世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 669-676
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

小肠疾病影像学诊断新进展

程英升, 宋富珍

程英升, 宋富珍, 上海交通大学附属第六人民医院放射科, 上海交通大学影像医学研究所 上海市 200233
程英升, 副教授, 硕士生导师, 主要从事胃肠影像诊断学和血管与非血管介入放射学研究.
通讯作者: 程英升, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科, 上海交通大学影像医学研究所.
cjr.chengysh@vip.163.com
电话: 021-64823392
收稿日期: 2006-11-23 接受日期: 2006-12-08

New progress in image diagnosis of small intestinal disease

Ying-Sheng Cheng, Fu-Zhen Song

Ying-Sheng Cheng, Fu-Zhen Song, Department of Radiology, the Sixth people's Hospital of Shanghai Jiao Tong University; Institute of Imaging Medical of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
Correspondence to: Dr. Ying-Sheng Cheng, Department of Radiology, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Institute of Imaging Medical of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China. cjr.chengysh@vip.163.com
Received: 2006-11-23 Accepted: 2006-12-08

Abstract
The small intestine is the longest organ of the gastrointestinal tract. Due to the curved course and overlapped canal of the small intestine, the technology of traditional intestinal canal examination and endoscopy can not exhibit the intestinal wall and extra-luminal structure well. Multi-slice spiral computed tomography (MSCT) and magnetic resonance imaging (MRI), which have the capability of helical scanning and three-dimensional post-processing techniques, can demonstrate the intestinal wall and extra-luminal structure clearly. Computed tomography enteroclysis (CTE) and magnetic resonance enteroclysis (MRE), as new imaging technologies, provide three-dimensional imaging capabilities and excellent soft-tissue contrast, which can analyze the abnormalities of peripheral intestinal structure as well as the tunica mucosa, greatly advancing the cognition of the imaging diagnosis for the intestinal disease. In this review, we described the progress in imaging diagnosis of the small intestinal disease.

Key Words: Multi-slice spiral computed tomography; Magnetic resonance imaging; Small intestinal disease; Diagnosis; Enteroclysis

Cheng YS, Song FZ. New progress in image diagnosis of small intestinal disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):669-676

■背景资料
小肠由于其肠管长, 常互相重叠排列, 且活动度较大, 因此, 小肠疾病的临床诊断比较困难, 而影像学诊断不可忽视.

摘要
小肠是胃肠道最长的器官, 因其走行弯曲, 肠管常互相重叠, 传统的胃肠道和内镜检查单纯地观察消化道腔内结构, 尚不能很好显示肠壁和腔外结构. 多层螺旋CT (MSCT)和磁共振成像(MRI)具有快速扫描和三维后处理能力, 能清晰反映肠壁和肠腔外的病变. 新的影像技术CT小肠灌肠造影(CTE)、MR小肠灌肠造影(MRE)具有良好的软组织对比度及三维成像能力, 不仅可以观察黏膜, 同时能够分析肠管周围的改变, 提高了人们对小肠疾病影像诊断的认识. 本文就近年来小肠疾病影像学诊断的进展及今后努力的方向作一述评.

关键词: 多层螺旋CT; 磁共振成像; 小肠疾病; 诊断; 小肠造影

程英升, 宋富珍. 小肠疾病影像学诊断新进展. 世界华人消化杂志 2007;15(7):669-676
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/669.asp

0 引言
小肠是胃肠道中最长的一段肌性管道, 也是消化与吸收营养物质的重要场所, 并有内分泌功能. 小肠疾病在临床中并不少见, 主要包括梗阻、缺血、肿瘤、炎症性肠病等, 其临床表现主要有腹痛、腹泻、肠道梗阻及其继发的各种表现. 由于其肠管长, 常互相重叠排列, 且活动度较大, 小肠疾病的临床诊疗比较困难[1-2]. 由于很多小肠疾病不但侵及肠壁、向腔内发展, 而且还穿透肠壁向腔外浸润. 既往由于缺乏有效的检查手段, 以致延误了该类疾病的诊治[3]. 随着内镜和各种影像学技术的飞速发展, 小肠疾病的诊疗水平有了很大的提高. 尤其是多层螺

■研发前沿
多层螺旋CT(MSCT)和磁共振成像(MRI)具有快速螺旋扫描和三维后处理能力, 能清晰反映肠壁和肠腔外的病变.

旋CT(multi-slice spiral computed tomography, MSCT)和磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)的问世, 小肠疾病的诊疗水平有了很大的提高.

1 小肠疾病诊断的现状

以往小肠疾病的检查手段主要是口服钡剂造影和小肠灌肠(small bowel enema, SBE)气钡双对比造影, 显示肠壁黏膜和肠管形态. 由于小肠较长, 走行弯曲, 肠管常互相重叠, 常规口服钡剂检查不能短时间、同时、全面显现整个小肠的形态; SBE需要插管, 操作较复杂, 且患者比较痛苦, 使得小肠双对比造影不能普遍开展. 电子小肠镜检查也是近年来开展起来的项目, 目前国内外使用最多的是推进式小肠镜, 可对小肠肿瘤进行诊断、活检及治疗[4], 但检查过程中患者极为痛苦, 操作难度较大, 耗时较长, 同时只能检查近端的部分小肠[5]. 胶囊内镜能够无创的观察小肠全段, 获得整个小肠的影像学资料, 而且操作较简单, 不需用镇静剂, 患者安全无痛. 检查期间患者可正常工作和生活, 检查结束后即可正常进食, 其主要用于不明原因的胃肠道出血, 也用于早期Crohn病的评估[6], 国内报道胶囊内镜对不明原因的消化道出血的诊断率为81%[7]. 其主要缺点是不能活检和治疗, 另外一个风险是在肠腔狭窄处被滞留[8]. 日本学者山本博德[9]发明的双囊电子小肠镜, 比普通推进式小肠镜能观察到更长的肠段, 即使在远端小肠也能够操作是他的特色之一, 并且能够往返多次观察、活检以及在给定的部位进行内镜治疗[8]. 双囊电子小肠镜操作比较简单, 术前应用麻醉或其他镇静药, 可明显减少患者的痛苦.

利用钡剂及各种内镜的检查技术主要显示肠壁黏膜和肠管形态, 然而很多小肠疾病不但侵及肠壁向腔内发展, 而且还穿透肠壁向腔外浸润. 近年来新的影像技术MSCT和MRI的应用, 能够较好的显示肠壁、肠腔和周围结构, 为小肠疾病的诊断提供了新的检查手段.

2 小肠疾病诊断新技术

2.1 MSCT成像技术 1998年MSCT的开发成功, 标志着CT历史上的又一次重大革新. MSCT与普通CT相比, 具有扫描速度快、照射量较低、X线管损耗小、空间分辨率高、采集信息量大及强大的图像后处理功能等优点. 其成像技术主要有多平面重建(multi-planar reconstruction, MPR)、曲面重组法(curved planar reformation, CPR)、最大密度投影(maximum intensity projection, MIP)、表面覆盖法(shaded surface display, SSD)、容积积分技术(volume rendered technique, VRT)、CT仿真内镜(computed tomography virtual endoscopy, CTVE)、CT血管造影(computed tomography angiography, CTA)等. MPR技术有利于诊断肠梗阻, CTA是诊断肠缺血的首选方法, VRT对显示缺血肠系膜血管的改变有重要价值.

CT小肠灌肠造影(computed tomography enteroclysis, CTE)早在1990年代中期就已开展, 由于早期的单排螺旋CT成像质量不高, 其结果没有得到大家的重视[10]. 新技术MSCT小肠灌肠造影(multi-slice spiral computed tomography enteroclysis, MSCTE)是通过小肠导管插管至十二指肠远段, 经导管注入中性对比剂(如甲基纤维素配制成4%-15%的泛影酸钠水溶液)或阳性对比剂(如1%稀释钡剂)使小肠肠腔充盈, 并经MSCT增强扫描, 将图像进行后处理, 使肠腔、肠壁、壁外系膜、腹腔内血管、后腹膜及腹内实质脏器多方位显示出来[11]. 已经证明CTE能够敏感的诊断Crohn病[12-13]及小肠肿瘤[14]. Boudiaf *et al*[15]证明CTE在诊断小肠疾病时有100%的敏感性、95%的特异性. 和常规小肠造影相比, CTE能够较好的显示肠壁及腔外结构[16]. 研究指出[17], 在诊断小肠疾病时, CTE与常规CT的敏感性分别为88%和80%.

2.2 MRI成像技术 MRI是利用磁场中人体氢质子共振所产生的信号经重建成像的一种方法, 不同的脉冲序列可产生不同参数成像. MRI技术能够很好的分辨软组织, 进行多方位成像, 后处理软件较丰富, 现代MR扫描技术克服了呼吸运动伪影及肠蠕动伪影的干扰, 并且较其他影像学检查有更多的优越性, MRI软硬件所具备的优点使胃肠道高分辨率的图像得以快速采集[18]. 随着MRI技术发展, 如快速扫描、水成像技术和对比剂的完善, MRI在小肠疾病的应用已日趋广泛[19]. MRI有多种脉冲序列和成像技术, 其中某些特殊序列可用来评价肠梗阻, 另一些特殊序列在诊断Crohn病方面亦有优势. 常用的成像方法为磁共振水成像: 因肠液在MRI重T_2序列呈高信号, 可利用肠道内的液体作为天然对比剂, 作横断面、冠状面、矢状面扫描, 采用快速自旋回波(spin echo, SE)和半傅里叶采集单次激发快速自旋回波序列(half-fourier acquisition single-

shot turbo echo, HASTE)等序列, 即“水成像”技术, 尤其适用于肠道肿瘤引起的肠梗阻, 可以显示增厚的肠壁和梗阻性肿块. 小肠磁共振水成像就是利用肠壁和腔内对比剂产生的信号差异显示小肠的形态.

MR小肠灌肠造影(magnetic resonance enteroclysis, MRE)是一种新的技术, 他结合传统小肠造影的优点和磁共振形态学成像性能, 使MR从纯形态学图像诊断发展成为功能与形态相结合的检查方法. MRE检查需要肠道清洁良好及肠管充分扩张, 同时小肠适宜的充盈至关重要. 因此, 选择能充分扩张肠管、不形成伪影而且对人体无害, 与肠壁的对比度良好的对比剂非常重要, 常用的有空气和顺磁性的钆. 虽然小肠双对比造影有利于观察早期黏膜改变, 但难以观察肠壁周围及肠系膜的病变, 而且患者受到较多的射线辐射. MRE技术无辐射, 具有良好的软组织对比度及进行三维成像, 不仅可以观察黏膜, 同时能够分析肠管周围的改变.

3 新的影像技术诊断小肠常见疾病

3.1 小肠急腹症

3.1.1 小肠梗阻 小肠梗阻最常见的病因是手术后的黏连、Crohn病和肿瘤[20]. 对于儿童来说, 肠套叠是另一个相对常见的病因, 而相对成年人却是非常少见的[21]. 以往诊断肠梗阻主要依据临床体征、病史和X线检查[22]. 虽然目前在国内平片检查仍被大多数医院作为首选影像诊断方法, 但其空间分辨率和密度分辨率较差, MRI成像速度虽已大大加快, 与MSCT的快速螺旋扫描相比, 检查时间仍然较长, 易产生呼吸运动伪影, MSCT对梗阻程度、部位及病因的判断, 明显优于腹部X线平片和MRI. MSCT能直接显示梗阻部位肠管的形态、肠壁的增厚、积气积液的肠袢、肠系膜及肠系膜血管的改变、肠管周围及腹腔间隙是否出现积液等情况. 多数情况下患者肠道内的积气积液是良好的对比剂, MSCT和MRI检查时并不需要口服对比剂.

小肠梗阻的一个征象是梗阻近段肠管扩张, 远段空虚萎陷, MSCT可以直接显示梗阻近段肠管、移行段肠管以及梗阻远侧不扩张的肠管, 易于诊断出肠梗阻[23]. 明兵 *et al*[24]认为小肠内径≥2.5 cm是诊断肠梗阻小肠扩张的可靠征象. 小肠梗阻的另一个征象是肠管内见到粪便, 如果同时在梗阻点附近的肠管内见到混合的气泡和粒状物质, 则提示小肠的高位梗阻[25]. 肠胃结石(粪石)是腔内梗阻的一个原因, 但有时与粪便难以区别. 植物粪石多为卵圆形的含气块状物, 而小肠内粪便多涉及较长的肠段, 外形上多为长管状[26]. 利用多层螺旋CT的后处理技术-曲面重建, 能够帮助区别含粪便的肠段内是粪便还是肠胃结石[23].

MSCT诊断肠梗阻有较高的准确率, 但是根据疾病的病程和病变的严重程度而不同[27]. 对梗阻病因的判断, MSCT和MRI明显优于腹部X线平片. Matsuoka *et al*[28]认为MRI, CT及腹部平片对诊断肠梗阻的敏感性分别为92.6%, 92.3%和81.5%, 且MRI和CT对其病因诊断的敏感性分别为92.6%和88.5%. MSCT薄层扫描和强大的后处理技术结合横断面图像在诊断肠梗阻中发挥着越来越重要的作用. Jaffe *et al*[29]认为, 利用16排MSCT的横断面检查, 能很好地诊断小肠梗阻, 而从各项同性数据资料进行的冠状面重建, 可以增加确诊或排除小肠梗阻的可信度. 刘文瑾 *et al*[30]认为, MSCT薄层扫描MPR技术对明确梗阻点、梗阻原因和范围有很大的帮助, 提高了准确率; 并且直观地显示了病变的空间形态与周围组织的毗邻关系, 有利于临床医师及时把握病情, 制订出有效的治疗方案. 沈蓓蕾 *et al*[31]也指出, MPR是最有价值的后处理技术, 应作为肠梗阻首选的应用技术. CTE可确定小肠梗阻的原因, 黏连的分类及精确定位, 横轴面图像结合冠状面及矢状位重组有助于区别肠壁的黏连和内脏的黏连[32]. MSCTE对部分性小肠梗阻的敏感性为89%, 特异性为100%, 明显高于常规CT的50%和94%, 如怀疑腹部恶性肿瘤所致梗阻时, MSCTE更具优势, 更易明确有无梗阻以及梗阻的程度、类型和原因[33]. 最近Boudiaf *et al*[15]总结了107例MSCTE检查资料, 其敏感度、特异度、准确度、阳性预测值和阴性预测值分别为100%, 95%, 97%, 94%和100%. MRI的HASTE检查能显示增厚的肠壁, 但对引起梗阻的肿瘤性肿块显示不十分清楚, 这一缺陷可用常规T_2SE序列弥补帮助评估阻塞性肿块的性质.

3.1.2 肠缺血 肠缺血的影像学表现有肠壁增厚所致的“靶征”、肠系膜动静脉栓塞、积气性肠炎及门静脉和肠系膜静脉内积气、肠壁强化不明显或异常增强等, 而增强扫描对肠管的缺血程度、范围及血运情况的评价十分重要. CT检查是诊断急性肠缺血可靠而且比较方便的方法. MSCT中CTA技术还可将腹腔动脉和静脉显示为与介入法血管造影所见极为相似的冠状面

■创新盘点
新的影像技术CT小肠灌肠造影(CTE)、MR小肠灌肠(MRE)具有良好的软组织对比度及三维成像能力, 不仅可以观察黏膜, 同时能够分析肠管周围的改变, 提高了人们对小肠疾病影像诊断的认识.

■应用要点
腹部MSCT、MRI和小肠钡剂灌肠能提供各自特有并互补的信息, 而CTE和MRE同时具备了两者的优点. CTE和MRE简便易行, 无明显并发症, 能全景式显示小肠腔、小肠壁、肠外淋巴结、肠系膜、肠系膜血管以及毗邻结构等, 适用于多种小肠病变, 图像直观生动, 诊断符合率高, 临床医生和患者皆十分欢迎.

或矢状面图像, 与诊断肠缺血的传统方法——介入性血管造影的“标准”方法比较, 由于CTA检查无创伤性、方法简便和医师无须在射线下操作, 已逐渐有代替前者的趋向, 目前已成为诊断本病首选的主要检查方法. Zalcman *et al*[34]认为MSCT的应用更有利于诊断和排除肠梗阻引起的肠缺血(敏感性为96%, 特异度为93%). 轴位成像和多平面显示技术能够有效地检测出肠壁和主要肠系膜血管的改变, 而VR技术通过一次扫描即可判断出从起源到远端分支的肠系膜血管的改变[35].

3.2 炎症性肠病

3.2.1 Crohn病 Crohn病是一种以全肠壁炎症、非连续性病变为特点的全身性肉芽肿性疾病. 可以累及肠管的任何部位, 但主要是在回肠末端和部分结肠[36]. 典型表现为肠管跳跃式受累, 肠壁不均匀增厚. 重症患者常伴有瘘管、脓肿及窦道形成, 在慢性期还可伴有肠腔狭窄. 气钡双对比造影一直是小肠Crohn病的主要影像学检查方法, 他可显示炎症早期增生的淋巴滤泡、颗粒状隆起及其中心的口疮样溃疡, 进展期的溃疡结节、“卵石征”、肠管变形、狭窄、僵硬、瘘管、窦道、病变的不对称性和跳跃性分布等. 在显示小肠黏膜的改变上, 气钡双对比造影有着不可替代的作用, 但难以显示周围受累器官的改变.

MSCT技术有较高的密度分辨率, 能显示肠壁、肠系膜及肠管周围结构的异常, 发现传统小肠造影难以发现的病变, 对准确诊断Crohn病及其并发症能提供决定性的信息[37]. Crohn病在CT上最常见的表现是节段性、非连续性肠壁增厚, 肠腔狭窄, 病变段肠周围结构改变如蜂窝织炎、纤维脂肪增生或脓肿等, 肠系膜及腹膜后淋巴结增大, 其他相关表现有骶髂关节炎、肛周脓肿等[38]. 正常小肠的厚度在CT上显示一般不超过2-3 mm, 而在Crohn病时其平均厚度可达11-13 mm, 最厚可达20 mm. Crohn病的肠壁增厚的CT表现与炎症活动性有关, 增厚的肠壁分层强化是活动期的表现, 而均一强化则表明是静止期. 在Crohn病活动期, 由于水肿、痉挛等可造成受累肠壁可逆增厚, 肠壁分层及肠壁明显不均一增强而形成“靶征”或“双晕征”. 在Crohn病慢性期或静息期, 由于全肠壁纤维化及疤痕形成则使受累肠壁不可逆增厚、肠壁轻度均一增强或不增强.

Freeman *et al*[39]指出, CT和MRI都能很好的显示出Crohn病的脓肿和瘘管的形成. MSCTE能高度精确地显示黏膜病变、肠壁增厚、瘘管窦道及肠外并发症等, 利用三维重建能有效地显示瘘管窦道与周围肠襻的关系. 研究指出[40], MSCTE与常规小肠插管造影对Crohn病检出率为89%及78%. 有人将MSCTE与MRE比较后, 发现MSCTE对观察肠壁增厚, 肠壁强化和淋巴结肿大有更高的一致性和敏感性[41]. 最近的研究[42-43]表明, 在诊断活动性Crohn病时, MRE明显优于常规造影. 在MRE影像上, 可见到高信号的斑片状的“卵石”征, 边界清楚, 累及较长的肠段, 在显示线性溃疡和假息肉方面, 序列不同结果就不一样[44]. Rieber *et al*[45]及Low *et al*[46]均认为诊断炎性病变、脓肿和瘘管, MRI均较传统小肠灌肠和CT优越. 但MRE对肠道准备和肠管扩张的要求较高, 目前在显示肠黏膜改变方面难以与双对比造影相比, 在显示周围器官的改变, 其空间分辨率不如MSCT. 因此, 在诊断Crohn病时, 三种方法应互为补充.

3.2.2 小肠结核 小肠结核以回盲部最多见, 分为较常见的溃疡型和少见的增殖型. 钡剂造影是检查小肠结核的主要手段, 溃疡型肠结核因炎症及溃疡刺激, 激惹征象明显, 表现为病变肠段无钡剂或仅有少量钡剂呈线状, 其相邻的上下端肠腔则能满意充盈, 有如跳跃一段肠管, 有时可与末段回肠Crohn病有完全相同的CT表现, 双对比造影可显示出病变的细微改变及其特征, 对鉴别诊断有很大意义. 受累肠壁增厚时, 注意应和肿瘤性病变鉴别: 当增厚肠壁厚度>1 cm, 肠系膜或腹膜后淋巴结呈环状强化时考虑为肠结核; 增厚肠壁厚度>1 cm, 肠系膜或腹膜后淋巴结短径>1 cm时, 要考虑肠肿瘤或淋巴瘤.

3.2.3 其他 小肠憩室炎的CT表现包括憩室的显示、憩室壁的增厚及肠壁周围炎症, 肠腔外的气体、瘘管和脓肿, 肠系膜门静脉的血栓性静脉炎在CT上也能明确显示[27]. Werner *et al*[47]指出CT是描述憩室壁的穿孔、腹腔内穿孔、瘘管和肠梗阻等并发症的主要影像技术. Kircher *et al*[48]指出MSCT对憩室炎诊断的准确度、敏感性、特异度大于95%. Leschka *et al*[49]提出冠状面重建更利于正常和非正常肠壁的鉴别. MSCTE能清楚区分放射性小肠炎的受累肠段和正常肠段, 能区分梗阻的程度及是否被腹膜纤维化包裹, 也能清楚显示肠内瘘[50]. 小肠Behcet病主要累及回肠, 钡剂造影表现为圆形或椭圆形溃疡, 边缘光滑锐利, 但无卵石样结节, 很少有肠管狭窄,

可与Crohn病鉴别. 溃疡性小肠炎以多发溃疡为特点, 钡剂造影时对比剂被稀释, 肠管狭窄和扩张, 黏膜皱襞增厚, 由于明显的分泌紊乱而使溃疡不易显示. 类风湿性关节炎及红斑狼疮等全身性疾病累及小肠时可表现为肠梗阻、肠穿孔等.

3.3 小肠肿瘤 原发性小肠肿瘤发病率较低, 约占胃肠道肿瘤的1%-5%[51]. 良性肿瘤以腺瘤最多, 其次为间质瘤. 恶性肿瘤在十二指肠、空肠、回肠的发生率约为18%, 36%, 41%[2]. 最常见的恶性肿瘤是腺癌, 好发于十二指肠远端和近端空肠. 临床怀疑原发性小肠肿瘤时应首选上胃肠道造影, 而CT和MRI可以明确诊断原发肿瘤, 确定肿瘤与腔外及周围组织结构的关系以及所属肠壁淋巴结或肝脏等处有无转移, 对肿瘤分期和选择治疗方案有重要意义. MSCT后处理技术及三维重建能从不同的角度和方位直观立体地显示病变及与周围毗邻的关系, 在小肠肿瘤的诊断上有着巨大的优势. MSCTE能更精确地判断小肠肿瘤的数目, 而且能发现小到0.5 cm的结节[52].

3.3.1 腺癌 小肠腺癌多发生于十二指肠和空肠交界处, 以黏膜破坏、中断及肠壁不规则增厚、肠腔向心性狭窄为主要表现, 也可表现为环形浸润、结节样肿块或溃疡. CT检查既可确诊钡剂检查中疑似病灶, 又可发现易漏诊部位的肿瘤, 与其他影像学方法相比较, 更能清楚显示肿瘤的大小、形态及内部结构, 向腔内外侵犯的程度, 与邻近结构的关系, 从而判断有无局部浸润及远处转移. CT的另一重要价值是对肿瘤进行分期, 观察实质性脏器转移程度, 从而避免不必要的手术治疗. 普通CT对小肠腺癌分期的准确度较低, 因不能区别肿瘤是否局限于黏膜和肌层, 难以分辨Ⅰ期和Ⅱ期. MSCT能及早发现黏膜下小肿瘤(肿瘤直径≥0.4 cm), 尤其是MSCT三维重建技术, 因有很高的空间分辨力, 能清晰显示病灶细微结构, 明确其来源、性质, 精确定位病灶且进行大体分型; 评价肿瘤浸润肠壁深度以及有无向壁外发展, 显示肠系膜、网膜、腹膜后及其他脏器有无肿瘤转移, 分期亦更准确, 尤其能清晰显示十二指肠水平部肿瘤及其与胰腺、主动脉、系膜血管的关系[53]. MRI检查亦能够显示原发肿块、估计肿瘤在肠壁中浸润的深度和了解肠管外侵犯情况. 其主要作用是对小肠恶性肿瘤进行临床分期, 有助临床治疗方案的选择, 且能评估疗效及随访发现复发病变. 小肠腺癌淋巴转移时, 强化的转移性淋巴结能在脂肪抑制增强图像上清晰显示.

3.3.2 淋巴瘤 小肠淋巴瘤好发于回肠末段, 多发小息肉型淋巴瘤表现为回肠壁内广泛的结节状、小息肉样增生, 形态相似, 并伴有溃疡. 恶性淋巴瘤CT或MRI表现为肠腔内多发性息肉样肿块及阶段性狭窄, 肠壁不均匀增厚, 管腔扩大, 内壁不光滑, 可见结节样突起, 亦可见腔外软组织肿块. 淋巴瘤显示的肠壁广泛增厚呈“夹心面包”样改变, 肠腔呈“动脉瘤样扩张”, 具有一定的特征性. 气钡双对比造影有利于显示肠道黏膜的改变、多发息肉、小灶性溃疡, 并观察病变段肠管的柔软度, 目前仍为首选的影像检查方法. CT和MRI在显示管壁增厚的程度、形态、范围, 软组织肿块的形态大小及密度, 浆膜面的改变, 肠外器官的侵犯, 淋巴结增大, 穿孔、瘘道等并发症等方面能提供更详细的影像学资料, 有利于病变的定性、分期, 确定治疗方案和治疗前后的疗效评价. 而且MRI可以任意方位重建图像, 分辨率高, 能更好地显示淋巴瘤的弥漫性肠壁增厚或伴较大的肿块, 而且对于骨骼的早期受累敏感.

3.3.3 间质瘤 小肠间质瘤多见于中老年男性, 临床症状出现晚且无特异性. Nishida *et al*[54]认为间质瘤的临床表现与肿瘤大小有关. 影像学检查是发现和诊断小肠间质瘤的主要手段, 以钡剂造影和CT检查为常用. 小肠钡剂造影可重点显示间质瘤累及黏膜的情况以及管腔的改变, CT及MRI可显示间质瘤的发生部位、密度、与周围组织器官的关系以及有否远处转移. 良性小肠间质肿瘤CT表现为在黏膜下形成肿块, 钡剂造影时显示为局部黏膜变平或消失, 腔内出现境界清楚的类圆形充盈缺损, 可伴有偏心性龛影. 恶性小肠间质肿瘤黏膜常破坏消失, 肠腔偏侧性狭窄或部分缺失, 龛影可位于肠轮廓外, 伴有不全性肠梗阻者可有近段肠管扩张、蠕动增强等肠动力性改变. CT增强扫描肿块有明显不均匀强化, 与邻近肠壁分界清楚. 恶性小肠间质瘤常有明显的黏膜破坏及肠壁缺损, 可伴有肝脏及肠系膜淋巴结转移. 小肠间质瘤在MRI上的信号是不均匀的, 这主要与肿瘤内部出血坏死及液化有关, 一般表现为形态不规则肿块影, 大多边界清晰, 部分可见完整包膜, T_1WI呈较低信号或等信号, T_2WI呈不均匀高信号, 增强扫描呈不均匀强化.

■名词解释

1 CT小肠灌肠(CTE): 是通过小肠导管插管至十二指肠远端, 经导管注入中性对比剂(如甲基纤维素配制成4%-15%的泛影酸钠水溶液)或阳性对比剂(如1%稀释钡剂)使小肠肠腔充盈, 并经MSCT增强扫描, 将图像进行后处理, 使肠腔、肠壁、壁外系膜、腹腔内血管、后腹膜及腹内实质脏器多方位显示出来.

2 MR小肠灌肠(MRE): 是一种新的技术, 他结合传统小肠造影的优点和磁共振形态学成像性能, 使MR从纯形态学图像诊断发展成为功能与形态相结合的检查方法. MRE检查需要肠道清洁良好及肠管充分扩张, 同时小肠适宜的充盈至关重要. MRE技术无辐射, 具有良好的软组织对比度及进行三维成像, 不仅可以观察黏膜, 同时能够分析肠管周围的改变, 对小肠疾病的诊断有极大的价值.

■同行评价
本文阐述了小肠疾病影像诊断学进展, 介绍了小肠疾病的影像诊断新技术, 新颖度好, 科学性较高, 有一定的指导价值.

4 MSCT和MRI成像技术在小肠疾病中的应用问题和展望

尽管现在有很多敏感的、直接的和间接的技术可以应用, 但是小肠疾病的诊断仍是一个难点[55-56]. MSCT和MRI的优质图像能清晰反映肠壁和肠腔外的病变, 因此, 将传统的X线检查和现代的MSCT与MRI检查技术, 特别与CTE和MRE结合起来, 能够互相补充、比较全面地反映小肠病变的部位、范围和性质[57-61]. MSCT是目前应用最为广泛的影像学检查技术[62-67], MRI检查费用相对较高, 所需时间长, 应用还没普及; MRI征象的特异性常还不够理想(多有重叠), 并且比CT成像更易产生运动伪影, 对某些器官和疾病的检查还有一定的限度. 然而MRI技术较其他方法有独特地优越性[68-72], 随着各种MR检查序列的不断开发、成像技术的不断完善, 检查时间的进一步缩短, CT和MRI将成为检查小肠疾病的一种有效方法[73-76].

一个有效完善的小肠影像学检查应既能发现早期病变, 争取及时诊治机会, 同时又能避免不必要的手术损伤. 因此, 在诊断时应选用恰当的检查方法, 制定具体的检查顺序, 取长补短, 择优从简. 随着科学技术的进步以及各种影像学技术的飞速发展, CTE和MRE对小肠疾病的诊断将会更完善, 效果更佳[77-81].

5 参考文献

1 Korman MU. Radiologic evaluation and staging of small intestine neoplasms. *Eur J Radiol* 2002; 42: 193-205
2 Rogalla P. CT of the small intestine. *Eur Radiol* 2005; 15 Suppl 4: D142-148
3 Umschaden HW, Szolar D, Gasser J, Umschaden M, Haselbach H. Small-bowel disease: comparison of MR enteroclysis images with conventional enteroclysis and surgical findings. *Radiology* 2000; 215: 717-725
4 Swain P, Fritscher-Ravens A. Role of video endoscopy in managing small bowel disease. *Gut* 2004; 53: 1866-1875
5 Gong F, Swain P, Mills T. Wireless endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 725-729
6 Hara AK, Leighton JA, Sharma VK, Heigh RI, Fleischer DE. Imaging of small bowel disease: comparison of capsule endoscopy, standard endoscopy, barium examination, and CT. *Radiographics* 2005; 25: 697-711; discussion 711-718
7 戈之铮, 胡运彪, 萧树东. 胶囊内镜与推进式小肠镜诊断不明原因消化道出血的评价. 中华消化内镜杂志 2003; 20: 223-226
8 Yamamoto H, Kita H. Enteroscopy. *J Gastroenterol* 2005; 40: 555-562
9 Yamamoto H, Sugano K. A new method of enteroscopy-the double-balloon method. *Can J Gastroenterol* 2003; 17: 273-274
10 Bender GN, Maglinte DD, Kloppel VR, Timmons JH. CT enteroclysis: a superfluous diagnostic procedure or valuable when investigating small-bowel disease? *AJR Am J Roentgenol* 1999; 172: 373-378
11 张联合, 章士正. 多排螺旋计算机断层成像技术小肠造影. 中华消化杂志 2005; 25: 255-256
12 Turetschek K, Schober E, Wunderbaldinger P, Bernhard C, Schima W, Puespoek A, Vogelsang H, Moeschl P, Mostbeck G. Findings at helical CT-enteroclysis in symptomatic patients with crohn disease: correlation with endoscopic and surgical findings. *J Comput Assist Tomogr* 2002; 26: 488-492
13 Hassan C, Cerro P, Zullo A, Spina C, Morini S. Computed tomography enteroclysis in comparison with ileoscopy in patients with Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 121-125
14 Gaffke G, Stroszczynski C, Schlecht I, Jost D, Ludwig WD, Schlag PM, Felix R. Diagnosis of tumors of the small intestine with the aid of CT contrast enema. Sellink CT technique evaluated in 63 patients. *Rontgenpraxis* 2002; 54: 214-219
15 Boudiaf M, Jaff A, Soyer P, Bouhnik Y, Hamzi L, Rymer R. Small-bowel diseases: prospective evaluation of multi-detector row helical CT enteroclysis in 107 consecutive patients. *Radiology* 2004; 233: 338-344
16 Parrish FJ. Small bowel CT-enteroclysis: technique, pitfalls and pictorial review. *Australas Radiol* 2006; 50: 289-297
17 Wold PB, Fletcher JG, Johnson CD, Sandborn WJ. Assessment of small bowel Crohn disease: noninvasive peroral CT enterography compared with other imaging methods and endoscopy-feasibility study. *Radiology* 2003; 229: 275-281
18 Gourtsoyiannis N, Papanikolaou N, Grammatikakis J, Maris T, Prassopoulos P. MR imaging of the small bowel with a true-FISP sequence after enteroclysis with water solution. *Invest Radiol* 2000; 35: 707-711
19 Gore RM, Leving MS. Textbook of gastrointestine radiology. 2nd ed. Pennsylvania: W. B. Sauders Company 2000: 86-97
20 Miller G, Boman J, Shrier I, Gordon PH. Etiology of small bowel obstruction. *Am J Surg* 2000; 180: 33-36
21 Byrne AT, Geoghegan T, Govender P, Lyburn ID, Colhoun E, Torreggiani WC. The imaging of intussusception. *Clin Radiol* 2005; 60: 39-46
22 Furukawa A, Yamasaki M, Furuichi K, Yokoyama K, Nagata T, Takahashi M, Murata K, Sakamoto T. Helical CT in the diagnosis of small bowel obstruction. *Radiographics* 2001; 21: 341-355
23 Aufort S, Charra L, Lesnik A, Bruel JM, Taourel P. Multidetector CT of bowel obstruction: value of post-processing. *Eur Radiol* 2005; 15: 2323-2329
24 明兵, 李振勋, 高源统, 汪永桢, 王晓阳, 蒲青凡, 余瑞立. CT在机械性肠梗阻诊断中的作用. 中华放射学杂志 2002; 36: 896-900
25 Fuchsjager MH. The small-bowel feces sign. *Radiology* 2002; 225: 378-379
26 Kim JH, Ha HK, Sohn MJ, Kim AY, Kim TK, Kim PN, Lee MG, Myung SJ, Yang SK, Jung HY, Kim JH. CT findings of phytobezoar associated with small bowel obstruction. *Eur Radiol* 2003; 13: 299-304
27 Federle MP. CT of the acute (emergency) abdomen. *Eur Radiol* 2005; 15 Suppl 4: D100-104
28 Matsuoka H, Takahara T, Masaki T, Sugiyama M, Hachiya J, Atomi Y. Preoperative evaluation by

magnetic resonance imaging in patients with bowel obstruction. *Am J Surg* 2002; 183: 614-617
29 Jaffe TA, Martin LC, Thomas J, Adamson AR, DeLong DM, Paulson EK. Small-bowel obstruction: coronal reformations from isotropic voxels at 16-section multi-detector row CT. *Radiology* 2006; 238: 135-142
30 刘文瑾, 张云, 刘锦萍, 季冬, 王康, 赵海庆, 张润, 朱荆皓. 多层螺旋CT多平面重建诊断急性肠梗阻病因的价值. 临床放射学杂志 2006; 25: 439-442
31 沈蓓蕾, 朱时锵, 方雄, 孙志超. 多层螺旋CT三维重建技术在机械性肠梗阻诊断中的应用. 实用放射学杂志 2006; 22: 554-556
32 刘于宝, 梁长虹. 小肠多层螺旋CT灌肠的研究. 放射学实践 2006; 21: 189-190
33 Maglinte DD, Kelvin FM, Rowe MG, Bender GN, Rouch DM. Small-bowel obstruction: optimizing radiologic investigation and nonsurgical management. *Radiology* 2001; 218: 39-46
34 Zalcman M, Sy M, Donckier V, Closset J, Gansbeke DV. Helical CT signs in the diagnosis of intestinal ischemia in small-bowel obstruction. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 175: 1601-1607
35 Wildermuth S, Leschka S, Alkadhi H, Marincek B. Multislice CT in the pre- and postinterventional evaluation of mesenteric perfusion. *Eur Radiol* 2005; 15: 1203-1210
36 Head K, Jurenka JS. Inflammatory bowel disease. Part II: Crohn's disease--pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Altern Med Rev* 2004; 9: 360-401
37 Lee SS, Ha HK, Yang SK, Kim AY, Kim TK, Kim PN, Lee MG, Myung SJ, Jung HY, Kim JH, Min YI. CT of prominent pericolic or perienteric vasculature in patients with Crohn's disease: correlation with clinical disease activity and findings on barium studies. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 179: 1029-1036
38 明兵, 贺国庆, 何瑜, 沈兰, 赵平武. Crohn病的CT表现. 中华放射学杂志 2006; 40: 88-91
39 Freeman AH. CT and bowel disease. *Br J Radiol* 2001; 74: 4-14
40 Doerfler OC, Ruppert-Kohlmayr AJ, Reittner P, Hinterleitner T, Petritsch W, Szolar DH. Helical CT of the small bowel with an alternative oral contrast material in patients with Crohn disease. *Abdom Imaging* 2003; 28: 313-318
41 Schmidt S, Lepori D, Meuwly JY, Duvoisin B, Meuli R, Michetti P, Felley C, Schnyder P, van Melle G, Denys A. Prospective comparison of MR enteroclysis with multidetector spiral-CT enteroclysis: interobserver agreement and sensitivity by means of "sign-by-sign" correlation. *Eur Radiol* 2003; 13: 1303-1311
42 Ochsenkuhn T, Herrmann K, Schoenberg SO, Reiser MF, Goke B, Sackmann M. Crohn disease of the small bowel proximal to the terminal ileum: detection by MR-enteroclysis. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 953-960
43 Gourtsoyiannis N, Papanikolaou N, Grammatikakis J, Papamastorakis G, Prassopoulos P, Roussomoustakaki M. Assessment of Crohn's disease activity in the small bowel with MR and conventional enteroclysis: preliminary results. *Eur Radiol* 2004; 14: 1017-1024
44 Masselli G, Casciani E, Polettini E, Lanciotti S, Bertini L, Gualdi G. Assessment of Crohn's disease in the small bowel: Prospective comparison of magnetic resonance enteroclysis with conventional enteroclysis. *Eur Radiol* 2006; 16: 2817-2827
45 Rieber A, Wruk D, Potthast S, Nussle K, Reinshagen M, Adler G, Brambs HJ. Diagnostic imaging in Crohn's disease: comparison of magnetic resonance imaging and conventional imaging methods. *Int J Colorectal Dis* 2000; 15: 176-181
46 Low RN, Francis IR, Politoske D, Bennett M. Crohn's disease evaluation: comparison of contrast-enhanced MR imaging and single-phase helical CT scanning. *J Magn Reson Imaging* 2000; 11: 127-135
47 Werner A, Diehl SJ, Farag-Soliman M, Duber C. Multi-slice spiral CT in routine diagnosis of suspected acute left-sided colonic diverticulitis: a prospective study of 120 patients. *Eur Radiol* 2003; 13: 2596-2603
48 Kircher MF, Rhea JT, Kihiczak D, Novelline RA. Frequency, sensitivity, and specificity of individual signs of diverticulitis on thin-section helical CT with colonic contrast material: experience with 312 cases. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 178: 1313-1318
49 Leschka S, Alkadhi H, Wildermuth S, Marincek B. Multi-detector computed tomography of acute abdomen. *Eur Radiol* 2005; 15: 2435-2447
50 Maglinte DD, Bender GN, Heitkamp DE, Lappas JC, Kelvin FM. Multidetector-row helical CT enteroclysis. *Radiol Clin North Am* 2003; 41: 249-262
51 Strickland L, Letson GD, Muro-Cacho CA. Gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Control* 2001; 8: 252-261
52 Bender GN, Maglinte DD, McLarney JH, Rex D, Kelvin FM. Malignant melanoma: patterns of metastasis to the small bowel, reliability of imaging studies, and clinical relevance. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2392-2400
53 Horton KM, Fishman EK. Multidetector-row computed tomography and 3-dimensional computed tomography imaging of small bowel neoplasms: current concept in diagnosis. *J Comput Assist Tomogr* 2004; 28: 106-116
54 Nishida T, Kumano S, Sugiura T, Ikushima H, Nishikawa K, Ito T, Matsuda H. Multidetector CT of high-risk patients with occult gastrointestinal stromal tumors. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 185-189
55 Gourtsoyiannis NC, Grammatikakis J, Papamastorakis G, Koutroumbakis J, Prassopoulos P, Rousomoustakaki M, Papanikolaou N. Imaging of small intestinal Crohn's disease: comparison between MR enteroclysis and conventional enteroclysis. *Eur Radiol* 2006; 16: 1915-1925
56 Maglinte DD. Small bowel imaging- a rapidly changing field and a challenge to radiology. *Eur Radiol* 2006; 16: 967-971
57 Rajesh A, Maglinte DD. Multislice CT enteroclysis: technique and clinical applications. *Clin Radiol* 2006; 61: 31-39
58 Laghi A, Paolantonio P, Passariello R. Small bowel. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2005; 13: 331-348
59 Wiarda BM, Kuipers EJ, Houdijk LP, Tuynman HA. MR enteroclysis: imaging technique of choice in diagnosis of small bowel diseases. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1036-1040
60 Akman C, Korman U, Ogut G, Kurugoglu S, Urger E, Ulus S, Esen G, Tasci I. A combination of small bowel imaging methods: conventional enteroclysis with complementary magnetic resonance

enteroclysis. *Clin Radiol* 2005; 60: 778-786
61 Frokjaer JB, Larsen E, Steffensen E, Nielsen AH, Drewes AM. Magnetic resonance imaging of the small bowel in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 832-842
62 Liu YB, Liang CH, Zhang ZL, Huang B, Lin HB, Yu YX, Xie SF, Wang QS, Zheng JH. Crohn disease of small bowel: multidetector row CT with CT enteroclysis, dynamic contrast enhancement, CT angiography, and 3D imaging. *Abdom Imaging* 2006
63 La Seta F, Buccellato A, Tese L, Biscaldi E, Rollandi GA, Barbiera F, Cappabianca S, Di Mizio R, Grassi R. Multidetector-row CT enteroclysis: indications and clinical applications. *Radiol Med (Torino)* 2006; 111: 141-158
64 Hong SS, Kim AY, Byun JH, Won HJ, Kim PN, Lee MG, Ha HK. MDCT of small-bowel disease: value of 3D imaging. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 1212-1221
65 Horton KM, Fishman EK. The current status of multidetector row CT and three-dimensional imaging of the small bowel. *Radiol Clin North Am* 2003; 41: 199-212
66 Patak MA, Mortele KJ, Ros PR. Multidetector row CT of the small bowel. *Radiol Clin North Am* 2005; 43: 1063-1077, viii
67 Di Mizio R, Rollandi GA, Bellomi M, Meloni GB, Cappabianca S, Grassi R. Multidetector-row helical CT enteroclysis. *Radiol Med (Torino)* 2006; 111: 1-10
68 Albert JG, Martiny F, Krummenerl A, Stock K, Lesske J, Gobel CM, Lotterer E, Nietsch HH, Behrmann C, Fleig WE. Diagnosis of small bowel Crohn's disease: a prospective comparison of capsule endoscopy with magnetic resonance imaging and fluoroscopic enteroclysis. *Gut* 2005; 54: 1721-1727
69 Horsthuis K, Lavini Mphil C, Stoker J. MRI in Crohn's disease. *J Magn Reson Imaging* 2005; 22: 1-12
70 Golder SK, Schreyer AG, Endlicher E, Feuerbach S, Scholmerich J, Kullmann F, Seitz J, Rogler G, Herfarth H. Comparison of capsule endoscopy and magnetic resonance (MR) enteroclysis in suspected small bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 97-104
71 Gourtsoyiannis NC, Papanikolaou N. Magnetic resonance enteroclysis. *Semin Ultrasound CT MR* 2005; 26: 237-246
72 Korman U, Kurugoglu S, Ogut G. Conventional enteroclysis with complementary MR enteroclysis: a combination of small bowel imaging. *Abdom Imaging* 2005; 30: 564-575
73 Masselli G, Brizi MG, Menchini L, Minordi L, Vecchioli Scaldazza A. Magnetic Resonance Enteroclysis imaging of Crohn's. *Radiol Med (Torino)* 2005; 110: 221-233
74 Herrmann KA, Zech CJ, Michaely HJ, Seiderer J, Ochsenkuehn T, Reiser MF, Schoenberg SO. Comprehensive magnetic resonance imaging of the small and large bowel using intraluminal dual contrast technique with iron oxide solution and water in magnetic resonance enteroclysis. *Invest Radiol* 2005; 40: 621-629
75 Negaard A, Sandvik L, Mulahasanovic A, Berstad AE, Klow NE. Magnetic resonance enteroclysis in the diagnosis of small-intestinal Crohn's disease: diagnostic accuracy and inter- and intra-observer agreement. *Acta Radiol* 2006; 47: 1008-1016
76 Wiarda BM, Kuipers EJ, Heitbrink MA, van Oijen A, Stoker J. MR Enteroclysis of inflammatory small-bowel diseases. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 522-531
77 Gourtsoyiannis NC, Papanikolaou N, Karantanas A. Magnetic resonance imaging evaluation of small intestinal Crohn's disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 137-156
78 Herrmann KA, Michaely HJ, Seiderer J, Ochsenkuehn T, Reiser MF, Schoenberg SO. The "star-sign" in magnetic resonance enteroclysis: a characteristic finding of internal fistulae in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 239-241
79 Schmidt S, Felley C, Meuwly JY, Schnyder P, Denys A. CT enteroclysis: technique and clinical applications. *Eur Radiol* 2006; 16: 648-660
80 Masselli G, Vecchioli A, Gualdi GF. Crohn disease of the small bowel: MR enteroclysis versus conventional enteroclysis. *Abdom Imaging* 2006
81 Herrmann KA, Michaely HJ, Zech CJ, Seiderer J, Reiser MF, Schoenberg SO. Internal fistulas in Crohn disease: magnetic resonance enteroclysis. *Abdom Imaging* 2006

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 677-682
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

培养的小鼠小肠和胃Cajal间质细胞起搏电流的特性

朴莲花, 张 扬, 黄 旭, 李春晖, 高 玲, 许文燮

朴莲花, 张扬, 黄旭, 高玲, 许文燮, 上海交通大学医学院生理学教研室 上海市 200240
朴莲花, 李春晖, 延边大学医学院生理学教研室 吉林省延吉市 133000
朴莲花, 2003级生理学专业硕士生, 主要从事消化道平滑肌动力学研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30160028, No. 30360031
通讯作者: 许文燮, 200240, 上海市东川路800号, 上海交通大学文选医学楼328室. wenxiexu@sjtu.edu.cn
电话: 021-34205639
收稿日期: 2006-08-24 接受日期: 2006-09-20

Characteristics of the pacemaker current in cultured interstitial cells of Cajal from murine stomach and small intestine

Lian-Hua Piao, Yang Zhang, Xu Huang, Chun-Hui Li, Ling Gao, Wen-Xie Xu

Lian-Hua Piao, Yang Zhang, Xu Huang, Ling Gao, Wen-Xie Xu, Department of Physiology, Medical College of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China
Lian-Hua Piao, Chun-Hui Li, Department of Physiology, Medical College, Yanbian University, Yanji 133000, Jinlin Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30160028, and No. 30360031
Correspondence to: Professor Wen-Xie Xu, Room 328, Wenxuan Medical Building, Shanghai Jiao Tong University, 800 Dongchuan Road, Shanghai 200240, China. wenxiexu@sjtu.edu.cn
Received: 2006-08-24 Accepted: 2006-09-20

Abstract

AIM: To investigate the characteristics of the pacemaker current in cultured interstitial cells of Cajal (ICC) from murine stomach and small intestine.

METHODS: ICC was isolated from murine stomach and small intestine and then cultured in the medium with stem cell factors. After 72 hours, ICC was identified by immunohistochemical technique with monoclonal antibody for c-kit protein labelling and the pacemaker currents in gastric and intestinal ICC were recorded under the conventional whole-cell patch-clamp configuration. When the concentration of calcium-chelating agent EGTA was increased from 0.1 to 10 mmol/L, the effects of low intracellular calcium on the pacemaker currents were observed.

RESULTS: At the 72nd hour, 2 to 4 projections were stacked out from the body of ICC, which interconnected with neighboring cells and formed cell networks under light microscope. Immunohistochemistry showed that c-kit protein was positively expressed on the surface of ICC. Under the conventional whole-cell configuration, the spontaneous and rhythmic inward currents (pacemaker currents) were elicited in cultured gastric and small intestinal ICC, respectively, as the membrane potential was held at -60 mV. There were differences in the amplitudes and frequencies between single ICC and ICC networks or between gastric ICC and small intestinal ICC. Under the conventional whole-cell configuration, an inward current was activated in ICC by increasing the concentration of EGTA in pipette solution W-7, a calmodulin-inhibitor, which activated the inward current and increased the amplitude of pacemaker currents in ICC.

CONCLUSION: The frequencies of the pacemaker currents from gastric and small intestinal ICC are very similar to the frequencies of rhythmic contraction in murine gastric and small intestinal smooth muscles; ICC network generates higher- amplitude, stabler and more rhythmic pacemaker currents than single ICC does; low concentration of intracellular free calcium is an important factor for generating pacemaker current; calmodulin is involved in the inhibitory regulation of the pacemaker current.

Key Words: Intersititial cells of Cajal; Pacemaker current; Calmodulin; Intracellular calcium

Piao LH, Zhang Y, Huang X, Li CH, Gao L, Xu WX. Characteristics of the pacemaker current in cultured interstitial cells of Cajal from murine stomach and small intestine. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):677-682

摘要

目的: 探讨培养的小鼠小肠和胃Cajal间质细

■背景资料
众所周知, 胃肠平滑肌具有自动节律性收缩和舒张的特性, 而这种节律性运动由基本电节律(慢波)所控制. 长期以来, 认为胃肠平滑肌节律性运动起源于纵行肌, 但近年的研究逐步认为, 引起胃肠平滑肌自动节律性运动的起搏细胞是位于纵行肌和环行肌之间的Cajal间质细胞(简称ICC), 他们是一种兼有成纤维细胞和平滑肌细胞特性的间质细胞. 本研究利用电生理学方法在培养的小鼠和小肠ICC上比较观察了起搏电流的特性.

■研发前沿
胃肠动力障碍性疾病在临床上非常常见, 尤其功能性胃肠动力障碍疾病的发病原因不清楚, 因此没有理想的治疗方法. 因为ICC是控制胃肠平滑肌自律性运动的起搏细胞, 因此了解和掌握ICC电生理特性是非常重要的课题.

胞(ICC)起搏电流的特性.

方法: 用二型胶原酶分离ICC并在含有干细胞因子的培养液中培养, 72 h后通过免疫组织化学方法进行鉴定. 利用传统全细胞模式膜片钳技术记录胃窦和小肠ICC的起搏电流. 把电极内液的钙螯合剂EGTA浓度由0.1 mmol/L增加到10 mmol/L, 使游离钙浓度降低, 观察细胞内低钙对起搏电流的影响.

结果: 培养72 h 后的ICC在光镜下表现出自胞体发出2-4条长突起, 并与邻近ICC突起相互连接成网络状; 激光共聚焦显微镜下观察到ICC表面酪氨酸激酶受体c-kit表达呈阳性; 膜电位钳制在-60 mV的条件下, ICC上可以记录到自发而节律性内向电流, 即起搏电流. 在胃和小肠ICC之间以及单个ICC和ICC网络之间, 电流幅度、频率有差异. 在传统的全细胞膜片钳模式下, 通过增加电极内液中EGTA浓度使细胞内游离钙降低时, 可以激活ICC的内向电流; 在细胞外给予钙调蛋白抑制剂W-7时, 可以激活ICC内向电流的同时明显增加起搏电流的幅度.

结论: 小鼠胃和小肠ICC产生的起搏电流频率与小鼠胃和小肠自律运动的频率非常接近; 网络ICC产生的起搏电流比单个ICC稳定、幅度高、频率快; ICC内游离钙浓度的降低是产生起搏电流的重要因素; 钙调蛋白在ICC内参与起搏电流的抑制性调节.

关键词: Cajal间质细胞; 起搏电流; 钙调蛋白; 胞内钙

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(7):677–682
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/677.asp

0 引言

消化道平滑肌细胞以静息膜电位为基础可产生节律慢的自发性去极化称为慢波(slow waves)电位, 又称基本电节律(basic electrical rhythm, BER). 胃肠平滑肌具有自动节律性收缩和舒张的特性, 而这种节律性运动由基本电节律(慢波)所控制[1-4]. 关于胃肠平滑肌慢波的起源及其产生的离子通道机制尚不清楚. 长期以来, 认为胃肠平滑肌节律性运动起源于纵行肌, 但近年的研究逐步认为, 引起胃肠平滑肌自动节律性运动的起搏细胞是位于纵行肌和环行肌之间的Cajal间质细胞(interstial cells of cajal, ICC), 他们是一种兼有成纤维细胞和平滑肌细胞特性的间质细胞. 一般认为, ICC可分为ICC-MY(inter-muscular layer ICC)和ICC-IM(intra-mucular ICC)两类, 其中ICC-MY是起搏细胞, 而ICC-IM与两层平滑肌细胞均形成缝隙连接(gap junctions)可将ICC-MY产生的慢波传给平滑肌[3-6]. ICC从食道到肛门内括约肌均有分布并形成网络. 越来越多证据表明, ICC是胃肠平滑肌的起搏细胞, 发动平滑肌的慢波, 控制胃肠平滑肌的节律性运动[7-9]. 国内外关于ICC产生起搏电流的机制、以及起搏电流如何转变成平滑肌细胞的慢波并控制平滑肌的节律性运动等很多问题有待于解决, 尤其国内有关ICC起搏电流的研究报道甚少. 因此, 本研究在培养的小鼠胃和小肠的ICC起搏电流的特性进行了初步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 生后10-15 d的Balb/c小鼠(由中国科学院实验动物中心提供), 雌雄不拘. Kraft-Bruhe液(K-B液)的成分(mmol/L): EGTA 0.5, HEPES 10, $MgCl_2·6H_2O$ 3, KCl 50, Glucose 10, L-Glutamate 50, Taurine 20, KH_2PO_4 20, 以KOH调pH值至7.40. Ca^{2+}-free-Hank's的成分(mmol/L): KCl 5.36, NaCl 125, NaOH 0.336, $NaHCO_3$ 0.44, Glucose 10, Sucrose 2.9, HEPES 10, 以Tris调pH值至7.40. 培养基: SMGM(Smooth Muscle Growth Medium; Clonetics Corp., San Diego, CA, USA); 抗生素(antibiotic/antimycotic Gibco BRL, Grand Island, NY, USA); SCF(Sigma, St Louis, MO, USA); PSS的成分(mmol/L): NaCl 134.8, KCl 4.5, HEPES 10, $CaCl_2$ 10, $MgCl_2·6H_2O$ 1, Glucose 10, 以Tris调pH值至7.40. 电极内液的成分(mmol/L): CsCl 110, TEA 20, EGTA 0.1, HEPES 5, Na_2ATP 3, $MgCl_2·6H_2O$ 3.5以Tris调pH值至7.30. 配制完成后, 用1 mL的分装瓶分装存放于0℃的冷冻箱中, 实验前解冻使用. W-7配成10 mmol/L母液待用.

实验动物脱臼致死并浸泡在750 mL/L酒精约5 min. 立即剖开腹壁取胃, 沿胃小弯切开, 用K-B液反复漂洗胃内容物, 胃组织用小针固定在特制的盛有K-B液溶液的培养皿(通氧气). 在解剖显微镜下剥离胃黏膜, 将胃组织切成小块, 并在无钙的Hank's溶液中孵育40 min, 然后参照Koh *et al*[10]的方法用二型胶原酶分离细胞. 分离后的细胞接种于平滑肌生长培养基并在二氧化碳培养箱(37℃, 950 mL/L氧, 50 mL/L二氧化碳)

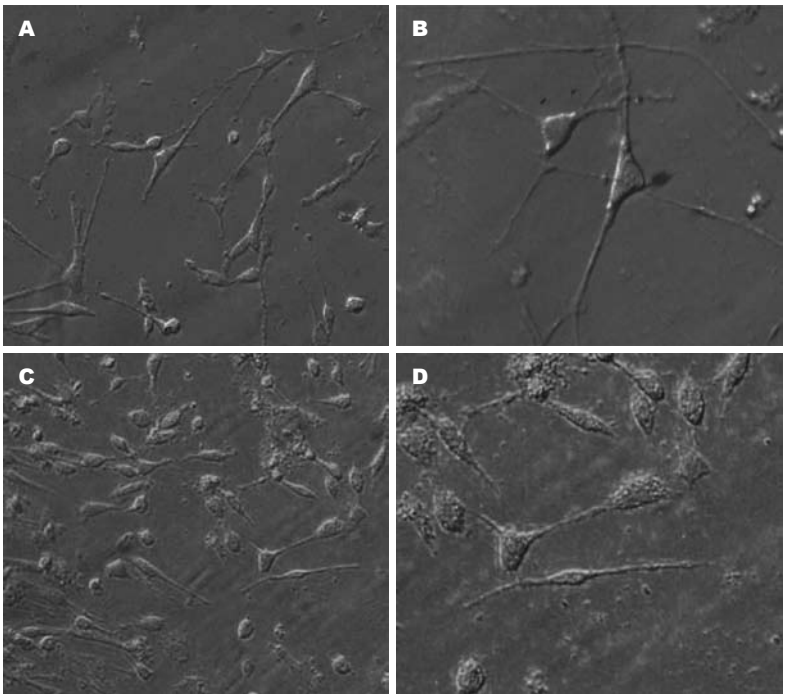

图 1 培养72 h的Cajal间质细胞. A: 胃(×100); B: 胃(×400); C: 小肠(×100); D: 小肠(×400).

■**创新盘点**
本文利用膜片钳技术比较观察了小鼠小肠和胃培养的ICC起搏电流的特征, 发现ICC内游离钙浓度的降低是产生起搏电流的重要因素; 钙调蛋白在ICC内参与起搏电流的抑制性调节.

进行培养. 培养24 h后更换无抗生素但含有干细胞因子(stemcell factor, SCF)的平滑肌生长的培养液.

1.2 方法 细胞稳定培养3 d后, 进行免疫组织化学鉴定. 倾去培养皿内的培养基, PBS冲洗3次; 在室温下用丙酮固定10 min; 再用PBS冲洗3次每次3 min; 加入羊血清后在室温下封闭30 min; 再加入c-Kit mAb (1∶100)4℃过夜; 然后加入羊抗大鼠FIT-C标记的二抗(1∶50)在常温下作用1 h; 最后PBS冲洗3次每次3 min, 用500 mL/L甘油封片. 在激光共聚焦显微镜或荧光显微镜下观察细胞.

取出培养72 h的ICC, 在实验前用室温的无钙生理盐水轻轻的反复冲洗, 取1个盖玻片平铺于倒置显微镜(IX-70 Olympus, Japan)镜台上的灌流槽底部, 进行灌流(2-3 mL/min)灌流. 然后用电阻为2-5 MΩ的玻璃电极进行5-10 GΩ的千兆封接. 膜电位钳制在-60 mV, 全细胞电流是通过膜片钳放大器EPC-10型膜片钳放大器记录分析处理.

统计学处理 所有统计数据用均数±标准差来表示. 实验结果采用同体对照的t检验, 具有显著性差异的标准为$P<0.01$.

2 结果

ICC培养24 h后在倒置显微镜下观察, 可见ICC已贴壁, 胞体呈三角形或梭形, 有少量突起. 核大、胞质内有许多黑色糖原颗粒. 培养72 h后可见自胞体发出2-4条长突起, 并与邻近细胞胞体及ICC突起相互连接成网络状(图1).

2.1 ICC免疫组织化学鉴定 ICC培养72 h后, 进行免疫组织化学鉴定. 免疫荧光染色后, 在荧光显微镜下观察, ICC表面酪氨酸激酶受c-Kit表达呈阳性, 胞体和突起均明显着色, 部分细胞发出长的凸起(图2).

2.2 全细胞膜片钳模式记录小鼠胃肠道起搏电流 在传统的全细胞膜片钳模式下, 将膜电位钳制在-60 mV, 记录胃和小肠ICC的起搏电流. 结果表明, 在胃和小肠ICC均可以记录到自发并具有节律的内向电流, 而胃和小肠ICC以及单一ICC与网络ICC之间起搏电流幅度、频率均有差异(图3A). 图3B结果显示: 胃单一ICC和网络状ICC的起搏电流振幅分别为130.8±9.6 pA和226.9±28.3 pA, 频率分别为2.6±0.2次/min和3.6±0.5次/min, 两者比较振幅和频率均有显著性差异($P<0.001$, $n = 6$); 小肠单一ICC和网络状ICC的起搏电流振幅分别为79.7±11.2 pA和272.3±38.8 pA, 频率分别为6.5±0.4次/min和16.3±1.0次/min, 两者比较振幅和频率均有显著性差异($P<0.001$, $n = 6$); 胃和小肠单一ICC与网络状ICC之间振幅和频率相比较也有显著性差异($P<0.001$, $n = 6$).

2.3 细胞内低钙对ICC钳制电流的影响 在传统的全细胞膜片钳模式下, 将膜电位钳制在-60 mV记录胃ICC起搏电流. 为了观察细胞内低钙对起搏电流的影响, 把电极内液的钙螯合剂EGTA浓

■应用要点
本文结果显示, 在小肠和胃ICC上能够记录起搏电流而这种起搏电流频率基本符合小鼠胃和小肠运动频率. 因此通过记录ICC起搏电流以及ICC形态学观察的方法, 可以深入研究胃肠动力障碍疾病与ICC之间关系.

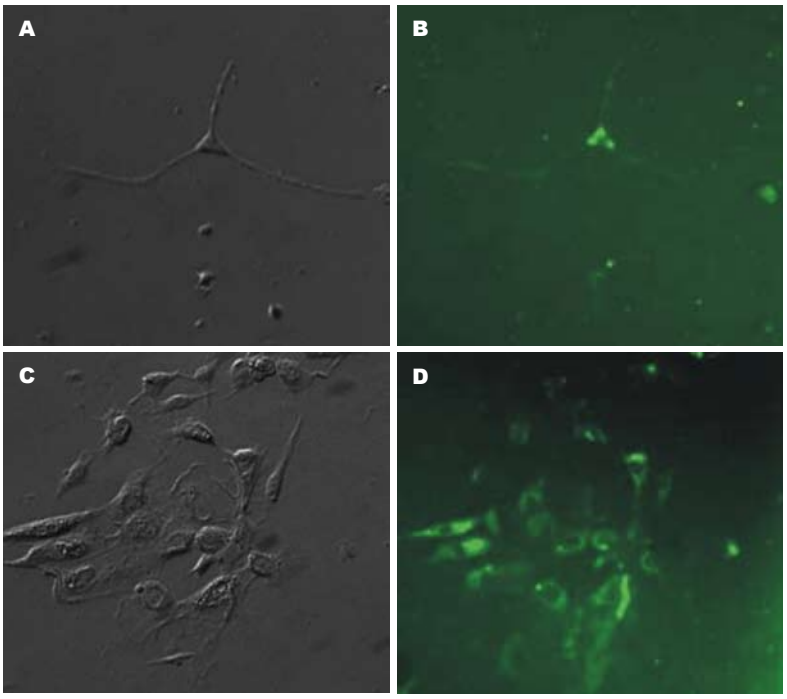

图 2 c-Kit蛋白免疫阳性Cajal间质细胞. A, B: 单个Cajal间质细胞(×100); C, D: 形成网络的Cajal间质细胞(×100).

度由0.1 mmol/L增加到10 mmol/L, 使游离钙浓度降低. 结果表明, 随着含有高浓度EGTA的电极内液向细胞内扩散, 逐步激活一种内向电流(图4), 其钳制电流的幅度平均增加219.93 pA.

2.4 钙调蛋白抑制剂W-7对ICC起搏电流的影响 在传统的全细胞膜片钳模式下, 将膜电位钳制在-60 mV记录起搏电流. 为了探讨钙调蛋白对起搏电流的影响, 观察了钙调蛋白抑制剂W-7(50 μmol/L)对起搏电流及钳制电流的影响. 结果表明, W-7明显增加ICC钳制电流的同时增加其起搏电流幅度(图5A). W-7增加起搏电流振幅由原来的48.5±9.9 pA增加到142.3±25.4 pA(图5B, $P<0.001$, $n = 4$), 并使钳制电流平均增加93.8 pA.

3 讨论

基本电节律是消化道平滑肌细胞以静息膜电位为基础可产生节律缓慢的自发性去极化, 又称为慢波(slow waves)电位. 关于胃肠平滑肌慢波的起源及其产生的离子通道机制, 长期以来的观点认为, 胃肠平滑肌节律性运动起源于纵行肌. 但是, 近年的研究逐步认为, 引起胃肠平滑肌自动节律性运动的起搏细胞是位于纵行肌和环行肌之间的ICC[11-12], 他们是一种兼有成纤维细胞和平滑肌细胞特性的间质细胞, 可分为ICC-MY(inter-muscular layer ICC)和ICC-IM (intra-muscular ICC)两类, 其中ICC-MY是起搏细胞, 其自发性产生的节律性电活动, 称为起搏电流(pacemaker current). 因此, ICC作为一类特殊的细胞, 已成为胃肠动力学领域的一个新的研究方向. 然而, 关于起搏电流的电生理特性、产生机制还存在一些分歧有待于进一步研究.

在本研究中我们参照Koh *et al*[7]方法培养了小鼠小肠和胃的ICC, 并比较观察了胃和小肠以及单个ICC和ICC网络起搏电流的特性. 关于ICC鉴定, 目前国际上惯用的方法是用c-Kit蛋白免疫组织化学染色法. c-Kit受体是III型酪氨酸激酶受体家族中的重要成员, c-Kit对于黑色素细胞、生殖细胞、造血干细胞及肥大细胞的发育是必要的, c-Kit与配体相互作用在这些细胞的分化与增殖中具有重要的作用. 研究发现, 几乎所有ICC均c-Kit阳性表达, 而胃肠道内表达c-Kit的细胞绝大多数为ICC, 从而将c-Kit作为ICC的标志物为鉴定ICC开辟了新纪元[13-14]. 我们把培养的ICC进行c-Kit免疫组化鉴定, 结果表明, 在显微镜下ICC以细胞团为中心向四周放射状成长, 细胞的形态多样, 如三角、星星状、不规则形态等, 但共同点是细胞体各角伸出突起就象神经元的树突, 而这些细胞c-Kit蛋白表达均为阳性. 这些结果与其他研究者报道的结果相似[7-8].

近年来的单细胞记录和分子水平的研究证明, 胃肠道无论是纵形肌还是环形肌均不具有发动SW的能力, 慢波是由存在于纵形肌和环形肌之间的Cajal间质细胞产生. 在本实验中我们通过免疫组织化学鉴定ICC后, 进一步采用膜片

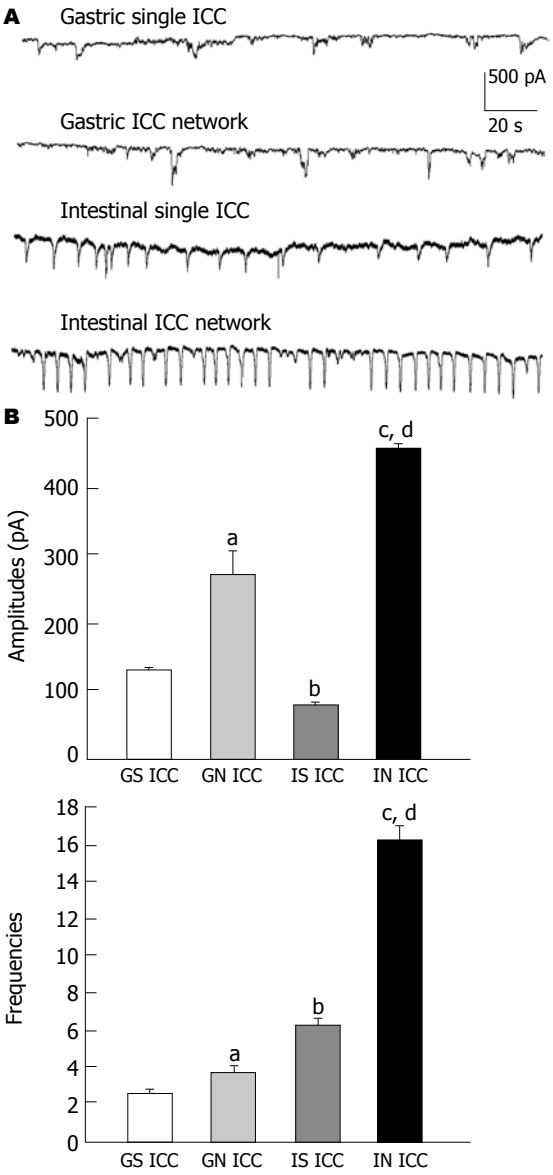

图 3 胃和小肠Cajal间质细胞起搏电流的比较. A: 胃和小肠Cajal间质细胞上记录到的起搏电流原始图; B: 胃和小肠Cajal间质细胞起搏电流幅度和频率的比较; GS ICC: 胃单个ICC; GN ICC: 胃网络ICC; IS ICC: 小肠单个ICC; IN ICC: 小肠网络ICC. $^{a}P<0.001$ *vs* GS ICC; $^{b}P<0.001$ *vs* GS ICC; $^{c}P<0.001$ *vs* IS; $^{d}P<0.001$ *vs* GN ICC, $n = 6$.

钳技术确认了培养的胃、肠ICC是否产生起搏电流. 结果表明, 在传统全细胞模式下把膜电位钳制在-60 mV, 可以记录到自发并节律性内向电流, 其幅度与胃、肠自律性运动频率非常接近. 在正常生理条件下胃的自发性运动频率明显低于小肠, 因此, 我们比较了胃和小肠ICC起搏电流频率. 我们结果显示, 小肠ICC起搏电流频率远高于胃ICC起搏电流频率. 既然在胃肠道ICC形成网络共同完成起搏功能, 而不是以单个细胞来完成起搏功能. 因此, 我们也比较了单个ICC和网络ICC的起搏电流. 结果表明, 单个ICC

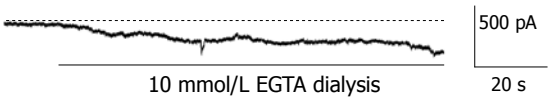

图 4 细胞内低浓度游离钙对Cajal间质细胞起搏电流的影响.

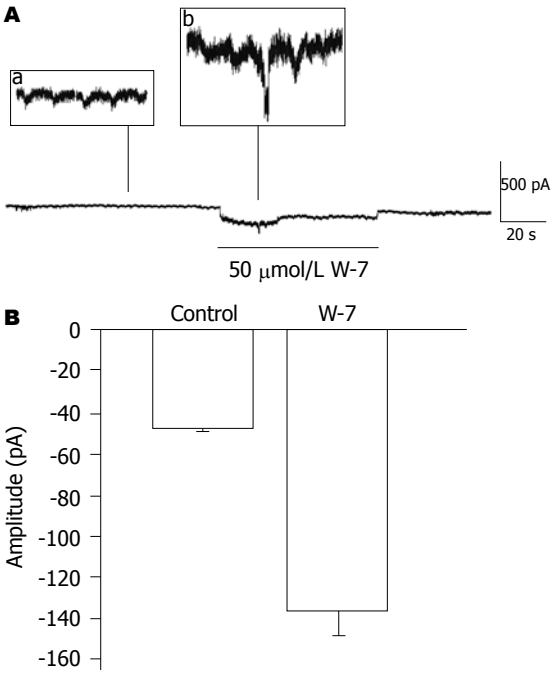

图 5 钙调蛋白抑制剂对Cajal间质细胞起搏电流的影响. A: 起搏电流, a和b表示局部放大图; B: 钙调蛋白抑制剂激活Cajal间质细胞起搏电流的统计图($P<0.001$, $n = 4$).

起搏电流的节律不如网络ICC规则、幅度和频率明显低于网络ICC. 这些结果说明, 尽管ICC是形成胃肠平滑肌节律性运动的起搏细胞, 但是当他们形成网络才能完成起搏功能.

有关ICC产生起搏电流机制的研究, 正逐步成为本领域的热点问题[15]. 已有的研究表明, ICC内由IP_3介导的钙库、线粒体和细胞膜上的非选择性阳离子通道(nonselective cation channel, NSCC)这三个要素共同构成的起搏单位(pacemaker unit), 产生起搏电流[16-17]. 其具体过程是, 首先IP_3介导的钙库释放钙, 胞内游离钙增加启动线粒体钙吸收, 当线粒体吸收钙使胞内游离明显降低时, 细胞膜上的NSCC被激活, 产生一种内向电流即起搏电流. 细胞内的高浓度游离钙和Ca^{2+}-钙调蛋白(calmodulin, CM)依赖的蛋白激酶抑制起搏电流. 因此, 把产生起搏电流的非选择性阳离子电流也称为低钙敏感内向电流(low calcium sensitive inward current)[18-19]. 在本实验中我们首先提高电极内液中的钙螯合

■名词解释

c-Kit受体: 是Ⅲ型酪氨酸激酶受体家族中的重要成员. c-Kit对于黑色素细胞、生殖细胞、造血干细胞及肥大细胞的发育是必要的, c-Kit与配体相互作用在这些细胞的分化与增殖中具有重要的作用. 研究发现, 几乎所有ICC均表达c-kit, 胃肠道内表达c-kit的细胞绝大多数为ICC, 因此将c-Kit作为鉴定ICC的标志物.

■同行评价
本文对临床研究胃肠动力性疾病的发病机制和药物治疗的研究具有一定的价值, 方法先进, 结论明确, 有较高的可读性.

剂EGTA的浓度, 使细胞内游离钙最大限度地降低情况下观察了ICC钳制电流的影响. 结果表明, 当形成全细胞模式后随着EGTA向细胞内扩散逐步激活非常明显内向电流. 此外, 细胞外给予钙调蛋白抑制剂W-7后不仅同样激活内向电流, 起搏电流的幅度也明显增加. 以上结果提示, 胃肠ICC产生起搏电流的过程中细胞内游离钙水平和钙调蛋白起着重要的作用.

ICC是胃肠自律性运动的起搏细胞, 因此ICC生理学功能以及ICC与胃肠动力相关性疾病的关系研究已经成为国内外学者关注的研究热点. 关于ICC起搏电流的产生机制还存在分歧, 如以加拿大学者Huizinga为代表的学者们认为ICC起搏电流的产生与钙敏感氯电流有关[20]; 而以Sanders为代表的美国学者们认为ICC起搏电流与非选择阳离子电流有关[13]. 因此, 在培养的ICC上研究他的起搏电流的特性, 探讨起搏电流的机制不仅对消化生理学具有重要的理论意义, 也对临床研究胃肠动力性疾病的发病机制具有重要的意义.

4 参考文献

1 Hashitani H, Garcia-Londono AP, Hirst GD, Edwards FR. Atypical slow waves generated in gastric corpus provide dominant pacemaker activity in guinea pig stomach. *J Physiol* 2005; 569: 459-465

2 Dickens EJ, Hirst GD, Tomita T. Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *J Physiol* 1999; 514 (Pt 2): 515-531

3 齐惠滨, 罗金燕. Cajal间质细胞的功能与疾病. 世界华人消化杂志 2001; 9: 325-328

4 李宇航, 王庆国, 陈萌, 杨美娟, 赵丽云, 李丽娜, 张冬梅, 王丹. 大鼠胃电节律失常模型胃肌间Cajal间质细胞含量的变化. 世界华人消化杂志 2004; 12: 639-641

5 Camborova P, Hubka P, Sulkova I, Hulin I. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity. *Physiol Res* 2003; 52: 275-284

6 Hirst GD, Beckett EA, Sanders KM, Ward SM. Regional variation in contribution of myenteric and intramuscular interstitial cells of Cajal to generation of slow waves in mouse gastric antrum. *J Physiol* 2002; 540: 1003-1012

7 Koh SD, Sanders KM, Ward SM. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine. *J Physiol* 1998; 513 (Pt 1): 203-213

8 Huizinga JD, Robinson TL, Thomsen L. The search for the origin of rhythmicity in intestinal contraction; from tissue to single cells. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 3-9

9 林琳, 许海尘, 张红杰, 胡晔东, 林征, 赵志泉. 结肠慢传输运动小鼠Cajal间质细胞的改变. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2107-2110

10 Koh SD, Kim TW, Jun JY, Glasgow NJ, Ward SM, Sanders KM. Regulation of pacemaker currents in interstitial cells of Cajal from murine small intestine by cyclic nucleotides. *J Physiol* 2000; 527 Pt 1: 149-162

11 Edwards FR, Hirst GD. An electrical description of the generation of slow waves in the antrum of the guinea-pig. *J Physiol* 2005; 564: 213-232

12 Kito Y, Ward SM, Sanders KM. Pacemaker potentials generated by interstitial cells of Cajal in the murine intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C710-720

13 Rich A, Miller SM, Gibbons SJ, Malysz J, Szurszewski JH, Farrugia G. Local presentation of Steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G313-320

14 Daigo Y, Takayama I, Ponder BA, Caldas C, Ward SM, Sanders KM, Fujino MA. Differential gene expression profile in the small intestines of mice lacking pacemaker interstitial cells of Cajal. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 17

15 Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 307-343

16 Liu HN, Ohya S, Furuzono S, Wang J, Imaizumi Y, Nakayama S. Co-contribution of IP3R and Ca2+ influx pathways to pacemaker Ca2+ activity in stomach ICC. *J Biol Rhythms* 2005; 20: 15-26

17 Ward SM, Ordog T, Koh SD, Baker SA, Jun JY, Amberg G, Monaghan K, Sanders KM. Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol* 2000; 525 Pt 2: 355-361

18 Koh SD, Jun JY, Kim TW, Sanders KM. A Ca(2+)-inhibited non-selective cation conductance contributes to pacemaker currents in mouse interstitial cell of Cajal. *J Physiol* 2002; 540: 803-814

19 Suzuki H, Takano H, Yamamoto Y, Komuro T, Saito M, Kato K, Mikoshiba K. Properties of gastric smooth muscles obtained from mice which lack inositol trisphosphate receptor. *J Physiol* 2000; 525 Pt 1: 105-111

20 Zhu Y, Mucci A, Huizinga JD. Inwardly rectifying chloride channel activity in intestinal pacemaker cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G809-821

电编 张敏 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 683-687
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠的防治作用

常 青, 赵立波, 郝建军, 邴飞虹, 张介眉

常青, 邴飞虹, 湖北中医学院中药研究所 湖北省武汉市 430061
赵立波, 华中科技大学同济医学院药理系 湖北省武汉市 430030
郝建军, 张介眉, 武汉市中西医结合医院 湖北省武汉市 430022
常青, 湖北中医学院硕士研究生, 主要从事药理学及中药化学研究.
湖北省卫生科研基金项目(鄂卫发), No. [2006]63号
通讯作者: 张介眉, 430022, 湖北省武汉市中山大道215号, 武汉市中西医结合医院院长办公室. zhangjiemei88@126.com
电话: 027-85332516 传真: 027-85332516
收稿日期: 2007-01-14 接受日期: 2007-01-20

Preparation of Chinese Allium fistulosum Linn in the prevention and treatment of rats with fatty liver disease

Qing Chang, Li-Bo Zhao, Jian-Jun Hao, Fei-Hong Bing, Jie-Mei Zhang

Qing Chang, Fei-Hong Bing, Institute of Traditional Chinese Medicine, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China
Li-Bo Zhao, Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Jian-Jun Hao, Jie-Mei Zhang, Wuhan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by the Research Foundation of Public Health of Hubei Province, No. [2006]63
Correspondence to: Jie-Mei Zhang, Wuhan Hospital of Combination of Traditional Chinese Medicine with Western Medicine, 215 Zhongshan Road, Jiangan District, Hubei 430022, China. zhangjiemei88@126.com
Received: 2007-01-14 Accepted: 2007-01-20

Abstract

AIM: To investigate the preventive and therapeutic effect of preparation of Chinese Allium fistulosum Linn (PCAL) on the rats with fatty liver disease (FLD) and its related mechanism.

METHODS: Sixty Sprague Dawley rats were randomly and averagely divided into group A, B, C, D, E and F. High-fat diet, ethanol, and carbon tetrachloride (CCl_4) were used to induce the model of FLD in all the rats except those in group A, and the rats in group A served as blank controls. Then the rats in group C, D, E and F were treated with low-, middle-, and high-dose PCAL (0.06, 0.12, 0.24 g/kg, repectively), and Dongbao Gantai (DBGT, 0.7 g/kg), respectively. All the animals were sacrificed after 8 weeks. Liver index (liver/body weight ratio) was calculated, and the levels of plasma total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were determined by automatic biochemical analyzer. Plasma endothelin-1 (ET-1) was assayed by radioimmunoassay. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting were used to measure the expression of tumor necrosis factor-α (TNF-α) mRNA and nuclear transcription factor-κB (NF-κB) in liver tissues, respectively.

RESULTS: Liver index, the levels of plasma TC, TG, ET-1, the expression of TNF-α mRNA and NF-κB p65 protein were significantly higher in group B that those in group A (3.45% ± 0.20% *vs* 2.33% ± 0.08%; 2.03 ± 0.38 mmol/L *vs* 1.39 ± 0.31 mmol/L; 1.18 ± 0.57 mmol/L *vs* 0.48 ± 0.08 mmol/L; 180.22 ± 9.80 ng/L *vs* 138.67 ± 21.84 ng/L; 0.84 ± 0.04 *vs* 0.47 ± 0.01; 180.33 ± 8.39 *vs* 110.67 ± 12.90; all $P < 0.01$). However, the above indexes were obviously decreased in group C, D, E and F (liver index: 2.59% ± 0.12%, 2.55% ± 0.19%, 2.65% ± 0.25%, 2.57% ± 0.16%, $P < 0.01$; TC: 1.67 ± 0.31, 1.65 ± 0.17, 1.69 ± 0.29, 1.52 ± 0.31 mmol/L, $P < 0.05$ or $P < 0.01$; TG: 0.65 ± 0.23, 0.60 ± 0.29, 0.55 ± 0.17, 0.61 ± 0.27 mmol/L, $P < 0.05$ or $P < 0.01$; ET-1: 149.39 ± 17.82, 136.91 ± 22.48, 130.52 ± 24.93, 154.45 ± 18.46 ng/L $P < 0.05$ or $P < 0.01$; TNF-α mRNA: 0.79 ± 0.01, 0.73 ± 0.03, 0.64 ± 0.05, 0.71 ± 0.02, $P < 0.01$ or no significance; NF-κB p65: 158.67 ± 8.08, 141.33 ± 9.29, 115.67 ± 14.05, 118.00 ± 9.85, $P < 0.05$ or $P < 0.01$) in comparison with those in group B.

CONCLUSION: PCAL is effective in the prevention and therapy of FLD rats, and the mechanism may be related to the reduction of NF-κB activity in liver tissues and alleviation of ET-1- and TNF-α-induced tissue impairment.

Key Words: Preparation of Chinese Allium fistulosum Linn; Fatty liver disease; Endothelin-1; Tumor necrosis factor-α; Nuclear factor-κB

■背景资料
由于当前临床上用于治疗脂肪肝的理想药物并不多, 西医常用维生素E、熊去氧胆酸和胰岛素增敏剂等, 疗效尚不确定, 中医药防治此类疾病已有几千年的历史, 且疗效可靠, 价格低廉, 开发中医药宝库有望能为防治脂肪肝提供一种很好的选择. 华夏小葱制剂是武汉市中西医结合医院经过多年研究的一种中药口服液, 已获国家专利. 据以往文献记载其性味辛温、通阳利尿之功效, 本文对其防治实验性脂肪肝大鼠的作用进行了探讨研究.

■研发前沿
因脂肪肝已成为一种常见病、多发病, 发病机制至今尚未明确, 临床上仍未找到治疗脂肪肝的特效药, 脂肪肝的研究受到了社会的普遍关注. 目前, 主要从脂肪肝的发病机制、降脂药及护肝药物的治疗、脂肪肝的预后等方面进行突破.

Chang Q, Zhao LB, Hao JJ, Bing FH, Zhang JM. Preparation of Chinese Allium fistulosum Linn in the prevention and treatment of rats with fatty liver disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):683-687

摘要

目的: 探讨华夏小葱制剂对大鼠脂肪肝的防治作用及其机制.

方法: 60只SD大鼠随机平均分为6个组: 空白对照组, 模型对照组, 华夏小葱制剂低、中、高剂量组以及东宝肝泰片组. 除空白对照组外, 其他组用高脂饮食及酒精水喂养, 并结合皮下注射小剂量四氯化碳色拉油溶液建立大鼠脂肪肝模型. 华夏小葱制剂低、中、高剂量组及东宝肝泰片组分别给予相应剂量的华夏小葱制剂0.06, 0.12, 0.24 g/kg或东宝肝泰片混悬液0.7 g/kg. 8 wk后计算肝脏指数(肝湿质量/体质量), 取肝左叶作组织病理学检查, 全自动生化分析仪测定总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)等指标, 放射免疫法测定血浆内皮素(ET-1)含量, RT-PCR测定肿瘤坏死因子-α(TNF-α) mRNA的表达, Western blot检测核转录因子-κB(NF-κB) p65蛋白的表达.

结果: 模型对照组肝指数、TC、TG、ET、TNF-α mRNA及NF-κB值(分别是2.33%±0.08%, 1.39±0.31 mmol/L, 0.48±0.08 mmol/L, 138.67±21.84 ng/L, 0.47±0.01, 110.67±12.90)显著高于空白对照组(P<0.01); 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组肝指数、TC、TG、ET-1、TNF-α mRNA、NF-κB p65值(肝指数: 2.59%±0.12%, 2.55%±0.19%, 2.65%±0.25%, 2.57%±0.16%, P<0.01; TC: 1.67±0.31, 1.65±0.17, 1.69±0.29, 1.52±0.31 mmol/L, P<0.05 or P<0.01; TG: 0.65±0.23, 0.60±0.29, 0.55±0.17, 0.61±0.27 mmol/L, P<0.05 or P<0.01; ET-1: 149.39±17.82, 136.91±22.48, 130.52±24.93, 154.45±18.46 ng/L, P<0.05 or P<0.01; TNF-α mRNA: 0.79±0.01, 0.73±0.03, 0.64±0.05, 0.71±0.02, P<0.01或无显著性差异; NF-κB p65: 158.67±8.08, 141.33±9.29, 115.67±14.05, 118.00±9.85, P<0.05 or P<0.01)低于模型对照组(分别是3.45%±0.20%, 2.03±0.38 mmol/L, 1.18±0.57 mmol/L, 180.22±9.80 ng/L, 0.84±0.04, 180.33±8.39).

结论: 华夏小葱制剂对实验性大鼠脂肪肝具有较好的防治作用, 其机制可能与降低NF-κB的激活、减少ET-1和TNF-α的损伤有关.

关键词: 华夏小葱制剂; 脂肪肝; 内皮素-1; 肿瘤坏死因子-α; 核转录因子-κB

常青, 赵立波, 郝建军, 邴飞虹, 张介眉. 华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠的防治作用. 世界华人消化杂志 2007;15(7):683-687
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/683.asp

0 引言

脂肪性肝病(fatty liver disease, FLD)简称脂肪肝, 是一种多病因引起的以肝细胞内中性脂肪异常沉积为主的临床病理综合征. 近年来, 全球脂肪肝发病率呈上升趋势, 目前尚缺乏有效的防治药物[1-3], 防治本病则成为普遍关注的医学和社会问题[4]. 华夏小葱制剂是武汉市中西医结合医院正在研究中的一种中药口服液(已获国家专利), 以往研究表明: 华夏小葱制剂具有防治动脉粥样硬化[5]、球囊损伤术后再狭窄[6], 治疗冠心病心绞痛[7]等作用. 据其具有性味辛温、通阳利尿、化解津液及瘀血等功效, 我们对其防治实验性脂肪肝大鼠的作用进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠60只, 体质量150±20 g, 雌雄各半, 购自华中科技大学同济医学院动物中心[合格证号: SCXK(鄂)2004-0007]. 华夏小葱制剂是精选百合科植物葱(Allium fistulosum Linn, 本实验用葱取自湖北黄陂)近根部的鳞茎(葱白), 切去须根及叶, 剥去外膜, 利用现代的技术加工方法将其提取物精制而成的口服液, 由武汉市中西医结合医院制剂中心提供, 专利号: 200610125543.1, 批号: 20050326; 东宝肝泰片(复方蛋氨酸胆碱片), 通化东宝药业股份有限公司, 批号: 060106, 灌胃前用2 g/L羟甲基纤维素(CMC)配制成70 g/L的混悬液. 两者均要在4℃冰箱保存备用. 总胆固醇(TC)试剂盒、甘油三脂(TG)试剂盒(上海申能-德赛诊断技术有限公司); ET-1放射免疫分析药盒(北京北方生物技术研究所); DEPC、琼脂糖、TRIzol、Tag DNA聚合酶(上海捷瑞生物工程有限公司); M-MLV逆转录酶(MBI); PCR Marker(大连宝生物公司); NF-κB p65兔多抗抗体(美国Santa Cruz公司). 全自动生化分析仪(Olympus Au560, 日本); 台式低温离心机(Genrifuge5471, 德国); FJ2003/50G型γ免疫计数器(国营二六二厂); 分光光度计(721型, 上海科学仪器厂); 梯度PCR仪(Eppendorf公司); 凝胶成像及图像分析系统(上海培清科技有限公司); 垂直型电泳槽、电泳仪以及转膜仪(E-C公司).

1.2 方法

1.2.1 分组与动物模型 大鼠适应性喂养1 wk后, 按体质量分层随机分为6组(n = 10). 空白对照组, 模型对照组, 华夏小葱低、中、高剂量组, 东宝肝泰片组. 空白对照组使用标准大鼠饲料和普通水喂养. 其他组参考孙要武 *et al*[8]报道的方法加以改进, 复制大鼠脂肪肝模型: 动物给予高脂饲料(含100 g/L猪油)和酒精水(含150 mL/L乙醇), 每周一次后肢皮下注射400 g/L CCl_4色拉油溶液(首次剂量5 mg/kg, 以后为3 mg/kg).

1.2.2 给药及取材方法 造模同时, 空白对照组, 模型对照组给予注射用生理盐水8 mL/(kg·d), ig; 华夏小葱低、中、高剂量组分别给予华夏小葱制剂0.06 g/(kg·d)、0.12 g/(kg·d)、0.24 g/(kg·d), ig; 东宝肝泰片组给予东宝肝泰混悬液0.70 g/(kg·d), ig. 连续给药8 wk后, 大鼠禁食16 h, 称质量, 以30 g/L戊巴比妥钠溶液40 mg/kg腹腔注射后, 心脏采血, 抽取血样置于含有抗凝液的离心管中, 离心后收集上清液, -20℃保存备用. 摘取大鼠肝脏并称质量, 计算肝脏指数(肝脏指数 = 肝湿质量/体质量×100%). 观察大体外观后, 取肝左叶作组织病理学检查; 取肝右叶, 制成100 g/L的肝组织匀浆. TG, TC用全自动生化分析仪测定, 其余指标按试剂盒说明书方法进行测定.

1.2.3 血浆ET-1含量放免测定 2 mL血样注入含100 g/L EDTA的离心管中, 混匀, 4℃, 3000 r/min, 离心15 min, 取上清, 按试剂盒步骤测ET-1含量.

1.2.4 RT-PCR测定TNF-α mRNA的表达 其序列参考文献[9]设计如下: TNF-α mRNA (295 bp), β-actin (349 bp). 其序列如下: TNF-α 5'-TAC, TGA, ACT, TCG, GGG, TGA, TTG, GTC, C-3', 5'-CAG, CCT, TGT, CCC, TTG, AAG, AGA, ACC-3'; β-actin 5'-TTG, TAA, CCA, ACT, GGG, ACG, ATA, TGG-3', 5'-GAT, CTT, GAT, CTT, CAT, GGT, GCT, AGG-3'. 以上引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成. 采用TRIzol提取肝脏总RNA, -20℃保存备用. RT-PCR按试剂盒说明操作, PCR反应体系为25 μL, 10×PCR Buffer 2.5 μL, 0.2 mmol/L dNTP 0.5 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μL, cDNA 3 μL, 上游引物和下游引物终浓度为0.8 μmol, 各加1 μL, Taq DNA聚合酶0.5 μL, 加入无核酸酶水至总体积25 μL. 然后执行如下反应条件: 94℃预变性2 min后, 94℃变性30 s, 60℃退火50 s, 72℃延伸30 s, 末次延伸为72℃ 10 min, 循环次数为30次, 终止反应, -20℃保存. 取4 μL PCR产物和4 μL β-actin扩增产物与2 μL电泳上样缓冲液混合, 将其在20 g/L的琼脂糖凝胶中进行电泳, 每组重复电泳3次, 紫外灯下观察后, 用凝胶成像分析系统成像及分析图像, 进行半定量分析. 以TNF-α与β-actin的条带积分光密度比值表示mRNA的表达水平.

1.2.5 Western blot检测NF-κB p65蛋白的表达 用组织裂解液裂解100 mg肝组织后, 根据考马斯亮蓝确定样品上样量为7 μL, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 染色, 脱色, 拍照后再转膜, 进行抗原抗体反应: 封闭液20-37℃封闭PVDF膜1-2 h; 0.01 mol/L PBST洗涤PVDF膜2次, 5 min/次; PVDF膜孵育NF-κB p65兔多抗抗体(1∶100), 4℃过夜; 0.01 mol/L PBST振荡洗涤PVDF膜2次; 用二抗(1∶400)羊抗兔抗体孵育PVDF膜, 37℃ 40 min; 0.01 mol/L PBST振荡洗涤PVDF膜4次(每隔5 min/次), 洗涤后暗室化学发光准确显影. 定量分析: 用凝胶成像分析系统对Western blot杂交图进行灰度分析.

统计学处理 各组数据以mean±SD表示, 用SPSS11.0统计软件进行单因素方差分析(One way ANOVA), P<0.05表示差异具有显著性意义.

2 结果

2.1 常规观察 空白对照组动物皮毛光亮整洁, 灵活好动, 饮食正常, 体质量持续增加, 无死亡现象; 模型对照组有不同程度的精神萎靡, 活动减少, 饮食减少, 皮毛凌乱, 体质量下降等表现, 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组较模型对照组有不同程度的改善.

2.2 肝脏外观变化情况 空白对照组肝脏肉眼观察呈鲜红色, 表面光滑. 脂肪肝模型对照组肉眼见肝脏体积增大, 颜色呈浅黄色, 质软, 切面有油腻状. 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组部分肝脏接近正常, 表面呈紫红色, 无油腻状, 指压有弹性, 体积大小接近空白对照组.

2.3 各组大鼠肝脏指数的比较 模型对照组大鼠肝指数显著高于空白对照组(P<0.01); 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组肝指数显著低于模型对照组(P<0.01, 表1).

2.4 各组大鼠血浆TC, TG的比较 经全自动生化分析仪测定, 结果表明: 模型对照组大鼠血浆TC, TG显著高于空白对照组(P<0.01), 且模型对照组TG值超过空白对照组的两倍. 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组大鼠血浆TC, TG显著低于模型对照组(P<0.05或P<0.01, 表1).

■创新盘点
本实验首次证明华夏小葱制剂对高脂及酒精引起的脂肪肝具有防治作用, 其作用可能与减轻内皮素的损伤、抑制细胞因子表达有关, 这为开发华夏小葱制剂提供了新的内容.

■应用要点
临床上目前缺乏有效的药物治疗脂肪肝. 华夏小葱制剂可通过减少内皮素和细胞因子的损伤作用而减少脂肪肝的危害, 为临床上脂肪肝的防治提供一种可靠的方法.

■名词解释

1 肿瘤坏死因子-α(TNF-α): TNF-α细胞来源极为广泛, 包括各种免疫细胞、内皮细胞、成纤维细胞等. 他可趋化和激活中性粒细胞, 促进黏附分子的表达, 具有广泛的生物学活性, 例如: 参与炎性反应和免疫应答; 抗肿瘤; 参与内毒性休克、动脉硬化、静脉血栓形成和脉管炎等病理过程; 引起恶液质.

2 核转录因子-κB (NF-κB): 他是由p50和p65多肽亚基组成同源二聚体及异源二聚体. 静息时, NF-κB二聚体与其抑制蛋白IκB家族成员结合, 以三聚体形式存在于胞质中. 氧化应激等因素可通过一个或多个信号转导途径激活IκB激酶, 使胞质中NF-κB三聚体复合物中的磷酸化解离, 游离的NF-κB进入细胞核中, 与DNA分子的特定基因启动子区域上的NF-κB结合位点相结合, 启动基因转录, 生成多种mRNA并表达而参与机体炎症、免疫等反应.

表 1 华夏小葱制剂对各组脂肪肝大鼠肝指数、大鼠血浆TC, TG, ET-1的比较(mean ± SD, n = 10)

分组	肝指数	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	ET-1 (ng/L)
空白对照组	2.33% ± 0. 08%	1.39 ± 0.31	0.48 ± 0.08	138.67 ± 21.84
模型对照组	3.45% ± 0.20%[b]	2.03 ± 0.38[b]	1.18 ± 0.57[b]	180.22 ± 9.80[b]
小葱低剂量组	2.59% ± 0.12%[d]	1.67 ± 0.31[c]	0.65 ± 0.23[c]	149.39 ± 17.82[c]
小葱中剂量组	2.55% ± 0.19%[d]	1.65 ± 0.17[c]	0.60 ± 0.29[c]	136.91 ± 22.48[d]
小葱高剂量组	2.65% ± 0.25%[d]	1.69 ± 0.29[c]	0.55 ± 0.17[d]	130.52 ± 24.93[d]
东宝肝泰片组	2.57% ± 0.16%[d]	1.52 ± 0.31[d]	0.61 ± 0.27[c]	154.45 ± 18.46[c]

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 空白对照组; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 模型对照组.

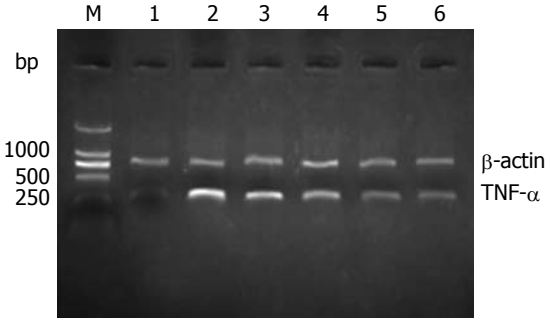

图 1 大鼠肝脏组织TNF-α mRNA表达分析图. M: marker; 1: 空白对照组; 2: 模型对照组; 3: 华夏小葱低剂量组; 4: 华夏小葱中剂量组; 5: 华夏小葱高剂量组; 6: 东宝肝泰片组.

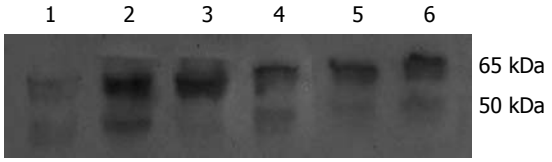

图 2 大鼠肝脏组织NF-κB蛋白表达分析图. 1: 空白对照组; 2: 模型对照组; 3: 华夏小葱低剂量组; 4: 华夏小葱中剂量组; 5: 华夏小葱高剂量组; 6: 东宝肝泰片组.

2.5 *治疗后各组ET-1水平比较* 采用放免法进行测定分析可得出模型对照组大鼠血浆ET-1值显著高于空白对照组(P<0.01); 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组大鼠血浆值显著低于模型对照组(P<0.05或P<0.01, 表1).

2.6 *TNF-α mRNA表达分析* 通过琼脂糖凝胶电泳图进行灰度分析可得出模型对照组大鼠肝脏组织TNF-α/β-actin mRNA值显著高于空白对照组(P<0.01); 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组大鼠肝脏组织TNF-α/β-actin mRNA值显著低于模型对照组(图1, 表2).

2.7 *NF-κB蛋白表达* 经Western blot方法测定, 结果显示模型对照组大鼠肝脏组织NF-κB值显著高于空白对照组(P<0.01); 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组大鼠肝脏组NF-κB值显著低于模型对照组(P<0.05, 图2, 表2).

表 2 华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠肝脏组织TNF-α/β-actin mRNA, NF-κB灰度值结果的比较(mean ± SD, n = 3)

分组	TNF-α/β-actin mRNA	NF-κB
空白对照组	0.47 ± 0.01	110.67 ± 12.90
模型对照组	0.84 ± 0.04[b]	180.33 ± 8.39[b]
小葱低剂量组	0.79 ± 0.01	158.67 ± 8.08[c]
小葱中剂量组	0.73 ± 0.03[d]	141.33 ± 9.29[d]
小葱高剂量组	0.64 ± 0.05[d]	115.67 ± 14.05[d]
东宝肝泰片组	0.71 ± 0.02[d]	118.00 ± 9.85[d]

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 空白对照组; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 模型对照组.

3 讨论

脂肪肝并非临床上一个独立的疾病, 而是各种原因导致的肝脏脂肪蓄积过多的一种病理状态. 有研究结果显示[10]: 在不同时期、不同国家和地区以及不同的人群中, 脂肪肝的发病率及其病因构成比是不同的. 多种因素参与了脂肪肝的发病过程[11-13], 主要包括: (1)遗传因素; (2)环境因素饮食营养状态食物污染食物营养素比例失调; (3)脂质代谢异常; (4)氧应激及脂质过氧化损伤. 本实验采用高脂饮食及酒精水喂养, 并结合每周一次行后肢皮下注射小剂量四氯化碳色拉油溶液的方法成功建立大鼠脂肪肝模型, 符合脂肪肝发病的一般规律. 实验结果表明: 模型对照组大鼠肝指数、血浆TC, TG值显著高于空白对照组(P<0.01), 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组大鼠肝指数、血浆TC, TG值显著低于模型对照组(P<0.01或P<0.05), 说明造模后脂肪肝大鼠血浆中的脂质水平显著增高, 给予华夏小葱制剂灌胃后能显著降低肝指数、TC, TG的含量, 其具有良好的降脂作用.

内皮素(ET)是一种首先由猪的血管内皮细

胞中分离纯化出的21个氨基酸组成的生物活性多肽, 人的ET有三种基因表达, 即ET-1, ET-2, ET-3, 其中以ET-1活性最强. 有研究作过报道[14-15]: ET-1可通过刺激单核细胞、中性白细胞产生IL-8, TNF-α而造成肝细胞损害. 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)主是由单核-吞噬细胞及其他多种细胞产生, 具有极为广泛的生物学活性. 例如, 他可通过激活核转录因子-κB (NF-κB)触发其他细胞因子或黏附分子的分泌, 如IL-6, IL-8和细胞间黏附分子, 从而致肠腔渗透性增加和氧自由基(ROS)产生, 加重炎症和损伤[16-17]. 又有研究显示[18]: 脂肪肝患者的肝脂肪组织有TNF-α mRNA的过度表达, 缺乏TNF-α受体鼠不能诱导发生脂肪性肝炎, 提示了TNF-α在脂肪肝的致病机制的重要作用. NF-κB是由p50和p65多肽亚基组成同源二聚体及异源二聚体, 是一种分布和作用十分广泛的真核细胞转录因子, 在脂肪肝的发病过程中具有非常重要的作用[19], Ribeiro *et al*[20]临床研究也显示了脂肪肝与活化的NF-κB表达相关性. 脂肪肝发病时, NF-κB过度活化, 上调包括TNF-α等在内的多种促炎因子基因的表达, 参与机体炎症、免疫等反应[21]. 通过本实验的研究发现: 模型对照组大鼠ET-1, TNF-α mRNA, NF-κB值显著高于空白对照组($P<0.01$); 华夏小葱低、中、高剂量组及东宝肝泰片组大鼠ET-1, TNF-α mRNA, NF-κB值低于模型对照组($P<0.01$或$P<0.05$或无显著性差异但有趋势). 结果表明: 华夏小葱制剂能够减轻脂肪肝形成中ET的损伤, 抑制NF-κB的活化, 减少TNF-α的表达, 从而在防治脂肪肝中发挥重要的作用.

华夏小葱制剂是我院用鲜葱白提取物精制而成口服液, 已申请了国家专利. 本实验探讨了其对脂肪肝大鼠肝指数、血浆脂质水平、内皮素及细胞因子水平的影响, 为临床上脂肪肝的预防和治疗提供理论指导, 也为开发一种高效、低毒、价廉的中药制剂提供了良好的前景.

4 参考文献

1 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100

2 Tsutsumi And M, Takase S. Effect of fenofibrate on fatty liver in rats treated with alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 75S-79S

3 Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 638-644

4 Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-787

5 张介眉, 时绍红, 郝建军, 邴飞虹. 搏心通对饲高脂家兔抗氧化损伤、改善内皮功能作用的实验研究. 中医杂志 2006; 47: 142-143

6 郑琼莉, 喻荣辉, 祝炜, 李佐民, 戴榕, 吴晓芬, 张介眉. 射心通胶囊抗球囊损伤术后再狭窄作用的实验研究. 中西医结合心脑血管病杂志 2005; 3: 510-511

7 郑琼莉, 张介眉, 喻荣辉, 贺立群, 柯于鹤. 射心通胶囊治疗冠心病心绞痛临床研究. 中国医药学报 2003; 18: 149-151

8 孙要武, 何宝国, 吴嘉慧, 李省三. 大鼠脂肪肝实验模型的建立. 齐齐哈尔医学院学报 2005; 26: 361-362

9 Wise GE, Yao S. Expression of tumour necrosis factor-alpha in the rat dental follicle. *Arch Oral Biol* 2003; 48: 47-54

10 Wooley OW, Wooley SC, Woods WA. Effect of calories on appetite for palatable food in obese and nonobese humans. *J Comp Physiol Psychol* 1975; 89: 619-625

11 范建高, 曾民德, 王国良. 脂肪肝的发病机制. 世界华人消化杂志 1999; 7: 75-76

12 于洪波, 戴林, 彭海英, 牟新春, 左中. 复方中药对大鼠高脂饮食所致脂肪性肝炎肝组织氧化和抗氧化系统的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2842-2847

13 丁小云, 李定国, 徐芹芳, 陆汉明. 辛伐他汀对大鼠实验性脂肪肝的影响. 世界华人消化杂志 2002; 10: 650-653

14 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415

15 杨牧祥, 张一昕, 李平山, 耿兰书, 王秉岳, 冀绪, 李栓路, 戚忠玺. 脂肝泰胶囊对高脂血症性脂肪肝患者内皮素-1的影响. 临床荟萃 2003; 18: 152-153

16 Prandota J. Important role of prodromal viral infections responsible for inhibition of xenobiotic metabolizing enzymes in the pathomechanism of idiopathic Reye's syndrome, Stevens-Johnson syndrome, autoimmune hepatitis, and hepatotoxi-city of the therapeutic doses of acetaminophen used in genetically predisposed persons. *Am J Ther* 2002; 9: 149-156

17 Lieber CS. CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatol Res* 2004; 28: 1-11

18 Oz HS, Im HJ, Chen TS, de Villiers WJ, McClain CJ. Glutathione-enhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model. *J Biochem Mol Toxicol* 2006; 20: 39-47

19 Nathens AB, Bitar R, Watson RW, Issekutz TB, Marshall JC, Dackiw AP, Rotstein OD. Thiol-mediated regulation of ICAM-1 expression in endotoxin-induced acute lung injury. *J Immunol* 1998; 160: 2959-2966

20 Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1708-1717

21 Hutter D, Greene JJ. Influence of the cellular redox state on NF-kappaB-regulated gene expression. *J Cell Physiol* 2000; 183: 45-52

■同行评价

本文用华夏小葱制剂低、中、高剂量组施与大鼠脂肪肝模型模型, 初步结果显示其可降低NF-κB的激活, 减少ET-1和TNF-α, 对实验性大鼠脂肪肝具有较好的防治作用. 实验设计合理, 方法可行, 数据可信.

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 688-693
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

JNK/SAPK信号转导系统在三氧化二砷诱导肝癌细胞凋亡中的作用

李航宇, 钟鑫平, 隋春阳, 孔凡民, 董 明, 张 浩, 刘金钢

■背景资料
As_2O_3是中国传统中药砒霜的主要有效成分, 我国学者应用As_2O_3治疗急性早幼粒性白血病(APL)取得了显著的临床效果. 近来的大量实验表明As_2O_3对肝癌、食管癌、胃癌以及结肠癌等实体瘤亦有明显的抑制作用, 但对于As_2O_3抑制肿瘤的具体机制还有待进一步阐明.

李航宇, 刘金钢, 中国医科大学附属第二医院普外科 辽宁省沈阳市 110004
钟鑫平, 第二军医大学附属东方肝胆医院胆道二科 上海市 200433
隋春阳, 孔凡民, 董明, 张浩, 中国医科大学附属第一医院普外科 辽宁省沈阳市 110001
李航宇, 医学博士, 讲师, 主治医师, 主要从事肝胆恶性疾病的基础与临床研究.
国家自然基金资助项目, No. 30572114
通讯作者: 李航宇, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二医院普外科. li_hangyu@126.com
电话: 024-83955279
收稿日期: 2006-12-20 接受日期: 2007-01-10

Role of JNK/SPARK signal transduction system in the apoptosis of hepatocellular carcinoma cell line $HepG_2$ induced by arsenic trioxide

Hang-Yu Li, Xin-Ping Zhong, Chun-Yang Sui, Fan-Min Kong, Ming Dong, Hao Zhang, Jin-Gang Liu

Hang-Yu Li, Jin-Gang Liu, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Xin-Ping Zhong, the Second Department of Biliary Tract Surgery, Dongfang Hepatobilliary Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Chun-Yang Sui, Fan-Min Kong, Ming Dong, Hao Zhang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by Nation Natural Science Foundation of China, No. 30572114
Correspondence to: Hang-Yu Li, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. li_hangyu@126.com
Received: 2006-12-20 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To explore of the role of JNK/SAPK signal transduction system in the apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line $HepG_2$ induced by arsenic trioxide (As_2O_3).

METHODS: Human hepatocellular carcinoma cell line $HepG_2$ was treated with different concentrations of As_2O_3. MTT assay was used to observe the proliferation of $HepG_2$ cells, and flow cytometry was used to examine the apoptosis rate and growth cycles of the cells. The expression of p-MEK4, JNK, p-JNK, Caspase-3 and poly (ADP ribose) polymerase (PARP) were detected by Western blot before and after JNK signal was blocked by SP600125, a JNK inhibitor.

RESULTS: As_2O_3 inhibited the proliferation of $HepG_2$ cells in a concentration- and time-dependent manner. Flow cytometry showed that As_2O_3 induced the apoptosis of $HepG_2$ cells in a time-dependent way, and the cells were mainly blocked in G_2/M phase (7.22% ± 1.50%, 11.56% ± 0.73%, 33.8% ± 1.62%, and 46.02% ± 0.11% for 0, 24, 48, and 72 hours, respectively). Western blotting exhibited that As_2O_3 induced the activation of Caspase-3 and PARP cleavage. The expression of p-MEK4 and p-JNK were detected 10 minutes after As_2O_3 treatment, reached the peak at the 20th minute, but decreased gradually from the 30th minute, and preceded apoptosis. The content of total JNK had no significant change. The activation of Caspase-3 and PARP were markedly suppressed after SP600125 treatment.

CONCLUSION: As_2O_3 can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of $HepG_2$ cells *in vitro*. As_2O_3-induced apoptosis is achieved by the activation of JNK, and then Caspase-3.

Key Words: Arsenic trioxide; Hepatic cancer; MTT assay; Flow cytometry; Western blot

Li HY, Zhong XP, Sui CY, Kong FM, Dong M, Zhang H, Liu JG. Role of JNK/SPARK signal transduction system in the apoptosis of hepatocellular carcinoma cell line $HepG_2$ induced by arsenic trioxide. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):688-693

摘要

目的: 探讨JNK/SAPK信号转导系统在三氧化二砷(As_2O_3)诱导人肝癌细胞株$HepG_2$凋亡过程中的作用.

方法: 采用MTT法观察不同浓度的As_2O_3对人

类肝癌细胞株$HepG_2$细胞生长的抑制作用; 以流式细胞术观察细胞的凋亡率及生长周期的变化; 以Western blot法检测p-MEK4、JNK、p-JNK、Caspase-3及PARP蛋白在As_2O_3作用下及SP600125阻断JNK信号转导通路情况下的表达.

结果: 各浓度As_2O_3均能明显抑制肝癌细胞$HepG_2$增殖, 且具有剂量依赖性和时间依赖性; 流式细胞术(FCM)分析显示, As_2O_3能够诱导肝癌细胞$HepG_2$凋亡且具有时间依赖性, 细胞滞留于G_2/M期(0, 24, 48, 72 h百分率分别为7.22%±1.50%, 11.56%±0.73%, 33.8%±1.62%, 46.02%±0.11%); Western blotting结果显示, As_2O_3诱导肝癌细胞$HepG_2$凋亡伴随着Caspase-3和PARP的活化; As_2O_3作用于$HepG_2$细胞10 min后p-MEK4和p-JNK蛋白表达开始增加, 20 min达到高峰, 30 min开始减少, 总JNK蛋白的含量无明显改变, MEK4和JNK的激活早于细胞凋亡; 用SP600125预处理$HepG_2$细胞株后, 可以明显减少Caspase-3和PARP的活化.

结论: As_2O_3可以体外通过诱导细胞凋亡抑制肝癌细胞株$HepG_2$的增殖, 细胞凋亡通过Caspase-3途径实现. JNK信号转导通路参与了As_2O_3诱导的$HepG_2$凋亡反应, 并位于Caspase-3的上游.

关键词: 三氧化二砷; 肝癌; MTT法; 流式细胞术; Western blot法

李航宇, 钟鑫平, 隋春阳, 孔凡民, 董明, 张浩, 刘金钢. JNK/SAPK信号转导系统在三氧化二砷诱导肝癌细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(7):688-693
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/688.asp

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的恶性肿瘤之一, 早期诊断困难, 根治性切除的机会小, 死亡率高, 对放化疗均不敏感, 总体疗效欠佳. 三氧化二砷(arsentic trioxide, As_2O_3, 亚砷酸)是中国传统中药砒霜的主要有效成分, 我国学者应用As_2O_3治疗急性早幼粒性白血病(APL)取得了显著的临床效果[1-4]. 近来的大量实验表明, As_2O_3对肝癌、食管癌、胃癌以及结肠癌等实体瘤亦有明显的抑制作用[5-6]. 其中对肝癌作用研究最广泛[7-10], 认为As_2O_3可以通过诱导肝癌细胞凋亡实现抗肿瘤作用. 但对于诱导凋亡的机制, 特别是哪些信号转导通路参与其中尚有待进一步阐明. 作为细胞应激产物的c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)/应激激活蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)信号传导系统, 是丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)家族的一员[11]. 在应激状态下, JNK信号传导系统的胞质内组分首先感受这些变化, 并将其传递给胞核内的组分, 最终通过核转录因子来调控细胞的表达[12]. 我们通过体外细胞实验, 研究JNK/SPAK信号转导系统在As_2O_3诱导肝癌细胞凋亡中的作用.

■研发前沿
近年来, 关于As_2O_3体外抑制肝癌细胞株生长和诱导其凋亡的研究成为研究热点, 但关于A_2O_3的具体作用机制尚未研究清楚, 特别是他与调节凋亡的信号转导系统之间的关系有待研究证实.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株$HepG_2$, 由中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所提供. RPMI1640培养液购自北京华美公司, 小牛血清, MTT购自Gibco公司, 二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司, 兔抗MEK4 (phospho S257+T261) antibody (Abcam产品)[13]、兔抗SAPK/JNK Antibody (CST产品)[14]、兔抗Phospho-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185) Antibody(CST)[15]、兔抗PARP Polyclonal Antibody (Biovision产品)、兔抗Cleaved Caspase-3 (Asp175)Antibody (CST产品)及特异性JNK抑制剂SP600125(Alexis Biochemicals产品)[16]均购自晶美生物工程有限公司. 亚砷酸三氧化二砷(As_2O_3)注射液为哈尔滨伊达药业有限公司上市药品. 肝癌细胞株$HepG_2$常规培养于含100 mL/L小牛血清, 1×10^5 U/L青霉素及链霉素的RPMI1640培养液中, 置于37℃, 50 mL/L CO_2培养箱内培养.

1.2 方法 As_2O_3对肝癌细胞增殖的抑制作用, 用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法进行检测. 取对数生长期细胞制成1×10^7/L单细胞悬液, 接种96孔培养板, 每孔200 μL, 37℃, 50 mL/L CO_2的培养箱培养, 培养24 h后, 弃去培养液, 每孔分别加入终浓度为0.5, 1, 2, 5, 10 μmol/L的As_2O_3 200 μL, 对照孔加200 μL培养液, 继续培养0-72 h, 实验终止前4 h加入50 g/L MTT溶液20 μL, 继续孵育4 h, 除去每孔培养液, 加DMSO 100 μL, 振荡15 min, 用酶联仪以波长570 nm测定各孔*A*值. 并计算细胞生长抑制率(%) = (1-加药孔平均*A*值/对照孔平均*A*值)×100%. 另取1×10^6的对数生长期的细胞悬液接种于培养瓶中, 待细胞贴壁后, 采用血清饥饿法使细胞同化. 加入终浓度为10 μmol/L的As_2O_3溶液, 置培养箱中培养0-72 h. 贴壁细胞用25 g/L胰酶+0.2 g/L乙二

■**创新盘点**
本研究不但证实了As_2O_3可以体外通过诱导细胞凋亡抑制肝癌细胞株$HepG_2$的增殖, 并且证实了JNK信号转导通路参与了As_2O_3诱导的$HepG_2$凋亡反应, 并位于Caspase-3的上游, 首次阐明了As_2O_3与JNK/SAPK信号转导系统之间的连系.

胺四乙酸二钠(EDTA)消化、离心(2000 r/min, 5 min), 缓慢加入700 mL/L预冷的乙醇1 mL固定1 h, 加入含有RNase 10 mg/L和50 mg/L的碘化丙啶(Propidium Iodide)的PBS进行染色, 过滤后, 存放在4℃冰箱内, 20 min后上流式细胞仪检测. 使用CELL Quest软件进行分析. 以上实验重复3次, 取其平均值. As_2O_3作用下Caspase-3和PARP的激活, 采用Western blot进行检测. 根据作用时间的不同分为12, 24, 48和72 h四组, 每组又根据是否有As_2O_3作用分为两个亚组. 在As_2O_3作用下JNK/SAPK信号转导系统各因子的变化情况, 采用Western blot进行检测. 根据作用时间的不同分为10, 20和30 min三组, 每组又根据是否有As_2O_3作用分为两个亚组. JNK信号转导通路阻断采用SP600125, 20 μmol/L, 预处理$HepG_2$细胞株1 h后, 加入As_2O_3, 检测各指标变化. 根据是否同时有As_2O_3和SP600125作用交叉分组, 采用Western blot进行检测. 主要步骤为: 取1×10^6的对数生长期的细胞悬液接种于培养瓶中, 待细胞贴壁后, 采用血清饥饿法使细胞同化. 分别加入终浓度为10 μmol/L的As_2O_3溶液, 置培养箱中培养0-30 min. PBS洗涤后, 加入适量细胞裂解液裂解细胞, 用细胞刮刀刮下后, 收集于1.5 mL的微量离心管中, 以12 000 r/min离心20 min (4℃). 取上清, 用Bradford法测定蛋白含量. 每种样品各取蛋白50 μg, 上样, 100 g/L SDS-PAGE (分离胶100 g/L, 浓缩胶60 g/L). 泳毕, 将凝胶上的蛋白电转移至硝酸纤维膜(NC)上, 滴加10 g/L BSA封闭后, 依次滴加一抗(兔抗, 工作浓度均为1∶1000)及二抗(1∶3000 HRP标记的羊抗兔IgG), 于室温下分别作用2, 1 h, 设β-actin为内参照, 洗膜后, 用ECL化学发光法观察结果.

统计学处理 实验数据采用SPSS12.0统计分析软件进行*t*检验, 所有数值以mean±SD表示, $P<0.05$有统计学意义.

2 结果

2.1 As_2O_3抑制$HepG_2$增殖 MTT结果显示, 各浓度As_2O_3均能明显抑制肝癌细胞$HepG_2$增殖(图1), 且具有剂量依赖性和时间依赖性, 抑制率同作用时间呈直线相关($P<0.01$). 结果表明, 10 μmol/L组在24, 48和72 h的抑制率分别为29.63%, 71.27%和81.44%, 对$HepG_2$增殖抑制最明显, 因此, 在后续的实验中我们采用10 μmol/L As_2O_3作为干扰因素, 探讨As_2O_3对各指标的影响.

2.2 As_2O_3诱导$HepG_2$凋亡 流式细胞术(FCM)分析显示, 将终浓度为10 μmol/L的As_2O_3溶液作用于肝癌细胞0-72 h后, 经流式细胞仪检测, 结果显示, 作用24, 48和72 h凋亡率分别为15.35%, 24.62%和48.53%, 呈时间依赖性. 对细胞周期的分布表现为, 随着作用时间的增加, S期细胞呈下降趋势, 而G_2/M期细胞比例呈上升趋势. 说明细胞滞留于G_2/M期(表1). Western blot结果显示, As_2O_3作用于$HepG_2$细胞24 h后可以看到Caspase-3前体及其底物PARP被剪切激活, 出现活化的Caspase-3条带(cleaved Caspase-3, 17 kDa)和活化的PARP条带(85 kDa), 并随时间延长作用加强(图2).

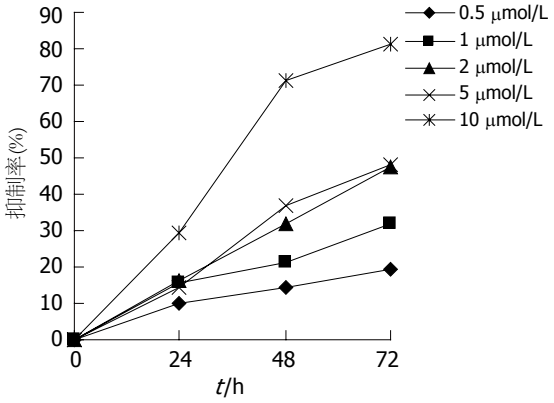

图 1 As_2O_3对$HepG_2$细胞生长的抑制率.

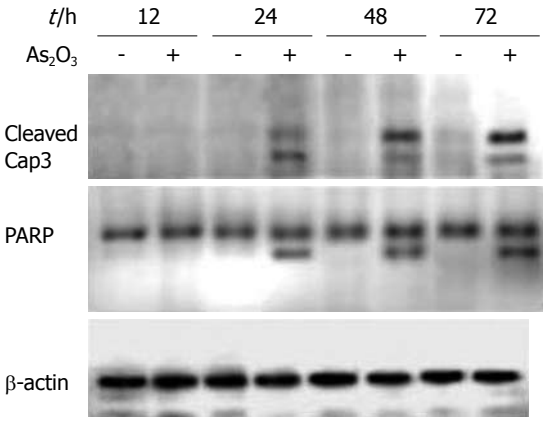

图 2 As_2O_3诱导$HepG_2$凋亡. As_2O_3作用于$HepG_2$细胞24 h后可以看到Caspase−3前体及其底物PARP被剪切激活, 出现活化的Caspase−3条带(cleaved Caspase−3, 17 kDa)和活化的PARP条带(85 kDa), 并随时间延长作用加强.

2.3 As_2O_3激活MEK4和JNK Western blot结果显示, As_2O_3作用于$HepG_2$细胞10 min后p-MEK4和p-JNK蛋白表达开始增加, 20 min达到高峰, 30 min开始减少. 总JNK蛋白的含量无明显改变(图3). MEK4和JNK的激活早于细胞凋亡.

2.4 SP600125阻断JNK通路对凋亡的影响 用

表 1 As_2O_3对$HepG_2$细胞凋亡及细胞周期的影响(%)

分组(h)	凋亡	G_0/G_1	S	G_2/M
0	–	67.35 ± 0.88	25.43 ± 1.12	7.22 ± 1.50
24	15.35 ± 2.11	63.43 ± 1.53	25.01 ± 1.27	11.56 ± 0.73
48	24.62 ± 3.71	41.43 ± 2.24	24.77 ± 0.23	33.8 ± 1.62
72	48.53 ± 4.22	34.41 ± 1.55	19.57 ± 2.01	46.02 ± 0.11

■应用要点
针对信号转导通路不同作用点, 特别是JNK/SAPK信号转导系统的抗癌药物已经在国外出现. 阐明As_2O_3与JNK/SAPK信号转导系统之间的连系, 不但有助于揭示其作用机制, 更为其在抗癌领域的临床应用奠定了坚实的基础.

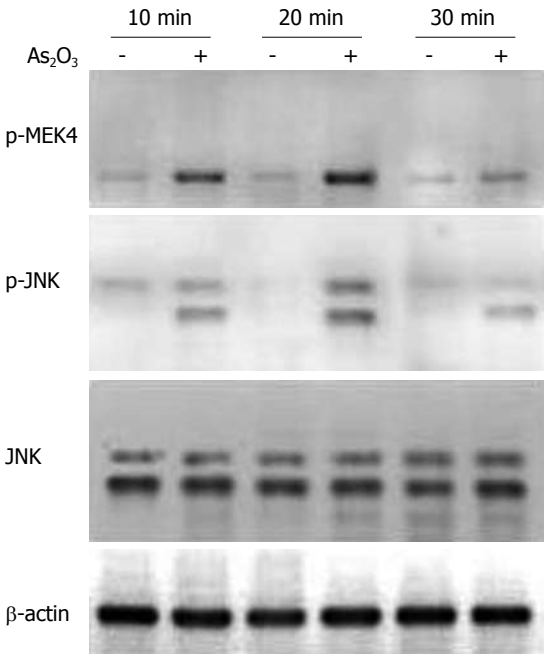

图 3 As_2O_3激活MEK4和JNK. As_2O_3作用于$HepG_2$细胞10 min后p-MEK4和p-JNK蛋白表达开始增加, 20 min达到高峰, 30 min开始减少, 总JNK蛋白的含量无明显改变.

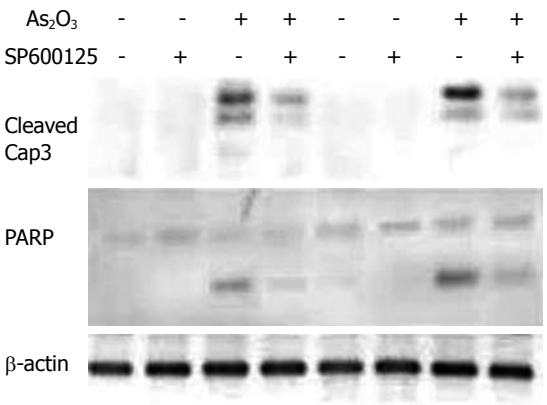

图 4 SP600125阻断JNK通路对凋亡的影响. 用SP600125预处理$HepG_2$细胞株1 h后, 可以明显减少Caspase-3和PARP的活化.

SP600125, 20 μmol/L, 预处理$HepG_2$细胞株1 h后, 加入As_2O_3作用48 h, Western blot检测结果显示, SP600125可以明显减少Caspase-3和PARP的活化, 提示JNK信号转导通路参与了As_2O_3诱导的$HepG_2$细胞凋亡反应(图4).

3 讨论

As_2O_3的抗肿瘤作用最早在急性早幼粒白血病的治疗中得到体现, 近年来人们开始将As_2O_3研究的热点转移到各种实体瘤的治疗上, 特别是对肝癌细胞的抑制作用研究的较为深入[17], 发现As_2O_3可以抑制肝癌细胞的增殖[18]. 我们采用MTT法检测不同浓度As_2O_3对肝癌细胞株$HepG_2$生长影响的实验, 结果表明As_2O_3可以使$HepG_2$的生长受到明显的抑制作用, 并且这种抑制作用具有时间依赖性及剂量依赖性, 从而证实As_2O_3确实具有体外抑瘤作用[19]. 流式细胞分析结果显示, 终浓度为10 μmol/L的As_2O_3溶液作用于$HepG_2$后, 可以诱导其凋亡, 并具有时间依赖性. Western blot结果进一步揭示, As_2O_3作用24 h后开始出现活化的Caspase-3和PARP蛋白, 并随时间的延长而表达增加, 持续至少72 h. 由此可见, As_2O_3抑制肝癌细胞增殖的作用可能是通过诱导细胞凋亡来实现的[20-21]. 细胞凋亡(apoptosis)是正常机体细胞对环境的生理性病理性刺激信号, 环境条件的变化或缓和性损伤产生的应答有序变化的死亡过程, 黏在多细胞生物的组织分化、器官发育、机体稳态的维持中有着重要的意义. 细胞凋亡不是一件被动的过程, 而是主动过程, 黏涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用. 有研究发现, As_2O_3作用于肿瘤细胞引起的凋亡在48 h达到较高水平后开始下降, 提示As_2O_3引起的细胞死亡是非典型死亡, 即凋亡与坏死现象共存, As_2O_3在诱导肿瘤细胞凋亡的同时也发挥了一定的细胞毒作用[22]. 但本研究结果未发现上述改变, 随着As_2O_3作用时间的延长, $HepG_2$的凋亡率逐渐增加, 这种作用至少持续72 h.

Caspase-3是ICE/CED-3家族的重要成员, 是细胞凋亡调控的重要因子, 以无活性前体存在于细胞质中, 当细胞进入凋亡时被激活, 并可促进ICE家族其他成员一起促进细胞凋亡[23-25].

■名词解释
细胞凋亡(apoptosis): 是正常机体细胞对环境的生理性病理性刺激信号, 环境条件的变化或缓和性损伤产生的应答有序变化的死亡过程, 他在多细胞生物的组织分化、器官发育、机体稳态的维持中有着重要的意义.

PARP为Caspase-3的底物, 因Caspase-3的活化将导致细胞发生凋亡性死亡, 所以PARP又被称为“死亡底物”[26]. Caspase-3经激活后能识别PARP中的Asp-Glu-Val-Asp (DVCD)序列, 从而剪切PARP. 目前认为, PARP蛋白的剪切是细胞凋亡的标志. PARP在维持DNA的完整性方面起着重要作用. 当PARP被降解后便失去了对DNA完整性的监护作用, 结果使受PARP负调控影响的Ca^{2+}/Mg^{2+}依赖性核酸内切酶活性增高, 裂解核小体间的DNA, 引起细胞凋亡[27-29].

有研究表明, As_2O_3可以通过活化Caspase-3途径诱导人肿瘤细胞凋亡[30-32]. 本研究亦发现, As_2O_3诱导$HepG_2$细胞凋亡伴有Caspase-3的活化. Caspase-3作为细胞凋亡的执行因子, 受其上游多种信号转导通路的调控. 我们在研究中发现, As_2O_3作用10 min后开始出现磷酸化MEK4和磷酸化JNK蛋白表达增加, 20 min达到高峰, 30 min开始减少, 且总JNK蛋白表达无变化, 表明p-JNK蛋白的增加是JNK活化所致. 因此, As_2O_3可以活化MEK4和JNK蛋白[33], 这种作用要早于细胞凋亡的出现(24 h), 即出现活化Caspase-3及PARP. 应用特异性JNK阻断剂SP600125, 预处理$HepG_2$细胞株后, Caspase-3及PARP的活化受到明显抑制. 可见, JNK信号转导通路参与了As_2O_3诱导的$HepG_2$凋亡反应, 并位于Caspase-3的上游. 由于SP600125并未完全阻断Caspase-3及PARP的活化, 因此As_2O_3还可以通过其他信号转导通路来活化Caspase-3, 诱导$HepG_2$凋亡. 要阐明所有参与As_2O_3诱导$HepG_2$凋亡反应的信号转导通路, 尚须进一步的相关研究.

总之, 我们的研究表明, As_2O_3可以体外通过诱导细胞凋亡抑制肝癌细胞株$HepG_2$的增殖. 细胞凋亡通过Caspase-3途径实现. JNK信号转导通路参与了As_2O_3诱导的$HepG_2$凋亡反应, 并位于Caspase-3的上游.

4 参考文献

1 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 施福东, 邱凤琴, 洪珞珈, 韩雪英, 杨惠芬, 宋颖昭, 刘艳平, 周晋, 金镇敬. 三氧化二砷注射液治疗72例急性早幼粒细胞白血病. 中华血液学杂志 1996; 17: 58-60

2 Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY. Use of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997; 89: 3354-3360

3 Jing Y, Dai J, Chalmers-Redman RM, Tatton WG, Waxman S. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood* 1999; 94: 2102-2111

4 高飞, 易静, 史桂英, 李慧, 金慧芳, 石学耕, 汤雪明. 活性氧水平决定白血病细胞对三氧化二砷诱导凋亡的敏感性. 生物化学与生物物理学报 2001; 33: 585-589

5 Xiao YF, Liu SX, Wu DD, Chen X, Ren LF. Inhibitory effect of arsenic trioxide on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5780-5786

6 钱军, 秦叔逵, 何泽明, 王琳, 陈映霞, 邵志坚, 刘秀峰. 三氧化二砷治疗中晚期原发性肝癌的临床研究. 中华肝脏病杂志 2002; 10: 63

7 Oketani M, Kohara K, Tuvdendorj D, Ishitsuka K, Komorizono Y, Ishibashi K, Arima T. Inhibition by arsenic trioxide of human hepatoma cell growth. *Cancer Lett* 2002; 183: 147-153

8 陈惠英, 刘文虎, 秦叔逵. 三氧化二砷对肝癌细胞株凋亡的诱导作用. 世界华人消化杂志 2000; 8: 532-535

9 徐洪雨, 高媛媛, 武俏丽, 高光强, 杨幼林, 陈淑香, 刘铁夫. 三氧化二砷抑制人肝癌细胞株增殖和诱导凋亡作用. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1233-1237

10 邬红霞, 于志坚. 三氧化二砷治疗肝胆系统恶性肿瘤机理及临床研究进展. 南通大学学报(医学版) 2006; 26: 154-156

11 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410: 37-40

12 Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994; 369: 156-160

13 Hagemann C, Blank JL. The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* 2001; 13: 863-875

14 Dai Y, Yu C, Singh V, Tang L, Wang Z, McInistry R, Dent P, Grant S. Pharmacological inhibitors of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase/MAPK cascade interact synergistically with UCN-01 to induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res* 2001; 61: 5106-5115

15 Shukla A, Timblin CR, Hubbard AK, Bravman J, Mossman BT. Silica-induced activation of c-Jun-NH2-terminal amino kinases, protracted expression of the activator protein-1 proto-oncogene, fra-1, and S-phase alterations are mediated via oxidative stress. *Cancer Res* 2001; 61: 1791-1795

16 Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13681-13686

17 Tchounwou PB, Wilson BA, Ishaque AB, Schneider J. Atrazine potentiation of arsenic trioxide-induced cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Mol Cell Biochem* 2001; 222: 49-59

18 刘连新, 朱安龙, 姜洪池, 周津, 王秀琴, 吴旻. 三氧化二砷对肝癌细胞系BEL-7402的影响. 中国普外基础与临床杂志 2001; 8: 209-211, 217

19 黄介飞, 谭兵, 魏群, 张弘, 倪润洲. 三氧化二砷对肝细胞肝癌抗肿瘤作用的实验研究. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 623-625

20 苏颖, 陈增, 林可焴, 邹长棪, 林华妹. 三氧化二砷抑制肝癌细胞端粒酶表达及诱导细胞凋亡作用. 世界华人

消化杂志 2003; 11: 264-267
21 刘连新, 姜洪池, 朱安龙, 周津, 王秀琴, 吴旻. 三氧化二砷对肝癌细胞凋亡的诱导及机制的探讨. 中华医学杂志 2001; 81: 1526-1527
22 刘静冰, 秦叔逵, 李进. 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1713-1716
23 Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-43
24 Gottlob K, Fulco M, Levrero M, Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* 1998; 273: 33347-33353
25 蒋晖, 朱润庆, 陈洪雷. 非小细胞肺癌组织中caspase-3及其底物PARP、DFF45蛋白表达的意义. 肿瘤防治研究 2005; 32: 619-622
26 Rodriguez-Lafrasse C, Alphonse G, Broquet P, Aloy MT, Louisot P, Rousson R. Temporal relationships between ceramide production, caspase activation and mitochondrial dysfunction in cell lines with varying sensitivity to anti-Fas-induced apoptosis. *Biochem* J 2001; 357: 407-416
27 Srinivas G, Anto RJ, Srinivas P, Vidhyalakshmi S, Senan VP, Karunagaran D. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. *Eur J Pharmacol* 2003; 473: 117-125
28 van Wijk SJ, Hageman GJ. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 81-90
29 Koh DW, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res* 2005; 52: 5-14
30 艾志龙, 陆维琪, 秦新裕. 三氧化二砷诱导人胆囊癌GBC细胞凋亡及其机制研究. 中国癌症杂志 2006; 16: 337-340
31 马银斌, 吴诚义, 陈鑫. As_2O_3对人乳腺癌中NF-κB p65、survivin和caspase-3的作用及相关性研究. 中国普外基础与临床杂志 2006; 13: 409-412
32 阳东荣, 陈昭典, 单玉喜. 三氧化二砷对激素非依赖性前列腺癌PC-3细胞Caspase-3活性及Survivin基因表达的影响. 中华实验外科杂志 2005; 22: 20-22
33 章圣辉, 韩义香, 尹丽慧, 熊术道, 吴建波. 三氧化二砷诱导K562细胞凋亡与其抑制Evi-1表达有关. 癌变・畸变・突变 2006; 18: 323-326

■**同行评价**
本文研究了JNK/SAPK信号转导系统在三氧化二砷诱导肝癌细胞凋亡中的作用, 内容新颖, 总体设计合理, 结果可信, 有较高的参考价值.

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

2007年协和肝脏外科新技术学习班通知

本刊讯 为了提高我国肝脏外科学临床与研究水平, 学习该领域国际先进技术和理念, 促进学术交流和学科发展, 由洛克菲勒基金会设立的CMB基金会资助, 中国医学科学院、中国协和医科大学、北京协和医院主办, 天津第一中心医院东方器官移植中心、中山大学第一附属医院器官移植中心协办, 中国医学科学院国际会议中心承办的“07年协和肝脏外科新技术学习班”将于2007-04下旬在北京市中国协和医科大学新科研教学楼举行.

培训班将邀请国内外肝脏外科领域著名专家黄洁夫教授、钟守先教授、芝加哥大学移植中心主任Michael Millis教授、瑞典Lund 大学肝外科主任Bengt Jeppsson教授、香港范上达教授、冷希圣教授、叶胜龙教授、沈中阳教授、何晓顺教授、朱继业教授、戴朝六教授等任教. 培训班除邀请国内知名专家作专题学术讲座外, 还有机会在天津第一中心医院东方器官移植中心进行临床肝移植的学习和观摩; 本培训班的另一个特点是参加培训的学员有申请CMB基金会合作课题并得到适当的基金资助的机会; 培训班将给予国家级继续教育学分10分. 我们真诚欢迎各位肝脏外科领域的同仁参加培训班, 共同促进和加强肝脏外科学的学术交流与合作, 推动我国肝脏外科学的发展.

收费标准: 培训费680元/人(含材料费和讲课费, 食宿自理)

通讯地址: 北京东城区东单三条9号中国医学科学院/中国协和医科大学国际合作处 邮编: 100730 联系人: 乔楠、蒋育红 电话: 010-65105934, 65105935, 65253447 传真: 010-65124876 E-mail: jiangyuhong@yzjg.pumc.edu.cn; dakuansun@yahoo.com.cn.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 694-699
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

添加益生元肠内营养对重症急性胰腺炎肠屏障损害和内毒素易位的作用

王 慧, 钟 燕, 蔡东联, 耿珊珊, 韩 婷, 陈凌云

■背景资料
重症急性胰腺炎(SAP)是临床常见的危急重症, 由于肠屏障功能受损, 肠源性细菌和内毒素易位引起继发感染, 所导致的多器官功能障碍综合征是患者死亡的主要原因, 目前尚缺乏有效的治疗手段. 近年来, 添加微生态调节剂的肠内营养在维护肠屏障功能完整性方面的作用被提升到较高地位. 微生态调节剂主要包括益生菌(probiotics)、益生元(prebiotics)及两者共同构成的合生素(synbiotics), 他们在保护肠屏障功能方面的作用既有共性, 也有区别. 与活菌制剂相比, 益生元不会对机体产生任何毒副作用, 同时还具有可溶性食物纤维的基本特性; 具有良好的耐消化性, 不易被唾液、胰液、肠液中的酶类分解, 可以到达结肠, 被结肠内细菌代谢. 目前关于益生元对肠屏障功能作用研究报道较少, 而且相关作用机制不明确, 尚需深入研究.

王慧, 中国人民解放军第一五三医院营养科 河南省郑州市 450052
钟燕, 上海交通大学医学院营养系 上海市 200092
蔡东联, 耿珊珊, 韩婷, 陈凌云, 第二军医大学附属长海医院临床营养中心 上海市 200433
王慧, 1998年河南中医学院学士, 主要从事临床营养研究.
上海市科学技术委员会科研计划项目, No. 034119829
通讯作者: 钟燕, 200092, 上海市控江路1665号, 上海交通大学医学院营养系. zhongyan73@263.net
电话: 021-65790000-3315
收稿日期: 2006-12-20 接受日期: 2007-01-10

Enteral nutrition with prebiotics on intestinal barrier dysfunction and endotoxin translocation in severe acute pancreatitis

Hui Wang, Yan Zhong, Dong-Lian Cai, Shan-Shan Geng, Ting Han, Ling-Yun Chen

Hui Wang, Department of Nutrition, the 153 Hospital of Chinese PLA, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China
Yan Zhong, Department of Nutrition, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China
Dong-Lian Cai, Shan-Shan Geng, Ting Han, Ling-Yun Chen, Center of Clinical Nutrition, Changhai Hospital Affiliated to the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Supported by the Science Research Project of Shanghai Science and Technology Committee, No. 034119829
Correspondence to: Dr. Yan Zhong, Department of Nutrition, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, 1665 Kongjiang Road, Shanghai 200092, China. zhongyan73@263.net
Received: 2006-12-20 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To explore the effect of micro-ecological enteral nutrition (EN) with prebiotics on the intestinal barrier dysfunction and endotoxin translocation in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: SAP specific enteral nutrition formula (EN-S) was prepared based on the nutritional and metabolic characteristic of SAP, and the micro-ecological EN formula was prepared with EN-S plus prebiotics (PRE-EN). Sixty-four Spraugue Dawley rats were divided randomly and averagely into 8 groups: sham operation control 4-day group, sham operation control 7-day group, SAP with EN-S 4-day group, SAP with EN-S 7-day group, SAP with PRE-EN 4-day group, SAP with PRE-EN 7-day group, SAP with PN 4-day group, and SAP with PN 7-day group, named as group A, B, C, D, E, F, G and H, respectively. The rat model of SAP was established by injection of 38 g/L sodium taurocholate (1 mL) beneath the pancreatic capsule. The nutritional therapy began after SAP model was established. The rats were killed on day 4 and 7, respectively. The serum levels of endotoxin and diamine oxidase (DAO) were detected. The apoptosis of intestinal mucosal epithelial cells were analyzed with terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP-biotin nick and labeling (TUNEL) method, and the apoptosis index (AI) was calculated.

RESULTS: At each time point, the levels of plasma endotoxin and DAO, and the value of AI were significantly higher in group C (158.7 ± 23.9 EU/L, 5.17 ± 0.62 kU/L, 50.5% ± 9.7%), D (140.5 ± 20.9 EU/L, 4.09 ± 0.49 kU/L, 41.6% ± 7.8%), E (110.4 ± 14.4 EU/L, 3.44 ± 0.59 kU/L, 48.9% ± 8.5%), F (88.16 ± 30.4 EU/L, 2.83 ± 0.96 kU/L, 33.8% ± 5.1%), G (202.0 ± 30.3 EU/L, 7.29 ± 0.68 kU/L, 63.5% ± 6.7%) and H (210.2 ± 30.3 EU/L, 7.57 ± 1.01 kU/L, 64.7% ± 10.4%) than those in group A (39.6 ± 13.1 EU/L, 2.01 ± 0.34 kU/L, 22.6% ± 3.3%) and B (40.7 ± 12.4 kU/L, 2.12 ± 0.42 kU/L, 23.1% ± 5.4%) ($P < 0.01$), and the above indexes were also markedly lower in group C, D, E and F than those in group G and H ($P < 0.01$). The levels of endotoxin and DAO in group E and F were markedly lower than those in group C and D, and AI value was significantly lower in group F than that in group D ($P < 0.05$). As compared with those on day 4, the level of DAO and the value of AI in EN-S and PRE-EN groups were significantly decreased on day 7 ($P < 0.01$), and there was a decreasing trend without significance for plasma endotoxin level.

CONCLUSION: Micro-ecological EN with pre-

biotics is beneficial in maintaining intestinal barrier function, decreasing the apoptosis of intestinal epithelial cells and the occurrence of endotoxin translocation. EN is superior to PN in maintaining intestinal barrier function.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Enteral nutrition; Prebiotics; Intestinal barrier dysfunction; Endotoxin translocation

Wang H, Zhong Y, Cai DL, Geng SS, Han T, Chen LY. Enteral nutrition with prebiotics on intestinal barrier dysfunction and endotoxin translocation in severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):694-699

摘要

目的: 研究重症急性胰腺炎(SAP)大鼠早期给予添加益生元的微生态肠内营养后对肠屏障损害和内毒素易位的作用及其机制.

方法: 根据SAP营养代谢特点配制专用EN配方(EN-S), 并添加低聚半乳糖益生元制成微生态肠内营养配方(RPE-EN). 64只SD大鼠被随机分成8组(n = 8): 假手术对照4 d组, 假手术对照7 d组, SAP+EN-S治疗4 d组、SAP+EN-S治疗7 d组、SAP+PRE-EN治疗4 d组、SAP+PRE-EN治疗7 d组、SAP+PN治疗4 d组、SAP+PN治疗7 d组. 采用胰被膜下均匀注射38 g/L牛磺胆酸钠法建立SAP大鼠模型, 营养治疗在模型建立成功后即开始. 分别在第4天和第7天处死大鼠, 分别采用偶氮基质显色法和辣根过氧化物酶检测血浆内毒素和二胺氧化酶(DAO)水平, 采用TUNEL法检测小肠上皮细胞凋亡, 并计算凋亡指数(AI).

结果: EN-S、PRE-EN及PN组的血浆内毒素(4 d组: 158.7±23.9, 110.4±14.4, 202.0±30.3 EU/L *vs* 39.6±13.1 EU/L; 7 d组: 140.5±20.9, 88.16±30.4, 210.2±30.3 EU/L *vs* 40.7±12.4 EU/L)、DAO (4 d组: 5.17±0.62, 3.44±0.59, 7.29±0.68 kU/L *vs* 2.01±0.34 kU/L; 7 d组: 4.09±0.49, 2.83±0.96, 7.57±1.01 kU/L *vs* 2.12±0.42 kU/L)和AI (4 d组: 50.5%±9.7%, 48.9%±8.5%, 63.5%±6.7% *vs* 22.6%±3.3%; 7 d组: 41.6%±7.8%, 33.8%±5.1%, 64.7%±10.4% *vs* 23.1%±5.4%)显著高于假手术对照组(P<0.01), 而EN-S和PRE-EN组的内毒素、DAO和AI显著低于相同时间点的PN组(P<0.01); PRE-EN组的内毒素、DAO水平显著低于相同时间点的EN-S组(P<0.01), 而AI显著低于EN-S 7 d组(P<0.05); EN-S和PRE-EN 7 d组与4 d组相比, DAO水平和AI显著降低, 内毒素水平有降低趋势, 但未检出显著性差异.

结论: 添加益生元的微生态EN有助于维护SAP大鼠肠屏障功能, 减少肠上皮细胞凋亡, 减少内毒素易位的发生; EN在维护SAP大鼠肠屏障功能方面的作用优于PN.

关键词: 重症急性胰腺炎; 肠内营养; 益生元; 肠屏障损害; 内毒素易位

王慧, 钟燕, 蔡东联, 耿珊珊, 韩婷, 陈凌云. 添加益生元肠内营养对重症急性胰腺炎肠屏障损害和内毒素易位的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(7):694-699
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/694.asp

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)患者后期的细菌和内毒素易位以及多器官功能衰竭是导致患者死亡的主要原因[1-3], 其发生与肠屏障破坏有密切关系. 肠外营养(parenteral nutrition, PN)用于SAP治疗的主要弊端是无法给肠屏障提供良好的保护, 容易导致后期并发症的出现, 因此早期给予SAP患者肠内营养(enteral nutrition, EN)近年来被重新受到重视[4-6]. 微生态EN是在普通EN的基础上添加某些微生态调节剂(包括益生菌、益生元和合生素), 以增强对肠屏障功能的保护作用. 一直以来人们多关注于对益生菌的研究而忽略了益生元类物质在临床的应用价值. 低聚糖类益生元作为一类重要的微生态调节剂, 可以促进肠内益生菌生长, 对维护肠屏障功能受损具有一定作用[7-9]. 在众多低聚糖中被称为双歧杆菌生长因子的低聚半乳糖(galacto-oligosaccharides, GOS)是很有发展前景的一种. 本研究根据SAP营养代谢特点研制合成专用的EN配方(EN-S), 并在该配方基础上添加GOS益生元制成微生态EN制剂(EN-PRE), 通过对SAP模型大鼠肠上皮细胞凋亡分析和血浆内毒素与二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)检测, 研究该EN-S, EN-PRE和PN在肠屏障功能损害和内毒素易位发生中的作用效果.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂清洁级SD大鼠64只, 6-7周龄, 体质量250±8 g(由第二军医大学实验动物中心提供). 动物适应性喂养7 d后进行实验. 此期间自由进食和饮水. 950 g/L水解乳清单白(美国GRANDE公司), 低聚半乳糖GOS(西安德施普生物制品有限公司), 内毒素鲎试剂盒(上海市

■研发前沿
如何维护肠屏障功能的完整性一直是临床多种应激性疾病治疗的关键和难点, 免疫微生态制剂正成为解决该问题的一个重要武器而受到越来越多的关注.

■相关报道
近年来有研究发现在SAP患者肠内营养中应用益生元具有改善临床预后的作用, 动物实验也发现具有改善肠屏障的作用, 但对其作用机制研究不明确, 有关对肠上皮细胞凋亡的调节作用未见报道.

■创新盘点
本研究通过SAP大鼠模型, 证实在肠内营养中添加低聚半乳糖益生元可以通过调节肠道上皮细胞凋亡, 起到防止内毒素易位和维持肠黏膜屏障完整性的作用.

医学化验所), 辣根过氧化物酶(Sigma公司), 邻茴香胺甲醇溶液(Sigma公司), 尸胺二氢氯化物(Sigma公司), TUNEL原位检测试剂盒(Roche公司), 肠内营养泵(flocate 800型肠内输注泵, 荷兰Nutricia公司), 静脉推注泵(Flo-Gard 6201, Baxter公司), 台式高速低温离心机(Beckman公司), UV754分光光度计(上海第三分析仪器厂).

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立 64只SD大鼠被随机分成8组(n = 8只): 假手术对照4 d组, 假手术对照7 d组, SAP+EN-S治疗4 d组、SAP+EN-S治疗7 d组、SAP+PRE-EN治疗4 d组、SAP+PRE-EN治疗7 d组、SAP+PN治疗4 d组、SAP+PN治疗7 d组. 实验前大鼠禁食12 h以上, 自由饮水. 采用25 g/L硫喷妥钠腹腔注射麻醉, 无菌条件下经上腹正中切口进腹, 暴露胰腺, 用1 mL注射器从胰尾部开始被膜下多点缓慢均匀注入38 g/L牛磺胆酸钠1 mL, 使整个胰腺均匀隆起, 胰腺组织可在短时间内出现充血、水肿, 继则可见包膜下胰腺组织点状或小片状出血, 约2 min后轻轻把胰腺复位, 分层缝合腹部切口. 对照组切开腹腔后, 轻翻胰腺后缝合切口. 胰腺病理学检查证实模型组发生出血坏死.

1.2.2 喂养途径建立 胃十二指肠置管方法: 经胃幽门区, 置入已用生理盐水充盈的外径1.5 mm无菌硅胶管, 远端位于空肠屈氏韧带以下5 cm左右, 在胃部荷包缝合固定, 经皮下隧道将硅胶管自颈部引出, 用自制背扣固定于颈部皮肤, 连接于肠内营养输注泵. 颈外静脉插管方法: 钝行分离出颈外静脉, 经颈外静脉置入已用生理盐水充盈的外径为1.2 mm无菌硅胶管, 用丝线结扎固定, 随后将硅胶管由颈背部皮下隧道引出, 导管穿过弹簧, 用自制背扣固定于颈部皮肤, 并连接于静脉推注泵.

1.2.3 营养给予方式 各EN组待术后动物清醒后6 h给予少量生理盐水冲洗肠管, 12 h时起肠内滴注EN制剂, 从最初1.0 mL/h的滴速逐渐增加, 至术后36 h滴速达到2.0 mL/h, 50 mL/d, 之后维持此速度; PRE-EN组动物每天营养液内添加1.0 g GOS益生元; PN组静脉营养液滴注速度在术后36 h内从1.0 mL/h增加至2.0 mL/h, 50 mL/d.

1.2.4 标本收集及测定 分别在造模后第4天和第7天处死动物, 腹主动脉取血, 将血液置于抗凝管中, 2500 r/m离心15 min, 同时取1 cm回肠组织, 40 g/L中性福尔马林固定. 内毒素检测采用鲎试剂盒, 用偶氮基质显色法检测. 血浆二胺氧化酶采用分光光度法测定[10], 在样品管中先后加入标本、0.2 mol/L pH7.2的磷酸缓冲液、辣根过氧化物酶、邻茴香胺甲醇和尸胺二氢氯化物. 在37℃水浴中孵育30 min后, 用紫外分光光度计在436 nm处测DAO活性. 肠上皮细胞凋亡检测, 将经福尔马林固定的标本常规石蜡切片, 二甲苯脱蜡入水, 双蒸水洗, 0.01 mol/L PBS洗涤3次, 每次5 min, 取标记溶液(含有核苷酸的混合液的反应液)100 μL做二张阴性对照片, 将酶浓缩溶液(TdT)50 μL与标记溶液450 μL混合, 置37℃温箱1 h; 0.01 mol/L PBS洗涤3次, 每次5 min, 滴加converter-AP, 37℃温箱中30 min, 0.01 mol/L PBS缓冲液洗涤3次, 每次5 min, BCIP/NBT显色, 双蒸水洗涤, GVA封片. 计数每100个上皮细胞中凋亡细胞个数, 即凋亡指数(apoptotic index, AI), 每张切片各任选3个视野, 求其平均值.

统计学处理 采用SPSS11.5软件进行统计分析, 实验结果以mean±SD表示, 运用方差分析统计, P<0.01或P<0.05为有统计学意义.

2 结果

2.1 血浆内毒素结果 在第4天和第7天两个时间点, 与假手术对照组相比, 各SAP组的血浆内毒素浓度显著升高(P<0.01), 其中PN组水平最高; EN-S和PRE-EN组水平显著低于PN组(P<0.01), EN-S组水平显著高于对应时间点的PRE-EN组(P<0.01); EN-S和PRE-EN 7 d组与对应的4 d组相比, 水平呈降低趋势但无显著性差异, 而PN 7d组与4 d组相比水平呈升高趋势(P>0.05)(表1).

2.2 血浆二胺氧化酶结果 在第4天和第7天两个时间点, 各SAP组的血浆DAO浓度显著高于假手术对照组(P<0.01), 其中PN组水平最高; EN-S和PRE-EN组水平显著低于PN组(P<0.01), EN-S组显著高于对应时间点的PRE-EN组(P<0.01); EN-S和PRE-EN 7 d组与对应的4 d组相比, 水平显著降低(P<0.01), 而PN组无此差异(表1).

2.3 小肠上皮细胞凋亡 显微镜下观察原位凋亡检测结果显示, 与假手术对照组相比, 各SAP组隐窝处可见较多的凋亡上皮细胞分布, PN组的凋亡细胞数量最多, PRE组的数量少于EN-S组(图1). 各SAP组的AI显著高于假手术对照组(P<0.01), EN-S和PRE-EN组显著低于PN组(P<0.01); EN-S和PRE-EN 7 d组显著低于4 d组(P<0.05), 而PN 4 d和7 d组相比无显著性差异; 在第7天时, PRE-EN组的AI显著低于EN-S组(P<0.05)(表1).

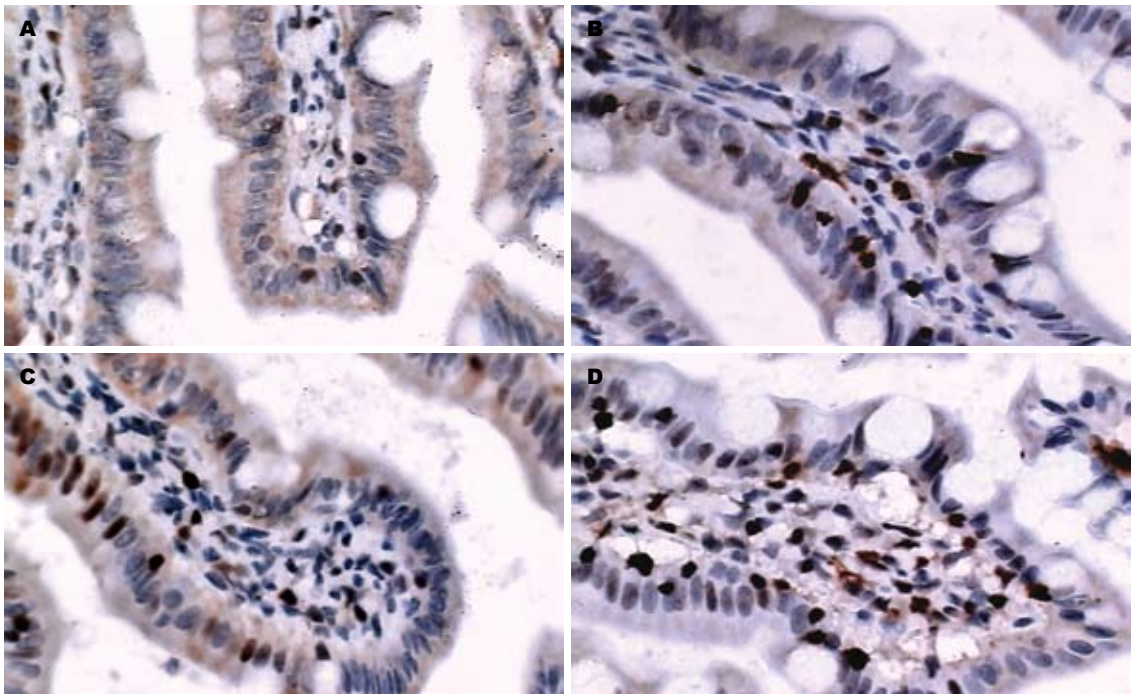

图 1 TUNEL检测小肠上皮凋亡细胞呈深棕色(×400). A: 假手术对照7 d组; B: SAP+EN−S 7 d组; C: SAP+PRE−EN 7 d组; D: SAP+PN 7 d组.

■应用要点
本研究通过动物实验研究添加益生元肠内营养对SAP肠屏障的保护作用机制, 为SAP患者寻求新的有效的营养辅助治疗途径, 为临床应用包括益生元在内的微生态肠内营养制剂提供理论依据.

表 1 血浆内毒素水平, DAO浓度和小肠黏膜上皮细胞AI结果(mean ± SD, n = 8)

分组	内毒素水平(EU/L)		DAO浓度(kU/L)		AI(%)	
	4 d	7 d	4 d	7 d	4 d	7 d
假手术对照	39.6 ± 13.1	40.7 ± 12.4	2.01 ± 0.34	2.12 ± 0.42	22.6 ± 3.3	23.1 ± 5.4
SAP+EN−S	158.7 ± 23.9^{b,d,f}	140.5 ± 20.9^{b,d,f}	5.17 ± 0.62^{b,d,f}	4.09 ± 0.49^{b,d,f,h}	50.5 ± 9.7^{b,f}	41.6 ± 7.8^{b,d,f,h}
SAP+PRE−EN	110.4 ± 14.4^{b,f}	88.16 ± 30.4^{b,f}	3.44 ± 0.59^{b,f}	2.83 ± 0.96^{b,f,h}	48.9 ± 8.5^{b,f}	33.8 ± 5.1^{b,f,h}
SAP+PN	202.0 ± 30.3^{b}	210.2 ± 30.3^{b}	7.29 ± 0.68^{b}	7.57 ± 1.01^{b}	63.5 ± 6.7^{b}	64.7 ± 10.4^{b}

^{b}P<0.01 *vs* 假手术对照组; ^{d}P<0.01 *vs* SAP+PRE−EN组; ^{f}P<0.01 *vs* SAP+PN组; ^{h}P<0.01 7 d *vs* 4 d组.

3 讨论

肠上皮细胞层构成机体的最前沿防御屏障, 具有抵御肠腔内有害微生物和潜在致病菌侵入外周脏器的作用. 由多种原因导致的SAP患者肠屏障功能破坏是全身继发感染及MODS发生的主要原因, 直接导致疾病的死亡率增加[11-13]. 如何维护患者肠屏障功能的完整性一直是临床上一个非常重要而且棘手的问题. 随着EN作用被重新认识, 多项研究已证实早期空肠EN是安全的, 而且有助于维持SAP患者肠屏障功能、减少内毒素和细菌易位的发生[14-16]. 本研究根据SAP营养需要和代谢特点, 研制适用于SAP的EN-S制剂, 前期研究已证实该配方具有改善SAP大鼠蛋白质代谢和电解质平衡的作用[17]. 本研究我们在该EN配方中添加一类重要的微生态调节剂——GOS益生元, 通过观察对SAP大鼠血浆内毒素、DAO和肠黏膜上皮细胞凋亡的观察, 探讨其对肠屏障的保护作用.

研究结果显示与假手术对照组相比, 各SAP组的血浆内毒素浓度显著升高. 内毒素是主要由肠道G⁻菌产生的一种大分子分解产物, 正常情况下, 完整的肠屏障可以将内毒素局限于肠腔内[18]. 但当肠屏障受损时, 则会穿过受损的肠屏障进入外周血循环, 激活单核巨噬细胞系统, 使其释放多种炎性介质, 大多数SAP患者外周血中都可以检测出内毒素, 而且这些患者90%以上都可能死于内毒素血症[19-21]. 本研究中, 与PN组相比, 不论是EN-S还是PRE-EN都可以显著降低血浆内毒素水平, 而且PRE-EN组的水平显著低于EN-S组, 说明在EN中添加GOS益生元可以有效改善SAP的内毒素血症. 另一方面随着营养治疗时间的延长, EN-S组和PRE-EN组的内毒素水平

■名词解释
益生元：益生元的概念是Gibson *et al*(1995年)首先提出来的，是指一些不被宿主消化的食物成分，能选择性刺激肠内双歧杆菌等有益菌代谢和增殖，从而起着增进宿主健康的物质，常称为双歧因子，常见的有各种低聚糖类，如低聚半乳糖(galacto-oligosaccharides, GOS)、低聚果糖、低聚木糖、低聚棉子糖、低聚麦芽糖等，通过促进益生菌生长，抑制有害菌，可以起到与益生菌类似的生理作用，达到调整肠管微生态平衡的目的.

出现降低的趋势，而PN组则相反，提示早期EN可减轻肠内毒素的吸收.

DAO是人类和所有哺乳动物肠黏膜上层绒毛细胞胞质中具有高度活性的细胞内酶，而在其他组织中则含量少、活性低. 肠黏膜细胞受损、坏死后该酶释放入血，或随坏死脱落的肠黏膜细胞进入肠腔内，导致血浆和肠腔DAO活性增高. DAO在外周血中活性稳定，因而可以反映肠黏膜屏障的完整性和损伤程度[22-23]. 导致体内DAO活性发生改变的因素可能包括[24]：(1)与营养途径有关：动物研究发现胃肠长期无负荷状态会导致肠黏膜萎缩，血浆DAO活性升高；(2)肠急性缺血：DAO活性改变与肠缺血有关，把大鼠肠系膜动脉夹闭60 min后肠DAO活性降低66%，而血浆DAO活性则显著增高. 本研究结果表明，EN-S和PRE-EN与PN组相比，DAO水平显著降低，PRE-EN组水平显著低于EN-S组，说明EN尤其是添加益生元的PRE-EN有助于减少SAP时的肠黏膜受损程度.

动物研究发现，SAP时肠黏膜上皮细胞凋亡与肠道黏膜功能受损有关，与对照组相比，SAP组的凋亡指数显著增加，尤其是隐窝部凋亡细胞的增加，可使细胞总体数目减少，细胞间紧密连接分离，使内毒素、细菌等大分子物质容易通过，发生内毒素和细菌易位[25-26]. 有研究通过抑制SAP大鼠的胱门蛋白酶(一种参与细胞凋亡的关键酶)发现可以显著减少肠上皮细胞凋亡，改善肠通透性，减少内毒素易位的发生，并降低动物的死亡率[27]. 导致SAP肠上皮凋亡的可能原因如下：内脏血流灌注减少，肠黏膜缺血缺氧；肠蠕动减慢，肠上皮受损，细菌容易黏附并穿过肠上皮，引起炎症反应以及细胞因子的产生；细菌黏附分子表达的异常，致使上皮细胞与细胞基质间连接破坏以及氧自由基的作用等. 本研究结果显示，各SAP组的AI显著高于对照组，EN-S和PRE-EN组显著低于PN组，PRE-EN 7 d组显著低于EN-S 7 d组，提示EN在改善及缓解上皮细胞凋亡方面的作用优于PN，而且添加GOS益生元有助于进一步提高EN在缓解凋亡方面的作用. 目前有关益生元调节细胞凋亡在肠屏障功能方面的作用尚未见报道，但某些对结肠癌的实验研究发现，益生元物质通过调节结肠上皮细胞凋亡，起到一定的预防癌症形成作用[28].

本研究结果提示添加GOS益生元的微生态EN可以增强EN维持肠黏膜屏障完整性的作用，其作用机制可能包括[29-30]：(1)GOS刺激肠内双歧杆菌和乳酸杆菌等有益菌的生长，抑制有害菌增殖，维持肠内菌丛平衡；(2)刺激肠管相关淋巴组织的活性以及免疫物质的生成，增强肠免疫功能；(3)增强宿主吞噬细胞的活性，提高机体特异性和非特异性抗感染能力；(4)作为肠道内益生菌的营养底物，发酵后产生各种短链脂肪酸，给肠上皮细胞提供能量和营养，从而有利于肠上皮细胞再生，促进屏障功能修复.

随着人们对免疫微生态营养支持在临床治疗中重要性的认识，以及各种新型益生元产品的开发，有关益生元在维持SAP等重症应激性疾病中的作用及其机制还值得进一步深入探讨.

4 参考文献

1 Manes G, Kahl S, Schulz HU, Lippert H, Ferrara EC, Malfertheiner P. Early bacterial infection of the pancreas and course of disease in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 423-428

2 刘晓臣, 彭燕. 肠屏障功能障碍与重症急性胰腺炎. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3131-3135

3 Rau BM, Bothe A, Kron M, Beger HG. Role of early multisystem organ failure as major risk factor for pancreatic infections and death in severe acute pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1053-1061

4 Kumar A, Singh N, Prakash S, Saraya A, Joshi YK. Early enteral nutrition in severe acute pancreatitis: a prospective randomized controlled trial comparing nasojejunal and nasogastric routes. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 431-434

5 McClave SA, Chang WK, Dhaliwal R, Heyland DK. Nutrition support in acute pancreatitis: a systematic review of the literature. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 143-156

6 Zhao H, Lu HG, Shi YB, Zhao LM, Bai C, Wang X. Role of enteral nutrition supplemented with ebselen and EHEC in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction in rats. *Inflamm Res* 2006; 55: 423-429

7 Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Chow J, Wolf BW, Garleb KA, Fahey GC Jr. Fructooligosaccharides and Lactobacillus acidophilus modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. *J Nutr* 2002; 132: 3721-3731

8 Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, Hutkins RW. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic Escherichia coli to tissue culture cells. *Infect Immun* 2006; 74: 6920-6928

9 Kotzampassi K, Giamarellos-Bourboulis EJ, Voudouris A, Kazamias P, Eleftheriadis E. Benefits of a synbiotic formula (Synbiotic 2000Forte) in critically Ill trauma patients: early results of a randomized controlled trial. *World J Surg* 2006; 30: 1848-1855

10 黎君友, 于燕, 郝军, 晋桦, 许惠君. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性. 氨基酸和生物资源 1996; 18: 28-30

11 Xu GF, Lu Z, Gao J, Li ZS, Gong YF. Effect of ecoimmunonutrition supports on maintenance of

integrity of intestinal mucosal barrier in severe acute pancreatitis in dogs. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 656-661
12 Leveau P, Wang X, Sun Z, Borjesson A, Andersson E, Andersson R. Severity of pancreatitis-associated gut barrier dysfunction is reduced following treatment with the PAF inhibitor lexipafant. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 1325-1331
13 Assimakopoulos SF, Alexandris IH, Scopa CD, Mylonas PG, Thomopoulos KC, Georgiou CD, Nikolopoulou VN, Vagianos CE. Effect of bombesin and neurotensin on gut barrier function in partially hepatectomized rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6757-6764
14 杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙. 益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 953-957
15 Makola D, Krenitsky J, Parrish C, Dunston E, Shaffer HA, Yeaton P, Kahaleh M. Efficacy of enteral nutrition for the treatment of pancreatitis using standard enteral formula. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2347-2355
16 Kumar A, Singh N, Prakash S, Saraya A, Joshi YK. Early enteral nutrition in severe acute pancreatitis: a prospective randomized controlled trial comparing nasojejunal and nasogastric routes. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 431-434
17 钟燕, 蔡东联, 耿珊珊, 陈凌云, 韩婷. 不同营养治疗途径对重症急性胰腺炎大鼠血浆氨基酸谱和电解质的影响. 氨基酸和生物资源 2006; 28: 49-53
18 Ferrier L, Berard F, Debrauwer L, Chabo C, Langella P, Bueno L, Fioramonti J. Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents. *Am J Pathol* 2006; 168: 1148-1154
19 Matsuda N, Nishihira J, Takahashi Y, Kemmotsu O, Hattori Y. Role of macrophage migration inhibitory factor in acute lung injury in mice with acute pancreatitis complicated by endotoxemia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 198-205
20 Qiao SF, Lu TJ, Sun JB, Li F. Alterations of intestinal immune function and regulatory effects of L-arginine in experimental severe acute pancreatitis rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6216-6218
21 Marotta F, Barreto R, Wu CC, Naito Y, Gelosa F, Lorenzetti A, Yoshioka M, Fesce E. Experimental acute alcohol pancreatitis-related liver damage and endotoxemia: synbiotics but not metronidazole have a protective effect. *Chin J Dig Dis* 2005; 6: 193-197
22 Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2006; 135: 18-26
23 Deng Q, Wu C, Li Z, Xiong D, Liang Y, Lu L, Sun X. The prevention of infection complicating acute necrotizing pancreatitis:an experimental study. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2000; 38: 625-629
24 商宏伟, 肖颖彬, 陈林, 刘梅. 大鼠体外循环后血浆二胺氧化酶活性变化与肠屏障损伤的关系. 中国病理生理杂志 2006; 22: 396-397
25 Takase K, Takeyama Y, Nishikawa J, Ueda T, Hori Y, Yamamoto M, Kuroda Y. Apoptotic cell death of renal tubules in experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 1999; 125: 411-420
26 尚占民, 王宝恩, 张淑文. 细胞凋亡在急性重症胰腺炎肠道粘膜屏障功能障碍中的意义. 中国危重病急救医学 2000; 12: 394-396
27 Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, Larvin M, McMahon MJ. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 26-35; discussion 35-36
28 Hughes R, Rowland IR. Stimulation of apoptosis by two prebiotic chicory fructans in the rat colon. *Carcinogenesis* 2001; 22: 43-47
29 Quigley EM, Quera R. Small intestinal bacterial overgrowth: roles of antibiotics, prebiotics, and probiotics. *Gastroenterology* 2006; 130: S78-90
30 Guarner F. Inulin and oligofructose: impact on intestinal diseases and disorders. *Br J Nutr* 2005; 93 Suppl 1: S61-65

■同行评价
本文研究了添加益生元肠内营养对重症急性胰腺炎肠屏障损害和内毒素易位的作用, 新颖度高, 内容详实, 结果可信, 有较高的科学价值.

电编 张敏 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读，以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流. 凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息. (世界胃肠病学杂志社 2007-03-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 700-705
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

血管内皮生长因子165基因对人胃癌细胞在体外生长及其受体表达的影响

关云艳, 欧希龙, 孙为豪, 颜 芳, 产松苗, 杨 柳

■背景资料
恶性肿瘤严重地威胁着人类健康和生命, 他在体内的生长依赖于血管的形成, 而血管内皮生长因子(VEGF)在迄今所发现的促血管生成因子中作用是最强的, 故针对这方面的治疗已成为治疗肿瘤的的另一希望. 该基因虽已发现多年, 但并未对其完全认识, 近年认为VEGF的促肿瘤生长作用除了通过促血管生成作用外对某些肿瘤细胞也有直接的促增殖作用, 但研究显示不同的肿瘤细胞VEGF受体种类及表达程度不同. 为此, 本文研究了人血管内皮生长因子对胃癌细胞BGC-823在体外生长的影响及对其受体表达的影响.

关云艳, 欧希龙, 颜芳, 杨柳, 东南大学临床医学院附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009
孙为豪, 南京医科大学第一附属医院老年病科 江苏省南京市 210029
产松苗, 上海梅山医院消化科 江苏省南京市 210039
关云艳, 东南大学临床医学院研究生, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的研究.
通讯作者: 欧希龙, 210009, 江苏省南京市, 东南大学临床医学院附属中大医院消化科. ouxilong@126.com
电话: 025-83272034
收稿日期: 2006-12-04 接受日期: 2006-12-31

Effect of vascular endothelial growth factor gene on its receptor-2 expression and proliferation of human gastric carcinoma cell *in vitro*

Yun-Yan Guan, Xi-Long Ou, Wei-Hao Sun, Fang Yan, Song-Miao Chan, Liu Yang

Yun-Yan Guan, Xi-Long Ou, Fang Yan, Liu Yang, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital Affiliated to Clinical Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Wei-Hao Sun, Department of Geratology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Song-Miao Chan, Department of Gastroenterology, Shanghai Meishan Hospital, Nanjing 210039, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Xi-Long Ou, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital Affiliated to Clinical Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. ouxilong@126.com
Received: 2006-12-04 Accepted: 2006-12-31

Abstract

AIM: To amplify and purify the recombinant adenovirus vector carrying vascular endothelial growth factor 165 (Ad-VEGF$_{165}$), and to investigate its effect of on the expression of VEGF receptor-2 (VEGFR-2) and the proliferation of human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823 *in vitro*.

METHODS: The adenoviruses were packaged and amplified in human embryonic kidney 293 cells. Then human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823 was transfected with the resultant adenoviruses. The proliferation and expression of VEGFR-2 were measured by MTT assay and immunocytochemistry, respectively.

RESULTS: The recombinant adenovirus vector carrying VEGF$_{165}$ or GFP (control virus) was amplified and purified successfully. The viral titer of VEGF$_{165}$ or GFP was 3.2×10^{13} and 2.0×10^{13} pfu/L, respectively. The transfection rate almost reached 100% in BGC-823 cells when the multiplicity of infection (MOI) was 20. The proliferation of BGC-823 cells (shown by absorbency) transfected with Ad-VEGF$_{165}$ was significantly higher than that of the cells transfected with Ad-GFP (24 h: 0.960 ± 0.01 *vs* 0.737 ± 0.01, $P < 0.01$; 48 h: 1.321 ± 0.03 *vs* 0.981 ± 0.02, $P < 0.01$; 72 h: 1.663 ± 0.03 *vs* 1.207 ± 0.01, $P < 0.01$) or the controlled cells (24 h: 0.960 ± 0.01 *vs* 0.724 ± 0.03, $P < 0.01$; 48 h: 1.321 ± 0.03 *vs* 0.968 ± 0.01, $P < 0.01$; 72 h: 1.663 ± 0.03 *vs* 1.185 ± 0.02, $P < 0.01$). Moreover, the expression of VEGFR-2 was expressed was markedly higher in BGC-823 cells transfected with Ad-VEGF$_{165}$ than that in Ad-GFP-transfected cells (62.5% *vs* 37.6%, $P < 0.01$) and the controlled cells (62.5% *vs* 34.1%, $P < 0.01$).

CONCLUSION: VEGF can promote the proliferation and increase VEGFR-2 expression of BGC-823 cells *in vitro*.

Key Words: Adenovirus; Vascular endothelial growth factor; Gastric carcinoma; Proliferation; Vascular endothelial growth factor receptor-2

Guan YY, Ou XL, Sun WH, Yan F, Chan SM, Yang L. Effect of vascular endothelial growth factor gene on its receptor-2 expression and proliferation of human gastric carcinoma cell *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):700-705

摘要

目的: 将已构建的重组腺病毒Ad-VEGF$_{165}$进行扩增和纯化并观察其对人胃腺癌细胞(BGC-823)在体外生长及其受体表达的影响.

方法: 以人胚肾293细胞对重组腺病毒Ad-

$VEGF_{165}$和对照病毒Ad-GFP进行包装、扩增后感染BGC-823细胞, 应用MTT比色法分析$VEGF_{165}$对该种细胞体外生长的影响, 并以免疫细胞化学方法检测该种细胞VEGFR-2的表达情况.

结果: 成功扩增及纯化了重组腺病毒Ad-$VEGF_{165}$及对照病毒Ad-GFP, 获得约3.2×10^{13} pfu/L滴度的重组腺病毒和2.0×10^{13} pfu/L滴度的对照病毒. 当感染复数(MOI)为20时转导率即接近100%而无明显细胞中毒现象. MTT结果显示Ad-$VEGF_{165}$组吸光度明显高于Ad-GFP组(24 h: 0.960±0.01 *vs* 0.737±0.01, $P<0.01$; 48 h: 1.321±0.03 *vs* 0.981±0.02, $P<0.01$; 72 h: 1.663±0.03 *vs* 1.207±0.01, $P<0.01$)及对照组(24 h: 0.960±0.01 *vs* 0.724±0.03, $P<0.01$; 48 h: 1.321±0.03 *vs* 0.968±0.01, $P<0.01$; 72 h: 1.663±0.03 *vs* 1.185±0.02, $P<0.01$). 另外, 在该细胞株上检测到了VEGFR-2的表达, 且在Ad-$VEGF_{165}$组其表达明显高于Ad-GFP组(62.5% *vs* 37.6%, $P<0.01$)和对照组(62.5% *vs* 34.1%, $P<0.01$).

结论: VEGF对胃癌细胞有直接的促生长作用, 并可上调其主要受体VEGFR-2的表达水平, 从而进一步证实了VEGF对胃癌细胞的自分泌作用.

关键词: 腺病毒; 血管内皮生长因子; 胃癌; 增殖; VEGFR-2

关云艳, 欧希龙, 孙为豪, 颜芳, 产松苗, 杨柳. 血管内皮生长因子165基因对人胃癌细胞在体外生长及其受体表达的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(7):700-705
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/700.asp

0 引言

目前已知肿瘤的生长依赖于血管的形成, 而新生血管的形成是由于促血管生成因子增多所致, 在这些因素中血管内皮生长因子(VEGF)作用最强, 并且研究最多[1-3]. 但以往认为VEGF对肿瘤的促生长作用是通过VEGF与血管内皮细胞上的受体结合, 促进其增殖、迁移并增加血管通透性而实现的. 而近年来发现在很多种肿瘤细胞上存在有VEGF受体, 因而可介导VEGF对肿瘤细胞的自分泌作用, 促进其增殖. 因此, 我们利用复制缺陷型腺病毒作载体将$VEGF_{165}$基因导入体外培养的胃癌细胞株BGC-823, 以观察其对胃癌细胞体外生长的影响, 以及对VEGF主要受体VEGFR-2表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃腺癌细胞株BGC-823购自于中科院; 293细胞购自Microbix Biosystems公司; 复制缺陷型腺病毒重组体及对照病毒由南京医科大学第一附属医院构建[4]并赠送. *Pac* Ⅰ, LipofectAmine 2000试剂盒分别购自NEB公司和Gibco公司, 氯化铯(CsCl)为Sigma公司生产, 透析袋购自Spectrum公司. VEGFR-2一抗和免疫组化试剂盒均购自武汉博士德公司. 293细胞和BGC-823细胞都以100 mL/L胎牛血清、100 kU/L青霉素及0.1 g/L链霉素的RPMI1640为培养液在37℃、50 mL/L CO_2孵箱中进行常规培养, 以2.5 g/L胰蛋白酶消化后进行传代.

1.2 方法

1.2.1 Ad-$VEGF_{165}$的包装、扩增及纯化 取对数生长期的293细胞, 以细胞密度为5×10^8个/L的细胞悬液10 mL接种于100 mm直径的培养皿中, 当细胞70%贴壁时, 吸去原培养液, 改无血清无抗生素的RPMI1640培养, 将以*Pac* Ⅰ酶切回收的线性化的Ad-$VEGF_{165}$ 1 μg通过Lipofectamine2000共转染至293细胞. 观察出现细胞病理反应(CPE)后收取细胞上清, 再以首次感染的病毒上清液转染更多的293细胞, 在37℃, 50 mL/L CO_2孵箱中培养3 d后再收集293细胞, 将其于-80℃至37℃反复冻融3次, 收集细胞裂解液, 最后以氯化铯梯度超速离心进行纯化.

1.2.2 Ad-$VEGF_{165}$滴度的测定 采用组织培养半数感染剂量法(TCID50)测定Ad-$VEGF_{165}$的滴度. 以1×10^4个/孔接种293细胞于96孔板, 待细胞密度约90%后, 倍比稀释病毒上清、分别以不同稀释浓度100 μL病毒溶液转染细胞, 以20 mL/L胎牛血清的培养基培养10 d后倒置显微镜下观察, 计算每一排中出现CPE的孔数, 根据Karbers公式计算病毒滴度. 同样方法对对照病毒Ad-GFP进行包装、扩增、纯化及滴度测定.

1.2.3 腺病毒体外转导效率的测定 BGC-823细胞以1×10^4个/孔接种于96孔板培养至60%-70%细胞贴壁时, 加入不同感染复数(MOI = 10, 20, 30, 50, 100)的Ad-GFP稀释液100 μL感染细胞, 8 h后换含100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养液继续培养, 48 h后在荧光显微镜下计数, 计算表达GFP的细胞数占视野中所有细胞的百分数, 取均值代表转导效率.

1.2.4 MTT法测定$VEGF_{165}$的转导对BGC-823细胞增殖的影响 实验分空白对照组(A组)、对照组(B组)、Ad-GFP(C组)、Ad-$VEGF_{165}$(D

■研发前沿
近年来在多种肿瘤细胞上发现有VEGF受体的表达, 证实了VEGF的自分泌作用, 说明如果阻断VEGF, 不仅抑制了肿瘤的血管形成, 同时也对肿瘤细胞生长有直接的抑制作用. 但并不是所有的肿瘤细胞上均有受体存在, 因而细胞有无受体表达也可作为估计抗VEGF制剂的疗效的一个预测性指标之一.

■**创新盘点**
实验通过对腺病毒重组体的扩增和纯化后，将VEGF导入胃腺癌细胞株，不仅检测了细胞的增殖情况也检测了对受体表达的影响，具有一定新意.

组)共四组，每组设三个复孔. 取对数生长期的BGC-823细胞，以1×10^4个/孔接种细胞于96孔培养板中的B，C，D组，A组只加培养液. 于60%-70%细胞贴壁时对C，D两组予相应的无血清无抗生素培养液稀释的病毒液100 μL感染(37℃; MOI: 20)，感染8 h后换RPMI1640全培养液继续培养. 以感染当天为第0天，分别于感染后第1-3天测定每孔吸光度(*A*值)，以空白对照孔的*A*值调零.

1.2.5 应用免疫细胞化学方法检测VEGFR-2在BGC-823细胞中的表达 取对数生长期的BGC-823细胞，消化后计数并调整培养液用量，使细胞悬液终浓度为1.0×10^8/L，接种至底部有小玻片的6孔板中，每孔2 mL细胞悬液，置孵育箱中培养. 次日，细胞在小玻片上贴壁生长约70%融合，分别于两孔中加入Ad-GFP、两孔中加入Ad-$VEGF_{165}$(MOI: 20)的无血清无抗生素培养液稀释的病毒液1 mL感染(37℃; MOI: 20)，感染8 h后换RPMI1640全培养液继续培养. 两孔中不加病毒作为对照组. 再于36 h后取出小玻片用丙酮固定. PBS缓冲液冲洗，3%双氧水灭活内源性过氧化酶，微波抗原热修复后正常山羊血清封闭，一抗冰箱过夜，生物素标记的兔抗二抗工作液、辣根酶标记链酶卵白素工作液各30 min，DAB显色，复染核、脱水、透明，中性树胶封片. 用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照，已知阳性片作阳性对照. 胞质或胞膜见棕黄色颗粒为阳性. 在200倍显微镜下随机取5个视野细胞计数，细胞阳性表达率 = 阳性细胞数/总细胞数×100%.

统计学处理 实验结果以均数±标准差表示，均数间比较采用*t*检验. 两个率之间的比较应用χ^2检验，所有数据均采用SAS8.1统计软件进行分析，$P<0.05$表示有显著差异.

2 结果

2.1 扩增、纯化后Ad-GFP及Ad-$VEGF_{165}$ cDNA的滴度 Ad-GFP的滴度为2.0×10^{13} pfu/L，Ad-$VEGF_{165}$ cDNA的滴度为3.2×10^{13} pfu/L.

2.2 腺病毒体外转导效率 随着MOI值的加大，腺病毒重组体对BGC-823细胞的感染效率逐渐增加，当MOI为20时，其转导效率接近100%而无明显细胞中毒现象(图1). 当MOI为50时，其转导效率虽为100%，但细胞很快就变圆、脱落.

2.3 MTT法测定$VEGF_{165}$转染对BGC-823细胞增殖的影响 Ad-GFP组和对照组比较: 24 h($t = 2.13$, $P = 0.1233$), 48 h($t = 1.08$, $P = 0.3878$), 72 h($t = 1.43$, $P = 0.2267$); Ad-$VEGF_{165}$组和对照组比较: 24 h($t = 15.26$, $P<0.01$), 48 h($t = 23.48$, $P<0.01$), 72 h($t = 23.23$, $P<0.01$); Ad-$VEGF_{165}$组和Ad-GFP组比较: 24 h($t = 24.98$, $P<0.01$), 48 h($t = 12.86$, $P<0.01$), 72 h($t = 25.16$, $P<0.01$). 结果说明$VEGF_{165}$能够促进BGC-823细胞的增殖. GFP对BGC-823细胞的增殖没有影响(表1).

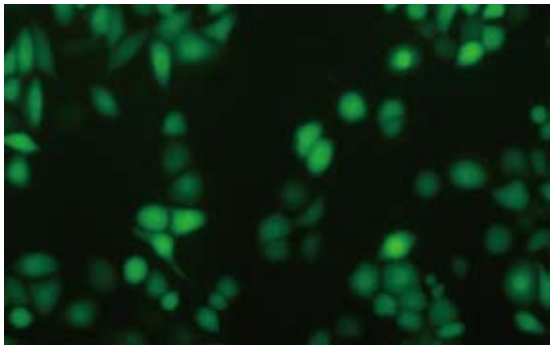

图 1 MOI = 20时BGC-823细胞的荧光表达(SP × 200).

表 1 MTT法测定$VEGF_{165}$转染对BGC-823细胞增殖的影响(mean ± SD)

分组	*A*值		
	24 h	48 h	72 h
对照	0.724 ± 0.03	0.968 ± 0.01	1.185 ± 0.02
Ad-GFP	0.737 ± 0.01	0.981 ± 0.02	1.207 ± 0.01
Ad-$VEGF_{165}$	0.960 ± 0.01	1.321 ± 0.03	1.663 ± 0.03

2.4 VEGFR-2在BGC-823细胞中的表达 BGC-823细胞中有VEGFR-2的阳性表达，且在Ad-$VEGF_{165}$组的阳性表达率明显高于对照组和Ad-GFP组(图2). 对照组、Ad-GFP组及Ad-$VEGF_{165}$组三组阳性率分别为34.1%，37.6%和62.5%. Ad-GFP组和对照组比较: $\chi^2=1.048$, $P = 0.306$; Ad-$VEGF_{165}$组和Ad-GFP组比较: $\chi^2 = 12.83$, $P<0.01$; Ad-$VEGF_{165}$组和对照组比较: $\chi^2 = 22.29$, $P<0.01$.

3 讨论

血管内皮生长因子(VEGF)基因的发现至今已有十余年，随着对其研究的深入，仍不断有新的认识. 目前认为，在所有的已知实体肿瘤中均有VEGF的表达上调[5-6]，VEGF表达水平与肿瘤大小、浸润程度、转移及预后密切相关[7-11]. 根据mRNA剪接方式不同，VEGF可形成多个变构体，包括$VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{183}$,

$VEGF_{189}$, $VEGF_{206}$. 而$VEGF_{165}$无论是在数量上还是在功能上都占有主导地位, 因此广泛用于临床和实验中[12-13]. 同样, 我们也选择$VEGF_{165}$ cDNA作为目的基因. VEGF第一外显子编码分泌肽序列, 能使VEGF蛋白从细胞中分泌出去, 再与受体结合而发挥生物学效应. 很多以病毒为载体研究显示, $VEGF_{165}$转导入细胞后用酶联免疫吸附法检测培养液上清中的$VEGF_{165}$的水平, 于48 h后达峰值, 并可持续2 wk左右[14-15]. 现已发现的VEGF受体有VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2(Flk-1/KDR), VEGFR-3(Flt-4), neuropilin-1(NRP-1)和neuropilin-2(NRP-2), 但在细胞的生长和分化中起重要作用的是VEGFR-2. VEGF与血管内皮细胞上的该受体结合后促使其发生磷酸化继之引起级联反应, 刺激内皮细胞增殖、迁移并增加血管通透性[16-17], 从而促进血管的构建和生长, Weisz *et al*[18]实验证实VEGF也可增加内皮细胞和平滑肌细胞中VEGFR-2的表达. 随着对该基因研究的深入, 又有研究证实在肺癌[19]、结肠癌[20]、前列腺癌[21]、胰腺癌[22]、膀胱癌[23]等多种实体肿瘤细胞上也有经典受体VEGFR-1或VEGFR-2的表达. 随后Bachelder *et al*[24]和Li *et al*[25]分别在不表达经典受体的乳腺癌和胰腺癌的肿瘤细胞上检测到NRP-1受体, 并认为肿瘤细胞也可通过该受体使VEGF对肿瘤细胞起到自分泌的作用, 促进其增殖、存活及侵袭转移能力. Tian *et al*[26]利用RT-PCR检测到胃腺癌MGC-803细胞株同时有VEGF和VEGFR-2 mRNA的表达, 且外源性$VEGF_{165}$能直接刺激该种细胞的增殖. Ren *et al*[27]应用原位杂交技术证实在人胃癌SGC7901细胞中有VEGFR-2 mRNA的高表达, 并且VEGFR-2的反义寡脱氧核苷酸明显抑制了该受体的表达. 后来, Zhang *et al*[28]又检测了8种胃癌细胞株上受体表达情况, 其中6种同时有VEGFR-1和VEGFR-2 mRNA的表达, 一种只有VEGFR-1的表达, 但KATOⅢ细胞株上均无两者表达, 且在细胞增殖实验中, KATOⅢ细胞对$VEGF_{165}$的刺激没有反应. 由此可见, 由于不同种类的肿瘤细胞表达受体的情况不同, 因而对VEGF的反应性也就不同. 为此, 我们利用复制缺陷型腺病毒作为载体将$VEGF_{165}$基因导入BGC-823细胞, 检测VEGF对其生长的影响.

本实验之所以采用复制缺陷型腺病毒作为载体, 是因为复制缺陷型腺病毒载体可广泛感染宿主细胞, 但所携带的基因不会整合入宿主细胞的基因组中, 因而具有高转导率和安全性高的优点[29-30]. Tan *et al*[31]应用不同种类载体介导$VEGF_{165}$转导内皮细胞时, 发现腺病毒载体转导效率高于其他病毒及非病毒载体, 但不足之处是其也能表达少量的腺病毒结构蛋白, 可能会对细胞产生一定的毒性. 我们的实验中, 当MOI值为50时即可见细胞变圆、脱落. MOI为20时, 转导效率接近100%而未见细胞中毒现象, 故本实验的病毒感染强度设为MOI = 20. 在实验中我们以绿色荧光蛋白(GFP)做平行对照, 因为GFP是目前唯一能在活细胞中表达的发光蛋白, 其基因序列很短, 易于构建质粒, 具有敏感的标记检测率, 而没有放射性的危害[32], 我们的结果显示GFP对BGC-823细胞的增殖没有影响, 也进一步证实GFP是在基因转染实验中较理想的平行对照基因.

本实验成功制备了高滴度的Ad-GFP和Ad-$VEGF_{165}$ cDNA, 并对胃癌细胞有较高的转导效

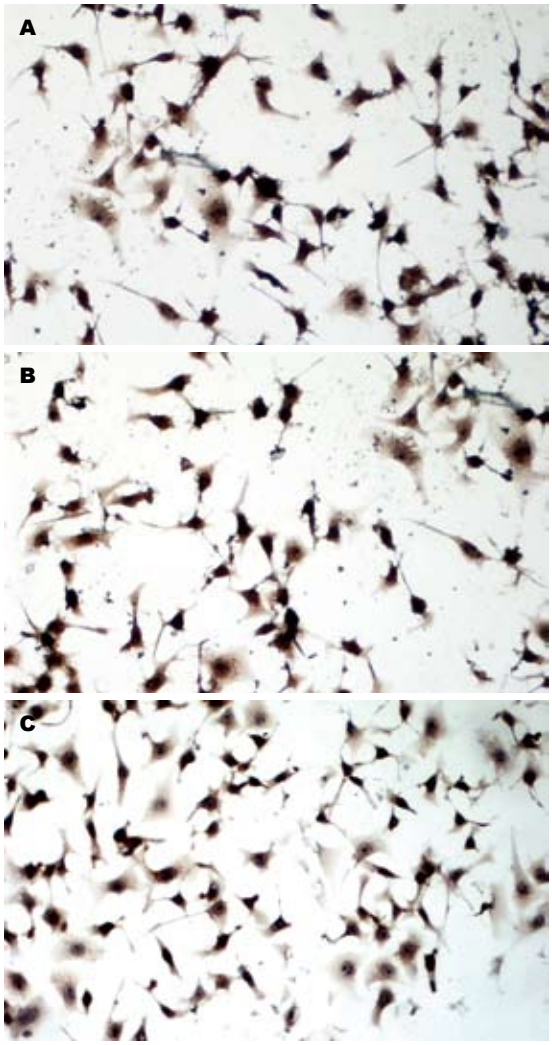

图 2 VEGFR-2在BGC-823细胞中的表达(SP × 200). A: 对照组; B: Ad-GFP组; C: Ad-$VEGF_{165}$组.

■应用要点
本研究证实了VEGF对胃腺癌BGC-823细胞株的体外促增殖作用, 并证实VEGF又可上调细胞VEGFR-2的表达, 从而阐释了VEGF促进肿瘤生长的多种途径, 进一步为临床应用抗VEGF制剂治疗恶性肿瘤提供了理论依据.

■名词解释
血管内皮细胞生长因子(VEGF)基因: 该基因位于染色体的6p21.3, 由8个外显子和7个内含子构成. 编码34-45 kDa的同源二聚体蛋白, 两亚基通过二硫键相连. 由于mRNA的剪接不同可产生5种变构体, $VEGF_{165}$无论是在数量上还是在功能上都占有主导地位, 因此广泛用于临床和实验中.

率. MTT结果显示转染Ad-$VEGF_{165}$组细胞吸光度明显高于未转染组及空载体转染组. 而未转染组及空载体转染组之间比较无明显差异, 说明$VEGF_{165}$能够促进体外培养的BGC-823细胞的生长. 另外, 我们应用免疫细胞化学方法在该种细胞株上也检测到了VEGFR-2的阳性表达, 且转染组阳性细胞表达率高于对照组和GFP组, 说明VEGF水平的增多可上调其受体的表达. 这些结果进一步证实了VEGF基因对肿瘤生长和转移的促进作用除了通过血管机制以外, 对肿瘤细胞也有直接的促生长作用.

4 参考文献

1 McNeish IA, Bell SJ, Lemoine NR. Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes. *Gene Ther* 2004; 11: 497-503

2 Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4368-4380

3 Ichikura T, Tomimatsu S, Ohkura E, Mochizuki H. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 2001; 78: 132-137

4 周磊, 张馥敏, 杨志健, 陆丽, 丁兆丰, 丁必森, 哈团柱, 李传富, 高翔, 马文珠. 人血管生成素-1和血管内皮生长因子165基因克隆及复制缺陷型腺病毒载体构建. 中华心血管病杂志 2003; 31: 699

5 Glass CA, Harper SJ, Bates DO. The anti-angiogenic VEGF isoform VEGF165b transiently increases hydraulic conductivity, probably through VEGF receptor 1 *in vivo*. *J Physiol* 2006; 572: 243-257

6 Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005; 9: 777-794

7 Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancers: a target for novel prognostic and therapeutic approaches. *Ann Surg* 2003; 238: 9-28

8 Harmey JH, Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays* 2002; 24: 280-283

9 Kakeji Y, Koga T, Sumiyoshi Y, Shibahara K, Oda S, Maehara Y, Sugimachi K. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21: 125-129

10 Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression. *Mol Pathol* 2000; 53: 307-312

11 Kakeji Y, Maehara Y, Sumiyoshi Y, Oda S, Emi Y. Angiogenesis as a target for gastric cancer. *Surgery* 2002; 131: S48-54

12 Gu ZP, Wang YJ, Li JG, Zhou YA. VEGF165 antisense RNA suppresses oncogenic properties of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 44-48

13 Partovian C, Adnot S, Raffestin B, Louzier V, Levame M, Mavier IM, Lemarchand P, Eddahibi S. Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 762-771

14 Maeda Y, Ikeda U, Shimpo M, Shibuya M, Monahan J, Urabe M, Ozawa K, Shimada K. Adeno-associated virus-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer into cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 438-443

15 Giunta RE, Holzbach T, Taskov C, Holm PS, Konerding MA, Schams D, Biemer E, Gansbacher B. AdVEGF165 gene transfer increases survival in overdimensioned skin flaps. *J Gene Med* 2005; 7: 297-306

16 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676

17 Gupta MK, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1144-1155

18 Weisz A, Koren B, Cohen T, Neufeld G, Kleinberger T, Lewis BS, Flugelman MY. Increased vascular endothelial growth factor 165 binding to kinase insert domain-containing receptor after infection of human endothelial cells by recombinant adenovirus encoding the Vegf(165) gene. *Circulation* 2001; 103: 1887-1892

19 Zhang G, Zhao M, Xu M, Yang Y, Wang M, Yang C. Correlation of angiogenesis with expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in lung carcinoma. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2002; 25: 89-93

20 Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, Somcio RJ, Wu Y, Hooper A, Hicklin DJ, Ellis LM. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 2647-2653

21 Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, Ricciardelli C, Stahl J, Choong C, Horsfall DJ, Tilley WD. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 854-859

22 Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, Liu W, Evans DB, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer* 2005; 104: 427-438

23 Wu W, Shu X, Hovsepyan H, Mosteller RD, Broek D. VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors. *Oncogene* 2003; 22: 3361-3370

24 Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 5736-5740

25 Li M, Yang H, Chai H, Fisher WE, Wang X, Brunicardi FC, Yao Q, Chen C. Pancreatic carcinoma cells express neuropilins and vascular endothelial growth factor, but not vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer* 2004; 101: 2341-2350

26 Tian X, Song S, Wu J, Meng L, Dong Z, Shou C. Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. *Biochem Biophys Res*

Commun 2001; 286: 505-512
27 Ren J, Dong L, Xu CB, Pan BR. The role of KDR in the interactions between human gastric carcinoma cell and vascular endothelial cell. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 596-601
28 Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 994-998
29 Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 2002; 7: 46-59
30 Zhang C, Liu ZK. Gene therapy for gastric cancer: a review. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2390-2394
31 Tan PH, Xue SA, Manunta M, Beutelspacher SC, Fazekasova H, Alam AK, McClure MO, George AJ. Effect of vectors on human endothelial cell signal transduction: implications for cardiovascular gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 462-467
32 Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* 2002; 102: 759-781

电编 张敏 编辑 张焕兰

■同行评价
本文研究了重组腺病毒Ad-$VEGF_{165}$对人胃腺癌细胞(BGC-823)在体外生长及其受体表达的影响, 发现VEGF对胃癌细胞有直接的促生长作用, 并可上调其主要受体VEGFR-2的表达水平, 证实了VEGF对胃癌细胞的自分泌作用. 本实验属于基础研究, 有一定的深度和较好的学术价值, 对胃癌细胞的生长、增殖、迁移机制的探讨具有重要意义.

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

• 消息 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

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

1 征文内容

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

2 征文要求

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 706-711
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

MAGE-A1在食管癌中的表达及其与肿瘤细胞增殖的关系

李 佳, 潘林娜, 张志燕, 李 曼

■背景资料
恶性肿瘤是当代威胁人类健康的最严重的疾病, 具有病期越晚治疗越难, 预后越差的特点, 因此寻找肿瘤特异性抗原(tumor-specific antigen, TSA)对于肿瘤的早期发现、早期诊断、早期治疗非常重要. 黑色素瘤抗原(MAGE)是首先从黑色素瘤中发现的, 其在正常组织中几乎不表达, 主要表达于以黑色素瘤为主的恶性肿瘤组织中, MAGE-A1是第一个发现的黑色素瘤抗原, 其表达和肿瘤的发生、发展及预后关系十分密切, 黑色素瘤抗原及其产物可用于肿瘤的分子学诊断和免疫治疗.

李佳, 潘林娜, 张志燕, 李曼, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腔镜室 黑龙江省哈尔滨市 150040
李佳, 硕士, 住院医师, 主要从事食管癌与黑色素瘤抗原家族方面的研究.
通讯作者: 潘林娜, 150040, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腔镜室.
limanl2488@hotmail.com
电话: 0451-82081615 传真: 0451-86663760
收稿日期: 2006-12-11 接受日期: 2007-01-18

Expression of melanoma antigen A1 and its relationship with tumor cell proliferation in esophageal carcinoma

Jia Li, Lin-Na Pan, Zhi-Yan Zhang, Man Li

Jia Li, Lin-Na Pan, Zhi-yan Zhang, Man Li, Department of Endoscopy, the Affiliated Cancer Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Lin-Na Pan, Department of Endoscopy, the Affiliated Cancer Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. limanl2488@hotmail.com
Received: 2006-12-11 Accepted: 2007-01-18

Abstract
AIM: To investigate the expression of melanoma antigen A1 (MAGE-A1) and Ki-67 in esophageal cancer (EC) and their correlations with the clinical pathological features and survival time of EC patients.

METHODS: The expression of MAGE-A1 and Ki-67 was detected by SP immunohistochemical technique using mouse anti-human MAGE-A1 and Ki-67 antibodies in formalin-fixed and paraffin-embedded sections from 60 EC patients.

RESULTS: The positive rate of MAGE-A1 expression was 83.3% (50/60) in EC, with a high expression rate of 10% (6/60) and low expression rate of 73.3% (44/60), while the positive rate of MAGE-A1 expression was 0% in the normal esophageal tissues, significantly lower than that in EC tissues ($P < 0.001$). The positive rate of Ki-67 expression was 93.3% (56/60) in EC, with a high expression rate of 70% (42/60) and low expression rate of 23.3% (14/60), while the positive rate of Ki-67 expression was 13.3% (4/30) in esophageal normal tissues, significantly lower than that in EC tissues ($P < 0.001$). There was a negative correlations between the positive expression of MAGE-A1 and Ki-67 ($r = -2.91$, $P < 0.05$). Besides, MAGE-A1 expression was also correlated with the differentiation degrees of carcinoma ($P < 0.05$), and Ki-67 expression was correlated with the age of patients, differentiation degrees and pathological type of carcinoma ($P < 0.05$). The survival time was higher for patients with the positive expression of MAGE-A1 than that for patients with the negative MAGE-A1 expression ($P < 0.05$).

CONCLUSION: MAGE-A1 is highly expressed in EC patients, which is correlated with the proliferation of tumor cells. The patients with positive MAGE-A1 expression have a favorable prognosis.

Key Words: Melanoma antigen A1; Ki-67; Proliferation; Immunology; Esophageal cancer

Li J, Pan LN, Zhang ZY, Li M. Expression of melanoma antigen A1 and its relationship with tumor cell proliferation in esophageal carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):706-711

摘要
目的: 研究食管癌中肿瘤特异性抗原MAGE-A1, Ki-67的表达及其相关性, 探讨他们与食管癌生物学行为及生存时间的关系.

方法: 免疫组化SP法, 利用鼠抗人MAGE-A1, Ki-67单克隆抗体检测60例食管癌标本中MAGE-A1, Ki-67表达水平.

结果: 60例食管癌中MAGE-A1表达率为83.3%(50/60), 高表达率为10%(6/60), 低表达率为73.3%(44/60), 正常组织表达率为0%, 食管癌和正常组织之间的表达具有显著性差异($P<0.001$). Ki-67表达率为93.3%(56/60), 高表达率为70%(42/60), 低表达率为23.3%(14/60), 正常组织表达率为13.3%(4/30), 食管癌和正常组织之间的表达具有显著性差异($P<0.001$).

MAGE-A1与分化程度有关(P<0.05), Ki-67与年龄、分化程度、病理类型有关(P<0.05). MAGE-A1阳性表达的高低与Ki-67阳性表达的高低呈负相关(r = -2.91, P<0.05). MAGE-A1阳性患者的生存时间明显高于阴性者.

结论: MAGE-A1在食管癌中有较高的表达, 并且与细胞增殖相关, 正常组织不表达, MAGE-A1阳性患者的预后好, 有望作为免疫治疗的靶点.

关键词: 黑色素瘤抗原基因A1; Ki-67; 增殖; 免疫; 食管癌

李佳, 潘林娜, 张志燕, 李曼. MAGE-A1在食管癌中的表达及其与肿瘤细胞增殖的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(7):706-711
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/706.asp

0 引言

恶性肿瘤的治疗研究一直是医学界的重要课题, 食管癌在我国是高发的恶性肿瘤, 其恶性程度较高, 患者生存期较短, 现有的治疗方法如常规的手术、放疗、化疗等疗效不好, 因此建立特异的肿瘤免疫疗法, 作为一种辅助治疗手段有助于推动肿瘤的治疗研究, 黑色素瘤抗原基因(melanoma antigen, MAGE)由于其表达产物具有较高的肿瘤特异性成为当前研究肿瘤学的热点. 1991年van der Bruggen *et al*[1]使用基因转染技术发现了黑色素瘤细胞系上的MAGE-A1基因, 该MAGE基因是肿瘤特异性抗原基因, 只在各种不同组织类型的肿瘤组织中表达, 在正常组织(除胎盘组织和男性生殖细胞)不表达[2-10]. MAGE基因编码的抗原可以与HLA(人类白细胞抗原)的Ⅰ类分子结合, 被CTL(细胞毒T淋巴细胞)特异识别, 产生CTL对肿瘤细胞的特异杀伤作用[11-12]. Ki-67是一种与细胞增殖密切相关的核内蛋白. 因其只表达于增殖细胞各期中, 静止期细胞阴性, 并具有半衰期短的特点, 而被作为评价细胞生长分数的有效指标, Rose *et al*[13]比较数种增殖标志物, 认为Ki-67抗体较适合作为常规的免疫组化研究, 目前Ki-67广泛应用于临床及基础研究.

本课题通过检测人食管癌(esophageal cancer)石蜡标本及食管正常组织中MAGE-A1蛋白与Ki-67蛋白表达状况, 研究MAGE-A1的表达与肿瘤增殖程度及机体的抗肿瘤免疫状态之间的相关性, 初步探讨MAGE-A1基因在此方面可能具有的调控或影响机制.

1 材料和方法

1.1 材料 经病理检查确诊食管癌标本(取自哈尔滨医科大学附属肿瘤医院2002年存档蜡块)60例, 男58例, 女2例, 年龄43-70(中位57.73)岁, 按组织学分级: 低分化20例, 中分化24例, 高分化16例. 30例食管正常黏膜作为对照. 所有标本均经中性甲醛固定、石蜡包埋, 4 μm切片用于HE染色和免疫组化染色. MAGE-A1鼠抗人单克隆抗体(LAB VISION公司), Ki-67鼠抗人单克隆抗体(福州迈新生物技术开发有限公司), Maxvision™试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)

1.2 方法

1.2.1 免疫组化SP法 具体步骤参照试剂盒说明书进行.

1.2.2 免疫组化结果判断 (1)MAGE-A1: 以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性. 其免疫反应分数(immunoreactive score, INS)参照Soslow *et al*[14]标准略加修改. 免疫反应分数根据染色强度(percentage of positive cell, PP)来判定, 即IRS = SI×PP. SI: 0分为无色, 1分为浅黄色, 2分为棕黄色, 3分为棕褐色; PP: 0分为阴性, 1分为阳性细胞≤10%, 2分为11%-50%, 3分为51%-100%; IRS = 0为阴性, ≤3分为低表达, >3分为高表达; 双盲法观察组织切片全部视野, 采用半定量积分法[15]判断结果: 首先确定阳性定位, 然后按照下面的标准进行评分, ①阳性细胞数: ≤5%为0分, 6%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >76%为4分; ②阳性强度: 无色为0分, 淡黄色为1分, 黄色为2分, 棕黄色为3分. 将①②两者积分相乘, 0分为阴性, >0分为阳性. (2) Ki-67: 以细胞核内有棕黄色颗粒为阳性. 参考Mehdi *et al*[16]方法, 随机选10个视野, 每个视野(放大400倍)计数100个细胞, 共计1000个细胞. 计算出每张切片上阳性细胞百分数, 阳性细胞所占百分比<1%为阴性, ≤25%为低表达, 阳性细胞所占百分比>25%为高表达. 参照文献[17]制定免疫组化半定量标准每张切片随机观察5个高倍视野, 每个视野计数100个肿瘤细胞, 阳性细胞数<10%为阴性, ≥10%为阳性.

统计学处理 采用SPSS13.0 for Windows统计学软件. 统计学分析用两独立样本比较的秩和检验、chi-square分析、相关性分析采用Spearman秩相关检验.

■研发前沿
对于包括MAGE在内的肿瘤特异性抗原的研究目前还处于探索阶段. 目前应用MAGE基因编码的抗原肽进行临床免疫治疗多仅限于黑色素瘤, 而对其他类型的肿瘤能否产生同等水平的疗效尚在动物实验和临床观察阶段. 随着人类基因工程的逐渐完成, 编码蛋白质的基因序列将被全部解析, 利用已知序列、结构的抗原多肽进行的抗肿瘤生物预防和治疗技术, 对肿瘤患者的治疗及高危人群的预防将是最终的成熟的方法.

■相关报道
Marchand *et al*的临床尝试性实验均证实了MAGE抗原用于免疫治疗无明显副作用, 能有效刺激机体的免疫系统, 发挥一定的抗癌作用. 因此选用适当的病例, 应用MAGE基因家族的表达产物对恶性肿瘤患者进行免疫治疗, 将具有重要的临床应用价值和广阔的应用前景.

■**创新盘点**
本实验在探讨MAGE-A1在肿瘤组织中的表达，同以前的研究进行对比，证实其作为免疫治疗靶点的可行性外，还研究了MAGE-A1和Ki-67的表达之间的关系，提示MAGE-A1在肿瘤组织的增殖调控方面可能具有重要作用. 进一步的生存分析也在提示患者预后方面做了详细的阐述.

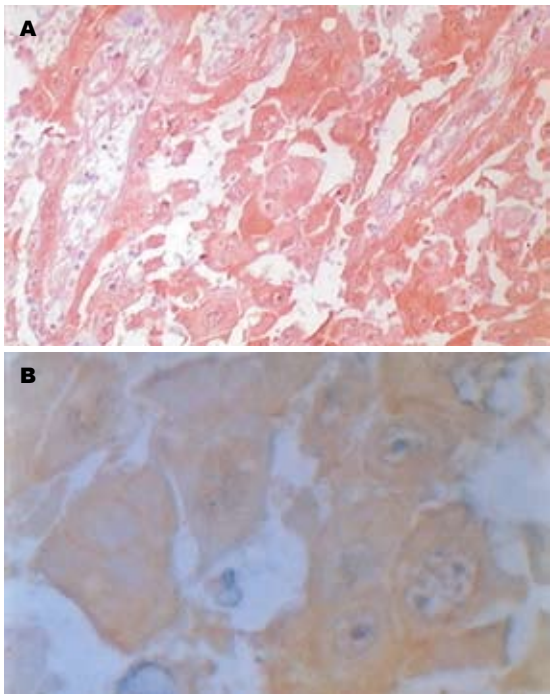

图 1 食管癌组织中MAGE-A1的表达. A: MAGE-A1弥漫表达于食管癌的胞质中(SP×100); B: MAGE-A1弥漫表达于食管癌的胞质中(SP×400).

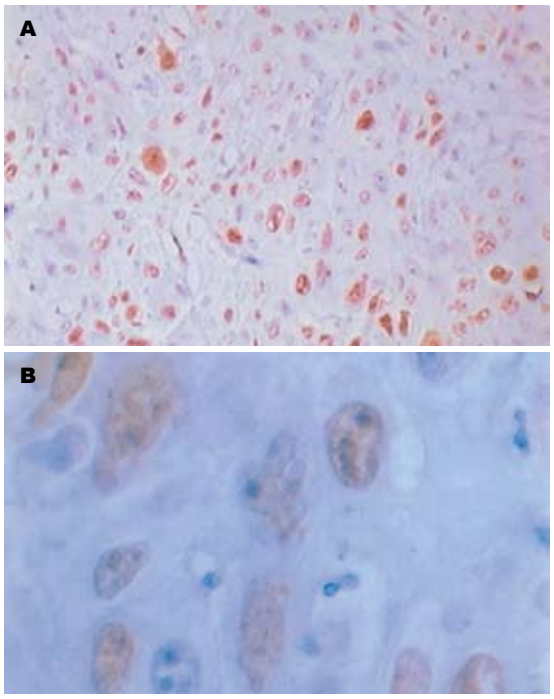

图 2 食管癌组织中Ki-67的表达. A: Ki-67表达于食管癌的胞核中(SP×100); B: Ki-67表达于食管癌的胞核中(SP×400).

表 1 MAGE-A1和 Ki-67在正常组织和肿瘤组织中的表达

分组	*n*	MAGE-A1				Ki-67			
		阴性	低表达	高表达	平均秩	阴性	低表达	高表达	平均秩
正常组织	30	30	0	0	23.50	26	3	1	19.63
食管癌	60	10	44	6	56.50[b]	4	14	42	8.43[b]

[b]$P<0.001$ *vs* 对照组.

2 结果

2.1 食管癌与正常组织中MAGE-A1和Ki-67表达状况(统计学分析用两独立样本比较的秩和检验) MAGE-A1蛋白阳性部位定位于肿瘤细胞胞质，其染色强度从浅黄色到棕黄色不等(图1). 周围正常组织和肿瘤间质无MAGE-A1表达. MAGE-A1阳性表达率83.3%(50/60)，高表达率为10%(6/60)，低表达率为73.3%(44/60). 平均秩为56.50，正常组织表达率为0%，平均秩为23.50，MAGE-A1在食管癌和正常组织之间的表达有显著性差异([b]$P<0.001$，表1). Ki-67蛋白表达于胞核，呈棕黄色. 腺癌及鳞癌癌巢周边部位Ki-67阳性细胞比其中心部位的更密集(图2). 阳性表达率为93.3%(56/60)，高表达率为70%(42/60)，低表达率为23.3%(14/60). 平均秩(Mean Rank)为58.43，正常组织表达率为13.3%(4/30)，平均秩(Mean Rank)为19.53，Ki-67在食管癌和正常组织中的表达有显著性差异([b]$P<0.001$，表1).

2.2 食管癌中MAGE-A1和Ki-67与临床病理参数的关系 采用chi-square分析发现，MAGE-A1的表达强度与食管癌患者分化程度有明显相关性($P<0.05$)，其中低分化与高分化组、中分化与高分化组间的表达有显著性差异，Ki-67的表达强度与食管癌患者年龄($P<0.001$)、病理($P<0.05$)、分化程度($P<0.001$)有明显相关性，其中分化程度中低分化与中分化组，低分化与高分化组间表达有显著性差异(表2).

2.3 MAGE-A1和Ki-67表达的相关性 采用Spearman秩相关检验发现，食管癌中MAGE-A1和Ki-67两者的表达有相关关系，并且为负相关关系($r=-2.91$, $P<0.05$，表3).

2.4 MAGE-A1和Ki-67与食管癌患者生存时间

表 2 食管癌中MAGE-A1和Ki-67与患者临床病理参数的关系

	MAGE-A1的表达		P	Ki-67的表达		P
	阴性(n)	阳性(n)		阴性(n)	阳性(n)	
性别						
男	16	42		6	52	
女	0	2		0	2	
年龄						<0.05
病理类型						
鳞癌	14	35		3	46	<0.05
腺癌	2	9		3	8	
分化程度						
低分化	4	16		6	14[c]	
中分化	4	20[a]	<0.05	0	24	<0.05
高分化	8	8[a]		0	16[c]	
TNM分期						
Ⅰ期	2	0		0	2	
Ⅱ期	9	31		4	36	
Ⅲ期	3	9		2	10	
Ⅳ期	2	4		0	6	
淋巴结转移						
无	7	17		2	22	
有	9	27		4	32	

[a]$P<0.05$ *vs* 低分化组; [c]$P<0.05$ *vs* 中分化组.

的关系 利用SPSS13.0软件, 根据患者生存时间及生存状态(由于食管癌患者生存时间较短, 此次主要比较3 a生存率, 两个因素采用阴性、阳性分类方法)做生存曲线. MAGE-A1阴性16例, 平均生存期16.125 mo, 中位生存时间15 mo, 阳性44例, 平均生存期23.386 mo, 中位生存时间20 mo(Log Rank = 4.70, $P<0.05$), MAGE-A1阴性、阳性对食管癌患者生存时间的影响有显著性差异. Ki-67生存曲线分析(Log Rank = 0.4, $P>0.05$), 尚不能认为Ki-67阴性、阳性对食管癌患者的远期生存的影响有显著性差异.

2.5 cox比例风险模型分析临床多因素对食管癌患者3 a生存率的影响 把各个临床因素分别作生存曲线分析, 发现年龄、分期、淋巴结转移对食管癌患者的远期生存时间的影响均有显著性差异, 把这些有意义的因素作为协变量运用逐步回归法进行筛选(95%可信区间, 筛选水平 = 0.05), 进行cox模型分析(表4), 从此复合多因素的结果看, 只有年龄$P>0.05$, 其余3者$P<0.05$, 是否可以认为把4者综合考虑, 年龄没有其他3者对患者生存的影响大. 其他因素, 如病理类型、分化程度等作为独立的因素影响食管癌患者的生存时间尚未构成统计学上的差异.

表 3 食管癌中MAGE-A1和Ki-67表达的相关性

Ki-67的表达	n	MAGE-A1的表达			r	P
		阴性(n)	低表达(n)	高表达(n)		
阴性	4	0	4	0		
低表达	14	2	10	2	−2.91	0.024
高表达	42	8	30	4		

3 讨论

人类MAGE(melanoma anigen)基因家族包含23个成员, MAGE-A1是MAGE家族中最早发现的基因, 其编码的蛋白产物在细胞质内被蛋白水解酶裂解, 形成两个可以被递呈系统识别的与MHC分子HLA-A1和HLA-Cw16.01结合的肽段, 由抗原加工相关转运物(transporter associated with antigen processing, TAP)转送至内质网后, 与HLA-I类分子结合形成复合物, 被递呈至细胞表面, 自体细胞毒性T淋巴细胞(CTL)通过识别抗原肽和HLA-I类分子复合体, 诱导特异性免疫杀伤肿瘤细胞效应[18-26], 除MAGE-D基因在人体正常成熟组织普遍表达外, 其他MAGE基因编码产物则在许多恶性肿瘤组织中有较高的表达, 但是在正常组织(除了睾丸和胎盘外)均不表达, 通过RT-PCR技术检测发现, 人类半数以上各种组织来源的恶性肿瘤中均至少表达一种MAGE基因, 但癌旁组织鲜见表达. 因而MAGE抗原肽是一种CTL介导的肿瘤特异性免疫治疗的理想靶分子.

本实验检测MAGE-A1在食管癌中的表达情况, 据相关文献报道, MAGE-A1在食管癌中表达的阳性率为62%[27], 53%[28]. 本结果显示MAGE-A1在食管癌中表达阳性率高(83.3%), 在正常组织中不表达, 这种差异的可能原因是所采标本的病期不同, 因为在食管癌不同发展阶段中肿瘤抗原表达可能不同, 也可能是本实验例数少产生一定的误差, 本结果提示在食管癌现有治疗方法不好的基础上, 有望利用MAGE-A1编码抗原作为食管癌免疫治疗攻击靶点并且可覆盖多数病例, 并有较好的特异性, 值得尝试. van der Bruggen *et al*[1]在研究中发现, MAGE-1基因阳性表达的黑色素瘤细胞系也必须同时表达HLA-A1, 才能诱发CTL细胞的杀伤作用, 否则不能激活CTL细胞. 可通过在体外合成MAGE编码蛋白与HLA-I类分子结合成多肽复合物用于临床抗肿瘤免疫治疗. Marchand *et al*[29]的临床尝试性实验均证实了MAGE抗原

■应用要点
MAGE-A1在肿瘤特异性免疫治疗中具有特异性靶位的潜在价值, 对基因治疗和免疫治疗的探索可以产生深远的影响. 还可以制成基因芯片, 进行免疫监视和免疫检测, 可监视肿瘤细胞的浸润生长状态, 以采取合适的干预措施, 在分子病理学诊断中的作用也不容忽视.

■名词解释
肿瘤特异性抗原(tumor special antigen, TSA): 是肿瘤细胞特有的或只存在于某些肿瘤细胞而不存在于正常细胞的新抗原. 这类抗原是人们于1950年代末在遗传背景基本相同的小鼠(可排除正常组织相容性抗原的影响) 即同系小鼠中通过移植排异的实验方法发现的.

表 4 多因素cox回归生存分析

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
MAGE–A1	–1.200	0.358	11.249	1	0.001	0.301	0.149	0.607
年龄	0.000	0.020	0.000	1	1.000	1.000	0.962	1.039
TNM 分期	1.029	0.299	11.815	1	0.001	2.798	1.556	5.032
淋巴结转移	1.043	0.378	7.603	1	0.006	2.836	1.352	5.951

用于免疫治疗无明显副作用, 能有效刺激机体的免疫系统, 发挥一定的抗癌作用. 因此选用适当的病例, 应用MAGE基因家族的表达产物对恶性肿瘤患者进行免疫治疗, 将具有重要的临床应用价值和广阔的应用前景.

MAGE-A1和Ki-67的表达之间具有负相关性(r = -2.91, P<0.05), 表明MAGE-A1阳性表达的肿瘤细胞比其阴性表达者可能具有较低增殖活性; MAGE-A1高表达的肿瘤细胞没有其低表达的增殖旺盛, 这提示MAGE-A1在肿瘤组织的增殖调控方面可能具有重要作用. 有研究认为, MAGE家族中的MAGE-B4[30]也可能在细胞周期调控中发挥重要作用, 推测该家族基因并不仅仅作为肿瘤特异性抗原存在, 他和组织细胞的正常增殖、分化也有非常密切的关系. 我们认为, MAGE-A1表达和肿瘤细胞增殖之间可能具有某种负调控关系. 肿瘤组织中MAGE-A1基因甲基化程度增加, 致使MAGE-A1高表达是否导致肿瘤细胞增殖活性的下调, 还是肿瘤细胞的高增殖状态诱发MAGE-A1基因高甲基化程度增加, 致使MAGE-A1高表达目前尚无定论. 另外, Ki-67阳性细胞在鳞癌癌巢外周部位比中心部位分布更密集, 提示外周的癌细胞具有更高的增殖活性.

本实验还表明MAGE-A1的表达和分化程度有相关性, Ki-67的表达与年龄、病理类型、分化程度有相关性. 对MAGE-A1和Ki-67阴性、阳性作生存曲线并进一步进行的生存分析, MAGE-A1阴性、阳性对食管癌患者生存时间的影响有显著性差异, 与Zambon *et al*[31]报道一致, 其报道48例食管癌中不表达任何基因的患者组(23例, 48%)平均生存期22 mo, 而表达一种或多种MAGE基因的患者组(17例, 35%)平均生存期57 mo, 明显高于抗原阴性者, 推测其原因, 可能是由于MAGE抗原阳性的患者体内存在识别自体肿瘤细胞的CTL, 肿瘤细胞被特异性CTL识别杀伤, 从而减少或延缓了肿瘤的复发与转移, 而MAGE抗原阴性的肿瘤细胞不被CTL识别杀伤, 肿瘤易复发转移, 生存率也相对低. 进一步的多因素cox回归生存分析结果显示, MAGE-A1、TNM分期、淋巴结转移对生存时间的影响有意义, 提示能否把他们考虑为影响预后的独立作用因素.

总之, 合并MAGE-A1的各方面优势, 其作为免疫治疗的靶点并进行进一步的研究值得尝试.

4 参考文献

1 van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-1647

2 Eura M, Chikamatsu K, Ogi K, Nakano K, Masuyama K, Ishikawa T. Expression of genes MAGE-1, -2, and -3 by human maxillary carcinoma cells. *Anticancer Res* 1995; 15: 55-59

3 Chen CH, Huang GT, Lee HS, Yang PM, Yan MD, Chen DS, Sheu JC. High frequency of expression of MAGE genes in human hepatocellular carcinoma. *Liver* 1999; 19: 110-114

4 Brasseur F, Marchand M, Vanwijck R, Herin M, Lethe B, Chomez P, Boon T. Human gene MAGE-1, which codes for a tumor-rejection antigen, is expressed by some breast tumors. *Int J Cancer* 1992; 52: 839-841

5 Shichijo S, Tsunosue R, Masuoka K, Natori H, Tamai M, Miyajima J, Sagawa K, Itoh K. Expression of the MAGE gene family in human lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 41: 90-103

6 Inoue H, Mori M, Honda M, Li J, Shibuta K, Mimori K, Ueo H, Akiyoshi T. The expression of tumor-rejection antigen "MAGE" genes in human gastric carcinoma. *Gastroenterology* 1995; 109: 1522-1525

7 Gajjar NA, Cochran AJ, Binder SW. Is MAGE-1 expression in metastatic malignant melanomas really helpful? *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 883-888

8 Castelli C, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M, Renkvist N, Parmiani G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol* 2000; 182: 323-331

9 梁锐, 王芳, 王开昕, 高倩, 王志强, 杨耘. MAGE-A1, -A4基因在大肠肿瘤中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2005; 13: 657-661

10 周迈, 彭吉润, 王红霞, 钟朝辉, 郭晏同, 潘秀英, 冷希圣. 利用质谱技术对肝癌组织中自然呈递的MAGE表

位进行鉴定. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1395-1399
11 Castelli C, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M, Renkvist N, Parmiani G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol* 2000; 182: 323-331
12 Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, Lethe B, Brasseur F, Boon T. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 921-930
13 Rose DS, Maddox PH, Brown DC. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol* 1994; 47: 1010-1014
14 Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000; 89: 2637-2645
15 曹立宇, 张洪福, 龚西瑜, 孟刚. 大肠肿瘤中p53和bcl-2蛋白的表达. 临床与实验病理学杂志 2000; 16: 214
16 Mehdi SA, Etzell JE, Newman NB, Weidner N, Kohman LJ, Graziano SL. Prognostic significance of Ki-67 immunostaining and symptoms in resected stage I and II non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1998; 20: 99-108
17 王维, 罗和生, 余保平. 胃癌及癌前病变中hTERT基因和*c-myc*蛋白的表达意义. 世界华人消化杂志 2002; 10: 258-261
18 Hu X, Chakraborty NG, Sporn JR, Kurtzman SH, Ergin MT, Mukherji B. Enhancement of cytolytic T lymphocyte precursor frequency in melanoma patients following immunization with the MAGE-1 peptide loaded antigen presenting cell-based vaccine. *Cancer Res* 1996; 56: 2479-2483
19 Ottaviani S, Zhang Y, Boon T, van der Bruggen P. A MAGE-1 antigenic peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 1214-1220
20 Liu G, Ying H, Zeng G, Wheeler CJ, Black KL, Yu JS. HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. *Cancer Res* 2004; 64: 4980-4986
21 Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, Wheeler CJ. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 2004; 64: 4973-4979
22 Ringhoffer M, Muller CR, Schenk A, Kirsche H, Schmitt M, Greiner J, Gschwend JE. Simultaneous expression of T-cell activating antigens in renal cell carcinoma: implications for specific immunotherapy. *J Urol* 2004; 171: 2456-2460
23 Corbiere V, Nicolay H, Russo V, Stroobant V, Brichard V, Boon T, van der Bruggen P. Identification of a MAGE-1 peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-B*5701 tumors. *Tissue Antigens* 2004; 63: 453-457
24 Kobayashi T, Lonchay C, Colau D, Demotte N, Boon T, van der Bruggen P. New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens* 2003; 62: 426-432
25 Grobholz R, Verbeke CS, Schleger C, Kohrmann KU, Hein B, Wolf G, Bleyl U, Spagnoli GC, Coplan K, Kolb D, Iversen K, Jungbluth AA. Expression of MAGE antigens and analysis of the inflammatory T-cell infiltrate in human seminoma. *Urol Res* 2000; 28: 398-403
26 Yamada A, Kawano K, Harashima N, Niiya F, Nagai K, Kobayashi T, Mine T, Ushijima K, Nishida T, Itoh K. Study of HLA class I restriction and the directed antigens of cytotoxic T lymphocytes at the tumor sites of ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1999; 48: 147-152
27 Inoue H, Mori M, Li J, Mimori K, Honda M, Nakashima H, Mafune K, Tanaka Y, Akiyoshi T. Human esophageal carcinomas frequently express the tumor-rejection antigens of MAGE genes. *Int J Cancer* 1995; 63: 523-526
28 Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F. Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res* 1997; 17: 387-391
29 Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, Cascinelli N, Bourlond A, Vanwijck R, Humblet Y. Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer* 1995; 63: 883-885
30 Osterlund C, Tohonen V, Forslund KO, Nordqvist K. Mage-b4, a novel melanoma antigen (MAGE) gene specifically expressed during germ cell differentiation. *Cancer Res* 2000; 60: 1054-1061
31 Zambon A, Mandruzzato S, Parenti A, Macino B, Dalerba P, Ruol A, Merigliano S, Zaninotto G, Zanovello P. MAGE, BAGE, and GAGE gene expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2001; 91: 1882-1888

■同行评价

本文研究了MAGE-A1在食管癌中的表达及其与肿瘤细胞增殖的关系, 有一定新颖性, 设计科学, 结论可靠.

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 712-716
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

热休克蛋白70对应激性胃溃疡黏膜的保护作用

王鹤, 曲彦, 胡丹

■背景资料
热休克蛋白是一组高度保守、与应激相关的蛋白，在细胞正常发育和多种应激状态下对维持细胞的稳定性具有重要作用. 其中，HSP70在正常情况下表达很低或是不表达，而在应激状态下表达明显增强.

王鹤, 青岛大学医学院护理学院 山东省青岛市 266023
曲彦, 胡丹, 青岛大学医学院附属市立医院ICU 山东省青岛市 266011
王鹤, 青岛大学医学院护理学院研究生, 主要从事危重症监护的研究.
通讯作者: 曲彦, 266011, 山东省青岛市, 青岛大学医学院附属市立医院ICU. qdquyan@yahoo.com
电话: 0532-86969701
收稿日期: 2006-11-28 接受日期: 2006-12-27

Protective role of heat shock protein 70 for gastric mucosa with stress ulcer

He Wang, Yan Qu, Dan Hu

He Wang, Nursing School, Qingdao University Medical College, Qingdao 266023, Shandong Province, China
Yan Qu, Dan Hu, Intensive Care Unit, the Affiliated Qingdao Municipal Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266011, Shandong Province, China
Correspondence to: Yan Qu, Intensive Care Unit, the Affiliated Qingdao Municipal Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266011, Shandong Province, China. qdquyan@yahoo.com
Received: 2006-11-28 Accepted: 2006-12-27

Abstract

AIM: To investigate whether the expressive intensity of heat shock protein 70 (HSP70) is changed with the progression of stress ulcer.

METHODS: Thirty stress ulcer patients with bleeding and ten patients without bleeding before operation from intensive care unit were included as study subjects. Gastric fluid and blood specimen were collected from these patients. After total RNA was extracted from the shed cells in gastric juice and peripheral white blood cells (PWBC) by TRIzol method, semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to investigate the intensity of HSP70 expression. Meanwhile, immunohistochemistry was used to evaluate the expression of HSP70 in PWBC.

RESULTS: RT-PCR result showed that the expressive intensity of HSP70 in each stage of stress ulcer was remarkably higher than that in the control group (blood specimen: 0.6289 ± 0.1839, 1.1322 ± 0.3683, 0.6855 ± 0.1923 *vs* 0.3868 ± 0.2071; gastric fluid specimen: 0.7741 ± 0.2442, 1.2385 ± 0.4558, 0.8790 ± 0.2722 *vs* 0.4626 ± 0.2416; for stage 1, 2, 3 and control group, respectively; all $P < 0.05$). The expression of HSP70 in stage-2 ulcer was higher than that in stage-1 and -3 one ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the expressive intensity of HSP70 between stage-1 and -3 ulcer ($P > 0.05$). Immunohistochemistry showed that the level of HSP70 expressive was significantly different among stress ulcer of different stages and the control group (40%, 80%, 30%, 10%, for stage 1, 2, 3 and control group, respectively, $\chi^2 = 10.8383$, $P < 0.05$), and the highest expression level occurred in stage-2 ulcer and the lowest in the control group.

CONCLUSION: HSP70 expression can be detected both in the shed cells in gastric fluid and PWBC from patients with stress ulcer. HSP70 may protect gastric mucosa from stress-induced damage and promote the healing of ulcer.

Key Words: Heat shock proteins 70; Gastric mucosa; Stress ulcer

Wang H, Qu Y, Hu D. Protective role of heat shock protein 70 for gastric mucosa with stress ulcer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):712-716

摘要

目的: 探讨热休克蛋白70(HSP70)表达是否随应激性胃溃疡病程的进展而变化.

方法: 收集30例应激性胃溃疡出血患者及10例术前患者的胃液及外周血, 采用TRIzol一步法提取胃液脱落细胞及外周血白细胞总RNA, 采用半定量RT-PCR检测HSP70的表达; 同时, 采用免疫组化技术检测外周血白细胞HSP70的表达.

结果: RT-PCR检测结果提示应激性溃疡各期的HSP70表达明显高于对照组的表达(血标本: 1期0.6289±0.1839, 2期1.1322±0.3683, 3期0.6855±0.1923, 对照组0.3868±0.2071; 胃液标本: 1期0.7741±0.2442, 2期1.2385±0.4558,

3期0.8790±0.2722, 对照组0.4626±0.2416; 均P<0.05), 应激性溃疡2期HSP70表达显著高于1期和3期(P<0.05), 而1期和3期之间无统计学差异(P>0.05). 免疫组化结果为应激性溃疡患者外周血白细胞HSP70的表达水平在不同病期有所不同(1期40%, 2期80%, 3期30%, 对照组10%, χ^2 = 10.8383, P<0.05), 以2期表达水平最高, 对照组表达最低.

结论: 应激性溃疡时患者外周血细胞和胃液脱落细胞均可检测到HSP70的表达, 应激状态可诱导HSP70的表达, HSP70对胃黏膜具有保护作用, 并可能促进应激性溃疡的愈合.

关键词: HSP70; **胃黏膜; 应激性溃疡**

王鹤, 曲彦, 胡丹. 热休克蛋白70对应激性胃溃疡黏膜的保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(7):712-716
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/712.asp

0 引言

热休克蛋白是一组高度保守、与应激相关的蛋白, 在细胞正常发育和多种应激状态下对维持细胞的稳定性具有重要作用. 机体经常处于各种应激状态下, 应激可造成胃黏膜损伤并降低胃黏膜的屏障保护作用, 导致应激性溃疡的产生[1-3]. 同时应激也可诱导热休克蛋白的合成, 而热休克蛋白又可以预防应激性溃疡, 抑制胃黏膜细胞凋亡, 促进胃溃疡的愈合. HSP70在正常情况下表达很低或是不表达, 而在应激状态下表达明显增强[4-5], 以往关于应激性溃疡与HSP70相互关系的研究多为检测血细胞中或干预后的动物胃黏膜上皮细胞中HSP70的表达, 本研究同时检测应激性溃疡患者外周血细胞以及胃液中脱落细胞(胃黏膜上皮细胞和炎性细胞等)HSP70的表达, 进一步探讨HSP70表达与应激性溃疡的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-11/2006-06收集30例在重症监护病房(ICU)进行治疗的应激性溃疡患者的胃液和外周抗凝血, 其中男18例, 女12例, 平均年龄61.4±16.1岁. 患者入选条件为: (1)收住时无应激性溃疡, 住院期间出现; (2)此次入院非消化道因素, 住院期间因其他疾病导致应激溃疡出血; (3)年龄18-80岁. 收集3个时间点的胃液, 即刚出现溃疡出血颜色较浅时; 颜色最深呈深咖啡色且量较多时; 颜色变淡呈浅咖啡色或转为正常时(分别定义为1, 2及3期). 同时选择无消化道应激性溃疡出血的10例(其中男6例, 女4例, 平均年龄68.3±7.2岁)术前患者, 收集其外周抗凝血和胃液作为对照. HSP70 mAb为美国NEO公司产品; SP通用型染色试剂盒、DAB显色试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 血细胞分离试剂Percoll和反转录试剂盒购自美国Promega公司; PCR反应体系购自上海生工生物工程技术服务有限公司; DNA marker DL-2000购自大连宝生物工程有限公司.

1.2 方法 每位患者收集胃液约20 mL, 3000 r/min离心取沉淀, 分离上皮细胞, 移入1.5 mL EP管中, 加TRIzol液1 mL提取细胞总RNA. 同时采集外周抗凝血10 mL, 3000 r/min离心取沉淀后, 用Percoll试剂分离上层血浆样部分的中性粒细胞, 一部分制备细胞涂片用于免疫组化检测, 一部分细胞加TRIzol液1 mL提取细胞总RNA.

1.2.1 半定量RT-PCR 参照文献[6]设计扩增HSP70基因和内参照GAPDH基因的特异性引物, 由上海生工生物工程技术服务工程有限公司合成. 引物序列为: 上游引物5'-CAACGGGCGCGACCTGAACA-3',下游引物5'- CCTCTCGCCCTCGTACACCTGGAT-3', 扩增产物为280 bp. 内参引物序列为: 上游引物5'-CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA-3', 下游引物5'-ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA-3', 扩增产物为450 bp. 参照逆转录试剂盒要求的标准条件合成cDNA作为PCR反应模板. PCR反应体系为25 μL, 包括10×Buffer 2.5 μL, $MgCl_2$ 1.5 mmol/L, 4×dNTP 0.2 mmol/L, 上下游引物各0.5 mmol/L, TaqE 1 U, cDNA 3 μL, 无菌去离子水加至25 μL. 反应条件为: 94℃预变性5 min; 然后94℃ 60 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 共35个循环; 最后72℃延伸10 min. 取10 μL PCR扩增产物于含EtBr(0.5 mg/L)的20 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 80 V, 1 h, 紫外透射仪下观察电泳结果, 并用天能GIL凝胶图像处理系统进行分析.

1.2.2 免疫组化检测HSP70蛋白的表达 制备外周血白细胞涂片, 干燥后冷丙醇固定, 依次滴加1∶150稀释的鼠抗人HSP70 mAb、生物素标记的通用型二抗工作液、辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液于细胞涂片上, 37℃分别孵育2.5 h, 15 min, 15 min. 加现配制的DAB显色液覆盖标本, 显色约15-20 min, 自来水充分冲洗后进行苏木素复染涂片, 进而依次脱水、透明和中性树胶封片, 光学显微镜下观察结果.

■研发前沿
近年来, 关于应激性溃疡与HSP70相互关系的研究多为检测血细胞中或干预后的动物胃黏膜上皮细胞中HSP70的表达, 并且证实应激可以诱导动物胃溃疡的形成同时可以诱导HSP70表达.

■相关报道
有报道表明, 在睡眠剥夺鼠胃黏膜与正常对照胃黏膜不同表达的基因研究中发现, 总的588个基因中有10个不同的表达基因, 这些基因大多数是与消化有关, HSP70基因就是其中之一; HSP70家族是细胞面对热刺激和其他物理刺激时存活下来所必须的, 而且大量证据支持HSP70具有在致死性刺激时可以提高细胞存活力的作用.

■**创新盘点**
本研究同时检测应激性溃疡患者外周血细胞以及胃液中脱落细胞(胃黏膜上皮细胞和炎性细胞等)HSP70的表达,证实应激可以诱导溃疡产生并在导致溃疡出血的同时诱导HSP70的表达,而且HSP70表达在促进应激性溃疡恢复方面具有非常重要的作用.

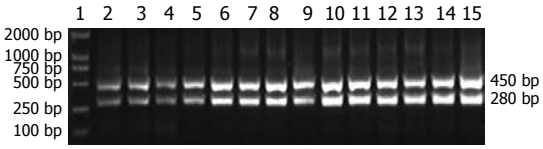

图 1 半定量RT-PCR检测血细胞中HSP70的表达. 1: DNA Marker DL2000; 2-15: HSP70基因(280 bp)和GAPD基因(450 bp)条带.

表 1 各组HSP70基因与GAPDH基因扩增条带光密度值的比值及HSP70蛋白表达的比较(n = 10)

分期	血标本光密度值比值	HSP70蛋白表达		胃液标本光密度值比值
		阴性(n)	阳性(n)	
1期	0.6289±0.1839	6	4	0.7741±0.2442
2期	1.1322±0.3683	2	8	1.2385±0.4558
3期	0.6855±0.1923	7	3	0.8790±0.2722
对照	0.3868±0.2071	9	1	0.4626±0.2416

由三位有经验的读片专家分别读片. 根据染色有无及深浅可分为阳性和阴性结果. 如果细胞核和细胞质出现棕黄色着色(可同时伴有胞质的棕黄色颗粒)视为阳性信号, 若同一涂片阳性细胞数>30%细胞数则视为阳性病例[7].

统计学处理 HSP70 cDNA扩增的半定量PCR检测结果采用计量资料的方差分析, 免疫组化结果采用χ^2检验进行统计学分析, P<0.05表示有显著性差异.

2 结果

2.1 *外周血细胞RT-PCR检测结果* 以GAPDH为内参照, 应用半定量RT-PCR检测30例应激性溃疡患者和10例对照者外周血白细胞HSP70 mRNA水平, 部分标本检测结果见图1. 每份标本均可观察到280 bp和450 bp两条电泳条带, 分别为HSP70和GAPDH扩增条带, 以HSP70基因与GAPDH基因扩增条带光密度值的比值表示目的基因的表达水平, 计算应激性溃疡患者组和对照组HSP70平均表达水平. 统计分析结果表明2期患者HSP70表达水平(1.1322±0.3683)明显高于1期(0.6289±0.1839)、3期(0.6855±0.1923)和对照组(0.3868±0.2071), 差别有统计学意义(P<0.05); 1期和3期患者HSP70表达水平也明显高于对照组, 差别有统计学意义(P<0.05); 而1期和3期患者HSP70表达水平无显著性差异(P>0.05). 结果表明对照组HSP70表达低于其他各实验组, 而实验组2期HSP70表达明显强于其他实验组和对照组(表1).

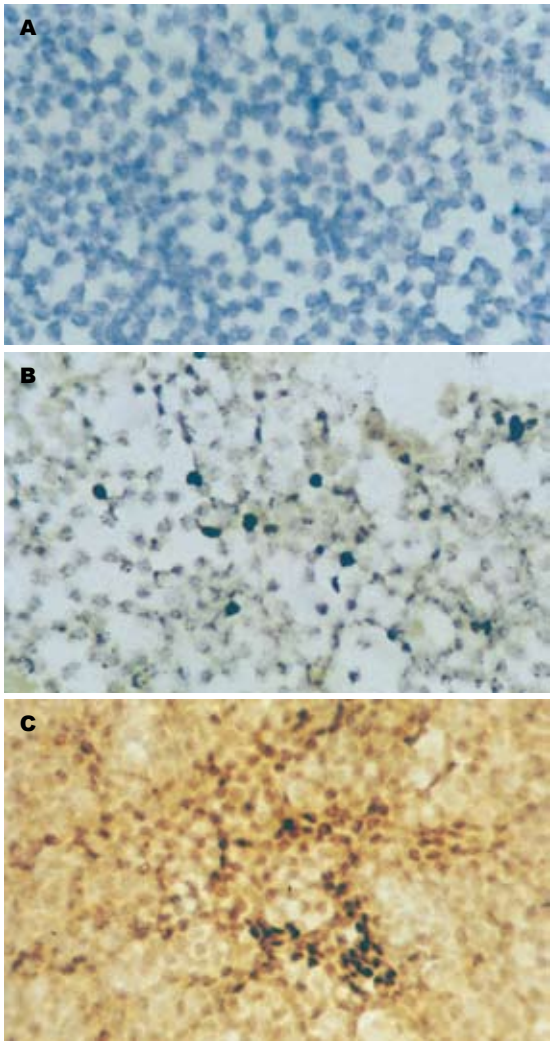

图 2 外周血白血细胞免疫组化检测结果(400). A: 对照组外周血白细胞免疫组化镜下结果; B: 1期镜下结果; C: 2期镜下结果.

2.2 *免疫组化结果与分析* 应用免疫组化法检测对照组和应激性溃疡患者外周血细胞中HSP70的表达. 结果显示, 在对照组的外周血细胞涂片中几乎无HSP70阳性细胞(图2A), 但是在应激性患者的外周血细胞涂片中均可观察到HSP70阳性细胞, 而且各期的着染程度不同, 图2C为2期患者检测结果, 可见大量的HSP70阳性细胞; 图2B为1期患者检测结果显示有HSP70阳性细胞, 但其表达不如2期多. 计算其阳性率结果见表1, 1期HSP70阳性率为40%(4/10), 2期为80%(8/10), 3期为30%(3/10), 对照组为10%(1/10). 4组间比较, χ^2值为10.8383, P = 0.0127<0.05, 差别有统计学意义, 多个样本率两两比较后显示, 除1期与3期之间差别无显著性差异外, 其他各组之间均有显著性差异, 表明应激性溃疡患者外周血白

细胞HSP70的表达水平在不同病期有所不同, 以2期表达水平最高, 对照组表达最低.

2.3 胃液脱落细胞HSP70表达的检测 以GAPDH为内参照, 应用半定量RT-PCR检测30例应激性溃疡患者和10例对照者胃液脱落细胞HSP70 mRNA水平, 部分标本检测结果见图1. 每份标本均可观察到280 bp和450 bp两条电泳条带, 即HSP70和GAPDH的扩增条带, 表1为应激性溃疡患者组和对照组HSP70平均表达水平. 统计分析结果表明2期患者HSP70表达水平(1.2385±0.4558)明显高于1期(0.7741±0.2442)、3期(0.8790±0.2722)和对照组(0.4626±0.2416), 差别有统计学意义(P<0.05); 1期和3期患者HSP70表达水平也明显高于对照组, 差别有统计学意义(P<0.05); 而1期和3期患者HSP70表达水平无显著性差异(P>0.05). 胃液脱落细胞HSP70检测结果与血细胞HSP70检测结果相似, 即实验组2期HSP70的表达最强而对照组HSP70的表达水平最低.

3 讨论

HSP70系列是最重要的应激蛋白, 几乎在所有生物的应激细胞中均高水平表达. 诱导HSP70系列产生的因素包括热应激、化学物质(氧自由基、乙醇等)、缺血缺氧、感染及严重创伤等[8-12]. 有学者在应激状态下动物实验研究中检测到HSP70基因的转录产物, 表明应激性状态下HSP70的转录产物高于正常[13-16]. 应激状态下胃黏膜上皮细胞HSP70表达增加的可能机制是: 在应激状态下胃黏膜细胞内蛋白质构型发生改变, 产生变性聚集的蛋白, 激发细胞的应激反应, 激活热休克基因, 编码产生HSP70. 诱导合成的HSP70又能促进细胞内蛋白质的合成、折叠、装配、转位, 并促使细胞从应激中恢复, 从而减少了黏膜细胞的损伤, 保护胃黏膜. 这与国外文献报道HSP70家族介导胃黏膜细胞的保护机制一致[17-21]. 研究显示, 诱导性HSP70家族可以修复损伤的前核糖体、防止溶酶体破坏、稳定细胞膜, 从而维持细胞正常的形态和功能, 对抗有害因素. 诱导产生的HSP70可以产生多种保护作用, 如可以在大鼠肺脓毒性损伤中产生保护性作用, 而且可以降低肿瘤坏死因子诱导的肝细胞凋亡, 表达HSP70的转基因小鼠可以抵抗局部缺血和致死性热损伤等不良刺激[22-26]. 但这种保护作用可被抑制HSP70表达的蛋白质合成抑制剂所阻断, 如果向纤维母细胞注射微量抗HSP70抗体, 就可增加细胞对亚致死温度的易损性[27-30]. 由此可见HSP70的表达对多种脏器具有保护作用.

应激状态下胃黏膜充血、水肿、糜烂、溃疡形成、进而引起溃疡出血, 同时伴有胃黏膜上皮细胞的脱落, 本研究采用半定量RT-PCR检测应激性溃疡患者胃液中脱落细胞和外周血白细胞HSP70的表达, 应用计量资料的方差分析对不同病期患者HSP70基因扩增的光密度比值进行统计分析. 结果显示, 胃液脱落细胞和血液白细胞中HSP70在应激状态下的表达相似, 不同病期应激性溃疡患者胃液脱落细胞及血液白细胞HSP70的表达有所不同. 对照组HSP70的表达明显低于应激性溃疡组, 溃疡出血2期即溃疡最严重期HSP70的表达明显高于其他期, 但是1期和3期之间即溃疡出血早期和溃疡恢复阶段HSP70的表达无显著性差异, 表明应激性溃疡可诱导HSP70表达, 且其表达随着应激性溃疡的发展而变化. 即当机体处于应激状态时, HSP70开始表达, 随着应激强度的增加应激性溃疡出血加重, HSP70的表达达到了高峰, 其保护作用也在增强, 随着溃疡的好转, HSP70的表达则逐渐降低. 同时, 我们也对血液白细胞HSP70表达进行了免疫组化检测, 所得的结果与RT-PCR的结果相符. 进一步证实应激可以诱导溃疡产生并在导致溃疡出血的同时诱导HSP70的表达, 而且HSP70表达在促进应激性溃疡恢复方面具有非常重要的作用.

虽然在应激状态下胃黏膜的保护作用减弱, 不可避免的会有炎性反应的产生, 进而会有炎性细胞的聚积, 因此从胃液中提取的细胞不仅仅是胃黏膜上皮细胞, 还有部分炎性细胞, 但是结果显示炎性细胞并没有影响应激状态下胃黏膜上皮细胞HSP70的表达. 而且我们初步认为, 胃黏膜的炎性反应也可能作为一种应激原诱导胃黏膜上皮细胞HSP70的表达.

■应用要点

热休克蛋白的细胞保护作用为应激性溃疡的治疗提供了新的模式. HSP在多种病理生理情况下对应激产生导致的胃黏膜损伤有拮抗作用, 因此寻找安全有效的HSP70诱导剂可以通过诱导HSP70的表达保护细胞对抗环境因素的刺激, 达到治疗消化性溃疡和其他应激诱发的疾病的目的, 他也可能用于日常饮食中作为日常生活中抗应激辅助物.

4 参考文献

1 Coskun T, Yegen BC, Alican I, Peker O, Kurtel H. Cold restraint stress-induced gastric mucosal dysfunction. Role of nitric oxide. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 956-963

2 Ren J, Gao J, Ojeas H, Lightfoot SA, Kida M, Brewer K, Harty RF. Involvement of capsaicin-sensitive sensory neurons in stress-induced gastroduodenal mucosal injury in rats. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 830-836

3 Liu GS, Huang YX, Li SW, Pan BR, Wang X, Sun DY, Wang QL. Experimental study on mechanism and protection of stress ulcer produced by explosive

■同行评价
本文观察了应激性溃疡出血不同阶段, 外周血液、胃液热休克蛋白70表达的变化, 为应激性溃疡出血时热休克蛋白70表达的变化研究提供了一些有价值的信息.

noise. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 519-523

4 Ozdemirler Erata G, Kanbagli O, Durlanik O, Bulut T, Toker G, Uysal M. Induced oxidative stress and decreased expression of inducible heat shock protein 70 (ihsp 70) in patients with colorectal adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 74-78

5 Tomanek L, Sanford E. Heat-shock protein 70 (Hsp70) as a biochemical stress indicator: an experimental field test in two congeneric intertidal gastropods (genus: Tegula). *Biol Bull* 2003; 205: 276-284

6 余厚友, 宋祖军, 袁顺书, 刘彦仿, 杨守京. 人热休克蛋白72基因的克隆、原核表达与纯化. 第四军医大学学报 2002; 23: 969-972

7 Cogan TA, Domingue G, Lappin-Scott HM, Benson CE, Woodward MJ, Humphrey TJ. Growth of Salmonella enteritidis in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. *Int J Food Microbiol* 2001; 70: 131-141

8 Minowada G, Welch WJ. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 1995; 95: 3-12

9 Villar J, Edelson JD, Post M, Mullen JB, Slutsky AS. Induction of heat stress proteins is associated with decreased mortality in an animal model of acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 177-181

10 Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG Jr. Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation* 1993; 87: 963-971

11 Stojadinovic A, Kiang J, Smallridge R, Galloway R, Shea-Donohue T. Induction of heat-shock protein 72 protects against ischemia/reperfusion in rat small intestine. *Gastroenterology* 1995; 109: 505-515

12 Stojadinovic A, Kiang J, Goldhill J, Matin D, Smallridge R, Galloway R, Shea-Donohue T. Induction of the heat shock response prevents tissue injury during acute inflammation of the rat ileum. *Crit Care Med* 1997; 25: 309-317

13 Shen XZ, Chow JF, Koo MW, Cho CH. Gene expression profiles in gastric mucosa of sleep deprivation rats. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 754-758

14 Guo JS, Chau JF, Shen XZ, Cho CH, Luk JM, Koo MW. Over-expression of inducible heat shock protein 70 in the gastric mucosa of partially sleep-deprived rats. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 510-515

15 Wang XP, Liu GZ, Song AL, Chen RF, Li HY, Liu Y. Expression and significance of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 429-432

16 Fiorenza MT, Bevilacqua A, Canterini S, Torcia S, Pontecorvi M, Mangia F. Early transcriptional activation of the hsp70.1 gene by osmotic stress in one-cell embryos of the mouse. *Biol Reprod* 2004; 70: 1606-1613

17 Kiang JG, Ding XZ, McClain DE. Overexpression of HSP-70 attenuates increases in [Ca2+]i and protects human epidermoid A-431 cells after chemical hypoxia. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 149: 185-194

18 Samali A, Cotter TG. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res* 1996; 223: 163-170

19 Ohkawara T, Takeda H, Nishiwaki M, Nishihira J, Asaka M. Protective effects of heat shock protein 70 induced by geranylgeranylacetone on oxidative injury in rat intestinal epithelial cells. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 312-317

20 Watanabe D, Otaka M, Mikami K, Yoneyama K, Goto T, Miura K, Ohshima S, Lin JG, Shibuya T, Segawa D, Kataoka E, Konishi N, Odashima M, Sugawara M, Watanabe S. Expression of a 72-kDa heat shock protein, and its cytoprotective function, in gastric mucosa in cirrhotic rats. *J Gastroenterol* 2004; 39: 724-733

21 Rafiee P, Shi Y, Pritchard KA Jr, Ogawa H, Eis AL, Komorowski RA, Fitzpatrick CM, Tweddell JS, Litwin SB, Mussatto K, Jaquiss RD, Baker JE. Cellular redistribution of inducible Hsp70 protein in the human and rabbit heart in response to the stress of chronic hypoxia: role of protein kinases. *J Biol Chem* 2003; 278: 43636-43644

22 Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD, Slutsky AS. Sodium arsenite induces heat shock protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis. *Crit Care Med* 1994; 22: 922-929

23 Marber MS, Mestril R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 1995; 95: 1446-1456

24 O'Connell-Rodwell CE, Shriver D, Simanovskii DM, McClure C, Cao YA, Zhang W, Bachmann MH, Beckham JT, Jansen ED, Palanker D, Schwettman HA, Contag CH. A genetic reporter of thermal stress defines physiologic zones over a defined temperature range. *FASEB J* 2004; 18: 264-271

25 Li G, Bae S, Zhang L. Effect of prenatal hypoxia on heat stress-mediated cardioprotection in adult rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1712-1719

26 Kiang JG, Bowman PD, Wu BW, Hampton N, Kiang AG, Zhao B, Juang YT, Atkins JL, Tsokos GC. Geldanamycin treatment inhibits hemorrhage-induced increases in KLF6 and iNOS expression in unresuscitated mouse organs: role of inducible HSP70. *J Appl Physiol* 2004; 97: 564-569

27 Burkart V, Liu H, Bellmann K, Wissing D, Jaattela M, Cavallo MG, Pozzilli P, Briviba K, Kolb H. Natural resistance of human beta cells toward nitric oxide is mediated by heat shock protein 70. *J Biol Chem* 2000; 275: 19521-19528

28 Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl: D12-19

29 Iordanskiy S, Zhao Y, DiMarzio P, Agostini I, Dubrovsky L, Bukrinsky M. Heat-shock protein 70 exerts opposing effects on Vpr-dependent and Vpr-independent HIV-1 replication in macrophages. *Blood* 2004; 104: 1867-1872

30 Riabowol KT, Mizzen LA, Welch WJ. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* 1988; 242: 433-436

电编 张敏 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 717-720
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

X基因——抗乙型肝炎病毒治疗的新靶点

吴洲清, 唐健熹, 信 芝, 姚 蓝, 宋家武

吴洲清, 武汉大学附属中南医院 湖北省武汉市 430072
吴洲清, 唐健熹, 信芝, 姚蓝, 宋家武, 中山大学附属第五医院消化内科 广东省珠海市 519000
广东省自然科学基金资助项目, No. 04300264
湖北省自然科学基金, No. 2004AA301C98
湖北省科技攻关项目, No. 2005AA304B05
通讯作者: 宋家武, 519000, 广东省珠海市, 中山大学附属第五医院消化内科. songjw@mail.sysu.edu.cn
电话: 0756-2528843 传真: 0756-3318499
收稿日期: 2006-11-25 接受日期: 2006-12-27

X gene: a novel target for anti-hepatitis B virus infection

Zhou-Qing Wu, Jian-Xi Tang, Zhi Xin, Lan Yao, Jia-Wu Song

Zhou-Qing Wu, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei Province, China
Zhou-Qing Wu, Jian-Xi Tang, Zhi Xin, Lan Yao, Jia-Wu Song, Department of Digestive Diseases, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen Univeristy, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 04300264, the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2004AA301C98, and the Key Science and Technology Project of Hubei Province, No. 2005AA304B05
Correspondence to: Dr. Jia-Wu Song, Department of Digestive Diseases, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China. songjw@mail.sysu.edu.cn
Received: 2006-11-25 Accepted: 2006-12-27

Abstract
X gene is one of the four genes of hepatitis B virus (HBV). HBV X (HBx) protein, which was coded by HBx gene, is a multifunctional regulator of cellular signal transduction and transcription pathways, and it is not only essential for the regulation of host immune reaction, participates all the HBV-related pathogenesis such as inflammation, carcinogenesis and other pathological process, but also play a critical role in HBV infection, replication, and gene expression. Down-regulation, knocking-out, or functional blockage of X gene can obviously inhibit the replication of HBV. In this review, we attempted to describe the current advance on the role of X gene in HBV replication and gene expression, and suggested that HBx had been a promising target for the treatment of HBV infection.

Key Words: X gene; Hepatitis B virus; Treatment; Target

Wu ZQ, Tang JX, Xin Z, Yao L, Song JW. X gene: a novel target for anti-hepatitis B virus infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):717-720

摘要
X基因是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的四个基因之一. 最近的研究表明, 他不仅参与HBV感染宿主过程, 还影响HBV病毒基因的复制和表达, 直接或/和间接通过宿主的免疫反应或其他作用, 导致HBV致病的系列病理过程, 而且在HBV生命周期中具有非常重要的作用. 降低或去除X基因转录, 或者封闭X蛋白某些功能以及使X基因表达沉默均能显著抑制病毒复制水平. 本文通过对X基因在HBV复制和基因表达中的作用以及针对X基因的干预对HBV复制和基因表达的影响的最新研究成果进行综述, 提出X基因是乙肝抗病毒治疗的一个新靶点.

关键词: X基因; 乙型肝炎病毒; 治疗; 靶点

吴洲清, 唐健熹, 信芝, 姚蓝, 宋家武. X基因——抗乙型肝炎病毒治疗的新靶点. 世界华人消化杂志 2007;15(7):717-720
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/717.asp

0 引言
X基因是一种仅存于嗜肝性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的基因, 其基因结构具有极明显的特殊性, 至今尚未在其他逆转录病毒和生物细胞中发现他的存在. 在被发现初期, 表达产物X蛋白的氨基酸序列与其他已知的生物蛋白序列有很大不同, 无法推测其功能, 而被命名为X蛋白. 同时, X基因还具有高度的保守性[2], 在嗜肝病毒的进化中, 基因序列一直保持着高度的基因同源性. 因此, 生物学家推测, X蛋白在HBV的生物学上一定具有重要的生物学意义, 从而引起了广大生物学者的关注. 越来越多的证据表明, 他在HBV的生命周期中, 直接影响病毒感染宿主、病毒复制, 调节和控制HBV其他

■背景资料
X基因是乙型肝炎病毒四个基因中的一个, 与宿主细胞生物学功能有广泛的联系和相互作用, 是乙型肝炎病毒致癌的主要基因和发病基础. 但作为一个仅存于该类病毒, 而且相当保守的基因而言, X基因一定在乙型肝炎病毒的生命周期中具有重要生物作用, 但国际上对此领域所知较少. 最近的研究表明, 特别是随着对X基因研究的重大进展, 人们发现, X基因在乙型肝炎病毒的复制和基因表达方面, 都有重大影响, X基因除在HBV致癌作用外, 在其生活周期中, 无论是病毒本身的复制还是在调节其他基因表达上, 均具有重要的生物学功能.

■**创新盘点**
本综述在仔细研究国内外有关领域的最新研究成果后, 提出了X基因是抗乙型肝炎病毒治疗的新靶点的假说.

基因功能的表达等生命过程, 同时, 他还是乙型肝炎病毒引起肝癌的直接病因[1], 并广泛参与影响宿主细胞的基因表达, 反式激活和细胞信号转导过程. 特别是最近获得的HBx在HBV生命周期中作用的重大进展[3-5]. 使越来越多的学者推测, X基因可能是抗乙型肝炎病毒感染的新靶点.

1 X基因产物在HBV生命周期中的重要作用

HBV的生命活动周期主要包括HBV感染宿主, 病毒在细胞内的复制和基因表达, 病毒的包装及脱颗粒等过程. 现有的研究表明, X基因直接影响着HBV这些生命的活动. Chen *et al*[6]和Zoulim *et al*[7]在不同的实验室, 应用基因突变技术, 以土拨鼠为实验动物, 研究HBV感染性质粒感染宿主土拨鼠的实验, 证实了X基因在HBV感染中不可或缺的作用. Chen *et al*[6]将HBV感染质粒的X基因进行突变, 去除X基因蛋白表达, 或对X基因表达的C其他突变, 使X蛋白C其他分别截除52, 31, 16或3个氨基酸, 与野生型感染质粒进行对照, 研究其感染性与X基因间关系, 结果发现, 除在C末端截除3个氨基酸的突变质粒外, 其他各种突变均不能有效感染土拨鼠. Zoulim *et al*[7]应用不同的感染性质粒, 独立进行了相似的实验, 结果显示, 所有注射野生型感染质粒的土拨鼠均被感染, 而注射X基因突变后的感染性质粒的实验组却未能检出病毒感染的相应标志物, 说明没有感染土拨鼠. 提示X蛋白具有在HBV感染宿主细胞过程中不可或缺的重要性.

X蛋白的缺失, 不仅影响到病毒感染宿主的过程, 还直接影响到HBV在细胞内的复制和基因表达功能. Zoulim *et al*[7]应用X基因突变技术, 研究去除X基因表达的质粒在转染$HepG_2$和Huh7细胞后对病毒复制的影响, 结果发现, 所有转入的质粒, 无论是野生型, 还是X基因突变后的质粒, 在转染初期即转染后24 h, 均可发现病毒的复制, 并从细胞上清中分离出病毒颗粒或与病毒相关的各种核酸, 然而, 随着观察时间的延长, 转染X基因突变质粒的细胞中, 肝炎病毒的分泌量显著减少: 转入$HepG_2$的突变质粒组的肝炎病毒DNA量在实验第9天, 只有野生型对照组的15%, 转入Huh7细胞的X基因突变质粒, 在第24天, 其细胞分泌的HBV DNA量只有野生型的60%, 进一步分析, 细胞内病毒核内核酸量亦平行减少. 提示X基因突变的质粒, 病毒的复制能力显著减弱. Bouchard *et al*[8]应用基因突变技术, 将X基因的突变质粒转入$HepG_2$中, 亦发现病毒的复制能力显著降低的同样结果. Xu *et al*[9]应用转基因方法研究X基因在活体动物体内对HBV复制的影响, 他们应用基因工程方法, 建立了能高效表达HBx蛋白野生型质粒, 同时应用点突变技术建立去除HBx蛋白表达的突变质粒, 并制备各自转基因鼠模型, 结果发现, 能表达野生型HBx蛋白的转基因鼠能高效复制HBV, 而表达去除HBx蛋白的HBV转基因鼠, 则不能形成HBV, 从而在动物整体水平上, 更进一步证实了HBx蛋白在HBV病毒复制中的重要作用.

2 X基因及其产物是HBV致病的主要原因之一

X基因不仅直接参与了HBV感染宿主、影响自身病毒基因的复制和表达, 并直接或/和间接通过宿主的免疫反应或其他作用, 导致了HBV致病的系列病理过程. X基因是HBV致癌的唯一基因. 在HBV致癌中的作用, 已获得一致的认同. 没有X基因禽类HBV病毒, 不能致癌.

Levrero *et al*[10]和Tang *et al*[11]用临床病理研究方法表明, 细胞内X蛋白的表达与HBV病毒复制标志物HBeAg显著相关. 而血清抗HBx则直接与乙型肝炎患者的疾病活动程度及病毒的复制有关. 对乙肝患者的活检标本检测与血清学检查结果比较后发现, 在6/38例免疫组化HBx染色阳性的标本中, 6例血清中应用Western blot方法检出血清HBx抗体, 组织病理学上, 均证实为慢性活动性肝炎患者, 且均为高病毒复制患者, 而无HBV感染的正常和肝癌对照组则全为阴性. HBeAg阳性的乙型肝炎患者的HBx表达阳性的细胞数量显著高于HBeAg阴性的患者. Hoare *et al*[12]通过对复制活跃的非肝硬化患者与复制不活跃的肝硬化患者的肝活检标本的比较发现, 非肝硬化组HBxAg阳性率显著高于肝硬化组且染色的细胞数亦明显多于肝硬化组, 患者血清HBeAg阳性患者的肝活检组织中HBxAg阳性细胞数量成倍增加. 结合他们以前的研究, 认为HBx表达与病毒高复制状态和保持高复制状态有关. Wang *et al*[13]对218例乙肝相关肝炎和肝硬化患者进行了HBxAg表达与肝脏病理学研究, 结果发现, HBxAg阳性细胞数量和染色程度与慢性活动性肝炎的肝病活动程度密切相关, HBxAg表达越多, 肝炎活动程度越重. 此外, 他们还发现, HBxAg表达还与肝组织中异型增生(dysplasia)密切相关[14], 并提示HBxAg的细胞核内表达, 与肝组织的异型增生关系尤其密切, 提

示HBxAg表达与可能肝癌的发生存在密切的关系.

此外, X基因的突变还可影响到HBV基因的表达, 导致血清中不能检出HBsAg和HBeAg[1,13,15-16]. Wang *et al*[13]在研究HBxAg阳性的HBV相关的肝炎和肝硬化中发现, HBxAg阳性的108例肝硬化病例中, 只有17%病例核心抗原阳性; Feitelson *et al*[15]在研究肾透析患者非甲非乙型HBsAg阴性的患者血标本时, 应用PCR扩增及基因测序技术, 结果发现, 34例患者中, 27例(82%)HBV DNA阳性, 其中23例(23/27)同时存在抗HBx或/和抗乙肝DNA聚合酶阳性, 24例发现丙肝阳性, 23例为乙、丙肝共同感染. 其后, 他们对这些HBV DNA阳性的标本, 应用不同引物, 扩增不同片段时, 发现有不少含core和X基因的片段, 不能扩增或片段较预期为短, 进一步的基因测序分析发现, 这些病毒主要存在着X基因启动子/增强子区多位点的点突变和X基因的缺失突变, 并认为HBsAg阴性与这些X基因突变有关.

3 干预HBx表达可显著降低HBV复制程度

越来越多的证据证实, X基因可直接影响HBV或其他病毒的生命活动, 因此应用各种干预技术, 降低或去除X基因转录, 将会导致HBV复制能力显著下降; 或者, 在转录后水平上, 封闭X蛋白某些功能蛋白亦能显著抑制病毒的复制水平[7,15]. Bouchard *et al*[8]应用基因突变技术, 将X基因的突变质粒转入$HepG_2$中, 使之不能有效表达X基因, 发现乙型肝炎病毒的复制能力平均降低8-10倍. 格列本脲(glibenclamide)是一种增加细胞质内钙离子浓度的化合物, 能恢复HBx缺失导致的病毒复制水平降低, 增加病毒复制时的mRNA水平; 在进一步实验中还证实, HBx去表达可显著降低HBV的DNA聚合酶的活性, 从而显著降低HBV复制水平. Melegari *et al*[17]在用$HepG_2$细胞研究中, 应用酵母双杂交技术, 发现了一种只能与野生型X蛋白相结合、而与非突变型的X蛋白无亲和力的X作用蛋白(HBx-interactiong protein, XIP), 若截除X蛋白C末端的其他的突变型, 则X蛋白将不能有效地与XIP蛋白结合. 他们将能表达XIP的质粒与含有野生型X基因的质粒共转染入$HepG_2$细胞, 发现HBV复制能力显著降低, 与无X蛋白表达的HBV质粒复制能力相当, 显著低于对照的野生型X蛋白的质粒组. Sitterlin *et al*[18]在研究中亦发现, HBV的有效复制, 有赖于X蛋白与一种UVDDB蛋白(UV damaged DNA binding protein)的正确结合. Klein *et al*[19]在研究X蛋白的细胞信号转导途径时发现, X蛋白是通过激活Src激酶来影响HBV复制的. 他们[4,8,20]更一步研究发现, Src激酶的特异抑制物格尔德霉素(Geldanamycin)或除莠霉素(herbimycin A)能够抑制Src激酶的功能, 从而能显著地抑制病毒的复制. 此外, 他们还发现, 环孢霉素衍生物, 如环孢霉素A、H及阻断细胞质钙离子信号转导途径和线粒体转运孔通透性的特异性抑制剂SDZNLM81, 均可显著影响HBV复制.

我们在前几年的研究中[18,21-22], 采用显性负突变(domninat negative mutant, DN)技术, 构建X基因的DN突变体, 在转录后水平上, 干扰X蛋白的功能, 结果表明具有显著的抑制病毒复制[21,23]和病毒基因表达[22]的作用. 最新的研究中, Carmona *et al*[23]应用RNAi技术, 以HBx基因为靶点, 在显著抑制HBx基因表达(80%-100%)的同时, 在体外及小鼠体内均显示出抑制HBV病毒复制的显著效应[11,24-25]. Shin *et al*[24]及其所在的小组, 应用类似的方法, 在体外以及实验鼠的在体实验中, 亦获得了显著的抑制病毒复制及病毒蛋白表达的效果. Hou *et al*[25]应用DNA酶(DNAzymes)技术, 以X基因为靶点, 干预病毒复制, 同样获得了显著的抑制HBV复制的效果. 这一切都从不同的侧面提示: X基因是研究抗HBV感染、复制和基因表达的重要靶点.

4 X基因或是抗HBV治疗的新靶点和新希望

以HBV S基因为靶点的抗HBV的预防策略, 开创了HBsAb免疫预防的新时代, 使HBV预防成为现实[26], 同时在保护器官移植后的供体肝免受HBV感染方面, 作出了突出的贡献. 而以P基因为靶点, 以核苷类药物为代表的治疗策略, 开创了口服治疗HBV, 迅速而显著抑制HBV复制的新纪元[27-29]. 以C基因为靶点的基因治疗, 亦获得了显著的实验室抑制病毒复制的效果[30-32]. 但迄今为止, 尚少见以X基因为治疗靶点及其在HBV相关性肝癌中的作用的报道. 我们在前期进行了这一方面的尝试, 并在抑制HBV复制和基因表达方面, 获得了初步的的效果.

由于X蛋白在HBV的感染、复制及基因表达和导致肝癌的过程中均具有重要的作用, 因此, 针对X基因的抗HBV治疗, 将有望在抑制或清除病毒感染、复制和基因表达, 以及阻断HBV所致肝癌上, 发挥重要的作用, 成为HBV治疗中的新靶点.

■应用要点

乙型肝炎病毒的治疗, 是当前医学研究的重点和难点, X基因作为乙型肝炎病毒治疗新靶点观点的提出, 必将推动X基因在HBV生物学方面和与宿主相互影响的基础研究, 特别是对于指导治疗乙型肝炎病毒感染新的治疗药物和治疗策略的研究, 具有重大的理论意义和临床应用前景.

■同行评价
本文内容有一定新意, 文章的条理性不错, 有一定学术价值.

5 参考文献

1 王小众, 陶其敏. 乙肝病毒X基因与肝癌. 世界华人消化杂志 1999; 7: 1063-1064
2 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体构建及表达. 世界华人消化杂志 2002; 10: 15-18
3 Ganem D. Virology. The X files-one step closer to closure. *Science* 2001; 294: 2299-2300
4 Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 2001; 294: 2376-2378
5 Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 1995; 376: 737-745
6 Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, Cote PJ, Gerin JL, Purcell RH, Miller RH. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol* 1993; 67: 1218-1226
7 Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection *in vivo*. *J Virol* 1994; 68: 2026-2030
8 Bouchard MJ, Puro RJ, Wang L, Schneider RJ. Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication. *J Virol* 2003; 77: 7713-7719
9 Xu Z, Yen TS, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, Ou JH. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol* 2002; 76: 2579-2584
10 Levrero M, Jean-Jean O, Balsano C, Will H, Perricaudet M. Hepatitis B virus (HBV) X gene expression in human cells and anti-HBx antibodies detection in chronic HBV infection. *Virology* 1990; 174: 299-304
11 Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci* 2006; 97: 977-983
12 Hoare J, Henkler F, Dowling JJ, Errington W, Goldin RD, Fish D, McGarvey MJ. Subcellular localisation of the X protein in HBV infected hepatocytes. *J Med Virol* 2001; 64: 419-426
13 Wang WL, London WT, Lega L, Feitelson MA. HBxAg in the liver from carrier patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14: 29-37
14 陶小红, 沈鼎明. 乙肝病毒X蛋白与肝细胞癌变. 中华肝脏病杂志 1997; 5: 115-117
15 Feitelson MA, Duan LX, Guo J, Sun B, Woo J, Steensma K, Horiike N, Blumberg BS. X region deletion variants of hepatitis B virus in surface antigen-negative infections and non-A, non-B hepatitis. *J Infect Dis* 1995; 172: 713-722
16 Paterlini P, Poussin K, Kew M, Franco D, Brechot C. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1995; 21: 313-321
17 Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication. *J Virol* 1998; 72: 1737-1743
18 Sitterlin D, Bergametti F, Tiollais P, Tennant BC, Transy C. Correct binding of viral X protein to UVDDB-p127 cellular protein is critical for efficient infection by hepatitis B viruses. *Oncogene* 2000; 19: 4427-4431
19 Klein NP, Bouchard MJ, Wang LH, Kobarg C, Schneider RJ. Src kinases involved in hepatitis B virus replication. *EMBO J* 1999; 18: 5019-5027
20 Bouchard MJ, Wang L, Schneider RJ. Activation of focal adhesion kinase by hepatitis B virus HBx protein: multiple functions in viral replication. *J Virol* 2006; 80: 4406-4414
21 宋家武, 林菊生, 梁扩寰. 乙型肝炎病毒X基因DN突变体稳定表达对乙型肝炎基因表达影响的实验研究. 中华传染病杂志 2003; 21: 251-254
22 宋家武. X基因DN突变体稳定表达抑制乙型肝炎病毒基因复制的实验研究. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 592-594
23 Carmona S, Ely A, Crowther C, Moolla N, Salazar FH, Marion PL, Ferry N, Weinberg MS, Arbuthnot P. Effective inhibition of HBV replication *in vivo* by anti-HBx short hairpin RNAs. *Mol Ther* 2006; 13: 411-421
24 Shin D, Kim SI, Kim M, Park M. Efficient inhibition of hepatitis B virus replication by small interfering RNAs targeted to the viral X gene in mice. *Virus Res* 2006; 119: 146-153
25 Hou W, Ni Q, Wo J, Li M, Liu K, Chen L, Hu Z, Liu R, Hu M. Inhibition of hepatitis B virus X gene expression by 10-23 DNAzymes. *Antiviral Res* 2006; 72: 190-196
26 吴亚平. 全球性应用乙肝疫苗预防和控制乙型肝炎. 中国流行病学杂志 1989; 10: 57-60
27 Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999; 341: 1256-1263
28 Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 61-68
29 Schalm SW, de Man RA, Heijtink RA, Niesters HG. New nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1995; 22: 52-56
30 Gonzalez-Aseguinolaza G, Crettaz J, Ochoa L, Otano I, Aldabe R, Paneda A. Gene therapy for viral hepatitis. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 1263-1278
31 von Weizsacker F, Wieland S, Kock J, Offensperger WB, Offensperger S, Moradpour D, Blum HE. Gene therapy for chronic viral hepatitis: ribozymes, antisense oligonucleotides, and dominant negative mutants. *Hepatology* 1997; 26: 251-255
32 Wands JR, Geissler M, Putlitz JZ, Blum H, von Weizsacker F, Mohr L, Yoon SK, Melegari M, Scaglioni PP. Nucleic acid-based antiviral and gene therapy of chronic hepatitis B infection. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: S354-369

电编 张敏 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 721-724
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

溃疡性结肠炎中肠道动力学研究进展

戴彦成, 唐志鹏, 李 凯, 王臻楠

戴彦成, 唐志鹏, 李凯, 王臻楠, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科 上海市 200032
上海市科学技术委员会科学研究计划资助项目, No. 06411941
通讯作者: 唐志鹏, 200032, 上海市, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科. zhipengtang@sohu.com
电话: 021-64385700-3925
收稿日期: 2006-12-12 接受日期: 2007-01-11

Research progress in intestinal motility during ulcerative colitis

Yan-Cheng Dai, Zhi-Peng Tang, Kai Li, Zhen-Nan Wang

Yan-Cheng Dai, Zhi-Peng Tang, Kai Li, Zhen-Nan Wang, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Supported by the Scientific Research Program of Shanghai Science and Technology Committee, No. 06411941
Correspondence to: Zhi-Peng Tang, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. zhipengtang@sohu.com
Received: 2006-12-12 Accepted: 2007-01-11

Abstract

Ulcerative colitis, which is fairly difficult to be treated, has an extended course and frequent recurrent rate. As a new direction in the pathogenesis of ulcerative colitis, the role of intestinal motility is being recognized and becoming a hotspot. It is reported that the changes of number and structure in interstitial cells of Cajal and colonic manometry, the abnormity of electrophsiology in the intestine and the expression of neurotransmitters, including acetylcholine (Ach), vasoactive intestinal peptide (VIP), nitric oxide (NO), and carbon monoxide (CO), are associated with the pathogenesis of ulcerative colitis. Further investigation of intestinal motility has an important significance in realizing the pathogenic mechanism of ulcerative colitis.

Key Words: Ulcerative colitis; Intestinal motility; Interstitial cells of Cajal; Intestinal electrophysiology; Neurotransmitter

Dai YC, Tang ZP, Li K, Wang ZN. Research progress in intestinal motility during ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):721-724

摘要

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)治疗难度大, 疗程长, 而且治愈后常易复发. 近年来, 肠道动力学异常与UC的发病关系得到医学界的重视, 并逐渐成为UC发病机制研究的热点. Cajal间质细胞结构改变与数量异常、肠道电生理紊乱、结肠压变化, 以及肠道相关神经递质(Ach、VIP、NO、CO等)表达异常与UC的发病有关. 相关肠道动力学异常参与UC发病的具体机制则有待于进一步深入研究.

关键词: 溃疡性结肠炎; 肠道动力学; Cajal间质细胞; 神经递质

戴彦成, 唐志鹏, 李凯, 王臻楠. 溃疡性结肠炎中肠道动力学研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(7):721-724
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/721.asp

■**背景资料**
胃肠道动力学异常与溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的发病关系得到医学界的重视, 并逐渐成为UC发病机制研究的热点. 而作为胃肠起搏的Cajal间质细胞在胃肠道电生理和动力发生以及动力障碍上具有重要作用.

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是以腹痛、腹泻、黏液脓血便、里急后重等为主要症状, 以直、结肠黏膜及黏膜下层炎症和溃疡形成为病理特点的一种慢性非特异性消化道疾病. 其病因可能与遗传, 肠道菌群, 免疫失调, 饮食过敏, 精神抑郁及焦虑等有关. 本病治疗难度大, 疗程长, 而且治愈后常易复发. 尤其是UC病程较长, 病变范围广泛, 病情反复发作者, 被认为结肠癌的癌前病变. 本病的发病率和患病率在我国有明显增加趋势[1]. 近年来, 肠道动力学异常与UC的发病关系得到医学界的重视, 并逐渐成为UC发病机制研究的热点. 本文就目前溃疡性结肠炎的肠道动力学研究进展作一综述.

1 Cajal间质细胞与溃疡性结肠炎

1.1 ICC的概念 Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是胃肠道内一种与神经系统密切相关的特殊类型的间质细胞, 其主要功能有[2-3]: (1)胃肠平滑肌的起搏细胞, 能产生胃肠道慢波

■研发前沿
UC中肠道动力学改变主要表现为患者便频、便急与腹泻、腹痛等症状. 研制中药口服pH依赖性结肠靶向制剂以最小剂量、最高疗效、最低毒副作用、最方便的途径给药, 针对UC湿热瘀结的病理特点, 先进的定位肠溶制剂使清热化湿、活血止血药物直接作用于靶器官, 既能抗炎消肿, 又能调节肠道动力, 具有良好的开发和产业化前景.

■创新盘点
先前学者对UC的研究大多侧重于异常免疫应答、炎症因子等免疫发病机制为主的层面, 而胃肠动力学则主要运用于功能性腹泻、肠易激综合征等功能性胃肠病的研究. 有鉴于此, 本文遂对溃疡性结肠炎中Cajal间质细胞、肠道电生理、结肠测压、肠道相关神经递质等肠道动力学异常变化的文献进行综述, 寻求两者之间的结合点.

(slow wave, SW), 控制胃肠道平滑肌的收缩和蠕动; (2)胃肠道非肾上腺素能, 非胆碱能抑制性神经传递的介质; (3)促进电活动扩布. 研究证实, Cajal间质细胞在胃肠道电生理和动力发生以及动力障碍上具有重要作用[4].

1.2 ICC的分类 胃肠道ICC分为4类[5]: 黏膜下ICC(sub mucosal IC-SM), 位于黏膜下环状肌层表面; 肌间ICC(my enteric IC-MY), 存在于环状肌和纵行肌之间; 肌内ICC(intramuscular IC-IM), 存在于环状肌和纵行肌束内; 深层肌丛ICC(deep muscular plexus IC-DMP)处于环状肌层内. 结肠中存在IC-SM, IC-MY及IC-IM, 而肛门内括约肌、回肠盲部括约肌仅有IC-IM.

1.3 ICC形态学 光镜下ICC的共同特征为核大, 卵圆形, 核周细胞质少, 2-5个长的突起, 使ICC的形状呈纺锤状或星状[6]. 电镜下超微结构具有5个特点: (1)胞质和突起内含丰富的线粒体、内质网和发育良好的高尔基体; (2)有膜内陷空泡(caveoli); (3)有较多中间丝, 无粗肌丝; (4)非常接近三级神经束; (5)ICCs相互之间、与平滑肌细胞间可见缝隙连接(gap junction)[7].

1.4 ICC异常与UC发病 ICC表达c-kit, 并依靠其激活酪氨酸激酶, 引发细胞内信号转导, 维持ICC表型, 因此c-kit成为胃肠道ICC的特异性标志物. 通过标记肠道神经丛ICC, 从而间接反映ICC的数目和含量, 并且c-kit信号途径对于ICC的发生、发育有重要作用. Sanders *et al*[8]研究表明: Cajal间质细胞数量减少与炎症性肠病发生相关, 但ICC数目的变化与人类胃肠道功能障碍严重程度, 以及二者间确切的比例难以确定.

近年研究表明[9]: UC和Crohn患者肠壁ICC不同程度缺失、减少或超微结构改变, 可能影响神经信号传递及平滑肌细胞(smooth mucle cell, SMC)功能, 从而引起疾病伴发的肠运动障碍. UC患者ICC的超微结构异常表现为[10]: 出现次级溶酶体, 与多个大的融合的脂滴和大簇的糖原颗粒紧密相关; 大的糖原簇含有不规则的、空的、融合的裂口和空泡, 空泡与紊乱的脂滴结合; 粗面内质网池和胞质内的小腔合并; 胞质内的致密体和中间丝有时移到外周, 可见成簇的微丝; 线粒体、滑面内质网、游离核糖体和高尔基器的结构无异常. 在ICC中没有发现细胞死亡的信号, 也未见结构修复的信号. 平滑肌细胞显示正常, 黏膜下神经丛神经末梢肿胀, 伴递质小泡减少或消失[11-12]. IC-SM周围存在大量巨噬细胞, 这些巨噬细胞产生大量的细胞因子和细胞毒物质(包括NO), 引起IC-SM的改变和损害[13].

2 肠道电生理与溃疡性结肠炎

2.1 结肠运动功能类型 结肠运动功能是通过三种不同类型的肌层收缩来实现的[14]: (1)节律性位相性收缩运动, 表现为上消化道移行性运动复合波(migrating motor complexes, MMC). 其慢波是由Cajal细胞激发. 平台期是由Ca^{2+}通过L型膜通道内流产生; 复极是由于Ca^{2+}失活和K^+通道激活造成的; (2)极速推进性收缩运动, 包括巨大移行性收缩运动(giant migrating contractions, GMCs)、逆行性巨大收缩运动(retrograde giant contractions, RGCs). 其中GMCs可在结肠的起源位置以»1 cm/s的速度不断的传播很长的距离, 可完全闭合肠腔, 推动内容物移动; (3)张力性收缩. 他是指张力的持续性增加并持续数分钟至数小时, 能使肠腔狭窄而增强相性收缩再混合和推进方面的有效性. 研究表明[14]: 健康人每日仅出现数次GMCs, 通常也仅出现在末端回肠和近端结肠. 而在炎症等病理状态下, GMCs出现频率显著增加, 还会出现在十二指肠, 并可在几分钟内传导至回肠.

2.2 ICC产生慢波的机制 结肠IC-SM、IC-MY参与其电活动的起搏, 他们不仅产生慢波, 还控制着慢波的传导. IC-IM参与介导神经冲动的传入[15]. 用膜片钳技术证明[16]: ICC通过T型Ca^{2+}通道, 产生一种小的、持续性的内向电流, 使ICC除极并逐渐接近阈值. 这种低阈值Ca^{2+}电流, 不与电压依赖性外向电流进行交换, 可产生正反馈除极效应. 同时ICC上的电压依赖性的L型Ca^{2+}通道也被激活, 产生内向电流促使ICC除极达阈值后触发SW, 通过缝隙连接传递至SMC, 激活了SMC上的L型Ca^{2+}通道, 使SMC去极化并达阈值, 产生动作电位. 一个Ca^{2+}敏感的电压依赖性K^+整流电流, 则使SW的复极并维持静息膜电位. Christensen[17]用亚甲蓝和光照选择性地损害ICC, 可导致选择性的SW活动消失. 证明SW由ICC产生并传导.

2.3 结肠电生理紊乱与UC发病 江学良 *et al*[18-19]研究表明, UC患者存在多种结肠动力紊乱, 活动期患者推进性收缩波数目增多, 推进速度加快, 从而导致排便次数增多, 出现腹泻. 而鱼腥草灌肠可松弛平滑肌, 减轻肠痉挛, 延长内容物停留并有利于其吸收, 从而缓解症状. 研究表明[14]: UC患者在体结肠慢波达6次/分, 节律较正常频

率要快; 而体外肌条实验显示: 慢波频率和振幅无改变, 这可能与实验黏膜下起搏区(IC-SM)被去除有关.

3 结、直肠压与溃疡性结肠炎

新近研究表明[20-21]: 正常人餐后压力乙状结肠>降结肠>结肠脾曲, 存在压力梯度, 通过节段性收缩混合和碾磨结肠内容物, 使其与肠黏膜充分接触, 以促进水和电解质重吸收. 而UC患者远端结肠各部位压力均较正常人明显降低, 不同部位压力无明显差别, 使节段性收缩作用减弱, 加之肠黏膜炎症, 不能充分吸收水和电解质, 导致腹泻. UC患者远端结肠感觉阈值、排便阈值、疼痛阈值均较正常人明显下降, 说明其远端结肠敏感性升高, 所以少量的肠容物刺激即产生排便反射, 导致便频、便急与腹泻、腹痛症状. 经鱼腥草灌肠治疗后上述指标明显好转.

4 肠道运动相关递质与溃疡性结肠炎

4.1 *肠道运动相关递质* 肠道平滑肌受到兴奋性和抑制性肠神经元突触后的神经支配. 兴奋性神经元的生理性神经递质是乙酰胆碱(Ach). 而抑制性运动神经元的神经递质可能是一氧化氮(NO)、血管活性肠肽(VIP)以及三磷酸腺苷(ATP)等[14]. 免疫组织化学染色和电镜研究发现, ICC与神经轴突有紧密接触, 其中包括兴奋性和抑制性神经元. 目前发现主要有NO, VIP, P物质(SP)及胆碱能神经元等. ICC与VIP神经元连接紧密, 其细胞膜上发现有VIP-1和VIP-2受体. 胃肠道NO信号也可通过ICC实现. Ordog *et al*[22]发现小鼠胃ICC免疫损伤后抑制性神经递质的作用减弱. 现已证明ICC有NO受体, ICC能合成NO, 对氮能神经递质的作用有放大效应[23]. 研究发现, 在哺乳动物ICC上存在速激肽NK1受体. Lavin *et al*[24]也发现豚鼠十二指肠和回肠ICC上存在速激肽NK1受体, 由此说明SP的作用也与ICC密切相关. 现在ICC上发现毒蕈碱M2, M3受体, 表明ICC在乙酰胆碱信号传递中起重要作用[25]. 此外, 大鼠结肠中有胱硫醚β-合成酶(CBS)和胱硫醚γ-裂解酶(CES)的表达, 可松弛结肠. 又如气性递质中的一氧化碳(CO)、硫化氢(H_2S)在胃肠动力中的作用也受到关注[26].

4.2 *UC中递质的改变* Cao *et al*[27]研究表明, UC患者乙状结肠环状肌和细胞中H_2O_2的含量较正常人高, 提示H_2O_2可减少UC患者中神经递质A(NKA)所引起的“钙池” 中Ca^{2+}的释放, 并可用来检测结肠运动障碍. Kinoshita *et al*[28]研究发现: 三硝基苯磺酸(TNBS)所诱导的结肠炎大鼠模型中, L型Ca^{2+}通道的离子流显著减少, 邻近的SMC内Ca^{2+}水平下降, 而这些可以被NF-κB抑制剂所逆转. Bossone *et al*[29]研究发现, 炎症性大鼠肠道自发性收缩运动增加, 而这与一氧化氮合酶生成减少相关. 这点也被临床研究所证实[30]. 董卫东 *et al*[31]用泻剂酚酞(果导片)所建立大鼠“泻剂结肠”模型, 症状与UC腹泻等症状相似. 实验发现, 酚酞组大鼠结肠AchE阳性神经元数目减少, 提示胆碱能神经受损, Ach合成或释放减少. Ach的释放与肠神经系统和其他神经递质密切相关, 神经肽Y和内源性NO可抑制Ach释放, 生长抑素(SOM)、降钙素基因相关肽及某些5羟色胺(5-HT)受体激动剂可以促进Ach释放.

总之, 先前学者对UC的研究大多侧重于异常免疫应答、炎症因子等免疫发病机制为主的层面, 而胃肠动力学则主要运用于功能性腹泻、肠易激综合征等功能性胃肠病的研究. 近年来, 肠道动力学异常与UC的发病关系得到医学界的重视, 并逐渐成为UC发病机制研究的热点. 通过对溃疡性结肠炎中Cajal间质细胞、肠道电生理、结肠测压、肠道相关神经递质等肠道动力学异常变化的研究, 以进一步探求UC中潜在的发病机制, 寻找调节UC肠道动力学的有效药物, 对于调整UC的临床治疗策略是有意义的.

■**应用要点**
UC中肠道动力有改变这一事实无可争议, 但具体机制尚待研究. 西药SASP, 5-SA联合中药治疗, 可抗炎、恢复肠道免疫作用、调节肠道动力, 且副作用低, 可能是其条新的治疗途径.

5 参考文献

1 江学良, 崔慧斐. 中国溃疡性结肠炎10218例的特点. 世界华人消化杂志 2001; 9: 869-873
2 Tong WD, Liu BH, Zhang LY, Zhang SB, Lei Y. Decreased interstitial cells of Cajal in the sigmoid colon of patients with slow transit constipation. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 467-473
3 Kito Y, Suzuki H. Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *J Smooth Muscle Res* 2003; 39: 163-173
4 Ward SM, Sanders KM, Hirst GD. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 112-117
5 Vannucchi MG. Receptors in interstitial cells of Cajal: identification and possible physiological roles. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 325-335
6 Torihashi S, Gerthoffer WT, Kobayashi S, Sanders KM. Identification and classification of interstitial cells in the canine proximal colon by ultrastructure and immunocytochemistry. *Histochemistry* 1994; 101: 169-183
7 Torihashi S, Fujimoto T, Trost C, Nakayama S. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol*

■**名词解释**
Cajal间质细胞(ICC): 是胃肠道内一种与神经系统密切相关的特殊类型的间质细胞, 由1893年西班牙神经解剖学家Cajal首先描述, 以后人们发现他在三个方面起作用: 胃肠道平滑肌活动的起搏, 推进电活动的传播, 调节神经递质.

■同行评价
本文所选文献较新，文献的可信度较高，内容归纳较精辟，条理清楚，是一篇较好的综述.

Chem 2002; 277: 19191-19197
8 Sanders KM, Ordog T, Ward SM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside. IV. Genetic and animal models of GI motility disorders caused by loss of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G747-756
9 Porcher C, Baldo M, Henry M, Orsoni P, Jule Y, Ward SM. Deficiency of interstitial cells of Cajal in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 118-125
10 Ozaki H, Kinoshita K, Hori M. Mechanism of the intestinal dysmotility in the inflammatory bowel diseases: possible involvement of muscularis resident macrophages. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2003; 122 Suppl: 46P-50P
11 Huizinga JD. Neural injury, repair, and adaptation in the GI tract. IV. Pathophysiology of GI motility related to interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1998; 275: G381-386
12 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
13 Rumessen JJ. Ultrastructure of interstitial cells of Cajal at the colonic submuscular border in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1996; 111: 1447-1455
14 马文M, 舒斯特. 胃肠动力学. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社 2003: 1-20
15 Yoneda S, Kadowaki M, Sugimori S, Sekiguchi F, Sunano S, Fukui H, Takaki M. Rhythmic spontaneous contractions in the rat proximal colon. *Jpn J Physiol* 2001; 51: 717-723
16 Salmhofer H, Neuhuber WL, Ruth P, Huber A, Russwurm M, Allescher HD. Pivotal role of the interstitial cells of Cajal in the nitric oxide signaling pathway of rat small intestine. Morphological evidence. *Cell Tissue Res* 2001; 305: 331-340
17 Christensen J. A commentary on the morphological identification of interstitial cells of Cajal in the gut. *J Auton Nerv Syst* 1992; 37: 75-88
18 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐风. 鱼腥草治疗初发型溃疡性结肠炎的临床研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1207-1210
19 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军, 齐风. 鱼腥草治疗溃疡性结肠炎大鼠对结肠压力的影响. 世界华人消化杂志 1999; 7: 639
20 江学良, 权启镇, 董兴成, 刘涛. 鱼腥草对溃疡性结肠炎患者直肠肛门动力学的影响. 中医药学报 2000; 28: 43-44
21 江学良, 权启镇, 王要军, 孙自勤, 王东, 齐风. 溃疡性结肠炎患者直肠容量、顺应性和肛门压力测定. 中华消化内镜杂志 2000; 17: 170-171
22 Ordog T, Takayama I, Cheung WK, Ward SM, Sanders KM. Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes* 2000; 49: 1731-1739
23 Koh SD, Kim TW, Jun JY, Glasgow NJ, Ward SM, Sanders KM. Regulation of pacemaker currents in interstitial cells of Cajal from murine small intestine by cyclic nucleotides. *J Physiol* 2000; 527 Pt 1: 149-162
24 Lavin ST, Southwell BR, Murphy R, Jenkinson KM, Furness JB. Activation of neurokinin 1 receptors on interstitial cells of Cajal of the guinea-pig small intestine by substance P. *Histochem Cell Biol* 1998; 110: 263-271
25 Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Relationship between interstitial cells of Cajal and enteric motor neurons in the murine proximal colon. *Cell Tissue Res* 2000; 302: 331-342
26 莫剑忠. 硫化氢与消化系统. 2006年胃肠动力学进展学术研讨会. 上海, 2006
27 Cao W, Vrees MD, Kirber MT, Fiocchi C, Pricolo VE. Hydrogen peroxide contributes to motor dysfunction in ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G833-843
28 Kinoshita K, Sato K, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Decrease in activity of smooth muscle L-type Ca2+ channels and its reversal by NF-kappaB inhibitors in Crohn's colitis model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G483-493
29 Bossone C, Hosseini JM, Pineiro-Carrero V, Shea-Donohue T. Alterations in spontaneous contractions *in vitro* after repeated inflammation of rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G949-957
30 刘建生, 田怡, 冯丽, 张晓红, 刘进, 袁耀宗. 溃疡性结肠炎与一氧化氮和氧自由基及Caja1间质细胞关系研究. 中华消化杂志 2006; 26: 785-786
31 董卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯. 酚酞对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响研究. 中华消化杂志 2003; 23: 723-726

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 725-728
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

血管生成拟态在消化道肿瘤中的研究进展

张婧, 高青

张婧, 高青, 重庆医科大学附属第一医院消化内科 重庆市 400016
通讯作者: 张婧, 400016, 重庆医科大学255号信箱, 重庆医科大学附属第一医院消化内科. bbnggz@163.com
电话: 023-68575846
收稿日期: 2006-12-19 接受日期: 2007-01-11

Research development of vasculogenic mimicry in digestive tumor

Jing Zhang, Qing Gao

Jing Zhang, Qing Gao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
Correspondence to: Jing Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, 225 P.O.Box, Chongqing 400016, China. bbnggz@163.com
Received: 2006-12-19 Accepted: 2007-01-11

Abstract
Vasculogenic mimicry is a new pattern of tumor microcirculation found in resent years, which is totally different from the classic tumor angiogenesis and independent of vascular endothelial cells, and it demonstrated the gene reversion and endothelial cell-associated gene expression and in highly-invasive tumor cells, as well as the formation of tube-like or retiary structure. Studies confirmed that vasculogenic mimicry has close relationship with the growth, invasion, metastases of tumors and the prognosis of patients. In this review, we conclude the characteristics, pathogenic mechanism, and significance in therapy of vasculogenic mimicry and its research development in digestive tumors.

Key Words: Digestive tumor; Neoplasmas; Vasculogenic mimicry; Angiogenesis

Zhang J, Gao Q. Research development of vasculogenic mimicry in digestive tumor. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):725-728

摘要
血管生成拟态是近几年来在发现的一种与经典的肿瘤血管生成途径完全不同、不依赖机体内皮细胞的全新肿瘤血管模式, 他描述了高度侵袭性肿瘤细胞可以发生基因逆转, 表达内皮细胞相关基因, 在三维基质中培养时形成管状结构或网络样管道的特有能力. 研究证实, 与肿瘤生长、侵袭、转移及患者预后密切相关. 本文就血管生成拟态的特点、发生机制、对肿瘤治疗的意义以及在消化道肿瘤中的研究进展等作一综述.

关键词: 消化道肿瘤; 血管生成拟态; 血管生成

张婧, 高青. 血管生成拟态在消化道肿瘤中的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(7):725-728
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/725.asp

■**背景资料**
血管生成拟态(简称VM)是近年来发现的一种不同于传统肿瘤血管生成的新的肿瘤微循环模式, 他与肿瘤的侵袭、转移以及患者的预后密切相关, 有望成为肿瘤治疗的一个全新的出发点, 为肿瘤的治疗提供一个新的方向.

0 引言
实体肿瘤的生长和转移有赖于血管生成[1]. 经典的肿瘤血管生成理论认为, 当瘤团直径大于2 mm时, 需要激活血管内皮细胞(endothelial cell, EC)构建血管获取血供, 否则肿瘤就会因为缺血缺氧发生坏死. 但在1999年美国Maniotis *et al*[2]根据对人眼葡萄膜黑色素瘤微循环的研究, 首次提出了一种与经典的肿瘤血管生成途径完全不同、不依赖机体内皮细胞的全新肿瘤微循环模式, 即血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)的概念, VM是指某些高度恶性肿瘤细胞通过自身变形模拟血管内皮细胞并与细胞外基质相互作用模仿血管壁结构形成可以运输血液(血浆, 红细胞)的管道系统, 从而重塑肿瘤微循环, 并与宿主血管相连使肿瘤获得血液供应的一种现象. 他描述了高度侵袭性肿瘤细胞可以发生基因逆转, 表达内皮细胞相关基因, 在三维基质中培养时形成管状结构或网络样管道的特有能力. VM对以内皮依赖性血管是肿瘤微循环唯一方式的传统观念提出了挑战, 同时也是对肿瘤血管生成理论的重要补充. 随后的研究证实这种营养性管道与肿瘤的生长、侵袭、转移密切相关[3-4]. 目前的研究证明在前列腺癌、肝癌、双向分化肿瘤、卵巢癌、膀胱癌

■研发前沿
目前有关血管生成拟态的研究主要集中在其发生机制以及在治疗中的作用等方面, 许多问题有待进一步解决, 例如如何特异性地区分肿瘤细胞与血管内皮细胞, 其发生机制究竟涉及哪些方面以及如何抑制其生成等, 将会成为研究的热点.

等中存在着VM现象. 本文就VM的近期研究, 特别是在消化道肿瘤中的研究进展作一综述.

1 VM的解剖、生理和生物学特点

VM是一种由细胞外基质构成的互相连接的环状通路, 肿瘤细胞存在于管壁的外侧, 这些通路有的是实性的, 有的是中空的[3]. 三维培养研究发现VM围绕在团块状肿瘤细胞的周围, 并与肿瘤血管之间存在着连接. 光学显微镜、电子显微镜以及针对内皮细胞的免疫组织化学染色等均未发现这些管道的基质中存在内皮细胞[3,5]. 目前研究认为[6]: 过碘酸雪夫反应(periodic acid-schiff, PAS)染色是确定VM的必须条件, 这是因为: (1)目前利用血管标记物(荆豆凝集素、CD31和CD34)不能观察到VM现象; (2)PAS阳性染色的管道显示与血管直接相通; (3)荆豆凝集素标记的PAS阳性管道可用来进行三维重建以显示管道的分支和环状形态, 并且主要出现于一些高侵袭性肿瘤的中心部位.

VM不仅在组织学上存在, 而且还具一定的生理功能: (1)直径>1 cm的视网膜黑色素瘤没有出现坏死, 表明肿瘤具有良好的灌注; (2)PAS阳性的管道中可见红细胞; (3)静脉注射吲哚青绿后利用共焦检眼成像系统在患者的视网膜黑色素瘤中发现了环状管道存在, 这些环状管道与组织切片PAS阳性染色的管道结构一致.

VM通常存在于一些高侵袭性的肿瘤中, 而弱侵袭性的肿瘤在相同的条件下却不能形成类似管道, 即使在培养基中加入生长因子或在低氧环境下也不能形成. 用基因芯片分析显示高侵袭性黑色素瘤细胞显示出多能胚胎样的基因表型, 表明这些肿瘤细胞可自主形成利于自身生长需要的营养管道并参与肿瘤的微循环[2]. 由于缺乏内皮细胞, VM管壁上的肿瘤细胞容易脱落入其管道中, 进入血管向远处转移[3]. 因此, VM与肿瘤的高度侵袭性和不良预后有明显的相关性. 国外研究证实, 有VM的恶性黑色素瘤转移率高于无VM的患者, 生存时间短, 且VM对预后的影响程度大于如肿瘤大小、有丝分裂活性等因素[2]; 有无VM的乳腺癌患者5 a生存率分别为65% *vs* 77%, 前者显著短于后者[7].

2 VM的发生机制

目前VM的生成机制尚不明确, 可能的原因主要是: (1)肿瘤细胞的可塑性机制; (2)基因表达的改变; (3)分子信号传递的改变; (4)微环境的影响.

2.1 肿瘤细胞的可塑性机制 肿瘤细胞的可塑性是VM形成的基础, 可解释肿瘤细胞具有模仿内皮细胞并能形成VM的倾向[8]. 高侵袭性及转移性黑色素瘤细胞可收缩或重塑浮动的胶原, 这也可能是体内VM形成的机制之一[2]. 细胞外基质(ECM)主要包括胶原、蛋白多糖、糖蛋白、糖胺多糖和弹力纤维等五大类物质, 其挛缩和重塑与许多体外实验中细胞产生的索状、管状结构有关. Maniotis *et al*[2]的体外实验表明, 高侵袭性葡萄膜黑色素瘤细胞可固定漂浮的胶原凝胶. 在贯穿肿瘤细胞的肌动蛋白中间丝转导力的参与下, 用细胞松弛素D可阻止这种固定、挛缩. 这说明, 高度恶性肿瘤细胞在缺氧的条件下可以通过自身的变形模拟内皮细胞形成管道样结构, 为其自身的生长和侵袭提供条件.

2.2 基因表达的改变 肿瘤细胞可表达内皮相关基因, 有研究发现由内皮样和成纤维细胞样细胞亚群构成的前列腺癌细胞系表达内皮相关基因(层黏连蛋白、α1β6层黏连蛋白2结合整合素等)时, 在病理分级高的肿瘤中可检测到VM生成[9]. 而TEL基因可诱导稳定的转化细胞如内皮细胞的聚集, 在NIH3T32UCLA细胞中, 当超过75%的构成单层细胞的细胞表达TEL基因时, 这些细胞就自发形成细胞索, 直径为15-25 μm的细胞索可形成管状结构. 用逆转录病毒载体将TEL和Ras基因转染内皮ES1细胞系或将TEL基因单独转导入高转化的胶质母细胞瘤细胞系EH2A, EH2B均可导致强烈的细胞聚集[10].

2.3 分子信号的传递的改变 最近研究发现, 一些分子信号的传递, 如血管内皮2钙黏素、酪氨酸蛋白激酶EphA2受体、FAK及磷酯酰肌醇-3激酶(PI3K)等可能参与VM的形成. 研究发现当血管内皮2钙黏素下调时, 生成VM的能力丧失, 这表明血管内皮2钙黏素与VM的形成有着密切的关系[11]. PI3K特异性地影响膜型基质金属蛋白酶-1(MT1-MMP)和基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的活性, 在VM网络结构的形成中具有重要作用[12-13]. 基质金属蛋白酶家族在肿瘤的侵袭和转移过程中起到重要的作用[14]. 免疫荧光分析发现高侵袭性黑色素瘤中酪氨酸激酶磷酸化活性特异性地集中于VM生成区, 利用酪氨酸蛋白激酶抑制剂或者暂时封闭磷酸化的酪氨酸激酶受体2上皮细胞激酶即可阻止细胞形成管状结构的能力[15].

2.4 微环境的影响 研究认为肿瘤的微环境对VM的生成具有一定的影响. 高侵袭性黑色素瘤细

胞上调组织因子(tissue factor, TF), 其抑制因子-1, -2 (TFPI-1, -2)是启动和调控凝血途径的关键因子, 弱侵袭性的黑色素瘤在含有TFPI-2复合物的三维基质中培养后能够转换为高侵袭性的细胞并呈现内皮细胞表型[16]. 有实验采用高侵袭性黑色素瘤细胞预处理后的含MMP-2和MT1-MMP蛋白水解产物Ln5γ2链碎片的基质培养低侵袭性黑色素瘤细胞, 结果发现肿瘤细胞发生了表型的改变, 具有形成VM的能力. 而使用MMP抑制剂或者抗体后, 不仅高侵袭性黑色素瘤形成VM的现象减少, 而且由基质诱导的低侵袭性黑色素瘤表型的转化都可以受到抑制[17]. 这说明肿瘤微环境的变化影响了VM的形成, 在肿瘤的生长, 侵袭过程中起到重要的作用.

3 VM与肿瘤治疗

VM现象的发现为高度恶性肿瘤的治疗提供了一个新的出发点. 传统的抗血管新生治疗主要针对血管内皮细胞, 而对肿瘤自身能够形成管道结构未加以考虑. 故在设计抗肿瘤血管治疗方案时, 必须同时考虑对VM的作用. VM的发现既是对传统的抗肿瘤血管新生治疗的挑战, 也是对他的补充. 以往在临床上使用抗体引导抗癌药物进入肿瘤组织的一个很大的问题就是由于内皮细胞的存在延缓了大分子药物在肿瘤组织中的蓄积过程. 这也是抗癌药物副作用较大的原因之一. 抗癌药物在存在VM现象的炎性乳腺癌中的蓄积速度较在没有VM现象的乳腺癌细胞株中要快得多, 并且浓度更大, 原因是没有了血管内皮细胞的阻挡作用. 这一研究也说明了在存在VM的肿瘤中使用抗体介导的抗癌药物的治疗将是一个有效的途径[18]. Liu *et al*[19]在研究前列腺癌中发现, 把可溶性的组织因子细胞外结构域与前列腺特异性抗原(PSMA)催化部位结合形成由PMSA介导的选择性肿瘤细胞凝血酶原抑制剂. 使用该抑制剂在小鼠前列腺癌模型中导致了选择性的具有VM现象的局部肿瘤组织坏死. 将该抑制剂与低剂量的阿霉素合用导致了明显的癌细胞破坏作用, 甚至可以根除某些肿瘤组织. 该实验结果为治疗肿瘤提供了一个新的途径. 针对肿瘤VM的治疗策略, 可考虑以下有关环节或作用靶点: (1)拮抗肿瘤细胞黏附分子表达; (2)抑制肿瘤侵袭相关蛋白酶的合成; (3)抑制细胞外基质合成与分泌以及肿瘤细胞重塑; (4)对恶性肿瘤细胞内皮细胞相关基因的靶向治疗.

4 消化道肿瘤中VM的研究

4.1 肝癌 国内研究发现[20]肝癌中存在VM现象. 根据Edomondson病理学分期Ⅰ-Ⅱ期(高度分化组)的肝癌组织中VM的发生率(2.5%)比Ⅲ-Ⅵ期(低度分化组)的肝癌组织中VM的发生率(18.64%)要低(P<0.05). 表明VM在分化程度较低的肝癌组织中较多. VM组较对照组的肝癌患者的血行转移率要高, 两组的生存期也存在明显的差别, VM组的患者平均生存期为9 mo, 远远少于不存在VM的肝癌患者(31 mo). 因而VM是恶性程度较高的肝癌细胞的一种特性, 他可以增加肿瘤细胞侵袭转移的机会, 缩短患者的生存期. 因此VM与肿瘤的侵袭、转移等生物学行为有关. VM有可能成为治疗肝癌的一个新靶点.

4.2 食管癌 恶性食管间质瘤是一种非定向分化的富含血管的间质瘤. 其血行转移率明显高于淋巴转移. 赵晖 *et al*[21]在研究恶性食管间质瘤中发现, 其中也存在VM现象. 并且VM存在的比例随着肿瘤恶性程度的增加而升高. 患者的生存率则与肿瘤中的VM现象呈反比关系. 随着VM的增加, 肿瘤组织中血管内皮生长因子(VEGF)的表达与微血管密度(VMD)也呈增加的趋势. 这说明, 随着食管间质瘤恶性程度的增加, 肿瘤细胞增殖更加迅速, 导致了肿瘤细胞的缺氧, 肿瘤细胞分泌VEGF的表达来刺激血管的生成. 但是当新生血管不能满足肿瘤组织生长的需要时, 部分肿瘤细胞就会通过自身的变形来模拟血管内皮细胞形成管道样结构并与内皮依赖性血管相通来保证肿瘤细胞氧和营养物质的供应.

4.3 胃癌 吴清 *et al*[22]进行TNP-470对胃癌细胞株SGC-7901体外VM的抑制作用的研究, 发现SGC-7901在体外三维立体培养基中可以形成管道状结构, 呈单个或多个环相连的网格状. 使用抗肿瘤血管生成药物TNP-470可以抑制VM的形成. 但这与van der Schaft *et al*[23]的实验结果存在一定的分歧, 其原因有待进一步的研究. 而丁印鲁 *et al*[24]在研究中使用含有est-1基因的反义寡核苷酸的培养基培养SGC-7901细胞株, 发现SGC-7901细胞株中的VM的形成受到了抑制. 这两个实验都说明, 人胃癌细胞具有形成VM的能力, 因此可为胃癌的抗血管治疗提供一个新的方向.

总之, VM的发现改变了人们以往对肿瘤血供的传统观念, 使人们对肿瘤细胞的一些特殊生物学性状有了新的认识, 亦为肿瘤的治疗提供了一种极具潜在应用价值的新思路、新途径.

■应用要点
血管生成拟态是对传统肿瘤血管生成理论的重要补充, 将会为高度恶性肿瘤的治疗提供一个全新的方向和靶点, 在临床治疗中起到指导作用.

■名词解释
血管生成拟态: 是指高度恶性肿瘤细胞通过自身变形模拟血管内皮细胞形成管道样结构运输血液, 从而为肿瘤细胞的生长提供氧气和营养物质供应的一种现象.

■同行评价
血管生成拟态概念较新颖, 是肿瘤血管再生理论的一大补充, 本文对血管生成拟态的生物学特点、形成机制、及在消化道肿瘤中的研究作了综述, 层次分明, 条理清楚, 有较高的参考价值.

近来, Clarijs *et al*[8]在缺乏淋巴管的葡萄膜黑色素瘤中发现了呈高表达的VEGF- C. Laakkonen *et al*[25]已在皮肤黑色素瘤细胞上定位淋巴管内皮透明质酸酶受体(lymphatic-vessel endothelial hyaluronan receptor 1, LYVE1), 可能会因此发现能模拟淋巴管的网络结构, 这为某些现象的解释提供了新的理论途径. 但仍有许多问题亟待进一步研究, 如VM分子机制中的反应级联问题, 是否涉及肿瘤细胞黏附、降解、移动的其他分子参与. 如何特异性区分肿瘤细胞、内皮细胞及其他外周细胞, 是否还有其他肿瘤存在VM现象,等等. 相信, 随着对肿瘤VM的进一步研究, 对肿瘤的发生、发展、浸润、转移等恶性生物学行为的认识和防范会进一步深入.

5 参考文献

1 王淑红, 张在人, 李萍, 赵德利. 胃癌组织中MVD和VEGF表达与影像学表现的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2004-2006

2 Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-752

3 Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry. *APMIS* 2004; 112: 508-525

4 Sun B, Zhang S, Zhao X, Zhang W, Hao X. Vasculogenic mimicry is associated with poor survival in patients with mesothelial sarcomas and alveolar rhabdomyosarcomas. *Int J Oncol* 2004; 25: 1609-1614

5 Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y, Kawamoto S, Brechbiel MW, Kasumi F, Iwanaga T, Konishi F, Terada M, Wakasugi H. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res* 2002; 62: 560-566

6 Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156: 361-381

7 Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, Watanabe I, Yamada S, Saito K, Konishi F. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 99: 821-828

8 Clarijs R, Schalkwijk L, Ruiter DJ, de Waal RM. Lack of lymphangiogenesis despite coexpression of VEGF-C and its receptor Flt-4 in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1422-1428

9 Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 411-421

10 Van Rompaey L, Holland E, Grosveld G. TEL Induces Aggregation in Transformed Cells and Induces Tube Formation in NIH3T3-UCLA Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 820-828

11 Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, Schatteman GC, Seftor RE. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8018-8023

12 Hess AR, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 2003; 63: 4757-4762

13 孙晓杰, 黄常志. PI3K-Akt信号通路与肿瘤. 世界华人消化杂志 2006; 14: 306-311

14 汪丽燕, 乔镇, 关景明. 基质金属蛋白酶及其抑制剂在消化道肿瘤中的研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2674-2678

15 Hess AR, Seftor EA, Gardner LM, Carles-Kinch K, Schneider GB, Seftor RE, Kinch MS, Hendrix MJ. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). *Cancer Res* 2001; 61: 3250-3255

16 Ruf W, Seftor EA, Petrovan RJ, Weiss RM, Gruman LM, Margaryan NV, Seftor RE, Miyagi Y, Hendrix MJ. Differential role of tissue factor pathway inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 2003; 63: 5381-5389

17 Seftor RE, Seftor EA, Kirschmann DA, Hendrix MJ. Targeting the tumor microenvironment with chemically modified tetracyclines: inhibition of laminin 5 gamma2 chain promigratory fragments and vasculogenic mimicry. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 1173-1179

18 Kobayashi H, Shirakawa K, Kawamoto S, Saga T, Sato N, Hiraga A, Watanabe I, Heike Y, Togashi K, Konishi J, Brechbiel MW, Wakasugi H. Rapid accumulation and internalization of radiolabeled herceptin in an inflammatory breast cancer xenograft with vasculogenic mimicry predicted by the contrast-enhanced dynamic MRI with the macromolecular contrast agent G6-(1B4M-Gd)(256). *Cancer Res* 2002; 62: 860-866

19 Liu C, Huang H, Donate F, Dickinson C, Santucci R, El-Sheikh A, Vessella R, Edgington TS. Prostate-specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction of tumors. *Cancer Res* 2002; 62: 5470-5475

20 Yao LQ, Feng YJ, Ding JX, Xu CJ, Jin HY, Yin LH. Primary study of vasculogenic mimicry induced by hypoxia in epithelial ovarian carcinoma. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2005; 40: 662-665

21 赵晖, 顾晓萌, 丛波, 李希波. 恶性食管间质瘤的血管生成拟态研究. 中华消化杂志 2006; 26: 405-407

22 吴清, 孙启龙, 丁印鲁, 李兆亭. TNP-470对胃癌细胞株SGC-7901体外血管生成拟态的抑制作用. 中国现代普通外科进展 2005; 8: 222-223

23 van der Schaft DW, Seftor RE, Seftor EA, Hess AR, Gruman LM, Kirschmann DA, Yokoyama Y, Griffioen AW, Hendrix MJ. Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1473-1477

24 丁印鲁, 李兆亭. est-1基因的反义寡核苷酸对胃癌体外血管生成拟态的影响. 外科理论与实践 2003; 8: 394-399

25 Laakkonen P, Porkka K, Hoffman JA, Ruoslahti E. A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nat Med* 2002; 8: 751-755

电编 张敏 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 729-732
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

幽门螺杆菌脂蛋白Lpp20的研究进展

刘志杰, 张 艳

刘志杰, 张艳, 南华大学病原生物学研究所 湖南省衡阳市 421001
通讯作者: 张艳, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学病原生物学研究所. nhzhangyan@yahoo.com.cn
电话: 0734-8282913
收稿日期: 2006-11-30 接受日期: 2006-12-28

Research progress in the lipoprotein Lpp20 of *Helicobacter pylori*

Zhi-Jie Liu, Yan Zhang

Zhi-Jie Liu, Yan Zhang, Institute of Pathobiology, Nanhua University, Hengyang 421001, Hu'nan Province, China
Correspondence to: Yan Zhang, Institute of Pathobiology, Nanhua University, Hengyang 421001, Hu'nan Province, China. nhzhangyan@yahoo.com.cn
Received: 2006-11-30 Accepted: 2006-12-28

Abstract
Lpp20 is a kind of conserved membrane-associated lipoprotein of *Helicobacter pylori*. It contains typical signal peptide of the bacterial lipoprotein. Recent studies suggested that Lpp20 had represented high immunogenicity and immunoprotection. The purpose of this article is to conclude the current knowledge about the structure, immunogenicity and immunoprotection of Lpp20.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Lipoprotein; Immunoprotection

Liu ZJ, Zhang Y. Research progress in the lipoprotein Lpp20 of *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):729-732

摘要
Lpp20是一种保守的幽门螺杆菌膜相关脂蛋白, 他含有细菌脂蛋白的典型信号肽. 近几年研究显示, Lpp20具有良好的免疫原性和免疫保护性. 本文即对Lpp20的结构及其免疫原性和免疫保护性的研究进展作一综述.

关键词: 幽门螺杆菌; 脂蛋白; 免疫保护性

刘志杰, 张艳. 幽门螺杆菌脂蛋白Lpp20的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(7):729-732
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/729.asp

0 引言
幽门螺杆菌(*H pylori*)是定植于胃黏膜表面与黏膜层之间的微需氧菌, 自1982年Warren和Marshall首次从患有慢性胃炎患者胃黏膜活检组织中发现*H pylori*以来, 大量的研究表明他是导致慢性胃炎、胃溃疡和胃癌等胃部疾病的主要致病菌[1-3], 1994年国际防癌症研究所将*H pylori*列入第一类致癌原. 已证实, 作为许多致病菌主要抗原之一的脂蛋白是一类多样的膜锚定多肽[4-7]. 他是由带有脂蛋白氨基末端信号肽的分泌性前体合成的[8]. 这种信号肽可由被球圆霉素特异性抑制的脂蛋白信号肽酶或信号肽酶Ⅱ切开, 此酶可以特异地切开在酶切位点后带有半胱氨酸残端的预分泌蛋白[9]. 通常成熟脂蛋白的一半脂质插入菌膜的脂质双层中[10]. 翻译后脂质的连接决定了脂蛋白的免疫原性, 而且在没有毒性佐剂的情况下其自身或重组的脂蛋白能够诱导较强的免疫保护性, 这使脂蛋白成为比较理想的疫苗候选抗原. 有报道称*H pylori* CCUG 17874株的HpaA也是一种脂蛋白[11]. 但目前, 对*H pylori*脂蛋白的研究几乎都基于脂蛋白Lpp20. 故本文就*H pylori*脂蛋白Lpp20的研究现状作一概述.

1 Lpp20的结构特征
Kostrzynska *et al*[12]用*H pylori*全菌免疫新西兰兔得到的抗血清采用免疫印迹法分析*H pylori*抗原, 结果发现一种分子量大约为20 kDa的主要抗原蛋白-Lpp20, 他们也首次研究了Lpp20的分子特征.

Lpp20基因长528 bp, 初始翻译产物有175个氨基酸, 分子量为19 094 Da. 开始的21个氨基酸显示了细菌脂蛋白信号肽的典型特征, 他包括一个七氨基酸残基的氨基端带电结构域和一个中心疏水性结构域. Lpp20信号肽的羧基末端区也符合前脂蛋白的相同加工位点, 即细菌

■背景资料
幽门螺杆菌(*H pylori*)已被证实是慢性胃炎和消化性溃疡的病因之一, 且与胃腺癌、胃黏膜相关性淋巴样组织(MALT)恶性淋巴瘤的发生密切相关, 已被IARC/WHO定为Ⅰ类致癌原. *H pylori*的Lpp20蛋白是定位于细菌外膜上的一种高度保守的脂蛋白, 有研究表明, Lpp20具有良好的免疫原性和免疫保护性, 故Lpp20在*H pylori*感染的诊断和疫苗开发中有重要价值.

■研发前沿
近年来, 国内外对Lpp20的研究主要集中于对其免疫原性和免疫保护性的研究, 但此蛋白在致病中所起作用尚未了解.

脂蛋白的一致序列Leu-X-Y-Cys, 表明成熟脂蛋白的第一个残基是一个脂化半胱氨酸, 也是此蛋白中唯一的半胱氨酸. 但*H pylori*的Lpp20中的亮氨酸被异亮氨酸所替代, 这一稀有现象的原因尚不清楚. 前脂蛋白的相同加工位点的存在, 及用SDS-PAGE和分子量光谱测定法测得的*H pylori* Lpp20的大小和由核酸序列推导所得成熟蛋白的分子量的差异都说明了该蛋白存在翻译后的脂化修饰, 也就是经过脂蛋白信号肽酶Ⅱ的加工. 为了证明这一点他们用抑制信号肽酶Ⅱ的球圆霉素处理含有表达Lpp20质粒的大肠杆菌后显示了有未加工蛋白的积聚. 但这一过程在*H pylori*中却未能得到证实, 他们分析可能是由于球圆霉素不能有效的穿透*H pylori*细胞膜, 或信号肽酶Ⅱ在*H pylori*中含量很高, 也可能他本身对球圆霉素有抗性. 他们推断其成熟蛋白有154个氨基酸组成, 分子量为16 865 Da, 含有35.1%的疏水氨基酸, 并用Kyte-Doolittle[13]疏水索引分析其疏水性得分为-6.04. 另外, Lpp20蛋白有31.8%的极性, 14.3%的酸性和18.8%的基本氨基酸残基. 用Rost和Sander的PHD运算法则, 测得成熟脂蛋白包含50.6%的螺旋结构, 17.5%的线性结构和31%的环状结构[14].

国内, 张荣光 *et al*[15]利用生物信息学分析了*H pylori*郑州分离株MEL-*H pylori* 27 Lpp20的主要化学特征: 其也由175个氨基酸组成, 分子量为19 122 Da, 等电点为9.95, pH7.0时电荷为9.035, 280 nm摩尔消光系数为12210, 280 nm吸光度为0.639. 研究显示, Lpp20在*H pylori*和表达重组Lpp20的大肠杆菌中都表达于菌体表面[16]. 然而Kostrzynska *et al*[12]却未能证实这一点, 可能是由于*H pylori*表面的Lpp20和他们用来免疫兔产生抗Lpp20多抗兔血清的SDS变性蛋白构象不同的原因. *H pylori*在体外培养时, Lpp20还存在于释放到胞外的外膜小泡中[16], Cao *et al*[17]也证实肉汤培养*H pylori*时Lpp20可被释放到胞外. 有研究显示, 当*H pylori*在人胃部生存时, 同样有外膜小泡释放于胞外, 但Lpp20是否如同体外实验那样存在于外膜小泡中而释放到胞外尚未明确阐明[18]. 为了研究Lpp20对*H pylori*生命力的影响, 通过对*H pylori* Lpp20的同源突变, 在无Lpp20表达的同源突变株中, *H pylori*的表型特征、正常细胞形态和生长率并未受到影响, 这表明Lpp20对*H pylori*的生存能力并不起重要作用[12].

2 Lpp20的免疫原性及免疫保护性

用抗*H pylori*兔血清识别*H pylori*全菌蛋白时, Lpp20作为主要抗原之一显示了其良好的免疫原性[12]. Cao *et al*[17]用针对*H pylori*肉汤培养基上清的抗血清筛查*H pylori*基因组文库时, Lpp20就是被识别的六种抗原之一. Keenan *et al*[16]收集肉汤培养基中生长的*H pylori* 60190表面释放的外膜小泡和黏膜佐剂一起口服免疫小鼠后, 发现其能够诱导出特异性的血清IgG抗体的产生, 对*H pylori* SS1株的攻击能够起到100%的保护作用. 免疫印迹分析在外膜小泡中其免疫保护作用的成分是一种分子质量为18 kDa的蛋白, 进一步用单克隆抗体分析后, 这种具有免疫优势的抗原蛋白就是Lpp20. 将能产生针对Lpp20的IgG1杂交瘤细胞回输入已感染*H pylori*小鼠的体内后发现能够显著减少细菌感染数量, 证实Lpp20确实是一理想疫苗候选抗原, 同时也揭示了血清IgG1在*H pylori*感染中的重要保护作用. 随后, Keenan *et al*[19]又将外膜小泡经鼻内分组免疫小鼠, 均可产生抗Lpp20血清IgG抗体. 用*H pylori*攻击后显示, 细菌减少的数量与血清和胃灌洗液的IgG数量相关. 用产生这种抗体的杂交瘤细胞被动免疫小鼠后发现胃灌洗液中的IgG可以起到保护作用, 进一步研究发现, *H pylori*感染中血清抗体可以渗出到胃部, 并且不影响其抗原结合能力. 说明血清抗体在*H pylori*免疫保护机制中的重要作用. 他们还发现, 当*H pylori*暴露于抗Lpp20 IgG抗体时小鼠胃黏膜有正常的S形*H pylori*聚集现象, 然后把*H pylori*置于从杂交瘤小鼠收集到的血清中孵育, 随着抗Lpp20 IgG1浓度的增加, 也可使细菌的凝集作用增加. 在体内, 可能通过这种机制从而阻碍其正常的迁移能力, 这就使得他们易于通过胃蠕动而被清除. 计时免疫标记实验显示随着时间的延长抗Lpp20单抗和*H pylori*的结合也随之减少, 提示要使机体对细菌的免疫清除大于免疫逃避就要维持特异性抗体的有效浓度. Keenan *et al*[20]又以霍乱毒素为佐剂的重组Lpp20和*H pylori*外膜小泡经鼻免疫小鼠和豚鼠. 结果表明, 这两种疫苗都可以引起小鼠的系统和局部IgG产生, 并且可以显著减少感染细菌的数量. 然而对于豚鼠, 只有外膜小泡可以引起免疫反应, 但这些抗体未能起到免疫保护作用. 这一研究说明, 对于*H pylori*疫苗的研究不仅抗原的选择很关键, 而且疫苗形式也很重要. 这些研究均表明, Lpp20是*H pylori*的免疫优势抗原, 以

佐剂和Lpp20共同免疫动物可以起到免疫保护作用, 并发现IgG在此免疫保护反应中起重要作用. 然而在小鼠和豚鼠实验中的免疫反应差异, 表明在不同动物中起免疫保护作用的疫苗形式也不同. 至于在人体中Lpp20能否起到免疫保护作用尚有待研究.

3 Lpp20与致病性关系

经研究一些脂蛋白在细菌致病性方面起着重要作用[21-22]. Opazo *et al*[23]在研究*H pylori*抗原与不同临床表现*H pylori*感染患者的关系时, 发现多在非溃疡性消化不良患者血清中检测到抗Lpp20抗体, 这也是在人体中检测到抗Lpp20抗体的首次报道. 而*H pylori* Lpp20与胃部疾病的具体关系尚不清楚. 据Bakos *et al*[24]研究推测, 通过菌体Lpp20和皮肤抗原成分的交叉反应, 抗*H pylori* Lpp20 IgG和部分IgA抗体可能会引起机体自身免疫反应, 在慢性荨麻疹的致病性中起一定作用, 但其致病的具体机制尚有待进一步研究.

由于Lpp20的免疫原性好, 特异性强, 有文献报道从人体中检测到的*H pylori* Lpp20蛋白与*H pylori*感染、胃癌以及胃癌高发人群都具有密切相关性[25-26]. 最近, Li *et al*[27]又成功制备了针对Lpp20的单克隆抗体, 因此*H pylori* Lpp20可能会成为一种高效的免疫诊断抗原[28]. 当然其最重要的意义就是在研究疫苗方面的重要作用. Lpp20在所有*H pylori*菌株中均表达[12,17,29-31], 且免疫筛查*H pylori*相关细菌均无交叉反应[12,29-30], 再加上如前所述Lpp20有较强的免疫原性及免疫保护性, 使其成为较理想的疫苗候选抗原. 总之, 对*H pylori* Lpp20的致病性研究, 及其在疾病诊断和疫苗研发中的应用研究都有很重要的价值.

4 参考文献

1 郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周. 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1766-1768

2 卢启明, 曹萍, 姜瑞, 张岫兰, 张丽萍, 李淑兰, 陈翔, 石丽清, 董桂梅, 周彦萍, 薛群基. 胃癌高发区幽门螺杆菌的家庭感染. 世界华人消化杂志 2005; 13: 118-120

3 霍晓辉, 朱振龙, 储建坤, 王志峰, 李超, 张丽静, 马金城, 于君. 幽门螺杆菌感染与胃癌前病变胃内分布的特点. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1992-1994

4 Green BA, Quinn-Dey T, Zlotnick GW. Biologic activities of antibody to a peptidoglycan-associated lipoprotein of Haemophilus influenzae against multiple clinical isolates of H. influenzae type b. *Infect Immun* 1987; 55: 2878-2883

5 Anderson BE, Baumstark BR, Bellini WJ. Expression of the gene encoding the 17-kilodalton antigen from Rickettsia rickettsii: transcription and posttranslational modification. *J Bacteriol* 1988; 170: 4493-4500

6 Ma Y, Weis JJ. Borrelia burgdorferi outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties. *Infect Immun* 1993; 61: 3843-3853

7 Erdile LF, Brandt MA, Warakomski DJ, Westrack GJ, Sadziene A, Barbour AG, Mays JP. Role of attached lipid in immunogenicity of Borrelia burgdorferi OspA. *Infect Immun* 1993; 61: 81-90

8 Wu HC, Tokunaga M. Biogenesis of lipoproteins in bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986; 125: 127-157

9 Dev IK, Harvey RJ, Ray PH. Inhibition of prolipoprotein signal peptidase by globomycin. *J Biol Chem* 1985; 260: 5891-5894

10 Hayashi S, Wu HC. Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 1990; 22: 451-471

11 O'Toole PW, Janzon L, Doig P, Huang J, Kostrzynska M, Trust TJ. The putative neuraminyllactose-binding hemagglutinin HpaA of *Helicobacter pylori* CCUG 17874 is a lipoprotein. *J Bacteriol* 1995; 177: 6049-6057

12 Kostrzynska M, O'Toole PW, Taylor DE, Trust TJ. Molecular characterization of a conserved 20-kilodalton membrane-associated lipoprotein antigen of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 1994; 176: 5938-5948

13 Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982; 157: 105-132

14 Rost B, Sander C. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* 1993; 232: 584-599

15 张荣光, 段广才, 范清堂. 利用生物信息学分析幽门螺杆菌Lpp20蛋白的化学和免疫学分子特征. 河南预防医学杂志 2003; 14: 193-195

16 Keenan J, Oliaro J, Domigan N, Potter H, Aitken G, Allardyce R, Roake J. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immun* 2000; 68: 3337-3343

17 Cao P, McClain MS, Forsyth MH, Cover TL. Extracellular release of antigenic proteins by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1998; 66: 2984-2986

18 Keenan J, Day T, Neal S, Cook B, Perez-Perez G, Allardyce R, Bagshaw P. A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 182: 259-264

19 Keenan J, Neal S, Allardyce R, Roake J. Serum-derived IgG1-mediated immune exclusion as a mechanism of protection against *H. pylori* infection. *Vaccine* 2002; 20: 2981-2988

20 Keenan JI, Rijpkema SG, Durrani Z, Roake JA. Differences in immunogenicity and protection in mice and guinea pigs following intranasal immunization with *Helicobacter pylori* outer membrane antigens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 36: 199-205

21 Chanyangam M, Smith AL, Moseley SL, Kuehn M, Jenny P. Contribution of a 28-kilodalton membrane protein to the virulence of Haemophilus influenzae. *Infect Immun* 1991; 59: 600-608

22 Ma Y, Weis JJ. Borrelia burgdorferi outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties.

■应用要点
Lpp20有望成为可应用于临床的一种有效的疫苗抗原和*H pylori*感染的诊断抗原.

■名词解释
外膜小泡: 细菌在生长时由于外膜生长速度超过下层的肽聚糖层, 部分外膜形成小泡从菌体脱落而成.

■同行评价
本文就*H pylori* Lpp蛋白的有关研究作了综述, 内容有一定的新颖性和可读性, 是一篇较好的综述.

Infect Immun 1993; 61: 3843-3853
23 Opazo P, Muller I, Rollan A, Valenzuela P, Yudelevich A, Garcia-de la Guarda R, Urra S, Venegas A. Serological response to *Helicobacter pylori* recombinant antigens in Chilean infected patients with duodenal ulcer, non-ulcer dyspepsia and gastric cancer. *APMIS* 1999; 107: 1069-1078
24 Bakos N, Fekete B, Prohaszka Z, Fust G, Kalabay L. High prevalence of IgG and IgA antibodies to 19-kDa *Helicobacter pylori*-associated lipoprotein in chronic urticaria. *Allergy* 2003; 58: 663-667
25 Shiesh SC, Sheu BS, Yang HB, Tsao HJ, Lin XZ. Serologic response to lower-molecular-weight proteins of *H. pylori* is related to clinical outcome of *H. pylori* infection in Taiwan. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 781-788
26 Konturek PC, Konturek SJ, Starzyska T, Marlicz K, Bielanski W, Pierzchalski P, Karczewska E, Hartwich A, Rembiasz K, Lawniczak M, Ziemniak W, Hahn EC. *Helicobacter pylori*-gastrin link in MALT lymphoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1311-1318
27 Li Y, Ning YS, Hong YH, Liu YC, Luo J, Long M, Dong WQ, Li M. Preparation and identification of monoclonal antibodies against *Helicobacter pylori*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2006; 26: 425-427
28 宁云山, 李妍, 龙敏, 董文其, 李明. 幽门螺杆菌5种候选疫苗抗原基因的克隆、表达及抗原性的鉴定. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2605-2609
29 Drouet EB, Denoyel GA, Boude M, Wallano E, Andujar M, de Montclos HP. Characterization of an immunoreactive species-specific 19-kilodalton outer membrane protein from *Helicobacter pylori* by using a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1620-1624
30 Keenan JI, Allardyce RA, Bagshaw PF. Dual silver staining to characterise Helicobacter spp. outer membrane components. *J Immunol Methods* 1997; 209: 17-24
31 Muller I, Medina-Selby A, Palacios JL, Martinez P, Opazo P, Bruce E, Mancilla M, Valenzuela P, Yudelevich A, Venegas A. Cloning and comparison of ten gene sequences of a Chilean *H. pylori* strain with other *H. pylori* strains revealed higher variability for VacA and CagA virulence factors. *Biol Res* 2002; 35: 67-84

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

欢迎订阅 2007 年《世界华人消化杂志》

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

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊.

《世界华人消化杂志》2007年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079，国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元. 欢迎广大消化科医务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, 世界胃肠病学杂志社. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 733-736
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

健脾疏肝方对反流性食管炎大鼠模型食管组织病理及PCNA的影响

李春婷, 沈水杰, 杜 斌, 滑永志, 蒋凤荣, 印 勇

李春婷, 沈水杰, 杜斌, 滑永志, 蒋凤荣, 印勇, 南京中医药大学中医内科教研室 江苏省南京市 210029
江苏省高校自然科学研究计划项目, No. 03KJB360100
通讯作者: 李春婷, 210029, 江苏省南京市汉中路282号61信箱, 南京中医药大学中医内科教研室. xt010503@sina.com
电话: 025-85811644
收稿日期: 2006-12-11 接受日期: 2007-01-05

Effect of liver-soothing and spleen-strengthening decoction on esophageal pathology and proliferating cell nuclear antigen expression in rats with reflux esophagitis

Chun-Ting Li, Shui-Jie Shen, Bin Du, Yong-Zhi Hua, Feng-Rong Jiang, Yong Yin

Chun-Ting Li, Shui-Jie Shen, Bin Du, Yong-Zhi Hua, Feng-Rong Jiang, Yong Yin, Department of Traditional Chinese Internal Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Supported by the Natural Science Research Foundation of Jiangsu Provincial Higher Education, No. 03KJB360100
Correspondence to: Chun-Ting Li, Department of Traditional Chinese Internal Medicine, 282 Hanzhong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. xt010503@sina.com
Received: 2006-12-11 Accepted: 2007-01-05

Abstract

AIM: To investigate the effect of liver-soothing and spleen-strengthening (LSSS) decoction on esophageal pathology and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in rats with reflux esophagitis.

METHODS: Partial pylori ligation plus cardiomyotomy was used to establish the rat models of reflux esophagitis. A total of 240 rats were divided into 7 groups, including normal group, model group, placebo group, positive control group, and Chinese medicine groups (high-, moderate-, and low-dose group). After treatment with the corresponding methods, HE staining was performed to observe the pathological changes of esophageal tissues, while the expression of PCNA was measured by immunohistochemistry.

RESULTS: LSSS decoction remarkably alleviated the esophageal pathological changes, the pathological score was significantly different between high-dose LSSS decoction group and model group. As compared with that in model group, the expression of PCNA was significantly decreased in LSSS decoction groups (low dose: 284.83 ± 30.49 *vs* 330.00 ± 35.35, $P < 0.05$; moderate dose: 239.67 ± 28.84 *vs* 330.00 ± 35.35, $P < 0.01$; high dose: 203.00 ± 25.29 *vs* 330.00 ± 35.35, $P < 0.01$). There was no marked difference between LSSS decoction groups and positive control group.

CONCLUSION: LSSS decoction may restrain the high expression of PCNA while alleviate the symptoms and esophageal inflammation of reflux esophagitis.

Key Words: Liver-soothing and spleen-strengthening decoction; Reflux esophagitis; Proliferating cell nuclear antigen

Li CT, Shen SJ, Du B, Hua YZ, Jiang FR, Yin Y. Effect of liver-soothing and spleen-strengthening decoction on esophageal pathology and proliferating cell nuclear antigen expression in rats with reflux esophagitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):733-736

摘要

目的: 观察健脾疏肝方对反流性食管炎大鼠模型食管组织病理及增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响.

方法: 采用“不全幽门结扎+贲门肌切开术”制作动物模型, 240只大鼠分为正常组、模型组、安慰剂(谷维素)组、阳性对照组(加斯清)、治疗高、中、低剂量组. 给予相应处理后, 取食管组织行HE染色, 光镜下观察组织病理学变化, 用免疫组化的方法测PCNA表达.

结果: 健脾疏肝方能显著改变反流性食管炎

■背景资料
反流性食管炎(RE)是指因食管胃连接部防反流机构障碍而导致胃或肠内容物反流入食管, 从而引起食管炎症, 临床上多表现为胸骨后灼热、疼痛, 反酸, 嗳气, 恶心呕吐等症状, 属中医“吐酸”、“噎膈”、“胃脘痛”等范畴, 目前西医治疗尚无明显进展, 仍局限于制酸药、动力药和黏膜保护剂等, 如奥美拉唑、红霉素、思密达等. 而传统中医药在改善症状, 调节食管下段括约肌功能, 抑制反流, 促进食管受损黏膜修复等方面均显示了良好的疗效.

■**创新盘点**
在动物实验研究中, 根据国内对反流性食管炎的动物模式的文献报道, 本研究采用了手术方法(贲门肌切开+幽门半结扎)造模并加以改进, 该方法具有成功率高、动物死亡率低等特点.

的病理变化, 健脾疏肝方高剂量组食道组织病理变化明显减轻; 健脾疏肝方能显著抑制PCNA表达的升高, 与模型组相比PCNA的表达显著降低(小剂量: 284.83±30.49 *vs* 330.00±35.35, $P<0.05$; 中剂量: 239.67±28.84 *vs* 330.00±35.35, $P<0.01$; 高剂量: 203.00±25.29 *vs* 330.00±35.35, $P<0.01$), 其疗效与加斯清相当.

结论: 健脾疏肝方有助于降低PCNA的高表达, 并有抗胃食管反流, 减轻食管炎症的疗效.

关键词: 健脾疏肝方; 反流性食管炎; 增殖细胞核抗原

李春婷, 沈水杰, 杜斌, 滑永志, 蒋凤荣, 印勇. 健脾疏肝方对反流性食管炎大鼠模型食管组织病理及PCNA的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(7):733-736
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/733.asp

0 引言

反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)是指由于胃与食管交界处抗反流屏障功能障碍而导致的胃或十二指肠内容物反流入食管, 引起食管组织黏膜损害[1]. 本病属于胃食管反流病(gastroesophagesl reflux diseases, GERD)范畴[2], 具有慢性复发倾向, 严重影响人民的身体健康和生活质量, 日益受到中外医学者的重视. 目前西药治疗存在维持治疗时间长, 副作用较大[3], 患者经济负担较重以及停药后易复发的不足. 我们在临床实践中, 依据反流性食管炎脾虚肝郁, 胃气上逆的常见中医病机[4], 拟定健脾疏肝为基本治则, 并组成方剂, 取得较为理想的临床疗效, 为进一步阐明其作用机制, 我们观察了该方对反流性食管炎大鼠模型食管组织病理及增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响, 报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♀SD大鼠240只, 体质量200-250 g, 由南京中医药大学动物中心提供. 健脾疏肝方方剂由半夏、厚朴、醋柴胡、白芍、苏叶、生苡仁、茯苓等组成, 南京中医药大学动物实验中心制备, 水煎后浓缩配制, 配成低210 g/L、中430 g/L、高850 g/L的浓度; 加斯清: 5 mg/片, 用蒸馏水配成浓度为0.11 g/L[5], 日本制药株式会社生产, 批号: 530202; 谷维素: 10 mg/片, 用蒸馏水配成浓度为0.23 g/L, 浙江昂利康制药有限公司, 批号: 5T1D09. 谷维素及加斯清组药物浓度均为人等效剂量的2倍, 中药组低、中、高剂量组为人等效剂量的2倍、4倍、8倍[6]. PCNA试剂: 兔抗鼠PCNA多克隆抗体、SABC试剂盒、DAB显色试剂盒为武汉博士德生物有限公司提供.

表 1 RE病理学评分标准

病变	10分	8分	6分	4分	2分	0分
黏膜层血管增生充血	–	+	+	+	+	+
鳞状上皮增生	–	–	+	+	+	+
黏膜固有层乳头延伸	–	–	+	+	+	+
黏膜层炎细胞浸润	–	+	+	+	+	+
上皮细胞层炎细胞浸润	–	–	–	–	+	+
黏膜糜烂	–	–	–	–	+	+
黏膜溃疡	–	–	–	–	–	+

+++~++++均记为6分.

1.2 方法

1.2.1 造模 参照于强 *et al*[7]方法制作并改进, 造模前大鼠适应环境4-7 d, 术前禁食24 h, 按30 mg/kg, ip 10 g/L戊巴比妥钠溶液进行麻醉. 将大鼠固定于鼠板, 取上腹部正中切开进腹, 分离贲门及胃, 缝合血管, 纵行切开贲门肌0.5 cm至黏膜层, 而后分离幽门, 半结扎幽门. 关腹前腹腔注入生理盐水1 mL及庆大霉素2万IU, 术后禁食24 h, 不禁水. 观察大鼠饮食、粪便及活动情况, 每周测定体质量, 术后3 wk即造模完成.

1.2.2 分组给药 预留12只作为正常组, 其余大鼠按照以上方法进行造模, 造模完成后将大鼠随机分为: 模型组、安慰剂组、阳性对照组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组. 正常组不治疗, 其他模型各组分别给予NS、谷维素、加斯清、中药高剂量、中药中剂量、中药低剂量灌胃, 10 mL/kg, 每天一次, 连续给药3 wk.

1.2.3 取食管组织 末次给药24 h后, 断髓处死大鼠, 取下食管组织, 纵行剖开, 作大体形态观察, 按反流性食管炎诊断及治疗方案(试行)(1999年烟台标准)标准进行分级[8]. 观察完后将标本放入40 g/L甲醛固定后常规HE染色, 光镜下观察组织病理学变化(表1).

1.2.4 PCNA免疫方法及主要实验步骤 采用ABC法[9], 主要步骤如下: (1)石蜡切片于二甲苯及阶梯浓度酒精中脱蜡至水; (2)过氧化氢溶液室温孵育10 min封闭内源性过氧化物酶; (3)加入血清白蛋白置湿盒内室温孵育20 min; (4)切片加第一抗体PCNA, 置湿盒内于4℃冰箱内孵育, 过夜; (5)加入第二抗体, 湿盒内室温孵育45 min; (6)加入SABC溶液, 湿盒内室温孵育20 min; (7)DAB

表 2 食道组织病理积分比较(只)

分组	10分	8分	6分	4分	2分	0分	合计(分)
正常	12	0	0	0	0	0	120
模型[a]	0	0	0	8	2	2	36
安慰剂组	0	0	0	6	4	2	32
阳性对照	6	0	2	2	2	0	84
小剂量组	2	2	0	4	2	0	56
中剂量组	4	2	2	4	0	0	84
高剂量组[c]	8	0	2	2	0	0	100

[a]$P<0.05$ *vs* 正常组; [c]$P<0.05$ *vs* 模型组, 西药对照组与中剂量、大剂量组比较无显著性差异.

显色剂显色; (8)阶梯浓度酒精脱水, 二甲苯透明, 树胶封片, 观察结果. PCNA: 阳性着色定位于细胞核, 细胞核被染成棕黄色或褐色, 呈颗粒型或弥漫型. 食管上皮组织均出现不同程度的细胞PCNA免疫组化阳性反应, 免疫阳性细胞主要位于基底细胞层的第1-2层和乳突区基底细胞. 计算方法: 每个高倍视野计算阳性细胞, 然后计算出单位面积的阳性细胞数, 任选12个视野.

统计学处理 应用SPSS12.0统计软件, 统计方法采用单因素方差分析, 进行组间的两两比较.

2 结果

2.1 大体标本观察 从反流性食管炎造模后取材病理观察, 对照1999-12中华医学会消化内镜学会颁布的RE病理诊断标准[9]. 证实反流性食管炎造模成功. 模型组主要表现为食管黏膜发红、糜烂或溃疡; 药物组与模型组有明显的病理学改变.

2.2 HE染色 正常大鼠黏膜除上皮细胞层内间或存在少量炎细胞外, 无其他异常表现. 安慰剂组: 与模型组相似. 模型组: 大鼠黏膜上皮细胞层内出现炎性细胞浸润, 鳞状上皮增生, 黏膜固有层乳头延伸, 成纤维细胞增多, 严重者出现黏膜糜烂、溃疡形成. 阳性对照组: 大鼠黏膜上皮细胞层内出现少量的炎性细胞浸润, 偶见黏膜糜烂. 中药低剂量组: 大鼠黏膜上皮细胞层内出现淋巴细胞及中性白细胞浸润, 鳞状上皮增生, 黏膜固有层乳头延伸, 并出现黏膜糜烂、溃疡形成. 中药中剂量组: 大鼠黏膜上皮细胞层内出现少量的淋巴细胞及中性白细胞浸润, 并出现黏膜糜烂、溃疡形成. 中药高剂量组: 大鼠黏膜上皮细胞层内散在的淋巴细胞及中性白细胞浸润, 鳞状上皮轻度增生(食道组织病理积分比较如表2).

表 3 各组食管组织PCNA的表达(mean ± SD, n = 12)

分组	PCNA的阳性细胞数(个)
正常组	187.50 ± 21.91[d]
模型组	330.00 ± 35.35[b]
安慰剂组	299.33 ± 23.79[b]
阳性对照组	234.00 ± 39.24[ad]
小剂量组	284.83 ± 30.49[bc]
中剂量组	239.67 ± 28.84[bd]
高剂量组	203.00 ± 25.29[d]

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

2.3 免疫组化结果 PCNA在安慰剂组、阳性对照组、小剂量组、中剂量组的表达与正常组差异显著, 正常组、阳性对照组、中剂量组及小剂量组中PCNA的表达显著低于模型组(表3).

3 讨论

PCNA是目前反应组织细胞增殖功能的指标之一, 其过度表达是细胞增殖的重要标志[10]. PCNA是存在于细胞核内DNA聚合酶的一种附属蛋白质, 对细胞G1期向S期过渡起重要的调节作用[11]处于增殖状态的细胞, 其PCNA的表达明显增强. 这表明PCNA与细胞增殖状态有关. 叶萍 *et al*[12]研究表明正常食管黏膜组织中PCNA阳性反应很弱, 仅占8%(<10%), 认为是一种不活跃的基因表达形式. 食管黏膜在刺激物的作用下, 增生细胞不断分化、增殖并随着炎症的加重, 表达率也逐渐地增加. 在细胞的异常增生或不典型增生和肠化生中, PCNA发挥着重要的作用. 因此, PCNA的阳性表达在反流性食管炎中具有重要的作用, PCNA的临床随访监测将对胃

■**应用要点**

健脾疏肝方有助于降低PCNA的高表达, 并有抗胃食管反流, 减轻食管炎症的疗效. 疗效与阳性对照加斯清相当, 都具有明显减轻食管炎症, 降低PCNA的高表达, 抑制细胞的异常增生或不典型增生和肠化的作用, 中医药为治疗和预防反流性食管炎提供了确实可靠的治疗方法, 必将在胃食管反流病的治疗中发挥日趋重要的作用.

■同行评价
本文研究了健脾疏肝方对反流性食管炎大鼠模型食管组织病理及PCNA的影响, 立题有依据, 实验方法先进、规范、科学, 难度较大, 结果可靠, 文章简洁, 论点明确, 条理性强.

食管反流病(GERD)患者的疗效和预后估价具有重要意义[12-13]. 根据临床表现RE多属于中医学“胸痛”、“反胃”、“嘈杂”、“泛酸”、“胃痛”、“噎膈”等范畴[14]. 在病因病机方面, 多数学者认为本病是由于各种因素造成气机升降失常, 胃气上逆所致. 临床辩证分型有肝胃不和、肝胃郁热、痰气交阻、脾胃虚寒、脾胃阴虚等, 学者们更加注重其中肝胃不和、肝胃郁热、脾胃虚寒3型[15]. 在治疗上强调疏肝理气, 和胃降逆, 清热和中. 我们在长期的临床实践中认识到反流性食管炎的中医病机主要为肝胆失于疏泄, 脾胃升降失调, 胃气上逆所致; 因此, 我们根据健脾疏肝的治疗原则组方, 方中柴胡疏肝理气, 配伍白芍、苏叶和中降逆、行气宽中, 生薏仁、茯苓健脾益气, 培补中焦; 半夏和胃降逆; 厚朴燥湿消痰, 下气除满; 诸药协同使用, 使气机得以平降和顺, 脾胃功能得以恢复, 症状消除. 现代药理研究表明, 厚朴主要成分厚朴酚对实验性溃疡有防治作用, 半夏、茯苓具有显著的抑制胃液分泌的作用, 苡仁、白芍能调节胃肠运动、抗溃疡、增加免疫功能. 健脾疏肝方有助于降低PCNA的高表达, 并有抗胃食管反流, 减轻食管炎症的疗效. 疗效与阳性对照加斯清相当, 都具有明显减轻食管炎症, 降低PCNA的高表达, 抑制细胞的异常增生或不典型增生和肠化的作用. 中药治疗组与剂量无绝对相关性, 高中剂量疗效优于低剂量但无法说明疗效与剂量成正相关, 低剂量组疗效不佳, 可能是药物浓度偏低, 行气降逆乏术造成. 全方标本兼顾, 配伍合理, 疏肝不忘健脾, 行气慎防伤阴, 共奏健脾疏肝, 行气降逆之功.

总之, 中医药为治疗和预防反流性食管炎提供了确实可靠的治疗方法, 必将在胃食管反流病的治疗中发挥日趋重要的作用.

4 参考文献

1 李军杰, 郑勇. 胃肠激素与反流性食管炎. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1493-1497
2 王虹, 刘宾. 胃食管反流性疾病的研究回顾. 世界华人消化杂志 2001; 9: 1041-1044
3 陈欣童, 黄晓军, 陈威. 中西医联合用药治疗反流性食管炎疗效观察. 现代预防医学 2006; 33: 112-113, 115
4 高祥华, 李春婷. 反流性食管炎的中医病机及辨治探讨. 吉林中医药 2004; 24: 15-16
5 刘东, 刘宇, 刘喆隆, 张冬林, 裘琳, 刘异, 汪震. 枸橼酸莫沙必利口服液与片剂人体生物等效性评价. 中国医院药学杂志 2006; 26: 1208-1210
6 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 郑青山, 孙瑞元. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算. 中国临床药理学与治疗学 2004; 9: 1069-1072
7 于强, 袁红霞, 崔乃强. 酸性反流性食管炎大鼠模型的改良制备. 中国中西医结合消化杂志 2002; 10: 74-75
8 中华医学会消化内镜学会、中华消化内镜杂志编辑部. 反流性食管病(炎)诊断及治疗方案(试行). 中华消化内镜杂志 1999; 16: 326
9 王和明, 曹秀峰, 张群华, 黄水清, 李义生, 袁爱华, 朱斌, 张延龄. 胃秘素及其受体拮抗剂对胃癌细胞PCNA、p53基因表达的影响. 中华实验外科杂志 2004; 21: 546
10 孟华, 刘丽娜, 孟晓光. 胃癌及癌前病变中的PCNA、p53表达及其与*H pylori*感染的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1253-1254
11 汪涛, 龚均, 陈谦, 王进海. 大鼠混合反流模型中COX-2、PCNA、CyclinD_1的表达. 西安交通大学学报(医学版) 2005; 26: 460-462
12 叶萍, 李兆申, 许国铭, 倪灿荣, 富克远. 反流性食管炎和食管腺癌组织中P16、P53、PCNA表达及其临床意义. 解放军医学杂志 2000; 25: 326-329
13 邹继彬, 黄广恩, 陈鸿莲. 食管癌Survivin和PCNA的表达及其临床意义. 中国医师杂志 2005; 7: 898-899
14 戴晓萍, 阎西丽, 王博. 反流性食管炎中医病名、病机及治疗探讨. 安徽中医临床杂志 2002; 14: 223-224
15 郭莉, 许喆. 胃食管反流病的中医药认识和研究进展. 江西中医药 2006; 37: 60-61

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 737-740
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

重组腺病毒载体介导HOSM基因对肝癌细胞体外增殖的抑制作用

胡朝全, 孙诚谊, 孙连生, 王玉芝

胡朝全, 孙诚谊, 贵阳医学院附属医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550004
孙连生, 王玉芝, 军事医学科学院放射医学研究所 北京市 100850
贵州省科学技术基金资助项目, No. 20023106
通讯作者: 孙诚谊, 550004, 贵州省贵阳市北京路9号, 贵阳医学院附属医院肝胆外科. scy@public.gz.cn
电话: 0851-86855119-6087 传真: 0851-6820346
收稿日期: 2006-11-19 接受日期: 2006-12-27

Growth suppression of human hepatic carcinoma cell by induction of human oncostatin M gene via recombinant adenovirus

Chao-Quan Hu, Cheng-Yi Sun, Lian-Sheng Sun, Yu-Zhi Wang

Chao-Quan Hu, Cheng-Yi Sun, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Lian-Sheng Sun, Yu-Zhi Wang, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China
Supported by the Science and Technology Foundation of Guizhou Province, No. 20023106
Correspondence to: Cheng-Yi Sun, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, 9 Beijing Road, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. scy@public.gz.cn
Received: 2006-11-19 Accepted: 2006-12-27

Abstract

AIM: To construct a replication-deficient recombinant adenoviral vector encoding human oncostatin M (HOSM) gene and evaluate its potential for suppressing the cell growth of hepatic carcinoma cell line HepG2 *in vitro*.

METHODS: Recombinant replication-deficient adenoviral vector encoding human oncostain M (HOSM) gene was constructed using homologous recombination modality. The transfection efficiency of the recombinant virus in HepG2 cells was examined by reporter gene AD-GFP. The expression of exogenous HOSM gene in adenovirus-infected HepG2 cells was identified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The proliferation inhibition of HepG2 cells was determined by trypan blue exclusion assay.

RESULTS: The desired recombinant adenovirus vectors were harvested with high titer and purity. The transfection efficiency of the recombinant virus in HepG2 cells was high, and positively correlated with the doses of AD-HOSM. The efficient expression of HOSM gene was detected in AD-HOSM treated cells at the 48th hour, and *in vitro* growth assay revealed significant growth retardation following AD-HOSM infection.

CONCLUSION: The expression of HOSM delivered by recombinant adenovirus is able to inhibit the proliferation of HepG2 cells *in vitro*, suggesting that recombinant adenovirus-mediated HOSM gene therapy might be a candidate method for the treatment of hepatic carcinoma.

Key Words: Adenoviral vector; Oncostatin M; Gene transfection; Reverse transcription polymerase chain reaction; Hepatic carcinoma

Hu CQ, Sun CY, Sun LS, Wang YZ. Growth suppression of human hepatic carcinoma cell by induction of human oncostatin M gene via recombinant adenovirus. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):737-740

摘要

目的: 构建含人抑瘤素M (human oncostatin M, HOSM)基因的复制缺陷型重组腺病毒载体AD-HOSM, 观察其对人肝癌细胞株HepG2在体外生长抑制情况.

方法: 通过同源重组方法构建含HOSM基因的缺陷型重组腺病毒载体AD-HOSM, 用报告基因AD-GFP检测腺病毒的对人肝癌细胞系的转染效率; 人肝癌细胞株HepG2转染含HOSM基因的缺陷型腺病毒载体AD-HOSM后, 用RT-PCR法检测外源HOSM基因在其中的表达; 台盼蓝染色、细胞计数法检测AD-HOSM对HepG2的体外增殖抑制情况.

■背景资料
肝癌是治疗效果较差的消化道恶性肿瘤, 需要对新的治疗模式进行探索. 肿瘤基因治疗是一项新兴而有前途的治疗方式. 人抑瘤素M(HOSM)是一种能抑制肿瘤细胞增殖多肽, 既往有关HOSM体外抑瘤多为直接应用或质粒介导, 本文所使用的质粒DNA同源重组构建了重组腺病毒载体AD-HOSM的方法, 具有操作简单, 获得重组腺病毒的几率较大的特点; 检测外源HOSM基因在靶细胞表达RT-PCR法简单易行; 台盼蓝染色、细胞计数法简单、易行而直观. 实验中AD-HOSM在体外显示了较好的抑制HepG2的的生长的作用, 提示HOSM可能对肝癌细胞有良好的抑制作用, 有着较好的应用前景.

■同行评价
本文研究了重组腺病毒载体介导HOSM基因对肝癌细胞体外增殖的抑制作用, 文章新颖度较好, 结果可信, 有较高的理论和应用价值.

结果: 成功构建了重组腺病毒载体AD-HOSM, AD-HOSM对肝癌细胞HepG2有较高的转染效率, 并且转染效率与病毒的剂量呈正相关. AD-HOSM感染HepG2细胞48 h, HOSM基因在转染细胞能有效的表达. 体外试验示, AD-HOSM转染的细胞的增殖却受到明显的抑制.

结论: 重组腺病毒介导HOSM表达能有效抑制HepG2在体外的增殖, 提示重组腺病毒介导的HOSM基因治疗可能成为肝癌治疗的候选方案.

关键词: 腺病毒载体; 抑瘤素M; 基因转染; 逆转录聚合酶链反应; 肝癌

胡朝全, 孙诚谊, 孙连生, 王玉芝. 重组腺病毒载体介导HOSM基因对肝癌细胞体外增殖的抑制作用. 世界华人消化杂志 2007;15(7):737-740
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/737.asp

0 引言

肝癌是常见的消化道恶性肿瘤, 化疗不敏感, 预后较差, 需要对新的治疗模式进行探索来提高肝癌的治疗效果. 抑瘤素M(oncostatin M)是一种能抑制肿瘤细胞增殖和促进正常成纤维细胞生长的多肽, 是迄今报道的具有较强抑制活性的因子, 我们构建了含人抑瘤素M(human oncostatin M, HOSM)基因复制缺陷型重组腺病毒载体, 以之转染肝癌细胞系, 观察外源性HOSM基因在其中的表达, 及体外的抑瘤效应进行检测和分析, 为肝癌的基因治疗提供参考.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞系HepG2购自ATCC, 培养条件为RMPI1640, 100 mL/L胎牛血清, 37℃, 50 mL/L CO_2. RPMI1640购自Gibico BRL, 胎牛血清购自北京军医兽医防治中心.

1.2 方法

1.2.1 构建含HOSM基因的重组腺病毒载体[1-3] 用含HOSM基因的穿梭质粒pCA14HOSM(含CMV-HOSMcDNA-SV40polyA)与环状质粒pJM17通过lipofectAMIN介导, 在人胚肾细胞中进行同源重组, 通过嗜斑分析筛选单克隆重组腺病毒, PCR法鉴定所构建的重组腺病毒载体, 在293细胞中扩增病毒, Cscl梯度超速离心纯化病毒, 嗜斑法测定病毒的滴度.

1.2.2 肝癌细胞系对腺病毒感染效率的检验[4] 将肝癌细胞系HepG2以10^4接种于24孔板, 12 h后给予不同MOI的AD-GFP感染, MOI分别为5, 10, 20, 30, 40, 50, 以DMEM为对照1-2 h后吸去病毒液, 每孔加入2 mL培养液, 以后每12 h在荧光显微镜下观察GFP的表达情况, 感染48 h后计数GFP表达阳性的细胞数(发绿色荧光), 同时计数该视野的全部细胞数, 计算感染效率. 转染效率 = GFP表达阳性细胞数/总细胞数×100%.

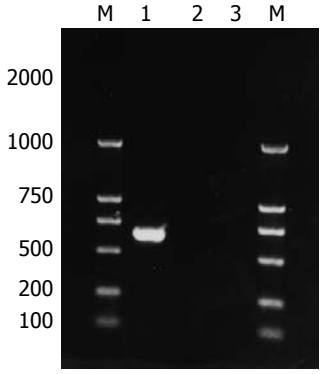

图 1 RT-PCR分析HOSM基因在HepG2细胞中的表达. 1: 转染AD-HOSM的HepG2细胞, 扩增出220 bp的特异性条带; 2: L转染AD-FDP的HepG2细胞; 3: 为专染病毒的HepG2细胞.

1.2.3 RT-PCR法检测目的基因在肝癌细胞系的表达 转染50MOI的AD-HOSM 48 h的肝癌细胞, 分别用AD-GFP及PBS作病毒对照及空对照. 用TRIzol试剂(GIBCO BRL)提取细胞的总RNA, 使用TRIzol试剂(GIBCO BRL), 参照说明书操作. 按HOSM CDNA序列合成引物, 上游引物: AGC, TGC, TCG, AAA, GAG, TAC, CG下游引物: CTG, TCC, CCT, GGT, CAT, GAG, TC预计扩增片段长度为660 bp, 使用Promega公司的Reverse Transcription Ststem(cat#A3500)试剂盒, 按说明书操作.

1.2.4 绘制细胞生长曲线[5-6] 将HepG2 1×10^5接种于60 mm的平皿, 分别感染50MOI的AD-HOSM, AD-GFP, PBS作对照, 每皿重复3次, 每天观察细胞生长状况, 于感染的2, 4, 6, 8 d, 用2.5 g/L胰蛋酶消化细胞, 离心收集细胞, 台盼蓝染色, 细胞计数, 每皿重复3次, 取平均值, 绘制细胞生长曲线.

2 结果

2.1 构建重组腺病毒载体AD-HOSM实验结果 成功构建了含HOSM基因的复制缺陷型重组腺病毒载体AD-HOSM[1-2].

2.2 肝癌细胞系对腺病毒感染效率的检验 肝癌细胞系对重组腺病毒易感, 以AD-GFP转染HepG2, 观察到转染效率与病毒的剂量呈正相关. 随着感染剂量加大, 目的基因的表达水平增

加, 产生强绿色的荧光的细胞数量亦增加, 病毒的转染效率提高.

2.3 重组腺病毒介导的目的基因在肝癌细胞的中表达 AD-HOSM感染HepG2细胞48 h后, 提取总RNA, 进行反转录PCR, 结果表明外源性HOSM基因能在肝癌细胞中能表达(图1).

2.4 重组腺病毒介导HOSM基因可抑制HepG2增殖 AD-GFP感染的细胞的增殖速度和光镜细胞形态与对照组没有明显的差别, 而相同剂量的AD-HOSM转染的细胞的增殖却受到明显的抑制, 光镜下可见细胞的贴壁性降低, 变园, 皱缩, 折光性增强, 部分细胞台盼蓝染色呈阳性, 此结果说明是病毒介导的目的基因而非病毒本身抑制肝癌细胞的增殖, 图2显示感染AD-GFP, AD-OSM及正常HepG2的生长曲线.

3 讨论

抑瘤素M是Zarling *et al*[7]在1986年分离的一种抑制肿瘤细胞增殖并有多种生物活性的细胞因子, 抑瘤素M能抑制多种肿瘤细胞株的增殖, 包括肝癌、乳腺癌、卵巢癌、神经胶质瘤、肺癌等, 可促进成纤维细胞的生长及Kaposi内瘤细胞的增殖, 可抑制体外培养的造血祖细胞的分化[8]. 病毒介导法转染效率高, 目的基因表达稳定, 在现有的基因治疗的方案中占绝大多数[9-11]. 腺病毒[12]是一种线状双链DNA病毒, 与其他病毒载体相比较而言, 对人致病性小, 且不诱导癌变, 感染后所致的临床症状较轻, 把腺病毒作为载体比较安全, 不整合入细胞基因组, 遗传毒性低; 宿主范围广; 不仅能感染繁殖期的细胞, 而且能感染非分裂期的细胞, 故能达到很高的转染效率; 易于制备, 纯化, 病毒滴度可达10^{13} pfu/L以上, 能满足于临床基因治疗的要求; ad_2, ad_5等的启运子功能较强, 可明显提高外源基因的表达水平.

实验中所使用的质粒DNA同源重组构建重组腺病毒载体AD-HOSM的方法, 具有操作简单, 获得重组腺病毒的几率较大的特点; 检测外源HOSM基因在靶细胞表达RT-PCR法简单易行; 台盼蓝染色、细胞计数法简单、易行而直观. 分别以AD-HOSM, AD-GFP, PBS转染肝癌细胞株, 结果显示, HOSM对肿瘤的生长有明显的抑制作用, AD-GFP感染的细胞的增殖速度和光镜细胞形态与对照组没有明显的差别, 而相同剂量的AD-HOSM转染的细胞的增殖却受到明显的抑制, 光镜下可见细胞的贴壁性降低, 变园, 皱缩, 折光性增强, 部分细胞台盼蓝染色呈阳性, 此结果说明, 是病毒介导的目的基因OSM而非病毒本身抑制肝癌细胞的增殖, 但OSM作用机制[13-14]尚不完全清楚, 可能与下述因素有关: OSM和其受体结合后, 通过JAK/STAT信号传导途径, 作用于靶基因, 如CDK_{IS}的P21WAF1/CIPI, $P27^{KLPI}$等, 使细胞生长阻滞; 或通过下调癌基因如抑制如c-myc的表达而抑制细胞增殖; 或通过免疫效应抑制细胞增殖.

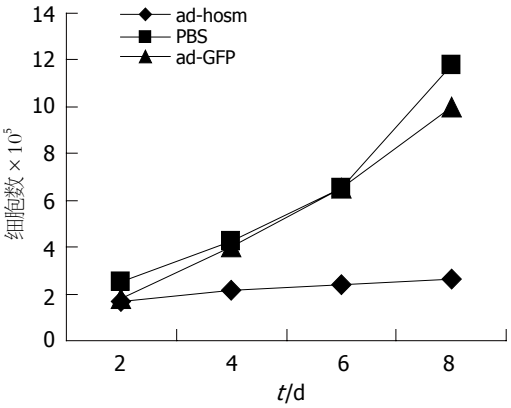

图 2 AD-HOSM, AD-GFP及PBS对肝癌细胞系HepG2体外增殖的影响.

当前对肝癌的基因治疗虽然取得了很多有意义的结果[15], 给肿瘤的治疗带来了新希望, 但仍存在着许多问题: (1)基因转移技术尚不完善; (2)病毒载体的安全性有待观察; (3)导入的基因间是否拮抗; (4)如何使导入的基因只作用于肝癌细胞. 相信随着科学技术进步及对肿瘤的发病机制的深入研究, 对基因转移载体进一步改造, 减轻其副作用, 提高其靶向性及转染效率, 新的功能基因不断被发现, 选择合适的治疗基因, 建立新的治疗模式, 经过长期不懈的努力, 我们相信肝癌的基因治疗将可能成为临床上可行的有效的辅助医疗方案, 基因治疗将会有一个灿烂辉煌的明天.

4 参考文献

1 胡朝全, 孙诚谊, 孙连生, 王玉芝. 质粒DNA同源重组法构建腺病毒载体hosm. 贵州医药 2004; 28: 7-9
2 胡朝全, 孙诚谊, 孙连生, 王玉芝. 重组腺病毒载体含人抑瘤素的扩增及纯化. 贵阳医学院学报 2004; 29: 14-17
3 Zhang WW, Fang X, Branch CD, Mazur W, French BA, Roth JA. Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis. *Biotechniques* 1993; 15: 868-872
4 de Martin R, Raidl M, Hofer E, Binder BR. Adenovirus-mediated expression of green fluorescent protein. *Gene Ther* 1997; 4: 493-495
5 Zhang WW, Fang X, Mazur W, French BA, Georges RN, Roth JA. High-efficiency gene transfer and

high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther* 1994; 1: 5-13
6 Qazilbash MH, Xiao X, Seth P, Cowan KH, Walsh CE. Cancer gene therapy using a novel adeno-associated virus vector expressing human wild-type p53. *Gene Ther* 1997; 4: 675-682
7 Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9739-9743
8 Bruce AG, Linsley PS, Rose TM. Oncostatin M. *Prog Growth Factor Res* 1992; 4: 157-170
9 Wang CJ, Xue XB, Yi JL, Chen K, Zheng JW, Wang J, Zeng JP, Xu RH. Melanoma differentiation-associated gene-7, MDA-7/IL-24, selectively induces growth suppression, apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 by replication-incompetent adenovirus vector. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1774-1779
10 Jacob D, Schumacher G, Bahra M, Davis J, Zhu HB, Zhang LD, Teraishi F, Neuhaus P, Fang BL. Fiber-modified adenoviral vector expressing the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene from the human telomerase reverse transcriptase promoter induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2552-2556
11 Li L, Huang JL, Liu QC, Wu PH, Liu RY, Zeng YX, Huang WL. Endostatin gene therapy for liver cancer by a recombinant adenovirus delivery. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1867-1871
12 Robbins PD, Tahara H, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. Trends Biotechnol 1998; 16: 35-40
13 Grant SL, Begley CG. The oncostatin M signalling pathway: reversing the neoplastic phenotype? *Mol Med Today* 1999; 5: 406-412
14 Tanaka M, Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; 149: 39-52
15 Hernandez-Alcoceba R, Sangro B, Prieto J. Gene therapy of liver cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6085-6097

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

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

1 征文内容和要求

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

2 学习班招收对象

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

3 联系方式

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 741-745
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

罗格列酮对日本血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织核因子-κB和过氧化物酶体增殖物激活受体γ表达的影响

谌 辉, 张景辉, 刘文琪, 贺永文

谌辉, 贺永文, 华中科技大学同济医学院附属协和医院传染科 湖北省武汉市 430030
张景辉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院外科实验室 湖北省武汉市 430030
刘文琪, 华中科技大学同济医学院寄生虫学教研室 湖北省武汉市 430022
湖北省自然科学基金资助项目, No. 2005ABA170
通讯作者: 谌辉, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院传染科. chenhui0515@yahoo.com.cn
电话: 027-85726419
收稿日期: 2006-11-20 接受日期: 2006-12-27

Effect of rosiglitazone on the activity of hepatic nuclear factor-kappa B and expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ in mice with liver fibrosis due to schistosoma japonicum infection

Hui Chen, Jing-Hui Zhang, Wen-Qi Liu, Yong-Wen He

Hui Chen, Yong-Wen He, Department of Infectious Diseases, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Jing-Hui Zhang, Department of Surgical Laboratory, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Wen-Qi Liu, Department of Parasitology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2005ABA170
Correspondence to: Hui Chen, Department of Infectious Diseases, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province,
China. chenhui0515@yahoo.com.cn
Received: 2006-11-20 Accepted: 2006-12-27

Abstract

AIM: To investigate the effect of rosiglitazone on the binding activity of hepatic nuclear factor-kappa B (NF-κB) and the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) in mice with liver fibrosis caused by schistosoma japonicum infection.

METHODS: A total of 50 mice were randomly and averagely divided into group A, B, C, D and E. The mice in group A served as normal controls, while those in the other four groups were infected with schistosoma japonicum to induce the model of liver fibrosis. Besides, the mice in group C, D and E were treated with praziquantel, rosiglitazone, and praziquantel plus rosiglitazone, respectively. HE staining was used to observe the pathological changes of liver tissues under light microscope, and Western blot and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RFQ-PCR) were performed to detect the activity of NF-κB and mRNA expression of PPARγ.

RESULTS: The inflammatory and fibrotic degrees were obviously alleviated in group E, which were the lightest among those groups with schistosomiasis ($P < 0.05$). The activity of NF-κB was the highest in group B (141.11 ± 15.37), significantly higher than that in group A, C, D and E (78.89 ± 18.12, 112.89 ± 20.17, 108.89 ± 20.47, 88.89 ± 19.34)($P < 0.05$). The level of PPARγ mRNA was markedly higher in group A [-16.557±(-3.022)], D [-18.217±(-4.498)] and E [-18.212±(-3.909)] than that in group B [-27.315±(-6.348)] and C [-25.647±(-5.694)] ($P < 0.05$).

CONCLUSION: NF-κB and PPARγ may be involved in the pathogenesis of liver fibrosis due to schistosoma japonicum infection. Rosiglitazone, a ligand of PPARγ, is obviously effective in the treatment of this disease by up-regulating PPARγ expression and reducing NF-κB activity.

Key Words: Rosiglitazone; Schistosomiasis; Nuclear factor-kappa B; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

Chen H, Zhang JH, Liu WQ, He YW. Effect of rosiglitazone on the activity of hepatic nuclear factor-kappa B and expression of peroxisome proliferator-activated receptor-γ in mice with liver fibrosis due to schistosoma japonicum infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):741-745

■背景资料
血吸虫病肝纤维化是晚期血吸虫病肝脏严重的病理改变, 目前国内外尚无理想的抗纤维化药物. PPARγ是一类由配体激活的核转录因子, 其功能改变与一些肝脏疾病有相关性. PPARγ与配体结合后被激活, 在肝纤维化形成中的作用已成为肝纤维化研究领域里的一个新热点, 但其具体机制尚不完全清楚, 但亟待解决.

■创新盘点
本文首次研究了NF-κB和PPARγ在日本血吸虫病肝纤维化小鼠肝脏的表达, 及PPARγ配体罗格列酮对其表达的影响. 目前, 国内外尚未见PPARγ及其配体对血吸虫病肝纤维化的作用进行研究.

摘要

目的: 观察日本血吸虫病肝纤维化小鼠肝脏肝组织核因子-κB(NF-κB)的活性和过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPARγ)的表达, 及PPARγ配体罗格列酮对其表达的影响.

方法: 50只昆明小鼠, 随机分为正常对照组、感染对照组、吡喹酮治疗组、罗格列酮治疗组及罗格列酮加吡喹酮治疗组. 除正常对照组外, 其余各组均建立血吸虫病肝纤维化小鼠模型. 用HE染色观察肝组织光镜下的病理改变. 用Western blot方法, 实时荧光定量PCR反应观察小鼠肝组织NF-κB的活性变化与PPARγ mRNA的表达.

结果: 罗格列酮加吡喹酮治疗组小鼠肝脏的炎性反应和纤维化病理改变较其他模型组轻(P<0.05). 感染对照组NF-κB活性(141.11±15.37)最强, 明显高于其余各组(正常对照组: 78.89±18.12; 吡喹酮组: 112.89±20.17; 罗格列酮组: 108.89±20.47; 罗格列酮加吡喹酮组: 88.89±19.34)(P<0.05). 感染对照组[-27.315±(-6.348)]及吡喹酮治疗组[-25.647±(-5.694)] PPARγ mRNA表达较正常对照组[-16.557±(-3.022)]及罗格列酮治疗组[-18.217±(-4.498)]、罗格列酮加吡喹酮治疗组[-18.212±(-3.909)]显著减弱(P<0.05).

结论: PPARγ及NF-κB在血吸虫病肝纤维化形成中起一定作用. PPARγ配体罗格列酮有明显的抗日本血吸虫病肝纤维化效应, 其抗纤维化机制与PPARγ配体激活PPARγ表达的同时抑制NF-κB的活性有关.

关键词: 罗格列酮; 日本血吸虫病; 核因子-κB; 过氧化物酶体增殖物激活受体γ

谌辉, 张景辉, 刘文琪, 贺永文. 罗格列酮对日本血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织核因子-κB和过氧化物酶体增殖物激活受体γ表达的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(7):741-745
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/741.asp

0 引言

血吸虫性肝纤维化是晚期血吸虫病肝脏严重的病理改变, 目前国内外尚无理想的抗纤维化药物. 有文献报道过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisome proliferators activator receptors gamma, PPARγ)的配体, 有较好的抗肝纤维化作用[1]. 但其具体机制尚不完全清楚, 也未见其对血吸虫病肝纤维化的作用进行研究. 本文研究肝组织核因子-κB(NF-κB)和PPARγ在日本血吸虫病肝纤维化小鼠肝脏的表达, 及PPARγ配体罗格列酮对其表达的影响, 为PPARγ配体抗血吸虫病肝纤维化的作用机制提供参考资料.

1 材料和方法

1.1 材料 昆明小鼠50只, 体质量16-22 g, 购于华中科技大学同济医学院动物实验中心. 随机分为5组, 每组10只, 除正常对照组外, 模型组均经皮感染日本血吸虫尾蚴40条. 罗格列酮片为葛兰素史克有限公司产品. 蛋白质分子量标准混合物(MBI公司预染的marker, 范围为21-118 kDa), NF-κB兔抗小鼠mAb(Santa Cruz公司), 碱性磷酸酶标记的山羊抗兔二抗(北京中山公司). PPARγ引物购自上海博亚生物技术有限公司, SYBR Green Ⅰ荧光染料购自美国Biotium公司, TRIzol溶液购自美国GIBCO公司. PCR仪: 上海枫岭生物技术有限公司生产的FTC-2000型实时荧光定量PCR仪.

1.2 方法

1.2.1 动物分组 (1)正常对照组: 常规喂养4 wk后灌服等量的生理盐水至10 wk末; (2)感染对照组: 感染尾蚴4 wk后灌服等量的生理盐水至10 wk末; (3)吡喹酮治疗组: 感染尾蚴4 wk后用吡喹酮500 mg/(kg·d)灌胃, 杀虫治疗2 d后改为等量的生理盐水灌胃治疗至10 wk末; (4)罗格列酮治疗组: 感染尾蚴4 wk后用罗格列酮4 mg/(kg·d)灌胃治疗至10 wk末. (5)罗格列酮加吡喹酮治疗组: 感染尾蚴4 wk后用吡喹酮灌胃(剂量同前)治疗2 d, 用罗格列酮4 mg/(kg·d)灌胃治疗至10 wk末. 最后断颈法处死小鼠, 取部分肝组织置液氮中保存备检, 另一部分置于甲醛中固定, 常规石蜡切片, HE染色作病理形态学观察.

1.2.2 组织病理学观察 肝组织病理学检查采用世界卫生组织肝硬化分类及命名标准[2], 病理切片光镜检查记录肝纤维化程度. 低倍镜下观察, 每张切片随机取10个视野计平均值. “-”汇管区无明显肝纤维组织; “+”汇管区较多纤维组织增生, 局限; “++”汇管区有大量纤维组织增生, 呈窄带状, 并向肝小叶伸展; “+++”汇管区大量纤维组织增生, 呈宽带状, 并伸展包绕肝小叶, 且见中央静脉偏位现象.

1.2.3 肝组织核蛋白的提取 肝组织匀浆, 过滤后4℃ 5000 r/min离心10 min, 弃上清液. 快速将沉淀的细胞重悬于200 μL的buffer A缓冲液中, 4℃ 5000 r/min离心10 min, 弃上清液. 将细胞重悬于100 μL的buffer C缓冲液中, 冰浴10 min. 4℃

表 1 各组小鼠肝组织NF-κB活性与PPARγ mRNA的表达(mean ± SD)

分组	*n*	NF-κB活性	PPARγ mRNA
正常对照组	10	78.89 ± 18.12	−16.557 ± (−3.022)
感染对照组	10	141.11 ± 15.37[a]	−27.315 ± (−6.348)[a]
吡喹酮组	10	112.89 ± 20.17[ac]	−25.647 ± (−5.694)[a]
罗格列酮组	10	108.89 ± 20.47[ac]	−18.217 ± (−4.498)[ce]
罗格列酮加吡喹酮	10	88.89 ± 19.34[ceg]	−18.212 ± (−3.909)[ce]

[a]P<0.05 *vs* 正常对照组; [c]P<0.05 *vs* 感染对照组; [e]P<0.05 *vs* 吡喹酮组; [g]P<0.05 *vs* 罗格列酮组.

■应用要点

本研究证实PPARγ配体罗格列酮有明显的抗日本血吸虫病肝纤维化效应, 为抗血吸虫病肝纤维化治疗的进一步研究提供新的思路和途径.

15 000 r/min离心20 min, 取上清液-70℃分装保存.

1.2.4 Western blot检测NF-κB活性 考马斯亮兰G-250法测定蛋白浓度. 取核蛋白提取物20 μg进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE电泳), 转膜, 封闭, 加入一抗(NF-κB兔抗小鼠单克隆抗体)孵育. 洗涤后加入碱性磷酸酶标记的二抗(山羊抗兔抗体), 孵育, 充分洗涤, NBT/BCIP显色液显色, PBS终止. SPSS软件分析条带积分光密度值(A), 进行定量分析.

1.2.5 mRNA提取 每份标本取100 mg组织加入玻璃匀浆器中, 加入TRIzol溶液1 mL提取总RNA, 以总RNA为模板, 逆转录合成cDNA.

1.2.6 实时荧光定量PCR反应检测PPARγ mRNA 应用SYBR Green Ⅰ荧光染料技术行实时定量PCR反应, 以适量cDNA为模板, 以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照, PCR扩增PPARγ基因片断. PPARγ引物设计, 上游: 5'-TTTCAAGGGTGCCAGTTTCG-3', 下游: 5'-TCTTTATTCATCAGGGAGGC-3'. GAPDH引物设计, 上游: 5'-GATGGTGAAGGTCGGTGTG-3', 下游: 5'-GAGGTCAATGAAGGGGTCG-3'. PCR反应参数: 预变性94℃ 5 min, 然后94℃变性30 s, 53℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 共45个循环, 最后72℃延伸10 min. 在延伸的过程中搜集荧光信号. 于每次扩增的同时设置无cDNA的阴性对照, 将PCR产物做熔解曲线, 65℃, TOUCH-DOWN PCR, 每个循环温度上升0.2℃, 150个循环, 证实以上PCR反应产物特异性良好. 计算方法: 待测样品相对值 = $2^{\Delta\Delta Ct}$; ΔΔCt = ΔCt待测样品-ΔCtβ-actin; Ct = Ct阴性对照-Ct待测样品. 本实验统计ΔΔCt值以比较各组PPARγ mRNA的表达(表1).

统计学处理 采用SPSS11.5软件分析. 计量资料结果以均数±标准差(mean±SD)表示, 采用方差分析, 以P<0.05为差异有统计学意义. 病理切片分级程度按“-”、“+”、“++”、“+++”分别计为0, 1, 2, 3, 用q值检验作方差分析.

2 结果

2.1 肝组织病理形态学变化 血吸虫尾蚴感染组小鼠, 肝内汇管区及虫卵肉芽肿周围纤维增生明显, 大部分虫卵肉芽肿出现坏死病灶及纤维化, 肝血窦扩张充血, 细胞颗粒变性, 大量炎性细胞浸润. 吡喹酮治疗组及罗格列酮治疗组小鼠肝脏汇管区及肉芽肿内少量纤维组织增生, 肝细胞颗粒变性少, 可见炎性细胞浸润. 罗格列酮加吡喹酮治疗组肝脏病变更轻, 肝细胞排列清晰, 少量炎性细胞浸润, 肝脏汇管区及肉芽肿内纤维组织增生不明显. 肝纤维化程度比较: 感染对照组, 吡喹酮治疗组, 罗格列酮治疗组, 罗格列酮加吡喹酮治疗组各组q值分别为2.31±0.63, 1.49±0.77, 1.38±0.60, 及0.78±0.53. 罗格列酮加吡喹酮治疗组肝纤维化程度较其他模型组轻(P<0.05).

2.2 肝组织NF-κB活性 感染对照组NF-κB活性最强, 与其余各组比较均有显著性差异(P<0.05). 罗格列酮加吡喹酮治疗组和正常对照组NF-κB活性明显弱于其余各组(P<0.05), 此两组比较无显著性差异. 吡喹酮治疗组和罗格列酮治疗组NF-κB活性比较无显著性差异, 但均明显弱于感染对照组, 强于罗格列酮加吡喹酮治疗组和正常对照组(P<0.05, 表1, 图1).

2.3 PPARγ mRNA在小鼠肝组织的表达 感染对照组及吡喹酮治疗组PPARγ mRNA表达较正常对照组及罗格列酮治疗组、罗格列酮加吡喹酮治疗组显著减弱(P<0.05), 罗格列酮治疗组及罗格列酮加吡喹酮治疗组虽比正常对照组值低, 但差异无统计学意义(P>0.05, 表1).

3 讨论

PPARγ是一类由配体激活的核转录因子, 是重

■同行评价
本文研究PPARγ配体罗格列酮对血吸虫病肝纤维化的影响，为PPARγ配体抗血吸虫病肝纤维化的作用机制提供参考资料. 文章目的明确，设计合理，方法正确，结果可信.

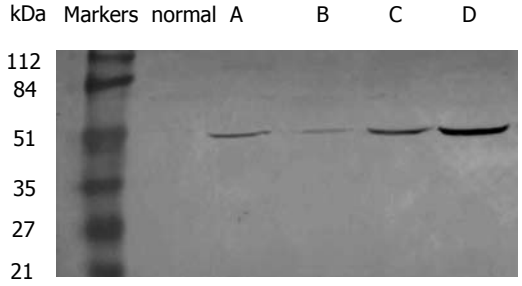

图 1 Western blot检测NF-κB在小鼠肝组织的表达活性. normal: 正常对照组; A: 罗格列酮组; B: 罗格列酮加吡喹酮组; C: 吡喹酮组; D: 感染对照组.

要的肝脏代谢功能调节分子，其功能改变与一些肝脏疾病有相关性[3-5]. 众所周知，肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活是肝纤维化发生发展的中心环节[6-8]. 最近研究证实，静止状态人类HSC表达PPARγ，而活化状态的HSC表达明显减少，PPARγ在维持HSC作为静止状态的表型上具有重要作用，PPARg表达减少与HSC激活密切相关[9-11]. 肝脏星状细胞活化时，PPARγ表达及其与PPAR反应元件结合成分减少. 用PPARγ配体可逆转这一反应，PPARγ与配体结合后被激活，与 PPAR反应元件结合而发挥转录调控作用[12]. PPARγ及其配体在肝纤维化形成中的作用已成为肝纤维化研究领域里的一个新热点，但其具体机制尚不完全清楚.

我们用日本血吸虫尾蚴感染小鼠建立肝纤维化模型，在肝纤维化早期采用PPARγ配体罗格列酮治疗，观察肝组织病理形态学变化，显示罗格列酮可显著减轻肝脏纤维组织增生. 并通过检测PPARγ mRNA在各组小鼠肝组织的表达，发现感染对照组及吡喹酮治疗组肝组织PPARγ mRNA表达较正常对照组显著减弱，用PPARγ配体罗格列酮治疗可明显提高PPARγ mRNA的表达. NF-κB是一种具有转录激活功能的蛋白质，细胞处于静止状态时，与NF-κB抑制蛋白单体结合呈非活性状态. 当机体受到外界刺激时，如氧化应激、细胞因子等，NF-κB即被激活，与靶基因的κB序列结合启动基因转录. NF-κB作为一种重要的炎症前基因的急早期转录调控子，在肝组织的炎症反应、氧化应激、细胞凋亡和再生中发挥者重要作用[13-14]. 最近研究显示，在肝纤维化形成过程中，NF-κB通过对肝细胞，HSC和肝脏库弗氏细胞的调节，对肝纤维化形成起重要调控作用. 研究发现，静息状态下和新分离的HSC核内缺乏NF-κB，而活化的、a-SMA阳性的HSC中出现了NF-κB的核转位活性，同时有细胞间黏附分子，IL-6等基因的表达，表明NF-κB可能参与了HSC激活的调节[15]，研究还发现，NF-κB具有抗HSC凋亡的作用[16]. 但目前NF-κB在HSC中的作用尚存在一定争议.

我们发现，感染对照组小鼠肝脏NF-κB的活性显著高于正常对照组，罗格列酮治疗后NF-κB的活性明显降低，说明NF-κB参与了肝纤维化的形成，PPARγ配体罗格列酮能抑制NF-κB的活性. 另外，本实验还显示，吡喹酮治疗也能降低NF-κB的活性，提示吡喹酮在驱虫治疗的同时减轻炎性反应而诱导一定的抗纤维化效应. 如果在驱虫治疗的同时应用有效的抗纤维化药物治疗能提高血吸虫病肝纤维化治疗的疗效.

总之，PPARγ及NF-κB在血吸虫病肝纤维化形成中起一定作用. PPARγ配体罗格列酮有明显的抗日本血吸虫病肝纤维化效应，其抗纤维化机制与PPARγ配体激活PPARγ表达的同时抑制NF-κB的活性，从而抑制HSC的激活有一定关系.

4 参考文献

1 Yuan GJ, Zhang ML, Gong ZJ. Effects of PPARγ agonist pioglitazone on rat hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1047-1051
2 Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol* 1978; 31: 395-414
3 Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, Suzuki Y, Saito H, Kohgo Y, Okumura T. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 215-222
4 Berkenstam A, Gustafsson JA. Nuclear receptors and their relevance to diseases related to lipid metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 171-176
5 Yang L, Chan CC, Kwon OS, Liu S, McGhee J, Stimpson SA, Chen LZ, Harrington WW, Symonds WT, Rockey DC. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G902-G911
6 Bartley PB, Ramm GA, Jones MK, Ruddell RG, Li Y, McManus DP. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of Schistosoma japonicum egg-induced fibrosis. *Int J Parasitol* 2006; 36: 993-1001
7 饶慧瑛，魏来. 肝星状细胞的生物学特性及活化调控机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 671-674
8 施贵静，赵金满. 肝星状细胞的生物学特性和肝纤维化. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1179-1183
9 Zheng S, Chen A. Activation of PPARgamma is required for curcumin to induce apoptosis and to inhibit the expression of extracellular matrix genes in hepatic stellate cells *in vitro*. *Biochem J* 2004; 384:

149-157
10 张锦生. 肝星状细胞激活的内在机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 831-834
11 Sung CK, She H, Xiong S, Tsukamoto H. Tumor necrosis factor-alpha inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity at a posttranslational level in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G722-G729
12 Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K. Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 187-195
13 Dela Pena A, Leclercq I, Field J, George J, Jones B, Farrell G. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology* 2005; 129: 1663-1674
14 Lv P, Luo HS, Zhou XP, Chireyath Paul S, Xiao YJ, Si XM, Liu SQ. Thalidomide prevents rat liver cirrhosis via inhibition of oxidative stress. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 777-788
15 Muhlbauer M, Weiss TS, Thasler WE, Gelbmann CM, Schnabl B, Scholmerich J, Hellerbrand C. LPS-mediated NFkappaB activation varies between activated human hepatic stellate cells from different donors. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 191-197
16 Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2005; 10: 927-939

电编 李琪 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

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

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

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

• 消息 •

世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版

本刊讯 《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式, 自1995年起, 发表的文章可以在线免费阅读全文(http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp). 自2003-04-15至今2006-11-27, 电子版的点击次数为13708834, 平均每天点击10409次. 总下载次数166750, 平均每天下载126次. (世界胃肠病学杂志社2007-03-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 746-749
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

不同地区幽门螺杆菌cagA基因羧基端可变区及其蛋白序列差异分析

吴 莺, 张尤历, 王文兵, 陈劲频, 沈 琰

■背景资料
目前的研究表明, *H pylori*与慢性胃炎、消化性溃疡和黏膜相关性淋巴样组织淋巴瘤发病关系密切, 并且涉及胃癌流行病学的研究, *H pylori*被WHO认定为Ⅰ类致癌物质.

吴莺, 张尤历, 陈劲频, 沈琰, 江苏大学附属医院消化科 江苏省镇江市 212001
王文兵, 江苏大学生命科学院 江苏省镇江市 212001
江苏省科学技术厅社会发展项目, No. BS2002023
通讯作者: 张尤历, 212001, 江苏省镇江市解放路438号, 江苏大学附属医院消化科. zjyouli@yahoo.com.cn
电话: 0511-5011787
收稿日期: 2006-09-28 接受日期: 2007-01-04

Diversity of cagA gene 3' terminal variable region and its corresponding protein in *Helicobacter pylori*

Ying Wu, You-Li Zhang, Wen-Bing Wang, Jin-Pin Chen, Yan Shen

Ying Wu, You-Li Zhang, Jin-Pin Chen, Yan Shen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China
Wen-Bing Wang, Institute of Life Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China
Supported by the Social Development Program of Jiangsu Science and Technology Department, No.BS2002023
Correspondence to: You-Li Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, 438 Jiefang Road, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. zjyouli@yahoo.com.cn
Received: 2006-09-28 Accepted: 2007-01-04

Abstract

AIM: To study the diversity and structural characteristics of cagA (cytotoxin-associated gene A) gene 3′ terminal variable region in *Helicobacter pylori* as well as their correlations with the outcome of *H pylori*-related diseases.

METHODS: PCR products with positive *H pylori* cagA were obtained from 20 cases and then sequenced by ExPASy-Translation software. Meanwhile, 3 to 6 cases of *H pylori* 3′ terminal variable region and amino acid sequence, collected from NCBI database in different countries, were comparatively analyzed.

RESULTS: The amino acid sequences were found with obvious regional characteristics, and could be classified into eastern-asian type and western type. Western-type aberrations occurred in some eastern-asian strains. Totally, 87.4% *H pylori* stains contained 3 EPIYA motifs in series, and 8.2% strains had 4 or more EPIYA motifs. A new sequence containing 3 amino acids was found. There was no correlation between the numbers of EPIYA motifs in the amino acid sequences of cagA protein and the clinical outcomes.

CONCLUSION: There exists marked diversity in cagA gene and protein of *H pylori*, which can be distinguished by the main sequences of *H pylori* cagA 3′ terminal variable region. The number of EPIYA motifs in cagA 3′ terminal variable region is not correlated with the clinical outcomes of diseases.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Cytotoxin-associated gene A; EPIYA motif; Diversity

Wu Y, Zhang YL, Wang WB, Chen JP, Shen Y. Diversity of cagA gene 3′ terminal variable region and its corresponding protein in *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):746-749

摘要

目的: 比较不同地区*H pylori* cagA 3'端可变区序列差异及序列的地域特征, 分析差异与疾病的相关性.

方法: 选择本实验室所收集的20例cagA$^+$的PCR产物进行测序, 并通过ExPASy-Translation软件推测其氨基酸序列, 搜索并收集GenBank中已公布的不同地区3-6个*H pylori* cagA 3'端可变区序列及其氨基酸序列进行比较分析.

结果: cagA蛋白的氨基酸序列可分为具有明显地域特征的东亚型和西方型两类; 部分东亚型菌株表现出西方型变异. 87.4%的菌株具有3个串联排列的EPIYA基序, 8.2%的菌株具有4个或以上EPIYA 基序. 新发现1条具有区

域特征的含有3个氨基酸的序列. cagA蛋白氨基酸序列中的EPIYA数目与临床结果没有相关性.

结论: *H pylori* cagA基因及其cagA蛋白序列具有明显多态性, 可以根据*H pylori* cagA 3'端可变区的主要序列差异进行地域分型, cagA 3'端可变区的EPIYA基序的数目与临床结果没有相关性.

关键词: 幽门螺杆菌; 细胞毒性相关基因A; EPIYA基序; 差异

吴莺, 张尤历, 王文兵, 陈劲频, 沈琰. 不同地区幽门螺杆菌*cagA*基因羧基端可变区及其蛋白序列差异分析. 世界华人消化杂志 2007;15(7):746-749

http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/746.asp

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)的细胞毒性相关基因A(cytotoxin-associated gene A, cagA), 是研究最多的*H pylori*的基因之一. 由cagA基因编码的cagA蛋白, 经由Ⅳ分泌系统进入细菌黏附的胃上皮细胞, 在其羧基端进行酪氨酸磷酸化, 从而引起细胞骨架的重排、诱导细胞形态学的变化和细胞动力的增强, 造成细胞异常的增殖和运动, 最终导致癌变. 因此cagA阳性($cagA^+$)的*H pylori*菌株较$cagA^-$的*H pylori*菌株毒力强[1-5]. 但是*H pylori*较其他细菌有更大的遗传变异, 从而导致感染后的不同临床后果: 从无症状携带到慢性胃炎、消化性溃疡、胃窦腺癌. 造成*H pylori*菌株cagA蛋白的功能差异的原因是cagA基因3'端可变区上重复序列的差异, 并由此造成了cagA基因结构的多态性和cagA蛋白的生物学差异, 这个差异还与萎缩性胃炎和胃癌的发病相关[1,6]. cagA蛋白羧基端的EPIYA基序(EPIYA基序为谷氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-酪氨酸-丙氨酸序列)的酪氨酸残基是cagA蛋白进行酪氨酸磷酸化的位点, 有研究认为, 具有更多EPIYA基序的cagA蛋白能诱导更多的酪氨酸磷酸化和白介素-8的分泌, 因此具有更强的细胞毒性[6-7]. 我们试图通过比较不同地区*H pylori*菌株cagA 3'端可变区及其cagA蛋白序列多态性的分析以及与临床结果相关性的研究, 试图找出*H pylori*的区域特征以及可能存在的结构差异、以及这种差异与感染后不同的临床转归之间是否存在关联.

1 材料和方法

1.1 材料 以“*Helicobacter pylori*”, “cagA”主题词检索Pubmed的Nucleotide数据库. 中国的20例为我们自己检测: 我们所搜集的60株*H pylori*, 分离自中国镇江地区胃肠病患者胃黏膜, 通过PCR检测cagA, 在56例$cagA^+$的菌株中, 分别选择胃癌菌株4例、消化性溃疡9例、慢性胃炎7例, 对其PCR产物用PCR产物纯化试剂盒回收, 再与pMD18-T载体连接, 转化感受态细胞进行蓝白斑筛选. 挑出白色单菌落扩增, 用SDS-碱裂解法抽提质粒, 分别用*Bam*HⅠ, *Eco*RⅠ酶切, 并电泳鉴定. 对阳性克隆进行测序. 测序由上海生工生物工程公司完成.

1.2 方法 以“*Helicobacter pylori*”, “cagA”主题词检索Pubmed的Nucleotide数据库, 共有1265个结果. 按检索出来的顺序, 选择日本菌株cagA 3'端可变区序列6个, 韩国3个, 越南4个, 美国3个, 哈萨克斯坦3个, 印度3个, 爱尔兰3个, 哥斯达黎加4个. 各菌株cagA基因核酸序列接受号分别为: 1-6为日本菌株: 1-AB057039(JapanO873), 2-AB057038(JapanO552), 3-AB057-011(JapanK30), 4-AB057036(JapanK260), 5-AB057020(JapanK46), 6-AB057012(JapanK31); 7-10为越南菌株: 7-AB057057(Vietnam2705), 8-AB057058(Vietnam2706), 9-AB057056(Vietnam2704), 10-AB057055(Vietnam2692); 11-13为美国菌株:11-AB057100(USA2754), 12-AB057099(USA2791), 13-AB057095(USA35); 14-16为韩国菌株: 14-AB057044(Korea23), 15-AB057043(Korea12), 16-AB057042(Korea9); 17-19为哈萨克菌株: 17-AB057096(Kazak1), 18-AB057097(Kazak2), 19-AB057098(Kazak3); 20-22为爱尔兰菌株: 20-AF427098、21-AF427099、22-AF427100; 23-26为哥斯达黎加菌株: 23-AF289463、24-AF289464、25-AF289462、26-AF289461; 27-29为印度菌株: 27-AF222808, 28-AF222807, 29-AF222809.

相对应的蛋白序列GenBank接受号为: 1-6为日本菌株: 1-BAB87406.1, 2-BAB87405.1, 3-BAB87378.1, 4-BAB87403.1, 5-BAB87387.1, 6-BAB87379.1; 7-10为越南菌株: 7-BAB87424.1, 8-BAB87425.1, 9-BAB87423.1, 10-BAB87422.1; 11-13为美国菌株: 11-BAB87467.1, 12-BAB87466.1, 13-BAB87462.1; 14-16为韩国菌株: 14-BAB87411.1, 15-BAB87410.1, 16-BAB87409.1;

■相关报道

目前的报道主要集中在cagA蛋白的遗传差异上. 主要涉及cagA蛋白的羧端可变区的差异和分类: 个体菌株之间的差异、地区间菌株的差异、以及这种差异与临床结果之间的关系. 这种差异与EPIYA基序的数目和其前后氨基酸的序列有关. 研究者试图找到其中的规律以及与临床结果的关联.

■应用要点
本文通过cagA蛋白的氨基酸序列分析, 研究了cagA蛋白的个体差异, 研究者以后可以应用类似的方法, 继续研究*H pylori*的其他毒力因子之间的差异, 以期找到造成*H pylori*感染不同结局的原因.

表 1 不同地区*H pylori*的菌株数与其cagA 3'端可变区的序列特征

国家	菌株数	cagA 3'端可变区主要特征序列	EPIYA基序的数目(*n*)		
			2(%)	3(%)	4(%)
中国	20	KIASAGKGVGGFSGA DFD		20(100%)	
日本	6	KIASAGKGVGGFSGA DFD		6(100%)	
韩国	3	KIASAGKGVGGFSGA DFD		3(100%)	
越南	4	KIASAGKGVGGFSGA DFD		4(100%)	
美国	3	FPLKRHDKVDDLSKV DDL	1(33.3%)	2(66.7%)	
哈萨克斯坦	3	FPLKRHDKVDDLSKV DDL		2(66.7%)	1(33.3%)
印度	3	FPLKRHDKVDDLSKV DDL		1(33.3%)	2(66.7%)
爱尔兰	3	FPLKRHDKVDDLSKV EDL	1(33.3%)	1(33.3%)	1[a](33.3%)
哥斯达尼加	4	FPLKRHDKVDDLSKV DDL		4(100%)	
总计	49		2(4.1%)	43(87.8%)	4(8.2%)

[a]表示为5个EPIYA基序.

17-19为哈萨克菌株: 17-BAB87463.1, 18-BAB87464.1, 19-BAB87465.1; 20-22为爱尔兰菌株: 20-AAL28091.1, 21-AAL28092.1, 22-AAL28093.1; 23-26为哥斯达黎加菌株: 23-AAG09912.1, 24-AAG09913.1, 25-AAG09911.1, 26-AAG09910.1; 27-29为印度菌株: 27-AAF35341.1, 28-AAF35340.1, 29-AAF35342.1.

2 结果

2.1 cagA 3'端可变区的区域性结构特点 中国和日本、韩国、越南共有33个菌株, 菌株的cagA 3'端可变区的结构相似, 每个菌株具有1个特征性的东亚主要氨基酸序列KIASAGKGVGGF-SGA, 100%的菌株为3个串联排列的EPIYA序列(33/33, 100.0%), 紧随第3个EPIYA序列后的1个DFD序列; 美国、哈萨克斯坦、印度、爱尔兰、哥斯达黎加共有16个菌株,菌株的cagA 3'端可变区的结构相似, 每个菌株具有2个以上特征性的西方主要氨基酸序列FPLKRHDKVDDL-SKV, 68.8%(10/16)的菌株具有3个EPIYA基序, 25.0%(4/16)菌株具有4个和4个以上EPIYA基序, 以及紧随第3个EPIYA序列后的1个DDL序列或EDL序列(表1).

2.2 *H pylori*菌株的cagA 3'端可变区长短的变化 从513-1335 bp不等, 印度菌株最长, 3个菌株cagA 3'端可变区为1224-1335 bp.

2.3 EPIYA基序的个数与临床结果的关系 中国镇江地区20株用于测序的*H pylori*菌株, 胃炎7例, 消化性溃疡9例, 胃腺癌4例, 测序结果cagA蛋白羧基端的EPIYA的数目均为3个, 没有显示cagA蛋白羧基端的EPIYA数目与临床结果相关.

3 讨论

Dangeruta通过PCR方法, 研究了来自5个地区500多株*H pylori*的DNA基序, 发现*H pylori*的cagPAI由于存在基序的缺失、插入、替换, 而使cagPAI表现为5个基因类型, 其中3个基因型最常见: Ⅰ型主要分布在西班牙人、秘鲁人、危地马拉人、非洲人、美国人中; Ⅱ型主要分布在日本人和中国人中; Ⅲ型主要分布在印度人中[8]. 显示了*H pylori*基因结构的多态性具有明显的地域分布特征及中国菌株与日本菌株的相似性. 我们对来自不同国家和地区的*H pylori* cagA蛋白的序列研究发现, 可以根据cagA蛋白羧端可变区主要重复序列是KIASAGKGVGGFSGA序列抑或是 FPLKRHDKVDDLSKV序列, 分为2大类: 东亚型(拥有KIASAGKGVGGFSGA序列), 见于中国、日本、韩国、越南; 西方型(拥有FPLKRHDKVDDLSKV序列), 见于美国、哈萨克斯坦、印度、爱尔兰、哥斯达黎. 这与Higashi *et al*[9]的研究结果相符. 我们还发现了1个新的具有区域特征的序列, 即紧随第3个EPIYA后的1个含有3个氨基酸的序列: 在东亚型菌株中是DFD序列、在西方型菌株中是DDL序列、在爱尔兰菌株中是EDL序列. 我们还发现, 亚洲菌株可以表现为西方型的变异. 比如, 印度, 他的3个菌株均具有西方型菌株的特征, 所以, 其cagA蛋白属于西方型. 我们也曾经在测序的菌株中, 发现1株来源于十二指肠球部溃疡患者的菌株, 表现为西方菌株的特征, 属于西方型. 但并没有发现西方型菌株向东亚型菌株的变异. 这种情况是否与人种的迁徙而发生的*H pylori*的进化有关呢? 尚需进一步的研究证明.

近来的研究发现, 不同*H pylori*菌株的cagA

蛋白细菌毒力并不相同, 这主要涉及菌株的cagA 3'端可变区重复序列的数目的变化, 而重复序列数目的变化主要是指cagA蛋白羧端串联排列的EPIYA基序数目的变化, 因为EPIYA序列上的酪氨酸残基是cagA蛋白酪氨酸磷酸化的位点. 在cagA蛋白串联排列的EPIYA基序中, 第1, 第2个EPIYA基序分别称为EPIYA-A, EPIYA-B, 第3个EPIYA基序, 在西方型菌株中称为EPIYA-C, 在东亚型菌株中则被称为EPIYA-D. cagA蛋白进入宿主上皮细胞后, cagA在其EPIYA-C或EPIYA-D位点被磷酸化, 然后在此位点特异性的连接并激活SHP-2; cagA在其EPIYA-A或EPIYA-B位点被磷酸化后, 在此位点连接并激活Csk[9-11]. 因此具有较多EPIYA基序的cagA蛋白具有更强的磷酸化能力, 因而, 具有更强的生物活性. 虽然中国和日本均有有2个和4个EPIYA基序的报道[12-13], 可是我们的研究结果显示, 我们的20株中国菌株和GenBank中收集的12株东亚菌株, 均为3个EPIYA基序. 我们的20个测序的菌株中, 有4个来自胃癌、4个来自胃溃疡, 也均表现为3个EPIYA 基序. 因此我们认为cagA蛋白的毒力强弱除了与EPIYA基序的数目有关外, 应该还有其他我们未知的因素参与[14-15]. Yamaoka *et al*[11]根据cagA基因PCR结果及PCR产物测序结果, 将东亚型菌株分为A型、B型、C型、D型4型. 我们的序列研究发现: 我们的20株中国菌株和GenBank中收集的12株东亚菌株均表现为A型, 没有B型、C型、D型的发现, 显示东亚型菌株主要表现型为A型, 与Yamaoka的报道一致. 同时发现, 西方型菌株不能按此标准进行分型.

总之, 我们的结果认为不同地区的*H pylori*可以根据cagA蛋白羧端的重复序列是KIASAGKGVGGFSGA序列抑或是FPLKRHDKVDDLSKV序列、DFD序列抑或是DDL序列, 分为东亚型和西方型, 西方型菌株根据是DDL序列抑或是EDL序列, 分为非爱尔兰型和爱尔兰型. 87.8%的*H pylori*菌株具有3个EPIYA基序, 8.2%的菌株具有4个或以上EPIYA 基序, 没有发现EPIYA基序的数目与临床结果相关.

4 参考文献

1 Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci* 2005; 96: 835-843

2 Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, Tsubokawa M, Tohyama Y, Maeda S, Omata M, Suzuki T, Sasakawa C. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* 2000; 191: 593-602

3 Ando T, Goto Y, Maeda O, Watanabe O, Ishiguro K, Goto H. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 181-186

4 佟书娟, 陈军, 詹瑛, 杨丹丹, 刘亚平. 胃癌组织中幽门螺杆菌cagA和vacA的表达及与其感染的相关性. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2632-2635

5 杜雅菊, 赵晶, 赵瑞波, 李宝杰. 幽门螺杆菌CagA蛋白与胃癌组织中Bcl-2、p53蛋白表达的关系. 世界华人消化杂志 2003; 11: 554-557

6 Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, Azuma T, Hatakeyama M. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* 2006; 130: 1181-1190

7 Zhang Y, Argent RH, Letley DP, Thomas RJ, Atherton JC. Tyrosine phosphorylation of CagA from Chinese *Helicobacter pylori* isolates in AGS gastric epithelial cells. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 786-790

8 Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatino B, Su W, Pan Z, Garcia C, Hernandez V, Valdez Y, Mistry RS, Gilman RH, Yuan Y, Gao H, Alarcon T, Lopez-Brea M, Balakrish Nair G, Chowdhury A, Datta S, Shirai M, Nakazawa T, Ally R, Segal I, Wong BC, Lam SK, Olfat FO, Boren T, Engstrand L, Torres O, Schneider R, Thomas JE, Czinn S, Berg DE. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J Bacteriol* 2000; 182: 3210-3218

9 Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14428-14433

10 Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T, Higashi H, Hatakeyama M. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 261-276

11 Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S, Yuasa H, Saadat I, Murata-Kamiya N, Azuma T, Hatakeyama M. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 23130-23137

12 Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY, Sepulveda AR. Variants of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2258-2263

13 朱永良, 杜勤, 钱可大, 方平楚, 郑树. 幽门螺杆菌CagA C−端功能域特征及其生物学功能研究. 中华消化杂志 2004; 24; 278-281

14 Yan J, Wang Y, Shao SH, Mao YF, Li HW, Luo YH. Construction of prokaryotic expression system of 2 148-bp fragment from cagA gene and detection of cagA gene, CagA protein in *Helicobacter pylori* isolates and its antibody in sera of patients. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1183-1190

15 Yang GF, Deng CS, Xiong YY, Gong LL, Wang BC, Luo J. Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: association with *Helicobactor pylori* cagA (+) infection. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 491-496

■名词解释

EPIYA基序: 位于cagA蛋白羧基端可变区, 是一个含有5个氨基酸的序列, 即谷氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-酪氨酸-丙氨酸序列, 为cagA蛋白的磷酸化位点.

电编 李琪 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 750-754
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

银杏叶提取物对慢性乙型肝炎患者肝窦微循环障碍的影响

主余华, 王 京, 梁 斌, 任万华, 张春清

■背景资料
研究表明, 在肝病早期, 仅有轻度纤维化时就有肝微循环的改变, 当肝纤维化向肝硬化进展时, 微循环障碍更明显. 慢性乙型肝炎时存在肝脏微循环障碍已成为大家的共识. 有些学者提出可用改善微循环制剂如复方丹参、肝素等, 干扰或阻抑肝纤维化发展. 银杏叶提取物EGb具有降低血栓程度、改善血液流变学特性等作用. 目前有研究表明, EGb在慢性肝损伤、肝纤维化过程中具有保护预防作用. 但临床缺少系统的临床对照研究.

主余华, 王京, 梁斌, 任万华, 张春清, 山东大学山东省立医院消化内科 山东省济南市 250021
山东省科委优秀中青年科学家基金, No. 03BS016
通讯作者: 张春清, 250021, 山东省济南市, 山东省立医院消化内科. zhchqing@medmail.com.cn
电话: 0531-85186350
收稿日期: 2006-12-07 接受日期: 2007-01-04

Effect of Ginkgo biloba extract on liver microcirculatory dysfunction in patients with chronic hepatitis B

Yu-Hua Zhu, Jing Wang, Bin Liang, Wan-Hua Ren, Chun-Qing Zhang

Yu-Hua Zhu, Jing Wang, Bin Liang, Wan-Hua Ren, Chun-Qing Zhang, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital of Shandong University, Ji'nan 250021, Shandong Province, China
Supported by the Foundation of Shandong Provincial Science and Technology Commission for Excellent Young and Middle-Aged Scientists, No. 03BS016
Correspondence to: Chun-Qing Zhang, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital of Shandong University, Ji'nan 250021, Shandong Province, China. zhchqing@medmail.com.cn
Received: 2006-12-07 Accepted: 2007-01-04

Abstract

AIM: To evaluate the effect of Ginko biloba extract (EGb761) on the microcirculatory dysfunction of hepatic sinusoid in patients with chronic hepatitis B.

METHODS: Forty-seven chronic hepatitis B patients were randomly divided into EGb761 treatment group (n = 26) and control group (n = 21). All the cases underwent liver biopsy before and after treatment. The pathological changes of liver tissues were detected by HE staining. At the same time, 10 samples were selected from each group, and the changes of hepatic sinusoidal microcirculation were analyzed by electron microscopy before and after treatments.

RESULTS: After treatment, liver cirrhosis and tissue damages were improved significantly (P < 0.05) in EGb761 treatment group (inflammation score: 10.7 ± 4.8; fibrosis score: 8.3 ± 4.2) as compared with those in patients before treatment (inflammation score: 15.7 ± 6.3; fibrosis score: 11.9 ± 6.2) and the controls (inflammation score: 14.2 ± 6.6; fibrosis score: 11.5 ± 5.6). Meanwhile, electron microscopy showed that liver microcirculatory dysfunction was improved obviously in EGb761 group after treatment in comparison with that before treatment, and the congregation of red cells in liver sinus (32 *vs* 56, P < 0.01), the sedimentation of collagen in hepatic sinusoid and Disse space (23 *vs* 38, P < 0.05), the damage of hepatic sinusoidal endothelial cells (41 *vs* 59, P < 0.05), and the hepatic sinusoidal capilarization (17 *vs* 32, P < 0.05) were markedly alleviated. But no difference was found before and after treatment in control group (P > 0.05).

CONCLUSION: EGb761 can improve hepatic microcirculation possibly through protecting hepatic sinusoidal endothelial cells from injury, inhibiting aggregation of blood cells, collagenous proliferation in sinusoid or Disse space and hepatic sinusoidal capilarization.

Key Words: Ginko biloba extract; Chronic hepatitis B; Hepatic sinusoid; Hepatic microcirculation

Zhu YH, Wang J, Liang B, Ren WH, Zhang CQ. Effect of Ginkgo biloba extrat on liver microcirculation dysfunction in patients with chronic hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):750-754

摘要

目的: 探讨银杏叶提取物(EGb761)对慢性乙型肝炎患者肝窦微循环障碍的影响.

方法: 将47例慢性乙型肝炎患者分为EGb761治疗组26例及对照组21例, 治疗前后分别进行肝组织活检术, 肝组织行HE染色, 并各取10例电镜观察治疗前后的肝窦微循环变化.

结果: 治疗后肝活检证实, 与治疗前(炎症计分: 15.7±6.3; 纤维化计分: 11.9±6.2)和对照组治疗后(炎症计分: 14.2±6.6; 纤维化计分: 11.5±5.6)相比, EGb761治疗组肝组织损伤程度及纤维化程度明显改善(炎症计分: 10.7±

4.8; 纤维化计分: 8.3±4.2)(P<0.05); 与治疗前相比, EGb761治疗组电镜下肝窦内血细胞聚集或微血栓形成(32 *vs* 56, P<0.01)、窦腔及Disse隙胶原沉积(23 *vs* 38, P<0.05)、窦内皮损伤(41 *vs* 59, P<0.05)、毛细血管化(17 *vs* 32, P<0.05)等肝脏微循环障碍明显改善; 而对照组治疗前后均无明显变化(P>0.05).

结论: 银杏叶提取物能保护慢性乙肝患者肝窦内皮细胞, 抑制肝窦内血细胞聚集及微血栓形成, 抑制肝窦及Disse隙内胶原沉积及肝窦毛细血管化, 改善肝脏微循环.

关键词: 银杏叶提取物; 慢性乙型肝炎; 肝窦; 肝脏微循环

主余华, 王京, 梁斌, 任万华, 张春清. 银杏叶提取物对慢性乙型肝炎患者肝窦微循环障碍的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(7):750-754
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/750.asp

0 引言

慢性乙型肝炎患者存在肝脏微循环障碍, 肝脏微循环障碍是乙型肝炎的重要病理特征, 是导致肝炎慢性化的重要环节, 并且微循环障碍与肝纤维化相互促进、相互因果, 形成恶性循环, 是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段. 因此慢性乙型肝炎时改善微循环及抗肝纤维化治疗极有必要[1-2]. 作为传统的微循环改善剂及细胞保护剂, 银杏叶提取物在心脑血管疾病应用广泛, 能明显改善心脑等缺血性疾病的微循环障碍及组织损伤[3-4]. 我们前期动物实验研究表明, 银杏叶提取物可用抑制肝纤维化, 改善肝纤维化大鼠肝窦微循环障碍, 缓解肝细胞损伤, 未见明显副反应[5]. 我们以慢性乙型肝炎患者为研究对象, 观察银杏叶提取物标准品(EGb761)对慢性乙型肝炎患者肝窦微循环的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003-05/2006-06的慢性乙型肝炎患者47例, 诊断符合2000年病毒型肝炎防治方案的标准[6], 肝炎病史半年以上, HBsAg阳性, HBV DNA阳性, 但半年内ALT水平在正常值3倍以下; 治疗前均行肝穿刺活检及静脉抽血备检; 肝功能Child A级, 无腹水或下肢水肿; 超声检查无明显肝硬化征象; 无消化道出血病史; 无合并其他器质性疾病; 年龄<65岁, 其中男51例, 女23例, 年龄17-63(平均41)岁. 分为银杏叶组(n = 26例)和对照组(n = 21例); 试验前3-6 mo内未使用过或合并使用糖皮质激素、免疫调节剂、抗病毒药物及抗肝纤维化药物. 对照组静脉滴注易善复930 mg每日一次, 共4 wk, 银杏叶组除易善复外加用银杏叶提取物标准品(德国舒培大药厂提供, 商品名金纳多)70 mg, 静滴, 每日一次, 共4 wk. 两组患者的平均年龄、性别比例、平均病程及肝功能水平等差异均无显著性(表1).

表 1 两组患者的一般情况

分组	n	年龄(岁)	病程(年)	谷丙转氨酶(nkat/L)
EGb组	26	44.7±10.8	3.4±1.8	1261.9±308.4
对照组	21	42.9±11.3	3.3±1.7	1388.6±190.0

1.2 方法 于治疗前后行两次肝穿刺活检; 肝穿组织40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 备光镜观察; 两组各有10例留取约1 cm的穿刺组织用25 g/L戊二醛固定, 常规电镜制样.

1.2.1 光镜观察 26例银杏叶组和21例对照组治疗前后的肝穿刺组织, 石蜡包埋, 4 μm切片, 常规HE染色; 肝组织损伤程度采用Knodell计数法(HAI), 并按“HAI炎症积分”“HAI纤维化积分”分别进行统计.

1.2.2 电镜标本制作及观察 两组各有10例患者治疗前后的肝活检组织行电镜观察. 肝组织组织25 g/L戊二醛溶液中前固定, 4℃条件下保存, 再依次经PBS冲洗, 10 g/L锇酸后固定(4℃, 1 h), PBS冲洗, 50%-70%-80%-90%-95%-100%梯度酒精脱水各10 min, EPON812环氧树脂渗透聚合, 平板包埋36 h, 切成50-70 nm的切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色, H-600透射电镜观察, 每例患者治疗前后的切片各随机读取10个肝窦, 观察肝窦是否通畅、有无血栓形成及胶原纤维沉积; 内皮细胞有无破坏损伤; Disse隙有无细胞外基质沉积及有无肝窦的毛细血管化; 肝实质细胞的损伤情况. 每组治疗前后均统计100个肝窦 , 进行定量比较.

统计学处理 计量资料的各项指标均采用均数±标准差(mean±SD), 使用SPSS11.5软件包进行单因素方差分析及t检验、χ^2检验, P<0.05为有统计学意义.

2 结果

2.1 光镜观察应用EGb761治疗前后肝脏的组织学变化 治疗组治疗后较治疗前炎症及纤维化计分均明显下降, 与对照组比较有显著性差异(表

■相关报道
近几年关于中药对肝纤维化治疗研究较为热烈, 银杏叶提取物研究也较多, 本课题组及其他研究者既往动物实验表明, EGb761可用于治疗肝纤维化, 主要从病理、生理、细胞水平和分子生物水平, 研究其对肝纤维化生成和发展各个环节, 包括对星形细胞、细胞外基质代谢、胶原酶表达等的影响, 取得较好的疗效.

■**创新盘点**

本课题组及其他研究者既往动物实验表明，EGb761可用于治疗肝纤维化，并能取得较好的疗效，但相关的临床应用研究报道尤其是对肝脏微循环障碍方面的研究较少. 本研究即以慢性乙型肝炎患者为对象，观察银杏叶提取物对其肝脏微循环的改善，以进一步探讨银杏叶提取物抗肝纤维化的机制.

表 2 两组患者治疗前后病理半定量计分变化(mean ± SD)

分组	*n*	炎症计分	纤维化计分
EGb组			
治疗前	26	15.7 ± 6.3	11.9 ± 6.2
治疗后	26	10.7 ± 4.8[a]	8.3 ± 4.2[a]
对照组			
治疗前	21	15.6 ± 5.9	11.7 ± 5.4
治疗后	21	14.2 ± 6.6[c]	11.5 ± 5.6[c]

[a]$P<0.05$ *vs* 治疗前; [c]$P<0.05$ *vs* 治疗组治疗后.

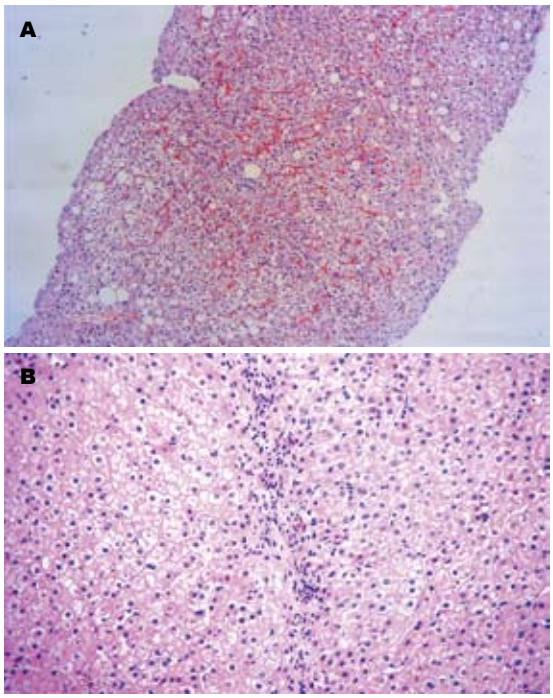

图 1 EGb761治疗前后肝组织(HE染色). A: 治疗前肝细胞显著肿胀，呈气球样变，可见点、片状嗜酸性小体，间质中有炎细胞浸润，肝窦腔内红细胞显著聚集; B: 治疗后肝细胞肿胀减轻，偶见嗜酸性小体，肝窦腔通畅.

2). 治疗前肝细胞显著肿胀，呈气球样变，可见点、片状嗜酸性小体，间质中有炎细胞浸润，肝窦腔内红细胞显著聚集. 治疗后肝细胞肿胀减轻，偶见嗜酸性小体，肝窦腔通畅(图1).

2.2 电镜观察EGb治疗前后肝窦微循环改变 电镜观察：治疗前两组肝细胞均显示不同程度损伤，线粒体肿胀、嵴突断裂，有的胞核固缩，可见肝细胞溶解坏死，代之以胶原组织(图2A)；治疗前56%的肝窦呈现微血栓形成(图2B)；38%的肝窦或Disse隙有不同程度的细胞外基质沉积(图2C)；59%的肝窦呈现窦内皮损伤或破坏，32%的肝窦表现为窦内皮窗孔减少或消失、基底膜形成或肝窦毛细血管化. 银杏叶治疗后，肝细胞损伤明显减轻(图2D)，肝窦内胶原纤维沉积及微血栓形成、Disse隙纤维沉积，肝窦内皮细胞损伤及肝窦内皮毛细血管化等的阳性率明显减少(表3)，而对照组治疗前后变化不明显.

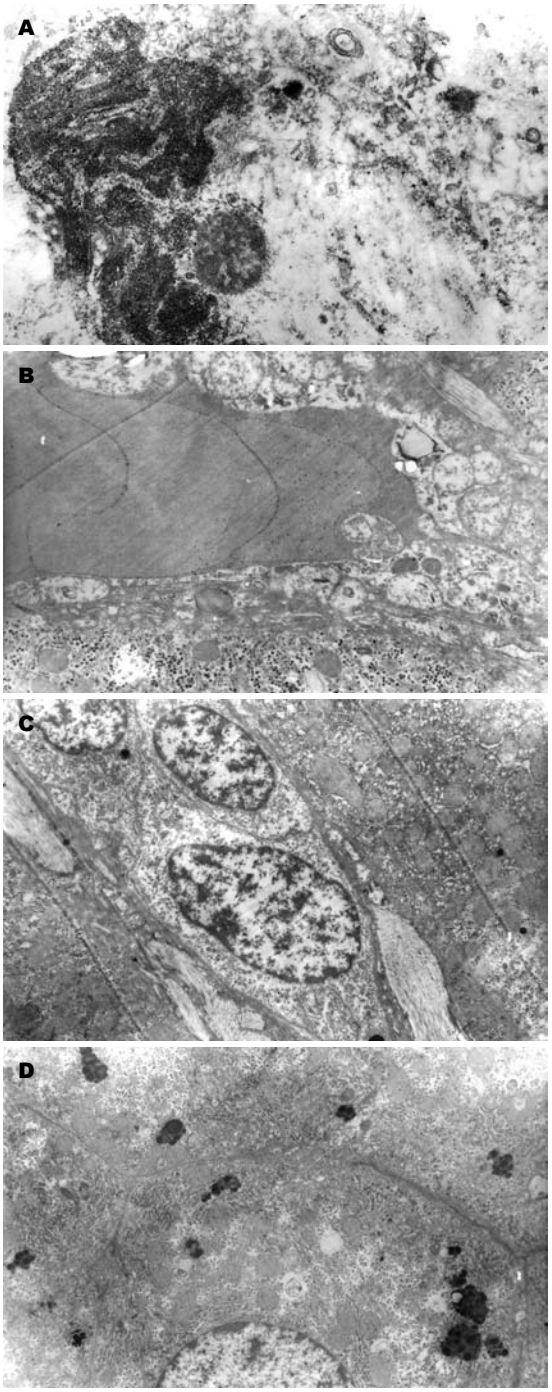

图 2 肝组织电镜下观察. A: EGb761治疗前肝细胞可见溶解坏死; B: EGb761治疗前肝窦微血栓形成，Disse隙胶原纤维沉积; C: EGb761治疗前肝窦内皮窗孔消失，Disse隙见胶原纤维沉积; D: EGb761治疗后肝细胞器有变性，但细胞形态、结构及细胞间连接基本正常.

3 讨论

肝窦是肝脏微循环的重要组成部分. 肝窦壁主

要由肝窦内皮细胞(SEC)组成, 正常SEC不同于一般的血管内皮细胞, 他在结构上的显著特点是有大量筛状排列的窗孔, 直径约0.1-1.0 μm, SEC下几乎没有基底膜. SEC的上述特点, 使肝窦具有极好的通透性便于肝细胞与血液之间进行活跃的物质交换. 慢性肝病时存在明显的肝脏微循环障碍, Wanless *et al*[7]对61例硬化肝的中等大小的肝静脉(直径0.2-3 mm)进行研究发现, 70%的肝静脉出现内膜纤维化, 且管腔至少减少了10%. 他们认为, 一些肝脏血管内膜存在的多层纤维化, 提示有反复发生的血栓形成. 也就是说, 血栓形成与血管壁纤维化, 乃至管腔闭塞之间存在着一定的因果联系. 研究表明, 在肝病早期, 仅有轻度纤维化时就有肝微循环的改变, 当肝纤维化向肝硬化进展时, 微循环障碍更明显[8]. 我们及其他作者研究均表明[1-2], 慢性乙型肝炎存在明显的肝窦微循环障碍, 其表现为肝窦内红细胞或血小板聚集, 微血栓形成, 堵塞管腔; 或内皮细胞受损破裂, 血细胞渗入Disse隙; 或肝细胞肿胀, 肝窦内众多淋巴细胞、单核细胞阻塞窦腔, 以至肝窦狭窄或阻塞、窦内皮损伤、血液及肝脏微循环障碍, 影响肝细胞的血液供应及物质交换, 肝细胞缺血、缺氧、变性或坏死. 其结果不仅导致肝窦压升高、引起肝细胞缺血缺氧及炎症反应, 还通过多种细胞因子激活HSC, 使之产生大量细胞外基质沉积于肝窦或Disse隙形成基膜样物质, 从而进一步加重肝窦微循环障碍、加重肝实质缺氧或缺血状态、加重纤维组织增生. 所以肝窦微循环障碍与肝组织损伤及肝纤维化关系密切, 并相互因果、相互影响, 共同促进肝病发展[1]. 改善肝脏微循环是慢性肝病治疗的重要环节. 目前, 国际上标准的银杏提取物EGb761主要可分为两大类: 24%黄酮类和6%萜内酯类. 现代药理学研究银杏提取物的中萜内酯类主要作用为: 改善微循环和解痉、拮抗血小板活化因子、降血脂、抗动脉硬化, 其黄酮类有调节免疫、清除自由基、抗氧化的作用[9-10]. 在心脑血管缺血性疾病中应用广泛, 对改善心脑血管微循环障碍及组织损伤已取得肯定疗效[3-4]. 目前有研究表明, EGB在慢性肝损伤、肝纤维化过程中具有保护预防作用[11-12].

我们发现, 银杏叶治疗组, 治疗后患者病理组织学得到了明显的改善, 炎症计分及纤维化计分均明显减轻. 电镜观察, 肝窦内血细胞聚集及微血栓形成消失或明显减少, 肝窦及Disse隙胶原沉积减轻, 肝窦内皮细胞损伤缓解, 肝窦腔通畅, 肝窦毛细血管化亦显著低于治疗前. 与我们动物实验结果相似[7,13]. 该结果进一步证实银杏叶提取物不仅能有效改善心脑血管供血不足, 还可有效改善慢性乙型肝炎患者的肝脏微循环障碍, 改善肝组织的血液灌注, 减轻肝纤维化及肝组织损伤.

表 3 EGb761治疗前后肝脏微循环变化(每组各统计100个肝窦)

分组	*n*	红细胞聚集或微血栓形成	肝窦或Disse隙胶原沉积	肝窦内皮损伤	毛细血管化
EGb组					
治疗前	100	56	38	59	32
治疗后	100	32^{bc}	23^{ac}	41^{ac}	17^{ac}
对照组					
治疗前	100	55	37	61	31
治疗后	100	53	34	57	29

$^{a}P<0.05$ *vs* 治疗前; $^{b}P<0.01$ *vs* 治疗前; $^{c}P<0.05$ *vs* 对照组治疗后.

■**应用要点**
本研究表明银杏叶提取物能保护慢性乙型肝炎患者肝窦内皮细胞, 抑制肝窦内血细胞聚集及微血栓形成, 抑制肝窦及Disse隙内胶原沉积及肝窦毛细血管化, 改善肝脏微循环. 研究结果可以指导临床用药.

银杏叶提取物改善肝窦微循环的机制可能与拮抗血小板活化因子、抑制血细胞聚集、保护肝窦内皮细胞损伤、抑制微血栓形成有关; 同时抑制肝星状细胞活化及细胞外基质沉积、减少肝窦及Disse间隙胶原形成[13-14], 也是EGb761改善肝窦微循环障碍的重要原因. 银杏叶提取物对肝窦微循环障碍的改善对慢性肝病的辅助治疗具有重要意义.

4 参考文献

1 严家春, 马勇, 陈文笔, 孙新华, 裴波. 乙型肝炎肝窦病变的免疫组织化学及电镜观察. 世界华人消化杂志 1999; 7: 943-947

2 Hao J, Shi J, Ren W, Han G, Zhu J, Wang S, Xie Y. Hepatic microcirculatory disturbances in patients with chronic hepatitis B. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 65-68

3 Kanowski S, Herrmann WM, Stephan K, Wierich W, Horr R. Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry* 1996; 29: 47-56

4 Smith PF, Maclennan K, Darlington CL. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J Ethnopharmacol* 1996; 50: 131-139

5 张春清, 朱菊人, 石恒美, 吕晓霞. 银杏叶提取物对大鼠肝组织TGF-β_1 mRNA表达及胶原沉积的影响. 中西医结合肝病杂志 2001; 11: 284-286

6 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分

■同行评价
本文研究了银杏叶提取物对慢性乙型肝炎患者肝窦微循环障碍的影响，实验思路清晰，方法可信，有较高的科学价值.

会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
7 Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology* 1995; 21: 1238-1247
8 Sherman IA, Pappas SC, Fisher MM. Hepatic microvascular changes associated with development of liver fibrosis and cirrhosis. *Am J Physiol* 1990; 258: H460-465
9 潘宇政. 银杏黄酮甙对人体免疫机能的影响. 广西医科大学学报 1998; 15: 27-28
10 何美霞, 刘方洲, 赵一, 牛志英. 银杏果袋泡茶抗自由基及改善微循环作用的实验研究. 中国中医药科技 1997; 4: 91-92
11 He SX, Luo JY, Wang YP, Wang YL, Fu H, Xu JL, Zhao G, Liu EQ. Effects of extract from Ginkgo biloba on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3924-3928
12 Luo YJ, Yu JP, Shi ZH, Wang L. Ginkgo biloba extract reverses CCl4-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1037-1042
13 Zhang C, Zu J, Shi H, Liu J, Qin C. The effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on hepatic sinusoidal endothelial cells and hepatic microcirculation in CCl4 rats. *Am J Chin Med* 2004; 32: 21-31
14 Zhang C, Zhu Y, Wan J, Xu H, Shi H, Lu X. Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation, cytokines and extracellular matrix of hepatic stellate cells. *Liver Int* 2006; 26: 1283-1290

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

2007年国际会议

Meeting Canadian Digestive Diseases Week (CDDW)
16–20 February 2007
Banff - AB
cagoffice@cag-acg.org
www.cag-acg.org/cddw/cddw2007.htm

Meeting Falk Symposium 158: Intestinal Inflammation and Colorectal Cancer
23–24 March 2007
Sevilla
symposia@falkfoundation.de

Meeting Falk Symposium 159: IBD 2007 - Achievements in Research and Clinical Practice
4–5 May 2007
Istanbul
symposia@falkfoundation.de

Digestive Disease Week
19–24 May 2007
Washington Convention Center, Washington DC

Meeting ESGAR 2007 18th Annual Meeting and Postgraduate Course
12–15 June 2007
Lisbon
fca@netvisao.pt

Meeting Falk Symposium 160: Pathogenesis and Clinical Practice in Gastroenterology
15–16 June 2007
Portoroz
symposia@falkfoundation.de

Meeting ILTS 13th Annual International Congress
20–23 June 2007
Rio De Janeiro
www.ilts.org

Meeting 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
27–30 June 2007
Barcelona
meetings@imedex.com

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 755-757
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

幽门螺杆菌感染胃癌组织MMP-2和MMP-9表达及其对胃癌侵袭转移能力的影响

王 舰, 李胜军, 赵成海, 罗恩杰

王舰, 中国医科大学口腔医学院 辽宁省沈阳市 110002
李胜军, 中国医科大学基础医学院免疫学教研室 辽宁省沈阳市 110001
赵成海, 中国医科大学基础医学院病理生理教研室 辽宁省沈阳市 110001
罗恩杰, 中国医科大学基础医学院病原生物学教研室 辽宁省沈阳市 110001
通讯作者: 王舰, 110002, 辽宁省沈阳市和平区南京北街117号, 中国医科大学口腔医学院. wangjcmu@sina.com
电话: 024-22892645
收稿日期: 2006-12-11 接受日期: 2007-01-10

Expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in *H pylori*-infected gastric cancer tissues and their effects on the invasion and metastasis of gastric cancer

Jian Wang, Sheng-Jun Li, Cheng-Hai Zhao, En-Jie Luo

Jian Wang, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, Liaoning Province, China
Sheng-Jun Li, Department of Immunology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Cheng-Hai Zhao, Department of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
En-Jie Luo, Department of Pathogenic Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Jian Wang, School of Stomatology, China Medical University, 117 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110002, Liaoning Province, China. wangjcmu@sina.com
Received: 2006-12-11 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To detect the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gastric tissues with *H pylori* infection, and to analyze the effect of *H pylori* infection on the invasion and metastasis of gastric cancer.

METHODS: A total of 42 cases of gastric cancer specimens were included in this study. *H pylori* infection was determined by improved Giemsa method and the expression of MMP-2 and MMP-9 were detected by immunohistochemistry. Fisher's exact was used to analyze the correlation between *H pylori* infection and the clinical pathological features of gastric cancer.

RESULTS: *H pylori* infection was confirmed in 26 of 42 cases, and it was correlated with the staging and lymph node metastasis, but not with the sex, age of patients and histological types. *H pylori* infection was also significantly correlated with the expression of MMP-9 and MMP-2 (χ^2 = 7.77, P < 0.01; χ^2 = 8.08, P < 0.01).

CONCLUSION: *H pylori* infection may promote the invasion and metastasis of gastric cancer by increasing the expression of MMP-2 and MMP-9.

Key Words: *H pylori*; Gastric cancer; Matrix metalloproteinase-2; Matrix metalloproteinase-9; Immunohistochemistry

Wang J, Li SJ, Zhao CH, Luo EJ. Expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in *H pylori*-infected gastric cancer tissues and their effects on the invasion and metastasis of gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):755-757

摘要

目的: 分析幽门螺杆菌感染对胃癌转移侵袭能力的影响, 同时对其基质金属蛋白酶2(MMP-2)和基质金属蛋白酶9(MMP-9)表达情况进行检测.

方法: 采用改良的Giemsa法检测幽门螺杆菌感染, 免疫组化法检测42例胃癌标本MMP-9和MMP-2表达情况. 采用Fisher's exact检验对幽门螺杆菌感染和胃癌患者临床病理特征的相关性进行分析.

结果: 胃癌组织中幽门螺杆菌感染率为61.9% (26/42). 幽门螺杆菌感染与胃癌的分期和淋巴结转移状况相关, 与患者性别、发病年龄、及组织类型无相关性. 幽门螺杆菌感染与MMP-9和MMP-2表达均具有相关性(χ^2 =

■背景资料
幽门螺杆菌感染是胃癌发病的重要原因之一, 且其与胃癌的不良预后相关. 金属基质蛋白酶则与多种恶性肿瘤的转移侵袭能力相关. 本文分析了幽门螺杆菌感染对胃癌转移侵袭能力的影响, 同时通过检测MMP-9和MMP-2, 对其机制亦进行了探讨.

■创新盘点
本研究发现幽门螺杆菌感染能够增加胃癌的侵袭转移能力，其机制可能与MMP-9和MMP-2表达增加有关.

7.77, P<0.01; χ^2 = 8.08, P<0.01).

结论：幽门螺杆菌感染能够增加胃癌的侵袭转移能力，其机制可能与MMP-9和MMP-2表达增加有关.

关键词：幽门螺杆菌；胃癌；基质金属蛋白酶-9；基质金属蛋白酶-2；免疫组化

王舰，李胜军，赵成海，罗恩杰. 幽门螺杆菌感染胃癌组织MMP-2和MMP-9表达及其对胃癌侵袭转移能力的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(7):755-757
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/755.asp

0 引言

目前，幽门螺杆菌感染已经被国际上确认为胃癌的重要病因之一，且其与胃癌的不良预后相关. 而胃癌的侵袭转移是导致胃癌不良预后的重要因素. 基质金属蛋白酶(MMPs)家族成员中的MMP-9和MMP-2能有效的分解基底膜的主要成分Ⅳ型胶原蛋白[1]，两者的过度表达常引起恶性肿瘤的转移侵袭能力增强. 因此，我们对幽门螺杆菌感染的胃癌患者的侵袭转移能力进行分析，同时对MMP-2和MMP-9表达情况进行检测，以探讨幽门螺杆菌感染对胃癌侵袭转移能力的影响及其相关机制.

1 材料和方法

1.1 材料 来自于中国医科大学附属第一、第二医院胃癌组织标本42例，男28例，女14例，平均年龄52.4岁. 标本获取后即冷冻于液氮之中，并保存在-80℃条件下备用. 患者具体临床特征见表1.

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 冰冻切片在室温下风扇吹干. 采用40 g/L多聚甲醛固定30 min. 300 mL/L H_2O_2 1份加纯甲醇50份混合，室温浸泡30 min，以灭活内源性过氧化物酶. 滴加50 g/L BSA封闭液，室温下20 min. 滴加单克隆MMP-9和MMP-2抗体，然后PBS(pH: 7.2-7.6)清洗. 滴加生物素化山羊抗小鼠IgG. 滴加试剂SABC，20-37℃下20 min. PBS(pH: 7.2-7.6)清洗5 min. 然后DAB显色. 染色结果判断：镜下任选5个视野，阳性细胞(存在明显棕黄染色)占总细胞数25%以上为MMP-9和MMP-2阳性表达. 采用改良的Giemsa法判断幽门螺杆菌感染是否阳性.

统计学处理 采用Fisher's exact检验分析幽门螺杆菌与患者临床病理特征之间的相关性，采用χ^2检验分析幽门螺杆菌感染与MMP-9和MMP-2表达之间的相关性，P<0.05有统计学意义.

表 1 胃癌患者的临床病理特征

因素	分类	n	%
性别	男	28	66.7
	女	14	33.3
年龄(诊断时)	>50	25	59.5
	≤50	17	40.5
分期	T1	18	42.9
	T2-T4	24	57.1
淋巴结转移	N0	19	45.2
	N1-N3	23	54.8
组织类型	弥散型	24	57.1
	肠型	18	42.9

表 2 *H pylori*感染与患者临床病理特征之间的相关性

因素	分类	n	*H pylori*(+)	*H pylori*(-)	P
性别	男	28	18	10	0.18
	女	14	8	6	
年龄(诊断时)	>50	25	15	10	0.18
	≤50	17	11	6	
分期	T1	18	5	13	0.03
	T2-T4	24	21	3	
淋巴结转移	N0	19	6	13	0.01
	N1-N3	23	20	3	
组织类型	弥散型	24	14	10	0.22
	肠型	18	12	6	

2 结果

2.1 幽门螺杆菌感染与胃癌患者临床病理特征之间的相关性 改良Geimsa法染色显示，42例胃癌标本中有26例存在幽门螺杆菌感染. 采用Fisher's exact检验分析，P<0.05有统计学意义，TNM分期按照国际癌症协会(UICC)标准. 结果显示，幽门螺杆菌与胃癌分期及淋巴结转移状况具有相关性，而与患者性别、发病年龄、组织类型及肿瘤大小均无相关性(表2).

2.2 幽门螺杆菌感染与MMP-9表达的相关性 免疫组化染色结果显示，26例幽门螺杆菌感染的胃癌病例中，有18例存在MMP-9染色，16例幽门螺杆菌感染阴性的患者中，仅有4例检出MMP-9阳性. 两者差异显著(χ^2 = 7.77, P<0.01, 表3)，26例幽门螺杆菌感染的胃癌病例中，有21例存在MMP-2染色，16例幽门螺杆菌感染阴性的患者中，有6例检出MMP-2阳性. 两者差异显著(χ^2 = 8.08, P<0.01, 表3).

表 3 *H pylori*感染与MMP-9, MMP-2表达的相关性

	n	MMP-9 (+)	MMP-9 (-)	MMP-2 (+)	MMP-2 (-)
H pylori(+)	26	18	8	21	5
H pylori(-)	16	4[b]	12	6[b]	10

[b]$P<0.01$ *vs H pylori*(+)阳性组.

3 讨论

自1983年幽门螺杆菌被发现以来, 幽门螺杆菌感染已经被认为是胃癌发病的重要原因[2-3]. 通常情况下, 幽门螺杆菌感染会引起胃黏膜上皮出现慢性炎症, 进而发生黏膜萎缩及不典型增生, 甚至在部分患者中出现恶性转化[1,4]. 幽门螺杆菌感染引起胃上皮炎症与一些细胞因子相关. 当幽门螺杆菌与胃上皮细胞黏附后, 会诱导IL-8的分泌, 而IL-8作为局部的一种化学趋化因子能够吸引多形态单核细胞, 而后者则是破坏胃黏膜屏障导致幽门螺杆菌侵入黏膜下层的关键性因素[5]. 幽门螺杆菌引起的黏膜损伤常以粒细胞和淋巴细胞浸润为特征, 后者可诱导细胞介导的免疫反应[6-7], 相关的细胞因子包括IFN-γ, TNF-α和IL-1β等[8-10].

作为一种常见的恶性肿瘤, 胃癌致死率在癌症中占第2位. 其较高的致死率常与其较早发生侵袭转移有关. 研究显示幽门螺杆菌阳性的胃癌易发生转移[11]. 李新华 *et al*[12]证实幽门螺杆菌能促进裸鼠移植癌的生长及肺转移. 另有研究显示, 金属基质蛋白酶家族中部分成员与恶性肿瘤的侵袭性和转移性增强有关[13-14]. MMP-2的激活与胃癌进展密切相关, 可作为胃癌的预后因素, 幽门螺杆菌感染可引起胃癌细胞MMP-3的分泌增强及活性增强[15]. 金属基质蛋白酶能够降解基底膜和细胞外基质中的主要成分胶原, 从而使肿瘤细胞可以浸润到周围组织并向远处转移. 我们的研究显示, 幽门螺杆菌感染阳性的胃癌比阴性胃癌更易发生局部的浸润和淋巴结转移. 同时幽门螺杆菌感染阳性的胃癌与MMP-2和MMP-9表达增多具有相关性. 因此本文研究结果提示, 幽门螺杆菌感染导致胃癌转移侵袭能力增强可能与MMP-2和MMP-9表达增多有关.

4 参考文献

1 Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 321-333

2 庄小强, 林三仁. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2000; 8: 206-207

3 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌致病因子研究进展. 世界华人消化杂志 2002; 10: 455-458

4 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-789

5 Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, Becker I, Wagner H, Prinz C. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol* 2002; 168: 3033-3041

6 Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, Brooks EG, Graham DY, Reyes VE, Ernst PB. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 1998; 114: 482-492

7 Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 615-640

8 Bodger K, Crabtree JE. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *Br Med Bull* 1998; 54: 139-150

9 Crabtree JE, Court M, Aboshkiwa MA, Jeremy AH, Dixon MF, Robinson PA. Gastric mucosal cytokine and epithelial cell responses to *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Pathol* 2004; 202: 197-207

10 Naumann M, Crabtree JE. *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol* 2004; 12: 29-36

11 Morgner A, Miehlke S, Fischbach W, Schmitt W, Muller-Hermelink H, Greiner A, Thiede C, Schetelig J, Neubauer A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. Complete remission of primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2041-2048

12 李新华, 张桂英, 罗非君, 徐美华, 李乾. 胃癌细胞系幽门螺杆菌感染对金属蛋白酶表达的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 544-546

13 Wu ZY, Li JH, Zhan WH, He YL. Lymph node micrometastasis and its correlation with MMP-2 expression in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2941-2944

14 Dicken BJ, Graham K, Hamilton SM, Andrews S, Lai R, Listgarten J, Jhangri GS, Saunders LD, Damaraju S, Cass C. Lymphovascular invasion is associated with poor survival in gastric cancer: an application of gene-expression and tissue array techniques. *Ann Surg* 2006; 243: 64-73

15 Kate V, Ananthakrishnan N, Badrinath S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on the ulcer recurrence rate after simple closure of perforated duodenal ulcer: retrospective and prospective randomized controlled studies. *Br J Surg* 2001; 88: 1054-1058

■同行评价

本文研究了幽门螺杆菌感染对胃癌转移侵袭能力的影响, 同时对其基质金属蛋白酶2(MMP-2)和基质金属蛋白酶9(MMP-9)表达情况进行检测. 文章有较好的理论和临床意义.

电编 张敏 编辑 王晓瑜

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 758-761
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

肠化胃黏膜病变组织HSP60的表达与幽门螺杆菌感染的相关性

刘东屏, 吕晓辉, 张艳梅, 王炳元

■背景资料
热休克蛋白(HSP)是一种高水平表达的蛋白, HSP在分子伴侣及细胞保护方面的作用日益受到重视. HSP在肠化胃黏膜中的表达及与幽门螺旋杆菌(*H pylori*)的关系的研究报道较少, HSP在*H pylori*感染过程中生物和免疫反应可能对疾病的治疗有重要的指导意义.

刘东屏, 吕晓辉, 张艳梅, 王炳元, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
通讯作者: 刘东屏, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化内科. dpl19632003@yahoo.com.cn
电话: 024-83282199
收稿日期: 2006-11-14 接受日期: 2006-12-18

Expression of heat shock protein 60 in gastric mucosa with intestinal metaplasia and its correlation with *Helicobacter pylori* infection

Dong-Ping Liu, Xiao-Hui Lv, Yan-Mei Zhang, Bing-Yuan Wang

Dong-Ping Liu, Xiao-Hui Lv, Yan-Mei Zhang, Bing-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Dong-Ping Liu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. dpl19632003@yahoo.com.cn
Received: 2006-11-14 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of heat shock protein 60 (HSP60) and *H pylori* infection in gastric mucosa with intestinal metaplasia (IM).

METHODS: A total of 171 IM mucosa (54, 76, and 41 cases for type Ⅰ, Ⅱ, and Ⅲ, respectively) and 89 controls (40 and 49 cases for superficial gastritis and gastric cancer, respectively) were included in this study. SP immunohistochemisty was used to detect the expression of HSP60 and *H pylori* infection was judged by enzyme-linked immunosorbnent assay (ELISA), anti-*H pylori* IgG detection and *H pylori* -DNA polymerase chain reaction (PCR), respectively.

RESULTS: HSP60 expression was moderately positive in gastric mucosa with type Ⅰ and Ⅱ and Ⅲ IM; the positive rate was 35.19% and 51.32% and 75.61%, and the over-expression rate was 1.9%, 3.9% and 19.5%, respectively. HSP60 expression was weak or moderately positive in superficial gastritis, and the positive rate was 30.00%. The positive rate of HSP60 expression in IM mucosa was increased statistically as compared with that in superficial gastritis (P < 0.01). Moderately or strongly positive expression of HSP60 was predominant (73.47%) in gastric cancer, and the over-expression rate was 34.69%, which was markedly higher than that in type Ⅰ and type Ⅱ IM. There was a negative relationship between HSP60 expression and *H pylori* infection of IM mucosa (r = -0.191, P = 0.012).

CONCLUSION: HSP60 over-expression occurs in the progression of gastric mucosal lesions, and *H pylori* infection of IM mucosa is associated with HSP60 expression.

Key Words: Heat shock protein 60; Intestinal metaplasia; Gastric cancer; *Helicobacter pylori*

Liu DP, Lv XH, Zhang YM, Wang BY. Expression of heat shock protein 60 in gastric mucosa with intestinal metaplasia and its correlation with *Helicobacter pylori* infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):758-761

摘要

目的: 探讨HSP60在肠化胃黏膜组织中的表达及与*H pylori*感染之间的关系.

方法: 对171例肠化胃黏膜组织其中Ⅰ型肠化54例、Ⅱ型肠化76例、Ⅲ型肠化41例, 对照组浅表性胃炎40例, 胃癌49例, 采用SP免疫组织化学技术进行胃黏膜HSP60的检测, 用ELISA, *H pylori* IgG抗体检测及*H pylori*-DNA PCR方法进行*H pylori*感染情况的判定.

结果: HSP60在肠化胃黏膜组织中的表达主要为中等强度阳性, Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ型肠化胃黏膜组织的阳性率分别为35.19%, 51.32%, 75.61%, 过表达率分别为1.9%, 3.9%和19.5%; 浅表性胃炎组织中的表达多为弱阳性或中等强度阳性, 阳性表达率为30.00%, 与浅表性胃炎相比肠化胃黏膜组织中HSP60的表达显著增加

(P<0.01); HSP60在胃癌组织的表达以强阳性和中等强度阳性为主, 阳性表达率为73.47%, 过表达率为34.69%, 明显高于Ⅰ, Ⅱ型肠化胃黏膜组织中的表达, 与Ⅲ型肠化胃黏膜组织相比差异不显著(P>0.05), 肠化胃黏膜组织的*H pylori*感染和HSP60表达有明显的相关性(r = -0.191, P = 0.012).

结论: HSP60的过度表达发生在胃黏膜病变的进展过程中; 肠化胃黏膜组织中*H pylori*感染和HSP60表达有明显的相关性.

关键词: 热休克蛋白60; 肠化胃黏膜; 胃癌; 幽门螺杆菌

刘东屏, 吕晓辉, 张艳梅, 王炳元. 肠化胃黏膜病变组织HSP60的表达及与幽门螺杆菌的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(7):758-761
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/758.asp

0 引言

热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)是生物细胞在生理应激或病理状态以及各种环境因素的刺激下所产生的一类蛋白质, 按其分子质量不同可分为HSP27, HSP60, HSP70, HSP90等, 各具特定的表达位置和生理功能[1]. 其中HSP60蛋白家族是存在于所有活的生物组织中最保守的蛋白, 无论是在原核生物还是真核生物, 动物还是植物中都广泛存在. HSP通过对多种蛋白质的构象影响参与细胞生长、繁殖等重要生命过程, 具有细胞保护和免疫调节作用[2-3]. 研究表明胃黏膜在接触各种外源性刺激物和内源性刺激因素后将迅速合成HSP60, 以发挥对胃黏膜细胞的保护作用[4]. *H pylori*感染在胃疾病发生中的病因学意义已经得到共识. *H pylori*感染后机体产生免疫反应, 这种反应是否诱发了HSP的表达, 有研究发现抗HSP免疫反应在*H pylori*感染的胃疾病中有一定作用[5]. 本实验对HSP60在肠化胃黏膜、浅表性胃炎和胃癌组织中的表达进行了测定, 并同步检测了*H pylori*感染, 以此探讨HSP60在不同肠化胃黏膜病变时的表达以及肠化胃黏膜组织中HSP60与*H pylori*感染之间的相互关系.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2001-07/2003-05我院外科手术标本, 其中肠化胃黏膜171例, 浅表性胃炎胃黏膜40例, 胃癌组织49例, 所有标本均经HE染色对所取组织进行了病理学诊断. 即用型mAb HSP60、即用型SP(链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶法, Streptavidin Peroxidase, SP)试剂盒、DAB底物试剂盒均购于福州迈新生物技术开发公司. *H pylori*-DNA PCR试剂盒购于上海复华公司. 血清抗*H pylori*-IgG抗体ELISA检测试剂盒购于华美生物工程天津分公司.

1.2 方法 利用HID-ABpH2.5-PAS黏蛋白组织化学染色进行肠化分型, 根据形态学、细胞分化程度及分泌黏蛋白不同将肠化分为三型: Ⅰ型(完全性): 腺管直, 结构规整, 腺上皮由成熟的吸收细胞和杯状细胞分泌唾液酸黏液为主, 呈蓝色着色. Ⅱ型(不完全性): 腺管伸长, 弯曲并可见轻度结构变形, 腺上皮以缺乏或极少吸收细胞和出现不同分化阶段的柱状黏液细胞为主着色以蓝色为主, 少量红色或黑色. Ⅲ型(不完全性)腺管结构变形, 细胞不典型性和细胞去分化程度较Ⅱ型显著, 柱状细胞分泌硫酸黏液为主, 也可分泌中性黏液, 潘氏细胞缺如, 着色以黑色为主, 少量蓝色或红色; 利用SP免疫组织化学技术进行HSP60检测, 对胃黏膜组织石蜡包埋切片, 以PBS置换一抗作为空白对照, 已知阳性切片作为阳性对照, DAB显色后细胞核呈棕黄色或伴有胞核棕黄色颗粒者为阳性细胞, 光学显微镜下计数20个以上高倍视野阳性细胞. 阴性(-): 为无阳性细胞或阳性细胞数小于5%, 弱阳性(+): 阳性细胞数6%-30%, 中等强度阳性(++): 阳性细胞数为31%-60%, 强阳性(+++): 阳性细胞数大于60%, 以中等强度阳性和强阳性为过表达[4]. 利用HE, *H pylori*-DNA PCR及血清ELISA检测*H pylori* IgG抗体3种方法进行*H pylori*感染情况的判定, HE染色后, 光学显微镜下观测*H pylori*感染后, 胃黏膜表面黏液层及小凹上皮内可见“S”型弯曲杆状细菌阳性标本, *H pylori*-DNA PCR扩增片段为430 bp, 取10 μL扩增产物与1 μL溴酚蓝混匀, 用20 g/L琼脂糖凝胶电泳30 min, 电压5 V/cm, 用紫外线透射仪检查, 若标本扩增带与阳性扩增带处同一位置, 判断为阳性, 否则为阴性.

统计学处理 采用秩和检验和Spearman秩相关检验, P<0.05有统计学意义.

2 结果

2.1 不同胃黏膜病变组织中HSP60的表达 浅表性胃炎和肠化胃黏膜组阳性率比U = 2.308, P = 0.021<0.05; 浅表性胃炎和胃癌组比较U = 4.549, P = 5×10^{-6}<0.001; 肠化黏膜和胃癌阳性率比U = 4.458, P = 8×10^{-6}<0.001; Ⅰ, Ⅱ型肠化胃黏膜与Ⅲ型肠化相比U = 5.326, P = 1×

■**同行评价**
本文研究了, *H pylori*感染对胃黏膜肠化生及胃癌的影响进行探讨, 选题有其新颖之处.

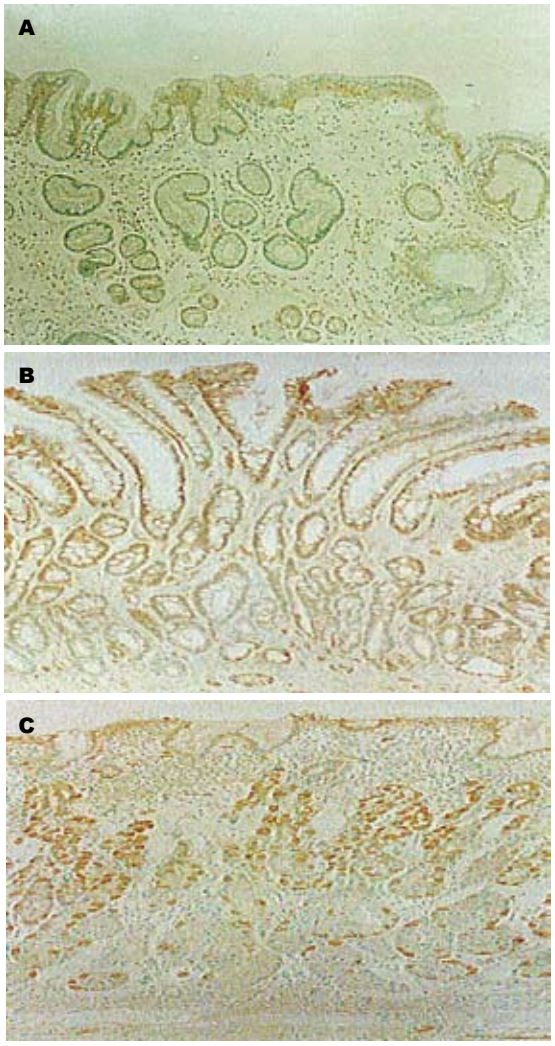

图 1 不同分型的肠化胃黏膜组织中的HSP60的表达. A:(×10); B: Ⅱ型胃黏膜上皮细胞的细胞核内可见棕黄色颗粒(×20); C: Ⅲ型(×10).

10^{-7}<0.001; Ⅲ型肠化与胃癌相比U = 1.005, P = 0.315>0.05; HSP60在肠化胃黏膜组织中表达主要为中等强度, 不同分型的恶肠化胃黏膜组织中的HSP60表达(图1), 浅表性胃炎组织中的表达多为弱阳性或中等强度阳性, HSP60在胃癌组织的表达以强阳性和中等强度阳性为主(表1). 浅表性胃炎的阳性过表达率为5%, Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型过表达率分别为1.9%、3.9%和19.5%, 胃癌组织的阳性过表达率为34.69%.

2.2 *H pylori*感染与HSP60表达的相关性 HSP60的表达与*H pylori*感染具有相关性(r_s = -0.191, P = 0.012<0.05)(表2).

3 讨论

热休克蛋白, 又称应激蛋白(stress protein, SP). 在应激因素作用下, 细胞可在翻译和转录水平调整蛋白合成, 改变细胞的代谢和功能, 可以提供结合蛋白, 协同参与抗原加工、递呈、免疫球蛋白装配及“T”细胞导航, 在机体的抗感染免疫、自身免疫特别是肿瘤免疫中起重要作用[6-7]. 胃癌形成、发展的多阶段模式是: 浅表性胃炎-萎缩性胃炎-肠上皮化生-不典型增生-胃癌, 其中肠上皮化生是胃黏膜良性病变向胃癌演变的中间过程, 不同类型的肠化是胃黏膜病变的不同阶段. 本研究发现, HSP60在浅表性胃炎-不同分型的肠化胃黏膜组织-胃癌组织中的表达阳性率呈逐渐增高趋势分别为30.00%, 35.19%, 51.32%, 75.61%, 73.47%, 其中肠化胃黏膜和胃癌组织中的HSP60表达阳性率显著高于浅表性胃炎组、Ⅲ型肠化胃黏膜的阳性表达率高于Ⅰ, Ⅱ型肠化胃黏膜阳性表达率的总和, 肠化黏膜组HSP60表达阳性率明显高于胃癌组差异显著(P<0.05). 提示HSP60的表达发生在胃黏膜病变的进展过程中, HSP60表达与细胞的转化和恶变过程密切相关. 本研究检测了肠化胃黏膜中*H pylori*感染组与非感染组中HSP60表达情况, 结果显示肠化胃黏膜中*H pylori*阳性组的HSP60阳性表达率和*H pylori*阴性组相比差异显著. 考虑其机制可能为: (1)文献报道*H pylori*作为一种外源性刺激能够引起正常胃黏膜产生炎症, 诱导机体产生体液免疫和细胞免疫反应, 产生应激蛋白HSP(包括HSP60), 肠化胃黏膜组织仍然具有这种应答反应. (2)*H pylori*的HSPB与人的HSP60同源, 可能通过免疫交叉反应上调胃黏膜HSP60表达水平, 故宿主对*H pylori*的反应, *H pylori*感染诱导的HSP60的表达, 可能参与了胃黏膜损伤、修复、癌变的形成过程.

表 1 HSP60在不同胃黏膜病变组织中的表达

疾病类型	n	HSP60表达(n)				阳性百分比(%)
		−	+	++	+++	
浅表性胃炎	40	28	7	3	2	30.00(12/40)
肠化胃黏膜						
Ⅰ型	54	35	16	2	1	35.19(19/54)
Ⅱ型	76	37	27	9	3	51.32(39/76)
Ⅲ型	41	10	12	11	8	75.61(31/41)
胃癌	49	13	8	11	17	73.47(36/49)

表 2 HSP60的表达与*H pylori*感染的同步检测结果

分组	n	HSP60表达(n)				阳性百分比(%)
		−	+	++	+++	
*H pylori*阳性肠化胃黏膜组织	109	44	40	16	9	59.63(65/109)
*H pylori*阴性肠化胃黏膜组织	62	38	15	6	3	38.71(24/62)

4 参考文献

1 Dhaubhadel S, Browning KS, Gallie DR, Krishna P. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *Plant J* 2002; 29: 681-691

2 Moseley PL. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann NY Acad Sci* 1998; 856: 206-213

3 Kamoshida S, Satoh Y, Kamiya S, Tsutsumi Y. Heat shock protein 60 (HSP60) immunoreactivity in gastric epithelium associated with Helicobacter pylori infection: a pitfall in immunohistochemically interpreting HSP60-mediated autoimmune responses. *Pathol Int* 1999; 49: 88-90

4 Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl: D12-D19

5 Takenaka R, Yokota K, Ayada K, Mizuno M, Zhao Y, Fujinami Y, Lin SN, Toyokawa T, Okada H, Shiratori Y, Oguma K. Helicobacter pylori heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. *Microbiology* 2004; 150: 3913-3922

6 Hauet-Broere F, Wieten L, Guichelaar T, Berlo S, van der Zee R, Van Eden W. Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Ann Rheum Dis* 2006; 65 Suppl 3: iii65-iii68

7 Ehrenfried JA, Herron BE, Townsend CM Jr, Evers BM. Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers. *Surg Oncol* 1995; 4: 197-203

电编 李琪 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的大型综合性消化病学类学术期刊. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号.《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》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》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展. 从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线http://www.wjgnet.com免费阅读全文.《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊.《世界华人消化杂志》开通了http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 762-766
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

胶囊内镜对小肠疾病诊断和治疗的影响程度

陈 孝, 张子其, 邵 勇, 张 钰, 张建萍, 王亚红

■背景资料
小肠疾病诊断一直是临床医学的难点, 既往的诊断方法比如小肠钡灌、血管造影等均无法获得满意的效果. 胶囊内镜的面世和临床运用为小肠疾病诊断的困顿局面带来了历史性变革, 早期诊断在一定程度上获得实现, 随之小肠疾病治疗也得到很大的改善.

陈孝, 张子其, 邵勇, 张钰, 张建萍, 王亚红, 中国人民解放军总医院南楼内窥镜中心 北京市 100853
通讯作者: 张子其, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院南楼内窥镜中心. chenxiao301@yahoo.com.cn
电话: 010-66937622
收稿日期: 2006-11-22 接受日期: 2006-12-18

Effect of capsule endoscopy on the diagnosis and treatment of small intestinal disorders

Xiao Chen, Zi-Qi Zhang, Yong Shao, Yu Zhang, Jian-Ping Zhang, Ya-Hong Wang

Xiao Chen, Zi-Qi Zhang, Yong Shao, Yu Zhang, Jian-Ping Zhang, Ya-Hong Wang, Endoscopic Center of South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Dr. Zi-Qi Zhang, Endoscopic Center of South Building, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853,
China. chenxiao301@yahoo.com.cn
Received: 2006-11-22 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To analyze the diagnostic yield and clinical impact of capsule endoscopy in the diagnosis and treatment of patients with suspected small intestinal diseases.

METHODS: A total of 288 subjects (including 204 patients and 84 healthy individuals), who received consecutive unselected capsule endoscopy examinations, were retrospectively analyzed.

RESULTS: The detectable rate of capsule endoscopy for small intestinal diseases was 53.57% in 84 healthy individuals, of which 22 cases needed drug treatment, 10 should be followed-up or accept other check-up modality, and 13 didn't need any treatment. All the 204 patients received more than one kind of gastrointestinal examinations, and the symptoms lasted a mean time of 50 months. Obscure gastrointestinal bleeding was detected in 76.47% patients, and abdominal pain, chronic diarrhea, and abdominal distention were detected in 68.49%, 61.90% and 66.67%, respectively. Among 204 patients with various symptoms, the diagnosis and therapeutic strategy were entirely changed in 75 patients (36.76%) because of capsule endoscopic findings, and total influencing rate of capsule endoscopy was 77.94%.

CONCLUSION: Capsule endoscopy is a proper modality in the diagnosis and treatment of suspected small intestinal diseases.

Key Words: Capsule endoscopy; Small intestine disorder; Diagnosis; Therapy

Chen X, Zhang ZQ, Shao Y, Zhang Y, Zhang JP, Wang YH. Effect of capsule endoscopy on the diagnosis and treatment of small intestinal disorders. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):762-766

摘要

目的: 了解胶囊内镜的运用对小肠疾病患者诊断和治疗方案抉择的影响.

方法: 分析我科自2002-03/2006-08进行胶囊内镜检查的健康查体者84例, 门诊或住院患者204例, 比较胶囊内镜检查前后患者诊断和治疗的变化情况.

结果: 84例无症状查体者病变检出率为53.57%(45/84), 其中需药物治疗者占48.89%(22/45), 需随访监测, 必要时进行其他检查或医疗干预者22.22%(10/45), 不需要处理者28.89%(13/45). 204例患者均接受过2种以上的消化道检查, 症状持续时间平均为50 mo. 不明原因消化道出血的病变检出率较高, 为76.47%; 腹痛、腹泻和腹胀的病变检出率分别为68.49%, 61.90%和66.67%. 204例有症状患者在胶囊内镜检查后诊断及治疗完全变更36.76%(75/204), 胶囊内镜检查对诊断和治疗变更的总有效影响率为77.94%(159/204).

结论: 胶囊内镜是小肠疾病诊断的理想工具, 对小肠疾病患者诊断和治疗的最后确定具有重要的影响, 也是小肠疾病"早期诊断"、"早期治疗"能得以实现的保障.

关键词: 胶囊内镜; 小肠疾病; 诊断; 治疗

陈孝, 张子其, 邵勇, 张钰, 张建萍, 王亚红. 胶囊内镜对小肠疾病诊断和治疗的影响程度. 世界华人消化杂志 2007;15(7):762-766
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/762.asp

0 引言

高效临床诊断手段的价值不仅体现于其对疾病诊断的高度特异性和敏感性, 更重要的是体现于对疾病治疗方案抉择决定性影响上. 胶囊内镜问世后, 为小肠疾病的诊断带来了历史性的突破, 其诊断的无创、高效等优点得到公认[1-2]. 但胶囊内镜对小肠疾病诊断和治疗方案的抉择一直未获得可靠的结论[3-4]. 我们自2002-03使用胶囊内镜以来, 在此方面进行了积极探索, 获得了一些经验, 现总结报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-03/2006-08到我科就诊, 自愿进行胶囊内镜检查、并签订知情同意书、完成胶囊内镜检查者共计288例, 男210例, 女78例, 平均年龄为52.67(15-98) 岁, 其中包括合并有心、肺、脑等多脏器疾病的老年人90例. 受检者中健康查体者84例, 门诊或住院患者204例(包括不明原因消化道出血85例、腹痛73例、腹泻21例、腹胀12例、其他症状13例).

1.2 方法 使用的胶囊内镜为以色列GIVEN影像公司生产的诊断图像系统(GIVEN, diagnostic imaging system), 胶囊内镜为M2A型, 尺寸为11 mm×26 mm, 重约3.7 g, 其内部结构分为3部分, 前端为光学区, 内置短焦镜头、发白光二极管、CMOS摄像机, 中部为电池, 尾部为发射器和天线. 胶囊内镜的视野范围为140°、景深为3.0 cm、最大放大倍数为8倍、最小分辨物可小于0.1 mm, 图像采集及发射器发射视频图的频率均为2帧/秒, 电池工作寿命为6-10 h. 胶囊被吞下后, 借助消化道的蠕动在消化道内移动, 获取并传输视频信号至接收装置. 工作站使用专用处理软件RAPID处理数据.

疑似小肠疾病患者于胶囊内镜检查前使用硫酸镁法和二甲基硅油进行肠道准备, 而健康体检者则不进行肠道准备, 只于检查前禁食8 h. 吞服胶囊内镜后2 h内禁食、禁水, 2 h后可适量进水, 4 h后可进食半流质. 检查期间受检者可自由活动, 检查开始至结束后, 受检者大便时要密切注意胶囊内镜是否排出, 必要时进行腹部X线透视以观察、核实. 在胶囊内镜未被证实排出体外之前, 禁止进行核磁共振检查.

统计学处理 采用STATA7.0软件进行统计处理, 组间计量资料比较采用t检验.

表 1 胶囊内镜对不同小肠症状的诊断能力

分组	n	阳性	阴性	失败	检出率(%)
查体	84	45	38	1	53.57
不明原因消化道出血	85	65	19	1	76.47
腹痛	73	50	21	2	68.49
腹泻	21	13	8	0	61.90
腹胀	12	8	4	0	66.67
其他	13	9	4	0	69.23
合计	288	190	94	4	65.97

2 结果

2.1 一般临床资料 204例受检患者均接受过其他消化道检查(如胃镜、结肠镜等), 且未明确病因和诊断, 其中曾接受2种检查方法者25例(占12.25%), 3种或3种以上者179例(占87.75%), 平均延误诊断时间(自症状出现至接受胶囊内镜检查明确诊断间的时间)为50 mo(最长为264 mo). 健康体检者无消化道相关症状.

2.2 胶囊内镜对健康体检者诊断和治疗的影响 84例健康体检者, 除1例失败外, 胶囊内镜证实小肠正常者38例, 检出小肠病变者45例(54.22%). 其中小肠存在1种病变者32例, 2种病变8例, 3种病变5例. 检出的主要病变包括: 黄色瘤22例、小肠炎16例、十二指肠球炎6例、息肉4例、血管发育不良8例、蛔虫3例、黏膜下肿物(性质未定)4例、脂肪瘤1例. 同时, 胶囊内镜还发现并诊断结肠多发性息肉5例, 结肠血管发育不良1例. 健康人群中检出的小肠病变, 22例需及时进行药物治疗(以炎症及寄生虫为主); 10例需随访及加强生活监测, 必要时进行其他检查或医疗干预(以小肠息肉、黏膜下肿物、脂肪瘤为主); 13例不需处理(以黄色瘤为主).

2.3 胶囊内镜对疑似小肠疾病患者的诊断和治疗的影响 胶囊内镜在具有小肠相关消化道症状的患者中检出的疾病谱较广, 疾病可以涵盖临床常见的各种小肠疾病. 不同的小肠性消化道症状病变检出率具有一定的差异, 且具有统计学意义(P = 0.029, 表1). 胶囊内镜检查之后与检查之前相比, 204例小肠疾病患者的诊断及治疗均发生了完全变更者占36.76%(75例); 诊断和治疗发生部分变更者占11.27% (23例); 诊断部分变更而治

■研发前沿
胶囊内镜的大量临床运用文献显示了胶囊内镜在小肠疾病诊断上具有巨大的优越性. 目前研究重点在于, 明确胶囊内镜诊断能力, 比如对不同症状、病种的小肠病变胶囊内镜运用价值等; 提升胶囊内镜性能, 比如内镜性能改善、肠道准备方法改进; 拓展胶囊内镜的临床运用范畴, 比如食管胶囊内镜、结肠胶囊内镜等的开发.

■应用要点
本文对胶囊内镜在不同病症小肠疾病中的性能特点作出评价, 可以指导临床医师掌握选择需要接受胶囊内镜检查病例的方法. 同时通过了解胶囊内镜诊断能力的局限性, 可以促进胶囊内镜应用的临床基础研究, 以此改进胶囊内镜临床应用方法, 进一步提高胶囊内镜性能.

疗不变者占29.90%(61例); 诊断治疗均完全不变者占22.06% [45例(含3例失败)], 对诊断和治疗的整体有效影响率为77.94% (159/204). 另还发现一批其他消化道检查方法等未检出的非小肠性疾病, 包括: 反流性食管炎1例、胃溃疡1例、结肠癌2例、结肠血管发育不良并活动性出血1例、结肠憩室1例、结肠炎1例.

3 讨论

小肠以迂曲盘绕状态位于消化道中央, 长达5-7 m, 过去的常用检查方法均难以获得理想的效果[5-6]. 小肠比较常见病变比如血管发育不良等平坦型病变在小肠钡餐无法显示[7]; 小肠镜检查范围超过常规上消化道内镜, 但要求内镜医师技术高、且操作费时、痛苦、有穿孔危险, 即使如此, 小肠镜也只能检查小肠近端80-120 cm[8]. 胶囊内镜是目前针对小肠解剖特点设计生产的特殊内镜性设备. 临床运用以来, 众多的研究业已证实: 胶囊内镜对小肠疾病诊断能力较现有的其他常用小肠检查手段如: 小肠钡灌、血管造影、核素扫描、CT扫描等明显优越, 与小肠镜相比也独具特性[9-12]. 但胶囊内镜的运用对小肠疾病的临床诊断, 尤其是治疗能产生多大影响, 目前尚不清楚.

小肠疾病诊断难度高, 患者不仅需要承受长期的病痛折磨、接受各种检查方法带来的痛苦和无法及时获得正确诊断治疗所产生的心理压力, 而且还要负担沉重的经济压力. 本组204例患者在接受胶囊内镜检查前, 平均症状存在时间50 mo(最长264 mo), 所有患者均接受过2种以上其他消化系影像学检查, 其中接受2种检查方法者25例(占12.25%), 3种或3种以上者179例(占87.75%).

常见的小肠病症为消化道失血、腹痛、腹胀等. 小肠出血中血管异常是最主要病因, 占70%-80%, 其中最主要病变是血管发育不良、次为肿瘤和小肠溃疡或炎症. 在诊断方法上, 传统的钡造影和CT扫描的诊断率为5%-10%, 而血管造影在出血间期的诊断率约为25%, 活动性出血时诊断率可达40%-50%. 小肠镜的诊断率较高, 且在诊断的同时可以进行治疗, 但不能进行全小肠检查[13-16]. 文献表明, 胶囊内镜是诊断不明原因消化道出血的理想诊断工具, 诊断能力优于除了术中内镜检查之外的所有其他检查[17-21]. 本组不明原因消化道出血患者85例, 病变检出率76.47%, 诊断率75.29%. 不明原因腹痛和腹胀的病因不仅包含器质性疾病, 也包括功能性改变, 因此病变检查率较出血为低[22-24]. 本组二者的检出率分别为68.49%和66.67%, 无小肠异常发现的患者比例较高证实了此观点.

胶囊内镜观察到的小肠异常是否会对影响患者的后续处理存在争论. 有研究认为, 经胶囊内镜检出的疑似克罗恩病可以进行直接治疗, 而有研究认为, 对确诊的克罗恩病进行胶囊内镜诊断无意义且对治疗策略并无影响, 因为克罗恩病治疗依据为临床症状, 而非检查所视的小肠炎症程度[25-27]. 相当多的研究显示, 胶囊内镜可以作为动态观察克罗恩病治疗效果的最佳方法, 但也有研究认为, 单纯靠观察克罗恩病的黏膜治愈情况来进行临床处置方案的选择和疾病预后的评估还不成熟. 在不明原因消化道出血中, 多种文献研究显示, 胶囊内镜作为其诊断工具具有较好的运用前景, 但胶囊内镜对治疗的结果和病情的演变的影响还不清楚[28-31]. Estevez *et al*[1]的研究发现: 胶囊内镜检查之后, 75.8%的患者举行了治疗变更或修订, 经过治疗和处置, 71.6%的患者出血得到解决. 在胶囊内镜发现有明显病变的患者中25.4%在随访结束时病情并没有变化, 在胶囊内镜无阳性发现的患者中65.6%病情进展明显. 本组通过检查发现的病变190例中新发病变占81.05%(154例), 18.95%(36/190)与其他检查相符, 但病变范围、程度更加明确. 204例小肠疾病患者在胶囊内镜检查之后, 诊断及治疗均发生了完全变更者占36.76%, 主要为小肠淋巴瘤、小肠癌、小肠克罗恩病、小肠间质瘤、小肠炎等可严重危害患者健康甚至生命的疾病; 诊断和治疗发生部分变更者占11.27%, 主要疾病为小肠炎、小肠淋巴瘤、十二指肠球炎、血管发育不良、以及部分功能性消化不良患者(主要表现为腹胀、腹痛); 诊断部分变更而治疗不变者占29.90%; 诊断治疗均完全不变者占22.06%, 主要为临床诊断和胶囊内镜诊断完全相符者和有临床症状但胶囊内镜未检出病变者. 总体上, 胶囊内镜的运用导致临床医疗行为发生改变者占77.94%, 可见胶囊内镜的临床应用使一批长期误诊、漏诊的患者获得了及时治疗. 对于查体, 他的临床意义在于能发现一些亚临床性疾病, 提升小肠疾病的早期诊断、早期治疗水平[32]. 本组无症状查体者84例, 小肠病变检出率为53.57%, 其中48.89%(22/45)的检出病变为十二指肠球炎、小肠炎、小肠糜烂、小肠息肉、小肠黏膜下肿物等疾病的检出使该批亚临床病例获得了早期

治疗. 但缺陷是成本太高, 广泛使用会导致医疗成本的上升和医疗资源的浪费, 同时也有并发症发生的风险[33], 因而不宜提倡.

总之, 胶囊内镜是小肠疾病的重要检诊手段, 他的临床运用有助于改善小肠疾病诊断和治疗困难局面, 对小肠疾病的早期诊断和早期治疗有益.

4 参考文献

1 Estevez E, Gonzalez-Conde B, Vazquez-Iglesias JL, de Los Angeles Vazquez-Millan M, Pertega S, Alonso PA, Clofent J, Santos E, Ulla JL, Sanchez E. Diagnostic yield and clinical outcomes after capsule endoscopy in 100 consecutive patients with obscure gastrointestinal bleeding. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 881-888

2 Sturniolo GC, Di Leo V, Vettorato MG, De Boni M, Lamboglia F, De Bona M, Bellumat A, Martines D, D'Inca R. Small bowel exploration by wireless capsule endoscopy: results from 314 procedures. *Am J Med* 2006; 119: 341-347

3 Frieling T. The clinical impact of capsule endoscopy: to believe or not to believe. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 873-874

4 Ersoy O, Sivri B, Arslan S, Batman F, Bayraktar Y. How much helpful is the capsule endoscopy for the diagnosis of small bowel lesions? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3906-3910

5 Dubcenco E, Baker JP, Jeejeebhoy KN. What is the clinical validity of capsule endoscopy for evaluating the small bowel? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 618-619

6 Carlo JT, DeMarco D, Smith BA, Livingston S, Wiser K, Kuhn JA, Lamont JP. The utility of capsule endoscopy and its role for diagnosing pathology in the gastrointestinal tract. *Am J Surg* 2005; 190: 886-890

7 Eliakim R. Wireless capsule video endoscopy: three years of experience. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1238-1239

8 Delvaux M, Gerard Gay. Capsule endoscopy in 2005: facts and perspectives. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 23-39

9 Bhuket T, Takami M, Fisher L. The use of wireless capsule endoscopy in clinical diagnostic gastroenterology. *Expert Rev Med Devices* 2005; 2: 259-266

10 Tatar EL, Shen EH, Palance AL, Sun JH, Pitchumoni CS. Clinical utility of wireless capsule endoscopy: experience with 200 cases. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 140-144

11 Peter S, Heuss LT, Beglinger C, Degen L. Capsule endoscopy of the upper gastrointestinal tract -- the need for a second endoscopy. *Digestion* 2005; 72: 242-247

12 Rastogi A, Schoen RE, Slivka A. Diagnostic yield and clinical outcomes of capsule endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 959-964

13 Jakobs R, Hartmann D, Benz C, Schilling D, Weickert U, Eickhoff A, Schoenleben K, Riemann JF. Diagnosis of obscure gastrointestinal bleeding by intra-operative enteroscopy in 81 consecutive patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 313-316

14 Gupta R, Lakhtakia S, Tandan M, Banerjee R, Ramchandani M, Anuradha S, Ramji C, Rao GV, Pradeep R, Reddy DN. Capsule endoscopy in obscure gastrointestinal bleeding-an Indian experience. *Indian J Gastroenterol* 2006; 25: 188-190

15 Lai LH, Wong GL, Chow DK, Lau JY, Sung JJ, Leung WK. Long-term follow-up of patients with obscure gastrointestinal bleeding after negative capsule endoscopy. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1224-1228

16 Viazis N, Papaxoinis K, Theodoropoulos I, Sgouros S, Vlachogiannakos J, Pipis P, Markoglou C, Avgerinos A. Impact of capsule endoscopy in obscure small-bowel bleeding: defining strict diagnostic criteria for a favorable outcome. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 717-722

17 Magnano A, Privitera A, Calogero G, Nanfito L, Sanfilippo G, Biondi A, Basile F. The role of capsule endoscopy in the work-up of obscure gastrointestinal bleeding. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 403-406

18 Karagiannis S, Goulas S, Kosmadakis G, Galanis P, Arvanitis D, Boletis J, Georgiou E, Mavrogiannis C. Wireless capsule endoscopy in the investigation of patients with chronic renal failure and obscure gastrointestinal bleeding (preliminary data). *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5182-5185

19 Ell C, Remke S, May A, Helou L, Henrich R, Mayer G. The first prospective controlled trial comparing wireless capsule endoscopy with push enteroscopy in chronic gastrointestinal bleeding. *Endoscopy* 2002; 34: 685-689

20 Adler DG, Knipschield M, Gostout C. A prospective comparison of capsule endoscopy and push enteroscopy in patients with GI bleeding of obscure origin. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 492-498

21 Hartmann D, Schilling D, Bolz G, Hahne M, Jakobs R, Siegel E, Weickert U, Adamek HE, Riemann JF. Capsule endoscopy versus push enteroscopy in patients with occult gastrointestinal bleeding. *Z Gastroenterol* 2003; 41: 377-382

22 Spada C, Pirozzi GA, Riccioni ME, Iacopini F, Marchese M, Costamagna G. Capsule endoscopy in patients with chronic abdominal pain. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 696-698

23 Fry LC, Carey EJ, Shiff AD, Heigh RI, Sharma VK, Post JK, Hentz JG, Fleischer DE, Leighton JA. The yield of capsule endoscopy in patients with abdominal pain or diarrhea. *Endoscopy* 2006; 38: 498-502

24 Bardan E, Nadler M, Chowers Y, Fidder H, Bar-Meir S. Capsule endoscopy for the evaluation of patients with chronic abdominal pain. *Endoscopy* 2003; 35: 688-689

25 Triester SL, Leighton JA, Leontiadis GI, Gurudu SR, Fleischer DE, Hara AK, Heigh RI, Shiff AD, Sharma VK. A meta-analysis of the yield of capsule endoscopy compared to other diagnostic modalities in patients with non-stricturing small bowel Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 954-964

26 Bar-Meir S. Review article: capsule endoscopy - are all small intestinal lesions Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24 Suppl 3: 19-21

27 Valle J, Alcantara M, Perez-Grueso MJ, Navajas J, Munoz-Rosas C, Legaz ML, Cuena R, Carrobles JM. Clinical features of patients with negative results from traditional diagnostic work-up and Crohn's disease findings from capsule endoscopy. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 692-696

28 Herrerias JM, Caunedo A, Rodriguez-Tellez M, Pellicer F, Herrerias JM Jr. Capsule endoscopy in patients with suspected Crohn's disease and

■同行评价

本文分析了该院288例胶囊内镜检查资料, 比较胶囊内镜检查前后患者诊断和治疗的变化情况. 结果显示胶囊内镜对诊断和治疗变更的总有效影响率达77.94%, 验证了胶囊内镜对小肠疾病患者诊断和治疗的最后确定有重要的价值, 也是小肠疾病“早期诊断”、“早期治疗”能得以实现的保障, 有临床意义.

negative endoscopy. *Endoscopy* 2003; 35: 564-568
29 Fireman Z, Mahajna E, Broide E, Shapiro M, Fich L, Sternberg A, Kopelman Y, Scapa E. Diagnosing small bowel Crohn's disease with wireless capsule endoscopy. *Gut* 2003; 52: 390-392
30 Lo SK. Capsule endoscopy in the diagnosis and management of inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2004; 14: 179-193
31 Chen GC, Enayati P, Tran T, Lee-Henderson M, Quan C, Dulai G, Arnott I, Sul J, Jutabha R. Sensitivity and inter-observer variability for capsule endoscopy image analysis in a cohort of novice readers. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1249-1254
32 Ang TL, Fock KM, Ng TM, Teo EK, Tan YL. Clinical utility, safety and tolerability of capsule endoscopy in urban Southeast Asian population. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2313-2316
33 陈孝, 张子其, 张建萍, 张钰. 胶囊内镜检查存在的问题及副作用的初步分析. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2233-2236

电编 李琪 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

2005年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序表[1]

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

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 767-771
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

成人盆底痉挛综合征型便秘的分型及其病理生理机制

肖元宏, 刘洲禄, 刘贵麟, 彭少林, 王 政, 彭 正, 臧传波, 夏少友, 张艳君

肖元宏, 刘洲禄, 刘贵麟, 彭少林, 王政, 中国人民解放军总医院小儿外科 北京市 100853
彭正, 臧传波, 夏少友, 张艳君, 中国人民解放军总医院普外科 北京市 100853
通讯作者: 肖元宏, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院小儿外科. xiaoyh28@sina.com
电话: 010-66937123
收稿日期: 2006-11-22 接受日期: 2006-12-18

Classification and pathophysiological mechanism of adult constipation caused by spastic pelvic floor syndrome in adults

Yuan-Hong Xiao, Zhou-Lu Liu, Gui-Lin Liu, Shao-Lin Peng, Zheng Wang, Zheng Peng, Chuan-Bo Zang, Shao-You Xia, Yan-Jun Zhang

Yuan-Hong Xiao, Zhou-Lu Liu, Gui-Lin Liu, Shao-Lin Peng, Zheng Wang, Department of Pediatric Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Zheng Peng, Chuan-Bo Zang, Shao-You Xia, Yan-Jun Zhang, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Xiao-Yuan Hong, Department of Pediatric Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. xiaoyh28@sina.com
Received: 2006-11-22 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To discuss the classification and pathophysiological mechanism of constipation caused by spastic pelvic floor syndrome (SPFS) in adults, and to investigate the mechanism of biofeedback training in treating this type of constipation.

METHODS: Biofeedback training was performed on 18 adult patients suffered from SPFS-caused constipation using the instruments produced by Medtronic Company with the basic circuit voltage of 1.53 μV for about 20-minute relaxation exercises. The basic resting and stimulated voltages of external anal sphincter (EAS) were obtained by the anal electrode, and then compared using statistical analysis.

RESULTS: Based on the resting voltage and the voltage change of EAS during simulation, the SPFS-caused constipation was classified into 3 types: type Ⅰ was characterized with a high resting voltage and paradoxical activity of EAS (44.44%); type Ⅱ was characterized with a high resting voltage of EAS (33.33%); type Ⅲ was characterized with paradoxical activity of EAS (22.22%). The patients with high resting voltages covered a percentage of 77.77%. There existed significant differences among three types (P = 0.001).

CONCLUSION: High resting voltages and secondary paradoxical activity may be the mechanisms of SPFS-caused constipation. A significant decrease of resting voltage and inhibition of EAS paradoxical activity can be obtained through biofeedback training.

Key Words: Pelvic dyssynergia constipation; Classification of constipation; Pathophysiology; Resting voltage; Biofeedback training

Xiao YH, Liu ZL, Liu GL, Peng SL, Wang Z, Peng Z, Zang CB, Xia SY, Zhang YJ. Classification and pathophysiological mechanism of adult constipation caused by spastic pelvic floor syndrome in adults. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):767-771

摘要

目的: 探讨成人盆底痉挛综合征型便秘的分型及其病理生理机制, 以及生物反馈治疗该型便秘的原理.

方法: 使用基础电路电压为1.53 μV的Medtronic公司生产的生物反馈训练仪对18例盆底痉挛综合征型便秘的成人患者首先进行约20 min放松练习, 肛门塞电极记录到外括约肌的静息电位值, 然后患者完成模拟排便动作, 获得模拟排便及放松两种状态下外括约肌电位的两组数值, 并进行统计学比较.

结果: 根据肛门外括约肌的静息电位以及模拟排便外括约肌的电位变化, 成人盆底痉挛综合征型便秘表现为三种病理分型, 即Ⅰ型: 高静息电位+矛盾运动(占44.44%), Ⅱ型: 高静息电位(占33.33%), Ⅲ型: 矛盾运动(占22.22%),

■背景资料
盆底痉挛综合征虽然表现为排便困难, 但由于其潜在的病理生理机制涉及的范围广泛, 因此需要多角度全方位进行研究, 特别是神经生理学、心理学的新成果对该型便秘的病理生理机制以及治疗的完善将起到积极的推动作用.

■创新盘点
本文首次根据外括约肌静息电位以及模拟排便是否存在外括约肌矛盾运动将盆底痉挛综合征型便秘分成3种病理类型, 并对各型的病理生理机制进行讨论, 得出外括约肌的高静息电位以及在此基础上并发的外括约肌矛盾运动构成了该型便秘的病理生理机制, 生物反馈的原理在于能够有效降低外括约肌的静息电位并消除可能出现的矛盾运动.

其中外括约肌的高静息电位占本组便秘患者的77.77%. 各病理分型外括约肌静息电位之间两两比较均具有显著性差异 ($P = 0.001$).

结论: 外括约肌的高静息电位以及在此基础上并发的外括约肌矛盾运动构成了盆底痉挛综合征型便秘的病理生理机制, 生物反馈训练能够有效降低外括约肌的静息电位并消除可能出现的外括约肌矛盾运动.

关键词: 盆底痉挛综合征型便秘; 便秘分型; 病理生理学; 静息电位; 生物反馈训练

肖元宏, 刘洲禄, 刘贵麟, 彭少林, 王政, 彭正, 臧传波, 夏少友, 张艳君. 成人盆底痉挛综合征型便秘的分型及其病理生理机制. 世界华人消化杂志 2007;15(7):767-771
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/767.asp

0 引言

盆底痉挛综合征型便秘病理特点的认识目前主要是描述性, 即模拟排便时肛管内括约肌压力或外括约肌整合电位不呈现下降趋势反而升高, 对其发生的病理生理机制未见明确阐述[1-3], 存在下述多种描述性的诊断, 如盆底协同困难、耻骨直肠肌矛盾收缩、耻骨直肠肌失弛缓综合征、梗阻性排便以及盆底出口梗阻等等[1,4]. 2005-03/2005-12我们对18例成人盆底痉挛综合征型便秘患者外括约肌静息电位以及模拟排便时外括约肌电位变化进行检测分析, 来探讨成人该型便秘的病理分型及其病理生理机制.

1 材料和方法

1.1 材料 18例患者年龄26-76(平均50.72)岁, 男女比例为5∶13, 经结肠传输试验、直肠肛门抑制反射检测以及钡灌肠等功能及形态学检测技术排除结肠慢传输、先天性无神经节细胞巨结肠以及直肠前突套叠等造成的便秘, 并通过5次模拟排便动作中3次以上出现外括约肌压力的升高来初步判定为盆底痉挛综合征型便秘[4].

1.2 方法 选用Medtronic公司生产的胃肠功能测定仪(PC Polygraf HR)以及8通道螺旋形分布压力检测导管进行直肠肛门抑制反射及模拟排便外括约肌压力变化检测, 获得距离肛门3.5 cm范围内八个层面(各通道两两间隔45度、相距0.5 cm)括约肌反射及压力变化情况. 选用该公司生产的生物反馈训练仪以及肛门塞电极, 首先嘱患者进行全身心的放松练习, 持续时间约20 min记录静息电位的变化, 最终获得外括约肌基础静息电位值. 在医师的口令下嘱患者做5次模拟排便动作(不看生物反馈训练仪的动画屏幕), 通过统计学计算验证是否存在外括约肌的矛盾收缩运动. 医师详细的向患者阐述正常的排便动力以及其自身存在的病理性的排便模式, 并通过模拟排便时动画曲线的变化来解释正常及异常的排便动力, 嘱患者按照动画指示的正常排便动力曲线完成模拟排便动作(增加腹压同时主动放松肛门外括约肌). 在此训练过程中要适时地给患者以必要的语言指导以帮助他们进一步认识、并纠正错误的模拟排便动作, 鼓励他们完成正确的模拟排便动作. 每次的模拟排便持续时间为10 s, 放松时间为10 s, 6次排便及放松动作为一组, 训练组间休息时间为10 min. 根据患者是否出现主观的感觉疲劳以及肛门部是否出现肌肉的酸胀感, 以及外括约肌电位是否稳定于一个较低的数值或达到电静息水平[5](仅表现为电路的基础电压1.53 μV)来决定是否结束该次训练, 一般总的训练时间为1.5-2 h.

统计学处理 通过CHISS软件对不同便秘类型外括约肌静息电位进行正态性检验及方差分析, $P<0.05$认为存在显著性差异.

2 结果

2.1 成人盆底痉挛综合征型便秘的病理分型 正常情况下, 肛门外括约肌静息电位及模拟排便时电位均不超过2 μV[6], 考虑到生物反馈训练仪电路的基础电压1.53 μV, 因此将外括约肌静息电位及模拟排便时电位超过3.53 μV判定为存在高静息电位以及模拟排便时外括约肌的矛盾收缩运动, 本研究发现成人盆底痉挛综合征型便秘患者存在三种病理分型(表1, 图1).

2.2 外括约肌高静息电位在成人盆底痉挛综合征型便秘的特点 外括约肌高静息电位总的发生率占该型便秘的77.77%. 各病理分型外括约肌静息电位之间两两比较均具有显著性差异($P = 0.001$)(表1).

3 讨论

肛门外括约肌和耻骨直肠肌不同于一般的骨骼肌, 其中耐疲劳、保持持续张力性电活动的Ⅰ型纤维含量占78%, 而不耐疲劳、完成短时收缩活动的Ⅱ型纤维数量相对较少[7]. 正常静息状态下, 肛门外括约肌和耻骨直肠肌处于一种部分持续收缩状态, 与内括约肌持续张力性收缩协同维持肛管由近端向远端显著增大的静息张力梯度, 外

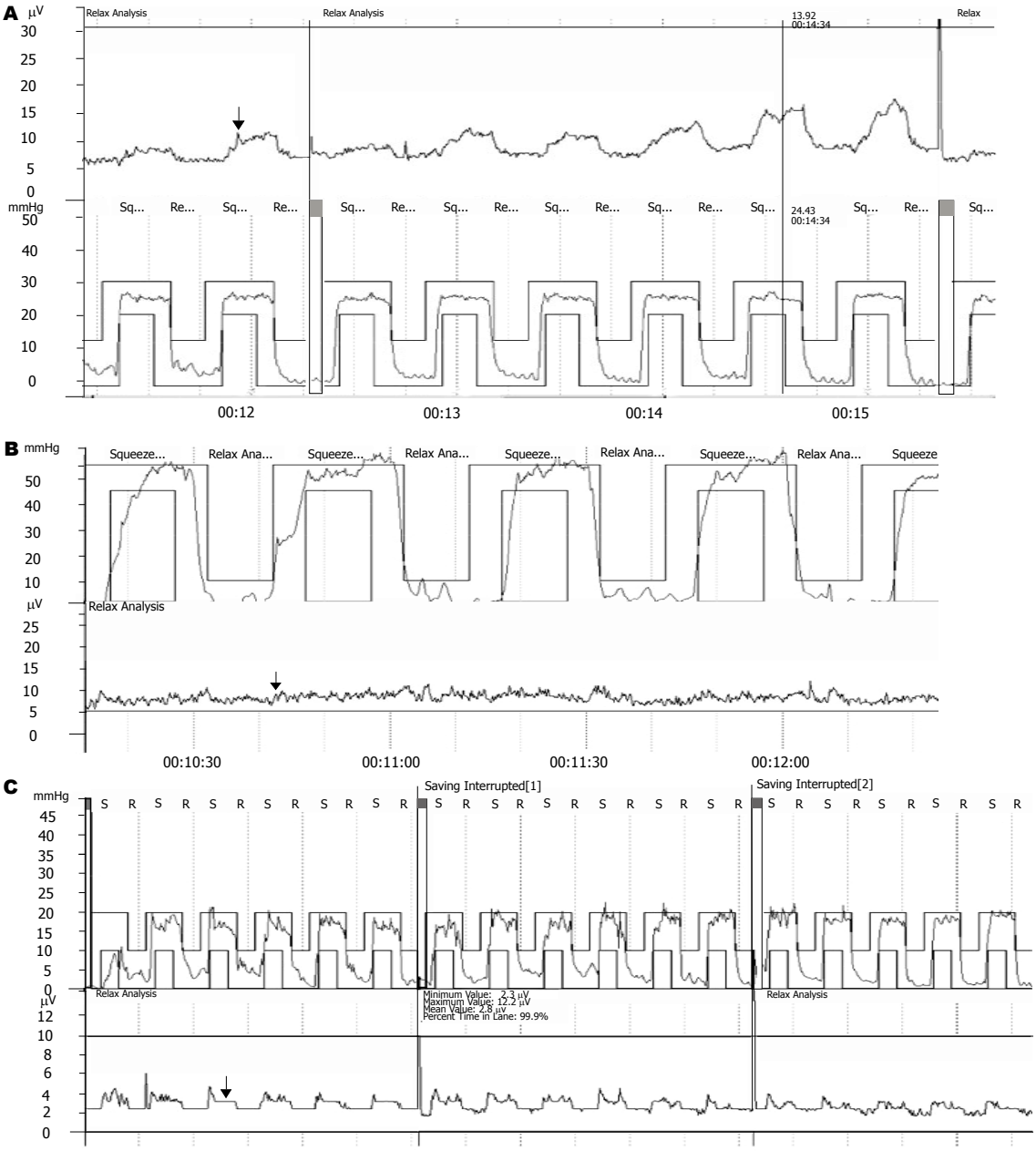

图 1 成人盆底痉挛综合征型便秘病理分型. A: Ⅰ型[外括约肌高静息电位+矛盾运动(箭头)]; B: Ⅱ型[外括约肌高静息电位(箭头)]; C: Ⅲ型[矛盾运动(箭头)].

括约肌由于肌纤维环状结构止点与作用位点的不同而对肛管不同层面产生直接方向压迫作用, 形成外括约肌的绞锁机制, 从而显著增强了静息状态下肛门的节制功能[8-13]. 外括约肌及耻骨直肠肌中Ⅰ型纤维保持一定的静息张力是Ⅱ型纤维完成一次收缩或反射活动的基础, 这是由排便和节制的脊髓低级反射中枢γ及α运动神经元对外括约肌及耻骨直肠肌Ⅰ, Ⅱ型进行神经支配, 以及脊髓上位各高级调节中枢, 如网状结构、小脑、大脑等对脊髓中枢活动进行综合调控的结果. 当机体由静息状态转为试图排便时, 大脑下达排便的指令, 网状结构下行兴奋性传导通路被抑制[14], 使脊髓前角γ运动神经元的电活动受到抑制, 进而使其支配的Ⅰ型纤维的张力性电活动减少, Ⅰ型纤维的本质是肌梭, 其发出的传入冲动减少, 无法达到α运动神经元的放电阈值[15], 因

表 1 成人盆底痉挛综合征型便秘的病理分型及比例

病理分型	*n*	比例(%)	静息电位均数(μV)	静息电位标准差(μV)
高静息电位(Ⅰ)+矛盾运动	8	44.44	10.510	4.640
高静息电位(Ⅱ)	6	33.33	4.251	0.551
矛盾运动 (Ⅲ)	4	22.22	2.504	0.301

■名词解释

生物反馈: 指利用仪器设备(通常是电子设备)将人体某些内在的、正常的或异常的生理现象, 用可视或可听的信号形式表现出来, 其目的是通过处理这些显示的信号教会个体如何处理这些生理事件. 如果不通过信号的形式予以表达, 对于这些正常或异常的生理现象人体是不自知或感受不到的. 这项技术在开放的生物反馈环中插入了人的意志力-因此被给予了生物反馈的名字.

■同行评价
出口梗阻性便秘是由于肛管和直肠功能异常引起的排便过程不顺利, 为一种功能性疾病. 本文总体设计较科学合理, 数据充分, 结论可靠.

此无法激发后者所支配的Ⅱ型肌纤维的一次位相性收缩或反射活动; 实质上模拟排便的正常生理机制就是通过高级调控机制、低级中枢的反射机制使外括约肌和耻骨直肠肌Ⅰ型纤维的张力性电活动不断降低[16]、同时有效地抑制了Ⅱ型纤维可能出现的矛盾收缩运动. 盆底痉挛综合征型便秘生物反馈治疗的原理就在于上述排便和调控机制的全面康复过程. 在一个良好的指导者语言以及生物反馈动画协同指导下, 一个有良好意志力和理解力的个体能够使其肛门外括约肌和耻骨直肠肌完全放松, 以至于在示波器上找不到任何肌肉电活动[5], 如果不考虑本仪器的电路电压1.53 μv, 则一次训练授课最理想的状态应该是使外括约肌及耻骨直肠肌Ⅰ型纤维完全放松, 达到0电位的状态, 此时患者不仅感到大脑的主观疲劳, 而且有肛门部肌肉酸胀感, 其原因是肌肉由维持一定的紧张性收缩变成了完全放松状态, 实质上是处于被撑开的非自然状态, 此时盆底痉挛被完全解除, 包括Ⅰ型纤维的高静息张力以及Ⅱ型纤维可能出现的矛盾运动, 这也就是生物反馈训练治疗盆底痉挛综合征型便秘的原理所在.

盆底痉挛综合征型便秘Ⅰ型表现为外括约肌高静息电位以及模拟排便时外括约肌的矛盾运动, 其可能的病理生理机制在于此类患者静息状态下, 网状结构下行的兴奋性神经传导冲动较正常高, 使外括约肌Ⅰ型纤维处于一种高水平的电活动状态, 因此属于一种中枢调节的失调; 当患者试图排便时, 大脑高级中枢又发放了错误的命令, 即不是主动放松肛门外括约肌而是相反, 这样, 很容易出现外括约肌Ⅰ型纤维高静息电活动基础上的Ⅱ型纤维的一次位相性收缩活动, 即矛盾运动. 表现为脊髓前角γ运动神经元的电活动没有减少反而增加, 更容易激发α运动神经元的一次放电活动, 产生Ⅱ型纤维的一次位相性收缩活动, 表现为静息高电位水平上的矛盾运动(图1A). 盆底痉挛综合征型便秘Ⅱ型表现为外括约肌高静息电位, 模拟排便时并不表现为外括约肌的矛盾运动, 仅由外括约肌及耻骨直肠肌Ⅰ型纤维超过正常张力水平的电活动状态造成盆底出口的阻力, 仅属于一种中枢调节的失调而不存在中枢的错误命令. 并且其高静息电位水平显著小于Ⅰ型便秘患者, 其病理程度较后者轻微, 外括约肌Ⅰ型纤维高张力电活动尚未能达到α运动神经元的一次放电阈值因此未能激发其一次位相性收缩的矛盾运动而仅表现为高静息电位(图1B). 盆底痉挛综合征型便秘Ⅲ型表现为外括约肌的矛盾运动, 是否可以将其考虑为Ⅰ型中的一些特例, 原因是其脊髓前角α运动神经元的放电阈值低于一般水平, 以至于在外括约肌及耻骨直肠肌Ⅰ型纤维较低水平电活动的激发下也容易出现放电, 使其支配的Ⅰ型纤维出现反射性收缩活动, 即矛盾运动, 从而造成了排便时盆底阻力(图1C). 高静息电位在本组便秘中占77.77%, 说明了盆底痉挛综合征发病机制中外括约肌及耻骨直肠肌的高静息电位起到了主导作用, 其实质是脊髓上位高级中枢调节机制的失调, 而生物反馈能够有效减少这种异常的神经冲动, 从而使中枢的调节机制得到康复, 有效降低了外括约肌及耻骨直肠肌的高静息电位, 并消除在此基础上可能出现的矛盾运动. 因此, 对于盆底痉挛综合征Ⅰ型及Ⅲ型患者生物反馈训练中不仅要强调排便中枢调节机制的康复, 而且要鼓励激发患者的意志力使其主动纠正模拟排便时中枢发放的错误命令; 而对于Ⅱ型便秘训练的重点在于中枢调节机制的康复降低盆底肌的张力性电活动.

4 参考文献

1 莫平, 刘宝华, 黄彬鉴. 生物反馈训练治疗便秘的现状与展望. 国外医学·物理医学与康复医学分册 2000; 20: 51-55

2 Chiarioni G, Heymen S, Whitehead WE. Biofeedback therapy for dyssynergic defecation. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7069-7074

3 Wang J, Luo MH, Qi QH, Dong ZL. Prospective study of biofeedback retraining in patients with chronic idiopathic functional constipation. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2109-2113

4 Rao SS. Constipation: evaluation and treatment. *Gastroenterol Clin North Am* 2003; 32: 659-683

5 John V. Basmajian. Biofeedback principles and practice for clinicians. Second Edition, Baltimore: Williams Wilkins 1979: 275-281, 1-4

6 Heymen S, Wexner SD, Vickers D, Nogueras JJ, Weiss EG, Pikarsky AJ. Prospective, randomized trial comparing four biofeedback techniques for patients with constipation. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 1388-1393

7 Lierse W, Holschneider AM, Steinfeld J. The relative proportions of type I and type II muscle fibers in the external sphincter ani muscle at different ages and stages of development--observations on the development of continence. *Eur J Pediatr Surg* 1993; 3: 28-32

8 Chang SM, Yu GR, Diao YM, Zhang MJ, Wang SB, Hou CL. Sacral anterior root stimulated defecation in spinal cord injuries: an experimental study in canine model. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1715-1718

9 Shafik A. A new concept of the anatomy of the anal sphincter mechanism and the physiology of defecation. The external anal sphincter: a triple-

loop system. *Invest Urol* 1975; 12: 412-419
10 Williamson JL, Nelson RL, Orsay C, Pearl RK, Abcarian H. A comparison of simultaneous longitudinal and radial recordings of anal canal pressures. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 201-206
11 Xiao Y, Liu G. Quantitative evaluation of the anal sphincter by the tendency presented in the manometric asymmetry variations. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 413-417
12 Xiao YH, Liu GL. Manometric asymmetry of the anal sphincter: anatomic evidence and clinical application. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118: 210-214
13 肖元宏, 刘贵麟. 肛门外括约肌压力偏位产生的解剖学基础及其特征. 中国临床康复 2005; 9: 92-94
14 Abysique A, Orsoni P, Bouvier M. Evidence for supraspinal nervous control of external anal sphincter motility in the cat. *Brain Res* 1998; 795: 147-156
15 Podnar S, Vodusek DB. Standardisation of anal sphincter EMG: high and low threshold motor units. *Clin Neurophysiol* 1999; 110: 1488-1491
16 Papachrysostomou M, Smith AN. Effects of biofeedback on obstructive defecation--reconditioning of the defecation reflex? *Gut* 1994; 35: 252-256

电编 李琪 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

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

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

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者. (世界胃肠病学杂志社2007-03-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 772-776
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

趋化性细胞因子受体CXCR4在大肠癌的表达及其临床意义

张孟贤, Kashif Iqbal, 于世英

■背景资料
恶性肿瘤侵袭和转移是一个多阶段多步骤的复杂过程, 是肿瘤致死的主要原因, 也是当前研究的热点, 但其具体机制尚不清楚. 最新研究表明, 趋化性细胞因子及其受体的相互作用可能在癌症的定向转移过程中起着关键作用. 其中最令人瞩目的是趋化因子受体CXCR4与其配体CXCL12的相互作用与多种癌症侵袭和转移密切相关.

张孟贤, 于世英, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤科 湖北省武汉市 430030
Kashif Iqbal, 华中科技大学同济医学院留学生部 湖北省武汉市 430030
通讯作者: 于世英, 430030, 武汉市解放大道1095号同济医院肿瘤科. syyu@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83663807
收稿日期: 2006-12-12 接受日期: 2007-01-07

Expression of CXC chemokine receptor CXCR4 in colorectal carcinoma and its correlation with prognosis

Meng-Xian Zhang, Iqbal Kashif, Shi-Ying Yu

Meng-Xian Zhang, Shi-Ying Yu, Department of Oncology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Iqbal Kashif, Foreign Student Department, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Shi-Ying Yu, Department of Oncology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. syyu@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2006-12-12 Accepted: 2007-01-07

Abstract

AIM: To investigate the expression of chemokine receptor CXCR4 in colorectal carcinoma and its correlation with the clinicopathologic characteristics and prognosis.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of CXCR4 and tumor microvessel density (MVD) in 67 tissue specimens of colorectal carcinoma, and the correlation between the CXCR4 expression and clinicopathologic factors was evaluated.

RESULTS: The positive rate of CXCR4 expression was 56.7% in colorectal carcinoma, which was correlated with lymph node metastasis, clinical staging and MVD as well as the survival of patients, but not with the sex and age of patients, tumor location, T staging, and pathological types. The expression of CXCR4 was 40.6%, 68.2% and 76.9% in cases of N0, N1 and N2 stage, 39.4% and 73.5% in cases of Ⅰ+Ⅱ and Ⅲ stage, respectively. The positive rate of CXCR4 expression was significantly lower in the case with low MVD than that with high MVD (36.4% *vs* 74.3%, $P < 0.01$), and the CXCR4-positive case had a higher recurrent or metastatic rate (47.4% *vs* 24.1%, $P < 0.05$) and a lower 3-year survival rate (32.6% *vs* 71.3%, $P < 0.05$) than the CXCR4-negative one.

CONCLUSION: Positive CXCR4 expression and high tumor MVD are associated with the poor prognosis of patients, and they can be used as potential predictive factors for the recurrence or metastasis of colorectal cancer.

Key Words: Chemokine receptor CXCR4; Colorectal carcinoma; Microvessel density; Prognosis

Zhang MX, Iqbal K, Yu SY. Expression of CXC chemokine receptor CXCR4 in colorectal carcinoma and its correlation with prognosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):772-776

摘要

目的: 探讨趋化性细胞因子受体CXCR4在大肠癌中的表达及其与预后的关系.

方法: 收集67例大肠癌患者手术标本, 采用免疫组织化学方法检测肿瘤组织中CXCR4蛋白的表达和微血管密度, 分析CXCR4的表达水平与临床病理特征和生存的关系.

结果: 大肠癌组织中CXCR4蛋白表达阳性率为56.7%(38/67), 与患者的性别、年龄、肿瘤部位、T分期和病理类型无相关性(P>0.05), 与淋巴结转移、临床分期、微血管密及生存相关. N0, N1和N2期CXCR4的阳性率分别为40.6%, 68.2%, 76.9%(P<0.05); Ⅰ+Ⅱ期和Ⅲ期CXCR4的阳性率分别为39.4%, 73.5% (P<0.05). 低MVD组CXCR4的阳性率显著低于高MVD组(36.4% *vs* 74.3%, P<0.01); CXCR4阳性组较CXCR4阴性组有较高的复发/转移率(47.4% *vs* 24.1%, P<0.05)和较低的3 a无病生存率(32.6% *vs* 71.3%, P<0.05).

结论: CXCR4可能促进大肠癌的侵袭和转移以及血管生成并影响其预后.

关键词: CXCR4蛋白; 大肠癌; 微血管密度; 预后

张孟贤, Kashif Iqbal, 于世英. 趋化性细胞因子受体CXCR4在大肠癌的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2007;15(7):772-776
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/772.asp

0 引言

大肠癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 占所有癌症相关死亡原因的第3位. 在临床上主要采取以手术治疗为主的综合治疗, 但效果并不理想, 仍有相当部分患者会失败. 复发和转移是大肠癌患者死亡的主要原因. 因此, 大肠癌复发和转移相关机制的研究具有重要意义. 最近研究表明, 趋化性细胞因子及其受体的相互作用可能在癌症的定向转移过程中起着关键作用. 其中最令人瞩目的是趋化因子受体CXCR4与其配体CXCL12的相互作用(CXCR4/CXCL12轴)与多种癌症发展及转移密切相关. 本研究采用免疫组织化学方法检测大肠癌中的CXCR4表达和微血管密度(micro vessel density, MVD), 探讨CXCR4在大肠癌中的表达情况及其与预后的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-01/2004-12在华中科技大学附属同济医院行根治性手术切除的大肠癌组织标本67例. 要求纳入本研究的患者均未接受术前放化疗, 并且有完整临床病理资料(包括患者年龄、性别、诊断、病理类型、TNM分期等)和随访资料(包括复发、死亡或无瘤生存). 67例患者中男48例, 女19例; 中位年龄52岁(25-71岁); 结肠癌40例, 直肠癌27例; 根据AJCC(美国癌症联合会)第6版分期标准, Ⅰ期14例, Ⅱ期19例, Ⅲ期34例. 末次随访时间到2006-05-31, 中位随访时间23(3-40) mo. 兔抗人CXCR4 mAb购自晶美生物公司, 兔抗人CD34 mAb和SP试剂盒购自北京中山生物公司.

1.2 方法 术后标本经40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 切片厚4 μm, 常规脱蜡至水. 采用SP三步法, 具体操作步骤按试剂说明书进行. CXCR4蛋白检测采用的一抗为兔抗人CXCR4 mAb(工作浓度为1∶100); 微血管密度检测一抗为兔抗人CD34 mAb (工作浓度为1∶50). 阴性对照用PBS代替一抗.

CXCR4结果判断: 光学显微镜下观察, 阳性细胞胞膜、胞质或者胞核出现棕黄色颗粒. 在低倍镜(40×)下观察CXCR4表达较强的区域, 高倍镜(200×)观察3个视野, 计数阳性细胞所占的百分比. 参考相关文献[1], 阳性细胞超过肿瘤细胞数的10%定义为CXCR4阳性, 否则为阴性.

MVD计数: 凡染成棕黄色, 与临近血管、癌细胞分开的单个内皮细胞或内皮细胞簇, 均作为一个血管计数, 不考虑是否有管腔形成. 凡管腔大于8个红细胞大小, 或有较厚的血管肌层均不计数. 先在低倍镜(40×)下选取5个血管数量较多的视野, 再转到高倍镜(200×)下计数每个视野的微血管数量. 按照每个200倍视野面积为0.785 mm^2, 计算MVD, 以5个视野的均值作为每个标本的MVD值.

统计学处理 CXCR4的表达及MVD与临床病理参数的关系采用χ^2分析, 生存情况使用Kaplan-Meier法绘制生存曲线, 并用log-rank检验. 所有统计计算使用SPSS10.0版统计分析软件包完成, $P<0.05$具有统计学意义.

2 结果

2.1 CXCR4的表达及其与大肠癌临床病理特征的关系 大肠癌组织中CXCR4阳性表达在光学显微镜下表现为棕黄色颗粒, 为胞膜、胞质或胞核的阳性着色. 本研究67例中有38例(56.7%)CXCR4表达阳性. CXCR4蛋白表达与大肠癌淋巴结转移状况(N分期)关系密切, 随着淋巴结分期的升高, CXCR4的表达显著增加($P<0.05$); 在大肠癌的临床分期(AJCC分期系统)中, CXCR4蛋白表达与临床分期相关, Ⅰ+Ⅱ期和Ⅲ期CXCR4的阳性率分别为39.4%和73.5%($P<0.05$); CXCR4蛋白的阳性率随分化程度的降低有升高趋势, 但差异无统计学意义($P>0.05$). CXCR4的表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位、T分期和病理类型无明显关系($P>0.05$)(表1).

2.2 MVD计数及其与大肠癌临床病理特征的关系 全组67例大肠癌患者MVD值为18.50±7.48, 以小于均值归入低MVD组, 大于或等于均值则归入高MVD组, 其中高MVD组占50.7% (34/67). MVD的高低与大肠癌的病理类型密切相关($P<0.05$); 随着N分期和临床分期的升高, MVD有升高趋势, 但差异无统计学意义($P>0.05$); MVD与患者年龄、性别、肿瘤部位、T分期和分化程度无明显关系($P>0.05$)(表1).

■创新盘点
本文在检测CXCR4表达的同时进行微血管密度检测, 初步探讨了CXCR4与肿瘤血管生成的关系. 另外对入选的研究对象进行较长时间的随访, 分析CXCR4表达与患者生存和复发/转移的关系.

■应用要点
探讨CXCR4在大肠癌中的表达及其与复发和转移的关系, 有助于分析大肠癌转移的发生机制, 为大肠癌患者预后的判断提供了参考, 为预防和治疗大肠癌复发和转移提供新的靶点和策略.

表 1 CXCR4表达及MVD与大肠癌患者临床病理参数的关系

参数	*n*(%)	CXCR4表达		*P*值	MVD		*P*值
		阴性	阳性		低	高	
性别							
男	48(71.6)	20	28	0.67	22	26	0.425
女	19(28.4)	9	10		11	8	
年龄(y)							
<50	29(43.3)	11	18	0.44	12	17	0.327
≥50	38(56.7)	18	20		21	17	
部位							
结肠	40(59.7)	19	21	0.39	18	22	0.460
直肠	27(40.3)	10	17		15	12	
T分期							
T1	7(10.4)	4	3	0.68	5	2	0.154
T2	27(40.3)	11	16		15	12	
T3	23(34.3)	11	12		11	12	
T4	10(14.9)	3	7		2	8	
N分期							
N0	32(47.8)	19	13	0.04	20	12	0.098
N1	22(32.8)	7	15		9	13	
N2	13(19.4)	3	10		4	9	
临床分期							
Ⅰ	14(20.9)	8	6	0.02	10	4	0.106
Ⅱ	19(28.4)	12	7		10	9	
Ⅲ	34(50.7)	9	25		13	21	
病例类型							
管状腺和乳头状腺	51(76.1)	25	26	0.21	31	20	0.003
黏液腺	10(14.9)	3	7		2	8	
其他	6(9.0)	1	5		0	6	
分化程度							
高分化	18(26.9)	8	10	0.08	9	9	0.757
中分化	28(41.8)	13	15		15	13	
低分化	21(31.3)	8	13		9	12	

2.3 CXCR4表达与MVD的关系 本研究结果显示, 33例低MVD大肠癌中CXCR4的阳性表达率为36.4%(12/33), 明显低于高MVD组的74.3%(P<0.01), 提示大肠癌组织微血管密度与CXCR4的表达有关.

2.4 CXCR4表达与大肠癌预后的关系 在随访过程中, 全组大肠癌患者中有25例在治疗后不同的时间出现复发/转移, 复发/转移率为37.3%(25/67). CXCR4阴性组复发率为24.1%, 明显低于CXCR4阳性组的47.4%(P<0.05). 比较两组的生存曲线(图1), CXCR4阴性组3 a无病生存率为71.3%, CXCR4阳性组为32.6%, 经log-rank检验, 差异有显著性(P<0.05).

2.5 MVD与大肠癌预后的关系 根据肿瘤组织中微血管密度的高低, 比较患者的生存曲线(图2), 低MVD组3 a无病生存率为68.4%, 高MVD组为24.7%, 经log-rank检验, 差异有显著性(P<0.05).

3 讨论

大肠癌包括结肠癌和直肠癌两部分, 最重要的生物学特征之一就是容易发生转移. 约35%的结直肠患者在确诊时已发生转移, 其中最常见的转移部位为肝脏. 因此, 研究结直肠癌的转移机制, 寻找预防和治疗结直肠癌转移的方法, 对于提高结直肠患者的预后具有重要意义.

人类的趋化性细胞因子家族包含着约45-50种蛋白质, 具有广泛的生物学功能[2-3]. CXCL12是属于CXC类趋化性细胞因子, CXCR4是其唯

一的专属受体[4]. 起初对于CXCR4/CXCL12信号系统的研究主要集中在免疫系统, 研究表明他在造血干细胞归巢、淋巴细胞迁移和HIV感染等方面发挥着重要作用[5-6]. 自Muller *et al*[7]报道了在大鼠模型中CXCR4与其配体CXCL12共同作用导致乳腺癌转移后, 趋化因子及其受体对肿瘤细胞的转移作用受到广泛重视. 他们在研究中发现CXCR4在人类乳腺癌中高表达, 而CXCR4的特异性配体CXCL12在乳腺癌容易发生转移的器官中高表达, 如骨髓、肺和脑. 此外, 有人发现如果用抗体体内中和CXCR4或采用基因沉默技术, 可以导致乳腺癌侵袭能力和器官特异性转移潜能明显下降[8-9]. 最近一些研究报道, 人类的卵巢癌[10]、肺癌[11]、食道癌[12]等也存在着CXCR4的选择性表达. 基于以上研究, 我们推断一些不同的癌细胞亦可能通过CXCR4/CXCL12途径介导他们的侵袭和转移, 就此我们检测分析了CXCR4在人大肠癌组织中的表达情况及其与临床病理特征和预后的关系.

在本实验中, 我们通过对67例大肠癌手术标本进行免疫组织化学染色, 发现38例CXCR4阳性表达, 阳性表达率为56.7%. 通过进一步分析, 我们发现CXCR4的表达与大肠癌淋巴结转移状况(N分期)和AJCC临床分期密切相关. 随着N分期和临床分期的增高, CXCR4表达的阳性率增高($P<0.05$). CXCR4阳性表达率与患者年龄、性别、病理类型、肿瘤大小(T分期)无明显关系. 结果与文献报道基本一致. Ottaiano *et al*[13]对72例Ⅱ期和Ⅲ期大肠癌手术标本进行研究, 结果发现CXCR4表达阳性率为77.8%, 且与淋巴结受累和早期发生远处转移密切相关. 马向涛 *et al*[14]研究发现结直肠癌组织中CXCR4/CXCL12表达水平比正常组织明显增高; 大肠癌肝转移组织中CXCR4/CXCL12表达比原发肿瘤增高. Rubie *et al*[15]实验也发现大肠癌肝转移灶CXCR4表达明显上调. 这些结果提示CXCR4极有可能参与大肠癌的侵袭和转移.

研究表明, 一些趋化性细胞因子可能通过促进血管生成而在肿瘤生长方面发挥间接作用[16]. Salcedo *et al*[17]研究发现, CXCR4是内皮细胞表达的一种主要的趋化性细胞因子受体. VEGF和bFGF可以明显上调CXCR4在内皮细胞上的表达, 使内皮细胞对CXCL12的反应性增加. 反过来, CXCL12/CXCR4也可以增加内皮细胞合成和释放VEGF, 从而形成一个正反馈过程, 促进血管的生成. 为了探讨趋化性细胞因子受体CXCR4与大肠癌血管生成的关系, 我们对67例大肠癌标本MVD进行检测(MVD与临床病理特征的关系见表1). 结果发现低MVD组CXCR4阳性表达率较高MVD组低, 提示大肠癌组织血管生成与CXCR4的表达有关. CXCR4是否通过促进血管生成从而促进大肠癌的侵袭和转移需要进一步深入研究.

为了进一步研究CXCR4的表达与大肠癌患者预后的关系, 我们对患者进行了随访. 通过分析发现CXCR4阴性组复发/转移率为24.1%, 明显低于CXCR4阳性组的47.4%($P<0.05$). CXCR4阴性组3 a无病生存率为71.3%, CXCR4阳性组为32.6%, 差异有显著性($P<0.05$). 同时也分析了MVD对大肠癌预后的影响, 结果发现低MVD组3 a无病生存率为68.4%, 高MVD组为24.7%, 差异有显著性($P<0.05$). 提示CXCR4的表达与大肠癌的复发/转移以及生存有关. 因此通过检测大肠癌患者CXCR4的表达和MVD, 有可能帮助我们预测和识别复发和转移的高危患者, 以进行强化治疗.

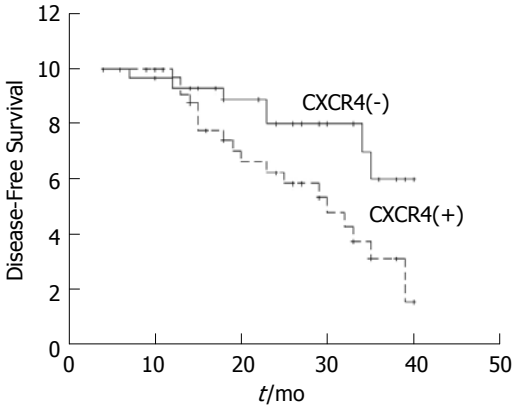

图 1 大肠癌患者CXCR4蛋白阴性表达组与阳性表达组的无病生存曲线.

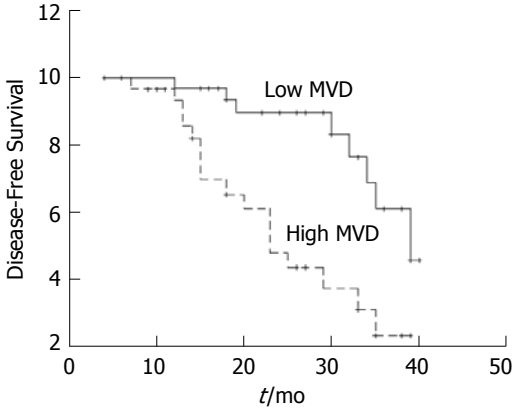

图 2 大肠癌患者低MVD组和高MVD组的无病生存曲线.

■名词解释

1 趋化性细胞因子: 趋化性细胞因子是不同类型细胞分泌的低分子量(8-10 kDa)的细胞因子, 他们对各种白细胞亚类, 如中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞具有趋化和预激活作用.

2 趋化性细胞因子受体: 是一类表达于不同类型细胞上的含有7个跨膜区的G蛋白偶联受体. 趋化性细胞因子通过作用于趋化性细胞因子受体参与多种生理和病理过程, 如细胞的生长、发育、分化、凋亡等, 通过趋化吸引白细胞及调节其效应功能等参与免疫应答过程.

■同行评价
肿瘤的复发与转移是决定预后的关键因素，因此是分子肿瘤学研究的热点. 本文研究趋化性细胞因子受体CXCR4在大肠癌中的表达及与临床特征的关系，以明确CXCR4在结肠癌中的作用. 研究发现CXCR4在人大肠癌组织中的表达率较高，并且与淋巴结受累、临床分期、无病生存时间及肿瘤的MVD密切相关，表明CXCR4是一结肠癌复发、转移的预警因子，研究具有一定的价值.

总之，本研究结果表明CXCR4在大肠癌组织中的表达与淋巴结受累、临床分期、无病生存率及肿瘤的MVD密切相关. 提示CXCR4可能在大肠癌发生、发展、侵袭转移和肿瘤血管生成中发挥着重要作用. 这些结果不仅为大肠癌患者预后的判断提供了参考，而且为预防和治疗大肠癌复发和转移提供新的靶点和策略，值得进一步深入研究.

4 参考文献

1 Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 2003; 105: 186-189

2 Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-242

3 Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-127

4 Kucia M, Jankowski K, Reca R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol* 2004; 35: 233-245

5 Kim CH, Broxmeyer HE. SLC/exodus2/6Ckine/TCA4 induces chemotaxis of hematopoietic progenitor cells: differential activity of ligands of CCR7, CXCR3, or CXCR4 in chemotaxis vs. suppression of progenitor proliferation. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 455-461

6 Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382: 829-833

7 Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-56

8 Lapteva N, Yang AG, Sanders DE, Strube RW, Chen SY. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth *in vivo*. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 84-89

9 Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L, Shim H. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2005; 65: 967-971

10 Jiang YP, Wu XH, Shi B, Wu WX, Yin GR. Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 226-233

11 Su L, Zhang J, Xu H, Wang Y, Chu Y, Liu R, Xiong S. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8273-8280

12 Koishi K, Yoshikawa R, Tsujimura T, Hashimoto-Tamaoki T, Kojima S, Yanagi H, Yamamura T, Fujiwara Y. Persistent CXCR4 expression after preoperative chemoradiotherapy predicts early recurrence and poor prognosis in esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7585-7590

13 Ottaiano A, Franco R, Aiello Talamanca A, Liguori G, Tatangelo F, Delrio P, Nasti G, Barletta E, Facchini G, Daniele B, Di Blasi A, Napolitano M, Ierano C, Calemma R, Leonardi E, Albino V, De Angelis V, Falanga M, Boccia V, Capuozzo M, Parisi V, Botti G, Castello G, Vincenzo Iaffaioli R, Scala S. Overexpression of both CXC chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-III colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2795-2803

14 马向涛，余力伟，张在兴，王杉，杜如昱，崔志荣. 趋化因子受体CXCR4/CXCL12信号转导通路在结直肠癌肝转移中的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1566-1570

15 Rubie C, Frick VO, Wagner M, Weber C, Kruse B, Kempf K, Konig J, Rau B, Schilling M. Chemokine expression in hepatocellular carcinoma versus colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6627-6633

16 Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer* 2006; 42: 768-778

17 Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: *In vivo* neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol* 1999; 154: 1125-1135

电编 张敏 编辑 张焕兰

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 777-780
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

痛泻要方加味联合黛力新治疗肠易激综合征60例

何如锋

何如锋, 四川省内江市第一人民医院中西医结合科 四川省内江市 641000
通讯作者: 何如锋, 641000, 四川省内江市中区沱中路31号, 内江市第一人民医院中西医结合科. scnjhrf118@sina.com
电话: 0832-2100073 传真: 0832-2104571
收稿日期: 2006-12-05 接受日期: 2007-01-11

Combination of Tongxie Yaofang Jiawei and Deanxit in treatment of irritable bowel syndrome: an analysis of 60 cases

Ru-Feng He

Ru-Feng He, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, the First People's Hospital of Neijiang City, Neijiang 641000, Sichuan Province, China
Correspondence to: Ru-Feng He, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, the First People's Hospital of Neijiang City, Sichuan 31 Tuozhong Road, Middle District, Neijiang 641000, Sichuan Province, China. scnjhrf118@sina.com
Received: 2006-12-05 Accepted: 2007-01-11

Abstract

AIM: To observe the clinical efficacy of Tongxie Yaofang Jiawei (TYJ) combined with Deanxit in the treatment irritable bowel syndrome (IBS).

METHODS: A total of 110 IBS patients were divided randomly into group A (n = 60) and B (n = 50), treated with TYF combined with Deanxit, and TYF alone, respectively, for a course of 1 month. The efficacy rate and adverse effect were observed in both groups.

RESULTS: The total efficacy rates were 100% and 84% in group and B, respectively (P < 0.05). Single-symptom analysis showed that the efficacy rates for abdominal pain, abdominal distention and diarrhea were significantly higher in group A than those in group B (100%, 96%, 93% *vs* 88%, 81%, 81%; all P < 0.05), while there were no marked difference for constipation and mucous stool between the two groups (P > 0.05). No visible adverse effects were observed in group A.

CONCLUSION: Chinese medicine TYJ combined with Deanxit can rapidly alleviate the symptoms of abdominal pain, abdominal distention and diarrhea, etc. so as to improve the clinical efficacy and reduce the adverse effect.

Key Words: Tongxie Yaofang Jiawei; Deanxit; Irritable bowel syndrome

He RF. Combination of Tongxie Yaofang Jiawei and Deanxit in treatment of irritable bowel syndrome: an analysis of 60 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):777-780

摘要

目的: 观察中药痛泻要方加味联合黛力新治疗肠易激综合征(IBS)的临床疗效.

方法: 将110例IBS患者随机分为观察组(n = 60)和对照组(n = 50), 分别采用中药痛泻要方加味联合黛力新及单用中药痛泻要方加味治疗1 mo. 观察两组有效率、不良反应.

结果: 观察组和对照组总有效率分别为100%, 84%(P<0.05). 腹痛、腹胀、腹泻单项症状总有效率观察组分别为100%, 96%, 93%, 而对照组分别为88%, 81%, 81%(P均<0.05); 便秘、黏液便总有效率观察组与对照组无显著差异(P>0.05). 观察组治疗期间未发现明显不良反应.

结论: 中药痛泻要方加味联合黛力新能快速消除和改善患者腹痛、腹胀、腹泻等症状, 显著提高临床治疗效果, 无明显不良反应.

关键词: 中药痛泻要方; 黛力新; 肠易激综合征

何如锋. 痛泻要方加味联合黛力新治疗肠易激综合征60例. 世界华人消化杂志 2007;15(7):777-780
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/777.asp

0 引言

肠易激综合征(IBS)是一种具有特殊生理病理基础的、独立的肠功能紊乱性疾病[1]. IBS可以发生于任何年龄, 以20-40岁青壮年居多, 男女之比1/2, 占消化门诊量的20%, 我国IBS患病率约

■背景资料
肠易激综合征是一组以腹痛、腹胀、腹泻或便秘、黏液便及便后不尽感为主要表现的功能性肠病, 发病率甚高, 发病机制复杂, 至今未完全明了. 但心理、情绪、社会因素在IBS的发生、发展中起重要作用. 目前西医以对症治疗为主, 中医以疏肝健脾和胃为基础辩证治疗.

■研发前沿
目前研究认为IBS的发病机制主要以胃肠动力异常、内脏高敏感性、社会心理因素、肠道感染有关, 而脑-肠轴互动调节机制被认为可能是联系并阐释IBS发病多因素相互影响的主要途径, 成为目前研究热点和切入点.

■**创新盘点**
本研究以常规中药联合抗抑郁药物治疗IBS取得显著疗效, 说明精神心理异常在本病发病机制中的重要性, 为进一步探讨精神心理因素如何通过脑-肠轴及其调节机制影响肠神经内分泌免疫功能提供了临床依据.

占人群的15%[2]. 其临床表现呈多样性, 症状持续或反复发作而无特异性[3], 但以腹痛、腹胀、腹泻或便秘、黏液便及便后不尽感为主要表现. IBS的发病机制复杂, 现代医学认为与精神因素、胃肠动力学异常、肠道感染与菌群失调、神经内分泌因素等相关, 对IBS的治疗主要有钙通道阻滞药、促胃肠动力药、肠容积性泻药、调节精神药物及对症治疗[4]. 中医学认为与肝郁气滞、肝脾不和、脾胃虚弱为主. 治疗上以辩证分型论治为主. 治疗方法较多, 但疗效均不尽满意. 我们采用中西药结合方法, 以中药痛泻要方加味联合黛力新治疗IBS 60例, 并与单用痛泻要方加味治疗对比, 取得满意疗效.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-06/2005-12本院门诊及病房选择患者110例, 全部病例均以腹痛、腹胀、腹泻及便秘为主诉, 伴有轻重不等的神经衰弱症状, 临床表现为腹痛101例(92%), 腹胀98例(89%), 腹泻80例(73%), 便秘45例(41%), 黏液便41例(37%). 随机分为观察组和对照组. 观察组60例, 其中男26例, 女34例, 年龄20-55平均(34)岁, 病程10 mo-15 a. 对照组50例, 其中男28例, 女22例, 年龄19-58(平均36)岁, 病程1-14 a. 治疗前详细询问病史、体格检查, 做血、尿、大便常规, 血沉, 肝肾功, B超及纤维结肠镜等检查, 排除器质性疾病, 符合1986年全国慢性腹泻学术讨论会制订的IBS临床诊断标准[5]. 大部分病例都曾服用过其他中西药物治疗.

1.2 方法 观察组采用中药痛泻要方加味, 组方: 炒白术15-30 g, 白芍药30-60 g, 陈皮10-15 g, 防风10 g, 甘草10-15 g. 腹痛甚者加元胡10-15 g, 川楝子10-15 g; 腹泻甚者加乌梅10 g, 石榴皮15-25 g; 便秘甚者加生大黄8-12 g, 槟榔10-20 g; 脾虚甚者加黄芪30-50 g, 党参15-30 g; 兼阳虚者加干姜10 g, 肉桂10-15 g. 每日一剂, 水煎分3次口服. 联合黛力新片(丹麦灵北制药有限公司生产)20 mg, 每日2次, 早晨和中午各一次口服. 对照组单用中药痛泻要方加味治疗(组方同前), 每日1剂, 水煎分3次口服. 两组疗程均为1 mo. 疗程中禁用其他对消化系统功能有影响的药物.

1.2.1 观察方法 疗程期间每周观察2次, 了解每日排便次数, 大便性状, 腹痛、腹胀等临床症状改善情况, 并作详细体格检查, 记录药物不良反应.

1.2.2 疗效判定标准 1 mo疗程结束后进行总疗效评定及单项症状疗效评定. (1)总疗效评定. 显效: 腹痛、腹胀及其伴随症状完全消失, 大便次数恢复正常(每日1-2次), 大便性状恢复正常; 有效: 疗程结束或治疗期间临床症状明显改善, 大便次数减少, 性状好转, 但未完全恢复正常; 无效: 治疗前后临床症状及大便次数、性状无明显变化. (2)单项症状疗效评定. 单项症状包括腹痛、腹胀、腹泻、便秘、黏液便. 显效: 各项症状完全消失; 有效: 各项症状较治疗前明显减轻, 发作频率较治疗前少; 无效: 症状无改善. 显效+有效 = 总有效率.

表 1 两组患者的总疗效比较(n, %)

	n	显效	有效	无效	总有效
观察组	60	44(73)	16(27)	0(0)	60(100)[a]
对照组	50	24(48)	18(36)	8(16)	42(84)

[a]$P<0.05$ *vs* 对照组.

统计学处理 将所得资料采用SPSS10.0统计软件进行处理, t检验分析, $P<0.05$为有显著性差异.

2 结果

2.1 总疗效比较 观察组总有效率为100%, 对照组为84%, 观察组显著高于对照组($P<0.05$, 表1).

2.2 单项症状疗效比较 对腹痛、腹胀、腹泻的疗效观察组总有效率高于治疗组(均$P<0.05$); 对便秘、黏液便的疗效两组差异均无显著意义(均$P>0.05$, 表2).

3 讨论

IBS是一种发病因素复杂的慢性功能性肠病. 现代医学一般认为IBS病理生理学基础主要是胃肠动力学异常、内脏感觉异常、精神因素、肠道感染与菌群失调、神经内分泌因素等多因素综合的结果, 其中心理、情绪、社会及环境因素在致病过程中起着极其重要的作用. 中医学没有肠易激综合征病名, 根据临床症状, 常把IBS归属于“泄泻、腹痛、便秘、郁证、休息痢”等病证范畴. 中医认为本病多与外感六淫、内伤七情、脾胃功能虚弱有关, 临床多数病例尤以情绪失常诱发或加重病情. 正如《素问举痛论》云: “百病生于气”. 忧思恼怒, 肝气郁结, 不得疏泄; 肝脾不调, 升降失常, 不通则痛; 气机郁滞, 致大肠传导失司, 糟粕内停而为便秘. 肝乘脾则脾不健运, 水湿不化而为溏泻.

叶天士云: “肝病必犯土是侮之所胜也, 克脾则腹胀, 便或溏或不爽. ”可见其核心病机是“肝郁脾虚”[6], 气机不畅, 运化失司, 大肠传化失常. 故疏肝理气, 健脾和胃, 调畅气机则为主要治则. 机于以上认识, 以抑肝扶脾, 调理气机之痛泻要方为主方, 辩证加味, 个性化治疗, 体现中医辩证论治优势. 方中白芍养血泻肝, 配甘草缓急止痛, 且可应用白芍至60 g, 加强解痉止痛, 据文献报道白芍有兴奋或抑制胃肠运动双向调节, 在胃肠痉挛时可有解痉止痛作用, 在FD(功能性消化不良)、IBS胃肠功能减弱时可有促胃肠动力作用[7]. 白术健脾除湿, 配陈皮理气醒脾和中; 防风能“搜肝气”祛风邪, 一则协助白芍的调肝, 使肝不乘脾, 一则借此升浮之品以升阳止泻. 腹泻甚者加用乌梅、石榴皮收敛止泻; 大便秘结者加生大黄、槟榔助行气导滞, 泻下通便, 此类药物据现代研究均有促胃肠动力作用[8], 尤其是大黄含蒽醌类物质包括大黄酸和大黄素, 能促进豚鼠结肠平滑肌细胞膜去极化, 加快慢波和快波发放, 能显著促进肠蠕动及推进功能[9]. 脾虚甚者加用黄芪、党参增强补气健脾和胃之功, 兼阳虚者加用干姜、肉桂温阳化气, 健运脾胃. 诸药合用, 共奏补脾土而泻肝木, 调气机而止痛泻之功. 黛力新是一种新型抗抑郁药物, 由小剂量二盐酸三氟噻吨与小剂量四甲蒽丙胺的合剂, 其药理作用是在两种成份的综合作用下, 提高突触间隙多巴胺、去甲肾上腺素及5-羟色胺等多种不同神经递质的含量, 调整中枢神经系统的功能[10], 具有良好抗焦虑、抗抑郁和兴奋的特点. 而IBS的发病和加重又往往与精神心理因素有关, 多数患者存在头昏、头痛、失眠、多梦等症状并伴随易激动, 抑郁、焦虑疑病等激惹情绪, 是一种具有特殊心理生理基础的心身疾病[11]. 黛力新能快迅消除和改善患者腹痛、腹胀、腹泻及焦虑紧张, 烦燥易怒及抑郁症状, 推测该药可能是通过胃肠道激素的调整及调节肠道神经肌电运动功能和内分泌而发挥作用的[12]. 观察发现中药痛泻要方加味联合黛力新治疗IBS具有良好协同作用, 能显著提高临床疗效, 改善生活质量, 树立治疗信心, 患者依从性好. 而对照组单用中药辩证治疗, 症状缓解的程度较观察组差, 尤其精神心理因素如患者的进行性焦虑和躯体化症状不能很好改善, 使肠功能紊乱就不能很好缓解, 影响了疾病疗效和患者治疗信心.

本临床研究是以中药治疗为主, 采用中药加小剂量抗抑郁药物为观察模式, 并同常规中药治疗对照; 有别于以西药治疗为基础, 加入中药观察其对疗效的提升这一传统思维模式. 是因为, 我们认为中医药对IBS的治疗存在较大优势, 从20 a来中医药治疗本病的临床报道分析可得到证实. 围绕肝郁脾虚、肝胃不和为基础进行辩证治疗[6], 既体现了中医辩证论治优势, 又充分发挥中药复方制剂包含多种复杂化学成份, 针对IBS发病的多环节、多靶点治疗, 其效果明显优于单用西药. 但IBS是一个多因素的生理心理疾病, 除了生理因素外还有明显精神、心理、情感因素, 尤其是反复发作, 久治不愈的中重度IBS患者, 其焦虑和抑郁可达40%-60%, 主要表现为焦虑、抑郁和恐惧、行为因素, 诸如应激和躯体创伤事件[6]. 因此, 在中药治疗基础上加用黛力新类抗抑郁药物, 可明显改善神经精神症状, 消除不良情绪和应激反应, 调节中枢神经系统, 并通过“脑-肠轴”相互作用[13], 减轻和消除不良情绪记忆, 影响肠神经系统, 促进胃肠动力紊乱和内脏感知异常的修复.

总之, 采用中药痛泻要方加味扶脾抑肝, 结合黛力新治疗IBS疗效肯定, 尤其是对伴焦虑、抑郁症状的中重度IBS患者效果显著, 值得进一步观察总结.

表 2 两组单项症状疗效比较(n, %)

	n	显效	有效	无效	总有效
腹痛					
观察组	52	41(79)	11(21)	0(0)	52(100)[a]
对照组	49	25(51)	18(37)	6(12)	43(88)
腹胀					
观察组	50	38(76)	10(20)	2(4)	48(96)[a]
对照组	48	29(60)	10(21)	9(19)	39(81)
腹泻					
观察组	44	31(70)	10(23)	3(7)	41(93)[a]
对照组	36	20(56)	9(25)	7(19)	29(81)
便秘					
观察组	22	11(50)	8(36)	3(14)	19(86)
对照组	23	10(43)	9(39)	4(17)	19(83)
黏液便					
观察组	22	12(54)	7(32)	3(14)	19(86)
对照组	19	9(47)	6(32)	4(21)	15(79)

[a]$P<0.05$ *vs* 本组对照组.

■**应用要点**
黛力新是新型抗抑郁药, 且药物不良反应轻微, 安全性和耐受性良好, 患者依从性较好, 通过本研究为中药联合抗抑郁药物规范治疗IBS, 特别是中重度IBS提供了依据.

4 参考文献

1 危北海, 张万岱, 陈治水. 中西医结合消化病学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 790-804

■同行评价
中西医结合治疗研究一般是在西医治疗基础上加入中药, 侧重观察中药的加入对疗效的提升, 因此通常以西药作为对照, 也有少数研究同时设西药对照和中药对照. 本文却是以中药作对照, 并未设西药对照, 虽不符合一般思维, 但也可认为是对传统思维的一个突破性尝试, 其意义在于把中药和西药完全等同来看, 甚至于把西药作为对中药作用的一个补充来对待, 对于中医的优势病种, 进行这样的尝试是有必要的.

2 徐秀英. 肠易激综合征的当前观念. 辽宁医学杂志 1998; 12: 9
3 杨天时, 郑雄. 伴焦虑、抑郁情绪的肠易激综合征之心理及药物治疗. 中华现代医学杂志 2001; 1: 11-12
4 寇学斌. 援生力维和小剂量抗抑郁药治疗难治性肠易激综合征32例. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1932-1935
5 全国慢性腹泻学术讨论会. 肠易激综合征临床诊断参考标准. 中华消化杂志 1987; 7: 159
6 蔡淦, 张正利. 肠易激综合征研究现状与展望. 世界华人消化杂志 2005; 13: 937-939
7 王振华, 吕立生. 中药胃肠通治疗胃肠功能紊乱. 新消化病学杂志 1997; 5: 448-449
8 朱金照, 杨国汉, 冷恩仁, 陈东风. 中药的促胃肠动力作用. 世界华人消化杂志 1999; 7: 689-690
9 杨文修, 金正根, 许文胜, 倪红艳, 钟朝凤, 田在善. 大承气汤和大黄对豚鼠结肠带平滑肌细胞电活动的影响. 中国中西医结合杂志 1993; 13: 33-35
10 曹良安. 新型抗抑郁抗焦虑药: 黛安神. 医药导报 1999; 18: 111-112
11 胡平亚. 匹维溴胺联合黛安神治疗肠易激综合征的疗效观察. 浙江医学 2000; 22: 438-439
12 叶惠韶, 李桥. 黛安神片治疗肠易激综合征30例临床分析. 中国临床医学生物学杂志 1999; 5: 210
13 王敬东. 脑-肠互动在肠易激综合征发病中的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3299-3301

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

第三届全军胃肠外科学术会议暨 2007年普通外科高峰论坛征文通知

本刊讯 全军胃肠外科学术委员会定于2007-06上旬在贵阳市召开“第三届全军胃肠外科学术会议暨2007年普通外科高峰论坛”. 会议将邀请国内、军内著名外科专家, 对热点问题作专题演讲与探讨. 代表获得国家继续医学教育Ⅰ类学分.

1 征文内容

(1)胃肠外科和普通外科的新进展、新技术、新手术、新经验; (2)实验研究; (3)腹腔镜手术; (4)围手术期肿瘤放化疗; (5)围手术期营养支持; (6)围手术期护理等.

2 征文要求

论文全文和摘要(600字左右)各一份, 并附拷贝软盘, 请寄: 100700北京市东城区南门仓5号 北京军区总医院全军普通外科中心 李世拥 收; 电话: 010-66721188; 截稿日期: 2007-05-01.

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

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

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. (世界胃肠病学杂志社2007-03-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年3月8日; 15(7): 781-784
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

普外科病房深部念珠菌感染标本73例分析

狄建忠, 张 频, 蒋燕群, 郑 起, 汪 昱, 冯昌宁

狄建忠, 张频, 蒋燕群, 郑起, 汪昱, 冯昌宁, 上海交通大学附属第六人民医院普外科 上海市 200233
蒋燕群, 上海交通大学附属第六人民医院检验科 上海市 200233
通讯作者: 张频, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. yzonnezp@126.com
电话: 021-64369181-1454
收稿日期: 2006-12-25 接受日期: 2007-01-10

Anaiysis of 73 specimens with deep candida infection in general surgical ward

Jian-Zhong Di, Pin Zhang, Yan-Qun Jiang, Qi Zheng, Yu Wang, Chang-Ning Feng

Jian-Zhong Di, Pin Zhang, Yan-Qun Jiang, Qi Zheng, Yu Wang, Chang-Ning Feng, Department of General Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
Yan-Qun Jiang, Department of Clinical Laboratory, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
Correspondence to: Pin Zhang, Department of General Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. yzonnezp@126.com
Received: 2006-12-25 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To investigate the risk factors and prevention methods of deep fungal infection in general surgical ward.

METHODS: The clinical materials of 73 patients infected with nosocomial candida from January 2004 to December 2005 were retrospectively analyzed.

RESULTS: One hundred and twenty-two strains of candida were cultivated from in 73 specimens, and the infection rate of candida albicans was as high as 45% (55/122). The infection of candida glabrata and tropicalis covered a percentage of 40% (49/122) and 7% (8/122), respectively. The 5 patients with the highest infection rates were found with gastrointestinal carcinoma, severe acute pancreatitis, non-traumatic gastrointestinal perforation, hepatobiliary and pancreatic carcinoma, and abdominal trauma combined intestinal perforation. The patients with the mortality rate ranked the first four were diagnosed with non-traumatic gastrointestinal perforation, gastrointestinal carcinoma, acute obstructive cholangitis and severe acute pancreatitis. Eighteen of 73 cases died, and the mortality rate was 25%. Except for breast cancer, the mortality of the other diseases combined with fungal infection was obviously higher than that of the single diseases.

CONCLUSION: Gastrointestinal operations, gastrointestinal leakage, gastrointestinal fungal parasitism, broad-spectrum antibiotic usage, and senility are the important reasons for the secondary fungal infection in general surgical patients; timely and reasonable gastrointestinal operations, avoiding gastrointestinal leakage, non-bacterial operations, and gut barrier protection are significant measures to prevent deep fungal infection in general surgical ward.

Key Words: Deep fungal infection; Candida; General surgery

Di JZ, Zhang P, Jiang YQ, Zheng Q, Wang Y, Feng CN. Anaiysis of 73 specimens with deep candida infection in general surgical ward. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(7):781-784

摘要

目的: 探讨普外科病房深部真菌感染的危险因素及预防措施.

方法: 回顾分析普外科病房2004-01/2005-12, 送检念珠菌阳性的73例患者, 分析其临床资料.

结果: 73例患者各种标本共培养出122株念珠菌, 白色念珠菌感染率最高, 为45%(55/122), 其次为光滑念珠菌40%(49/122)和热带念珠菌7%(8/122). 73例患者念珠菌感染排在前5位的疾病依次是胃肠道恶性肿瘤、重症急性胰腺炎、非外伤性消化道穿孔、肝胆胰恶性肿瘤、腹部外伤合并肠穿孔; 合并念珠菌感染病死率排在前4位的是非外伤性消化道穿孔、

■背景资料
深部真菌感染多发生于免疫力低下、器官功能障碍的患者, 常常侵犯心、肺、肾、脑、血液、肝、脾、胃肠及骨骼等多系统器官, 合并或导致严重的全身感染. 深部真菌感染已占据医院获得性感染的第5位, 外科是发生率最高的科室, 念珠菌感染约占全部真菌感染的80%, 临床治疗手段有限, 预后差, 病死率高.

■应用要点
本文研究结果提示消化道手术、消化道漏、胃肠道真菌寄殖、广谱抗生素使用、高龄是普外科患者继发真菌感染的重要原因, 对普外科临床防治深部真菌感染有一定的指导意义.

胃肠道恶性肿瘤、急性梗阻性胆管炎和重症急性胰腺炎. 其中死亡18例, 病死率为25%, 除外乳腺癌, 其他各疾病病死率均明显高于单纯不合并真菌感染的病种.

结论: 消化道手术、消化道漏、胃肠道真菌寄殖、广谱抗生素使用、高龄是普外科患者继发真菌感染的重要原因, 及时合理的消化道手术、避免消化道漏、无菌操作、保护肠屏障功能是预防普外科病房深部真菌感染的重要措施.

关键词: 深部真菌感染; 念珠菌; 普外科

狄建忠, 张频, 蒋燕群, 郑起, 汪昱, 冯昌宁. 普外科病房深部念珠菌感染标本73例分析. 世界华人消化杂志 2007;15(7):781-784
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/781.asp

0 引言

1980-1990年美国国立医院院内感染监测统计结果, 10 a内院内真菌感染增加了2倍, 2004-01/2005-12, 我院普外科病房送检念珠菌阳性的73例患者中外科患者中的发生率增加最明显, 增速为124%[1]; 国外报道真菌感染的病死率为38%-75%, 深部真菌感染使ICU患者的死亡危险增加了2.9倍[2]. 深部真菌感染严重影响疾病预后, 其发生率的逐年升高给临床诊治带来难题. 念珠菌是深部真菌感染中最常见的病原菌, 念珠菌约占全部真菌感染的80%[3]. 我们对外科病房2004-2005念珠菌感染标本患者的临床资料进行回顾分析, 探讨外科临床预防深部真菌感染的措施.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-01/2005-12, 我院普外科病房送检念珠菌阳性的73例患者; 其中男38例, 女35例; 年龄38-91(中位72)岁; 71例在ICU时间5-134(中位13) d; 61例有腹部手术史, 12例重症急性胰腺炎采用非手术治疗, 重症急性胰腺炎术后肠漏5例. 患者各类送检标本包括尿液、粪便、咽拭子、痰液、血液、导管、脓、腹腔积液和引流液等. 标准菌株Calbicas ATCC90028由国家耐药监测中心提供. 真菌培养基购自上海科玛嘉微生物技术有限公司, 酵母鉴定板VitekYBC; 仪器: Vitec ASM均由法国生物梅里埃公司生产.

1.2 方法

1.2.1 直接镜检 将采集的标本用生理盐水制片、染色、镜下查找真菌成分, 若标本是痰、粪便应注意有无菌丝, 有菌丝为真菌增殖致病状态.

1.2.2 培养鉴定 将标本接种于沙氏琼脂培养基, 置室温或35℃ 24-48 h, 取真菌培养物接种于VitekYBC酵母鉴定板, 一般48 h可读取结果, 与Bofile register对照鉴定.

统计学处理 结果应用SAS统计软件处理, $P<0.05$被认为有统计学差异.

2 结果

2.1 念珠菌的检出率及病原谱 73例患者各种标本共培养出122株念珠菌, 其中白色念珠菌55株, 光滑念珠菌49株, 热带念珠菌8株, 克柔氏念珠菌4株, 近光滑念珠菌和季也蒙念珠菌各3株. 白色念珠菌和光滑念珠菌分别占45%和40%, 合占念珠菌属85%(表1).

2.2 念珠菌的标本来源及分布 检出的122株念珠菌主要来至尿、痰、粪便和咽拭子的真菌培养(表1).

2.3 检出念珠菌的普外科疾病及预后 73例患者有胃肠道恶性肿瘤、重症急性胰腺炎、非外伤性消化道穿孔(包括胃十二指肠溃疡、急性阑尾炎、嵌顿性腹股沟疝、肠梗阻合并胃肠穿孔)、肝胆胰恶性肿瘤、腹部外伤合并肠穿孔、急性梗阻性胆管炎、乳腺癌. 其中, 死亡18例, 病死率为25%明显高于同期死亡率($P<0.001$), 除外乳腺癌, 其他各疾病病死率均明显高于单纯不合并真菌感染的病种($P<0.001$)(表2).

3 讨论

近年来, 临床深部真菌感染呈明显上升趋势[4-5], 真菌感染在医院感染中越来越重要, 真菌感染已占院内感染的10%-15%[6], 国内资料报告高达20.88%[7], 移植术后真菌感染占首位, 为40.47%[8]. 我国深部真菌感染已居院内感染的第3-5位, 外科是发生率最高的科室[1,9].

临床深部真菌感染危险因素主要有: 接受免疫抑制剂治疗; 免疫功能低下疾病; 长期使用广谱抗生素; 体内留置导管; 创伤、烧伤、腹部手术; 长期住ICU的危重患者; 免疫功能低下的患者; 高APACHEⅡ评分; 真菌寄殖[2]. 普外科收治的患者很多符合上述特征. 分析本组资料: 念珠菌感染排在前5位的疾病依次是胃肠道恶性肿瘤、重症急性胰腺炎、非外伤性消化道穿孔、肝胆胰恶性肿瘤、腹部外伤合并肠穿孔;

表 1 检出念珠菌的标本来源

	尿	粪便	咽拭子	痰	血	导管	脓	腹腔积液	引流液	合计
白色念珠菌	19	7	7	17	2	1	0	1	1	55
光滑念珠菌	33	6	2	4	3	0	1	0	0	49
热带念珠菌	7	0	0	1	0	0	0	0	0	8
克柔氏念珠菌	2	1	0	0	1	0	0	0	0	4
近光滑念珠菌	2	0	1	0	0	0	0	0	0	3
季也蒙念珠菌	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3
合计	66	14	10	22	6	1	1	1	1	122

表 2 念珠菌感染普外科疾病、分布构成比

疾病	*n*	疾病构成比(%)	死亡	死亡构成比(%)	病死率(%)
胃肠道恶性肿瘤	21	29	7	39	33
肝胆胰恶性肿瘤	10	14	1	6	10
非外伤性消化道穿孔	11	15	4	22	36
重症急性胰腺炎	17	23	4	22	23
急性梗阻化脓性胆管炎	4	5	1	6	25
腹部外伤合并肠穿孔	9	12	1	6	11
乳腺癌	1	1	0	–	–
合计	73	99	18	101	

■名词解释

深部真菌感染: 又称侵袭性真菌感染是指相对于皮肤, 毛发, 指(趾)甲等浅表组织而言的一类主要在医院内获得的真菌感染.

合并念珠菌感染病死率排在前4位的是非外伤性消化道穿孔、胃肠道恶性肿瘤、急性梗阻性胆管炎和重症急性胰腺炎. 所有病例中发生胃肠道破裂、穿孔、手术有46例, 死亡病例中16例合并胃肠道破裂、穿孔、手术. 在正常人群的胃肠道有真菌寄殖, 因此胃肠道是滋生真菌感染的重要来源, 其发病机制可能与肠道菌群移位或患者免疫力下降, 大量抗生素致肠道菌群紊乱. 综合本组病例资料, 念珠菌感染发生最多的疾病是与消化道相关的疾病(胃肠道恶性肿瘤、胃肠穿孔), 合并念珠菌感染病死率最高的也是与消化道相关疾病(胃肠道破裂、穿孔).

普外科深部真菌感染发生率高与胃肠道大手术是分不开的, 还与近年手术患者年龄的增高, 长期不能进食所致的肠道菌群易位, 静脉营养的使用时间过长, 气管插管呼吸机的普遍使用, 术后引流(胃肠减压、留置导尿、腹腔引流、深静脉导管等)的时间过长, 也可能存在重症监护病房内的交叉感染. 当然不合理的抗生素使用肯定是促成真菌感染产生的重要原因.

深部真菌感染临床治疗手段有限, 后果严重, 本组资料合并念珠菌感染病死率高达25%, 因此重点在于预防. 患者的高龄、本身免疫力低下是不可避免的. 胃肠道手术重建消化道吻合口的缝合是关键, 本组合并念珠菌感染病例有超过40%发生消化道漏, 吻合口的缝合有多种方法, 一层或两层缝合或吻合器闭合, 其中均有很多细节, 必须注意各个细节尽量减少甚至避免漏的发生, 一旦发生应尽早处理, 不应回避二次手术甚至多次手术. 其次对于消化道穿孔患者, 尤其老年患者, 采取保守治疗应谨慎, 不应发生弥漫性腹膜炎、中毒性休克再手术, 应尽早手术干预, 否则病程延长, 禁食时间延长, 广谱抗生素使用时间延长, 必将导致深部真菌感染, 导致病死率升高. 本组资料念珠菌感染多为手术患者, 且多为术后(胰腺炎盆式引流术后、结直肠癌术后吻合口漏等)换药较频繁、复杂的患者, 提示反复换药通过医务人员的手传播可能是发病原因之一.

临床治疗深部真菌感染缺乏有效手段, 关键在于预防. 对于预防普外科患者深部真菌感染作者体会如下: (1)消化道手术要提高手术技巧, 合理缩短消化道操作时间, 减少术后吻合口漏; (2)合并消化道穿孔的患者必须采取合理及时的治疗, 避免延误手术时间; (3)消化道术后维护肠屏障功能: 尽早合理开展肠内营养, 应用谷氨酰胺等; (4)合理使用抗生素; (5)术后换药、导尿、吸痰等操作严格无菌操作原则.

■同行评价
本文进行了对普外科病房深部念珠菌感染标本的分析, 结果对于普外科大手术后防治真菌感染提供了可借鉴的资料, 有实际意义, 结果较可信, 统计学处理正确, 结论恰当.

4 参考文献

1 陈亚红, 姚婉贞, 王建丽. 重症监护病房肺部真菌感染的诊断与治疗. 中华结核和呼吸杂志 2004; 27: 197-200
2 陈惠德. 深部真菌感染的临床诊治. 中华医学杂志 2003; 83: 1639-1640
3 《应用抗菌药物防治外科感染的指导意见》撰写协作组. 应用抗菌药物防治外科感染的指导意见(草案)XX——外科患者深部真菌感染的防治. 中华外科杂志 2005; 43: 1030-1033
4 Jialal I, Devaraj S. Remnant lipoproteins: measurement and clinical significance. *Clin Chem* 2002; 48: 217-219
5 Kam LW, Lin JD. Management of systemic candidal infections in the intensive care unit. *Am J Health Syst Pharm* 2002; 59: 33-41
6 Shelton BK. Opportunistic fungal infections in the critically ill. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2000; 12: 323-340
7 尹有宽, 张继明, 黄玉仙, 石尧忠, 翁心华. 医院内深部真菌感染的前瞻性调查. 中华医院感染学杂志 2004; 14: 1308-1310
8 Tamm M. The lung in the immunocompromised patient. Infectious complications part 2. *Respiration* 1999; 66: 199-207
9 汤耀卿. 外科危重病并发深部真菌感染的防治. 外科理论与实践 2003; 8: 424-427

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

第三届全国肝移植学术研讨会通知

本刊讯 天津医学会器官移植分会、天津市第一中心医院将于2007-03-24/25在天津天鹅湖度假村举行“第三届全国肝移植学术研讨会”, 会议期间, 将邀请国内包括香港和台湾地区的著名肝移植专家作精彩演讲. 近年, 我国肝移植技术进入快速发展时期, 国内已有大批长期存活的肝移植受者, 如何提高肝移植受者的生存质量是国内的肝移植临床工作人员今后应该研究的重点之一, 本次研讨会将以“肝移植术后患者的长期生存”为主题, 对肝移植术后肝炎复发的防治、肿瘤复发的综合防治、免疫抑制剂的长期应用及其副作用、肝移植术后患者的长期随访等问题进行深入讨论. 适逢举办此次研讨会之际, 与各位专家学者及临床一线的医生共同交流肝移植临床实践的经验.

会议主题: 肝移植术后患者的长期生存; 报道日期: 2007-03-24; 会议日期: 2007-03-25; 会议地点: 天津天鹅湖度假村; 主办单位: 天津市第一中心医院; 联系人: 刘彤; 电话: 022-23626879, 022-85738707; 传真: 022-23626897; 地址: 中国天津南开区复康路24号; 邮编: 300192. 承办单位: 茵斯派克国际会展服务有限公司; 联系人: 高洋; 电话: 010-62358943; 地址: 中国北京市海淀区北太平庄路甲1号9号楼中昊财务写字楼415室; 邮编: 100088.