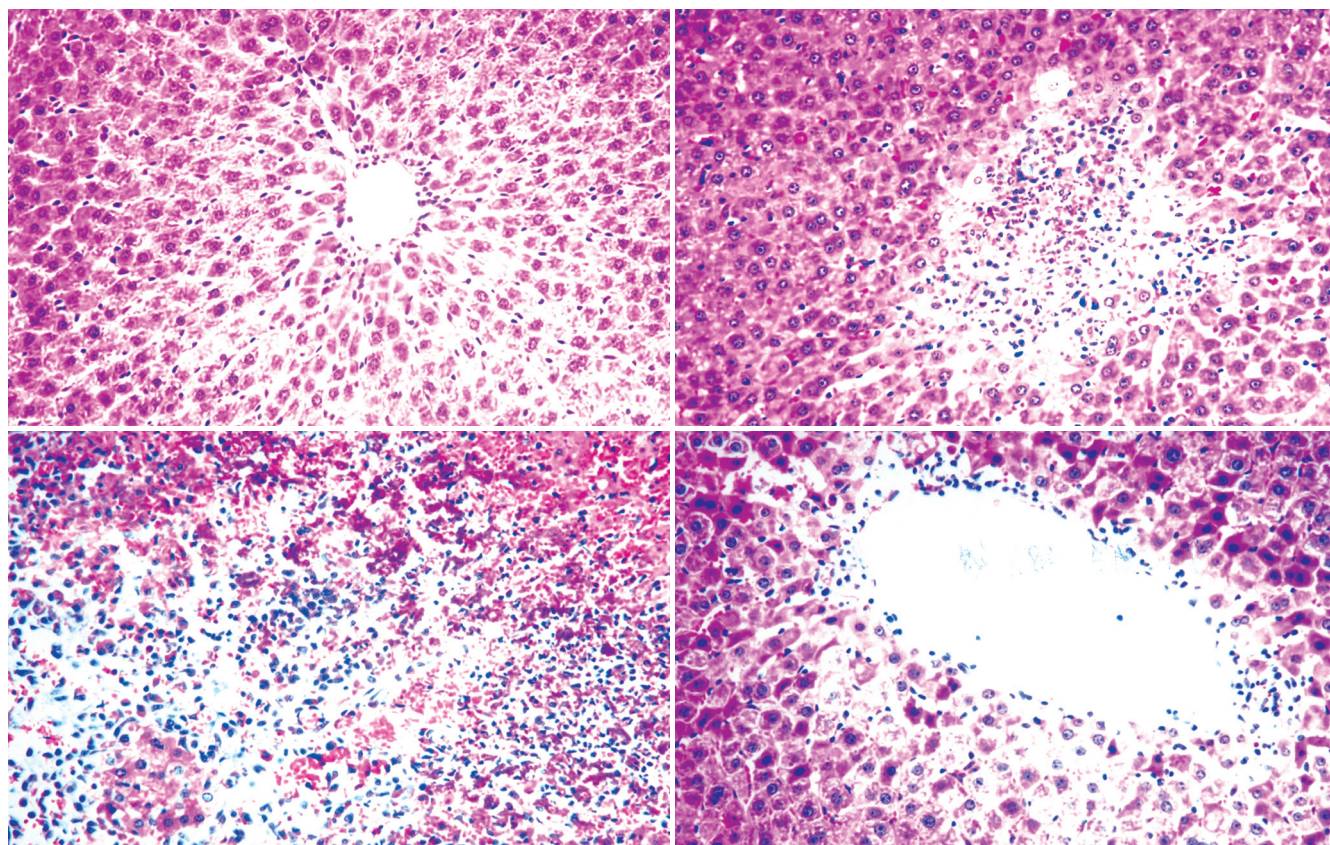


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 9 月 8 日 第 16 卷 第 25 期 (Volume 16 Number 25)



25 / 2008

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》，荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
白文元教授
苒新明教授
陈洪副教授
陈军贤主任医师
陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈卫昌教授

陈贻胜教授
陈玉林教授
程斌副教授
迟宝荣教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯红主任医师
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关晓辉主任医师
关玉盘教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
金懋林教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李继强教授
李淑德教授
李晓宇主任医师
李延青教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马金城教授
马欣主任医师
毛高平主任医师

倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴熙绪主任医师
朴云峰教授
秦成勇教授
曲智威副主任医师
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋于刚教授
孙富强副教授
孙侃教授
孙自勤教授
唐采白副教授
唐笑爱教授
唐丽安教授
田德安主任医师
童强主任医师
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王吉耀教授
王莉瑛教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
吴萍主任医师
夏时海副教授
徐秀英副教授
许春舫主任医师
许乐主任医师
许亚平副教授
杨冬华教授
杨建民教授
杨希山教授
杨幼林主任医师
杨云生教授
杨昭徐教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
于红刚副教授
于晓峰主任医师
袁伟建教授
展玉涛副主任医师
张春清教授
张方信主任医师

张国梁主任医师
张吉翔教授
张集昌主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
赵晓晏教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
朱人敏教授
邹晓平主任医师

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈建荣副教授
陈克能主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈亚军主任医师
陈知水教授
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
迟强教授
仇毓东副教授
崔彦教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅廷亮教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授
龚建平教授

巩鹏教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
郭克建教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何生教授
何裕隆教授
何振平教授
黄志勇副教授
李加孚教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
兰平教授
黎乐群教授
李国威教授
李华山副主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李小荣教授
李旭副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
刘建教授
刘颖斌副教授
刘志苏教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
吕明德教授
吕云福教授
梅铭惠教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
彭志海教授
钱建民教授
乔岐禄主任医师
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦仁义教授
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

裴正军教授
任建安教授
荣大庆教授
邵永孚教授
沈柏用副教授
沈世强教授
沈岩主任医师
师英强教授
施诚仁教授
宋世兵主任医师
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙家邦教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭群友副教授
汤恢焕教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王要军教授
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
卫洪波教授
吴德全教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰瑞教授
吴志勇教授
席启主任医师
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐智教授

许戈良教授
严律南教授
严以群主任医师
杨广顺教授
杨维良教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于恩达教授
于健春教授
于良副教授
于则利教授
郝宝铭教授
郝正亚副教授
曾勇教授
张柏和教授
张群华教授
张水军教授
张肇达教授
张宗明教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
钟德珩教授
周丁华主任医师
周伟平教授
朱立元教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松副研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
党双锁副教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
江家骥教授
李智伟教授
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
孟庆华教授
宁琴教授
牛俊奇教授
钱林学主任医师

秦波教授
石统东副教授
孙殿兴主任医师
谭德明教授
唐霓副研究员
唐世刚教授
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
谢青教授
徐小元教授
宣世英教授
闫惠平研究员
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张绪清副教授
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵桂珍教授
赵连三教授
周伯平教授
周文兴教授
周霞秋教授
朱传武副主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
劳绍贤教授
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
牛建昭教授
沈洪教授
唐旭东主任医师
唐志鹏研究员
王新月教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

白玉贤教授
曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
马力文主任医师
吴晴教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

陈克敏教授
程红岩教授
褚建国主任医师
官泳松教授
韩新巍教授
胡红杰主任医师
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
刘海峰主任医师
潘林娜教授
沈俊教授
孙明军教授
万军教授

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
倪才方教授
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授

刘鲁明教授
唐文富副主任医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员
高峰教授
高英堂研究员
管冬元副教授
黄文林教授
李东辉教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
孙秀发教授
谭学瑞教授
屠红副研究员
汪思应教授
吴晓东教授
夏建川研究员
徐存拴教授
徐德忠教授
徐宁志研究员
徐迎新研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赧宏研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周士胜教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
左国营副主任药师

消化病理学

杜祥教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
阎晓初副教授
易永芬教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2008 年 9 月 8 日 第 16 卷 第 25 期 (总第249期)

述 评

- 2793 肝门胆管癌手术进展与争论
许戈良

基础 研究

- 2797 不同药物对小鼠肝细粒棘球蚴术后感染的抑制作用
彭心宇, 吕海龙, 张示杰, 阿杜瓦一, 杨宏强, 孙红, 杨军, 李炳军, 刘远坤
- 2804 核因子- κ B及其下游因子TNF- α 、Bcl-2在急性肝损伤中的作用及机制
王春妍, 范玉强, 迟宝荣, 曹武奎, 李海
- 2809 瘦素对脂变人肝细胞TG的含量及PPAR α 、CPT-I表达的影响
谭英征, 陈双华, 阳学风, 胡剑峰, 傅京力, 胡杨
- 2815 长效奥曲肽对大鼠肝纤维化门静脉高压形成的影响
杨文燕, 吴建新, 戴强, 江佛湖
- 2820 IFN γ 基因修饰的树突状细胞在肝癌免疫治疗中的应用
薛刚, 程莹, 曹永宽, 王培红, 张国虎, 龚加庆, 黄文林, 田伏洲
- 2826 舒林酸对人结肠癌细胞凋亡及相关基因表达谱的作用
聂家艳, 黄杰安, 唐国都, 刘诗权
- 2831 VEGF反义寡核苷酸对体外生长的大肠癌HT-29细胞的抑制作用
焦得闯, 吴爱国, 邵国利, 纪术峰

临 床 研 究

- 2836 艾滋病患者肝组织瘦素的表达及与肝脂变的关系
兰孟东, 孙成福, 赵红心, 沈冰, 张亮, 赵辉, 卢联合, 王笑梅, 郎振为, 李兴旺, 毛羽

文 献 综 述

- 2841 支架成形术在食管良恶性狭窄中的应用进展
李峰, 程英升
- 2848 非酒精性脂肪肝分子发病机制的研究进展
钱林, 胡小宣
- 2853 NKT细胞在肝脏疾病中的作用
汤伯宗, 高月求
- 2859 骨髓干细胞移植治疗肝脏疾病的若干问题
吴海军, 肖恩华
- 2867 共聚焦显微内镜的研究现状
黄锦, 孙刚, 杨云生
- 2871 凋亡抑制基因Bcl-xL的研究进展
郭文娟, 王爱英
- 2877 MDM2在消化系肿瘤中作用的研究进展
陈现亮, 高善玲, 赵磊

临 床 经 验

- 2883 汕头地区居民食管病患者回顾分析1476例
马佩炯, 林茂煌, 李文芳, 施广石
- 2887 两种莫西沙星三联疗法对幽门螺杆菌的根除率的比较
周俊, 张玫, 孙立东
- 2891 胃十二指肠壁非肿瘤性病变超声图像特点的比较
陶春梅, 刘东屏, 王学梅, 阙艳红

	2895 胃癌中iNOS与HIF-1α表达的相互关系及临床意义 魏房, 孙威, 柴伟, 郭琳 2900 开腹与腹腔镜胆囊切除处理Mirizzi综合征的比较 王宏, 李军成, 罗建管, 易旭华 2903 成人粪石性急性小肠梗阻患者的早期诊治15例 陈庆永, 方志, 王春友
致 谢	2906 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2796 世界华人消化杂志修回稿须知 2814 世界华人消化杂志正文要求 2819 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标 2825 世界华人消化杂志投稿方式 2835 世界华人消化杂志名词术语标准 2847 世界华人消化杂志被收录情况 2858 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策 2866 世界华人消化杂志网络版的发表前链接 2870 世界华人消化杂志外文字符标准 2882 世界华人消化杂志中文摘要要求 2886 世界华人消化杂志英文摘要要求 2890 世界华人消化杂志计量单位标准 2894 世界华人消化杂志数字用法标准 2899 世界华人消化杂志参考文献要求
封面故事	王春妍, 范玉强, 迟宝荣, 曹武奎, 李海. 核因子-κB及其下游因子TNF-α、Bcl-2在急性肝损伤中的作用及机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2804-2808 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2804.asp
本期责任人	编务 李慧; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

世界华人消化杂志 Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊) 创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-09-08 原刊名 新消化病学杂志 名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心	编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com	世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。 特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。 2008年版权归世界华人消化杂志所有
--	---	--

中国标准连续出版物号	ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号	82-262	国外代号	M 4481	国内定价	每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证	1401004000050
------------	--------------------------------	------	--------	------	--------	------	--------------------	---------	---------------

World Chinese Journal of Digestology

September 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 25

EDITORIAL	2793 Development and controversy of surgical therapy for hilar cholangiocarcinoma <i>Xu GL</i>
BASIC RESEARCH	2797 Inhibitory effects of different drugs on the post-operative infection of hepatic echinococcus granulosus in mice <i>Peng XY, Lv HL, Zhang SJ, A DWy, Yang HQ, Sun H, Yang J, Li BJ, Liu YK</i> 2804 Roles of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor-α and Bcl-2 in acute hepatic injury and their mechanisms <i>Wang CY, Fan YQ, Chi BR, Cao WK, Li H</i> 2809 Effects of leptin on the content of triglyceride and the expression of peroxisome proliferator activated receptor α and carnitine palmitoyltransferase-I in human hepatocytes with fatty degeneration <i>Tan YZ, Chen SH, Yang XF, Hu JF, Fu JL, Hu Y</i> 2815 Effect of long-acting octreotide on portal hypertension in rats with liver fibrosis <i>Yang WY, Wu JX, Dai Q, Jiang FH</i> 2820 Use of interferon γ gene modified dendritic cells in immunotherapy for hepatic cancer <i>Xue G, Cheng Y, Cao YK, Wang PH, Zhang GH, Gong JQ, Huang WL, Tian FZ</i> 2826 Effect of sulindac on apoptosis and related gene expression profile of human colon cancer cells <i>Nie JY, Huang JA, Tang GD, Liu SQ</i> 2831 Inhibitory effect of VEGF antisense oligonucleotide on HT-29 human colorectal cancer cells <i>in vitro</i> <i>Jiao DC, Wu AG, Shao GL, Ji SF</i>
CLINICAL RESEARCH	2836 Relationship between leptin expression and hepatic steatosis in liver tissues of patients with acquired immunodeficiency syndrome <i>Lan MD, Sun CF, Zhao HX, Shen B, Zhang L, Zhao H, Lu LH, Wang XM, Lang ZW, Li XW, Mao Y</i>
REVIEW	2841 Application progress of stent placement in esophageal malignant and benign stenosis <i>Li F, Cheng YS</i> 2848 Advance in the molecular pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease <i>Qian L, Hu XX</i> 2853 Role of natural killer T cells in liver diseases <i>Tang BZ, Gao YQ</i> 2859 Several issues about bone marrow stem cell transplantation for liver diseases <i>Wu HJ, Xiao EH</i> 2867 Current research status of confocal endomicroscopy <i>Huang J, Sun G, Yang YS</i> 2871 Research progress in anti-apoptosis gene Bcl-xL <i>Guo WJ, Wang AY</i> 2877 Research progress in roles of murine double minute 2 gene in the gastrointestinal tumor <i>Chen XL, Gao SL, Zhao L</i>

CLINICAL PRACTICE	2883 Esophageal disease in Shantou area: an analysis of 1476 cases <i>Ma PJ, Lin MH, Li WF, Shi GS</i> 2887 Comparison between <i>H pylori</i> eradication rates of two moxifloxacin-based triple therapies <i>Zhou J, Zhang M, Sun LD</i> 2891 Comparative analysis on sonograms of non-tumorous lesions in gastric and duodenal wall <i>Tao CM, Liu DP, Wang XM, Que YH</i> 2895 Relationship between hypoxia-inducible factor-1α and inducible nitric oxide synthase expression in gastric cancer and its clinical significance <i>Wei F, Sun W, Chai W, Guo L</i> 2900 Comparison between conventional cholecystectomy and laparoscopic cholecystectomy in treatment of Mirizzi's syndrome <i>Wang H, Li JC, Luo JG, Yi XH</i> 2903 Early diagnosis and management of acute small intestinal obstruction due to bezoars in adults: an analysis of 15 cases <i>Chen QY, Fang Z, Wang CY</i>
ACKNOWLEDGMENT	2906 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Wang CY, Fan YQ, Chi BR, Cao WK, Li H.</i> Roles of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor-α and Bcl-2 in acute hepatic injury and their mechanisms. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(25): 2804-2808 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2804.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Hui Li</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date September 8, 2008

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology
of Shanxi Province

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

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

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
Director: Hai-Ning Zhang

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2008 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2008 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

肝门胆管癌手术进展与争论

许戈良

许戈良, 安徽医科大学附属省立医院 安徽省合肥市 230001
许戈良, 1982年皖南医学院本科, 教授, 主要从事肝胆外科临床与基础研究。

通讯作者: 许戈良, 230001, 安徽省合肥市庐江路17号, 安徽医科大学附属省立医院外科, xugeliang2007@163.com
电话: 0551-2283916 传真: 0551-2282121

收稿日期: 2008-04-28 修回日期: 2008-07-18

接受日期: 2008-07-29 在线出版日期: 2008-09-08

Development and controversy of surgical therapy for hilar cholangiocarcinoma

Ge-Liang Xu

Ge-Liang Xu, Department of General Surgery, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

Correspondence to: Ge-Liang Xu, Department of General Surgery, Anhui Provincial Hospital, 17 Lujiang Road, Hefei 230001, Anhui Province, China. xugeliang2007@163.com

Received: 2008-04-28 Revised: 2008-07-18

Accepted: 2008-07-29 Published online: 2008-09-08

Abstract

Hilar cholangiocarcinoma has always been the focus attracting the attention of surgeons because of its special anatomic location and poor prognosis. At the present time, complete tumor resection has been recognized as the most effective therapy for hilar cholangiocarcinoma. However, the risk of operation is very high, and there also are many technical difficulties and exploratory progress in attempting to remove the tumor. This article will analyze and discuss the perioperative management and the development and controversy of surgical skills in the treatment of hilar cholangiocarcinoma in order to help clinical surgeons take an active part in improving their practice skills.

Key Words: Hilar cholangiocarcinoma; Surgical operation

Xu GL. Development and controversy of surgical therapy for hilar cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2793-2796

摘要

肝门胆管癌由于位置的特殊和不良的预后一

直是外科医生关注的重点。目前手术是唯一可以治愈肝门胆管癌的手段, 但是其面临的风险很大, 难点较多, 探索性的进步也很快。本文就目前围手术期的处理和手术技能的发展与争论作一述评, 以期帮助临床外科医生积极投身到提高技能的实践中去。

关键词: 肝门胆管癌; 手术

许戈良. 肝门胆管癌手术进展与争论. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2793-2796

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2793.asp>

0 引言

肝门胆管癌由Klatskin在1965年首次描述。目前手术是仅有治愈的手段。但是, 由于肝门部解剖的特殊复杂和肿瘤对周围重要结构的侵犯, 这一部位肿瘤的手术治疗一直挑战着外科医生。近10多年由于肝脏外科技能的提高, 肝门胆管癌的治疗发生了很大的变化。更加积极扩大的肝叶切除, 尤其是完整切除和切缘阴性R₀(病理证实切缘无癌细胞残留)给患者提供了长期生存的机会。虽然, 扩大的肝脏切除虽然可以提高胆管切缘阴性率(R₀), 但是肝功能衰竭的风险增加。如果减少肝脏的切除量可能会增加切缘阳性, 如何平衡还是个困难的问题。

1 肝门胆管癌黄疸的术前处理

肝门胆管癌最常见的临床症状就是黄疸, 扩张的胆管可能会对门静脉造成压迫, 导致肝脏的贫血和肝细胞的坏死, 长期的黄疸和并发胆管炎, 术后常常遇到肝脏功能不良, 包括肝衰在内的并发症发生率增高, 手术缓解压力也可引起贫血再灌注损伤。Kondo *et al*^[1]认为术前的胆管减压, 降低血清胆红素浓度在34.2 μmol/L以下, 有助控制局限性胆管炎。他们对40例患者扩大的肝切除没有出现肝衰和术后的死亡, 可能与术前适当的胆管减压降低黄疸, 恢复损伤的肝脏功能, 早期治疗肝段胆管炎有关。在日本进行积极的手术之前胆管减压几乎成了常规, 以缓解黄疸。Tabata *et al*^[2]

■背景资料

肝门胆管癌由Klatskin在1965年首次描述, 其最常见的临床症状就是黄疸。目前手术是仅有治愈的手段。但是, 由于肝门部解剖的特殊复杂和肿瘤对周围重要结构的侵犯, 这一部位肿瘤的手术治疗一直挑战着外科医生。

■同行评议者

刘作金, 副教授, 重庆医科大学附属第二医院 肝胆外科

■ 研究前沿

肝门胆管癌由于位置的特殊和不良的预后一直是外科医生关注的重点。

在75例手术患者中,术前胆管引流占63例,76%的患者接受了肝叶切除,没有围手术期死亡率的发生。

在术前黄疸的引流技术上多数中心的研究认为逆行胰胆管镜检查(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)和支架置放原则上不推荐。虽然在这样的患者中30%胆汁中有菌,但是发热或胆管炎并不常见。如果胆管树被管子插入并置放支架,由于这种方式置放的支架引流往往不全面,特别是尾状叶分支胆管,几乎100%的患者都会发生菌胆症(bacteribilia),胆管炎的发生率也明显增高。肝门胆管癌的无效引流往往导致败血症。Liu *et al*^[3]将不同时间段的2组患者进行了比较,前组阻塞性黄疸的缓解主要是ERCP和内镜下支架引流,后组的处理主要靠经皮肝穿胆管引流(percutaneous transhepatic cholangial drainage, PTCD)进行减黄。结果后组的肝功能状况好于前组,手术切除率也高于前组。因此,为了保留预留肝的功能,改善黄疸,常规的PTCD作为标准的方法正在被推荐已经获得普遍的认同。

但是,术前胆管引流是有争议的。虽然他可以改善肝功能,降低肝衰发生率,但是增加细菌定植和围手术期的感染。Sewnath *et al*^[4]总结了一个近年的Meta分析:关于是否术前胆管引流可以降低术后致死率,由于缺乏对照组还不能得到肯定的回答。我们的实践表明,没有常规的胆管引流同样也可以获得70%以上的切除率并改善结果,关键是手术能力和技巧,他和良好的结果具有高度的相关性。肝门胆管癌手术切除率的提高正是近20年肝脏外科手术技术的发展,而不仅仅是由于黄疸的引流。虽然术前胆管引流的益处讨论仍然在进行,但是,最佳的术前引流应该是准备做扩大的肝叶切除和肝功能储备较差的患者。

2 扩大肝叶切除的手术安全性

由于肝门胆管癌患者长期黄疸或并发胆管炎,在进行肝切除时,术后的并发症和肝功能不良成了一个严重的问题。虽然肝衰和术后死亡率已经明显降低,但是手术的并发症仍没有下降,可能与肝脏切除量的增大有关。一些研究中心认为门静脉栓塞可以使被栓塞段肝脏进入凋亡,而未栓塞段肝脏进入增殖^[5]。当肿瘤需要广泛切除肝脏的时候需要进行胆管引流以保留肝脏的最大功能,同时可以通过术前的门静脉栓塞(preoperative portal vein embolisation, PVE)使得预留肝脏肥厚,增加大范围手术的安全性。CT

容量分析法可以对将要预留的肝脏量进行测量,从而了解预留肝脏量的变化。

PVE方法通常在术前的4-6 wk进行。或者是由Nagino *et al*^[6]描述的使用同侧经皮肝穿入路的介入放射学技术或者通过Makuuchi *et al*^[7]描述的经回结肠静脉途径的微型剖腹术,将5.5Fr三腔球囊导管通过上述2种途径置入门静脉系统,并通过造影成像证实。然后将球囊打开,用纤维蛋白胶合剂和乳化碘剂,对切除侧门静脉分支进行栓塞。停止注射后球囊仍然保持3 min以防止门静脉主干或其他支异位栓塞。此法可增加预留肝量的10%-15%,降低术后肝功能的不良。但是,老年患者或肝功能损害较重并不都能通过PVE来实现扩大的肝切除。Kawarada *et al*^[8]对于肝功能不良、不适合扩大切除的患者,采用了Taj Mahal法切肝。理由是:(1)这种方法可以较为容易的切除整个尾状叶包括腔静脉周围的肝脏;(2)肝脏切面很象一本打开的书,具有很好的视野,易于进行肝肠吻合;右叶肝管的切端(VI, VII, VIII)的切缘更加易于检查以达到阴性切缘,特别适于I、II和部分双侧胆管受侵犯IV型。术后很少有严重的并发症,生存期也长于PVE术后的扩大右半肝患者。

但是,也有学者认为对于术前进行PVE需要很好的设计前瞻性的研究方案。在选择PVE的时候是否能够准确判断出肿瘤的可切除性?是否能明确肿瘤是单侧侵犯而不是双侧?残肝量到多大才是应该达到的目的?假如在4-6 wk后没有达到一定的量是否拒绝手术再次栓塞或使用其他的方法?有无患者在栓塞期间肿瘤进一步发展^[9]?尽管目前还没有更多的Meta分析资料来证实术前PVE可以有效改善预留肝脏肝功能的储备量,提高手术的安全性。但是,自1990年Makuuchi *et al*开始在术前进行PVE并取得了较好的结果,在这个基础上,这种方法已经在日本逐渐被推开,现在已成为扩大右半肝术前的常规工作并被引入美国等^[2,5,11]。因此,我们认为实践并不违反原理,尤其在肝叶扩大切除的患者中。

3 尾状叶是否常规切除

一些研究已经表明,对于长期生存者最重要的预后因素之一是彻底切除肿瘤(R₀)。由于肝门胆管癌在浸润胆管周围邻近的组织之前常常沿着胆管壁生长,而且容易侵犯尾状叶,所以日本和美国的经验认为肝门胆管肿瘤合并肝叶以及尾

状叶的切除的确可以提供较高的切缘阴性率。Tabata *et al*^[2]将75例肝门胆管癌患者按时间先后顺序分为3组, 其中12例为早期组(1976-1981), 主要是胆管切除; 50例为中期(1981-1994), 扩大的肝切除加尾状叶切除; 13例为后期组(1994-1998), 开始引进了PVE技术, 以增加手术的安全性, 所有的患者都切除了尾状叶。治愈性切除率(R_0)在3组中分别是16.7%, 64%, 84.6%。Kawarada *et al*的研究发现42.3%的患者的尾状叶受到肿瘤的侵犯, 肝脏的4段胆管分支在肝门胆管癌中也常常受侵犯, 因此, 根治性的手术必须将尾状叶连同4a段肝脏一并切除^[8]。一些作者认为Bismuth分型只是考虑了肿瘤侵入右或左肝管, 没有考虑到向前侵犯方叶以及向后侵犯尾状叶, 如果肿瘤位于中央或肿瘤扩散到左肝管, 尾状叶累及的可能性非常大。同样, 在Bismuth分型的IIIa中, 由于肿瘤常常侵犯生长进入肝脏前、后段, 所以外科治疗应该包括方叶和尾状叶的切除。甚至有些作者提倡将尾状叶在内整块切除作为根治的标准手术^[12]。但是也有人认为对于起源于右肝管而没有侵犯到肝门板的一般不需要切除尾状叶。我们认为对于Bismuth I型和术中证实肿瘤仅位于右肝管的不需要常规切除尾状叶。

4 肿瘤累及到血管, 门静脉和肝动脉的切除技术及对预后的影响

许多情况下, 肝门胆管癌常侵犯门静脉和(或)肝动脉, 如一侧肝动脉及同侧门静脉分支均有浸润, 而对侧的肝管、门静脉、肝动脉分支正常, 为了取得切缘阴性, 必须进行门静脉分叉处的切除。

在部分门静脉的切除过程中, 当有足够的长度可以从肝脏中解剖出来没有遇到肿瘤的时候, 门静脉重建可以在切肝前。如果困难则在肝切除后, 留有适量的长度。在门静脉的切除过程中尽量不要碰触切除的肿瘤以及邻近的组织, 无瘤技术对预后很重要。当完成了左三叶切除, 需要对门静脉分叉处的右支进行切除, 由于血管相对较短, 可能技术上更为困难, 少数情况下可能会借助人工移植物。所有门静脉的重建都是用6-0 prolene线端端吻合。在静脉重建期间, 动脉的供血要保持通畅。假如动脉同样受侵犯也应该一并切除和重建或修补。多数情况下, 在肝门部狭小复杂的区域, 在没有切除肿瘤之前, 探明血管内是否受累很困难。德国柏林的医生

对肝门肿瘤采用非接触技术将肝门部与扩大的右半肝以及门静脉分叉部的切除一起整块完成, 避免在肿瘤的周围进行解剖分离。切除后左侧门静脉与门静脉主干端端吻合重建。依据这些原则他们完成了 R_0 切除, 患者术后5年生存率达到了72%^[13]。

但是, 也有作者认为他们的结果在生存期上并没有明显的改善。认为肿瘤累计到了血管, 即使血管切除, 由于手术风险的增加, 患者预后并不能改善甚至更坏^[1]。Ebata *et al*也报告需要门静脉切除的患者长期生存差。但是, Meta分析证明门静脉切除本身并不影响预后, 但腔内有肿瘤或切缘阳性预后不好。Alan *et al*认为, 虽然对于标准的手术, 门静脉的切除并不是必须的, 但是, 对于治愈性的切除, 门静脉切除并不是禁忌。获得阴性切缘是延长生存期最重要的因素, 假如需要门静脉的切除来达到这个目的应该毫不犹豫, 5年生存期可达45%^[10]。我们的经验不多, 但是, 同意门静脉切除的风险评价与门静脉切除的经验有关, R_0 切除可以改善患者的预后。

5 参考文献

- 1 Kondo S, Hirano S, Ambo Y, Tanaka E, Okushiba S, Morikawa T, Katoh H. Forty consecutive resections of hilar cholangiocarcinoma with no postoperative mortality and no positive ductal margins: results of a prospective study. *Ann Surg* 2004; 240: 95-101
- 2 Tabata M, Kawarada Y, Yokoi H, Higashiguchi T, Isaji S. Surgical treatment for hilar cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 148-154
- 3 Liu CL, Fan ST, Lo CM, Tso WK, Lam CM, Wong J. Improved operative and survival outcomes of surgical treatment for hilar cholangiocarcinoma. *Br J Surg* 2006; 93: 1488-1494
- 4 Sewnath ME, Karsten TM, Prins MH, Rauws EJ, Obertop H, Gouma DJ. A meta-analysis on the efficacy of preoperative biliary drainage for tumors causing obstructive jaundice. *Ann Surg* 2002; 236: 17-27
- 5 Lai EC, Lau WY. Aggressive surgical resection for hilar cholangiocarcinoma. *ANZ J Surg* 2005; 75: 981-985
- 6 Nagino M, Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Kanai M. Selective percutaneous transhepatic embolization of the portal vein in preparation liver resection: the ipsilateral approach. *Radiology* 1996; 200: 559-563
- 7 Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunvén P, Yamazaki S, Hasegawa H, Ozaki H. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery* 1990; 107: 521-527
- 8 Kawarada Y, Das BC, Naganuma T, Tabata M, Taoka H. Surgical treatment of hilar bile duct carcinoma: experience with 25 consecutive

■相关报道

Alan *et al*认为, 虽然对于标准的手术, 门静脉的切除并不是必须的, 但是, 对于治愈性的切除, 门静脉切除并不是禁忌。

■同行评价

本文就肝门胆管癌目前在围手术期的处理和手术技能的发展与争论作一述评,有助于临床外科医生技能的提高,学术价值较好。

- 9 hepatectomies. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 617-624
- 10 Hemming AW, Reed AI, Fujita S, Foley DP, Howard RJ. Surgical management of hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2005; 241: 693-699; discussion 699-702
- 11 Hemming AW, Kim RD, Mekeel KL, Fujita S, Reed AI, Foley DP, Howard RJ. Portal vein resection for hilar cholangiocarcinoma. *Am Surg* 2006; 72: 599-604; discussion 604-605
- 12 Dinant S, Gerhards MF, Rauws EA, Busch OR, Gouma DJ, van Gulik TM. Improved outcome of resection of hilar cholangiocarcinoma (Klatskin tumor). *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 872-880
- 13 D'Angelica MI, Jarnagin WR, Blumgart LH. Resectable hilar cholangiocarcinoma: surgical treatment and long-term outcome. *Surg Today* 2004; 34: 885-890
- 14 Van Gulik TM, Dinant S, Busch OR, Rauws EA, Obertop H, Gouma DJ. Original article: New surgical approaches to the Klatskin tumour. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26 Suppl 2: 127-132

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表,同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益,本刊对修回稿要求如下。

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表,所有作者均符合作者条件,所有作者均同意该文代表其真实研究成果,保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系,修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信,保证无泄密,如果是几个单位合作的论文,则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删节时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回的,作重新投稿处理。

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期);起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须经得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布;作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(常务副总编辑:张海宁 2008-09-08)

不同药物对小鼠肝细粒棘球蚴术后感染的抑制作用

彭心宇, 吕海龙, 张示杰, 阿杜瓦一, 杨宏强, 孙红, 杨军, 李炳军, 刘远坤

彭心宇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝胆外科中心 湖北省武汉市 430030

彭心宇, 吕海龙, 张示杰, 阿杜瓦一, 杨宏强, 孙红, 杨军, 李炳军, 刘远坤, 石河子大学医学院第一附属医院普外科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

彭心宇, 1989年武汉同济医科大学硕士, 主任医师, 教授, 主要从事肝胆外科研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30760244

通讯作者: 彭心宇, 832008, 新疆维吾尔自治区石河子市, 石河子大学医学院第一附属医院普外科. pengxy2000@yahoo.com

电话: 0993-28589449

收稿日期: 2008-02-19 修回日期: 2008-04-18

接受日期: 2008-04-28 在线出版日期: 2008-09-08

Inhibitory effects of different drugs on the post-operative infection of hepatic echinococcus granulosus in mice

Xin-Yu Peng, Hai-Long Lv, Shi-Jie Zhang, Du-Wayi A, Hong-Qiang Yang, Hong Sun, Jun Yang, Bing-Jun Li, Yuan-Kun Liu

Xin-Yu Peng, Center of Liver Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Xin-Yu Peng, Hai-Long Lv, Shi-Jie Zhang, Du-Wayi A, Hong-Qiang Yang, Hong Sun, Jun Yang, Bing-Jun Li, Yuan-Kun Liu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30760244

Correspondence to: Xin-Yu Peng, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. pengxy2000@yahoo.com

Received: 2008-02-19 Revised: 2008-04-18

Accepted: 2008-04-28 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To explore the inhibition of different drugs on the hepatic echinococcus granulosus infection in mice, and to investigate the influence on the infection after enhancing the host immune function.

METHODS: After immunization with echinococcus granulosus cyst fluid for 3 wk, mice with positive IgG seroresponses were divided into drug-treated group and model control group.

One week before infection and one month after infection with prostoscolex, the mice in the former were treated with single liposomal albendazole (L-Alb), single huaier extract, and huaier extract with L-Alb, respectively. The prostoscolex was dealt with 750 mL/L alcohol, 200 g/L hypertonic saline, L-Alb and balanced solution when the mice were inoculated. After infection for 90 d, the pathological changes, spleen index, the levels of IgG and IgE in peripheral blood were observed; meanwhile, the levels of CD4⁺ and CD8⁺ cells were determined by flow cytometry.

RESULTS: Pathological examination showed that the germinal layer and corneous layer of echinococcus granulosus were severely damaged in the mice with combined treatment. There were significant differences in the spleen index and the levels of serum IgE between the drug-treated groups and the model control group (3.84 ± 0.86 , 3.95 ± 1.01 , 3.27 ± 0.52 vs 5.46 ± 0.52 ; 0.06 ± 0.08 $\mu\text{g/L}$, 0.07 ± 0.08 $\mu\text{g/L}$, 0.03 ± 0.03 $\mu\text{g/L}$ vs 0.20 ± 0.02 $\mu\text{g/L}$; all $P < 0.01$); the difference was the most significant between the combined treatment group and the model control group. The level of IgG had no marked difference between the drug-treated groups and the model control group. The level of CD8⁺ cells was significantly lower (16.60 ± 3.89 , 18.18 ± 3.90 , 15.38 ± 2.63 vs 32.90 ± 4.71 ; all $P < 0.01$), but the level of CD4⁺/CD8⁺ cells was higher (3.21 ± 0.70 , 3.05 ± 0.66 , 3.53 ± 0.57 vs 1.57 ± 0.26 ; all $P < 0.01$) in the drug-treated groups than that in the model control group; the most significant change was observed in the mice with combined treatment.

CONCLUSION: L-Alb combined with huaier extract may obviously enhance immune function, inhibit the growth of echinococcus granulosus, and reduce the post-operative infection of echinococcus granulosus in mice.

Key Words: Hepatic echinococcus granulosus; Post-operative infection; Liposomal albendazole; Huaier extract

Peng XY, Lv HL, Zhang SJ, A DWy, Yang HQ, Sun H, Yang J, Li BJ, Liu YK. Inhibitory effects of different drugs

■背景资料

肝细粒棘球蚴病是一种在我国西北部牧区广泛流行的人畜共患寄生虫病。由于目前尚无特效药物。外科治疗仍为首选。彭心宇在外科实践中发现肝包虫周围纤维性囊壁的病理组织结构与传统理论不符。外囊可分为内层和外层,两层之间有可分离间隙存在,沿此间隙可完整摘除包虫。首创了“闭合式肝包虫外膜内完整摘除术”,并根据手术操作的差异衍生出“开放式肝包虫外膜内完整摘除术”、“开放式肝包虫外膜内部分摘除术”,尽可能作到完整摘除,尽可能减少外囊在肝内的残留,达到降低复发、减少残腔并发症,提高术后生命质量的目的。

■同行评议者

王怡, 主任医师, 天津市传染病医院天津市肝病研究所肝病一科

■ 研发前沿

由于细粒棘球蚴抗原成分较多,且在生活史的不同阶段表达特定的抗原,产生不同的特异性免疫应答,因此免疫应答机制较为复杂,宿主体内包虫囊的形成有赖于宿主免疫应答。

on the post-operative infection of hepatic echinococcus granulosus in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(25): 2797-2803

摘要

目的: 探讨不同药物对小鼠肝细粒棘球蚴感染的抑制作用,了解增强宿主免疫功能对小鼠肝细粒棘球蚴感染的影响。

方法: 取包虫囊液成功免疫小鼠,分为药物治疗组和模型对照组。肝脏接种原头蚴前1 wk及接种后1 mo,药物治疗组分别用阿苯达唑脂质体、槐耳浸膏及阿苯达唑脂质体联合槐耳浸膏治疗,接种头节时各药物治疗组再分为4组,每组头节分别使用750 mL/L乙醇、200 g/L高渗盐水、阿苯达唑脂质体及平衡液处理后接种,模型对照组头节用平衡液处理后直接接种,接种后3 mo观察小鼠肝细粒棘球蚴大体和病理变化,检测小鼠脾脏指数、外周血IgG和IgE水平,并用流式细胞仪检测小鼠外周血CD4⁺和CD8⁺淋巴细胞的百分率。

结果: 联合治疗组中小鼠肝细粒棘球蚴生发层和角质层破坏较严重。各药物治疗组小鼠脾脏指数、IgE水平明显低于模型对照组(3.84 ± 0.86 , 3.95 ± 1.01 , 3.27 ± 0.52 vs 5.46 ± 0.52 ; 0.06 ± 0.08 $\mu\text{g/L}$, 0.07 ± 0.08 $\mu\text{g/L}$, 0.03 ± 0.03 $\mu\text{g/L}$ vs 0.20 ± 0.02 $\mu\text{g/L}$, 均 $P < 0.01$), 其中联合药物治疗组降低最为明显;药物治疗组IgG水平与模型对照组相比无显著性差异。药物治疗组CD8⁺水平明显低于模型对照组(16.60 ± 3.89 , 18.18 ± 3.90 , 15.38 ± 2.63 vs 32.90 ± 4.71 , 均 $P < 0.01$), CD4⁺/CD8⁺明显高于模型对照组(3.21 ± 0.70 , 3.05 ± 0.66 , 3.53 ± 0.57 vs 1.57 ± 0.26 , 均 $P < 0.01$), 其中联合治疗组变化最为明显。

结论: 阿苯达唑脂质体与槐耳浸膏联合用药可以明显增强小鼠免疫功能,抑制细粒棘球蚴的生长,使小鼠肝细粒棘球蚴术后感染率降低。

关键词: 肝细粒棘球蚴; 术后感染; 阿苯达唑脂质体; 槐耳浸膏

彭心宇, 吕海龙, 张示杰, 阿杜瓦一, 杨宏强, 孙红, 杨军, 李炳军, 刘远坤. 不同药物对小鼠肝细粒棘球蚴术后感染的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2797-2803
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2797.asp>

0 引言

肝细粒棘球蚴病又称囊型肝包虫病,是畜牧地

区常见的地方性疾病,目前尚无有效药物治疗,确诊后需手术治疗^[1]。在细粒棘球蚴感染高发区,人和羊对其感染均具有一定的抵抗力^[2],包虫幼虫侵入宿主组织后生长缓慢,往往数年后才出现症状,但是小儿感染包虫囊肿生长较快,多发,免疫血清测定的阳性率较成人低^[3]。宿主在感染细粒棘球蚴3-5 d即可出现巨噬细胞和中性粒细胞的浸润,随后主要是嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞水平升高;在人工动物感染包虫实验中,宿主各抗体水平升高,仅有不到5%的虫卵可逐渐在宿主体内存活并形成包囊^[4],国外也有学者报道了包虫病患者自愈的病例^[5]。由此可见,细粒棘球蚴在体内感染与宿主的免疫能力相关,宿主体内包虫囊的形成有赖于宿主免疫应答。

彭心宇1999年发现,在肝包虫外囊与邻近肝脏组织之间存在一层纤维膜,沿此间隙即可完整剥离包虫外囊,从根本上解决了包虫复发和残腔并发症^[6]。当包虫体积较大或临近重要管道时,术中需选择开放式肝包虫外膜内外囊完整或部分摘除术,如果溢出或残留原头节,则会增加术后复发的风险。包虫外囊屏障在包虫免疫逃避中起着重要作用^[7],肝包虫外膜内外囊完整摘除术后复发率降低,可能与外囊切除后,残留的头节直接暴露肝脏创面,宿主通过免疫应答杀灭寄生虫有关。如果我们在术前及术后加强宿主免疫功能,抑制原头蚴的生长,可能会进一步降低手术后复发率。因此,我们采用动物模型,模拟开放式肝包虫外膜内外囊完整摘除术的手术处理过程,先对小鼠进行抗原免疫产生抗体,然后在小鼠肝脏直接接种细粒棘球蚴,接种时头节分别使用不同药物处理,术前及术后运用不同药物进行治疗,了解提高宿主免疫功能对肝包虫外膜内外囊完整摘除术后复发的影响,为临床治疗肝包虫术后复发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 从自然感染的绵羊肝棘球蚴囊中,无菌抽取含原头节的囊液,离心后弃上清,沉淀的原头节用0.15 mol/L的灭菌磷酸缓冲液(PBS, pH7.2)清洗3遍。取0.1 mL在显微镜下观察原头节活动情况并计数,用染料排斥实验检查原头节活力在85%以上,制成每毫升含有20 000个原头节的混悬液,即可作动物体内接种。♀昆明种小鼠200只,体质量18-20 g,购自石河子大学医学院实验动物中心。阿苯达唑脂质体10 g/L,购自新疆医科

表 1 不同药物治疗小鼠感染细粒棘球蚴后脾脏指数、IgG及IgE变化 (mean ± SD)

分组	n	脾脏指数	IgG(g/L)	IgE(μg/L)
阿苯达唑组	35	3.84 ± 0.86 ^b	2.43 ± 0.10	0.06 ± 0.08 ^b
槐耳浸膏组	33	3.95 ± 1.01 ^b	2.44 ± 0.12	0.07 ± 0.08 ^b
联合治疗组	35	3.27 ± 0.52 ^b	2.42 ± 0.11	0.03 ± 0.03 ^b
模型对照组	8	5.46 ± 0.52	2.52 ± 0.19	0.20 ± 0.02
空白对照组	8	3.34 ± 0.26	2.25 ± 0.07	0.02 ± 0.07

^bP<0.01 vs 模型对照组.

大学; 槐耳清膏呈褐色糊状, 溶于水, 由南京中医药大学药用菌研究室提供, 每毫升含槐耳菌质0.8 g 提取清膏.

1.2 方法 取我院已制备好的人肝包虫囊液抗原, 小鼠ip免疫原制剂3次, 每次注射0.1 mL, 2 wk后重复ip免疫原制剂. 末次注射1 wk后取鼠血做ELISA, 检测小鼠IgG抗体, 模拟人感染肝包虫体内产生抗体. 外周血IgG抗体为阳性小鼠, 分为药物治疗组(3组, 每组40只)和模型对照组(1组, 10只), 药物治疗组分别用阿苯达唑脂质体75 mg/kg(10 g/L, 稀释成5 g/L, 按20 g小鼠1次用量1.5 mg配制, 每次0.3 mL), 免疫增强剂槐耳浸膏0.4 mL, 槐耳浸膏0.4 mL联合阿苯达唑脂质体75 mg/kg, 灌胃口服治疗, 用药3次/wk. 另设1组(8只)正常小鼠空白对照.

治疗1 wk后, 各药物治疗组再分为4组(每组10只), 进行肝脏注射接种原头节0.3 mL, 模拟术中原头节脱落或残留, 各组原头节分别用750 mL/L乙醇、200 g/L高渗盐水、阿苯达唑脂质体和平衡液进行处理20 min后接种. 然后继续用上述3种药物治疗1 mo, 模型对照组(10只)灌服同体积蒸馏水, 模型对照组头节行平衡液处理后直接接种. 接种3 mo后解剖. 空白对照组不作任何处理. 随机抽取各组棘球蚴囊, 用50 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, HE染色及切片, 观察棘球蚴囊壁组织病理形态改变. 小鼠治疗3 mo后, 取脾脏称重并计算脾脏指数. 脾脏指数的计算: 脾脏指数 = 脾脏质量(g)/体质量(g) × 1000. 摘眼球取血, 离心取血清, 应用免疫比浊法测IgG的含量, 酶联免疫吸附试验测定血清中IgE的含量. 另取小鼠血液100 μL, 分别加入抗小鼠PE-CD4, PE-CD8, FCM检测T淋巴细胞亚群的比例.

统计学处理 应用SPSS13.0 for Windows统计软件, 对实验数据进行方差分析.

2 结果

2.1 肝棘球蚴大体观察 阿苯达唑脂质体、槐耳

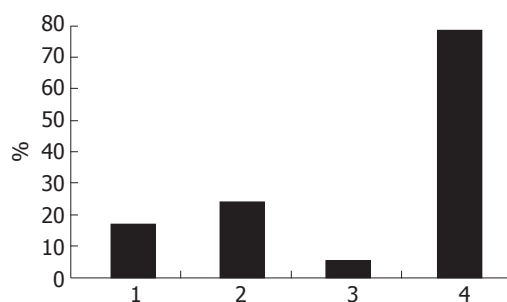


图 1 不同药物治疗后小鼠肝脏细粒棘球蚴感染率. 1: L-ABZ组; 2: 槐耳浸膏组; 3: 联合用药组; 4: 模型组.

浸膏、及联合用药组小鼠肝细粒棘球蚴复发率分别是17.1%、24.2%和5.7%(图1). 阿苯达唑治疗组棘球蚴的生长为单发, 体积较小, 色泽浑浊, 多数呈半透明状或结节状(图2A); 槐耳浸膏治疗组棘球蚴的生长为单发或多发, 可见多个相互融合, 体积相对较大, 包囊光滑透明, 部分呈结节状(图2B); 联合治疗组中, 感染棘球蚴均为单发, 色泽发白, 体积较小, 呈结节状(图2C), 对照组棘球蚴生长相对良好, 包囊光滑透明, 体积较大, 数量单发或多发, 个别包囊组织浑浊灰暗(图2D).

2.2 病理观察 在3个治疗组中, 小鼠肝细粒棘球蚴囊均受到不同程度的损害, 阿苯达唑脂质体组中囊壁生发层和角质层出现断裂、脱落甚至缺损, 角质层变薄, 结构模糊甚至消失, 大量空泡形成, 生发层细胞肿胀且数量减少, 部分出现细胞变性(图3A). 槐耳浸膏组中囊壁角质层结构均匀、清晰, 呈板层状排列, 部分结构模糊空泡形成, 生发层细胞可见(图3B). 联合治疗组棘球蚴的病理组织学变化相对较严重, 角质层变薄, 出现断裂、缺损, 结构模糊消失, 囊壁与周围肝组织分离, 生发层细胞肿胀, 消失, 结构断裂, 卷曲, 残存细胞发生变性, 还有的囊内内囊塌陷, 卷曲, 在囊泡内可见急性出血现象(图3C). 光镜下可见模型对照组肝棘球蚴组织基本正常, 多数囊生发层和角质层生长良好, 生发层细胞清

■创新盘点

本研究采用动物模型, 模拟开放式肝包虫外膜内外囊完整摘除术的手术处理过程, 在小鼠肝脏直接接种细粒棘球蚴, 接种时头节分别使用不同药物处理, 术前及术后运用不同药物进行治疗, 了解提高宿主免疫功能对小鼠肝细粒棘球蚴感染的影响.

■应用要点

棘球蚴的免疫逃逸作用是引起肝包虫病术后复发的主要原因,因此在棘球蚴形成之前进行有效地药物干预,恢复和增加宿主的免疫功能,对于残留原头蚴的生长可能会起到一定的抑制作用,以减少术后的复发。

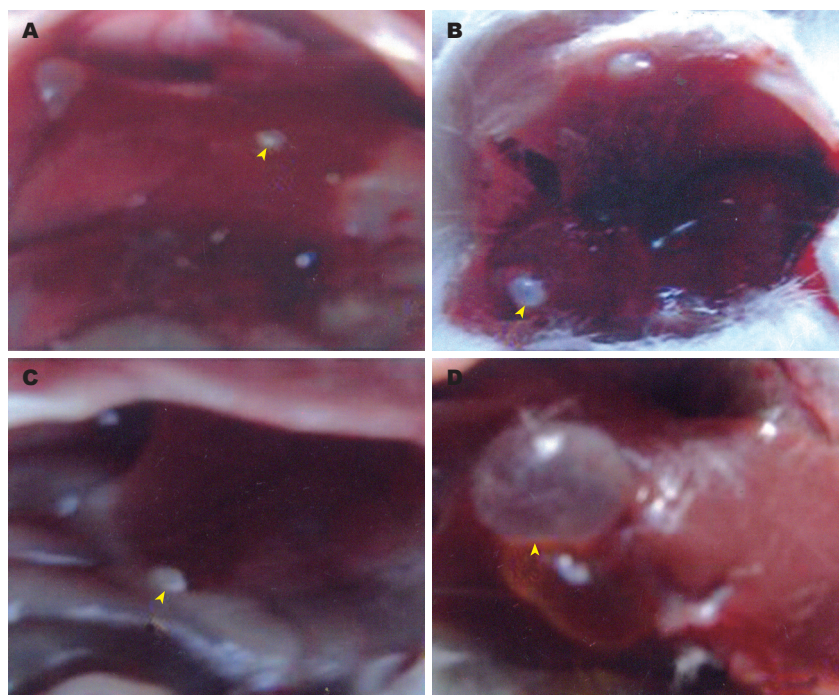


图 2 棘球蚴肉眼观. A: 阿苯达唑组; B: 槐耳浸膏组; C: 联合治疗组; D: 模型组.

表 2 不同药物治疗小鼠感染细粒棘球蚴后T淋巴细胞亚群检测 (mean ± SD)

分组	n	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
阿苯达唑组	35	67.98 ± 9.05	50.85 ± 7.87	16.60 ± 3.89 ^b	3.21 ± 0.70 ^b
槐耳浸膏组	33	71.60 ± 8.34	53.18 ± 6.14	18.18 ± 3.90 ^b	3.05 ± 0.66 ^b
联合治疗组	35	70.62 ± 7.88	54.22 ± 6.33	15.38 ± 2.63 ^b	3.53 ± 0.57 ^b
模型对照组	8	86.33 ± 7.30	50.92 ± 4.90	32.90 ± 4.71	1.57 ± 0.26
空白对照组	8	61.09 ± 8.22	45.59 ± 7.03	14.73 ± 2.15	3.16 ± 0.60

^b $P < 0.01$ vs 模型对照组.

晰可见,角质层板层结构均匀(图3D).

2.3 脾脏指数、IgG和IgE水平 IgG阳性抗体组小鼠与空白对照组比较,脾脏指数、IgG和IgE水平值均有意义($P < 0.05$).各药物组治疗后小鼠脾脏指数、IgE水平明显低于模型对照组($P < 0.01$,表1),但联合治疗组降低最为明显,IgG水平经药物治疗后与模型对照组变化不大($P > 0.05$).在药物治疗组中,进行两因素 2×2 析因分析结果,两种药物阿苯达唑脂质体和槐耳浸膏,在降低脾脏指数和IgE水平上具有明显交互作用($P < 0.05$,图4A).

2.4 T淋巴细胞亚群分类 IgG阳性抗体组小鼠与空白对照组比较,T淋巴细胞亚群和CD4⁺/CD8⁺水平值均有意义($P < 0.05$).各组小鼠T细胞CD4⁺值在各用药组变化不大($P > 0.05$,表2),药物治疗组CD8⁺水平明显低于模型对照组($P < 0.01$,表2),CD4⁺/CD8⁺明显高于模型对照组($P < 0.01$,表2);在阿苯达唑脂质体和槐耳浸膏药物治

疗组中,CD4⁺、CD8⁺和CD4⁺/CD8⁺水平变化不大($P > 0.05$);但联合治疗组中CD8⁺降低、CD4⁺/CD8⁺水平升高变化最为明显.在对药物治疗组中进行两种药物完全随机两因素 2×2 析因分析,结果显示两种药物在降低CD8⁺水平和提高CD4⁺/CD8⁺水平上同样具有明显交互作用($P < 0.05$,图4B).

3 讨论

机体感染细粒棘球蚴后,免疫反应在抗感染过程中发挥重要作用.细粒棘球蚴在未成熟阶段即开始释放抗原刺激机体产生抗体,通过检测抗体可早期诊断包虫病.不同组织器官寄生的包虫,诱导宿主所产生的抗体类型和抗体水平存在着差异,特异性IgG按检出率的高低,依次为肝脏和肺脏.在包虫抗原刺激下,机体感染初期先产生IgM抗体,随着IgG抗体产生,其替代IgM并成为抗包虫特异性免疫球蛋白的主要组

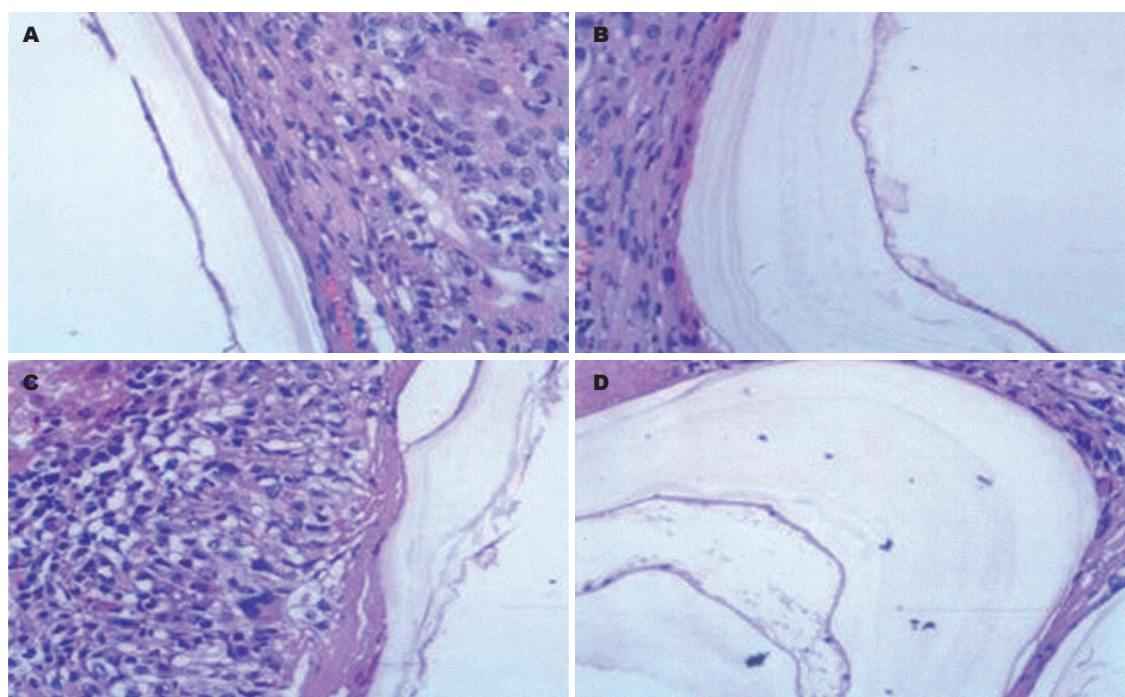


图 3 棘球蚴的病理观(HE × 400). A: 阿苯达唑组; B: 桉耳浸膏组; C: 联合用药组; D: 模型对照组.

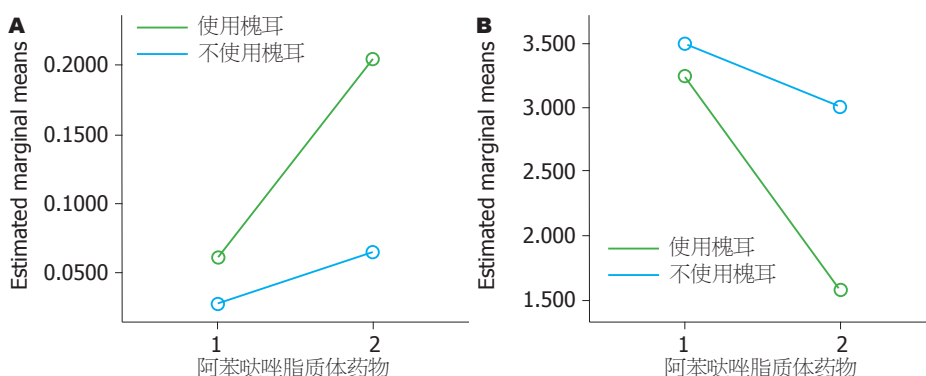


图 4 两种药物治疗过程中的交互作用. A: IgE; B: CD4⁺/CD8⁺. 1: 使用L-ABZ; 2: 不使用L-ABZ.

分. 绵羊和小鼠分别感染棘球蚴后1 wk和2 wk, 即可测出囊液抗原的IgG抗体反应^[8]. 我们通过制作动物模型, 用肝包虫囊液粗抗原免疫小鼠, 使其产生一定的IgG抗体, 从而模拟人类感染肝包虫后机体抗体的产生. IgG阳性者作为实验对象进行分组, 分组时选用临床治疗包虫常用药物阿苯达唑以及增强机体免疫力药物, 了解通过围手术期药物治疗和增强小鼠的免疫能力前提下, 小鼠肝细粒棘球蚴的感染情况. 实验小鼠感染时选择小鼠肝脏直接接种头节, 使宿主免疫应答直接作用于虫体, 模拟“肝包虫外膜下外囊完整摘除术”术中头节脱落或残留头节, 手术前1 wk和术后1 mo分别选用分组药物阿苯达唑脂质体、免疫增强剂桉耳浸膏以及联合阿苯达唑脂质体和桉耳浸膏用药进行治疗, 观察增强小鼠免疫功能对细粒棘球蚴生长的抑制作

用, 以及免疫增强剂与阿苯达唑脂质体的协同作用效果, 为临床实践中治疗肝包虫术后复发筛选有效治疗药物.

阿苯达唑被认为是治疗棘球蚴病最有效的药物之一, 他通过抑制虫体摄取葡萄糖, 致使虫体生发层细胞糖原耗竭、内质网小体和线粒体变性, 溶酶体增加, 最终导致虫体死亡^[9], 脂质体可作为抗寄生虫药物的载体, 进入体内后可迅速被网状内皮细胞摄取, 而包虫病多发于网状内皮细胞丰富的组织和器官, 如肝脏和肺部. 阿苯达唑被脂质体包封后集中于网状内皮系统, 在心脏、肾脏中的累积量比游离药物低得多, 因此可降低药物对心脏、肾脏的毒性作用; 脂质体作为异物被肝、肺、脾等网状内皮系统吞噬, 对这些脏器具有明显的靶向性, 并可增加药物在靶组织滞留时间和滞留量, 延长药物有效

■同行评价

本研究选材较好, 分组明确, 条理清晰, 目的性强, 用图与表说明问题, 有理有据, 具有较好的理论指导意义。

作用时间^[10]。阿苯达唑脂质体可使靶细胞周围的药物浓度高于其他部位, 改变阿苯达唑亚枫在小鼠肝脏的代谢作用, 从而提高治疗效果^[11], 在术前及术后运用阿苯达唑进行治疗, 可以明显减少育囊和术后复发^[12]。槐耳是我国民间重要药用真菌, 槐耳菌质所提取的清膏及进一步提取的多糖是一种良好的生物反应调节剂, 对小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能有非常明显的促进作用, 是一种有效的免疫增强剂^[13]。本实验表明阿苯达唑脂质体、槐耳浸膏对细粒棘球蚴生长具有明显的抑制作用, 阿苯达唑脂质体与槐耳浸膏联用抑制效果更好。用药组各组小鼠感染肝细粒棘球蚴体积明显小于模型对照组, 多数呈现结节状, 在同一生长周期中说明各用药组均对肝细粒棘球蚴的生长起到不同程度的抑制作用。我们首次使用槐耳浸膏治疗小鼠肝细粒棘球蚴, 感染率为24.2%, 这可能与槐耳浸膏改善因棘球蚴寄生造成的免疫抑制, 增强机体免疫功能有关。阿苯达唑脂质体组小鼠肝细粒棘球蚴感染率为17.1%, 显示阿苯达唑脂质体确有抑制小鼠肝细粒棘球蚴生长作用。通过与模型组对比同一生长周期内包虫囊的大小, 各用药组均可以抑制肝细粒棘球蚴的生长。观察本实验包虫感染的病理变化, 在各药物治疗组中, 均可以看见生发层细胞减少, 角质层紊乱, 并出现空泡结构, 其中阿苯达唑脂质体联合槐耳浸膏组对包虫囊壁破坏效果明显强于单独使用槐耳浸膏或阿苯达唑脂质体, 感染率为5.7%, 说明槐耳浸膏通过增强机体免疫能力, 可以抑制小鼠肝细粒棘球蚴生长作用, 但作用效果不能完全替代阿苯达唑脂质体。联合用药可以增强阿苯达唑脂质体对虫体囊壁的破坏作用。

细粒棘球蚴病同其他寄生虫病一样, 在CD4⁺两种细胞类型Th1和Th2产生的独特型细胞因子的调控下刺激体液免疫和细胞免疫反应。在大多数寄生虫感染过程中, Th1细胞活化与保护性免疫有关, Th2细胞活化与疾病的易感有关。IgE介导的局部速发型变态反应在宿主抗寄生虫中起着有益的作用, 但高强度的全身性速发型过敏反应, 会对宿主会产生免疫病理损伤^[14]。同时脾脏是重要的免疫器官, 脾脏指数变化影响体液免疫的状况。本实验中, 模型对照组中小鼠与空白对照组相比, 小鼠脾脏指数及IgE水平明显增高, 反映棘球蚴病Th1/Th2细胞失衡, 体液免疫功能亢进, 从而造成IgE合成增加, 由此引起的过敏反应导致发生的免疫病理损伤, Th2细胞占

优势, 有利于包虫的生长, 小鼠感染率较高。经药物治疗后, 各用药组脾脏指数和IgE均降低, 证明超敏反应被抑制, 免疫状况有所改善, 各组感染率均降低, 尤以联合用药组最为明显。联合用药组与阿苯达唑脂质体组、槐耳浸膏组相比较, 脾脏指数和IgE水平降低, 两种药物有明显的交互作用, 说明联合用药可以加强和进一步调节宿主的免疫功能, 降低包虫引起的超敏反应和体液免疫亢进, 减小对组织的免疫损伤。本实验中各组之间IgG水平变化不大, 可能是由于在包虫感染宿主的血清中, 其中主要的特异性抗包虫免疫球蛋白为IgG类, 而肝脏包囊主要产生的是IgG抗体, 接种前1 mo包虫囊液抗原皮下接种和头节接种刺激机体产生保护性抗体, IgG水平逐渐升高。但在感染包虫小鼠体内, 在IgG免疫球蛋白中, 仅IgG3和IgG4与治疗有相关性^[15]。IgG4抗体应答与囊肿的发展、生长和疾病的进展有关, 而IgG1, IgG2和IgG3应答主要发生在囊肿被宿主浸润或破坏^[16], 且IgG浓度在体内升高所持续的时间较长, 亚类的变化对于血清总IgG水平可能影响不大。血清中IgG3和IgG4的比例较低, 其浓度的变化可能不致影响血清总IgG水平。

T淋巴细胞按其功能可分为CD4(TH/TDTH)和CD8(TS/TC)等细胞亚群。CD4⁺ T细胞具有辅助和诱导功能, CD8⁺ T细胞具有抑制和细胞毒性功能, 各功能亚群之间是相互联系、相互促进、相互制约的。CD4⁺/CD8⁺比值的动态平衡反映了机体免疫调控状态和免疫水平, CD4⁺/CD8⁺比值降低标志着机体免疫功能抑制。Riganò *et al*^[17]发现抗原B可使外周血单个核细胞产生Th1/Th2细胞因子比值改变, 倾向与病理免疫相关的Th2, CD8⁺数量明显上升, 机体免疫功能受到抑制。我们利用FCM对细粒棘球蚴感染小鼠外周血淋巴细胞中CD4⁺和CD8⁺细胞亚群进行动态观察, 在模型组与空白组相比, CD8⁺明显增高, CD4⁺/CD8⁺比值下降, 机体免疫功能受到抑制, Th2细胞免疫应答增强, 免疫逃避机制形成, 小鼠肝包虫囊肿得以生长, 肝细粒棘球蚴感染率较高。阿苯达唑脂质体在治疗包虫患者中, 不仅能够提高药物(代谢)动力学和生物利用度, 而且能够刺激Th1型IFN- γ 细胞因子的表达和巨噬细胞功能的效应器, 恢复T淋巴细胞和B淋巴细胞增殖反映^[18]。本实验结果显示, 阿苯达唑脂质体组、槐耳浸膏组CD8⁺值、CD4⁺/CD8⁺比值变化不大, 与模型组相比CD8⁺值降低, CD4⁺/CD8⁺比值升高, 说明两种药物均可以恢复宿主的机体免疫功能,

恢复T淋巴细胞增殖反应, 从而起到抑制棘球蚴生长作用, 降低小鼠肝细粒棘球蚴感染率, 两种药物对于宿主免疫功能恢复作用相近, 但是感染率有所不同, 这可能与阿苯达唑脂质体本身药理作用有关; 联合用药组中CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺比值明显不同于模型对照组, 与阿苯达唑组及槐耳浸膏组相比, 虽然CD4⁺值变化不大, CD8⁺值降低, CD4⁺/CD8⁺比值升高, 两种药物交互作用明显, 本实验证实联合用药能够明显增强小鼠免疫功能恢复, 治疗效果较单独用药更加明显。

本实验表明, 阿苯达唑脂质体与槐耳浸膏联合用药可以提高小鼠免疫功能, 抑制细粒棘球蚴生长, 使小鼠肝包虫感染率降低。免疫增强剂槐耳浸膏可以协同阿苯达唑脂质体增加小鼠免疫功能, 进一步证明了宿主免疫功能与棘球蚴生长密切相关, 宿主免疫的增强可以抑制包虫的生长。“肝包虫外膜下外囊完整切除术”术后复发率低, 可能与外囊切除后, 包虫头节直接脱落于肝脏裸露的创面, 机体通过免疫应答作用直接将其杀死有关。因此在棘球蚴形成之前通过药物干预, 恢复和增加宿主的免疫功能, 对于术中残留原头蚴的生长可能会起到抑制作用, 以减少或避免肝包虫手术后的复发。

致谢: 感谢石河子大学医学院寄生虫教研室刘振忠、李永祥老师及石河子大学医学院一附院病理科给予的支持与帮助。

4 参考文献

- 徐明谦. 包虫病手术治疗的进展(附21560例分析). 中华普通外科杂志 1994; 9: 50-52
- Gemmell MA, Lawson JR, Roberts MG. Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: evaluation of the biological parameters of *Taenia hydatigena* and *T. ovis* and comparison with those of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 1987; 94: 161-180
- 栾梅香, 温浩, 张新峰. 小儿肝囊型包虫病552例的诊断和外科治疗. 中华普通外科杂志 1998; 13: 329-331
- 郑宏, 徐志新. 宿主感染细粒棘球蚴免疫反应的研究进展. 中国寄生虫病防治杂志 2002; 15: 55-58
- Romig T, Zeyhle E, Macpherson CN, Rees PH, Were JB. Cyst growth and spontaneous cure in hydatid disease. *Lancet* 1986; 1: 861
- 彭心宇, 张示杰, 牛建华, 吴向未, 阿不都, 潘惠忠, 莫拉提, 杨宏强. 肝包虫病外科治疗术式选择的新观点(附684例报道). 腹部外科 2003; 16: 19-21
- 潘卫庆, 汤林华. 分子寄生虫学. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 354-359
- Yong WK, Heath DD, Van Knapen F. Comparison of cestode antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *T. ovis* infections in sheep. *Res Vet Sci* 1984; 36: 24-31
- Franchi C, Di Vico B, Teggi A. Long-term evaluation of patients with hydatidosis treated with benzimidazole carbamates. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 304-309
- 魏农农, 温浩, 陆彬. 阿苯达唑脂质体在小鼠体内的分布及其药物动力学研究. 华西药理学杂志 2002; 17: 95-97
- Wen H, New RR, Muhmut M, Wang JH, Wang YH, Zhang JH, Shao YM, Craig PS. Pharmacology and efficacy of liposome-entrapped albendazole in experimental secondary alveolar echinococcosis and effect of co-administration with cimetidine. *Parasitology* 1996; 113 (Pt 2): 111-121
- Bildik N, Cevik A, Altıntaş M, Ekinçi H, Canberk M, Gülmen M. Efficacy of preoperative albendazole use according to months in hydatid cyst of the liver. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 312-316
- 陈慎宝, 丁如宁. 槐耳菌质成分对小鼠免疫功能的影响. 食用菌学报 1995; 2: 21-25
- Dzhuraev MN, Saidov RK, Pallaev MG. [Immunoglobulin E (IgE) in the blood and the diagnosis of hepatic echinococcosis] *Med Parazitol (Mosk)* 2006: 13-15
- Riganò R, Profumo E, Teggi A, Siracusano A. Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with *Echinococcus granulosus* infection. *Clin Exp Immunol* 1996; 105: 456-459
- Zhang W, Li J, McManus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 18-36
- Riganò R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzarà A, Ioppolo S, Buttari B, Ortona E, Margutti P, Teggi A, Siracusano A. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect Immun* 2001; 69: 288-296
- Dvornáková E, Hrková G, Borosková Z, Velebný S, Dubinský P. Effect of treatment with free and liposomized albendazole on selected immunological parameters and cyst growth in mice infected with *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Int* 2004; 53: 315-325

编辑 潘伯荣 电编 何基才

核因子- κ B及其下游因子TNF- α 、Bcl-2在急性肝损伤中的作用及机制

王春妍, 范玉强, 迟宝荣, 曹武奎, 李海

■背景资料

核因子- κ B是一种广泛存在于体内多种细胞的核转录因子。除能介导多种炎症介质转录表达外, 他也参与细胞凋亡的调控, 主要通过调控凋亡相关的重要基因表达。研究表明NF- κ B及其调控产物的过度表达在肝脏慢性炎症、肝纤维化的发生及发展中起重要作用。但NF- κ B在急性肝损伤中作用及机制研究较少。

王春妍, 范玉强, 曹武奎, 李海, 天津市传染病医院 天津市300192

迟宝荣, 吉林大学第一医院 吉林省长春市 130021

王春妍, 博士, 主治医师, 主要从事急性肝衰竭的基础研究。

作者贡献分布: 实验试剂和研究工具由范玉强与王春妍提供; 研究过程由王春妍、范玉强、迟宝荣、曹武奎及李海共同完成; 数据分析由王春妍与李海完成; 论文写作由迟宝荣与王春妍完成。

通讯作者: 迟宝荣, 130021, 吉林省长春市新民大街71号, 吉林大学第一医院。chibaorong@sohu.com

电话: 0431-85612437

收稿日期: 2008-06-29 修回日期: 2008-07-27

接受日期: 2008-07-29 在线出版日期: 2008-09-08

Roles of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor- α and Bcl-2 in acute hepatic injury and their mechanisms

Chun-Yan Wang, Yu-Qiang Fan, Bao-Rong Chi, Wu-Kui Cao, Hai Li

Chun-Yan Wang, Yu-Qiang Fan, Wu-Kui Cao, Hai Li, Tianjin Infectious Disease Hospital, Tianjin 300192, China
Bao-Rong Chi, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Correspondence to: Bao-Rong Chi, the Hospital of Jilin University, 71 Xinmin Street, Changchun 130021, Jilin Province, China. chibaorong@sohu.com

Received: 2008-06-29 Revised: 2008-07-27

Accepted: 2008-07-29 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To explore the roles of nuclear factor-kappa B and its downstream factors such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Bcl-2 in acute hepatic injury and their mechanisms.

METHODS: A total of 90 male Wistar rats were randomly and averagely divided into normal group, TAA (thioacetamide) model group and PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) pretreated group. The rats in each group were killed 6, 24 and 48 h after induction of the model, 10 rats for each time point. Chromogenic substrate limulus amebocyte lysate method was used to examine the level of plasma endotoxin, and radioimmunoassay was performed to detect the level of plasma TNF- α . Liver tissues were collected for pathological examination by immunohistochem-

istry, and the apoptotic index of hepatic cells was also measured.

RESULTS: As compared with those in the normal group, the levels of plasma endotoxin (EU/mL) and TNF- α (μ g/L) were significantly increased (endotoxin: 0.64 ± 0.08 vs 0.23 ± 0.02 , $P < 0.01$; 0.96 ± 0.14 vs 0.25 ± 0.02 , $P < 0.01$; 1.15 ± 0.17 vs 0.25 ± 0.03 , $P < 0.01$; TNF- α : 5.97 ± 1.07 vs 1.44 ± 0.52 , $P < 0.01$; 12.52 ± 2.09 vs 1.57 ± 0.62 , $P < 0.01$; 10.76 ± 1.95 vs 1.49 ± 0.57 , $P < 0.01$), and the activities of NF- κ B and Bcl-2 in liver tissues were enhanced (NF- κ B: $87.11\% \pm 8.23\%$ vs $4.64\% \pm 1.82\%$, $78.55\% \pm 6.82\%$ vs $4.58\% \pm 1.91\%$, $74.27\% \pm 6.26\%$ vs $4.73\% \pm 1.89\%$, all $P < 0.01$; Bcl-2: $51.11\% \pm 4.23\%$ vs $6.74\% \pm 3.93\%$, $71.59\% \pm 6.82\%$ vs $6.68\% \pm 3.88\%$, $82.19\% \pm 8.54\%$ vs $6.81\% \pm 4.14\%$, all $P < 0.01$) in the TAA group. With prolonging of TAA treatment, the apoptotic index of hepatic cells were increasing, and the pathological changes becoming notable. After the activity of NF- κ B was inhibited by PDTC, the pathological injury was alleviated.

CONCLUSION: TNF- α is activated in TAA-induced acute liver injury, and NF- κ B aggravates hepatic injury by regulating its downstream gene expression.

Key Words: Acute liver injury; Nuclear factor-kappa B; Tumor necrosis factor- α ; Bcl-2; Immunohistochemistry; Radioimmunoassay

Wang CY, Fan YQ, Chi BR, Cao WK, Li H. Roles of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor- α and Bcl-2 in acute hepatic injury and their mechanisms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2804-2808

摘要

目的: 探讨核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)及其下游因子TNF- α 、Bcl-2在急性肝损伤中的作用及机制。

方法: δ Wistar大鼠90只随机分为正常组, 硫代乙酰胺(TAA)造模组及脯氨酸二硫代氨基

■同行评议者

谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

甲酸酯(PDTC)预处理组($n = 30$). 三组大鼠分别于造模完成后6、24、48 h 3个时间点处死, 每个时间点各取10只大鼠. 萤试剂显色基质法测定大鼠血浆内毒素, 放免法测定血浆TNF- α 水平, 取肝脏行病理学及免疫组化检测, 制备肝脏单细胞悬液检测肝细胞凋亡指数.

结果: 与正常组相比, TAA组在6、24、48 h时间点均可见血浆内毒素(EU/mL)及TNF- α (μ g/L)水平明显升高(内毒素: 0.64 ± 0.08 vs 0.23 ± 0.02 , $P < 0.01$; 0.96 ± 0.14 vs 0.25 ± 0.02 , $P < 0.01$; 1.15 ± 0.17 vs 0.25 ± 0.03 , $P < 0.01$; TNF- α : 5.97 ± 1.07 vs 1.44 ± 0.52 , $P < 0.01$; 12.52 ± 2.09 vs 1.57 ± 0.62 , $P < 0.01$; 10.76 ± 1.95 vs 1.49 ± 0.57 , $P < 0.01$), 肝组织NF- κ B及Bcl-2明显活化(NF- κ B: $87.11\% \pm 8.23\%$ vs $4.64\% \pm 1.82\%$, $78.55\% \pm 6.82\%$ vs $4.58\% \pm 1.91\%$, $74.27\% \pm 6.26\%$ vs $4.73\% \pm 1.89\%$, 均 $P < 0.01$; Bcl-2: $51.11\% \pm 4.23\%$ vs $6.74\% \pm 3.93\%$, $71.59\% \pm 6.82\%$ vs $6.68\% \pm 3.88\%$, $82.19\% \pm 8.54\%$ vs $6.81\% \pm 4.14\%$, 均 $P < 0.01$). 随着时间延长, 肝细胞凋亡指数增加, TAA组肝脏病理变化明显, 抑制NF- κ B活性后, 可见肝脏病理变化减轻.

结论: TAA所致急性肝损伤中, TNF- α 水平明显升高, 发挥了促炎及诱导凋亡作用. 其促凋亡作用相对拮抗Bcl-2抗凋亡作用. NF- κ B通过调控其下游基因加重肝脏损伤.

关键词: 急性肝损伤; 核因子- κ B; 肿瘤坏死因子- α ; Bcl-2; 免疫组化; 放免法

王春妍, 范玉强, 迟宝荣, 曹武奎, 李海. 核因子- κ B及其下游因子TNF- α 、Bcl-2在急性肝损伤中的作用及机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2804-2808

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2804.asp>

0 引言

核因子- κ B(nuclear factor-kappaB, NF- κ B)是一种广泛存在于体内多种细胞的核转录因子, 参与多种疾病的病理生理过程, 在机体的免疫和炎症反应及凋亡调控等方面发挥着重要作用^[1]. NF- κ B除了能介导多种炎症介质转录表达外, 他也参与了细胞凋亡的调控, 主要是通过调控凋亡相关的重要基因表达. 其对细胞凋亡的调控具有两种截然不同的作用: 抗凋亡或促凋亡. 细胞类型和刺激的类型、凋亡诱导因素不同导致NF- κ B发挥不同的作用. TNF- α , Bcl-2为NF- κ B下游2个重要的与凋亡相关基因. 目前NF- κ B及其下游因子TNF- κ , Bcl-2在急性肝损伤中的作用

及机制的相关研究较少, 故本实验采用硫代乙酰胺造模方法就此问题进行探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 硫代乙酰胺(TAA)购自天津市大茂化学仪器供应站. 脯氨酸二硫代氨基甲酸酯(PDTC)购于Sigma公司. 内毒素试剂盒购于湛江海洋生物制品厂. TNF- α 放免试剂盒购于北京尚柏生物医学技术有限公司. DAB试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司. NF- κ B P65 mAb购自北京中山生物技术有限公司. Bcl-2 mAb购自武汉博士德生物工程有限公司. 其余化学试剂均为市售分析纯.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: δ Wistar大鼠90只随机分为正常组(30只), TAA造模组(30只)及PDTC预处理组(30只). TAA造模组大鼠予硫代乙酰胺(TAA)300 mg/kg sc, 24 h后以相同剂量重复皮注1次, 48 h造模完成; PDTC预处理组于建立急性肝损伤模型前1 h ip PDTC 100 mg/kg; 正常组予同等剂量生理盐水皮注. 三组大鼠分别于造模完成后6、24、48 h 3个时间点处死, 每时间点各取10只大鼠.

1.2.2 检测指标: 血浆内毒素测定: 采用萤试剂显色基质法; 血浆TNF- α 检测采用放免法测定; 肝脏病理学检测: 将经处理的肝脏组织制成常规石蜡切片, HE染色后进行组织学检查. SP法(链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶)免疫组化检测肝脏组织中NF- κ B及Bcl-2活性. 结果判定: NF- κ B细胞染色呈黄色或棕黄色为阳性, 定位于细胞核和(或)细胞质. Bcl-2细胞染色呈黄色或棕黄色为阳性, 定位于细胞质. 每张切片取5个高倍镜视野(每个视野>500个细胞), 分别计算阳性率, 阳性率 = 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$. 肝细胞凋亡指数检测: 将肝脏组织制备成单细胞悬液, 按1:3体积加入冷乙醛内固定, 4 $^{\circ}$ C, 过夜. 次日首先600转离心5 min, 洗去乙醛, 弃上清, 用PBS反复洗3次, 弃上清, 调整细胞数为 1×10^9 /L, 过350目纱网. 加入RNASE 100 mL混匀, 37 $^{\circ}$ C水浴30 min, 然后加入碘化丙锭(PI)400 mL, 室温下避光染色30 min. 送流式细胞仪待测.

统计学处理 采用SPSS12.0软件处理数据. 实验数据以mean $\pm$ SD表示, 组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 各组肝组织NF- κ B和Bcl-2免疫组化结果

■ 研发前沿

目前, NF- κ B及其下游基因TNF- α , Bcl-2在硫代乙酰胺所致急性肝损伤中作用及机制的研究尚未见报道.

■相关报道

研究表明,一种转录调节因子可以在不同类型的细胞中表现出多种各异的生物学效应,通过这一机制,使纷繁复杂的基因表达控制趋于最经济,又不失其特异性。

表 1 各组肝组织NF- κ B及Bcl-2免疫组化结果 (mean $\pm$ SD, %)

分组	NF- κ B			Bcl-2		
	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
对照组	4.64 $\pm$ 1.82	4.58 $\pm$ 1.91	4.73 $\pm$ 1.89	6.74 $\pm$ 3.93	6.68 $\pm$ 3.88	6.81 $\pm$ 4.14
TAA组	87.11 $\pm$ 8.23 ^b	78.55 $\pm$ 6.82 ^b	74.27 $\pm$ 6.26 ^b	51.11 $\pm$ 4.23 ^b	71.59 $\pm$ 6.82 ^b	82.19 $\pm$ 8.54 ^b
PDTC预处理组	31.88 $\pm$ 4.14 ^{bd}	27.58 $\pm$ 3.44 ^{bd}	26.67 $\pm$ 3.88 ^{bd}	27.45 $\pm$ 3.37 ^{bd}	32.58 $\pm$ 3.91 ^{bd}	35.94 $\pm$ 4.67 ^{bd}

^b P <0.01 vs 正常对照组; ^d P <0.01 vs TAA组。

表 2 各组血浆内毒素含量检测结果 (mean $\pm$ SD)

分组	内毒素(EU/mL)			TNF- α (μ g/L)		
	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
对照组	0.23 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.03	1.44 $\pm$ 0.52	1.57 $\pm$ 0.62	1.49 $\pm$ 0.57
TAA组	0.64 $\pm$ 0.08 ^b	0.96 $\pm$ 0.14 ^b	1.15 $\pm$ 0.17 ^b	5.97 $\pm$ 1.07 ^b	12.52 $\pm$ 2.09 ^b	10.76 $\pm$ 1.95 ^b
PDTC预处理组	0.42 $\pm$ 0.05 ^{bd}	0.54 $\pm$ 0.07 ^{bd}	0.65 $\pm$ 0.07 ^{bd}	3.52 $\pm$ 0.90 ^{bd}	5.47 $\pm$ 0.99 ^{bd}	4.36 $\pm$ 0.95 ^{bd}

^b P <0.01 vs 正常对照组; ^d P <0.01 vs TAA组。

表 3 各组肝细胞凋亡指数结果比较 (mean $\pm$ SD, %)

分组	6 h	24 h	48 h
对照组	3.11 $\pm$ 0.42	3.67 $\pm$ 0.51	3.40 $\pm$ 0.49
TAA组	19.26 $\pm$ 1.83 ^b	43.25 $\pm$ 3.91 ^b	67.43 $\pm$ 7.04 ^b
PDTC预处理组	18.54 $\pm$ 1.79 ^b	29.21 $\pm$ 2.81 ^{bd}	41.73 $\pm$ 3.94 ^{bd}

^b P <0.01 vs 正常对照组; ^d P <0.01 vs TAA组。

TAA造模组各时间点均可见NF- κ B明显活化,于造模后6 h升高即达到峰值,至24-48 h NF- κ B活性仍保持在较高水平。PDTC组各时间点NF- κ B活化抑制。TAA造模组各时间点Bcl-2表达显著升高,随着时间的延长,Bcl-2表达也随之升高。PDTC组各时间点Bcl-2表达明显降低(表1)。

2.2 各组血浆内毒素及TNF- α 含量检测分析 TAA造模组各时间点血浆内毒素含量明显升高,随着时间的延长,TAA组内毒素的含量也随之升高。PDTC组各时间点血浆内毒素含量降低。TAA组各时间点TNF- α 水平显著升高,于造模后6 h开始升高,24 h达到最高峰;PDTC组各时间点TNF- α 水平明显降低(表2)。

2.3 各组肝细胞凋亡指数结果 TAA组各时间点肝细胞凋亡指数明显增加。随着时间的延长,肝细胞凋亡指数也随之增加。PDTC组各时间点肝细胞凋亡指数降低(表3)。

2.4 各组肝组织病理结果 正常组大鼠肝组织,肝小叶结构正常,清晰。肝窦清晰无扩张,无明显

炎性细胞浸润。TAA 6 h组大鼠肝组织,灶状坏死,肝细胞肿胀,肝细胞质疏松,偶见细胞空泡样变性,炎性细胞浸润,肝小叶尚清晰。TAA 24 h组大鼠肝组织,片状坏死,肝细胞高度肿胀,体积变大,部分细胞空泡变性,可见肝细胞核碎裂,炎性细胞明显浸润,肝小叶尚清晰,肝索排列不整齐。TAA 48 h组大鼠肝组织,大片状坏死,出血,肝小叶不清,结构紊乱,肝索排列紊乱。可见少数尚存肝细胞,肝细胞核碎裂或消失,大量炎性细胞浸润。PDTC各组肝组织病理改变较TAA组同时间点明显减轻(图1)。

3 讨论

越来越多的证据表明,一种转录调节因子可以在不同类型的细胞中表现出多种各异的生物学效应,通过这一机制,使纷繁复杂的基因表达控制趋于最经济,又不失其特异性;细胞核因子NF- κ B正是这样一种具有多向性调节作用的蛋白质因子。NF- κ B除了能介导多种炎性介质转录

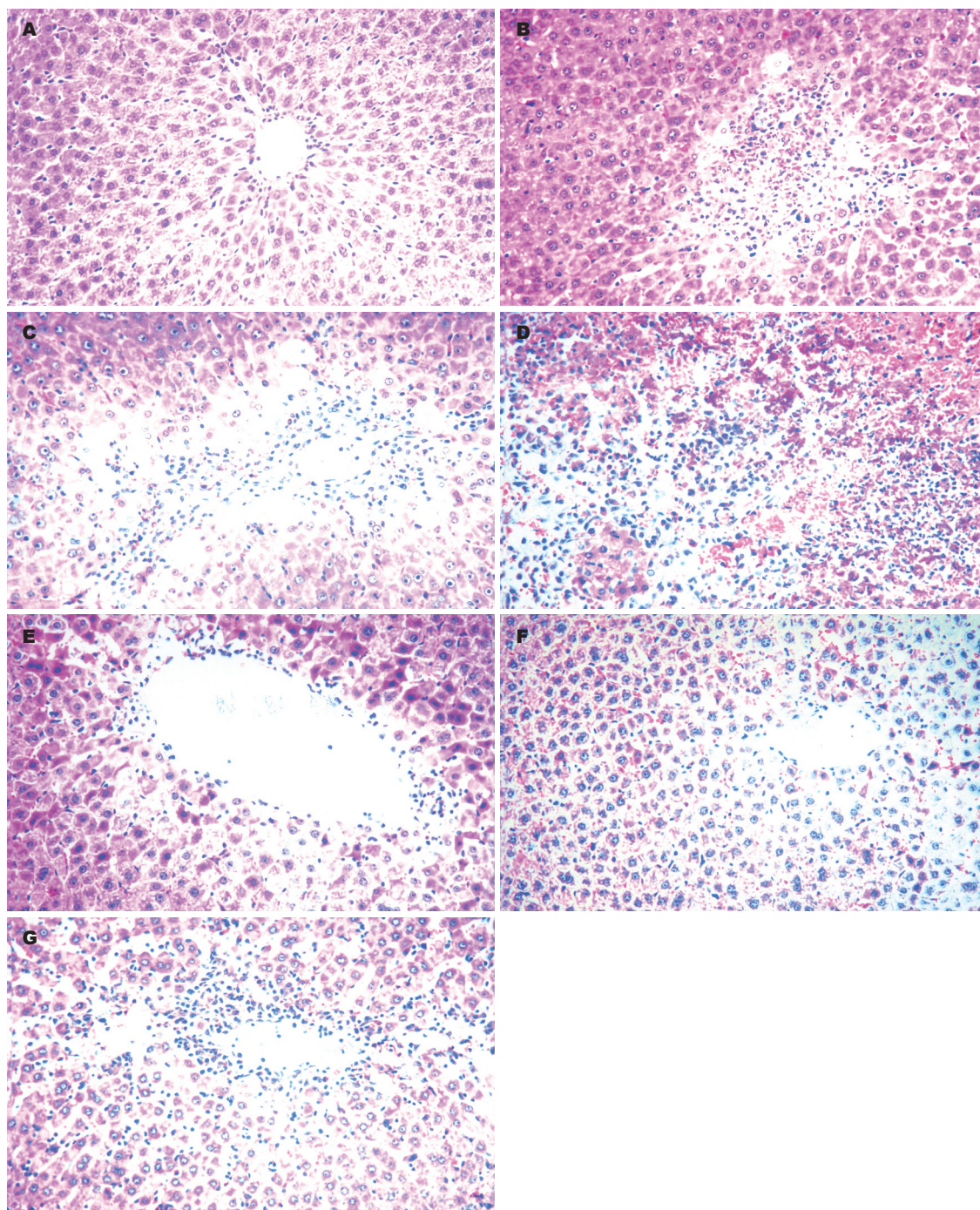


图1 肝组织病理结果. A: 正常肝脏组织($\times 200$); B: TAA 6 h组; C: TAA 24 h组; D: TAA 48 h组; E: PDTC 6 h组; F: PDTC 24 h组; G: PDTC 48 h组.

■应用要点

本文通过动态观测NF- κ B及其下游因子TNF- α 、Bcl-2表达变化,探讨其在急性肝损伤中作用及机制,为今后临床肝衰竭的治疗提供一定的理论基础.

表达外,也参与了细胞凋亡的调控.主要是通过调控凋亡相关的重要基因表达.其对细胞凋亡的调控具有2种截然不同的作用:抗凋亡或促凋亡. TNF- α 、Bcl-2为NF- κ B的下游基因,在两者的启动子上存在着NF- κ B的结合位点^[2-3]. PDTC是一种抗氧化剂,对NF- κ B的活化有明显的抑制作用.本实验通过PDTC抑制NF- κ B活性,动态研究下游基因TNF- α 及Bcl-2的变化来探讨NF- κ B的作用及机制.

TAA所致的急性损伤同时伴有内毒素血症形成^[4].血浆内毒素水平升高,刺激细胞内的NF- κ B,使之活化. NF- κ B激活后可促进多种炎症介质如细胞因子、黏附分子、趋化因子等基因的转录,在炎症反应中起重要作用^[5]. NF- κ B活化在炎症反应时复杂的细胞因子网络中可能是中心环节,生成大量炎症介质^[6],从而产生炎症级联放大作用.在这个过程中, TNF- α 是最关键的促炎介质,在内毒素性急性肝损伤和其他炎性细

■同行评价

本研究设计合理,数据可信,具有一定的创新性和科学意义。

胞因子的产生中起重要作用^[7]。同时, TNF- α 也发挥着促凋亡效应, 主要由TNF-R1介导。TNF-R1的激活导致了多种凋亡途径的激活, 包括促凋亡的Bcl-2家族蛋白、活性氧、c-Jun NH2-末端激酶、组织蛋白酶B、酸性鞘磷脂酶及中性鞘磷脂酶。这些途径密切相关并主要作用于线粒体, 线粒体释放致凋亡因子及其他物质, 导致细胞凋亡^[8]。NF- κ B通过调控TNF- α 发挥着促炎及促凋亡作用。

同时, 活化的NF- κ B激活其下游基因Bcl-2, Bcl-2过度表达后可与NF- κ B在细胞质内形成Bcl-2-NF- κ B复合物。一方面, 该复合物限制NF- κ Bp65-P50进入细胞核, 另一方面他可与NF- κ Bp65-P50在细胞核内竞争结合位点。Bcl-2蛋白是最重要的抗凋亡物质, 其抗凋亡机制是: (1)抑制凋亡蛋白酶Caspase的激活, 阻止凋亡事件的发生; (2)直接的抗氧化作用; (3)抑制线粒体释放促凋亡的蛋白质, 如细胞色素C; (4)抑制促凋亡蛋白Bax、Bak的细胞毒作用^[9]。NF- κ B通过调控Bcl-2发挥抗凋亡作用。

分析本试验结果: (1)TAA造模组各时间点血浆内毒素含量明显升高, 随着时间的延长, TAA组内毒素的含量也随之升高。说明急性肝损伤出现内毒素血症, 且随着造模时间的延长而逐渐加重。 (2)TAA造模组各时间点均可见NF- κ B明显活化, 于造模后6 h升高即达到峰值, 至24-48 h NF- κ B活性仍保持在较高水平。血浆TNF- α 于造模后6 h开始显著升高, 24 h达到最高峰, 高峰时间滞后于NF- κ B。分析急性肝损伤伴发内毒素血症, 血浆内毒素升高, 刺激细胞内的转录因子NF- κ B, 使之活化。活化后的NF- κ B可增强TNF- α 、IL-6等炎症因子的转录, 促进TNF- α 、IL-6等细胞因子生成和释放增多, 进而持续激活NF- κ B, 保持NF- κ B在较高活化水平。 (3)TAA造模组各时间点Bcl-2表达显著升高。随着时间的延长, Bcl-2表达也随之升高。分析活化后的NF- κ B一直维持于较高活化水平, 其促进了Bcl-2表达。 (4)TAA所致急性肝损伤早期, NF- κ B及下游基因TNF- α 、Bcl-2表达即明显增加, 提示肝脏受到损伤信号刺激时, NF- κ B活化并启动下游促凋亡和抗凋亡基因的表达, 同时也启动了损伤和修复程序。随着时间的延长, 肝细胞凋

亡指数增加, 提示在急性肝损伤过程中, 诱导凋亡机制占优势。 (5)造模组肝脏病理变化提示NF- κ B加重肝脏损伤。 (6)用PDTC抑制NF- κ B的活性后, TNF- α 水平明显下降, Bcl-2表达降低, 肝细胞凋亡指数降低, 肝脏病理改变减轻。

总之, NF- κ B加重肝脏损伤的机制可能为: 细胞中的NF- κ B在未受到适当刺激时与I κ B抑制蛋白结合在一起, 处于未活化状态。内毒素刺激细胞内转录因子NF- κ B活化, 激活枯否氏细胞和肝内单核细胞释放TNF- α 。NF- κ B表达增强, 激活下游基因Bcl-2, 通过调控Bcl-2发挥其抗凋亡作用。TNF- α 作为炎症细胞因子, 不仅可激活细胞因子级联反应, 而且可促进氧自由基、NO、细胞色素C等物质生成, 诱导肝细胞凋亡, 其促凋亡作用相对抑制Bcl-2的抗凋亡作用, 最终诱导肝细胞大量凋亡。故NF- κ B通过调控其下游基因发挥着促凋亡作用, 同时促进炎症因子的大量释放, 发挥促炎作用, 使肝脏的损伤越来越严重, 终致肝功能衰竭。

4 参考文献

- 1 Elsharkawy AM, Mann DA. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology* 2007; 46: 590-597
- 2 杨文军, 张启瑜, 余正平. 核因子- κ B在肝细胞增殖与凋亡中的研究进展. *肝胆胰外科杂志* 2005; 17: 252-254
- 3 Chen C, Edelstein LC, Gélinas C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2687-2695
- 4 王春妍, 杨世忠, 江海艳. 急性肝损伤大鼠肠源性内毒素血症形成机理及其作用的实验研究. *临床肝胆病杂志* 2007; 23: 109-111
- 5 Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 749-759
- 6 Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Med* 1998; 24: 1131-1138
- 7 Nowak M, Gaines GC, Rosenberg J, Minter R, Bahjat FR, Rectenwald J, MacKay SL, Edwards CK 3rd, Moldawer LL. LPS-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF-alpha and the TNF-p55 receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R1202-R1209
- 8 李晶媛, 李树臣, 杨维良. TNF- α 诱导肝细胞凋亡机制的回顾与展望. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 606-611
- 9 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326

编辑 李军亮 电编 何基才

瘦素对脂变人肝细胞TG的含量及PPAR α 、CPT-I表达的影响

谭英征, 陈双华, 阳学风, 胡剑峰, 傅京力, 胡杨

谭英征, 傅京力, 株洲市一医院感染内科 湖南省株洲市 412000
陈双华, 湖南中医药高等专科学校 湖南省株洲市 412012
阳学风, 胡杨, 南华大学附属南华医院消化内科 湖南衡阳市 421002
胡剑峰, 浏阳市人民医院消化内科 湖南省浏阳市 410300
谭英征, 2004年南华大学硕士, 主要从事防治慢性肝病的研究。
作者贡献分布: 此课题由谭英征、陈双华、阳学风及胡剑峰设计; 研究过程由谭英征、陈双华、胡剑峰、傅京力及胡杨操作完成; 数据分析由谭英征、阳学风及胡剑峰完成; 本论文写作由谭英征及陈双华完成。
通讯作者: 谭英征, 412000, 湖南省株洲市, 株洲市一医院感染内科. tyz20040343@yahoo.com.cn
电话: 0733-8203284
收稿日期: 2008-07-02 修回日期: 2008-08-06
接受日期: 2008-08-09 在线出版日期: 2008-09-08

Effects of leptin on the content of triglyceride and the expression of peroxisome proliferator activated receptor α and carnitine palmitoyltransferase-I in human hepatocytes with fatty degeneration

Ying-Zheng Tan, Shuang-Hua Chen, Xue-Feng Yang, Jian-Feng Hu, Jing-Li Fu, Yang Hu

Ying-Zheng Tan, Jing-Li Fu, Department of Infections Diseases, Zhuzhou First Hospital, Zhuzhou 412000, Hunan Province, China
Shuang-Hua Chen, Hunan Traditional Chinese Medicine College, Zhuzhou 412012, Hunan Province, China
Xue-Feng Yang, Yang Hu, Department of Gastroenterology, Nanhua Hospital Affiliated to Nanhua University, Hengyang 421002, Hunan Province, China
Jian-Feng Hu, Department of Gastroenterology, Liuyang People's Hospital, Liuyang 410300, Hunan Province, China
Correspondence to: Ying-Zheng Tan, Department of Infections Diseases, Zhuzhou First Hospital, Zhuzhou 412000, Hunan Province, China. tyz20040343@yahoo.com.cn
Received: 2008-07-02 Revised: 2008-08-06
Accepted: 2008-08-09 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To the influence of leptin on lipid degeneration of hepatocytes and its mechanism.

METHODS: The model of hepatocyte fatty degeneration was prepared using human L-02

liver cells. This experiment included the following groups: normal hepatocytes group, fatty degeneration model group, positive control group (treated with gemfibrozil), and leptin treatment groups I, II and III (using 10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} mol/L leptin, respectively). After 24-hour incubation, cell morphology and the formation of intracellular lipid droplets were observed by oil red O staining and the content of intracellular triglyceride (TG) was detected through high performance liquid chromatography (HPLC). Besides, the mRNA expression levels of peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) and its target gene carnitine palmitoyltransferase-I (CPT-I) were detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The intracellular lipid droplets were increased in the model group and leptin group I as compared with those in the other groups. The contents of intracellular TG were 1.063 ± 0.146 , 0.648 ± 0.023 and 0.553 ± 0.045 mmol/g protein respectively when leptin was used at concentrations of 10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} mol/L. In comparison with that in the positive control group, the mRNA expression of PPAR α was increased significantly in the leptin groups II or III ($P < 0.01$); but PPAR α mRNA expression was not remarkably different between the leptin group I and the positive control group. There was no marked difference between the model group and the normal group in CPT-I mRNA expression, but it was significantly elevated after leptin treatments ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Leptin decreases the content of TG in human L-02 hepatocytes with fatty degeneration in a dose-dependent manner, and its mechanism may be related to the up-regulation of PPAR α and its target genes.

Key Words: Leptin; Human L-02 hepatocyte; Peroxisome proliferator activated receptor α ; Lipoprotein lipase; Carnitine palmitoyltransferase-I; High performance liquid chromatography; Reverse transcription-polymerase chain reaction

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是指除酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞脂肪变为主要特征的临床病理综合征。NAFLD的发病率和早期诊断率逐年上升, 该病是胃肠道病中最常见的疾病之一, 发病年龄年轻化, 已成为全球性的公共卫生问题, 但其发病原因和发病机制至今尚不完全明了。

■同行评议者

吴君, 主任医师, 贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科

■研究前沿

瘦素作为肥胖基因编码的蛋白产物,其能调节能量平衡,参与肝脏糖原及脂肪的代谢调节,对NAFLD的发生、发展具有很大作用。从而瘦素的研究成为热门课题,而瘦素的作用机制是其中的研究热点。

Tan YZ, Chen SH, Yang XF, Hu JF, Fu JL, Hu Y. Effects of leptin on the content of triglyceride and the expression of peroxisome proliferator activated receptor α and carnitine palmitoyltransferase-I in human hepatocytes with fatty degeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2809-2814

摘要

目的: 探讨瘦素对肝细胞脂质变性的作用及其机制。

方法: 以离体人肝L-02细胞株制备肝细胞脂肪变性模型。实验分为正常肝细胞组、人肝L-02细胞脂肪变性模型组、瘦素不同浓度处理 I、II、III组(浓度分别为 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L)和阳性对照组。孵育24 h后,油红O染色观察细胞形态和细胞内脂滴的形成,高效液相色谱法(HPLC)检测细胞内甘油三酯(TG)的含量,RT-PCR检测过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)及其目标基因肉碱转移酶-I(CPT-I) mRNA水平的表达。

结果: 模型组和瘦素 I 组细胞质中有较多的脂滴形成,而瘦素 II、III组、正常组、阳性对照组胞质中脂滴较少。瘦素浓度为 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L时,肝细胞中TG的含量为 1.063 ± 0.146 、 0.648 ± 0.023 、 0.553 ± 0.045 mmol/L/g 蛋白,呈细胞依赖性减少。瘦素 II、III组与阳性对照组比较,PPAR α 的mRNA表达上升更为明显,差别有统计学意义($P < 0.01$);但瘦素 I 组与阳性对照组之间无显著性差异。模型组与正常组比较,CPT-I mRNA表达无明显改变,经瘦素处理后,较模型组相比,CPT-I mRNA表达明显上升($P < 0.01$)。

结论: 瘦素能降低人肝L-02脂变细胞内TG的含量,呈剂量依赖关系,其降低细胞内TG作用可能与PPAR α 及其目标基因表达上调有关。

关键词: 瘦素; 人肝L-02细胞; 过氧化物酶体增殖物激活受体 α ; 肉碱转移酶-I; 高效液相色谱法; 逆转录-聚合酶链反应

谭英征, 陈双华, 阳学风, 胡剑峰, 傅京力, 胡杨. 瘦素对脂变人肝细胞TG的含量及PPAR α 、CPT-I表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(25): 2809-2814

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2809.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种肝组织病理学改变与酒精性肝病相似但无过量饮酒史的临床综合

征,表现为肝细胞脂肪变性,伴轻重不等的炎症和肝纤维化。目前,NAFLD的发病率和早期诊断率逐年上升,发病年龄年轻化,已成为全球性的公共卫生问题^[1-2]。瘦素作为肥胖基因(obese gene, ob gene)编码的蛋白产物,其主要功能是调节能量平衡,参与肝脏糖原及脂肪的代谢调节,对NAFLD的发生、发展具有一定作用。本实验旨在观察瘦素对脂变人肝L-02细胞的甘油三酯(TG)含量、脂滴形成的影响,并通过测定PPAR α 及其目的基因CPT-I mRNA表达,初步探讨瘦素对肝细胞脂质变性的防治作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640为Gibco公司产品,胎牛血清为杭州四季青公司产品,无支原体级,瘦素、胰蛋白酶、油红O试剂均为美国Sigma公司产品,MMLV第一链cDNA合成试剂盒、即用PCR扩增试剂盒为上海生物工程公司产品,PPAR α 、CPT-I、GAPDH引物均由上海生物工程公司合成,人肝L-02细胞购自武汉细胞典藏中心,CO₂培养箱为美国Fisher,Scientific 1168751H型,倒置相差显微镜为日本产Nikon TMS,美国产Beckman J6-HC型低温离心机,美国Beckman公司LE-80型低温超速离心机,美国Agilent1100LC高效液相色谱仪。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人肝L-02细胞用含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640完全培养液,于37℃、50 mL/L CO₂条件下常规培养。用胰蛋白酶消化后收集细胞并传代。

1.2.2 肝细胞脂肪变性模型的建立: 人肝L-02细胞达 1×10^9 个/L时用完全培养基重新悬浮,并以1:3的比例传代,取对数生长期细胞,更换新鲜培养液后,用含100 mL/L医用脂肪乳注射液和100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640完全培养基孵育人肝L-02细胞24 h,低倍镜下每单位面积见1/3以上的肝细胞脂肪变性,细胞内出现脂滴或泡沫样物沉积,则制成肝细胞脂肪变性模型(镜像比较造模前后细胞内的脂滴变化,组织学上低倍镜下每单位面积见1/3以上的肝细胞脂肪变性和脂肪储积,无其他明显组织学改变)。将所得细胞改置于含1 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基中,使其静止24 h后,再按实验分组做相应的处理。

1.2.3 实验分组: 实验分为正常肝细胞组(培养48 h)、人肝L-02细胞脂肪变性模型组(造模24 h后,

■相关报道

目前的研究认为,NAFLD的发生肝脏脂质合成与排泄失衡,引起肝细胞内甘油三酯(TG)堆积,最终导致中性脂肪在肝细胞内过度沉积而形成脂肪肝。

再孵育24 h)、瘦素 I 组(造模24 h后, 加瘦素使其终浓度为 10^{-8} mol/L, 共同孵育24 h)、瘦素 II 组(造模24 h后, 加瘦素使其终浓度为 10^{-7} mol/L, 共同孵育24 h)、瘦素 III 组(造模24 h后, 加瘦素使其终浓度为 10^{-6} mol/L, 共同孵育24 h)、阳性对照组(造模24 h后, 加吉非罗齐使其终浓度为4 mmol/L, 共同孵育24 h)。实验重复5次, 结果取平均值。

1.2.4 油红O染色观察细胞内脂滴变化: 将细胞培养于放有无菌盖玻片的6孔培养板, 细胞被处理后, 用PBS洗3次, 6.53 mol/L异丙醇固定1 min, 油红O染色液染色10 min, 蒸馏水冲洗3次, 每次1 min, 苏木素染色5 min, 蒸馏水冲洗3次, 27.4 mmol/L盐酸分色及氨水返蓝, 明胶封片, HPIAS-1000型图像分析系统收集图像。

1.2.5 HPLC测量细胞内TG含量: 参照文献[3-4]方法, 细胞培养瓶中细胞达到 10^9 个/L时, 弃去培养基, 加2 mL生理盐水吹打细胞, 1500转离心5 min, 弃上清液, 加细胞裂解液200 μ L, 3000 r/min 10 min, 取上清, 即得细胞样品。取细胞裂解液10 μ L进行BCA蛋白定量。采用美国Agilent1100LC高效液相色谱仪, Hypersil ODS 4.6 mm $\times$ 250 mm色谱柱, 柱温25 $^{\circ}$ C, 检测波长230 nm, 流速0.7 mL/min, 流动相A为1%水的乙腈溶液, 流动相B为1%乙腈水溶液; 采用两相梯度洗脱, 梯度洗脱时间为0-12 min: 75%A-95%A; 12-18 min: 75%A。以峰面积对甘油浓度绘制标准曲线, 并进行线性回归, 所得结果除以细胞蛋白定量值, 计算出细胞内游离甘油与总甘油的含量, 总甘油与游离甘油之差即为细胞内TG的量, 以mmol/g细胞蛋白为单位。

1.2.6 RT-PCR检测PPAR α 、CPT-I mRNA: 收集培养的细胞, 按TRIzol试剂的说明书, 分别提取总RNA, 用紫外分光光度计定量后, 调整RNA的浓度为0.2 g/L。RT-PCR的反应体系为: 两对引物各1.0 μ L、 $10\times$ Buffer 5 μ L、25 mmol/L MgSO $_4$ 1 μ L、10 mmol/L dNTP mix 0.5 μ L、DNA聚合酶0.5 μ L及逆转录酶0.5 μ L, 用去离子水补至25 μ L。PPAR α 上游引物5'-CAA GTG CCT TTC TGT CGG-3', 下游引物5'-TGT TTC CAT CTT CGC TGT-3', 扩增产物长度374 bp, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 1 min、50 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min, 共30个循环, 于72 $^{\circ}$ C再延伸10 min。CPT-I上游引物5'-TCC AGT TGG CTT ATC GTG GTG-3', 下游引物5'-CGT TTC CAG AGT CCG ATT GAT TT-3', 扩增产物长度102 bp, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 1 min、

表 1 不同浓度瘦素对细胞内TG含量的影响

分组	TG(mmol/g蛋白)
正常肝细胞组	0.417 $\pm$ 0.045
模型肝细胞组	1.612 $\pm$ 0.104 ^a
吉非罗齐组	0.865 $\pm$ 0.143 ^b
瘦素 10^{-8} mol/L	1.063 $\pm$ 0.146
10^{-7} mol/L	0.648 $\pm$ 0.023 ^b
10^{-6} mol/L	0.553 $\pm$ 0.045 ^b

^a $P<0.05$ vs 正常组; ^b $P<0.01$ vs 模型组。

56 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min, 共30个循环, 72 $^{\circ}$ C再延伸10 min。GAPDH上游引物5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3', 下游引物5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3', 扩增产物长度697 bp。紫外灯下凝胶成像分析系统记录结果, 待测基因mRNA相对表达量以其扩增带吸光度值与相应内参照扩增带吸光度值的比值表示。

统计学处理 计量资料均以mean $\pm$ SD表示, 先进行方差齐性检验, 如具有方差齐性, 采用方差分析, 多个样本均数间的两两比较采用SNK-q检验; 方差不齐则采用秩和检验。全部资料均用SPSS13.0统计软件进行分析。

2 结果

2.1 瘦素处理后脂滴形态数量的变化 在显微镜下, 观察到模型组和瘦素 10^{-8} mol/L组细胞质中有较多的脂滴形成, 而瘦素 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L组、正常组、阳性对照组细胞质中脂滴较少, 说明瘦素 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L组瘦素对细胞内的脂肪沉积有一定的抑制作用, 而瘦素 10^{-8} mol/L组的作用不明显(图1)。

2.2 不同浓度瘦素对细胞内TG含量的影响 不同浓度的瘦素(10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L)分别加入模型组中, 处理24 h后高效液相色谱分析结果发现, 瘦素在浓度为 10^{-8} mol/L到 10^{-6} mol/L范围内, 肝细胞中TG的含量呈细胞依赖性减少(表1)。

2.3 不同浓度瘦素对肝细胞PPAR α mRNA表达的影响 为研究瘦素对细胞PPAR α 在转录水平的影响, 我们采用了半定量RT-PCR法检测了正常肝细胞、模型组肝细胞及不同浓度瘦素处理组肝细胞, 结果显示: 模型组与正常组比较, PPAR α 的mRNA表达无明显差异, 经瘦素处理后, 与模型组相比, PPAR α 的mRNA表达明显上升, 且呈浓度依赖性, 有统计学意义(图2, $P<0.01$)。瘦素(10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L)处理组与阳性对照组比较,

■创新盘点

本文通过研究人肝L-02细胞的甘油三酯含量和PPAR α 及其目的基因CPT-I mRNA表达变化的关系, 初步探讨瘦素对肝细胞脂质变性的防治作用。

■应用要点

人肝L-02细胞的甘油三酯含量减少与PPAR α 及其目的基因CPT-I mRNA表达变化有关,为探讨瘦素影响肝细胞甘油三酯代谢,改善肝细胞脂肪变性提供了新的依据。

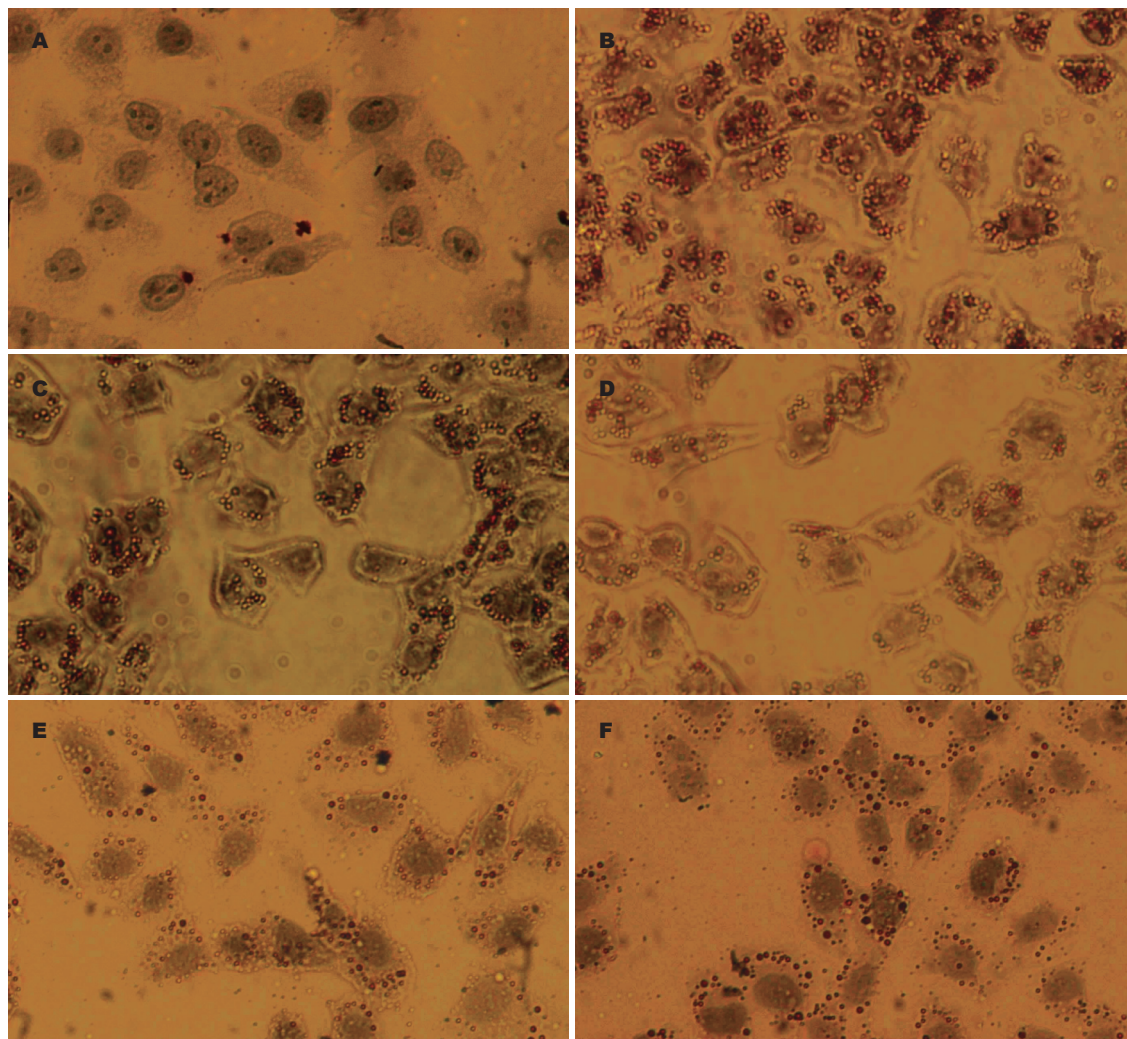


图1 不同浓度瘦素对肝细胞脂肪沉积的影响(油红O染色 $\times 400$)。A: 正常组; B: 模型组; C: 瘦素 10^{-8} mol/L处理组; D: 瘦素 10^{-7} mol/L处理组; E: 瘦素 10^{-6} mol/L处理组; F: 阳性对照组。

PPAR α 的mRNA表达上升更为明显, 差别有统计学意义($P < 0.01$); 但瘦素 10^{-8} mol/L处理组与阳性对照组之间无显著性差异。

2.4 不同浓度瘦素对肝细胞CPT-I mRNA表达的影响 为进一步研究瘦素降低细胞内TG与CPT-I mRNA水平上表达的关系, 我们采用了半定量RT-PCR法检测了人肝L-02细胞的CPT-I的mRNA水平。结果显示, 模型组与正常组比较, CPT-I mRNA表达无明显改变, 经瘦素处理后, 较模型组相比, CPT-I mRNA表达明显上升, 有统计学意义(图3, $P < 0.01$)。

3 讨论

瘦素是人类肥胖基因(obese gene, ob gene)编码的一个由167个氨基酸组成的蛋白质, 具有广泛的生物学效应。瘦素作为一种脂源性“脂肪调节激素”, 是调节能量平衡的重要因子, 研究发现瘦素的缺乏及瘦素受体基因敲除可导致高胰

岛素血症、脂肪肝的形成^[5]; Shimomura *et al*^[6]通过先天性脂肪营养不良(CGL)大鼠模型观察到了瘦素的缺乏可引起胰岛素抵抗, 从而造成高胰岛素血症、高血糖及肥胖, 促进脂肪肝的发生; 给CGL大鼠连续滴注重组瘦素, 可以改善胰岛素抵抗, 逆转肝脏脂肪沉积。肝细胞有大量瘦素受体表达, 瘦素的作用不仅限于调节体内能量代谢和脂肪沉积, 还参与了多种肝病的发生发展。

本研究用重组人瘦素作为处理因素, 处理细胞后, 油红O染色结果显示: 正常组细胞形态正常, 无明显脂滴形成; 模型组细胞质内可见大量红色的小泡性脂滴; 瘦素(10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L)处理组及阳性对照组细胞质内只有少量红色的小泡性脂滴; 高效液相色谱分析结果发现: 正常组与模型组比较, 细胞内TG含量由 0.417 ± 0.045 mmol/g蛋白上升至 1.612 ± 0.104 mmol/g蛋白, 明显增高, 差别有统计学意义($P < 0.01$); 瘦素(10^{-8} 、

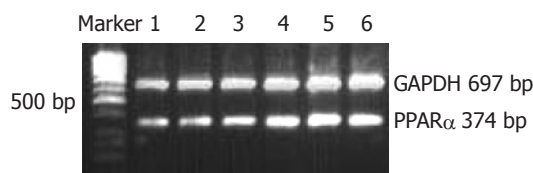


图 2 不同浓度瘦素对肝细胞PPAR α mRNA表达的影响. 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 瘦素 10^{-8} mol/L组; 4: 瘦素 10^{-7} mol/L组; 5: 瘦素 10^{-6} mol/L组; 6: 阳性对照组.

10^{-7} 、 10^{-6} mol/L)处理组及阳性对照组细胞内TG含量分别为 1.063 ± 0.146 mmol/g蛋白, 0.648 ± 0.023 mmol/g蛋白和 0.553 ± 0.045 mmol/g蛋白, 与模型组比较均明显降低, 差别有统计学意义($P < 0.01$), 说明细胞内TG含量随瘦素剂量的增高而降低. 瘦素(10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L)处理组与瘦素(10^{-8} mol/L)处理组及阳性对照组比较, 前两者细胞内TG含量下降较后者更为明显, 差别有统计学意义($P < 0.01$); 说明增加瘦素的剂量可增强降细胞内TG的效果, 当其剂量达到一定时, 其降TG的效果可高于阳性对照组, 但瘦素处理组 10^{-7} mol/L与 10^{-6} mol/L之间无显著性差异. 说明外源性瘦素可直接作用于肝细胞, 能降低肝细胞内TG含量, 减轻肝细胞脂肪变性, 其作用呈剂量依赖性.

PPAR α 由468个氨基酸残基组成, 位于鼠的15号染色体, 人的22号染色体^[7]. 他高表达于具有丰富线粒体和 β 氧化活性的组织如肝、肾皮质、肠黏膜和心脏, 而在一些其他组织也发现了PPAR α 的低水平表达. 近年研究发现PPAR α 可通过调节编码肝脂肪酸结合蛋白、载脂蛋白A1等基因的转录、活化, 影响脂肪酸的摄取、结合及脂质转运^[8], PPAR α 还可通过与活化蛋白-1(activator protein-1, AP-1), 核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)相互作用, 抑制炎症因子的表达, 阻止泡沫细胞的形成^[9], 当PPAR α 表达受抑会影响肝细胞线粒体和过氧化物酶体的氧化、减少脂肪组织消耗, 引起肝细胞脂肪变性、坏死和炎性细胞浸润^[10], 越来越多的证据表明PPAR α 具有调节脂肪代谢和调节炎症、免疫以及细胞分化等作用, 从而参与脂肪性肝病的发病机制, 越来越多的证据表明PPAR α 是代谢综合征的一个重要调节因子.

PPAR α 主要在肝脏表达, 被配体激活后, 可引起乙酰辅酶A合酶(acetyl CoA synthetase, ACS)、肉碱转移酶I(CPT-I)、脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)的转录增强^[11], 其中CPT-I是长链脂肪酸进入线粒体进行 β 氧化的第

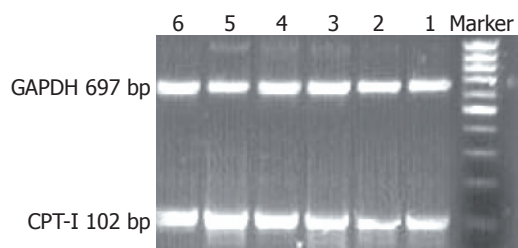


图 3 不同浓度瘦素对肝细胞CPT-I mRNA表达的影响. 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 瘦素 10^{-8} mol/L组; 4: 瘦素 10^{-7} mol/L组; 5: 瘦素 10^{-6} mol/L组; 6: 阳性对照组.

1个限速酶, 表达水平与体脂含量相关, 表达水平升高有助于增加脂肪酸分解, 降低体脂肪含量^[12], 具有对抗肝脂肪变、延缓脂肪肝形成的作用; 本实验中我们采用了半定量RT-PCR法检测了人肝L-02细胞的PPAR α 及目标基因CPT-I的mRNA表达, 结果显示肝细胞在高脂环境造模过程中, PPAR α 及目标基因CPT-I的mRNA呈弱表达, 当予以瘦素干预后, 较模型组相比, RT-PCR显示PPAR α 及目标基因CPT-I的mRNA表达增强, 有统计学意义($P < 0.01$), 且与瘦素呈剂量依赖性关系. CPT-I基因是在转录水平上受到调控, PCR扩增肝脏组织CPT-I基因的5'-端证明了这一片段具有转录活性, 而且该区域存在有PPAR α 的反应元件, 他的表达受脂肪酸和过氧化物酶体增殖剂的调节^[13]. CPT-I是脂酸 α 氧化的限速酶, 其表达增加, 可增强脂肪酸的氧化代谢, 可见瘦素能促进PPAR α 及目标基因CPT-I的mRNA的表达, 起对抗肝脂肪变、延缓脂肪肝形成的作用. 本实验通过高效液相色谱分析也显示瘦素处理后脂肪变肝细胞内TG量明显减少. 本课题组其他成员观察了瘦素能上调肝细胞内微粒体TG转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)mRNA的表达, MTP对VLDL自肝细胞中组装和分泌是必须的, 能加速TG排泄及极低密度脂蛋白的合成. 因此, 瘦素可能是通过多个途径影响肝细胞TG代谢, 减轻肝细胞脂肪变性.

4 参考文献

- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387-1395
- Chitturi S, Farrell GC, George J. Non-alcoholic steatohepatitis in the Asia-Pacific region: future shock? *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 368-374
- Mingrone G, Rosa G, Greco AV, Manco M, Vega N, Hesselink MK, Castagneto M, Schrauwen P, Vidal H. Decreased uncoupling protein expression and

■名词解释

代谢综合征: 葡萄糖调节受损或糖尿病, 和(或)胰岛素抵抗, 并伴有另外两项或两项以上的成分, 如高血压、高甘油三酯血症和(或)低高密度脂蛋白胆固醇血症、中心性肥胖、微量蛋白尿.

■同行评价

本文的科学性、可读性均能较好的反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平,具有一定的学术价值。

- intramyocytic triglyceride depletion in formerly obese subjects. *Obes Res* 2003; 11: 632-640
- 4 董莉娜, 苏耀东, 沈玉桓, 朱立岳. 反相高效液相色谱法测定人血清中甘油三酯含量. *同济大学学报(医学版)* 2004; 25: 104-107
- 5 Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 89-104
- 6 Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 1999; 401: 73-76
- 7 Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-688
- 8 Mano H, Kimura C, Fujisawa Y, Kameda T, Watanabe-Mano M, Kaneko H, Kaneda T, Hakeda Y, Kumegawa M. Cloning and function of rabbit peroxisome proliferator-activated receptor delta/beta in mature osteoclasts. *J Biol Chem* 2000; 275: 8126-8132
- 9 Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219
- 10 Neve BP, Fruchart JC, Staels B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1245-1250
- 11 Rocchi S, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, the ultimate liaison between fat and transcription. *Br J Nutr* 2000; 84 Suppl 2: S223-S227
- 12 张芳林. 肉碱棕榈酰转移酶-I 的研究进展. *国外医学·内分泌学分册* 2002; 22: 166-170
- 13 Mascaró C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 1998; 273: 8560-8563

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^a $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第 3 套为^c $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。(5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。(常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)

长效奥曲肽对大鼠肝纤维化门静脉高压形成的影响

杨文燕, 吴建新, 戴强, 江佛湖

杨文燕, 戴强, 江佛湖, 上海交通大学医学院附属第三人民医院消化内科 上海市 201900

吴建新, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科 上海市 200092

杨文燕, 讲师, 主要从事消化系统疾病的研究。

通讯作者: 吴建新, 200092, 上海市, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科。wjxgp@sh163.net

收稿日期: 2008-07-02 修回日期: 2008-08-17

接受日期: 2008-08-26 在线出版日期: 2008-09-08

Effect of long-acting octreotide on portal hypertension in rats with liver fibrosis

Wen-Yan Yang, Jian-Xin Wu, Qiang Dai, Fu-Hu Jiang

Wen-Yan Yang, Qiang Dai, Fu-Hu Jiang, Department of Gastroenterology, the Third People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

Jian-Xin Wu, Department of Gastroenterology, XinHua Hospital Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Correspondence to: Jian-Xin Wu, Department of Gastroenterology, XinHua Hospital Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China. wjxgp@sh163.net

Received: 2008-07-02 Revised: 2008-08-17

Accepted: 2008-08-26 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To observe the effect of long-acting release octreotide (Sandostatin LAR) on the genesis of portal hypertension in rats with liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄).

METHODS: Forty SD rats were assigned randomly into 3 groups: normal control group ($n = 8$), fibrosis with portal hypertension group ($n = 16$) and Sandostatin LAR group ($n = 16$). Except those in the normal control group, the rats in the remaining two groups were subcutaneously injected with 400 mL/L CCl₄ (3 mL/kg) for induction of fibrosis with portal hypertension. Sandostatin LAR (0.8 mg/kg) was used intramuscularly once every 4 weeks. After 8 weeks, the pressures of portal vein were measured before pathological evaluation including macroscopic features of the liver, and plasma glucagon as well as endothelin was determined by radioimmunoassay.

RESULTS: The portal pressure, plasma glucagon and endothelin levels were significantly lower in the Sandostatin LAR group than those in the fibrosis with portal hypertension group ($t = 2.5, P < 0.05$; $t = 2.088, P < 0.05$; $t = 2.102, P < 0.05$), but still higher than those in the normal control group ($t = 5.152, P < 0.01$; $t = 2.896, P < 0.01$; $t = 2.770, P < 0.05$). In the normal control group, liver morphology and histology were had no abnormal changes; in the fibrosis with portal hypertension group and Sandostatin LAR group, fibrotic changes were observed, and moreover, the severity was higher in the former group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Long-acting octreotide can remarkably decrease the pressures of portal vein, which may be attributed to reduced liver fibrosis and decreased plasma glucagon and endothelin levels.

Key Words: Long-acting octreotide; Portal pressure; Glucagon; Endothelin

Yang WY, Wu JX, Dai Q, Jiang FH. Effect of long-acting octreotide on portal hypertension in rats with liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2815-2819

摘要

目的: 探讨长效奥曲肽对四氯化碳(CCl₄)诱发大鼠肝纤维化门静脉高压的影响和机制。

方法: SD大鼠40只, 随机分为正常对照组($n = 8$)、肝纤维化门脉高压组($n = 16$)和长效奥曲肽组($n = 16$)。以400 mL/L CCl₄ sc(3 mL/kg)建立大鼠肝纤维化门脉高压症模型, 长效奥曲肽组同时给以长效奥曲肽(0.8 mg/kg), 每4 wk肌肉注射1次。8 wk后检测门静脉压力、肝脏组织形态学改变、血浆胰高血糖素和内皮素等。

结果: 长效奥曲肽组门静脉压、胰高血糖素和内皮素较肝纤维化门脉高压组显著降低($t = 2.5, P < 0.05$; $t = 2.088, P < 0.05$; $t = 2.102, P < 0.05$), 但仍高于正常对照组($t = 5.152, P < 0.01$; $t = 2.896, P < 0.01$; $t = 2.770, P < 0.05$)。

■背景资料

长效奥曲肽在目前主要用于某些恶性肿瘤的治疗。但是, 20多年来生长抑素及其类似物有效地用于抢救门脉高压症并发食管胃底静脉曲张破裂出血的事实, 启迪本课题组去探讨他是否具有降低或阻止门脉压力增高、预防并发再次出血的作用。

■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

■研发前沿

生长抑素及其类似物(奥曲肽)半衰期短,只能短期应用于急诊抢救,不作为预防用药。新近推出的以缓释技术生产的长效奥曲肽,弥补了药效短促缺点,但这一制剂目前临床上仅用于肿瘤,尚未有防治肝硬化(肝纤维化)门脉高压症并发食管胃底静脉曲张破裂出血方面的研究。

正常对照组大鼠肝脏大体形态和组织学无异常改变;肝纤维化门脉高压组及长效奥曲肽组大鼠肝脏组织形态学表现为肝纤维化改变,但后者的病理损害指标显著轻于前者($P<0.05$)。

结论: 长效奥曲肽组大鼠门静脉压力显著低于肝纤维化门脉高压组,其机制可能与肝脏组织损害减轻、血浆胰高血糖素和内皮素降低等有关。

关键词: 长效奥曲肽; 门静脉压; 胰高血糖素; 内皮素

杨文燕, 吴建新, 戴强, 江佛湖. 长效奥曲肽对大鼠肝纤维化门静脉高压形成的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2815-2819

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2815.asp>

0 引言

肝硬化门脉高压症并发食管胃底静脉曲张破裂(esophageal varicis bleeding, EVB)和/或门脉高压性胃病(portal hypertension gastropathy, PHG)可以引起致命性上消化道大出血。能有效防治这些并发症的药物及其效果有限。以普萘洛尔为代表的 β -受体阻滞剂药物疗效肯定^[1],但至少30%的门脉高压症患者服药后仍然出现门静脉压力增高,并发再出血。生长抑素及其类似物(奥曲肽)控制急性出血有效^[2]。然而,这类药物半衰期短,只能短期应用于急诊抢救,不作为预防用药。新近推出的以缓释技术生产的长效奥曲肽,弥补了药效短促缺点,但这一制剂目前临床上仅用于肿瘤,尚未有防治肝硬化(肝纤维化)门脉高压症并发食管胃底静脉曲张破裂出血方面的研究。为此,本研究应用长效奥曲肽干预大鼠肝纤维化门脉高压形成,观察这一药物对肝纤维化病理组织学损伤、门静脉血液动力学以及血浆相关激素的影响,评价其降低门脉压力的效果和作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠40只,体质量 162 ± 10 g,购于中国人民解放军第二军医大学动物实验中心(SPF级动物实验室)。上述大鼠的饲养以及整个动物实验在中国人民解放军第二军医大学动物实验中心进行。长效奥曲肽(商品名善龙,诺华制药),20 mg/支,4℃冰箱内保存,注射前24 h室温放置,给药前用生理盐水配制成0.5 g/L;四氯化碳(CCl_4 ,上海化学试剂厂,化学纯),用橄

油配制成浓度为400 mL/L;胰高血糖素放免试剂药盒(北京北方生物技术研究所);血管内皮素放免试剂药盒(中国人民解放军总医院科技开发中心)等。

1.2 方法 SD大鼠称质量并标记后,根据SAS软件随机分组数据分为正常对照($n=8$)、肝纤维化门脉高压症($n=16$)和长效奥曲肽($n=16$)3组。肝纤维化门脉高压组每周2次 sc 400 mL/L CCl_4 3 mL/kg,首剂sc 5 mL/kg;每4 wk肌肉注射生理盐水1次;长效奥曲肽组每周2次 sc 400 mL/L CCl_4 3 mL/kg(首剂5 mL/kg),同时每4 wk给予长效奥曲肽肌肉注射1次(0.8 mg/kg);正常对照组仅给以橄榄油和生理盐水,注射方法及剂量与其他2组相同。3组大鼠均于8 wk后经腹腔注射30 g/L戊巴比妥钠(2 mL/kg)麻醉后开腹,暴露门静脉主干,测定门静脉压力(用L型毛细玻璃测压管);腹主动脉采集血用放免法检测胰高血糖素和内皮素;同时采集肝脏组织标本,以40 g/L甲醛固定、脱水、常规石蜡包埋,连续切片行HE染色和Masson三色染色并参照有关标准进行纤维化程度评定^[3]。

统计学处理 各组测定值计量数据用mean $\pm$ SD表示,组间比较采用 t 检验;计数资料组间比较采用卡方检验。检验水准 $\alpha=0.05$;当 $P<0.05$ 时,组间差异具有统计学显著性意义。

2 结果

2.1 门静脉压力 肝纤维化门脉高压组与长效奥曲肽组大鼠门静脉压显著高于正常对照组(20.9 ± 3.6 cmH₂O 18.2 ± 1.9 cmH₂O vs 14.3 ± 0.9 cmH₂O, $t=5.054, 5.152, P<0.01$),长效奥曲肽组大鼠门静脉压力低于肝纤维化门脉高压组($t=2.5, P<0.05$)。

2.2 血浆胰高血糖素、内皮素 肝纤维化门脉高压组大鼠血浆胰高血糖素、内皮素水平显著高于正常对照组($P<0.01$);长效奥曲肽大鼠血浆胰高血糖素、内皮素水平也较正常对照组高($P<0.01, P<0.05$),但显著低于肝纤维化门脉高压组($P<0.05$;表1)。

2.3 肝脏病理组织学 正常对照组大鼠肝脏组织切片HE和Masson染色见肝脏小叶结构正常,未见脂肪变性、坏死和纤维组织增生(图1A,图2A)。肝纤维化门脉高压组大鼠肝脏质地变硬,边缘变钝,表面呈明显结节状。肝脏切片HE和Masson染色可见肝细胞脂肪变性、坏死,有纤维组织增生,肝脏正常结构被破坏,假小叶形成

■**相关报道**
门脉高动力循环病理生理的另一特征是血管收缩因子的异常, 动物实验及临床研究均证实了外源性内皮素可以引起门静脉高压。

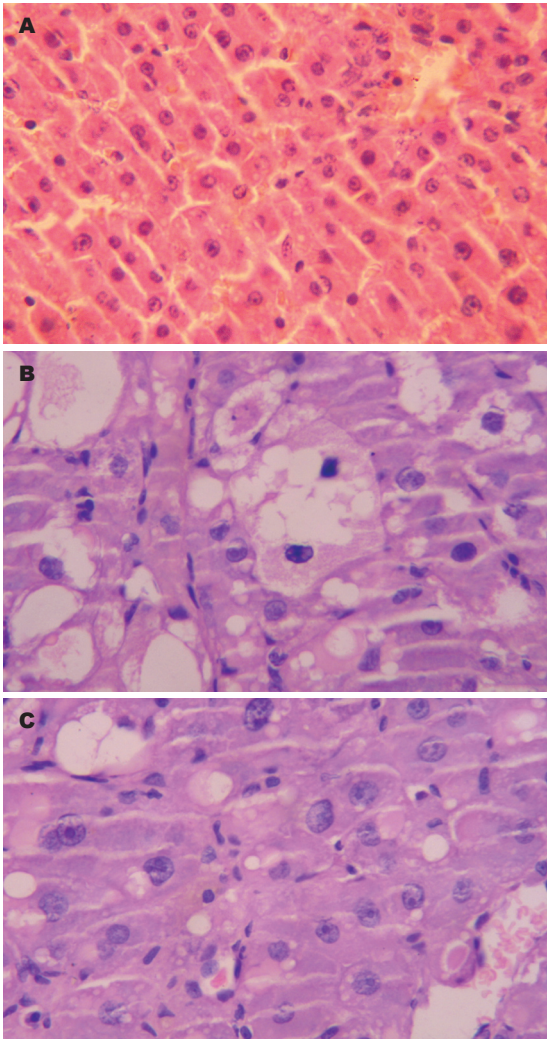


图 1 肝脏组织病理(HE染色×400). A: 正常对照组; B: 肝纤维化门脉高压组; C: 长效奥曲肽组.

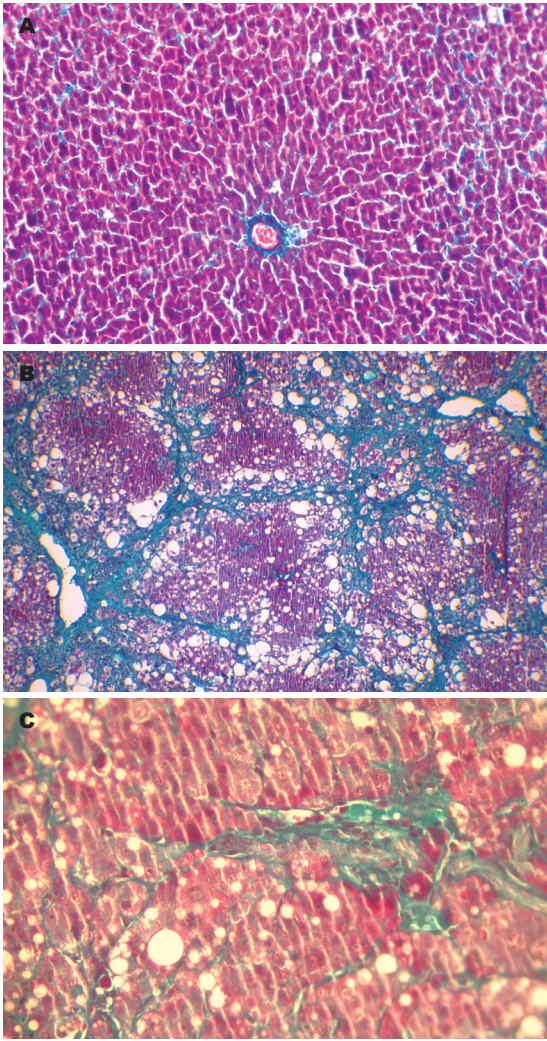


图 2 肝脏组织病理(Masson染色×200). A: 正常对照组; B: 肝纤维化门脉高压组; C: 长效奥曲肽组.

表 1 三组大鼠血浆胰高血糖素与内皮素测定结果及比较 (mean ± SD)

分组	n	胰高血糖素(μg/L)	血管内皮素(ng/L)
正常对照	8	375.36 ± 60.52	72.91 ± 15.47
肝纤维化	16	513.67 ± 70.81	125.45 ± 25.20
门脉高压			
长效奥曲肽	15	460.77 ± 65.24 ^{ab}	104.60 ± 28.21 ^{ce}

$t = 2.088$, ^a $P < 0.05$ vs 肝纤维化门脉高压组; $t = 2.896$, ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; $t = 2.77$, ^c $P < 0.05$ vs 正常对照组; $t = 2.102$, ^e $P < 0.05$ vs 肝纤维化门脉高压组.

(图1B, 图2B). 长效奥曲肽组大鼠肝脏质地变硬, 边缘变钝, 表面呈明显结节状, 肝脏组织切片HE和Masson染色可见肝脏细胞脂肪变性、坏死, 纤维组织增生. 但与肝纤维化门脉高压组相比较, 肝脏细胞脂肪变性、坏死数量减少, 纤维组织增生减轻, 肝脏组织正常结构破

坏少^[4]($P < 0.05$, 图1C, 图2C).

3 讨论

长效奥曲肽在目前主要用于某些恶性肿瘤的治疗. 但是, 20多年来生长抑素及其类似物有效地用于抢救门脉高压症并发食管胃底静脉曲张破裂出血的事实, 启迪本课题组去探讨他能否具有降低或阻止门脉压力增高、预防并发再次出血的作用. 本研究的结果显示, CCl₄诱发的大鼠肝纤维化模型, 经长效奥曲肽干预后, 门静脉压力显著低于肝纤维化组. 不仅如此, 肝脏纤维化损害的程度也明显减轻; 与门静脉高压形成相关的激素或细胞因子如胰高糖素和内皮素也显著低于肝纤维化组. 长效奥曲肽显示了缓慢而持久地减少门静脉系统血流、降低门静脉压力的特征, 而且还表现为一定程度上抑制了肝组织损害和门静脉高动力循环的形成. 这些结果强烈提示, 长效奥曲肽有可能是用于预防门脉

■应用要点

长效奥曲肽显示了缓慢而持久地减少门静脉系统血流、降低门静脉压力的特征,而且还表现为一定程度上抑制了肝组织损害和门静脉高动力循环的形成。

高压症并发食管胃底静脉曲张破裂出血的又一选择。

生长抑素及其类似物具有抑制多种激素的释放,抑制激素和多种细胞因子对靶细胞的作用,同时具有广泛的抑制细胞增殖活性的作用^[5],对肝脏慢性炎症、肝纤维化以及门脉高压相关的多种细胞因子、激素具有调控或抑制作用^[6-7]。慢性肝病及肝纤维化其细胞外基质代谢的异常,关键在于肝星状细胞异常活化和异常分泌,致使大量胶原沉积,肝脏发生重构异常,形成再生结节和假小叶,从而使肝内血管阻力增加。有些学者研究了生长抑素及其类似物对慢性肝脏损害、抑制肝纤维形成的影响后发现,生长抑素及其类似物给药后,不仅有肝星状细胞活化的抑制,而且还出现了与肝星状细胞活化相关的多种细胞因子调控异常的改善^[8]。这些细胞因子包括转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、血小板衍生生长因子(PDGF)以及结缔组织生长因子(CTGF)等^[9]。本研究虽然没有进一步作上述相关指标的检测,但长效奥曲肽组大鼠肝脏纤维化病理组织学的明显改善,足以证明该药在抑制门脉高压症形成的机制中,可以减轻肝纤维化组织损害,进而降低门脉系统血管阻力。

体内许多血管活性因子参与并且维持了门静脉高动力循环^[10]。根据这些血管活性因子的功能,大致可以分为扩血管因子和缩血管因子两类。扩血管因子以胰高血糖素、一氧化氮、前列腺素 E_2 等为代表;缩血管物质有内皮素、神经肽Y等。本研究检测的两个代表性因子胰高血糖素和内皮素,结果都显示了肝纤维化门脉高压组这两个血管活性因子显著增高,而应用长效奥曲肽后,上述两种血管活性因子的水平显著低于前者。早在20年前,生长抑素及其类似物就已经被证实为可以显著抑制血中胰高血糖素水平,并用于胰高糖素瘤的治疗。事实上,胰高糖素在体内除了具有升高血糖的作用外,又是一个作用很强的内脏血管扩张剂,与其他相关生物因子一起,促成并维持了门脉高压症血液学的高动力循环特征。所以,有人提出,胰高糖素血症直接的后果就是门脉系统等血管的扩张,高动力循环形成。当然,肝硬化胰高糖素血症的形成,还与慢性肝功能损害,肝脏降解胰高糖素发生障碍等多种因素有关。所以,血浆胰高糖素水平升高的程度与肝功能损害的程度成正相关。这与本研究的结果完全一致。另外,胰高糖素增高也与体内许多激素分子等有关,例如

胃泌素、胆囊收缩素(CCK)、乙酰胆碱、胰岛素以及胰泌素等。这些激素或细胞因子恰恰都受生长抑素及其类似物靶向负调节的影响^[11],本研究中长效奥曲肽组出现的血浆胰高血糖素和门脉压低于肝纤维化组的事实就是例证。

门脉高动力循环病理生理的另一特征是血管收缩因子的异常。动物实验及临床研究均证实了外源性内皮素可以引起门静脉高压^[12]。本研究也显示肝纤维化大鼠血浆内皮素含量明显升高。在参与门脉压力调节的多种血管活性因子中,内皮素是目前已知最强的内源性缩血管活性肽。肝纤维化时,活化的肝星状细胞大量分泌内皮素;而内皮素又能刺激肝星状细胞^[13]。肝星状细胞具有收缩性,使肝内血管阻力增加。内皮素亦可直接刺激肾小球旁细胞合成和释放肾素、血管紧张素,使血中醛固酮滞留,从而使血管收缩、钠回吸收增加^[14],这正是高动力循环的重要物质基础。生长抑素及其类似物能抑制肝星状细胞的活化,抑制其分泌内皮素,这也可能是长效奥曲肽抑制门脉高压形成重要机制^[15],而缓释的药理作用特征使得这种抑制机制得以持续而充分地发挥。

4 参考文献

- 1 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
- 2 杨利剑. 不同生长抑素制剂治疗食管静脉曲张出血31例. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 73
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *肝脏* 2000; 5: 257-263
- 4 杨文燕, 吴建新, 戴强, 江佛湖, 赵力民, 张燕捷, 朱黎明, 王碧君. 长效奥曲肽影响大鼠肝纤维化形成的研究. *中国医药导报* 2007; 4: 17-19
- 5 Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20: 157-198
- 6 Fort J, Oberti F, Pilette C, Veal N, Gallois Y, Douay O, Rousselet MC, Rosenbaum J, Calès P. Antifibrotic and hemodynamic effects of the early and chronic administration of octreotide in two models of liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1998; 28: 1525-1531
- 7 Sharma K, Patel YC, Srikant CB. C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 82-90
- 8 潘勤, 李定国, 汪余勤, 徐芹芳. 生长抑素对肝星状细胞的影响机制. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1250-1252
- 9 Chowdhury Y, Cahalon L, Lahav M, Schor H, Tal R, Bar-Meir S, Levite M. Somatostatin through its specific receptor inhibits spontaneous and TNF- α - and bacteria-induced IL-8 and IL-1 β secretion from intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2000; 165: 2955-2961
- 10 赵海峰, 闻勤生, 黄裕新, 张蓉. 肝硬化患者血浆内皮

- 素和胰高血糖素水平的变化及其临床意义. 临床内科杂志 2003; 20: 309-311
- 11 萧树东. 江绍基胃肠病学. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 64
- 12 姚冬梅, 姚希贤, 杨川杰, 冯志杰, 房红梅, 高军萍. 内皮素-1对肝硬化大鼠不同病期离体肝脏及血管环调节作用的研究. 中华医学杂志 2002; 82: 1565
- 13 Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996; 110: 534-548
- 14 张忠民. 肝硬化患者血浆内皮素及血管紧张素Ⅱ测定的临床意义. 内科急危重症杂志 2003; 9: 81, 119
- 15 Reynaert H, Vaeyens F, Qin H, Hellemans K, Chatterjee N, Winand D, Quartier E, Schuit F, Urbain D, Kumar U, Patel YC, Geerts A. Somatostatin suppresses endothelin-1-induced rat hepatic stellate cell contraction via somatostatin receptor subtype 1. *Gastroenterology* 2001; 121: 915-930

■同行评价

本研究有一定的创新性, 层次分明, 思路清晰, 讨论客观, 具有较好的学术价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价.

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术.

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务. (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)

IFN γ 基因修饰的树突状细胞在肝癌免疫治疗中的应用

薛刚, 程莹, 曹永宽, 王培红, 张国虎, 龚加庆, 黄文林, 田伏洲

■背景资料

新近发现, IFN γ 具有促进DC的分化和成熟以及上调DC分泌IL-12的能力。而DC摄取、加工和递呈抗原给淋巴细胞从而引起和维持原发免疫反应的功能使其成为肿瘤免疫治疗(肿瘤疫苗)的最佳选择, 体外分离和繁殖DC技术的发展又令DC作为肿瘤疫苗的制备成为可能。

薛刚, 曹永宽, 王培红, 张国虎, 龚加庆, 田伏洲, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心 四川省成都市 610083

程莹, 中国人民解放军成都军区总医院内分泌科 四川省成都市 610083

黄文林, 中山大学肿瘤防治中心 肿瘤学国家重点实验室 广东省广州市 510060

薛刚, 博士, 主要从事普通外科基础与临床研究。

国家基础研究计划(973)资助项目, No. 2004CB518801

广东省科委重大攻关资助项目, No. 2003A10902

作者贡献分布: 此课题设计由薛刚完成; 研究过程由薛刚、曹永宽、王培红、张国虎及龚加庆操作完成; 数据分析由薛刚与程莹完成; 本论文写作由薛刚与程莹完成; 田伏洲指导。

通讯作者: 黄文林, 510060, 广东省广州市, 中山大学肿瘤防治中心、肿瘤学国家重点实验室。wl-huang@hotmail.com

收稿日期: 2008-07-03 修回日期: 2008-08-03

接受日期: 2008-08-04 在线出版日期: 2008-09-08

Use of interferon γ gene modified dendritic cells in immunotherapy for hepatic cancer

Gang Xue, Ying Cheng, Yong-Kuan Cao, Pei-Hong Wang, Guo-Hu Zhang, Jia-Qing Gong, Wen-Lin Huang, Fu-Zhou Tian

Gang Xue, Yong-Kuan Cao, Pei-Hong Wang, Guo-Hu Zhang, Jia-Qing Gong, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Ying Cheng, Department of Endocrinology, General Hospital of Chinese PLA Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Wen-Lin Huang, State Key Laboratory of Oncology in South China; Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Supported by: the National Basic Research Program (973 Program) of China, No. 2004CB518801, and the Major Program from Science Committee of Guangdong Province, No. 2003A10902

Correspondence to: Wen-Lin Huang, State Key Laboratory of Oncology in South China; Cancer Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China. wl-huang@hotmail.com

Received: 2008-07-03 Revised: 2008-08-03

Accepted: 2008-08-04 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To construct an adenoviral vector expressing human interferon γ (IFN γ) for transfecting human monocyte-derived dendritic cells (Ad-IFN γ -DC), and then to detect the anti-hepatic cancer ability of whole cell lysates pulsed Ad-IFN γ -DC acting as adjuvant.

METHODS: The recombinant adenoviral vector carrying IFN γ gene (Ad-IFN γ) was constructed and transfected into Ad-IFN γ -DC. After transfection, the IFN γ protein expression and cytokines secretion by DC were detected and DC phenotypes were assayed with flow cytometry; the phagocytic ability of DC was assayed using FITC-dextran uptake method. Subsequently, the capability of antigen pulsed Ad-IFN γ -DC to promote T cell proliferation and differentiation was detected using ^3H -TdR incorporation and RT-PCR/ELISA method respectively. Finally, the ability of T cells to kill HepG2 cells was detected with lactate dehydrogenase release assay.

RESULTS: Ad-IFN γ did not impact the phagocytic function of DC 24 h after transfection ($F = 2.31$, $P = 0.13$). DC transfected with Ad-IFN γ expressed IFN γ protein successfully ($P < 0.01$). Antigen pulsed Ad-IFN γ -DC stimulated T cell proliferation and enhanced expression of interleukin-2 (IL-2) and T-bet from the T cells ($P < 0.01$). Finally, the abilities of tumor antigen loaded Ad-IFN γ -DC primed T cells to kill HepG2 cells were $43.64\% \pm 3.51\%$ and $48.87\% \pm 4.83\%$ as the ratio of E/T was 20 : 1 and 50 : 1, respectively, which were stronger than those in the Ad-LacZ-DC and NTDC primed T cells ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Ad-IFN γ transfection can promote DC maturation, enhance its capacities of antigen presentation and T cell stimulation, induce Th1 polarization and strengthen anti-HepG2 cell immunities.

Key Words: Interferon γ ; Dendritic cell; Hepatic cancer; Cytotoxicity

Xue G, Cheng Y, Cao YK, Wang PH, Zhang GH, Gong JQ, Huang WL, Tian FZ. Use of interferon γ gene modified dendritic cells in immunotherapy for hepatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2820-2825

摘要

目的: 研究IFN γ 修饰的树突状细胞(dendritic cell, DC)对T淋巴细胞增殖和分化的影响以及后者对肝癌HepG2细胞的杀伤作用。

■同行评议者

刘彬彬, 副研究员, 复旦大学附属中山医院、复旦大学肝癌研究所; 吕明德, 教授, 中山大学附属第一医院肝胆外科

方法: 构建携带人IFN γ 基因的重组复制缺陷型腺病毒载体(Ad-IFN γ), 用其感染人外周血单个核细胞来源的DC, 观察后者表型和吞噬功能的变化. 再用反复冻融裂解法提取的肝癌HepG2细胞抗原致敏DC, 将其与自身T淋巴细胞共同培养, 观察T淋巴细胞的增殖和分化情况以及活化T细胞对HepG2细胞的杀伤作用.

结果: Ad-IFN γ 转染后24 h, 各组DC的吞噬能力差异无统计学意义($F = 2.31$, $P = 0.13$). Ad-IFN γ 转染的DC培养上清中有IFN γ 的高表达, 其表达量显著高于另外两组($P < 0.01$). Ad-IFN γ -DC促进T细胞增殖的能力明显强于Ad-LacZ-DC和NTDC($P < 0.01$). 以HepG2细胞抗原致敏时, Ad-IFN γ -DC活化的T淋巴细胞对HepG2细胞的杀伤率在E : T = 20 : 1和E : T = 50 : 1时分别为43.64% $\pm$ 3.51%和48.87% $\pm$ 4.83%, 显著高于Ad-LacZ-DC和NTDC组($P < 0.01$).

结论: IFN γ 的修饰能促进DC成熟, 增强DC促进T淋巴细胞增殖的作用, 诱导细胞免疫, 增强T细胞的细胞毒作用, 使T细胞能有效地杀伤肿瘤细胞.

关键词: γ 干扰素; 树突状细胞; 肝癌; 细胞毒性

薛刚, 程莹, 曹永宽, 王培红, 张国虎, 龚加庆, 黄文林, 田伏洲. IFN γ 基因修饰的树突状细胞在肝癌免疫治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2820-2825

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2820.asp>

0 引言

γ -干扰素(IFN γ), 又称免疫干扰素, 具有抑制病毒复制、抑制细胞分裂和免疫调节的作用, 在机体免疫应答和抗肿瘤免疫反应中发挥着极其重要的作用. 本文旨在探讨IFN γ 基因修饰对DC表型和功能的影响, 以及后者作为佐剂对T细胞增殖分化的影响和活化T细胞对肝癌HepG2细胞的免疫杀伤作用.

1 材料和方法

1.1 材料 Ficoll-PlaqueTM Plus密度梯度离心液(Amersham Bio., Sweden), CD14标记的免疫磁珠(Miltenyi Biotec, Germany), PE-CD14(BD. Pharmingen, USA), PE-CD14、PE-CD3、FITC-CD86、FITC-CD83、FITC-HLA-DR、FITC-CD14、PE-CD80、PE-CD1a、PE-CD11c及PE-CCR7(BD. Pharmingen, USA), 重组人GM-CSF(Peprotech Inc. UK), RPMI 1640(Invitrogen,

USA), 6孔培养板中、25 cm²培养瓶(Falcon, USA), 流式细胞仪(Beckman Coulter, USA), IFN γ 、IL-12p70、IL-10液相芯片法检测试剂盒(Linco Research, Inc. USA), 乳酸脱氢酶释放法检测试剂盒(CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit, Promega, USA).

1.2 方法

1.2.1 人外周血单个核细胞来源DC的分离和培养: 抽取健康志愿者外周静脉血50 mL, 肝素抗凝, 用Ficoll-PlaqueTM Plus和CD14标记的免疫磁珠分离CD14⁺和CD14⁻的外周血单个核细胞(PBMC), 收集CD14⁺细胞, 取少量用PE-CD14标记后流式细胞仪检测纯度. 其余细胞用含5%人AB血清、100 U/L青霉素、100 mg/L链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺、30 μ g/L重组人IL-4和100 μ g/L重组人GM-CSF的RPMI 1640重悬成 2×10^9 细胞/L, 于6孔培养板中、37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂培养箱中培养, 培养第3天半量补充IL-4和GM-CSF.

1.2.2 T淋巴细胞的分离和培养: 制备尼龙毛柱(nylon-wool column), 将前一步中分离的CD14⁺的PBMC用尼龙毛柱分离出T淋巴细胞, 取少量细胞用PE-CD3标记, 流式细胞仪检测T细胞的纯度. 其余细胞用含20 kU/L重组人IL-2(IL-2, Peprotech Inc. UK)和5%人AB血清的RPMI 1640重悬, 25 cm²培养瓶中维持培养.

1.2.3 Ad-IFN γ 转染对DC吞噬功能和表型的影响: 体外连接法构建Ad-IFN γ 并鉴定^[1]. 收集培养第6天的DC, 无血清、无抗生素RPMI 1640重悬, 按MOI(感染复数) = 50、离心法^[2]转染Ad-IFN γ (Ad-IFN γ -DC), 以Ad-LacZ作无关病毒对照组(Ad-LacZ-DC, 实验室保存, 携带 β -半乳糖苷酶基因), 用无血清、无抗生素RPMI 1640作非病毒转染对照组(NTDC). 转染后24 h, 收集部分细胞, 用FITC-Dextran摄取法检测DC的吞噬功能. 转染后48 h, 收集各组细胞, 分别用FITC-CD86、FITC-CD83、FITC-HLA-DR、FITC-CD14、PE-CD80、PE-CD1a、PE-CD11c和PE-CCR7等荧光抗体标记, 流式细胞仪检测DC的表型.

1.2.4 Ad-IFN γ 转染后DC分泌细胞因子的变化: Ad-IFN γ 转染后48 h, 收集细胞培养上清, 液相芯片法检测各组DC培养上清中IFN γ 、IL-12p70和IL-10的含量.

1.2.5 Ad-IFN γ -DC作为佐剂对T淋巴细胞的刺激作用: 收集转染后24 h的DC, 用含IL-4和GM-CSF的培养基重悬细胞成 5×10^8 /L, 加入HepG2

■ 相关报道

2004年, Pan *et al*报道IFN γ 作为一种自分泌因子可促进DC的成熟. 2008年, 薛刚 *et al*报道IFN γ 修饰的DC可增强T细胞对结肠癌LoVo细胞的杀伤作用.

■创新盘点

本文首先应用IFN γ 修饰的DC刺激T淋巴细胞,发现IFN γ -DC可促进T细胞增殖,并诱导T细胞向Th1分化。IFN γ 的修饰可明显增强肝癌细胞抗原负载的DC所活化的T细胞对肝癌细胞的杀伤作用。

全细胞裂解物100 mg/L^[3],继续培养24 h,加入丝裂霉素A 25 mg/L, 37℃孵育30 min。重悬DC为 1×10^8 /L,与T淋巴细胞在96孔培养板中按DC:T = 1:20混合培养,每组设3个复孔。96 h后³H-TdR(上海原子能研究所)掺入法检测T淋巴细胞的增殖程度,计算刺激指数SI = (实验组cpm-机器本底cpm)/(对照组cpm-机器本底cpm)。ELISA法检测混合细胞培养上清中IL-2的浓度;半定量RT-PCR法检测培养细胞中T-bet的表达。

1.2.6 Ad-IFN γ -DC活化的T淋巴细胞对HepG2细胞的杀伤作用:以肝癌HepG2细胞株为靶细胞,HepG2细胞裂解物(以结肠癌LoVo细胞裂解物作非特异抗原对照,以结肠癌LoVo细胞为对照杀伤细胞)致敏的Ad-IFN γ -DC活化的T淋巴细胞为效应细胞,按操作指南,以效靶比分别为20:1和50:1、乳酸脱氢酶释放法检测T淋巴细胞对HepG2细胞的杀伤效应,计算杀伤率。

统计学处理 所有数据以mean $\pm$ SD表示,应用SPSS11.5统计软件分析,各实验组之间的比较采用单因素的方差分析和多组均数间的多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 DC和T淋巴细胞的分离和培养 外周静脉血经密度梯度离心和免疫磁珠阳性选择出的CD14⁺的PBMC纯度可达92.4%。上述CD14⁺的PBMC在IL-4和GM-CSF的诱导下第3天,可见细胞形态不规则,大小不一致,部分细胞聚集成团,边缘出现毛刺状外观。培养第6天,更多的细胞出现更为明显的毛刺状外观,呈现出树突状细胞的典型光镜下改变。CD14⁺的PBMC经过尼龙毛柱分离纯化所得T淋巴细胞的纯度可达94.8%,可以满足下一步实验的需要。

2.2 Ad-IFN γ 转染后DC的吞噬功能和表型 Ad-IFN γ 转染后24 h, FITC-Dextran摄取法检测发现各组DC的吞噬能力分别为: Ad-IFN γ -DC: (80.83 $\pm$ 7.98)%、Ad-LacZ-DC: (82.57 $\pm$ 6.95)%、NTDC: (86.23 $\pm$ 4.90)%,其差异无统计学意义($F = 2.31$, $P = 0.13$)。流式细胞仪检测发现各组DC(未经抗原物质刺激)中共刺激分子CD80和CD86、主要组织相容性复合物HLA-DR以及CD11c的表达均维持在较高的水平,CD14则呈低表达。与其他两组相比,CD83、CCR7在Ad-IFN γ -DC的表达明显上调,同时其CD1a的表达则有明显的降低($P < 0.05$,图1)。

2.3 Ad-IFN γ 转染后DC对细胞因子的分泌 液相

芯片检测发现,在Ad-IFN γ 转染的DC培养上清中有IFN γ 的高表达,其表达量显著高于另外两组($P < 0.01$,图2)。此外,Ad-IFN γ -DC组培养上清中增强免疫的细胞因子IL-12p70的表达也明显高于Ad-LacZ组和NTDC组;而抑制免疫的细胞因子IL-10的表达则明显低于后两组($P < 0.01$,图2)。

2.4 Ad-IFN γ -DC作为佐剂对T细胞的刺激 ³H-TdR掺入法检测T细胞的增殖状况,结果显示,Ad-IFN γ -DC促进T细胞增殖的能力明显强于Ad-LacZ-DC和NTDC($P < 0.01$,图3)。半定量RT-PCR检测T-bet的表达,发现Ad-IFN γ -DC刺激的T细胞表达T-bet的水平明显高于Ad-LacZ-DC和NTDC刺激的T细胞($P < 0.01$,图3);ELISA法检测混合细胞培养上清中IL-2的含量也发现Ad-IFN γ -DC刺激的T细胞分泌IL-2的能力明显高于Ad-LacZ-DC和NTDC刺激的T细胞($P < 0.01$,图3)。

2.5 肿瘤抗原致敏的Ad-IFN γ -DC激活的T淋巴细胞对肝癌HepG2细胞的杀伤作用 乳酸脱氢酶(LDH)释放法检测T淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤率,结果显示,以HepG2细胞抗原致敏时,Ad-IFN γ -DC活化的T淋巴细胞对HepG2细胞的杀伤率在E:T = 20:1和E:T = 50:1时分别为(43.64 $\pm$ 3.51)%和(48.87 $\pm$ 4.83)%,显著高于Ad-LacZ-DC和NTDC组,而对LoVo细胞的杀伤率在各组之间无显著性差异($P < 0.01$,图4);以LoVo细胞抗原冲击时,Ad-IFN γ -DC活化的T淋巴细胞对HepG2细胞的杀伤率在E:T = 20:1和E:T = 50:1时分别为(5.61 $\pm$ 2.21)%和(6.23 $\pm$ 1.82)%,与Ad-LacZ-DC和NTDC组相比无显著差异($P > 0.05$,图4)。此外,HepG2细胞抗原致敏时各组的杀伤率均明显高于LoVo细胞抗原致敏时($P < 0.01$,图4)。

3 讨论

DC是体内功能最强大的专一性抗原递呈细胞,其摄取、加工和递呈抗原给淋巴细胞从而引起和维持原发免疫反应的功能使其成为肿瘤免疫治疗(肿瘤疫苗)的最佳选择^[4]。体外分离和繁殖DC技术的发展又令DC作为肿瘤免疫治疗疫苗成为可能^[5]。

一般来说,将CD14⁺的单核细胞(前体DC)在含GM-CSF和IL-4的培养基中培养5-7 d可以得到未成熟DC,后者在含细菌促炎因子或T细胞来源的刺激物如TNF α 、IL-1 β 、IFN α 、IFN γ 和PGE2等的培养基中继续培养2-3 d就能获得成熟DC。我们发现,Ad-IFN γ 基因转染后,IFN γ 蛋白

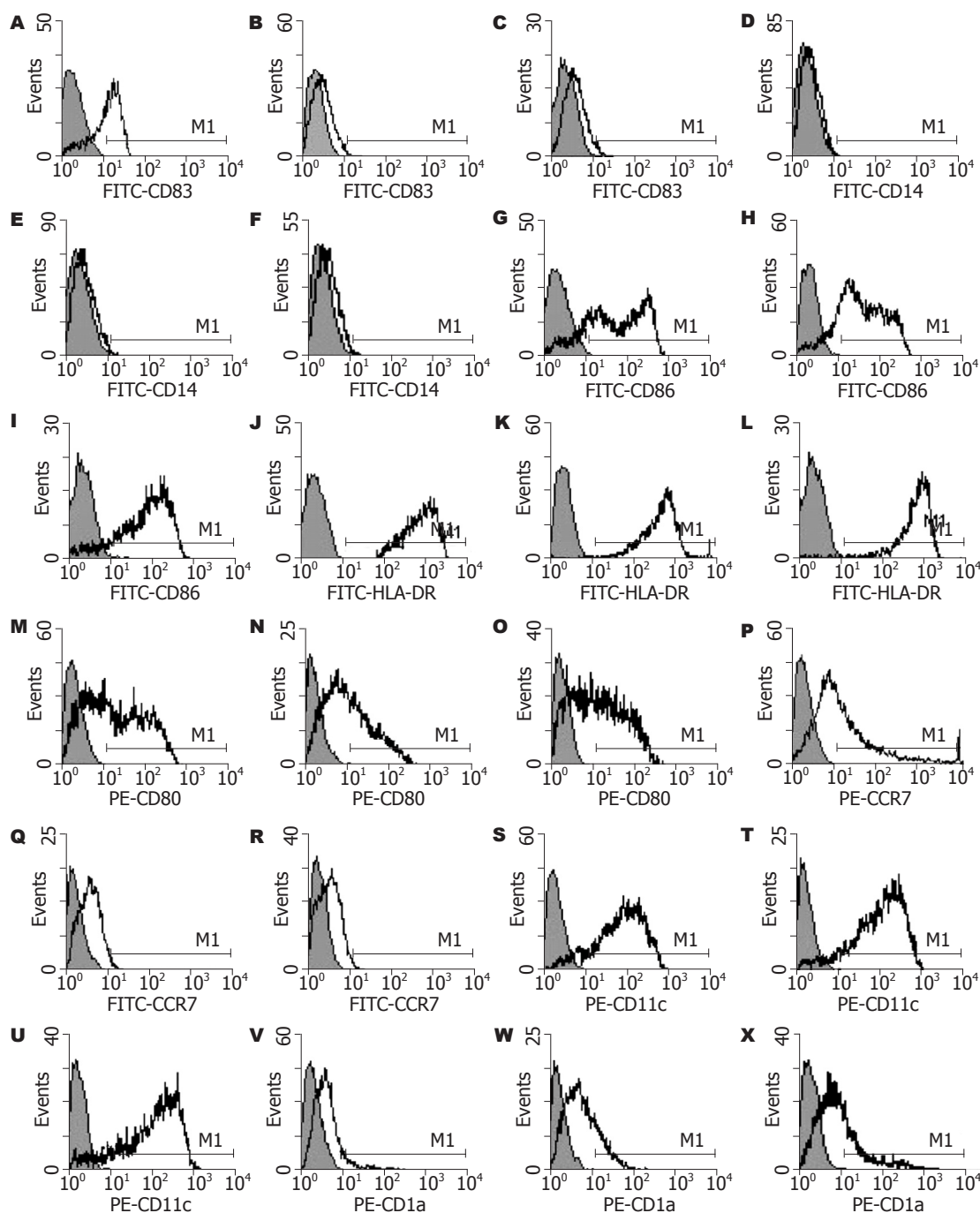


图 1 重组腺病毒转染对人PBMC来源DC表型的影响. A-C: CD83; D-F: CD14; G-I: CD86; J-L: HLA-DR; M-O: CD80; P-R: CCR7; S-U: CD11c; V-X: CD1a; A、D、G、J、M、P、S、V: Ad-IFN γ ; B、E、H、K、N、Q、T、W: Ad-LacZ; C、F、I、L、O、R、U、X: NTDC.

能在DC中得到高水平的表达,同时Ad-IFN γ -DC表面有高水平的CD80、CD86、CD11c和HLA-DR表达,成熟DC的标志物CD83和CCR7在其表面的表达也有明显的上调,提示Ad-IFN γ -DC分泌的IFN γ 蛋白能够作为一种自分泌因子在一定程度上促进DC的表型成熟,这与其他学者的研究结果-IFN γ 能介导DC的成熟一致^[6].这种Ad-IFN γ 的转染能上调DC表面共刺激分子和MHC表达和促进DC成熟的能力将有助于DC向T淋巴

细胞传递抗原信息(第一信号)和第二信号,有利于促进T细胞的增殖和活化.

此外,与NTDC相比,病毒转染后24 h,DC对FITC-Dextran的吞噬作用无明显变化,提示在转染Ad-IFN γ 后24 h内,腺病毒的转染及其所携带的基因并不明显地影响DC的吞噬功能,此结果使在病毒转染后24 h给予DC抗原冲击成为可能.在既往的研究中,我们发现肝癌HepG2细胞全细胞裂解物致敏的DC所活化的T淋巴细胞对该肿

■应用要点

本研究通过基因修饰的方式增强了DC的功能,为基于DC的肿瘤免疫治疗和生物治疗提供了新的方向,为DC抗肿瘤作用的研究和临床应用奠定了基础.

■名词解释

IFN γ : 又称免疫干扰素, 除了抑制病毒复制, 抑制细胞分裂的作用外, 还具有免疫调节作用, 可上调MHC I 和MHC II 的表达、促进Th1细胞增殖、促进抗原的递呈、促进可诱导的一氧化氮合酶(iNOS)的合成、调节白细胞-内皮细胞的相互作用等。

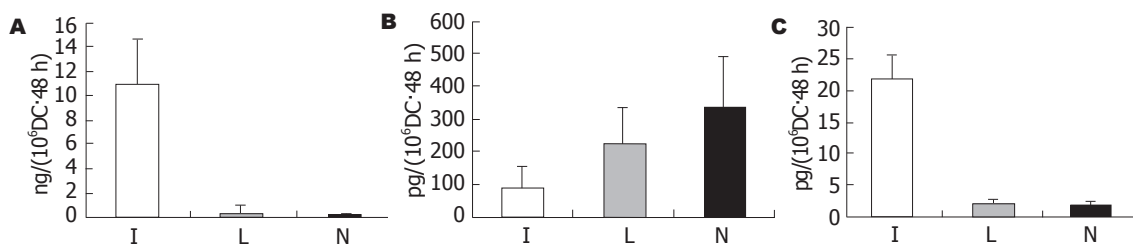


图2 Ad-IFN γ -DC培养上清中IFN γ 的表达和细胞因子的分泌. A: Ad-IFN γ -DC表达IFN γ ; B: Ad-IFN γ -DC分泌IL-10; C: Ad-IFN γ -DC分泌IL-12p70. I: Ad-IFN γ -DC; L: Ad-LacZ-DC; N: NTDC.

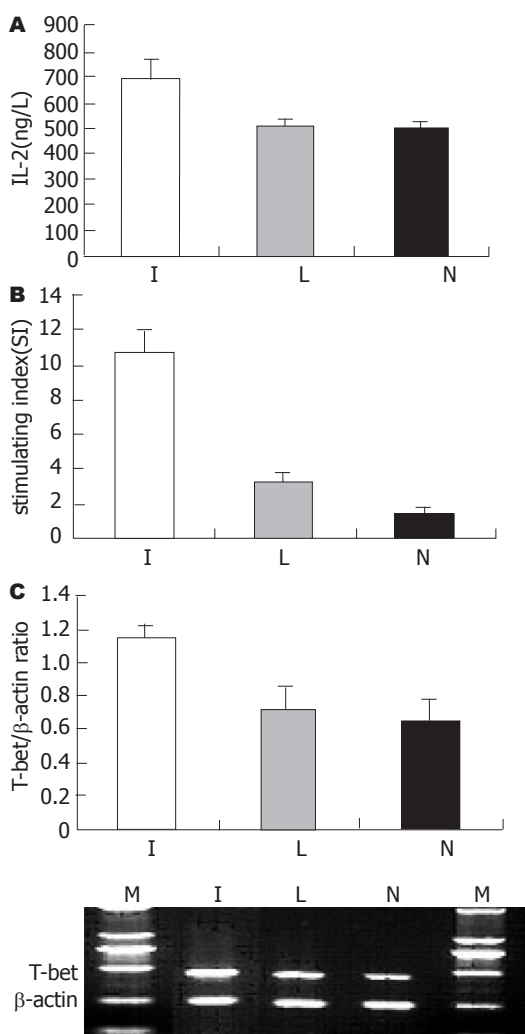


图3 HepG2细胞抗原致敏的Ad-IFN γ -DC促进自体T淋巴细胞的增殖和分化作用. A: Ad-IFN γ -DC促进T细胞分泌IL-2的作用; B: Ad-IFN γ -DC促进T细胞的增殖作用; C: Ad-IFN γ -DC促进T细胞表达T-bet的作用. I: Ad-IFN γ -DC; L: Ad-LacZ-DC; N: NTDC.

瘤细胞有明显的杀伤效应^[2]. 因此, 在本研究中, 我们再次用HepG2细胞株的全细胞裂解物来致敏被IFN γ 修饰的DC, 结果发现, Ad-IFN γ 转染能显著提高抗原冲击的DC分泌细胞因子IL-12p70, 同时也能显著减少IL-10的分泌. IL-12是一种具有促进炎症和免疫调节功能的多效细胞因子, 能增强T细胞和NK细胞的增殖和毒性, 诱导

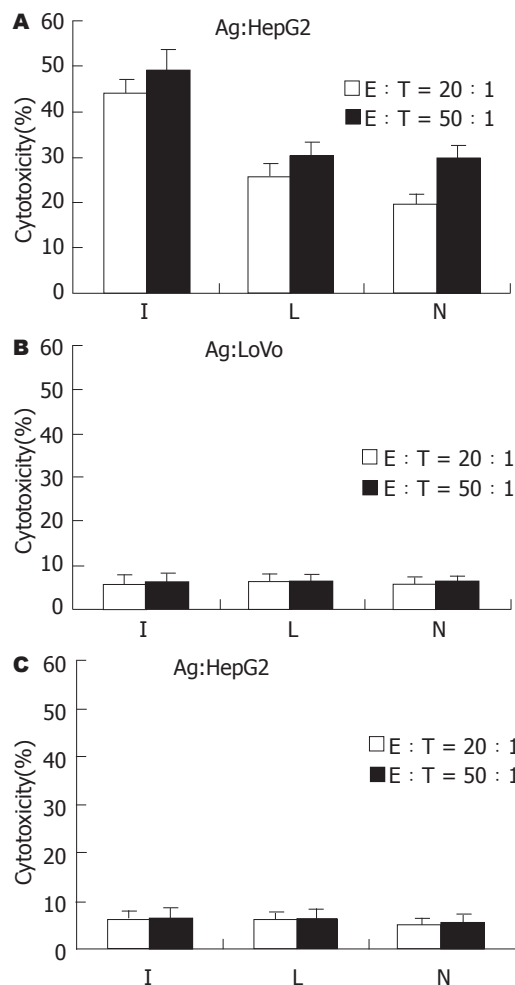


图4 肿瘤细胞裂解物致敏的Ad-IFN γ -DC活化的自体T细胞对HepG2细胞的杀伤作用. A: HepG2细胞抗原致敏的Ad-IFN γ -DC活化的T细胞对HepG2细胞的杀伤效应; B: LoVo细胞抗原致敏的Ad-IFN γ -DC活化的T细胞对HepG2细胞的杀伤效应; C: HepG2细胞抗原致敏的Ad-IFN γ -DC活化的T细胞对LoVo细胞的杀伤效应. I: Ad-IFN γ -DC; L: Ad-LacZ-DC; N: NTDC.

IFN γ 、TNF α 、IL-2、IL-3、IL-8以及CSF的生成, 是一种强有力的I型免疫反应的诱导剂, 能直接和间接地诱导CD4⁺和CD8⁺的I型细胞的增殖, 进而启动特异性T淋巴细胞反应并抑制Th2细胞的生成^[7]. 而IL-10则能阻碍DC的分化成熟, 抑制DC在肿瘤内的聚集, 下调IL-12的产生以及共刺激分子、黏附分子和MHC II的表达, 并能

抑制Th1型细胞因子的产生和T细胞的增殖^[8]。因此Ad-IFN γ 能诱导DC分泌IL-12p70, 抑制DC分泌IL-10的功能提示Ad-IFN γ 的修饰可诱导免疫反应向Th1型分化, 增强T细胞的溶细胞活性。

进一步研究发现, Ad-IFN γ -DC能明显促进T淋巴细胞的增殖, 这个结果可能是DC表达的IFN γ 蛋白直接引起的, 也可能是IFN γ 促进DC成熟或上调IL-12p70等细胞因子分泌而导致的。此外, Ad-IFN γ -DC能上调T细胞对T-bet和IL-2的表达, 再次提示其能使T细胞向Th1分化, 有利于诱导出强有力的细胞免疫。

最后, 我们发现携带肿瘤抗原信息的Ad-IFN γ -DC活化的T淋巴细胞对肿瘤细胞有明显地特异性杀伤作用, 该作用强于Ad-LacZ-DC组和NTDC组, 提示Ad-IFN γ -DC作为免疫佐剂可有效提高T细胞的抗肿瘤免疫反应, 为进一步研究其在体功能和临床应用提供了依据。

4 参考文献

- 1 薛刚, 李焱, 刘然义, 田伏洲, 黄文林. 体外连接法构建重组人 γ 干扰素腺病毒并检测其在真核细胞中的表达. 癌症 2006; 25: 771-774
- 2 Nishimura N, Nishioka Y, Shinohara T, Ogawa H, Yamamoto S, Tani K, Sone S. Novel centrifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence protein gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol Methods* 2001; 253: 113-124
- 3 张艳林, 薛刚. 肿瘤细胞裂解物致敏的树突状细胞对肝癌HepG2细胞杀伤的体外研究. 华西医学 2007; 22: 18-19
- 4 Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* 1997; 156: 25-37
- 5 Lodge PA, Jones LA, Bader RA, Murphy GP, Salgaller ML. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of a phase II clinical trial. *Cancer Res* 2000; 60: 829-833
- 6 Pan J, Zhang M, Wang J, Wang Q, Xia D, Sun W, Zhang L, Yu H, Liu Y, Cao X. Interferon-gamma is an autocrine mediator for dendritic cell maturation. *Immunol Lett* 2004; 94: 141-151
- 7 Rodolfo M, Colombo MP. Interleukin-12 as an adjuvant for cancer immunotherapy. *Methods* 1999; 19: 114-120
- 8 Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, Robecchi A, Emanuelli G, Rodeck U. Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol* 1999; 155: 537-547

■同行评价

本研究设计合理, 文章撰写条理清晰, 具有一定的学术价值。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版。在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/submission@wjgnet.com>, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxx.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d。来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。(常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)

舒林酸对人结肠癌细胞凋亡及相关基因表达谱的作用

聂家艳, 黄杰安, 唐国都, 刘诗权

■背景资料

结肠癌作为危害人类健康的恶性肿瘤之一, 在我国, 其发病率呈逐年上升趋势, 然其发病率还不是很清楚。近年来 NSAIDs 治疗消化系统肿瘤是人们十分关注的话题, 并且取得了一定的疗效。

聂家艳, 黄杰安, 唐国都, 刘诗权, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

聂家艳, 2008年广西医科大学硕士, 现工作于湖北省荆州市中心医院, 主要从事急性胰腺炎发病机制的研究。

广西自然科学基金资助项目, 桂科自No. 0229038

广西卫生厅医疗卫生科研课题资助项目, No. Z2002043

作者贡献分布: 聂家艳与黄杰安对本文所作贡献均等; 此课题由黄杰安与唐国都设计; 研究过程由聂家艳操作完成; 数据分析由聂家艳与黄杰安完成; 本论文写作由聂家艳、黄杰安及刘诗权完成。

通讯作者: 黄杰安, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院消化内科. hjgxmu@yahoo.com
电话: 0771-5356501

收稿日期: 2008-06-22 修回日期: 2008-07-28

接受日期: 2008-08-04 在线出版日期: 2008-09-08

Effect of sulindac on apoptosis and related gene expression profile of human colon cancer cells

Jia-Yan Nie, Jie-An Huang, Guo-Du Tang, Shi-Quan Liu

Jia-Yan Nie, Jie-An Huang, Guo-Du Tang, Shi-Quan Liu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

Supported by: the Guangxi Natural Science Foundation, No. 0229038, and the Medical Research Projects of Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. Z2002043

Correspondence to: Jie-An Huang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China. hjgxmu@yahoo.com

Received: 2008-06-22 Revised: 2008-07-28

Accepted: 2008-08-04 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To observe the changes of cell apoptosis and gene expression profile of human colon carcinoma cell line Lovo after sulindac treatment.

METHODS: Transmission electron microscopy and flow cytometry were used to observe the apoptosis changes of LoVo cells 48 and 72 h after sulindac treatment; meanwhile, cDNA microarray was used to detect the genes differentially expressed in LoVo cells.

RESULTS: Apoptotic bodies were found and the apoptotic rates of LoVo cells increased greatly after treatment with 0.6, 0.9 and 1.2 mmol/L

sulindac in comparison with those of control cells (48 h: 4.2 ± 1.04 , 4.26 ± 0.28 , 7.51 ± 2.09 vs 1.81 ± 0.91 ; 72 h: 6.21 ± 0.56 , 7.48 ± 1.45 , 10.40 ± 1.30 vs 2.06 ± 1.43 ; all $P < 0.05$). Hybridization with cDNA microarray containing 17101 genes screened 1013 differentially expressed genes, of which 178 genes (17.87%) were associated with cell apoptosis. Of the 178 genes, 82 were up-regulated while 96 were down-regulated.

CONCLUSION: Sulindac can induce apoptosis of LoVo cells, and its mechanism may attribute to up-regulation or down-regulation of some apoptosis-related genes.

Key Words: Colon carcinoma; Sulindac; cDNA microarray; Flow cytometry

Nie JY, Huang JA, Tang GD, Liu SQ. Effect of sulindac on apoptosis and related gene expression profile of human colon cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2826-2830

摘要

目的: 观察舒林酸对人结肠癌Lovo细胞株凋亡的影响, 以及舒林酸作用后的该细胞基因表达谱改变。

方法: 应用透射电镜, 流式细胞仪观察舒林酸作用48 h、72 h对Lovo细胞凋亡的影响; 基因芯片法检测舒林酸作用前后Lovo细胞的差异表达基因。

结果: 经舒林酸处理后细胞有典型的凋亡小体形成; 经舒林酸0.6、0.9、1.2 mmol/L作用后, 细胞凋亡率与对照组比较明显升高(48 h: 4.2 ± 1.04 , 4.26 ± 0.28 , 7.51 ± 2.09 vs 1.81 ± 0.91 ; 72 h: 6.21 ± 0.56 , 7.48 ± 1.45 , 10.40 ± 1.30 vs 2.06 ± 1.43 ; 均 $P < 0.05$)。与含有17101个cDNA的基因芯片杂交, 筛选出差异表达基因1013条, 其中178条为凋亡相关基因(表达上调82条, 下调96条), 占有差异表达基因的17.87%。

结论: 舒林酸具有诱导Lovo细胞发生凋亡的作用, 上调或下调某些凋亡相关基因的表达可

■同行评议者

张声生, 教授, 首都医科大学附属北京中医医院消化中心

能是其诱导凋亡的分子机制之一。

关键词: 结肠癌; 舒林酸; 基因芯片; 流式细胞术

聂家艳, 黄杰安, 唐国都, 刘诗权. 舒林酸对人结肠癌细胞凋亡及相关基因表达谱的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2826-2830

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2826.asp>

0 引言

结肠癌作为严重危害人类健康的常见恶性肿瘤在经济发达的欧美国家仅次于肺癌, 列恶性肿瘤死因的第2位。在我国随着生活方式和饮食结构的改变, 其发病率逐年上升^[1], 然而其发病机制还不是很明确。近年来NSAIDs治疗消化系肿瘤是人们十分关注的话题, 并且取得了一定的疗效。流行病学资料显示, 长期服用NSAIDs可以降低40%-60%结直肠癌的发生^[2]。在家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)的小鼠实验模型中发现舒林酸可减少肿瘤的形成^[3]。我们的前期研究结果显示, 舒林酸可使结肠癌Lovo细胞生长明显减慢, 使Lovo细胞周期阻滞于G₀/G₁期^[4]。国外大量学者进行体外细胞培养干预实验也证实, NSAIDs具有抑制肿瘤细胞生长增值的作用, 而且其对正常细胞毒性作用小, 认为其机制可能与诱导细胞凋亡或直接的细胞毒作用等多方面有关^[5-7]。本研究检测舒林酸对细胞凋亡的影响, 同时利用基因芯片技术检测基因的表达, 以探讨其体外抗肿瘤的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌细胞Lovo株由上海复旦大学惠赠, 舒林酸、过氧化氢酶PI、RnaseA、NP-40均为美国Sigma公司产品。标准胎牛血清, 杭州四季清生物技术有限公司产品; NaCl、KCl、Na₂HPO₄·H₂O、KH₂PO₄、NaHCO₃、酚红等其他试剂均为国产分析纯, 基因芯片购自上海生物芯片有限公司, 含有17101个cDNA。

1.2 方法

1.2.1 透射电镜观察: 取对数生长期细胞, 实验组加入舒林酸(0.9 mmol/L), 对照组加入新鲜培养液, 作用48 h, 收集细胞, 离心10 min, 4℃预冷PBS(0.01 mol/L)再次离心, 弃上清, 加入100 mol/L胎牛血清蛋白1滴, 混合离心5 min, 弃上清, 加入4℃预冷的0.2 mol/L戊二醛固定液固定30 min, 4℃ PBS(0.1 mol/L)洗3次, 按电镜常规制作超薄切片, 双重染色, 观察照相。

表 1 实验样品总RNA质量测定

分组	纯化前总量(μg)	A _{260/280}	电泳检测
处理组	1203	2.06	合格
对照组	2131.02	2.12	合格

1.2.2 流式细胞仪Annexin V/PI双染法检测细胞凋亡: 取对数生长期细胞, 实验组加不同浓度(0.6、0.9、1.2 mmol/L)的舒林酸, 对照组加入新鲜培养液, 分别作用48、72 h, 结合缓冲液调整细胞浓度, 上流式细胞仪检测细胞凋亡情况(具体按试剂盒说明进行)。

1.2.3 总RNA抽提: 取对数生长期细胞, 实验组加入舒林酸(0.9 mmol/L), 对照组加入新鲜培养液, CO₂培养箱中继续培养48 h后, 收集细胞, 每2×10⁶细胞加入1 mL TRIzol, 用移液器反复吹打, 液氮保存送上海生物有限公司。总RNA的质量检测、芯片探针制备、杂交及洗涤、数据分析、标准化处理由上海生物有限公司合作完成。

2 结果

2.1 透射电镜观察 对照组的Lovo细胞核形态规则, 核仁清晰, 核染色质均匀分布细胞核内。经舒林酸处理后细胞体积缩小, 染色质高度凝聚, 边缘化浓缩呈境界分明的细小团块状沿核膜内侧排列, 部分细胞核解体, 核仁消失, 包膜下陷, 形成由质膜包裹内含完整的细胞器、核碎片等细胞内容物的凋亡小体(图1)。

2.2 流式细胞仪检测 经舒林酸0.6、0.9、1.2 mmol/L作用48/72 h后, 细胞凋亡率分别为4.2±1.04/6.21±0.56、4.26±0.28/7.48±1.45和7.51±2.09/10.40±1.30, 而对照组仅为1.81±0.91/2.06±1.43, 处理组与对照组比较差异均有统计学意义(P<0.05), 细胞凋亡率(AR)逐渐上升, 且呈时间-剂量依赖性(图2)。

2.3 总RNA提取的定性定量分析及cDNA分析 实验组和对照组的总RNA定量以及紫外分光光度法测得RNA在260nm和280nm的A值比值即A_{260/280}见表1; 琼脂糖凝胶电泳结果分18srRNA 和28srRNA 条带清晰, 两条带的亮度之比约为1:2(图3), 以上说明所提取组织的总RNA完整性好没有降解, 纯度高可以用于杂交探针制备。

2.4 芯片杂交体系验证结果 点样杂交后, 对芯片进行Cy3和Cy5荧光扫描显示: 芯片信号强度高, 片内信号均一, 基因点清晰, 没有基因点漏点、

■研究前沿

NSAIDs药可以抑制肿瘤细胞的增殖, 但其作用机制一直是研究的热点, 其在基因水平上如何抑制肿瘤细胞的生长仍有待进一步的研究。

■创新盘点

本研究在基因水平上探讨舒林酸抗Lovo细胞增殖的作用机制,不同于以往仅仅在分子生物学研究其作用机制。

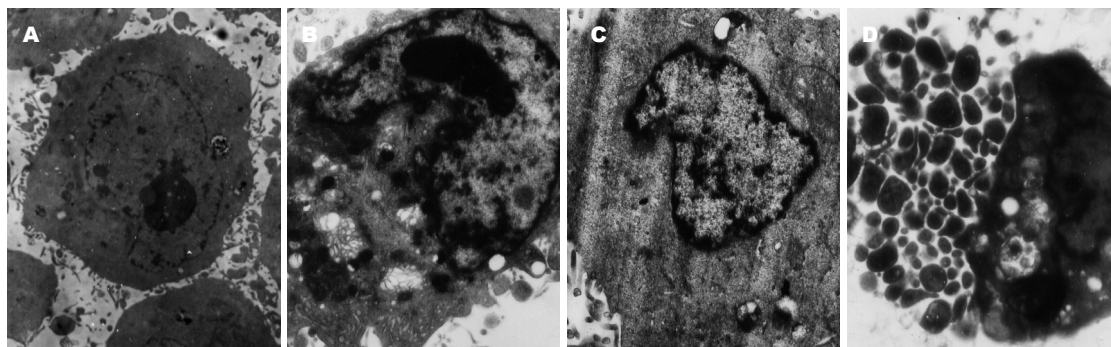


图1 电镜观察舒林酸处理后Lovo细胞形态学变化. A: 对照组细胞($\times 2500$); B-D: 舒林酸(0.9 mmol/L)作用72 h, 其中, B: ($\times 4800$); C: ($\times 3600$); D: ($\times 7700$).

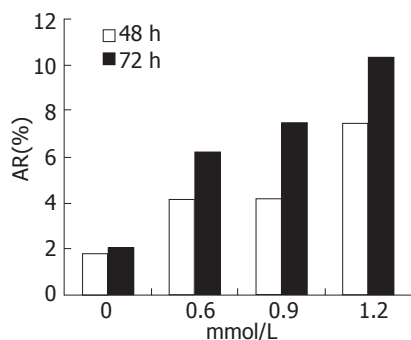


图2 舒林酸对细胞凋亡率AR的作用.

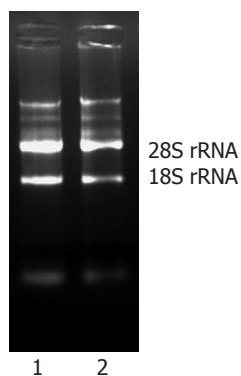


图3 琼脂糖凝胶电泳图. 1: 处理组; 2: 正常组.

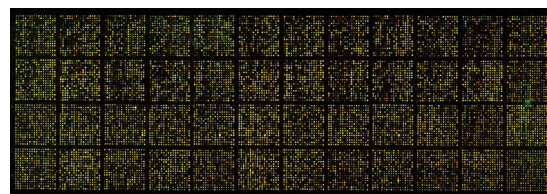


图4 基因芯片部分荧光图.

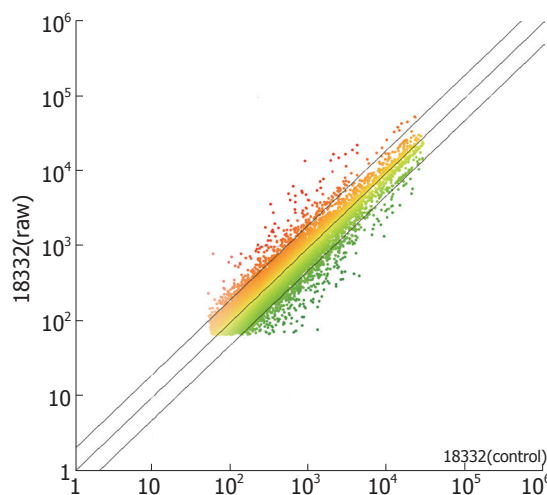


图5 基因芯片Cy3/Cy5杂交信号相关性散点图.

点重叠、以及不正常荧光的情况; Cy3、Cy5的背景值均匀, 符合要求(图4). 实验中对处理组探针标记Cy3荧光素(呈红色), 对照组探针标记Cy5荧光素(呈绿色), 则红绿色的差异就表示该基因在处理组和对照组中表达水平上的差异, 黄色代表水平无差异, 各组探针信号值的散点分布图(图5), 显示大部分基因位于回归线内, 表明大部分基因在两种组织中表达接近, 少部分基因产生表达差异, 且随着差异基因倍数逐渐增加, 差异基因数量逐渐减少(图5).

2.5 芯片杂交结果 本实验按照差异显著阳性的标准, 以Ratio(Cy3/Cy5)值 ≥ 2 或 ≤ 0.5 作为差异表达基因点, >2 表示基因表达上调, <0.5 表示

基因表达下调. 在与含有17101个cDNA的基因芯片杂交, 筛选出差异表达基因1013条, 其中表达上调基因434条(占42.84%), 表达下调的基因579条(占51.76%); 根据Affymetrix分析中心GO(Gene Ontology)分类数据库中基因生物学过程的描述对差异表达基因进行功能分类, 其中178条为凋亡相关基因(表达上调的有82条, 下调的有96条), 占有差异表达基因的17.87%, 未知分子功能的有30条(上调13条, 下调17条). 将舒林酸作用Lovo细胞后诱导与凋亡相关的上调基因($cy3/cy5 > 3$)以及下调明显的基因($cy3/cy5 < 0.2$)从小到大排列见表2.

表 2 表达水平上调或下调明显且与凋亡或肿瘤相关的基因

GenBank	基因名称	基因简写	Ratio(Cy3/Cy5)
NM_001946	Dual specificity phosphatase 6	DUSP6	4.084
NM_000389	Cyclin-dependent kinas inhibitor 1A (p21, Cip1)	CDKN1A	4.139
NM_002203	Integrin, alpha 2(CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	ITGA2	4.151
AF332558	BCL2 binding component 3	BBC3	4.383
NM_002818	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	PSME2	5.277
NM_003330	Thioredoxin reductase 1	TXNRD1	5.36
NM_002229	Jun B proto-oncogene	JUNB	5.649
NM_005980	S100 calcium binding protein P	S100P	6.143
NM_001964	Early growth response 1	EGR1	8.357
NM_016270	Kruppel-like factor 2 (lung)	KLF2	9.428
NM_001657	Amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	AREG	11.54
NM_004864	Growth differentiation factor 15	GDF15	13.88
NM_001168	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	0.113
NM_012291	Extra spindle poles like 1 (S. cerevisiae)	ESPL1	0.119
NM_007019	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	UBE2C	0.122
NM_001237	Cyclin A2	CCNA2	0.127
NM_002658	Plasminogen activator, urokinase	PLAU	0.144
AF220267	Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	UHRF1	0.155
NM_004217	Aurora kinase B	AURKB	0.158
AF070648	Caveolin 1, caveolae protein, 22 kDa	CAV1	0.159
NM_005030	Polo-like kinase 1 (Drosophila)	PLK1	0.167
NM_014750	Discs, large homolog 7 (Drosophila)	DLG7	0.184
NM_016426	G-2 and S-phase expressed 1	GTSE1	0.192

■应用要点

本研究为舒林酸抗结肠癌作用机制在基因水平上提供了线索,有助于加深对舒林酸抗肿瘤机制的认识。

3 讨论

近年来,大量研究发现肿瘤的发生不仅是增殖和分化异常的疾病,也是细胞凋亡异常的疾病,也即肿瘤的发生不仅与细胞的生长速度有关,也与死亡速度有关,许多抗肿瘤药物可以通过触发肿瘤细胞发生凋亡从而达到治疗肿瘤的目的^[8-10]。本实验采用定性检测凋亡的金标准-“透射电镜”进行形态学观察,并用流式细胞仪对凋亡做定量检测。实验发现,经舒林酸处理的细胞出现了核固缩、核裂解等典型的凋亡形态学改变。流式细胞仪结果也显示,舒林酸能诱导Lovo细胞发生凋亡,且凋亡率呈时间和剂量依赖性增加。以上说明舒林酸具有诱导Lovo细胞发生凋亡的作用,而且这种作用可能是其抗肿瘤生长增殖的作用机制之一,这与以往的报导一致^[11]。

众所周知,肿瘤的发生、发展是一个多基因、多因素参与的过程,因此从基因水平上研究药物抗肿瘤作用具有十分重要的意义,我们应用基因芯片技术检测舒林酸诱导结肠癌细胞Lovo基因表达谱的改变,结果显示,舒林酸通过上调或下调某些凋亡相关基因从而发挥其诱导

凋亡的作用。分析与凋亡相关上调显著的基因,GDF15(growth and differentiation factor 15,生长分化因子15)上调最为显著,cy3/cy5为13.88,其本身是一个与信号转导相关的基因,属于TGF- β 超家族成员之一,在胎盘和前列腺中高表达,在其他组织和器官(包括心脏)中的表达量很低或几乎不表达^[12],在结肠癌、前列腺癌、乳腺癌、胰腺癌等癌症中,GDF15基因在病灶部位的表达显著上调,国外学者研究发现,GDF15在HCT-116结肠肿瘤细胞中高表达完全消除了该细胞在裸鼠中引发的肿瘤生长^[13-14]。本实验中,GDF15基因上调显著,说明舒林酸可能通过诱导其高表达从而发挥抗肿瘤的作用。

上调同样明显的CDC16,作为APC(anaphase-promoting complex)核心亚基之一,被认为其磷酸化程度与细胞周期有关^[15]。JunB,属于AP-1(activator protein-1)的亚单位,与同属于AP-1亚单位正性调节生长的c-jun^[16]相比,JunB(可能还有JunD)则可负性调节细胞增生,抑制肿瘤生长。来源于JunB过度表达小鼠的纤维母细胞,其细胞G₁周期延长,细胞过早老化而显示增生减缓^[17]。CDKN1A、EGR1是两种重要的

同行评价

本研究方技术可靠,数据准确,行文流畅,有一定的学术价值。

抑癌基因,其编码的抑制因子能使细胞周期阻滞于G₁期^[18],以上相关基因均可使细胞周期阻滞于G₀/G₁,这与我们前期的实验结果一致^[4],说明舒林酸能抑制有增殖能力的静止细胞进入增殖周期,肿瘤细胞从此脱离细胞周期进入凋亡程序,增殖受到抑制,从而有效控制肿瘤的发展。

在下调基因中,与凋亡相关最密切的是BIRC5,此基因编码的蛋白为凋亡抑制因子,在细胞周期G₂/M期表达,BIRC5与有丝分裂纺锤体微管以及抑制凋亡活性有关。PLK1是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白酶,G₁期几乎不能检出,于S期开始积累,G₂及M期表达水平较高,分裂完成后急剧下降^[19]。大量研究发现其在许多肿瘤中如肺癌^[20]、乳腺癌^[21]卵巢癌^[22]等存在过表达。Takahashi *et al*^[23]研究认为,PLK1在大肠癌中的过表达与肿瘤侵犯深度、淋巴结转移、Duke'分期有关。但也有研究发现,PLK1基因在结肠癌淋巴结转移中成低表达^[24]。本研究中,经舒林酸处理后的结肠癌细胞PLK1基因低表达,从一定程度上说明了PLK1基因通过抑制凋亡从而促进肿瘤细胞的生长,而舒林酸则可抑制这种作用。

参考文献

- Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 57-70
- Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998; 104: 2S-8S; discussion 21S-22S
- Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 135-138
- 聂家艳, 黄杰安, 唐国都, 梁志海, 廖晓霞. 舒林酸对结肠癌Lovo细胞生长增殖及凋亡的作用研究. *中国肿瘤医学文摘·肿瘤学* 2007; 21: 362-366
- Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 2000; 275: 11397-11403
- Gao J, Niwa K, Sun W, Takemura M, Lian Z, Onogi K, Seishima M, Mori H, Tamaya T. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit cellular proliferation and upregulate cyclooxygenase-2 protein expression in endometrial cancer cells. *Cancer Sci* 2004; 95: 901-907
- Okami J, Nakamori S, Hiraoka N, Tsujie M, Hayashi N, Yamamoto H, Fujiwara Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M. Suppression of pancreatic cancer cell invasion by a cyclooxygenase-2-specific inhibitor. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 577-584
- 金岩, 李海波, 关洪全, 李建春. 中药诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究进展. *中医研究* 2005; 18: 52-57
- Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol* 1998; 68: 29-43
- Darzynkiewicz Z. Apoptosis in antitumor strategies: modulation of cell cycle or differentiation. *J Cell Biochem* 1995; 58: 151-159
- 陈光侠, 费素娟. 舒林酸抑制结肠癌Lovo细胞增殖作用机制研究. *山东医药* 2005; 45: 16-17
- Paralkar VM, Vail AL, Grasser WA, Brown TA, Xu H, Vukicevic S, Ke HZ, Qi H, Owen TA, Thompson DD. Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family. *J Biol Chem* 1998; 273: 13760-13767
- Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 901-908
- Albertoni M, Shaw PH, Nozaki M, Godard S, Tenan M, Hamou MF, Fairlie DW, Breit SN, Paralkar VM, de Tribolet N, Van Meir EG, Hegi ME. Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene* 2002; 21: 4212-4219
- Peters JM, King RW, Hoog C, Kirschner MW. Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* 1996; 274: 1199-1201
- 郑明, 张伟, 汤晓飞, 刘敬华. 癌基因c-fos, c-jun在口腔鳞癌的表达研究. *口腔医学研究* 2005; 20: 279-282
- Passeque E, Waqner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J* 2000; 19: 2969-2979
- 廖允军, 张阳德, 王成友, David Rudnic. EGR1在调控肝再生过程中的功能研究. *中国现代医学杂志* 2004; 14: 1-4
- Anger M, Kues WA, Klima J, Mielenz M, Kubelka M, Motlik J, Esner M, Dvorak P, Carnwath JW, Niemann H. Cell cycle dependent expression of Plk1 in synchronized porcine fetal fibroblasts. *Mol Reprod Dev* 2003; 65: 245-253
- Zhou Q, Su Y, Bai M. Effect of antisense RNA targeting Polo-like kinase 1 on cell growth in A549 lung cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2008; 28: 22-26
- 韩淑梅, 马廷行, 唐晓勇. PLK1和PCNA在乳腺癌组织中的表达及临床意义. *山东医药* 2007; 47: 18-20
- Weichert W, Denkert C, Schmidt M, Gekeler V, Wolf G, Kobel M, Dietel M, Hauptmann S. Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 90: 815-821
- Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K, Kimura M, Okano Y, Saji S. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 148-152
- 李曼, 赵作伟, 张阳. 结肠癌淋巴结转移相关基因的表达谱研究. *肿瘤研究与临床* 2006; 18: 661-663

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

VEGF反义寡核苷酸对体外生长的大肠癌HT-29细胞的抑制作用

焦得闯, 吴爱国, 邵国利, 纪术峰

焦得闯, 吴爱国, 邵国利, 纪术峰, 南方医科大学附属珠江医院普通外科 广东省广州市 510282

焦得闯, 南方医科大学附属珠江医院普外科硕士在读, 主要从事大肠癌基因治疗的研究。

广东省科技计划资助项目, No. 2005B31201011

作者贡献分布: 吴爱国与焦得闯对此文所作贡献均等; 此课题由吴爱国指导设计; 研究过程由焦得闯、邵国利及纪术峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由纪术峰提供; 数据分析由焦得闯与邵国利完成; 本论文写作由焦得闯完成。

通讯作者: 吴爱国, 510282, 广东省广州市工业大道中253号, 南方医科大学附属珠江医院普外科. wajiashou@163.com

电话: 020-61643207 传真: 020-61643207

收稿日期: 2008-06-12 修回日期: 2008-07-14

接受日期: 2008-07-21 在线出版日期: 2008-09-08

Inhibitory effect of VEGF antisense oligonucleotide on HT-29 human colorectal cancer cells *in vitro*

De-Chuang Jiao, Ai-Guo Wu, Guo-Li Shao, Shu-Feng Ji

De-Chuang Jiao, Ai-Guo Wu, Guo-Li Shao, Shu-Feng Ji, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital of Nanfang Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Supported by: the Science and Technology Program of Guangdong Province, No. 2005B31201011

Correspondence to: Ai-Guo Wu, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital of Nanfang Medical University, 253 Industrial Avenue, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. wajiashou@163.com

Received: 2008-06-12 Revised: 2008-07-14

Accepted: 2008-07-21 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) antisense oligonucleotide (ASODN) on human colorectal cancer cell line HT-29 *in vitro*.

METHODS: Human colorectal cancer HT-29 cells were transfected with VEGF ASODN and scrambled oligodeoxynucleotide (SODN) by Lipofectamine™2000. The expression of VEGF mRNA in HT-29 cells was detected using semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the excretion of VEGF protein was measured by Western blot 48

and 72 hours after transfection. The proliferation and apoptosis of HT-29 cells were measured using MTT assay and flow cytometry respectively.

RESULTS: The expression of VEGF mRNA in HT-29 cells transfected with ASODN was significantly lower 48 h after transfection than that in the plasmid controls or SODN controls (0.455 ± 0.032 vs 0.934 ± 0.031 , 0.915 ± 0.004 ; both $P < 0.01$). There was no marked difference between the two control groups. The expression of VEGF protein in HT-29 cells was confirmed and the specific band on PVDF membrane in the ASODN group was obviously weaker than that in the control groups. VEGF ASODN inhibited the proliferation of HT-29 cells in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$); the apoptotic index of HT-29 cells in the ASODN group was obviously higher than that in the control groups ($P < 0.05$) 72 h after transfection.

CONCLUSION: VEGF ASODN can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HT-29 cells *in vitro* by inhibiting VEGF gene expression.

Key Words: Antisense oligodeoxynucleotide; Vascular endothelial growth factor; Colorectal cancer; MTT assay; Flow cytometry; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot

Jiao DC, Wu AG, Shao GL, Ji SF. Inhibitory effect of VEGF antisense oligonucleotide on HT-29 human colorectal cancer cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2831-2835

摘要

目的: 探讨血管内皮生长因子(VEGF)反义寡核苷酸(ASODN)对体外生长的人大肠癌HT-29细胞的抑制作用。

方法: 实验设空白对照组、脂质体转染组、错义链转染组(SODN组)和不同浓度反义链转染组(ASODN组)。用Lipofectamine™2000介导的VEGF ASODN和错义寡核苷酸(SODN)转染人大肠癌细胞株HT-29, 半定量RT-PCR检测

■背景资料

VEGF是肿瘤治疗中抗血管生成治疗具有良好前景的靶点, 目前已有大量针对该靶标的药物进入临床实验阶段或已应用于临床, 随着对VEGF研究的深入, 越来越多的学者发现VEGF除了在肿瘤血管生成方面发挥作用外, 还能够诱导肿瘤细胞分裂增殖。

■同行评议者

王志刚, 副主任医师, 上海市第六人民医院普外科

■研发前沿

目前肿瘤基因治疗的研究热点主要集中在靶基因的选择、如何提高基因药物的靶向性以及载体的选择和制备等几个方面。

各组细胞VEGF mRNA的表达; Western blot测定转染48、72 h后VEGF蛋白表达; MTT法和流式细胞术检测细胞增殖和凋亡。

结果: 转染48 h后, ASODN组的VEGF mRNA表达水平明显低于脂质体对照组和SODN组 (0.455 ± 0.032 vs 0.934 ± 0.031 , 0.915 ± 0.004 , $P < 0.01$); 脂质体对照组与SODN组之间无显著差异。细胞转染48、72 h后, ASODN组蛋白表达明显弱于脂质体对照组和SODN组, 且72 h弱于48 h。与对照组比较, VEGF ASODN对HT-29细胞有明显的生长抑制作用, 并且抑制呈剂量和时间依赖性 ($P < 0.05$)。

结论: VEGF ASODN通过抑制VEGF的基因表达, 对体外生长的人大肠癌HT-29细胞的增殖进行抑制。

关键词: 反义寡核苷酸; 血管内皮生长因子; 大肠癌; MTT法; 流式细胞术; 聚合酶链反应; 免疫印迹

焦得闻, 吴爱国, 邵国利, 纪术峰. VEGF反义寡核苷酸对体外生长的大肠癌HT-29细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2831-2835

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2831.asp>

0 引言

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是肿瘤血管生成研究领域的中心焦点, 他不仅在肿瘤的生长和转移中发挥重要的作用, 而且对肿瘤细胞本身的增殖和凋亡也有一定的影响^[1-4]。反义核酸技术是近年来兴起的一种新的基因治疗技术, 反义技术中的反义寡核苷酸技术是目前最有可能应用于临床的基因治疗方法。它具有高度靶特异性、设计容易、多样且合成简单的特点, 这都是常规药物设计、生产和作用所不可比拟的, 因而具有巨大的研究价值。本实验运用Lipofectamine™ 2000介导的VEGF ASODN转染体外生长的人大肠癌HT-29细胞, 观察HT-29细胞VEGF mRNA和蛋白的表达, 测定其对HT-29细胞增殖和凋亡的影响, 以探讨VEGF在肿瘤细胞生长中的作用, 从而为反义核酸应用于大肠癌的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人大肠癌HT-29细胞株由广东省人民医院细胞室惠赠; RPMI 1640培养基和胎牛血清购自莱德尔公司; Lipofectamine™ 2000为Invitrogen公司产品; 小鼠抗人mAb及羊抗小鼠IgG为Santa

Cruz公司产品; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物公司; 反义及错义寡核苷酸链由上海生物工程公司合成, ASODN序列为: 5'-TGGCTTGAAGATGTACTCGAT-3'; SODN序列为: 5'-TACGTAGTATGGTGTACGATC-3', 均采取全程硫代磷酸化修饰。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养、转染和分组: HT-29细胞用含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基(含青霉素和链霉素浓度均为 1×10^5 U/L), 培养于37℃、50 mL/L CO₂的培养箱中。取对数生长期的HT-29细胞以每孔 3×10^5 接种于6孔板内, 约80%细胞融合时开始实验。设置空白对照组、脂质体转染组、1000 nmol/L错义链转染组和不同浓度(200、600、1000 nmol/L)反义链转染组, 每组设6个复孔。细胞转染按Lipofectamine™ 2000试剂盒说明书进行。

1.2.2 RT-PCR法检测细胞VEGF mRNA的表达:

(1)细胞总RNA的提取及浓度的测定: 细胞转染48 h后, 按TRIzol试剂盒说明书提取总RNA, 经氯仿处理, 异丙醇沉淀, 750 mL/L乙醇洗涤后, 略干燥, 无RNA酶水溶解, -70℃保存。以核酸紫外分析仪检测 A_{260}/A_{280} 值为1.9, 计算RNA浓度, RNA浓度(g/L) = $A_{260} \times$ 稀释倍数 $\times 0.04$ 。用DEPC水定量到1 g/L。(2)RT-PCR: 提取的RNA按照MMLV第一链合成试剂盒说明书合成cDNA。VEGF上游引物: 5'-GTGCCCCACTGAGGAGTCAACAT-3', 下游引物: 5'-CGGCTTGTCACATCTGCAAGTAC-3', GAPDH上游引物: 5'-CGGGAAGCTTGTCATCAATGG-3', 下游引物: 5'-GGCAGTGATGGCATGGACTG-3'。反应体系体积为50 μL, PCR反应条件为94℃, 2 min, 反转录酶灭活和RNA/cDNA引物预变性; 94℃ 30 s, 59.8℃ 30 s, 72℃ 2 min, 39个循环, 最后72℃延伸7 min。产物于20 g/L琼脂糖进行凝胶电泳, 拍照记录电泳结果, 图像分析仪测定电泳产物灰度值A, 以同一标本的GAPDH mRNA作为内参进行校正, 对VEGF PCR产物相对定量。

1.2.3 Western blot检测VEGF蛋白表达: 转染48、72 h后, 提取各组细胞的总蛋白质, 用紫外分光光度法测定其浓度。取50 μg蛋白经120 g/L SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 常规湿法转膜后, 与1:1000小鼠抗人VEGF mAb 4℃孵育过夜, 1:2000辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG室温轻摇1 h。EMC显色, 常规显影和定影, 观察结果。

■相关报道

Masood *et al*通过对AIDS-Kaposi肉瘤的研究发现, 反义VEGF寡核苷酸可以自分泌的方式抑制肉瘤细胞的生长; Mercurio *et al*证实VEGF有阻碍乳腺癌细胞程序性死亡的功能, 可通过直接作用于肿瘤细胞本身而发挥作用。

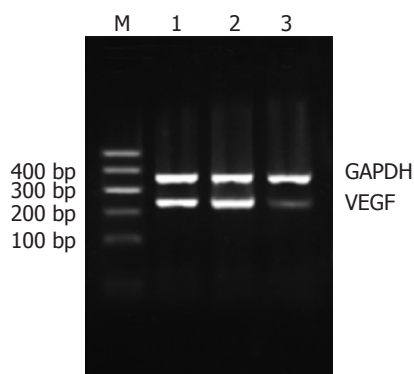


图1 VEGF ASODN对大肠癌HT-29细胞VEGF mRNA表达的影响. M: 标准参照物; 1: 脂质体对照组; 2: SODN(1000 nmol/L)组; 3: ASODN(1000 nmol/L)组.

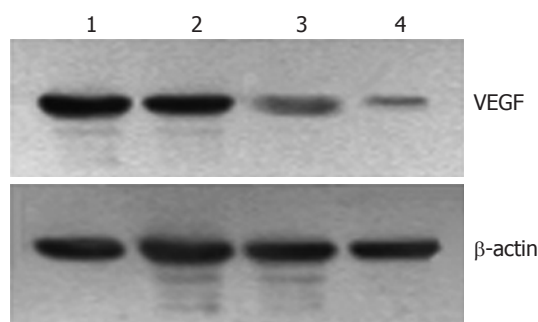


图2 VEGF ASODN对大肠癌HT-29细胞VEGF蛋白表达的影响. 1: 脂质体对照组转染48 h; 2: SODN(1000 nmol/L)组转染48 h; 3: ASODN(1000 nmol/L)组转染48 h; 4: ASODN(1000 nmol/L)组转染72 h.

1.2.4 MTT法观察细胞增殖抑制情况: 各组细胞在96孔板内分别培养24、48和72 h后进行实验. 每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μ L, 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂培养箱中继续孵育4 h后, 弃去孔内培养液, 每孔加入150 μ L DMSO, 振荡10 min, 用酶联免疫检测仪测定A₄₉₀. 每组取各复孔的平均值, 计算细胞增殖抑制率: 抑制率 = (1-处理组A/细胞对照组A) $\times$ 100%.

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡比率: ASODN组和脂质体对照组的细胞分别培养72 h后, 每组计数 3×10^5 个细胞用于实验, 用500 μ L Binding Buffer(1 $\times$)重悬细胞, 每组加入Annexin V-FITC 5 μ L, 避光反应15 min, 加入PI 10 μ L, 15 min内上机进行流式细胞检测.

统计学处理 应用SPSS11.0统计软件进行统计学分析, 实验数据中计量资料以mean $\pm$ SD表示, 采用方差分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 VEGF ASODN对HT-29细胞VEGF mRNA表达的影响 脂质体对照组、SODN组和ASODN

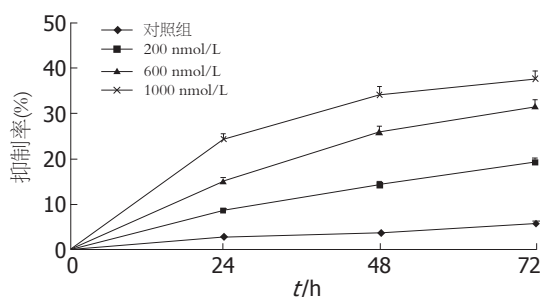


图3 VEGF ASODN对人大肠癌HT-29细胞的抑制作用.

组成功扩增出相应目的基因的PCR产物, 条带与Marker比较证实扩增的目的片段大小完全吻合(图1). 电泳条带经凝胶电泳图像扫描仪扫描, 测各条带的灰度值, 经同一标本的GAPDH条带的灰度值校正后进行比较. ASODN组(0.455 ± 0.032)对HT-29细胞VEGF mRNA的表达有明显的抑制作用, 与脂质体对照组(0.934 ± 0.031)和SODN组(0.915 ± 0.004)比较有统计学意义($P < 0.01$). 脂质体对照组与SODN组之间无显著差异($P > 0.05$).

2.2 转染后细胞VEGF蛋白的表达结果 细胞转染48、72 h后, ASODN(1000 nmol/L)组蛋白表达条带明显弱于脂质体对照组和SODN(1000 nmol/L)组, 72 h弱于48 h(图2).

2.3 VEGF ASODN对HT-29细胞增殖的影响 MTT法测定结果显示, 与对照组比较, VEGF ASODN对HT-29细胞有明显的生长抑制作用, 并且抑制呈剂量和时间依赖性($P < 0.05$, 图3).

2.4 VEGF ASODN对HT-29细胞凋亡的影响 流式细胞检测结果显示, VEGF ASODN对HT-29细胞有一定的凋亡诱导作用, 与对照组比较有统计学意义($P < 0.05$, 图4).

3 讨论

大肠癌是世界范围内四大最常见恶性肿瘤之一, 近年来我国的大肠癌的发病率呈上升趋势, 且以每年4%的幅度递增, 递增速度为世界水平的2倍. 传统的治疗方法效果并不理想. 基因治疗是当代医学和生物学的一个新的研究领域, 随着分子生物学及基因工程的发展, 基因治疗已成为研究重点, 也成为提高大肠癌患者预后的一种有前景的途径.

血管生成是实体肿瘤生长和转移必不可少的条件, 多种血管生长因子在肿瘤血管的生成中发挥作用, VEGF家族是目前研究最深入的血管生长因子家族, 也被越来越多的研究者作为抗肿瘤血管生成基因治疗的靶点. VEGF家族包

■创新盘点

本文从反义VEGF寡核苷酸对体外生长的大肠癌细胞的增殖和凋亡的影响入手, 探讨VEGF在肿瘤细胞生长中的作用以及以VEGF为靶点的药物的作用机制.

■名词解释

反义寡核苷酸 (ASODN): 人工合成的, 与靶基因DNA或mRNA某一区段互补的核酸片段, 可以通过碱基互补原则结合于靶基因DNA或mRNA上, 从而封闭基因的表达。

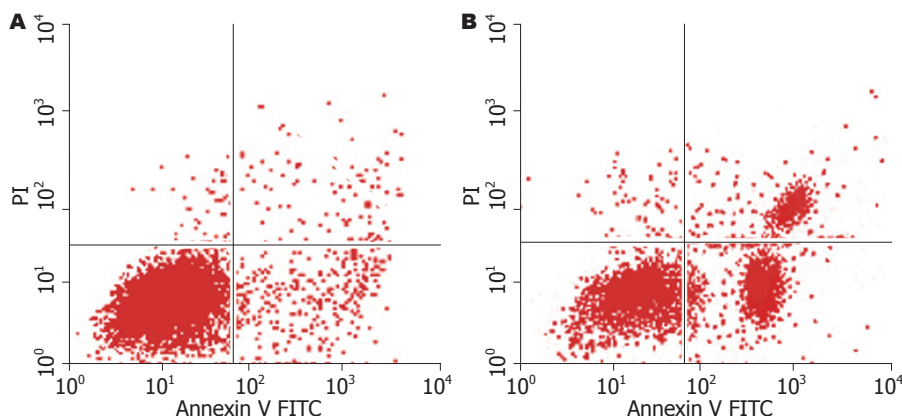


图4 VEGF ASODN对人大肠癌HT-29细胞凋亡的影响. A: 脂质体对照组; B: ASODN(1000 nmol/L)组.

括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、胎盘生长因子^[5-7]和新近从蛇毒中发现的VEGF-F^[8], 通常所说的VEGF即VEGF-A, 其分子质量为34-45 kDa, 以5种不同的亚型出现, 即VEGF121、VEGF165、VEGF189、VEGF206和VEGF145, 体内以VEGF165最常见^[9]. VEGF表达量与癌细胞的浸润、淋巴结的转移及肝转移等多种生物学行为有关^[10-12]. 对多种肿瘤中VEGF的作用机制的研究发现, VEGF可以通过旁分泌和自分泌两种方式对肿瘤细胞的生长和转移产生影响. VEGF受体包括VEGFR-1(flt-1)、VEGFR-2(KDR/flk)和VEGFR-3(flt-4). 另外, KDR还有一个辅助受体Neuropilin-1(NP-1), 他可使KDR与VEGF165的结合增加. flt-4主要分布在淋巴管内皮细胞, 而flt-1和KDR主要在血管内皮细胞表达, 但现在也有在肿瘤细胞表面发现^[13-14].

以往的研究多集中在VEGF对血管的发生和生成的作用上, 现在随着VEGF自分泌作用途径的发现, 越来越多的研究证实, 除了通过改变血供来影响肿瘤细胞的生长外, VEGF可以通过抑制肿瘤细胞凋亡等途径对肿瘤细胞的生物学行为造成影响.

用VEGF ASODN抗大肠癌的治疗比传统的治疗方法有很大的优势. 首先, 反义脱氧寡核苷酸的设计和批量生产较容易, 硫代磷酸化修饰后可使其稳定性增加, 利用脂质体转染的方法可使转染效率提高; 其次, 给药方式也较反义RNA载体传递途径简单, 更方便应用于临床. 另外, 脂质体转染法在短期应用的基因治疗中也有明显的优点, 他可以靠静电作用结合寡核苷酸链形成“寡核苷酸链-脂质体”复合物, 同时又吸附于带负电的细胞膜表面, 增加了转染的效率^[15-16].

本实验把VEGF ASODN的靶序列定位于VEGF基因的第三外显子^[17], 体外合成的寡核苷

酸序列经过全硫代修饰, 在不影响其与靶序列特异性结合的同时, 又增加了其稳定性.

RT-PCR和Western blot结果显示, 与对照组比较, VEGF ASODN能够明显抑制HT-29细胞mRNA及蛋白的表达, 同时发现其对蛋白的抑制作用在72 h较强. 脂质体对照组和SODN组则无此作用, 说明此效应是序列特异的.

MTT结果显示, 利用VEGF ASODN封闭VEGF基因后, HT-29细胞的增殖率明显降低, 且这种抑制作用具有剂量和时间的依赖关系. 流式细胞结果证明, 与脂质体对照组比较, VEGF ASODN对体外生长的HT-29也有一定的凋亡诱导作用.

以上结果证实VEGF ASODN能够通过降低VEGF基因的表达, 抑制人大肠癌HT-29细胞的体外增殖, 并对其具有一定的凋亡诱导作用. 同时也提示HT-29细胞可以表达VEGF受体, VEGF可以通过自分泌的方式发挥作用. 但VEGF ASODN在对体内大肠癌细胞是否也具有这些作用尚有待动物实验和临床实验证实. 本实验的结果为以后VEGF ASODN用于大肠癌的基因治疗提供了一定的理论依据.

4 参考文献

- Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder RE. Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10: 283-290
- 李海军, 庞作良, 毛拉艾沙·买买提. VEGF反义寡核苷酸对胆囊癌细胞VEGF, Flt-1及KDR mRNA表达和VEGF蛋白分泌的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1225-1231
- 邵成浩, 胡先贵, 刘瑞, 张怡杰, 唐岩, 曹贵松. 血管内皮生长因子反义核酸治疗裸鼠皮下种植胰腺癌. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2916-2918
- 吴汉平, 冯敢生, 田元. 反义VEGF寡核苷酸与碘油混合肝动脉注入转染鼠肝癌的可行性. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 23-26
- Meyer M, Clauss M, Leppl-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Büttner M, Rziha HJ, Dehio C. A novel vascular

- endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1999; 18: 363-374
- 6 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22
- 7 Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 561-569
- 8 Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006; 580: 2879-2887
- 9 Takayama K, Ueno H, Nakanishi Y, Sakamoto T, Inoue K, Shimizu K, Oohashi H, Hara N. Suppression of tumor angiogenesis and growth by gene transfer of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor into a remote organ. *Cancer Res* 2000; 60: 2169-2177
- 10 Maehara Y, Kabashima A, Koga T, Tokunaga E, Takeuchi H, Kakeji Y, Sugimachi K. Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma. *Surgery* 2000; 128: 408-416
- 11 Soufla G, Sifakis S, Baritaki S, Zafiropoulos A, Koumantakis E, Spandidos DA. VEGF, FGF2, TGF β 1 and TGF β R1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. *Cancer Lett* 2005; 221: 105-118
- 12 Xu T, Chen D, Chen J. Expression of vascular endothelial growth factor C and its correlation with lymph node metastasis in colorectal carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004; 24: 596-598
- 13 Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59: 728-733
- 14 Ishigami SI, Arai S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, Mori A, Onodera H, Imamura M. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 1379-1384
- 15 Martinez LA, Naguibneva I, Lehrmann H, Vervisch A, Tchénio T, Lozano G, Harel-Bellan A. Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 14849-14854
- 16 Donzé O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e46
- 17 Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Naidu Y, Gill PS. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 979-984

■同行评价

本研究选题新颖, 从体外细胞水平研究提示VEGF除传统认为的血管作用外, 可能还有对肿瘤细胞的直接作用, 值得探讨, 有一定的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

●消息●

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。(常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)

艾滋病患者肝组织瘦素的表达及与肝脂变的关系

兰孟东, 孙成福, 赵红心, 沈冰, 张亮, 赵辉, 卢联合, 王笑梅, 郎振为, 李兴旺, 毛羽

■背景资料

肝脂变是非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 主要的组织学表现。目前, 有较多的研究探讨了 NAFLD 的发生、发展及发病机制。随着我国艾滋病感染者由高危人群向一般人群扩散, 脂肪肝也成为艾滋病患者较常见的肝脏组织学表现。但我国艾滋病感染者的肝脂变发生率及肝脂变发生的相关因素研究则少有报道。

兰孟东, 沈冰, 张亮, 郎振为, 北京地坛医院病理科 北京市 100011

孙成福, 安徽理工大学 安徽省淮南市 232001

赵红心, 卢联合, 王笑梅, 李兴旺, 毛羽, 北京地坛医院感染病中心 北京市 100011

赵辉, 北京地坛医院检验科 北京市 100011

兰孟东, 医学博士, 副主任医师, 主要从事艾滋病, 肝病病理研究。北京市科委研发攻关类项目-艾滋病防治资助项目, No. D0906003040291

作者贡献分布: 此课题由兰孟东、郎振为、李兴旺及毛羽设计; 研究过程由兰孟东、孙成福、赵红心、沈冰、张亮、赵辉、卢联合及王笑梅操作完成; 数据分析由兰孟东与王笑梅完成; 本文写作由兰孟东、郎振为及毛羽完成。

通讯作者: 毛羽, 100011, 北京市, 北京地坛医院感染病中心。

mao58@vip.sohu.net

收稿日期: 2008-07-18 修回日期: 2008-08-13

接受日期: 2008-08-19 在线出版日期: 2008-09-08

Relationship between leptin expression and hepatic steatosis in liver tissues of patients with acquired immunodeficiency syndrome

Meng-Dong Lan, Cheng-Fu Sun, Hong-Xin Zhao, Bing Shen, Liang Zhang, Hui Zhao, Lian-He Lu, Xiao-Mei Wang, Zhen-Wei Lang, Xing-Wang Li, Yu Mao

Meng-Dong Lan, Bing Shen, Liang Zhang, Zhen-Wei Lang, Department of Pathology, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Cheng-Fu Sun, Anhui University of Science and Technology, Huainan 22001, Anhui Province, China

Hong-Xin Zhao, Lian-He Lu, Xiao-Mei Wang, Xing-Wang Li, Yu Mao, Center of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Hui Zhao, Department of Clinical Laboratory, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Supported by: Beijing Municipal Science and Technology Commission Foundation for AIDS Prevention, No. D0906003040291

Correspondence to: Yu Mao, Center of Infectious diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China. mao58@vip.sohu.net

Received: 2008-07-18 Revised: 2008-08-13

Accepted: 2008-08-19 Published online: 2008-09-08

■同行评议者

朱传武, 副主任医师, 江苏省苏州市第五人民医院传染科; 宣世英, 教授, 山东省青岛市市立医院肝病内科

Abstract

AIM: To investigate the prevalence of hepatic steatosis and its correlation with the expression of leptin in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Beijing district.

METHODS: A total of 18 Chinese AIDS patients were included in this study. Immunohistochemistry was used to detect the expression of leptin, CD68 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in liver specimens of these patients. The hepatic steatosis and histopathological changes of these liver specimens were evaluated. Meanwhile, we also analyzed the relations of age, gender, body mass index (BMI), liver function, fasting blood glucose, cholesterol, triglyceride, HIV load, CD4⁺ count and CD8⁺ count with hepatic steatosis.

RESULTS: In this group of AIDS patients with AIDS, the prevalence of hepatic steatosis was 61.1% (11/18). Macrovesicular steatosis was 72.7% (8/11). The patients complicated with liver disease-associated opportunistic infections accounted for 22.2% (4/18). The positive rate of leptin was 44.4% in AIDS patients, and the positive rates of leptin and CD68 in steatosis patients were higher than those in non-steatosis patients without statistical significances. The positive expression of TNF- α in AIDS patients with steatosis was significantly higher than those in patients without steatosis (100% vs 42.9%, $P = 0.012$), but the CD8⁺ cell count ($\times 10^6$ cells/L) was just the opposite (142.0 ± 93.0 vs 515.6 ± 320.7 , $P = 0.026$). Hepatic steatosis had no correlations with the patients' age, gender, BMI, liver function, blood-fasting sugar, cholesterol, triglyceride, HIV load, CD4⁺ count and coinfection of hepatitis C virus.

CONCLUSION: Hepatic steatosis is highly prevalent in AIDS patients and shows no significant relations with leptin expression, which seems to associate with the mechanism of injury-repair in liver.

Key Words: Acquired immunodeficiency syndrome; Human immunodeficiency virus; Hepatic steatosis; Leptin; Tumor necrosis factor- α ; Immunohistochemistry

Lan MD, Sun CF, Zhao HX, Shen B, Zhang L, Zhao H, Lu LH, Wang XM, Lang ZW, Li XW, Mao Y. Relationship between leptin expression and hepatic steatosis in liver tissues of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2836-2840

摘要

目的: 调查北京地区艾滋病患者肝脂变的发生率, 研究艾滋病患者肝组织中瘦素与肝脂变的关系。

方法: 应用免疫组织化学法检测18例国人艾滋病患者肝组织中瘦素、CD68及TNF- α 的表达, 评价这些患者肝脏的组织学改变及脂变状况, 分析性别、年龄、肝功能、血脂水平、空腹血糖、HIV病毒载量、CD4⁺细胞计数和CD8⁺细胞计数与肝脂变的关系。

结果: 本组病例艾滋病患者肝脂变的发生率为61.1%(11/18), 其中大泡脂变占72.7%(8/11), 合并肝病相关性机会性感染者占22.2%(4/18)。18例肝组织中瘦素检出率为44.4%, 有肝脂变的肝组织其瘦素及CD68表达的阳性率高于无脂变组, 但无统计学意义, 脂变组TNF- α 的阳性率显著高于无脂变组(100% *vs* 42.9% $P = 0.012$)。除CD8⁺细胞计数($\times 10^6$ 个/L)在脂变组显著低于无脂变组(142.0 ± 93.0 *vs* 515.6 ± 320.7 , $P = 0.026$)外, 其余因素如年龄、体质量指数、肝功能、血脂水平、空腹血糖、HIV载量、CD4⁺细胞计数及是否合并丙型肝炎感染均与肝脂变的发生无显著相关。

结论: 艾滋病患者中肝脂变发生率较高, 肝脂变的发生与瘦素的表达未见明显相关, 可能与肝组织损伤修复机制有关。

关键词: 艾滋病; HIV感染; 肝脂变; 瘦素; 肿瘤坏死因子- α ; 免疫组化

兰孟东, 孙成福, 赵红心, 沈冰, 张亮, 赵辉, 卢联合, 王笑梅, 郎振为, 李兴旺, 毛羽. 艾滋病患者肝组织瘦素的表达及与肝脂变的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2836-2840
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2836.asp>

0 引言

肝脂变是非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)常见的和重要的组织学改变。慢性人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者可能成为越来越多的NAFLD的危险因素之一^[1]。由脂肪细胞分泌的瘦素是一种具有多种生理功能的内分泌调节激素^[2]。瘦素水平的升高, 可促进肝细胞内脂肪酸堆积, 从而促进肝脂变的发生^[3]。艾滋病患者中肝脂变的发生率及其相关因素国内研究尚少。本研究应用免疫组织化学法检测艾滋病患者肝组织中瘦素的表达, 探讨肝组织中瘦素的表达与肝脂变的关系以及肝脂变的相关因素。

1 材料和方法

1.1 材料 1995-03/2007-07在北京地坛医院就诊的艾滋病患者18例, 14例尸解患者发病前均有性乱行为史, 入院时均已是艾滋病临终期患者, 其中男13例, 女1例, 年龄22-53(平均 38.4 ± 9.8)岁, 其外周血CD4⁺细胞计数 $5-97/\mu\text{L}$, 2例HBV血清学标志物阳性。4例肝活检患者中, 男3例, 女1例, 年龄11-36岁, 2例有明确输血史, 3例血清抗-HCV及HCV RNA阳性, 外周血CD4⁺细胞计数 $25-356/\mu\text{L}$ 。仅1例患者接受高效抗逆转录病毒治疗(highly active antiretroviral therapy, HAART)3 wk, 其他病例均未接受抗病毒治疗。

1.2 方法

1.2.1 肝组织学检查: 14例患者为尸体解剖取得肝组织标本, 4例为活检获得肝组织, 肝活检采用美国Bard Magnum型穿刺枪, 16G穿刺针实行1 s快速肝穿刺术, 获取长度为1.5-2.5 cm之肝组织于40 g/L的中性甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 4 μm 厚连续切片, 分别做HE、网状纤维、Masson染色。肝组织学评价应用Knodel^[4]HAI评分系统。肝脂变程度的分类参照文献^[5]: 脂变肝细胞少于肝小叶的5%为阴性; 超过5%为阳性, 其中5%-25%为轻度; 大于26%为重度。

1.2.2 免疫组织化学检测: 瘦素, CD68及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的检测应用EnVision两步法。具体步骤如下: 石蜡切片常规脱蜡至水, 应用0.3%双氧水室温孵育10 min以消除内源性过氧化物酶活性, EDTA缓冲液高压抗原修复后, 分别滴加CD68 mAb(购自北京中杉生物技术有限公司, 1:160稀释); 兔抗人-TNF- α 抗体(购自北京中杉生物技术有限公司, 1:200稀释); 兔抗人-瘦素抗体(购自武汉博士德生物技术有限公司, 1:180稀释), 4℃过夜, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗片后滴加辣根过氧化物酶标志的二抗(购自北京基因公司), 湿盒37℃孵育30 min, 3, 3'-二氨基联苯胺(购自北京基因公司)显色, 苏木素复染, 封片。在以上步骤中以PBS代替一抗作为空白对照。

瘦素表达的评价参考卢建华 *et al*^[6]的评价方法: 肝组织中细胞内有瘦素信号表达者为阳性, 未见阳性信号者为阴性。TNF- α 表达的半定量评价方法参考丁效蕙 *et al*^[7]并加以修改: 未见阳性信号者为阴性, 阳性细胞占间质细胞数的1%-5%为+, 超过5%为++。CD68的半定量评价方法: 阳性细胞占间质细胞数的1%-10%为+, 10%-20%为++, 超过20%为+++。

1.2.3 血清学检测: 乙肝五项、抗-HCV采用

■研究前沿

脂肪因子在NAFLD中的作用及其机制研究是该领域中的研究热点。有研究表明, NAFLD患者往往伴有高瘦素血症, 而瘦素水平与肝脏的脂肪变性程度呈正相关。艾滋病感染者的肝脂变是否与瘦素原位高表达有关, 值得探讨。

■相关报道

国外Sutinen *et al* 报道HARRT治疗可能增加脂肪性肝病的发生的危险因素如肥胖, 脂肪性营养不良及胰岛素抵抗。另外, 美国学者Gaslightwala *et al*的研究认为: 肝脂变在HIV合并HCV感染者中更常见及更严重。

表 1 艾滋病患者肝组织学变化

序号	病历号	性别	年龄(岁)	Knodel HAI分值	机会性感染
1	68584	男	53	7	无
2	66579	男	22	3	无
3	63385	男	45	3	巨细胞病毒
4	62436	男	41	3	无
5	58862	女	37	13	无
6	57513	男	35	3	无
7	55897	男	36	5	分枝杆菌
8	49075	男	42	0	无
9	53671	男	51	3	无
10	82279	男	27	4	分枝杆菌
11	82623	男	26	8	无
12	82589	男	47	8	无
13	87752	男	29	1	无
14	94676	男	47	3	分枝杆菌
15	89306	男	36	6	无
16	78096	男	36	2	无
17	92178	女	11	4	无
18	59801	男	35	4	无

MEIA(微粒子酶免分析)方法, 试剂为美国Abbott公司生产。血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(TBIL)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyltransferase, GGT)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(cholesterol, CHO)采用HITACHI-7180型全自动生物化学分析仪检测。空腹血糖(FBS)采用美国德灵公司Dimension-RXL型全自动生物化学分析仪检测。

统计学处理 计量资料以mean $\pm$ SD表示, 应用Student *t*, Mann-Whitney U检验, 比较脂变组与无脂变组之间的差异; 计数资料应用 χ^2 检验或Fisher精确检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。所有统计处理均使用SPSS13.0统计软件。

2 结果

2.1 艾滋病患者的肝组织学变化 18例肝组织标本中, 13例患者出现点灶性坏死, 8例出现轻至中度的肝细胞水肿, 个别患者出现肝细胞气球样变, 8例出现汇管区炎症, 炎症细胞以淋巴细胞为主, 未见显著的淋巴细胞聚集或淋巴滤泡形成, 17例出现轻至中度的汇管区纤维化。典型的肝硬化表现1例(例5); 合并肝病相关性机会性感染者4例, 占22.2%, 其中3例尸解肝组织中发

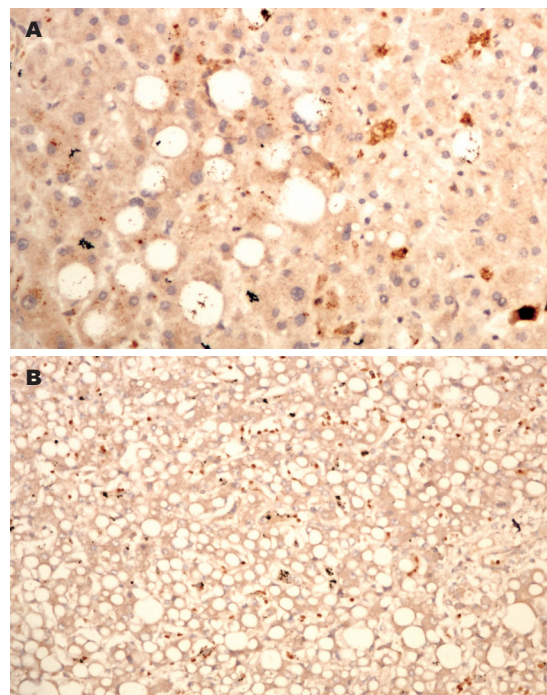


图 1 艾滋病患者肝组织中瘦素蛋白及TNF- α 的表达(EnVision法)。A: 瘦素蛋白($\times 200$); B: TNF- α ($\times 100$)。

现肉芽肿及干酪样坏死, 抗酸染色证实为结核分枝杆菌感染(例7, 10, 14, 表1), 1例尸解肝组织中发现巨细胞病毒感染(例3, 表1)。应用Knodel HAI评分系统评价, 本组18例患者肝组织HAI分值0-13分, 中位数为3分, 按是否存在肝脂变分组, 肝脂变组与无脂变组比较, 其HAI值无显著性差异(4.8 ± 3.6 vs 3.9 ± 2.1 , $P=0.531$, 表2)。

2.2 艾滋病患者肝组织脂变检出率及脂变分布特点 18例艾滋病患者肝组织中, 伴有肝脂变占61.1%(11/18), 其中轻度脂变者占33.3%(6/18), 重度脂变者占27.8%(5/18), 无脂变者仅7例。在脂变患者肝组织中, 大泡脂变8例, 微泡脂变6例, 混合脂变4例。在4例肝活检组织中, 有3例血清抗-HCV及HCV RNA阳性, 但均无肝脂变出现。合并有肝脂变的肝组织中, 脂变的肝细胞多见于肝小叶的3区带, 伴肝细胞气球样变。

2.3 艾滋病患者肝组织中瘦素的表达 瘦素表达的阳性细胞主要位于汇管区及肝窦纤维化部位, 位于肝窦间质细胞的胞质中(图1A)。18例肝组织中, 瘦素表达的总阳性率为44.4%(8/18)。有肝脂变的肝组织中, 瘦素阳性表达占54.5%(6/11), 而无脂变的肝组织中, 瘦素阳性表达的仅占28.6%(2/7)(表2), 但两组比较无统计学差异($P>0.05$)。

2.4 艾滋病患者肝组织中CD68, TNF- α 的表达 肝组织中枯否氏细胞可以应用CD68 mAb标志。18

表 2 18例艾滋病肝脂变与无脂变的临床及实验室资料比较

	肝脂变组(<i>n</i> = 11)	无脂变组(<i>n</i> = 7)	<i>P</i> 值
年龄(岁)	37.5 ± 8.1	34.7 ± 14.5	0.600
性别(男%)	10(85.7)	6(90.9)	0.641
BMI(kg/m ²)	17.5 ± 2.1	17.1 ± 2.4	0.676
ALT(U/L)	40.5 ± 35.8	49.4 ± 49.1	0.684
AST(U/L)	122.8 ± 93.2	50.6 ± 16.7	0.408
TBIL(μmol/L)	28.3 ± 37.2	10.1 ± 4.1	0.606
ALP(U/L)	388.7 ± 810.8	135.8 ± 73.9	0.465
GGT(U/L)	202.6 ± 287.7	111.6 ± 113.1	0.478
TG(mmol/L)	1.9 ± 1.1	1.5 ± 0.6	0.504
CHO(mmol/L)	3.6 ± 1.5	2.9 ± 0.7	0.426
BFS(mmol/L)	5.7 ± 4.4	4.6 ± 3.0	0.597
Log(HIV load)	6.1 ± 0.6	6.0 ± 0.5	0.862
CD4 ⁺ 计数(× 10 ⁶ 个/L)	35.1 ± 28.4	83.2 ± 137.1	0.434
CD8 ⁺ 计数(× 10 ⁶ 个/L)	142.0 ± 93.0	515.6 ± 320.7	0.026
HAI分值	4.8 ± 3.6	3.9 ± 2.1	0.531
瘦素(阳性%)	6(54.5)	2(28.6)	0.278

BMI: 体质量指数; ALT: 血清丙氨酸氨基转移酶; AST: 天门冬氨酸氨基转移酶; TBIL: 总胆红素; ALP: 碱性磷酸酶; GGT: γ-谷氨酰转肽酶; TG: 甘油三酯; CHO: 总胆固醇; BFS: 空腹血糖; HIV load: HIV病毒载量; HAI: 组织学活动指数。

表 3 18例艾滋病患者中, TNF-α的表达与肝脂变的关系 *n*(%)

TNF-α	肝脂变组(<i>n</i> = 11)	无脂变组(<i>n</i> = 7)	<i>P</i> 值
-	0(0)	4(57.1)	0.012
+	8(72.7)	3(42.9)	
++	3(27.3)	0(0)	

例肝组织中均可见CD68阳性细胞, 主要分布于肝窦中, 汇管区也可见到。脂变组中72.7%的肝组织CD68阳性细胞增生活跃, 在脂变区较显著, 但增生程度在这两组中无显著性差异。TNF-α表达的阳性细胞主要见于单个核细胞及活化的肝星状细胞。有肝脂变的肝组织中均可见TNF-α的表达(图1B), 其中TNF-α弱表达的有8例(72.7%), TNF-α强表达的有3例(27.3%), 而无脂变的肝组织中, TNF-α弱表达的有3例(42.9%)(表3), 两组比较差异显著(*P* < 0.05)。

2.5 艾滋病患者肝脂变相关因素 本研究对这些患者的一般人口学资料, 如性别、年龄等, 临床及实验室资料, 如体质量指数、肝功能、血脂水平, 空腹血糖, HIV载量, CD4⁺细胞计数, CD8⁺细胞计数, 是否合并丙型肝炎感染与肝脂变的发生进行了相关性分析, 其中TNF-α, CD8⁺细胞计数在脂变组显著低于无脂变组外(*P* < 0.05), 其余因素均与艾滋病患者的肝脂变发生无显著相关性(表2)。

3 讨论

肝脂变是脂肪性肝病的组织学改变之一, 脂肪性肝病包括酒精性肝病和非酒精性脂肪性肝病, 其中非酒精性脂肪性肝病的发病率不断增加。目前, 我国的艾滋病感染者已由高危人群向一般人群扩散, 脂肪肝也成为艾滋病患者较常见的肝脏组织学表现。在欧美国家, 通过艾滋病患者的肝活检及尸解研究发现脂肪肝的发生率超过30%^[9-10]。而国内艾滋病患者的肝脂变发生率则未见报道。本研究通过对14例艾滋病患者的尸解资料及4例肝活检资料的研究发现脂肪肝的发生率为61.1%, 较欧美国家的报道明显增加, 分析原因包括: (1)本组资料多为艾滋病尸解资料, 而艾滋病尸解患者多为艾滋病终末期。(2)这些尸解患者普遍存在恶液质及严重营养不良, 从而引起脂肪代谢紊乱。(3)这些患者常合并多种机会性感染, 感染引发的毒血症及脓毒血症可加剧营养不良及脂肪代谢紊乱。

Sutinen *et al*^[11]报道HARRT治疗可能增加脂肪性肝病发生的危险因素如肥胖, 脂肪性营养不良及胰岛素抵抗。本研究中的艾滋病尸解患者多为2001年以前的患者, 那时我国尚罕有使用HARRT治疗者。本组病例中仅有1例患者接受过HARRT治疗。另外, 美国学者Gaslightwala *et al*^[12]的研究认为: 肝脂变在HIV合并HCV感染

■创新盘点

本研究为国内首次研究艾滋病患者的肝脂变的特点及脂肪因子在肝脂变中的作用及意义。

■同行评价

本文选题新颖,方法得当,数据可靠,虽然样本例数过少,但提供了一些很明确的数据,为艾滋病患者肝脂变的研究提供了真实的数据。

者中更常见及更严重。本组病例中有3例患者合并HCV感染,但合并HCV感染对肝脂变未见明显影响。这可能与本组病例较少有关,因此尚需要积累更多的资料。

瘦素是瘦素基因的产物,通过与瘦素受体结合发挥其生理效应,增加能量消耗,抑制脂肪合成^[2]。有研究表明,NAFLD患者往往伴有高瘦素血症,这与一些刺激脂肪细胞瘦素合成和(或)分泌的因素,如细胞因子、性激素、胰岛素和皮质醇的水平增加有关,从而调节脂肪细胞瘦素基因表达的信号机制,使脂肪组织释放瘦素增加,而瘦素水平与肝脏的脂肪变性程度呈正相关^[13-14]。但瘦素引起肝脏脂肪变性的机制尚不明确,可能的原因是当瘦素水平升高时,引起胰岛素抵抗,脂肪变性呈渐进性加重^[15],同时,瘦素还能增强肝脏枯否细胞对TNF- α 、白介素6(IL-6)、IL-12等细胞因子的分泌,促进肝细胞的变性坏死^[16]。卢建华 *et al*^[6]应用免疫组织化学法研究HBV感染者肝组织中瘦素的表达,发现肝脂变对瘦素表达无影响,说明肝组织原位瘦素的表达不是脂变所导致,而可能是肝组织损伤修复机制所引起。本研究的结果显示,艾滋病患者肝组织瘦素的原位表达虽然脂变组阳性率高于无脂变组,但统计学处理未显示差异。进一步检测肝组织中CD68及TNF- α 的表达,发现脂变组CD68及TNF- α 的阳性表达显著高于无脂变组,提示艾滋病患者肝脂变可能与炎症因子TNF- α 的分泌增加有关。由于本组病例未检测患者血清胰岛素水平,无法测算是否存在胰岛素抵抗;而且本组病例较少,增加研究病例数是否增加艾滋病患者中肝脂变与瘦素的原位表达的相关性,尚需进一步研究。

另外,本研究中还发现一个有趣的现象:CD8⁺ T淋巴细胞胞计数在脂变组显著低于无脂变组。CD8⁺细胞为细胞毒性T淋巴细胞,在艾滋病感染者中能够杀死被艾滋病病毒感染的细胞,因此CD8⁺细胞在艾滋病病毒清除中起重要作用。因此,艾滋病患者的脂变是否与HIV病毒的复制及机体免疫状态有关,尚需要进一步研究。

总之,本研究的结果表明,本组病例艾滋病患者中肝脂变发生率较高,肝脂变的发生与瘦素的表达未见明显相关,而可能与肝组织损伤修复机制有关。

参考文献

- 1 Ristig M, Drechsler H, Powderly WG. Hepatic steatosis and HIV infection. *AIDS Patient Care STDS* 2005; 19: 356-365
- 2 Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 413-437
- 3 Kaplan LM. Leptin, obesity, and liver disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 997-1001
- 4 Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435
- 5 Altıparmak E, Koklu S, Yalinkilic M, Yuksel O, Cicek B, Kayacetin E, Sahin T. Viral and host causes of fatty liver in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3056-3059
- 6 卢建华, 刘勇钢, 郎振为, 刘玉珍, 侯军良, 段毅利, 梅志勤, 叶立红. 慢性乙型肝炎患者肝组织瘦素的表达. *中华传染病杂志* 2007; 25: 177-178
- 7 丁效蕙, 赵景民, 孙艳玲, 周光德, 潘登, 杨建法, 赵雨来. 非酒精性脂肪性肝组织TNF- α 、TGF- β 和Leptin的表达及意义. *解放军医学杂志* 2006; 31: 750-754
- 8 Albisetti M, Braegger CP, Stallmach T, Willi UV, Nadal D. Hepatic steatosis: a frequent non-specific finding in HIV-infected children. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 971-974
- 9 Poles MA, Dieterich DT, Schwarz ED, Weinshel EH, Lew EA, Lew R, Scholes JV. Liver biopsy findings in 501 patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 11: 170-177
- 10 Trojan A, Kreuzer KA, Flury R, Schmid M, Schneider J, Schröder S. [Liver changes in AIDS. Retrospective analysis of 227 autopsies of HIV-positive patients] *Pathologe* 1998; 19: 194-200
- 11 Sutinen J, Häkkinen AM, Westerbacka J, Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Halavaara J, Järvinen A, Ristola M, Yki-Järvinen H. Increased fat accumulation in the liver in HIV-infected patients with antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *AIDS* 2002; 16: 2183-2193
- 12 Gaslightwala I, Bini EJ. Impact of human immunodeficiency virus infection on the prevalence and severity of steatosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2006; 44: 1026-1032
- 13 Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002; 36: 403-409
- 14 戚丽, 路中. 非酒精性脂肪肝胰岛素抵抗及血清瘦素和脂联素水平的研究. *中国中西医结合消化杂志* 2006; 14: 167-170
- 15 Sweeney G, Keen J, Somwar R, Konrad D, Garg R, Klip A. High leptin levels acutely inhibit insulin-stimulated glucose uptake without affecting glucose transporter 4 translocation in l6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2001; 142: 4806-4812
- 16 Nicolás JM, Fernández-Solà J, Fatjó F, Casamitjana R, Bataller R, Sacanella E, Tobías E, Badía E, Estruch R. Increased circulating leptin levels in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 83-88

编辑 李军亮 电编 何基才

支架成形术在食管良恶性狭窄中的应用进展

李 烽, 程英升

李烽, 程英升, 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
作者贡献分布: 本文写作由李烽完成; 指导及审校由程英升完成.
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.chengyish@vip.163.com
电话: 021-64823392
收稿日期: 2008-07-02 修回日期: 2008-07-26
接受日期: 2008-07-29 在线出版日期: 2008-09-08

Application progress of stent placement in esophageal malignant and benign stenosis

Feng Li, Ying-Sheng Cheng

Feng Li, Ying-Sheng Cheng, Department of Radiology, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University; Institute of Medical Imaging, 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 Medical Imaging, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China. cjr.chengyish@vip.163.com
Received: 2008-07-02 Revised: 2008-07-26
Accepted: 2008-07-29 Published online: 2008-09-08

Abstract

Stent placement is widely used for palliation of dysphagia caused by advanced esophageal carcinoma. As the development of technology, many new stents are being used for clinical therapy. Some stents are added with anti-reflux valve or retrievable device, some are loaded with ^{125}I ; the biodegradable stent are even invented. Improvement of stents can decrease many complications while elevate survival rates. Several nonsurgical palliative modalities including endoluminal laser therapy, photodynamic therapy, electrocoagulation and brachytherapy are available to recanalize malignant stenosis, but the fastest palliative method is stent placement. Reports about treating benign esophageal stricture with stents are increasing, and temporary and biodegradable stents have a better effect.

Key Words: Esophageal stenosis; Stent; Biodegradable stent

Li F, Cheng YS. Application progress of stent placement in esophageal malignant and benign stenosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2841-2847

摘要

支架成形术目前已广泛用于改善晚期食管癌所致的吞咽困难. 随着食管支架的不断改进, 现在有许多新的支架用于临床治疗. 这些支架在原来的基础上增加抗反流瓣膜、装有可回收装置或载有 ^{125}I 颗粒等以及出现生物可降解支架. 支架的改进能减少并发症并提高生存率. 许多非手术性姑息方法如腔内激光治疗、光动力疗法、电凝及腔内近距离放射治疗都用来治疗食管狭窄, 但最迅速缓解症状的方法就是食管支架成形术. 支架治疗良性食管狭窄的报道也不断增多, 应用暂时性支架及生物可降解支架可以很好地改善效果.

关键词: 食管狭窄; 支架; 生物可降解支架

李烽, 程英升. 支架成形术在食管良恶性狭窄中的应用进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2841-2847
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2841.asp>

0 引言

在我国食管癌是常见的胃肠道肿瘤, 中晚期食管癌患者由于进行性吞咽困难, 造成营养不良, 严重影响生活质量. Atkinson *et al*^[1]于20世纪70年代介绍了内镜下插入塑料假体治疗吞咽困难, 但那些支架的直径较小(10-12 mm), 导致很多患者很难恢复正常饮食. 塑料假体的并发症发生率相对较高, 而自膨式金属支架(SEMS)有更小的引导器, 他们更灵活并有更大的内径^[2]. Frimberger *et al*^[3]1983年首次描述在内镜引导下放置扩张的螺旋式支架, 而Domschke *et al*^[4]则首次应用Wallstent支架治疗食管癌性狭窄.

食管良性狭窄的治疗一般采用食管扩张术, 其可分为球囊扩张和探条扩张两种. 对于球囊扩张难以治疗的食管良性狭窄, 可考虑使用支架治疗. 现在越来越多的文献报道使用支架成形术治疗顽固性良性狭窄, 由于长期放置并

■背景资料

支架成形术目前已广泛用于改善晚期食管癌所致的吞咽困难, 随着食管支架的不断改进, 现在有许多新的支架用于临床治疗. 支架治疗良性食管狭窄的报道也不断增多, 应用暂时性支架及生物可降解支架可以很好地改善效果.

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室; 曹秀峰, 主任医师, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

■ 研发前沿

生物可降解支架和食管内照射支架分别初步用于食管良恶性狭窄取得了较好的临床效果,但药物缓释支架目前临床上还没有应用到对食管病变的治疗。

发症较多,因而需要一段时间后取出支架。对于良性狭窄,更重要的是要预防长期并发症的发生,因为患者的预后与狭窄的原因无关^[5]。如果支架能在保持扩张的同时可以逐渐降解,那将治疗良性狭窄的理想方法。从这点来说,生物可降解材料制成的支架则是处理良性狭窄最好的方法之一^[5-7]。

1 食管支架成形术的适应证和禁忌证

1.1 适应证 恶性食管狭窄、食管气管瘘^[8-12]、食管胃吻合口瘘或狭窄^[9,12]、食管以及贲门癌放化疗后狭窄^[13]、球囊扩张无效和不适合手术的食管良性狭窄、内镜下黏膜下层剥离所致狭窄(ESD)^[14]、贲门失弛缓症^[15]、食管穿孔和纵隔或气管肿瘤引起的食管受压^[16]。

1.2 禁忌证 食管支架置入没有绝对的禁忌证,相对禁忌证有:严重心、肺功能衰竭、严重恶液质、凝血功能障碍、接近声带的高位食管狭窄、胃十二指肠梗阻^[2]、预期寿命很短或病情严重的患者、近期(3-6 wk)实施过大剂量放、化疗的患者,因其可加重出血和穿孔^[2]。

2 食管支架成形术在食管恶性狭窄中的应用

2.1 支架的类型与选择 食管支架成形术是治疗恶性肿瘤所致食管狭窄的一种非常安全和有效的方法,他可以持久缓解吞咽困难并提高患者的生活质量(QOL)。Maraju *et al*^[17]用SEMS治疗后患者的生存质量评分由治疗前的62-94分提高到80-133分。支架置入后多会产生相应的并发症,如支架移位、肿瘤长入或(和)肉芽组织的过度生长、食管阻塞、食管瘘、再狭窄和反流等,Homann *et al*^[18]应用支架治疗时产生迟发性并发症的发生率达53.4%。并发症产生的原因有两类,一类是与支架有关,另一类是因为肿瘤的病理生理过程。为了减少并发症的产生,支架的设计与选择也非常重要。支架根据其材料的不同有金属支架和塑料支架两种。金属支架有镍钛合金支架(Ultraflex支架、Niti-S支架、Choo-支架、Do-支架和Song-支架)和不锈钢支架(Flamingo支架和Gianturco-Rosch Z-支架)。支架腔内外表面被覆覆膜的称为覆膜支架(covered stent),有全覆膜和部分覆膜两种。如覆膜型SEMS(Ultraflex支架)的中间部分有聚氨基甲酸酯薄层覆膜,近端和远端则裸露。而SEPS(Polyflex支架)是一种聚酯网状支架,其内表面全部内垫有硅胶膜而两端也无裸露部分,硅胶膜可以预防黏膜增生或肿瘤长入。

虽然Ultraflex支架和Polyflex支架都能有效地解决吞咽困难,但Polyflex支架由于材料的特性不同,其并发症的发生率很高,目前临床上已很少再使用^[19-20]。对于肿瘤引起的食管狭窄,为了防止支架置入后因新生物长入而形成再狭窄,应优先选择覆膜支架^[21],现在也几乎很少再使用无覆膜支架来治疗恶性食管狭窄。对于食管气管瘘或食管穿孔的患者则毫无疑问使用覆膜支架。不管是全覆膜还是部分覆膜支架,支架移位的发生率比无覆膜支架要高。大口径的支架可以减少因支架移位、食物阻塞引起再发吞咽困难,但他增加与支架相关的并发症^[13]。特殊设计的Ultraflex支架和Niti-S支架可明显减少支架移位^[19],特别是Niti-S支架,他的近端和远端口径宽而中间窄,成哑铃状,其双层设计使网丝嵌入食管壁而更好地防止支架移位,文献称Niti-S支架移位的发生率为7%-12%^[19-22]。普通支架一般不能达到对肿瘤本身治疗的目的,只是对症治疗,而放射性支架和药物缓释食管支架可以有望解决这个问题。早期Won *et al*^[23]将放射性核素¹⁶⁶Ho浸透到自膨支架外层的聚氨酯膜上进行动物实验,最近有学者将¹²⁵I粒子固定在支架的外面做成放射性支架^[24-26]用于临床取得了较好的效果。药物缓释支架^[27](drug-eluting stent)是一种可携带药物的支架,现已经广泛应用于冠心病的介入治疗。药物缓释食管支架理论上是能够对食管病变进行药物治疗,但目前没有任何相关临床试验的报道,他可能有望成为支架成形术需改进的另一个方向。

2.2 支架成形术在食管恶性狭窄中的应用进展 食管癌最多发生于食管中段,其次为下段,上段最少。对于食管中段的食管狭窄,支架置入非常安全、有效^[16-20]。而在食管上、下括约肌附近的肿瘤,由于解剖学上的原因,在支架置入时与中段相比有着更高的危险性或并发症。在食管远端或食管贲门交界处的病变,通过食管支架产生有症状的胃食管反流是很常见的,而且据报道食管远端支架移位的比率比食管上2/3部位高出40%^[28]。为了解决这些问题,许多学者发明了许多带有抗反流机制的新支架。Dua *et al*^[29]设计出一种改进的带有“风向袋”样防反流瓣膜的自膨式Z-支架(Dua-支架),而且报道认为他可以和常规支架一样减轻吞咽困难并可以有效防止反流。Wenger *et al*^[30]通过随机试验支持Dua-抗反流支架可实用于临床实践,因为他与普通支架相比没有更多增加并发症、降低生存率、恶化

临床症状或降低生存质量的风险. Shim *et al*^[31]设计的新型支架(S-型长叶片瓣膜)比普通支架及Do-支架明显更有效地预防食管反流. Power *et al*^[32]通过随机对照临床试验表明抗反流支架比普通支架更好地减轻胃食管反流症状并能很好地缓解吞咽困难, 得到较好的生活质量. 虽然抗反流支架可以防止反流和误吸, 但支架移位却仍是个没有解决的问题, 这也限制了他的使用. Schppmeyer *et al*^[33]通过长期随访发现胃食管交界处放置支架有很高的并发症(主要是支架移位、反流), 因而他们认为对于食管胃交界处的肿瘤并不推荐使用抗反流支架, 需要进一步对支架进行改进或应用其他方法如腔内放疗来治疗, 但对于期望寿命小于6 mo需要快速缓解症状则使用支架治疗^[33]. 也许随着支架的改进使得并发症不断减少, 抗反流支架会被首选用于治疗食管胃交界处的肿瘤.

颈段食管狭窄的处理是一个很有挑战性的问题, 处理方法也很局限. 颈段食管定义为咽食管交界处(C6水平)到胸廓入口(T1水平). 在C6水平有一段3 cm长的高压力区域称食管上括约肌. 由于操作困难, 在这一区域支架置入非常受限. 患者由于有异物感和因操作相关的并发症而感到很不适. 支架置入位置越高, 异物感越强. 基于这个原因, 早期把近食管入口(离食管上括约肌2 cm以内)的病变做为支架置入时的禁忌证, 近来有报道称不应再把这个区域当成禁忌证^[34]. 很多文献称支架成形术可以很好地解决吞咽困难而且手术相关并发症也很低^[34-39]. 颈段食管放置支架时主要有两个需要考虑的主要问题: 异物感和支架移位. 异物感产生的机制是复杂的, 他虽存在但是患者是可以耐受的, 而且随着时间推移异物感会减少^[34-35,39]. 支架近端移位如穿破食管, 则可以造成很严重的并发症, 有人报道支架移位形成食管主动脉瘘及侵入左颈总动脉形成动脉瘤致大出血^[40-41]. 虽然这种并发症不常见, 但却是致命的. Ultraflex支架用于颈段食管相对其他的金属支架要理想, 他的形态和特性可以减少移位, 但目前仍没有一种理想的支架可以彻底解决支架移位这个问题. 虽然有相当的并发症, 但对于晚期肿瘤患者, 他们的期望寿命比较短, 支架置入可以很快地缓解吞咽困难症状, 相对改善生活质量, 是颈段食管癌晚期患者的主要治疗方法.

晚期食管癌患者行食管支架成形术能提高患者的生活质量, 解决吞咽困难, 但对生存期的

延长并不显著, 是一种治标不治本的方法. 外放疗疗效确定, 但并发症高, 特别是安置支架后再行外放射术则更增加并发症的发生率, 与支架成形术前放疗或不放疗相比要大^[42]. 钴-60和镭-192腔内近距离放疗也广泛用于治疗食管癌. 腔内近距离放疗和支架置入术的对照研究表明^[43-44], 支架置入可以快速缓解吞咽困难, 而前者长期效果较好, 可以给一些生存期相对较长的患者提供更好的生活质量, 产生较少的并发症. 食管内照射支架(esophageal irradiation stent)则把这两者的优点很好地结合了起来. 这种支架把自膨式支架和¹²⁵I放射性粒子结合在一起, 其技术上的可行性和安全性已经在兔子模型上得到了很好的证实^[24]. 国内有学者将其初步用于临床治疗晚期食管癌患者得到了很好的效果, 除与普通支架一样可以快速缓解吞咽困难外, 患者中位生存期明显延长^[25-26], 并且随访发现近一半患者有肿瘤缩小^[25]. 用食管内照射支架治疗食管癌是一种标本兼治的方法, 很有潜力, 期待进一步研究来证实和完善.

3 食管成形术在食管良性狭窄中的应用

3.1 支架的类型与选择 金属支架广泛用于食管恶性狭窄, 而极少用于良性狭窄. 大部分金属支架是非外科手术无法取出的, 长期放置产生的后果也还不能确定, 而且可以产生致命并发症如移位、穿孔甚至穿破颈动脉及主动脉^[40-41]. 用于良性狭窄的支架应是暂时性的, 在病变修复的过程中可以维持在合适位置, 随后很容易取出, 并且避免再狭窄的发生. 目前有以下一些支架可以用于良性狭窄: (1)金属支架: 永久性镍钛合金支架由镍钛记忆合金丝编成, 无覆膜或部分覆膜. 不管有无覆膜, 由于支架移位、反流、再狭窄等并发症, 永久性镍钛合金支架治疗食管良性功能性狭窄的中长期效果较差^[15], 现已很少应用永久性金属支架治疗食管良性狭窄; (2)可回收自膨覆膜镍钛合金支架^[42,45-47]由0.2 mm的单根镍钛记忆合金丝编成, 并覆盖聚氨酯, 其近端和远端的直径较中间宽, 成喇叭口状或哑铃状. 在支架的近端, 有环绕管腔的2根尼龙绳由尼龙环固定在合金丝的内缘. 回收时用由钩丝和鞘组成的特制的支架回收系统, 在透视下抓住尼龙绳使支架近端缘塌陷而较易取出. 暂时性镍钛记忆合金支架是一种部分覆膜支架, 在导丝和透视帮助下置入, 3-7 d后用活检钳在内镜下取出, 取出前通过内镜注入500-1000 mL

■相关报道

Tanaka *et al*用聚乳酸单纤丝编成的支架最初将其用于2例患者(腐蚀性狭窄和吻合口狭窄各1例)取得很好的效果.

■创新盘点

本文根据国内外最新资料,介绍食管支架成形术在食管良恶性狭窄中的应用进展,特别是生物可降解支架和食管内照射支架的最新临床应用。

冰水缩小支架的直径^[15,48-50]。(3)生物可降解支架^[5,14,51]是由聚乳酸(左旋聚乳酸)单纤维编织而成,支架的径向力比那些常用的市售的金属支架还大。支架在几个月内逐渐降解并随着粪便排出,不用取出,也没有发生再狭窄。他是一种新型的很有前途的用于良性食管狭窄的支架。

3.2 支架成形术在食管良性狭窄中的应用进展对于良性食管狭窄的治疗,扩张术一直是最常用的方法。虽然他可以有效缓解症状,但不能持续很长时间,患者因为再发狭窄而需多次行扩张术。狭窄的类型不同,其发生再狭窄的可能性也不一样,因此,区分简单性狭窄和复杂性狭窄是很有必要的^[52]。简单性狭窄定义为狭窄是局限的,较直的且直径可以通过常规的内镜。复杂性狭窄则为较长的(>2 cm),扭曲的或直径不能通过常规内镜的狭窄。如果复杂性狭窄不能扩张到足以通过固体食物,在每隔2-4 wk内就会发生再狭窄或需要持续扩张(>7-10次),则他们就被认为是顽固性狭窄^[52]。特别是放射性或酸碱腐蚀性损伤引起的狭窄和吻合口狭窄,对扩张术是最抵抗的^[52]。对于简单狭窄,则很适合球囊扩张。对于复杂性、顽固性或球囊扩张失败的良性狭窄,暂时性支架置入则是一种很好的方法。

国内外许多学者应用不同的支架治疗良性狭窄都取得了很好的效果^[5,14-15,45-55]。早期Song *et al*^[53]通过随访发现用可膨式金属支架治疗食管良性狭窄长期效果不好而且因支架移位和新狭窄形成而引起的并发症的发生率很高。无覆膜支架置入后最常见的并发症就是肉芽组织通过支架网长入,最早可发生在支架置入后2-6 wk^[45]。Song *et al*^[47]设计的可回收覆膜镍钛记忆合金支架可以较有效地克服常规金属支架带来的问题,患者很好地耐受支架置入和取出。初步应用于25名患者后最初的缓解率为100%,在支架取出后7 wk累积缓解率呈现出平稳状态,在支架的两端由于增生可引起新的狭窄,新狭窄在支架取出后可以改善,且对球囊扩张的反应较好^[47]。虽然支架置入后4-8 wk曾被认为是取出支架最合适的时间,因为那段时间很少发生新的狭窄^[53],但Song *et al*^[47]的研究中近一半患者的新狭窄却发生在支架置入后2-6 wk。因此, Song *et al*认为支架取出的最适宜时间仍是不确定的,他们常规选择在狭窄形成时取出支架,为了观察狭窄形成,患者需要每2 wk做1次内镜或食管造影^[47]。Siersema *et al*^[45]用部分覆膜Ultraflex支架治疗良性狭窄,一般放置4-6 wk后取出。国内

生产的暂时性镍钛记忆合金支架取出更为方便,暂时放置3-7 d后从内镜孔中注入500-1000 mL冰水,使支架直径变小再经内镜取出。Cheng *et al*^[48]在研究中发现支架移位多发生在1 wk以内,支架在第3-4天还容易取出,在第5天就比较难,第6-7天变得非常难以取出。暂时性金属支架取出的最适宜时间也尚不确定。研究中发现,支架的直径越大,中远期的治疗效果越好,但要确定最理想的直径尚需进一步研究^[15]。对用暂时性贲门支架成形术治疗贲门失弛缓症的远期随访发现,30 mm直径暂时性贲门支架是最佳的选择^[55]。暂时性支架在体内一般放置3-7 d,放置后随着体内温度的上升,支架逐渐展开,可以引起平滑肌的慢性撕裂,而且平滑肌的撕裂相对比较规则,相对形成较少的疤痕组织,因此,再狭窄的发生率比较低^[48-50]。再者,暂时性部分覆膜支架近端1-2 cm为无覆膜区,可以有效增加支架的稳定性。对于食管良性狭窄,尤其是对贲门失弛缓症患者的治疗,暂时性部分覆膜支架成形术是首选的方法^[48-50]。许多研究表明^[15,45,47-50,54-55],可回收覆膜镍钛记忆合金支架和暂时性部分覆膜金属支架都是治疗良性食管狭窄(包括儿童^[54])的一种安全、有效的方法,而暂时性放置的部分覆膜支架比无覆膜和全覆膜支架更能有效地防止支架移位和肉芽组织长入,中远期治疗效果都很好,他将成为非外科方式处理胃肠道良性狭窄的最好的方法之一^[15,48-50]。

生物可降解支架^[5,14,51]是治疗良性狭窄理想的方法,他可以让患者免除支架再取出。Tanaka *et al*^[5]用聚乳酸单纤维编成的支架最初将其用于2例患者(腐蚀性狭窄和吻合口狭窄各1例)取得很好的效果。在支架置入过程中没有并发症,在10-15 d支架移位并随粪便一起经肠道排出,没有任何并发症,在随后的6 mo的随访中也没有再狭窄发生。Saito *et al*^[51]应用生物可降解支架治疗13例食管良性狭窄患者取得同样类似的效果。10例支架在10-21 d自发移位并随肠道排出,没有任何并发症,随访7 mo-2年没有患者有再狭窄症状。特别是对于早期食管癌行内镜下黏膜下剥离(ESD)后引起的狭窄有很好的效果^[14]。支架移位在研究中都可发现,自发支架移位可能与支架逐步降解后其径向力减小有关^[5,51]。要防止在还没达到足够的治疗效果前支架就自发移位,因此,也许有必要将支架固定在合适位置至少2 wk^[5]。虽然支架移位后经肠道排出没出现并发症,但是因支架移位带来可能的并发症如肠梗

阻还是要值得注意的。

4 食管支架成形术的并发症及处理

食管支架成形术并发症的发生与支架的材料、结构、操作者的操作技术以及病变的部位、性质和患者本身的因素有关。文献报道SEMS成形术并发症的发生率为26%-52%，操作相关的死亡率为2%-3%^[56]。其主要并发症及处理如下：(1)疼痛及异物感：疼痛多由于支架对食管壁的机械刺激和支撑作用造成的，食管上端神经丰富，更为敏感^[57]，且颈段食管支架成形术后5%-15%的患者有异物感^[45]。症状轻者无须特殊处理，严重者可服用镇痛剂。对于高位食管病变，使用Ultraflex支架是比较好的选择^[45]。(2)支架移位：这是一种常见并发症，支架移位的发生率与支架的设计和置入的部位有关^[18-22]，文献称覆膜Wallstent支架在胃食管交界处置入时支架移位的发生率高达50%^[18]，而Niti-S支架移位的发生率远低得多^[19-22]。对移位的支架可采用内镜下调整、取出或重新置入第二个支架^[19]。Homann *et al*^[18]则支持一种观察-等待策略，因为移位的支架可能通过肠道自发排出。(3)再狭窄：肿瘤组织、肉芽组织、纤维组织在覆膜支架两端过度生长或沿无覆膜支架网孔向内长入均可导致管腔再狭窄的发生。组织长入或过度生长引起再狭窄的发生率为19%-31%^[18-19,45]。处理方法可以采用腔内放疗、微波、激光、局部注射化疗药物，也可以置入第二枚支架^[18,45,57-58]。(4)反流性食管炎：多发生在吻合口或食管胃交界处，目前有多种抗反流支架，此症状发生较少，术后可配合抑酸抗反流治疗。(5)食物嵌顿：多为吞咽大块食物、过早进食粗食所致，嵌顿食物可用内镜取出或推入。(6)其他并发症：如出血、穿孔等，这些并发症的发生率非常低，但却是致命的并发症^[59]。如果支架穿破动脉引起大出血，几乎没有抢救机会^[40-41,57]。一般的出血多为食管本身的出血，可推注止血药、血管收缩药甚至介入栓塞治疗。支架置入后引起的食管穿孔可以采用取出先前的支架而放置另一枚支架来处理^[59]。

5 结论

目前食管支架成形术广泛用于食管恶性狭窄，其缓解吞咽困难的效果是明显的。但支架移位和肿瘤生长或(和)肉芽组织长入引起的再狭窄仍是2个最主要的问题。食管内照射支架理论上标本兼治，目前却还不能准确测定载有¹²⁵I粒

子支架的放射剂量，而且也没有相关放射治疗的标准定量数据^[25]，有待以后更多的研究来解决这些问题。暂时性放置可回收金属覆膜支架可以安全有效地治疗良性狭窄，但支架取出的最适宜的时间尚未能确定。药物缓释支架目前临床上还没有应用到对食管病变的治疗。生物可降解支架治疗良性狭窄效果显著，潜力很大，并有望用于药物传递系统。但目前应用较少，未来需要更多研究和长期随访来评估这些支架的有效性，以及研究这些支架降解消失与狭窄开放之间的关系^[14]。

6 参考文献

- Atkinson M, Ferguson R. Fibreoptic endoscopic palliative intubation of inoperable oesophagogastric neoplasms. *Br Med J* 1977; 1: 266-267
- Sabharwal T, Morales JP, Salter R, Adam A. Esophageal cancer: self-expanding metallic stents. *Abdom Imaging* 2005; 30: 456-464
- Frimberger E. Expanding spiral--a new type of prosthesis for the palliative treatment of malignant esophageal stenoses. *Endoscopy* 1983; 15 Suppl 1: 213-214
- Domschke W, Foerster EC, Matek W, Rödl W. Self-expanding mesh stent for esophageal cancer stenosis. *Endoscopy* 1990; 22: 134-136
- Tanaka T, Takahashi M, Nitta N, Furukawa A, Andoh A, Saito Y, Fujiyama Y, Murata K. Newly developed biodegradable stents for benign gastrointestinal tract stenoses: a preliminary clinical trial. *Digestion* 2006; 74: 199-205
- Saito Y, Minami K, Kaneda H, Okada T, Maniwa T, Araki Y, Imamura H, Yamada H, Igaki K, Tamai H. New tubular bioabsorbable knitted airway stent: feasibility assessment for delivery and deployment in a dog model. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 1438-1440
- Tsuji T, Tamai H, Igaki K, Kyo E, Kosuga K, Hata T, Okada M, Nakamura T, Komori H, Motohara S, Uehata H. Biodegradable Polymeric Stents. *Curr Interv Cardiol Rep* 2001; 3: 10-17
- 蒋霆辉, 茅爱武, 高中度, 范红. 金属带膜支架治疗恶性食管支气管瘘的临床研究. *生物医学工程与临床* 2003; 7: 37-38
- 徐美东, 姚礼庆, 钟芸诗, 周平红, 陈巍峰, 张轶群. 覆膜金属支架治疗晚期食管癌的临床价值. *中国临床医学* 2006; 13: 929-931
- Baltayiannis N, Magoulas D, Bolanos N, Anagnostopoulos D, Kaya A, Kontogiannopoulos Ch, Nicolouzos S, Georgiannakis E, Kastrinaki K, Kayiani E, Chatzimichalis A. Expandable wallstents for treatment of tracheoesophageal fistulas of malignant origin. *J BUON* 2006; 11: 457-462
- Shin JH, Song HY, Ko GY, Lim JO, Yoon HK, Sung KB. Esophagorespiratory fistula: long-term results of palliative treatment with covered expandable metallic stents in 61 patients. *Radiology* 2004; 232: 252-259
- 王盛根, 王寿九, 涂金兰, 谷丽娟, 曾庆菊, 吴玉纯. 超细胃镜在食管金属支架置放中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2349-2353
- Verschuur EM, Steyerberg EW, Kuipers EJ, Siersema PD. Effect of stent size on complications

■名词解释

内镜下黏膜下剥离(ESD): 是内镜下处理早期食管癌的新近发展的一种技术, 外科医生可以将病灶整块地切除, 患者生活质量远好于食管切除术, 但黏膜切除超过管壁圆周的3/4就可以引起食管狭窄。

■同行评价

本综述信息量大,观点新,对临床应用有一定指导意义。

- and recurrent dysphagia in patients with esophageal or gastric cardia cancer. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 592-601
- 14 Saito Y, Tanaka T, Andoh A, Minematsu H, Hata K, Tsujikawa T, Nitta N, Murata K, Fujiyama Y. Novel biodegradable stents for benign esophageal strictures following endoscopic submucosal dissection. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 330-333
- 15 Cheng YS, Li MH, Chen WX, Zhuang QX, Chen NW, Shang KZ. Follow-up evaluation for benign stricture of upper gastrointestinal tract with stent insertion. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2609-2611
- 16 Ott C, Ratiu N, Endlicher E, Rath HC, Gelbmann CM, Schölmerich J, Kullmann F. Self-expanding Polyflex plastic stents in esophageal disease: various indications, complications, and outcomes. *Surg Endosc* 2007; 21: 889-896
- 17 Maroju NK, Anbalagan P, Kate V, Ananthakrishnan N. Improvement in dysphagia and quality of life with self-expanding metallic stents in malignant esophageal strictures. *Indian J Gastroenterol* 2006; 25: 62-65
- 18 Homann N, Noftz MR, Klingenberg-Noftz RD, Ludwig D. Delayed complications after placement of self-expanding stents in malignant esophageal obstruction: treatment strategies and survival rate. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 334-340
- 19 Verschuur EM, Repici A, Kuipers EJ, Steyerberg EW, Siersema PD. New design esophageal stents for the palliation of dysphagia from esophageal or gastric cardia cancer: a randomized trial. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 304-312
- 20 Conio M, Repici A, Battaglia G, De Pretis G, Ghezzi L, Bittinger A, Messmann H, Demarquay JF, Bianchi S, Togni M, Conigliaro R, Filiberti R. A randomized prospective comparison of self-expandable plastic stents and partially covered self-expandable metal stents in the palliation of malignant esophageal dysphagia. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2667-2677
- 21 Saranovic Dj, Djuric-Stefanovic A, Ivanovic A, Masulovic D, Pesko P. Fluoroscopically guided insertion of self-expandable metal esophageal stents for palliative treatment of patients with malignant stenosis of esophagus and cardia: comparison of uncovered and covered stent types. *Dis Esophagus* 2005; 18: 230-238
- 22 Verschuur EM, Homs MY, Steyerberg EW, Haringsma J, Wahab PJ, Kuipers EJ, Siersema PD. A new esophageal stent design (Niti-S stent) for the prevention of migration: a prospective study in 42 patients. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 134-140
- 23 Won JH, Lee JD, Wang HJ, Kim GE, Kim BW, Yim H, Han SK, Park CH, Joh CW, Kim KH, Park KB, Shin KM. Self-expandable covered metallic esophageal stent impregnated with beta-emitting radionuclide: an experimental study in canine esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 53: 1005-1013
- 24 Guo JH, Teng GJ, Zhu GY, He SC, Deng G, He J. Self-expandable stent loaded with 125I seeds: feasibility and safety in a rabbit model. *Eur J Radiol* 2007; 61: 356-361
- 25 Guo JH, Teng GJ, Zhu GY, He SC, Fang W, Deng G, Li GZ. Self-expandable esophageal stent loaded with 125I seeds: initial experience in patients with advanced esophageal cancer. *Radiology* 2008; 247: 574-581
- 26 郭金和, 滕皋军, 朱光宇, 何仕诚, 方文, 邓钢, 李国昭. 食管内照射支架治疗食管癌的临床对照研究. *中华放射学杂志* 2007; 41: 1120-1123
- 27 Vlaar PJ, Lennon RJ, Rihal CS, Singh M, Ting HH, Bresnahan JF, Holmes DR Jr. Drug-eluting stents in octogenarians: early and intermediate outcome. *Am Heart J* 2008; 155: 680-686
- 28 Bartelsman JF, Bruno MJ, Jensema AJ, Haringsma J, Reenders JW, Tytgat GN. Palliation of patients with esophagogastric neoplasms by insertion of a covered expandable modified Gianturco-Z endoprosthesis: experiences in 153 patients. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 134-138
- 29 Dua KS, Kozarek R, Kim J, Evans J, Medda BK, Lang I, Hogan WJ, Shaker R. Self-expanding metal esophageal stent with anti-reflux mechanism. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 603-613
- 30 Wenger U, Johnsson E, Arnelo U, Lundell L, Lagergren J. An antireflux stent versus conventional stents for palliation of distal esophageal or cardia cancer: a randomized clinical study. *Surg Endosc* 2006; 20: 1675-1680
- 31 Shim CS, Jung IS, Cheon YK, Ryu CB, Hong SJ, Kim JO, Cho JY, Lee JS, Lee MS, Kim BS. Management of malignant stricture of the esophagogastric junction with a newly designed self-expanding metal stent with an antireflux mechanism. *Endoscopy* 2005; 37: 335-339
- 32 Power C, Byrne PJ, Lim K, Ravi N, Moore J, Fitzgerald T, Keeling PW, Reynolds JV. Superiority of anti-reflux stent compared with conventional stents in the palliative management of patients with cancer of the lower esophagus and esophagogastric junction: results of a randomized clinical trial. *Dis Esophagus* 2007; 20: 466-470
- 33 Schoppmeyer K, Golsong J, Schiefke I, Mössner J, Caca K. Antireflux stents for palliation of malignant esophagocardial stenosis. *Dis Esophagus* 2007; 20: 89-93
- 34 Eleftheriadis E, Kotzampassi K. Endoprosthesis implantation at the pharyngo-esophageal level: problems, limitations and challenges. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2103-2108
- 35 Cindoruk M, Karakan T. Management of cervical esophageal strictures with self-expanding metallic stents. *Turk J Gastroenterol* 2006; 17: 294-297
- 36 Profili S, Meloni GB, Feo CF, Pischedda A, Bozzo C, Ginesu GC, Canalis GC. Self-expandable metal stents in the management of cervical oesophageal and/or hypopharyngeal strictures. *Clin Radiol* 2002; 57: 1028-1033
- 37 Verschuur EM, Kuipers EJ, Siersema PD. Esophageal stents for malignant strictures close to the upper esophageal sphincter. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 1082-1090
- 38 Shim CS, Jung IS, Bhandari S, Ryu CB, Hong SJ, Kim JO, Cho JY, Lee JS, Lee MS, Kim BS. Management of malignant strictures of the cervical esophagus with a newly-designed self-expanding metal stent. *Endoscopy* 2004; 36: 554-557
- 39 茅爱武, 高中度, 李国芬, 蒋霆辉, 胡旋, 吴浩如, 杨仁杰, 肖湘生. 颈段高位食管恶性梗阻的介入治疗. *介入放射学杂志* 2003; 12: 362-364
- 40 Unosawa S, Hata M, Sezai A, Niino T, Yoda M, Shimura K, Furukawa N, Minami K. Surgical treatment of an aortoesophageal fistula caused by stent implantation for esophageal stenosis: report of a case. *Surg Today* 2008; 38: 62-64
- 41 Ali AT, Kokoska MS, Erdem E, Eidt JF. Esophageal

- stent erosion into the common carotid artery. *Vasc Endovascular Surg* 2007; 41: 80-82
- 42 Song HY, Lee DH, Seo TS, Kim SB, Jung HY, Kim JH, Park SI. Retrievable covered nitinol stents: experiences in 108 patients with malignant esophageal strictures. *J Vasc Interv Radiol* 2002; 13: 285-293
 - 43 Homs MY, Steyerberg EW, Eijkenboom WM, Tilanus HW, Stalpers LJ, Bartelsman JF, van Lanschot JJ, Wijrdeman HK, Mulder CJ, Reinders JG, Boot H, Aleman BM, Kuipers EJ, Siersema PD. [Palliative treatment of esophageal cancer with dysphagia: more favourable outcome from single-dose internal brachytherapy than from the placement of a self-expanding stent; a multicenter randomised study] *Ned Tijdschr Geneesk* 2005; 149: 2800-2806
 - 44 Bergquist H, Wenger U, Johnsson E, Nyman J, Ejnell H, Hammerlid E, Lundell L, Ruth M. Stent insertion or endoluminal brachytherapy as palliation of patients with advanced cancer of the esophagus and gastroesophageal junction. Results of a randomized, controlled clinical trial. *Dis Esophagus* 2005; 18: 131-139
 - 45 Siersema PD. Treatment options for esophageal strictures. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 142-152
 - 46 Wong RF, Adler DG, Hilden K, Fang JC. Retrievable esophageal stents for benign indications. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 322-329
 - 47 Song HY, Jung HY, Park SI, Kim SB, Lee DH, Kang SG, Il Min Y. Covered retrievable expandable nitinol stents in patients with benign esophageal strictures: initial experience. *Radiology* 2000; 217: 551-557
 - 48 Cheng YS, Li MH, Chen WX, Chen NW, Zhuang QX, Shang KZ. Comparison of different intervention procedures in benign stricture of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 410-414
 - 49 Cheng YS, Li MH, Chen WX, Chen NW, Zhuang QX, Shang KZ. Selection and evaluation of three interventional procedures for achalasia based on long-term follow-up. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2370-2373
 - 50 Cheng YS, Li MH, Chen WX, Chen NW, Zhuang QX, Shang KZ. Temporary partially-covered metal stent insertion in benign esophageal stricture. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2359-2361
 - 51 Saito Y, Tanaka T, Andoh A, Minematsu H, Hata K, Tsujikawa T, Nitta N, Murata K, Fujiyama Y. Usefulness of biodegradable stents constructed of poly-L-lactic acid monofilaments in patients with benign esophageal stenosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3977-3980
 - 52 Lew RJ, Kochman ML. A review of endoscopic methods of esophageal dilation. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 117-126
 - 53 Song HY, Park SI, Do YS, Yoon HK, Sung KB, Sohn KH, Min YI. Expandable metallic stent placement in patients with benign esophageal strictures: results of long-term follow-up. *Radiology* 1997; 203: 131-136
 - 54 Zhang C, Yu JM, Fan GP, Shi CR, Yu SY, Wang HP, Ge L, Zhong WX. The use of a retrievable self-expanding stent in treating childhood benign esophageal strictures. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 501-504
 - 55 程英升, 李明华, 杨仁杰, 陈维雄, 陈尼维, 庄奇新, 尚克中. 不同直径暂时性贲门支架成形术治疗贲门失弛缓症的远期随访. *介入放射学杂志* 2006; 15: 673-676
 - 56 McLoughlin MT, Byrne MF. Endoscopic stenting-Where are we now and where can we go? *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3798-3803
 - 57 黄种文, 张起楷, 翁明珠, 余磊. 食管支架治疗恶性食管狭窄并发症分析与处理. *中国临床医学影像杂志* 2007; 18: 305-307
 - 58 王运东, 韩真. 食管带膜支架置入术后再狭窄的机制和治疗. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1193-1196
 - 59 Jung GS, Park SD, Cho YD. Stent-induced esophageal perforation: treatment by means of placing a second stent after removal of the original stent. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2008; 31: 663-668

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)

非酒精性脂肪肝分子发病机制的研究进展

钱林, 胡小宣

■背景资料

随着社会经济的发展, 非酒精性脂肪肝(NAFLD)成为常见肝病。现在定义为: 遗传-环境-代谢应激相关因素所致, 以肝细胞内脂肪堆积为主的临床病理综合征。其发病具体机制尚未清楚, 目前普遍认为与胰岛素抵抗(IR)密切相关。

钱林, 胡小宣, 湖南师范大学第一附属医院肝病内科 湖南省长沙市 410005

作者贡献分布: 本文综述由钱林完成; 审校由胡小宣完成。

通讯作者: 钱林, 410005, 湖南省长沙市解放西路61号, 湖南师范大学第一附属医院肝病内科. yoyouqianlin@163.com
电话: 0731-6686411

收稿日期: 2008-04-25 修回日期: 2008-07-18

接受日期: 2008-07-29 在线出版日期: 2008-09-08

Advance in the molecular pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease

Lin Qian, Xiao-Xuan Hu

Lin Qian, Xiao-Xuan Hu, Department of Hepatology, the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410005, Hunan Province, China

Correspondence to: Lin Qian, Department of Hepatology, the First Affiliated Hospital of Hunan Normal University, 61 Jiefang West Street, Changsha 410005, Hunan Province, China. yoyouqianlin@163.com

Received: 2008-04-25 Revised: 2008-07-18

Accepted: 2008-07-29 Published online: 2008-09-08

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a common liver disease and its incidence rate is increasing year by year. In this paper, we investigated and summarized the studies on the mechanisms of NAFLD in recent years, aiming at illustrating the roles of genes in NAFLD and their molecular mechanisms.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Molecular mechanism

Qian L, Hu XX. Advance in the molecular pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2848-2852

摘要

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种常见肝病, 且发病率有逐年增加的趋势。本文概述近年来国内外学者在NAFLD发病机制方面的主要成果和观点, 探讨在NAFLD发病中基因的作用, 旨在阐明NAFLD发病的分子机制。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 分子机制

钱林, 胡小宣. 非酒精性脂肪肝分子发病机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2848-2852

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2848.asp>

0 引言

随着社会经济的发展, 非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)成为常见肝病。其最早由Ludwig *et al*^[1]于1980年定义, 指女性肥胖症伴2型糖尿病的患者, 虽无饮酒史, 但肝脏病理类似于酒精性肝炎的综合征。现在定义为: 遗传-环境-代谢应激相关因素所致, 以肝细胞内脂肪堆积为主的临床病理综合征^[2], 包括肝细胞的脂肪沉积、脂肪性肝炎、肝纤维化和肝硬化。其发病具体机制尚未清楚, 目前普遍认为与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)密切相关^[3]。本文对近年来在NAFLD发病中瘦素基因、细胞色素P450基因、脂联素基因、肿瘤坏死因子基因、脂肪酸转运蛋白基因和解偶联蛋白基因的作用综述如下, 旨在探讨NAFLD发病的分子机制。

1 瘦素基因

1994年, Zhang *et al*^[4]发现了肥胖基因(ob基因)及其表达产物瘦素。人类的肥胖基因位于7号染色体长臂31带的7亚带, 长20 kb, 由3个外显子和2个内含子组成。主要是由脂肪细胞分泌的肽类激素, 其前体由166-167个氨基酸组成, 分泌入血的过程中去除由21个氨基酸组成的N端21信号肽, 形成145-146个氨基酸分泌型蛋白质瘦素, 即成熟瘦素。Oral *et al*^[5]观察到脂肪肝患者血中瘦素浓度有所降低, 肝细胞脂肪沉积。经补充瘦素后, 患者症状缓解, 肝脂肪沉积好转。说明瘦素缺乏是患者发生NAFLD的原因。瘦素基因主要在白色脂肪组织中表达, 在棕色脂肪组织中表达较少, 在其他不少组织也有表达。瘦素通过转录因子SREBP^[6]或神经肽(neuropeptide Y, NPY)^[7-8]发生作用, 抑制硬脂酰CoA去饱和酶-1(stearoyl-CoA desaturase, SCD, E.C. 1.14.99.5)基因的表达。

■同行评议者

陈国凤, 主任医师, 中国人民解放军第302医院感染七科; 王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

瘦素还可以增加外周组织的糖摄取及更新, 从而降低流入肝脏的葡萄糖. Mammès *et al*^[9]报道在肥胖人群中, 含瘦素基因-2548G/A等位基因G的血清瘦素水平比含等位基因A的明显增高, 因此等位基因A为NAFLD的保护基因. 瘦素受体的结构和功能的改变直接影响着瘦素的生物学功能. 陈韶华 *et al*^[10]通过研究发现LERP基因Lys109携带者腹壁脂肪厚度和体脂含量较Lys109Arg和Arg109Arg携带者明显升高, 而总胆固醇水平明显降低, 提示Lys109Lys基因型可能肥胖者脂质代谢起着保护性作用, 但至于瘦素受体基因Lys109Arg多态性是否与NAFLD的发病机制有关, 目前尚未明确. 另外, 与肥胖相关的基因还有编码11 β -羟基类固醇脱氢酶-1(11 β HSD-1)基因. Masuzaki *et al*^[11]发现在实验中转基因鼠中过度表达11 β HSD-1, 动物血中糖皮质激素浓度明显升高, 从而引起腹型肥胖和一系列代谢综合征. SCD是单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA)生物合成的限速酶, 是瘦素作用目的基因之一, 在脂肪酸代谢及能量平衡中起重要的调节作用^[12]. SCD是脂质代谢和体质量调节的关键控制点. 陆元善 *et al*^[13]发现经一段时间喂养脂饮食大鼠肝SCD-1 mRNA水平下降, SCD-1 mRNA水平下降可能与高脂喂养引起的内源性高瘦素血症有关.

2 细胞色素P450基因

细胞色素P450是一族相对非特异性酶, 广泛存在于机体内, 但主要存在于肝细胞内质网上, 负责外来物及某些体内代谢物质的生物转化, 此酶可被某些化合物(包括药物)诱导或抑制, 影响化合物在体内的代谢速度. 参与内源性和外源性物质(包括药物和环境污染物)代谢的细胞色素P450(CYP)主要有CYP1A、2E和3A. 史洪涛 *et al*^[14]利用免疫组织化学和Western blot方法测定肝细胞色素P4501A1表达变化, 逆转录聚合酶链反应测定肝细胞色素P4501A1 mRNA表达变化, 结果显示肝细胞色素P4501A1基因及蛋白表达随着脂肪肝程度的加重明显增强, 表明了NAFLD大鼠肝细胞色素P4501A1基因的表达变化与脂肪肝引起的肝脏损害程度密切相关, 肝细胞色素P4501A1参与了NAFLD的发生. 细胞色素P450 II E1(CYP II E1)是二甲基亚硝胺D-脱甲基酶, 主要在肝脏表达^[15-16], 参与许多内源性及外源性化合物的代谢. CYP II E1存在6种限制性内切酶片段长度多态性, 其中c2基因与酒精性脂肪肝发病有关^[17-19]. 细胞色素氧化酶

(cytochrome oxidase, COX)是线粒体内呼吸链电子传递的终末复合物, 是电子传递链的限速酶, 在线粒体氧化能力调节中起关键作用. COX与线粒体功能及细胞能量的产生密切相关, 其编码基因的改变、表达及酶活性的发挥对细胞在生理和病理情况下的机能、代谢和形态结构有直接影响. 已知COX有6-13个亚基, 所有哺乳动物真核细胞均由13个亚基组成, 其中最大的3个亚基(COX I、II和III)来源于线粒体. 史洪涛 *et al*^[20]研究发现NAFLD大鼠肝细胞COX I表达变化与脂肪肝引起的脂质过氧化反应以及肝脏损害程度密切相关, 肝细胞COX I可能参与了NAFLD的发生.

3 脂联素基因

脂联素(adiponectin)是Scherer *et al*^[21]近年发现的一种脂肪细胞特异性细胞因子, 其编码基因位于染色体3q27, 包括3个外显子和2个内含子, 其编码的蛋白质命名为Acrp30, 即小鼠Adiponectin. 脂联素以5-30 nmol/L的浓度存在于人类血清中, 他的空间构架有二聚体、三聚体和6个三聚体组成的多聚体高分子化合物. 脂联素是目前已知的唯一一个与肥胖呈负性相关的脂肪分泌蛋白. 肥胖者脂肪组织的脂联素基因表达明显降低^[22]. 脂联素降低与肥胖和IR存在密切联系, 可能是导致NAFLD发生的因素之一^[23]. Yamauchi *et al*^[24]发现脂联素通过降低肥胖鼠肌肉和肝脏中TG浓度, 可减轻IR. 脂联素基因敲除大鼠FFA清除率减慢, 肌肉脂肪酸转运蛋白-1的mRNA水平降低, 脂肪组织TNF- α 水平升高, IRS-1相关的PI-3K活性降低, 而给予脂联素后则可改善. Menzaghi *et al*^[25]在评价脂联素基因的变异性是否与IR相关中, 通过对413个非糖尿病的高加索患者的两种SNPs进行分析, 发现45位的T变为G, 276位的G变为T, 此脂联素多态性与IR关系密切. 而IR对于非酒精性脂肪肝(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)的发生发展来说至关重要^[26]. Kaser *et al*^[27]对13个NASH和9个单纯脂肪肝的患者的脂联素及其受体RI和RII基因的mRNA表达进行FBRT-PCR分析, 结果发现相对于单纯性脂肪肝, NASH患者的脂联素及其受体RII基因的mRNA显著减少, 而患者血清中未发现; RI基因的mRNA与对照组无明显差异. 此研究显示NASH与脂联素及其受体RII基因在病理生理中存在相关性. Vuppalanchi *et al*^[28]也得出相同的结论. NAFLD原发于IR相关的超重、肥胖、2型糖尿病和高脂血症等代谢

■研发前沿

由于缺乏足够的统计数据、没有统一的表型标准以及适合人群的选择, 对于目前所研究的基因存在极大的阻碍.

■相关报道

Huang *et al*对NAFLD的一般基因标志物进行研究, 分别对编码DDX5和MTP基因的SNP进行分析, 发现DDX5和MTP在NAFLD患者发展为NASH具有相关性, 但是还是需要行进一步的大规模的人群调查。

紊乱性疾病, 所以这些因素显得越发重要。Hara *et al*^[29]对糖尿病易感轨迹进行基因扫描, 发现其定位于3q27, 而这正是脂联素基因(APM1)所在。从而证明了APM1和2型糖尿病在45和276位点上存在着相关性。间接地反映了脂联素基因和NAFLD相关。

4 肿瘤坏死因子基因

人类肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)基因属HLA-III类基因, 定位于6号染色体P21.3上, 至少包含5种多态性的微卫星。其中TNF- α 基因和TNF- β 基因片段各长约3000个碱基对, 都包含4个外显子和3个内含子。TNF- α 和TNF- β 发挥生物学效应的天然形式是同源的二聚体。TNF- α 以两种形式存在, 即结合于细胞膜的26D的TNF- α 前体和可溶性的17D TNF- α 活性型。后者以三聚体形式与细胞表面的TNF受体(TNFR)结合, 介导多种生物学活性。

TNF- α 在NAFLD的发病机制中发挥重要作用。近年来的研究发现TNF- α 参与肥胖相关的IR, 肥胖者机体过度地表达TNF- α , 并且与IR的程度呈正相关。Hui *et al*^[30]对正常肝脏、单纯脂肪肝以及NASH的标志进行测量, 发现NASH中中心性肥胖较普遍, 患者血清中TNF- α 水平较高。TNF- α 可能是初次打击(IR)发生的重要中介环节。实验发现, TNF- α 基因敲除小鼠在诱发肥胖后不能产生IR, 胰岛素受体底物1(IRS1)丝氨酸磷酸化下调IRS1信号是其潜在的作用机制^[31]。而Castro *et al*^[32]研究发现, TNF- α 可促进脂肪细胞分解和FFA释放, TNF- α 基因的促进区不同而导致脂肪组织的脂解程度不同, TNF- α 基因敲除小鼠由于体内缺乏TNF- α , 其促进脂肪分解的作用消失, FFA水平也降低。近年研究发现TNF-启动子区域中的两个位点(-238、-308)发生鸟嘌呤(G)向腺嘌呤(A)的突变, 原来可被限制性内切酶Nco I、Msp I 识别的位点缺失, 核苷酸序列不能被切断, 因此产生3种基因型: GG(无突变)、GA(突变杂合子)、AA(突变纯合子), 其直接结果就是影响TNF- α 的体表达量^[33]。在NAFLD的研究中, Valenti *et al*^[34]报道NAFLD(特别是其中NASH)患者中-238的A等位基因频率较对照组相比显著升高, 并与IR密切相关。TNF- α 为影响脂联素水平的重要因素, 导致脂联素水平下降并进一步引发NAFLD^[35]。

5 脂肪酸转运蛋白基因

脂肪酸转运蛋白(fatty acid transport protein4,

FATP4)是跨膜转运蛋白超家族中的一员, 存在于肝细胞和小肠黏膜细胞胞膜, 对长链脂肪酸具有高度亲和力, 从而参与脂肪酸的摄取与转运^[36]。人FATP4的基因高度保守, 定位于第七号染色体的q11.2, 有15个外显子, 长32 kb, 含有471个氨基酸残基。由于糖基化不同, 在不同的细胞中具有不同的分子质量, 约为78-88 kb。大量研究报道其在肥胖、糖尿病的形成过程中具有重要的作用^[37]。

6 解偶联蛋白基因

目前发现的解偶联蛋白(uncoupling protein, UCP)家族共有5种, 分别为UCP1、UCPn2、UCP3、StUCP和AtUCP。UCP都是由3个U型跨膜单位组成, 每个单位由100多个氨基酸组成, 形成6个由 α 螺旋组成的跨膜结构域, 这些氨基酸结构域都有线粒体载体信号基序。UCP的功能单位是二聚体。UCP1早在1978年就被纯化, 人类UCP1基因于1985年克隆成功, 定位于4号染色体长臂。UCP1是位于线粒体内膜上的一个二聚体蛋白, 含306个氨基酸, 分子质量32 kDa, 由6个C或N末端朝向胞液的跨膜区组成。UCPn2基因位于人类11号染色体上, UCPn2基因全长8.7 kb, 由8个外显子和7个内含子组成。UCPn2在体内分布广泛, 如白色脂肪组织(WAT)、BAT、骨骼肌、心脏、脾脏、肾脏、肝、胰及淋巴结等。某些情况如肥胖患者的肝细胞^[38]以及内毒素、脂多糖刺激均可以诱导肝细胞内UCPn2 mRNA表达^[39]。UCPn2是一种位于线粒体内膜上的载体蛋白, 具有多种功能: (1)介导质子的跨膜内流, 降低线粒体内膜的电化学梯度, 使ATP合成酶催化ADP磷酸化为ATP所需要的 ΔM_H 降低, 导致线粒体合成ATP能力下降, 肝细胞线粒体ATP 储备降低; (2)调节脂肪酸的 β 氧化。介导脂肪酸的跨膜转运, 有利脂肪酸在线粒体氧化利用, 减轻蓄积脂毒性; (3)限制ROS的合成; (4)有一定的抗凋亡、促坏死作用, 线粒体能量储备降低使肝细胞对坏死敏感性增加, 易致肝细胞坏死。UCPn2具有调节脂质代谢的作用, 并受脂质的反馈调节, 从而抑制肥胖或脂质代谢障碍时脂质在肝脏沉积, 阻止肝细胞脂肪变性, 在脂肪肝的发生过程中起保护作用。但是, 顾小红 *et al*^[40]在实验中发现, 随着NAFLD的形成和程度加重, UCPn2表达逐渐增强, 其介导的酶活性显著增高, 启动脂质过氧化反应, 促进脂肪肝的形成和发展。因此, 在脂肪肝中UCPn2表达增加是一把

“双刃剑”^[41]. UCP3基因位于11q13, 与UCPn2紧密连锁, 相隔仅6000 bp.

7 结论

除上述研究较多之外, Huang *et al*^[42]对NAFLD的一般基因标志物进行研究, 分别对编码DEAD box polypeptide 5(DDX5)和microsomal triglyceride transfer protein(MTP)基因的SNP进行分析, 发现DDX5和MTP在NAFLD患者发展为NASH具有相关性, 但是还是需要行进一步的大规模的人群调查. Namikawa *et al*^[43]报道在NAFLD患者中锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)基因表现为多态性, 而这种基因在限制线粒体氧化应激反应中发挥重要作用. 基因多态性在血管紧张素原和转化生长因子- β 1这两种基因中的表现, 导致了凋亡的脂肪细胞大量纤维化. 所有的研究相当令人振奋, 但是需要大量的研究才能将其中的机制阐述清楚.

生物技术的出现和发展为医学研究领域带来了巨大变化. 基因的检测手段多种多样, 可以直接对DNA进行定性和定量分析, 也可以采用基因芯片技术. 基因表达最强大的工具就是基因芯片, 可以动态观察各相关基因在不同的时间中的表达以及各产物之间量的对比关系, 具有高信息量、并行性、集成化等优点, 但是却存在着可靠性和无法解释的变化性, 故目前很多手段是直接针对其产物进行检测的. 在RNA水平上对基因表达产物进行定性或(和)定量分析的方法主要包括Northern印迹、RT-PCR、实时RT-PCR、RNA酶保护试验和cDNA芯片技术等. 范建高 *et al*^[44]就是用免疫组化和RT-PCR的方法检测肝脏解偶联蛋白2 mRNA转录及其蛋白表达. 实时RT-PCR是目前最好的定量分析mRNA的方法, 可以检测实时积累的特异性PCR产物, 而且能够监测一个DNA分子或RNA分子, 不少学者运用这一途径进行检测. PCR、PCR-RFLP对基因多态性进行分型, 免疫组化和Western blot方法测定基因表达变化, 都是根据DNA产物采用的相关的实验手段. 而对于存在于血液中的微量产物, 则用ELISA、放射免疫法方法测定. 国内外很多学者通过ELISA、放射免疫法方法测量出血液当中瘦素、脂联素、TNF- α 的含量, 从而揭示他们与NAFLD之间的关系. 这些方法廉价、简单、直接, 值得推广.

总之, NAFLD的发病机制具有多样性, 除上述因素外, 还仍有广阔的研究空间. 但是由于缺

乏足够的统计数据、没有统一的表型标准以及适合人群的选择, 对于目前所研究的基因存在极大的阻碍. 随着对NAFLD发病机制研究的深入, 利于开发出更有效的药物, 从而进行针对性治疗.

8 参考文献

- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-438
- Lieber CS. CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatology Res* 2004; 28: 1-11
- Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 575-594, ix
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432
- Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, Gorden P, Garg A. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* 2002; 346: 570-578
- Kakuma T, Lee Y, Unger RH. Effects of leptin, troglitazone, and dietary fat on stearoyl CoA desaturase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 1259-1263
- Asilmaz E, Cohen P, Miyazaki M, Dobrzyn P, Ueki K, Fayzikhodjaeva G, Soukas AA, Kahn CR, Ntambi JM, Socci ND, Friedman JM. Site and mechanism of leptin action in a rodent form of congenital lipodystrophy. *J Clin Invest* 2004; 113: 414-424
- Wang H, Storlien LH, Huang XF. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E1352-E1359
- Mammès O, Betoulle D, Aubert R, Herbeth B, Siest G, Fumeron F. Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet* 2000; 64: 391-394
- 陈韶华, 厉有名, 姜玲玲, 虞朝辉. 瘦素受体基因 Lys109Arg多态性与非酒精性脂肪性肝病的关系. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 453-455
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 2001; 294: 2166-2170
- Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 2002; 297: 240-243
- 陆元善, 范建高, 方继伟, 丁晓东, 杨兆瑞. 瘦素及硬脂酰CoA去饱和酶-1在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪肝发病中的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2327-2331
- 史洪涛, 陈东风, 李陶. 非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素P450 1A1基因及表达变化的意义. *胃肠病学和肝病科学杂志* 2005; 14: 265-267
- Pentiuk OO, Kachula SO, Herych OKh. [Cytochrome P4502E1. Polymorphism, physiological function, regulation, and role in pathology] *Ukr Biokhim Zh* 2004; 76: 16-28
- Plumlee CR, Lazaro CA, Fausto N, Polyak SJ. Effect of ethanol on innate antiviral pathways and HCV replication in human liver cells. *Virology* 2005; 2: 89
- Gemma S, Vichi S, Testai E. Individual susceptibility

■应用要点

国内外很多学者通过ELISA、放射免疫法方法测量出血液当中瘦素、脂联素、TNF- α 的含量, 从而揭示他们与NAFLD之间的关系. 这些方法廉价、简单、直接, 值得推广.

■同行评价

本文反映了当前较为热点的问题, 对非酒精性脂肪性肝病的分子学发病机制研究进展进行了综述, 内容较新颖, 文字表达较好, 具有较好的学术价值。

- and alcohol effects:biochemical and genetic aspects. *Ann Ist Super Sanita* 2006; 42: 8-16
- 18 Zhuge J, Luo Y, Yu YN. Heterologous expression of human cytochrome P450 2E1 in HepG2 cell line. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2732-2736
- 19 Castaneda F, Rosin-Steiner S. Low concentration of ethanol induce apoptosis in HepG2 cells: role of various signal transduction pathways. *Int J Med Sci* 2006; 3: 160-167
- 20 史洪涛, 李陶, 陈东风. 肝细胞色素氧化酶 I 在非酒精性脂肪肝大鼠形成中的作用. 第三军医大学学报 2006; 28: 160-162
- 21 Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 26746-26749
- 22 Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, Elariny H, Collantes R, Afendy A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg* 2006; 16: 1118-1125
- 23 Yang H, Li YY, Nie YQ, Zhou YJ, DU YL, Sha WH, Hong Y. [The relationship between insulin resistance and adiponectin gene expression in nonalcoholic fatty liver disease] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 525-528
- 24 Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7: 941-946
- 25 Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, Berg AH, Warram JH, Scherer PE, Trischitta V, Doria A. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2002; 51: 2306-2312
- 26 Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379
- 27 Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2005; 54: 117-121
- 28 Vuppalanchi R, Marri S, Kolwankar D, Considine RV, Chalasani N. Is adiponectin involved in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis? A preliminary human study. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 237-242
- 29 Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P, Kadowaki T. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 2002; 51: 536-540
- 30 Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54
- 31 Feldstein A, Gores GJ. Steatohepatitis and apoptosis: therapeutic implications. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1718-1719
- 32 Castro Cabezas M, Erkelens DW, van Dijk H. [Free fatty acids: mediators of insulin resistance and atherosclerosis] *Ned Tijdschr Geneesk* 2002; 146: 103-109
- 33 Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34: 391-399
- 34 Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 274-280
- 35 Hector J, Schwarzloh B, Goehring J, Strate TG, Hess UF, Deuretzbacher G, Hansen-Algenstaedt N, Beil FU, Algenstaedt P. TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat. *Horm Metab Res* 2007; 39: 250-255
- 36 Storch J, Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1486: 28-44
- 37 Memon RA, Fuller J, Moser AH, Smith PJ, Grunfeld C, Feingold KR. Regulation of putative fatty acid transporters and Acyl-CoA synthetase in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Diabetes* 1999; 48: 121-127
- 38 Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, Ezaki O. Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 9562-9569
- 39 Faggioni R, Shigenaga J, Moser A, Feingold KR, Grunfeld C. Induction of UCP2 gene expression by LPS: a potential mechanism for increased thermogenesis during infection. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 75-78
- 40 顾小红, 张云东, 冯爱娟. 解偶联蛋白-2在大鼠非酒精性脂肪肝中的表达. 世界华人消化杂志 2005; 15: 2310-2313
- 41 Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, Desimone C, Song XY, Diehl AM. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350
- 42 Huang H, Merriman RB, Chokkalingam AP. Novel genetic markers associated with risk of non-alcoholic steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver diseases. *Gastroenterology* 2005; 128 suppl 2: A-694
- 43 Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, Akisawa N, Saibara T, Hiroi M, Enzan H, Onishi S. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2004; 40: 781-786
- 44 范建高, 丁晓东, 王国良, 徐正婕, 田丽艳, 郑晓英. 非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏解偶联蛋白2表达及其与能量贮备的关系. 中华肝病杂志 2005; 13: 374-377

编辑 李军亮 电编 何基才

NKT细胞在肝脏疾病中的作用

汤伯宗, 高月求

汤伯宗, 高月求, 上海中医药大学附属曙光医院 上海市 200021

作者贡献分布: 本论文综述由汤伯宗完成; 审校由高月求完成.
通讯作者: 高月求, 200021, 上海市卢湾区普安路185号, 上海中医药大学附属曙光医院科教处. gaoyueqiu@hotmail.com
电话: 021-63857984

收稿日期: 2008-06-29 修回日期: 2008-08-02
接受日期: 2008-08-04 在线出版日期: 2008-09-08

Role of natural killer T cells in liver diseases

Bo-Zong Tang, Yue-Qiu Gao

Bo-Zong Tang, Yue-Qiu Gao, Shuguang Hospital Affiliated to Traditional Chinese Medicine University, Shanghai 200021, China

Correspondence to: Yue-Qiu Gao, Science and Education Department, Shuguang Hospital Affiliated to Traditional Chinese Medicine University, 185 Pu'an Road, Luwan District, Shanghai 200021, China. gaoyueqiu@hotmail.com

Received: 2008-06-29 Revised: 2008-08-02

Accepted: 2008-08-04 Published online: 2008-09-08

Abstract

Natural killer T (NKT) cells are a unique subset of lymphocytes, which express both T and NK cell surface markers as well as functional characteristics. They connect innate and acquired immunity, and restrictedly recognize glycolipid antigens presented by CD1d molecule. NKT cells secrete a great quantity of cytokines rapidly which regulate human immune response after being activated. For there are abundant NKT cells in human liver, researchers have a great interest in their roles.

Key Words: Natural killer T cells; Immunoregulation

Tang BZ, Gao YQ. Role of natural killer T cells in liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2853-2858

摘要

自然杀伤T细胞(natural killer T cells, NKT细胞)是一种同时具有NK细胞和T细胞部分表型及功能的细胞亚群. 他能将先天性免疫应答和获得性免疫应答连接起来, 限制性识别CD1d-糖脂抗原、活化后迅速分泌大量细胞因子从

而调节机体的免疫应答. 人体的肝脏内富含NKT细胞, 因此, NKT细胞在肝脏中的作用引起了人们的广泛兴趣.

关键词: NKT细胞; 免疫调节

汤伯宗, 高月求. NKT细胞在肝脏疾病中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2853-2858

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2853.asp>

0 引言

NKT细胞作为一类新型的免疫调节细胞, 其主要特征为T细胞受体(TCR)基因表达的恒定性, CD1d的限制性以及细胞因子产生的迅速、高水平性. NKT细胞既能增强免疫反应又能抑制免疫反应, 从而在抗感染、抗肿瘤、抑制自身免疫性疾病及移植耐受中发挥重要的作用. 现就近年来有关NKT细胞的研究进展综述如下.

1 NKT细胞的命名

1987年, 美国国立卫生研究院与瑞士的两个研究小组同时在小鼠的胸腺中发现一种TCR中等水平表达、V β 8.2高表达、同时又缺乏CD4和CD8分子的 $\alpha\beta$ TCR⁺ T细胞的存在. 这类细胞大多表达NK细胞的表面标志NK1.1(鼠NKR-P1C或人CD161C), 并具有大量分泌IL-4、IFN- γ 和TNF的潜力^[1]. 随后的研究发现NK1.1⁺CD4⁺ T细胞也具有此潜能, 这两类细胞都表达TCRV α 14J α 28, 并且他们的发育都依赖于MHC样、 β 2球蛋白相关分子CD1d. 这些发现强有力证明NK1.1⁺ $\alpha\beta$ 双阴性(double negative, DN)和NK1.1⁺CD4⁺ T细胞属于同一细胞系^[2]. 由此, NKT细胞的概念第1次提出, 并引起人们的广泛关注. 随着研究的逐渐深入, 发现此命名并不准确, 因为人类并不是所有表达CD161的T细胞都是NKT细胞, 也并不是NKT细胞均表达CD161. 在小鼠中除C57BL/6小鼠外其他品系的小鼠也不表达NK1.1, 而一些其他的T细胞(包括传统的病毒特异性的CD8⁺ T细胞)也能诱导性表达NK1.1. NKT细胞虽然能表达穿孔素、FasL及其他受体(例如NKG2D), 但自然

■背景资料

肝脏作为一个重要的免疫器官已经被广泛接受, 因此肝脏内免疫细胞的功能与肝脏疾病的发生有重要关系. 肝脏内富含NKT细胞, 因此其免疫功能在肝脏病的发生、发展与转归中起重要作用.

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

■研究前沿

NKT细胞在肝脏疾病中的确切作用还处于探索阶段,以激活NKT细胞功能为主的治疗方法主要应用于肿瘤的治疗,这也是目前研究的热点。

杀伤活性并不是NKT细胞的主要效应作用,而免疫调节是其作用,因此更为准确的命名应为CD1d依赖的自然杀伤样T细胞(CD1d-dependent natural killer-like T cells)^[3]。

2 NKT细胞的分化发育

NKT细胞确切的发育来源目前仍处于探索阶段,大部分研究显示NKT细胞的发育是胸腺依赖的。NKT细胞与传统 $\alpha\beta$ T细胞一样都来源于双阳性胸腺细胞,这群细胞是由表达CD1d的CD4⁺CD8⁺胸腺细胞介导识别自身糖脂完成阳性选择^[4]。阳性选择后NKT细胞经历一个独特的成熟过程,从CD44^{low}TCR^{high}NK1.1⁻到CD44^{high}TCR^{int}NK1.1⁻再到CD44^{high}TCR^{int}NK1.1⁺的发育顺序^[5-7]。同时,活化受体由CD69⁺CD122^{low}转化为CD69⁺CD122^{high},分泌的细胞因子由Th2型向Th1型偏离。阳性选择阶段DOCK2调节T细胞前体进一步分化为NKT细胞^[8]; Tec家族酪氨酸激酶Itk和Irk选择性上调NK1.1^[9],细胞因子 γ 链(γ c)也在NK1.1期开始表达^[10],表明Itk以及 γ c相关信号传导对于NKT细胞后期功能成熟至关重要。NKT细胞的完全成熟多发生在胸腺外^[11]。蛋白激酶C θ 、维生素D受体及CD1d的表达也能够影响NKT的发育及在外周的进一步成熟和功能的发挥^[12-14]。

NKT细胞的TCR先于NKR的表达方式有其独特意义,CD1d与未成熟NKT细胞的TCR相互作用在共刺激分子CD80/CD86和/或B7h的辅助下上调转录因子T-bet、GATA-3的表达使NKT细胞活化并增殖^[15-16]。随后表达的NKR削弱这种增殖反应以避免成熟NKT细胞潜在的自身反应性,这与细胞在胸腺中停止分化或长期定居于外周有关^[17]。

3 NKT细胞的分布

在传统T细胞分布的地方均有NKT细胞的分布,但以胸腺、肝为主;脾、骨髓次之;淋巴结、皮肤黏膜和外周血最少见^[18]。NKT细胞占肝脏固有淋巴细胞的30%-50%、骨髓总T细胞的20%-30%、胸腺T细胞的0.3%-0.5%、脾脏淋巴细胞的0.5%-1%、外周淋巴结淋巴细胞的0.1%^[19]。人NKT细胞约占外周血T淋巴细胞的0.09%^[20],小鼠NKT细胞占外周血T淋巴细胞的1%-2%、骨髓T细胞的30%^[21]。

4 NKT细胞的分类

Godfrey *et al*^[3,22]根据NKT细胞是否表达恒定TCR(小鼠V α 14-J α 18,人类V α 24-J α 18)将其分

为经典和非经典两大类。通常所说的NKT细胞为经典型NKT细胞(小鼠V α 14-J α 18⁺ NKT细胞和人类V α 24-J α 18⁺ NKT细胞)。经典NKT细胞表达恒定的TCR,限制性识别CD1d提呈的糖脂抗原如 α -半乳糖基神经酰胺(α -galactosylceramide, α -GalCer)。

4.1 经典NKT细胞 根据NK1.1的表达与否将NKT细胞分为以下2型: (1)NK1.1⁺ NKT细胞: 根据CD4、CD8的表达与否,小鼠的此类NKT细胞分为CD4⁺和(CD4⁻CD8⁻)DN 2个亚群。人类的NKT细胞分为CD4⁺、CD8⁺和(CD4⁻CD8⁻)DN 3个亚群^[3,23-24]。(2)NK1.1⁻ NKT细胞: 此类细胞大多为CD4⁺细胞^[25],目前研究认为胸腺NK1.1⁻ NKT细胞是NK1.1⁺ NKT细胞的前体,可以在外周血进一步发育成熟^[5]。然而在体外实验中观察到NK1.1⁺ NKT细胞在 α -GalCer刺激后出现NK1.1的表达下调而表现为NK1.1⁻,所以NK1.1⁻ NKT细胞又可能为体内接受刺激后的细胞。基于上述研究,目前发现NK1.1的表达与否与下列因素有关: 遗传背景、NKT细胞是否成熟、是否被刺激以及组织定位。

4.2 非经典NKT细胞 小鼠非经典NKT细胞主要是表达多样性TCR或恒定的V α 3.2-J α 9/V α 8和V β 8.2^[3,26-27]CD1d依赖性V α 14⁻ NKT细胞,此外还包括 $\gamma\delta$ TCR⁺ T细胞^[3,28],分为CD4⁺和DN两个亚群。小鼠非经典NKT细胞对 α -GalCer无应答,不能被负载 α -GalCer的CD1d四聚体所识别^[3]。人类也存在CD1d依赖性V α 24-V β 11⁻ NKT细胞,多表达CD8 α ⁺CD8 β ⁺,在体外具备CD8依赖的细胞毒作用。然而与小鼠不同的是,人类非经典NKT细胞具有 α -GalCer反应性^[3]。

5 NKT细胞的抗原识别和活化

NKT细胞的抗原识别与传统的T细胞不同,不能识别由经典的MHC-I、II类分子提呈的抗原肽,而只识别由细胞表面CD1d分子提呈的糖脂类抗原^[28]。

5.1 CD1分子 CD1分子主要在骨髓来源的细胞上表达,存在于内体和细胞表面,是一条约50 kDa的糖基化蛋白重链,与 β 2微球蛋白以非共价键连接^[29]。人CD1基因家族有CD1A至CD1E五种基因,而小鼠只有CD1D1和CD1D2两种非常相似的基因。根据氨基酸序列同源性,将CD1a、b、c归为I类,CD1d为II类^[30]。

5.2 CD1反应性T细胞 根据细胞特性和TCR可将CD1反应性T细胞分为3大类^[21]: (1)对I类CD1

分子提呈的微生物脂类抗原应答, 表达高度多样性 $\alpha\beta$ TCR, 主要防御分支杆菌感染. (2)对 I 或 II 类CD1分子提呈的自身糖脂抗原应答, 表达多样性 $\alpha\beta$ TCR或 $\gamma\delta$ TCR, 细胞功能不明, 可能涉及免疫调节或自身免疫性疾病的发生. (3)CD1d限制性NKT细胞, 是CD1反应性T细胞的主要组成部分.

5.3 抗原递呈 CD1蛋白是第三类抗原递呈分子. 与MHC分子不同, CD1为非多态性, 在细胞表面表达时无需功能性TAP(抗原加工相关转运体). CD1分子抗原结合槽为疏水性, 能提呈多种脂类抗原. I 类CD1分子提呈分支杆菌细胞壁糖脂以及自身糖脂, II 类CD1分子的天然配体至今不明确. 但已发现CD1d分子能提呈 α -GalCer, 这种海绵来源的糖脂在体内并不存在, 表明他不是CD1d反应性T细胞的天然配体^[31]. 小鼠CD1d分子有2个亚型, 具有不同的抗原加工提呈机制. V α 14⁺ NKT细胞识别的CD1d分子具有内体取向基序, 通过内体途径加工抗原^[31-32]; 而V α 14⁻ NKT细胞识别的CD1d分子不含内体取向基序, 是以可溶性分泌形式通过分泌性途径加工内源性抗原^[32-33].

5.4 CD1d依赖性NKT细胞的特异识别 α -Galcer是半乳糖基与含有酰基和神经鞘氨醇链的神经酰胺醇通过 α 连接形成的糖脂的总称^[34]. α -GalCer的神经酰胺部分经疏水键结合至CD1d两个疏水口袋区A'和F', 糖基部分则与CD1d分子 α -螺旋的亲水氨基酸相互作用. 糖基的2-OH和3-OH残基对于 α -GalCer与CD1d的Asp⁷⁹, Asp⁸⁰和Glu⁸³之间、神经鞘氨醇的3-OH残基与CD1d α 1-螺旋上Val¹⁴⁹之间、以及脂酰链上氨基氮与CD1d α 2-螺旋上Asp¹⁵³之间的稳定结合十分重要^[35]. β -GalCer也能特异激活NKT细胞, 可能在NKT细胞天然识别抗原的生成和/或组装上起重要作用^[36].

5.5 NKT的活化信号 使NKT细胞活化并迅速分泌细胞因子除了需要CD1d提呈的抗原信号外, 还需要共刺激信号的辅助. CD28介导的共刺激途径是Val14NKT细胞生成IFN- γ 和IL-4所必需的, 而CD40介导的共刺激途径只是生成IFN- γ 所必需^[37]. IL-2^[38]、雌二醇^[39]和活化NK1.1特异性抗体促进NKT细胞生成IFN- γ , IL-18^[40]以及CD86^[41]和CD40L特异性封闭抗体促进NKT细胞生成IL-4. 但识别MHC-I类分子的Ly49家族(小鼠)/KIR受体(人类)活化后能抑制NKT细胞分泌细胞因子^[42].

6 NKT细胞在肝脏疾病中的作用

人体的肝脏内富含NKT细胞, NKT细胞在病毒、细菌等糖脂类抗原的刺激下被激活迅速产生IL-4、IFN- γ 、IL-10等细胞因子, 从而在抗感染、抗肿瘤、抑制自身免疫性疾病及移植免疫中发挥重要的作用.

6.1 HBV感染 肝脏内NKT细胞在HBV感染中的抗病毒作用已经得到肯定. 当HBV感染时, 肝脏内存在的大量NKT细胞一方面可以接受CD1d细胞提呈的脂类抗原而活化, 而这些脂类抗原来源于HBV及亚病毒颗粒中的糖脂及磷脂; 另外在病毒诱导产生的细胞因子作用下, NKT细胞可以间接地被活化. 活化的NKT细胞通过两个方面来发挥抗HBV的作用, 一方面通过其分泌的细胞因子; 另一方面通过活化其他淋巴细胞.

Kakimi *et al*^[43]在研究中发现, 在注射 α -GalCer 24 h的HBV转基因小鼠的肝内可检测到IFN- γ 和IFN- α/β , HBV的复制被终止. 这种现象与肝内NKT细胞的迅速消失和激活的NK细胞向肝内短暂的募集相关. 当用抗体去除CD4⁺和CD8⁺ T细胞时, 不影响 α -GalCer诱导的抑制HBV复制, 表明传统的T细胞不参与此免疫应答. 另外在IFN- γ 或IFN- α 受体缺陷的小鼠中, 这种效应也丧失. 以上实验表明 α -GalCer首先直接激活NKT细胞, 使其分泌细胞因子进一步激活NK细胞, 再通过NK细胞释放抗病毒复制的细胞因子来抑制病毒的复制. NKT细胞介导的抑制病毒复制反应优于通过病毒抗原特异性介导的获得性免疫应答. 首先, 他不用考虑MHC分子的差异; 其次, 他不需要抗原特异的效应细胞的活化和扩增, 也不需要将这些效应细胞募集到肝脏. 但在慢性HBV感染中, 由于免疫耐受的存在, 还不能成功获得HBV特异的T细胞应答. 因此, 通过激活先天性免疫应答来治疗HBV感染具有一定的应用前景.

6.2 HCV感染 Agrati *et al*^[44]研究发现, HCV感染时, HCV的包装糖蛋白E能激活NK表面的CD81, 而CD81在肝脏内又反过来抑制NK的功能, 这可能是肝脏病毒清除缺失及感染慢性化的机制之一. 因此, CD1d/NKT和糖蛋白E2/CD81之间的相互作用, 在HCV免疫发病机制中发挥着重要的作用. Durante-Mangoni *et al*^[45]研究发现在HCV感染时, 被感染肝细胞周围的炎性细胞和胆管细胞上调CD1d的表达, 而肝细胞表面只要少量的CD1d就能被CD1d反应性的T细胞识别. CD161⁺CD56⁺ NKT亚型识别提呈的脂质抗原,

■应用要点

本文阐述了NKT细胞在肝脏不同疾病中的作用, 为探讨NKT疗法防治肝脏疾病, 尤其是病毒性肝炎和肝肿瘤提供了理论基础.

■名词解释

α -半乳糖基神经酰胺(α -GalCer): 是从海洋海绵中提取的一种由亲水性的碳酸化物部分与疏水性的酰基鞘氨醇部分通过 α 连接形成的具有通过CD1d特异性的活化NKT细胞功能的糖脂。

从而正向或负向调节炎性应答反应。由于肝内固有的Th1型CD1d反应性T细胞的监视,被病毒感染的肝细胞能有效处理CD1d递呈的抗原,这一功能有助于急性期病毒的清除,但在慢性感染时则会产生肝脏损害。

6.3 肝硬化和肝肿瘤 乙肝或丙肝病毒感染机体后,主要的病理表现特征是肝内散在的炎性坏死并伴有纤维瘢痕形成,进一步可发展为肝硬化和肝癌。de Lalla *et al*^[46]研究发现,在肝纤维化进一步发展为肝硬化的特征是NKT细胞高表达2型促纤维化细胞因子IL-4和IL-13,并高表达CD1d。并且在体外通过CD1d限制性的活化健康自愿者NKT细胞能够诱导出IL-4和IL-13,进一步证实NKT细胞可以通过诱导2型细胞因子的产生加重肝纤维化转变为肝硬化。在肿瘤免疫中NKT细胞也发挥重要的作用,在抗肿瘤免疫的过程中活化的NKT细胞通过分泌各种细胞因子和肝脏内其他免疫细胞相互联系可以达到共同抗肿瘤的目的。在原发性肝细胞癌(hepatic cell carcinoma, HCC)的患鼠肝内的NKT细胞增加,同时CD8⁺/CD4⁺淋巴细胞比率也升高,这与NKT细胞和CD8⁺/CD4⁺淋巴细胞是通过分泌IFN- γ 发挥抗肿瘤作用有关^[47]。Tatsumi *et al*^[48]研究发现,与p53脉冲树突状细胞相比,向鼠类CMS4肝肿瘤模型肝内注射 α -GalCer脉冲树突状细胞能够完全的排除肿瘤并建立长期存活的动物模型。其主要机制是通过 α -GalCer激活肝内NKT细胞,迅速产生大量IFN- γ ,然后进一步活化肝内NK细胞产生抗肿瘤作用。

6.4 肝移植及肝细胞再生 肝移植是各类肝脏疾病发展到终末期的一种有效的治疗手段,具有双重免疫调节功能的NKT细胞在移植免疫中的作用日益引起人们的重视,越来越多的实验表明NKT细胞与同种异体移植耐受之间存在密切关系。

Kiyomoto *et al*^[49]证实,大鼠原位肝移植耐受组(BN鼠为供体,LEW鼠为受体)与移植排斥组(DA鼠为供体,LEW鼠为受体)相比,移植术后7 d供肝来源的NKT细胞前者较后者显著增多。去除供肝中的NKT细胞后,NKT细胞缺乏组出现急性排斥反应的时间比正常组明显提前。耐受组中NKT细胞产生的细胞因子以IL-10与TGF- β 为主,IL-4的产生减少,而排斥组IFN- γ 明显升高。表明NKT细胞与IL-10在大鼠原位肝移植免疫耐受的形成的有重要作用。

无论是慢性肝损伤还是肝移植后,肝细胞

再生是对受损肝脏的一种修复机制,其在肝病病理生理中具有重要作用。Nakashima *et al*^[50]证实活化的NKT能促进部分肝切除的肝脏再生。他们在70%肝切除术后36 h,给大鼠注射 α -GalCer 8 h后,肝细胞的有丝分裂比对照组要显著增强,老年大鼠组比青年大鼠组增殖要快,并且肝脏内NKT细胞的TNF受体1及Fas配体(FasL)的表达都增强。在部分肝切除术3 d前或肝切除术后立即注射抗-NK1.1抗体能够明显抑制 α -GalCer的促有丝分裂和肝再生作用。而且在注射 α -GalCer 1 h前用TNF1抗体或FasL抗体处理大鼠,肝细胞的增殖基本被抵消。这说明NKT细胞加速肝细胞有丝分裂及肝脏的再生,主要通过TNF和Fas/FasL途径实现的。然而Dong *et al*^[51]的报道却截然相反,HBV转基因小鼠部分肝切除术后,肝脏内聚集大量高表达IFN- γ 和CD69的NKT细胞削弱肝脏的再生能力。进一步研究证实阻断CD1d-NKT相互作用能够明显减轻因NKT细胞活化产生的抑制肝细胞再生作用,中和IFN- γ 能够减轻细胞周期停滞。并且将HBV转基因小鼠的NKT细胞过继性转输给受体小鼠能够明显抑制受体小鼠的肝细胞再生,进一步证明活化肝NKT细胞能够抑制HBV转基因小鼠部分肝切除术后肝细胞的再生。

7 结论

人体肝脏内富含NKT细胞,表达恒定的TCR可变区和NK细胞受体;限制性识别CD1d-糖脂类抗原;激活后可迅速分泌大量Th1和Th2型的细胞因子。这些特点使NKT细胞以双刃剑的方式调节着免疫系统,越来越引起人们的关注,随着分子免疫学和分子生物学技术的不断进展以及对NKT细胞认识的逐步深入,NKT细胞疗法将不断完善并应用于临床,必将为病毒性肝炎、肝硬化、肝癌的预防和治疗开辟一条新的途径。

8 参考文献

- 1 Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH, Pardoll DM. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 1987; 329: 251-254
- 2 Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 1995; 268: 863-865
- 3 Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 231-237
- 4 MacDonald HR, Mycko MP. Development and

- selection of Valpha14i NKT cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007; 314: 195-212
- 5 Kronenberg M, Engel I. On the road: progress in finding the unique pathway of invariant NKT cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 186-193
- 6 Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 2002; 296: 553-555
- 7 Gadue P, Stein PL. NK T cell precursors exhibit differential cytokine regulation and require Itk for efficient maturation. *J Immunol* 2002; 169: 2397-2406
- 8 Kunisaki Y, Tanaka Y, Sanui T, Inayoshi A, Noda M, Nakayama T, Harada M, Taniguchi M, Sasazuki T, Fukui Y. DOCK2 is required in T cell precursors for development of Valpha14 NK T cells. *J Immunol* 2006; 176: 4640-4645
- 9 Felices M, Berg LJ. The Tec kinases Itk and Rlk regulate NKT cell maturation, cytokine production, and survival. *J Immunol* 2008; 180: 3007-3018
- 10 Ranson T, Vosshehrich CA, Corcuff E, Richard O, Laloux V, Lehuen A, Di Santo JP. IL-15 availability conditions homeostasis of peripheral natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2663-2668
- 11 Pellicci DG, Hammond KJ, Uldrich AP, Baxter AG, Smyth MJ, Godfrey DI. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med* 2002; 195: 835-844
- 12 Stanic AK, Bezbradica JS, Park JJ, Van Kaer L, Boothby MR, Joyce S. Cutting edge: the ontogeny and function of Valpha14Ja18 natural T lymphocytes require signal processing by protein kinase C theta and NF-kappa B. *J Immunol* 2004; 172: 4667-4671
- 13 Yu S, Cantorna MT. The vitamin D receptor is required for iNKT cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5207-5212
- 14 Zimmer MI, Colmone A, Felio K, Xu H, Ma A, Wang CR. A cell-type specific CD1d expression program modulates invariant NKT cell development and function. *J Immunol* 2006; 176: 1421-1430
- 15 Chung Y, Nurieva R, Esashi E, Wang YH, Zhou D, Gapin L, Dong C. A critical role of costimulation during intrathymic development of invariant NK T cells. *J Immunol* 2008; 180: 2276-2283
- 16 Kim PJ, Pai SY, Brigl M, Besra GS, Gumperz J, Ho IC. GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. *J Immunol* 2006; 177: 6650-6659
- 17 MacDonald HR. Immunology. T before NK. *Science* 2002; 296: 481-482
- 18 Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 557-568
- 19 Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 535-562
- 20 Kim CH, Johnston B, Butcher EC. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 2002; 100: 11-16
- 21 Kronenberg M, Naidenko O, Koning F. Right on target: novel approaches for the direct visualization of CD1-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2950-2952
- 22 Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000; 21: 573-583
- 23 Brossay L, Burdin N, Tangri S, Kronenberg M. Antigen-presenting function of mouse CD1: one molecule with two different kinds of antigenic ligands. *Immunol Rev* 1998; 163: 139-150
- 24 Gadola SD, Dulphy N, Salio M, Cerundolo V. Valpha24-JalphaQ-independent, CD1d-restricted recognition of alpha-galactosylceramide by human CD4(+) and CD8alphabeta(+) T lymphocytes. *J Immunol* 2002; 168: 5514-5520
- 25 Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, Koezuka Y, Kronenberg M. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 2000; 192: 741-754
- 26 Behar SM, Podrebarac TA, Roy CJ, Wang CR, Brenner MB. Diverse TCRs recognize murine CD1. *J Immunol* 1999; 162: 161-167
- 27 Park SH, Weiss A, Benlagha K, Kyin T, Teyton L, Bendelac A. The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. *J Exp Med* 2001; 193: 893-904
- 28 Huber S, Sartini D, Exley M. Role of CD1d in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Immunol* 2003; 170: 3147-3153
- 29 Sidobre S, Kronenberg M. CD1 tetramers: a powerful tool for the analysis of glycolipid-reactive T cells. *J Immunol Methods* 2002; 268: 107-121
- 30 Calabi F, Milstein C. The molecular biology of CD1. *Semin Immunol* 2000; 12: 503-509
- 31 Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997; 278: 1626-1629
- 32 Chiu YH, Jayawardena J, Weiss A, Lee D, Park SH, Dautry-Varsat A, Bendelac A. Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J Exp Med* 1999; 189: 103-110
- 33 Joyce S, Woods AS, Yewdell JW, Bennink JR, De Silva AD, Boesteanu A, Balk SP, Cotter RJ, Brutkiewicz RR. Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science* 1998; 279: 1541-1544
- 34 Van Kaer L. alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 31-42
- 35 Kamada N, Iijima H, Kimura K, Harada M, Shimizu E, Motohashi Si, Kawano T, Shinkai H, Nakayama T, Sakai T, Brossay L, Kronenberg M, Taniguchi M. Crucial amino acid residues of mouse CD1d for glycolipid ligand presentation to V(alpha)14 NKT cells. *Int Immunol* 2001; 13: 853-861
- 36 Stanic AK, De Silva AD, Park JJ, Sriram V, Ichikawa S, Hirabayashi Y, Hayakawa K, Van Kaer L, Brutkiewicz RR, Joyce S. Defective presentation of the CD1d1-restricted natural Valpha14Ja18 NKT lymphocyte antigen caused by beta-D-glucosylceramide synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1849-1854
- 37 Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Van Kaer L, Saiki I, Okumura K. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J Immunol* 2001; 166: 6012-6018
- 38 Bessoles S, Fouret F, Dudal S, Besra GS, Sanchez F, Lafont V. IL-2 triggers specific signaling pathways

■同行评价

本文内容新颖, 系统全面, 对肝病基础与临床工作具有指导意义。

- in human NKT cells leading to the production of pro- and anti-inflammatory cytokines. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 224-233
- 39 Gourdy P, Araujo LM, Zhu R, Garmy-Susini B, Diem S, Laurell H, Leite-de-Moraes M, Dy M, Arnal JF, Bayard F, Herbelin A. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-gamma production by invariant natural killer T cells. *Blood* 2005; 105: 2415-2420
- 40 Uchida T, Kinoshita M, Fukasawa M, Habu Y, Shinomiya N, Seki S. IL-18 time-dependently modulates Th1/Th2 cytokine production by ligand-activated NKT cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 966-977
- 41 Pál E, Tabira T, Kawano T, Taniguchi M, Miyake S, Yamamura T. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V alpha 14 NK T cells. *J Immunol* 2001; 166: 662-668
- 42 Hayakawa Y, Berzins SP, Crowe NY, Godfrey DI, Smyth MJ. Antigen-induced tolerance by intrathymic modulation of self-recognizing inhibitory receptors. *Nat Immunol* 2004; 5: 590-596
- 43 Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000; 192: 921-930
- 44 Agrati C, Nisii C, Oliva A, D'Offizi G, Montesano C, Pucillo LP, Poccia F. Lymphocyte distribution and intrahepatic compartmentalization during HCV infection: a main role for MHC-unrestricted T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2002; 50: 307-316
- 45 Durante-Mangoni E, Wang R, Shaulov A, He Q, Nasser I, Afdhal N, Koziel MJ, Exley MA. Hepatic CD1d expression in hepatitis C virus infection and recognition by resident proinflammatory CD1d-reactive T cells. *J Immunol* 2004; 173: 2159-2166
- 46 de Lalla C, Galli G, Aldrighetti L, Romeo R, Mariani M, Monno A, Nuti S, Colombo M, Callea F, Porcelli SA, Panina-Bordignon P, Abrignani S, Casorati G, Dellabona P. Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis. *J Immunol* 2004; 173: 1417-1425
- 47 Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M, Taniguchi M. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997; 278: 1623-1626
- 48 Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Sakamori R, Ohkawa K, Kohga K, Uemura A, Hayashi N. Intrahepatic delivery of alpha-galactosylceramide-pulsed dendritic cells suppresses liver tumor. *Hepatology* 2007; 45: 22-30
- 49 Kiyomoto T, Ito T, Uchikoshi F, Ohkawa A, Akamaru Y, Miao G, Komoda H, Nishida T, Matsuda H. The potent role of graft-derived NKR-P1+TCRalpha/beta+ T (NKT) cells in the spontaneous acceptance of rat liver allografts. *Transplantation* 2005; 80: 1749-1755
- 50 Nakashima H, Inui T, Habu Y, Kinoshita M, Nagao S, Kawaguchi A, Miura S, Shinomiya N, Yagita H, Seki S. Activation of mouse natural killer T cells accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Gastroenterology* 2006; 131: 1573-1583
- 51 Dong Z, Zhang J, Sun R, Wei H, Tian Z. Impairment of liver regeneration correlates with activated hepatic NKT cells in HBV transgenic mice. *Hepatology* 2007; 45: 1400-1412

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

本刊讯 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策, 具体格式如: (1)作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成. (2)同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科. (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)

骨髓干细胞移植治疗肝脏疾病的若干问题

吴海军, 肖恩华

吴海军, 肖恩华, 中南大学湘雅二医院放射科 湖南省长沙市 410011

国家自然科学基金资助项目, No. 30070235, No. 30470508

湖南省自然科学基金资助项目, No. 06JJ20081

湖南省中医药管理局科研基金资助项目, No. 202064, No. 204057

湖南省科技厅科研基金资助项目, No. 04-SK-306-2

长沙市科技计划项目资助项目, No. K071532-11

作者贡献分布: 本文写作及文献采集归纳由吴海军完成; 与本综述相关课题设计、论文修改及审校由肖恩华完成。

通讯作者: 肖恩华, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院放射科. cjr.xiaoenhua@vip.163.com

电话: 0731-5292116

收稿日期: 2008-03-23 修回日期: 2008-06-28

接受日期: 2008-07-07 在线出版日期: 2008-09-08

Several issues about bone marrow stem cell transplantation for liver diseases

Hai-Jun Wu, En-Hua Xiao

Hai-Jun Wu, En-Hua Xiao, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital, Xiangya Medical School of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30070235, No. 30470508; the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 06JJ20081; the Traditional Chinese Medicine Administration Research Foundation of Hunan Province, No. 202064, No. 204057; the Science and Technology Commission Foundation of Hunan Province, No. 04-SK-306-2; and the Science and Technology Project of Changsha City, No. K071532-11

Correspondence to: En-Hua Xiao, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital, Xiangya Medical School of Central-South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. cjr.xiaoenhua@vip.163.com

Received: 2008-03-23 Revised: 2008-06-28

Accepted: 2008-07-07 Published online: 2008-09-08

Abstract

Recently, many studies reported that bone marrow stem cells (BMSCs) had the ability to differentiate into hepatocytes and cholangiocytes in normal livers or in some pathologic environments and to generate functional hepatocytes to restore the injured livers by cell transplantation. This review is designed as a state-of-the-art survey taking into account current knowledge and published work, including the evidence from animal models, the possible mechanisms and

conditions, future application modalities for the clinical use of cellular-derived therapeutics for patients with liver diseases.

Key Words: Liver disease; Bone marrow cells; Transplantation

Wu HJ, Xiao EH. Several issues about bone marrow stem cell transplantation for liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2859-2866

摘要

最近诸多研究已经报道了骨髓干细胞在正常肝脏及一些肝脏病理条件下能够分化为有功能的肝细胞和胆管细胞且可修复受损肝脏。本综述就当前骨髓源性肝脏干细胞研究水平进行回顾, 涵盖了最新的知识和已发表的文献, 包括: 来自动物模型的证据、可能的机制和条件, 未来临床应用细胞移植治疗肝病的方式等。

关键词: 肝脏疾病; 骨髓细胞; 移植

吴海军, 肖恩华. 骨髓干细胞移植治疗肝脏疾病的若干问题. *世界华人消化杂志* 2008; 16(25): 2859-2866

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2859.asp>

0 引言

自从Berry和Friend于1969年借助胶原酶消化技术分离出肝细胞以来, 实验动物研究已经证实肝细胞移植具有治疗肝衰竭以及肝脏先天性代谢病的潜能。当前, 临床上肝细胞移植具有了替代原位肝移植治疗肝衰竭的趋势, 然而, 健康人成体肝细胞来源的缺乏限制了其临床应用。大多数情况下, 移植肝细胞来源于手术丢弃的肝组织, 往往合并有过度的脂肪沉积而不适合移植。更为重要的是其分离步骤本身就加重了细胞破坏, 导致肝细胞调亡。因此, 临床上需要寻找新的肝细胞源。人骨髓分离的间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)具有在活体内外分化为肝细胞的潜能, 有望成为新的肝细胞源治疗肝脏疾病^[1-5]。本文

■背景资料

当前原位肝移植是治疗终末期肝病及肝衰竭的主要方法, 但因正常肝脏供体的缺乏使人们将注意力转向肝脏干细胞。骨髓干细胞是研究最为广泛的肝脏干细胞, 近期研究证实骨髓干细胞移植能够修复受损肝脏, 为提高肝功能衰竭的防治水平提供了新的思路。

■同行评议者

余宏宇, 教授, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院病理科

■ 研发前沿

骨髓干细胞移植
治疗肝脏疾病是
目前医学领域研
究的热点。

就BMSCs移植治疗肝脏疾病的研究进展及目前存在的问题作一综述。

1 BMSCs分化为肝细胞的证据

BMSCs作为肝脏干细胞的直接证据是其在活体内、外均能够分化为具有肝细胞功能的细胞。实验已证实骨髓中含有能够直接分化为肝细胞的细胞成分,即为起源于骨髓的肝脏干细胞。Avital *et al*^[6]就从骨髓中直接分离出 β_2m^-/Thy^+ 细胞,此类细胞不仅能表达白蛋白、AFP、细胞角蛋白(cytokeratins, CK)8、CK18等肝系细胞特异性标志,也具有胆管细胞特性。Schwartz *et al*^[7]发现细胞生长环境(如生长因子及细胞外基质)对调节BMSCs向肝细胞系特异性分化起至关重要的作用。他们将体外培养的BMSCs中加入肝细胞生长因子(HGF)及成纤维细胞生长因子-4(FGF-4)后同样诱导分化出具有肝细胞特异性标志及超微结构的肝样细胞。此外,Okumoto *et al*^[8]发现体外将BMSCs与肝细胞共同培养也有利于其向肝细胞分化。他们将BMSCs与肝细胞在体外共同培养后,发现BMSCs不仅可以分化为肝细胞系,并且与成熟肝细胞一样表达肝细胞特异因子mRNA,包括白蛋白。

诸多动物模型实验证实BMSCs移植到活体损伤肝组织内也可分化为有功能的肝细胞,活体肝损伤的诱导分化是目前主要的研究方向。Petersen *et al*^[9]对一组受到致死性照射的小鼠予以骨髓移植,在移植前给予2-乙酰氨基苄(2-acetylaminofluorene, 2-AAF)抑制宿主肝细胞再生同时给予四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)诱导肝损伤,检查发现在受体鼠肝脏内存在有来自于供体骨髓衍生的肝细胞。Theise *et al*^[10]将♂小鼠的骨髓注入到受照射损伤的雌鼠体内,检测发现所有♀肝组织内均有显著表达Y染色体和白蛋白mRNA的雄鼠骨髓细胞衍生的肝细胞。Oh *et al*^[11]将二肽基肽酶IV阳性(DPPIV(+))的鼠骨髓移植到2-AAF联合70%肝切除诱导的DPPIV(-)小鼠肝损伤模型后,在受体肝脏内发现有数量约20%的DPPIV(+)肝细胞以及卵圆细胞。Zhan *et al*^[12]将自体BMSCs移植到 CCl_4 诱导的鼠肝纤维化模型内,6 wk后检测发现植入的细胞分化为表达肝系细胞特异性标志物的细胞。

2 BMSCs在肝内分化的条件

临床及实验动物研究^[13-14]均表明BMSCs的增殖分化大多数情况下发生在严重的肝损伤或慢性

肝病的肝脏内,在正常肝组织中很少发现。从而推测肝脏损伤是BMSCs迁移活化的先决条件。Lagasse *et al*^[15]的研究除发现移植的BMSCs仅在受损的肝脏中具有生存优势以外,还证实了肝内移植的BMSCs转分化的水平随着肝脏损伤程度的加重(中度到重度)也相应增加。此外,Hong *et al*^[16]发现体外培养的BMSCs在受损肝血清的诱导下同样可分化为肝细胞。他们将2-AAF/ CCl_4 联合诱导的鼠肝损伤血清诱导培养BMSCs后,发现其表达幼稚肝细胞的标志物-丙酮酸激酶的同功酶M2(M2-PK)及肝脏发育的标志物integrin- $\beta 1$,而无血清刺激或正常血清培养的BMSCs均未表达上述标志物。

然而,BMSCs分化是否仅发生在受损的肝脏内也存在争议,Wagers *et al*^[17]研究发现移植的BMSCs在正常肝脏内仍可以分化为肝细胞,只是处于较低的水平。他们将鼠BMSCs移植到无特异性肝损伤的小鼠体内,在受体肝脏内仍可检测出BMSCs衍生的肝细胞,但发生率较低,约为1/70 000。尽管目前大多数研究支持肝损伤调节植入干细胞的分化,但正如上述所报道的结果仍存在显著的差异,究其原因分析可能与各实验模型应用的不同干细胞亚群有关。最初的研究主要是未分群的骨髓细胞,随后发现 $CD34^+$ 的细胞具有显著的肝脏再生能力^[10]。以后发现SP亚群也具备相似的多向分化能力^[18],然而SP亚群却富含 $CD34^+$ 细胞^[9]。由此可见实验方法的不同可能也与报道结果的差异有关。

3 动物模型实验应用到临床的依据

尽管干细胞的生物学特性在动物模型的研究方面已经明确,但其临床应用需要提供人干细胞具有相同特性的确凿证据。已有报道显示人类肝脏干细胞在多种急、慢性肝病的表型和组织反应与先前在动物模型观察到的结果相似^[20]。Alison *et al*^[21]对人同种干细胞移植的观察中发现,人BMSCs可以衍生为肝细胞和胆管上皮细胞。他们对接受性别错配的骨髓移植或肝移植的患者进行肝组织活检,通过对Y染色体荧光原位杂交检测发现有供体骨髓衍生的肝细胞和胆管上皮细胞。Theise *et al*^[22]的报道也显示,在接受骨髓移植患者的肝内,约4%-43%的肝细胞和4%-38%的胆管细胞来源于BMSCs的横向分化。不仅如此,体外分离的人BMSCs移植到活体动物模型内也可分化为肝细胞,进一步证实了人BMSCs的肝细胞分化潜能,为临床应用BMSCs

移植治疗肝病奠定了理论基础. Newsome *et al*^[23]将人脐血干细胞植入非致死性照射的非肥胖性糖尿病/重度联合免疫缺陷病(NOD/SCID)的小鼠体内, 处死后检查发现鼠肝内存在有人肝细胞. Ishikawa *et al*^[24]将人BMSCs同样植入到鼠NOD/SCID模型, 通过RT-PCR检测出植入细胞产生的人血白蛋白mRNA. Kakinuma *et al*^[25]将人脐血干细胞植入到1/3肝脏切除联合2-AAF诱导的肝损伤动物模型后, 受体肝脏内也鉴定出人脐血干细胞衍生的有功能的肝细胞. Wang *et al*^[26]将人HSC移植到鼠肝免疫损伤模型, 同样在模型鼠肝内检测出表达人血白蛋白mRNA的肝细胞.

4 植入干细胞分化为肝细胞的机制

在对于肝脏内干细胞分化机制的研究中, 植入干细胞是转分化(transdifferentiation)成为宿主细胞还是与宿主细胞融合(cell fusion)也是近期争论的焦点. 转分化可以定义为一类定型细胞在周围环境的诱导下直接转变为另一细胞类型. 上述报道均支持转分化的观点, 尤其是体外试验. 体内试验因转分化的细胞数量有限且无法解释宿主细胞的去向问题而备受争议. 因为假如BMSCs能够分化为另一组织的干细胞, 那么从理论上说这些少数的起始细胞也能够再生出整个器官. 对移植供体细胞的基因学分析已经揭示了另一种可能的机制, 那就是供体与宿主的细胞融合产生了成熟的组织细胞, 其间没有转或去分化发生. 融合产生的异核体细胞能够治愈一些致命的基因缺陷病并且似乎不易发生癌变^[27]. 诸多实验也证实了细胞融合的观点. Terada *et al*^[28]将标记的鼠骨髓细胞与胚胎细胞体外共同培养, 结果发现传代的细胞群落表达骨髓细胞标记物的同时又与胚胎细胞的形态及生长动力学相似. 故认为融合促进了转分化. 另一项研究显示将野生型的雄鼠骨髓细胞植入到延胡索酸乙酰乙酸酶(FAH)缺乏的雌鼠体内, 结果雌鼠肝脏内产生了表达FAH的肝脏结节. 结节切除后提取基因组DNA并通过探针检测FAH序列和Y染色体序列的基因数量, 发现所有宿主肝脏结节的基因数量(约为26%)均低于供体骨髓细胞DNA的基因数量(>90%), 提示供体骨髓细胞不能直接转化为肝细胞^[29]. Wang *et al*^[30]将BMSCs移植到鼠肝损伤模型, 通过对受体肝细胞DNA检测发现超过一半的细胞染色体组与受体相同或是与受体融合的产物, 同样支持干细胞移植后与宿主细胞融合的观点. Dahlke *et al*^[31]

将BMSCs移植到T细胞免疫介导的鼠肝炎模型后, 发现骨髓衍生的肝细胞的细胞核包含有供体和受体两种细胞核成分, 提示BMSCs对免疫介导的肝炎的修复是通过细胞融合完成的.

与上述观点相反研究也见报道, 在人类肝脏干细胞移植到鼠模型的实验中, 通过对鼠及人细胞核染色并未显示细胞融合的任何证据^[23-24], 提示细胞融合对转分化几乎不起作用. Jiang *et al*^[32]将HSCs与受损肝组织共同培养, 免疫荧光检测HSCs失去了正常的表型并且开始表达白蛋白, 上述结果细胞融合同样无法解释.

5 BMSCs移植治疗肝脏疾病的动物实验证据、临床证据和疗效

肝纤维化既是大多数慢性肝病的主要特征, 也是慢性肝病向肝硬化、肝癌和肝功能衰竭发展的必经过程. 通常认为肝纤维化是进行性加重的病程, 然而已有研究证实自体BMSCs移植可有效逆转其病程, 促进肝纤维化的消退. 将有望成为顽固性肝纤维化的新的治疗策略. Higashiyama *et al*^[33]将表达增强绿色荧光蛋白(EGFP)的鼠BMSCs移植到CCl₄诱导的鼠肝损伤模型, 不同时间观察发现大量EGFP(+)细胞定位于肝纤维化的中心区域, 并且发现其数量随着肝纤维化的修复而减少. Wu *et al*^[34]报道将中药归元方联合自体BMSCs移植到大鼠肝纤维化模型, 结果显示肝损伤区域减小, 肝功能及肝纤维化评分均有改善, 肝组织羟脯氨酸的含量降低, 免疫组化显示移植的骨髓干细胞能在肝损伤、肝纤维化形成环境中存活、增殖, 并向肝细胞分化. BMSCs移植对肝纤维化的修复除通过分化为肝细胞改善肝功能外, 尚可通过减少肝脏内胶原沉着发挥抗纤维化效应. Abdel Aziz *et al*^[35]将鼠BMSCs细胞通过尾静脉移植到CCl₄诱导的鼠肝纤维化模型内, 结果显示模型鼠肝脏胶原基因的表达及羟脯氨酸的含量均降低, 表现了显著的抗肝脏纤维化效应. Zhan *et al*^[12]将自体BMSCs移植到鼠CCl₄诱导的肝纤维化模型, 发现植入干细胞可有效地分化为肝细胞, 但不能表达 α -平滑肌动蛋白, 即不能分化为肝星形细胞, 后者在肝纤维化形成中起到关键作用. 间接证实了自体BMSCs移植有助于治疗肝纤维化. 所有上述动物模型报道解决了临床细胞移植需要的健康原代细胞的问题, 也进一步明确了BMSCs具有多向分化潜能, 有望成为细胞移植治疗的靶细胞.

■ 相关报道

Oertel *et al*认为受损肝脏再生发生在3种相对独立的水平: 肝细胞、肝内干细胞(卵圆细胞)和肝外干细胞. 前两种细胞在肝组织损伤后增殖能力有限, 而外生性的肝脏干细胞来源于骨髓干细胞, 可以对烯丙醇损伤以及肝癌形成后的肝损伤作出应答. 虽然数量较少, 但此类细胞可以多向分化且具有非常强的增殖潜能, 对肝细胞再生意义重大.

■创新盘点

本文从骨髓干细胞分化活体内、外为肝细胞的证据、可能的分化的机制、移植到肝脏的方式、细胞数量等相关热点问题展开论述。

临床上干细胞移植通常需要在体外培养扩增,体外培养过程中干细胞是否会发生自发性分化甚至发生突变将直接影响着治疗的安全性,这就要求我们寻找人干细胞体外培养安全性的直接证据。Sawada *et al*^[36]观察人BMSCs体外培养从原代到12代的3 mo中,增殖率逐渐下降,细胞形态未见明显变化,细胞增殖基因的表达也显著不同于癌细胞。由此可见Child-Pugh评分体外培养1-2 mo很少发生自发性转化,适用于临床干细胞移植治疗。研究BMSCs对肝脏的修复作用至少应该包括两个方面:即对受损肝脏功能的恢复以及促进受损肝脏的再生。Fürst *et al*^[37]证实自体BMSCs移植可促进受损肝脏再生。他们将CD133(+)的BMSCs移植到实施了扩大右肝切除手术的肝脏恶性肿瘤患者的残肝内,CT测量移植后残肝体积及平均每日肝脏体积增长数均显著高于未予细胞移植的对照组。Terai *et al*^[38]报道将9名肝硬化患者的自体BMSCs通过外周静脉灌注到患者体内,移植24 wk后观察发现所有患者血清白蛋白、总蛋白及Child-Pugh评分均有显著提高($P<0.05$)。Levicar *et al*^[2]将CD34(+)BMSCs通过门静脉及肝动脉移植到5名慢性肝病患者肝脏内,移植细胞数量范围为 1×10^6 至 2×10^8 之间,连续随访12-18 mo显示所有接受细胞移植的患者均较好的耐受了移植治疗,未见严重的并发症和副反应发生。BMSCs除可用于治疗肝损伤性疾病外,还可用于肝脏代谢性疾病以及基因遗传缺陷病的治疗。Wilson's病是肝脏铜代谢异常的疾病,已有应用BMSCs移植治疗该病的报道。Allen *et al*^[39]将同窝出生的小鼠BMSCs移植到46只小鼠Wilson's模型(通过亚致死性照射后给予铜负荷饮食制备),观察发现11只模型鼠肝内显示有肝脏基因型的再生,肝脏铜水平显著下降,铜负荷逆转水平与常规同系肝细胞移植相似。Lagasse *et al*^[15]证实BMSCs诱导产生的肝细胞可能重新构建延胡索酸乙酰乙酸酶(FAH)缺陷小鼠的肝脏,他们将骨髓移植到FAH-缺乏的致死性遗传性I型高酪氨酸血症的小鼠模型中,观察发现骨髓衍生的细胞重建了大部分(达30%-50%)肝组织,同时发现大量供体衍生的能够表达FAH酶的形态正常的肝细胞,生化机能鉴定显示骨髓衍生的细胞几乎完全修复了正常肝细胞的功能。另外,最近研究显示粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor G-CSF)可有效地促进受损肝脏修复,利用G-CSF动员自体BMSCs治疗终末期肝病也代表

了未来干细胞治疗的研究方向。此法较BMSCs移植具有显著的优势,是真正意义上的无创治疗。Gaia *et al*^[40]为评估G-CSF动员自体BMSCs治疗终末期肝硬化的可行性和安全性进行了一项研究。他们对8名严重肝硬化的患者(Child-Pugh评分B-C,脾脏直径 <170 mm)给予G-CSF($5\mu\text{g/kg}$,3次/d,连续3 d)动员BMSCs,结果发现所有患者的CD34⁺细胞和骨髓CFU-GM前体细胞均增加,脾脏直径较前显著逆转。所有患者均可对G-CSF耐受,没有不良反应发生。

上述研究成果为我们揭示了BMSCs治疗终末期肝病的美好蓝图,但上述报道是否真正意义上促进细胞移植大规模应用于临床却并未得到广泛认同。与上述研究的结果相反,尚有报道显示移植的BMSCs并不能改善受损肝脏功能及提高生存率,甚至可能参与受体肝纤维化的形成。Dahlke *et al*^[41]将BMSCs移植到CCl₄联合惹草碱诱导的啮齿动物肝损伤模型,结果显示移植后并未改善动物的生存率。组织学检查发现浸润到肝脏的植入细胞大部分是粒细胞系的,仅代表肝坏死的炎症反应。Cantz *et al*^[42]将BMSCs移植到肝损伤鼠的脾脏内,检测发现骨髓衍生的细胞对肝损伤再生作用很少或几乎没有作用。Kisseleva *et al*^[43]的研究结果除提示骨髓干细胞移植除不能改善受损鼠肝功能外,尚有潜在地促进肝纤维化形成的作用。由此可见BMSCs对肝病潜在的治疗作用必须谨慎的评估。

6 BMSCs与肝癌的关系

干细胞和肿瘤细胞具有相同的特性即可以无限增殖,这同时也引发一个疑问,那就是肝脏干细胞是否具有癌变的潜能。许多肝癌的动物模型均证实肿瘤起源于卵圆细胞,人们不禁提出了假说,认为这些细胞对人肝脏肿瘤的发生具有潜在的促进作用。最近,研究者已经证实一些癌瘤干细胞也是由成人干细胞分化而来,如胃癌可以直接起源于BMSCs。肝癌的起源是否也与成体干细胞有关尚不明确。当前通过形态学和表型已在肝硬化的不良结节和肝腺瘤内鉴定出肝脏干细胞,加之肝细胞癌和胆管细胞癌都存在过渡型以及结合型的肝-胆管细胞癌,若假设这些类型的癌均起源于肝脏干细胞则更容易解释^[36]。有学者提出了新的肝癌遗传学模型,阐述了干细胞与肝癌形成的关系。其观点为:慢性肝损伤可以动员骨髓干细胞到肝脏,进而分化为卵圆细胞和干细胞促进肝脏再生。持续再生导

致过度增生, 转化突变率也随之增加, 细胞外基质重塑触发了抑制肝脏特异性转录因子转活潜能的级联反应, 干细胞的成熟受阻, 最终导致肝癌发生^[44].

最近亦有研究显示肝脏肿瘤细胞即为成熟肝细胞与同时具有胆管细胞及肝细胞表型的未分化细胞融合而成. Cerec *et al*^[45]研究发现肝脏干细胞具有极强的可塑性, 其在转分化为肝细胞和增殖的同时具有分化为肿瘤细胞的潜能. Chiba *et al*^[46]研究发现肝脏干细胞的自我更新失调可能是肝癌发生的早期改变. 他们将Bmi1及 β -连环蛋白突变体基因转入肝脏干细胞以促进干细胞自我更新, 结果导致单个干细胞显著扩增出子代同源细胞, 进而形成同时具有肝细胞癌及胆管细胞癌特征的肿瘤.

7 BMSCs肝内移植方式的选择

BMSCs移植到肝脏可供选择的移植途径较多, 肝脏、脾脏及腹膜腔均是可供选择的移植部位, 且已被报道用于动物模型实验. 影像设备引导下腹膜腔穿刺移植创伤较小且可以移植较大的数量, 但其缺点是肝细胞在腹膜腔内较难存活. 门静脉内移植BMSCs应用较多, 此途径移植也更符合肝脏组织学及生理学特点, 与其他途径相比, 细胞更易进入肝窦. 动物模型已经证实门静脉输注BMSCs在肝脏内有更高的首次通过率^[47]. 此外, 门静脉是肝脏的营养静脉, 门静脉血中的营养成分对植入的细胞有益, 加之肝脏本身的微环境也可调节植入细胞的分化. 门静脉移植大致可分为直接和间接两种途径, 直接途径为经皮肝内门静脉穿刺套管插入术, 间接途径是剖腹肠系膜静脉插入套管或借助腹腔镜^[48]门静脉插管移植. 间接门静脉途径细胞移植需通过开腹将导管插至肠系膜下静脉或脐静脉, 创伤较大, 应用较少. 经皮肝内门静脉穿刺套管插入术属于介入放射学范畴, 技术成熟且创伤相对较小, 已有较多报道应用于肝内胰岛细胞移植^[49]. 具体方法是在超声、CT或透视引导下经皮穿刺到肝内门静脉, 造影明确后引入套管, 同时缓慢输注移植细胞, 注入细胞期间密切监测门静脉压力, 注完后给予肝素抗凝以防止门静脉血栓形成. 术后予以凝血酶饱和的明胶海绵栓塞针道. Goss *et al*^[49]通过上述途径移植胰岛细胞, 术后随访未见门静脉栓塞及内出血等并发症. Weimar *et al*^[50]也报道了44例经皮穿刺肝内门静脉插管移植胰岛细胞的病例,

其中39例1次穿刺成功, 4例穿刺2次, 1例穿刺4次成功. 所有病例仅1例出现包膜下血肿.

肝动脉介入插管途径也可将细胞直接输注至肝脏, 但从肝脏的组织超微结构来看, 并不利于细胞向肝窦内迁移. 但其优点是符合介入移植的动脉插管途径, 临床上也见经肝动脉细胞移植的报道^[51-53].

脾脏被认为是肝细胞移植的理想部位, 植入脾内的肝细胞可长期存活、增殖并保持肝细胞的形态和功能. 脾内移植后50%-60%的植入肝细胞位于肝脏内, 15%仍在脾内, 5%入肺. 但其缺点同样是移植的细胞数量受限, 脾脏仅能容纳不超过3%的正常肝组织, 且可引起门静脉高压症及右心房压力升高等并发症. 目前, 脾脏内肝细胞移植亦有较多报道^[53-56].

8 BMSCs肝内移植数量

门静脉内植入细胞的数量也是值得探讨的问题, 如果细胞移植数量过少, 则达不到治疗效果. 但若经门静脉输注过多的细胞即可导致死性的门静脉栓塞及肝坏死. 移植细胞的数量应参照人体肝细胞总数, 通常的计算方法是每千克体重大概是 4×10^9 个肝细胞. 人体大约需要 2.5×10^{10} 个肝细胞才能维持人体正常肝脏功能. 由于肝功能衰竭患者体内尚有部分残存的肝细胞, 故移植相当于3%-5%肝细胞总量($3-5 \times 10^9$ 个肝细胞)即可起到较好的支持作用^[2]. Levicar *et al*^[2]将数量为 1×10^6 至 2×10^8 个CD34(+)BMSCs通过门静脉或肝动脉移植到5名慢性肝病患者肝脏内, 连续随访12-18 mo未见严重的并发症和副反应发生. Muraca *et al*^[57]研究证实门静脉栓塞的发生率与植入的细胞数量呈正相关. 他们通过门静脉插管移植猪肝细胞, 以 2.5×10^8 个/min的速度注入, 发现当注入细胞数量达 4×10^8 - 2.4×10^9 个时, 门静脉压也随之增加, 二者呈线形关系. 此时门静脉血流量逐渐降低, 与门静脉压呈反线性关系. 当门静脉压 >40 mmHg时门静脉血流量接近于零, 血小板降至原来的22%-58%. 肝段内及门静脉小分支内均见包含有肝细胞的血栓形成.

为降低门静脉栓塞等并发症的发生率, 应严格控制植入细胞的数量. 但究竟细胞数量控制在什么范围内才可避免并发症的发生尚无明确标准. 报道移植成功的病例移植的细胞数量也不尽一致. 王平 *et al*^[58]将 10^5 个BMSCs通过门静脉移植到正常大鼠肝脏内, 发现移植后4 wk仍见存活

■应用要点

本文较全面的总结性肝脏干细胞研究水平, 对骨髓干细胞移植治疗肝脏疾病的实验及临床研究具有一定的参考价值.

■名词解释

骨髓干细胞: 研究最广泛的成体干细胞, 包括造血干细胞和间充质干细胞。骨髓干细胞位于骨髓腔内, 具有极强的可塑性, 分离培养的BMSCs能够在多次传代中保持未分化状态及稳定的表型。

的移植细胞, 且向肝实质内迁移。am Esch *et al*^[59]通过门静脉插入5-F cobra导管, 将最大细胞数量达 1.23×10^7 个自体CD133⁺ BMSCs输注到肝右段门静脉栓塞术后的患者肝脏内, 4 min注完。期间未见门静脉栓塞。Gordon *et al*^[51]通过门静脉将最高达 2×10^8 个CD34⁺ BMSCs移植到肝功能不全的患者肝脏内, 亦未见门静脉栓塞等并发症发生。已有报道显示门静脉内少量多次细胞移植可降低门静脉栓塞等的发生率。Rozga *et al*^[60]通过实验研究发现, 与一次性大量细胞植入比较(一次性输注 2×10^7 个肝细胞), 门静脉内多次少量细胞移植(分6批植入, 每批 5×10^6 个肝细胞)可明显降低肝损害的发生率($P < 0.05$)。Dunn *et al*^[61]也提出经多次脾内移植, 可减少了一次大量移植产生的并发症且增加了移植细胞的总量。

9 结论

BMSCs应用于临床前景广阔, 然而, 临床上成功的应用干细胞治疗肝脏疾病必须包括对患者进行严密的治疗风险预测, 严格的把握适应症以及建立长期的疗效观察。这一切都将决定治疗的利弊^[62]。肝癌的起源是否与成体干细胞有关也尚不明确。尽管对BMSCs移植存在这些困难、疑问以及潜在的危险, 当前对BMSCs新的试验模式的研究仍在继续, 如移植时同时给予细胞因子和化学增殖素以利于细胞在肝内有效的定位及分化等^[4,63]。相信随着成人肝脏干细胞研究的深入及上述问题的解决, 将使人们更好的了解肝脏内环境的稳态和再生的机制, 也必将开启细胞移植治疗肝脏疾病的大门。

10 参考文献

- 1 Tanaka K, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Rivas-Carrillo JD, Jun HS, Kobayashi N. Functional hepatocyte culture and its application to cell therapies. *Cell Transplant* 2006; 15: 855-864
- 2 Levicar N, Pai M, Habib NA, Tait P, Jiao LR, Marley SB, Davis J, Dazzi F, Smadja C, Jensen SL, Nicholls JP, Apperley JF, Gordon MY. Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34⁺ cells in patients with chronic liver disease. *Cell Prolif* 2008; 41 Suppl 1: 115-125
- 3 Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE, Christ B. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007; 56: 405-415
- 4 Yagi K, Kojima M, Oyagi S, Ikeda E, Hirose M, Isoda K, Kawase M, Kondoh M, Ohgushi H. [Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative

medicine] *Yakugaku Zasshi* 2008; 128: 3-9

- 5 Yan L, Han Y, Wang J, Liu J, He Y, Wang H, Fan D. Peripheral blood monocytes from the decompensated liver cirrhosis could migrate into nude mouse liver with human hepatocyte-markers expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371: 635-638
- 6 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 156-164
- 7 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
- 8 Okumoto K, Saito T, Haga H, Hattori E, Ishii R, Karasawa T, Suzuki A, Misawa K, Sanjo M, Ito JI, Sugahara K, Saito K, Togashi H, Kawata S. Characteristics of rat bone marrow cells differentiated into a liver cell lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver. *J Gastroenterol* 2006; 41: 62-69
- 9 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- 10 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
- 11 Oh SH, Witek RP, Bae SH, Zheng D, Jung Y, Piscaglia AC, Petersen BE. Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology* 2007; 132: 1077-1087
- 12 Zhan Y, Wang Y, Wei L, Chen H, Cong X, Fei R, Gao Y, Liu F. Differentiation of hematopoietic stem cells into hepatocytes in liver fibrosis in rats. *Transplant Proc* 2006; 38: 3082-3085
- 13 Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, Achten R, Verslype C, Diehl AM. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 2003; 163: 1301-1311
- 14 Faris RA, Konkin T, Halpert G. Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease. *Artif Organs* 2001; 25: 513-521
- 15 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234
- 16 Hong H, Chen JZ, Zhou F, Xue L, Zhao GQ. Influence of serum from liver-damaged rats on differentiation tendency of bone marrow-derived stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2250-2253
- 17 Wagers AJ, Sherwood RL, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256-2259
- 18 Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, Brenner MK, Goodell MA. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells.

- Haematologica* 2003; 88: 368-378
- 19 Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997; 3: 1337-1345
 - 20 Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999; 30: 1425-1433
 - 21 Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
 - 22 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
 - 23 Newsome PN, Johannessen I, Boyle S, Dalakas E, McAulay KA, Samuel K, Rae F, Forrester L, Turner ML, Hayes PC, Harrison DJ, Bickmore WA, Plevris JN. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* 2003; 124: 1891-1900
 - 24 Ishikawa F, Drake CJ, Yang S, Fleming P, Minamiguchi H, Visconti RP, Crosby CV, Argraves WS, Harada M, Key LL Jr, Livingston AG, Wingard JR, Ogawa M. Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 174-185
 - 25 Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, Teramoto K, Arai S, Sato C, Takase K, Yasumizu T, Teraoka H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003; 21: 217-227
 - 26 Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolta JA. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 101: 4201-4208
 - 27 Kashofer K, Bonnet D. Gene therapy progress and prospects: stem cell plasticity. *Gene Ther* 2005; 12: 1229-1234
 - 28 Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-545
 - 29 Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904
 - 30 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901
 - 31 Dahlke MH, Loi R, Warren A, Holz L, Popp FC, Weiss DJ, Piso P, Bowen DG, McCaughan GW, Schlitt HJ, Bertolino P. Immune-mediated hepatitis drives low-level fusion between hepatocytes and adult bone marrow cells. *J Hepatol* 2006; 44: 334-341
 - 32 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49
 - 33 Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, Okano H, Matsuzaki Y, Shiota G, Okazaki I. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2007; 45: 213-222
 - 34 Wu LM, Li LD, Liu H, Ning KY, Li YK. Effects of Guiyuanfang and autologous transplantation of bone marrow stem cells on rats with liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1155-1160
 - 35 Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, Rashed LA, Sabry D, Hassouna AA, Hasan NM. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007; 40: 893-899
 - 36 Sawada R, Ito T, Tsuchiya T. Changes in expression of genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in comparison with cancer cells. *J Artif Organs* 2006; 9: 179-184
 - 37 Fürst G, Schulte am Esch J, Poll LW, Hosch SB, Fritz LB, Klein M, Godehardt E, Krieg A, Wecker B, Stoldt V, Stockschröder M, Eisenberger CF, Mödder U, Knoefel WT. Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology* 2007; 243: 171-179
 - 38 Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24: 2292-2298
 - 39 Allen KJ, Cheah DM, Lee XL, Pettigrew-Buck NE, Vadolas J, Mercer JF, Ioannou PA, Williamson R. The potential of bone marrow stem cells to correct liver dysfunction in a mouse model of Wilson's disease. *Cell Transplant* 2004; 13: 765-773
 - 40 Gaia S, Smedile A, Omedè P, Olivero A, Sanavio F, Balzola F, Ottobrelli A, Abate ML, Marzano A, Rizzetto M, Tarella C. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol* 2006; 45: 13-19
 - 41 Dahlke MH, Popp FC, Bahlmann FH, Aselmann H, Jäger MD, Neipp M, Piso P, Klempnauer J, Schlitt HJ. Liver regeneration in a retrorsine/CCl4-induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute? *J Hepatol* 2003; 39: 365-373
 - 42 Cantz T, Sharma AD, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Klein C, Manns MP, Ott M. Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant* 2004; 13: 659-666
 - 43 Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* 2006; 45: 429-438
 - 44 Wu XZ, Yu XH. Bone marrow cells: the source of hepatocellular carcinoma? *Med Hypotheses* 2007; 69: 36-42
 - 45 Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, Gripon P, Kremsdorf D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor.

同行评价

本文内容全面, 参考文献引用较新, 是一篇较好的综述。

- Hepatology* 2007; 45: 957-967
- 46 Chiba T, Zheng YW, Kita K, Yokosuka O, Saisho H, Onodera M, Miyoshi H, Nakano M, Zen Y, Nakanuma Y, Nakauchi H, Iwama A, Taniguchi H. Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology* 2007; 133: 937-950
 - 47 Fan TX, Hisha H, Jin TN, Yu CZ, Lian ZX, Guo SB, Cui YZ, Feng B, Yang GX, Li Q, Ikehara S. Successful allogeneic bone marrow transplantation (BMT) by injection of bone marrow cells via portal vein: stromal cells as BMT-facilitating cells. *Stem Cells* 2001; 19: 144-150
 - 48 Movahedi B, Keymeulen B, Lauwers MH, Goes E, Cools N, Delvaux G. Laparoscopic approach for human islet transplantation into a defined liver segment in type-1 diabetic patients. *Transpl Int* 2003; 16: 186-190
 - 49 Goss JA, Soltes G, Goodpastor SE, Barth M, Lam R, Brunnicardi FC, Froud T, Alejandro R, Ricordi C. Pancreatic islet transplantation: the radiographic approach. *Transplantation* 2003; 76: 199-203
 - 50 Weimar B, Rauber K, Brendel MD, Bretzel RG, Rau WS. Percutaneous transhepatic catheterization of the portal vein: A combined CT- and fluoroscopy-guided technique. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1999; 22: 342-344
 - 51 Gordon MY, Levicar N, Pai M, Bachellier P, Dimarakis I, Al-Allaf F, M'Hamdi H, Thalji T, Welsh JP, Marley SB, Davies J, Dazzi F, Marelli-Berg F, Tait P, Playford R, Jiao L, Jensen S, Nicholls JP, Ayav A, Nohandani M, Farzaneh F, Gaken J, Dodge R, Alison M, Apperley JF, Lechler R, Habib NA. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells* 2006; 24: 1822-1830
 - 52 张强, 李京雨, 徐力扬, 刘明, 姚鹏, 王帅. 经肝动脉骨髓干细胞移植治疗肝硬化的初步临床应用. *中国介入影像与治疗学* 2005; 2: 261-263
 - 53 姚鹏, 胡大荣, 王帅, 胡学玲, 闻炜, 周一鸣, 龚丽娟. 自体骨髓干细胞移植治疗慢性重症肝病临床研究. *透析与人工器官* 2006; 17: 18-21
 - 54 Arkadopoulos N, Lilja H, Suh KS, Demetriou AA, Rozga J. Intrasplenic transplantation of allogeneic hepatocytes prolongs survival in anhepatic rats. *Hepatology* 1998; 28: 1365-1370
 - 55 蔡云峰, 陈积圣, 闵军, 魏菁, 何劲松, 莫隽全. 骨髓源性肝干细胞定向分化及脾内移植研究. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 551-554
 - 56 Ju S, Teng GJ, Lu H, Zhang Y, Zhang A, Chen F, Ni Y. In vivo MR tracking of mesenchymal stem cells in rat liver after intrasplenic transplantation. *Radiology* 2007; 245: 206-215
 - 57 Muraca M, Neri D, Parenti A, Feltracco P, Granato A, Vilei MT, Ferraresio C, Ballarin R, Zanusso GE, Giron G, Rozga J, Gerunda G. Intraportal hepatocyte transplantation in the pig: hemodynamic and histopathological study. *Transplantation* 2002; 73: 890-896
 - 58 王平, 王建华, 颜志平, 胡美玉, 王艳红, 李文涛, 林根来. 大鼠骨髓基质细胞分离培养和经门静脉途径移植的初步研究. *中华放射学杂志* 2004; 38: 129-132
 - 59 am Esch JS 2nd, Knoefel WT, Klein M, Ghodsizad A, Fuerst G, Poll LW, Piechaczek C, Burchardt ER, Feifel N, Stoldt V, Stockschröder M, Stoecklein N, Tustas RY, Eisenberger CF, Peiper M, Häussinger D, Hosch SB. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 2005; 23: 463-470
 - 60 Rozga J, Holzman M, Mosconi AD, Fujioka H, Morsiani E, Demetriou AA. Repeated intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic rats. *Cell Transplant* 1995; 4: 237-243
 - 61 Dunn TB, Kumins NH, Raofi V, Holman DM, Mihalov M, Blanchard J, Law WR, Rastellini C, Benedetti E. Multiple intrasplenic hepatocyte transplantations in the dalmatian dog. *Surgery* 2000; 127: 193-199
 - 62 Fändrich F, Ruhnke M. [Stem cells and liver replacement] *Med Klin (Munich)* 2003; 98 Suppl 2: 18-22
 - 63 Marumoto Y, Terai S, Urata Y, Matsumoto T, Mizunaga Y, Yamamoto N, Jin H, Fujisawa K, Murata T, Shinoda K, Nishina H, Sakaida I. Continuous high expression of XBP1 and GRP78 is important for the survival of bone marrow cells in CCl4-treated cirrhotic liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 367: 546-552

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志网络版的发表前链接

本刊讯 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程. (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)

共聚焦显微内镜的研究现状

黄锦, 孙刚, 杨云生

黄锦, 孙刚, 杨云生, 中国人民解放军总医院消化内科 北京市 100853

作者贡献分布: 文献检索、资料分析和论文撰写由黄锦和孙刚完成, 选题和审校由杨云生完成。

通讯作者: 杨云生, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院消化疾病中心. sunny888@medmail.com.cn
电话: 010-66939747

收稿日期: 2008-03-31 修回日期: 2008-07-07

接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-09-08

Current research status of confocal endomicroscopy

Jin Huang, Gang Sun, Yun-Sheng Yang

Jin Huang, Gang Sun, Yun-Sheng Yang, Department of Gastroenterology and Hepatology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Yun-Sheng Yang, Department of Gastroenterology and Hepatology, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. sunny888@medmail.com.cn

Received: 2008-03-31 Revised: 2008-07-07

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-09-08

Abstract

Confocal endomicroscope integrates a miniaturized confocal microscope in the distal tip of a conventional endoscope, and enables subsurface analysis of gastrointestinal mucosa and *in vivo* histology during ongoing endoscopy. The diagnostic spectrum of confocal endomicroscopy is currently expanding from screening and surveillance for colorectal cancer towards ulcerative colitis, Barrett's esophagus, *Helicobacter pylori*, early gastric cancer, oral carcinoma and so on. It's tempting to speculate that confocal endomicroscopy will play an important diagnostic role in gastrointestinal diseases in the future.

Key Words: Confocal endomicroscopy; Diagnosis; Gastrointestinal disease

Huang J, Sun G, Yang YS. Current research status of confocal endomicroscopy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2867-2870

摘要

共聚焦显微内镜(confocal endomicroscopy)整

合了激光共聚焦显微镜和传统内镜, 实现了进行内镜检查的同时进行黏膜的共聚焦显微观察, 在对消化系统疾病的诊断方面有着独特的优势, 已经应用于结直肠癌, 溃疡性结肠炎、Barrett食管、幽门螺杆菌及早期胃癌等疾病的诊断, 本文对近年来共聚焦显微内镜的研究现状作一综述。

关键词: 共聚焦显微内镜; 诊断; 消化系统疾病

黄锦, 孙刚, 杨云生. 共聚焦显微内镜的研究现状. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2867-2870

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2867.asp>

0 引言

电子内镜问世以来, 已经在消化系统疾病的诊断和治疗等方面得到了广泛的应用。随着光学、视频、计算机等技术的迅速发展, 又诞生了将激光共聚焦显微镜结合于标准电子内镜的共聚焦内镜, 不仅具备传统电子内镜的特点, 更能同时生成共聚焦图像, 在内镜检查的过程中对体内组织实时显微成像, 提供放大1000倍的图像, 其在临床上的应用具有深远的意义。

1 共聚焦内镜的结构及成像原理

共聚焦内镜是在标准电子内镜的头端整合了激光共聚焦显微镜^[1-2]。其头端和插入镜管直径为12.8 mm, 包含一个水和气体喷嘴、两个光导束、一个辅助喷水孔道和一个2.8 mm的工作孔道。激光显微内镜检查时, 发射至组织表面的氩离子激光激发波长为488 nm, 最大激光输出功率≤1 mW。共聚焦图像的扫描速度为0.8帧/s(1024像素×1024像素)或1.6帧/s(1024像素×512像素)。每次扫描光学层面厚度为7 μm, 侧面分辨率为0.7 μm。表层下Z轴范围(自黏膜表面至黏膜下的深度)为0-250 μm。共聚焦内镜的单根光纤同时充当照明点光源和检测针孔。在单点扫描的共聚焦显微镜中, 以光栅模式扫描某点, 测量从连续的点返回至检测器的光波并将其数字化, 从而构成扫描区域的图像, 每一个图像代表组织中的一个光学切面。操作时共聚焦图像可以

■背景资料

共聚焦显微内镜在内镜检查的同时对体内组织实时显微成像, 达到光学活检的目的, 不需要活检和组织病理学检查即可获得消化系黏膜层高度放大的横断面图像。进行即时高分辨率的组织学诊断, 在对消化道疾病的诊断方面有着独特的优势, 避免了重复内镜检查及多次活检, 是快速准确的诊断工具。

■同行评议者

刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

■研发前沿

共聚焦激光显微内镜问世以来,已经在消化系统疾病的诊断中显示出了良好的应用前景,有望成为替代传统内镜检查的有利工具。

与内镜图像同时生成。

进行共聚焦内镜检查时,为了增加对比度,往往需要使用荧光对比剂。目前应用较广泛的主要是静脉注射剂荧光素钠和局部应用的盐酸吡啶黄。荧光素钠^[3]是一种微酸性、亲水的荧光染色剂,常用于眼科,静脉注射后20 s,可以广泛结合于血清清蛋白,未结合的染色分子可随静脉输入逐渐渗透入黏膜全层,标记表面上皮的细胞外基质和基底膜,显示结肠隐窝结构、上皮细胞、固有膜的结缔组织基质、血管和红细胞,使固有膜的结缔组织基质与微血管系统产生强烈对比,并可以持续30 min。但由于荧光素钠不能穿过细胞的类脂膜与细胞核的酸性物质结合,故不能清楚显示细胞核。盐酸吡啶黄局部喷洒数秒钟即可被吸收,能够穿过细胞膜与细胞核的酸性物质结合,更适于标记表层上皮细胞、显示细胞核。但是只局限于黏膜表层(0-100 μm)不能逐渐渗入黏膜全层产生上皮下深层对比,且其分布随时间的变化小,因此二者的联合应用可以更清晰的显示胃肠黏膜的结构,这些图像与同一部位的活检组织横切面的病理图像有很好的一致性。

2 共聚焦显微镜的应用

2.1 在消化系统疾病中的应用

2.1.1 Barrett食管及Barrett食管相关的癌变:共聚焦激光显微内镜在食管疾病研究中应用最早、最多的是Barrett食管,由于杯状细胞存在,Barrett食管在共聚焦图像中有特征性的形状^[4-6]。Kiesslich *et al*^[7]用共聚焦内镜对63例存在长期胃食管反流症和已知存在Barrett食管的患者进行检查,并同时可对可疑病灶取活检进行对照,将共聚焦内镜诊断结果与活检组织病理学结果对照显示:共聚焦内镜对Barrett食管及Barrett食管相关癌变诊断的敏感性分别是98.1%和92.9%;特异性分别是94.1%和98.4%;准确性分别为96.8%和97.4%;且不同内镜医师之间的诊断一致性较好。

2.1.2 食管鳞状细胞癌:Deinert *et al*^[8]通过共聚焦显微内镜检测到食管血管和细胞结构上的改变,诊断了一位63岁的早期食管鳞状细胞癌患者。Pech *et al*^[9]研究了共聚焦显微内镜对21例早期食管鳞状细胞癌患者诊断的价值,结果显示,通过共聚焦显微内镜发现了21位患者的43处病变,共聚焦显微内镜的诊断准确率高达95%,敏感性和特异性分别为100%和87%。该项研究提示,共聚焦显微内镜可以成为诊断早期食管鳞状细胞

癌的有利工具。

2.1.3 幽门螺杆菌(*H pylori*):应用共聚焦显微内镜可以观察到经吡啶黄染色后*H pylori*的典型形状,单个或聚集成群的白色明亮的光点,经共聚焦内镜图像放大后可清楚地观察到包括菌体和鞭毛的特征性形态。Kiesslich *et al*的研究^[10]首次报道在体内直接观察到*H pylori*,为*H pylori*检测提供了一种更为直观的方法。这种技术也可以应用于*H pylori*相关性胃炎的诊断。

2.1.4 早期胃癌:共聚焦内镜在早期胃癌的诊断价值已被多项研究证实。Kitabatake *et al*^[11]对27例早期胃癌患者进行共聚焦内镜检查,将共聚焦图像与病理组织学横断面图像进行对比,由2名病理医师分别对正常和癌组织的共聚焦图像进行诊断,结果显示共聚焦图像与组织学图像对应性好,2名病理医师的诊断准确率达到94.2%和96.2%,提示依据共聚焦图像完全可以进行实时体内组织学诊断。Kakeji *et al*^[12]对内镜下切除的早期胃癌黏膜体外涂抹0.05%吡啶黄后用图像分析软件计算其核面积,显示胃癌尤其是分化型胃癌黏膜细胞核面积明显高于正常黏膜,提示吡啶黄进行细胞核染色效果好,并且可以依据共聚焦图像和细胞核面积诊断早期胃癌。由于共聚焦内镜的显微放大作用,结合染色剂增加对比度,可在内镜检查的同时进行实时模拟组织学检查,对黏膜粗糙及可疑部位进行检查并靶向活检,更易于检出黏膜内早期癌变。

2.1.5 结直肠癌:共聚焦内镜可直接对可疑病灶进行检测,大大提高了内镜对结直肠癌的检出率,而且这种快速的优化诊断对于临床内镜下治疗如肿瘤组织的内镜黏膜切除术有重要的意义。Kiesslich *et al*^[13]对42例具有行结直肠癌普查或检测指征的患者进行共聚焦内镜和普通肠镜检查,并对可疑病灶取活检,结果显示共聚焦内镜可准确地检测出瘤样病变,敏感性为97.4%,特异性为99.4%,准确性为99.2%。

2.1.6 溃疡性结肠炎:大量临床研究应用共聚焦显微内镜联合色素内镜对溃疡性结肠炎及其上皮内瘤样变进行早期诊断。先给予亚甲蓝或靛胭脂,内镜下显示病变区域,再行共聚焦显微内镜检查以发现早期肿瘤。亚甲蓝的应用对共聚焦内镜激光扫描系统无影响,这种病变区域的靶向活检以及内镜检查过程中实时病理检查可发现早期瘤样变。Kiesslich *et al*^[14]选择153例有8年以上溃疡性结肠炎病史并处于缓解期的患者,按1:1的比例随机进行共聚焦内镜和常规肠镜

■相关报道

Kiesslich *et al*对于共聚焦内镜的应用进行了深入和广泛的研究,提供了非常有价值的

的检查. 在进行共聚焦内镜检查前, 用1 g/L的亚甲蓝全肠染色, 明确病变部位后, 用共聚焦内镜进行靶向活检, 且自肛门至盲肠每隔10 cm肠黏膜做随机活检. 结果表明共聚焦内镜可准确预测瘤样病变, 敏感性为94.7%, 特异性为98.3%, 准确性为97.8%. Sakashita *et al*^[15]研究也取得了类似的结果.

2.2 在其他疾病中的应用 随着共聚焦内镜的发展, 在其他领域也得到了应用. Thong *et al*^[16]将共聚焦内镜应用于口腔的恶性肿瘤诊断, 他们通过大鼠模型检测正常鼠舌及鳞状细胞癌的鼠舌, 结果显示, 通过共聚焦内镜结合5-ALA(5-氨基乙酰丙酸)及荧光素, 可以显示正常组织及病变组织的形态学差异, 共聚焦内镜有望成为无创的诊断口腔恶性肿瘤的新手段. Goetz *et al*^[17]的研究显示共聚焦探针可以用于腹腔镜及腹腔脏器的研究. 共聚焦图像可以辨认正常和病变组织细胞、亚细胞及分子结构的特征, 有望实现腹腔实时分子诊断^[18].

3 共聚焦内镜的局限性

共聚焦内镜在临床上的应用具有划时代意义, 但目前该技术主要处于研究阶段, 仍有很多问题亟待解决. 由于共聚焦内镜的硬性部件较普通内镜长、弯曲角度小, 故操控性不如常规内镜. 另外共聚焦图像质量也是影响组织学诊断的重要原因. Kitabatake *et al*^[19]对早期胃癌患者进行共聚焦内镜检查, 发现影响诊断准确性的主要因素是图像的质量. 影响共聚焦图像质量的最大的问题是存在伪影, 许多伪影是因为内镜的头端与黏膜表面没有平坦的接触, 有些是胃肠蠕动引起, 应用解痉剂及通过工作通道吸引一下使黏膜表面与内镜的头端正确接触可以减少此类伪影. Becker *et al*^[20]的研究通过video mosaicing来解决伪影, 取得了一定效果. 对比剂荧光素钠和盐酸吡啶黄的应用, 目前尚无严重不良反应报道, 但其临床风险需进一步评估. 其他对比剂如白蛋白、甲紫酚、四环素、光卟啉等显像效果不十分理想, 亟需研究新型的对比剂, 可以显示特定分子在黏膜内的分布, 以拓宽共聚焦内镜的应用.

4 结论

共聚焦内镜作为一种目前最新开发的诊断工具, 使内镜检查与在体组织学检查同步, 标志着内镜检查从表层走向深层, 从形态学到机能组织

学的质的飞跃. 相信, 随着光学显微镜技术、激光扫描技术和生物计算机图像处理技术及相关技术的进一步完善与结合, 共聚焦内镜的扫描深度可加大, 不再局限于黏膜层, 可以进行内镜下的实时肿瘤分级分期, 慢性炎症程度和活动度的分级诊断, 及对黏膜萎缩和化生进行分级分型. 同时, 对比剂的改进可以使细胞核、其他亚细胞结构或特定的分子基团清晰的显示, 将抗体及分子标志物与荧光素结合, 在共聚焦内镜下可实现识别肿瘤细胞. 可以预测, 未来的共聚焦内镜更加容易操作, 可能替代很多的病理检查, 观察各种细胞器的微细结构, 发挥更加重要的诊断治疗作用.

5 参考文献

- 1 Wang TD, Van Dam J. Optical biopsy: a new frontier in endoscopic detection and diagnosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 744-753
- 2 DaCosta RS, Wilson BC, Marcon NE. Optical techniques for the endoscopic detection of dysplastic colonic lesions. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 70-79
- 3 Kim J. The use of vital dyes in corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2000; 11: 241-247
- 4 Goetz M, Hoffman A, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. Confocal laser endoscopy: new approach to the early diagnosis of tumors of the esophagus and stomach. *Future Oncol* 2006; 2: 469-476
- 5 Kara MA, DaCosta RS, Streutker CJ, Marcon NE, Bergman JJ, Wilson BC. Characterization of tissue autofluorescence in Barrett's esophagus by confocal fluorescence microscopy. *Dis Esophagus* 2007; 20: 141-150
- 6 Dacosta RS, Wilson BC, Marcon NE. Spectroscopy and fluorescence in esophageal diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 41-57
- 7 Kiesslich R, Gossner L, Goetz M, Dahlmann A, Vieth M, Stolte M, Hoffman A, Jung M, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. In vivo histology of Barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 979-987
- 8 Deinert K, Kiesslich R, Vieth M, Neurath MF, Neuhaus H. In-vivo microvascular imaging of early squamous-cell cancer of the esophagus by confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy* 2007; 39: 366-368
- 9 Pech O, Rabenstein T, Manner H, Petrone MC, Pohl J, Vieth M, Stolte M, Ell C. Confocal laser endomicroscopy for in vivo diagnosis of early squamous cell carcinoma in the esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 89-94
- 10 Kiesslich R, Goetz M, Burg J, Stolte M, Siegel E, Maeurer MJ, Thomas S, Strand D, Galle PR, Neurath MF. Diagnosing *Helicobacter pylori* in vivo by confocal laser endoscopy. *Gastroenterology* 2005; 128: 2119-2123
- 11 Kitabatake S, Niwa Y, Miyahara R, Ohashi A, Matsuura T, Iguchi Y, Shimoyama Y, Nagasaka T, Maeda O, Ando T, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Confocal endomicroscopy for the diagnosis of gastric cancer in vivo. *Endoscopy* 2006; 38:

■创新盘点

本文总结了共聚焦激光显微内镜目前的应用现状, 尤其是在Barrett食管、食管腺癌、食管鳞癌、早期胃癌、*Hp*感染、溃疡性结肠炎和结肠癌等消化系疾病的诊断价值, 提出了目前存在的局限性.

■应用要点

本文对于共聚焦显微内镜的诊断价值及局限性进行总结, 为共聚焦内镜的进一步应用及发展提供方向.

■同行评价

本文符合目前临床所需, 实用性强, 层次清楚, 逻辑性强, 学术价值很好。

- 1110-1114
- 12 Kakeji Y, Yamaguchi S, Yoshida D, Tanoue K, Ueda M, Masunari A, Utsunomiya T, Imamura M, Honda H, Maehara Y, Hashizume M. Development and assessment of morphologic criteria for diagnosing gastric cancer using confocal endomicroscopy: an ex vivo and in vivo study. *Endoscopy* 2006; 38: 886-890
- 13 Kiesslich R, Burg J, Vieth M, Gnaendiger J, Enders M, Delaney P, Polglase A, McLaren W, Janell D, Thomas S, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 2004; 127: 706-713
- 14 Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, Schneider C, Burg J, Stolte M, Vieth M, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 874-882
- 15 Sakashita M, Inoue H, Kashida H, Tanaka J, Cho JY, Satodate H, Hidaka E, Yoshida T, Fukami N, Tamegai Y, Shiokawa A, Kudo S. Virtual histology of colorectal lesions using laser-scanning confocal microscopy. *Endoscopy* 2003; 35: 1033-1038
- 16 Thong PS, Olivo M, Kho KW, Zheng W, Mancor K, Harris M, Soo KC. Laser confocal endomicroscopy as a novel technique for fluorescence diagnostic imaging of the oral cavity. *J Biomed Opt* 2007; 12: 014007
- 17 Goetz M, Memadathil B, Biesterfeld S, Schneider C, Gregor S, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. In vivo subsurface morphological and functional cellular and subcellular imaging of the gastrointestinal tract with confocal mini-microscopy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2160-2165
- 18 Goetz M, Fottner C, Schirmacher E, Delaney P, Gregor S, Schneider C, Strand D, Kanzler S, Memadathil B, Weyand E, Holtmann M, Schirmacher R, Weber MM, Anlauf M, Kloppel G, Vieth M, Galle PR, Bartenstein P, Neurath MF, Kiesslich R. In-vivo confocal real-time mini-microscopy in animal models of human inflammatory and neoplastic diseases. *Endoscopy* 2007; 39: 350-356
- 19 Kitabatake S, Niwa Y, Miyahara R, Ohashi A, Matsuura T, Iguchi Y, Shimoyama Y, Nagasaka T, Maeda O, Ando T, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Confocal endomicroscopy for the diagnosis of gastric cancer in vivo. *Endoscopy* 2006; 38: 1110-1114
- 20 Becker V, Vercauteren T, von Weyhern CH, Prinz C, Schmid RM, Meining A. High-resolution miniprobe-based confocal microscopy in combination with video mosaicing (with video). *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 1001-1007

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*ln*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)

凋亡抑制基因Bcl-xL的研究进展

郭文娟, 王爱英

郭文娟, 王爱英, 北京大学第三医院消化科 北京市 100083
国家自然科学基金资助项目, No. 30571810
作者贡献分布: 本文由王爱英选题, 郭文娟收集资料; 论文写作由郭文娟和王爱英共同完成.
通讯作者: 王爱英, 100083, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院消化科. wangaiy@bjmu.edu.cn
电话: 010-82265533
收稿日期: 2008-06-03 修回日期: 2008-07-31
接受日期: 2008-08-17 在线出版日期: 2008-09-08

Research progress in anti-apoptosis gene Bcl-xL

Wen-Juan Guo, Ai-Ying Wang

Wen-Juan Guo, Ai-Ying Wang, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30571810
Correspondence to: Ai-Ying Wang, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China. wangaiy@bjmu.edu.cn
Received: 2008-06-03 Revised: 2008-07-31
Accepted: 2008-08-17 Published online: 2008-09-08

Abstract

Apoptosis is a physiological process that an organism selectively eliminates cells that are no longer needed, or have been damaged, or are dangerous. Bcl-xL, an important member of the Bcl-2 family that plays indispensable roles in regulating cell survival and apoptosis, is frequently over-expressed in various kinds of human cancers. The inhibition of this molecule is associated with decreased tumorigenesis and resistance to conventional chemotherapy. This article briefly reviews some progresses in the study of Bcl-xL in the past few years.

Key Words: Bcl-xL; Cell apoptosis; Tumor

Guo WJ, Wang AY. Research progress in anti-apoptosis gene Bcl-xL. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(25): 2871-2876

摘要

Bcl-xL是Bcl-2家族的重要成员, 在抑制细胞凋亡中发挥了重要作用. 凋亡是由基因调控的细胞主动自杀过程, 机体通过凋亡将衰老畸

变的细胞从体内清除掉以维持内环境的稳定. Bcl-xL抑制凋亡的作用在肿瘤的发生、发展及耐药性中发挥了重要作用. 本文就Bcl-xL的结构表达、调控、功能、与肿瘤关系以及在耐药性中所起的作用作一综述.

关键词: Bcl-xL; 凋亡; 肿瘤

郭文娟, 王爱英. 凋亡抑制基因Bcl-xL的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2871-2876
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2871.asp>

0 引言

凋亡又称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD), 其异常可以引起许多人类疾病, 如肿瘤和退行性病变等. 目前已发现的Bcl-2家族成员超过25种^[1], 根据其结构和功能可以分为三类: 第I类具有抑制凋亡的作用, 包括Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、A1/Bfl-1、Boo/Diva/Bcl-B、NR-13、ORF16、LMW5-HL、ELB-19和CED-9等, 这些蛋白含有4个Bcl-2同源结构域BH1、BH2、BH3、BH4. 第II类具有促进凋亡的作用, 包括Bax、Bak、Bok/Mtd和Bax-xs. 第III类只含有BH3结构域, 因此被称为BH3-only蛋白, 包括Bid、Bad、Noxa、Puma、Bmf、Biml/Bod、Bik/Nbk和EGL-1等. 近年来, Bcl-xL在抑制细胞凋亡, 促进肿瘤发生中的作用引起了人们的广泛重视. 本文就Bcl-xL的结构表达、调控、功能、与肿瘤关系以及在耐药性中所起的作用作一综述.

1 Bcl-xL的结构及表达

Bcl-xL是从禽类的互补DNA(cDNA)文库中鉴定出来的, 属于Bcl-2家族I类成员, 具有抑制细胞凋亡的作用. 其开放读码框架ORF(open reading frame)有44%与人和鼠的Bcl-2相同. Bcl-x基因有两个剪接变体: 长链mRNA编码具有抑制细胞凋亡作用的Bcl-xL, 由233个氨基酸组成的Bcl-2同系物; 短链mRNA编码170个氨基酸构成的Bcl-xs, 缺少构成BH1和BH2区域的63个氨基酸, Bcl-

■背景资料

Bcl-xL基因是Bcl-2家族的重要成员之一, 越来越多的研究表明, Bcl-xL基因在抑制肿瘤的发生、发展, 维持内环境的稳定过程中发挥着重要的作用.

■同行评议者

曹秀峰, 主任医师, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心; 王晓艳, 副教授, 湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

■ 研发前沿

以基因为靶点, 进行干预治疗是目前临床和基础科学研究的热点, 有关Bcl-2家族其他成员的研究表明, 其家族成员可能是临床干预治疗的重要靶点。

xs可能通过抑制Bcl-2和Bcl-xL发挥其促进凋亡的作用^[2]。

Bcl-xL是第一个阐明空间结构的Bcl-2家族成员, Muchmore *et al*利用X射线晶体衍射(X-ray crystallography)和核磁共振分光术(NMR spectroscopy)相结合的方法分析Bcl-xL的结构^[3]。其分子中由长度可变的环状结构连接8个 α 螺旋结构。BH4、BH3结构域对应着第一和第二个 α 螺旋, BH1结构域对应着第五个 α 螺旋及其上游的环状结构, 而BH2结构域则与第六个 α 螺旋及其下游的环状结构相对应。分析显示, Bcl-xL的26-83位的氨基酸残基被丙氨酸取代后, 该突变型较野生型更有利于抑制细胞凋亡, 说明该环并不有利于Bcl-xL的抗凋亡作用, 而可能发挥相反的作用。同样, Bcl-2也有类似的长环结构, 当其70位的丝氨酸被磷酸化后抑制凋亡的作用消失^[4]。进一步研究发现caspase-3切割Bcl-2的34位天冬氨酸后, 抑制凋亡的作用消失反而显示促进凋亡的作用^[5]。

三维结构显示, BH1、BH2、BH3结构域彼此近邻构成了疏水环的顶部, $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 构成疏水环的底部。这种疏水环类似于受体, 通过他可与Bcl-2家族中促凋亡蛋白如Bad、Bak等分子表面的配体结合, 形成异源二聚体^[6]。

在正常细胞中, Bcl-xL分布于胞质和膜上, 在凋亡信号作用下, Bcl-xL转位到线粒体外膜和其他细胞器膜上。在线粒体外膜上可以与其他促凋亡蛋白如Bad结合或形成离子通道维持线粒体外膜的完整性。Bcl-xL的离子通道与可溶性的N末端结构的重排有关, 与C末端跨膜区无关, 因此Bcl-xL的活性可以通过N末端结构域可逆性地插入线粒体膜进行调节^[7]。到目前为止, 线粒体膜上是否存在针对Bcl-2家族蛋白特异性的蛋白受体还不确定。体外试验表明: 构象的变化与酸性PH值和酸性脂质有关^[8], 这与许多细菌毒素如大肠杆菌素A、白喉毒素相似。因此这些毒素与Bcl-2家族蛋白之间可能存在相似的膜整合机制。

2 Bcl-xL的表达调控

Bcl-xL基因的表达主要在转录水平进行调节, 大量转录因子如: Sp1, AP-1, Oct-1, Ets, Rel/NF- κ B, STATs和GATA-1等, 可以对Bcl-x启动子区域的共同基序进行调节, 其中NF- κ B, STATs和Ets发挥了重要作用。有研究表明, NF- κ B可以被TAX刺激所激活, 从而进一步促进Bcl-xL基因的表达。人和鼠的Bcl-xL启动子中均含有NF- κ B的结

合位点, 在B细胞中可以由CD40激活, 在T细胞中则是由TAX的过度表达激活^[9]。在对人的多发性骨髓瘤细胞系的研究中发现, IL-6介导的信号通路能够激活Stat3和Janus激酶, 进而诱导了Bcl-xL的表达, 导致凋亡减少引起多发性骨髓瘤^[10]。NF- κ B和STAT3的激活可以上调Bcl-xL的表达, NF- κ B或STAT3的抑制以及P53的过度表达则下调Bcl-xL的表达, 导致Bax/Bcl-xL比例的增加, 从而促进细胞凋亡。并且有研究认为, NF- κ B和STAT3的抑制、P53的过度表达三者的相互配合是目前调节Bax/Bcl-xL的比例并使之恢复正常最为有效的方式^[11]。Boon-Ung *et al*在吐根素对人前列腺癌细胞系的研究中发现, 蛋白磷酸酶-1通过对Bcl-x mRNA外显子2选择剪接, 下调了Bcl-xL mRNA水平的同时增加Bcl-xs mRNA水平^[12]。Alfano *et al*在尿激酶对人视网膜色素上皮细胞凋亡的研究中发现, MEK/ERK和PI3K/Akt途径可以激活Bcl-xL的转录, 从而在细胞黏附、迁移、转移中发挥了重要作用^[13]。另外, 类固醇激素受体包括糖皮质激素和黄体激素受体也可以通过与Bcl-x启动子结合来促进其表达^[14]。

在转录后调节的研究中发现, c-jun氨基末端激酶可以使Bcl-xL本身的状态影响其抗凋亡活性, 例如c-jun氨基末端激酶可以使Bcl-xL磷酸化而抑制其抗凋亡活性。

3 Bcl-xL的功能

3.1 Bcl-xL的生物学活性 尽管Bcl-xL和Bcl-2在抗凋亡中均发挥了重要的作用, 但在不同的细胞类型和不同的死亡信号作用过程中, 两者发挥的作用并不相同^[15]。Bcl-xL不仅可以抑制细胞凋亡, 而且可以抑制细胞坏死^[16]。例如, 在活性T细胞的凋亡过程中, 是由Bcl-2的表达上调发挥主要作用, 而在NK细胞中, 则是由Bcl-xL表达上调发挥主导从而抑制其凋亡发生^[17]。在过度肝切除和Fas/CD95配体导致的肝细胞凋亡中, 胰岛素和前列腺素通过增加Bcl-xL的表达发挥抗凋亡作用^[18]。Bcl-xL在鼠的T细胞中抑制Fas诱导的细胞凋亡, 也可以抑制Fas诱导的B细胞凋亡。CD4⁺ T细胞中, 调节IKKB活性和Bcl-xL的表达可以调节T细胞克隆的寿命和增值率。催乳素可以通过增加Bcl-xL的表达促进胰岛Beta细胞的存活。

3.2 Bcl-xL与细胞凋亡 大量研究表明Bcl-xL参与多种蛋白质-蛋白质相互作用发挥其抑制凋亡功能。在内源性凋亡途径中, Bcl-xL通过阻断

Bax对线粒体外膜的破坏发挥抗凋亡作用^[19];在死亡配体诱导的外源性凋亡途径中, Bcl-xL通过干扰死亡诱导信号复合体DISC(death-inducing signaling complex)的组装, 从而抑制了半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶Caspase-8(Cysteinylaspartate specific proteinase-8)的活性^[20]。在哺乳动物中, Bcl-xL和Bcl-2通过干扰Caspase-3的活性阻止凋亡, 也可以通过维持线粒体膜电位和控制活性氧ROS(reactive oxygen species)的毒性发挥其抗凋亡的作用^[21]。因此, Bcl-xL通过多种蛋白质-蛋白质的相互作用发挥其抗凋亡功能, 但是细胞色素C转移到胞质的具体机制尚不清楚^[22]。在早期的免疫沉淀研究中, 细胞色素C通过与Bcl-xL特异的相互作用作为对离子辐射和遗传毒性效应的应答反应。Bcl-xL也可以通过不依赖细胞色素C的途径发挥其抗凋亡作用。

Bcl-xL的三维立体结构与白喉毒素、大肠杆菌毒素的膜插入区非常相似, 都含有两个疏水的 α 螺旋可以插入脂质双分子层中形成离子通道^[23]。抗凋亡蛋白形成的通道为阳离子选择性, 促凋亡蛋白形成的通道为阴离子选择性, 导致了他们对细胞色素C的释放起相反的调控作用。Caspase-9的激活需要细胞凋亡蛋白酶活化因子Apafs的激活, 激活的Caspase-9再激活下游的效应分子Caspase-3引起细胞凋亡, 而Bcl-xL可以与Apaf-1、Caspase-9结合形成三元复合物, 阻断了级联反应, 从而发挥抑制凋亡的作用^[24-25]。Caspase切割Bcl-xL、Bcl-2等抗凋亡蛋白, 可以使他们无功能或转变为促凋亡分子, 因此诱导细胞凋亡。

3.3 Bcl-xL与其他Bcl-2家族成员的关系 Bcl-xL通过BH1、BH2、BH3结构域空间上邻近形成的疏水口袋与Bcl-2家族成员相互作用, BH3结构域是二聚体形成中的配体。BH3的疏水区插入BH1、BH2、BH3形成的疏水口袋, 介导分子间的二聚化发挥其抑制凋亡的生物学功能。当受到外界凋亡信号刺激时, BH3-only家族中的成员如: Bad、Bid、Bim等以其自身的BH3结构域与Bcl-xL结合, 使得原来与Bcl-xL相结合的Bax释放出来, 通过引起线粒体通透性转变孔道PTP(permeability transition pore)的开放^[26]或增加线粒体膜的通透性^[27]引起细胞色素C等一系列物质的释放导致细胞的凋亡。Bcl-xL的52、66位天冬酰胺脱酰胺后其抗凋亡作用减弱, 但也有实验显示: 包含这两个位点的序列缺失, Bcl-xL的抗凋亡作用反而增强, 可能的解释是这两

个位点的氨基酸所带的负电荷在维持其空间结构中发挥了重要的作用。Bcl-xL与促凋亡蛋白的BH3结构域结合, Bim与未脱酰胺基的Bcl-xL的结合力远大于与脱酰胺基的Bcl-xL的结合。视网膜母细胞瘤抑制基因Rb是在细胞周期转录调控和细胞分化中起重要作用的转录调节因子, 处在细胞生长和分化的中心环节。Rb的抗凋亡活性即通过抑制Bcl-xL的脱酰胺基作用来发挥的^[28]。Puma通过与Bcl-xL结合促进其降解。Bcl-xL与Bax在结构上相似, 但生物学行为截然不同。研究表明, 他们在功能上相似, 只是Bcl-xL缺乏增加膜通透性的能力, 因此, Bcl-xL在功能上类似显性负相Bax^[29-30]。

3.4 Bcl-xL与P53的关系 P53蛋白是由抑癌基因p53转录翻译得到的一种肿瘤抑制蛋白, 有“基因卫士”之称。其本质是一种核磷酸蛋白, 以转录因子的形式调节相关基因表达, 促进细胞周期停滞, 诱导细胞凋亡, 促进细胞终末分化。P53可通过与Bcl-xL结合, 对抗后者的抑制凋亡的作用^[31]。其结合位点不同于Bcl-xL与Bcl家族其他成员的位点。两者的结合受Bcl-2柔性区的调节, Bcl-xL柔性区是位于BH3和BH4区域之间的32-87的一段氨基酸序列, 其中32-68部分的氨基酸对Bcl-xL与P53的结合起正调节作用, 即结合之后促进细胞的凋亡; 而69-87部分的氨基酸主要对P53与Bcl-xL的结合起负调节作用, 去除这一段能够加强两者的结合, 从而促进细胞凋亡^[32]。

3.5 Bcl-xL的其他作用 Nakamura *et al*报道在大鼠心脏缺血/灌注模型中注射HGF(肝细胞生长因子, 是肝细胞和内皮细胞的强有力的促有丝分裂因子)后能够减少梗死面积并明显减少心肌细胞凋亡。他们的进一步研究发现: 损伤的心肌注射HGF后迅速上调Bcl-xL, 而不是Bcl-2, 因此认为Bcl-xL在HGF对心脏保护过程中起核心作用。鼠B细胞转基因表达Bcl-2或Bcl-xL可以增强体内多聚糖对链球菌肺炎的应答反应^[33]。Bcl-xL在B细胞中过表达, 促进了Th1应答反应并加剧胶原诱导的关节炎^[34]。Bcl-xL基因转移抑制Bax转位并延长鼠心肌冷藏时间^[35]。Bcl-xL在体内对树突状细胞的存活起重要作用并对效应T细胞和记忆T细胞的产生发挥重要作用^[36-37]。

4 Bcl-xL的表达与恶性肿瘤

4.1 Bcl-xL与消化系统肿瘤 Bcl-xL与Bcl-2有着高度的序列同源性并且在许多肿瘤中共同表达, 但有着不同的生物学作用。结肠癌是一种异型

■相关报道

Alfano *et al*在尿激酶对人视网膜色素上皮细胞凋亡的研究中发现, MEK/ERK和PI3K/Akt途径可以激活Bcl-xL的转录, 从而在细胞黏附、迁移、转移中发挥了重要作用。

■创新盘点

本文总结了近年来关于Bcl-xL基因的研究进展,并重点探讨了其表达调控与肿瘤发生、发展的关系,为进一步深入研究Bcl-xL基因提供了重要的文献参考。

性肿瘤,由不同生长速率和转移潜能的癌细胞组成。在正常结肠黏膜中,Bcl-2主要表达于隐窝底部的上皮细胞中,表面的Bcl-2表达缺失。在肿瘤组织中,其表达弥散且位于胞质中^[38]。Bcl-2表达的增高与结直肠癌的发生有关。与Bcl-2的表达相比,Bcl-xL表达于大多数结肠癌中。在正常的结肠黏膜中,Bcl-xL弥散地表达在隐窝的全层;在结肠癌组织中为胞质弥散性颗粒状染色。尽管Bcl-2和Bcl-xL都发挥了抗凋亡作用,但其途径不同。Bcl-xL对凋亡的抑制作用强于Bcl-2,因为Bcl-xL的过度表达可以抑制凋亡通路。

在结直肠癌中,Bcl-xL mRNA表达明显增强,占83%,Bcl-xL/Bax的比值明显升高^[39],Bcl-xL过度表达会引起多重耐药性。以目的基因Bcl-xL为靶点的siRNA(small interfering RNA)使得Bcl-xL基因转录后沉默,降低了Bcl-xL蛋白的表达,可以增加细胞的凋亡,抑制细胞生长,从而达到治疗肿瘤的目的。最近研究表明,表达针对Bcl-xL的含有U6启动子的小分子发卡样RNA(Ad/Bcl-xL shRNA)重组腺病毒可以有效的降低Bcl-xL在结肠癌中的表达并降低癌细胞的活性,且增加了对化疗药物如五氟尿嘧啶的敏感性。

在食管鳞状细胞癌中,Bcl-xL的表达升高导致了对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体TRAILD的抵抗,因此阻断Bcl-xL的过度表达可以使其对TRAIL联合化疗药物的敏感性增加。

在肝癌中,Bcl-xL的表达亦明显升高,过度表达的Bcl-xL有效地阻断了大剂量阿霉素诱导的凋亡,但不影响小剂量阿霉素诱导的细胞凋亡。因此,小剂量的阿霉素可以用于Bcl-xL过度表达的肝癌的治疗^[40]。另外,Bcl-xL通过阻止ERK和PKB的失活以抑制凋亡。十字孢碱通过PKB/MAPK信号途径诱导肝细胞凋亡,因此,Bcl-xL的过表达可以抵消十字孢碱引起的肝细胞凋亡。

4.2 Bcl-xL与泌尿系统肿瘤 膀胱癌组织中普遍表达Bcl-xL基因,其阳性率和基因的表达水平均明显高于正常的膀胱组织。Bcl-xL的过度表达与膀胱癌的发生、发展和复发有关。Li *et al*报道,前列腺癌细胞系PC-3瘤细胞中Bcl-xL过表达,他在蛋白激酶抑制剂十字孢碱(STS)诱导瘤细胞凋亡的作用中起重要的拮抗作用,下调Bcl-xL表达则恢复PC-3瘤细胞对STS的敏感性,提示前列腺癌细胞对药物介导的凋亡产生耐受性与Bcl-xL有关^[41],而且其表达与肿瘤的进展有关。在培养

的前列腺癌细胞系LNCaP研究发现,雄激素受体可以与Bcl-xL启动子结合,从而促进Bcl-xL的表达。在培养的前列腺癌细胞系LNCaP中,雄激素通过雄激素受体依赖机制,明显地增加Bcl-xL在mRNA和蛋白质水平的表达,导致体外细胞增殖和体内肿瘤生长。另外,Bcl-xL的表达明显增加了细胞周期蛋白D2的表达,这可能是Bcl-xL诱导细胞增殖和肿瘤生长的原因。

恶性肿瘤中,凋亡机制的失调是其耐药性产生的重要机制。凋亡抑制蛋白如Bcl-2、Bcl-xL表达量的增加是恶性肿瘤对放化疗敏感性降低的重要原因。在移行细胞癌中两者的表达增加,从而降低了其对放化疗药物的敏感性^[42]。针对Bcl-2和Bcl-xL的AS-ODNs可以增加化疗药物2,2-二氟脱氧胞嘧啶核苷、顺铂、丝裂霉素C、紫杉醇等的敏感性。在蛋白质水平,小分子的抑制物结合Bcl-xL蛋白,干扰了Bcl-xL与促凋亡蛋白的BH3结合,因此诱导细胞死亡。与Bcl-xL有亲和力的小分子蛋白因其廉价且便于运送,成为有潜力的治疗肿瘤的物质。

4.3 Bcl-xL与血液系统肿瘤 细胞外信号调节激酶ERK1/2信号通(Raf-MEK1/2-ERK1/2)是经典的MAPK信号转导路径,ERK1/2可以激活Bcl-xL的表达。在NHL B细胞淋巴瘤中,利妥昔单抗通过下调Bcl-xL和Bcl-2的表达使肿瘤细胞对药物的敏感性增加。Raf-1激酶抑制蛋白RKIP通过与Raf-1结合,抑制下游的信号转导。RKIP的过量表达明显的降低了Raf-1激酶域BXB的转化率和减少了激活蛋白AP-1依赖的转录。利妥昔单抗通过上调RKIP的表达进而抑制ERK1/2通路,降低Bcl-xL的表达,增加了NHL耐药B细胞对化疗药物的敏感性。利妥昔单抗抑制细胞分裂素(丝裂原)活化蛋白激酶MEK1/2进而降低ERK1/2通路(Raf-1, MEK1/2和ERK1/2)和降低AP-1DNA结合活性和Bcl-xL基因的表达。因此,利妥昔单抗可以通过调节ERK1/2信号通路中的多个位点促进淋巴瘤细胞对化疗药物的敏感及凋亡^[43]。

4.4 Bcl-xL与其他系统恶性肿瘤 恶性胸膜间皮瘤中Bcl-xL的表达升高,对传统的化疗药物产生耐药性,因此针对Bcl-xL的特异性AON可以促进凋亡,也可以增加对传统化疗药物的敏感性^[44]。通过AON15999和顺铂的联合疗法,可以显著的降低Bcl-xL的表达,引起胸膜间皮瘤的凋亡^[45]。黑色素瘤细胞高表达Bcl-xL,可以用Bcl-xL的反义寡核苷酸来治疗,但正常的黑色素细胞也表达Bcl-2和Bcl-xL,因此在某种程度上

限制了该方法的应用. 除了直接促进凋亡作用外, Bcl-xL的反义寡核苷酸可以增加对化疗药物的敏感性, 而且反义寡核苷酸可以将Bcl-x前mRNA切割为Bcl-xs, 进一步促进了细胞的凋亡. 由于Bcl-2和Bcl-xL的同源性, 设计针对Bcl-2和Bcl-xL的反义寡核苷酸可以同时抑制两者的表达, 促进癌细胞的凋亡^[46].

舒林酸和三氧化二砷以协同作用的方式通过c-JunN末端激酶依赖的Bcl-xL磷酸化诱导人类肺癌H1299细胞的凋亡^[47]. 在小细胞肺癌细胞中, 成纤维细胞生长因子2通过激活胞外信号调节激酶上调Bcl-2和Bcl-xL使得癌细胞免于依托泊甙引起的凋亡^[20].

5 结论

目前, 面对肿瘤发病率的提高及其在化疗过程中的耐药性问题, 要求从分子水平深入研究肿瘤的发生、进展机制. 大量的研究表明, Bcl-xL在肿瘤的发生过程中发挥了重要的作用, 通过对Bcl-xL的研究, 探讨其在凋亡过程中所起的作用, 与其他Bcl-2家族成员的关系, 有利于了解其与肿瘤的发生以及耐药性的关系, 对肿瘤的临床治疗提供重要理论依据.

6 参考文献

- 1 Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 83-94
- 2 Kirkin V, Joos S, Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 229-249
- 3 Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; 381: 335-341
- 4 Dramsi S, Scheid MP, Maiti A, Hojabrpour P, Chen X, Schubert K, Goodlett DR, Aebersold R, Duronio V. Identification of a novel phosphorylation site, Ser-170, as a regulator of bad pro-apoptotic activity. *J Biol Chem* 2002; 277: 6399-6405
- 5 Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 1997; 278: 1966-1968
- 6 Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 1997; 275: 983-986
- 7 Thuduppathy GR, Terrones O, Craig JW, Basanez G, Hill RB. The N-terminal domain of Bcl-xL reversibly binds membranes in a pH-dependent manner. *Biochemistry* 2006; 45: 14533-14542
- 8 Basanez G, Zhang J, Chau BN, Maksaev GI, Frolov VA, Brandt TA, Burch J, Hardwick JM, Zimmerberg J. Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J Biol Chem* 2001; 276: 31083-31091
- 9 Sun A, Tang J, Hong Y, Song J, Terranova PF, Thrasher JB, Svojanovsky S, Wang HG, Li B. Androgen receptor-dependent regulation of Bcl-xL expression: Implication in prostate cancer progression. *Prostate* 2008; 68: 453-461
- 10 Khoshnan A, Tindell C, Laux I, Bae D, Bennett B, Nel AE. The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 2000; 165: 1743-1754
- 11 Lee TL, Yeh J, Friedman J, Yan B, Yang X, Yeh NT, Van Waes C, Chen Z. A signal network involving coactivated NF-kappaB and STAT3 and altered p53 modulates BAX/BCL-XL expression and promotes cell survival of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2008; 122: 1987-1998
- 12 Boon-Ung K, Yu Q, Zou T, Zhou A, Govitrapong P, Zhou J. Emetine regulates the alternative splicing of Bcl-x through a protein phosphatase 1-dependent mechanism. *Chem Biol* 2007; 14: 1386-1392
- 13 Alfano D, Iaccarino I, Stoppelli MP. Urokinase signaling through its receptor protects against anoikis by increasing BCL-xL expression levels. *J Biol Chem* 2006; 281: 17758-17767
- 14 Gascoyne DM, Kypta RM, Vivanco MM. Glucocorticoids inhibit apoptosis during fibrosarcoma development by transcriptionally activating Bcl-xL. *J Biol Chem* 2003; 278: 18022-18029
- 15 Demirci G, Li XC. IL-2 and IL-15 exhibit opposing effects on Fas mediated apoptosis. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 123-128
- 16 Fujimura S, Suzumiya J, Yamada Y, Kuroki M, Ono J. Downregulation of Bcl-xL and activation of caspases during retinoic acid-induced apoptosis in an adult T-cell leukemia cell line. *Hematol J* 2003; 4: 328-335
- 17 Zheng X, Wang Y, Wei H, Ling B, Sun R, Tian Z. Bcl-xL is associated with the anti-apoptotic effect of IL-15 on the survival of CD56(dim) natural killer cells. *Mol Immunol* 2008; 45: 2559-2569
- 18 Wang Y, Zhang B, Peng X, Perpetua M, Harbrecht BG. Bcl-xL prevents staurosporine-induced hepatocyte apoptosis by restoring protein kinase B/mitogen-activated protein kinase activity and mitochondria integrity. *J Cell Physiol* 2008; 215: 676-683
- 19 Breckenridge DG, Xue D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 647-652
- 20 Wang X, Zhang J, Kim HP, Wang Y, Choi AM, Ryter SW. Bcl-XL disrupts death-inducing signal complex formation in plasma membrane induced by hypoxia/reoxygenation. *FASEB J* 2004; 18: 1826-1833
- 21 Gabriel B, Sureau F, Casselyn M, Teissie J, Petit PX. Retroactive pathway involving mitochondria in electroloaded cytochrome c-induced apoptosis. Protective properties of Bcl-2 and Bcl-XL. *Exp Cell Res* 2003; 289: 195-210
- 22 Yadaiah M, Rao PN, Harish P, Bhuyan AK. High affinity binding of Bcl-xL to cytochrome c: possible relevance for interception of translocated cytochrome c in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1774: 1370-1379
- 23 Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Miyashita

■同行评价

本文对凋亡抑制基因Bcl-xL的研究进展进行综述, 从结构、功能、与肿瘤的关系等几方面阐明Bcl-xL基因的生物特征, 具有一定的意义, 但新颖性一般.

- T, Wang HG, Reed JC. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 1994; 145: 1323-1336
- 24 Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 1998; 273: 5841-5845
- 25 Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 4386-4391
- 26 Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 11357-11362
- 27 Tsujimoto Y, Shimizu S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1174-1181
- 28 Deverman BE, Cook BL, Manson SR, Niederhoff RA, Langer EM, Rosova I, Kulans LA, Fu X, Weinberg JS, Heinecke JW, Roth KA, Weintraub SJ. Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage. *Cell* 2002; 111: 51-62
- 29 Bolenz C, Becker A, Trojan L, Schaaf A, Cao Y, Weiss C, Alken P, Michel MS. Optimizing chemotherapy for transitional cell carcinoma by application of bcl-2 and bcl-xL antisense oligodeoxynucleotides. *Urol Oncol* 2007; 25: 476-482
- 30 Billen LP, Kokoski CL, Lovell JF, Leber B, Andrews DW. Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol* 2008; 6: e147
- 31 Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 2003; 11: 577-590
- 32 Petros AM, Gunasekera A, Xu N, Olejniczak ET, Fesik SW. Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR. *FEBS Lett* 2004; 559: 171-174
- 33 Chattopadhyay G, Khan AQ, Sen G, Colino J, DuBois W, Rubtsov A, Torres RM, Potter M, Snapper CM. Transgenic expression of Bcl-xL or Bcl-2 by murine B cells enhances the in vivo antipolysaccharide, but not antiprotein, response to intact *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 2007; 179: 7523-7534
- 34 Zheng B, Marinova E, Switzer K, Wansley D, He H, Bheekha-Escura R, Behrens TW, Han S. Overexpression of Bcl(XL) in B cells promotes Th1 response and exacerbates collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2007; 179: 7087-7092
- 35 Huang J, Nakamura K, Ito Y, Uzuka T, Morikawa M, Hirai S, Tomihara K, Tanaka T, Masuta Y, Ishii K, Kato K, Hamada H. Bcl-xL gene transfer inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rats. *Circulation* 2005; 112: 76-83
- 36 Hon H, Rucker EB 3rd, Hennighausen L, Jacob J. bcl-xL is critical for dendritic cell survival in vivo. *J Immunol* 2004; 173: 4425-4432
- 37 Zhang N, He YW. The antiapoptotic protein Bcl-xL is dispensable for the development of effector and memory T lymphocytes. *J Immunol* 2005; 174: 6967-6973
- 38 Han HS, Park YM, Hwang TS. Differential expression of Bcl-2, Bcl-XL and p53 in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1108-1114
- 39 Hayward RL, Macpherson JS, Cummings J, Monia BP, Smyth JF, Jodrell DI. Antisense Bcl-xl down-regulation switches the response to topoisomerase I inhibition from senescence to apoptosis in colorectal cancer cells, enhancing global cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2856-2865
- 40 Park SS, Kim MA, Eom YW, Choi KS. Bcl-xL blocks high dose doxorubicin-induced apoptosis but not low dose doxorubicin-induced cell death through mitotic catastrophe. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 1044-1049
- 41 Li X, Marani M, Mannucci R, Kinsey B, Andriani F, Nicoletti I, Denner L, Marcelli M. Overexpression of BCL-X(L) underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1699-1706
- 42 Wang R, Lin F, Wang X, Gao P, Dong K, Wei SH, Cheng SY, Zhang HZ. Suppression of Bcl-xL expression by a novel tumor-specific RNA interference system inhibits proliferation and enhances radiosensitivity in prostatic carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 61: 943-952
- 43 Jazirehi AR, Vega MI, Chatterjee D, Goodglick L, Bonavida B. Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res* 2004; 64: 7117-7126
- 44 Ozvaran MK, Cao XX, Miller SD, Monia BA, Hong WK, Smythe WR. Antisense oligonucleotides directed at the bcl-xl gene product augment chemotherapy response in mesothelioma. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 545-550
- 45 Littlejohn JE, Cao X, Miller SD, Ozvaran MK, Jupiter D, Zhang L, Rodarte C, Smythe WR. Bcl-xL antisense oligonucleotide and cisplatin combination therapy extends survival in SCID mice with established mesothelioma xenografts. *Int J Cancer* 2008; 123: 202-208
- 46 Olie RA, Hafner C, Kuttel R, Sigrist B, Willers J, Dummer R, Hall J, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. Bcl-2 and bcl-xL antisense oligonucleotides induce apoptosis in melanoma cells of different clinical stages. *J Invest Dermatol* 2002; 118: 505-512
- 47 Jin HO, Seo SK, Woo SH, Lee HC, Kim ES, Yoo DH, Lee SJ, An S, Choe TB, Kim JI, Hong SI, Rhee CH, Park IC. A combination of sulindac and arsenic trioxide synergistically induces apoptosis in human lung cancer H1299 cells via c-Jun NH(2)-terminal kinase-dependent Bcl-xL phosphorylation. *Lung Cancer* 2008 Feb 15. [Epub ahead of print]

编辑 李军亮 电编 郭海丽

MDM2在消化系肿瘤中作用的研究进展

陈现亮, 高善玲, 赵磊

陈现亮, 高善玲, 赵磊, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

黑龙江省科学技术厅科技攻关资助项目, No. GC06C421

作者贡献分布: 本文文献检索、资料分析及撰写由陈现亮完成; 赵磊协助; 选题、指导及审校由高善玲完成。

通讯作者: 高善玲, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科. chenchen149@sohu.com

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2008-05-20 修回日期: 2008-07-08

接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-09-08

Research progress in roles of murine double minute 2 gene in the gastrointestinal tumor

Xian-Liang Chen, Shan-Ling Gao, Lei Zhao

Xian-Liang Chen, Shan-Ling Gao, Lei Zhao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Key Program of Science and Technology Office of Heilongjiang Province, No. GC06C421

Correspondence to: Shan-Ling Gao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. chenchen149@sohu.com

Received: 2008-05-20 Revised: 2008-07-08

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-09-08

Abstract

Murine double minute 2 (MDM2), an oncogene discovered in recent years, can enhance cell survival activity, prolong cell survival duration, promote cell proliferation and stimulate tumor growth. In recent years, it was shown that MDM2 participated in the genesis and development of various tumors. In addition, MDM2 is associated with the invasion, metastasis and poor prognosis of malignant tumors, especially gastrointestinal tumors such as esophageal cancer, gastric cancer, colon cancer, liver cancer, etc. So it is significant to study the relationship between MDM2 and gastrointestinal tumors for tumor prevention and treatment. In combination with domestic and overseas literatures, this article provides a brief review of the research progress in the roles of MDM2 in the genesis, development and metastasis of gastrointestinal tumors.

Key Words: Murine double minute 2; Gastrointesti-

nal tumor; *p53*

Chen XL, Gao SL, Zhao L. Research progress in roles of murine double minute 2 gene in the gastrointestinal tumor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2877-2882

摘要

MDM2为小鼠双微体基因,是近几年发现的一种癌基因,对细胞生长有调节作用。其生物学作用是增强细胞的生存活力,使细胞生存期延长,促进细胞增生及肿瘤的生长。近年来,许多研究显示MDM2参与了许多肿瘤的发生发展,且该基因与恶性肿瘤的浸润、转移和不良预后有关,尤其与食管癌、胃癌、结肠癌和肝癌等消化系肿瘤关系密切。因此,研究MDM2与消化系肿瘤的关系在肿瘤防治中具有重要的意义。本文结合国内外文献就MDM2在消化系肿瘤发生发展及其转移过程的研究进展作一综述。

关键词: MDM2; 消化系肿瘤; *p53*

陈现亮, 高善玲, 赵磊. MDM2在消化系肿瘤中作用的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(25): 2877-2882

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2877.asp>

0 引言

MDM2(murine double minute 2)为小鼠双微体基因,是近几年发现的一种癌基因。该基因最初是由Cahilly-Snyder *et al*^[1]在自发肿瘤鼠Balb/c 3T3成纤维细胞系(3T3DM)中鉴定出来,他在进化过程中很保守,人和鼠的许多组织中都有表达。人类的MDM2编码区约为1467 bp, 编码蛋白质分子量为90 kDa。近年来,许多研究显示MDM2参与了许多肿瘤的发生和发展,如在肉瘤、胶质瘤、膀胱肿瘤、输尿管肿瘤、子宫肿瘤、乳腺肿瘤及肺肿瘤等中均发现有MDM2基因的改变^[2-7]。并且该基因与恶性肿瘤的浸润、转移和不良预后有关^[8-13],尤其与食管癌、胃癌、结肠癌和肝癌等消化系肿瘤的关系密切^[14-17]。所以研究MDM2与消化系肿瘤的关系在肿瘤防治中具

■背景资料

MDM2作为一种癌基因,对细胞生长有调节作用。其生物学作用是增强细胞的生存活力,使细胞生存期延长,促进细胞增生及肿瘤的生长。近年来,许多研究显示MDM2参与了许多肿瘤的发生和发展,尤其与食管癌、胃癌、结肠癌和肝癌等消化系肿瘤的关系密切。

■同行评议者

董蕾, 教授, 西安交通大学第二附属医院消化内科; 李瑗, 教授, 广西肿瘤研究所

■研发前沿

目前,此领域的研究重点在于MDM2与p53相互作用机制及其在肿瘤发生发展中的作用,寻找更好的治疗肿瘤新途径。

有重要的意义. 本文结合国内外文献就MDM2在消化系肿瘤发生发展及其转移过程的研究进展作一综述.

1 MDM2基因的结构和功能

1.1 MDM2基因的结构 人类MDM2定位于12q13-14, 其表达的调节相当复杂, 并且有不同的mRNA剪接形式^[18]. 将鼠、人、蟾蜍、斑鱼的MDM2序列进行比较, 发现4个保守区. I区包括N端大约100个氨基酸残基, 是MDM2与p53基因相互结合的部位, 也可能直接结合到细胞基因启动子上, 激活基因该区还有核定位序列(NLS)和核输出信号(NES); II区为一个高度酸性区域, 能与核糖体L5、L11蛋白以及5SrRNA结合; III区则含有一个锌指结构, 能结合到基因, 激活基因, 使细胞由G₁期进入S期; IV区含有一个环指结构, 可介导蛋白质-蛋白质相互作用, 也能与DNA或RNA作用, 参与细胞调控, 促进细胞增长^[19-21].

在MDM2基因内鉴定出两个启动子p1和p2, p1在编码基因的上游, 可组成性地表达, p2存在于第一个内含子中, 由p53通过其附近的2个p53结合位点进行控制, 这使得MDM2有多种转录产物^[22]. 有研究表明在培养细胞中至少存在p90、p85、p76、p75、p58和p57共6种MDM2异构体, 在体内仅有全长的p90-95和p57能与p53结合^[23]. 人类MDM2与p53发生结合的区域为第17至125位氨基酸残基, p53上与MDM2结合的区域为第15-29位氨基酸残基. MDM2的p53结合区域含有14个保守的疏水性芳香性氨基酸残基, 通过两性 α -螺旋和中等 β 折叠形成一深的疏水性狭缝. p53上的结合部位与MDM2接近时被其诱导形成两圈半的两性 α -螺旋其疏水面深深插入MDM2的狭缝中, 以多范德华力进行结合. 这种结合在进化过程中相当保守^[24-26].

1.2 MDM2基因的功能 研究显示MDM2在人和鼠的各种组织中有广泛表达, 提示其参与细胞的基本生理过程^[10,27]. MDM2作为一种癌基因, 对细胞生长有调节作用. 其生物学作用是增强细胞的生存活力, 使细胞生存期延长, 促进细胞增生及肿瘤的生长^[28-31]. 作用方式为: (1)与p53结合, 抑制p53的抑癌功能. Jones *et al*^[32]的基因敲除实验发现MDM2基因完全缺失的小鼠不能存活, 而p53和MDM2都缺失的小鼠则能存活. 而这种抑制作用在胚胎发育的最早期就存在, 所以有人将MDM2称作p53的“大哥”. MDM2本身半衰期很短, 也通过泛素-蛋白酶体途径被降解. 这样一旦应激信号消除, p53和MDM2都通过相

似的蛋白质水解机制被迅速清除, 之后细胞很快恢复到无应激的基本状态^[21]; (2)其酸性激活区和锌指区直接结合到细胞基因启动子上, 激活基因使细胞由G₁期进入S期; (3)激活E2F-1, 使E2F-1与pRb分离, 解除pRb的生长阻滞作用使细胞由G₁期进入S期; (4)MDM2蛋白与p21结合, 终止p21被p53活化的抑制细胞增生的作用^[33-34].

2 MDM2基因与p53基因的相互作用

p53的上游过程涉及多种成分, 存在诱导p53表达的多种途径. p53抑制细胞生长或诱导凋亡的能力在正常情况下就始终存在. MDM2以两种形式实现对其功能的调节, 即介导降解和抑制其转录活性.

2.1 MDM2介导p53穿过核膜进入胞质 目前认为MDM2可能是通过调控p53的核输出途径介导其降解, 使p53在细胞中保持较低水平, 处于无活性状态. p53是一个动态的分子, 其特有的亚细胞定位决定着自身的活性. 研究表明, p53只在核内发挥作用, 他通过C2末端固有的核定位信号(NLS)将自己定位于核内. 遗传毒性应激反应可以刺激刚刚稳定的和已经磷酸化的p53进入胞核, 在核内被激活的p53又以具有细胞类型特异性的方式反式激活各种靶基因, 发挥其功能. 并且作为整个过程的一部分最终离开胞核, 在胞质中降解.

p53从核内向外输出可能依赖MDM2的途径调控. p53可被MDM2捕获, 并在MDM2的介导下穿过核膜进入胞质. 人类MDM2含有一个核输出序列(NES), 可以介导MDM2蛋白或一个融入该序列的异源性运输因子从细胞核进入胞质^[35]. Grossman *et al*^[36]则认为, MDM2需与p300转录共同激活因子/组蛋白甲基化酶结合方能介导p53降解. MDM2的NES受损后不再具有促进p53降解的能力, 说明MDM2的核输出作用与P53蛋白的稳定性有着内在的联系. 既然p53的核输出是决定其降解的关键, 可以推测p53在核与胞质的分布状态是决定其稳定性的关键因素.

2.2 MDM2对p53转录活性的直接抑制作用 MDM2是p53的转录靶基因, 含有一个p53基因结合位点, 可在野生型p53基因的诱导下转录增强, 致使细胞中MDM2蛋白水平升高; 并转而与p53结合形成复合物, 封闭其转录活性, 抑制其功能. 即p53/MDM2负反馈调节环在生理状态下, 既可调节p53蛋白活性又可调节MDM2基因的表达. 野生型p53水平升高, 能阻滞细胞在

G₁期末的限制点进入增殖周期, 同时又可诱导MDM2表达并形成p53/MDM2复合物, 使细胞克服G₁期末限制点的控制进入S期^[37]. 在各种损伤因素刺激下, P53蛋白急剧增加, 并表现出转录激活特性, 诱导其负调节子MDM2的转录和表达^[38]. MDM2表达过强则可封闭p53介导的反式激活作用, 使p53功能丧失, 导致基因的不稳定及细胞增生, 表现出癌基因蛋白的作用, 参与肿瘤形成^[16,39-41].

3 MDM2基因与消化系肿瘤

3.1 MDM2基因与食管癌 食管癌的发生和发展涉及多种病因学机制, 癌基因异常可能是食管癌发生、发展的一个重要原因. 动物实验证明, MDM2癌基因能使细胞转化和具有成瘤性, 并可使移植瘤快速出现. 赵仲生 *et al*^[42]利用免疫组化SP法检测了68例食管鳞状细胞癌中MDM2蛋白的表达. 研究发现食管鳞癌中有MDM2蛋白过表达, 且MDM2蛋白阳性率在I、II、III级间比较, 有显著性差异($P<0.01$), 提示MDM2癌基因产物的过表达与食管癌的发生、发展有关, 并与肿瘤的分化程度密切相关, 高分化者MDM2蛋白表达高于低分化者. 这与李灵敏 *et al*^[43]的研究结果相一致. 52.3%(23/44)的I、II期食管鳞癌表达MDM2蛋白, III、IV期食管鳞癌中仅25.0%(6/24)表达MDM2蛋白, 两组比较, 有显著性差异($P<0.05$), 提示早期(I、II期)食管鳞癌MDM2蛋白表达比晚期(III、IV期)高. 分化高的食管癌(I、II级)MDM2蛋白表达比低分化癌(III级)高, 这进一步说明MDM2蛋白表达状况与食管癌的生物行为有关, 可作为食管癌的病理分级和预后评估的参考指标之一.

3.2 MDM2基因与胃癌 Günther *et al*^[44]对43例进展期胃癌检测MDM2原癌基因表达, 结果显示, MDM2基因扩增阳性率为41.9%(18/43). MDM2基因扩增与胃癌扩散相关, 与患者性别和年龄无关. 同时证实MDM2/p53途径与胃癌的发生密切相关, 仅有约20%的胃癌组织中不存在MDM2和(或)p53改变. 原癌基因MDM2的激活和抑癌基因p53失活在弥漫性胃癌中具有更为重要的作用. 刘远廷 *et al*^[26]采用流式细胞术和免疫荧光技术对胃癌及癌前病变的细胞中MDM2蛋白表达进行定量检测, 结果显示, MDM2在胃黏膜不典型增生中出现表达, 但蛋白表达量及阳性表达率均较低. 在胃癌中, MDM2蛋白表达量及阳性表达率均显著高于不典型增生等癌前病变. MDM2表达与胃癌分化程度、浸润深度及淋巴

转移有关; MDM2表达越高的胃癌, 分化程度越低, 浸润能力越强, 越易出现淋巴转移. 随访18例MDM2阳性的胃癌患者, 术后3年中有16例出现了复发和转移. 提示MDM2过表达是胃癌发生发展中的相对晚期事件, 检测MDM2蛋白可成为诊断癌变、确定胃癌恶性程度、预测预后和潜在淋巴转移的一个指标, 在临床治疗上有一定的指导意义. 但Blok *et al*^[45]的研究结果则表明, 胃癌组织中未检测到MDM2的过表达, 因此认为MDM2与胃癌的发生无相关性.

3.3 MDM2基因与结肠癌 大肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率呈增长趋势. 在其发生发展过程中抑癌基因的失活、突变与原癌基因的异常激活可能发挥了重要作用. 郭洁 *et al*^[46]应用免疫组化的方法初步探讨了MDM2和P14ARF在结肠肿瘤发生发展中的作用, 提示MDM2的上调, p14^{ARF}的下调可能与结肠癌的发生发展有关. 阎再宏 *et al*^[47]采用流式细胞术(FCM)对经病理证实的63例大肠癌和11例正常对照组结肠标本进行MDM2蛋白的检测, 实现了细胞定量分析. 结果亦显示大肠癌的发生与MDM2高表达有关, 表明MDM2基因可能与其他癌基因一起参与大肠癌的发生^[48-51].

3.4 MDM2基因与肝癌 原发性肝细胞癌是我国一种常见的恶性肿瘤, 其侵袭性强, 预后差, 居我国癌症死因第2位, 而其发生发展机制尚未完全阐明. 许多研究表明癌基因激活及抑癌基因的缺失或失活是癌变的分子基础, 他引起基因的转录和翻译功能异常, 使细胞恶性增殖, 最终形成肿瘤. 程玲 *et al*^[52]应用免疫组织化学、原位分子杂交方法和细胞图像分析技术, 检测原发性肝细胞癌组织中MDM2蛋白及其mRNA的表达情况. 结果显示在肝细胞癌组织、癌旁肝组织和正常肝组织中MDM2蛋白免疫组织化学阳性反应颗粒的平均吸光度分别为 0.404 ± 0.005 , 0.302 ± 0.067 和 0.087 ± 0.034 . 肝细胞癌组织与癌旁肝组织、正常肝组织相比, MDM2蛋白表达的差异均有显著性意义($P<0.05$). MDM2mRNA在肝细胞癌组织中呈阳性表达, 而癌旁肝组织及正常肝组织均呈阴性表达, 提示MDM2蛋白及其mRNA在原发性肝细胞癌中呈高表达变化. MDM2基因转录的异常启动可能是MDM2蛋白异常表达的关键因素, MDM2的过度表达与肝细胞癌发生发展密切相关. 王华曦 *et al*^[53]的研究表明, MDM2蛋白及突变型p53的表达可作为原发性肝细胞癌预后判断的指标. 有资料表明MDM2的过度表达预示肝

■相关报道

MDM2在肿瘤发病机制中的研究是近几年研究的热点, 目前有大量文献报道了消化系肿瘤和MDM2的相互关系, 特别是食管、胃和结肠的研究较多, 胰腺肿瘤的研究相对较少.

■创新盘点

本文详细介绍了MDM2的结构、功能及其与p53的相互作用。重点介绍了MDM2与消化系统肿瘤发生发展的关系。

癌预后差^[54]。

3.5 MDM2与胰腺癌 胰腺癌的发生和发展涉及到多种病因学机制。癌基因的异常可能是胰腺癌发生和发展的一个重要因素。MDM2属于癌基因,其编码的蛋白质可以和P53结合,并抑制p53的功能^[55-57]。MDM2在体内最重要的作用是抑制野生型p53的激活转录功能和抗肿瘤活性。MDM2是p53的转录靶基因,直接结合p53,与p53形成一个精细的负反馈调节环,野生型p53基因诱导MDM2蛋白高表达,后者与p53结合形成复合物,反过来抑制p53的转录活性,严格控制P53蛋白水平。MDM2表达过强则可封闭p53介导的反式激活作用,使p53功能丧失^[58],抑制其抗肿瘤活性。马刚 *et al*^[59]应用免疫组织化学方法检测59例胰腺癌标本中P53和MDM2蛋白表达,结果显示P53与MDM2蛋白阳性表达率分别为67.8%和28.8%,MDM2蛋白的表达与性别、年龄、肿瘤部位、TNM分期及分化程度无明显关系。MDM2蛋白阳性表达组与其他组相比,生存时间明显缩短。提示P53和MDM2蛋白的过表达可能反映了胰腺癌的恶性增生过程,导致胰腺癌的恶性发展,联合检测两者的表达有助于判定肿瘤的预后。胡磊 *et al*^[60]采用流式细胞仪检测MDM2蛋白的表达,包括胰腺癌组的癌组织68例和对照组的癌旁非肿瘤胰腺组织20例。结果显示胰腺癌中MDM2基因表达明显增高,亦提示其在胰腺癌的发病中起着重要作用。

4 结论

诸多的研究都为MDM2在消化系统肿瘤的发生、发展中的重要作用提供了有力的证据,MDM2将成为消化系统肿瘤防治研究的一个新靶点。但是目前的研究尚在实验室阶段,如何将这些研究应用于临床,为众多的肿瘤患者带来希望,是目前亟待解决的问题。此外,p53与MDM2在消化系统肿瘤中表达状态的差异,是否具有特异性,是否有某些因素影响这种表达的差异,仍需进一步研究。据报告^[61-65]MDM2不仅与癌的发生发展有关,而且对癌细胞敏感性也有很大影响。目前医药界利用MDM2-P53为抗癌靶点进行了积极研发,如Chène *et al*^[66]根据MDM2-P53晶体复合物的结构,合成了与MDM2有高亲和性的八肽。倪虹 *et al*^[67]利用MDM2转染卵巢癌细胞,提高癌细胞对抗癌药物的敏感性,使之对顺铂的抗癌效果明显提高。因此,对MDM2基因的进一步研究和对他在肿瘤发生发展中的作用的深入认识,

必将为消化系统肿瘤的预防和治疗开创新的思路和途径。

5 参考文献

- 1 Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, George DL. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet* 1987; 13: 235-244
- 2 Zhang H, Macdonald WD, Erickson-Johnson M, Wang X, Jenkins RB, Oliveira AM. Cytogenetic and molecular cytogenetic findings of intimal sarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 179: 146-149
- 3 Zakrzewska M, Szybka M, Zakrzewski K, Biernat W, Kordek R, Rieske P, Golanska E, Zawlik I, Piaskowski S, Liberski PP. Diverse molecular pattern in a bihemispheric glioblastoma (butterfly glioma) in a 16-year-old boy. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 177: 125-130
- 4 Wang M, Zhang Z, Zhu H, Fu G, Wang S, Wu D, Zhou J, Wei Q, Zhang Z. A novel functional polymorphism C1797G in the MDM2 promoter is associated with risk of bladder cancer in a Chinese population. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3633-3640
- 5 Lum SS, Chua HW, Li H, Li WF, Rao N, Wei J, Shao Z, Sabapathy K. MDM2 SNP309 G allele increases risk but the T allele is associated with earlier onset age of sporadic breast cancers in the Chinese population. *Carcinogenesis* 2008; 29: 754-761
- 6 Liu G, Wheatley-Price P, Zhou W, Park S, Heist RS, Asomaning K, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC. Genetic polymorphisms of MDM2, cumulative cigarette smoking and nonsmall cell lung cancer risk. *Int J Cancer* 2008; 122: 915-918
- 7 王家璧. MDM2蛋白在宫颈鳞状细胞癌和尖锐湿疣发病中的作用. 中国医学科学院学报 2001; 23: 297-299
- 8 Pacinda SJ, Ledet SC, Gondo MM, Langston C, Brown RW, Carmona PA, Franklin RB, Roggli VL, Cagle PT. p53 and MDM2 immunostaining in pulmonary blastomas and bronchogenic carcinomas. *Hum Pathol* 1996; 27: 542-546
- 9 McCann AH, Kirley A, Carney DN, Corbally N, Magee HM, Keating G, Dervan PA. Amplification of the MDM2 gene in human breast cancer and its association with MDM2 and p53 protein status. *Br J Cancer* 1995; 71: 981-985
- 10 Ladanyi M, Cha C, Lewis R, Jhanwar SC, Huvos AG, Healey JH. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res* 1993; 53: 16-18
- 11 Almog N, Rotter V. An insight into the life of p53: a protein coping with many functions! Review of the 9th p53 Workshop, Crete, May 9-13, 1998. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1378: R43-R54
- 12 Moller MB, Nielsen O, Pedersen NT. Oncoprotein MDM2 overexpression is associated with poor prognosis in distinct non-Hodgkin's lymphoma entities. *Mod Pathol* 1999; 12: 1010-1016
- 13 熊首先, 朱尤庆, 何军. MDM2和p53在大肠癌组织中的表达及其意义. 长江大学学报 2007; 4: 11-13
- 14 Hong Y, Miao X, Zhang X, Ding F, Luo A, Guo Y, Tan W, Liu Z, Lin D. The role of P53 and MDM2 polymorphisms in the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 9582-9587
- 15 Ohmiya N, Taguchi A, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Goto H. MDM2 promoter polymorphism is associated with both an increased susceptibility to gastric carcinoma and poor

- prognosis. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4434-4440
- 16 Shangary S, Ding K, Qiu S, Nikolovska-Coleska Z, Bauer JA, Liu M, Wang G, Lu Y, McEachern D, Bernard D, Bradford CR, Carey TE, Wang S. Reactivation of p53 by a specific MDM2 antagonist (MI-43) leads to p21-mediated cell cycle arrest and selective cell death in colon cancer. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1533-1542
- 17 Jablonski M, Bocian A, Bialkowska J, Bartkowiak J. A comparative study of P53/MDM2 genes alterations and P53/MDM2 proteins immunoreactivity in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 117-125
- 18 Momand J, Zambetti GP. Mdm-2: "big brother" of p53. *J Cell Biochem* 1997; 64: 343-352
- 19 Keegan PE, Lunec J, Neal DE. p53 and p53-regulated genes in bladder cancer. *Br J Urol* 1998; 82: 710-720
- 20 Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 96-107
- 21 Juven-Gershon T, Oren M. Mdm2: the ups and downs. *Mol Med* 1999; 5: 71-83
- 22 Piette J, Neel H, Marechal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 1997; 15: 1001-1010
- 23 Bueso-Ramos CE, Manshouri T, Haidar MA, Huh YO, Keating MJ, Albitar M. Multiple patterns of MDM-2 deregulation in human leukemias: implications in leukemogenesis and prognosis. *Leuk Lymphoma* 1995; 17: 13-18
- 24 Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, George DL. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet* 1987; 13: 235-244
- 25 Lozano G, Montes de Oca Luna R. MDM2 function. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1377: M55-M59
- 26 刘远廷, 齐凤英, 段惠军, 左连富. 胃癌及癌前病变中MDM2蛋白表达及临床意义. *中国综合临床* 2004; 20: 546-548
- 27 Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80-83
- 28 Eguchi K, Yao T, Konomoto T, Hayashi K, Fujishima M, Tsuneyoshi M. Discordance of p53 mutations of synchronous colorectal carcinomas. *Mod Pathol* 2000; 13: 131-139
- 29 Millon R, Muller D, Schultz I, Salvi R, Ghnassia JP, Frebourg T, Wasylyk B, Abecassis J. Loss of MDM2 expression in human head and neck squamous cell carcinomas and clinical significance. *Oral Oncol* 2001; 37: 620-631
- 30 Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003; 16: 376-388
- 31 Nakashima M, Kondo S, Shimizu Y, Wakisaka N, Muro S, Furukawa M, Yoshizaki T. Impact of MDM2 single nucleotide polymorphism on tumor onset in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2008; 128: 808-813
- 32 Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 1995; 378: 206-208
- 33 Thut CJ, Goodrich JA, Tjian R. Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev* 1997; 11: 1974-1986
- 34 Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387: 296-299
- 35 Roth J, Dobbelstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J* 1998; 17: 554-564
- 36 Grossman SR, Perez M, Kung AL, Joseph M, Mansur C, Xiao ZX, Kumar S, Howley PM, Livingston DM. p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell* 1998; 2: 405-415
- 37 Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 180-185
- 38 Freedman DA, Levine AJ. Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein--thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1999; 59: 1-7
- 39 Colaluca IN, Tosoni D, Nuciforo P, Senic-Matuglia F, Galimberti V, Viale G, Pece S, Di Fiore PP. NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature* 2008; 451: 76-80
- 40 Murray MF, Jurewicz AJ, Martin JD, Ho TF, Zhang H, Johanson KO, Kirkpatrick RB, Ma J, Lor LA, Thrall SH, Schwartz B. A high-throughput screen measuring ubiquitination of p53 by human mdm2. *J Biomol Screen* 2007; 12: 1050-1058
- 41 Das P, Vaiphei K, Jain D, Wig JD. p53 and mdm2 expression in colorectal carcinoma: a correlative analysis with clinical staging and histological parameters. *Int J Surg Pathol* 2007; 15: 335-345
- 42 赵仲生, 张梅, 许文娟. P53蛋白和MDM2蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达及意义. *实用癌症杂志* 1998; 13: 201-203
- 43 李灵敏, 刘育艳. p53和MDM2在食管鳞癌中的作用及相关性分析. *山西医科大学学报* 2005; 36: 23-24
- 44 Günther T, Schneider-Stock R, Häckel C, Kasper HU, Pross M, Hackelsberger A, Lippert H, Roessner A. Mdm2 gene amplification in gastric cancer correlation with expression of Mdm2 protein and p53 alterations. *Mod Pathol* 2000; 13: 621-626
- 45 Blok P, Craanen ME, Dekker W, Offerhaus GJ, Tytgat GN. No evidence for functional inactivation of wild-type p53 protein by MDM2 overexpression in gastric carcinogenesis. *J Pathol* 1998; 186: 36-40
- 46 郭洁, 沈志祥, 谭诗云. MDM2与P14ARF在结肠肿瘤中的表达及意义. *胃肠病学和肝病学杂志* 2002; 11: 144-146
- 47 阎再宏, 张蓉, 梁慧霞, 郭文有, 柴兰英, 李秋萍. 大肠癌中mdm2和p53基因表达及生物学意义. *中国全科医学* 2006; 9: 1067-1068
- 48 刘坤平, 莫鉴锋, 谢芝香, 胡国洪, 原伟权, 张永东, 叶勇. 结直肠癌mdm2、p21和p53蛋白的表达. *中华病理学杂志* 2000; 29: 69
- 49 王晓玫, 陶凤华, 成志强, 单军, 苏学劲, 王玲. 结直肠癌MDM2基因表达与生物学行为的关系. *第四军医大学学报* 2003; 24: 1356-1358
- 50 金树梅, 戴洁, 左东升, 范应昌. mdm2及p53与bcl-2在大肠良性和恶性病变中表达意义及相关性分析. *中国肿瘤临床* 2004; 31: 296-297
- 51 于雁, 陈国华, 胡靖, 李悦, 吴洪波, 尚利华, 孙萍. 大肠癌中mdm2表达与临床相关性的研究. *中国肿瘤临床*

■应用要点

MDM2将成为消化系统肿瘤防治研究的一个新靶点, 为肿瘤的进一步研究和治疗提供了新的思路.

■同行评价

本文叙述较为全面,层次分明,语言流畅,具有较好的学术价值。

- 2006; 33: 264-266
- 52 杨庆春, 郑美容, 车向新. MDM2在原发性肝细胞癌中的表达. 中国组织化学与细胞化学杂志 2004; 13: 503-506
- 53 王华曦, 潘运龙, 覃莉, 蒋光愉, 严林, 李文生. P53和MDM2蛋白表达对肝细胞肝癌预后判断的意义. 暨南大学学报 2004; 25: 461-467
- 54 Endo K, Ueda T, Ohta T, Terada T. Protein expression of MDM2 and its clinicopathological relationships in human hepatocellular carcinoma. *Liver* 2000; 20: 209-215
- 55 Dudkina AS, Lindsley CW. Small molecule protein-protein inhibitors for the p53-MDM2 interaction. *Curr Top Med Chem* 2007; 7: 952-960
- 56 Lavin MF, Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 2006; 13: 941-950
- 57 Lam KY, Lo CY, Wat NM, Luk JM, Lam KS. The clinicopathological features and importance of p53, Rb, and mdm2 expression in pheochromocytomas and paragangliomas. *J Clin Pathol* 2001; 54: 443-448
- 58 Lev Bar-Or R, Maya R, Segel LA, Alon U, Levine AJ, Oren M. Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11250-11255
- 59 马刚, 董明, 郑新宇, 郭可建, 郭仁宣, 田雨霖, 董雨亭. p53和MDM2蛋白在胰腺癌组织中表达的临床病理学意义. 中国医科大学学报 2006; 35: 166-167
- 60 胡磊, 毛汉文, 沈雄山, 黄政斌, 李为民, 樊立. Mdm2基因在胰腺癌中的表达及其意义. 中国普通外科杂志 2006; 15: 864-865
- 61 任义, 吴逸明, 魏立, 吴拥军. 肺癌组织中MDM2、p53蛋白的表达. 郑州大学学报(医学版) 2005; 40: 73-75
- 62 李学忠, 田军, 张立强, 潘新良, 雷大鹏, 解光, 栾信庸, 王天铎. MDM2与P27在下咽癌中的表达及临床意义. 临床鼻咽喉科杂志 2004; 18: 716-718
- 63 Prives C, White E. Does control of mutant p53 by Mdm2 complicate cancer therapy? *Genes Dev* 2008; 22: 1259-1264
- 64 Hu Z, Jin G, Wang L, Chen F, Wang X, Shen H. MDM2 promoter polymorphism SNP309 contributes to tumor susceptibility: evidence from 21 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2717-2723
- 65 Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N, Kawamoto K, Suehiro Y, Tanaka Y, Dahiya R. MDM2 SNP309 polymorphism as risk factor for susceptibility and poor prognosis in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4123-4129
- 66 Chène P, Fuchs J, Bohn J, García-Echeverría C, Furet P, Fabbro D. A small synthetic peptide, which inhibits the p53-hdm2 interaction, stimulates the p53 pathway in tumour cell lines. *J Mol Biol* 2000; 299: 245-253
- 67 倪虹, 廉若然. MDM2蛋白对卵巢癌细胞药物敏感性的影响. 中华妇产科杂志 2004; 38: 438-439

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度,研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征,如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准,如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值)。(常务副总编辑:张海宁 2008-09-08)

汕头地区居民食管病患者回顾分析1476例

马佩炯, 林茂煌, 李文芳, 施广石

马佩炯, 李文芳, 施广石, 汕头市第二人民医院消化内科 广东省汕头市 515011

林茂煌, 汕头市中心医院内六科 广东省汕头市 515053

作者贡献分布: 马佩炯、林茂煌与李文芳对此文所作贡献均等; 本论文写作由马佩炯、林茂煌、李文芳与施广石共同完成。

通讯作者: 马佩炯, 515011, 广东省汕头市金平区外马路28号, 广东省汕头市第二人民医院消化内科。mapeijiong@tom.com
电话: 0754-88412876

收稿日期: 2008-05-26 修回日期: 2008-07-12

接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-09-08

Esophageal disease in Shantou area: an analysis of 1476 cases

Pei-Jiong Ma, Mao-Huang Lin, Wen-Fang Li, Guang-Shi Shi

Pei-Jiong Ma, Wen-Fang Li, Guang-Shi Shi, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Shantou City, Shantou 515011, Guangdong Province, China

Mao-Huang Lin, Department of Internal Medicine, Shantou Central Hospital, Shantou 515031, Guangdong Province, China

Correspondence to: Pei-Jiong Ma, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Shantou City, 28 Waima Road, Jinping District, Shantou 515011, Guangdong Province, China. mapeijiong@tom.com
Received: 2008-05-26 Revised: 2008-07-12

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-09-28

Abstract

AIM: To explore the incidence, prevention and treatment of esophageal diseases in Shantou residents.

METHODS: We retrospectively analyzed the data (e.g. gastroscopic findings, pathological results, imaging manifestations and surgical treatments) of 1476 patients endoscopically diagnosed with esophageal diseases.

RESULTS: Of the 1476 cases, 714 were diagnosed with esophageal cancer, 455 with esophagitis, 120 with esophageal varices, 85 with benign esophageal stenosis, 46 with esophageal mucosal laceration, 34 with esophageal foreign bodies, 23 with esophageal diverticulum, 6 with esophageal polyps, and 3 with esophageal achalasia. Conservative treatment was performed in 840 cases; endoscopic treatment was used in

124 cases; surgical treatment was achieved in 512 cases. Of the 714 patients with esophageal cancer, 218 cases (152 received operation and 66 with non-surgical treatment) were followed up, and the 1- and 3-year death rates of those with operation or non-operation were 40% and 90%, or 95% and 100%, respectively. Of the cases with esophagitis, 150 recovered while 10 died.

CONCLUSION: Esophagitis and esophageal cancer constitute the majority of esophageal diseases. The incidence of esophageal cancer is relatively high in this region, and residents should strengthen the sense of prevention.

Key Words: Electronic gastroscope; Multi-slice spiral computed tomography; Magnetic resonance imaging; Esophageal cancer

Ma PJ, Lin MH, Li WF, Shi GS. Esophageal disease in Shantou area: an analysis of 1476 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2883-2886

摘要

目的: 探讨汕头地区居民食管病发病情况及预防治疗策略。

方法: 回顾性分析1476例经内镜诊断为食管病患者的胃镜、病理、影像学及手术治疗等资料。

结果: 1476例食管病患者中发生食管癌714例, 食管炎445例, 食管静脉曲张120例, 食管良性狭窄85例, 食管黏膜撕裂症46例, 食管异物34例, 食管憩室23例, 食管息肉6例, 食管贲门失弛缓症3例。保守治疗840例, 内镜治疗124例, 手术治疗512例。食管癌患者随访218例, 其中手术152例、非手术66例, 其1、3年期死亡率分别为40%、90%和95%、100%。食管炎患者康复150例, 死亡10例。

结论: 食管病主要以食管癌与食管炎为主, 且食管癌在本地区的发病率较高, 增强居民预防食管病的意识, 可降低疾病的发生。

关键词: 电子胃镜; 多层螺旋CT; 磁共振成像; 食管癌

■背景资料

内镜与影像学技术的发展使食管癌的诊疗水平有了很大的提高, 汕头是食管癌高发区, 分析本地区近年来食管病的发病及治疗情况, 突显食管癌在本地区预防和治疗的必要性。

■同行评议者

张军, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

■ 研发前沿

近年来内镜技术较多应用于食管癌的早期诊断与治疗, CT/MRI等影像学技术在食管癌诊治中有重要的意义, 食管癌的综合治疗(手术、化疗、放疗等)大大改善了患者的预后。

马佩炯, 林茂煌, 李文芳, 施广石. 汕头地区居民食管病患者回顾分析1476例. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2883-2886
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2883.asp>

0 引言

食管病是常见的消化系统疾病, 内镜和病理活检、影像学技术是食管病常用的诊疗手段. 汕头地区是食管癌的高发区, 通过分析经内镜和病理活检诊断食管病的汕头地区居民共1476例, 并结合MSCT、MRI等影像学检查结果, 以及保守或手术治疗等资料, 从而了解本地区目前食管病发病情况; 食管癌在食管病中所占有的比例、发病原因和治疗情况; 影像学技术在食管病诊断、治疗中的应用价值. 从而提高食管病的预防及诊疗水平.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-01/2007-12汕头市第二人民医院和汕头市中心医院经胃镜诊断食管病的汕头地区居民1476例, 其中城镇居民808例; 农村居民668例. 男785例, 女691例, 年龄在9-85(平均年龄56.7±13)岁. 所有病例常规查血、粪常规; 粪潜血、凝血功能、血生化及胸片、心电图. 部分病例需要超声波检查.

1.2 方法 采用Olympus260电子胃镜检查, 必要时行病理活检. MSCT检查方法^[5-7]: 利用MSCT行薄层扫描, 扫描时层厚选择5-10 mm, 螺距为1, 上至锁骨上肺炎区, 下至肾上腺上极(包括全肝脏). 扫描结束后, 利用工作站对图像进行后处理, 其中包括多平面重建、三维成像及CT仿真内窥镜等. MRI检查方法^[7-10]: 常规行冠状位、矢状位及轴位扫描, 扫描区域与CT相同. 饮食因素、食管慢性刺激、亚硝胺前体、遗传等调查(主要针对食管癌患者).

2 结果

2.1 1476例食管病 食管癌714例; 食管炎445例(包括霉菌性食管炎19例)食管静脉曲张120例; 食管良性狭窄85例; 食管黏膜撕裂症46例; 食管异物34例; 食管憩室23例; 食管息肉6例; 食管贲门失弛缓症3例. 食管癌714例: 中段396例; 下段234例; 上段84例. 病理分类: 鳞状细胞癌604例; 腺癌68例; 鳞腺癌36例; 未分化癌6例. 临床分期^[1]: 0-1期39例; 2期204例; 3-4期471例. MSCT检查571例, 食管癌CT分期III-IV期^[1]; MRI检查435例. 饮食因素与食管慢性刺激(包括进食过

快、过烫, 浓茶, 食管慢性病变等)647例; 亚硝胺及其前体(咸菜、咸鱼等)705例; 一级或二级亲属中患食管癌或其他消化系统恶性肿瘤329例.

2.2 治疗情况 保守治疗840例, 包括抗感染、抗真菌; 抑制胃酸分泌、抗反流; 降低门脉压力、减少内脏血流、止血; 食管癌放射疗法与化学疗法. 内镜治疗124例, 包括胃镜下异物钳除34例; 沙氏扩张器食管狭窄扩张术86例; 胃镜下食管息肉钳除4例. 手术治疗512例, 食管贲门失迟缓征经胸的Hell-er肌层切开术加抗反流手术2例; 门腔静脉分流术、脾切除+脾肾或脾腔静脉分流术34例; 食管癌切除术436例; 食管癌食管腔内置管术23例; 食管癌胃造瘘术15例; 食管息肉恶性变切除2例.

2.3 预后及随访 食管黏膜撕裂症46例、食管异物34例共80例全部康复. 食管贲门失弛缓症2例术后随访2年, 疗效显著; 食管息肉6例均随访3年, 内镜治疗4例, 术后无复发, 2例第2年病理活检恶性变行手术治疗; 食管憩室23例, 10例随访半年无合并憩室炎或憩室出血; 食管良性狭窄85例, 随访38例, 其中20例3年内行扩张术2-3次; 食管静脉曲张120例, 5例合并大出血死亡, 随访69例, 3年均有反复多次出血; 食管炎445例, 康复150例, 死亡10例, 为恶性肿瘤合并霉菌性食管炎, 1例情况不详(HIV合并霉菌性食管炎); 食管癌714例, 随访218例, 其中手术152例、非手术66例, 其1年、3年期死亡率分别为40%、90%; 95%、100%.

3 讨论

食管疾病主要症状有咽下困难、胸骨后灼热感或疼痛、食物反流、呕血、发热、消瘦等, 其中咽下困难、胸骨后疼痛、消瘦尤为重要^[1]. 在食管病中食管炎、食管癌占绝大部分. (1)食管癌: 闽、粤交接地区是食管癌高发区, 对有吞咽梗阻感、胸骨后疼痛、消瘦等报警症状的就诊者应注意食管癌的排查, 尤其对年龄>60岁; 一级或二级亲属中有食管癌或其他消化系统肿瘤病史者应高度重视, 同时注意到有小部分患者临床上并无明显症状与体征, 只是因为一级或二级亲属中有食管癌患者而要求检查发现. 本研究显示, 食管癌在本地区仍然有较高的发病率, 应再次引起注意, 通过对饮食因素、食管慢性刺激、亚硝胺前体、遗传等调查表明进食过快、过烫, 饮浓茶, 食用咸菜、咸鱼等含有亚硝胺及其前体食物在食管癌的发病中有重要的意义. Lyronis *et al*^[3]研究显示HPV感染、吸烟与滥

用酒精在食管癌发病中也有一定的意义. 彭仙娥 *et al*^[2] 研究显示基因和环境因素的交互作用与食管癌的发病有关. 本地居民大多有进食过快、过烫, 饮浓茶, 食用咸菜、咸鱼等含有亚硝胺及其前体食物等饮食习惯, 表明改变饮食习惯是本地区食管癌一级预防的一个重要措施, 同时应治疗食管慢性病变、感染, 加强易感人群(食管癌、或其他癌瘤家族史等)的监测, 普及防癌知识, 提高防癌意识. 近年来食管癌的综合治疗已日益受到临床的重视, 放疗、化疗、手术三者的结合是食管癌综合治疗的趋势^[14-16]. 手术治疗仍然是食管癌治疗的重要手段, 早期发现, 早期治疗, 甚至可能使患者得到长期存活, 上述结果显示, 本地区食管癌患者手术切除率不高(61.06%), 影响本地区食管癌患者手术切除的原因有^[1]: 临床分期, III期中的T4; 任何NM0及IV期. 经济状况, 年龄大, 体质差. 心脏、肺等脏器功能不全者. 思想陈旧落后. 食管癌常规放射治疗的长期生存率为4.3%-16.4%. 非常规分割方法将食管癌放射治疗的5年生存率提高了15%以上, 同期放化疗结合治疗食管癌也显示出其优势. 治疗方案的个体化可进一步增加疗效, 降低并发症, 提高生活质量. 生物学方法可能为非手术治疗食管癌个体化治疗方案的选择提供思路^[15]. 合理而有效的综合治疗, 已取得较单一方法更为满意的疗效, 提高了患者的长期生存率. 新的化疗药物的应用、对新辅助化疗的认识、和对辅助性化疗的再认识是食管癌内科治疗领域近年来发展的亮点. (2)食管炎是另外一个常见病, 包括感染、反流、化学物刺激、物理性损伤及继发于食管憩室、肿瘤或贲门失弛缓症等, 表现吞咽不适、疼痛、反流、发热等症状. 霉菌性食管炎多继发于肿瘤、应用免疫抑制剂(包括器官移植术后)等, 另一个值得引起注意的病因是HIV, 本组1例, 男性, 35岁, 因持续发热住院, 胃镜和病理检查诊断霉菌性食管炎, 进一步查找病因确诊HIV. 故此对于高危人群应提起注意. 反流性食管炎近年来颇受重视, 治疗食管反流可改善患者的生活质量, 减少食管良性狭窄甚至是食管下段癌变的发生. (3)食管静脉曲张临床上较为多见, 大多数患者有肝硬化病史, 因呕血就诊行胃镜检查确诊. (4)食管良性狭窄表现进食梗阻、呕吐. 食管黏膜撕裂症出现呕吐、呕血. 临床上两种疾病较为常见. (5)食管异物多在耳鼻喉科就诊, 但有部分病例行胃镜检查及治疗. (6)食管憩室、食管息肉、食管贲门失弛

缓症本组病例较少, 食管息肉有恶变可能, 应定期随访.

电子胃镜在食管病诊疗中的价值: 胃镜与组织学检查在食管病的诊断中有其他检查不可替代的位置. 通过内镜直视下观察食管黏膜表现特点同时进行病理取材, 是诊断食管癌的一种有效方法. 食管黏膜色素染色可清楚显示病变范围, 增强病变黏膜与正常黏膜的对比度, 对提高早期食管癌的诊断率; 从而做到早诊断、早治疗有重要意义^[11-12]. 近年来, 超声内镜对于食管疾病的诊断, 在临床上应用非常广泛. 超声内镜对于食管黏膜下病变的鉴别诊断和食管癌的深度、分期有重要的价值, 对于其他食管疾病的诊断也具有重要意义^[4]. 食管病的内镜治疗: I: 食管静脉曲张硬化剂治疗; 组织粘合剂注射治疗; 金属夹内镜治疗; 套扎术. II: 食管狭窄治疗, 包括沙氏扩张器; 球囊扩张; 内镜下高频电刀或微波切开法. III: 内镜下食管小息肉钳除与异物取出. IV: 对病灶直径<2 cm或小于食管半周的范围, 浸润深度未达黏膜下层的食管癌可行内镜下黏膜切除术; 进展期食管癌不愿行手术、放疗、化疗可行内镜下激光、微波治疗, 或放支架治疗^[11-13].

影像学技术在食管癌中的应用价值: CT与MRI都可用于食管癌可切除性的判断. 有研究结果表明, 从敏感性、特异性和准确率方面将CT和MRI对食管癌术前TNM分期(以术后大体病理结果作为金标准)比较没有差异^[7-10]. CT的优势在于成像技术简单、参数较少、易于被临床医生所掌握; 价格较为低廉. 增强CT扫描还能显示肿块与心脏大血管的关系, 弥补传统X线检查的不足, 绝大多数病例具备X线和CT结果就可以得出比较明确的诊断. 但对某些特殊病例常规CT扫描有局限性, 进行MRI检查就成为必须. MRI具有多方位(轴位、矢状位、冠状位甚至斜位)、显示肿瘤构成成分以及肿瘤与血管的关系和肿瘤内血管的优势, 缺点是成像参数多、易受外界(呼吸、心跳)因素干扰、价格昂贵. 同时有文献报道也证实CT和MRI存在较高的假阴和假阳性率^[7-9], 值得注意. 术前影像学检查判断中晚期食管癌不可切除的标准为主动脉、气管支气管或左心房受侵, 肝、肺或其他远处转移^[7]. 此外PET和PET/CT从代谢功能方面判断病变的良恶性, PET和PET/CT的应用为食管癌的诊断、分期和疗效评价提供了新的方法, 为影像学开辟了新的研究领域, 展示了广阔的应用前景^[6].

■创新盘点

本研究通过分析汕头地区居民食管病发病情况, 重点在于分析食管癌的发病和病因, 探讨内镜和影像学技术在食管癌诊断与治疗中的应用价值. 从而提高高发区居民对食管癌的认识, 提倡重在预防、早期诊断、早期治疗的观点.

■同行评价

本文目的是探讨汕头地区居民食管病发病情况及预防治疗策略,有一定的总结意义,但代表性一般。

本地区居民中食管癌病例仍然是所有食管病中最重要最应该值得重视的一部分,应提高本地区居民对食管癌的认识,做好预防措施。合理内镜及影像学检查,有利于提高食管病的诊疗水平,改善患者的预后。

4 参考文献

- 1 陈灏珠. 实用内科学. 第11版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1843-1848
- 2 彭仙娥, 史习舜, 周紫荆, 李国梁, 潘培川, 陈子龙, 李文明, 吴清波. 基因和环境因素的交互作用与食管癌的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2531-2533
- 3 Lyronis ID, Baritaki S, Bizakis I, Krambovitis E, Spandidos DA. K-ras Mutation, HPV Infection and Smoking or Alcohol Abuse Positively Correlate with Esophageal Squamous Carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2008 Jul 1; [Epub ahead of print]
- 4 陈立刚, 任建林. 超声内镜在食管常见疾病诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3216-3218
- 5 於唯鸣, 潘志国, 叶萍. 食管癌X线与CT诊断. 中国社区医师(综合版) 2007; 9: 91-92
- 6 丁其勇, 黄庆娟. PET和PET/CT在食管癌诊断中的应
- 7 王旭广, 陈哲. CT和MRI检查对食管癌术前TN分期的价值. 肿瘤 2005; 25: 281-283
- 8 雷益, 邱德正, 翁准. 食管癌手术可切除性的MRI评估. 放射学实践 2005; 20: 711-713
- 9 Wu LF, Wang BZ, Feng JL, Cheng WR, Liu GR, Xu XH, Zheng ZC. Preoperative TN staging of esophageal cancer: comparison of miniprobe ultrasonography, spiral CT and MRI. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 219-224
- 10 Kantarci M, Polat P, Alper F, Eroglu A, Eren S, Okur A, Onbaş O. Comparison of CT and MRI for the diagnosis recurrent esophageal carcinoma after operation. *Dis Esophagus* 2004; 17: 32-37
- 11 张月明, 王贵齐. 早期食管癌的内镜诊断与治疗进展. 中国消化内镜 2008; 2: 26-34
- 12 林振和, 刘明, 任建林. 食管癌内镜治疗进展. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3219-3225
- 13 葛勤利, 杨伟捷, 张红霞. 内镜下综合治疗食管恶性肿瘤85例. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2884-2885
- 14 卢绪菁, 王建华. 食管癌术后放疗的临床应用价值. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2535-2537
- 15 孙苏平, 杨鸿鹏, 黎功. 中国非手术治疗食管癌研究进展. 癌症进展 2008; 6: 30-35
- 16 李苏宜, 孙新臣, 刘琳. 食管癌内科治疗及综合治疗进展. 癌症 2006; 25: 509-515

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名 文章的题名应言简意赅,方便检索,英文题名以不超过10个实词为宜,应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名,后姓; 首字母大写,双名之间用半字线“-”分开,多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者,后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)

两种莫西沙星三联疗法对幽门螺杆菌的根除率的比较

周俊, 张玫, 孙立东

周俊, 张玫, 孙立东, 首都医科大学宣武医院消化科 北京市 100053

作者贡献分布: 此课题由周俊设计、统计分析解释数据及文章撰写; 采集数据由周俊与孙立东完成; 张玫对此研究提供指导、行政、技术支持, 对文章的知识性内容作批评性审阅。

通讯作者: 周俊, 100053, 北京市宣武区长椿街45号, 首都医科大学宣武医院消化科. zhstrive@yahoo.com.cn
电话: 010-8319 8321

收稿日期: 2008-06-05 修回日期: 2008-08-02

接受日期: 2008-08-12 在线出版日期: 2008-09-08

Comparison between *H pylori* eradication rates of two moxifloxacin-based triple therapies

Jun Zhou, Mei Zhang, Li-Dong Sun

Jun Zhou, Mei Zhang, Li-Dong Sun, Department of Gastroenterology, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China

Correspondence to: Jun Zhou, Department of Gastroenterology, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, 100053 Beijing, China. zhstrive@yahoo.com.cn

Received: 2008-06-05 Revised: 2008-08-02

Accepted: 2008-08-12 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To compare the *H pylori* eradication rates of two 7-day moxifloxacin-based therapies.

METHODS: In this parallel control study, 52 *H pylori*-positive patients were divided into EMT (esomeprazole 20 mg bid, moxifloxacin 0.4 g qd, tinidazole 0.5 g bid) group and RMA (ranitidine bismuth citrate capsules 0.4 g bid, moxifloxacin 0.4 g qd, amoxicillin 1.0 g bid) group. The patients in both groups were treated for 7 days. *H pylori* status was assessed 4 weeks after the end of treatment by ¹³C urea breath test.

RESULTS: The treatment was completed in all the 52 patients. The rates of *H pylori* eradication in group EMT and RMA were 83.3% and 79.4%, respectively, and there was no difference between them ($\chi^2 = 0.117$, $P = 0.521$).

CONCLUSION: Seven-day moxifloxacin-based triple therapy is a feasible *H pylori* eradication regimen.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Moxifloxacin; Seven-day triple therapy

Zhou J, Zhang M, Sun LD. Comparison between *H pylori* eradication rates of two moxifloxacin-based triple therapies. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2887-2890

摘要

目的: 比较两种以莫西沙星为基础的7 d三联疗法对*H pylori*感染的根除率。

方法: 采用平行对照实验设计, 52例*H pylori* (+)患者分为2组, EMT组: 埃索美拉唑20 mg bid、莫西沙星0.4 g qd、替硝唑0.5 g bid; RMA组: 枸橼酸铋雷尼替丁0.4 g bid、莫西沙星0.4 g qd、阿莫西林1.0 g bid, 治疗7 d, 治疗结束4 wk后通过¹³C-UBT检查*H pylori*是否根除。

结果: EMT组*H pylori*根除率为83.3%, RMA组根除率为79.4%。两组之间的*H pylori*根除率没有显著性差异($\chi^2 = 0.117$, $P = 0.521$)。

结论: 以莫西沙星为基础的7 d三联疗法是可供选择的*H pylori*根除方案。

关键词: 幽门螺杆菌; 莫西沙星; 7 d三联疗法

周俊, 张玫, 孙立东. 两种莫西沙星三联疗法对幽门螺杆菌的根除率的比较. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2887-2890
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2887.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)在慢性胃炎、消化性溃疡、胃GALT淋巴瘤和胃癌的发病中有重要的作用。根据Maastricht-III及我国的*H pylori*共识意见, 根除*H pylori*感染是治疗上述疾病的重要目的。此外, 还有一些疾病支持根除*H pylori*治疗。标准一线三联7 d疗法根除*H pylori*方案多样, 都需要两种抗生素(克拉霉素、阿莫西林、甲硝唑等), *H pylori*根除率为70%-85%。由于*H pylori*逐渐产生的对克拉霉素和甲硝唑等的耐药性、患

■背景资料

*H pylori*感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃GALT淋巴瘤、胃癌等有关, 应该根除; *H pylori*根除率逐渐降低, 在寻找新的抗生素和方案时, 发现以莫西沙星可用于*H pylori*的根除治疗。

■同行评议者

白文元, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科; 陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■研究前沿

莫西沙星单用和二联疗法对*H pylori*的根除率较低,以莫西沙星为基础的三联疗法对*H pylori*有较高的根除率;国外有研究以其为基础的不同的三联方案,但*H pylori*的根除率不一。

者的依从性等原因,*H pylori*根除率逐渐降低。因此有学者致力于寻找新的抗*H pylori*药物和治疗方案,在寻找新的抗生素时,有学者发现莫西沙星(moxifloxacin)有抗*H pylori*的作用。莫西沙星单用和二联疗法对*H pylori*的根除率分别为22.5%和33.3%;而以莫西沙星为基础的三联疗法对*H pylori*有较高的根除率^[1];国外有研究以其为基础的一线治疗方案和二线治疗方案。国内目前还没有关于用莫西沙星治疗*H pylori*的报道。本文比较两种以莫西沙星为基础的三联疗法作为一线治疗方案对*H pylori*的根除率。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-01/2008-01我院门诊患者中,以上腹痛、反酸、烧心等主要症状就诊者52例,胃镜下快速尿素酶检测及病理标本Giemsa染色法(+)或空腹6 h以上¹³C-呼气实验(¹³C-UBT)实验*H pylori*(+)的患者作为入选对象。所有患者均符合Maastricht-III及我国共识意见中的*H pylori*根除指征。所有患者均为第1次根除*H pylori*治疗,治疗前4 wk内未使用PPI、H₂RA、铋剂、抗菌药;无相关药物过敏史;无严重心、肝、肾功能障碍及其他消化系统疾病;并且不是哺乳期妇女及孕妇。埃索美拉唑由无锡阿斯利康公司生产;莫西沙星片由拜耳医药保健股份公司生产;阿莫西林由联邦制药有限公司生产;枸橼酸铋雷尼替丁由丽珠集团丽珠制药厂生产;替硝唑由丽珠集团丽珠制药厂生产。

1.2 方法 采用平行对照实验设计,患者分成2组,接受7 d的口服给药治疗。(1)EMT组:埃索美拉唑20 mg bid、莫西沙星0.4 g qd、替硝唑0.5 g bid;(2)RMA组:枸橼酸铋雷尼替丁0.4 g bid、莫西沙星0.4 g qd、阿莫西林1.0 g bid。

所有患者停药4 wk后复查¹³C-UBT,其DOB值(delta over baseline)小于2.5%为阴性,判断为根除治疗成功;阳性为根除治疗失败。记录患者的药物不良反应,尤其是消化系统和神经系统副作用。

统计学处理 采用SPSS13.0进行统计分析。两组间的比较采用 χ^2 检验、*t*检验、Fisher's精确检验。*P*<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

EMT组和RMA组在性别、年龄疾病构成方面的无统计学意义的差异(*P*>0.05),具有可比性(表1)。EMT组的*H pylori*根除率为83.3%(15/18),

而RMA的*H pylori*根除率为79.4%(27/34)(表2)。两组之间的*H pylori*根除率没有显著性差异($\chi^2 = 0.117, P = 0.521$)。EMT组有2例患者出现为恶心、腹泻等不良反应。RMA组出现不良反应者有4例,表现为食欲减退、腹泻等。

3 讨论

抗生素阿莫西林、甲硝唑、克拉霉素、红霉素等药有杀菌抑菌作用,联合质子泵抑制剂、H₂受体阻断剂、枸橼酸铋雷尼替丁等药组成的各种三联疗法可使*H pylori*的根除率提高到70%-85%。但是由于*H pylori*的耐药性等原因,其根除率逐渐降低。

莫西沙星为第4代氟喹诺酮类药物,对G菌和厌氧菌有抗菌活性,*T*_{1/2}为9-16 h,可每天1次给药,老年人和轻中度肾功能损害患者不需要调整剂量。应用于临床的时间较短。既往主要用于社区获得性肺炎、急性细菌性鼻窦炎、泌尿生殖系感染、继发性腹膜炎、肺结核的早期及延长早期间治疗、强直性脊柱炎、皮肤和皮肤组织感染等^[2]。研究发现莫西沙星对*H pylori*有杀灭作用,Sánchez *et al*^[3]的研究发现莫西沙星对*H pylori*的MIC₅₀为0.12 mg/L, MIC₉₀为2 mg/L; Cattoir *et al*^[4]的研究中, MIC₅₀为0.5 mg/L, MIC₉₀为16 mg/L。国外有以莫西沙星为基础的三联疗法作为*H pylori*的一线治疗方案或者二线治疗方案的报道^[5],尤其以韩国学者报道居多。

Nista *et al*^[5]报道以莫西沙星为基础的一线治疗方案,EMA方案对*H pylori*的根除率为89%, EMT方案的根除率为92%,高于对照组。Bago *et al*^[6]报道:277例*H pylori*(+)非溃疡性消化不良患者随机分成如下4组治疗7 d: MML组、MAL组、CML和CAL组。265患者完成实验。各组*H pylori*的清除率分别是: MML组96.7%; MAL组90.5%; CML组75.8%; CAL组80.2%。他们的研究提示莫西沙星三联疗法比克拉霉素三联疗法明显有效,可用于*H pylori*感染的杀菌治疗。Cheon *et al*^[7]对于一线治疗方案根除*H pylori*失败的患者,以EMA方案作为二线治疗方案,对*H pylori*的根除率为83.3%。

上述研究提示以莫西沙星为基础的三联疗法对*H pylori*的根除率较高,但是有土耳其的学者报告以莫西沙星为基础的三联疗法对*H pylori*的根除率较低。Sezgin *et al*的研究中,患者服药14 d,泮托拉唑40 mg bid、莫西沙星0.4 g qd、阿莫西林1 g bid, *H pylori*的清除

表 1 EMT组和RMA组患者一般资料的比较

	EMT组	RMA组	P
n	18	34	
性别(男/女)	5/13	10/24	0.584 ^f
年龄(mean ± SD)	48.17 ± 15.59	53.35 ± 9.28	0.138 ^t
疾病(%)			0.989 ^p
消化性溃疡	16.67	14.71	
胃食管反流病	11.11	8.82	
慢性浅表性胃炎	66.66	70.59	
慢性萎缩性胃炎	5.56	5.88	

f: 双侧Fisher's精确检验; t: 双侧t检验; p: 双侧Pearson's卡方检验。

表 2 EMT组和RMA组的H pylori根除率比较

	n	¹³ CUBT阳性	¹³ CUBT阴性	根除率(%)	χ^2	P
EMT组	18	3	15	83.3	0.117	0.521
RMA组	34	7	27	79.4		

率仅为47.6%。有研究报告韩国不同的机构中H pylori耐药性不同^[8], 推测不同的国家H pylori耐药性亦可不相同; 也有可能为不同地区H pylori菌株毒力明显不同^[9-10]; 亦有可能为泮托拉唑与埃索美拉唑的差异所导致。

我们的研究中, 以莫西沙星为基础的三联疗法对H pylori根除率为EMT组为83.3%, RMA组为79.4, 两组之间的根除率没有显著性差异。与文献报道的H pylori根除率相似^[6-7]。与其他实验不同的是PPI、RBC的组成有所不同。

以色列学者对7373进行¹³C-UBT的患者(女4531, 男2842)进行研究, 发现10-80年龄组中女性DOB值(24.7 ± 17.4)明显高于男性DOB值(17.6 ± 11.8)(P < 0.001), 年龄调整的性别差异是7.1(95% CI: 6.4-7.9)^[11]。一些研究认为高DOB值意味着较低的H pylori根除率, 但Zullo *et al*^[12]将基线DOB值分类为低值组(<16)、中值组(16-35)、高值组(>35), 多因素分析显示DOB值不影响H pylori根除。我们的实验病例数少, DOB值、年龄对H pylori根除率的影响还不能得出明确的结论。

莫西沙星的副作用主要表现在消化系统和神经系统方面, 口服给药容易引起恶心、呕吐, 静滴给药更易导致肝功能异常^[13]。我们的实验中, 患者口服莫西沙星, 出现的不良反应有恶心、纳差、腹泻; 没有神经系统和心血管系统副作用。两组患者的不良反应程度均不重, 均坚

持服完所有的药物。由于没有监测肝肾功能, 不能明确是否有肝肾副作用。

总之, 以莫西沙星为基础的7 d三联疗法有较好高的H pylori根除率, 是可供选择的根除H pylori的一线治疗方案; 两组间的根除率无显著性差异。

4 参考文献

- Di Caro S, Ojetto V, Zocco MA, Cremonini F, Bartolozzi F, Candelli M, Lupascu A, Nista EC, Cammarota G, Gasbarrini A. Mono, dual and triple moxifloxacin-based therapies for Helicobacter pylori eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 527-532
- 孟静娟. 新抗生素莫西沙星国内外研究应用最新进展. *微生物学杂志* 2007; 27: 98-101
- Sánchez JE, Sáenz NG, Rincón MR, Martín IT, Sánchez EG, Martínez MJ. Susceptibility of Helicobacter pylori to mupirocin, oxazolidinones, quinupristin/dalfopristin and new quinolones. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 283-285
- Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, Soussy CJ, Cambau E. Update on fluoroquinolone resistance in Helicobacter pylori: new mutations leading to resistance and first description of a gyrA polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 389-396
- Nista EC, Candelli M, Zocco MA, Cazzato IA, Cremonini F, Ojetto V, Santoro M, Finizio R, Pignataro G, Cammarota G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Moxifloxacin-based strategies for first-line treatment of Helicobacter pylori infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 1241-1247
- Bago P, Vcev A, Tomic M, Rozankovic M, Marusic M, Bago J. High eradication rate of H. pylori with

■创新盘点

国内目前还没有关于用莫西沙星治疗H pylori的报道。本文比较两种以莫西沙星为基础的三联疗法对H pylori的根除率, 并且药物组合不同于其他报道。

■同行评价

本研究实用性较强,结果可信,具有一定的临床参考价值。

- moxifloxacin-based treatment: a randomized controlled trial. *Wien Klin Wochenschr* 2007; 119: 372-378
- 7 Cheon JH, Kim N, Lee DH, Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS. Efficacy of moxifloxacin-based triple therapy as second-line treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2006; 11: 46-51
- 8 Kim N, Kim JM, Kim CH, Park YS, Lee DH, Kim JS, Jung HC, Song IS. Institutional difference of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Korea. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 683-687
- 9 Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, Ohtani M, Suto H, Ito Y, Yamazaki Y, Keida Y, Higashi H, Hatakeyama M, Azuma T. Distinct diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3906-3916
- 10 Salih BA, Ipek FM. Global research on *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 147-148
- 11 Shmueli H, Yahav J, Samra Z, Chodick G, Ofek I. Elevated ¹³C urea breath test values females infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 402-404
- 12 Zullo A, Perna F, Ricci C, Hassan C, Tampieri A, De Francesco V, Morini S, Vaira D. ¹³C-urea breath test values and *Helicobacter pylori* eradication. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 370-374
- 13 胡明礼. 国内莫西沙星不良反应文献分析. 药学服务与研究 2007; 7: 281-283

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-、 $\pm$ 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d, 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm $\times$ 6 cm $\times$ 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg $\cdot$ d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)

胃十二指肠壁非肿瘤性病变超声图像特点的比较

陶春梅, 刘东屏, 王学梅, 阙艳红

陶春梅, 王学梅, 阙艳红, 中国医科大学附属第一医院超声
诊断科 辽宁省沈阳市 110001

刘东屏, 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: 陶春梅, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155
号, 中国医科大学第一附属医院超声中心.

dpl19632003@yahoo.com.cn

电话: 024-81532777/83282097

收稿日期: 2008-03-20 修回日期: 2008-07-29

接受日期: 2008-08-04 在线出版日期: 2008-09-08

Comparative analysis on sonograms of non-tumorous lesions in gastric and duodenal wall

Chun-Mei Tao, Dong-Ping Liu, Xue-Mei Wang,
Yan-Hong Que

Chun-Mei Tao, Xue-Mei Wang, Yan-Hong Que, Depart-
ment of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of China
Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province,
China

Dong-Ping Liu, Department of Gastroenterology, the First
Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang
110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Chun-Mei Tao, Department of Ul-
trasound, the First Affiliated Hospital of China Medical
University, 155 Nanjing North Street, Heping District,
Shenyang 110001, Liaoning Province,
China. dpl19632003@yahoo.com.cn

Received: 2008-03-20 Revised: 2008-07-29

Accepted: 2008-08-04 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To assess the value of gastric ultrasound in
the diagnosis of common non-tumorous lesions
in gastric and duodenal wall.

METHODS: A total of 247 patients with gastric
or duodenal diseases underwent both gastric
ultrasound and gastroscopic examinations. The
sonograms were compared with the results of
gastroscopic or pathological examination.

RESULTS: Of the 247 cases, the coincidence
rates of gastric sonography and gastroscopy
were 75% for acute gastritis, 81.14% for chronic
gastritis, 90.47% for gastric ulcer, and 82.05% for
duodenal ulcer. The sonograms of these gastric
diseases had marked differences.

CONCLUSION: The sonograms of non-tumor-
ous lesions have their own characteristics and
are valuable in the diagnosis of lesions in gastric
and duodenal wall.

Key Words: Stomach; Duodenum; Non-tumorous
lesion; Gastric sonography

Tao CM, Liu DP, Wang XM, Que YH. Comparative
analysis on sonograms of non-tumorous lesions in gastric
and duodenal wall. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008;
16(25): 2891-2894

摘要

目的: 探讨胃超声在常见胃、十二指肠壁非
肿瘤性病变中的诊断价值.

方法: 247例胃、十二指肠疾病患者同时进行
胃超声和胃镜检查, 以胃镜结果和/或病理为
标准, 与胃超声检查结果对比分析.

结果: 247例胃超声检查结果与胃镜结果同步
对比符合率分别为: 急性胃炎75.00%, 慢性胃
炎81.14%, 胃溃疡90.47%, 十二指肠球部溃疡
82.05%. 各种疾病胃壁超声图像改变有明显
差异.

结论: 胃、十二指肠壁非肿瘤性病变超声检
查声像图有各自特点, 差异较大, 在胃壁病变
的判定中有一定的诊断价值.

关键词: 胃; 十二指肠; 非肿瘤性病变; 胃超声检查

陶春梅, 刘东屏, 王学梅, 阙艳红. 胃十二指肠壁非肿瘤性病
变超声图像特点的比较. *世界华人消化杂志* 2008; 16(25):
2891-2894

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2891.asp>

0 引言

胃、十二指肠疾病诊断的主要手段是胃镜和胃
钡餐透视检查, 但是, 临床对于高龄, 近期消化
道出血, 幽门梗阻, 有心肺功能不全等患者, 不
适于上述检查; 有些胃部轻度不适患者或对胃
镜检查有恐惧心里的患者不愿接受上述检查.

■背景资料

胃、十二指肠疾
病诊断的主要手
段是胃镜和胃钡
餐透视检查, 但
是, 临床对于高
龄, 近期消化道出
血, 幽门梗阻, 有
心肺功能不全等
患者, 不适于上述
检查; 近年来经腹
对胃的超声检查
作为一种简便易
行的检查手段, 已
经被临床医生所
认识.

■同行评议者

范志宁, 主任医
师, 南京医科大学
第二附属医院内
镜中心

■ 研发前沿

超声对胃病诊断的报道多局限在胃癌方面, 对非肿瘤性胃壁增厚的研究较少。

近年来经腹对胃的超声检查作为一种简便易行的检查手段, 已经被临床医生所认识^[1-3]。临床常见的胃、十二指肠非肿瘤性疾病有急、慢胃炎, 胃溃疡, 十二指肠溃疡。现对247例胃、十二指肠非肿瘤性疾病的患者, 经腹胃超声检查、同时进行胃镜, 对其检查结果进行对比分析, 探讨胃超声检查在胃、十二指肠壁非肿瘤性病变的诊断中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-01/2006-05, 于我院门诊和住院的247例患者, 均同时进行胃超声检查和胃镜检查, 排除胃、十二指肠肿瘤性病变、肝胆胰病变。其中男151例, 女96例, 年龄16-90(平均年龄48.5)岁。所有患者均有胃部不适、隐痛等症状, 经胃镜检查及/或活检病理证实急性胃炎12例, 慢性胃炎175例, 胃溃疡21例, 十二指肠球部溃疡39例。

1.2 方法 凸阵探头: 3.5-5.0 MHz, 高频探头: 8-10 MHz, 患者检查前禁食水8-12 h, 先空腹检查, 观察胃腔内有无潴留, 询问病史, 排除胃、十二指肠穿孔, 大致按胃解剖位置顺序扫查, 再饮水检查。饮水600 mL左右, 使胃腔适度充盈。根据需要取仰卧位、左右侧卧位或半卧位, 顺序观察腹段食道至贲门、胃底、胃体、胃角、胃窦、幽门、十二指肠各部; 变换探头方向分别取得胃各部位纵切面、横切面的图像。观察内容为胃壁厚度、结构、连续性, 有无凹陷、隆起等形态学改变, 胃腔有无狭窄, 胃壁的蠕动情况。

2 结果

胃超声检查结果与胃镜和/或病理活检结果有一定的差异(表1)。247例胃超声检查结果与胃镜结果同步对比符合率分别为: 急性胃炎75.00%, 慢性胃炎81.14%, 胃溃疡90.47%, 十二指肠球部溃疡82.05%。几种常见胃、十二指肠壁病变超声检查声像图有各自特点, 差异较大, 可作出初步诊断(图1)。各种疾病超声所见及与胃镜比较见表2。

3 讨论

根据胃、十二指肠壁声像图的不同, 可以初步判定胃、十二指肠病变的部位、性质, 能够发现胃镜下无法观察到的胃壁整体变化, 如厚度、病变浸及的深度, 还可以了解胃周围淋巴结和毗邻器官有无转移, 弥补胃镜和X线钡餐检查的不足^[4-7]。以上各种胃、十二指肠壁病变超声检查声像图有各自特点, 差异较大, 可以作出较明确的临床诊断, 或给临床提供有用的信息。

表1 胃镜和/或活检病理诊断结果与胃超声结果比较 n(%)

诊断	胃镜和或病理	超声提示	符合率
急性胃炎	12	9	9/12(75.00)
慢性胃炎	175	142	142/175(81.14)
胃溃疡	21	19	19/21(90.47)
十二指肠溃疡	39	33	33/39(82.05)
总符合率	247	203	203/247(82.18)

急性胃炎超声检查可见病变部位胃壁全层增厚, 黏膜层及下层呈隆起状, 黏膜明显不光滑, 胃壁结构可分辨, 回声减低, 可伴有不同程度的幽门梗阻, CDFI血流信号可明显增多。慢性胃炎超声检查可见病变部位胃黏膜不光滑、略增厚、呈小毛刺状或称小锯齿状, 表面附着物增多, 回声可稍低。慢性萎缩性胃炎胃体部好发, 可见胃黏膜变薄、欠光滑、胃壁略薄。而慢性疣状胃炎可见乳头状突起, 胃壁增厚, 黏膜、黏膜下层及肌层为主, 回声可稍低, 黏膜较急性胃炎光滑。胃溃疡超声检查可见病变部位局部黏膜呈固定高回声, 增厚或凹陷, 可清晰显示病变浸及深度, 急性期可见病变周围胃壁增厚、隆起, 回声减低。陈旧性溃疡病变周围胃壁无明显的增厚, 一般回声正常。如病变下方和周围胃壁结构不清晰或消失不均匀, 应考虑溃疡有恶变倾向。十二指肠球部溃疡在其充盈时显示清晰, 可见局部的黏膜呈固定高回声, 多隆起, 相对应的球壁及周边略厚, 回声稍低, 病变处蠕动受限。十二指肠球部以下结构, 受充盈度的影响, 超声检查显示不清。

胃的超声检查也有一定的局限性, 特别是早期胃癌检出率很低, 本组病例中有9例胃溃疡病例经活检病理证实为早期胃癌或癌前病变, 超声检查无特异性表现, 无法诊断。本组十二指肠球部溃疡病例中有3例降部伴有溃疡, 超声无法检出。胃超声检查过程中应注意: 胃腔内的充盈随胃的蠕动和消化而排出, 因此检查应该选择在饮水后短时间内进行; 如果首次检查不满意, 或有时胃, 特别是十二指肠黏膜高回声不能确定时, 可再次饮用充盈剂; 检查过程中应不断变换体位, 同时可以反复适量的加压, 促进胃的蠕动, 观察病变部位的情况。

胃镜对胃黏膜病变的诊断仍然是最主要的检查手段, 即可直接观察病变部位的变化, 同时可以取得病变组织, 进行病理诊断。胃镜无法观察胃壁全层变化, 以及病变浸及的深度。如果胃

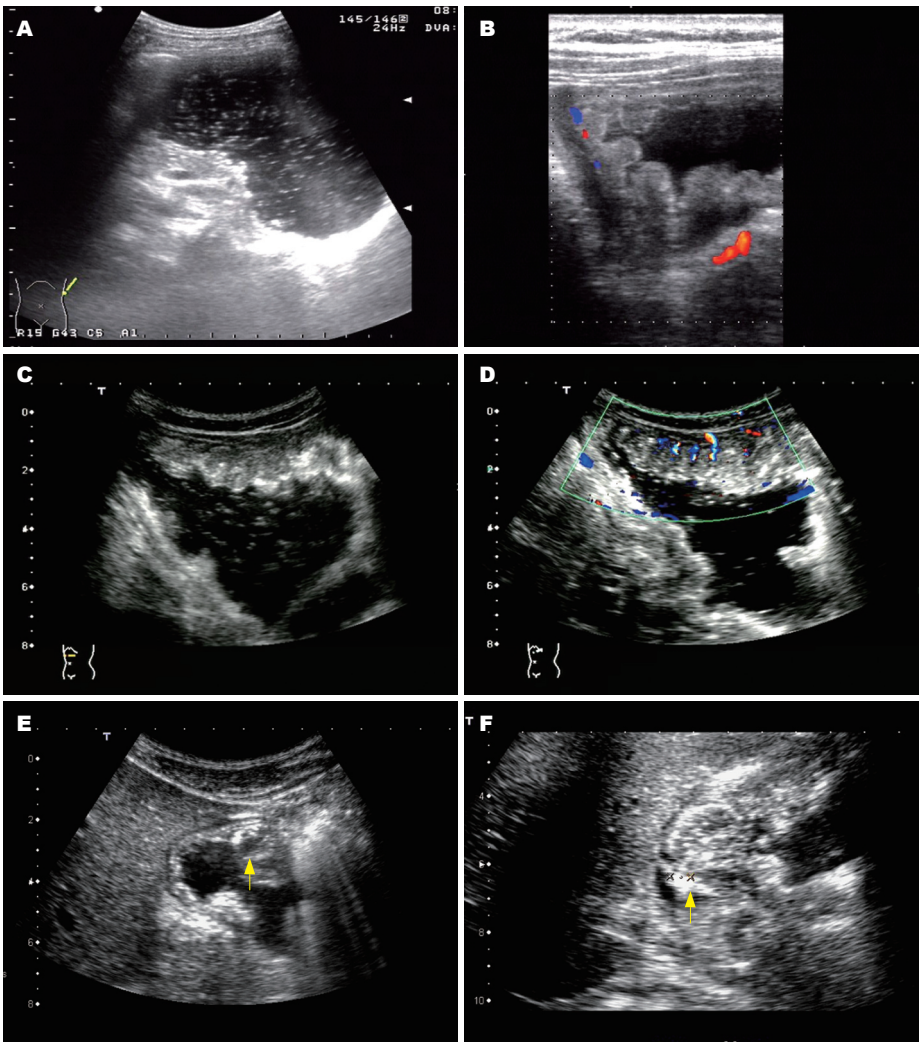


图 1 急性胃炎和胃溃疡十二指肠溃疡的超声图像. A: 慢性胃炎黏膜呈小毛刺状; B: 慢性疣状胃炎黏膜呈乳头状突起; C: 急性胃炎胃壁增厚, 黏膜下为主, 回声减低, 黏膜明显不光滑; D: 急性胃炎病变胃壁血流信号增多; E: 胃窦小弯侧溃疡, 黏膜凹陷, 其下胃壁结构清晰; F: 十二指肠球部溃疡黏膜呈高回声, 无凹陷.

■应用要点
本文总结了非肿瘤性胃壁疾病超声检查, 胃壁图像的不同特点, 提出超声在上述疾病诊断中, 有意义的临床检查信息, 对上述疾病的诊断有一定的临床诊断价值.

表 2 常见非肿瘤性胃、十二指肠壁病变超声检查图像特点与胃镜比较

病变处壁变化	急性胃炎	慢性胃炎	胃溃疡	十二指肠溃疡
黏膜层	增厚、突起 明显不光滑	不光滑呈小毛刺状 或锯齿状 表面隆起或变薄	中断, 呈固定 高回声, 增厚	局部增厚, 呈固 定高回声
各层结构界限	清晰或模糊	清晰或较清晰	病变后方清晰	模糊或不清晰
胃壁厚度	增厚	不明显略厚或变薄	病变周围可增厚	病变处及两侧可增厚
正常结构	清晰或可辨认	清晰或较清晰	病变后方结构清 晰或较清晰	病变浸及深度结构 消失, 后方显示不清
病变好发部位	胃体至胃窦	胃体窦	小弯侧, 胃窦部	球部前后壁
病变处回声	稍低	变化不大或稍低	病变及周围稍低	周围稍低
血流信号	增多	变化不大	周边可增多	不明显
病变相邻壁	略厚	正常	周围可呈隆起状	略厚
胃镜所见	充血、发红 明显不光滑	呈网状或苍白少血管 凹凸不平或不光滑	周围可充血 凹陷、周边可隆起	周围可充血 凹陷、周边可隆起

超声检查和胃镜检查两者能够结合应用, 对胃壁病变的检出率会大大提高.

本研究中采用不含气饮用水进行胃超声检查, 替代了以往口服胃显影剂的方法^[3], 使胃超

声检查更简便, 经济易行, 其诊断的总符合率 82.18%, 值得临床医生重视. 胃超声检查对于临床胃镜检查受限, 或不愿接受胃镜检查的患者, 能够给临床医生提供有价值的疾病信息. 随着

■同行评价

本文较详细的阐述了非肿瘤性胃病的超声图像特点,值得临床医生借鉴。

超声技术的不断提高和操作者的丰富经验,其临床实用价值也得到临床医生的认同。

4 参考文献

- 1 范晓华, 陆文明. 急性胃炎的超声诊断及鉴别诊断. 中国超声诊断杂志 2005; 6: 378-379
- 2 张淑芳. B型超声诊断胃炎的临床价值探讨. 川北医学院学报 2005; 20: 189-190
- 3 李巧萍, 杨菊萍. 超声显像诊断消化性溃疡42例分析. 中华现代影像学杂志 2005; 2: 636-637
- 4 王文元, 齐幼平, 袁韬. 经腹超声检查对胃癌的诊断价

值. 现代实用医学 2006; 18: 631-634

- 5 Segura JM, Oliveira A, Conde P, Erdozain JC, Suárez J. Hydrogastric sonography in the preoperative staging of gastric cancer. *J Clin Ultrasound* 1999; 27: 499-504
- 6 Davies J, Chalmers AG, Sue-Ling HM, May J, Miller GV, Martin IG, Johnston D. Spiral computed tomography and operative staging of gastric carcinoma: a comparison with histopathological staging. *Gut* 1997; 41: 314-319
- 7 张惠萍, 刘燕, 李影, 赵国萍, 陶永康, 方青流. 体表超声在胃癌定量诊断中的应用. 中国超声医学杂志 2002; 18: 25-28

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean $\pm$ SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4 $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq$ 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq$ 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2008-09-08)

胃癌中iNOS与HIF-1 α 表达的相互关系及临床意义

魏 房, 孙 威, 柴 伟, 郭 琳

魏房, 孙威, 柴伟, 郭琳, 中国医科大学附属盛京医院胃肠外科 辽宁省沈阳市 110003

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 20072109

沈阳市自然科学基金资助项目, No. 1071200-1-00

作者贡献分布: 魏房与孙威对此文所作贡献均等; 此课题由魏房、孙威、柴伟及郭琳设计; 研究过程由魏房与郭琳操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由孙威部分提供; 数据分析由柴伟与郭琳完成; 本论文写作由魏房与孙威完成。

通讯作者: 孙威, 110003, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院胃肠外科. sunw@cmu2h.com

电话: 024-83955063

收稿日期: 2008-07-03 修回日期: 2008-07-31

接受日期: 2008-08-04 在线出版日期: 2008-09-08

Relationship between hypoxia-inducible factor-1 α and inducible nitric oxide synthase expression in gastric cancer and its clinical significance

Fang Wei, Wei Sun, Wei Chai, Lin Guo

Fang Wei, Wei Sun, Wei Chai, Lin Guo, Department of Gastrointestinal Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20072109; and the Natural Science Foundation of Shenyang City, No. 1071200-1-00

Correspondence to: Dr. Wei Sun, Department of Gastrointestinal Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110003, Liaoning Province, China. sunw@cmu2h.com

Received: 2008-07-03 Revised: 2008-07-31

Accepted: 2008-08-04 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) as well as their correlation in gastric cancer, and to explore their roles in the genesis, invasion and metastasis of gastric cancer.

METHODS: Immunohistochemical technique was used to detect the expression of iNOS and HIF-1 α in 54 cases of gastric cancer and 15 cases of normal gastric tissues. The relationships between the expression of iNOS, HIF-1 α and tumor angiogenesis, clinical pathologic features of patients were analyzed.

RESULTS: The expression levels of iNOS and

HIF-1 α in gastric cancer were significantly higher than those in the normal gastric tissues (66.67% vs 6.67%, $P < 0.05$; 74.07% vs 0%, $P < 0.01$); iNOS and HIF-1 α expression in gastric cancer were significantly associated with TNM staging, invasive depth and lymph node metastasis ($P < 0.05$ or 0.01). There was a positive correlation between iNOS and HIF-1 α expression ($r = 0.596$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Inducible NOS and HIF-1 α play very important roles in the genesis and development of gastric cancer, and they may serve as markers in the diagnosis of gastric cancer and estimation of prognosis.

Key Words: Inducible nitric oxide synthase; Hypoxia-inducible factor-1 α ; Gastric cancer; Immunohistochemistry

Wei F, Sun W, Chai W, Guo L. Relationship between hypoxia-inducible factor-1 α and inducible nitric oxide synthase expression in gastric cancer and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2895-2899

摘要

目的: 研究诱导型一氧化氮合酶(iNOS)与缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)在胃癌中表达的相互关系, 探讨他们在胃癌的发生发展、浸润和转移中的作用。

方法: 2001-01/2002-03手术切除, 病理证实为腺癌的胃癌标本54例, 患者术前均未行化疗或放疗, 另取正常胃组织15例作对照。应用免疫组化SP法检测胃癌及正常胃组织中iNOS和HIF-1 α 的表达, 光镜下观察iNOS及HIF-1 α 蛋白表达, 分析iNOS与HIF-1 α 的表达关系及临床意义。

结果: 胃癌中iNOS和HIF-1 α 的表达明显高于正常胃组织(66.67% vs 6.67% $P < 0.05$; 74.07% vs 0% $P < 0.01$), 其表达与胃癌TNM分期、肿瘤浸润深度和淋巴结转移显著相关($P < 0.05$ 或 0.01)。胃癌组织中iNOS与HIF-1 α 的表达呈正相关($r = 0.596$, $P < 0.05$)。

■背景资料

iNOS可在大多数肿瘤组织中高表达, 通过产生NO而增加血管的通透性, 加速肿瘤血管的形成, 促进肿瘤的生长和转移, 此外, 过多的iNOS也能抑制肿瘤细胞凋亡。转录因子HIF-1通过与靶基因上的缺氧反应元件(HRE)结合, 可诱导下游靶基因(VEGF)的转录, 从而产生一系列代偿反应, 此外, 他还可以上调多种基因的表达, 如iNOS, 最终影响肿瘤细胞的生长, VEGF和iNOS都是促进血管生成的重要因子, 而HIF-1 α 是缺氧状态下血管生成的核心调控因子。

■同行评议者

葛海燕, 教授, 同济大学附属第十人民医院普通外科; 关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

■研究前沿

寻找一条正确的途径预测胃癌的发生发展并控制浸润与转移,已经成为迫切需要解决的问题。

结论: iNOS和HIF-1 α 在胃癌的发生发展中起重要作用,联合检测可作为判断胃癌恶性程度和预后的指标。

关键词: 缺氧诱导因子-1 α ; 诱导型一氧化氮合酶; 胃癌; 免疫组织化学

魏房, 孙威, 柴伟, 郭琳. 胃癌中iNOS与HIF-1 α 表达的相互关系及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2895-2899
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2895.asp>

0 引言

胃癌是消化系发病率很高的恶性肿瘤之一,且发病率和死亡率呈上升趋势,肿瘤细胞生长的无限性和浸润转移是肿瘤的最重要的特征,是胃癌治疗失败导致死亡的主要原因,而肿瘤细胞生长及浸润转移受多种因子的调控^[1]. 因此寻找一条正确的途径预测胃癌的发生发展并控制浸润与转移,已经成为迫切需要解决的问题. 缺氧是实体肿瘤生长微环境的一个共同特征^[2],缺氧可触发机体产生一系列应急性保护反应,使得肿瘤细胞适应缺氧微环境. 研究表明诱导型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, iNOS)为一种诱生型酶其活性与许多肿瘤的血管生成密切相关. 有研究表明低氧上调iNOS表达, NO在内皮细胞中诱导有丝分裂,在癌细胞中诱导血管内皮生长因子的表达和肿瘤中新生血管的形成,以及肿瘤生长、转移^[3]. 研究表明缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是介导细胞对缺氧微环境进行适应性反应的关键性转录调控因子,可促进肿瘤血管的生成,在肿瘤生长、浸润和转移中起重要作用. 基础和临床研究均表明肿瘤生长依赖于血管形成,肿瘤血管形成是肿瘤生长和转移的基础. 本研究采用免疫组织化学法,检测iNOS、HIF-1 α 在胃癌中的表达,探讨他们与胃癌肿瘤生物学行为的关系及二者之间的相关性,为临床上进一步了解胃癌的生物学行为、判断预后提供帮助.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2002-03手术切除,病理证实为腺癌,临床病理及随访资料齐全的胃癌蜡块标本54例,术前均未行化疗或放疗. 其中男37例,女17例;年龄38-78岁;肿瘤的原发灶大小、深度(T)、淋巴结转移(N)由病理确定,远处转移(M)由病理学和临床确定. 其中肿瘤直径<5 cm 37例,≥5 cm 17例;肿瘤浸润深度在浆膜下者15例,浸透

浆膜者39例;组织学分型:高分化19例,中分化17例,低分化18例;局部淋巴结无转移29例,有转移25例;远隔无转移42例,有转移12例. 根据1997年国际抗癌联盟(IUCC)制定的TNM分期标准进行临床分期, I期12例, II期14例, III期16例, IV 12例. 另取正常胃组织15例作对照,男10例,女5例,年龄44-77岁,标本取自胃溃疡或十二指肠溃疡手术标本中正常的胃组织,并经病理观察证实且排除重度不典型增生. 浓缩型兔抗人iNOS抗体、兔抗人HIF-1 α mAb购于北京中山生物制品有限公司; S-P试剂盒及DAB显色试剂盒购自福州市迈新生物技术开发公司. 免疫组织化学染色所需的常规试剂:枸橼酸盐缓冲液(0.01 mol/L pH6.0)、磷酸氢二钠、氯化钠、二甲苯、乙醇、过氧化氢、苏木素等,普通实验室冰箱、切片刀、烤片机、高压锅、温育箱、湿盒恒温振荡器、Olympus BX41显微镜、显微数码相机 Olympus BX40 F4等,均由中国医科大学附属盛京医院病理科提供.

1.2 方法 常规HE染色,确定标本的组织分化程度. 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶连接(SP)免疫组织化学方法检测iNOS和HIF-1 α 在胃癌及正常胃组织中的表达. 具体操作步骤按常规进行,其一抗工作稀释度分别为1:75和1:50. 用已知阳性的乳腺癌切片作为阳性对照, PBS缓冲液代替一抗作阴性对照.

光镜下以肿瘤细胞胞质内有棕黄色细颗粒为iNOS及HIF-1 α 蛋白表达阳性. 先于低倍镜下观察,排除肿瘤坏死出血区及边缘反应区,高倍镜下(400倍)对每张切片随机选择5个视野,每个视野计数200个细胞,共计1000个. iNOS阳性细胞数<10%为阴性(-),阳性细胞数≥10%为阳性(+). HIF-1 α 阳性细胞数<5%为阴性(-),阳性细胞数≥5%为阳性(+).

统计学处理 采用SPSS13.0软件包进行统计分析. HIF-1 α 、iNOS各指标间的相关性研究采用相关分析. 各检验方法皆以 $P<0.05$ 为差异显著标准.

2 结果

2.1 iNOS免疫组化染色结果 iNOS主要表达于胃癌细胞胞质中,呈颗粒状分布. 巨噬细胞、中性粒细胞等炎性细胞中亦有部分表达,肿瘤坏死区域和肿瘤浸润边缘表达尤为强烈. iNOS在正常胃组织中的阳性表达率为6.67%,显著低于在胃癌中的表达阳性率为66.67%, $P<0.01$. 54

例胃癌中, iNOS在不同组织学分型组中阳性表达率无显著性差异($P>0.05$), 而在无浆膜浸润组与有浆膜浸润组中阳性表达率有显著性差异($P<0.05$), 在无淋巴结转移组与有淋巴结转移组中阳性表达率亦有显著性差异($P<0.05$). iNOS与胃癌的淋巴转移、浸润深度、临床分期显著相关($P<0.05$), 随淋巴转移的产生、浸润深度、临床分期的提高而明显升高. 与患者的性别、年龄、肿瘤大小、组织学分型($P>0.05$, 表1).

2.2 HIF-1 α HIF-1 α 阳性表达的黄色颗粒或棕黄色颗粒见于细胞核及胞质中, 正常胃组织中未见HIF-1 α 的阳性达. 本组54例胃癌患者中(-)14例, (+)40例; 总阳性表达率为74.07%(40/54). HIF-1 α 在胃癌中的表达明显高于胃正常组织, 差别有显著统计学意义($P<0.01$). HIF-1 α 在胃癌TNM I、II和III、IV期的阳性表达率分别为61.5%和85.7%, 两组间比较有统计学差异($P<0.05$); 胃癌浸润深度的不同(浆膜下和浆膜外), HIF-1 α 阳性表达率也明显增加(46.7%、87.6%), 两组间比较显著性差异($P<0.01$); 淋巴结转移组的HIF-1 α 阳性表达率92%, 显著高于淋巴结未转移组58.6%($P<0.05$).

2.3 iNOS与HIF-1 α 在胃癌组织中的表达相互关系 胃癌组织中iNOS与HIF-1 α 的表达呈正相关($r=0.596$, $P<0.05$).

3 讨论

20世纪80年代, 一氧化氮(nitric oxide, NO)才被认识到是人体内的一种具有生物活性的分子. 人体内的NO有两种来源, 一种为非酶生(non-enzymstigenese)即来自于体表或摄入的无机氮的化学降解和转化. 一种为酶生型(enzymstigenese)即由NO合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化合成. 内源性NO是由NOS催化左旋-精氨酸(L-Arg)与氧分子经多步氧化还原反应产生的^[4]. NOS是催化左旋精氨酸转变为NO的关键酶. 与eNOS(内皮型)和nNOS(神经型)不同, iNOS呈诱导性表达, 当细胞接触TNF- α 、LPS等炎症因子后iNOS以Ca²⁺非依赖方式被诱导, 从而促进NO释放. NO对肿瘤的生长具有双重作用, 其促肿瘤作用主要与引起DNA损伤并抑制DNA修复酶、促进野生型P53突变、促进VEGF表达及抑制Caspase酶活性等途径有关^[5]. NO为一种双功能酶, 不仅参与机体多个系统、多种细胞的多种生理作用, 并且也参与多种疾病发生发展的病理过程. NO既有细胞保护功能又具

表1 iNOS和HIF-1 α 在胃癌中的表达与临床病理因素的关系 n (%)

临床病理因素	n	iNOS	HIF-1 α
年龄(岁)			
≤60	41	28(68.29)	31(75.6)
>60	13	8(61.53)	9(69.2)
性别			
男	37	26(64.86)	28(75.7)
女	17	10(58.82)	12(70.6)
肿瘤大小(cm)			
≤5	37	24(64.86)	27(73.0)
>5	17	12(70.59)	13(76.5)
组织学分型			
高分化	19	14(73.68)	12(63.2)
中分化	17	10(58.82)	13(76.5)
低分化	18	12(66.67)	13(72.2)
浸润深度			
浆膜下	15	5(33.33)	7(46.7)
浆膜外	39	31(79.49) ^a	33(84.6)
淋巴结转移			
无	29	15(51.72)	17(58.6)
有	25	21(84.00) ^a	23(92.0) ^a
远隔转移			
无	42	32(76.19)	30(71.4)
有	12	4(33.33) ^a	10(83.3)
TNM分期			
I、II期	26	12(46.15)	16(61.5)
III、IV期	28	24(85.71) ^b	24(85.7)

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

有细胞毒性的双重作用, 其作用方向取决于生成的NO的量.

大量研究表明, iNOS可在大多数肿瘤组织中高表达, 通过产生NO而增加血管的通透性, 加速肿瘤血管的形成, 促进肿瘤的生长和转移, 此外, 过多的iNOS也能抑制肿瘤细胞凋亡. 目前已在多种肿瘤组织中检测到iNOS的表达明显高于正常组织, 例如在胃癌、前列腺癌、肺腺癌、结肠癌、喉癌、咽癌及口腔癌表达均是增加的. 由iNOS催化产生的高浓度的NO则可通过以下作用参与炎症的发展及肿瘤的形成: (1)产生有致癌作用的亚硝胺, 诱发DNA碱基脱氨基和基因突变. (2)过量的NO可引起膜脂质过氧化的细胞毒性作用. (3)NO在VEGF促血管内皮细胞增殖和迁移中起重要作用^[6]. 由iNOS催化合成的大量NO及其衍生物可能在致癌多阶段中起重要作用. 如NO与其代谢产物活性氧类可氧化DNA, 造成链断裂、交叉联结等多种DNA损伤; 或通

■相关报道

近期的研究指出转录因子HIF-1通过与靶基因上的缺氧反应元件(HRE)结合, 可诱导下游靶基因(VEGF)的转录, 从而产生一系列代偿反应, 此外, 他还可以上调多种基因的表达, 如iNOS, 最终影响肿瘤细胞的生长, VEGF和iNOS都是促进血管生成的重要因子, 而HIF-1 α 是缺氧状态下血管生成的核心调控因子.

■应用要点

iNOS和HIF-1 α 在胃癌的发生发展中起重要作用,联合检测可作为判断胃癌恶性程度和预后的指标。

过氧化应激形成过氧化亚硝酸盐造成DNA损伤,从而引起基因突变。此外,过多的iNOS也能抑制肿瘤细胞凋亡^[7]。由于NO在体内的半衰期极短,可通过检测iNOS来间接反映NO的生成。

iNOS参与肿瘤发生发展的机制仍不十分清楚,目前认为可能与下列因素有关:细胞增殖/凋亡失衡,肿瘤新生血管形成,抑制机体对肿瘤细胞的免疫作用等。本实验结果显示:iNOS在胃癌中亦呈高表达状态,与正常胃黏膜组织相比,差异有显著性($P<0.05$),且其表达与胃癌组织学分型无关($P>0.05$),而与胃癌浸润深度、淋巴结转移及临床分期有关($P<0.05$)。结果提示,iNOS可能参与了胃黏膜癌变形成的整个过程,是胃癌发生发展转移中的危险因素之一。

缺氧诱导因子HIF-1是细胞缺氧状态下稳定表达的中心调节因子,可在转录水平调控诸多靶基因的表达,导致细胞对缺氧应激的耐受^[8]。缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是由HIF-1 α 及HIF-1 β 亚单位构成的异二聚体^[9]。每个亚单位均有氨基酸末端的bHLH-PAS结构,他是两个亚单位聚合所必需的结构^[10]。研究表明,HIF-1 α 是唯一的氧调节亚单位,他决定HIF-1的活性^[11]。在非缺氧细胞核和胞质中,可检测到HIF-1 β ,不能检测到HIF-1 α 。细胞缺氧时,HIF-1 β 从胞质转移到核,而HIF-1 α 在核中显著增加。暴露于正常氧浓度,HIF-1 β 重新出现在胞质中,而核中高水平的HIF-1 α 很快降解^[12]。因此,HIF-1 α 对缺氧更具有敏感性。研究表明HIF-1 α 在多数恶性肿瘤组织中都有表达,已有学者证实HIF-1 α 在肝癌、乳腺癌、脑肿瘤等多种肿瘤组织中表达并调节其生物学行为^[13]。在常氧条件下,88%的正常人体组织不表达HIF-1 α ,53%的恶性肿瘤组织表达HIF-1 α ,在相应的良性肿瘤中没有检测到HIF-1 α ^[14],而且HIF-1 α 表达水平与肿瘤患者的预后呈负相关^[15]。当周围环境的氧浓度下降时,HIF-1 α 表达增加,并且其表达增加表现在多个水平上,包括转录和蛋白等水平,但主要是蛋白水平的表达改变^[16]。肿瘤组织生长迅速,必然会处于缺氧状态而诱导HIF-1 α 表达,因此,癌基因的激活及抑癌基因的失活可导致瘤细胞中HIF-1 α 的表达升高及活性的增强。

本组实验中,采用免疫组化的方法对HIF-1 α 进行标志,结果证实HIF-1 α 主要表达于胞核,胞质也有表达,肿瘤坏死明显的区域和肿瘤浸润的边缘HIF-1 α 表达明显增多,周围正常组织及肿瘤间质无HIF-1 α 的表达。这表明HIF-1 α 在

肿瘤的发生、发展中具有重要作用,他不仅调节血管形成,调节众多的下游基因以维持或促进肿瘤的发展,而且他可反馈接受肿瘤生长过程中所产生的因子或缺氧环境上调表达,如此形成恶性循环促进肿瘤生长,调节肿瘤的生物特性。肿瘤细胞快速生长所造成的缺氧环境都可诱导HIF-1 α 的表达,而HIF-1 α 又可调节其下游基因表达而促进血管形成和肿瘤生长^[17]。因此,肿瘤坏死明显的区域和肿瘤浸润的边缘HIF-1 α 表达明显增多。

由近期的研究指出转录因子HIF-1通过与靶基因上的缺氧反应元件(hypoxia resp-onde element, HRE)结合,可诱导下游靶基因(VEGF)的转录,从而产生一系列代偿反应,此外,他还可以上调多种基因的表达,如iNOS,最终影响肿瘤细胞的生长,VEGF和iNOS都是促进血管生成的重要因子,而HIF-1 α 是缺氧状态下血管生成的核心调控因子^[18]。缺氧条件下,瘤细胞内许多基因的转录和表达发生变化,对缺氧作出应激反应,HIF-1 α 水平主要依赖于细胞间的氧供,决定了HIF-1的活性,他通过与靶基因特定序列DNA结合而调控他们的转录。这些基因包括血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR-1)、促红细胞生成素(EPO)、诱导型一氧化氮合酶等。研究认为在肿瘤缺氧条件下HIF-1 α 表达水平增高,诱导iNOS表达,而iNOS催化精氨酸产生的NO则诱导HIF-1 α 表达,形成正反馈环^[19]。我们的研究显示,胃癌组织中iNOS与HIF-1 α 蛋白表达之间存在显著性正相关,这提示:HIF-1 α 可能通过上调iNOS的蛋白表达促进肿瘤血管生成而促进胃癌的转移。同时iNOS催化精氨酸产生的NO也能控制HIF-1 α 的表达,同缺氧一样能增加HIF-1 α 的结合活性和HIF-1 α 蛋白的量。此外,iNOS和HIF-1 α 均可通过刺激VEGF来促进肿瘤新生血管的生成,故我们认为iNOS可能和HIF-1 α 之间存在正反馈的关系。

通过iNOS、HIF-1 α 在胃癌中相互关系的研究,我们发现在胃癌中iNOS、HIF-1 α 表达呈正相关,并且均与肿瘤的TNM分期和淋巴结转移程度有关。HIF-1 α 可能通过上调iNOS的蛋白表达水平促进肿瘤血管生成而促进胃癌的转移。胃癌组织中iNOS、HIF-1 α 表达增高可以作为胃癌浸润、转移的重要判定指标,这些可能为胃癌的早期诊断及临床判断预后提供理论依据。由此我们认为iNOS、HIF-1 α 均在胃癌的发生发展和浸润转移过程中起重要作用,但其作用途

径和形式复杂且相互关联,需要进一步研究其作用机制。

4 参考文献

- 1 吕晓君,毛晓韵,李锦毅,韩琤波,吴东瑛,张淑敏,辛彦.利用组织芯片技术研究COX-2在胃癌中的表达及其与血管生成的关系.世界华人消化杂志 2006; 14: 550-556
- 2 韩冰,徐瑞华,史艳侠,李宇红,骆卉妍,王峰,侯景辉,蔡木炎,姜文奇. HIF-1 α 在胃癌组织中的表达及其临床意义.癌症 2006; 25: 1439-1442
- 3 高举,罗春华.自身免疫性血小板减少性紫癜的发病机制及诊治进展.中国实用儿科杂志 2003; 18: 77-79
- 4 Kinoshita T, Takahashi Y, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T, Yoshimoto T. Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenases 1 and 2 in human colon carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1438: 120-130
- 5 刘莹,朱祖安,费素娟. COX-2 iNOS及VEGF在胃不典型增生胃癌中的表达及其意义.中国肿瘤临床 2005; 32: 428-430
- 6 吴蓉,吴小翎,江丰,吴显才. PTEN、iNOS、COX-2在胃癌中的表达及意义.现代肿瘤医学 2005; 13: 453-456
- 7 陈江,谢勇,周小江. COX-2和iNOS在大肠腺癌中的表达及意义.中国现代医学杂志 2004; 14: 1-4
- 8 Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732
- 9 宗建春. HIF-1的生物学机制及在肿瘤研究中的进展.重庆医学 2004; 33: 780-783
- 10 Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1474-1480
- 11 茅文斌,邵增务. iNOS与HIF-1 α 在骨肉瘤中的表达及其与血管生成的关系.中国骨肿瘤骨病 2006; 5: 210-213
- 12 程春生,贺克俭,吴盛州,吴雪飞,张岷,林木贤,董卫国. HIF-1 α 在胃癌组织中的表达及临床意义.胃肠病学和肝病学杂志 2006; 15: 448-450
- 13 Giatromanolaki A, Harris AL. Tumour hypoxia, hypoxia signaling pathways and hypoxia inducible factor expression in human cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 4317-4324
- 14 Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835
- 15 郭克勤,于如同,高文昌. HIF-1 α 、VEGF表达与脑胶质瘤预后的相关性.徐州医学院学报 2003; 23: 228-232
- 16 孙威,赵滢,郭琳,王强. 胃癌中HIF-1 α 与Cox-2表达的相互关系及临床病理意义.现代肿瘤医学 2008; 16: 600-603
- 17 Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C947-C970
- 18 Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9: 677-684
- 19 樊利芳,夏东,江从庆,刁路明,钱群,刘志苏. HIF-1 α 和iNOS在大肠癌组织血管形成中的作用.实用癌症杂志 2004; 19: 265-267

■同行评价

本文具有科研和临床实用价值,研究设计合理,结论可信,为临床进一步了解胃癌生物学行为和判断预后提供了帮助。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码.如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊:序号,作者(列出全体作者).文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页.(常务副总编辑:张海宁 2008-09-08)

开腹与腹腔镜胆囊切除处理Mirizzi综合征的比较

王宏, 李军成, 罗建管, 易旭华

■背景资料

随着腹腔镜胆囊切除术在外科领域的广泛应用和发展, 对Mirizzi综合征在腹腔镜胆囊切除术术前、术中和术后的认识已受到越来越多外科医师的重视。

王宏, 罗建管, 易旭华, 湖南省浏阳市人民医院肝胆外科 湖南省浏阳市 410300

李军成, 苏州大学附属第二医院普外科 江苏省苏州市 215004

作者贡献分布: 王宏与李军成对此文所作贡献均等; 此课题由王宏与李军成设计; 研究过程由王宏、李军成、罗建管和易旭华操作完成; 数据分析由王宏完成; 本论文写作由王宏、李军成、罗建管及易旭华完成。

通讯作者: 王宏, 410300, 湖南省浏阳市, 湖南省浏阳市人民医院肝胆外科。wanghong810112@tom.com

收稿日期: 2008-06-06 修回日期: 2008-07-15

接受日期: 2008-07-21 在线出版日期: 2008-09-08

Comparision between conventional cholecystectomy and laparoscopic cholecystectomy in treatment of Mirizzi's syndrome

Hong Wang, Jun-Cheng Li, Jiang-Guan Luo, Xu-Hua Yi

Hong Wang, Jiang-Guan Luo, Xu-Hua Yi, Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Liuyang City, Liuyang 410300, Hunan Province, China

Jun-Cheng Li, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hong Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Liuyang City, Liuyang 410300, Hunan Province, China. wanghong810112@tom.com

Received: 2008-06-06 Revised: 2008-07-15

Accepted: 2008-07-21 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To compare advantages and disadvantages between conventional cholecystectomy and laparoscopic cholecystectomy in the treatment of Mirizzi's syndrome.

METHODS: Thirty-four cases of Mirizzi's syndrome were selected from patients with cholelithiasis and acute or chronic cholecystitis in our hospital from January 2002 to January 2006. The operating time, post-operative hospital stay and complications were compared between conventional cholecystectomy and laparoscopic cholecystectomy in treatment of Mirizzi's syndrome; meanwhile, we analyzed the relations of pre-operative ultrasonography and liver function with the diagnosis of Mirizzi's syndrome.

RESULTS: The operating time was not significantly different between conventional cholecystectomy and laparoscopic cholecystectomy, but the post-operative hospital stay after laparoscopic surgery was shorter than that after open cholecystectomy for type I Mirizzi syndrome (4.57 d vs 9.33 d, $P < 0.01$). There were no complications in both therapies. The gallstone impaction in the cystic duct or gallbladder neck by pre-operative ultrasonography and liver dysfunction had close relations with the diagnosis of Mirizzi's syndrome ($P < 0.001$).

CONCLUSION: Laparoscopic cholecystectomy may shorten the post-operative hospital stay in treating type I Mirizzi's syndrome, and pre-operative ultrasonography is very helpful for the diagnosis of Mirizzi's syndrome.

Key Words: Cholelithiasis; Cholecystectomy; Laparoscope; Mirizzi's syndrome

Wang H, Li JC, Luo JG, Yi XH. Comparision between conventional cholecystectomy and laparoscopic cholecystectomy in treatment of Mirizzi's syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2900-2902

摘要

目的: 比较开腹与腹腔镜胆囊切除术处理Mirizzi综合征的利弊。

方法: 对2002-01/2006-01收住我院胆囊结石、急慢性胆囊炎患者中的34例Mirizzi综合征进行回顾性分析。比较开腹与腹腔镜胆囊切除术处理Mirizzi综合征的手术时间、术后住院天数和术后并发症; 分析术前B超和肝功能检查与Mirizzi综合征的关系。

结果: I型Mirizzi综合征腹腔镜手术时间与开腹手术比较无明显差异, 术后住院天数短于开腹手术(9.33 d vs 4.57 d, $P < 0.01$), 两组均未出现并发症。术前B超发现胆囊颈管结石嵌顿伴肝总管扩张和肝功能异常者与Mirizzi综合征密切相关($P < 0.001$)。

结论: 腹腔镜胆囊切除处理 I 型Mirizzi综

■同行评议者

沈柏用, 副教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

合征可缩短术后住院天数.术前B超可提高Mirizzi综合征的诊断率.

关键词: 胆囊结石; 胆囊切除; 腹腔镜; Mirizzi综合征

王宏, 李军成, 罗建管, 易旭华. 开腹与腹腔镜胆囊切除处理Mirizzi综合征的比较. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2900-2902
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2900.asp>

0 引言

Mirizzi综合征是胆囊结石所继发的一种不太常见的并发症, 手术治疗容易发生胆管损伤. Rust *et al*^[1]曾认为其是腹腔镜胆囊切除的绝对禁忌证, 但近年来随着腹腔镜技术的发展, 对Mirizzi综合征患者行腹腔镜胆囊切除术的报告日见增多. 为比较传统开腹胆囊切除术与腹腔镜胆囊切除术对Mirizzi综合征处理的利弊, 我们就2002-01/2005-12收住我院行手术治疗的胆囊结石、急慢性胆囊炎中的Mirizzi综合征作一回顾性分析, 报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-01/2005-12手术治疗Mirizzi综合征34例. 除1例为术前MRCP检查明确诊断外, 33例均为术中探查所证实.

1.2 方法 腹腔镜胆囊切除均由同组医生担任手术者, 开腹胆囊切除均由经验丰富的高年资医生担任手术者. 开腹胆囊切除处理Mirizzi综合征共18例, 男13例, 女5例, 平均年龄47.1岁, 其中I型13例, II型2例, III型2例, IV型1例; 腹腔镜胆囊切除处理Mirizzi综合征共10例, 男4例, 女6例, 平均年龄49.1岁, 其中I型9例, II型1例; 腹腔镜中转开腹共6例, 男3例, 女3例, 平均年龄50.7岁, 其中I型2例, II型4例.

2 结果

对开腹与腹腔镜胆囊切除处理22例I型Mirizzi综合征进行比较, 其平均手术时间为1.97 h vs 1.42 h ($P>0.05$, $t=1.4659$), 术后住院天数9.33 d vs 4.57 d ($P<0.01$, $t=2.9078$). 两组均无一例出现术后并发症.

对本组34例Mirizzi综合征均行B超和肝功能检查. 27例B超发现有胆囊颈管结石嵌顿或肝总管扩张, 这27例中肝功能异常者24例, 3例无异常. 7例B超仅发现胆囊结石、胆囊炎, 无胆囊颈管结石嵌顿或肝总管扩张, 7例中2例肝功能异常, 5例正常. 采用Fisher确切概率法进行统计



图1 Mirizzi综合征MRCP观.

学分析, 以分析术前B超检查和肝功能异常与Mirizzi综合征的关系, 发现 $P=0.0001368<0.001$, 这表明术前B超发现胆囊颈管结石嵌顿伴肝总管扩张和肝功能异常可帮助提高Mirizzi综合征的诊断率.

本组1例患者术前出现黄疸, 行MRCP检查, 发现肝总管有压迹, 压迹上方胆管轻度扩张, 诊断为Mirizzi综合征I型(图1). 经手术探查证实.

3 讨论

对Mirizzi综合征的认识是一个逐步加深的过程. Kehr首先描述了这类疾病, 认为是由于胆囊管结石导致胆囊颈和肝十二指肠韧带炎症压迫肝总管所致. 1948年, Mirizzi首先提出是由于肝管中生理性的括约肌存在导致胆汁郁滞和胆管炎而引起的“功能性肝脏综合征”, 后来他又发现胆囊管结石也是造成这类综合征的原因之一. 现在认为, Mirizzi综合征是因为胆囊管或胆囊颈部结石压迫肝总管所致. 1982年McSherry *et al*根据炎症的程度将Mirizzi综合征分成二型, I型是胆囊结石压迫邻近肝总管但未形成瘘, 而II型则是结石压迫胆囊管与肝总管间隔造成坏死而形成瘘. 后来, Csendes *et al*进一步将Mirizzi分成四型, I型是结石单纯压迫肝总管, II型是结石压迫形成瘘不超过胆总管周径的1/3, III型是瘘口不超过胆总管周径2/3, IV型是压迫导致胆总管壁的完全破坏. 目前, Csendes分型比较公认^[2].

为了保证手术的安全性, 不管是传统开腹胆囊切除还是腹腔镜胆囊切除, 术前确诊是非常重要的. Kok *et al*^[3]通过术前ERCP确诊为Mirizzi综合征6例患者, 5例成功地进行了腹腔镜胆囊切除. 无创检查MRCP可以为Mirizzi综合征的术前诊断提供了有助于手术的指导信息. 我们在对B超检查胆囊颈管结石嵌顿有无肝总管扩张以及肝功能有无异常进行了统计分析, 发

■ 相关报道

Paul及Meng *et al*就曾报道腹腔镜治疗I型Mirizzi综合征. Binnie *et al*报道腹腔镜治疗II型Mirizzi综合征.

■ 应用要点

本文为临床上腹腔镜处理Mirizzi综合征提供了一定的实践和理论依据, 并比较了开腹与腹腔镜处理Mirizzi综合征的优劣, 对临床上处理此类疾病有一定的借鉴意义.

■同行评价

本文选题较好, 临床资料全面, 统计方法恰当, 结论可靠, 有一定的临床实用价值, 若能添加手术技巧, 术中图片, 并对手术结果进行详细讨论, 则不失为一篇具有较好临床实用价值的短篇论文。

现 $P<0.001$, 这表明术前B超如发现胆囊颈管结石嵌顿或有肝总管扩张, 同时有肝功能异常, 诊断Mirizzi综合征的可能性较大。我们认为, 对于没有黄疸病史, 肝功能亦无胆红素增高及肝酶增高, 但B超发现胆囊管或胆囊颈部有嵌顿结石的患者, 术前MRCP或ERCP显得并不十分重要。但对于有黄疸病史, 肝功能检查胆红素升高或肝酶升高, 同时B超发现胆囊颈管有嵌顿结石或肝总管有扩张的患者, 术前最好能进行MRCP或ERCP检查。本组术前明确诊断的1例即是出现黄疸后进行了MRCP检查, 从而发现了I型Mirizzi综合征。术前明确诊断能为手术方式的选择做好准备, 这样就能最大限度地保证手术的安全性, 减少手术后并发症的发生。

开腹胆囊切除对Mirizzi综合征的处理主要根据分型而定。Lester *et al*认为I型可取出结石, 不能完整切除胆囊者行胆囊部分切除术, 无肝总管狭窄者不必放置T管。II型和III型, 可在瘘口处放置T管, 作胆囊切除或胆囊部分切除, 但有人认为放置T管易发生胆瘘, 应在瘘口下放置T管, 用残余的胆囊壁和胆囊管修补瘘口。IV型行胆肠吻合是最佳选择^[4-5]。术中胆道造影和胆道镜检查可以排除肝总管狭窄或肝总管、胆总管结石的可能。本组I型患者肝管受压较轻且术前胆红素不高者, 一般不放置T管。肝管受压较重且术前胆红素升高者, 最好放置T管, 以免引起术后胆瘘或胆总管狭窄。对于II型患者, 利用肝十二指肠韧带或大网膜修补瘘口, 常规放置T管。对于III、IV型患者如果瘘口不能修补, 则行胆总管-空肠Roux-en-Y吻合。

20世纪90年代即有腹腔镜胆囊切除治疗Mirizzi综合征的报告。Paul *et al*^[6]及Meng *et al*^[7]就曾报道腹腔镜治疗I型Mirizzi综合征。Binnie *et al*^[8]报道腹腔镜治疗II型Mirizzi综合征。随着超声内镜、碎石和介入技术等以及腹腔镜本身技术的发展, 使得腹腔镜下处理Mirizzi综合征的方法更多, 因此, 已有更多的学者不再认为

Mirizzi综合征是腹腔镜胆囊切除的绝对禁忌症。

Mirizzi综合征主要见于45-50岁, I型占70.6%。腹腔镜胆囊切除在I型Mirizzi综合征大多能顺利完成(9例/11例), 表明Mirizzi综合征I型是腹腔镜手术的手术指征。而II型只进行了1例, 发现腹腔镜处理II型Mirizzi综合征较为困难, 手术操作复杂, 目前仍需谨慎施行。建议对于术前已确诊为Mirizzi综合征II型和目前腹腔镜手术难以完成III、IV型的患者, 仍首选开腹手术。这样既能保证手术安全、操作顺利, 又尽可能地减少了术后并发症的发生。

腹腔镜胆囊切除与开腹胆囊切除处理I型Mirizzi综合征比较可见手术时间 $P>0.05$; 术后住院天数 $P<0.01$, 表明腹腔镜手术可缩短住院时间。两种手术方式均未有并发症发生。说明腹腔镜手术只要掌握指征恰当也是安全可行的。

4 参考文献

- 1 Rust KR, Clancy TV, Warren G, Mertesdorf J, Maxwell JG. Mirizzi's syndrome: a contraindication to coelioscopic cholecystectomy. *J Laparoendosc Surg* 1991; 1: 133-137
- 2 Csendes A, Diaz JC, Burdiles P, Maluenda F, Nava O. Mirizzi syndrome and cholecystobiliary fistula: a unifying classification. *Br J Surg* 1989; 76: 1139-1143
- 3 Kok KY, Goh PY, Ngoi SS. Management of Mirizzi's syndrome in the laparoscopic era. *Surg Endosc* 1998; 12: 1242-1244
- 4 Johnson LW, Sehon JK, Lee WC, Zibari GB, McDonald JC. Mirizzi's syndrome: experience from a multi-institutional review. *Am Surg* 2001; 67: 11-14
- 5 刘新连, 陈炜, 郭化鑫, 宋宣, 刘冰, 武林枫, 张伟辉, 姜洪池. Mirizzi综合征的诊治分析38例. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2048-2049
- 6 Paul MG, Burris DG, McGuire AM, Thorfinnson HD, Schonekas H. Laparoscopic surgery in the treatment of Mirizzi's syndrome. *J Laparoendosc Surg* 1992; 2: 157-163
- 7 Meng WC, Kwok SP, Kelly SB, Lau WY, Li AK. Management of Mirizzi syndrome by laparoscopic cholecystectomy and laparoscopic ultrasonography. *Br J Surg* 1995; 82: 396
- 8 Binnie NR, Nixon SJ, Palmer KR. Mirizzi syndrome managed by endoscopic stenting and laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg* 1992; 79: 647

编辑 李军亮 电编 郭海丽

成人粪石性急性小肠梗阻患者的早期诊治15例

陈庆永, 方志, 王春友

陈庆永, 方志, 华中科技大学同济医学院附属协和医院急诊外科 湖北省武汉市 430022

王春友, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 此课题由方志、陈庆永及王春友设计; 研究过程由方志与陈庆永共同完成; 数据分析、论文写作由陈庆永完成。

通讯作者: 陈庆永, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院急诊外科. chenqy68@yahoo.com.cn
电话: 027-62885623

收稿日期: 2008-06-18 修回日期: 2008-07-25

接受日期: 2008-07-29 在线出版日期: 2008-09-08

Early diagnosis and management of acute small intestinal obstruction due to bezoars in adults: an analysis of 15 cases

Qing-Yong Chen, Zhi Fang, Chun-You Wang

Qing-Yong Chen, Zhi Fang, Department of Emergency Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Chun-You Wang, Department of General Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Qing-Yong Chen, Department of Emergency Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. chenqy68@yahoo.com.cn

Received: 2008-06-18 Revised: 2008-07-25

Accepted: 2008-07-29 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To present our experiences in treating acute small intestinal obstruction due to bezoars (ASIOB) in adults without a history of gastric surgery.

METHODS: Fifteen adult ASIOB patients without a history of gastric surgery were treated in our hospital from April 2003 to April 2008. Abdominal X-ray and computed tomography (CT) scan were performed in all the patients, and conservative treatment was firstly used. Two old patients who could not endure operation were treated with foaming agent or cellulose. Laparotomy was performed in 11 of 15 cases as conservative treatment was not effective after 3 days. Another 2 cases were treated by laparoscopic operation.

RESULTS: Abdominal X-ray and CT scan showed air-fluid levels and presence of intraluminal hyperdense "stones", respectively. In 12 patients, bezoars were localized in the ileum, and in the rest 3 patients, they were found in the jejunum. The mean short-axis and long-axis diameters of the bezoars were 3.4 cm and 5.1 cm, respectively. Single bezoar was observed in 11 (73.3%) patients, and multiple bezoars were found in 4 (36.7%) cases. All of the 15 patients were cured without complications.

CONCLUSION: Bezoars-induced small bowel obstruction frequently occurs in distal jejunum and ileum in adults. Laparoscopic operation is safe and effective in treating this disease with advantages of shorter hospital stay and lighter pain.

Key Words: Bezoars; Intestinal obstruction; Laparoscopy; Diagnosis; Treatment

Chen QY, Fang Z, Wang CY. Early diagnosis and management of acute small intestinal obstruction due to bezoars in adults: an analysis of 15 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2903-2905

摘要

目的: 总结无胃手术史成人粪石性急性机械性小肠梗阻患者15例诊治经验。

方法: 2003-04/2008-04我院共收治成人粪石性急性机械性小肠梗阻患者15例, 均无胃大部切除术史。所有患者行腹部平片检查和腹部CT扫描, 并先予以保守治疗, 2例老年人不能耐受手术, 以内服发泡剂或纤维素酶治疗后缓解; 保守治疗3 d后若肠梗阻症状无好转或逐渐加重后行手术治疗, 11例行剖腹探查, 2例行腹腔镜手术。

结果: 腹部平片检查均有大小不等的气液平面。腹部CT扫描均显示有肠内高密度粪石影。12例患者的粪石位于回肠, 3例位于空肠。粪石的平均短轴直径是3.4 cm, 平均长轴直径是5.1 cm。11例为单发粪石, 占73.3%, 4例为多发粪石, 占36.7%。患者全部治愈, 无并发症。

结论: 粪石性小肠梗阻多发于远端空肠和回

■背景资料

粪石性肠梗阻是小肠梗阻值得注意的原因之一, 发生率约占小肠梗阻的4%, 并且准确的术前诊断困难, 通常发生在有胃手术史的患者如胃空肠吻合术或胃迷走神经切断术, 或者有胃肠运动功能不良的患者。本文通过临床病例分析探讨无胃大部切除术后成人粪石性急性机械性小肠梗阻的诊治要点。

■同行评议者

杨维良, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外四科; 张宗明, 教授, 清华大学第一附属医院消化医学中心

■研发前沿

粪石是肠梗阻中一种很少见的原因,发病机制独特,并且准确的术前诊断困难,早期诊断及治疗方法均有其特殊性。

肠,腹腔镜手术较传统开腹手术具有住院时间短、疼痛轻的优势。

关键词: 粪石; 肠梗阻; 腹腔镜; 诊断; 治疗

陈庆永, 方志, 王春友. 成人粪石性急性小肠梗阻患者的早期诊治15例. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2903-2905

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2903.asp>

0 引言

小肠梗阻是普外科急腹症中常遇见的腹部问题,而粪石是肠梗阻中一种很少见的原因,并且准确的术前诊断困难,粪石性肠梗阻的发生率约占小肠梗阻的4%^[1].粪石性肠梗阻是小肠梗阻值得注意的原因之一,通常发生在有胃手术史的患者如胃空肠吻合术或胃迷走神经切断术,或者有胃肠运动功能不良的患者^[2-3].近年来粪石性肠梗阻的发病率有呈逐年上升的趋势,多数学者认为该病好发于胃大部切除术后患者^[4].我院2003-04/2008-04共收治15例成人粪石性急性机械性小肠梗阻患者,均无胃大部切除术史.鉴于其独特的发病背景及诊治原则,我们将我院收治的15例成人粪石性急性机械性小肠梗阻患者的诊治体会报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003-04/2008-04共收治成人粪石性急性机械性小肠梗阻患者15例.男9例,女6例,年龄18-72(平均44.5)岁.发病前有明确进食柿子者5例,有明确胃石史者1例,3例患者伴有糖尿病.均无胃大部切除术史.发病前食用柿子的数量,少者4-5枚,多者有26-30枚.食后至发病时间不等,短多为6-12 h,长的有2-5 mo左右.15例患者均有腹痛、呕吐等低位小肠梗阻症状.多数患者经保守治疗后可好转,进食后又出现梗阻或有不全性肠梗阻的表现.入院时发病最短者6 h,最长者达5 mo.

1.2 方法 腹部平片检查均有大小不等的气液平面.腹部CT扫描均显示有肠内高密度粪石影.15例患者均行腹部CT检查,10例发现有一种明确的,内部成分不一的团块被气泡包裹着.15例患者根据临床表现及辅助检查,均明确诊断肠梗阻或不全性肠梗阻.先均予以胃肠减压、抗炎补液、普通灌肠等保守治疗,2例采用以发泡剂或纤维素酶(一种水解酶)为主中西药结合普通灌肠等非手术疗法而缓解,手术治疗的适应症:保守治疗3 d后若肠梗阻症状逐渐加重,或经保守治疗后腹痛、腹胀逐渐好转,但进食后又出

现肠梗阻;治疗后立位腹部平片复查仍有大小不等的气液平面较入院时无明显改善或加重者;腹部CT扫描显示有肠内高密度“粪石”影等.13例采用手术治疗(其中2例行腹腔镜手术取石):术中见腹腔有不同程度的黄色渗液,小肠梗阻部位为卵圆形团块,呈“瓶塞状”阻塞,梗阻近端肠管明显扩张、充血、水肿,远端空虚,未见肠管坏死.手术方式:11例切开肠管取出粪石(其中多发粪石4例,多位于回肠及横结肠或胃,同时采用的治疗方法有:伴发的小肠内粪石较软用手指将粪石捏碎,将粪石推入结肠;伴发的回肠内粪石切开取石;横结肠内粪石挤入直肠;胃内结石切开取石等),2例行腹腔镜手术取石。

2 结果

11例行剖腹探查,2例行腹腔镜手术,2例以内服发泡剂或纤维素酶(一种水解酶)治疗,患者全部治愈,无并发症.12例患者的粪石位于回肠,3例位于空肠.粪石最大6.5 cm×6 cm×5 cm,最小3.0 cm×2.5 cm×2.5 cm,粪石的平均短轴直径是3.4(范围是2.5-5.4) cm,平均长轴直径是5.1(范围是3-6.5) cm.11例为单发粪石,占73.3%;4例为多发粪石,占36.7%。

3 讨论

粪石性小肠梗阻罕见,但是是小肠梗阻值得注意的原因之一.引起肠梗阻的肠石可分3种:即真性肠石、药性肠石和混合性肠石(也称植物毛粪石),其中以植物性粪石较多见,其中以生柿子、黑枣类和山楂多见,少见的有石花菜、芒果等.植物性粪石多与进食生柿子或生山渣、黑枣过多有关,混合性肠石(也称植物毛粪石)多有异嗜癖症如进食毛发等癖好,无胃手术病史粪石性小肠梗阻则可能与老年患者或有糖尿病患者胃肠排空功能不良有关,本组有3例患者有糖尿病,无进食柿子或毛发等病史,但却形成了粪石性肠梗阻,多与糖尿病患者存在自主神经病变致胃肠排空功能不良有关.本组病例中有5例是有明确的进食柿子史.由各种植物的果核、果皮或纤维等形成的胃肠道植物性粪石所致肠梗阻,国内外均有文献报道.其中Krausz *et al*^[5]报告均为柿子所致.国内李洪 *et al*^[6]报告22例则由山楂造成.最近研究还表明,粪石性小肠梗阻还与维生素B12缺乏密切相关^[7].形成粪石的主要原因为该类食物含有鞣酸,遇胃酸后形成胶状物质,与蛋白质结合成为不溶于水的鞣酸蛋白,

■相关报道

近年来粪石性肠梗阻的发病率有呈逐年上升的趋势,多数学者认为该病好发于胃大部切除术后患者。

再有未消化的果皮、果核、其他植物纤维等,即凝集成块状粪石.因此很容易在胃肠道形成粪石.

粪石是肠梗阻很少见的原因,并且准确的术前诊断困难,临床有急性肠梗阻表现,腹部平片可见小肠扩张及气液平表现.腹部X线和CT扫描显示有液平和肠内高密度粪石影,本组患者均行腹部平片检查和术前腹部CT平扫,X线可见小肠扩张及气液平表现;15例术前腹部CT平扫发现,10例有肠内高密度粪石影,CT诊断粪石性肠梗阻的正确率达66.7%.有研究报道,术前腹部CT平扫揭示了一种明确的,内部成分不一的团块被气泡包裹着,CT诊断粪石性肠梗阻的特异性和敏感性分别为97%和100%^[8],CT对诊断粪石性肠梗阻是有用的^[9].因此,本病根据病史、临床表现及腹部X线和CT扫描,早期诊断多无困难.如了解到患者有进食生柿子或生山渣、黑枣等病史,更有利于本病的确诊.

本组13例行手术治疗(11例行剖腹探查,2例行腹腔镜手术):术中见腹腔有不同程度的黄色渗液,小肠梗阻部位为卵圆形团块,呈“瓶塞状”阻塞,梗阻近端肠管明显扩张、充血、水肿,远端空虚,未见肠管坏死.手术方式:11例有包括肠切开取石术或肠外捏碎粪石挤入结肠,2例行腹腔镜手术.11例为单发粪石,占73.3%;4例为多发粪石,占36.7%,多位于回肠及横结肠或胃,将回肠内粪石肠切开取出,横结肠内粪石挤入直肠,胃内结石切开取石.另外2例老年人并患有糖尿病,心脏病等多种内科疾病并不能耐受手术,以内服发泡剂或纤维素酶(一种水解酶)治疗后缓解.术中要全面探查,要想到胃、肠多发性粪石的可能.本组有4例除小肠粪石梗阻部位外,在胃或横结肠内亦有多发粪石存在,采取切开肠管取出粪石,并同时行肠内减压,术中并切开胃壁取出或将结石挤入结肠.另外,我们有1例患者行肠切开取石术后5 d再发肠梗阻,再次手术探查发现残留粪石继发小肠梗阻,教训深刻.因此术中应仔细探查,以免粪石残留再次继发小肠梗阻.对于肠切开取石术,我们的治疗体会是:(1)左下腹疼痛并有压痛,多为空肠或结肠粪石;右下腹疼痛并有压痛,多为回肠粪石;(2)粪石形状不规则或多边形,可能同时有多个粪石存在;(3)经保守治疗后可好转,进食后又出现梗阻;(4)粪石多发于回肠,肠切开取石时要将粪石推到近端肠管扩张,血运较好的肠管处取石,发生肠瘘的几率大为减少,我们运用此法取石无一例发生肠瘘.(5)同时检查整个消化道,以

免遗漏粪石,特别是胃和十二指肠.2例行腹腔镜手术取石成功.最新研究表明,腹腔镜手术治疗粪石性肠梗阻是安全并且是可行的.是有效的治疗粪石性肠梗阻的方法之一,与传统的开腹手术相比,具有手术时间短、手术后并发症少及住院时间短等优势^[10-11],必要时可行腹腔镜辅助有限腹部切口行肠切开术并移走梗阻的粪石^[12].2例采用以发泡剂溶解胃石或纤维素酶(一种水解酶)为主结合禁食、胃肠减压、普通灌肠及输液纠正水电解质平衡紊乱等非手术疗法而完全缓解.我们认为粪石性肠梗阻早期,对老年人或患有糖尿病的患者不能耐受手术者,可在严密观察下并严格掌握适应症,应用以发泡剂为主或纤维素酶(一种水解酶)等非手术疗法能减少手术率.

4 参考文献

- 1 Ho TW, Koh DC. Small-bowel obstruction secondary to bezoar impaction: a diagnostic dilemma. *World J Surg* 2007; 31: 1072-1078; discussion 1079-1080
- 2 Bitton A, Keagle JN, Varma MG. Small bowel bezoar in a patient with Noonan syndrome: report of a case. *MedGenMed* 2007; 9: 34
- 3 Aytaç B, Cakar S. Bezoar: an uncommon cause of intestinal obstruction. *Acta Gastroenterol Belg* 2001; 64: 295-297
- 4 孙忠义, 侯宝华, 施超, 亢福, 范亦明, 宋宝琴, 吴功侃, 安卫德, 卿三华, 张刚庆, 彭明, 卢丽, 李岩, 张振秋. 植物粪石性急性小肠梗阻52例分析. *中国实用外科杂志* 1999; 19: 164-165
- 5 Krausz MM, Moriel EZ, Ayalon A, Pode D, Durst AL. Surgical aspects of gastrointestinal persimmon phytobezoar treatment. *Am J Surg* 1986; 152: 526-530
- 6 李洪, 蒋永康. 山楂食物团性肠梗阻22例报告. *实用外科杂志* 1992; 12: 439
- 7 Koktener A, Dilmen G, Turkay C, Erbayrak M. Small bowel obstruction caused by phytobezoar and associated with vitamin B12 deficiency. *South Med J* 2006; 99: 1013-1014
- 8 Liou CH, Yu CY, Lin CC, Chao YC, Liou YC, Juan CJ, Chen CY. CT diagnosis of small bowel obstruction due to phytobezoar. *J Formos Med Assoc* 2003; 102: 620-624
- 9 Haga N, Chikamori M, Kitamura T, Shiomi S, Kitagawa H, Mizusima S, Fujisawa T, Kuwano H. Obstruction due to persimmon bezoars: computed tomography detection. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1069-1071
- 10 Yau KK, Siu WT, Law BK, Cheung HY, Ha JP, Li MK. Laparoscopic approach compared with conventional open approach for bezoar-induced small-bowel obstruction. *Arch Surg* 2005; 140: 972-975
- 11 Kan JY, Huang TJ, Heish JS. Laparoscopy-assisted management of jejunal bezoar obstruction. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2005; 15: 297-298
- 12 Ganpathi IS, Cheah WK. Laparoscopic-assisted management of small bowel obstruction due to phytobezoar. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2005; 15: 30-32

■同行评价

本研究治疗方法和结果有临床参考意义,实用性较强,但学术价值一般.

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹志成 院士

香港伊丽莎白医院临床肿瘤部、肿瘤科研部

迟宝荣 教授

吉林大学第一医院消化内科

党双锁 副教授

西安交通大学第二医院感染科

樊晓明 主任医师

复旦大学附属金山医院消化科

高春芳 研究员

中国人民解放军第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

高英堂 研究员

天津市第三中心医院天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

巩鹏 教授

大连医科大学附属第一医院普外二科

郭晓钟 教授

中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

洪天配 教授

北京大学第三医院内分泌科

黄恒青 主任医师

福建省第二人民医院消化内科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

刘改芳 主任医师

河北医科大学第三医院消化内科

刘连新 教授

哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

谭学瑞 教授

汕头医学院第一附属医院院长室

唐文富 副主任医师

四川大学华西医院中西医结合科

王蒙 副教授

中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

王志刚 副主任医师

上海市第六人民医院普外科

魏经国 教授

中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科

吴建国 教授

武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室

吴君 主任医师

贵州省贵阳医学院附属医院感染科

吴泰璜 教授

山东省立医院肝胆外科

肖恩华 教授

中南大学湘雅二医院放射教研室

姚登福 教授

南通大学附属医院分子医学中心

殷正丰 教授

中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院

袁友红 副教授

湖南省人民医院科研部(科)(放射与介入)

张继明 教授

复旦大学附属华山医院肝炎研究室

张小晋 主任医师

北京积水潭医院消化内科

张学 教授

中国协和医科大学基础医学院医学遗传学系

张宗明 教授

清华大学第一附属医院消化医学中心