶染色, 流式细胞仪进行检测. 空白对照组和1.25 mg/L、2.5 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L黄芩甙处理组分别作用48 h后, 制备各细胞悬液, PI染色流式细胞计数测定凋亡率.

统计学处理 全部数据用SPSS10.0软件包进

■研发前沿

肿瘤细胞的侵袭与转移是恶性肿瘤的基本特征. 恶性肿瘤细胞在侵袭和转移过程中, 与宿主组织成分发生多次黏附, 抗黏附治疗与其他包括化疗在内的治疗联合应用, 不但可以产生协同作用, 降低用药剂量, 而且可以在多个环节上阻断肿瘤的侵袭和转移, 弥补彼此之间的不足.

■相关报道
多数学者认为，如果E-cd介导的黏附功能受损或表达减少，肿瘤细胞连接松散，易脱落，许多癌组织中均出现E-cd的表达缺失或基因突变．某些恶性肿瘤导入E-cd基因后，能明显降低肿瘤细胞侵袭和转移的能力．Kuefer *et al*首先报道了在进展期和伴有转移的前列腺癌患者血清中E-cd明显升高，其可作为预测肿瘤进展和转移的指标．Strobel *et al*的实验研究表明阻断卵巢癌integrinβ1可以有效抑制肿瘤的腹膜播散．

表 1 黄芩甙对肝癌细胞BEL-7402黏附和integrinβ_1、E-cd表达的影响(mean ± SD)

分组	黄芩甙(mg/L)	黏附	integrinβ_1	E-cd
对照组	0	84.32 ± 6.74	407.54 ± 20.58	251.72 ± 12.34
黄芩甙组	5	52.38 ± 3.83[a]	354.07 ± 18.17[a]	335.5 ± 20.18[a]
	10	35.63 ± 2.32[a]	319.44 ± 15.21[a]	376.4 ± 22.36[a]
	20	26.58 ± 1.13[a]	291.49 ± 12.88[a]	393.8 ± 25.68[a]

[a]P<0.05 *vs* 对照组.

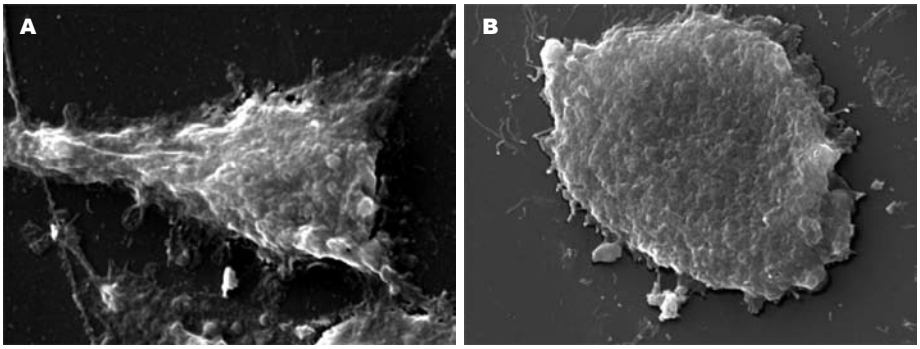


图 1 黄岑甙对人肝癌细胞形态的影响．A：对照组（×5000）；B：黄芩甙组（×6500）．

行统计处理．计量资料用mean±SD表示．各组及组间比较用t检验．

2 结果

2.1 黄芩甙对人肝癌细胞黏附力及integrinβ_1、E-cd表达的影响 黄芩甙组肝癌细胞黏附力明显下降，黄芩甙显示出显著的抗黏附作用，该作用呈剂量效应关系．黄芩甙组细胞integrinβ_1表达较对照组降低，E-cd的表达则增加．黄芩甙5 mg/L组即呈现上述显著变化(P<0.05)，10 mg/L组、20 mg/L组与5 mg/L黄芩甙组相比integrinβ_1、E-cd的表达呈量效关系(表1)．

2.2 黄芩甙对人肝癌细胞形态的影响 倒置显微镜下见，对照组细胞表现出纤维母细胞样形态，伸出形态各异的伪足；而黄芩甙组细胞形态较圆，伪足数目相对较少．扫描电镜下见对照组细胞形态不规则，有多个细长的突起，微绒毛较多，体积较大；黄芩甙处理组细胞变小，突起减少，形态变圆，微绒毛减少甚至消失，有的细胞表面有凹陷，胞质可见有穿孔或空洞，可见凋亡小体(图1)．

2.3 黄芩甙对肝癌细胞细胞周期和凋亡的影响 黄芩甙作用后，随黄芩甙浓度的增加肝癌细胞G_1/G_0期比例逐步降低，S期细胞减少，说明黄芩甙将肝癌细胞阻滞在G_1期(表2)．1.25 mg/L、2.5 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L黄芩甙分别作用肝癌细胞48 h后，凋亡百分率分别为2.32%±0.72%，2.42%±0.68%，9.86%±1.98%，17.59%±3.26%，17.59%±3.26%，17.59%±3.26%，17.59%±3.26%，22.27%±3.89%，24.34%±3.79%，与对照组(2.18%±0.66%)相比有显著性意义(P<0.01)，呈量效关系．

3 讨论

肿瘤转移是肿瘤治疗的主要障碍，控制转移是决定肿瘤患者预后的关键因素．研究发现肿瘤细胞的高转移性与其高黏附特性有关，抗黏附治疗可阻断肿瘤转移．恶性肿瘤细胞在侵袭和转移过程中，与宿主组织成分发生多次黏附．新近资料表明，这一现象与细胞黏附分子的作用有密切关系[3]．其中引人注目的是钙黏附素、整合素家族成员[4]．钙黏附素主要介导正常和肿瘤组织中细胞与细胞间的黏附．E-cd属钙黏附素超家族经典Ⅱ族成员，依赖细胞外Ca^{2+}介导同种亲和性的细胞与细胞间的黏附，在相邻细胞间形成钙黏附拉链，参与建立和维持细胞间连接，在同种细胞间起相互联系、相互制约的作用．他的表达程度及功能活性直接影响细胞的脱离和再附着．多数学者认为，如果E-cd介导的黏附功能受损或表达减少，肿瘤细胞连接松散，易脱落．许多癌组织中均出现E-cd的表达缺失或基因突变[5]．某些恶性肿瘤导入E-cd基因后，能明显降低肿瘤细胞侵袭和转移的能力．Kuefer *et al*[6]首先报道了在进展期和伴有转移的前列

腺癌患者血清中E-cd明显升高, 其可作为预测肿瘤进展和转移的指标. integrinβ_1是由α、β亚单位通过二硫键形成的二聚体跨膜蛋白, 可以同时与细胞基质成分及细胞骨架结合而形成配体-integrinβ_1-细胞骨架跨膜信息系统, 介导肿瘤细胞的黏附和转移. Fujita *et al*研究了包括肝癌在内的27种癌细胞系, 结果表明全部细胞均不同程度的表达integrinβ_1. Strobel *et al*[7]的实验研究表明, 阻断卵巢癌integrinβ_1可以有效抑制肿瘤的腹膜播散. 褚忠华 *et al*[8]研究表明, 肝癌多种黏附分子基因mRNA表达量与肿瘤大小、有无转移, 结节数目有关. E-cd与肿瘤大小、有无转移, 结节数目呈负相关, integrinβ_1与之呈正相关. 我们的研究结果表明, 黄芩甙作用后光学显微镜下肝癌细胞形态发生明显改变, 细胞变小、变圆, 突起明显减少. 进一步电镜观察, 对照组细胞表面微绒毛密集、细长, 为转移和附着于其他组织提供方便. 黄芩甙组微绒毛稀疏, 甚至消失. 经检测黄芩甙组细胞黏附力也明显降低, 表明黄芩甙具有抗肝癌细胞黏附的作用. 同时发现黄芩甙处理组E-cd表达增多, integrinβ_1表达下降, 认为黄芩甙通过促进E-cd表达, 抑制integrinβ_1表达而使癌细胞间连接紧密, 从而避免癌细胞从原发灶处的脱落、游离, 达到抑制肿瘤侵袭、转移的作用.

细胞周期是细胞生命活动的基本过程. 细胞的增殖、凋亡、分化均是细胞周期依赖性的. 细胞周期的调控是一个复杂的生物学过程, 许多癌基因、抑癌基因直接参与细胞周期的调控, 或者本身就是细胞周期调控复合体的主要成分[9-10]. 这些基因变异的结果, 导致细胞周期的失控, 失去控制的细胞无限制增殖, 形成的克隆群体便是肿瘤. 因此, 有学者认为肿瘤是一类细胞周期疾病. 调节细胞周期为策略将是今后抗肿瘤治疗的新途径之一[11-12]. 细胞周期的长短主要决定于G_1期, G_1期阻滞可使细胞增殖周期延长. S期可反映细胞的增殖情况, S期占细胞周期比例高, 则提示DNA合成活跃. 一般而言, 肿瘤细胞的S期比例较正常细胞要高, 其增殖活性也较正常细胞高. 目前的研究表明, 肿瘤细胞的黏附作用增强, 可诱导产生一些蛋白质, 如p21Cip1/Wafl, 血管内皮生长因子等, 并通过某些信号转导机制来调控细胞周期蛋白的表达, 进而影响细胞周期. 有研究证明, EMT-6细胞转染黏附分子后, 细胞间黏附作用加强, 同时伴有P27的高表达, 细胞大量滞留于G_1期. 我们用PI标记流式细胞仪分析黄芩甙作用后肝癌细胞BEL-7402细胞周期的变化, 结果发现随着黄芩甙药物浓度的增加, 细胞黏附力降低, 细胞周期中G_0/G_1期的比例逐渐增加, S期比例逐渐减少. 与上述结果不一致, 可能与细胞系不同有关. Chang *et al*[13]研究发现, 黄芩甙影响肝癌细胞周期, 而且细胞系结果不一致. 黄芩甙作用于HepG2细胞, G_2/M期显著增多, 作用于Hep3B细胞G_1期细胞增多. 本研究与Yano *et al*研究结果一致[14], 表明黄芩甙主要作用于G_1/S节点, 使细胞停滞于G_1期, S期细胞减少, 反映细胞增殖活性降低, 趋于分化成熟.

表 2 黄芩甙对肝癌细胞BEL-7402细胞周期的影响(%)

黄芩甙 (mg/L)	G_0/G_1	S	G_2/M
0	57.4	29.8	12.8
2.5	58.6	28.1	13.3
5	63.3	21.2	15.5
10	67.4	18.7	13.9
20	69.7	16.5	13.8

在抗肿瘤治疗过程中, 化疗药物除直接杀伤肿瘤细胞外, 更主要的作用是诱导肿瘤细胞进入凋亡程序. 在许多哺乳动物细胞系统中, 细胞之间可通过传递一种“生存信号”来避免进入凋亡程序. 许多研究表明, 这种“生存信号”可通过细胞-细胞和细胞-基质之间的黏附作用进行传递. 肿瘤细胞相互间也通过上述黏附作用传递“生存信号”, 以避免发生凋亡, 对抗化疗药物的致凋亡作用. 研究发现, 运用mAb阻断E-cd介导的细胞-细胞间黏附作用后, 可促进细胞凋亡. 当细胞与细胞外基质失去正常的黏附作用后, 细胞发生凋亡, 这种现象被称为“anoikis”. 本研究结果显示, 黄芩甙在发挥抗黏附作用的同时, 肝癌细胞凋亡增多, 证实了上述观点.

4 参考文献

1 Dong Y, Yang MM, Kwan CY. In vitro inhibition of proliferation of HL-60 cells by tetrandrine and coriolus versicolor peptide derived from Chinese medicinal herbs. *Life Sci* 1997; 60: PL135-PL140

2 Matsuzaki Y, Kurokawa N, Terai S, Matsumura Y, Kobayashi N, Okita K. Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 170-177

3 Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y*

■创新盘点
本文从黏附角度探讨黄芩甙对肝癌细胞的作用, 视角较新颖. 引入Matrigel基质胶, 模拟体外黏附模型中细胞外基质的作用, 方法较先进.

■应用要点
本文结果有助于对黄芩甙作用机制的深入、广泛认识, 对黄芩甙的进一步开发应用提供了实验基础.

■同行评价
本文设计合理, 统计学处理恰当, 结论明确, 论证有据, 条理分明, 对基础研究有一定的参考意义.

Acad Sci 2004; 1014: 155-163

4 Sun JJ, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Feng JX, Zhou G, Xue Q, Chen J. Invasion and metastasis of liver cancer: expression of intercellular adhesion molecule 1. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 28-34

5 Garcia S, Martini F, De Micco C, Andrac L, Sappa P, Hardwigsen J, Lavaut MN, Le Treut YP, Charpin C. Prognostic value of E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma. *Ann Pathol* 1998; 18: 98-102

6 Kuefer R, Hofer MD, Gschwend JE, Pienta KJ, Sanda MG, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Day ML. The role of an 80 kDa fragment of E-cadherin in the metastatic progression of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 6447-6452

7 Strobel T, Cannistra SA. Beta1-integrins partly mediate binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 362-367

8 褚忠华, 闵军, 凌云彪, 赵海燕, 刘建平, 区庆嘉. 多种粘附分子基因在原发性肝癌的表达及其临床意义. 中国病理生理杂志 2004; 20: 1672-1676

9 Gakiopoulou H, Korkolopoulou P, Levidou G, Thymara I, Saetta A, Piperi C, Givalos N, Vassilopoulos I, Ventouri K, Tsenga A, Bamias A, Dimopoulos MA, Agapitos E, Patsouris E. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 in non-benign epithelial ovarian tumours: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications. *Br J Cancer* 2007; 97: 1124-1134

10 司维柯, 高利宏, 刘彬, 陈安, 李鹏, 姚婕. 苦参碱诱导人肝癌细胞分化、凋亡时对G_1细胞周期调节因子的调控. 癌症 2001; 20: 848-851

11 夏金荣, 刘乃丰, 黄晓明, 胡向阳. 特异性核酶对肝星状细胞细胞周期蛋白D1基因表达及激活的影响. 中华消化杂志 2007; 27: 174-176

12 Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Takemura M, Yoshida S, Suzuki H, Nakashima I. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits the growth of malignant melanoma cells by upregulating Fas-mediated apoptosis and arresting cell cycle through downregulation of cyclin dependent kinases. *Int J Oncol* 1998; 12: 1321-1326

13 Chang WH, Chen CH, Lu FJ. Different effects of baicalein, baicalin and wogonin on mitochondrial function, glutathione content and cell cycle progression in human hepatoma cell lines. *Planta Med* 2002; 68: 128-132

14 Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, Haramaki M, Ogasawara S, Momosaki S, Kojiro M. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Res* 1994; 54: 448-454

编辑 程剑侠 电编 何基才

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 2008 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.

《世界华人消化杂志》2008年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079，国内统一刊号 CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教研人员、各大图书馆订阅. 联系地址: 100023, 北京市2345信箱. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3395-3402
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

粒细胞集落刺激因子防治小鼠CCl_4所致肝损伤的作用

王君平, 孙殿兴, 李兵顺, 李敏然, 郭争荣, 亢继文, 李伟勇

王君平, 孙殿兴, 李敏然, 郭争荣, 亢继文, 白求恩国际和平医院肝病科 河北省石家庄市 050082
李兵顺, 石家庄市传染病医院肝病四科 河北省石家庄市 050021
李伟勇, 白求恩国际和平医院传染科 河北省石家庄市 050082
王君平, 2006年河北医科大学硕士研究生毕业, 主治医师, 主要从事乙型病毒性肝炎的研究.
河北省科技攻关题资助项目, No. 052761262
通讯作者: 孙殿兴, 050082, 河北省石家庄市, 白求恩国际和平医院肝病科. sundianxing@hotmail.com
电话: 0311-87978436
收稿日期: 2007-07-17 修回日期: 2007-10-10

Effect of granulocyte colony stimulating factor on repair of CCl_4-induced liver injury in mice

Jun-Ping Wang, Dian-Xing Sun, Bing-Shun Li, Min-Ran Li, Zheng-Rong Guo, Ji-Wen Kang, Wei-Yong Li

Jun-Ping Wang, Dian-Xing Sun, Min-Ran Li, Zheng-Rong Guo, Ji-Wen Kang, Department of Liver Diseases, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China
Bing-Shun Li, the Fourth Department of Liver Diseases, Shijiazhuang Infectious Disease Hospital, Shijiazhuang 050021, Hebei Province, China
Wei-Yong Li, Department of Infectious Disease, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China
Supported by: the Research Foundation of Science and Technology of Hebei Province, China, No. 052761262
Correspondence to: Dian-Xing Sun, Department of Liver Diseases, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China. sundianxing@hotmail.com
Received: 2007-07-17 Revised: 2007-10-10

Abstract

AIM: To observe the effect of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) on repair of CCl_4-induced liver injury in mice, and to investigate the homing ability of peripheral blood stem cells mobilized by rhG-CSF to localize in the injured liver.

METHODS: Liver injury was induced by 400 mL/L CCl_4 2 mL/kg in clean BALB/c mice twice a week and then treated. Then, with rhG-CSF 200 μg/kg sc. The mortality rate and liver pathology changes and liver functions and other factors were analyzed. Detection of $CD34^+$ and Thy-1^+ cells were performed with flow-cytometry and immunohistochemical staining respectively. The situ hybridization for Y chromosome in liver was tested to determine the homing ability of the peripheral blood stem cells of male mice mobilized by rhG-CSF to the injured liver of female mice.

RESULTS: Compared with the liver injury group, the mortality rate and changes in liver histology and function in the rhG-CSF prevention group were significantly lower ($P < 0.05$). Alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were significantly lower in the rhG-CSF treatment group at 30 days after CCl_4 discontinuation than in the control group (1033.5 ± 350.1 nkat/L *vs* 1983.7 ± 616.8 nkat/L, $P < 0.01$; 1817.0 ± 483.4 nkat/L *vs* 3017.3 ± 811.2 nkat/L, $P < 0.05$). Compared with the control group, Thy-1^+ and $CD34^+$ cells in the liver of the rhG-CSF treatment group were increased on days 8 and 15 ($P < 0.05$). In situ hybridization in the liver of female mice transplanted with peripheral stem cells from male mice revealed that Y-chromosome- positive cells were found in the injured liver, which were mainly seen around the duct area and central vein, and a few in the spleen.

CONCLUSION: rhG-CSF prevention and treatment significantly promote recovery and improve survival after CCl_4-induced liver injury.

Key Words: Granulocyte colony stimulating factor; Bone marrow stem cell; Liver injury; Liver repair; Y chromosome

Wang JP, Sun DX, Li BS, Li MR, Guo ZR, Kang JW, Li WY. Effect of granulocyte colony stimulating factor on repair of CCl_4-induced liver injury in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3395-3402

摘要

目的: 观察重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)对CCl_4所致小鼠肝损伤的保护和治疗作用以及探讨rhG-CSF动员的外周血干细胞在

■背景资料
肝硬化在我国是常见病, 但由于其病情危重, 而目前又缺乏有效的药物治疗, 最终的解决需要做肝移植. 但由于肝移植来源困难, 免疫排斥反应及经费高, 在众多的患者中也只有少数人得以治疗, 所以目前病死率仍很高. 骨髓干细胞的研究为之提供了新希望. 通过rhG-CSF动员骨髓干细胞, 并验证动员到外周血的干细胞在肝内沉积、转化对肝组织损伤的修复作用, 寻求一种在重型肝炎、肝硬化治疗上方便、可行、有效的新方法.

■创新盘点
肝干细胞及骨髓干细胞移植治疗肝病是近来研究的热点. 但干细胞分离方法复杂, 移植途径的多样, 移植后血栓形成等有关问题, 阻碍了干细胞移植的临床应用. 本实验用rhG-CSF动员自体骨髓干细胞对肝损伤的保护及修复作用, 不存在上述问题, 是一种治疗肝病更方便、可行的新方法.

受损肝组织内定植的能力.

方法: 清洁级BALB/c小鼠, ip 400 mL/LCCl_4, 2 mL/kg, 每周2次, 诱导肝损伤, sc rhG-CSF 200 μg/kg进行预防和治疗. 观察各实验组小鼠的生存率、肝组织病理变化、肝功能等指标. 分别用免疫组化及流式细胞术观察肝组织中Thy-1和CD34阳性细胞变化, 用Y染色体原位杂交法观察rhG-CSF动员的♂小鼠外周血干细胞在肝受损伤的♀小鼠肝脏内的定居能力.

结果: rhG-CSF预防组小鼠的生存率、肝组织病理改变、肝功能的酶学指标均好于模型组(P<0.05). 治疗后30 d, rhG-CSF治疗组小鼠血清中肝功能酶学指标ALT和AST与对照组相比分别有显著性意义(1033.5±350.1 nkat/L *vs* 1983.7±616.8 nkat/L, P<0.01; 1817.0±483.4 nkat/L *vs* 3017.3±811.2 nkat/L, P<0.05). 治疗后8 d、15 d rhG-CSF组肝脏组织中Thy-1^+和$CD34^+$细胞明显多于对照组(P<0.05). 接受♂小鼠外周血干细胞移植的♀小鼠肝组织可见Y染色体阳性的细胞, 主要位于汇管区与中央静脉周围, 少数位于脾脏.

结论: rhG-CSF预防和治疗均能促进CCl_4所致的小鼠肝损伤修复, 提高生存率.

关键词: 粒细胞集落刺激因子; 骨髓干细胞; 肝损伤修复; Y染色体

王君平, 孙殿兴, 李兵顺, 李敏然, 郭争荣, 亢继文, 李伟勇. 粒细胞集落刺激因子防治小鼠CCl_4所致肝损伤的作用. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3395–3402
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3395.asp

0 引言

在我国重型肝炎、肝硬化是常见病, 其病情危重, 而目前又缺乏有效的药物治疗, 最终的解决需行肝移植. 但由于肝移植来源困难, 免疫排斥反应及经费高, 在众多的患者中也只有少数人得以治疗, 所以目前病死率仍很高. 我们设计由CCl_4诱导小鼠肝损伤, 通过血清学、肝组织病理等指标变化及异性干细胞移植原位杂交实验来分析干细胞动员剂-重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)对肝损伤的修复作用及机制.

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c小鼠113只, ♂101只、♀12只, 购自河北医科大学实验动物中心. rhG-CSF由华北制药金坦生物技术股份有限公司馈赠, CCl_4由北京化工厂生产, 橄榄油为欧蕾特纯冷榨橄榄油, 大鼠抗小鼠CD34抗体、兔抗小鼠Thy-1抗体购自Santa Cruz公司, FITC-羊抗大鼠IgG抗体、羊抗兔IgG抗体购自中杉生物技术有限公司, Ficoll细胞分离液、小鼠Y染色体荧光探针染色试剂盒购自天津灏洋生物制品公司.

1.2 方法

模型组52只, 400 mL/L CCl_4 2 mL/kg, ip, 每周2次, 持续70 d制备动物模型, 然后随机分为治疗组和对照组, 各16只. 治疗组每日给予rhG-CSF 200 μg/kg, sc, 连续7 d. 对照组应用等量生理盐水, 分别于肝硬化模型制备终止8 d、15 d、30 d分批处死小鼠. 另rhG-CSF预防组25只, 在应用CCl_4前先每日给予rhG-CSF 200 μg/kg, sc, 连续7 d. 应用CCl_4过程中, 每隔20 d连续应用rhG-CSF 5 d. 模型组应用等剂量的生理盐水, 正常组6只.

1.2.1 外周血干细胞定居于受损伤肝脏的能力: 取♂小鼠18只, 每日用rhG-CSF 200 μg/kg, sc, 连续5 d, 每次3只. 然后处死♂小鼠并取外周血, 分离单个核细胞, 每周2次(星期二、五), 经尾静脉注射给经400 mL/L CCl_4 2 mL/kg, ip, 每周2次(星期一、四)肝损伤的♀小鼠10只. 上述♀小鼠应用400 mL/L CCl_4每周2次共3 wk, 接受♂小鼠外周血单个核细胞尾静脉注射也是每周2次共3 wk. 另外2只♀小鼠为对照, 400 mL/L CCl_4应用剂量、次数同上述10只♀小鼠, 但尾静脉注射同剂量的生理盐水. 自最后一次移植30 d后处死♀小鼠.

1.2.2 观察指标: 小鼠肝功能由白求恩国际和平医院检验科自动生化分析仪检测. 透明质酸(HA)和层粘连蛋白(LN)用固相放射免疫法, 由白求恩国际和平医院同位素科专业人员检测. 肝组织病理标本用40 g/L甲醛固定, 应用常规HE染色. 肝纤维化程度分期诊断标准按2000年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订《病毒性肝炎防治方案》[1]. Y染色体原位杂交、Thy-1免疫组化(应用冰冻切片)及CD34流式细胞分析均按有关试剂盒说明或常规方法进行. Thy-1免疫组化结果分析: 每张片子随机观察5个高倍视野, 每个视野计100个细胞中的阳性细胞数, 取均值, 以百分数表示.

统计学处理 使用SAS8.0统计软件处理实验数据, 有关资料的指标采用mean±SD表示. 两样本均数的比较采用t检验, 等级资料、非参数检验采用秩和检验, 生存率或死亡率的比较采用对数秩和检验. P<0.05, 为差异有显著性.

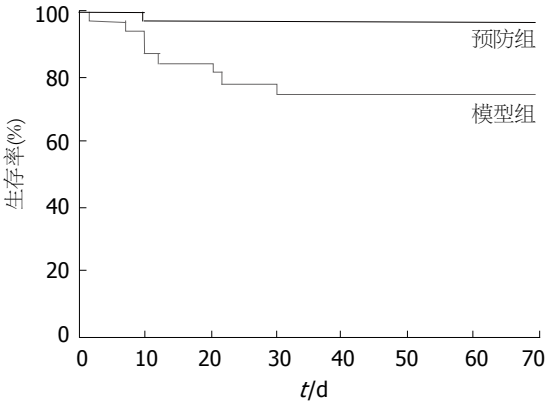


图 1 小鼠生存率曲线.

2 结果

2.1 肝功能, HA和LN rhG-CSF预防组25只, 死亡1只, 死亡率为4%. 模型组52只, 死亡12只, 死亡率为23%. 两组小鼠的生存率有显著性差异(P<0.05, 图1). 预防组与模型组肝功能相比, ALT(2908.9±86.9 nkat/L *vs* 4764.3±46.7 nkat/L, P<0.001)以及AST(3464.0±80.0 nkat/L *vs* 5789.5±140.0 nkat/L, P<0.001), ALB(22.0±0.8 g/L *vs* 20.3±1.0 g/L, P<0.01)均有显著性差异, 但TBIL(34.5±0.7 μmol/L *vs* 37.5±0.4 μmol/L, P>0.05)两组相比无差异性. 预防组HA和LN均低于模型组, HA(927.5±72.0 μg/L *vs* 1155.5±163.2 μg/L, P<0.05), LN(250.5±54.6 μg/L *vs* 475.6±90.3 μg/L, P<0.001)均有显著性差异. 肝损伤在rhG-CSF治疗后30 d时, 治疗组与对照组肝功能相比, ALT(1033.5±350.1 nkat/L *vs* 1983.7±616.8 nkat/L, P<0.01)以及AST(1817.0±483.4 nkat/L *vs* 3017.3±811.2 nkat/L, P<0.05)有显著性差异, 但ALB和TBIL两组相比无差异性.

2.2 肝组织中Thy-1及CD34细胞 Thy-1阳性细胞着色定位于细胞膜与细胞质, 呈棕黄色均匀弥漫. 正常肝脏组织未发现Thy-1阳性细胞. 在肝硬化模型制备终止时, rhG-CSF预防组肝脏组织可见较多Thy-1阳性细胞, 主要在汇管区, 中央静脉周围, 肝脏组织内Thy-1阳性细胞, 相对含量为8.3%±1.2%. 模型组在汇管区发现少量的Thy-1阳性细胞, 相对含量为2.8%±0.6%, 两组相比有显著差异(P<0.01, 图2, 表1). 预防组小鼠肝组织和模型组小鼠肝组织的$CD34^+$细胞数与正常组相比, 均有显著性差异(P<0.01), 预防组与模型组小鼠肝组织中$CD34^+$细胞数相比也有显著性差异(P<0.05, 表1). 治疗后8 d和15 d, 治疗组与对照组小鼠肝组织中Thy-1阳细胞数分别为5.1%±1.3% *vs* 3.3%±0.8%和7.5%±1.4% *vs* 3.4%±0.9%, 均有显著性差异(P<0.05), 30 d时两组小鼠肝组织中Thy-1阳细胞数均下降但无明显差异(3.2%±0.6% *vs* 2.3%±0.6%, P>0.05, 图3). 治疗组小鼠肝组织$CD34^+$细胞数高于对照组, 且8 d、15 d时治疗组与对照组小鼠肝组织中的$CD34^+$细胞数相比均有显著性差异(P<0.05). 但30 d时两组小鼠肝组织中的$CD34^+$细胞数均有所下降, 且无明显性差异(P>0.05, 表1).

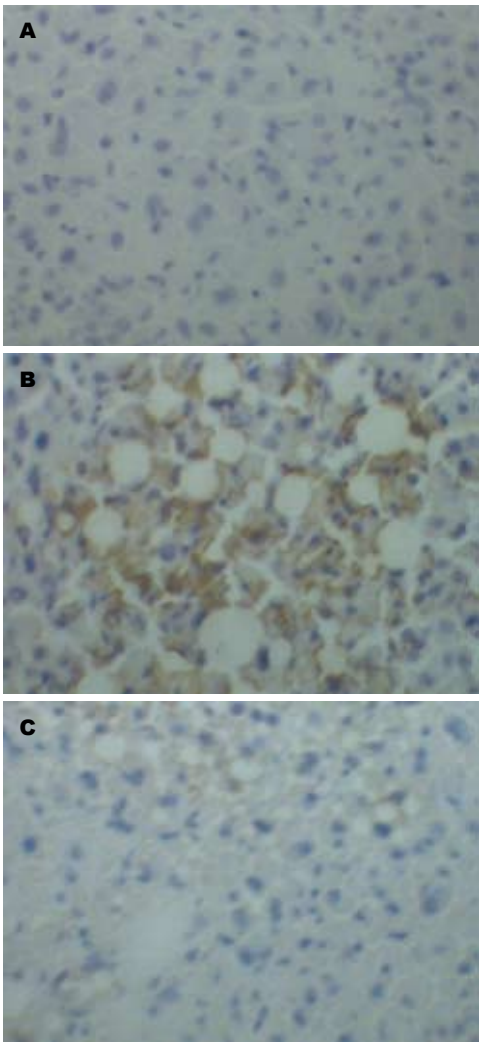


图 2 小鼠肝组织中Thy-1的表达(ABC × 400). A: 正常组; B: 预防组; C: 模型组.

2.3 对肝脏病理变化的影响 模型组中可见典型的假小叶形成, 预防组与模型组相比肝脏纤维化程度明显较轻(P<0.05, 图4). 治疗组与对照组相比, 于8 d、15 d时, 两组的纤维化程度比较无显著性差异. 但于30 d时, 对照组肝脏纤维增生仍明显, 仍有纤维隔, 部分肝组织小叶结核紊乱. 而治疗组明显改善, 治疗组肝脏恢复明显好于对照组(P<0.05, 图5).

■相关报道

国外有研究粒细胞集落刺激因子直接动员造血干细胞到外周血对肝损伤可起到明显的改善作用的个别报道, 但国内未见类似动物实验研究报道.

■应用要点
通过验证重组人粒细胞集落刺激因子直接动员造血干细胞到外周血，并具有预防肝损伤和促进肝损伤的修复作用，为临床治疗重型肝炎、肝硬化等终末期肝脏疾病提供更方便、经济和更有效的新方法，有较好临床应用前景.

表 1 肝损伤小鼠肝组织中Thy-1及CD34细胞数的比较(mean ± SD, %)

分组	CD34(n = 4)	Thy-1(n = 6)	CD34⁺细胞数			
			n	8 d	15 d	30 d
模型组	5.2 ± 1.0[b]	2.8 ± 0.6				
预防组	11.0 ± 3.0[bc]	8.3 ± 1.2[d]				
正常组	2.2 ± 0.8					
对照组			4	5.4 ± 1.0	4.5 ± 0.8	4.7 ± 0.4
治疗组			4	9.5 ± 2.2[e]	8.2 ± 1.9[e]	5.7 ± 1.8

[b]P<0.01 *vs* 正常组; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 模型组; [e]P<0.05 *vs* 对照组.

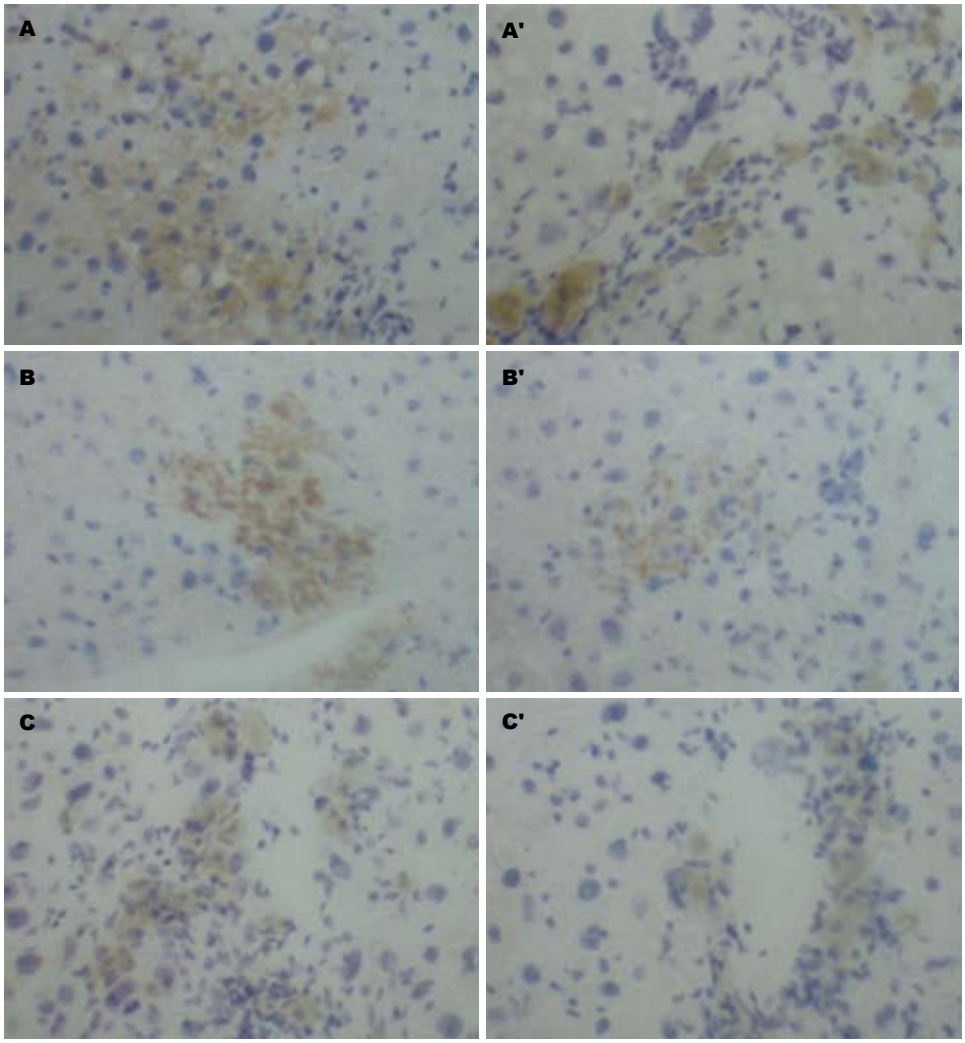


图 3 小鼠肝组织中Thy-1表达于胞膜与胞质，呈棕黄色均匀弥漫(AB × 400). A: 治疗组8 d; A': 对照组8 d; B: 治疗组15 d; B': 对照组15 d; C: 治疗组30 d; C': 对照组30 d.

2.4 外周血干细胞在受损伤肝组织内定植的研究 未接受♂小鼠外周血干细胞移植的♀小鼠肝组织为阴性对照，未见Y染色体阳性细胞. 设♂小鼠肝组织为阳性对照，Y染色体原位杂交阳性细胞为黄绿色荧光. 在正常♂小鼠肝组织Y染色体荧光着色明显增强、增多，在接受移植的受体♀小鼠肝组织内发现Y染色体阳性的肝细胞，主要位于汇管区与中央静脉周围. 同时做心、肺、肾、脾Y染色体原位杂交，心脏、肺脏、肾脏组织内未发现Y染色体阳性细胞，脾脏可见数个Y染色体阳性细胞(图6).

3 讨论

肝脏是一个结构与功能相对复杂、再生能力极

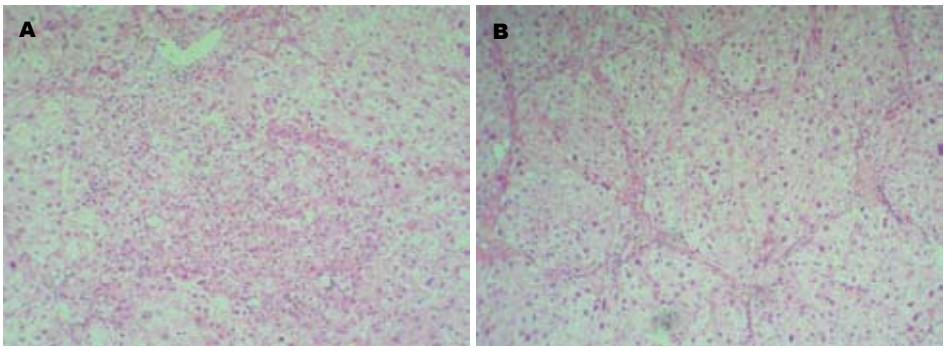


图 4 小鼠肝组织学改变(HE × 100). A: 预防组; B: 模型组.

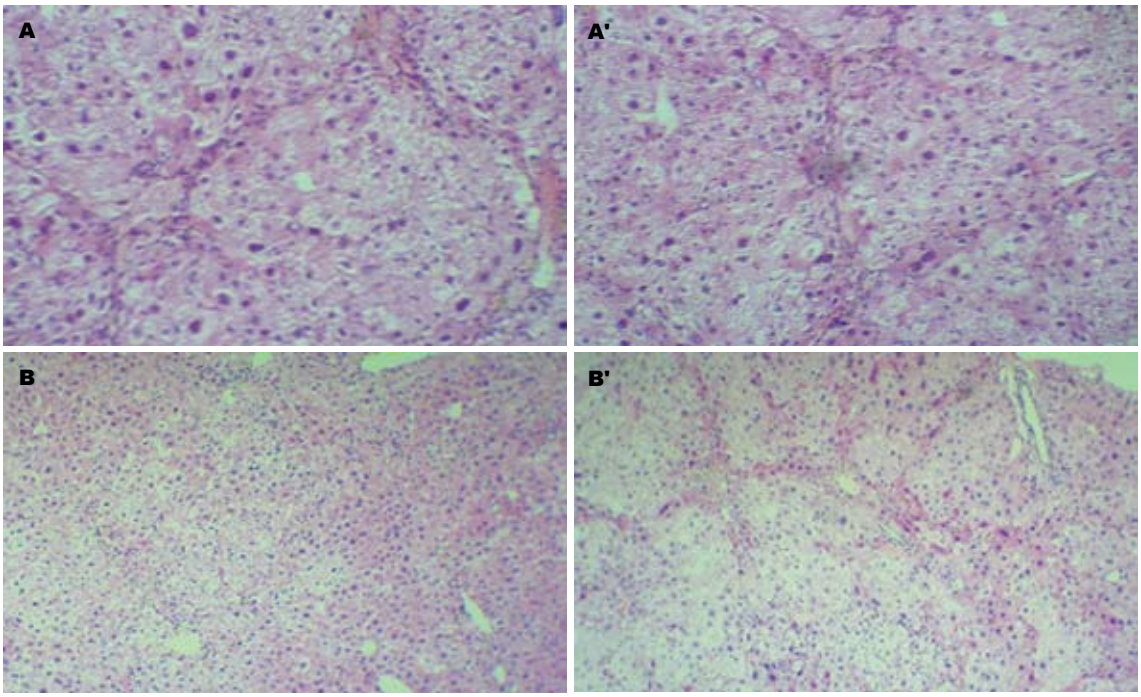


图 5 小鼠肝组织学改变(8 d, HE × 200; 30 d, HE × 100). A: 治疗组8 d; A': 对照组8 d; B: 治疗组30 d; B': 对照组30 d.

■名词解释

骨髓干细胞: 是重要的成体干细胞. 研究表明成体干细胞具有多向分化潜能, 可以演变成为与其组织发育或与其再生来源无关的多种组织的细胞. 骨髓干细胞在特定的环境下可分化为多种组织细胞, 如心肌细胞、神经细胞、肝细胞等.

强的器官. 成体肝脏损伤后, 肝实质的维持和再生主要有3个细胞来源: 成熟的肝细胞、肝脏内的干细胞和肝外来源的干细胞(血液循环或骨髓来源的细胞)[2-3]. 以上这3种细胞处于动态平衡中. 当肝损伤严重时, 成熟肝细胞增生会受到限制, 骨髓干细胞及肝脏内的干细胞才会被活化、增殖, 然后迁移到受损伤的肝脏实质, 并进一步分化为肝细胞和胆管细胞, 修复和重建肝脏[4-6]. 骨髓干细胞(bone marrow stem cells , BMSCs)主要有两类干细胞群体: 造血干细胞和间充质干细胞, 而他们都具有多种分化潜能, 具有分化为肝细胞的能力. 王韫芳 *et al*[7]用丙烯醇致肝损伤微环境, 经门静脉输入标记好的骨髓干细胞, 移植3 d后, 在肝组织切片汇管区周围发现大量标记的阳性细胞, 7-10 d出现环状分布的外源性细胞, 至14-21 d进一步增多, 这些外源性的细胞大量高表达白蛋白. 而把骨髓干细胞移植于正常肝脏的大鼠体内, 则几乎未见阳性细胞表达. Sakaida *et al*[8]建立小鼠CCl_4肝损伤模型, 尾静脉注射标记了绿色荧光蛋白的骨髓干细胞, 5-8 wk后发现所有细胞均到达肝脏, 并进一步论证了骨髓来源的干细胞有助于减轻CCl_4诱导的小鼠肝纤维化. 史明霞 *et al*[9]也用CCl_4制备肝纤维化模型, 经尾静脉注射分离的$FIKI^+$间充质干细胞, 5 wk后, 注射$FIKI^+$间充质干细胞组的小鼠肝纤维程度明显减轻, 认为可能是由于$FIKI^+$间充质干细胞启动的肝细胞内源性修复程序而起作用, 这都说明骨髓干细胞具有向肝损伤部位迁移, 并在受损伤的肝脏定居、转化, 减轻肝损伤的作用.

rhG-CSF动员自体骨髓干细胞治疗急性心肌梗死和脑中风的有效性、安全性、可行性已

■**创新盘点**
本文阐述重组人粒细胞集落刺激因子直接动员造血干细胞到外周血, 利用干细胞具有向肝脏定向迁移的特性, 并在损伤部位沉积、转化为肝细胞, 并促进肝损伤的修复, 且具有操作方便、无副作用、无排斥反应、成本低、便于临床应用的优点.

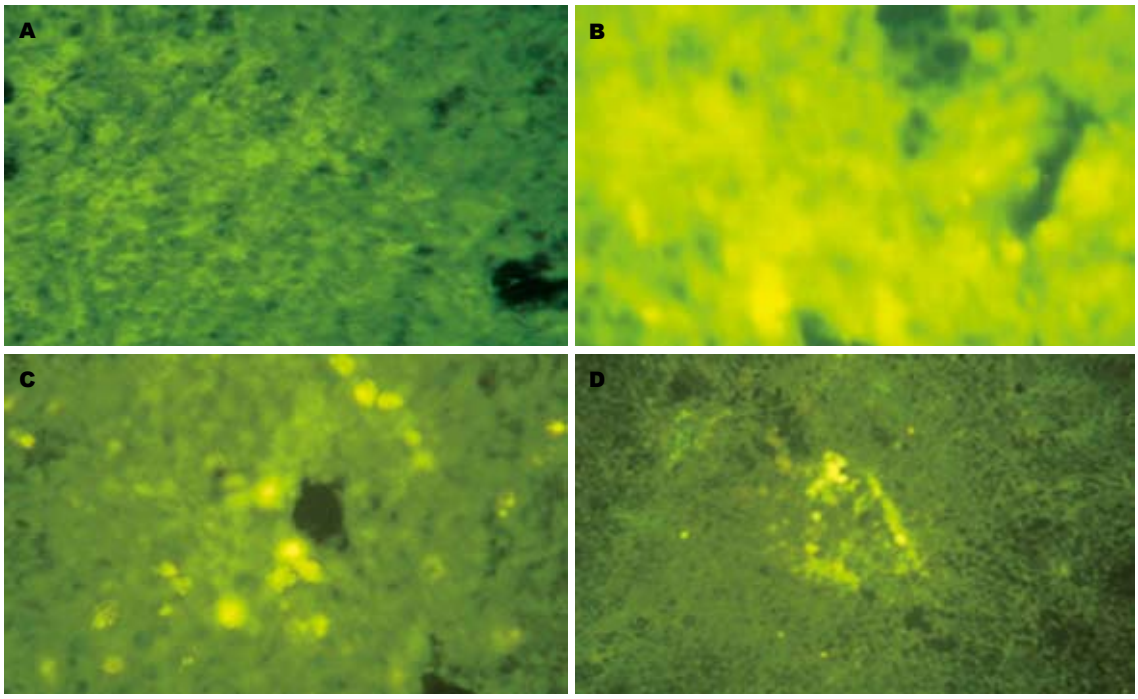


图 6 Y染色体原位杂交阳性细胞为黄绿色荧光(ABCD × 400). A: 未接受移植组; B: 正常♂组; C: 接受移植肝组织组; D: 接收移植脾组织组.

被许多基础研究所证实[10-13]. 目前在临床上已应用G-CSF治疗急性心肌梗死、急性缺血性脑卒中患者在国内外均有报道, 并取得满意疗效[14-16]. 在本实验中, 我们研究rhG-CSF动员自体骨髓干细胞对肝损伤的作用, 发现rhG-CSF预防组小鼠死亡率明显低于模型组小鼠, 肝组织病理损伤程度及肝功能指标均好于模型组小鼠, 说明rhG-CSF可降低CCl_4所致肝损伤小鼠死亡率, 减轻肝损伤, 对肝损伤具有保护作用, 这与文献报道结果一致[17-19]. rhG-CSF直接动员骨髓干细胞到外周血可提高实验性小/大鼠的生存率、保护肝功能、明显改善肝损伤, 并认为这种作用与rhG-CSF启动肝再生的内源性程序、改善肝再生有关. 具体机制尚不清楚.

HA是由间质细胞合成分泌的, 其代谢大部分由肝脏内皮细胞完成. 慢性肝病时由于肝脏代谢能力下降, 肝窦内皮细胞清除减少, HA释放入血. 肝硬化时因肝功能损害累及内皮细胞功能, 摄入和分解HA的能力下降, 均使血清HA水平增高. LN是构成基底膜的主要成分, 在细胞黏附、分化和基因表达起重要作用, 其血清含量与肝组织汇管区和小叶内炎症相关, 与肝纤维化程度平行. 血清中的HA、LN的含量能较好地反映肝脏的状况及慢性肝病的严重程度, 且随着肝纤维化程度的加重而升高. 在本实验中, rhG-CSF预防组小鼠血清中HA和LN均低于模型组小鼠, 反映了rhG-CSF预防组小鼠肝损伤程度轻, 说明rhG-CSF可以减轻CCl_4所致小鼠肝损伤的肝纤维化程度, 从另一方面也说明了rhG-CSF对肝损伤具有保护作用. rhG-CSF作为骨髓干细胞动员剂, 具有同时动员骨髓造血干细胞及间充质干细胞的能力[20]. 间充质干细胞可以抑制肝星状细胞的增殖和活化, 而肝星状细胞的增殖与活化是肝纤维化形的关键因素[21-23], 这也从一个方面解释了rhG-CSF预防组的肝纤维化程度轻的原因.

Huling *et al*[24]证明, 把G-CSF动员后的外周血干细胞经门静脉注入肝切除70%的F344大鼠体内, 可以提高肝再生的细胞数, 并促进肝脏功能的恢复. 在本实验中, 治疗组小鼠的肝组织病理变化、肝功能与对照组相比, 治疗后8 d、15 d时两组无明显变化, 但在30 d时治疗组肝功能、肝组织病理变化等有关指标明显好于对照组, 说明rhG-CSF可以加速CCl_4所致小鼠肝损伤的修复. $CD34^+$细胞在正常肝组织中的小血管内皮细胞表达, $Thy\text{-}1^+$在正常成年肝脏中并不表达, 但他们两者均在活化的肝卵圆细胞(肝的干细胞)和骨髓造血干细胞表达[25-26]. 在肝损伤实验中, 预防组的$CD34^+$细胞数及$Thy\text{-}1^+$细胞数都显著高于模型组, 这是因为rhG-CSF动员干细胞的作用. rhG-CSF治疗组与对照组$CD34^+$和$Thy\text{-}1^+$细胞数变化趋势, 一方面说明CCl_4所致

的小鼠慢性肝损伤本身也具有动员骨髓造血干细胞和/或肝的干细胞参与肝损伤的修复, 但是这种自发的作用是很小的, 而rhG-CSF动员后这种作用明显增加. 另一方面也说明rhG-CSF动员后, 较多骨髓造血干细胞进入损伤的肝组织和/或较多的肝干细胞被活化参与肝细胞再生. 随着时间的推移, 骨髓造血干细胞和/或肝的干细胞渐向成熟的肝细胞分化, 肝组织内$CD34^+$和$Thy\text{-}1^+$细胞数表达渐减少, 从而改善肝功能、促进肝损伤修复. 刘峰 *et al*[27]研究发现, G-CSF动员自体骨髓干细胞可以促进部分肝移植物的再生, 在移植后第3-14 d动员组汇管区可见较多的$CD34^+$细胞, 且动员组的受体生存率明显提高, 移植肝再生明显, 肝损伤轻, 考虑可能与造血干细胞参与肝再生有关.

已证实骨髓干细胞可在受损伤的肝脏内定植、转化为肝细胞参与肝损伤的修复. 在本实验中, 我们把经rhG-CSF动员的♂小鼠的外周血干细胞经尾静脉移植给肝受损伤的♀小鼠, 然后通过原位杂交, 在接受移植的受体♀小鼠肝组织内发现Y染色体阳性的肝细胞, 主要位于汇管区与中央静脉周围, 同时做心、肺、肾、脾Y染色体原位杂交, 心、肺、肾组织未发现Y染色体阳性细胞, 脾组织内可见数个Y染色体阳性细胞, 证明外周血干细胞具有向肝损伤部位迁移、归巢并在损伤部位定居的特性. 同时也对我们前面实验的结果即rhG-CSF具有对肝损伤的保护作用以及促进肝损伤恢复作用的有效性提供了有力的依据. 而直接用rhG-CSF动员自体干细胞更简便, 且不存在伦理问题与组织配型和免疫排斥问题, 具有操作方便、无损伤、成本低、便于临床应用的等优点.

rhG-CSF对肝损伤具有保护作用以及加速肝损伤的恢复, 减轻肝纤维化程度, 可能与下列因素有关. 除了前面提到的rhG-CS动员间充质干细胞从而抑制肝星状细胞增殖与活化外, 间充质干细胞还可减少肝组织胶原沉积, 减少平滑肌动蛋白和转化生因子β受体表达[28]. rhG-CSF动员骨髓干细胞, 而骨髓干细胞在肝纤维化形成环境中向肝细胞定向分化, 不向肌成纤维样细胞分化. 这样, 通过骨髓干细胞分化可能有助于补充肝纤维化形成环境中丧失的肝细胞, 而不会使肝纤维化形成的关键细胞—肌成纤样细胞大量增加, 从而减轻肝纤维化[29]. 骨髓干细胞在肝损伤、肝纤维化环境中存活、增殖并向肝细胞分化, 表达肝脏特异的角蛋白CK-18. 同时骨髓细胞通过分泌细胞因子刺激受体肝细胞再生, 间接影响某些胶原降解因子表达, 如uPA(激酶样纤溶酶原活化物), 促进胶原和ECM的降解, 逆转肝纤维化, 促进肝小叶结构的恢复[30]. rhG-CSF作用于机体后, 启动内源性肝干细胞再生, 保护肝功能、加速损伤的恢复. rhG-CSF通过激活其受体和细胞内的一些信号传导途径如Akt(蛋白激酶B)等而直接作用于受损伤的组织[31-32], 而发挥其保护作用和促进肝细胞的再生.

rhG-CSF动员使损伤的肝脏加速恢复, 这既有骨髓干细胞参于肝损伤修复的作用, 也可能有肝内源性肝再生参于损伤修复所起的作用, 其详细机制尚需要进一步研究. 但rhG-CSF可减轻CCl_4所致的小鼠肝损伤, 并可改善肝功能、加速肝损伤修复的作用, 将为临床上治疗重症肝炎及难治性肝硬化患者提供了一个更方便、经济、有效的新方法.

■同行评价

本文课题设计严谨、内容新颖, 创新性强. 本研究拟探索一条治疗肝硬化的新方法, 有较好的临床应用前景.

4 参考文献

1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订《病毒性肝炎防治方案》. 肝脏 2000; 5: 257-263

2 Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66

3 Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477-1487

4 Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 4080-4085

5 Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530

6 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170

7 王韫芳, 南雪, 尉承泽, 李艳华, 张锐, 管立东, 岳文, 裴雪涛. 丙烯醇致肝损伤微环境定向诱导骨髓干细胞向肝细胞分化. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 274-277

8 Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1304-1311

9 史明霞, 房佰俊, 廖联明, 杨少光, 刘煜昊, 赵春华. $FIKI^+$间充质干细胞减轻四氯化碳导致的肝纤维化的研究. 生物工程学报 2005; 21: 396-401

10 徐新, 马绍椿, 罗东云, 唐良秋, 林拓, 张昌瑞. 应用G-CSF动员骨髓干细胞治疗急性心肌梗塞的研究. 中国分子心脏病学杂志 2003; 3: 223-225

11 Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Ohtsu Y, Ishida M, Yutani C, Kitamura S. G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. *Cell Transplant* 2004; 13: 741-748

12 Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T, Yutani C,

Kitamura S. Endogenous bone-marrow-derived stem cells contribute only a small proportion of regenerated myocardium in the acute infarction model. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24: 67-72
13 Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, Tzeng YS, Pang CY, Yen PS, Li H. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation* 2004; 110: 1847-1854
14 Park HK, Chu K, Lee ST, Jung KH, Kim EH, Lee KB, Song YM, Jeong SW, Kim M, Roh JK. Granulocyte colony-stimulating factor induces sensorimotor recovery in intracerebral hemorrhage. *Brain Res* 2005; 1041: 125-131
15 葛朝莉, 白润涛, 韩漫夫, 任力杰. 动员自体骨髓干细胞治疗急性缺血性脑卒中的临床研究. 卒中与神经疾病 2005; 12: 161-163
16 Kuethe F, Figulla HR, Herzau M, Voth M, Fritzenwanger M, Opfermann T, Pachmann K, Krack A, Sayer HG, Gottschild D, Werner GS. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2005; 150: 115
17 Liatsos GD, Mykoniatis MG, Margeli A, Liakos AA, Theocharis SE. Effect of acute ethanol exposure on hepatic stimulator substance (HSS) levels during liver regeneration: protective function of HSS. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1929-1938
18 Szumilas P, Barcew K, Baskiewicz-Masiuk M, Wiszniewska B, Ratajczak MZ, Machalinski B. Effect of stem cell mobilization with cyclophosphamide plus granulocyte colony-stimulating factor on morphology of haematopoietic organs in mice. *Cell Prolif* 2005; 38: 47-61
19 Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, Proya E, Anagnostopoulos A, Fassas A. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005; 33: 108-119
20 Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7: 430-436
21 赵东长, 陈蕊, 余伟华, 雷俊霞, 彭延文, 刘宁, 张秀明, 李树浓, 项鹏. 骨髓间质干细胞抑制肝星状细胞增殖与活化的肝外研究. 中国病理生理杂志 2005; 21: 1139-1142
22 Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002; 59: 514-523
23 Matsuda-Hashii Y, Takai K, Ohta H, Fujisaki H, Tokimasa S, Osugi Y, Ozono K, Matsumoto K, Nakamura T, Hara J. Hepatocyte growth factor plays roles in the induction and autocrine maintenance of bone marrow stromal cell IL-11, SDF-1 alpha, and stem cell factor. *Exp Hematol* 2004; 32: 955-961
24 Huiling X, Inagaki M, Arikura J, Ozaki A, Onodera K, Ogawa K, Kasai S. Hepatocytes derived from peripheral blood stem cells of granulocyte-colony stimulating factor treated F344 rats in analbuminemic rat livers. *J Surg Res* 2004; 122: 75-82
25 孙冰, 安靓. 肝卵圆细胞的研究进展. 解剖科学进展 2005; 11: 83-87
26 朱英, 刘平, 龙爱华, 吴云林, 肖家诚. 二甲基亚硝胺所致大鼠肝硬化形成与逆转过程中Thy1.1与OV6阳性染色细胞比较. 世界华人消化杂志 2005; 13: 953-957
27 刘峰, 潘孝本, 陈国栋, 蒋栋, 丛旭, 费然, 魏来. 粒细胞集落刺激因子动员自体骨髓干细胞促进大鼠部分肝移植物的肝再生. 中华医学杂志 2005; 85: 3342-3345
28 Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004; 78: 83-88
29 展玉涛, 魏来, 陈红松, 丛旭, 费然, 王宇. 骨髓干细胞在大鼠肝纤维化形成环境中的分化. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 673-675
30 Wu LM, Li LD, Liu H, Ning KY, Li YK. Effects of Guiyuanfang and autologous transplantation of bone marrow stem cells on rats with liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1155-1160
31 Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Esaki M, Maruyama R, Kanamori H, Li L, Ogino A, Misao Y, Khai NC, Mikami A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. *Lab Invest* 2006; 86: 32-44
32 Takano H, Qin Y, Hasegawa H, Ueda K, Niitsuma Y, Ohtsuka M, Komuro I. Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med* 2006; 84: 185-193

编辑 何燕 电编 李军亮

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3403-3407
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

前列腺素E1对梗阻性黄疸大鼠肝脏缺血再灌注损伤时白介素-1β表达的影响

徐 锋, 戴朝六, 赵 闯, 贾昌俊, 许永庆, 彭松林, 顾 玺, 赵 阳

徐锋, 中国医科大学盛京医院第一胆道外科 辽宁省沈阳市 110004
戴朝六, 赵闯, 贾昌俊, 许永庆, 彭松林, 顾玺, 赵阳, 中国医科大学盛京医院肝胆外科 辽宁省沈阳市 110004
徐锋, 2006年中国医科大学外科学博士, 讲师, 主要从事肝胆疾病基础与临床研究.
通讯作者: 戴朝六, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛京医院肝胆外科. daicl-sy@tom.com
电话: 024-83955232
收稿日期: 2007-04-01 修回日期: 2007-09-28

Effect of prostaglandin E1 on expression of interleukin-1β in hepatic ischemic reperfusion injury in rats with obstructive jaundice

Feng Xu, Chao-Liu Dai, Chuang Zhao, Chang-Jun Jia, Yong-Qing Xu, Song-Lin Peng, Xi Gu, Yang Zhao

Feng Xu, the First Department of Biliary Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Chao-Liu Dai, Chuang Zhao, Chang-Jun Jia, Yong-Qing Xu, Song-Lin Peng, Xi Gu, Yang Zhao, Department of Hepatobiliary Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Professor Chao-Liu Dai, Department of Hepatobiliary Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. daicl-sy@tom.com
Received: 2007-04-01 Revised: 2007-09-28

Abstract

AIM: To investigate the protective effect of prostaglandin E1 against hepatic ischemic reperfusion injury and effect on expression of interleukin-1β in rats with obstructive jaundice.

METHODS: Male Wistar rats were divided randomly into two groups: PG group received prostaglandin E1 (n = 18) and NS group received normal saline served as controls (n = 18). All rats underwent ligation and division of common bile duct to establish obstructive jaundice model according to Yoshidome's maneuver. After 1 wk, total liver ischemia for 15 min according to Pringle's maneuver and internal biliary drainage during hepatic reperfusion were performed. The hepatoprotective effect of prostaglandin E1 in PG group was studied throughout treatment with PGE1 by continuously pumping via portal vein from 15 min before hepatic ischemia to 60 min after reperfusion, while rats of NS group were only treated with normal saline. All rats were sacrificed at 1, 6, and 24 h after reperfusion. IL-1β expression was determined by ELISA, and glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in liver tissue homogenate, activities of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) in serum, in addition to serum level of bilirubin (total and conjugated) were evaluated. Liver tissue sections were examined to observe histopathological changes.

RESULTS: Analysis of data showed that treatment with prostaglandin E1 significantly attenuated hepatic IL-1β expression (1 h: 304.1 ± 67.9 ng/L *vs* 362.8 ± 137.1 ng/L; 6 h: 376.8 ± 74.6 ng/L *vs* 618.8 ± 217.8 ng/L; 24 h: 273.0 ± 69.0 ng/L *vs* 373.0 ± 71.7 ng/L), and lowered serum activities of ALT (1 h: 1939 ± 1427 nkat/L *vs* 5596 ± 2975 nkat/L; 6 h: 3409 ± 1708 nkat/L *vs* 9279 ± 4404 nkat/L; 24 h: 1434 ± 274 nkat/L *vs* 2264 ± 630 nkat/L), AST (1 h: 21 746 ± 12 083 nkat/L *vs* 37 552 ± 12 382 nkat/L; 6 h: 55 039 ± 35 471 nkat/L *vs* 98 811 ± 11 126 nkat/L; 24 h: 9394 ± 1662 nkat/L *vs* 27 664 ± 15 856 nkat/L) and MDA (1 h: 0.89 ± 0.18 μmol/g *vs* 1.21 ± 0.24 μmol/g; 6 h: 1.08 ± 0.23 μmol/g *vs* 1.45 ± 0.13 μmol/g; 24 h: 1.03 ± 0.08 μmol/g *vs* 1.45 ± 0.26 μmol/g) levels in tissue homogenate while elevating GSH (1 h: 945.1 ± 121.2 mg/g *vs* 720.0 ± 80.1 mg/g; 6 h: 753.5 ± 118.6 mg/g *vs* 553.6 ± 140.0 mg/g; 24 h: 768.0 ± 135.9 mg/g *vs* 596.3 ± 36.4 mg/g, $P < 0.05$) levels, while there was no difference in serum bilirubin levels between PG group and NS group ($P > 0.05$). Additionally, histological evaluation revealed improvement of liver damage in PG group compared with NS group.

CONCLUSION: The data indicate that prostaglandin E1 administered via the portal vein reduces expression of IL-1β in hepatic tissue and protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats with obstructive jaundice.

■**背景资料**
如何防护梗阻性黄疸肝脏缺血再灌注损伤是肝脏外科面临的一个重要临床问题, 但至今仍缺少有效的防护手段.

■研究前沿
肝脏缺血再灌注损伤的防护方法有多种, 其中应用药物防护是目前的研究热点, 也更符合临床实际.

Key Words: Obstructive jaundice; Liver; Ischemic reperfusion injury; Interleukin-1β; Prostaglandin E1

Xu F, Dai CL, Zhao C, Jia CJ, Xu YQ, Peng SL, Gu X, Zhao Y. Effect of prostaglandin E1 on expression of interleukin-1β in hepatic ischemic reperfusion injury in rats with obstructive jaundice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3403-3407

关键词: 梗阻性黄疸; 肝脏; 缺血再灌注损伤; 白介素-1β; 前列腺素E1

徐锋, 戴朝六, 赵闯, 贾昌俊, 许永庆, 彭松林, 顾玺, 赵阳. 前列腺素E1对梗阻性黄疸大鼠肝脏缺血再灌注损伤时白介素-1β表达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3403-3407
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3403.asp

摘要

目的: 探讨前列腺素(PG)E1对梗阻性黄疸肝脏缺血再灌注损伤的保护作用以及对IL-1β表达的影响.

方法: 将♂Wistar大鼠随机分为PGE1处理组(PG组, n = 18)和生理盐水对照组(NS组, n = 18). 参照Yoshidome法结扎并切断胆总管建立梗阻性黄疸模型, 1 wk后Pringle法阻断肝门15 min, 再灌注后建立胆道再通. 于缺血前15 min至再灌注60 min, PG组经门静脉持续泵入PGE1 0.5 μg/(kg•min), NS组给予等量生理盐水. 于再灌注1、6和24 h 3个时点取材, 检测血清ALT, AST, 总胆红素(total bilirubin, TBIL), 直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)水平, 测定肝组织GSH, MDA含量. ELISA法测定肝组织IL-1β表达, 并观察肝脏病理组织学改变.

结果: 再灌注各时点PG组血清ALT水平(1 h: 1939±1427 nkat/L *vs* 5596±2975 nkat/L; 6 h: 3409±1708 nkat/L *vs* 9279±4404 nkat/L; 24 h: 1434±274 nkat/L *vs* 2264±630 nkat/L)和AST(1 h: 21746±12083 nkat/L *vs* 37552±12382 nkat/L; 6 h: 55039±35471 nkat/L *vs* 98811±11126 nkat/L; 24 h: 9394±1662 nkat/L *vs* 27664±15856 nkat/L)、肝组织MDA含量(1 h: 0.89±0.18 μmol/g *vs* 1.21±0.24 μmol/g; 6 h: 1.08±0.23 μmol/g *vs* 1.45±0.13 μmol/g; 24 h: 1.03±0.08 μmol/g *vs* 1.45±0.26 μmol/g)以及肝组织IL-1β表达水平(1 h: 304.1±67.9 ng/L *vs* 362.8±137.1 ng/L; 6 h: 376.8±74.6 ng/L *vs* 618.8±217.8 ng/L; 24 h: 273.0±69.0 ng/L *vs* 373.0±71.7 ng/L)均显著低于NS组(P<0.05), 而肝组织GSH含量显著高于NS组(1 h: 945.1±121.2 mg/g *vs* 720.0±80.1 mg/g; 6 h: 753.5±118.6 mg/g *vs* 553.6±140.0 mg/g; 24 h: 768.0±135.9 mg/g *vs* 596.3±36.4 mg/g, P<0.05), 但两者胆红素水平无明显差异(P>0.05). PG组肝脏病理组织学损伤程度也较NS组明显减轻.

结论: PGE1下调肝组织IL-1β表达, 对梗阻性黄疸肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用.

0 引言

胆道恶性肿瘤引起的梗阻性黄疸正逐年增加. 为了彻底根除病灶和延长生存期, 越来越多的患者在解除胆道梗阻的同时需联合切除部分肝脏. 切肝时常用肝门阻断法控制出血, 当解除阻断后不可避免地会发生肝脏缺血再灌注损伤(hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI). HIRI常导致患者术后肝功能衰竭甚至死亡, 但目前对此仍缺少有效的防护方法. HIRI时肝脏非实质细胞产生的细胞因子如IL-1β介导肝细胞损伤, 甚至导致肝功能衰竭. 近来研究发现, 前列腺素E1(prostaglandin E1, PGE1)能有效地治疗肝移植后原发性无功能, 说明对肝脏具有保护作用[1-4]. 因此我们通过梗阻性黄疸大鼠肝脏缺血再灌注损伤模型探讨PGE1抑制肝组织IL-1β表达, 达到对梗阻性黄疸HIRI的保护作用, 为临床应用提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar♂大鼠, 体质量270±20 g, 中国医科大学盛京医院实验动物中心提供. IL-1β ELISA试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司, 谷胱甘肽(GSH)及丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, PGE1购自北京赛生药业有限公司.

1.2 方法 将36只♂Wistar大鼠随机分为PGE1处理组(PG组, n = 18)和生理盐水对照组(NS组, n = 18). 参照Yoshidome *et al*[5]和Wang *et al*[6]报道的方法建立梗阻性黄疸模型, 稍加改动. 各组大鼠用100 g/L水合氯醛(按3 μL/g)ip麻醉, 取正中切口入腹, 5/0丝线结扎并切断胆总管. 术后大鼠均单笼饲养, 常规进食水. 造模1 wk后再次麻醉, 取正中及右肋缘下联合切口入腹, 游离扩张的胆总管, 离断肝周韧带. PG组PGE1按0.5 μg/(kg•min)(100 μg PGE1溶于20 mL生理盐水)经门静脉持续泵入15 min, NS组生理盐水按相同速度给予. 随后用无创伤动脉夹Pringle法完全阻断肝门15 min, 移除动脉夹恢复肝脏血供. 肝脏再灌注后再持续泵入PGE1或生理盐水60 min, 并用硬膜外导管连

表 1 大鼠肝IR血清ALT、AST、TBIL和DBIL水平(mean ± SD, n = 6)

指标	分组	再灌注1 h	再灌注6 h	再灌注24 h
ALT(nkat/L)	NS组	5596 ± 2975	9279 ± 4404	2264 ± 630
	PG组	1939 ± 1427[a]	3409 ± 1708[a]	1434 ± 274[a]
AST(nkat/L)	NS组	37 552 ± 12 382	98 811 ± 11 126	27 664 ± 15 856
	PG组	21 746 ± 12 083[a]	55 039 ± 35 471[a]	9394 ± 1662[a]
TBIL(μmol/L)	NS组	123.3 ± 24.8	65.2 ± 10.2	83.6 ± 30.1
	PG组	101.1 ± 31.0	58.8 ± 26.9	81.9 ± 9.1
DBIL(μmol/L)	NS组	100.4 ± 20.0	51.9 ± 8.7	70.2 ± 24.4
	PG组	83.2 ± 24.8	46.4 ± 23.7	70.0 ± 8.6

[a]P<0.05 *vs* NS组.

表 2 大鼠肝IR肝组织GSH、MDA和IL-1β含量(mean ± SD, n = 6)

指标	分组	再灌注1 h	再灌注6 h	再灌注24 h
GSH(mg/g)	NS组	720.0 ± 80.1	553.6 ± 140.0	596.3 ± 36.4
	PG组	945.1 ± 121.2[a]	753.5 ± 118.6[a]	768.0 ± 135.9[a]
MDA(μmol/g)	NS组	1.21 ± 0.24	1.45 ± 0.13	1.45 ± 0.26
	PG组	0.89 ± 0.18[a]	1.08 ± 0.23[a]	1.03 ± 0.08[a]
IL-1β(ng/L)	NS组	362.8 ± 137.1	618.8 ± 217.8	373.0 ± 71.7
	PG组	304.1 ± 67.9	376.8 ± 74.6[a]	273.0 ± 69.0[a]

[a]P<0.05 *vs* NS组.

通胆总管与十二指肠, 建立胆道再通. 分别于肝脏再灌注后1, 6, 24 h 3个时点(各6只)取材, 自腹主动脉采血3 mL, 静置20 min, 3000 r/min离心10 min. 将血清转移至塑料弹头中, 置于-20℃冰箱中保存, 待测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)以及直接胆红素(DBIL)水平(用Hitachi 7600全自动生化分析仪检测上述血清指标)方法如下: 快速夹取肝组织, 用锡箔纸包裹后置于液氮中, 再转至-80℃冰箱中保存, 待做肝组织GSH和MDA含量测定和白介素-1β(IL-1β)ELISA检测. 处死大鼠, 取1 cm×1 cm×1 cm大小肝组织置于40 g/L甲醛中固定, 待做病理组织学检查.

1.2.1 肝组织IL-1β、GSH、MDA含量测定: 称取-80℃冰箱保存的肝组织, <100 mg, 加生理盐水使其浓度为1 kg/L, 冰水中匀浆, 4℃ 16 000 r/min离心10 min, 取上清液. 按试剂盒说明书操作, 测定GSH和MDA含量. 建立IL-1β标准曲线, 待测品孔每孔加入待测样品100 μL, 将反应板充分混匀后置37℃水浴120 min, 用洗涤液将反应板充分洗涤4-6次, 向滤纸上印干. 每孔中加入一抗体50 μL, 置37℃水浴60 min, 洗板: 每孔加酶标抗体100 μL, 将反应板置37℃水浴60 min. 洗板; 每孔加底物100 μL, 置37℃暗处反应5-10 min. 每孔加1滴终止液, 混匀, 于492 nm处用全自动酶标仪测定吸光度A值和IL-1β含量.

1.2.2 肝组织病理组织学检查: 肝组织块常规石蜡包埋, 切片, HE染色, 光镜下观察肝病理组织学变化.

统计学处理 所有数据采用统计软件SPSS11.5进行t检验分析, P<0.05为有统计学意义.

2 结果

2.1 血清生化酶和胆红素水平 PG组再灌注各时点血清ALT和AST水平均显著低于NS组(P<0.05). 肝组织损伤虽以再灌注6 h最明显, 但随再灌注时间延长呈逐渐恢复趋势. PG组血清TBIL和DBIL水平虽较NS组有下降, 但无统计学差异(P>0.05, 表1).

2.2 肝组织GSH和MDA含量 PG组再灌注6 h肝组织GSH水平虽达低值, 但再灌注各时点GSH水平均显著高于NS组(P<0.05). PG组再灌注6 h肝组织MDA水平虽达峰值但随再灌注时间延长, MDA水平有逐渐下降趋势, 且再灌注各时点MDA水平均显著低于NS组水平(P<0.05). 而NS组再灌注24 h肝组织MDA则仍维持于较高水平(表2).

■创新盘点
本文以梗阻性黄疸肝脏缺血再灌注损伤的肝脏微循环障碍为切入点, 应用前列腺素E1对微循环的作用进行研究, 具有一定的创新性.

■应用要点
本文提示前列腺素E1对梗阻性黄疸肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用, 因此在临床上可以适度地推广应用.

■名词解释
梗阻性黄疸: 指外科黄疸. 由于肝外胆道梗阻, 导致胆汁返流, 血中胆红素水平升高, 并出现黄疸表现的一类疾病.

2.3 肝组织IL-1β含量 PG组再灌注各时点肝组织IL-1β水平均低于NS组, 且再灌注6, 24 h两组肝组织IL-1β水平均有统计学差异($P<0.05$). 再灌注24 h PG组肝组织IL-1β水平已明显低于再灌注1 h水平, 而NS组却仍高于再灌注1 h水平(表2).

2.4 肝组织病理形态学 PG组再灌注各时点肝组织损伤均较NS组轻, 表现为肝细胞肿胀较轻、肝细胞索排列较规则、肝窦结构较宽且较清晰、肝细胞坏死较少. 而NS组肝组织结构不清, 肝细胞索排列紊乱, 肝窦明显变窄, 肝细胞坏死明显, 尤其再灌注6 h中央静脉周围出现大量肝细胞坏死(图1).

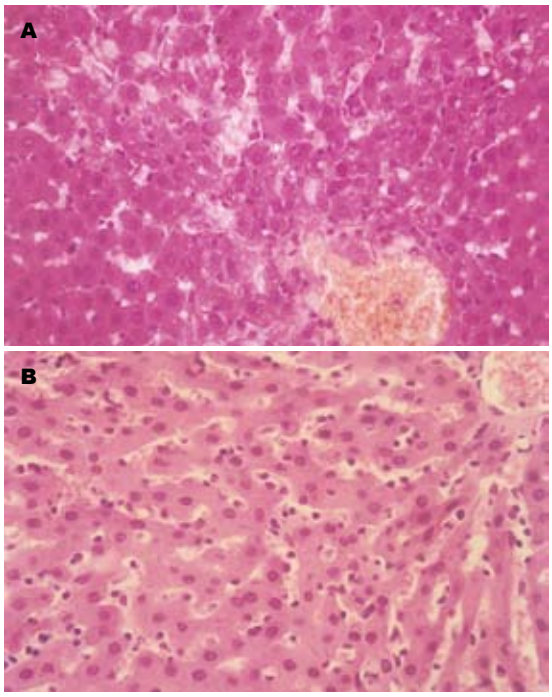


图 1 大鼠肝IR 6 h肝组织改变(HE × 400). A: NS组; B: PG组.

3 讨论

如何减轻梗阻性黄疸患者肝脏缺血再灌注损伤是肝脏外科面临的一个重要临床问题. 虽然目前对梗阻性黄疸肝脏缺血再灌注损伤的作用机制进行了初步研究[5,7-12], 但至今仍无有效的防护方法. 研究发现, PGE1具有扩张血管、增加肝脏血流量作用, 能改善再灌注时微循环障碍所致的无复流现象. 治疗原发性肝移植物无功能[1-4]. 但PGE1经外周静脉给药后约70%在肺部被迅速代谢, 此外动脉和肠道也可利用一部分[4]. 这势必需要加大剂量才能使PGE1对肝脏产生满意的作用, 由此也容易出现低血压等全身不良反应. 如利用肝脏独特的供血系统, 采用经门静脉途径给药, PGE1可直接经肝脏循环对肝细胞产生作用, 则可减少药物用量. 但至今为止, PGE1经门静脉途径给药在梗阻性黄疸HIRI中作用尚无研究报道. 本研究显示PGE1治疗组再灌注后各时点血清ALT和AST水平均显著下降, 且肝脏病理组织学改变也明显减轻, 提示应用PGE1可减轻缺血再灌注对瘀疸肝脏的损伤, 具有保护作用. HIRI时肝细胞内还原性GSH显著下降, 且其损伤程度与缺血前细胞内GSH含量成反比, GSH水平可作为组织损伤严重程度的敏感指标之一[13-14]. 缺血再灌注时产生的氧自由基是造成肝脏损伤的一个重要因素. GSH作为体内重要的抗氧化剂, 可对抗氧自由基的损害, 减轻对肝脏组织的损伤[15-16]. MDA则是自由基连锁反应-脂质过氧化的最终产物, 测定其含量可反映机体内脂质过氧化的程度, 间接反映细胞膜损伤的程度, 两者的变化可反映肝脏的抗氧化能力[17-18]. 我们发现, PG组, 再灌注后GSH水平虽有下降但明显高于NS组, 且MDA水平虽有增加但不明显, 提示应用PGE1可通过提高肝组织GSH水平, 降低MDA水平, 增强肝脏的抗氧化能力, 有效地清除氧自由基, 从而减轻HIRI. 这与Bulbuller *et al*[15]实验结果类似.

瘀疸肝脏缺血再灌注后肝细胞肿胀进一步加重, 压迫微血管, 肝脏白细胞浸润增加, 并通过ICAM-1表达增加黏附于内皮细胞, 进而嵌顿、阻塞肝窦; 肝窦内大量白细胞黏附、附壁的同时, 释放大量IL-1β等炎性介质, 从而进一步加重肝脏损伤[5,7-12,19]. 我们应用PGE1后, 再灌注各时点肝组织白细胞浸润减少, IL-1β表达水平显著下降. 这可能与以下因素有关: (1)PGE1具有直接舒张血管平滑肌作用, 增加肝脏血流量, 并阻止缩血管物质的释放, 降低血管平滑肌对血管收缩物质的敏感性, 抑制白细胞黏附, 从而减少IL-1β等细胞因子介导的损伤, 稳定溶酶体膜及抑制溶酶释放, 保护细胞膜[20-24]. (2)PGE1具有阻止血小板聚集的作用, 抑制血小板聚集, 减少血小板释放TXA2, 防止微血栓形成, 减少白细胞黏附[25-27]. (3)PGE1直接提高Kupffer细胞内cAMP含量, 抑制IL-1β等炎性介质的合成和释放[20]. (4)PGE1可通过激活腺苷酸环化酶, 提高肝细胞内cAMP含量, 明显抑制肝窦ICAM-1等黏附分子表达, 抑制白细胞与肝窦内皮细胞的黏附和渗出, 增加红细胞的变形能力, 改善肝窦微循环障碍[28-30]. 总之, PGE1可减少梗阻性黄疸HIRI时肝组织IL-1β表达、减轻肝脏损伤, 但其具体的分子机制仍有待进一步研究.

4 参考文献

1 Gatta A, Dante A, Del Gaudio M, Pinna AD, Ravaioli M, Riganello I, Volta G, Faenza S. The use of prostaglandins in the immediate postsurgical liver transplant period. *Transplant Proc* 2006; 38: 1092-1095

2 Kornberg A, Schotte U, Kupper B, Hommann M, Scheele J. Impact of selective prostaglandin E1 treatment on graft perfusion and function after liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 526-531

3 Kawachi S, Shimazu M, Wakabayashi G, Tanabe M, Shirasugi N, Kitajima M. Intraportal infusion of prostaglandin E1 improves graft viability after orthotopic liver transplantation in pigs. *Transplant Proc* 1997; 29: 374-375

4 Greig PD, Woolf GM, Sinclair SB, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor BR, Blendis LM, Superina RA, Glynn MF, Langer B. Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E1. *Transplantation* 1989; 48: 447-453

5 Yoshidome H, Miyazaki M, Shimizu H, Ito H, Nakagawa K, Ambiru S, Nakajima N, Edwards MJ, Lentsch AB. Obstructive jaundice impairs hepatic sinusoidal endothelial cell function and renders liver susceptible to hepatic ischemia/reperfusion. *J Hepatol* 2000; 33: 59-67

6 Wang DS, Dou KF, Li KZ, Gao ZQ, Song ZS, Liu ZC. Hepatocellular apoptosis after hepatectomy in obstructive jaundice in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2737-2741

7 Georgiev P, Navarini AA, Eloranta JJ, Lang KS, Kullak-Ublick GA, Nocito A, Dahm F, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Cholestasis protects the liver from ischaemic injury and post-ischaemic inflammation in the mouse. *Gut* 2007; 56: 121-128

8 Chinnakotla S, Pande GK, Sahni P, Gupta SD, Maulik M, Kumari R, Nundy S, Chattopadhyay TK. Evaluation of Pringle maneuver during liver resection in a rat model of surgical obstructive jaundice. *J Invest Surg* 2005; 18: 107-113

9 Karavias DD, Tsamandas AC, Tepetes K, Kritikos N, Kourelis T, Ravazoula P, Vagenas K, Siasos N, Mirra N, Bonikos DS. BCL-2 and BAX expression and cell proliferation, after partial hepatectomy with and without ischemia, on cholestatic liver in rats: an experimental study. *J Surg Res* 2003; 110: 399-408

10 姚凯, 房淑彬. 胆道梗阻大鼠肝脏缺血再灌注损伤的初步研究. 皖南医学院学报 2003; 22: 244-247

11 Karavias D, Tsamandas AC, Tepetes K, Kritikos N, Kourelis T, Mirra N, Bonikos DS, Androulakis J. The effect of ischemia on the regeneration of the cholestatic liver. An experimental study. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 456-460

12 Baron V, Hernandez J, Noyola M, Escalante B, Muriel P. Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2000; 127: 243-249

13 Heys SD, Ashkanani F. Glutamine. *Br J Surg* 1999; 86: 289-290

14 Yang CS, Chen WY, Tsai PJ, Cheng FC, Kuo JS. Effect of diethylmaleate on liver extracellular glutathione levels before and after global liver ischemia in anesthetized rats. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 357-361

15 Bulbuller N, Cetinkaya Z, Akkus MA, Cifter C, Ilhan YS, Dogru O, Aygen E. The effects of melatonin and prostaglandin E1 analogue on experimental hepatic ischaemia reperfusion damage. *Int J Clin Pract* 2003; 57: 857-860

16 Kacmaz A, User EY, Sehirli AO, Tilki M, Ozkan S, Sener G. Protective effect of melatonin against ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat. *Surg Today* 2005; 35: 744-750

17 Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, Sun XM, Zheng SH, Li X. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1825-1828

18 Sheen-Chen SM, Hung KS, Ho HT, Chen WJ, Eng HL. Effect of glutamine and bile acid on hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the rat. *World J Surg* 2004; 28: 457-460

19 Ma W, Wang ZR, Shi L, Yuan Y. Expression of macrophage inflammatory protein-1alpha in Kupffer cells following liver ischemia or reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3854-3858

20 季德刚, 刘秉义, 郑泽霖, 王伟. 前列腺素E_1对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用. 中国普外基础与临床杂志 2003; 10: 36-38

21 马玮, 王作仁, 张云峰, 石磊. 前列腺素E_1对肝缺血/再灌注损伤大鼠Kupffer细胞中单核细胞趋化蛋白-1表达的影响. 南方医科大学学报 2006; 26: 1180-1183

22 Natori S, Fujii Y, Kurosawa H, Nakano A, Shimada H. Prostaglandin E1 protects against ischemia-reperfusion injury of the liver by inhibition of neutrophil adherence to endothelial cells. *Transplantation* 1997; 64: 1514-1520

23 Hafez T, Moussa M, Nesim I, Baligh N, Davidson B, Abdul-Hadi A. The effect of intraportal prostaglandin E1 on adhesion molecule expression, inflammatory modulator function, and histology in canine hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2007; 138: 88-99

24 Hossain MA, Izuishi K, Maeta H. Effect of short-term administration of prostaglandin E1 on viability after ischemia/reperfusion injury with extended hepatectomy in cirrhotic rat liver. *World J Surg* 2003; 27: 1155-1160

25 Takahashi T. The effects of thromboxane A2 synthetase inhibitor (OKY-046) on complete hepatic ischemia in rats with obstructive jaundice. *Surg Today* 1996; 26: 15-20

26 Matsuzaki Y, Sugimoto H, Hamana K, Nagamine T, Matsuzaki S, Mori M. Effects of eicosanoids on lipopolysaccharide-induced ornithine decarboxylase activity and polyamine metabolism in the mouse liver. *J Hepatol* 1997; 27: 193-200

27 Hanazaki K, Kuroda T, Kajikawa S, Amano J. Prostaglandin E1 reduces thromboxane A2 in hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 807-811

28 Iwata K, Shimazu M, Wakabayashi G, Ohshima A, Yoshida M, Kitajima M. Intraportal perfusion of prostaglandin E1 attenuates hepatic postischaemic microcirculatory impairments in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 634-641

29 Qu W, Graves LM, Thurman RG. PGE(2) stimulates O(2) uptake in hepatic parenchymal cells: involvement of the cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 1999; 277: G1048-G1054

30 Liu H, Wang L, Liu Y, Song J, Huang J, He S. Experimental study on liver microcirculation disturbance following transplantation and the protective effect of prostaglandin E1 in the rat. *Chin Med J (Engl)* 1998; 111: 1079-1082

■同行评价

本文实验结果真实可靠, 数据处理严谨, 具有一定的创新性和应用前景.

编辑 程剑侠 电编 李军亮

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3408-3412
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

胃癌组织中细胞骨架4.1蛋白家族的表达意义

许晶晶, 陈鲤翔, 翟文杰, 冯文坡, 祁元明

■背景资料
蛋白4.1(指红细胞膜蛋白经SDS-PAGE后第4.1条显色带)是红细胞中以血影蛋白(spectrin)为基础的细胞膜骨架的一个基本成分, 在维持红细胞正常的形态和生物物理特性方面有重要作用. 蛋白4.1基因的缺失会导致红细胞畸形和溶血. 蛋白4.1家族包括4.1R、4.1N、4.1G和4.1B. 他们都具有一些相同的结构域: SABD结构域(spectrin–actin-binding domain). FERM结构域(在four.one/ezrin/radixin/moesin及merlin/NF2蛋白中都有该结构域)或称膜结合结构域(membrane binding domain, MBD)和CTD结构域(C-terminal domain).

许晶晶, 陈鲤翔, 翟文杰, 冯文坡, 祁元明, 郑州大学生物工程系 河南省郑州市 450001
许晶晶, 主要从事消化系统疾病的病理研究.
河南省医学科技创新人才资助项目, No. 200311201
河南省重点科技攻关资助项目, No. 0495060801
通讯作者: 祁元明, 450001, 河南省郑州市, 郑州大学生物工程系. qym@zzu.edu.cn
电话: 0371-67783329
收稿日期: 2007-06-29 修回日期: 2007-10-12

Expression and significance of membrane skeleton protein 4.1s in gastric carcinoma

Jing-Jing Xu, Li-Xiang Chen, Wen-Jie Zhai, Wen-Po Feng, Yuan-Ming Qi

Jing-Jing Xu, Li-Xiang Chen, Wen-Jie Zhai, Wen-Po Feng, Yuan-Ming Qi, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China
Supported by: the Medical Science and Technique Innovation Talent Project of Henan Province, No. 200311201; and the Tackle Key Problems in Science and Technology Project of Henan Province, No. 0495060801
Correspondence to: Dr. Yuan-Ming Qi, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. qym@zzu.edu.cn.
Received: 2007-06-29 **Revised:** 2007-10-12

Abstract

AIM: To investigate the expression and significance of four members (4.1B, 4.1R, 4.1G and 4.1N) of membrane skeleton protein 4.1 family in human gastric carcinoma tissues.

METHODS: Expression of 4.1B, 4.1R, 4.1G and 4.1N was examined by immunohistochemistry (Envision$^+$ assay) in archival paraffin-embedded gastric carcinoma tissues from 104 patients (77 males, 27 females, median age 61.7 years). Each case had detailed clinical data and surgical records. None of the patients were treated by radiotherapy or chemotherapy before surgery.

RESULTS: In gastric carcinoma, the expression of 4.1B, 4.1R, 4.1G and 4.1N was significantly different from that in normal gastric tissue (P < 0.01). The expression of 4.1B, 4.1G and 4.1N was significantly reduced when tumor differentiation became lower, which suggested these three members were significantly correlated with tumor differentiation status (P_B < 0.05, P_G < 0.01, P_N < 0.01). In gastric carcinoma with lymph node metastasis, the expression of 4.1B and 4.1N was significantly lower than that in tumors without lymph node metastasis (P_B < 0.05, P_N < 0.01).

CONCLUSION: Abnormal expression of 4.1B, 4.1G and 4.1N is related to the degree of tumor malignancy. Abnormal expression of 4.1N and 4.1B is related to lymph node metastasis of gastric cancer.

Key Words: Gastric carcinoma; Protein 4.1; Immunohistochemistry

Xu JJ, Chen LX, Zhai WJ, Feng WP, Qi YM. Expression and significance of membrane skeleton protein 4.1s in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3408-3412

摘要

目的: 研究细胞骨架4.1蛋白家族成员(4.1 B、4.1R、4.1G和4.1N)在胃癌组织中的表达及意义.

方法: 应用Envision$^+$免疫组织化学的方法检测104例胃癌(男77例、女27例, 中位年龄61.7岁, 每例均有详细的临床资料和手术记录. 所有病例术前均未进行放疗、化疗)中4.1蛋白家族成员的表达情况.

结果: 在胃癌组织中, 4.1B, 4.1R, 4.1G和4.1N的表达程度和其在癌旁对照组织中的表达程度均有明显差异(P<0.01), 4.1B, 4.1G和4.1N的表达程度随着胃癌组织的分化程度降低而减弱, 与癌组织分化程度显著相关(P_B<0.05, P_G<0.01, P_N<0.01), 在有淋巴结转移的胃癌中, 4.1B, 4.1N的表达程度明显低于无淋巴结转移者(P_B<0.05, P_N<0.01). 由于仅浸润黏膜层的病例过少, 4.1蛋白家族成员的表达与浸润均无相关性(P>0.05).

结论: 4.1B, 4.1G和4.1N参与胃癌的分化调节, 4.1B和4.1N则在胃癌的淋巴结转移过程中发挥作用.

关键词: 胃癌; 4.1蛋白; 免疫组化

许晶晶, 陈鲤翔, 翟文杰, 冯文坡, 祁元明. 胃癌组织中细胞骨架4.1蛋白家族的表达意义. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3408-3412
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3408.asp

0 引言

蛋白4.1(指红细胞膜蛋白经SDS-PAGE后第4.1条显色带)是红细胞中以血影蛋白(spectrin)为基础的细胞膜骨架的一个基本成分[1], 在维持红细胞正常的形态和生物物理特性方面有重要作用. 蛋白4.1基因的缺失会导致红细胞畸形和溶血[2]. 蛋白4.1家族包括4.1R、4.1N、4.1G和4.1B[3]. 他们都具有一些相同的结构域: SABD结构域(spectrin–actin-binding domain), FERM结构域(在four.one/ezrin/radixin/moesin及merlin/NF2蛋白中都有该结构域)或称膜结合结构域(membrane binding domain, MBD)和CTD结构域(C-terminal domain)[4].

研究发现, 在脑膜瘤[5]、室管膜瘤[6]、非小细胞肺癌[7]和乳腺癌[8]等多种肿瘤中, 4.1蛋白的表达缺失, 并且越来越多的临床和实验证据证实编码4.1蛋白的基因在多种肿瘤中表现出抑癌基因的作用[9], 表明4.1蛋白与肿瘤的发生和发展有着密切的关系. 目前国内外尚没有关于4.1蛋白家族成员在胃癌标本中的表达情况, 及其与胃癌发生、发展之间相关性的报道. 我们用Envision$^+$免疫组织化学[10]的方法来检测4.1蛋白家族成员在胃癌中的表达情况, 并探讨4.1蛋白家族成员的表达与胃癌发生、发展的关系, 以期为胃癌诊断、治疗和判断预后提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2005/01-2006/06郑州大学附属医院胃癌手术标本蜡块共104例, 男77例、女27例, 中位年龄61.7(35-88)岁. 将104例癌旁组织中符合对照原则的68例做为对照组. 每例均有详细的临床资料和手术记录. 所有病例术前均未进行放、化疗. 伴有淋巴结转移者51例. 参照1981年WHO推荐的分化分级标准: 高分化腺癌30例, 中分化腺癌28例, 低分化腺癌46例. 兔多抗4.1R、4.1N、4.1G、4.1B抗体由美国纽约血液中心安秀丽博士馈赠, Envision$^+$免疫组化试剂盒为美国Dako公司产品.

1.2 方法

所有蜡块做4 μm连续切片, 每个蜡块均切5-6张, 1张行HE染色, 作组织学诊断, 其余做免疫组化染色. 程序按Dako Envision$^+$免疫组化试剂盒说明书进行. 4.1R、N、B染色前行热抗原修复, G行酶抗原修复. DAB显色, 苏木素轻度复染. PBS代替一抗做阴性对照, 癌旁组织做阳性对照. 免疫组化染色阳性结果为质膜或胞质, 胞核内出现棕褐色颗粒或染色. 结果判定按半定量评分标准进行, 具体如下: 在高倍镜下, 与周围间质相比, 无着色记为0分, 浅褐色记为1分, 褐色为2分, 深褐色为3分; 阳性细胞百分率<10%记为0分, 10%-50%记为1分, 50%-75%记为2分, 75%以上记为3分, 两者相加为综合染色强度评分. 0-1分为阴性, 记为“-”, 2分为弱阳性, 记为“+”, 3-4分为阳性, 记为“++”, 5-6分为强阳性, 记为“+++”. 每张切片均判读癌组织及癌旁组织的染色强度.

统计学处理 采用SAS 9.13分析软件包行统计学处理. 应用卡方检验分析4.1B, 4.1R, 4.1G和4.1N表达与临床病理的关系.

2 结果

2.1 癌组织4.1的表达 4.1B, 4.1R, 4.1G和4.1N在胃癌组织中的表达程度明显低于癌旁对照组(图1), 两者之间差异显著(P<0.01, 表1).

2.2 4.1B, G, N表达与组织分化 4.1B、4.1G和4.1N的表达程度随着癌组织分化的降低而减弱(P_B<0.05, P_G<0.01, P_N<0.01), 4.1R的表达程度随着癌组织分化程度降低而减弱的趋势, 但是差异无统计学意义(P_R>0.05, 表1).

2.3 4.1B, G, N的表达与淋巴结转移和浸润深度 4.1B和4.1N的表达程度在伴有淋巴结转移和未伴有淋巴结转移的病例中的差异有统计学意义(P_B<0.05, P_N<0.01). 4.1R和4.1N的表达程度在伴有淋巴结转移的病例和未伴有淋巴结转移的病例中的差异无统计学意义(P>0.05, 表1). 由于浸润深度仅限于黏膜层的病例过少, 4.1B、4.1R、4.1G和4.1N的表达程度在不同浸润深度的病例中差异无统计学意义(P>0.05).

3 讨论

胃癌是严重威胁人类健康的消化道恶性肿瘤, 发病率位居肿瘤类疾病的第2位[11]. 深入研究胃癌的发病机制以及早期诊断、预后评估的方法具有十分重要的临床和社会价值. 胃癌的发生涉及原癌基因的激活与抑癌基因的失活所造成的异常细胞增殖及分化调控[12], 而且胃癌

■**相关报道**
研究发现, 在脑膜瘤、室管膜瘤、非小细胞肺癌和乳腺癌等多种肿瘤中, 4.1蛋白的表达缺失, 并且越来越多的临床和实验证据证实编码4.1蛋白的基因在多种肿瘤中表现出抑癌基因的作用.

■**创新盘点**
目前国内外尚没有关于4.1蛋白家族成员在胃癌标本中的表达情况, 及其与胃癌发生、发展之间相关性的报道.

表 1 胃癌组织中4.1蛋白的表达意义

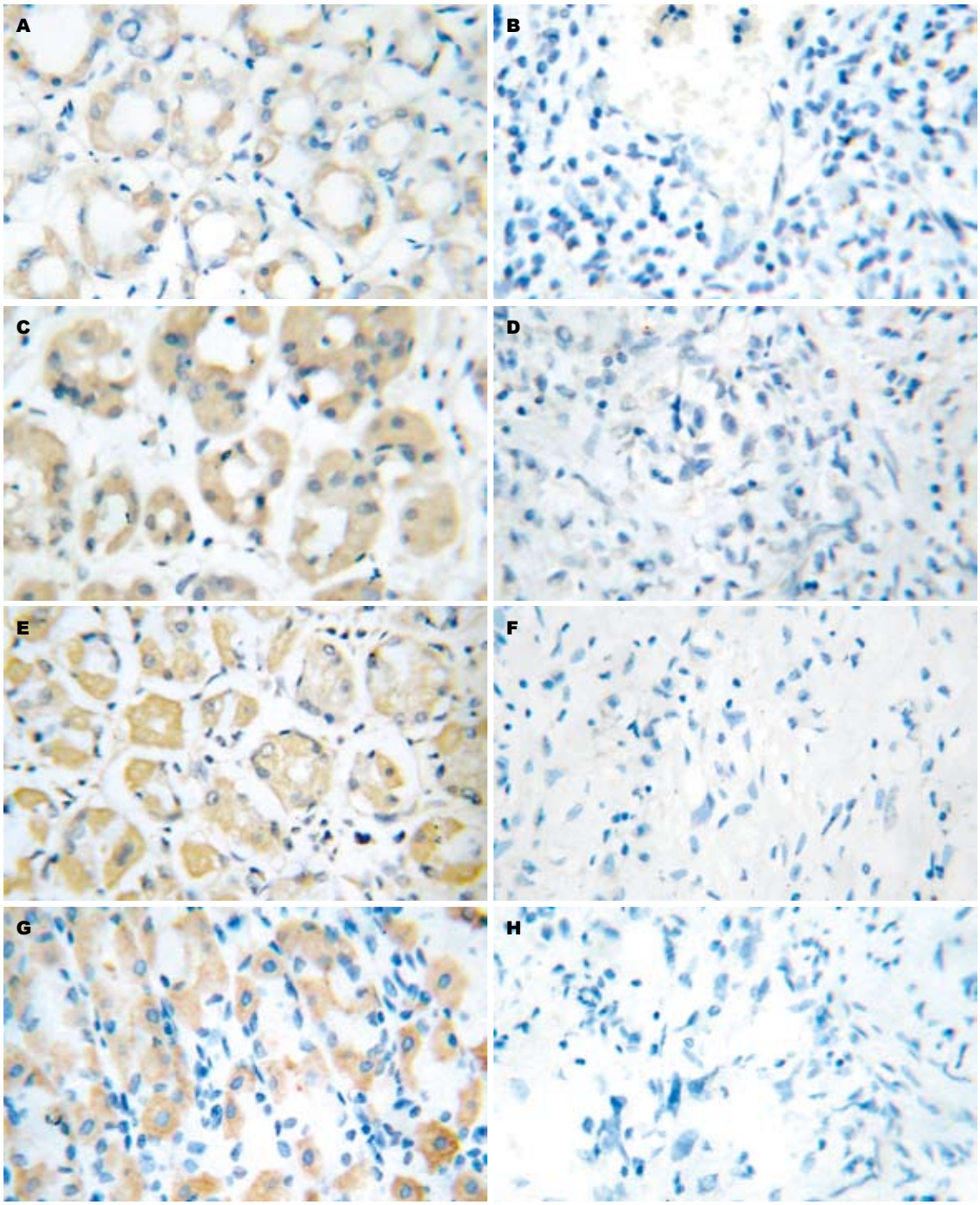
抗体	表达程度	胃癌 $n = 68$	癌旁 $n = 68$	低分化 $n = 46$	中分化 $n = 28$	高分化 $n = 30$	有转移 $n = 51$	无转移 $n = 47$
4.1B	–	11	0	15	6	2	16	6
	+	9	0	10	1	4	7	7
	++	37	14	15	13	22	21	25
	+++	11	54[b]	6	8	2[a]	7	9[a]
4.1R	–	19	5	16	8	6	16	13
	+	8	6	6	3	3	8	4
	++	34	27	21	16	18	24	26
	+++	7	30[b]	3	1	3	3	4
4.1G	–	11	3	13	5	2	10	6
	+	12	3	9	5	3	9	7
	++	34	27	22	13	16	26	30
	+++	11	35[b]	2	5	9[b]	6	4
4.1N	–	15	4	19	4	3	20	4
	+	9	2	11	1	4	7	9
	++	38	20	15	19	19	21	29
	+++	6	42[b]	1	4	4[b]	3	5[b]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$.

的发生、发展过程与E-cadherin和CD44等黏附分子密切相关[13-14]. Charboneau *et al*[15]发现, 将4.1B/DAL-1蛋白基因导入缺失4.1B/DAL-1蛋白的乳腺癌细胞系后, 其生长受到抑制, 且细胞与细胞之间的粘连性增强, 表明4.1B/DAL-1蛋白基因可能起到抑癌基因的作用. 作为细胞膜蛋白与细胞骨架之间的连接子, 4.1B蛋白能够与E-cadherin和CD44等多个隶属于不同家族的黏附分子结合[16-17], 和细胞转移[18]存在相关性. 4.1蛋白家族的另一成员, 4.1R蛋白能够和NuMA(核有丝分裂器)相互作用, 参与细胞的有丝分裂[19], 同时还参与调节细胞的mRNA翻译, 是联系翻译装置和细胞骨架的桥梁分子[20]. 这些研究均证明4.1R参与对细胞增殖分裂的调节. 已有研究表明, 4.1R蛋白和脑膜瘤的发生发展密切相关[21], 推测4.1R蛋白在脑膜瘤中起到肿瘤抑制因子的作用.

4.1G蛋白是第1个被发现的可与亲免素家族成员FKBP13结合的有生理活性的蛋白质[22], 而亲免素家族[23]是一个高度同源的伴侣分子蛋白家族, FKBP13就参与内质网蛋白的分泌[24]提示4.1G可能起到分子伴侣的作用, 催化蛋白质在内质网进行折叠、聚集和分泌, 对蛋白质的功能起到调节作用. 而其是否能通过影响其他调节胃癌发生、发展过程的蛋白质的功能而参与胃癌的进展尚需要进一步研究. 4.1N与4.1R的结构较为类似. Ye *et al*[25]研究发现, 4.1N的CTD结构域可与NuMA(核有丝分裂器)[26]结合, 抑制4.1N的入核可阻止NGF介导的细胞分裂停滞, 而4.1N的过量表达, 则可逆转该过程. 因此推测, 4.1N可通过拮抗NuMA在有丝分裂中的作用来介导NGF的抗增殖作用, 而4.1N这种参与有丝分裂的功能在我们的研究中也有所体现. 迄今为止, 对4.1G和4.1N蛋白在肿瘤发病过程中所起作用的研究鲜有报道. 考虑到4.1蛋白家族成员间的分子结构[27]具有很高的同源性, 推测他们在功能上可能也具有相似性. 本研究对4.1蛋白家族不同成员在胃癌组织中表达情况及其与胃癌发病机制的相关性进行了深入的研究并证实了这种推断.

本研究的结果表明, 4.1蛋白家族的成员4.1B, 4.1R, 4.1G和4.1N的阳性表达程度在癌和癌旁对照组织中都存在明显的差异, 4.1蛋白家族成员的表达程度在胃癌组织中明显降低甚至消失, 提示4.1蛋白与胃癌的发生、发展密切相关. 4.1B、4.1G和4.1N蛋白的表达程度均随着肿瘤分化程度的降低而降低, 提示这3个蛋白可能参与胃黏膜上皮分化的调节过程. 伴有淋巴结转移的病例中, 4.1B和4.1N的阳性表达程度明显低于无淋巴结转移的病例, 提示4.1B和4.1N可能参与胃癌的淋巴结转移过程. 4.1蛋白作为重要的膜骨架成分[28], 可能在细胞黏附因子和细胞



■应用要点
本文用Envision$^+$免疫组织化学的方法来检测4.1蛋白家族成员在胃癌中的表达情况, 并探讨4.1蛋白家族成员的表达与胃癌发生、发展的关系, 以期为胃癌诊断、治疗和判断预后提供依据.

图 1 胃癌, 癌旁组织中4.1蛋白的表达(Envision$^+$, ×400). A: 4.1B在癌旁组织中的免疫染色; B: 4.1B在癌组织中的免疫染色; C: 4.1R在癌旁组织中的免疫染色; D: 4.1R在癌组织中的免疫染色; E: 4.1G在癌旁组织中的免疫染色; F: 4.1G在癌组织中的免疫染色; G: 4.1N在癌旁组织中的免疫染色; H: 4.1N在癌组织中的免疫染色.

内信息传导中[29]处于“信号中转站”的关键性作用, 并因此在肿瘤的发生、发展的过程中起到重要作用. 本研究关于4.1蛋白与胃癌发病相关性研究的结果证实了这种推断. 值得注意的是, 4.1R蛋白的表达虽然在癌和癌旁组织中有明显差异, 但未发现其与癌组织的分化、转移和浸润有任何关系, 可认为4.1R的表达降低乃至缺失是胃癌发生的早期事件[30]. 研究表明, 4.1R可以和NuMA相互作用而参与细胞的有丝分裂, 而4.1R蛋白具体是通过何种途径参与胃癌的发生、发展过程, 仍需要进一步研究.

总之, 本研究表明, 4.1蛋白家族成员在胃癌的发生、发展的过程中起到重要作用, 可以作为衡量胃癌分化、预后的指标, 但还需要做进一步的工作以阐明其作用的机制. 而进一步阐明4.1蛋白在胃癌浸润、转移过程中的作用机制

■同行评价
本文具有较强的创新性，研究内容比较具体完整，设计合理，结果详实，对胃癌的研究具有一定的理论指导意义.

也将为胃癌发病机制的研究提供新的依据并且有可能为胃癌的治疗提供一个新的靶点.

4 参考文献

1 Diakowski W, Grzybek M, Sikorski AF. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 231-248

2 Conboy J, Marchesi S, Kim R, Agre P, Kan YW, Mohandas N. Molecular analysis of insertion/deletion mutations in protein 4.1 in elliptocytosis. II. Determination of molecular genetic origins of rearrangements. *J Clin Invest* 1990; 86: 524-530

3 Calinisan V, Gravem D, Chen RP, Brittin S, Mohandas N, Lecomte MC, Gascard P. New insights into potential functions for the protein 4.1 superfamily of proteins in kidney epithelium. *Front Biosci* 2006; 11: 1646-1666

4 Hoover KB, Bryant PJ. The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 229-234

5 Robb VA, Li W, Gascard P, Perry A, Mohandas N, Gutmann DH. Identification of a third Protein 4.1 tumor suppressor, Protein 4.1R, in meningioma pathogenesis. *Neurobiol Dis* 2003; 13: 191-202

6 Rajaram V, Gutmann DH, Prasad SK, Mansur DB, Perry A. Alterations of protein 4.1 family members in ependymomas: a study of 84 cases. *Mod Pathol* 2005; 18: 991-997

7 Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Maruyama T, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y. Promoter methylation of DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2954-2961

8 Kittiniyom K, Mastronardi M, Roemer M, Wells WA, Greenberg ER, Titus-Ernstoff L, Newsham IF. Allele-specific loss of heterozygosity at the DAL-1/4.1B (EPB41L3) tumor-suppressor gene locus in the absence of mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 40: 190-203

9 Wong SY, Haack H, Kissil JL, Barry M, Bronson RT, Shen SS, Whittaker CA, Crowley D, Hynes RO. Protein 4.1B suppresses prostate cancer progression and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 12784-12789

10 Roskams T. The role of immunohistochemistry in diagnosis. *Clin Liver Dis* 2002; 6: 571-589

11 Anderson C, Nijagal A, Kim J. Molecular markers for gastric adenocarcinoma: an update. *Mol Diagn Ther* 2006; 10: 345-52

12 Sarbia M, Becker KF, Hofler H. Pathology of upper gastrointestinal malignancies. *Semin Oncol* 2004; 31: 465-475

13 Chan AO, Lam SK, Chu KM, Lam CM, Kwok E, Leung SY, Yuen ST, Law SY, Hui WM, Lai KC, Wong CY, Hu HC, Lai CL, Wong J. Soluble E-cadherin is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. *Gut* 2001; 48: 808-811

14 Harn HJ, Ho LI, Shyu RY, Yuan JS, Lin FG, Young TH, Liu CA, Tang HS, Lee WH. Soluble CD44 isoforms in serum as potential markers of metastatic gastric carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 1996; 22: 107-110

15 Charboneau AL, Singh V, Yu T, Newsham IF. Suppression of growth and increased cellular attachment after expression of DAL-1 in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer* 2002; 100: 181-188

16 Nunomura W, Takakuwa Y, Tokimitsu R, Krauss SW, Kawashima M, Mohandas N. Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca2+ and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction. *J Biol Chem* 1997; 272: 30322-30338

17 Hiscox S, Jiang WG. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. *J Cell Sci* 1999; 112 Pt 18: 3081-3090

18 Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T, Fukuhara H, Maruyama T, Shibuya M, Murakami Y. Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 5129-5133

19 Huang SC, Liu ES, Chan SH, Munagala ID, Cho HT, Jagadeeswaran R, Benz EJ Jr. Mitotic regulation of protein 4.1R involves phosphorylation by cdc2 kinase. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 117-127

20 Mattagajasingh SN, Huang SC, Hartenstein JS, Snyder M, Marchesi VT, Benz EJ. A nonerythroid isoform of protein 4.1R interacts with the nuclear mitotic apparatus (NuMA) protein. *J Cell Biol* 1999; 145: 29-43

21 Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G. Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol* 2004; 70: 183-202

22 Walensky LD, Gascard P, Fields ME, Blackshaw S, Conboy JG, Mohandas N, Snyder SH. The 13-kD FK506 binding protein, FKBP13, interacts with a novel homologue of the erythrocyte membrane cytoskeletal protein 4.1. *J Cell Biol* 1998; 141: 143-153

23 Chelu MG, Danila CI, Gilman CP, Hamilton SL. Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 227-234

24 Neye H, Verspohl EJ. The FK506 binding protein 13 kDa (FKBP13) interacts with the C-chain of complement C1q. *BMC Pharmacol* 2004; 4: 19

25 Ye K, Compton DA, Lai MM, Walensky LD, Snyder SH. Protein 4.1N binding to nuclear mitotic apparatus protein in PC12 cells mediates the antiproliferative actions of nerve growth factor. *J Neurosci* 1999; 19: 10747-10756

26 Zeng C. NuMA: a nuclear protein involved in mitotic centrosome function. *Microsc Res Tech* 2000; 49: 467-477

27 Ramez M, Blot-Chabaud M, Cluzeaud F, Chanan S, Patterson M, Walensky LD, Marfatia S, Baines AJ, Chasis JA, Conboy JG, Mohandas N, Gascard P. Distinct distribution of specific members of protein 4.1 gene family in the mouse nephron. *Kidney Int* 2003; 63: 1321-1337

28 Shi ZT, Afzal V, Coller B, Patel D, Chasis JA, Parra M, Lee G, Paszty C, Stevens M, Walensky L, Peters LL, Mohandas N, Rubin E, Conboy JG. Protein 4.1R-deficient mice are viable but have erythroid membrane skeleton abnormalities. *J Clin Invest* 1999; 103: 331-340

29 Ohno N, Terada N, Yamakawa H, Komada M, Ohara O, Trapp BD, Ohno S. Expression of protein 4.1G in Schwann cells of the peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 2006; 84: 568-577

30 Gutmann DH, Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, Rempel SA, Gutierrez JA, Newsham IF. Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1495-1500

编辑 何燕 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3413-3417
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

肝细胞癌中金属硫蛋白表达下调及其临床病理学意义

张树辉, 徐爱民

张树辉, 上海中医药大学附属岳阳医院病理科 上海市 200437
徐爱民, 第二军医大学东方肝胆外科医院 上海市 200438
张树辉, 博士后, 副主任医师, 副教授, 主要从事肝脏肿瘤临床病理诊断和分子病理学研究.
上海市教育委员会研究基金资助项目, No. 06CZ016
通讯作者: 张树辉, 200437, 上海市甘河路110号, 上海中医药大学附属岳阳医院病理科. zhangshuhui100@sohu.com
电话: 021－65161782－2604
收稿日期: 2007-08-19 修回日期: 2007-10-29

Down-regulated expression of metallothionein and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma

Shu-Hui Zhang, Ai-Min Xu

Shu-Hui Zhang, Department of Pathology, Yueyang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China
Ai-Min Xu, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
Supported by: the Research Foundation from Shanghai Municipal Education Commission, No. 06CZ016
Correspondence to: Shu-Hui Zhang, Department of Pathology, Yueyang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 110 Ganhe Road, Shanghai 200437, China. zhangshuhui100@sohu.com
Received: 2007-08-19 Revised: 2007-10-29

Abstract

AIM: To investigate the expression and localization of metallothionein (MT) and their association with clinicopathological characteristics in hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Four hundred histological specimens of HCC with corresponding non-cancerous liver tissues were immunohistochemically stained for MT (E9), P53 and Ki-67 by EnVision Plus staining using tissue microarrays.

RESULTS: Down-regulated expression of MT protein was detected in HCC, compared with non-cancerous liver tissues. The frequency of MT positivity was significantly lower in cases positive for hepatitis B surface antigen than in those that were negative (P = 0.042). The positive rate of MT expression was higher in tumors ≤ 2 cm than > 2 cm in diameter (P = 0.007). There was a tendency for MT expression to decrease with the progression of histological grade (P = 0.004). Nuclear expression of MT was closely correlated with poorly differentiated HCC. No statistical correlation was found between P53, Ki-67 and MT expressions.

CONCLUSION: Down-regulated expression of MT in HCC may play a role in hepatocarcinogenesis and be a marker of hepatocellular differentiation. Hepatitis B virus infection may be correlated with down-regulated expression of MT. The mainly nuclear MT immunostaining may reflect aggressive behavior in poorly differentiated HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Metallothionein; Immunohistochemistry; Tissue microarray

Zhang SH, Xu AM. Down-regulated expression of metallothionein and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3413-3417

摘要

目的: 研究MT在肝细胞癌(HCC)中的表达和定位及其与临床病理特征.

方法: 对400例外科切除的HCC及相应非癌肝组织标本构建组织芯片, 用EnVision Plus法进行MT, P53和Ki-67免疫组织化学染色.

结果: 与相应的非癌肝组织相比, HCC组织MT的表达显著下调, HBsAg阳性患者MT阳性率显著低于阴性者(P = 0.042), 肿瘤直径≤2 cm的MT阳性率显著高于肿瘤直径>2 cm者(P = 0.007). 随着组织学分级进程, MT表达呈降低趋势(P = 0.004), MT核内表达与低分化HCC密切相关. MT与P53及Ki-67的表达无统计学相关性.

结论: HCC中MT表达下调在肝癌的发生过程中有一定作用, 可能是肝细胞分化的一个标志物, HBsAg与MT表达下调有关, 以核染色为主的MT表达可能反映了低分化HCC的一种侵袭性行为.

■背景资料
金属硫蛋白(MT)是一组富含半胱氨酸的低分子量胞内蛋白质, 在人体多种肿瘤如乳腺、肺、肾、鼻咽、卵巢、唾液腺、睾丸、甲状腺及膀胱癌等表达增加, 但在肝细胞癌(HCC)、前列腺癌和大肠癌等表达下调.

■相关报道
cDNA微阵列基因表达谱研究显示HCC组织中MT-1X和MT-2A表达显著下调

关键词: 肝细胞癌; 金属硫蛋白; 免疫组织化学; 组织芯片

张树辉, 徐爱民. 肝细胞癌中金属硫蛋白表达下调及其临床病理学意义. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3413–3417
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3413.asp

0 引言

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一组富含半胱氨酸的低分子量胞内蛋白质, 其编码的基因家族位于16q13, 由10个功能亚型(MT-1A、MT-1B、MT-1E、MT-1F、MT-1G、MT-1H、MT-1X、MT-2A、MT-3、MT-4)和7个非功能亚型(MT-1C、MT-1D、MT-1I、MT-1J、MT-1K、MT-1L、MT-2B)组成. 一系列的证据表明MT参与许多病理过程, 包括金属离子稳态和解毒、保护氧化损伤、细胞增殖和凋亡、药物和放射治疗耐受和致癌的某些过程[1-2]. 多项研究显示MT表达与人类多种肿瘤发生和发展的不同阶段密切相关, 在人体多种肿瘤如乳腺、肺、肾、鼻咽、卵巢、唾液腺、睾丸、甲状腺及膀胱癌等表达增加, 但在某些肿瘤如肝细胞癌(HCC), 前列腺癌和大肠癌表达下调[1-2]. 由于以往对HCC中MT表达研究的病例较少, 因此其在HCC中意义仍不明了[3-5]. 王葵 *et al*[6]对HCC的cDNA微阵列基因表达谱研究显示, 与相应的非癌肝组织相比, HCC组织中MT-2A表达显著下调. 为了评价在HCC中MT作为肿瘤标记物的潜在价值, 我们用组织芯片技术, 对肝癌组织和非癌肝组织中MT表达和定位进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 400例肝癌切除标本来自第二军医大学东方肝胆外科医院, 所有患者术前未接受任何治疗. 男286例, 女114例, 年龄27-78(中位数为50.7)岁, 305例患者血清HBsAg阳性, 261例患者血清甲胎蛋白(AFP)>20 μg/L, 肿瘤平均直径6.8(1.0-17.5) cm, 57例为直径≤2 cm的单结节肿瘤, 343例肝癌>2 cm. 组织病理诊断根据2000年WHO肝及肝内胆管肿瘤病理学分类, 高分化95例、中分化236例、低分化69例. 321例肿瘤无包膜或包膜不完整, 274例有肝内转移(门静脉浸润和/或肝内扩散), 275例伴有肝硬化, 89例慢性肝炎和36例正常肝组织.

1.2 方法

1.2.1 组织芯片制备: 首先在苏木精-伊红(HE)染色切片上进行定位. 选取癌及癌旁组织位点, 应用Instrumedics公司生产的组织芯片制作仪, 取样针直径2 mm, 共制作10个组织芯片蜡块, 以4 μm厚度连续切片, 敷贴于10 g/L多聚赖氨酸处理的载玻片上, 各取1张进行HE染色供形态学观察.

1.2.2 免疫组化染色: 免疫组化采用Dako EnVision Plus法, 鼠抗人MT mAb(E9克隆系, 与MT-1及MT-2反应, Dako, 1∶100)、鼠抗人P53 mAb(DO-7, Dako, 1∶50)、鼠抗人Ki-67核抗原mAb(MIB-1, Dako, 1∶500)均购于基因公司. 抗原修复用0.02 mol/L(pH8.0)乙二铵四乙酸钠液微波处理10 min, 共2次, 用已知的阳性切片作阳性对照, PBS液代替一抗作阴性对照. 染色切片由两名事先未了解患者临床资料的病理医师按以往介绍的方法独立评估[3]. MT阳性细胞包括胞质、胞核或胞质和胞核三种表达模式, 无染色为阴性, <10%为低表达, ≥10%为高表达. P53和Ki-67阳性细胞仅胞核出现棕黄色颗粒, Ki-67标记指数为阳性细胞百分数, P53染色超过10%视为阳性.

统计学处理 所有统计学处理采用SPSS11.0软件. MT表达与HCC临床病理特征关系分析采用χ^2检验, MT与Ki-67和P53的相关性分析采用Spearman检验, $P<0.05$视为差异有显著性.

2 结果

2.1 肝细胞癌MT表达与临床病理特征的关系 所有阴性对照切片均无MT阳性着色, 表明本实验所用小鼠抗人MT mAb(E9)的特异性. 图1A显示一个肿瘤及相应的非癌肝组织MT表达组织芯片. 在正常肝、肝炎和肝硬化组织的肝细胞中MT呈一致强阳性表达(图1B), 肝硬化组织中透明细胞的胞质和胞核呈弱阳性(图1C), 周围结缔组织、血管和胆管无MT阳性着色.

与相应的非癌肝组织相比, HCC中MT表达显著下调. HCC组织MT呈异质性表达, 弥漫阳性57例(14.3%)、灶性阳性203例(50.8%)和阴性140例(35%). 高、中分化HCC中MT表达以胞质染色为主, 而胞核呈弱阳性或阴性(图1D-E). 低分化HCC中MT染色以胞核为主, 而胞质呈弱阳性或阴性(图1F). 低分化HCC胞核MT染色的频率显著高于高、中分化者(16/36 *vs* 59/224, P = 0.026).

肝细胞癌MT、P53和Ki-67表达与临床病理特征的相关性HBsAg阳性患者MT阳性率显著低于阴性者(P = 0.042), 肿瘤直径≤2 cm的MT阳

■创新盘点
HCC组织MT的表达显著下调与肿瘤大小和组织学分级进程密切相关, HBsAg可能与MT表达下调有关, 以核染色为主的MT表达可能反映了低分化HCC的一种侵袭性行为.

表 1 肝细胞癌金属硫蛋白、P53和Ki67表达与临床病理学的关系

参数	*n*	金属硫蛋白			P53			Ki67		
		–	+(低, 高)	*P*	–(<10%)	+(≥10%)	*P*	<50%	≥50%	*P*
性别										
男	286	97	189(156, 33)	0.472	164	122	0.826	127	159	0.167
女	114	43	71(47, 24)		64	50		42	72	
年龄										
≤中位数	184	62	122(94, 28)	0.614	103	81	0.703	80	104	0.646
>中位数	216	78	138(109, 29)		125	91		89	127	
血清AFP水平(μg/L)										
<20	137	56	81(61, 20)	0.075	72	65	0.195	62	75	0.380
≥20	263	84	179(142, 37)		156	107		107	156	
血清HBsAg										
阳性	305	115	190(171, 19)	0.042	179	126	0.222	130	175	0.787
阴性	95	25	70(32, 38)		49	46		39	56	
肿瘤直径										
≤2 cm	57	11	46(30, 16)	0.007	40	17	0.030	22	35	0.546
>2 cm	343	129	214(173, 41)		188	155		147	196	
组织学分级										
高分化	95	22	73(41, 32)	0.004	68	27	0.002	56	39	<0.001
中分化	236	85	151(134, 17)		129	107		93	143	
低分化	69	33	36(28, 8)		31	38		20	49	
肝硬化										
无	125	44	81(59, 22)	0.955	70	55	0.785	55	70	0.633
有	275	96	179(144, 35)		158	117		114	161	
肿瘤包膜										
完整	79	21	58(38, 20)	0.08	49	30	0.338	36	43	0.505
无或不完整	321	119	202(165, 37)		180	141		133	188	
肝内转移										
未发现	126	35	91(65, 26)	0.125	81	45	0.046	57	69	0.412
发现	274	105	169(138, 31)		147	127		112	162	
P53										
+	172	53	119(91, 28)	0.127	–	–		79	93	0.196
–	228	87	141(112, 29)		–	–		90	138	
Ki67										
≤50%	169	58	111(88, 23)	0.807	90	79	0.196	–	–	
>50%	231	82	149(115, 34)		138	93		–	–	
合计	400	140	260(203, 57)		228	172		169	231	

性率显著高于肿瘤直径>2 cm者(P = 0.007), MT阳性率与组织学分级进程显著相关 (P = 0.004), MT表达与患者年龄、血清甲胎蛋白浓度、肝硬化、包膜及肝内转移无显著差异(表1).

2.2 MT表达与P53的关系 肝细胞癌P53表达的阳性率为43%(172/400), 肿瘤直径≤2 cm的P53阳性率显著低于肿瘤直径>2 cm者(P = 0.030), P53阳性率与组织学分级进程显著相关(P = 0.002), 肝内转移者P53阳性率明显高于无明显肝内转移者 (P = 0.046), P53和MT染色之间无统计学相关性.

2.3 MT表达与Ki-67的关系 肝细胞癌高Ki-67标记指数(≥50%)为57.8%(231/400), 高Ki-67标记指数与HCC的组织学分化进程显著相关(P<0.001), Ki-67和MT染色之间无统计学相关性.

3 讨论

研究表明, MT可参与细胞增殖、发育、肿瘤发生和细胞周期调节. 在正常肝组织中MT含量丰富, 是肝脏参与金属解毒功能的物质基础. MT是细胞内一种重要的自由基清除剂, 在灭活体内自由基等过氧化物方面起重要作用, 因其

■应用要点
HCC中MT表达下调在肝癌的发生过程中可以起一定作用, 可能是HCC一个潜在的诊断、预后及化疗标记.

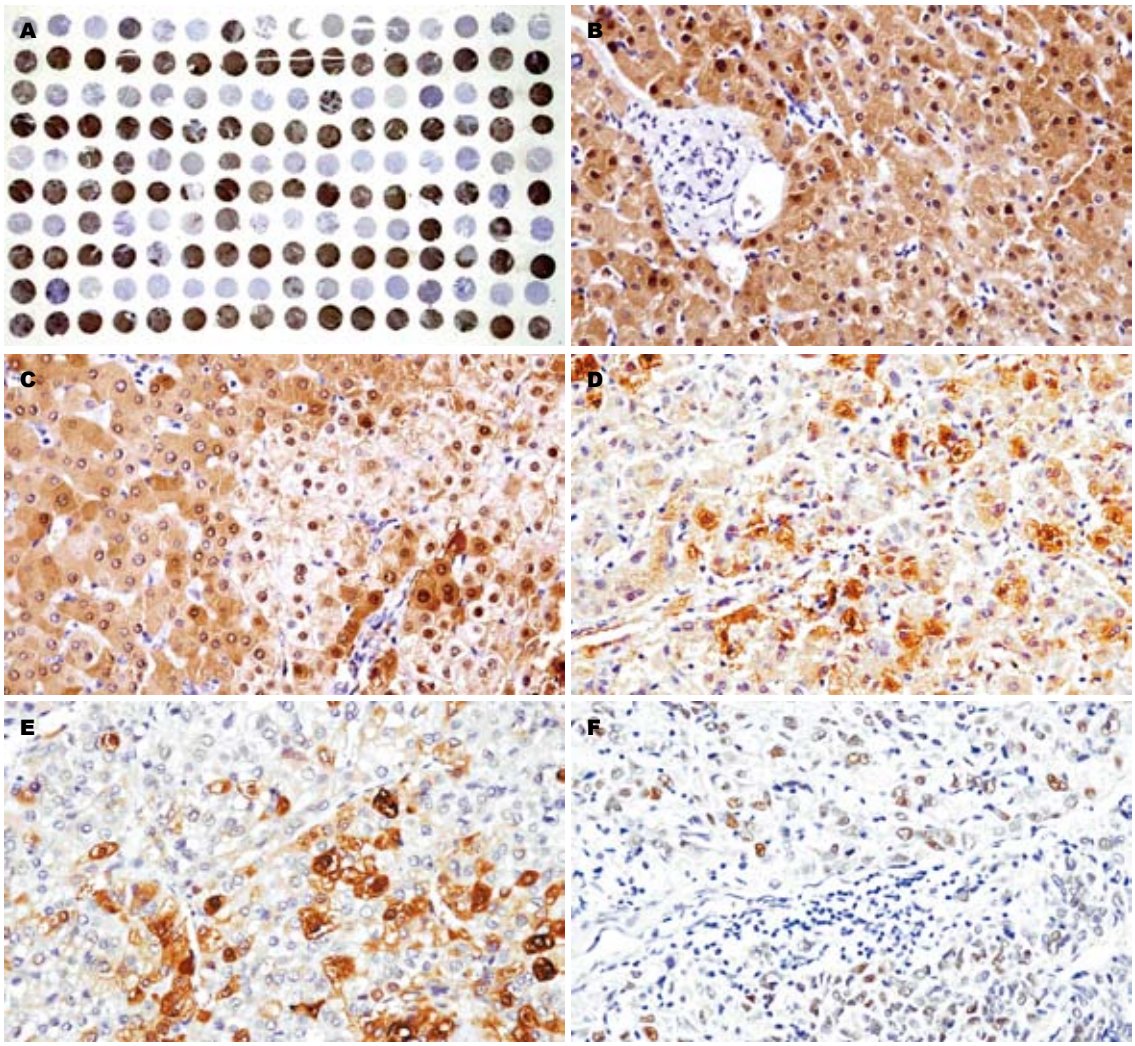


图 1 肝细胞癌及其癌周组织金属硫蛋白表达情况. A: 金属硫蛋白表达组织芯片; B: 肿瘤周肝组织弥漫阳性; C: 肝硬化组织透明变性, 肝细胞胞质和胞核呈弱阳性; D: 高分化肝细胞癌弥漫阳性; E: 中分化肝细胞癌局灶阳性; F: 低分化肝细胞癌阳性细胞主要位于核内.

分子上含有丰富的巯基(SH), 起重要的细胞保护功能. 而哺乳动物细胞内基因突变最重要的原因是内源性氧化损伤, MT表达的下降将导致细胞内氧化物的堆积, 从而引起某些原癌基因的激活或抑癌基因的失活而引发肝细胞癌变[1-2]. 本研究结果显示, 与相应的非癌肝组织相比, HCC中MT表达显著下调, 且与HBsAg、肿瘤大小和肿瘤分化明显相关. 这一结果表明, MT表达下降可能在致癌过程中发挥作用, 并可能是一个相对早期事件和肝细胞分化的标记.

我们的研究结果显示, HBV感染与MT表达下调相关, 其机制尚不清楚. 有文献报道MT能与HBV的多种抗原成分结合, 在致肝细胞损伤过程中可能起重要作用[7]. 因此我们推测, HBV感染后与肝脏内MT结合, 导致肝细胞内MT表达和功能降低, 最终导致HCC的发生, 但确切的机制需要进一步研究.

MT是一种胞质蛋白. 最近的研究表明, 他存在于正常和恶性肿瘤细胞的胞质和胞核内, 且核内表达似乎与对顺铂的耐药有关[8-9]. 我们的结果显示, 在高、中分化HCC中MT阳性细胞位于胞质和胞核, 而低分化HCC则以胞核为主, 提示其可能与其侵袭性行为有关, 但是否与HCC对化疗效果差和预后不良有关, 尚需进一步加以研究. 此外, 研究显示乳腺和鼻咽癌MT表达与细胞增殖活性相关[10-11]. 我们的研究结果显示高Ki-67指数与肿瘤分级进程显著相关, 但与MT表达无明显相关性.

肝细胞癌中MT下调的机制尚不清楚, 可能与MT启动子甲基化或其他基因如P53的突变有关[12-13]. 体外研究显示, P53和雌激素受体影响上皮性肿瘤细胞MT的表达和诱导, 提示MT与P53

之间的功能关系[14]. MT和P53阳性的食管鳞状细胞癌对化疗的反应较差, 提示联合MT和P53检测可能有助于寻找治疗中晚期食管鳞状细胞癌术前化疗药物[15]. 我们的研究结果也证实P53表达与较大肿瘤和组织学分级进程密切相关, 支持P53基因突变是HCC一个相对晚期事件, 但MT与P53表达之间无相关性. 因此, MT的生物学功能以及表达下调作为HCC一个潜在的诊断、预后及化疗标记仍需进一步加以研究.

4 参考文献

1 Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology* 2004; 45: 103-118

2 Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* 2003; 533: 201-209

3 Deng DX, Chakrabarti S, Waalkes MP, Cherian MG. Metallothionein and apoptosis in primary human hepatocellular carcinoma and metastatic adenocarcinoma. *Histopathology* 1998; 32: 340-347

4 Cai L, Wang GJ, Xu ZL, Deng DX, Chakrabarti S, Cherian MG. Metallothionein and apoptosis in primary human hepatocellular carcinoma (HCC) from northern China. *Anticancer Res* 1998; 18: 4667-4672

5 Ebara M, Fukuda H, Hatano R, Saisho H, Nagato Y, Suzuki K, Nakajima K, Yukawa M, Kondo F, Nakayama A, Sakurai H. Relationship between copper, zinc and metallothionein in hepatocellular carcinoma and its surrounding liver parenchyma. *J Hepatol* 2000; 33: 415-422

6 王葵, 沈锋, 丛文铭, 施乐华, 吴孟超. 肝癌伴门静脉癌栓的基因表达研究. 癌症进展杂志 2005; 3: 417-422

7 Lu YY, Liang YD, Cheng J, Chen TY, Wang L, Liu Y, Li K, Zhang LX, Yang YP. Mutual interaction between hepatitis B virus antigen and metallothionein. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004; 12: 540-542

8 Kondo Y, Kuo SM, Watkins SC, Lazo JS. Metallothionein localization and cisplatin resistance in human hormone-independent prostatic tumor cell lines. *Cancer Res* 1995; 55: 474-477

9 Kondo Y, Yamagata K, Satoh M, Himeno S, Imura N, Nishimura T. Optimal administration schedule of cisplatin for bladder tumor with minimal induction of metallothionein. *J Urol* 2003; 170: 2467-2470

10 Pastuszewski W, Dziegiel P, Krecicki T, Podhorska-Okolow M, Ciesielska U, Gorzynska E, Zabel M. Prognostic significance of metallothionein, p53 protein and Ki-67 antigen expression in laryngeal cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 335-342

11 Jin R, Chow VT, Tan PH, Dheen ST, Duan W, Bay BH. Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis* 2002; 23: 81-86

12 Deng D, El-Rifai W, Ji J, Zhu B, Trampont P, Li J, Smith MF, Powel SM. Hypermethylation of metallothionein-3 CpG island in gastric carcinoma. *Carcinogenesis* 2003; 24: 25-29

13 Ostrakhovitch EA, Olsson PE, Jiang S, Cherian MG. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS Lett* 2006; 580: 1235-1238

14 Ostrakhovitch EA, Olsson PE, von Hofsten J, Cherian MG. P53 mediated regulation of metallothionein transcription in breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2007

15 Sunada F, Itabashi M, Ohkura H, Okumura T. p53 negativity, CDC25B positivity, and metallothionein negativity are predictors of a response of esophageal squamous cell carcinoma to chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5696-5700

■同行评价
本文所用方法成熟, 设计合理, 临床标本量大, 有一定的学术价值.

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3418-3422
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

重症急性胰腺炎并发感染的菌谱和耐药性

何馥倩, 黄宗文, 郭 佳, 樊景云, 陈 燕, 李永红, 刘义刚

■背景资料
重症急性胰腺炎是临床常见的急腹症, 临床表现复杂, 并发症多, 死亡率高. 80% SAP死亡患者与并发感染有关. 目前, SAP的治疗虽基本有章可循, 国内外学者也就SAP并发感染的防治做了大量研究, 但效果不甚满意.

何馥倩, 黄宗文, 郭佳, 樊景云, 陈燕, 四川大学华西医院中西医结合科 四川省成都市 610041
李永红, 四川大学华西基础与法医学院生物医学工程 四川省成都市 610041
刘义刚, 四川大学华西医院实验医学科 四川省成都市 610041
何馥倩, 四川大学硕士研究生, 主要从事急性胰腺炎及急腹症的研究.
通讯作者: 黄宗文, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院中西医结合科. huangzongwen@medmail.com.cn
电话: 028-81812725
收稿日期: 2007-05-15 修回日期: 2007-10-16

Spectrum and susceptibility of bacterial isolates from complicated infections among patients with severe acute pancreatitis

Fu-Qian He, Zong-Wen Huang, Jia Guo, Jing-Yun Fan, Yan Chen, Yong-Hong Li, Yi-Gang Liu

Fu-Qian He, Zong-Wen Huang, Jia Guo, Jing-Yun Fan, Yan Chen, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Yong-Hong Li, Department of Biomedical Engineering, School of West China Basic Medicine and Forensics, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Yi-Gang Liu, Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Zong-Wen Huang, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, 37 Guoxue Lane, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. huangzongwen@medmail.com.cn
Received: 2007-05-15 Revised: 2007-10-16

Abstract

AIM: To investigate the spectrum of complicated infections among patients with severe acute pancreatitis in West China Hospital, and analyze the antimicrobial susceptibility of common pathogens, to assist in choosing the right antibiotics both for prophylaxis against infection and for treating established infections.

METHODS: One hundred and seventy-two pathogens were isolated from a total of 56 patients with acute pancreatitis in West China Hospital during the period between January 2004 and December 2006 (mean age 52 years; 39 males and 17 females). Detailed investigations were carried out to identify infections and antibiotic sensitivity in patients with suspected infection. These investigations included cultures of blood, urine, bile, stool, fluid drained from the abdominal cavity, indwelling cannulae and catheter tips. Pancreatic tissue and pus were obtained by needle aspiration guided by CT or ultrasound during operation. Susceptibility of pathogens was assayed with MicroScan WalkAway 40 Blood Culture Analyzer (Dade, USA). Extended-spectrum of beta-lactamases (ESBLs) was first detected by MicroScan WalkAway 40, and then confirmed by disk diffusion method tests.

RESULTS: The main infected sites were the pancreas and respiratory and abdominal cavities, as well as the blood. Acinetobacter baumannii, Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa accounted for 19.19%, 15.70%, 9.30% and 8.72%, respectively. Gram-negative bacilli made up the majority of strains (61.05%), and had resistance to several antibiotics. 93.75% of S. aureus were methicillin-resistant strains, and sensitive to vancomycin and trimethoprim–sulfamethoxazole.

CONCLUSION: Pathogens of complicated infections among patients with severe acute pancreatitis are mostly Gram-negative bacilli with high-level and multi-drug resistance. A microbiological survey is important for guiding clinical therapy.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Complicated infections; Antibiotic resistance

He FQ, Huang ZW, Guo J, Fan JY, Chen Y, Li YH, Liu YG. Spectrum and susceptibility of bacterial isolates from complicated infections among patients with severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3418-3422

摘要

目的: 分析我院重症急性胰腺炎患者感染菌

谱及药敏情况以便更加合理的应用抗生素.

方法: 从我院2004-01/2006-12住院治疗的56例SAP感染患者中分离出172株病原菌.标本包括痰液、血液、尿液、中心静脉导管、胆汁、大便、腹腔穿刺液或引流液及CT或B超下细针穿刺取得的胰周脓液和术中取下的胰腺坏死组织及脓液. 菌株鉴定和药敏试验检测采用革兰阴性菌的NC21或革兰阳性菌的PC12测试板.

结果: 感染部位主要是呼吸系统、胰腺及腹腔、血液. 分离数居前4位的病原菌是鲍曼不动杆菌(19.19%)、大肠埃希菌(15.70%)、金黄色葡萄球菌(9.30%)、铜绿假单胞菌(8.72%). 革兰阴性菌在病原菌中占优势(61.05%), 且对多种抗生素有不同程度耐药, 对亚胺培南相对敏感. 93.75%金葡菌为耐甲氧西林菌株，仅对万古霉素和复方新诺明敏感度高.

结论: 重症急性胰腺炎感染以革兰阴性菌为优势菌株, 具有高度耐药和多重耐药的特点.

关键词: 重症急性胰腺炎; 并发感染; 耐药

何馥倩, 黄宗文, 郭佳, 樊景云, 陈燕, 李永红, 刘义刚. 重症急性胰腺炎并发感染的菌谱和耐药性. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3418–3422

http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3418.asp

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床常见的急腹症, 临床表现复杂, 并发症多, 死亡率高. 80% SAP死亡患者与感染有关[1]. 目前, SAP的治疗虽基本有章可循, 国内外学者也就SAP并发感染做了大量研究, 但效果仍不甚满意. 发现近年来国内缺乏对SAP并发感染的菌谱及耐药情况的报道. 为给临床抗感染治疗提供有益信息及减少抗生素不合理应用带来的不良后果, 我们对2004-01/2006-12我院住院的SAP并发感染患者进行了病原菌培养, 对分离出的病原菌进行统计和分析耐药情况, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 从2004-01/2006-12我院住院治疗的56例SAP感染患者中分离出172株病原菌. 这56例病例满足如下条件: (1)患者SAP和感染的诊断均符合中华医学会外科学会胰腺外科学组制定的《重症急性胰腺炎诊治草案》[2]. (2)入院时未出现感染临床表现. 男39例, 女17例, 中位年龄52(24-80)岁. 同一患者, 分离的病原菌来自1个部位的为26例(46.4%), 2个部位的为16例(28.6%), 3个及以上的为14例(25.0%). 标本包括痰液(85/172, 49.41%)、血液(25/172, 14.54%)、尿液(2/172, 1.16%)、中心静脉导管液(9/172, 5.23%)、胆汁(8/172, 4.65%)、大便(5/172, 2.91%)、腹腔穿刺液或引流液及CT或B超下细针穿刺取得的胰周脓液和术中取下的胰腺坏死组织及脓液(38/172, 22.09%). 质控菌株为大肠埃希菌ATCC 25 922, 肺炎克雷伯菌ATCC 700603, 铜绿假单胞菌ATCC 27 853, 金黄色葡萄球菌ATCC 25 923. MicroScan WalkAway-40全自动微生物鉴定和药敏系统及配套Negative Combo Panel Type21(NC21测试板)和Positive Combo Panel Type12(PC12测试板)为美国DADE公司产品.

1.2 方法 将疑似SAP感染患者的相关标本送检. 菌株鉴定和药敏试验检测采用革兰阴性菌的NC21或革兰阳性菌的PC12测试板. 超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)检测经美国DADE公司MicroScan鉴定得到初筛结果, 再采用纸片扩散法试验确证. 严格按照美国国家临床实验室标准化研究所(CLSI/NCCLS)2004版标准, 根据其微量稀释法测得MIC值, 判定细菌药敏结果为敏感(S)、中介(I)、耐药(R).

统计学处理 数据统计采用Excel 2003进行结果的录入和分析. 同一病例、同类标本出现相同的病原菌不重复计算.

2 结果

2.1 重症急性胰腺炎患者并发感染的部位 感染部位依次为呼吸系统、胰腺及腹腔、血液、胆道、消化道、泌尿道.

2.2 重症急性胰腺炎并发感染的菌谱 在病原菌中, 革兰阴性菌占优势(61.05%), 主要来源于假单胞菌属、肠杆菌科; 革兰阳性菌(22.10%)多为葡萄球菌属; 真菌(16.86%)有增加趋势, 以念珠菌和似酵母样菌常见. 排在前4位的病原菌是鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌(表1).

2.3 产生超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)的细菌 大肠埃希菌13/27(48.15%), 肺炎克雷伯菌5/7(71.43%), 耐甲氧西林的金色葡萄球菌(MASA) 15/16(93.75%). 重症急性胰腺炎并发感染常见G^-细菌的耐药率见表2, 重症急性胰腺炎并发感染常见G^+细菌的耐药率见表3.

■相关报道

Garg *et al*报道了印度某医院1997-2000年急性胰腺炎患者感染细菌的发生率和菌谱特点及药敏情况, 其结论是: 铜绿假单胞菌和大肠埃希菌是最常见的病原菌, 分离出的大多数病原菌都对三代头孢和喹诺酮类抗生素敏感. 这是目前为数不多的前瞻性观察急性胰腺炎感染情况及耐药性的临床试验之一.

■研发前沿
SAP并发感染是目前国内外研究的热点，研究涉及了病理机制、危险因素、预防性使用抗生素的RCT、抗生素的药理学研究等方面，并深入到了分子水平和基因层面. 但是，SAP并发感染仍是临床治疗的难题.

表 1 重症急性胰腺炎并发感染的菌谱

G^-	*n*	%	G^+	*n*	%	真菌	*n*	%
鲍曼不动杆菌	33	19.19	金黄色葡萄球菌	16	9.3	白色念珠菌	9	5.23
大肠埃希菌	27	15.7	肠球菌	4	2.33	似酵母样菌	9	5.23
铜绿假单胞菌	15	8.72	屎肠球菌	4	2.33	热带念珠菌	6	3.49
肺炎克雷伯菌	7	4.07	表皮葡萄球菌	2	1.16	曲霉菌	1	0.58
阴沟肠杆菌	6	3.49	棒状杆菌	2	1.16	光滑念珠菌	1	0.58
洋葱伯克霍尔德菌	3	1.74	木糖葡萄球菌	1	0.58	克柔念珠菌	1	0.58
黏质沙雷菌	3	1.74	模仿葡萄球菌	1	0.58	光滑球似酵母菌	1	0.58
嗜麦芽假单胞菌	3	1.74	溶血葡萄球菌	1	0.58	白吉利毛孢子菌	1	0.58
产气肠杆菌	2	1.16	松鼠葡萄球菌	1	0.58			
木糖氧化产碱杆菌 xylo亚种	2	1.16	人葡萄球菌 novo亚种	1	0.58			
嗜水气单胞菌属	1	0.58	粪肠球菌	1	0.58			
短黄杆菌	1	0.58	D群链球菌	2	1.16			
多雷极氏普罗威登氏菌	1	0.58	B群无乳链球菌	1	0.58			
			微球菌属细菌	1	0.58			
总计	105	61.05		38	22.1		29	16.86

表 2 重症急性胰腺炎并发感染常见G^-细菌的耐药率(%)

	鲍曼不动杆菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌	肺炎克雷伯菌	阴沟肠杆菌
氨苄青霉素	100.0	100.0	80.0	80.0	100.0
氨苄青霉素/舒巴坦	66.7	87.0	75.0	85.7	100.0
头孢哌酮/舒巴坦	42.9	–	–	–	–
头孢唑啉	–	91.3	100.0	83.3	100.0
头孢噻吩	–	91.7	50.0	85.7	100.0
头孢泊肟	–	89.5	100.0	83.3	–
头孢西丁	–	29.6	100.0	57.1	100.0
头孢他啶	60.0	76.0	40.0	85.7	83.3
头孢三嗪	75.8	78.6	73.3	85.7	66.7
头孢呋辛	–	79.2	100.0	83.3	100.0
头孢噻肟	75.0	80.0	64.3	85.7	50.0
头孢吡肟	75.0	78.3	15.4	83.3	50.0
哌拉西林	76.7	96.0	58.3	85.7	85.7
哌拉西林/他唑巴坦	86.7	33.3	46.2	28.6	83.3
氨曲南霉素	71.9	77.8	40.0	85.7	85.7
丁胺卡那霉素	66.7	14.8	13.3	28.6	28.6
庆大霉素	87.9	81.5	60.0	71.4	85.7
妥布霉素	75.0	76.9	73.3	71.4	85.7
亚胺培南	48.4	11.1	46.7	0.0	0.0
复方新诺明	87.9	88.9	100.0	28.6	71.4
环丙沙星	74.1	95.8	42.9	57.1	50.0
氧氟沙星	87.5	–	50.0	–	33.3

3 讨论

我们的资料显示，SAP患者感染的主要部位是呼吸道，腹腔和胰周，血液也是感染的较常见部位. 这与国内陈敏英 *et al*[3]2002年报道的结果基本一致，说明SAP易感染部位没有发生变化. SAP患者并发肺部感染与诸多因素有关，包括：SAP病情危重、高龄、免疫力下降、卧床时间长、机械通气的使用、全身炎症反应综合征对肺等胰腺远端脏器的打击等[4-5]. 本资料中，革兰阴性菌在病原菌中占优势，病原菌分离数居前4位的分别是鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌，其中有3位是革兰阴性菌. 从表2可看出，革兰阴性菌普遍耐药. 其中，鲍曼不动杆菌对一代、二代头孢菌素及头霉素

表 3 重症急性胰腺炎并发感染常见G^+细菌的耐药率(%)

	金黄色葡萄球菌	其他葡球	肠球菌
阿莫西林/棒酸C	92.3	100.0	–
氨苄青霉素	100.0	100.0	87.5
苯唑青霉素	93.3	100.0	75.0
复方新诺明	7.7	42.9	–
环丙沙星	92.3	80.0	80.0
红霉素	93.3	75.0	87.5
克拉霉素	84.6	80.0	–
克林霉素	93.3	71.4	–
利福平	93.8	42.9	60.0
庆大霉素	100.0	83.3	–
青霉素	100.0	100.0	83.3
四环素	93.3	42.9	66.7
头孢唑啉	92.9	100.0	–
头孢噻肟	93.3	100.0	–
头孢噻吩	90.9	100.0	–
万古霉素	0.0	0.0	0.0
亚胺培南	92.9	100.0	–
氧氟沙星	–	100.0	–

几乎全部耐药[6]; 对头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南耐药率稍低, 但已接近50%; 对其他抗生素耐药率超过60%. 其中对头孢三代、四代耐药率在75%左右, 对复方新诺明和庆大霉素耐药率已接近90%. 该菌的高度耐药和多重耐药可能与其78%来源于重症监护室(ICU)有一定关系. 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是产超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)的典型细菌, 除了碳青霉烯类和头霉素, ESBLs可以抵抗其他所有β-内酰胺类药物[7]. 本资料中, 产ESBLs的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌分别高达13/27(48.15%)和5/7(71.43%). 因肺炎克雷伯菌在本资料中仅7株, 该数据可能与实际情况存在偏差. 大肠埃希菌对哌拉西林/他唑巴坦耐药率低, 对亚胺培南、丁胺卡那霉素、头孢西丁耐药率也低, 显示出碳青霉烯类、氨基糖苷类、头霉素抗生素对肠杆菌科细菌有良好的抗菌活性, 可能与其不被细菌产生的ESBLs破坏有关. 铜绿假单胞菌与鲍曼不动杆菌一样, 同属条件致病菌, 有多重耐药的趋势. 铜绿假单胞菌对四代头孢菌素和头孢吡肟以及丁胺卡那较敏感, 而对亚胺培南敏感性不高, 对复方新诺明高度耐药. 总之, 分离到的革兰阴性菌对多种抗生素有不同程度耐药, 对亚胺培南相对敏感, 但其仍面临鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌的挑战. 与Garg *et al*[8]2001年报道的药敏结果相比, 本研究反映出病原菌的耐药形势相当严峻. 耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MASA)在本资料的金黄色葡萄球菌中高达15/16(93.75%), 金葡菌对复方新诺明耐药率低, 万古霉素的耐药率为0, 我院尚未发现耐万古霉素的金葡菌.

胰腺坏死感染是急性胰腺炎最严重的局部并发症, 发生率达40%-70%[9]. 细菌侵入胰腺或胰周坏死组织的途径是: 血行播散, 结肠内细菌易位, 胆道系统细菌侵袭, 十二指肠内细菌通过胰腺主胰管侵袭[10]. 肠道菌群易位是其主要原因. 已有实验研究证实, 细菌可穿过结肠壁直接到达胰腺[11]. 经学者们多年的研究, 总结出胰腺炎患者抗生素应用应遵循的三大原则[12-13]: 抗菌谱以革兰阴性菌和厌氧菌为主、脂溶性强、有效透过血胰屏障. 现临床首推亚胺培南、三代头孢、喹诺酮类抗生素作为预防及治疗用药. 发生肠道菌群易位的主要是G^-菌, 但本资料分析显示G^-菌对环丙沙星敏感率低, 尤其是大肠埃希菌对环丙沙星耐药率高达95.83%, 这与近年来喹诺酮类抗生素被高频率使用有相当大的关系. 故是否将喹诺酮类抗生素继续作为预防及治疗感染的一线用药值得探讨. 替加环素(Tigecycline)是美国食品和药物管理局(FDA)2005年批准的首个甘氨酰四环素类抗菌素, 用于治疗并发的腹内感染和皮肤及皮肤结构感染的成人患者, 有广谱的抗菌活性, 对抗耐甲氧西林的病原菌有效. 国外多中心RCT证实, 替加环素治疗腹腔感染的疗效不亚于泰能[14], 但没有治疗SAP感染的RCT报道, 仅有个案报道了替加环素治疗胰腺感染的情况. Swoboda *et al*[15]单一使用替加环素成功治疗了1例胰腺外科术后耐万古霉素肠球菌(VRE)败血症休克的患者. Taccone *et al*[16]报道了1例急性胰腺炎并发腹腔脓肿的患者, 感染的鲍曼不动杆菌全线耐药, 美罗培南和多黏菌素治疗无效, 加用替加环素后治疗感染有效. 替加环素对SAP胰腺感染疗效究竟如何, 有待进一步研究.

近年来, 随着抗生素(特别是广谱抗生素)在SAP患者中的预防性使用, 使耐药菌株增加, 包括革兰阴性菌、革兰阳性菌以及真菌[17-18]. 学术界一直就是否在SAP患者中预防性使用抗生素争论不休. 有meta分析结果表明, 预防性应用抗生素可降低胰腺炎患者的死亡率[19-21]. 但最新的多中心随机对照双盲试验报道, 试验组和安慰剂组在胰腺感染、死亡率、转外科治疗方面差异无统计学意义, 不支持SAP患者预防性使用抗生素[22].

总之, 随着SAP并发感染的菌群改变、菌种

■**应用要点**
本文旨在给临床SAP感染的防治提供有益信息, 减少抗生素不合理应用带来的不良后果.

■同行评价
本文内容新颖, 分析全面, 语句通顺, 具有很强的临床参考价值.

增加、耐药性增强, SAP的临床治疗难度也在增加, 对抗生素的合理应用提出了更高要求. 唯有进行更深入的研究, 才能攻克SAP并发感染这一难题, 进一步降低SAP死亡率.

4 参考文献

1 Dambrauskas Z, Pundzius J, Barauskas G. Predicting development of infected necrosis in acute necrotizing pancreatitis. *Medicina (Kaunas)* 2006; 42: 441-449
2 中华医学会外科学会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治草案. 中华消化杂志 2001; 21: 622-623
3 陈敏英, 管向东, 陈娟, 张晟, 黎丽芬. 重症急性胰腺炎的感染特点. 中国实用外科杂志 2002; 22: 533-534
4 Dreyfuss D, Ricard JD. Acute lung injury and bacterial infection. *Clin Chest Med* 2005; 26: 105-112
5 高金波, 熊炯昕, 吕平, 王春友. 重症急性胰腺炎并发肺部感染的临床分析. 消化外科 2005; 4: 399-401
6 陶传敏, 陈慧莉, 王仲琼, 陈文昭, 过孝静. 1716株不动杆菌的鉴定及药敏分析. 四川医学 2003; 5: 517-518
7 Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Extended-spectrum beta-lactamases (ESbLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit Rev Microbiol* 2004; 30: 25-32
8 Garg PK, Khanna S, Bohidar NP, Kapil A, Tandon RK. Incidence, spectrum and antibiotic sensitivity pattern of bacterial infections among patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1055-1059
9 Uhl W, Warshaw A, Imrie C, Bassi C, McKay CJ, Lankisch PG, Carter R, Di Magno E, Banks PA, Whitcomb DC, Dervenis C, Ulrich CD, Satake K, Ghaneh P, Hartwig W, Werner J, McEntee G, Neoptolemos JP, Buchler MW. IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis. *Pancreatology* 2002; 2: 565-573
10 Widdison AL, Karanjia ND, Reber HA. Routes of spread of pathogens into the pancreas in a feline model of acute pancreatitis. *Gut* 1994; 35: 1306-1310
11 Moody FG, Haley-Russell D, Muncy DM. Intestinal transit and bacterial translocation in obstructive pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1798-1804
12 李兆申. 急性胰腺炎的内科治疗. 中国实用内科杂志 2004; 24: 710-713
13 Renzulli P, Jakob SM, Tauber M, Candinas D, Gloor B. Severe acute pancreatitis: case-oriented discussion of interdisciplinary management. *Pancreatology* 2005; 5: 145-156
14 Oliva ME, Rekha A, Yellin A, Pasternak J, Campos M, Rose GM, Babinchak T, Ellis-Grosse EJ, Loh E. A multicenter trial of the efficacy and safety of tigecycline versus imipenem/cilastatin in patients with complicated intra-abdominal infections (Study ID Numbers: 3074A1-301-WW; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00081744). *BMC Infect Dis* 2005; 5: 88
15 Swoboda S, Hoppe-Tichy T, Geiss HK, Hainer C, Nguyen TH, Knaebel HP, Weigand MA. Septic shock due to vancomycin-resistant enterococci infection. Tigecycline monotherapy. *Anaesthesist* 2007; 56: 169-174
16 Taccone FS, Rodriguez-Villalobos H, De Backer D, De Moor V, Deviere J, Vincent JL, Jacobs F. Successful treatment of septic shock due to pan-resistant Acinetobacter baumannii using combined antimicrobial therapy including tigecycline. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25: 257-60
17 Solomkin JS, Umanskiy K. Intraabdominal sepsis: newer interventional and antimicrobial therapies for infected necrotizing pancreatitis. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9: 424-427
18 Eggimann P, Jamdar S, Siriwardena AK. Pro/con debate: antifungal prophylaxis is important to prevent fungal infection in patients with acute necrotizing pancreatitis receiving broad-spectrum antibiotics. *Crit Care* 2006; 10: 229
19 Sharma VK, Howden CW. Prophylactic antibiotic administration reduces sepsis and mortality in acute necrotizing pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreas* 2001; 22: 28-31
20 Zhou YM, Xue ZL, Li YM, Zhu YQ, Cao N. Antibiotic prophylaxia in patients with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 23-27
21 Villatoro E, Bassi C, Larvin M. Antibiotic therapy for prophylaxis against infection of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; CD002941
22 Dellinger EP, Tellado JM, Soto NE, Ashley SW, Barie PS, Dugernier T, Imrie CW, Johnson CD, Knaebel HP, Laterre PF, Maravi-Poma E, Kissler JJ, Sanchez-Garcia M, Utzolino S. Early antibiotic treatment for severe acute necrotizing pancreatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Surg* 2007; 245: 674-683

编辑 何燕 电编 李军亮

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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3423-3429
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤组织中MUC1, MUC2, MUC5AC和TFF1的表达意义

何 度, 张秀辉

何度, 张秀辉, 四川大学华西医院病理科 四川省成都市 610041
何度, 硕士, 从事肿瘤病理研究.
通讯作者: 张秀辉, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院病理科. zhangxiuhui1955@126.com
收稿日期: 2007-04-12 修回日期: 2007-10-10

Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and TFF1 in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and its significance

Du He, Xiu-Hui Zhang

Du He, Xiu-Hui Zhang, Department of Pathology, West China Hospital, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Xiu-Hui Zhang, Department of Pathology, West China Hospital, 37 Guoxue Lane, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. zhangxiuhui1955@126.com
Received: 2007-04-12 Revised: 2007-10-10

Abstract

AIM: To examine the expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and TFF1 in intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) of the pancreas and its significance.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and TFF1 in nine surgically resected specimens with different histological subtypes of IPMN.

RESULTS: The positive rates of MUC1, MUC2 and MUC5AC in all IPMNs were 44.4%, 66.7% and 100%, respectively. The common expression patterns of MUCs in different histological subtypes were: gastric type (MUC1–, MUC2–, MUC5AC+), intestinal type (MUC1–, MUC2+, MUC5AC+), and oncocytic type (MUC1+, MUC2+, MUC5AC+). Ductal type invasive carcinomas associated with IPMNs were MUC1+, whereas colloid carcinomas were MUC2+. MUC5AC and TFF1 were co-localized in IPMNs, and reduced expression appeared in invasive components. Gastric type IPMNs sometimes merged with other IPMN subtypes, and transition between different epithelia was present, implying that the gastric type might be a precursor of the other subtypes.

CONCLUSION: Different IPMN subtypes have their own MUC expression pattern. MUC1 suggests aggressive behavior, MUC2 is associated with colloid carcinoma, and MUC5AC and TFF1, which were co-expressed, might be protective factors.

Key Words: Pancreatic neoplasms; Intraductal papillary mucinous neoplasms; Mucin; Trefoil factor 1

He D, Zhang XH. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and TFF1 in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and its significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3423-3429

摘要

目的: 了解胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤(IPMN)中MUC1, MUC2, MUC5AC及TFF1的表达意义.

方法: 采用免疫组织化学方法, 检测IPMN手术切除标本9例中MUC1, MUC2, MUC5AC及TFF1的表达, 分析不同组织学类型及不同性质IPMN之间黏液蛋白及TFF1表达的差异.

结果: MUC1表达率为44.4%, MUC2为66.7%, MUC5AC和TFF1为100%. 胃型IPMN黏液蛋白表达模式主要为MUC1-, MUC2-, MUC5AC+. 肠型IPMN为MUC1-, MUC2+, MUC5AC+. 嗜酸性细胞型IPMN为MUC1+, MUC2+, MUC5AC+. IPMN相关管状癌MUC1阳性, 胶质癌MUC2阳性. MUC5AC和TFF1共同表达, 在浸润癌中表达下降. 胃型IPMN常与其他类型IPMN同时出现并且不同上皮之间出现移行过渡, 提示胃型可能是其他类型IPMN的前期病变.

结论: 不同组织学亚型的IPMN具有不同的黏液蛋白表达模式. MUC1表达提示侵袭性生物

■背景资料
胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤(IPMN)是发生在胰腺主导管或其主要分支导管的乳头状黏液分泌肿瘤, 近20年来被逐渐认识. IPMN是胰腺外分泌肿瘤的一种独特类型, 包括多种组织学形态和不同性质的肿瘤, 其5年生存率显著高于普通胰腺导管癌. 目前IPMN被认为是侵袭性胰腺癌的癌前病变之一, 但其肿瘤发生途径与胰腺上皮内肿瘤—导管癌的途径不完全相同. 黏液蛋白(MUC)免疫组化研究发现不同组织学亚型的IPMN存在不同的表达模式, 并且在鉴别胰腺囊性肿瘤及提示肿瘤生物学行为方面具有重要作用.

■创新盘点
本文验证了MUC1, MUC2, MUC5AC及TFF1在不同组织学亚型IPMN中的表达意义, 观察到胃型IPMN与其他类型IPMN在组织学上存在移行过渡, 并发现TFF1与MUC5AC的表达具有一致性.

学行为, MUC2与胶质癌浸润有关, MUC5AC与TFF1协同表达, 可能起保护作用.

关键词: 胰腺肿瘤; 导管内乳头状黏液性肿瘤; 黏液蛋白; 三叶因子1

何度, 张秀辉. 胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤组织中MUC1, MUC2, MUC5AC和TFF1的表达意义. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3423–3429
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3423.asp

0 引言

胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN)是发生在胰腺主导管或其主要分支导管的乳头状黏液分泌肿瘤[1], 占胰腺囊性肿瘤的第2位, 仅次于胰腺实性假乳头状肿瘤[2]. 其发病率自1990年代后期开始明显增加[3]. IPMN作为胰腺外分泌肿瘤的一种独特类型, 包括多种组织学形态及不同性质的肿瘤, 其导管起源、组织学形态、生物学行为及肿瘤发生途径与普通胰腺导管癌存在较大差别. IPMN的5年生存率(浸润型60%, 非浸润型100%)明显比普通胰腺导管癌高[4]. 黏液蛋白(mucin, MUC)是一类大分子量糖蛋白, 在正常生理状态下, 黏液蛋白的表达具有明确的组织特异性和时间特异性, 其表达稳态容易受到损伤因子的破坏. 黏液蛋白表达异常是许多炎症及肿瘤的显著特征, 在多种恶性肿瘤中, 黏液蛋白参与肿瘤的发生[5]. MUC1, MUC2及MUC5AC与IPMN关系密切, 对IPMN的诊断、鉴别、分型及生物学行为的提示具有重要作用. 三叶因子1(trefoil factor 1, TFF1)又称雌激素诱导蛋白pS2, 是三叶因子家族成员之一, 与黏液蛋白关系紧密. 人类TFF1直接与MUC5AC相互作用[6], 在正常胃肠道中TFF1与MUC5AC协同表达[7]. TFF1具有保护胃黏膜, 促进黏膜修复的功能[8], 还可能是肿瘤抑制基因[9]. 我们对IPMN进行临床病理分析, 目的在于了解不同类型IPMN中MUC1, MUC2, MUC5AC及TFF1的表达及意义, 并对TFF1及MUC5AC在IPMN中的关系进行探讨.

1 材料和方法

1.1 *材料* 1998-2006年四川大学华西医院手术切除胰腺IPMN 9例, 按照WHO分类标准[1], 包括良性3例, 交界性1例, 恶性5例. 根据2005年国际专家组达成的IPMN组织学分型标准[10], 将病例分为胃型3例, 肠型4例和嗜酸性细胞型2例(本组病例中无胰胆管型). 由于在某些病例中存在一种以上的IPMN组织学类型, 因此将主要成分和次要成分同时列出, 另外将IPMN相关的浸润型癌成分也一并列出. 肿瘤周围正常胰腺组织5例作为正常对照. 患者年龄24-62(平均49.9)岁, 男5例, 女4例. 肿瘤部位: 胰腺头部6例, 尾部2例, 体部1例. 肿瘤最大直径1.2-9(平均4.41) cm. 大体多为囊性(7/9), 囊内容物为黏液, 其余2例表现为副胰管内新生物及胰管周变硬. 5例伴主胰管扩张, 2例无扩张, 2例主胰管有无扩张不清楚. 临床表现以腹痛、腹胀及腹部不适最常见(5例), 其次为腰背部胀痛不适或慢性腹泻. 2例无IPMN的相关症状, 其中1例是在行胃癌胃大部切除时, 术中发现脾动脉干处一“肿大淋巴结”. 病理检查显示其来源胰腺的囊性肿瘤, 另1例为B超体检时意外发现胰腺后方占位. IPMN常伴胰外器官肿瘤, 本组中2例合并胰外器官肿瘤, 其中1例伴有十二指肠PJ息肉(临床诊断为Peutz-Jeghers综合征), 另1例伴胃窦癌(表1).

1.2 *方法* 采用免疫组化LsAB法. 标本经中性甲醛固定, 石蜡包埋, 切片厚4 μm. 分别进行HE染色及免疫组织化学标记, 其中1例进行AB-PAS染色. 切片常规脱蜡梯度水化, 过氧化氢处理切片25 min, 抗原修复, 血清封闭, 滴加一抗(表2). 一抗37℃孵育2 h, PBS洗片, 二三抗使用北京中杉金桥生物有限公司SP-9002试剂盒, 孵育时间均为45 min. PBS洗片, DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 中性树胶封片. PBS代替一抗作为空白对照. MUC1及MUC5AC定位于细胞质和或细胞膜, MUC2及TFF1定位于细胞质; 阳性细胞数<10%为阴性, ≥10%为阳性. 细胞染色结果按照阳性强度分级: -(阴性), +(弱阳性), ++(中等强度阳性), +++(强阳性). 细胞外黏液染色强度按照阳性面积百分比分级: -(阴性), +(<1/3阳性), ++(1/3-2/3阳性), +++(>2/3阳性).

2 结果

2.1 *IPMN的类型* IPMN的组织学亚型分别为: 胃型3例, 肠型4例(包括2例肠型+胃型), 嗜酸性细胞型2例(包括1例嗜酸性细胞型+胃型). 4例为良性及交界性, 5例为恶性浸润型, 与IPMN相关的浸润成分为胶质癌(3/5)和管状癌(2/5)(表3).

2.2 *MUC1, MUC2, MUC5AC及TFF1的表达* MUC1表达率为44.4%(4/9), 均为浸润型IPMN, 包括1例胃型, 1例嗜酸性细胞型, 1例嗜酸性细

表 1 IPMN 9例的临床资料

编号	年龄	性别	肿瘤部位	大体	大小(cm)	主胰管扩张	相关症状	病理类型(WHO)	胰外肿瘤
1	24	女	头	囊性	5	是	腹痛7 mo	导管内乳头状黏液瘤	肠PJ息肉
2	56	男	头	副胰管内新生物	1.2		无	导管内乳头状黏液瘤	胃窦癌
3	50	男	头	胰管周质硬	1.5	是	腹痛	导管内乳头状黏液瘤	
4	51	男	头	囊性	3	是	腹泻14 mo	交界性导管内乳头状黏液瘤	
5	40	男	尾	囊性	9	否	腹痛6 mo	浸润型导管内乳头状黏液癌	
6	62	男	头	囊性	5		腹胀3 mo	浸润型导管内乳头状黏液癌	
7	62	女	尾	囊性	8	否	无	浸润型导管内乳头状黏液癌	
8	48	女	体	囊性	2	是	腹部不适72 mo	浸润型导管内乳头状黏液癌	
9	52	女	头	囊性	5	是	腰背部痛5 mo	浸润型导管内乳头状黏液癌	

表 2 一抗来源, 修复方式及阳性对照组织

一抗	克隆类型	克隆系	工作浓度	抗原修复方法	购买公司	阳性对照组织
MUC1	鼠抗人mAb	Ma695	即用型	高压锅; 枸橼酸缓冲液; pH = 6.0	北京中杉金桥生物有限公司(Zymed公司产品)	乳腺癌
MUC2	鼠抗人mAb	Ccp58	即用型	高压锅; 枸橼酸缓冲液; pH = 6.0	北京中杉金桥生物有限公司(Zymed公司产品)	十二指肠
MUC5AC	鼠抗人mAb	45M1	即用型	高压锅; 枸橼酸缓冲液; pH = 6.0	福州迈新生物技术开发有限公司	胃
TFF1	鼠抗人mAb	BC04	1∶50	100℃水浴; EDTA缓冲液; pH = 9.0	北京中杉金桥生物有限公司(Zymed公司产品)	已知阳性乳腺癌

■应用要点

不同组织学亚型的IPMN存在不同的MUC表达模式, MUC1与管状浸润癌有关, MUC2与胶质癌浸润有关. TFF1与MUC5AC在IPMN中高表达, 两者表达的区域一致. 对机体而言两者可能是保护因素, 但有待于进一步深入研究.

胞型+胃型及1例肠型+胃型, 良性和交界性病变不表达. MUC1在高中分化的浸润管状癌的顶端细胞膜上呈中-强阳性表达, 并出现胞质阳性表达. 低分化癌MUC1胞质表达增强呈中等强度阳性, 1例出现细胞外黏液阳性, 3例IPMN相关胶质癌MUC1呈阴性. MUC1在嗜酸性细胞型IPMN的胞质中呈中-强阳性表达, 细胞膜呈阴性表达. 正常胰腺组织内的小叶间导管及小叶内导管的上皮细胞顶端细胞膜MUC1呈细线状表达, 胞质阴性. MUC2阳性率为66.7%(6/9), 2例(2/4)为良性和交界性, 4例(4/5)为浸润型, 阳性信号定位于细胞质. 细胞膜及细胞外黏液(除1例外)均未见表达. 阳性IPMN包括2例肠型, 2例肠型+胃型, 1例嗜酸性细胞型及1例嗜酸性细胞型+胃型. 在1例良性肠型+胃型IPMN中, 肠型区域呈低乳头状生长, MUC2呈强阳性, 胃型区域MUC1和MUC2呈阴性. 浸润性管状癌呈阴性或部分阳性表达, 胶质癌(3/3)均呈强阳性表达. MUC2在正常胰腺的小叶间导管及小叶内导管均不表达. 所有IPMN呈MUC5AC阳性表达, 阳性定位于细胞质、顶端细胞膜及细胞外黏液(图1A). 然而管状浸润癌的表达下降, 部分低分化癌表达丧失. MUC5AC在正常胰腺的小叶间导管及小叶内导管上皮细胞中呈阴性或个别细胞质阳性. TFF1在所有IPMN的细胞质呈强阳性表达, 2例管状癌及1例胶质癌中表达部分丧失, 正常胰腺小叶间导管及小叶内导管上皮细胞呈阴性或个别上细胞阳性, 增生性病变呈阳性表达. TFF1与MUC5AC在表达强度和表达的细胞类型上具有相似性(图1B-C).

胃型IPMN多为良性病变, 常与其他类型IPMN同时出现, 某些区域的不同上皮细胞之间出现移行过渡(图1D), 提示胃型是其他类型的前体病变. 单纯胃型IPMN黏液蛋白表达模式主要为MUC1-, MUC2-, MUC5AC+(图2A-D). 肠型IPMN为MUC1-, MUC2+, MUC5AC+(图2E-H). 嗜酸性细胞型IPMN为MUC1+, MUC2+, MUC5AC+(图2I-L). 当肿瘤发生癌浸润时, 胃型IPMN出现MUC1表达.

3 讨论

近年来胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤逐渐被认识, 在我国并不常见. Sohn *et al*[3]回顾了1987-2003年Johns Hopkins Hospital因IPMN手

■同行评价
本文内容详尽, 资料丰富, 对提高胰腺癌的认识具有重要意义, 有一定的可读性.

表 3 在不同IPMN组织学亚型中MUC1, MUC2, MUC5AC和TFF1的表达

编号	IPMN类型(WHO)	肿瘤组织学构成	MUC1			MUC2		MUC5AC			TFF1
			胞膜	胞质	胞外黏液	胞质	胞外黏液	胞膜	胞质	胞外黏液	胞质
1	瘤	胃型IPMN	–	–	–	–	–	+++	++	+++	+++
2	瘤	胃型IPMN	–	–	–	–	–	+++	+++	+++	+++
3	瘤	肠型(主)+胃型(次)IPMN	–	–	–	–/+++	–	+++	+++	+++	+++
4	交界性	肠型IPMN	–	–	–	+++	–	–	+++	+++	+++
5	浸润型癌	胃型IPMN	+++	–	++	–	–	+++	++	+++	+++
		管状癌(高中分化)	+++	+	++	–	–	–~+++	–~+++	+++	–~+++
6	浸润型癌	肠型IPMN	–	–	–	+++	+	+++	+++	++	+++
		胶质癌	–	–	–	+++	–	–~+++	–~+	+	–~+++
7	浸润型癌	肠型(主)+胃型(次)IPMN	–	–~++	–	+~+++	–	+++	+++	+++	+++
		管状癌(中低分化)	–~++	–~++	–	–~+	–	–~+++	–~+	+++	–~+++
8	浸润型癌	嗜酸性细胞型IPMN	–	++	–	+++	–	+++	–~++	+++	+++
		胶质癌	–	–	–	+++	–	+++	++	+++	+++
9	浸润型癌	嗜酸性细胞型(主)+胃型(次)IPMN	–	+++	–	+++	–	+++	+++	+++	+++
		胶质癌	–	–	–	+++	–	+++	+++	+++	+++

术切除病例136例, 发现自1990年代末期以后IPMN的发病率明显增加. 过去常将其归为胰腺黏液性囊性肿瘤(mucinous cystic neoplasm, MCN). 两者形态学相似, 但胰腺黏液性囊性肿瘤几乎均发生在女性, 位于胰腺体尾部, 卵巢型间质(ovarian-type stroma, OS)是目前区别两者的严格组织学指标[11]. 胰腺上皮内肿瘤(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN)常发生于直径≤5 mm的导管[12], 常形成乳头状结构, 但高级别PanINs常进展成为恶性程度较高的胰腺导管癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC). IPMN, MCN和PanIN均包括不同级别的病变, 在生物学行为及遗传学上具有异同, 3者都是侵袭性胰腺导管癌的癌前病变[13]. 黏液蛋白(mucin, MUC)是一类大分子糖蛋白, 在正常消化道、呼吸道及生殖道的上皮中广泛表达, 迄今为止已发现19种人类黏液蛋白[5]. 根据结构特点和生理学功能, 黏液蛋白分为两大类: 分泌型(secreted)和膜结合型(membrane-bound)[5]. 其分布具有器官、组织及时间特异性. 在疾病状态下, MUC异常表达或异常糖基化. 在肿瘤的演进过程中, MUC影响细胞的生长、分化、黏附、运动和机体的免疫监视功能. IPMN具有4种组织学亚型: 胃型、肠型、胰胆管型和嗜酸性细胞型. 每种亚型具有各自独特的MUC表达模式, 除形态学标准外, 2005年制定的新分型标准将MUC作为另一重要的辅助诊断标准, 不同组织学类型代表不同级别的IPMN[10].

MUC1是一种膜结合型黏液蛋白, 表达于正常乳腺上皮顶端细胞膜, 维持腺腔结构的稳定性[14], 在正常胰腺小叶间导管及小叶内导管的上皮细胞顶部呈细线状表达. 过表达MUC1导致细胞转化, 抑制损伤诱导的细胞凋亡[14-15]. MUC1削弱E-cadherin介导的细胞与细胞之间的黏附[16], 参与肿瘤浸润. 过表达MUC1使肿瘤细胞逃避细胞毒性效应细胞的杀伤作用[17]. MUC1阳性常见于胰胆管型和嗜酸性细胞型IPMN[18], 胃型及肠型MUC1常呈阴性[18], 当进展为管状浸润癌时, MUC1常为阳性[13]. 本组中2例浸润型IPMN的浸润成分为管状癌, 均有不同程度MUC1表达. 高-中分化管状癌的腺管上皮细胞顶端呈强阳性表达, 胞质呈阴性或弱阳性表达, 低分化癌胞质表达增强, 呈中等强度阳性. 2例嗜酸性细胞型IPMN, MUC1呈细胞质内中-强阳性表达, 细胞膜不表达, 提示此型为高级别肿瘤.

MUC2为分泌型黏液蛋白, 正常组织的杯状细胞高表达, 在正常胰腺的小叶间导管和小叶内导管不表达. 当MUC2基因敲除后, 小鼠发生胃肠道的腺瘤及腺癌, 提示MUC2是一种肿瘤

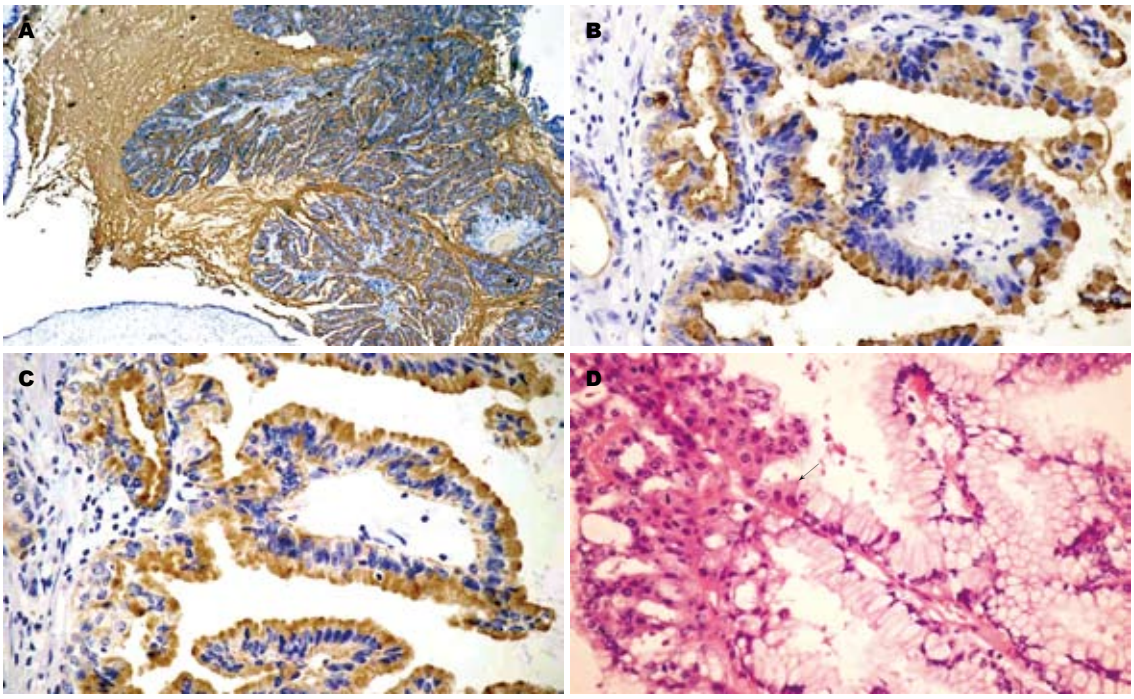


图 1 胰腺导管内乳头状黏液性肿瘤. A: 细胞外黏液MUC5AC呈强阳性表达(×30); B: 肿瘤细胞质MUC5AC呈强阳性表达(×300); C: 肿瘤细胞质TFF1呈强阳性表达(×300); D: 嗜酸性细胞型与胃型有移行过渡(HE, ×300), ↙所示.

抑制因子[19]. MUC2在肠型IPMN中常为阳性, 而MUC2在PanIN及胰腺导管癌中几乎不表达[13]. 除散在的杯状细胞外, MCNs不表达MUC2[20], 说明MUC2是IPMN的诊断、分型及提示生物学行为的重要指标. 嗜酸性细胞型IPMN非常少见, MUC2的表达情况各家报道不一. Terris *et al*[21]报道此型IPMN缺乏MUC2表达, 但Luttges *et al*[22]发现MUC1及MUC2均表达. 本组中4例肠型IPMN和2例嗜酸性细胞型IPMN均呈阳性表达, 3例IPMN相关性胶质癌MUC2呈强阳性表达, 而MUC1阴性. 由于胰腺胶质癌的预后明显较胰腺导管癌好, 两者MUC1和MUC2的表达模式恰恰相反, 因此Adsay *et al*[13]提出MUC1和MUC2代表两种不同的肿瘤演进方式: MUC2是“惰性”途径标志(代表IPMN和胶质癌), MUC1是“侵袭性”途径标志(代表从PanIN到导管腺癌). 本组中, 2例浸润型IPMN由肠型和胃型混合构成, 1例浸润型IPMN由嗜酸性细胞型和胃型(胃型MUC1+, MUC2+)混合构成. 随着肿瘤级别增高, 胃型IPMN出现MUC1及MUC2的表达, 提示胃型可能是其他类型IPMN的前期病变.

MUC5AC为胃型黏液蛋白, 与MUC2同属于分泌型黏液蛋白, 导管上皮细胞不表达或仅少数细胞表达. Jinfeng *et al*[23]发现浸润型胰腺导管癌的MUC5AC阳性表达率为63.6%, MUC5AC失表达与淋巴结转移和血管浸润相关, MUC5AC阳性病例的预后较好. 本研究9例IPMN均为阳性, 阳性率与其他报道一致[22-24]. 与IPMN相关的1例胶质癌及2例管状浸润癌部分区域MUC5AC表达丧失, 分化越低MUC5AC丧失越明显. 在所有病例中均发现肿瘤细胞外黏液MUC5AC强表达. 以上结果提示MUC5AC可能具有抑制肿瘤侵袭的功能.

TFF1在正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎及胃溃疡中全部表达, 在不典型增生胃黏膜的表达率下降, 胃癌阳性率仅为20%[25]. Lefebvre *et al*[9]研究发现所有TFF1纯合子突变小鼠发生了胃窦幽门腺瘤, 30%小鼠发生上皮内或黏膜内癌, 提示TFF1可能是肿瘤抑制基因. Madsen *et al*[26]检测到正常胰腺组织中有中等水平TFF1 mRNA表达. TFF1蛋白在慢性胰腺炎导管上皮细胞中均呈强阳性[27], 在PanINs中随着其级别增高TFF1表达率降低[28], 在胰腺导管癌中仅半数表达TFF1[29]. 利用基因芯片技术已检测到IPMN存在多种基因表达异常, 其中TFF1和MUC5AC基因显著上调[30-31]. 人类TFF1能与MUC5AC结合, 稳定MUC5AC[6]. 我们通过免疫组化检测发现TFF1蛋白在正常导管中不表达或仅少数上皮细胞表达, IPMN的TFF1阳性率为100%. 在IPMN相关的2例管状癌及1例胶质癌中部分区域TFF1表达丧失, 其表达丧失区域与MUC5AC表达丧失区域的部位相似, 集中在低分化癌处,

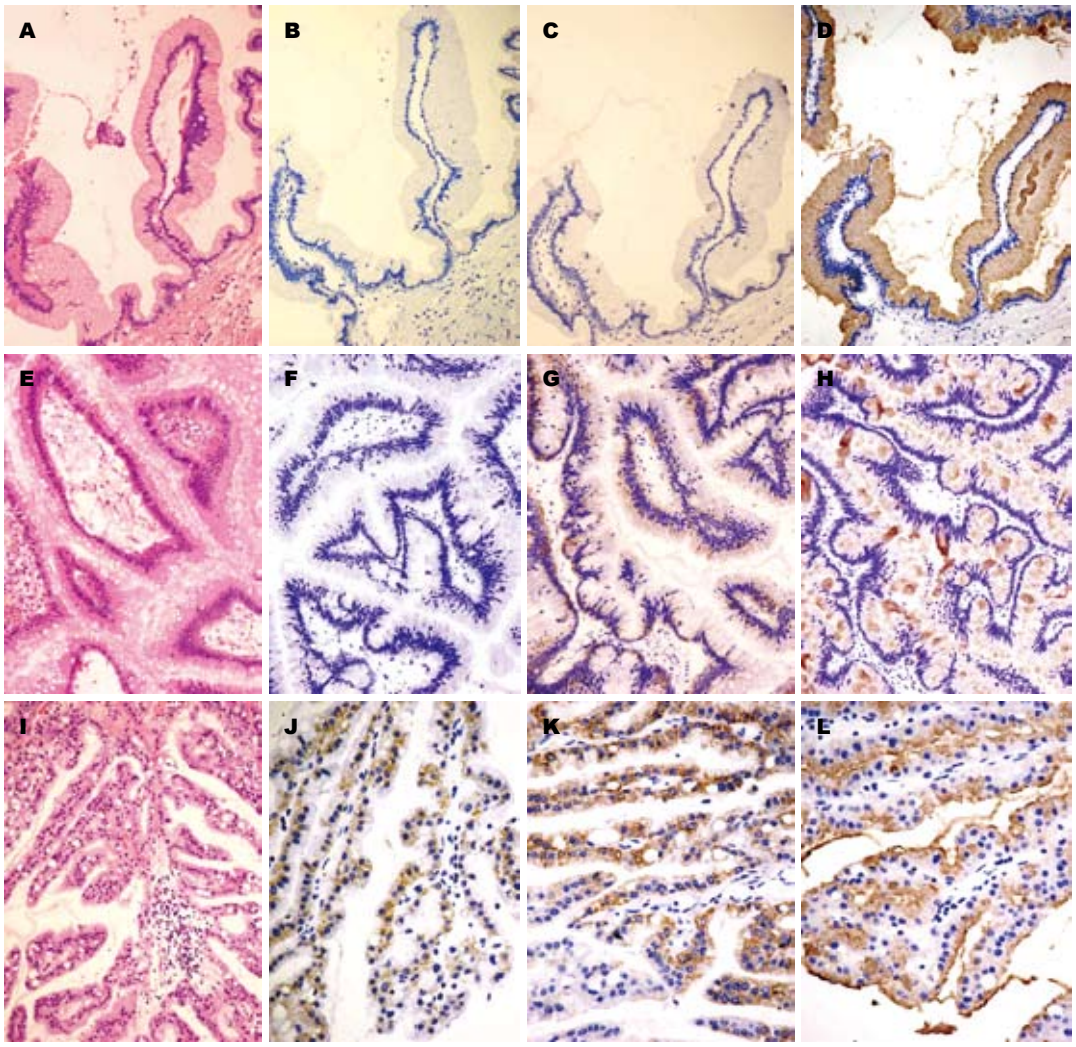


图 2 MUC1, MUC2, MUC5AC在不同组织学类型IPMN中的表达. A−D: 胃型呈MUC1−, MUC2−, MUC5AC+; E−H: 肠型呈MUC1−, MUC2+, MUC5AC+; I−L: 嗜酸性细胞型呈MUC1+, MUC2+, MUC5AC+. A, E, I(HE); B, F, J(MUC1); C, G, K (MUC2); D, H, L(MUC5AC)(A−I: ×150; J−L: ×300).

提示TFF1与MUC5AC协同参与胰腺IPMN的发生, 共同抑制肿瘤侵袭.

我们的研究证实, 不同组织学亚型的IPMN具有其特有的黏液蛋白表达模式. MUC1是提示浸润型IPMN的有用指标, 与管状侵袭成分相关. MUC2提示“惰性”侵袭途径, 是肠型IPMN及胶质癌的标记, 且嗜酸性细胞型IPMN同样可表达. MUC5AC与TFF1共同表达于所有IPMN, 在浸润癌中表达不同程度丧失, 对机体而言两者可能是保护因素. 但TFF1与MUC5AC在IPMN中具体作用机制以及功能尚不清楚, 有待进一步深入研究.

4 参考文献

1 Hamilton SR, Aaltonen LA. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumors of the digestive system. Lyon: IRAC Press, 2000: 237-240

2 Kosmahl M, Pauser U, Peters K, Sipos B, Luttges J, Kremer B, Kloppel G. Cystic neoplasms of the pancreas and tumor-like lesions with cystic features: a review of 418 cases and a classification proposal. *Virchows Arch* 2004; 445: 168-178

3 Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Fukushima N, Campbell KA, Lillemoe KD. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: an updated experience. *Ann Surg* 2004; 239: 788-797; discussion 797-799

4 Salvia R, Fernandez-del Castillo C, Bassi C, Thayer SP, Falconi M, Mantovani W, Pederzoli P, Warshaw AL. Main-duct intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: clinical predictors of malignancy and long-term survival following resection. *Ann Surg* 2004; 239: 678-685; discussion 685-687

5 Andrianifahanana M, Moniaux N, Batra SK. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1765: 189-222

6 Ruchaud-Sparagano MH, Westley BR, May FE. The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 1946-1954

7 Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulsom R, Corfield AP, Thomas MG, Wright NA. Coordinated localisation of mucins and trefoil

peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 2000; 47: 792-800
8 Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 721-732
9 Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 1996; 274: 259-262
10 Furukawa T, Kloppel G, Volkan Adsay N, Albores-Saavedra J, Fukushima N, Horii A, Hruban RH, Kato Y, Klimstra DS, Longnecker DS, Luttges J, Offerhaus GJ, Shimizu M, Sunamura M, Suriawinata A, Takaori K, Yonezawa S. Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: a consensus study. *Virchows Arch* 2005; 447: 794-799
11 Tanaka M, Chari S, Adsay V, Fernandez-del Castillo C, Falconi M, Shimizu M, Yamaguchi K, Yamao K, Matsuno S. International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatology* 2006; 6: 17-32
12 Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, Goggins M, Kato Y, Kloppel G, Longnecker DS, Luttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Shimizu M, Yonezawa S. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 977-987
13 Adsay NV, Merati K, Andea A, Sarkar F, Hruban RH, Wilentz RE, Goggins M, Iocobuzio-Donahue C, Longnecker DS, Klimstra DS. The dichotomy in the preinvasive neoplasia to invasive carcinoma sequence in the pancreas: differential expression of MUC1 and MUC2 supports the existence of two separate pathways of carcinogenesis. *Mod Pathol* 2002; 15: 1087-1095
14 Li Y, Liu D, Chen D, Kharbanda S, Kufe D. Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene. *Oncogene* 2003; 22: 6107-6110
15 Yin L, Li Y, Ren J, Kuwahara H, Kufe D. Hu-man MUC1 carcinoma antigen regulates intracellular oxidant levels and the apoptotic response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2003; 278: 35458-35464
16 Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 565-577
17 van de Wiel-van Kemenade E, Ligtenberg MJ, de Boer AJ, Buijs F, Vos HL, Melief CJ, Hilkens J, Figdor CG. Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction. *J Immunol* 1993; 151: 767-776
18 Adsay NV, Merati K, Basturk O, Iacobuzio-Donahue C, Levi E, Cheng JD, Sarkar FH, Hruban RH, Klimstra DS. Pathologically and biologically distinct types of epithelium in intraductal papillary mucinous neoplasms: delineation of an "intestinal" pathway of carcinogenesis in the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 839-848
19 Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 2002; 295: 1726-1729
20 Luttges J, Feyerabend B, Buchelt T, Pacena M, Kloppel G. The mucin profile of noninvasive and invasive mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 466-471
21 Terris B, Dubois S, Buisine MP, Sauvanet A, Ruszniewski P, Aubert JP, Porchet N, Couvelard A, Degott C, Flejou JF. Mucin gene expression in intraductal papillary-mucinous pancreatic tumours and related lesions. *J Pathol* 2002; 197: 632-637
22 Luttges J, Zamboni G, Longnecker D, Kloppel G. The immunohistochemical mucin expression pattern distinguishes different types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and determines their relationship to mucinous noncystic carcinoma and ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 942-948
23 Jinfeng M, Kimura W, Hirai I, Sakurai F, Moriya T, Mizutani M. Expression of MUC5AC and MUC6 in invasive ductal carcinoma of the pancreas and relationship with prognosis. *Int J Gastrointest Cancer* 2003; 34: 9-18
24 Handra-Luca A, Flejou JF, Rufat P, Corcos O, Belghiti J, Ruszniewski P, Degott C, Bedossa P, Couvelard A. Human pancreatic mucinous cystadenoma is characterized by distinct mucin, cytokeratin and CD10 expression compared with intraductal papillary-mucinous adenoma. *Histopathology* 2006; 48: 813-821
25 李俊美, 罗和生, 姚宏昌. 雌激素诱导基因PS2/TFF1在胃癌及癌前病变中的表达. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1302-1305
26 Madsen J, Nielsen O, Tornoe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 505-513
27 Ebert MP, Hoffmann J, Haeckel C, Rutkowski K, Schmid RM, Wagner M, Adler G, Schulz HU, Roessner A, Hoffmann W, Malfertheiner P. Induction of TFF1 gene expression in pancreas overexpressing transforming growth factor alpha. *Gut* 1999; 45: 105-111
28 Prasad NB, Biankin AV, Fukushima N, Maitra A, Dhara S, Elkahloun AG, Hruban RH, Goggins M, Leach SD. Gene expression profiles in pancreatic intraepithelial neoplasia reflect the effects of Hedgehog signaling on pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Res* 2005; 65: 1619-1626
29 Collier JD, Bennett MK, Bassendine MF, Lendrum R. Immunolocalization of pS2, a putative growth factor, in pancreatic carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 396-400
30 Terris B, Blaveri E, Crnogorac-Jurcevic T, Jones M, Missiaglia E, Ruszniewski P, Sauvanet A, Lemoine NR. Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Am J Pathol* 2002; 160: 1745-1754
31 Sato N, Fukushima N, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, van Heek NT, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Gene expression profiling identifies genes associated with invasive intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Am J Pathol* 2004; 164: 903-914

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3430-3434
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

病毒性肝炎后肝硬化发生的临床危险因素研究进展

叶华曦, 张焜和

■背景资料
人群中肝炎病毒感染者众多, 但发展为肝炎后肝硬化者毕竟是少数, 宿主因素及环境因素可能都会影响肝炎后肝硬化的发生发展. 近年来研究表明, 肝炎病毒类型及其基因型、病毒性肝炎的临床特点、饮酒、肝脂肪变性等因素都与肝炎后肝纤维化和肝硬化的发生发展密切相关.

叶华曦, 南昌大学第三附属医院消化内科 江西省南昌市 330008
张焜和, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006
通讯作者: 张焜和, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化内科. yfyzkh@sina.com
电话: 0791-8692507
收稿日期: 2007-08-21 修回日期: 2007-10-29

Advances in research of clinical risk factors for the development of cirrhosis due to viral hepatitis

Hua-Xi Ye, Kun-He Zhang

Hua-Xi Ye, Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330008, Jiangxi Province, China
Kun-He Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Kun-He Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. yfyzkh@sina.com
Received: 2007-08-21 Revised: 2007-10-29

Abstract
Patients infected with hepatitis viruses may have different clinical outcomes, some of whom develop liver cirrhosis. Understanding the risk factors for liver cirrhosis is of importance in clinical practice. Recent studies have shown that the development of liver fibrosis and cirrhosis is correlated with the type of hepatitis virus and its genotype, clinical features of viral hepatitis, alcohol consumption, and liver steatosis. These risk factors may contribute independently or jointly to the development of cirrhosis due to viral hepatitis.

Key Words: Liver cirrhosis; Risk factor; Hepatitis virus; Alcohol; Steatosis

Ye HX, Zhang KH. Advances in research of clinical risk factors for the development of cirrhosis due to viral hepatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3430-3434

摘要
肝炎病毒感染患者有着不同的临床转归, 其中一部分将发展为肝硬化. 了解肝硬化发生发展的临床危险因素对临床实践具有重要的指导意义. 近年来研究显示, 肝炎病毒类型及其基因型、病毒性肝炎的临床特点、饮酒、肝脂肪变性等临床因素与肝纤维化和肝硬化的发生发展密切相关, 这些因素可独立或共同促使病毒性肝炎后肝硬化的发生.

关键词: 肝硬化; 危险因素; 肝炎病毒; 酒精; 肝脂肪变性

叶华曦, 张焜和. 病毒性肝炎后肝硬化发生的临床危险因素研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3430-3434
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3430.asp

0 引言
病毒性肝炎患者有不同的转归, 其中一部分将发展为肝炎后肝硬化. 2002年全球的死亡率预测数据显示, 92.9万人死于慢性乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染所致的肝病, 其中包括44.6万人死于肝硬化(HBV相关者23.5万, HCV相关者21.1万)[1]. 近年来, 病毒性肝炎后肝硬化发生危险因素的研究已引起人们的重视, 国内外学者在这方面做了不少工作. 本文拟就病毒性肝炎后肝硬化发生的临床危险因素进展作一综述.

1 肝炎病毒类型与肝炎后肝硬化
1.1 乙肝病毒 HBV感染是肝炎后肝硬化的主要病因. 刘伟 *et al*[2]统计了病毒性肝炎后肝硬化的病因, 发现HBV占86.88%, 远高于HCV(6.38%)和丁肝病毒(HDV, 0.71%). 乙肝后肝硬化患者的乙肝病毒血清标志物检测有一定的特点. 白宪光 *et al*[3]研究表明, 乙肝后肝硬化患者中HBsAg、HBeAg及抗-HBc均阳性者占59.0%, 抗-HBs阳性者1.5%, 余为HBsAg、抗-HBe和抗-HBc阳性, 或HBsAg和抗-HBc阳性. 吴君 *et al*[4]对乙型肝炎患者5年追踪随访发现, 肝硬化的发生率为16.54%, HBeAg、抗-HBe和HBV DNA持续阳性是肝

硬化发生的危险因素, 相对危险度(RR)分别为5.67、1.21和9.82. 血循环HBV病毒载量与肝脏疾病转归之间的关系已引起研究人员的广泛重视[5-8]. 台湾的一项研究显示[9], 随着血循环HBV病毒载量从低于3×10^5拷贝/L至10^9拷贝/L, 肝硬化发生率从4.5%升至36.2%.

HBV的基因型分为8型(A-H型)[10]. 研究发现, 亚洲HBV感染者中C型比B型更易发生肝硬化, 而D型则较少发生肝硬化. 林裕龙 *et al*[11]对广东地区HBV感染者中无症状携带者、肝癌和肝硬化3组患者中的HBV基因型分析显示, B型分别占45.0%、30.0%和33.9%, C型分别占33.3%、65.0%和60.7%, D型分别占21.7%、3.4%和5.4%. 张汉荣 *et al*[12]除发现肝硬化患者C型检出率(69.0%)显著高于慢性乙型肝炎(43.2%)外, 还发现CP双变异(nt 1762 A-T和1764 G-A)检出率(72.4%)也显著高于慢性乙型肝炎(45.5%), 且CP双变异在C型(69.2%)显著高于B型感染者(44.1%), 认为CP双变异与C基因型密切相关, 并且导致病情向肝硬化发展. Yotsuyanagi *et al*[13]和Song *et al*[14]的研究结果也与上述报道相似. 而印度人群中以HBV基因A型和基因D型最为常见, 其基因A型的患者比基因D型的患者更容易发生肝硬化[15].

1.2 丙肝病毒 据世界卫生组织统计, 全球HCV的平均感染率约为3%, 约1.7-2.0亿人感染HCV[16]. 我国一般人群抗-HCV阳性率为3.2%, 北方(3.6%)高于南方(2.9%). 感染HCV后有60%-80%的患者发展成为慢性携带者, 在其后的10-20年的时间内有20%-30%发展为肝硬化. 我国较大规模的追踪资料显示, HCV慢性化率为70.99%[17]. 与HCV相关的肝纤维化几乎与HCV感染持续时间呈线性关系, 慢性丙型肝炎自然发展过程中HCV准种构成相对稳定[18]. 在日本, HCV感染后发展成肝硬化平均为21.2年; 在美国, 平均为21±10年[19].

HCV RNA水平与病情的关系文献报道不一. Zechini *et al*[20]研究认为, HCV RNA水平与血清ALT呈正相关, 而HCV复制常伴随肝细胞损伤及病情加重. 但Anand *et al*[21]研究认为, 血清ALT水平并不一定与病毒水平相平行, 肝脏病变程度也不一定和病毒水平相关. Jang *et al*[22]报道肝内的HCV RNA水平与肝脏组织学活动密切相关而与抗病毒治疗的反应无关, 而血清HCV RNA水平则与肝脏组织学活动水平无关.

根据HCV基因变异状况可将HCV分为6个主要基因型和50多个基因亚型, 以1a、1b基因型最常见, 几乎呈全球分布. 其中1a基因型主要见于欧美国家, 我国HCV的主要基因型为1b、2a和6型(见于香港). HCV基因型与肝损伤、疾病进展和转归密切相关. 已有不少研究结果显示, 1b基因型感染与肝炎的慢性化进程和严重的肝脏疾病有关[23]. 国内研究表明[24], 1b基因型在慢性肝炎、肝硬化和肝癌中占绝大多数(80%以上), 同时多表现为血清ALT升高, 导致肝细胞损伤. 塞尔维亚最近的一项调查显示[25], 该国西南部地区慢性HCV感染患者中1b型和3a型占优势, 1b型与肝脏疾病进展、高病毒载量相关.

1.3 丁肝病毒 HDV是一种缺陷病毒, 需在HBV感染的基础上才能复制, 以慢性患者与携带者为主. 在美国, 约有7万例HDV携带者, HDV感染所致肝炎约占所有急性肝炎的2%, 所有慢性肝脏疾病的6%. HDV与HBV同时感染和重叠感染后的慢性转化率不同, 前者约5%发展为慢性, 而后者则高达70%. 60%-70%的慢性丁肝发展为肝硬化, 从HDV感染至发展为肝硬化一般需2-15年[26]. Moatter *et al*[27]研究发现, HDV感染可以发生在任何年龄, 但是通常见于年轻成年男性, 基因Ⅰ型常见, 多数患者HBV DNA复制被抑制, 49%的患者出现临床肝硬化.

HDV分为3种基因型, Ⅰ型分布最广泛, Ⅱ型分布于东亚, Ⅲ型主要流行于南美洲地区. Ⅰ型HDV感染及合并HBV持续复制容易导致肝硬化、肝癌甚至死亡等不良临床结局[28]. 台湾学者[29]的研究显示, 年龄大、HDV基因Ⅰ型和HBV基因C型的双重感染患者更容易发生肝硬化或肝癌.

1.4 肝炎病毒的混合或重叠感染 慢性乙型肝炎患者同时感染HCV或HIV是病情恶化的危险因素. 大约有10%-25%的患者同时合并有HBV和HCV感染, 尤其是吸毒者. 在蒙古的慢性肝病患者中, HBV/HCV二重病毒感染占7.7%, HBV/HCV/HDV三重病毒感染占30.0%[30]. HBV和HCV混合感染者比单病毒感染者肝脏损害更严重, 预后更差. 吴君 *et al*[4]对乙肝合并HCV感染患者的5年随访结果表明, HBV和HCV重叠感染更容易发生肝硬化(RR 5.50).

合并HIV感染的慢性乙肝同性恋者与HIV感染患者比较有以下特点[31-34]: (1)HBV复制处于高水平状态, (2)HBeAg自然阴转率降低, (3)增加患肝硬化的机率. Piroth *et al*[35]随访HBV/HIV

■**研发前沿**
本文较为系统地综述了近年来关于病毒性肝炎后肝硬化发生的主要临床危险因素, 包括了病毒的基因分型、与HIV等病毒的重叠感染、目前越来越突出的肝脂肪变性和代谢综合征等.

■应用要点
通过对肝炎后肝硬化临床危险因素研究进展的了解, 更新现有的相关知识结构, 了解相关的危险因素和保护因素, 对高危患者实施有效的提前干预, 把肝炎后肝硬化的临床防治关口提前.

混合感染患者5年, 发现HBeAg转阴率更低, 肝纤维化更明显. 联合使用替诺福韦或阿德福韦、干扰素抗HBV治疗前后病原学、免疫学或生化指标方面的改善不及单纯HBV感染者.

2 病毒性肝炎的临床特点与肝硬化的发生

病毒性肝炎的临床特点与肝硬化的发生有一定的关系. 白宪光 *et al*[3]对一组546例肝炎后肝硬化患者统计分析, 将肝炎后肝硬化的发展模式归为4类: (1)反复发作型, 即肝炎症状反复出现, 肝功反复异常, 占41.8%; (2)间歇型, 即有明确肝炎病史, 间歇数年后发展为肝硬化, 占13.2%; (3)HBV携带型, 即HBV标志物阳性, 肝功正常, 隐匿进展为肝硬化, 占15.1%; (4)无症状型, 即平素无症状, 或血清标志物阴性, 起病或体检即发现为肝硬化, 占30.0%. 他们的统计还表明, 从肝炎至肝硬化, 病程最短1年, 最长38年, 其中肝炎反复发作型为(6.2±4.7)年，间歇型为(9.1±7.4)年, 表明肝炎反复发作者更易发展为肝硬化, 所需时间也更短. 不过, 无症状病毒携带者发展为肝硬化也很常见.

肝炎后肝硬化的发生有明显的年龄及性别特点. 白宪光 *et al*[3]统计高峰年龄在31岁-60岁, 占77.6%; 25岁以下和65岁以上者发病较少, 男女比例为4.31∶1. 吴君 *et al*[4]发现5年间1850例乙肝患者中有306例出现肝硬化(16.54%), 男性发生率为20.61%, 女性9.26%, 男女之比为2.23∶1.

研究表明[36], HCV感染时的年龄是影响慢性丙型肝炎进展的一个主要因素. 感染时的年龄越小, 发展至肝硬化的时间越长, 一般在30年以上, 发展至肝硬化的机会也越低. 相反, 感染时的年龄越大, 发展至肝硬化的危险性明显增加, 病程进展也明显加快. Bialek *et al*[37]指出, HCV感染后达到20年以上将会面临慢性感染的各种并发症包括肝硬化和肝癌, 其危险因素包括感染病毒时的年龄、感染持续时间、大量饮酒、合并HIV或HBV感染以及男性患者. 但也有报道认为[38], 患者的年龄、性别、酒精消耗等因素对肝纤维化的预测结果与组织学的相关性很弱(Kappa = 0.13).

3 饮酒与病毒性肝炎后肝硬化

酒精摄入对乙肝后肝硬化的发生作用是比较肯定的. 吴君 *et al*[4]对贵州省5家医院2250例乙肝患者进行5年的追踪调查显示, 饮酒(250 mL/d以上)是肝硬化发生的危险因素(RR值9.82). Ribes *et al*[39]对地中海地区HBsAg阳性的2352例患者20年的随访结果也显示, 酒精摄入量是促进肝病进展的危险因素之一, *OR*值为6.3(3.1-12.8).

Hutchinson *et al*[40]通过对感染HCV的患者摄入酒精量的多少与发展为肝硬化的危险性做量化Meta分析发现, 大量酒精摄入(定义为至少210-560 g/wk)与肝硬化相关的合并相对危险度为2.33(95% CI 1.67-3.26), 大量酒精摄入相关的HCV肝病的危险性与病程严重程度同步增加即肝纤维化最低(1.63, 95% CI 1.22-2.17), 失代偿性肝硬化最高(3.54, 95% CI 2.14-5.85), 表明慢性HCV感染患者同时饮酒会导致病情恶化. 以往研究表明, 女性HCV感染者往往比男性患者存活时间长, 但是Chen *et al*[41]最近研究发现过量饮酒会使这一优势荡然无存. 在众多HCV相关肝纤维化的危险因素中, 饮酒似乎并不十分重要. Monto *et al*[42]单因素分析显示, 重度饮酒(>50 g/d)与肝纤维化相关, 而中度和少量饮酒则无明显相关. 多因素分析显示, 相对于年龄、血清ALT、炎症活动这些独立危险因素来说, 酒精摄入尚不是肝纤维化的决定因素.

4 肝脂肪变性与肝炎后肝硬化

近年来, 肝脂肪变性、代谢综合征、糖尿病等与肝炎后肝硬化的关系引起人们的重视[43-44]. Hu *et al*[45]对324例美国慢性丙肝患者进行了回顾性调查, 显示肝脂肪变性的发病率为66.0%, Ⅱ/Ⅲ级脂肪变性与Ⅲ/Ⅳ级纤维化和较高组织学活动指数相关. 多因素分析发现肝脂肪变性, 尤其是Ⅱ/Ⅲ级脂肪变性是Ⅲ/Ⅳ级纤维化的独立危险因子. Vadan *et al*[46]对无或仅有适度酒精摄入(<40 g/d)的慢性丙肝者肝纤维化的相关因素进行研究, 单因素和多因素分析均显示高级别(Ⅱ、Ⅲ级)纤维化与肝脂肪变性有关. 但Perumalswami *et al*[47]对美国国家临床健康研究中心病理数据库中1980-2003年有肝脏活检资料的慢性丙肝患者进行统计, 单变量分析显示肝脂肪变性与组织学坏死炎症活动度和纤维化有关, 而多变量分析发现肝脂肪变性与纤维化无关. 有二次肝活检且纤维化加重者也只与年龄大、门静脉周围炎症、ALT增高相关, 与肝脂肪变无关.

有关肝脂肪变性与乙肝后肝硬化的报道不多, 两者的关系尚不够明确. Bondini *et al*[48]观察了慢性HBV感染者的非酒精性脂肪肝情况, 肝脏活检显示19%的患者合并有非酒精性脂肪肝, 13%的患者合并有非酒精性肝炎, 86%的患者有不同程度的肝纤维化, 39%的患者有严重的肝纤维化. 相关因素的分析显示, HBV感染合并非

酒精性肝炎与代谢综合征的几个要素(肥胖、高血压和高脂血症)相关, 肝纤维化除与宿主和病毒因素有关以外, 还与腹部肥胖相关. Kim *et al*[49]研究显示, HBV表达的x蛋白(HBx)能上调肝细胞内的脂质基因合成脂酶类的表达, 认为可能是乙肝相关的脂肪肝分子机制. 但也有研究显示肝脂肪变性与乙肝后肝硬化的关系并不密切. Thomopoulos *et al*[50]调查了233例单纯性慢性HBV感染患者(排除合并其他病毒感染、其他原因的肝病及大量饮酒), 发现肝脂肪变性与空腹血糖水平和超重(体质量指数≥25)独立相关, 而与肝纤维化分期、炎症分级及少量酒精摄入等不相关.

5 结论

人群中肝炎病毒感染者众多, 但发展为肝炎后肝硬化者毕竟是少数, 其机制尚未完全阐明. 宿主因素及环境因素都是决定肝炎后肝硬化发生的重要危险因素. 从临床角度而言, 了解和掌握肝炎病毒感染后发展为肝硬化的各种危险因素, 特别是临床危险因素, 对于预防和治疗肝炎后肝硬化有深远的意义.

6 参考文献

1 Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006; 45: 529-538

2 刘伟, 罗蝉. 病理确诊肝硬化的临床高危因素调查. 现代预防医学 2001; 28: 314-315

3 白宪光, 张丽环, 何文革, 连建奇. 546例肝炎后肝硬化患者的流行病学和临床特点. 第四军医大学学报 2000; 21: 820-823

4 吴君, 程明亮, 丁一生, 刘仁才, 李佳, 王万灵, 胡莲. 病毒性肝炎肝硬变危险因素的5年追踪调查. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1365-1367

5 Yuen MF, Yuan HJ, Wong DK, Yuen JC, Wong WM, Chan AO, Wong BC, Lai KC, Lai CL. Prognostic determinants for chronic hepatitis B in Asians: therapeutic implications. *Gut* 2005; 54: 1610-1614

6 Matos CA, Perez RM, Lemos LB, Medina-Pestana JO, Lanzoni VP, Alberto FL, Moreira ES, Silva AE, Ferraz ML. Factors associated with the intensity of liver fibrosis in renal transplant patients with hepatitis B virus infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 653-657

7 Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, Shih WL, Kao JH, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 265-272

8 Mahmood S, Niiyama G, Kamei A, Izumi A, Nakata K, Ikeda H, Suehiro M, Kawanaka M, Togawa K, Yamada G. Influence of viral load and genotype in the progression of Hepatitis B-associated liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; 25: 220-225

9 Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006; 130: 678-686

10 Toan NL, Song le H, Kremsner PG, Duy DN, Binh VQ, Koeberlein B, Kaiser S, Kandolf R, Torresi J, Bock CT. Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam. *Hepatology* 2006; 43: 1375-1384

11 林裕龙, 柳青, 彭永正, 冯桂湘, 侯金林. PCR-RFLP检测肝癌和肝硬化患者乙型肝炎病毒基因型. 中华微生物学和免疫学杂志 2004; 24: 330-331

12 张汉荣, 谈国蕾, 孙梅, 曹利, 刘新钰, 赵巍. HBV C基因启动子变异及基因型与肝硬化的相关性研究. 山东医药 2004; 44: 4-5

13 Yotsuyanagi H, Hino K, Tomita E, Toyoda J, Yasuda K, Iino S. Precore and core promoter mutations, hepatitis B virus DNA levels and progressive liver injury in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2002; 37: 355-363

14 Song BC, Cui XJ, Kim HU, Cho YK. Sequential accumulation of the basal core promoter and the precore mutations in the progression of hepatitis B virus-related chronic liver disease. *Intervirology* 2006; 49: 266-273

15 Kumar A, Kumar SI, Pandey R, Naik S, Aggarwal R. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24: 19-22

16 Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2004; 24 Suppl 2: 3-8

17 魏来, 王齐欣, 徐小元, 万华, 高燕, 田秀兰, 于敏, 孙德贵, 范春蕾, 金剑, 樊文梅, 尹利民, 朱万孚, 陈红松, 庄辉, 王宇. 河北省固安县某农村单采浆献血员丙型肝炎病毒感染的追踪研究. 北京大学学报(医学版) 2002; 34: 574-578

18 王齐欣, 魏来, 高燕, 陈志军, 孙德贵, 蒋栋, 徐小元, 陈红松, 王宇. 丙型肝炎病毒感染自然过程中准种的构成的变化. 中华医学杂志 2003; 83: 841-843

19 Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S35-S46

20 Zechini B, Pasquazzi C, Aceti A. Correlation of serum aminotransferases with HCV RNA levels and histological findings in patients with chronic hepatitis C: the role of serum aspartate transaminase in the evaluation of disease progression. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 891-896

21 Anand BS, Velez M. Assessment of correlation between serum titers of hepatitis C virus and severity of liver disease. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2409-2411

22 Jang JY, Kim YS, Kim SG, Kim YS, Cho YD, Lee JS, Jin SY, Lee MS, Kim JH, Shim CS, Kim BS. Clinical significance of intrahepatic HCV RNA level in chronic HCV infection. *Korean J Hepatol* 2006; 12: 515-523

23 王琳, 徐东平, 张玲霞. 丙型肝炎病毒基因型分型及临床意义. 肝脏 2006; 11: 416-417

24 Lu L, Nakano T, He Y, Fu Y, Hagedorn CH, Robertson BH. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants. *J Med Virol* 2005; 75: 538-549

25 Svirtlih N, Delic D, Simonovic J, Jevtovic D, Dokic L, Gvozdenovic E, Boricic I, Terzic D,

■同行评价

本文文章较新颖, 内容丰富, 数据翔实.

Pavic S, Neskovic G, Zerjav S, Urban V. Hepatitis C virus genotypes in Serbia and Montenegro: the prevalence and clinical significance. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 355-360
26 应楹, 张常晶, 姚定康. 肝硬化病因流行病学研究进展. 人民军医 2001; 44: 594-596
27 Moatter T, Abbas Z, Shabir S, Jafri W. Clinical presentation and genotype of hepatitis delta in Karachi. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2604-2607
28 Wu JC. Functional and clinical significance of hepatitis D virus genotype II infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 307: 173-186
29 Su CW, Huang YH, Huo TI, Shih HH, Sheen IJ, Chen SW, Lee PC, Lee SD, Wu JC. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology* 2006; 130: 1625-1635
30 Tsatsralt-Od B, Takahashi M, Nishizawa T, Endo K, Inoue J, Okamoto H. High prevalence of dual or triple infection of hepatitis B, C, and delta viruses among patients with chronic liver disease in Mongolia. *J Med Virol* 2005; 77: 491-499
31 Sheng WH, Hung CC, Kao JH, Chang SY, Chen MY, Hsieh SM, Chen PJ, Chang SC.Impact of hepatitis D virus infection on the long-term outcomes of patients with hepatitis B virus and HIV coinfection in the era of highly active antiretroviral therapy: a matched cohort study. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 988-995
32 Nunez M, Ramos B, Diaz-Pollan B, Camino N, Martin-Carbonero L, Barreiro P, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. Virological outcome of chronic hepatitis B virus infection in HIV-coinfected patients receiving anti-HBV active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22: 842-848
33 Matthews GV, Cooper DA, Dore GJ. Improvements in parameters of end-stage liver disease in patients with HIV/HBV-related cirrhosis treated with tenofovir. *Antivir Ther* 2007; 12: 119-122
34 Benhamou Y, Fleury H, Trimoulet P, Pellegrin I, Urbinelli R, Katlama C, Rozenbaum W, Le Teuff G, Trylesinski A, Piketty C; TECOVIR Study Group. Anti-hepatitis B virus efficacy of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-infected patients. *Hepatology* 2006; 43: 548-555
35 Piroth L, Sene D, Pol S, Goderel I, Lacombe K, Martha B, Rey D, Loustau-Ratti V, Bergmann JF, Pialoux G, Gervais A, Lascoux-Combe C, Carrat F, Cacoub P. Epidemiology, diagnosis and treatment of chronic hepatitis B in HIV-infected patients (EPIB 2005 STUDY). *AIDS* 2007; 21: 1323-1331
36 Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S47-S56
37 Bialek SR, Terrault NA. The changing epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2006; 10: 697-715
38 Myers RP, Hilsden RJ, Lee SS. Historical features are poor predictors of liver fibrosis in Canadian patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2001; 8: 249-255
39 Ribes J, Cleries R, Rubio A, Hernandez JM, Mazzara R, Madoz P, Casanovas T, Casanova A, Gallen M, Rodriguez C, Moreno V, Bosch FX. Cofactors associated with liver disease mortality in an HBsAg-positive Mediterranean cohort: 20 years of follow-up. *Int J Cancer* 2006; 119; 687-694
40 Hutchinson SJ, Bird SM, Glodberg DJ. Influence of alcohol on the progression of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 1150-1159
41 Chen CM, Yoon YH, Yi HY, Lucas DL.Alcohol and hepatitis C mortality among males and females in the United States: a life table analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: 285-292
42 Monto A, Patel K, Bostrom A, Pianko S, Pockros P, McHutchison JG, Wright TL. Risks of a range of alcohol intake on hepatitis C-related fibrosis. *Hepatology* 2004; 39: 826-834
43 Cholet F, Nousbaum JB, Richecoeur M, Oger E, Cauvin JM, Lagarde N, Robaszkiewicz M, Gouérou H. Factors associated with liver steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28: 272-278
44 Hirche TO, Ignee A, Hirche H, Schneider A, Dietrich CF. Evaluation of hepatic steatosis by ultrasound in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2007; 27: 748-757
45 Hu KQ, Kyulo NL, Esrailian E, Thompson K, Chase R, Hillebrand DJ, Runyon BA. Overweight and obesity, hepatic steatosis, and progression of chronic hepatitis C: a retrospective study on a large cohort of patients in the United States. *J Hepatol* 2004; 40: 147-154
46 Vadan R, Gheorghe L, Becheanu G, Iacob R, Iacob S, Gheorghe C. Predictive factors for the severity of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C and moderate alcohol consumption. *Rom J Gastroenterol* 2003; 12: 183-187
47 Perumalswami P, Kleiner DE, Lutchman G, Heller T, Borg B, Park Y, Liang TJ, Hoofnagle JH, Ghany MG. Steatosis and progression of fibrosis in untreated patients with chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 2006; 43: 780-787
48 Bondini S, Kallman J, Wheeler A, Prakash S, GramLich T, Jondle DM, Younossi ZM. Impact of non-alcoholic fatty liver disease on chronic hepatitis B. *Liver Int* 2007; 27: 607-611
49 Kim KH, Shin HJ, Kim K, Choi HM, Rhee SH, Moon HB, Kim HH, Yang US, Yu DY, Cheong J. Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis via transcriptional activation of SREBP1 and PPARgamma. *Gastroenterology* 2007; 132: 1955-1967
50 Thomopoulos KC, Arvaniti V, Tsamantas AC, Dimitropoulou D, Gogos CA, Siagris D, Theocharis GJ, Labropoulou-Karatza C. Prevalence of liver steatosis in patients with chronic hepatitis B: a study of associated factors and of relationship with fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 233-237

编辑 程剑侠 电编 李海寅

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3435-3438
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

血糖变化对糖尿病大鼠胃排空功能与leptin表达的影响

卢 静, 魏良洲, 田字彬, 杨振中

卢静, 魏良洲, 田字彬, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003
杨振中, 中国航天员科研训练中心 北京市 100094
通讯作者: 魏良洲, 266003, 山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院消化内科. weiliangzhou62@126.com
电话: 0532-82911302
收稿日期: 2007-08-11 修回日期: 2007-10-22

Effect of blood glucose variation on gastric emptying and leptin expression in diabetic rats

Jing Lu, Liang-Zhou Wei, Zi-Bin Tian, Zhen-Zhong Yang

Jing Lu, Liang-Zhou Wei, Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Zhen-Zhong Yang, Astronaut Research and Training Center of China, Beijing 100094, China
Correspondence to: Liang-Zhou Wei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. weiliangzhou62@126.com
Received: 2007-08-11 Revised: 2007-10-22

Abstract

AIM: To investigate the relationship between delayed gastric emptying and gastric leptin expression at different stages of diabetes.

METHODS: Forty Wistar rats were randomly divided into four groups: 1-wk normal control group (NC1 group, n = 6), 4-wk normal control group (NC2 group, n = 6), 1-wk diabetes mellitus group (DM1 group, n = 14), and 4-wk diabetes mellitus group (DM2 group, n = 14). Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). One and 4 wk after STZ injection, gastric emptying was measured by intragastric administration of phenol red, and expression of serum and gastric leptin was detected by radioimmunoassay.

RESULTS: One week after STZ injection, body weight did not differ between the DM1 and NC1 groups. The level of serum leptin in the DM1 group decreased compared with that in the NC1 group (0.6 ± 0.40 μg/L *vs* 2.9 ± 0.32 μg/L), but gastric emptying (72.07% ± 9.67% *vs* 33.04% ± 4.07%) and gastric leptin level (11.041 ± 1.422 μg/L *vs* 8.529 ± 1.450 μg/L) in the DM1 group increased significantly compared with the NC1 group. Four weeks after STZ injection, body weight, gastric emptying rate, serum and gastric leptin levels in the DM2 group decreased significantly compared with those in the NC2 group (162.25 ± 19.74 g, 15.81% ± 3.55%, 0.4 ± 0.22 μg/L, 7.772 ± 1.751 μg/L *vs* 329.42 ± 11.06 g, 31.87% ± 2.87%, 3.3 ± 0.25 μg/L, 11.433 ± 1.799 μg/L; $P < 0.05$).

CONCLUSION: The decreased serum leptin levels in short-term hyperglycemia may participate in rapid gastric emptying and increase ingestion, which can maintain energy balance in the body. Long-term hyperglycemia may inhibit the expression and release of serum and gastric leptin, to stimulate food intake to maintain energy balance.

Key Words: Diabetes mellitus; Gastroparesis; Gastric emptying; Leptin

Lu J, Wei LZ, Tian ZB, Yang ZZ. Effect of blood glucose variation on gastric emptying and leptin expression in diabetic rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3435-3438

摘要

目的: 探讨不同病期糖尿病胃排空延迟与leptin表达的关系.

方法: 将40只Wistar大鼠随机分为对照饲养1 wk组(NC1组, n = 6)、对照饲养4 wk组(NC2组; n = 6)、糖尿病造模1 wk组(DM1组, n = 14)和糖尿病造模4 wk组(DM2组, n = 14). 腹腔注射链脲佐菌素(STZ)制备糖尿病大鼠模型, 分别于给药1 wk和4 wk后用酚红灌胃法检测胃排空, 采用放射免疫法检测大鼠血清及胃组织leptin表达.

结果: 注射STZ 1 wk后, 与NC1组相比, DM1组大鼠的体质量无显著变化, 胃排空率显著加快(72.07%±9.67% *vs* 33.04%±4.07%), 血清leptin含量减少(0.6±0.40 μg/L *vs* 2.9±0.32 μg/L), 胃组织leptin含量显著增加(11.041±

■**背景资料**
糖尿病胃轻瘫可严重影响患者的生活质量. leptin与糖尿病关系密切, 并有资料表明leptin可通过中枢和外周作用抑制胃排空. 本文通过研究血糖变化对糖尿病大鼠胃排空功能与leptin表达的影响来探讨不同病期糖尿病胃排空延迟与leptin表达的关系.

■研发前沿
leptin是近年来新发现的一种主要由脂肪分泌的脑肠肽, 广泛分布于全身各组织器官, 具有调节能量平衡和代谢水平等多种生物学作用. 目前关于糖尿病时leptin受体的变化尚不完全清楚, 对其进一步研究有助于更好的了解leptin在糖尿病胃轻瘫发病机制中的作用.

1.422 μg/L *vs* 8.529±1.450 μg/L). 注射STZ 4 wk后, 与NC2组相比, DM2组大鼠的体质量(162.25±19.74 g *vs* 329.42±11.06 g)和胃排空率显著下降(15.81%±3.55% *vs* 31.87%±2.87%), 血清leptin含量(0.4±0.22 μg/L *vs* 3.3±0.25 μg/L)和胃组织leptin的表达显著减少(7.772±1.751 μg/L *vs* 11.433±1.799 μg/L).

结论: 短期血糖升高可能通过降低血清瘦素水平来增加摄食, 加快胃排空以补充热量摄入, 维持能量平衡, 而胃组织leptin的增加可能是机体反馈性的作用. 长期高血糖可能通过抑制血清及胃组织leptin的表达和释放以增加摄食, 维持能量平衡.

关键词: 糖尿病; 胃轻瘫; 胃排空; 瘦素

卢静, 魏良洲, 田字彬, 杨振中. 血糖变化对糖尿病大鼠胃排空功能与leptin表达的影响. 世界华人消化杂志. 2007; 15(32): 3435-3438
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3435.asp

0 引言

糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis, DGP)是指糖尿病患者无机械性梗阻存在时并发的胃动力障碍和胃排空延迟, 临床上出现恶心、呕吐、早饱、腹胀、腹痛、食欲不振等症状[1]. 据报道,糖尿病胃轻瘫的发病率高达30%-50%[2], 严重影响患者的生活质量. 其病理生理机制相当复杂, 大多学者认为糖尿病胃轻瘫与多种因素有关, 如高血糖、自主神经病变、胃肠激素分泌异常、胃肠平滑肌变性等, 至今尚未完全阐明. 瘦素 (leptin)是近年来新发现的一种主要由脂肪分泌的脑肠肽, 广泛分布于全身各组织器官, 具有调节能量平衡和代谢水平等多种生物学作用. 目前, 众多学者认为leptin与糖尿病关系密切[3], 并有资料表明leptin可通过中枢和外周作用抑制胃排空[4]. 本文通过研究血糖变化对糖尿病大鼠胃排空功能与leptin表达的影响来探讨不同病期糖尿病胃排空延迟与leptin表达的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级♂Wistar大鼠40只, 体质量160-180 g, 购自青岛市动物实验中心, 随机分为对照饲养1 wk组(NC1组, n = 6)、对照饲养4 wk组(NC2组, n = 6)、糖尿病造模1 wk组(DM1组, n = 14)和糖尿病造模4 wk组(DM2组, n = 14). 大鼠适应性饲养1 wk后, 禁食8 h. DM组大鼠以60 mg/kg的剂量一次性ip 10 g/L链脲佐菌素(streptozotocin, STZ; 购自美国Sigma公司, 用0.1 mmol/L、pH4.4的柠檬酸缓冲液配制而成), NC组大鼠注射相同体积的柠檬酸缓冲液. 注射72 h后剪尾取血, 用血糖仪测随机血糖, 血糖值≥16.7 mmol/L确定为糖尿病模型建立. 注射STZ 1 wk后取NC1组和DM1组大鼠进行实验, NC2组和DM2组大鼠继续喂养3 wk.

1.2 方法 大鼠禁食不禁水16 h, 称体质量, 断尾测空腹血糖. 胃排空的测定: 给予大鼠50 mg/dL的酚红溶液2 mL ig, 15 min后将其处死, 剖腹, 结扎贲门和幽门, 取出整个鼠胃, 沿胃大弯切开, 以蒸馏水冲洗胃内容物, 定容为20 mL. 而后加入0.5 mol/L NaOH 20 mL搅拌混匀, 静置1 h, 取5 mL上清液加入200 mL/L三氯乙酸0.5 mL去蛋白, 3500 r/min 4℃离心10 min. 取上清液用分光光度计在560 nm波长下测定吸光度值, 另取酚红溶液2 mL, 先后加入蒸馏水18 mL、0.5 mol/L NaOH 20 mL、20 mL/L三氯乙酸4 mL搅拌混匀, 测定吸光度值. 大鼠胃排空率 = (1-实测酚红吸光度值/标准酚红吸光度值)×100%.

血清和胃组织leptin测定, 处死大鼠, 剖胸, 心脏取血5 mL, 不抗凝, 在4℃环境下静置2 h, 3000 r/min 4℃离心10 min, 留取上清液, -20℃冰箱保存待测. 取约100 mg的胃组织, 称质量后立即置于煮沸的生理盐水1 mL中煮沸3 min, 加入0.1 mol/L冰醋酸0.5 mL于匀浆器中进行匀浆, 用0.1 mol/L NaOH 0.5 mL中和, 3500 r/min 4℃离心20 min, 取上清液贮于-20℃待测. 采用放射免疫法测定血清和胃组织leptin含量(leptin测定试剂盒由北京华英生物技术研究所提供).

统计学处理 数据均以mean±SD表示, 应用SPSS11.5统计软件进行分析, 组间比较采用t检验法, 显著性水平取P<0.05.

2 结果

2.1 大鼠一般状况 大鼠ip STZ 3 d后开始出现多饮、多食、多尿症状. 与NC1组大鼠相比, DM2组大鼠出现明显精神紧张、躁动不安、体质量下降, 至4 wk时DM2组大鼠出现精神萎靡、活动迟缓、明显消瘦、懒动、毛色干枯无光泽, 仍有多饮、多食、多尿, 且有2只出现白内障. 实验期间DM2组大鼠死亡1只, DM1组造糖尿病模型不成功3只.

2.2 各组大鼠体质量、空腹血糖及胃排空率的比较 注射STZ 1 wk后, 与NC1组相比, DM1组大鼠空腹血糖显著升高(P<0.01), 体质量无明显改变(P>0.05), 胃排空率显著加快(P<0.01). 注射

表 1 各组大鼠体质量、空腹血糖及胃排空率的比较(mean ± SD)

分组	样本量 *n*	体质量 (g)	空腹血糖 (mmol/L)	胃排空率 (%)	血清leptin (μg/L)	胃组织leptin (μg/L)
NC1	6	168.85 ± 19.91	5.90 ± 0.94	33.04 ± 4.07	2.9 ± 0.32	8.529 ± 1.450
DM1	11	161.63 ± 17.18	22.99 ± 4.15[b]	72.07 ± 9.67[b]	0.6 ± 0.40[a]	11.041 ± 1.422[b]
NC2	6	329.42 ± 11.06	6.38 ± 1.50	31.87 ± 2.87	3.3 ± 0.25	11.433 ± 1.799
DM2	13	162.25 ± 19.74[c]	25.51 ± 4.08[d]	15.81 ± 3.55[d]	0.4 ± 0.22[d]	7.772 ± 1.751[d]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$与NC1相比; [c]$P<0.05$, [d]$P<0.01$与NC2组相比.

STZ 4 wk后, 与NC2组相比, DM2组大鼠空腹血糖显著升高($P<0.01$), 体质量明显下降($P<0.05$), 胃排空率显著下降($P<0.01$)(表1).

2.3 各组大鼠血清瘦素及胃组织瘦素表达的变化 如表1所示, 注射STZ 1 wk后, 与NC1组大鼠比较, DM1组大鼠血清leptin表达减少($P<0.05$), 胃组织leptin的表达明显增加($P<0.01$). 注射STZ 4 wk后, 与NC2组大鼠比较, DM2组大鼠血清leptin及胃组织leptin的表达均明显减少($P<0.01$).

3 讨论

大鼠ip STZ可选择性破坏胰腺β细胞, 制备的模型具有高血糖、体质量减轻、多饮、多食、多尿的特点, 可用于糖尿病慢性并发症的研究. 本实验制备的模型表现与此完全相符. 相关研究显示, 约半数糖尿病患者存在胃排空障碍[2]. 高血糖是胃排空障碍的一个重要发病因素. 高血糖可抑制消化间期移行性复合运动(migrating motor complex, MMC)的产生, 并通过抑制迷走-迷走反射减慢固体及液体的胃排空速度, 其减慢程度与血糖水平有关[5].

leptin是近年来新发现的一种由肥胖基因编码, 主要由白色脂肪组织分泌的蛋白类激素. leptin及其受体广泛存在于全身各组织器官, 如脂肪组织、心脏、胰腺等. 近年来研究发现leptin及其受体也存在于胃黏膜中[6-7]. leptin可能主要通过两条途径抑制胃排空, 一是分泌到血液及通过血脑屏障主要作用于下丘脑的OB-Rb, 进而抑制下丘脑弓状核表达和分泌神经肽Y(NPY)从而抑制食欲, 延缓胃排空. 二是通过内外分泌作用到消化道与其受体OB-Rb结合, 与胆囊收缩素(CCK)协同作用及刺激CCK分泌来抑制胃排空, 他们通过激活迷走神经从而延缓信号向脑的传导. 胃组织leptin的这种途径可能为食物摄取后CCK介导的早期胃排空作用有密切关系[4,9]. Martinez *et al*[10]将3 mg leptin注入大鼠脑室,可使5 h累积食物摄入量减少39%, 胃转运减少50%, 提示leptin对胃排空有一定的抑制作用. 一些研究表明, 向大鼠右侧脑室及胃内注入leptin后, 胃排空均延缓, 且证实leptin对胃运动的外周作用可能是通过与胆囊收缩素(CCK)协同作用并刺激CCK分泌, 进而激活迷走神经, 延缓信号向脑的传导, 共同抑制胃排空和短时间的摄食[4,9]. leptin除了抑制胃肠动力和摄食外, 还可以调节能量代谢, 并与长期高血糖引起的高胰岛素水平具有密切相关性, 表现为高胰岛素血症常常伴有瘦素水平的升高[11-12].

在我们的实验中, 注射STZ 1 wk后, 与NC1组大鼠相比, DM1组大鼠胃排空速率明显加快, 血清leptin减少而胃组织leptin明显增加. 由于leptin可抑制胃肠运动、延缓胃排空, 因此在糖尿病早期血清leptin表达减少将直接减弱瘦素在中枢对POMC/CORT神经元和NPY/AgRP神经元的效用, 引起近端胃舒张功能和远端胃运动收缩功能减弱, 最终可导致胃对液体的胃排空加快[13]. 推测血清leptin表达的减少可能是引起急性高血糖期胃排空加快的原因之一. 此外胃组织leptin明显增加可能为机体的一种保护机制, 对明显加快的胃排空起一定的抑制作用, 从而减少摄食的过度增加, 防止血糖进一步升高.

注射STZ 4 wk后, 与NC2组大鼠相比, DM2组大鼠胃排空率显著减慢, 血清leptin及胃组织leptin含量显著减少, 说明长期高血糖可抑制leptin的表达和释放. 血清及胃组织leptin表达的减少将可能直接减弱瘦素中枢及外周对胃排空的影响, 因此糖尿病晚期胃排空延缓可能与leptin无显著相关性. 糖尿病晚期胃排空减慢, 其影响因素可能与长期高血糖及其导致的一系列并发症相关, 内脏植物神经病变、胃肠平滑肌病变及其他胃肠激素的紊乱等相关[5,12].

此外, 在糖尿病早期胃组织leptin的增加可能与机体的自我保护机制密切相关, 代偿性地

■相关报道

Martinez *et al*研究表明, leptin对胃排空有一定的抑制作用. 另外一些研究表明, 向大鼠右侧脑室及胃内注入leptin后, 胃排空均延缓, 且证实leptin对胃运动的外周作用可能是通过与CCK协同作用并刺激CCK分泌, 进而激活迷走神经, 延缓信号向脑的传导, 共同抑制胃排空和短时间的摄食.

■同行评议
本文选题新颖, 层次清楚, 内容一般, 建议作进一步的研究.

刺激leptin分泌增加. 晚期leptin显著减少的影响因素可能为: (1)DM2组大鼠较NC2组大鼠体质量明显下降, 体内脂肪含量可能相应减少, 而脂肪组织是分泌leptin的主要场所, 故相应的leptin含量减少. (2)1型糖尿病大鼠模型其正常胰腺遭到破坏不能代偿或代偿不良, 因此高血糖不能刺激胰岛分泌大量胰岛素, 胰岛素水平下降, 不能有效地刺激脂肪组织分泌leptin[11-12]. (3)糖尿病晚期大鼠明显消瘦, 机体处于能量负平衡状态, 机体可能代偿性的下调leptin的表达, 进而增加摄食, 维持能量平衡. (4)糖尿病大鼠模型出现明显的血清leptin水平的下降, 循环leptin的减少使得外部到达胃组织的leptin减少.

通过以上研究我们认为, 1型糖尿病早期可能通过降低血清leptin水平来增加摄食, 加快胃排空以补充热量摄入, 维持能量平衡. 而胃组织leptin的增加可能是机体的一种反馈性的保护机制. 长期高血糖可能通过抑制血清及胃组织leptin的表达、释放来增加摄食, 维持能量平衡. 目前关于糖尿病时瘦素受体的变化尚不完全清楚, 对其进一步研究有助于更好的了解leptin在糖尿病胃轻瘫发病机制中的作用.

4 参考文献

1 Kong MF, Horowitz M. Diabetic gastroparesis. *Diabet Med* 2005; 22: 13-18
2 Bhatia M. Apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis: is it good or bad? *J Cell Mol Med* 2004; 8: 402-409
3 Toyoshima Y, Gavrilova O, Yakar S, Jou W, Pack S, Asghar Z, Wheeler MB, LeRoith D. leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes. *Endocrinology* 2005; 146: 4024-4035
4 Cakir B, Kasimay O, Devseren E, Yegen BC. leptin inhibits gastric emptying in rats: role of CCK receptors and vagal afferent fibers. *Physiol Res* 2007; 56: 315-322
5 Rayner CK, Samsom M, Jones KL, Horowitz M. Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control. *Diabetes Care* 2001; 24: 371-381
6 Cammisotto PG, Renaud C, Gingras D, Delvin E, Levy E, Bendayan M. Endocrine and exocrine secretion of leptin by the gastric mucosa. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 851-860
7 Cammisotto PG, GingrasD, RenaudC, Levy E, Bendayan M. Secretion of soluble leptin receptors by exocrine and endocrine cells of the gastric mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G242-G249
8 Sainsbury A, Cooney GJ, Hemog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002; 16; 623-637
9 Sanchez J, Oliver P, Miralles O, Ceresi E, Pico C, Palou A. leptin orally supplied to ueonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology* 2005; 146: 2575-2582
10 Martinez V, Barrachina MD, Wang L,Tache Y. Intra-cerebroventricular leptin inhibits gastric emptying of a solid nutrient meal in rats. *Neuroreport* 1999, 10: 3217-3221
11 Cong L, Chen K, Li J, Gao P, Li Q, Mi S, Wu X, Zhao AZ. Regulation of adiponectin and leptin secretion and expression by insulin through a PI3K-PDE3B dependent mechanism in rat primary adipocytes. *Biochem J* 2007; 403: 519-525
12 Cakir M, Sari R, Tosun O, Karayalcin U. leptin response to oral glucose tolerance test in obese and nonobese premenopausal women. *Endocr Res* 2005; 31: 1-8
13 周吕, 王礼建, 袁勃, 王玲. 下丘脑瘦素对大鼠胃运动的作用. 诊断学理论与实践 2006; 5: 20-23

编辑 程剑侠 电编 李海寅

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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3439-3442
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

小鼠空肠Cajal间质细胞的分离、培养和亚甲蓝活染选择性标记

祝 炼, 余保平, 吴志轩, 夏 虹

祝炼, 湖北省孝感市妇幼保健院内儿科 湖北省孝感市 432000
余保平, 吴志轩, 夏虹, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
通讯作者: 余保平, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. yubaoping62@yahoo.com.cn
电话: 027-68759391
收稿日期: 2007-08-27 修回日期: 2007-10-29

Culture of interstitial cells of Cajal from neonatal mouse jejunum and selective live staining with methylene blue

Lian Zhu, Bao-Ping Yu, Zhi-Xuan Wu, Hong Xia

Lian Zhu, Department of Pediatrics, Xiaogan Maternal and Child Health Hospital, Xiaogan 432000, Hubei Province, China
Bao-Ping Yu, Zhi-Xuan Wu, Hong Xia, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Bao-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yubaoping62@yahoo.com.cn
Received: 2007-08-27 Revised: 2007-10-29

Abstract

AIM: To obtain intestinal pacemaker cells through dissection of the myenteric plexus of mouse jejunum, and to identify interstitial cells of Cajal (ICC) AP through selective staining with methylene blue for further electrophysiological study.

METHODS: Jejunum was removed from newborn CD-1 mice. The longitudinal muscle layer containing the myenteric plexus was cut into small pieces for culture. Live cells were stained with methylene blue and c-kit antibody.

RESULTS: Cells grown from explant culture and characterized by phenotypic features were identified as pacemaker cells, i.e. ICC-AP. Cells stained with methylene blue were also positive for c-kit antibody, whereas live neurons, smooth muscle cells and other types of ICC were not stained with methylene blue.

CONCLUSION: Pacemaker cells, i.e. ICC-AP, can be obtained through selective dissection. Methylene blue can be used for live staining identification of ICC-AP and, therefore, provides a model for further functional study.

Key Words: Jejunum; Interstitial cells of Cajal; Explant culture; Methylene blue

Zhu L, Yu BP, Wu ZX, Xia H. Culture of interstitial cells of Cajal from neonatal mouse jejunum and selective live staining with methylene blue. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3439-3442

摘要

目的: 探讨组织解剖剥离小鼠空肠起博细胞的培养和亚甲蓝选择性标记鉴定方法, 为区分Cajal间质细胞亚型及其功能研究提供条件.

方法: 取CD1新生小鼠的空肠组织, 采用精细快速剥离, 取含有肌间丛及肌间丛Cajal间质细胞的纵行肌组织块进行培养. 新生发的细胞在成活状态下用亚甲蓝和c-kit特异性抗体标记, 证实细胞类型.

结果: 剥离组织所含Cajal间质细胞主要为肌间丛Cajal间质细胞(ICC-AP), 即起博细胞, 并具有其固有特征, 着色亚甲蓝细胞被c-kit抗体荧光染色证实为Cajal间质细胞, 而神经细胞、平滑肌细胞及其他亚型Cajal间质细胞在成活状态下均不被亚甲蓝着色.

结论: 组织解剖剥离能选择性获取空肠肌间丛起博细胞, 活染亚甲蓝标记能特异性区分出肌间丛起博细胞并可用于进一步的功能研究.

关键词: 空肠; Cajal间质细胞; 分离培养; 亚甲蓝

祝炼, 余保平, 吴志轩, 夏虹. 小鼠空肠Cajal间质细胞的分离、培养和亚甲蓝活染选择性标记. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3439-3442
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3439.asp

■**背景资料**
胃肠道Cajal间质细胞(ICC)的原代培养是进行发育和电生理功能研究的基础. 传统的酶解法, 破坏了细胞表面的kit蛋白, 且不能区分ICC的亚型.

0 引言

消化道Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal,

■研发前沿
原代培养ICC后，研究神经递质等对ICC生长发育和电生理功能的调节是当前的研究热点. 但如何研究某一特定类型ICC是亟需解决的问题.

ICC)因分布于管壁的不同层面而被相应命名[1-2]. 不同区域的Cajal间质细胞有不同的结构和功能. 位于空肠肌间丛的Cajal间质细胞有起搏功能, 能产生节律性慢波而直接决定胃肠的蠕动及频律, 同时还参与神经肌肉间的信号传递和调节, 与多种消化道动力障碍性疾病密切相关[3]. 目前国内外学者虽可以成功的进行胃肠Cajal间质细胞的分离和培养, 但所采用的酶解法破坏了该细胞表面的kit蛋白, 并且不能区分Cajal间质细胞的亚型. 我们尝试新生小鼠空肠肌间丛Cajal间质细胞(ICC-AP)的分离、培养, 并采用亚甲蓝选择性标记及c-kit特异性染色, 为进一步开展消化道动力障碍性疾病研究积累了重要经验.

1 材料和方法

1.1 材料 CD-1小鼠(2-6 d), 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 雌雄不拘. PSS的成分(mmol/L): NaCl 134.8, KCl 4.5, HEPES 10, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, Glucose 10, 以NaOH调节pH值至7.35. M-199培养基、胎牛血清购自Gibco公司, Alexa488标记的大鼠抗小鼠c-kit抗体购自Santa cruz公司, 亚甲蓝购自Sigma公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞分离和培养: 取新生鼠近端空肠约1.5 cm, 固定两端, 于横径两侧经浆膜各剪一小切口, 用镊子沿管壁将口端边缘轻轻提起牵拉, 呈脱套式剥离. 被剥离的肌块随即放置于M-199培养基中, 快速切成约0.5 mm^2小块, 然后分别移至含有盖玻片的12孔培养板中, 在37℃含氧950 mL/L、二氧化碳50 mL/L的温箱内孵育. 培养基中含有100 mL/L胎牛血清, 100 kU/L青、链霉素和2 mmol/L谷氨酸胺.

1.2.2 亚甲蓝和c-kit抗体活染: 经过3-4 d的孵育, 种植肌块新生细胞向四周生发. 置换培养液体为含亚甲蓝(Methylene blue, 0.1 mmol/L)的PSS, 室温下连续充氧1 h后于倒置显微镜下观察. 然后加入荧光Alexa488标记的鼠c-kit mAb以证实亚甲蓝活染着色的特异性. 其主要方法如下, 50 mL/L的羊血清孵育30 min, PSS冲洗5 min×3 次, 加荧光标记的c-kit抗体室温下孵化1 h, PSS冲洗5 min ×3次, 然后在荧光显微镜下观察.

2 结果

培养3 d后的组织块形成细胞界限清楚、层次明显的细胞团. 新生发的细胞沿细胞团向周边蔓延而形成单层或多层, 其中Cajal间质细胞与平滑肌细胞伴行. 经亚甲蓝活染, 细胞团中的Cajal间质细胞着色, 呈现出特有的网状结构(图1A), 而外周Cajal间质细胞则易于聚焦, 表现出胞体呈三角形, 核大、胞质少、胞体多突起、细胞之间相互连接形成网络, 与平滑肌细胞伴行. 在亚甲蓝活染中呈均匀粉红或黑蓝色, 依时间长短而异, 着色部位在突起、胞体和胞核, 相邻着色的细胞经突起连接呈网络状, 镜下可见收缩运动. 少数坏死细胞的胞核可见亚甲蓝不均匀着色且胞膜缺损, 易于鉴别. 其他细胞如神经细胞、平滑肌细胞在成活状态下均不着色(图1B). 直接免疫荧光染色后, 在荧光显微镜下可见Cajal间质细胞呈c-kit阳性, 其同时也着色亚甲蓝(图2). 为进一步应证亚甲蓝活染Cajal间质细胞的特异性和敏感性, 我们急性分离成年小鼠肌条组织, 并采用亚甲蓝活染. 结果显示在肌间丛神经节干支之间及其四周富含Cajal间质起搏细胞的区域, 亚甲蓝着色阳性, 而其他细胞不着色(图3).

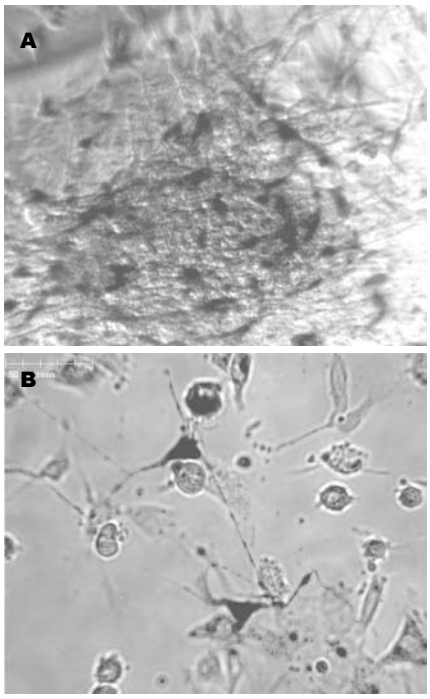


图 1 亚甲蓝活染组织块培养3 d的Cajal间质细胞(×400). A: 在成活状态下亚甲蓝选择性标记细胞团中的Cajal间质细胞; B: 亚甲蓝选择性标记细胞团四周的Cajal间质细胞.

3 讨论

Cajal间质细胞的分离和培养不仅是研究和了解起搏细胞功能和特性的基础, 也是研究Cajal间质细胞发生发育过程的基本模型. 因此, 正确掌握Cajal间质细胞的培养和标记方法, 认清不同方法中的优势和弊端, 方能扬长避短. 酶解法

可以获得业已生长之后的Cajal间质细胞, 如在培养液中加入干细胞因子可以帮助一定数量的Cajal间质细胞再生[4]. 但这种方法因多次反复的机械牵拉, 极易损伤Cajal间质细胞. 多种消化酶和诸多培养因子的作用, 会改变分离出和再生出Cajal间质细胞所固有的某些功能和特性[5-6]. Zhu *et al*[7]和Park *et al*[8]先后摸索出新生鼠和胎鼠在无酶消化条件下培养消化道Cajal间质细胞的方法. 近来也有学者采用原位法解决此问题[9-10], 即在组织上将肌间丛和肌间丛Cajal间质细胞进行暴露并用膜片钳进行功能试验. 我们采用组织解剖剥离法, 成功分离、培养出肌间丛Cajal间质细胞. 该方法极大程度上避免了牵拉, 新生鼠又含有大量自己所固有的生长因子, 避免了外加的化学反应, 使培养所得的Cajal间质细胞基本为原位, 富有原本生理特征. 因此他是目前研究Cajal间质细胞功能特性和发育过程比较理想的模型.

鉴定Cajal间质细胞特异的染色方法, 即c-kit (CD117和CD34)抗体的免疫组化检测已广泛用于Cajal间质细胞的分布、定性定量、Cajal间质细胞之间和Cajal间质细胞与其他类型细胞之间的相互关系[11-12]. 但是, 正如人们所知, 酪氨酸激酶的细胞表面跨膜受体c-kit不仅仅只在Cajal间质细胞中表达. 而且不同部位和不同功能特性的Cajal间质细胞也不能以c-kit抗体而进行区分. 免疫电镜也提示部分Cajal间质细胞c-kit(CD117)抗体反应呈阴性[13]. 而且, 在酶解法条件培养下, Cajal间质细胞还会在短期内衍生为平滑肌细胞或转化为介入Cajal间质细胞与平滑肌细胞两种特性皆有的c-kit阳性细胞[14]. 因此, c-kit阳性细胞并不一定就是Cajal间质细胞, 更不代表一定就是起博细胞. 在CD117抗体出现之前, 亚甲蓝是用于鉴定酵氏间质细胞的主要方法之一, 但因其应用的浓度、温度、时间、pH和溶液而使得着色细胞类型发生变化. Cajal本人, 作为发现和命名Cajal间质细胞者, 正是用亚甲蓝鉴定出Cajal间质细胞. Thuneberg首先发现Cajal间质细胞具有慢波起搏功能及在肌肉神经间具有传递信息作用, 也正是在亚甲蓝的鉴定中才认识并向人们推荐Cajal间质细胞[1], 并使之成为当今的一个热门研究领域. 我们采用亚甲蓝活染培养的Cajal间质细胞, 发现其能显现该细胞典型的形态学特征及网络状结构. 而神经细胞、平滑肌细胞在成活状态下均不着色, 从而能简单的将Cajal间质细胞与其他细胞鉴别. 免疫荧光染色显示c-kit阳性细胞同时也着色亚甲蓝, 进一步证实了该方法具有很高的特异性和敏感性. Zhu *et al*[7]的研究表明, 组织解剖剥离法所获得Cajal间质细胞为ICC-AP. 结合组织结构定位和特异性抗体标记, 我们认为亚甲蓝是鉴定ICC-AP的特异性标记物. 亚甲蓝活染培养的ICC-AP能更好的应用于随后的电生理功能研究.

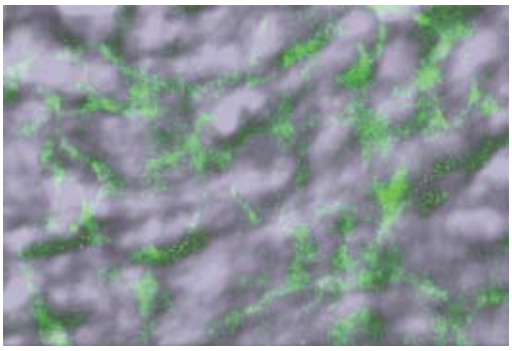


图 2 亚甲蓝活染后, c-kit标记的Cajal间质细胞(×400).

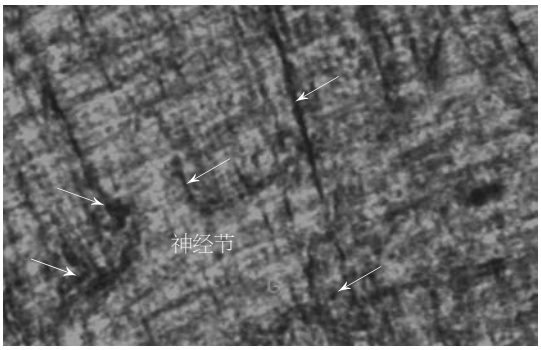


图 3 成年小鼠肌条组织的亚甲蓝活染(×400).

■应用要点

亚甲蓝活染能特异性研究肌间丛ICC的发育和电生理功能调节. 亚甲蓝活染标记ICC特异性强, 较荧光抗体染色简便易行, 为进一步的功能研究提供基础.

我们在研究中发现, 亚甲蓝仅仅只着色于Cajal间质细胞中的起搏细胞. 据文献报导[9,15], 亚甲蓝着色ICC-AP可能是其染料在内质网不可逆沉积所至. 但在电镜研究中, 由于固定剂处理组织或细胞后, 会导致亚甲蓝大量脱色, 从而无法进行结构定位. 有关亚甲蓝着色的机制和可能存在的功能影响亟待进一步深入研究.

4 参考文献

1 Thuneberg L. One hundred years of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 223-238

2 吴志轩, 余保平, 夏虹, 徐龙. 小鼠空肠cajal间质细胞的分离与培养. 胃肠病学和肝病学杂志 2005; 14: 455-457

3 Vanderwinden JM, Rumessen JJ. Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 344-360

4 Li CX, Liu BH, Tong WD, Zhang LY, Jiang YP. Dissociation, culture and morphologic changes of interstitial cells of Cajal in vitro. *World J*

■同行评价
本文设计合理, 方法可靠, 结果准确, 结论有一定的参考价值.

Gastroenterol 2005; 11: 2838-2840
5 Choi KM, Gibbons SJ, Roeder JL, Lurken MS, Zhu J, Wouters MM, Miller SM, Szurszewski JH, Farrugia G. Regulation of interstitial cells of Cajal in the mouse gastric body by neuronal nitric oxide. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 585-995
6 Ye J, Zhu Y, Khan WI, Van Snick J, Huizinga JD. IL-9 enhances growth of ICC, maintains network structure and strengthens rhythmicity of contraction in culture. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 687-694
7 Zhu Y, Golden CM, Ye J, Wang XY, Akbarali HI, Huizinga JD. ERG K+ currents regulate pacemaker activity in ICC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G1249-1258
8 Park SJ, Mckay CM, Zhu Y, Huizinga JD. Volume-activated chloride currents in interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G791-797
9 Zhu Y, Ye J, Huizinga JD. Clotrimazole-sensitive K+ currents regulate pacemaker activity in interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1715-1725
10 Hou X, Yin J, Liu J, Pasricha PJ, Chen JD. In vivo gastric and intestinal slow waves in W/WV mice. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1335-1341
11 刘勇, 齐清会. 大鼠胃Cajal间质细胞的分离和培养. 世界华人消化杂志 2005; 13: 495-498
12 朴莲花, 张扬, 黄旭, 李春晖, 高玲, 许文燮. 培养的小鼠小肠和胃Cajal间质细胞起搏电流的特性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 677-682
13 Wang XY, Berezin I, Mikkelsen HB, Der T, Bercik P, Collins SM, Huizinga JD. Pathology of interstitial cells of Cajal in relation to inflammation revealed by ultrastructure but not immunohistochemistry. *Am J Pathol* 2002; 160: 1529-1540
14 Epperson A, Hatton WJ, Callaghan B, Doherty P, Walker RL, Sanders KM, Ward SM, Horowitz B. Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C529-539
15 Liu LW, Thuneberg L, Daniel EE, Huizinga JD. Selective accumulation of methylene blue by interstitial cells of Cajal in canine colon. *Am J Physiol* 1993; 264: G64-73

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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(2007)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2006年从6500种统计刊源析出的290余万条中国期刊引文数据库及CNKI “中国期刊网”中心网站2006-01/12全文下载记录(2.1亿篇次)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2611, 影响因子为0.460, 5年影响因子为0.482, 即年指标为0.148, 他引总引比为0.80, 被引期刊数为585, 被引半衰期为4.6, 2006载文量为696, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为17.7. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3443-3445
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

内镜姑息治疗食管癌性瘘47例

张集昌, 张力建

张集昌, 北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院内镜中心 北京市 100036
张力建, 北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院胸科 北京市 100036
通讯作者: 张集昌, 100036, 北京市海淀区阜成路52号, 北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院内镜中心. drzhangjichang@sina.com
电话: 010-88196403
收稿日期: 2007-07-15 修回日期: 2007-10-24

Palliative endoscopic therapy for cancer patients with esophageal fistula: an analysis of 47 cases

Ji-Chang Zhang, Li-Jian Zhang

Ji-Chang Zhang, Center of Endoscopy, Clinic Cancer College of Beijing University, Beijing Cancer Hospital, Beijing 100036, China
Li-Jian Zhang, Department of Thoracic Surgery, Clinic Cancer College of Beijing University, Beijing Cancer Hospital, Beijing 100036, China
Correspondence to: Ji-Chang Zhang, Center of Endoscopy, Clinic Cancer College of Beijing University, 52 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100036, China. drzhangjichang@sina.com
Received: 2007-07-15 Revised: 2007-10-24

Abstract

AIM: To find an effective treatment for advanced cancer patients with esophageal fistula.

METHODS: From 1998 to 2006, we studied 42 patients with advanced esophageal cancer and 5 with carcinomatous esophageal fistula (3 females, 44 males, aged 29–92 years old). Ten patients with both esophageal cancer stricture and fistula were first dilated by endoscopy, then a memory stent with a membrane was placed in the esophageal lumen. Others were treated with a memory stent with a membrane, three of whom with a large fistula (diameter > 1.5 cm) were treated with bio-protein glue after placement of an esophageal metal tent.

RESULTS: The fistulas were covered by a stent and the patients could eat and drink immediately, their quality of life was improved and their survival was prolonged, with 44 of 47 patients living for > 3 mo.

CONCLUSION: Placement of esophageal stent with membrane was put in only or in combination with bio-protein through endoscope is an effective method for treating the branco-esophageal fistula.

Key Words: Esophageal fistula; Endoscopic treatment; Palliative treatment

Zhang JC, Zhang LJ. Palliative endoscopic therapy for cancer patients with esophageal fistula: an analysis of 47 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3443-3445

摘要

目的: 探讨癌性食管瘘的有效治疗方法.

方法: 1998-2006病理证实的食管癌性瘘肿瘤患者47例, 女3例, 男44例, 年龄29-92岁. 食管癌42例, 肺癌5例, 全部存在食管瘘. 10例伴有食管狭窄的患者先行内镜下食管扩张, 随后行食管内带膜支架置入术. 其余37例则直接行食管带膜支架置入术, 并对其中瘘口较大者3例(超过1.5 cm)附加蛋白胶黏堵.

结果: 患者的食管癌性瘘口即刻被封堵住, 患者可进食进水, 提高生活质量, 延长生存期, 70%(33/47)患者生存超过3 mo.

结论: 胃镜下食管内支架置入术或支架置入附加黏堵术为治疗支气管瘘的有效方法.

关键词: 食管气管瘘; 内镜治疗; 姑息治疗

张集昌, 张力建. 内镜姑息治疗食管癌性瘘47例. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3443-3445
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3443.asp

0 引言

晚期食管癌支气管瘘的患者饮水后呛咳, 不能进食进水, 整日靠输液维持生命, 生活质量很差, 瘘口较大者可出现高烧, 剧烈咳嗽, 十分危重, 难以生存. 对于此类患者我们采用了胃镜下扩张及食管支架置入术, 对于有的患者还进行了蛋白黏堵治疗, 收到了一定的治疗效果延长患者的生存期[1]. 本文报告此方法的操作及疗效.

■背景资料
食管支气管瘘患者尤其是癌性支气管瘘形成后, 患者滴水不进, 肺部感染不易控制, 高烧不退, 病情十分危急, 在未出现食管支架置入术前, 患者只能接受胃造瘘术. 如果在影像介入条件下行支架治疗, 由于难于鉴别食管狭窄口和气管瘘口, 操作极难成功. 相反在胃镜直接观察下可达到安全方便地行食管狭窄扩张及置放支架, 迅速改善患者的生存质量.

■研发前沿
近几年来, 国内外开展食管扩张及支架置入术仍以影像介入条件为主, 胃镜下行扩张或支架虽有报告, 但方法不尽相同, 无一定标准. 本文不用X线监视, 采用胃镜监视进行食管支气管瘘治疗较多, 在此进行总结希望能将此治疗方法进一步规范, 并大力推广.

1 材料和方法

1.1 材料 1998-2006病理证实的食管支气管癌性瘘肿瘤患者47例, 食管癌42例, 肺癌5例. 女3例, 男44例, 年龄29-92岁. 所用设备包括日本Olympus GIF 130电子镜, 美国Cook公司生产的食道沙氏扩张器外径0.6-1.4 cm, 国产内窥镜彩色数字成像系统, 国产食管带膜支架及推进器, 日本Olympus公司生产的内镜注射针.

1.2 方法 对此类患者首先行泛影葡胺食管造影, 了解瘘口部位及大小, 胃镜下治疗食管支气管瘘全程无需X线监测. 下胃镜至瘘口部位, 然后寻找食管狭窄口, 找到狭窄口后, 经胃镜活检口置入导丝通过食管狭窄口. 用沙氏扩张器逐级将狭窄口扩张至1.2 cm, 进胃镜观察食管狭窄长度及瘘口大小, 以便选定支架长短及口径大小. 支架长度应能覆盖瘘口上下各4-5 cm, 为宜. 将已装好支架的推进器沿导丝推至病变部位以下4-5 cm后, 退出推进器同时释放支架. 如低于所要求部位可以用鼠齿钳进行调整, 如高于所要求部位可以用鼠齿钳将支架取出, 再重新置入. 置入支架至满意位置后, 经内镜活检口以内镜喷管喷少量温度较高的生理盐水, 令支架充分膨胀, 并可检验瘘口是否已有效封住. 如瘘口封堵仍不满意, 可以内镜喷管沿支架上缘喷洒生物蛋白胶以便达到更满意的封堵效果. 此治疗组中5例为肺癌合并支气管瘘患者仅行支架治疗, 42例食管癌合并支气管瘘患者其中29例直接置入支架治疗, 10例伴食管高度狭窄则先行食管狭窄扩张再行支架治疗, 3例支气管瘘口较大则行支架置入加黏堵术.

此类治疗一般在内镜室, 患者处于清醒状态下进行, 未采用X线监测. 与影象学治疗方法不同[1,15-16], 对于个别体质敏感者采用异丙酚浅全麻下行内镜治疗. 采用了扩张囊和沙氏扩张器结合扩张的方法, 当狭窄口过小时下泥鳅导丝将瘘口稍扩大后, 再采用扩张囊进一步扩张, 然后进行支架置入术. 方法简便安全, 迅速, 值得进一步推广.

对于太复杂的食管支气管瘘, 由于食管口高度狭窄, 置入导丝应在确定无阻力时进行. 否则应注意调节导丝方向, 以确保导丝通过狭窄口后方能进行扩张治疗. 逐级扩张时, 可多次在胃镜下观察或多次扩张治疗, 必要时再次泛影葡胺造影后扩张. 总之, 扩张是成功的关键, 正确充分的扩张(一般1.2-1.4 cm)才能保证支架的顺利置入.

内镜合并症仍以穿孔、出血、疼痛3项评定, 出血少于50 mL为无出血, 多于50 mL为有出血. 疼痛可忍受为轻度疼痛, 需镇疼治疗为中度疼痛, 需强镇痛药才能止痛为重度疼痛.

表 1 食管支气管瘘支架治疗后生存期n(%)

分组	n	生存期		
		<3 mo	>3 mo	>1年
食管癌	42	2(5)	40(95)	3(7)
肺癌	5	1(20)	4(80)	1(20)

表 2 食管支气管瘘的内镜治疗后合并症n(%)

分组	n	穿孔	出血	疼痛程度		
				轻度	中度	重度
扩张加支架	10	0	0	5(50)	2(20)	1(10)
支架	29	0	0	9(30)	3(10)	1(3)

2 结果

经置入支架后, 患者生存期多数超过3 mo, 可进食进水, 部分患者可进普食. 个别治疗前发高烧的患者, 经抗感染治疗后缓解. 少数患者经化疗后, 生存期达1年以上. 1例患者经再次支架置入生存期也超过2年. 1例原发病为肺癌患者, 其右支气管与食管形成癌性瘘口, 经两次支架治疗生存期仅为2 mo. 1例食管气管高位瘘(瘘口位于食管距门齿18 cm)的患者在支架置入后2 wk仍不能进食进水, 经2次蛋白生物胶黏堵未效, 生存期不到2 mo(表1). 对3例瘘口超过1.5 cm的患者我们采用了置入支架及蛋白胶封堵, 收到了好的效果. 在治疗食管支气管癌性瘘时多数患者经食管狭窄扩张后, 置入支架, 少数食管狭窄不严重的患者直接置入了带膜支架. 我们为1例食管管径正常但存在多个瘘口的患者定制了大口径支架, 成功的将瘘口封堵, 防止了支架脱落. 在胃镜下扩张及支架置入过程中, 未遇到出血和穿孔等重大合并症. 置入后无疼痛症状患者约为20%, 其他的80%患者出现不同程度的疼痛症状(表2).

3 讨论

食管支气管瘘内镜治疗的合并症并不高于未合并瘘的晚期食管癌的内镜治疗. 合并支气管瘘的患者往往合并不同程度的感染, 易于出血, 按照以往的方法计算的出血率稍高于晚期食管癌未合并支气管瘘患者的. 但以前将出血定在10 mL以上计算合并出血, 该标准比较严格. 如果定在50 mL以上则可认为内镜治疗无出血这一合并症[1-2,6-8], 因此内镜治疗的出血率仍低于文献

报告的3%-5%.

在内镜治疗中未遇到穿孔合并症, 该结果也低于文献报告的3%左右[6-12]. 在扩张前及进镜后我们认真辨认食管狭窄口, 找到食管狭窄后再置入导丝, 支气管瘘口经常位于上方, 而且多数情况下大于食管狭窄口. 如果急于下导丝势必会将支气管瘘口扩大, 个别情况下根本看不见食管狭窄口. 此时术前泛影葡胺造影片可以提示大概的方向, 可在支气管瘘口下方偏左侧下导丝进行扩张, 逐级扩张后, 进镜至胃窦, 重新置入导丝才能引导推进器将支架置入. 此时应注意支架上下缘覆盖瘘口上下各4 cm, 否则不能将瘘口完全覆盖. 因此如果支气管瘘口高于距门齿20 cm, 以带膜支架治疗效果不完全, 或瘘口较大超过1 cm可配合附加生物胶黏堵会收到一些效果. 对于存在支气管瘘口但无狭窄的患者应考虑到置入支架的脱落问题. 针对1例支气管多发瘘口无支气管狭窄的病例, 我们定置了大口径支架, 并成功地用于此患者, 既将瘘口堵住又防止支架脱落, 在国内外尚无报道.

支架置入后疼痛症状出现机率与无支气管瘘的食管支架置入患者无大差别[6,13-14,19], 原因在于高位支气管瘘可能会引起置入后疼痛, 而采用小口径支架, 可成功地预防此类患者的疼痛合并症. 我们实验中1例患者由于食管无狭窄而置入了大口径支架后, 曾一度出现较严重疼痛, 给予吗啡类镇痛药后缓解.

肺癌合并主支气管与食管瘘, 一般均伴有食管外压性狭窄. 置入带膜支架后, 患者症状改善, 生活质量提高, 肺部感染容易得到控制. 但肺癌合并左右支气管瘘口时, 置入食管支架后, 效果不很满意. 是否应同时置入支气管带膜支架还有待于探索[17].

我们此组患者经内镜治疗后, 多数可进食进水, 部分患者可进半流食和普食, 生活质量明显改进, 患者大部分生存期达3 mo以上. 少数患者营养改善后进行了成功的化疗, 从而生存期延续了2年以上, 远远超过了文献报告的1年[3-5,7-10,15-18].

4 参考文献

1 张集昌, 张力建, 王燕蒙, 张军, 李伟. 内镜介入治疗伴梗阻的晚期胃癌、食管癌161例分析. 肿瘤防治研究 2001; 28: 322

2 张集昌, 张力建, 王燕蒙, 张军. Ⅳ期食管癌的内镜介入治疗. 中国内镜杂志 2001; 7: 8-9

3 张集昌, 张力建, 王燕蒙, 李伟. 内镜介入治疗晚期梗阻性食道癌. 肿瘤防治研究 1998; 25: 389-390

4 Wright RA, O'Conner KW. A pilot study of endoscopic injection chemo/sclerotherapy of esophageal carcinoma. *Gastrointest Endosc* 1990; 36: 47-48

5 Kinsman KJ, DeGregorio BT, Katon RM, Morrison K, Saxon RR, Keller FS, Rosch J. Prior radiation and chemotherapy increase the risk of life-threatening complications after insertion of metallic stents for esophagogastric malignancy. *Gastrointest Endosc* 1996; 43: 196-203

6 张朋彬, 赵晓晏, 李宜辉, 达四平. 自膨胀金属支架治疗晚期食管癌吞咽困难26例. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1528-1530

7 Mason R. Palliation of oesophageal cancer. *Surg Oncol* 2001; 10: 123-126

8 Kaneko K, Ito H, Konishi K, Kurahashi T, Katagiri A, Katayose K, Kitahara T, Ohtsu A, Mitamura K. Implantation of self-expanding metallic stent for patients with malignant stricture after failure of definitive chemoradiotherapy for T3 or T4 esophageal squamous cell carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 699-705

9 Lee SH. The role of oesophageal stenting in the non-surgical management of oesophageal strictures. *Br J Radiol* 2001; 74: 891-900

10 Cordero JA Jr, Moores DW. Self-expanding esophageal metallic stents in the treatment of esophageal obstruction. *Am Surg* 2000; 66: 956-958; discussion 958-959

11 Dallal HJ, Smith GD, Grieve DC, Ghosh S, Penman ID, Palmer KR. A randomized trial of thermal ablative therapy versus expandable metal stents in the palliative treatment of patients with esophageal carcinoma. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 549-557

12 Acunas B, Poyanli A, Rozanes I. Intervention in gastrointestinal tract: the treatment of esophageal, gastroduodenal and colorectal obstructions with metallic stents. *Eur J Radiol* 2002; 42: 240-248

13 Weigel TL, Frumiento C, Gaumintz E. Endoluminal palliation for dysphagia secondary to esophageal carcinoma. *Surg Clin North Am* 2002; 82: 747-761

14 O'Donnell CA, Fullarton GM, Watt E, Lennon K, Murray GD, Moss JG. Randomized clinical trial comparing self-expanding metallic stents with plastic endoprostheses in the palliation of oesophageal cancer. *Br J Surg* 2002; 89: 985-992

15 Park HS, Do YS, Suh SW, Choo SW, Lim HK, Kim SH, Shim YM, Park KC, Choo IW. Upper gastrointestinal tract malignant obstruction: initial results of palliation with a flexible covered stent. *Radiology* 1999; 210: 865-870

16 Razzaq R, Laasch HU, England R, Marriott A, Martin D. Expandable metal stents for the palliation of malignant gastroduodenal obstruction. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2001; 24: 313-318

17 McGrath JP, Browne M, Riordan C, Ravi N, Reynolds JV. Expandable metal stents in the palliation of malignant dysphagia and oesophageal-respiratory fistulae. *Ir Med J* 2001; 94: 270-272

18 Decker P, Lippler J, Decker D, Hirner A. Use of the Polyflex stent in the palliative therapy of esophageal carcinoma: results in 14 cases and review of the literature. *Surg Endosc* 2001; 15: 1444-1447

19 Cheng YS, Li MH, Chen WX, Chen NW, Zhuang QX, Shang KZ. Comparison of different intervention procedures in benign stricture of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 410-414

■应用要点
本文对食管支气管癌性瘘的治疗有一定的参考意义和临床应用价值.

■同行评价
本文有一定的学术参考价值和社会效益.

编辑 何燕 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年11月18日; 15(32): 3446-3450
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

肿瘤降期在低位直肠癌新辅助治疗中的意义

郁宝铭, 张 敏, 吴唯勤

■背景资料
局部进展期直肠癌采用单纯手术治疗, 局部复发率高、根治性切除率低、保肛机率小、5年生存差. 近年来推行术前放化疗结合TME手术操作可明显提高疗效, 已被国际公认为标准治疗方案, 国内尚未见临床报道.

郁宝铭, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科 上海市 200025
张敏, 吴唯勤, 上海市第八人民医院结直肠外科 上海市 200235
上海市卫生局重点课题资助项目, No. 99ZD-11003
通讯作者: 郁宝铭, 200025, 上海瑞金二路197号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科. baomingiok@163.com
电话: 021-64514139
收稿日期: 2007-06-11 修回日期: 2007-09-30

Significance of down-staging following neoadjuvant radiochemotherapy for low rectal cancer

Bao-Ming Yu, Min Zhang, Wei-Qin Wu

Bao-Ming Yu, Department of Surgery, Ruijin Hospital, Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China
Min Zhang, Wei-Qin Wu, Department of Colorectal Surgery, Shanghai 8th People's Hospital, Shanghai 200235, China
Supported by: the Key Item from Shanghai Hygiene Administration, No. 99ZD-11003
Correspondence to: Bao-Ming Yu, Departmant of Surgery, Ruijin Hospital, Medical College, Shanghai Jiaotong University, 197 Ruijin Second Road, Shanghai 200025, China. baomingiok@163.com
Received: 2007-06-11 Revised: 2007-09-30

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of preoperative oral capecitabine combined with radiation (RT) on locally advanced low rectal cancer.

METHODS: Patients with T_3/T_4 tumors located 3 to 7 cm from the anal verge, without distant metastases or extension to the anal canal, were stratified according to clinical staging and subjected to oral capecitabine 1250 mg/(m^2•d) + pelvic radiation 40-46 Gy at 2 Gy per day. Surgery was carried out 6-8 weeks following completion the radiation, under the rule of TME for curative resection, and oral capecitabine was taken persistently during the interval leading up to surgery.

RESULTS: One hundred and five patients were enrolled in this study. Thirteen patients showed a clinical complete response and were followed up without surgery. Ninety two patients received curative (RO) resection, including low anterior resections in 71 cases. Parks' coloanal anastomosis was performed in 17 cases and abdominoperineal excision was in 4 cases, with an overall sphincter preservation in 101 patients (96.19%). Pathologically, 11 patients showed a complete response plus clinical complete response, with an overall complete response rate of 22.86%. There was no disease progression. According to Dworak's tumor regression grading, there were 5 cases of TGR0, 18 of TGR1, 11 of TGR2, 46 of TGR3 and 24 of TGR4. The pathologic response rate (TGR2 + 3 + 4) or downstaging occurred in 78.09% of patients. All patients were followed up with a median follow-up time of 39 months (16-67 months). Local recurrence occurred in 4 patients (3.81%), lung metastases in 4 patients and liver metastases in 2 patients, with a distant metastatic rate of 5.71% and overall recurrence rate of 9.52%. The disease-free survival (DFS) was 82.81% and overall survival (OS) was 96.16%. Grade 3 toxicities occurred only, in 2 cases (1.9%) of hand-foot syndome.

CONCLUSION: Preoperative radiochemotherapy with capecitabine is highly effective and safe, and the results from this study are extremely encouraging. Downstaging occurred in this series, including complete (TGR4) and intermediate pathologic responses (TGR2 + 3), resulting in improved DFS and OS after preoperative capecitabine combined with radiotherapy, meanwhile preoperative radiochemotherapy significantly increased curative resectability and sphincter preservation, with an apparent improvement in local control and overall long term survival.

Key Words: Rectal cancer; Neoadjuvant radiochemotherapy; Down-staging

Yu BM, Zhang M, Wu WQ. Significance of down-staging following neoadjuvant radiochemotherapy for low rectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(32): 3446-3450

摘要

目的: 评估口服卡培他滨与放疗联合治疗局部进展低位直肠癌的疗效.

方法: 按临床分期属T_3/T_4、距肛缘3-7 cm、无远处转移或侵犯肛管的局部进展期低位直肠癌病例给予卡培他滨1250 mg/m^2·d, 分2次*po*和盆腔放射总剂量40-46 Gy, 每次2 Gy. 放疗结束后休息6-8 wk, 按TME操作原则进行根治性切除术, 在休息期间继续服用卡培他滨直至手术.

结果: 本研究共105例, 13例临床肿瘤完全消退, 未手术予以随访. 92例进行根治性切除术(RO)包括直肠前切除71例, Parks'结肠肛管吻合术17例和腹会阴切除术4例, 实际保留肛门括约功能者101例(96.19%). 病理上11例肿瘤完全消退, 加上临床肿瘤完全消退, 肿瘤完全消退率(CR)达到22.86%, 未见疾病进展(PD). 按Dworak's肿瘤消退分级(TRG), TRG 0 5例, TRG1 18例, TRG2 11例, TRG3 47例和TRG4 24例. 病理有效率或降期(TGR2+3+4)为78.09%. 全部病例获得随访, 中位随访39(16-67) mo. 局部复发4例(3.81%), 肺转移4例和肝转移2例, 远处转移率5.71%, 总复发率9.52%. 3年无病生存(DFS)82.81%, 总生存(OS)96.16%. 3级毒副反应仅见于手足综合征2例(1.9%).

结论: 采用卡培他滨的新辅助放化疗是高度有效和安全的. 通过术前卡培他滨与放射联合, 绝大多数肿瘤降期包括完全消退(TGR4)和中度消退(TGR3+2), 使DFS和OS增高, 同时术前放化疗又明显增加了切除率和保肛手术率, 并提高了局部控制和长期生存, 疗效确切.

关键词: 直肠癌; 新辅助放化疗; 肿瘤降期

郁宝铭, 张敏, 吴唯勤. 肿瘤降期在低位直肠癌新辅助治疗中的意义. 世界华人消化杂志 2007; 15(32): 3446–3450
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3446.asp

0 引言

目前在我国直肠癌是发病率呈上升趋势的常见恶性肿瘤, 其治疗结果常不能令人满意. 问题的症结在于复发率高和常需牺牲肛门致术后生活质量差. 因而降低局部复发率和改善术后生活质量已成为当前直肠癌治疗的两大目标, 也是检验治疗质量的重要指标. 因为我国直肠癌的特点之一是低位直肠癌占大多数, 所以上述二项指标尤为重要. 自直肠根治性切除采用全直肠系膜切除(TME)操作原则后总体治疗效果虽已有明显提高, 但局部复发率尚有10%左右. 为此, 我们对局部进展期低位直肠癌患者采用手术前的新辅助放化疗后再进行手术, 以观察其在提高手术的近远期疗效和改善生活质量方面是否有更好的效果.

1 材料和方法

1.1 *材料* 2001/05-2005/08随机对105例局部进展期(T_3T_4期)低位直肠癌(距肛缘≤7 cm)患者先给予手术前辅助性放化疗, 再行手术. 全部病例需经直肠手指检查、直肠腔内B超扫描、盆腔CT或MRI、纤维结肠镜检、活组织病理切片检查确诊为腺癌, 病变符合T_3或T_4期. 经腹部B超和CT以及胸部X线摄片确认无肝、肺等远处器官受累.

1.2 *方法* 本文入组病例年龄在31-86岁, 男59例, 女46例, 年龄32-77岁. T_3期78例, T_4期27例. 全部病例统一给予术前放射治疗, 剂量为40-46 Gy/4-5 wk, 每周5天, 每次2 Gy. 放射治疗结束后休息6 wk复查决定手术治疗. 在开始放射时给予卡培他滨1250 mg/m^2·d, 分两次*po*, 持续服用至决定手术. 如无3/4级毒副反应, 中间不中断给药. 放疗结束休息6 wk后应通过直肠指检、直肠腔内B超、盆腔CT或MRI、纤维结肠镜, 必要时再次活组织病理切片检查以及肝脏B超、CT和胸片等检查, 当然还有血液常规、肝肾功能、肿瘤指标物等检测, 对患者进行全面的评估以决定是否手术以及选用何种术式.

全部直肠切除手术均按全直肠系膜切除(TME)操作要求进行, 低位前切除术均采用双钉合器完成吻合, 部分超低位前切除术则按Parks结肠肛管吻合术经肛门完成手法吻合.

本组病例疗效评判首先按WHO标准分为CR: 肿瘤完全消退, 切除标本中已无肿瘤存在, 完全消失; PR: 肿瘤部分缓解, 切除标本肿瘤较术前缩小>50%, 病理显示肿瘤浸润变浅; SD: 病情稳定, 无变化, 切除标本肿瘤缩小<25%, 病理中浸润深度无改变; PD: 疾病进展、肿瘤增大, 病理中肿瘤浸润深度增加. 同时为了更精确地了解放化疗对肿瘤的作用, 本组标本还参照Dworak's肿瘤消退分级(tumor regression grading)进行评定: TRG0为肿瘤无消退, 肿瘤细胞无变化; TRG1为肿瘤轻微消退, 肿瘤组织中伴明显纤维化, 但不超过肿瘤的25%; TRG2为中度消退, 肿瘤组织中伴明显纤维化, 纤维化占26%-50%; TRG3为肿瘤消退良好, 纤维化细胞长出肿瘤外, 占50%以上; TRG4为肿瘤完全消退, 已经完全找

■相关报道
由于放疗方案、化疗方案以及放化疗结束后间歇期长短上存在的差异, 加上T_3、T_4和N0、N1病期病例比例的不同. 因而各家报道疗效亦尚存在着一定的差距, 新一代化疗药物的出现更为疗效的提高提供了希望.

■应用要点
本文采用中等剂量放疗(40 Gy-46 Gy)和新一代口服氟嘧啶类药物卡培他滨相结合, 间歇期为6 wk, 强调间歇期口服化疗药物不能停止, 一直服用到手术, 而且卡培他滨采用小剂量持续服用, 中间不休息, 较常规静脉给药既方便又安全、依顺性好、不良反应轻.

不到肿瘤细胞, 仅见纤维组织.

统计学处理 本组资料采用Kaplan-Meier法统计分析无瘤生存与总生存率.

2 结果

全部患者按计划完成放化疗. 在手术前复查时发现13例肿瘤临床完全消退(cCR)占12.38%, 未行手术. 其余92例均进行了根治性切除术(RO), 包括低位前切除术(LAR)71例, 超低位前切除术(ULAR)-Parks'结肠肛管吻合术17例, 腹会阴切除术4例, 完成保肛手术88例, 占直肠根治性切除手术的95.65%, 全组实际保肛率达96.19%(101/105例), 无疾病进展, 无手术死亡. 术后发生吻合口漏5例, 发生率5.68%(5/88例), 包括直肠阴道漏3例. 2例单纯吻合口漏经保守治疗痊愈, 3例直肠阴道漏需再次行近端结肠失功性造口加一期漏口修补后痊愈.

放化疗期间36例(34.29%)出现各种毒副反应, 包括手足综合征, 肛门疼痛, 肛周皮肤糜烂, 白细胞减少, 腹泻, 恶心等. 各种毒副反应的严重程度详见表1, 绝大多数反应均属1和2级.

3级反应仅2例, 均表现在手足综合征, 发生率1.9%.

术前复查发现13例肿瘤消失, 均通过直肠指检, 直肠腔内B超, 肠镜和活组织检查等多项检查确认. 术后标本的病理检查有11例经反复切片未发现癌细胞, 确认为肿瘤完全消退(pCR)加上临床肿瘤消退, 总的肿瘤消退共24例占22.86%, T_2N_0为23例, T_3N_0为43例, T_4N_0为2例, T_2N_1为5例, T_3N_1为8例. 按WHO评判标准应为CR 24例, PR为28例, SD为53例, PD为0. 根据Dworak's肿瘤消退分级, TRG0为5例, TRG1为18例, TRG2为11例, TRG3为47例, TRG4为24例. 而肿瘤降期应为TRG4+TRG3+TRG2, 故本组肿瘤降期共82例占78.09%. 本组标本淋巴结检出数平均4.8个, 明显较同期术前未作放化疗病例的平均检出数11.8个为少. 本组病例100%获随访, 随访时间16-67 mo, 中位时间为39 mo, 24例CR最长已67 mo至今尚无复发出现. 在随访期间出现肺转移4例, 肝转移2例和局部复发4例(3.81%), 总的复发率为9.52%. 在远处转移6例患者中3例最终死于癌肿, 局部复发病例中1例经局部切除手术处理后又出现复发, 建议作腹会阴切除. 1例再行腹会阴切除术. 后来在复发, 随访中, 2例需作腹会阴切除术, 但患者拒绝永久性结肠造口, 目前带瘤生存情况良好. 故本组无瘤生存率(DFS)为82.81%. 总生存率为(OS)96.16%.

表 1 化疗的毒副反应

	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
腹泻	11	4		
呕吐	4	2		
恶心	3	1		
白细胞减少	12	6		
脱发	1	1		
发热	2	1		
手足综合征	15	9	2	
口腔黏膜炎	2			

3 讨论

新辅助放化疗与TME联合对局部进展期低位直肠癌的疗效究竟如何? 自直肠癌切除术遵循全直肠系膜切除(TME)操作原则[1-2]以来, 局部复发率有了明显下降. 保肛手术成功率也有所提高, 5年生存率得到了改善. 与传统外科手术操作的结果相比, 无疑已前进了一大步. 从我们自己的经验来看, 局部复发率在4%, 5年生存率为78%[3], 与Heald *et al*[4]报道的结果基本一致. 就国内外各家报道而言, TME手术的局部复发率在10%以下, 5年生存率在70%以上[5-8], 各家结果的差异与各组病例的病期是密切相关的. 众所周知, 在影响预后的诸多因素中, 病期永远是一个决定性因素, 即使在TME手术操作原则下依然摆脱不了病期的影响. 作者的资料显示, Dukes'B期的局部复发率为2.3%, Dukes'C期为12.5%, Dukes'D期为53.9%[9], 显然病期的早晚对局部复发具有决定性作用. 然而病期既不是患者本人所能决定, 更不是医师主观愿望所能左右, 完全取决于发现和诊断的早晚, 也许更重要的是患者和诊治医师的警惕性. 鉴于直肠癌起病隐匿, 又缺乏特异症状, 多数患者一旦发现已非早期, 这就是局部复发率和5年生存率难以改善的关键所在. 因此改变这种局面的根本在于早期发现和早期诊断.

放射治疗是可用于治疗恶性肿瘤的另一种手段. 对直肠癌而言, 单纯放疗达不到根治目的,但用作辅助治疗则具有降低手术后局部复发的效用. 考虑到放疗可能引起的毒副反应, 故作为辅助放疗其适用对象仅限于T_3和T_3以上或Ⅱ期和Ⅱ期以上的直肠癌, 即进展期直肠癌病例[10]. 通过大量临床研究证明, 唯有手术后放疗与化疗联合应用才能既降低局部复发率, 可使5年生存率比单纯手术有较为明显的提高[11-12], 但

远处转移率并未减少, 因而无瘤生存率(DFS)与总的生存率(OS)并无明显改善[13-14]. 美国在研究手术后放射治疗+化疗的时候, 欧洲研究却集中在术前辅助治疗. 德国CAO/ARO/AIO 94研究肯定了包括疗效、毒副反应和保肛成功率等多方面术前放化疗优于术后放化疗, 因而当前在欧洲和美国术前放化疗已成为进展期直肠癌的标准治疗[10]. 自卡培他滨问世并被证实具有疗效优于5-FU/CF, 毒副反应低, 用药方便等优点后, 我们先后探索了以卡培他滨取代5-FU/CF与放疗结合作为新辅助放化疗的可能性, 安全性及其疗效[15-16]. 在得出确切的结论后, 我们进一步进行了本研究. 从本组病例的治疗结果中可以清晰地看到经过手术前的放化疗的105例中, 13例(12.38%)肿瘤完全消退, 避免了手术, 92例完成根治性切除, 保肛手术达到88例(95.65%), 仅4例需作AP切除术. 经中位3年随访, 局部复发率3.81%, 远处转移率5.71%, 总复发率9.52%, 3年无瘤生存率82.81%, 总生存率96.16%. 这一结果比以往我们单纯强调TME手术操作原则的疗效又提高了一大步. 因此新辅助放化疗对局部进展期低位直肠癌的疗效应予完全肯定, 并值得在更大范围更多合适病例中推广采用, 本组结果与国际报道的结果完全一致.

肿瘤降期(downstaging)和肿瘤缩小(downsizing)是新辅助放化疗取得突出疗效的基础, 对于新辅助放化疗的疗效已有大量临床资料予以证明, 归纳起来具有以下几大疗效: (1)可使大量原先不能手术切除的肿瘤转变为可以切除. (2)约有13%-20%的病例在病理上可达到肿瘤完全消退(pCR), 显然这是提高无病生存的基础. 是与改善术后生存率相关的. (3)可使许多原先术前判断需行腹会阴切除术的病例最终完成保留括约肌功能的手术. (4)局部复发率有进一步的下降. (5)术前放化疗在产生上述疗效的同时, 与单纯术前放疗或术后放化疗相比并未增加其他不良副反应, 甚至更轻[10].

所有这些优点都在本组资料中得到体现. 这些优点在不同的术前放化疗方案中将会有不同的反应. 例如在施行术前短期单次大剂量放疗时, 由于放疗结束后短期即行手术, 因此对提高切除率、保肛手术成功率. 以及肿瘤完全消退率方面都看不到有什么改变. 反之, 由于放疗对组织的作用-反应尚未消退, 手术并发症将明显增加. 尽管局部复发率可以降低, 但术前放化疗的优点就表现得不那么突出, 放疗剂量过高同样会产生较大副反应, 同时术前放疗结束后需休整的时间也需相应延长, 否则会影响手术的操作, 增加手术并发症. 因此, 当前国际上采用的术前放射剂量多在45 Gy(40-50.4 Gy), 称为中等剂量的范围内, 治疗的目标是争取最佳疗效和最小副反应. 在取得上述疗效中, 术前放化疗所产生的肿瘤降期(down-staging)是最关键的作用. 对一个进展期癌肿患者的群体而言, 术前治疗如不能产生肿瘤降期的效果, 切除率、保肛率、局部复发率和无病生存率这一切都不会有令人满意的结果. 病期下降的程度和比率则是最终决定效果的主要因素, 这是不言而喻的事实. 究竟产生多少病期的下降是件极为重要的事. 以往对治疗反应的判断都是沿用WHO的标准, 术前根据直肠指检、直肠腔内B超, CT或MRI扫描来判断病期, 这种主要依赖影像学诊断的病期带有一定的主观判断, 缺乏精确的定量. 除了CR外, 对PR和SD的判断相对是比较粗略的. Dworak[17]提出了根据病理切片中肿瘤细胞数量和纤维组织比例的半定量分级系统来进行评定, 正确性相对较高. 本组采用了这一评定系统发现肿瘤完全消退(TRG4, 相当pCR)24例(22.86%), 全组肿瘤降期(TRG4+3+2)[17]82例(78.09%), 正是由于本组病例经术前放化疗后有3/4以上的病例出现了肿瘤降期, 在临床检查中明显感到肿瘤较治疗前缩小了, 因而达到了90%以上的根治性切除和保留了完整排便控制功能, 并取得了较低的局部复发率和较高的3年中位无瘤生存率和总生存率. 作者认为, 这种肿瘤降期和肿瘤缩小既是术前放化疗的作用和效益, 也是我们追求的目标. 因为唯有产生这样的效益, 才能达到提高疗效的目的. 由于肿瘤缩小, 原先不能切除变为可以切除; 原先肛门无法保留的, 结果可完全地保留下来, 环切缘阳性的机率降低了, 局部复发的风险也相应减少了. 病期的降低为长期生存的提高提供了坚实的基础. 作者认为, 术前放化疗结束后休整期不中断化疗, 则是防止出现肿瘤进展, 特别是发生远处转移的重要措施. 本组未出现1例PD就是一个见证, 这也是本组采用中等放射剂量, 放疗后休整6-8 wk, 等肿瘤充分降期后再行手术的理由[10,18]. 肿瘤降期表现最突出的是肿瘤的完全消失CR. 在巴西一组260例随访长达10年的资料中, 不论是临床肿瘤消失或病理肿瘤完全消失, 复发率和癌肿相关死亡率在二者间并无差异. 总的10年生存率可高达97%, 10年无病生存率84%. 有4例死亡为非癌肿原因, CR组无盆腔复发, 全组局部复发率5%, 盆腔复发5.7%, 全身性

■**同行评价**
本文资料可靠, 数据可信, 有一定的参考价值和临床应用价值.

复发13%[19], 这一结果堪称满意. 该组资料指出, 在低位直肠癌中不论其原始临床和放射学分期如何, 最终的病理分期对决定患者的总生存率和无病生存率是一个重要的预后因素. 从术前辅助放化疗所产生的肿瘤降期给我们传送了一个新信息, 即原来以为病期是无法改变的现在已被推翻.

人们不得不承认, 通过积极有效的措施可以使大部分患者的病期发生变化, 从而彻底改变患者的命运. 对一个肿瘤患者不是首先进行手术, 而是先进行综合治疗来改变病期, 应该说是一个新理念. 如果这一理念确实能使疗效得到明显提高, 那么广泛地采纳这种理念, 将会使整个肿瘤治疗的效果提高到一个新的水平. 当然真正推广和实现这样一种新理念的治疗还有许多工作需做, 有待通过大量临床研究加以证实, 但给中后期病变患者提供了一个希望和方向.

总之, 本组结果再次显示, 对局部进展期低位直肠癌采用术前放疗与卡培他滨相结合, 继之按TME原则进行手术可取得比单纯根治性切除手术更好的疗效, 值得进一步推广应用.

4 参考文献

1 Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982; 69: 613-616

2 Heald RJ. The 'Holy Plane' of rectal surgery. *J R Soc Med* 1988; 81: 503-508

3 Yu BM, Li DH, Zheng MH, Zhao R, Lu AG, Huang L. Role of total mesorectal excision in curative resection of rectal cancer. *German J Clin Oncol* 2002; 1: 126-128

4 Heald RJ, Moran BJ, Ryall RD, Sexton R, MacFarlane JK. Rectal cancer: the Basingstoke experience of total mesorectal excision, 1978-1997. *Arch Surg* 1998; 133: 894-899

5 Wibe A, Moller B, Norstein J, Carlsen E, Wiig JN, Heald RJ, Langmark F, Myrvold HE, Soreide O. A national strategic change in treatment policy for rectal cancer--implementation of total mesorectal excision as routine treatment in Norway. A national audit. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 857-866

6 Wibe A, Eriksen MT, Syse A, Myrvold HE, Soreide O. Total mesorectal excision for rectal cancer--what can be achieved by a national audit? *Colorectal Dis* 2003; 5: 471-477

7 Kapiteijn E, Putter H, van de Velde CJ. Impact of the introduction and training of total mesorectal excision on recurrence and survival in rectal cancer in The Netherlands. *Br J Surg* 2002; 89: 1142-1149

8 Martling A, Cedermark B, Johansson H, Rutqvist LE, Holm T. The surgeon as a prognostic factor after the introduction of total mesorectal excision in the treatment of rectal cancer. *Br J Surg* 2002; 89: 1008-1013

9 郁宝铭, 李东华, 郑民华, 沈耀祥, 王灏. 直肠系膜全切除在双吻合器低位前切除术中的意义. 中华外科杂志 2000; 38: 496-498

10 Ross HM, Mahmoud N, Fry RD. The current management of rectal cancer. *Curr Probl Surg* 2005; 42: 72-131

11 Douglass HO Jr, Moertel CG, Mayer RJ, Thomas PR, Lindblad AS, Mittleman A, Stablein DM, Bruckner HW. Survival after postoperative combination treatment of rectal cancer. *N Engl J Med* 1986; 315: 1294-1295

12 Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. Swedish Rectal Cancer Trial. *N Engl J Med* 1997; 336: 980-987

13 Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, Kubista TP, Poon MA, Meyers WC, Mailliard JA. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 709-715

14 Fisher B, Wolmark N, Rockette H, Redmond C, Deutsch M, Wickerham DL, Fisher ER, Caplan R, Jones J, Lerner H. Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer: results from NSABP protocol R-01. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 21-29

15 郁宝铭, 吴唯勤, 邬宇飞. 卡培他滨在低位直肠癌新辅助治疗中的应用. 外科理论与实践 2003; 8: 184-186

16 郁宝铭, 吴唯勤. 新辅助化放疗与TME联合治疗局部进展期低位直肠癌. 中国实用外科杂志 2005; 25: 270-272

17 Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997; 12: 19-23

18 Saltz LB, Minsky B. Adjuvant therapy of cancers of the colon and rectum. *Surg Clin North Am* 2002; 82: 1035-1058

19 Habr-Gama A, Perez RO, Nadalin W, Nahas SC, Ribeiro U Jr, Silva E Sousa AH Jr, Campos FG, Kiss DR, Gama-Rodrigues J. Long-term results of preoperative chemoradiation for distal rectal cancer correlation between final stage and survival. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 90-99; discussion 99-101

编辑 李军亮 电编 郭海丽