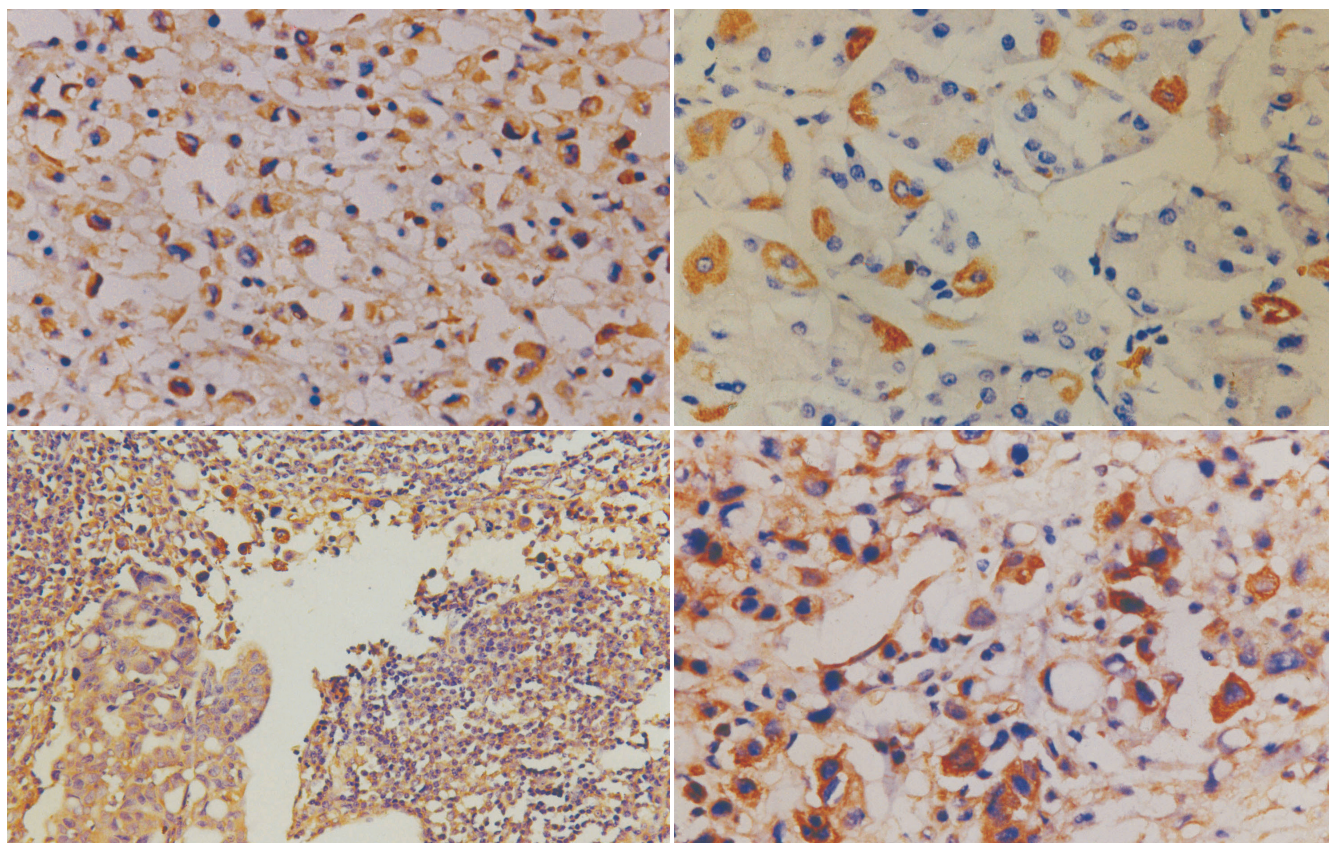


世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 9 月 15 日 第 13 卷 第 17 期 (Volume 13 Number 17)



17 / 2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2003-01-15/2005-12-15

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
樊代明教授
黄象谦教授
黄志强教授
刘耕陶教授
刘锴教授
裘法祖教授
汤钊猷教授
王宝恩教授
危北海教授
吴孟超教授
吴咸中教授
杨春波教授
张金哲教授
张学庸教授
赵东海教授
周殿元教授

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

编委

蔡淦教授
蔡威教授
陈海龙教授
陈红松副研究员
陈家春教授
陈立波副教授
陈仕珠主任医师
陈蔚文教授
陈耀凯副教授
陈祖林副教授
程明亮教授

程英升副主任医师

崔云甫教授

戴冬秋教授

旦增副主任医师

董蕾教授

房静远教授

冯志华副教授

高春芳教授

高毅教授

谷俊朝副教授

郭新宁教授

韩天权教授

韩泽广研究员

郝俊鸣副主任医师

何振娟副主任医师

和水祥副教授

洪天配教授

侯晓华教授

胡以平教授

黄恒青副主任医师

冀振华副主任医师

江学良副主任医师

匡安仁教授

来茂德教授

兰林副教授

劳绍贤教授

冷希圣教授

李伯安教授

李朝品教授

李定国教授

李东辉副研究员

李恩民副教授

李国威教授

李靖副教授

李兰娟教授

李岩教授

李增山副教授

李兆申教授

李宗芳教授

梁萍教授

林菊生教授

林勇讲师

刘军讲师

刘莉讲师

刘连新教授

刘平教授

刘杞教授

刘银坤教授

刘正稳教授

龙致贤教授

卢绮萍主任医师

陆才德教授

吕宾主任医师

吕宁主任医师

吕毅教授

罗和生教授

马春红副教授

茅爱武主任医师

梅林教授

南极星副教授

聂青和副教授

宁琴教授

牛建昭教授

潘林娜教授

潘兴华副主任医师

潘秀珍教授

彭吉润副教授

彭淑牖教授

彭心宇教授

戚中田教授

钱会南副教授

钱建民教授

秦环龙副教授

秦仁义教授

邱赛红研究员

邱双健副教授

任建林副教授

邵成浩讲师

石统东副教授

石雪迎讲师

司富春教授

宋振顺教授

苏鲁主任医师

孙秀发教授

孙志伟副研究员

谭学瑞主任医师

唐承薇教授

屠红副研究员

王吉耀教授

王鲁副主任医师

王明荣教授

王庆国教授

王维教授

王小众教授

王兴鹏教授

王学浩教授

王振军教授

魏来教授

沃健儿副研究员

吴开春教授

吴梧桐教授

吴育连教授

向德兵讲师

邢金良讲师

徐存拴教授

徐德忠教授

徐列明教授

徐小元教授

许洪卫教授

许玲副教授

许文燮教授

严律南教授

杨刚毅副教授

杨建勇教授

杨希山教授

杨旭教导

杨云生教授

姚树坤教授

姚云清副教授

叶胜龙教授

伊力亚尔·夏合丁副教授

于聪慧副主任医师

于皆平教授

于颖彦教授

余龙教授

喻荣彬副教授

袁耀宗教授

袁正宏研究员

岳茂兴教授

臧伟进教授

詹林盛研究员

张吉翔教授

张锦生教授

张青云研究员

张学教授

张亚力教授

张宗明教授

赵平讲师

赵新泰研究员

钟鸣研究员

周丁华副教授

周晓东研究员

周智副教授

周总光教授

庄贵华副教授

周士胜教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2005 年 9 月 15 日 第 13 卷 第 17 期 (总第145期)

述 评

- 2057 细胞黏附力和黏附分子对癌侵袭性影响的研究展望 许洪卫
2061 酒精性胃病 任建林, 潘金水, 董菁

基 础 研 究

- 2064 CagA⁺幽门螺杆菌胃癌前及癌变中NF- κ B的表达增强
李国平, 吴灵飞, 蒲泽锦, 冯家琳, 郑宗茂, 王炳周
2069 大鼠肝癌细胞 HSV-tk/GCV 自杀基因系统的构建及其旁观者效应
谭宇蕊, 吴映雅, 杜标炎, 胡岳山, 赵鹏, 李杰芬
2074 三氧化二砷抑制小鼠体内肝癌细胞增殖的实验研究
唐印华, 田永刚, 刘铁夫, 徐洪雨, 庄丽维, 梁桃, 姜爱民
2078 乙肝疫苗联合含CpG基序寡脱氧核苷酸和卡介苗对小鼠的免疫应答影响
王甦, 陈群, 王兴, 张燕, 马丽, 汪中强
2082 荔枝核总黄酮的抗鸭乙型肝炎病毒作用 徐庆, 宋芸娟, 李丽亚, 侯巧燕
2086 HMGCR基因多态性与乙型病毒性肝炎关联分析 邓春青, 邓国宏, 王宇明
2090 经兔肝动脉灌注平阳霉素碘油乳剂制作肝纤维化模型 李枫, 徐克, 刘瑞宝
2094 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对SW48结肠腺癌细胞生物学行为的影响
李秀梅, 刘南植, 倪志, 张庆, 洪玮
2098 低氧对胰腺癌细胞株PC-3中IAP-2表达的影响机制 赵秋, 谷华, 杜静, 覃华, 刘南植
2103 重症胰腺炎肾脏损伤中细胞凋亡相关基因的作用 朱明德, 方驰华, 史学深

文 献 综 述

- 2108 幽门螺杆菌感染与细胞因子单核苷酸多态性 陈威, 袁媛
2115 微机器人在消化道内摩擦行为的研究 罗海堤, 李洁, 黄平
2119 自身免疫性肝炎发病机制研究进展 鲍启德, 崔东来, 杨兰兰
2122 丹参治疗急性胰腺炎的机制 张喜平, 李志军
2125 Ghrelin与能量代谢和肥胖的关系 张兴渝, 杨刚毅
2128 SNP的研究现状及在MMPs研究中的应用 葛金梅, 张忠英, 彭宣宪, 任建林

研 究 快 报

- 2138 二甲基亚硝胺诱发大鼠肝纤维化模型中库普弗细胞与星状细胞的分布
朴金花, 金京顺, 崔京淑, 朴东明
2141 胃癌组织环氧合酶-2表达与幽门螺杆菌cagA⁺菌株感染
张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 王钊, 陈虹彬
2145 三种H₂受体拮抗剂诱导鼠胃壁细胞H₂受体脱敏的比较 李玲, 罗和生, 刘艳

临 床 经 验

- 2148 腹腔冲洗液和腹膜组织检测胃癌腹腔微转移的临床意义
王夫景, 高岩, 黄跃南, 佟佰峰, 张秀云, 杨维良
2150 恶性消化道肿瘤晚期患者血TNF- α 与胰岛素抵抗和胰岛素分泌的功能关系
冯青青, 王占科, 吕小林, 刘亚诚, 余文, 涂云
2153 肠道动静脉畸形的诊断与治疗8例 柴新群, 邓飞涛, 蒋春舫, 冯贤松
2156 胃癌前哨淋巴结体外检测的临床意义 程黎阳, 陈晓东, 谢正勇, 周洪锋, 钟世镇
2159 气囊扩张术联合肉毒素注射序贯治疗贲门失弛缓症的近期及远期疗效
弭希峰, 黄子成, 王木成, 李水森
2162 肝硬化患者糖代谢变化临床分析46例 罗庆锋, 许乐, 傅亮
2165 干扰素- α 联合乙型肝炎疫苗治疗慢性乙型肝炎16例 任粉玉, 朴熙绪, 任淑子
2166 马来酸曲美布汀胶囊治疗肠易激综合症46例 陈克河, 李士坤, 卢世健
2168 重症急性胰腺炎继发感染临床研究 郑晓梅, 黄宗文, 薛平, 刘芳, 郭佳

病 例 报 告

- 2171 过氧乙酸致食管烧伤后严重狭窄1例
尹勇, 王中林, 陆一民

致 谢	2172 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2060 第一届北京国际消化疾病高峰论坛 2063 加入台湾华艺CEPS中文电子期刊服务声明 2073 第五届全国消化道恶性病变内镜/介入治疗研讨会会讯 2077 广东中西医结合、中医消化病学术会议 2089 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊 2102 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2107 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2114 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2137 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知 2170 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知
封面故事	Zhang JF, Zhang YP, Hao FY, Zhang CX, Li YJ, Ji XR. DNA ploidy analysis and expression of MMP-9, TIMP-2, and E-cadherin in gastric carcinoma. <i>World J Gastroenterol</i> 2005; 11(36): 5592-5600 http://www.wjgnet.com/1007-9327/11/5592.asp
国际会议	APDW 2005: Asian Pacific Digestive Week 2005 September 25-28, 2005 13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005 American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005 ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net

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
(半月刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2005-09-15
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

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

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊。世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

2005年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

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576.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

September 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 17

EDITORIAL

Prospect in effect of cell adhesion and cell adhesion molecules on invasion of carcinoma

Xu HW 2057

Alcoholic gastric cancer

Ren JL, Pan JS, Dong J 2061

BASIC RESEARCH

Increased expression of NF- κ B p65 in CagA+ *H. pylori*-related gastric precancerous lesions and carcinoma

Li GP, Wu LF, Pu ZJ, Feng JL, Zhen ZM, Wang BZ 2064

Construction of HSV-*tk*/GCV suicide gene system for hepatocarcinoma cells and its bystander effect in rats

Tan YH, Wu YY, Du BY, Hu YS, Zhao P, Li JF 2069

Inhibitory effect of arsenic trioxide on proliferation of hepatoma cells in mice

Tang YH, Tian YG, Liu TF, Xu HY, Zhuang LW, Liang T, Jiang AM 2074

Effect of hepatitis B vaccine with CpG oligodeoxynucleotide or Bacilli Calmette Guerin on immune responses in mice

Wang S, Chen Q, Wang X, Zhang Y, Ma L, Wang ZQ 2078

Effect of total flavone of *Litchi Chinensis* Sonn on duck hepatitis B virus

Xu Q, Song YJ, Li LY, Hou QY 2082

Relationship between polymorphisms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene and hepatitis B virus infection

Deng CQ, Deng GH, Wang YM 2086

A new model of hepatic fibrosis induced by intra-arterial injection of iodized oil and pingyangmycin emulsions

Li F, Xu K, Liu RB 2090

Effect of demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine on human colonic carcinoma cell line SW48

Li XM, Liu NZ, Ni Z, Zhang Q, Hong W 2094

Effect of hypoxia on apoptosis inhibitory protein 2 expression and its mechanism in pancreatic cancer cell line PC-3

Zhao Q, Gu H, Du J, Qin H, Liu NZ 2098

Renal cells apoptosis and *bax*, *bcl-2* expression in rats with severe acute pancreatitis

Zhu MD, Fang CH, Shi XS 2103

REVIEW

Relationship between *Helicobacter pylori* infection and single nucleotide polymorphism of cell factor

Chen W, Yuan Y 2108

Friction of micro-robot in digestive tract

Luo HD, Li J, Huang P 2115

Advance in mechanism of autoimmune hepatitis

Bao QD, Cui DL, Yang LL 2119

Mechanism of *Danshen* in treatment of acute pancreatitis

Zhang XP, Li ZJ 2122

Relations of Ghrelin with energy metabolism and adiposity

Zhang XY, Yang GY 2125

Current status of single nucleotide polymorphism and its application in research of matrix metalloproteinases

Ge JM, Zhang ZY, Peng XX, Ren JL 2128

BRIEF REPORT

Distribution of Kupffer Cells and hepatic stellate cells in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Piao JH, Jin JS, Cui JS, Piao DM 2138

Relationship between expression of cyclooxygenase-2 and cagA+ *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinoma

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Wang Z, Chen HB 2141

Differences among desensitization of histamine H₂ receptor induced by three H₂ receptor antagonists on rat gastric parietal cells

Li L, Luo HS, Liu Y 2145

CLINICAL PRACTICE

Clinical significance of free cancer cells in peritoneal washes and tissues of patients with gastric cancer

Wang FJ, Gao Y, Huang YN, Tong BF, Zhang XY, Yang WL 2148

Relations of plasma TNF- α with insulin resistance and insulin excretion in terminal patients with malignant gastrointestinal tumor

Feng QQ, Wang ZK, Lv XL, Liu YC, Yu W, Tu Y 2150

Diagnosis and treatment of arteriovenous malformation of gastrointestinal tract: an analysis of 8 cases

Chai XQ, Deng FT, Jiang CF, Feng XS 2153

Clinical significance of *ex vivo* detection of sentinel lymph node in gastric cancer

Cheng LY, Chen XD, Xie ZY, Zhou HF, Zhong SZ 2156

Short-term and long-term effect of pneumatic dilation and botulinum toxin injection in treatment of cardiac achalasia

Mi XF, Huang ZC, Wang MC, Li SM 2159

Changes of glucose metabolism in patients with liver cirrhosis: an analysis of 46 cases

Luo QF, Xu L, Fu L 2162

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology Monthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date September 15, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

细胞黏附力和黏附分子对癌侵袭性影响的研究展望

许洪卫

许洪卫, 上海同济大学附属第十人民医院普外科 上海市 200072
许洪卫, 男, 1960-12-15生, 云南省腾冲县人, 汉族. 上海同济大学附属第十人民医院普外科. 副教授、副主任医师、硕士生导师. 1996-07毕业于第二军医大学, 获外科学博士学位, 2000年转业至上海市第十人民医院. 主要从事胃肠肿瘤外科治疗和基础研究. 已在核心期刊发表学术论文30余篇, 作为课题负责人先后完成了有关胃癌的两项国家自然科学基金项目, 并担任国家自然科学基金委员会同行评议专家、《世界华人消化杂志》和《中国肿瘤临床》编委.
国家自然科学基金资助项目, No. 30171039
通讯作者: 许洪卫, 200072, 上海市延长中路301号, 同济大学附属第十人民医院普外科. xudo99@sina.com
电话: 021-66300588-3650 传真: 021-66303983
收稿日期: 2005-04-21 接受日期: 2005-05-19

摘要

在癌细胞脱离原发灶、移动并附着远处器官等癌浸润转移过程中, 细胞黏附分子和细胞黏附力发挥着重要作用. 至少有两个细胞黏附系统共同参与细胞连接, 某些细胞黏附分子的表达程度及功能活性状态直接影响着癌细胞的脱离和再附着. 细胞黏附的力学强度既可以用力来定义也可以用能量来定义, 细胞黏附的分子基础是受体与其特异性配体间的结合, 近年随着流动腔和微吸管技术的相继引入, 有关受体配体结合动力学的研究已经由三维转到二维水平, 这有助于在细胞和分子水平上揭示力学-化学耦合作用的内在规律及其分子生物学机理, 对认识癌细胞转移等某些重要的病理生理过程有重大意义.

许洪卫. 细胞黏附力和黏附分子对癌侵袭性影响的研究展望. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2057-2060
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2057.asp>

0 引言

癌转移是一个复杂的多步骤的癌细胞与宿主相互作用的过程. Liotta认为, 黏附、基质溶解和移动是癌细胞侵袭宿主的三大步骤. 其中黏附是指癌细胞通过自身膜表面的黏附分子与细胞外基质成分间的相互反应. 目前人们对于细胞黏附的研究主要集中在两个方面: 一方面是研究它的生物化学机制, 以细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAM)的研究为代表^[1,2], 近年来这方面取得了很大成绩并已逐渐成为生物学界的热点之一^[3,4]; 另一方面是细胞黏附的生物物理性质和机理的研究, 细胞黏附的一个基本物理问题是黏附的力学强度问题, 这里的力学强度既包括细胞间的黏附强度又包括黏附分子间的分子键强度^[5]. 目前这方面的研究报道尚处于起步阶段, 尤其是肿瘤细胞的黏附力学问题, 国内外所见报道不多.

1 细胞黏附分子与癌细胞的信号传导

1.1 两个细胞黏附系统共同参与细胞连接 CAM系指存在于细胞膜上的一类跨膜糖蛋白, 包括整合素类(integrins)、钙黏附素类(cadherins)、免疫球蛋白(Ig)类、凝集素类(selectins)四大超家族等^[2]. 细胞黏附和移动等各种细胞功能的发挥离不开细胞连接——包括细胞与细胞间的连接和细胞与细胞外基质的连接. 极化的上皮细胞间的连接表现为一种特殊的膜结构形式. 可分为紧密连接、黏附连接(adherens junctions, AJs)和桥粒. AJs是其它两种细胞连接形式的基础^[6]. 一般认为, 由钙黏附素、 β -连环素(catenins)、 α -连环素和丝状肌动蛋白(F-actin)等组成的钙黏附素-连环素系统构成并维系着细胞间的AJs^[7]. 但新近又发现了另一套细胞黏附系统, 它至少由nectin和afadin组成^[8]. Nectin是一种同源性非钙依赖型的CAM, 属免疫球蛋白超家族, 由nectin-1、nectin-2、nectin-3组成, 其中每个成员又有2-3个剪接变异体, 它们都位于AJs, 具有同型或异型细胞黏附活性. Afadin是一种丝状肌动蛋白结合蛋白, 它有两个剪接变异体, 1-afadin和s-afadin, 人类s-afadin基因突变与急性白血病有关^[9]. Nectin诸成员的C末端含有保守性基元, 可与afadin的PDZ部分结合, afadin又与丝状肌动蛋白相连, 在AJs中组成另一个独立的黏附连接系统. 新近的文献认为^[6, 10], nectin-1 α 或nectin-2 α 与afadin相互结合是钙黏附素介导的AJs中的基本反应通路; nectin-afadin系统与细胞间单纯病毒I的传播有关; nectin-2与精源性细胞骨架的形成相关. 因此, nectin-afadin系统在细胞连接中发挥着非常重要的作用.

两个细胞黏附系统在功能上是相互关联的, (图1). 因为钙黏附素介导的细胞黏附作用可激活Src家族激酶, 继而诱导nectin-2酪氨酸磷酸化; 两系统分别通过各自的细胞内成员afadin和 α -连环素相互连接, 共同构建细胞间的AJs. 此外, 各自的新成员ponsin(afadin结合蛋白)与vinculin(α -连环素结合蛋白)之间也存在连接点^[8].

1.2 细胞黏附分子基因突变与癌的浸润和转移 近年国内外学者通过对黑色素瘤和结直肠癌等肿瘤恶性演进的分子生物学、分子细胞学机制研究发现, 肿瘤的浸

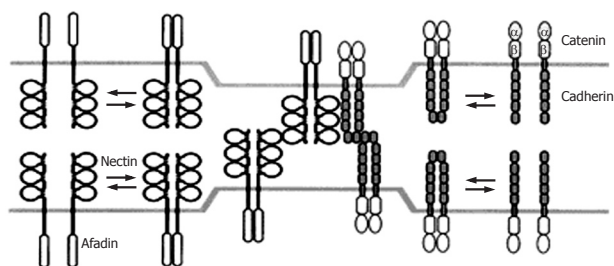


图1 钙黏附素-连蛋白系统与nectin-afadin系统的关联性.

润和转移与钙黏附素、整合素等CAM表达水平的变化有关.一方面,肿瘤细胞表面某些CAM的减少可以使细胞间的黏附性减弱,肿瘤细胞与细胞外基质成分的黏附性增强,并导致肿瘤细胞游离出基底膜,这是肿瘤浸润性生长和远处转移的始动步骤;另一方面,肿瘤细胞表达的某些CAM使进入血中的肿瘤细胞得以黏附血管内皮细胞,造成血循环转移^[1,2].但nectin、afadin与胃癌等肿瘤的关系研究文献报道甚少.

我们对不同转移潜能的癌细胞株和癌症患者手术切除标本的初步研究表明,E-钙黏附素表达程度与胃癌细胞浸润转移潜能呈负相关,E-钙黏附素表达下调与胃癌的转移等恶性表型密切相关;E-钙黏附素和连蛋白表达减弱可能在大肠癌的浸润、转移过程中发挥着重要作用,同时检测E-钙黏附素、 α -连蛋白、 β -连蛋白三指标的表达式比单独检测其中之一更能精确地预测大肠癌的浸润和转移趋势.有限的资料显示,E-钙黏附素基因细胞外区某些外显子缺失或突变,可能削弱E-钙黏附素的细胞黏附功能,使低分化印戒状胃癌细胞的侵袭性增强.但连环素等多种因素影响E-钙黏附素的肿瘤侵袭抑制功能.E-钙黏附素等CAM的表达程度及功能活性状态直接影响着胃癌细胞的脱离和再附着^[2].

2 细胞黏附力学行为的研究现状、主要研究方法及其评价

2.1 细胞黏附力的基本概念^[5] 细胞黏附的力学强度既可以用力来定义也可以用能量来定义.从相对宏观和微观的角度看,细胞的黏附强度可以在细胞和分子两个水平上表达,即一个是单个的细胞水平,一个是单个的分子键水平.在细胞水平,黏附在一起的两个细胞在被分离的瞬间所受到的分离力即为黏附时的接触力.细胞表面的黏附能量密度是指要分离接触面积为一个单位的细胞对所需作的功.在分子水平,单键强度是指一个分子键所能承受的最大的力.键能则是指断开一个分子键所需的能量.

2.2 二维、三维动力学的区别^[11-13] 细胞黏附的分子基础是受体与其特异性配体间的结合.当受体与配体分

子至少一种处于游离状态时,受体与配体之间的结合是三维的,目前已有许多方法研究三维受体配体反应动力学.当受体与配体均位于细胞表面时,受体与配体之间的结合则局限于两细胞之间的二维空间.90年代以来随着流动腔和微吸管技术的相继引入,有关受体配体结合动力学的研究才由三维转到二维水平.目前二维动力学研究的基本思路是通过黏附概率与接触时间的相关性求得动力学参数.

2.3 检测细胞黏附力的主要方法 在外力作用下,活组织和器官不断改变着其结构和力学特性.作为组织和器官的基本单位,细胞通过自身形状、结构、力学特性和功能的变化来对力刺激作出适当的反应.检测细胞力学特性的方法包括两大类.一类是针对单细胞的局部特征,比如细胞探针(cell poking)、局部细胞膜微吸管技术(micropipette aspiration of local cell surface layer)、细胞内包埋或表面黏着外源性磁性颗粒技术、用显微操作器使黏着细胞伸长部分弧度改变技术、声学扫描显微镜以及原子力显微镜(AFM)等^[14-16].另一类是针对单细胞的整体特征,目前主要用于血细胞和肌细胞的力学特性研究.比如全细胞微吸管技术(micropipette aspiration of a whole cell)、用微型平皿对测定细胞的伸缩性、用微吸管对测定细胞的黏弹性^[16]以及平行板流动腔系统^[17].以下简述其中最具有代表性的两种方法.

2.4 微吸管技术 又称为微管吸吮实验系统,是指利用微吸管中的负压对细胞进行直接操作的技术.利用微吸管抓持细胞可实现两细胞的对接连接,在控制接触面积和接触时间的条件下直接测定细胞与细胞间的黏附概率,从而排除了流体动力学情况下的干扰因素,是目前测定细胞黏附力的客观可行的较好方法^[16,18].特别是近两年来,Cheng Zhu沿用并改进了Evans *et al*的方法,通过控制接触面积和接触时间,利用同一细胞对反复做黏附实验,重复上百次,统计黏附事件发生的频率,以期达到测定动力学参数的目的^[12].

2.4.1 黏附循环测试实验 以测定CHO细胞二维受体配体(CD16-IgG)结合的动力学速率为例详细说明^[19].先将含有半等渗HBSS和1% BSA的溶液3 mL注满显微镜小室,注入表达受体(1×10^3)的CHO细胞和被覆配体(1×10^4)的红细胞,借助显微操作法,用相应的微吸管分别吸吮单个的CHO细胞和红细胞并使之呈对称性排列(图2).压力调节系统精确地控制着负压,使得红细胞的非吸附部分既可维持球形松弛状态(图2A)又容易受作用于吸附部分微力的影响而变形.用计算机辅助的步进电机(piezo translator)操纵红细胞移动,精确控制两细胞对接的面积和时间(图2B).随着微吸管的缓慢回缩,两细胞要么立即分离(得分为0),要么

因红细胞被拉长(图2C)而维持短暂的接触(得分为1)。



图2 典型的黏附循环测试实验显微照片^[9]. A: 接近; B: 接触.

2.4.2 理论计算 黏附循环测试重复上百次以通过计算黏附次数与测试次数之比来估算总黏附概率(P_t), 特异性黏附概率(P_a)与非特异性黏附概率(P_n)的关系式为: $P_a = (P_t - P_n) / (1 - P_n)$, 据此可知, P_a 与受体和配体的密度(分别为 m_r 、 m_l)、接触面积(A_c)和接触时间(t)相关, 如方程式1所示^[19]:

$$P_a = 1 - \exp\{-m_r m_l A_c K_a [1 - \exp(-k_r t)]\} \quad (\text{方程式1})$$

其中, m_r 、 m_l 可事先分别测出, A_c 始终是一个常量, 为了更好地了解 P_a 与 t 的关联性, 在每一黏附循环测试系列中, 接触时间都被设定为衡量, 不同的测试系列使用不同的细胞对, 故取系统性方差均值为 t 值; K_a 、 k_r 各为二维结合亲和系数及其反比率。

2.4.3 评价 与传统的黏附力检测方法相比, 微吸管法具有明显的优点: 红细胞变形是细胞黏附的标志, 通过观察红细胞变形可敏感地检测黏附事件; 可人为控制接触条件, 如时间、面积、负压力的大小以及接触频率等; 分子键的形成可控制在一个预定的时间内. 因此, 微吸管法的许多黏附试验条件可人为调控, 其准确度得到明显提高, 而系统误差被降至最低限度, 可能是目前测定细胞黏附力的较理想方法^[20].

2.5 流动腔 细胞流动腔又称为平行板流动腔(parallel-plate flow chamber), 是一个高度远小于横向和纵向几何尺寸的平行平板流动室, 是用以体外研究细胞力学行为的主要工具之一^[17]. 剪切速率 $G = 6Q/WH^2$ (Q 为单位时间的液体流量, W 为小室宽度, H 为小室高度). 剪切速率以细胞能耐受剪切力而不脱落为宜. 在细胞黏附力学研究方面, 其基本原理是测定细胞与表面之间每单位位移和每单位黏附持续时间形成的黏附概率, 通过他们之间的定量关系来获得动力学反应速度的信息^[20].

2.5.1 恒定力存在下的黏附持续时间 在细胞黏附的生物物理学研究方面, 流动腔技术也许是最常被采用的研究手段. 在流体动力学力存在的情况下, 细胞移动的距离决定着受体与配体的结合与否. 我们可以从两种检测方法中获得反转率信息. 一种是测定流动的细胞附着于裱衬低密度配体的表面上的黏附持续时间; 另一种是在裱衬高密度配体的表面上, 持续滚动的细胞具有滞留-滚动的运动特征, 据此可测得细胞的暂停时间^[12].

2.5.2 评价 流动腔法模拟了白细胞在内皮细胞上的自

然流动, 虽然它所受的影响因素较多, 但它比微吸管法更接近于一种生理状态, 在对炎症^[21]、肿瘤^[22]等病理过程的生物物理机理研究方面, 仍不失为一种理想的较接近生理的模型。

3 细胞黏附力学与细胞黏附化学耦合作用小结及展望

细胞力学行为(黏附、展布、聚集、运动等)及其机制研究, 体现了当前生物力学发展中宏观向微观深入、宏微观相结合这一大趋势, 为细胞间的通讯(当前细胞生物学的热点)拓展了新的研究领域(力学信号的传递、介导、转录、表达), 有助于在细胞和分子水平上揭示力学-化学耦合作用(mechano-chemical effect)的内在规律及其分子生物学机理, 对生物学图式的形成以及认识炎症反应、肿瘤细胞转移等某些重要的病理生理过程有重大意义。

癌细胞浸润和转移性播散机制是现代肿瘤学研究热点之一, 目前国内外研究仅限于针对非肿瘤细胞的力学行为或肿瘤细胞的整和素等CAM基因突变等方面, 若能在同一癌模型上同时探讨细胞黏附力学变化和nectin、afadin等分子生物学变化对癌细胞侵袭潜能的影响, 就有可能为防止癌细胞的脱离和再附着提供新的思路。

4 参考文献

- 1 许洪卫, 王元和, 高瀚. E-钙黏附素失活及其基因突变与肿瘤细胞黏附和转移的关系. 肿瘤 1998;18:57-59
- 2 许洪卫, 蔡诚忠, 谭龙益. 胃癌根治术与血清、组织E-钙黏附素变化的关系. 中华实验外科杂志 2003;20:751-752
- 3 许洪卫, 何金, 王元和, 陈泳莲. 胃癌及其淋巴转移灶 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 亚单位整合素表达的临床意义. 中华病理学杂志 1997;26:168-169
- 4 许洪卫, 王元和, 谭龙益. 胃癌患者转化生长因子 $\beta 1$ 及其受体检测的意义. 中华普通外科杂志 2000;15:72-74
- 5 张景, 曾衍钧. 细胞黏附的生物力学研究进展. 力学进展 1999;29:576-583
- 6 Kikyo M, Matozaki T, Kodama A, Kawabe H, Nakanishi H, Takai Y. Cell-cell adhesion-mediated tyrosine phosphorylation of nectin-2 δ , an immunoglobulin-like cell adhesion molecule at adherens junctions. *Oncogene* 2000;19:4022-4028
- 7 Yokoyama S, Tachibana K, Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 2000;148:399-404
- 8 Miyahara M, Nakanishi H, Takahashi K, Horikawa KS, Tachibana K, Takai Y. Interaction of nectin with afadin is necessary for its clustering at cell-cell contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction. *J Biol Chem* 2000;275:613-618
- 9 Horikawa KS, Nakanishi H, Takahashi K, Miyahara M, Nishimura M, Tachibana K, Mizoguchi A, Takai Y. Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities. *J Biol Chem* 2000;275:10291-10299
- 10 Ikeda W, Kakunaga S, Itoh S, Shingai T, Takekuni K, Satoh K, Inoue Y, Hamaguchi A, Morimoto K, Takeuchi M, Imai T, Takai Y. TAGE4/Nectin-like molecule-5 heterophilically trans-interacts with cell adhesion molecule Nectin-3 and enhances cell migration. *J Biol Chem* 2003;278:28167-28172
- 11 Zhu C. Kinetics and mechanics of cell adhesion. *J Biomech* 2000;33:23-33
- 12 Huang J, Chen J, Chesla SE, Yago T, Mehta P, McEver RP, Zhu

- C, Long M. Quantifying the effects of molecular orientation and length on two-dimensional receptor-ligand binding kinetics. *J Biol Chem* 2004;279:44915-44923
- 13 Hinds MT, Park YJ, Jones SA, Giddens DP, Alevriadou BR. Local hemodynamics affect monocytic cell adhesion to a three-dimensional flow model coated with E-selectin. *J Biomech* 2001;34:95-103
- 14 Bhasin N, Carl P, Harper S, Feng G, Lu H, Speicher DW, Discher DE. Chemistry on a single protein, vascular cell adhesion molecule-1, during forced unfolding. *J Biol Chem* 2004;279:45865-45874
- 15 Miyazaki H, Hasegawa Y, Hayashi K. A newly designed tensile tester for cells and its application to fibroblasts. *J Biomech* 2000;33:97-104
- 16 Hochmuth RM. Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech* 2000;33:15-22
- 17 虞兰, 酃鸣阳, 钱丽君, 王国雄, 艾XUN, 顾兴华, 王克强. 离体血流循环切应力水平控制方法的研究. *上海生物医学工程杂志* 1999;20:10-15
- 18 Brodland GW, Chen HH. The mechanics of cell sorting and envelopment. *J Biomech* 2000;33:845-851
- 19 Chesla SE, Li P, Nagarajan S, Selvaraj P, Zhu C. The membrane anchor influences ligand binding two-dimensional kinetic rates and three-dimensional affinity of FcγRIII (CD16). *J Biol Chem* 2000;275:10235-10246
- 20 李秀峰, 曾衍钧, 赵红, 庄逢源. 受体与配体结合的动力学研究进展. *力学进展* 2000;30:605-612
- 21 Dong C, Lei XX. Biomechanics of cell rolling: shear flow, cell-surface adhesion, and cell deformability. *J Biomech* 2000;33:35-43
- 22 Kitayama J, Nagawa H, Tsuno N, Osada T, Hatano K, Sunami E, Saito H, Muto T. Laminin mediates tethering and spreading of colon cancer cells in physiological shear flow. *Br J Cancer* 1999;80:1927-1934

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第一届北京国际消化疾病高峰论坛

本刊讯 第一届北京国际消化病高峰论坛定于 2005-11-04/06 在北京世纪金源大酒店举行, 本届论坛由中国医学论坛报社主办, 内容包括胃食管反流病、Barrett 食管和食管癌、胃癌和幽门螺杆菌、结直肠癌筛查、炎性肠病、慢性胰腺炎和胰腺癌、NASH/ 脂肪肝和病毒性肝炎等重要专题。

本届论坛很荣幸地邀请到 M. Brian Fennerty, J. Thomas LaMont, Meinhard Classen, David A. Johnson, David Lieberman, David J. Bjorkman, Manfred Stolte, Stuart Sherman 和 Atif Zaman 等欧美消化领域的知名专家, 以及萧树东、钱家鸣、斯崇文、欧阳钦、郑树、柯美云、王贵奇、周丽雅、罗金燕、贾继东等国内知名专家。他们将从临床研究和实践的角度总结 2005 年胃肠病学和肝病学的最新进展和发展动态, 并将根据自己掌握的关键性的第一手资料, 对上述疾病发病机制、诊断和治疗中的热点问题精彩演讲。希望通过参会的国内外高层专家们之间的深入探讨, 提高我国消化系统疾病的诊治水平。

为了加强国内外学术交流的深度和效果, 本届论坛语言采用中文和英文, 并配有同声传译系统。论坛热忱邀请全国医院消化中心的负责人和学术人带头人、中青年专家参加本届论坛, 共同为东西方在消化疾病领域的高层学术交流与合作写下新的篇章。

1 主要议题

本届论坛的主要议题包括: ①胃食管反流病 (GERD): 中国和美国的不同经验; ②Barrett 食管和食管癌: 东西方的异同; ③胃癌和幽门螺杆菌: 东西方的看法是否相同? ④慢性胰腺炎和胰腺癌; ⑤病毒性肝炎治疗新进展; ⑥炎性肠病 (IBD): 中国的现状; ⑦IBD 的病理生理及临床治疗 -- 2005 年新进展; ⑧结直肠癌筛查: 全球范围是否面临同样的问题? ⑨非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)/ 脂肪肝 -- 新的流行病。

2 壁报征文

论坛将为参会者提供以壁报方式展示最新研究成果的机会。壁报摘要要求在 800 字以内, 需描述研究目的、方法、结果和结论。评审费为 500 元, 届时将评选优秀壁报 5 名, 获奖者将免注册费。

3 大会秘书处

大会设有秘书处, 联系人为黄向东, 张莉, 詹宁育, 北京市鼓楼西大街 41 号, 中国医学论坛报社, 邮编 100009, 电话: 010-64002844, 传真: 010-64064469, Email: communications@gisummit.com。

本论坛欢迎全国医院消化中心的负责人和学术人带头人、中青年专家参加, 详细注册及相关费用信息请咨询大会秘书处。

酒精性胃病

任建林, 潘金水, 董 菁

任建林, 潘金水, 董菁, 厦门大学中山医院消化内科 厦门市消化病研究所 福建省厦门市 361004

任建林, 男, 1965-02-01生, 甘肃人, 汉族, 2004年西安交通大学医学博士, 2003年哈佛大学麻省总院, 纽约大学研修教授、主任医师、硕士研究生导师, 厦门大学附属中山医院消化内科主任, 主要从事胃肠黏膜保护及肝病的基础与临床研究。

通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学中山医院消化内科, 厦门市消化病研究所, jianlinr@msn.com

电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017

收稿日期: 2005-07-15 接受日期: 2005-07-28

摘要

酒精是引起胃黏膜损伤的重要原因之一, 了解其形成原因及防治具有重要意义。酒精导致的胃黏膜损伤包括急性及慢性损伤两方面, 前者主要表现为黏膜炎症, 后者表现为黏膜糜烂伴上皮代偿性增生, 并可能引起恶变。主要原因在于酒精可从多方面导致对胃黏膜的侵袭因素增强, 同时使黏膜防卫因素相对减弱。长期以来, 酒精引起的胃黏膜慢性损伤在临床上并未受到充分的重视。由于酒精导致的胃黏膜损伤是多方面的、多阶段的, 可以视为一个临床症状候群, 因此我们提出“酒精性胃病”这一概念, 以期临床上对这一症候群引起足够的重视。我们重点讨论了酒精性胃病的发病机制, 同时对这一疾病的诊治进行了探讨。

潘金水, 任建林, 董菁. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2061-2063

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2061.asp>

0 引言

急性酗酒所致的急性糜烂性胃炎是临床上常见的上消化道出血原因之一, 慢性酗酒可致酒精性肝炎、脂肪肝、肝硬化等酒精性肝病。了解乙醇对胃黏膜损伤机制及其防护具有重要意义。摄入乙醇后, 一方面, 乙醇可造成胃黏膜损伤, 组织学证据表明乙醇可使胃黏膜上皮层发生改变、破坏上皮顶端胞浆膜, 导致细胞脱落及胃多发糜烂、溃疡, 如累及血管则可引起出血; 另一方面, 胃可能参与乙醇的代谢, 与乙醇的“首过清除”有关, 表现为胃黏膜中存在多种乙醇脱氢酶同工酶, 但亦有不同观点^[1-3]。

1 病理改变

乙醇对胃黏膜的损伤包括急性及慢性两方面。前者主要表现为急性糜烂性胃炎甚至溃疡, 内镜下表现为黏膜表面点状糜烂, 直径常为1-2 mm, 常不累及深层, 多伴有一定程度的出血(多为黏膜下瘀点), 活检时黏膜炎症常并不突出。如累及黏膜肌层, 则形

成溃疡。如与非甾体类消炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID)(如布洛芬)协同作用, 则对胃黏膜的损伤更为显著。后者表现为胃肠黏膜糜烂伴有上皮代偿性增生, 时间较长可出现肠上皮化生、上皮不典型增生, 甚至癌变, 这可能与氧化应激及脂质过氧化反应有关^[4, 5]。此外, 慢性酗酒者幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染所致的慢性胃炎发病率较高, 但治疗后黏膜常可完全恢复正常。

2 发病机制

乙醇对胃黏膜的损伤是个复杂的、多方面的过程。总的来说, 与胃黏膜的侵袭因素和防卫因素之间的不平衡有关。前者包括胃酸、胃蛋白酶及黏膜刺激物等; 后者包括胃黏液层、黏膜血流、HCO₃⁻、前列腺素、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及上皮细胞更新等。

2.1 侵袭因素相对增强

2.1.1 促进胃酸、胃蛋白酶分泌 乙醇能增加壁细胞膜上H⁺-K⁺-ATP酶表达, 从而促进胃酸分泌, 并可促进胃蛋白酶的分泌^[6]; 慢性乙醇中毒也存在酸分泌现象^[7], 但也有不同观点^[8]。

2.1.2 对胃肠道黏膜的刺激 乙醇能影响胃肠道黏膜中乙醇脱氢酶、过氧化氢酶、微粒体乙醇氧化系统及乙醛脱氢酶等表达, 使乙醛产生量多于被氧化量, 有潜在致癌活性^[9-11]。

2.1.3 氧自由基(oxygen free radical, OFR)对胃黏膜造成损伤 乙醇可引起胃黏膜血管内皮损伤, 导致微循环障碍和缺血, 从而使OFR产生增多, 乙醇代谢亦可产生OFR。OFR可引起细胞膜中不饱和脂肪酸氧化, 导致膜顺应性下降, 并可氧化蛋白中的巯基以及造成DNA断裂。应用巯基化合物清除OFR有助于黏膜修复^[12, 13]。

2.2 防卫因素相对减弱

2.2.1 对黏膜、黏液层的影响 黏膜屏障中直接受酒精影响的是表层黏液及其下方的上皮细胞。乙醇是一种有机溶剂, 能溶解黏液层, 并可引起黏膜细胞损伤而致黏液合成减少, 故酗酒后黏液层变薄。乙醇还可增加胃黏膜对H⁺逆向弥散的通透性, 引起黏膜形态学损伤、耗竭黏液层内上皮细胞。EGF能促进黏蛋白(一种与维持胃黏膜完整性、强度有关的蛋白)及前列腺素生成。乙醇可抑制EGF产生, 从而使黏蛋白生成减少^[14, 15]。

2.2.2 引起胃黏膜血流减少 主要是通过血栓素A₂(thromboxane A₂)介导的血管收缩^[16]。

2.2.3 抑制黏膜上皮细胞膜鞘糖脂层生成及硫转移酶活性^[17].

2.2.4 减少前列腺素生成 花生四烯酸由环氧化酶(cyclooxygenase, COX)催化生成前列腺素. COX可分为COX-1及COX-2两种, COX-1为组成性表达, COX-2则为诱导性表达, 乙醇能抑制COX-2表达, 从而使前列腺素生成减少^[18,19]; NSAID则能同时抑制COX-1及COX-2, 亦可引起前列腺素生成减少.

2.2.5 其他影响 导致HCO₃⁻渗漏、壁细胞胞浆中及线粒体内Ca²⁺浓度增加^[7,20].

3 临床表现

与NSAID、应激等其他原因相比, 乙醇所致的急性糜烂性胃炎并无特异性表现. 主要表现为中上腹痛, 有时伴恶心、呕吐, 如合并胃出血, 则可出现呕吐咖啡样胃内容物及解柏油样大便, 大出血时甚至发生休克.

4 诊断

有急、慢性酗酒史, 并排除应用NSAID及糖皮质激素等药物及应激等因素, 出现中上腹痛、恶心、呕吐等症状, 内镜下表现为胃黏膜表面充血、水肿, 并有点状糜烂、溃疡, 有时伴有黏膜下出血.

5 治疗

5.1 病因治疗 立即停止饮酒, 停用NSAID等药物, 注意休息, 避免过度紧张.

5.2 抑制胃酸分泌

5.2.1 抗酸治疗 可服用中和胃酸药物, 如氢氧化铝等, 可暂时中和胃酸, 减轻过多胃酸对黏膜的损害. 但应注意适量, 避免过多碱造成胃黏膜灼伤.

5.2.2 H₂受体拮抗剂 通过阻断壁细胞膜上H₂受体, 减少胃酸分泌. 如雷尼替丁、西米替丁、法莫替丁及新一代的尼扎替丁及罗沙替丁等.

5.2.3 质子泵抑制剂(PPI) 能与壁细胞膜上H⁺-K⁺-ATP酶结合, 使之失效, 从而抑制基础酸分泌与各种刺激引起的胃酸分泌, 具有显效快、作用强而持久的特点. 如奥美拉唑、兰索拉唑、雷贝拉唑及埃索美拉唑等. 但对于慢性酗酒者, 长期应用PPI, 可使胃内pH值上升, 对胃泌素分泌的反馈性抑制减弱, 造成胃泌素分泌增多, 并可致胃内细菌过度繁殖、Vit B₁₂吸收障碍、铁吸收不良而致缺铁性贫血. 因此, 有人^[21-25]认为长期应用奥美拉唑无益于黏膜修复, 可使胃息肉发生率增高, 甚至有潜在致癌性. 但亦有不少证据^[26-28]表明长期应用PPI是安全的, 胃癌发生率无明显增加.

5.3 保护黏膜

5.3.1 黏膜保护剂 如硫糖铝、思密达及铝碳酸镁等, 这类药物能覆盖于胃黏膜表面, 形成一保护层, 并暂

时中和胃酸, 促进糜烂、溃疡的黏膜修复. 其他黏膜保护剂还有瑞巴派特, 尚有清除氧自由基、增加前列腺素分泌作用.

5.3.2 前列腺素E₂(PGE₂) PGE₂能刺激黏液合成, 改善黏膜血流, 同时可抑制胃酸分泌, 增强上皮细胞对细胞毒素的抵抗力, 并可抑制白细胞的募集, 抑制白细胞释放自由基及水解酶, 从而促进黏膜修复^[16,29].

5.4 生长抑素 天然的生长抑素有思他(Somatostatin), 人工合成的有奥曲肽(Octreotide). 生长抑素可抑制胃酸、胃蛋白酶及胃泌素的分泌, 防止微血管栓塞, 减轻血管通透性^[30]. 一氧化氮(NO)能有效增加胃黏液分泌、减少白细胞浸润、抑制肥大细胞兴奋、舒张胃平滑肌、增加胃黏膜血流和及时清除氧自由基, 因而能减轻乙醇对胃黏膜的损伤, 抑制NO合成则黏膜易于受损^[16,31]. 生长抑素能以NO依赖的方式保护胃黏膜及恢复黏膜下血流^[32,33].

5.5 三叶肽 三叶因子家族(trefoil factor family, TFF)是一群主要由胃肠道黏液细胞分泌的小分子多肽, 具有胃黏膜保护及参与上皮重建作用, 溃疡发生时TFF分泌增多有利于溃疡修复^[34]. 小鼠实验^[35,36]表明, 局部或静脉内应用TFF有助于黏膜修复.

如发生出血, 可按照上消化道出血的原则进行治疗.

6 参考文献

- 1 Haber PS. Metabolism of alcohol by the human stomach. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:407-408
- 2 Haber PS, Gentry RT, Mak KM, Mirmiran-Yazdy SA, Greenstein RJ, Lieber CS. Metabolism of alcohol by human gastric cells: relation to first-pass metabolism. *Gastroenterology* 1996;111:863-870
- 3 Levitt MD, Furne J, DeMaster E. First-pass metabolism of ethanol is negligible in rat gastric mucosa. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:293-297
- 4 Hernandez-Munoz R, Montiel-Ruiz C, Vazquez-Martinez O. Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. *Lab Invest* 2000;80:1161-1169
- 5 Simanowski UA, Homann N, Knuhl M, Arce L, Waldherr R, Conradt C, Bosch FX, Seitz HK. Increased rectal cell proliferation following alcohol abuse. *Gut* 2001;49:418-422
- 6 Klaassen CH, Swarts HG, De Pont JJ. Ethanol stimulates expression of functional H⁺K⁺-ATPase in SF9 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;210:907-913
- 7 Hernandez-Rincon I, Olguin-Martinez M, Hernandez-Munoz R. Enhanced intracellular calcium promotes metabolic and secretory disturbances in rat gastric mucosa during ethanol-induced gastritis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:315-324
- 8 de Oliveira C, Cruz AR, Goncalves RP. Effect of chronic alcoholism upon the parietal cells of the stomach of rats. *Anat Anz* 1988;165:395-403
- 9 Pronko P, Bardina L, Satanovskaya V, Kuzmich A, Zimatkin S. Effect of chronic alcohol consumption on the ethanol-and acetaldehyde-metabolizing systems in the rat gastrointestinal tract. *Alcohol Alcohol* 2002;37:229-235
- 10 Blasiak J, Trzeciak A, Malecka-Panas E, Drzewoski J, Wojewodzka M. In vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. *Toxicol In Vitro* 2000;14:287-295
- 11 卿笃信, 凌奇荷. 人胃肠黏膜乙醇脱氢酶的分布. 新消化病学杂志

- 1996;4:543-544
- 12 Mutoh H, Hiraishi H, Ota S, Terano A, Ogura K, Ivey KJ, Sugimoto T. Relationships between metal ions and oxygen free radicals in ethanol-induced damage to cultured rat gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci* 1995;40:2704-2711
 - 13 夏敏. 氧自由基在酒精性胃黏膜损伤中的作用及巯基化合物的保护作用. 国外医学消化系疾病分册 1996;16:200-202
 - 14 Shimamoto C, Hirata I, Umegaki E, Takiuchi H, Hiraike Y, Fujiwara S, Katsu K. Gastric mucosal cell protection by epidermal growth factor in primary monolayer culture of guinea pig gastric mucous cells. *J Gastroenterol* 2003;38:727-733
 - 15 Xu CD, Gan RB, Chen SN, Jiang SH, Xu JY. Protection of gastric mucosa from ethanol induced injury by recombinant epidermal growth factor in rats. *World J Gastroenterol* 1998;4:437-438
 - 16 Wallace JL, Ma L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226:1003-1015
 - 17 Slomiany A, Jozwiak Z, Liau YH, Murty VL, Slomiany BL. Effect of ethanol on the enzymatic sulfation of glycosphingolipids in gastric mucosa. *J Biol Chem* 1984;259:5792-5796
 - 18 Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Taut A, Kwiecien S, Pajdo R, Sliwowski Z, Hahn EG. Bacterial lipopolysaccharide protects gastric mucosa against acute injury in rats by activation of genes for cyclooxygenases and endogenous prostaglandins. *Digestion* 1998;59:284-297
 - 19 Brzozowski T, Konturek PC, Moran AP, Kwiecien S, Pajdo R, Konturek SJ, Drozdowicz D, Ptak A, Pawlik W, Hahn EG. Enhanced resistance of gastric mucosa to damaging agents in the rat stomach adapted to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Digestion* 2003;67:195-208
 - 20 Guth PH. Gastric blood flow in ethanol injury and prostaglandin cytoprotection. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1986;125:86-91
 - 21 Abdel Fattaha NA, Abdel-Rahman MS. Effects of omeprazole on ethanol lesions. *Toxicol Lett* 2000;118:21-30
 - 22 Vakevainen S, Tillonen J, Salaspuro M, Jousimies-Somer H, Nuutinen H, Farkkila M. Hypochlorhydria induced by a proton pump inhibitor leads to intragastric microbial production of acetaldehyde from ethanol. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1511-1518
 - 23 Ruscini JM, Page RL, 2nd, Valuck RJ. Vitamin B(12) deficiency associated with histamine(2)-receptor antagonists and a proton-pump inhibitor. *Ann Pharmacother* 2002;36:812-816
 - 24 Khatib MA, Rahim O, Kania R, Molloy P. Iron deficiency anemia: induced by long-term ingestion of omeprazole. *Dig Dis Sci* 2002;47:2596-2597
 - 25 Pashankar DS, Israel DM. Gastric polyps and nodules in children receiving long-term omeprazole therapy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:658-662
 - 26 Freston JW, Rose PA, Heller CA, Haber M, Jennings D. Safety profile of Lansoprazole: the US clinical trial experience. *Drug Saf* 1999;20:195-205
 - 27 Reilly JP. Safety profile of the proton-pump inhibitors. *Am J Health Syst Pharm* 1999;56:S11-S17
 - 28 Bateman DN, Colin-Jones D, Hartz S, Langman M, Logan RF, Mant J, Murphy M, Paterson KR, Rowsell R, Thomas S, Vessey M. Mortality study of 18 000 patients treated with omeprazole. *Gut* 2003;52:942-946
 - 29 Hoshino T, Tsutsumi S, Tomisato W, Hwang HJ, Tsuchiya T, Mizushima T. Prostaglandin E2 protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP2 and EP4 receptor activation. *J Biol Chem* 2003;278:12752-12758
 - 30 Kusterer K, Buchheit KH, Schade A, Bruns C, Neuberger C, Engel G, Usadel KH. The somatostatin analogue octreotide protects against ethanol-induced microcirculatory stasis and elevated vascular permeability in rat gastric mucosa. *Eur J Pharmacol* 1994;259:265-271
 - 31 余贤恩, 罗绮凝. 外源性一氧化氮对豚鼠酸化乙醇性胃黏膜损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2000;8:224
 - 32 Ancha H, Ojeas H, Tedesco D, Ward A, Harty RF. Somatostatin-induced gastric protection against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. *Regul Pept* 2003;110:107-113
 - 33 Nahavandi A, Mani AR, Homayounfar H, Akbari MR, Dehpour AR. The role of the interaction between endogenous opioids and nitric oxide in the pathophysiology of ethanol-induced gastric damage in cholestatic rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2001;15:181-187
 - 34 任建林, 卢雅丕, 王琳, 陈建民, 施华秀, 叶震世, 吴艳环, 钟燕, 林逊汀, 林辉, 潘金水, 罗金燕. TFF1 在正常及损伤胃黏膜中的表达改变. 世界华人消化杂志 2003;11:1809-1810
 - 35 McKenzie C, Thim L, Parsons ME. Topical and intravenous administration of trefoil factors protect the gastric mucosa from ethanol-induced injury in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1033-1040
 - 36 Babyatsky MW, deBeaumont M, Thim L, Podolsky DK. Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology* 1996;110:489-497

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

加入台湾华艺 CEPS 中文电子期刊服务声明

本刊讯 世界华人消化杂志, 将自 2005 年 7 月起, 加入台湾中文电子期刊服务—思博网 (CEPS). 中文电子期刊服务—思博网是目前台湾地区最大的期刊全文数据库, 其访问地址为: www.ceps.com.tw 自此, 读者可以通过这一网址检索世界华人消化杂志于 1993 年起各期的全文, 在一段时期后, 还可以回溯检索 13 年前历年的全文.

此外, 由于世界华人消化杂志被 CEPS 收录, 故凡向本刊投稿者, 均视为其文稿刊登后可供思博网 (CEPS) 收录、转载并上网发行; 其作者文章著作权使用费与稿酬一次付清, 本刊不再另付其他报酬. 请各位继续支持本刊, 谢谢! (世界胃肠病学杂志社 2005-09-15)

CagA⁺幽门螺杆菌胃癌前及癌变中NF-κB的表达增强

李国平, 吴灵飞, 蒲泽锦, 冯家琳, 郑宗茂, 王炳周

李国平, 吴灵飞, 蒲泽锦, 郑宗茂, 王炳周, 汕头大学医学院第二附属医院消化科 广东省汕头市 515041

冯家琳, 汕头大学医学院第二附属医院信息科 广东省汕头市 515041

李国平, 男, 1968-02-01生, 湖北省天门市人, 汉族, 1992年湖北医科大学本科毕业, 1998年湖北医科大学硕士研究生, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的临床和科研工作。

广东省科技厅资助项目, No. 2003C30307

通讯作者: 吴灵飞, 515041, 广东省汕头市东厦北路, 汕头大学医学院第二附属医院消化科. lingfeiwu@21cn.com

电话: 0754-8915810 传真: 0754-8346543

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-15

Increased expression of NF-κB p65 in CagA⁺ *H pylori*-related gastric precancerous lesions and carcinoma

Guo-Ping Li, Ling-Fei Wu, Ze-Jin Pu, Zong-Mao Zheng, Bing-Zhou Wang

Guo-Ping Li, Ling-Fei Wu, Ze-Jin Pu, Zong-Mao Zheng, Bing-Zhou Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, Guangdong Province, China

Jia-Lin Feng, Department of Information, the Second Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, Guangdong Province, China

Supported by Science and Technology Department of Guangdong Province, No.2003C30307

Correspondence to: Ling-Fei Wu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, Guangdong Province, China. lingfeiwu@21cn.com

Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-15

Abstract

AIM: To determine the expression of nuclear factor kappa B (NF-κB) in human gastric precancerous lesions and carcinoma and its correlation with CagA⁺ *H pylori* infection.

METHODS: The expression of NF-κB p65 was detected by immunohistochemistry (SABC assay), and *H pylori* were examined using ¹⁴C-breath test, rapid urease test and Warthin-Starry staining in patients with chronic superficial gastritis (CSG: *n* = 34), intestinal metaplasia (IM: *n* = 31), atypical dysplasia (AD: *n* = 34) and gastric cancer (GC: *n* = 55). Serum CagA IgG antibody was detected by dot immunogold filtration assay. The correlations of NF-κB p65 expression with CagA⁺ *H pylori* infection as well as the histological types, clinicopathological stages and lymph node metastasis were analyzed.

RESULTS: The expression of NF-κB p65 in CSG, IM, AD, GC was 15.0%, 41.9%, 64.7%, and 78.2%, respectively, and there were significant differences between them ($\chi^2 = 43.98$, $P < 0.01$). The rates of *H pylori* infection were 70.0%, 67.7%, 73.5%, and 54.5%, respectively, and there were no significant differences between them ($P > 0.05$). The percentage of CagA⁺ *H pylori* infection were 53.6%, 61.9%, 68.0%, and 73.3%, respectively, and there were no significant differences ($P > 0.05$). In IM, the positive rate of NF-κB p65 expression in *H pylori* or CagA⁺ *H pylori* positive patients were significantly higher than that in patients without *H pylori* infection or with CagA⁻ *H pylori* infection (57.1%, 76.9% vs 10%, 25.0%, $P < 0.05$). In GC patients, the positive expression of NF-κB p65 was correlation with the T stages ($\chi^2 = 5.91$, $P < 0.05$) and lymph node metastasis ($\chi^2 = 7.47$, $P < 0.01$), but not with the pathohistological types ($P > 0.05$).

CONCLUSION: NF-κB is constitutively activated in human gastric precancerous lesions and carcinoma tissue and correlates with tumor progression. The early activation may be related to CagA⁺ *H pylori* infection.

Key Words: Nuclear factor kappa B; CagA⁺ *H pylori*; Gastric cancer; Precancerous lesions

Li GP, Wu LF, Pu ZJ, Feng JL, Zheng ZM, Wang BZ. Increased expression of NF-κB p65 in CagA⁺ *H pylori* gastric precancerous lesions and carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2064-2068

摘要

目的: 探讨核因子-κB (nuclear factor-Kappa B, NF-κB)在癌前病变及胃癌组织中的表达及其与细胞毒素相关抗原A幽门螺杆菌(CagA⁺ *H pylori*)感染之间的关系。

方法: 慢性浅表性胃炎34例, 肠腺化生31例, 不典型增生34例, 胃癌55例, 应用免疫组化方法(SABC法)检测NF-κB p65的表达, 以¹⁴C-呼气试验、快速尿素酶试验和Warthin-Starry银染色检测*H pylori*, 采用斑点金免疫渗滤法检测患者血清抗*H pylori* CagA IgG抗体, 分析NF-κB p65表达与CagA⁺ *H pylori*感染之间、以及与胃癌组织学分型、临床病理分期、淋巴结转移的关系。

结果: 在慢性浅表性胃炎、肠腺化生、不典型增生和胃癌组中, NF-κB p65阳性表达率分别为15.0%, 41.9%, 64.7%和78.2%, 呈逐渐增高趋势, 各组间有显著性差异($\chi^2 = 43.98, P < 0.01$); *H pylori*感染率分别为70.0%, 67.7%, 73.5%和54.5%, 各组间无显著性差异($P > 0.05$). CagA⁺ *H pylori*构成比分别为53.6%, 61.9%, 68.0%和73.3%, 各组间无显著性差异($P > 0.05$). 在肠化组中, *H pylori* 阳性和CagA⁺ *H pylori*感染的患者NF-κB p65阳性表达率分别为57.1%和76.9%, 显著高于同组无*H pylori*感染的10.0% ($\chi^2 = 6.18, P < 0.05$) 和CagA⁻ *H pylori*感染者的25.0% ($\chi^2 = 5.45, P < 0.05$). 在胃癌组中, NF-κB p65阳性表达与T分期($\chi^2 = 5.91, P < 0.05$)及淋巴结转移有关($\chi^2 = 7.47, P < 0.05$), 但与胃癌组织学分型无关($P > 0.05$).

结论: NF-κB的异常活化在胃癌前病变及癌变过程中起作用, 早期的活化与CagA⁺ *H pylori*感染有关.

关键词: 核因子-κB; CagA⁺ *H pylori*; 胃癌; 癌前病变

李国平, 吴灵飞, 蒲泽锦, 冯家琳, 王炳周, 郑宗茂. CagA⁺幽门螺杆菌胃癌前及癌变中NF-κB的表达增强. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2064-2068 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2064.asp>

0 引言

幽门螺杆菌 (*H pylori*) 感染是慢性活动性胃炎的主要病因, 是萎缩性胃炎肠上皮化生和不典型增生等癌前病变的促进因素^[1,5]. 流行病学调查资料表明, *H pylori* 感染者发生胃癌的危险性较非感染者6倍^[6], 但确切机制仍不清楚. 核因子-κB (nuclear factor kappa B, NF-κB) 作为一种多向转录调节因子^[7], 广泛参与多种生理和病理过程的基因调控^[8,11], 最近发现它在肿瘤发生发展中亦起重要作用^[12,15], 但有关在胃癌发病中的作用报道尚少. 有文献报道, 表达细胞毒素相关抗原A的*H pylori* (CagA⁺ *H pylori*)可上调NF-κB的表达^[16]. 我们研究胃癌及癌前病变中NF-κB的表达以及*H pylori*, 尤其是CagA⁺ *H pylori*的感染状态, 旨在探讨二者之间的相互作用关系及其对胃癌发生发展的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-5/2004-12我院胃癌患者55例, 男30例, 女25例, 年龄32-77(平均62.4)岁. 高分化癌25例, 中分化癌13例, 低分化癌11例, 黏液腺癌6例. T₁期2例, T₂期11例, T₃期29例, T₄期13例. 淋巴结转移40例, 无淋巴结转移15例. 所有患者术前均未行化疗或放疗. 胃镜取材活检标本中慢性浅表性胃炎40例, 慢性萎缩性胃炎伴肠化31例, 不典型增生34例, 患者

均经病理组织学诊断证实. 胃黏膜活检标本取自胃窦或病变区, 手术标本均取癌灶及癌旁2 cm组织, 采用40 g/L多聚甲醛固定, 常规脱水、石蜡包埋, 备测. 取胃窦部黏膜作快速尿素酶试验、Warthin-starry银染色结合¹⁴C-呼气试验, 其中2项阳性定为*H pylori*感染. 微量胶囊法¹⁴C-呼气试验所需试剂由深圳养和生物科技公司提供, 按说明书检测样品每分钟衰变数(dmp), ≥200 dmp为(+), ≤150 dmp为(-); Warthin-Starry银染色按常规组织病理学技术进行, 深棕色细长弯曲为*H pylori*染色. CagA⁺ *H pylori* 检测 采用斑点金免疫渗滤法. 试剂盒购自西安联尔生物技术公司, 仅对*H pylori*阳性者检测, 反应完成后有1个红色斑点为阴性, 有2个红色斑点为阳性, 无红色斑点为无效. 阳性者被视为CagA⁺ *H pylori*感染.

1.2 方法 采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)法 兔抗人NF-κB p65及SP试剂盒购自北京中山生物公司. 4 μm厚连续切片, 二甲苯脱蜡、酒精水化后, 浸入30 mL/L的双氧水中30 min以阻断内源性过氧化物酶的活性, 微波抗原修复, 山羊血清封闭, 分别依次滴加抗NF-κB p65抗体(工作浓度1:100), 4℃过夜, PBS液洗涤3次. 生物素化二抗, 加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液, 室温、湿盒中作用30 min, PBS液洗涤3次, DAB液显色, 苏木精轻度复染后脱水、透明、封片. 以PBS代替一抗作阴性对照, 用已知胃癌阳性切片作阳性对照. 在组织切片中显示胞质或胞核染为淡黄至棕黄色者为阳性细胞. 先在低倍镜下选择阳性细胞最集中的5个视野, 每个视野观察100个细胞, 最后取5个视野中阳性细胞平均百分数作为每张切片的观察结果. 根据Handel *et al*^[17]的分级标准采用双盲法记分, 根据阳性细胞所占比例判断结果: <5%为阴性(-), 5-24%为弱阳性(+), 25-50%为中度阳性(++), >50%为强阳性(+++). 根据染色强度将阳性信号分为3类: 染色强度弱(+)—淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色染色, 染色强度强(+++)—呈棕黄至棕褐色染色, 中等染色强度(++)—染色强度介于弱阳性与强阳性之间. 染色强度×阳性细胞百分数为每例组织染色的综合记分. 综合记分≥1判为表达阳性, <1则为阴性.

统计学处理 采用 χ^2 检验和Spearman等级相关分析, 应用SPSS 10.0软件包, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 胃部疾病中 *H pylori* 及CagA⁺ *H pylori*感染和NF-κB p65表达 慢性浅表性胃炎40例中, *H pylori* 阳性28例(CagA⁺ *H pylori* 15例, 占53.6%), *H pylori* 阴性12例, *H pylori*感染率为70.0%. 慢性萎缩性胃炎

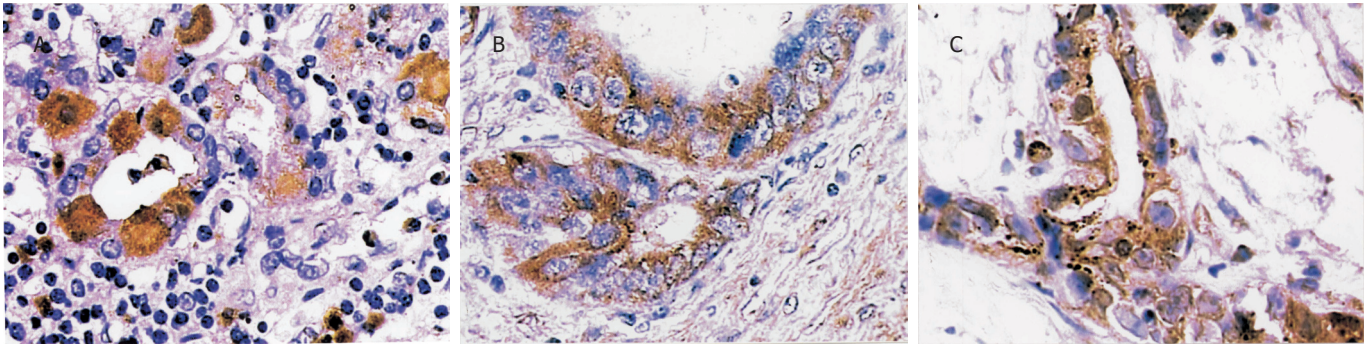


图1 NF-κB p65的表达(SP法, ×400). A: 不典型增生; B: 高分化胃腺癌; C: 中分化胃腺癌.

表1 NF-κB p65表达与Hp感染的关系 *n* (%)

分组	<i>H. pylori</i> (+)	NF-κB p65	<i>H. pylori</i> (-)	NF-κB p65
浅表性胃炎	28	5 (17.9)	12	1(8.3)
肠化	21	12 (57.1)	10	1(10.0) ^a
不典型增生	25	16 (64.0)	9	6(66.7)
胃癌	30	24(80.0)	25	19(76.0)

^a*P* < 0.05 vs *H. pylori*(+).

伴肠化31例中, *H. pylori*阳性21例(*CagA*⁺ *H. pylori* 13例, 占61.9%), *H. pylori*阴性10例, *H. pylori*感染率为67.7%. 不典型增生34例中, *H. pylori*阳性25例(*CagA*⁺ *H. pylori*17例, 占68.0%), *H. pylori*阴性9例, *H. pylori*感染率为73.5%. 55例胃癌组织中, *H. pylori*阳性30例(*CagA*⁺ *H. pylori*22例, 占73.3%), *H. pylori*阴性25例, *H. pylori*感染率为54.5%. 各组 *H. pylori*感染率无显著性差异($\chi^2 = 4.32$, *P* > 0.05). *CagA*⁺ *H. pylori*感染的比例在胃炎、胃癌前病变至胃癌组中有逐渐增高趋势, 但无统计学意义($\chi^2 = 2.69$, *P* > 0.05). NF-κB p65蛋白表达呈棕黄色颗粒, 定位于细胞质, 部分亦可见于细胞核. 慢性浅表性胃炎组织中胞质、胞核中很少呈现表达. 癌前病变组织中其表达信号逐渐增强, 在不典型增生中炎性细胞浸润明显, 腺体结构破坏, 异型细胞胞质中可见其表达, 为棕黄颗粒(图1A). 胃癌细胞中则常见其表达, 呈粗细不等的棕黄或棕褐色颗粒, 胞质、胞核同时着色, 表达强度为中等或强阳性(图1B-C). 慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎伴肠化、不典型增生和胃癌组织中NF-κB p65的表达率分别为15.0%, 41.9%, 64.7%和78.2%, 呈递增趋势, 经统计学处理, 差异有显著性($\chi^2 = 43.98$, *P* < 0.005).

2.2 *H. pylori*与NF-κB p65表达的关系 按照*H. pylori*感染情况分组, 浅表性胃炎中*H. pylori*(+)组NF-κB p65表达率高于*H. pylori*(-)组, 但无显著性差异(*P* > 0.05). 肠化患者中*H. pylori*(+)组NF-κB p65表达率显著高于*H. pylori*(-)组, 差异有统计学意

义($\chi^2 = 6.18$, *P* < 0.05). 不典型增生和胃癌组中*H. pylori*(+)与*H. pylori*(-)患者NF-κB p65表达阳性率相近, 经统计学处理, 均无显著性差异(*P* > 0.05)(表1). 按照*CagA*情况分组, 慢性萎缩性胃炎伴肠化组中*CagA*⁺ *H. pylori*患者NF-κB p65阳性率为76.9%, *CagA*⁻ *H. pylori*患者的阳性率为25.0%, 二者相比, 差异有统计学意义($\chi^2 = 5.45$, *P* < 0.05). 其余各组组内比较均无显著性差异(*P* > 0.05)(表2).

表2 NF-κB p65表达与*CagA*⁺ *H. pylori*感染的关系 *n* (%)

分组	<i>CagA</i> ⁺ <i>H. pylori</i>	NF-κB p65	<i>CagA</i> ⁻ <i>H. pylori</i>	NF-κB p65
浅表性胃炎	15	4(26.7)	13	1(7.7)
肠化	13	10(76.9)	8	2(25.0) ^a
不典型增生	17	13(76.5)	8	3(37.5)
胃癌	22	18(81.8)	8	6(75.0)

^a*P* < 0.05 vs *CagA*⁺ *H. pylori*.

2.3 NF-κB p65与胃癌临床病理特征的关系 NF-κB p65表达阳性率与胃癌病理学类型无关, 与胃癌的临床分期、浸润深度及淋巴结转移有关(表3).

表3 NF-κB p65表达与胃癌临床病理特征的关系 *n* (%)

临床病理因素	<i>n</i>	NF-κB p65
高分化腺癌	25	22(88.0)
中分化腺癌	13	10(76.9)
未分化/黏液癌	17	11(64.7)
T ₁ +T ₂	13	7(53.8)
T ₃ +T ₄	42	36(85.7) ^a
无淋巴结转移	15	8(53.3)
有淋巴结转移	40	35(87.5) ^b

^a*P* < 0.05 vs T₁+T₂, ^b*P* < 0.01, 无淋巴结转移.

3 讨论

流行病学调查资料表明, 胃癌发生率与当地*H. pylori*感染率呈正相关, 然而, *H. pylori*如何引起胃癌的机制并不清楚. 一般认为, 胃癌的发生是一个有多因素参与的复杂而漫长的过程. 大多从慢性浅表性胃炎至

萎缩性胃炎, 逐渐出现肠上皮化生和不典型增生等癌前病变, 最终才转化成癌. 本结果表明, 在有胃病症状的人群中 *H. pylori* 的感染率为54.5%~73.5%, 与文献报道相同^[18, 19]. 胃癌组患者的感染率较低(54.5%), 我们认为可能与研究方法有关. 通过血清学方法, 我们发现在胃炎、胃癌前病变至胃癌组中CagA⁺ *H. pylori* 感染比例有逐渐增高趋势, 显示检测抗体的方法可能比实时检测细菌更能反映 *H. pylori* 对胃部疾病的长期影响, 新近Storskrubb *et al* 在 *H. pylori* 对胃癌前病变的一组流行病学调查报告中亦支持此观点^[20]. 慢性萎缩性胃炎伴肠化 *H. pylori* 阳性或CagA⁺ *H. pylori* 患者NF- κ B p65的阳性表达率显著高于 *H. pylori* 阴性或CagA⁻ *H. pylori* 患者, 慢性浅表性胃炎组中 *H. pylori* 阳性NF- κ B p65表达虽高于 *H. pylori* 阴性患者, 但未显出差异且均在较低的水平, 提示 *H. pylori* 感染引起NF- κ B p65表达上调需要一定的时间. 不典型增生及胃癌组NF- κ B p65的表达均明显增高, 且与 *H. pylori* 或CagA⁺ *H. pylori* 感染无关, 说明一旦进入病变严重或不可逆阶段, 由于涉及多种遗传物质的改变, *H. pylori* 的作用已不再易于显示出来, NF- κ B p65的激活是多因素作用长期累积的结果^[21, 22]. CagA⁺ *H. pylori* 感染的胃炎向胃癌转变过程中NF- κ B p65可能是重要的分子生物学环节. *H. pylori*, 特别是CagA⁺ *H. pylori* 引起NF- κ B p65活化, 并与其它因素一起启动靶基因 *c-myc*, *Cyclin D* 和 *bcl-2* 的转录^[23, 27], 破坏正常细胞的分化过程, 最终导致胃上皮细胞向恶性方向转化^[28], 可能是其参与胃癌发生的机制之一. 最近研究发现, NF- κ B 在肿瘤的发生、发展中起重要作用, 可调控细胞的增殖、分化、凋亡及恶性转化, 其活性失控常与哺乳动物肿瘤发生有关^[29, 31]. 有证据表明, NF- κ B 的持续活化可作为结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌等多种实体肿瘤的标志^[7-11, 22, 29]. Wang *et al*^[32] 检测胰腺组织中NF- κ B p65的表达, 结果胰腺癌的表达阳性率为67%, 而正常胰腺组织表达罕见. 在前列腺癌的研究中, Huang *et al*^[33] 报道NF- κ B 活化后可抑制细胞凋亡, 促进其增殖. Sasaki *et al*^[15] 应用免疫组织化学方法检测NF- κ B p65在胃癌细胞胞质和胞核中的表达情况, 结果肿瘤组织中NF- κ B p65的表达明显高于癌旁正常上皮细胞; 电泳迁移率改变分析显示胃癌组织中NF- κ B 的DNA结合活性与核转位的活性均增加. 本研究中NF- κ B p65在慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎伴肠化、不典型增生及胃癌组织中的表达阳性率呈递增趋势, 各组之间差异有统计学意义, 且随着组织学病变程度的加重, 阳性细胞数量逐渐增多, 分布范围也逐渐扩大, 与Sasaki *et al*^[15] 结果一致. NF- κ B p65在癌前病变中有较高的阳性率, 表

明NF- κ B p65蛋白表达参与了胃癌前病变的进展, 为胃癌癌变的早期事件, 有可能成为检测早期癌变的标志物. 本组55例胃癌中, NF- κ B p65表达阳性率在高分化腺癌中较高, 但与中分化腺癌、低分化或黏液癌无显著性差异, 提示NF- κ B 的表达与肿瘤发生的组织学类型无关. 比较不同肿瘤分期中NF- κ B p65的表达, T₃, T₄期的胃癌此蛋白的表达显著高于T₁, T₂期, 而且伴淋巴结转移者显著高于无淋巴结转移者, 显示NF- κ B p65表达与胃癌的分期、浸润深度及淋巴结转移等病理学特性关系密切, 越近晚期的癌肿表达阳性率相对也越高, 与史朝晖 *et al*^[34]、王维 *et al*^[35] 的报道相似, 提示NF- κ B p65的异常活化与胃癌的发病密切相关外, 还可能对胃癌侵袭生长施加影响, 并可增加其转移潜能^[13, 14]. 从另一角度分析, 此蛋白表达与胃癌浸润及转移有关, 则有可能作为判断胃癌预后的指标^[36].

4 参考文献

- 1 中华医学会消化病学分会. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. 中华消化杂志 2000;20:117-118
- 2 Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477-484
- 3 Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2:301-310
- 4 Ma XT, Wang S, Ye YJ, Du RY, Cui ZR, Somsouk M. Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1569-1573
- 5 吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 张金池, 曾哲. 胃食管反流病与幽门螺杆菌相关胃炎及胃肠激素的关系. 世界华人消化杂志 2004;12:1100-1103
- 6 Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, Coffey RJ, Ito S, Varro A, Dockray GJ, Fox JG. Synergistic interaction between hypergastrinemia and Helicobacter pylori infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology* 2000;118:36-47
- 7 Lin A, Karin M. NF-kappa B in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* 2003;139:107-114
- 8 Yu LL, Yu HG, Yu JP, Luo HS. Nuclear factor-kappa B regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human colorectal carcinoma tissue. *Eksp Onkol* 2004;26:40-47
- 9 Ross JS, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Kaur P, Gray K, Stringer B. Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence. *Clin Cancer Res* 2004;10:2466-2472
- 10 Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, Mizuno R, Ohtsubo M, Marumo K, Shimizu N, Murai M. Increased nuclear factor-kappa B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2003;24:377-384
- 11 Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappa B puzzle. *Cell* 2002;109 Suppl:S81-S96
- 12 Yu LL, Yu HG, YU JP, Luo HS, Xu XM, Li JH. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human colorectal carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2004;10:3255-3260
- 13 Yu HG, Zhong X, Yang YN, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F. Increased expression of nuclear factor-kappaB/RelA is correlated with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:18-22

- 14 Cao HJ, Fang Y, Zhang X, Chen WJ, Zhou WP, Wang H, Wang LB, Wu JM. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of heparanase gene expression by nuclear factor kappa B in human gastric carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2005;11:903-907
- 15 Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, Yao T, Tsuneyoshi M, Noshiro H, Nakamura K, Yamanaka T, Uchiyama A, Tanaka M, Katano M. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res* 2001;7:4136-4142
- 16 Lawniczak M, Starzynska T. Helicobacter pylori CagA(+) infection in gastric cancer patients. *Pol Merkurys Lek* 2002;13:216-220
- 17 Handel ML, Mcmorrow LB, Gravalles EM. Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65. *Arthritis Rheum* 1995;38:1762-1770
- 18 Whary MT, Sundina N, Bravo LE, Correa P, Quinones F, Caro F, Fox JG. Intestinal helminthiasis in colombian children promotes a Th2 response to Helicobacter pylori: possible implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1464-1469
- 19 Ye W, Held M, Enroth H, Kraaz W, Engstrand L, Nyren O. Histology and culture results among subjects with antibodies to CagA but no evidence of Helicobacter pylori infection with IgG ELISA. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:312-318
- 20 Storskrubb T, Aro P, Ronkainen J, Vieth M, Stolte M, Wreiber K, Engstrand L, Nyhlin H, Bolling-Sternevald E, Talley NJ, Agreus L. A negative Helicobacter pylori serology test is more reliable for exclusion of premalignant gastric conditions than a negative test for current H. pylori infection: a report on histology and H. pylori detection in the general adult population. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:302-311
- 21 Kojima M, Morisaki T, Sasaki N, Nakano K, Mibu R, Tanaka M, Katano M. Increased nuclear factor-kB activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression. *Anticancer Res* 2004;24:675-681
- 22 Sovak MA, Bellas RE, Kin DW, Zanieski DJ, Rogers AE, Traish AM, Sonenshein GE. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997;100:2952-2960
- 23 Wang HT, Li ZH, Yuan JP, Zhao W, Shi XD, Tong SQ, Guo XK. Effect of Helicobacter pylori VacA on gene expression of gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2005;11:109-113
- 24 Navaglia F, Basso D, Zambon CF, Ponzano E, Caenazzo L, Gallo N, Falda A, Belluco C, Fogar P, Greco E, Di Mario F, Rugge M, Plebani M. Interleukin 12 gene polymorphisms enhance gastric cancer risk in H pylori infected individuals. *J Med Genet* 2005;42:503-510
- 25 Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, Maeda M, Yamasaki S, Kato M, Hashimoto Y, Ohshio G, Matsumoto M, Imamura M. Expression of cyclooxygenase-2 in primary and remnant gastric carcinoma: comparing it with p53 accumulation, Helicobacter pylori infection, and vascular endothelial growth factor expression. *J Surg Oncol* 2002;80:79-88
- 26 Papa A, Danese S, Sgambato A, Ardito R, Zannoni G, Rinelli A, Vecchio FM, Gentiloni-Silveri N, Cittadini A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Role of Helicobacter pylori CagA+ infection in determining oxidative DNA damage in gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:409-413
- 27 Maihofner C, Charalambous MP, Bhambra U, Lightfoot T, Geisslinger G, Gooderham NJ; Colorectal Cancer Group. Expression of cyclooxygenase-2 parallels expression of interleukin-1beta, interleukin-6 and NF-kappaB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2003;24:665-671
- 28 Ricca A, Biroccio A, Trisciuglio D, Cippitelli M, Zupi G, Del Bufalo D. relA over-expression reduces tumorigenicity and activates apoptosis in human cancer cells. *Br J Cancer* 2001;85:1914-1921
- 29 Sweeney C, Li L, Shanmugam R, Bhat-Nakshatri P, Jayaprakasan V, Baldrige LA, Gardner T, Smith M, Nakshatri H, Cheng L. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in prostate cancer in vitro and is overexpressed in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate. *Clin Cancer Res* 2004;10:5501-5507
- 30 Bueso-Ramos CE, Rocha FC, Shishodia S, Medeiros LJ, Kantarjian HM, Vadhan-Raj S, Estrov Z, Smith TL, Nguyen MH, Aggarwal BB. Expression of constitutively active nuclear-kappa B RelA transcription factor in blasts of acute myeloid leukemia. *Hum Pathol* 2004;35:246-253
- 31 Tai DI, Tsai SL, Chang YH, Huang SN, Chen TC, Chang KS, Liaw YF. Constitutive activation of nuclear factor kappaB in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;89:2274-2281
- 32 Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:119-127
- 33 Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 2001;20:4188-4197
- 34 史朝晖, 常新忠, 姜希宏, 李兆亭. 胃癌组织中核因子-kB p65的表达及其与血管内皮生长因子的关系. *中国普外基础与临床杂志* 2004;11:113-115
- 35 王维, 罗和生, 余保平. 人胃癌及癌前病变中NF-kappa B和c-myc蛋白的表达与意义. *肿瘤防治研究* 2002;29:285-287
- 36 Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Sakon M, Kameyama M, Imaoka S, Sekimoto M, Nakamori S, Monden M, Aozasa K. Expression of valosin-containing protein in colorectal carcinomas as a predictor for disease recurrence and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:651-657

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

大鼠肝癌细胞 HSV-*tk*/GCV 自杀基因系统的构建及其旁观者效应

谭宇蕙, 吴映雅, 杜标炎, 胡岳山, 赵 鹏, 李杰芬

谭宇蕙, 吴映雅, 胡岳山, 广州中医药大学生化教研室 广东省广州市 510405

杜标炎, 赵鹏, 广州中医药大学病理教研室 广东省广州市 510405

李杰芬, 广州中医药大学中医基础实验中心 广东省广州市 510405

谭宇蕙, 女, 1966-04-22生, 广东省恩平市人, 汉族, 2002年广州中医药大学中西医结合专业博士, 副教授, 生化教研室主任, 主要从事中西医结合分子肿瘤学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30171201

广州市科技计划项目, No. 2002J1-C7041

通讯作者: 杜标炎, 510405, 广州市机场路12号, 广州中医药大学病理教研室. Tyuhui66@yahoo.com.cn

电话: 020-36585475

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-16

Construction of HSV-*tk*/GCV suicide gene system for hepatocarcinoma cells and its bystander effect in rats

Yu-Hui Tan, Ying-Ya Wu, Biao-Yan Du, Yue-Shan Hu, Peng Zhao, Jie-Fen Li

Yu-Hui Tan, Ying-Ya Wu, Yue-Shan Hu, Department of Biochemistry, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Biao-Yan Du, Peng Zhao, Department of Pathology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Jie-Fen Li, Basic Experiment Center of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Supported by National Science Foundation of China, No. 30171201; and the Fund from Guangzhou Science and Technology Project, No. 2002J1-C7041

Correspondence to: Biao-Yan Du, Department of Pathology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China.

Tyuhui66@Yahoo.com.cn

Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-16

Abstract

AIM: To construct the therapeutic system of HSV-*tk*/GCV suicide gene for hepatocarcinoma cell line, and to establish a cell model and method to examine the effect of HSV-*tk*/GCV system and its bystander effect.

METHODS: CBRH7919 cells was infected by the active retrovirus particle excreted by the packaging cell line PT67/*tk*, and then a high anti-G418 clone named CBRH7919/*tk* was obtained by G418 screening for 3 wk. The total DNAs of CBRH7919 and CBRH7919/*tk* cells were extracted. The cDNA fragments of HSV-*tk* were labeled with Digoxin and then hybridized with the

DNAs of CBRH7919, CBRH7919/*tk* cells and positive controls. The CBRH7919 and CBRH7919/*tk* cells were treated with different concentrations (0.1, 1, 10, 50, and 100 mg/L) of GCV, respectively. The mixture with different ratios of *tk* positive and negative cells was also treated with GCV. The survival rates of the cells were examined by MTT assay. The bystander effect was analyzed to determine a suitable proportion of *tk* positive cells for the successive experiments.

RESULTS: A high anti-G418 clone named CBRH7919/*tk* (*tk*⁺) was obtained. The HSV-*tk* gene was detected in the CBRH7919/*tk* cells, while it was not detected in the CBRH7919 cells. GCV showed significant cytotoxicity and inhibition on the proliferation of CBRH7919/*tk* cells in a concentration- and time-dependent manner. The CBRH7919(*tk*⁻) cells manifested low sensitivity to GCV. The killing rate of GCV to the mixtures containing 5% and 10% *tk* positive cells were 6.0% and 25.2%, respectively. The sensitivity of MTT assay in the detection of the bystander effect was relatively high, and the bystander effect was low when the mixture contained 5-10% *tk* positive cells.

CONCLUSION: The therapeutic system of HSV *tk*/GCV suicide gene for hepatocarcinoma cells in rats is successfully constructed, and the mixed cells containing 5-10% *tk* positive ones can be used for further study.

Key Words: HSV *tk*/GCV; Suicide gene system; Hepatocarcinoma; Rats; Bystander effect

Tan YH, Wu YY, Du BY, Zhao P, Hu YS, Li JF. Construction of HSV-*tk*/GCV suicide gene system for hepatocarcinoma cells and its bystander effect in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2069-2073

摘要

目的: 构建针对大鼠肝癌细胞的HSV-*tk*/GCV(以下简称*tk*/GCV系统)自杀基因治疗系统, 建立比较*tk*/GCV系统作用效果及其旁观者效应大小的细胞模型和检测方法。

方法: 用包装细胞PT67/*tk*分泌的重组逆转录病毒的

活性颗粒感染大鼠肝癌CBRH7919细胞,用G418筛选3 wk获得高耐药性的重组子CBRH7919/*tk*,扩大培养.提取CBRH7919(*tk*⁻),CBRH7919/*tk*(*tk*⁺)细胞的DNA,把HSV-*tk*基因片段用Dig标记为探针后,与2种DNA及阳性对照DNA进行点杂交,以检测*tk*⁺细胞的DNA是否整合有HSV-*tk*基因.用0.1、1、10、50、100 mg/L的GCV体外作用于*tk*⁻、*tk*⁺细胞,MTT检测存活率.用GCV体外分别作用于含不同比例*tk*⁺细胞的*tk*⁺、*tk*⁻混合细胞,MTT检测存活率,比较分析各组旁观者效应大小,确定后续实验的合适*tk*⁺比例.

结果:用G418筛选3 wk后获到高耐药性的CBRH7919/*tk*(*tk*⁺)重组细胞.HSV-*tk*基因片段用Dig标记为探针后进行点杂交,检测到*tk*⁺细胞DNA上已整合有HSV-*tk*基因,而*tk*⁻细胞DNA不含HSV-*tk*基因.GCV对*tk*⁺细胞生长抑制和细胞毒作用明显,而且有浓度、时间依赖性,而*tk*⁻细胞对GCV不敏感,说明HSV-*tk*基因已表达且表达产物具有生物学活性.GCV对含5%和10%*tk*⁺的混合细胞杀伤率分别为6.0%和25.2%,结果表明5-10%的*tk*⁺混合比例下自杀基因系统自身的旁观者效应较低,而且用MTT检测旁观者效应大小时灵敏度比较高,可作为后续研究中药活性成分对旁观者效应增效作用的*tk*⁺、*tk*⁻混合比例.

结论:成功构建了针对大鼠肝癌的HSV1-*tk*/GCV自杀基因治疗系统,建立了体外快速筛选旁观者效应增效药物的稳定有效的细胞模型和检测方法.

关键词: HSV1-*tk*/GCV自杀基因系统;肝癌;大鼠;旁观者效应

谭宇慧,杜标炎,吴映雅,胡岳山,赵鹏,李杰芬.大鼠肝癌细胞HSV-*tk*/GCV自杀基因系统的构建及其旁观者效应.世界华人消化杂志2005;13(17):2069-2073
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2069.asp>

0 引言

HSV-*tk*/GCV对癌细胞的杀伤作用已进入III期临床实验^[1-4].旁观者效应(bystander effect)是肿瘤自杀基因疗法的突出优点,筛选旁观者效应增效药物的研究对推进自杀基因疗法的临床应用很有意义^[5].我们构建表达HSV-*tk*基因的大鼠肝癌重组细胞株CBRH7919/*tk*,建立针对大鼠肝癌的肿瘤自杀基因*tk*/GCV系统,通过测定*tk*/GCV系统对CBRH7919的杀伤作用和旁观者效应大小,建立快速筛选旁观者效应增效药物的细胞模型和筛选方法如下.

1 材料和方法

1.1 材料 PLXSN逆转录病毒表达载体购自美国Clontech公司;重组质粒PLXSN/*tk*和重组PT67/*tk*细胞由本课题组构建^[5];大鼠肝癌细胞株CBRH7919细胞

株购自中山大学动物中心细胞库.细胞培养板等耗材购自Corning公司,Polybrene,G418,GCV等为Sigma公司产品;DMEM,RPMI-1640,胎牛血清为Gibco公司产品;新生牛血清为杭州四季青公司产品;高纯度质粒提取、DNA片段凝胶回收、基因组DNA提取等试剂盒购自上海Sangon生物工程技术公司;Dig标记及检测试剂盒购自Roche公司.主要仪器有BNA-3210型CO2培养箱(日本Espec),电泳系统(Bio-Rad),凝胶成像系统(Syngene),倒置显微镜(重庆COIC),酶标仪(BioRad),杂交仪(北京华运).

1.2 方法 细胞培养、复苏、传代、冻存、MTT检测(四甲基偶氮比色法)等实验技术方法参考文献^[6-9].将CBRH7919细胞以 5×10^3 个/孔接种于含梯度浓度G418(0,100,200,300,400,600,800 mg/L)的6孔培养板中,每4 d换液一次,每天观察细胞,选用5 d内细胞绝大多数死亡或2 wk内细胞全部死亡的最小G418浓度为筛选浓度.把已转染重组逆转录病毒的PT67/*tk*细胞复苏,培养至对数生长期,收集滴度为 4×10^7 cfu/L的PT67/*tk*细胞上清液,经0.45 μ m孔径的过滤器过滤,吸取100 μ L加入对数生长期的CBRH7919细胞,随后加聚季丁胺(polybrene)至终浓度为8 mg/L,2 d后更换含G418的选择培养液,连续筛选2 wk后,获得抗性细胞克隆,命名为CBRH7919/*tk*.

1.2.1 点杂交鉴定*tk*基因对CBRH7919的转染 按试剂盒说明书方法提取质粒PLXSN/*tk*的DNA,经EcoRI/BamHI双酶切后,用凝胶回收试剂盒回收1.7 kb的*tk*基因片段,按Dig标记试剂盒说明书提供的方法用Dig(地高辛)试剂标记*tk*基因探针、检测标记效率.提取CBRH7919,CBRH7919/*tk*细胞的DNA,琼脂糖电泳检查后,把两种细胞各约1 μ g的DNA和1 μ g质粒PLXSN/*tk*的DNA(阳性对照),热变性后与标记好的*tk*探针进行杂交、显色反应.

1.2.2 GCV对CBRH7919/*tk*的杀伤作用 将CBRH7919(*tk*⁻)和CBRH7919/*tk*(*tk*⁺)按每孔 5×10^3 个细胞接种96孔板,每孔含培养液190 μ L,再分别加入GCV10 μ L使GCV终浓度分别为0,0.1,1,10,100 mg/L,每孔总体积200 μ L,各6个复孔,首列6孔为无细胞对照.培养48,72 h后用倒置显微镜观察细胞的变化,用MTT法检测*tk*⁻和*tk*⁺细胞在不同浓度GCV下的吸光度,计算各组存活率.

1.2.3 *tk*⁺/*tk*⁻混合比例对*tk*/GCV系统旁观者效应的影响 用高浓度的750 mg/L G418筛选已被GCV杀伤实验和点杂交鉴定的重组细胞株CBRH7919/*tk* 3 wk,以获得对G418高耐药的较纯化的*tk*⁺癌细胞集落.按*tk*⁺细胞占总细胞的0%,5%,10%,20%,30%,50%,70%,100%混合*tk*⁺和*tk*⁻细胞,培养12 h后均加入100 mg/L

的GCV; 另设不加GCV的 tk^- 和 tk^+ 的空白对照组. 各组分别置于96孔培养板, 每孔200 μ L均接种 5×10^3 个细胞, 每组6个复孔, 于37℃, 50 mL/LCO₂培养72 h, 采用MTT法检测存活率.

统计学处理 用SPSS统计软件分析, 两组间比较用LSD法.

2 结果

经对G418的敏感试验确定CBRH7919/*tk*的筛选浓度为350 mg/L. 重组病毒PLXSN/*tk*转染CBRH7919后筛选3 wk, 获得对G418高耐药性的细胞集落, 命名为CBRH7919/*tk*(tk^+ 细胞), 扩大培养.

2.1 点杂交鉴定 tk 基因对CBRH7919的转染 tk 探针标记效率较高, CBRH7919的DNA不与 tk 探针杂交, CBRH7919/*tk*的DNA和重组质粒PLXSN/*tk*的DNA均与 tk 探针杂交显色, 说明 tk 基因已转染CBRH7919并整合到CBRH7919/*tk*的DNA上.

2.2 GCV对CBRH7919/*tk*的杀伤作用 倒置显微镜下观察, tk^+ 细胞密度随GCV浓度的增高和作用时间增加而逐步减少, GCV10 mg/L以上作用48 h和GCV1 mg/L以上作用72 h的各复孔均见细胞变圆, 胞膜皱缩, 部分细胞脱落悬浮, 并有大量凋亡小体及细胞碎片产生, GCV100 mg/L组作用72 h镜下几乎不见存活细胞, 但MTT检测存活率为29.1%. GCV对 tk^+ 细胞作用72 h的IC₅₀为9 mg/L(图1, 表1). 而GCV作用于 tk^- 细胞时小于100 mg/L各浓度组细胞生长良好, 与空白对照组比较细胞密度、存活率无显著差异. 只有GCV达100 mg/L、作用72 h时 tk^- 细胞才有明显生长抑制, 存活率76.9%($P < 0.05$ vs 对照组, 表1).

2.3 tk^+ / tk^- 混合比例对 tk /GCV系统旁观者效应的影响 含0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%,

表1 GCV对 tk^+ 和 tk^- 细胞的作用 (mean $\pm$ SD, $n = 3$)

细胞	GCV (mg/L)	存活率 (%)	
		48 h	72 h
1 tk^+	0	100 $\pm$ 7.1	100 $\pm$ 3.7
2 tk^+	0.1	95.4 $\pm$ 12.1	74.8 $\pm$ 6.8 ^b
3 tk^+	1	93.2 $\pm$ 16.5	63.2 $\pm$ 6.0 ^b
4 tk^+	10	55.7 $\pm$ 8.2 ^b	49.2 $\pm$ 3.0 ^b
5 tk^+	100	37.2 $\pm$ 3.4 ^b	29.1 $\pm$ 6.4 ^b
6 tk^-	0	100 $\pm$ 9.3	100 $\pm$ 6.7
7 tk^-	0.1	97.9 $\pm$ 10.5	107.3 $\pm$ 5.9
8 tk^-	1	92.5 $\pm$ 0.7	97.9 $\pm$ 11.4
9 tk^-	10	100.6 $\pm$ 12.5	98.8 $\pm$ 3.7
10 tk^-	100	94.8 $\pm$ 11.6	76.9 $\pm$ 8.2 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 组1.

100% tk^+ 的混合细胞在100 mg/L GCV作用下存活率(%)分别为74.9 $\pm$ 10.4, 70.4 $\pm$ 2.2, 56.0 $\pm$ 5.7, 47.3 $\pm$ 2.0, 39.9 $\pm$ 9.8, 28.4 $\pm$ 2.6, 21.0 $\pm$ 2.3, 23.5 $\pm$ 1.1. 5% tk^+ 的混合细胞无明显旁观者效应, 10% tk^+ 细胞能杀伤25.2%癌细胞($P < 0.05$ vs 空白对照组), 已有明显旁观者效应, 70%以上 tk^+ 的混合细胞与100% tk^+ 细胞杀伤率已没有差异(图2). 镜下观察到的细胞已从不规则多边形全部变圆, 苔盼蓝计数法检测活细胞也为零, MTT检测存活率却达20~30%, 明显偏高. 镜检发现凋亡小体、细胞碎片也能被MTT染色(图3), 这可能是MTT检测时细胞杀伤程度越高, 结果偏高越严重的原因.

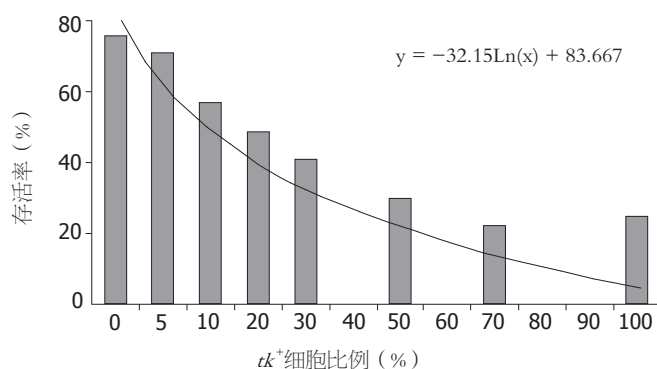


图2 GCV对含不同比例 tk^+ 的 tk^+ 、 tk^- 混合细胞旁观者效应的影响.

3 讨论

用培养PT67/*tk*的含病毒上清液感染大鼠肝癌细胞株CBRH7919, 用G418筛选获得了稳定的抗性克隆, 与Dig标记的HSV *tk*基因探针点杂交实验证明CBRH7919/*tk*细胞的DNA已整合有HSV *tk*基因, 而CBRH7919细胞不含HSV *tk*基因. GCV在体外对CBRH7919/*tk*癌细胞有明显的杀伤作用, 而对CBRH7919对照组细胞无明显毒性, 表明HSV *tk*基因已在CBRH7919/*tk*细胞中表达且产物具有生物活性. 以上结果表明已成功构建了

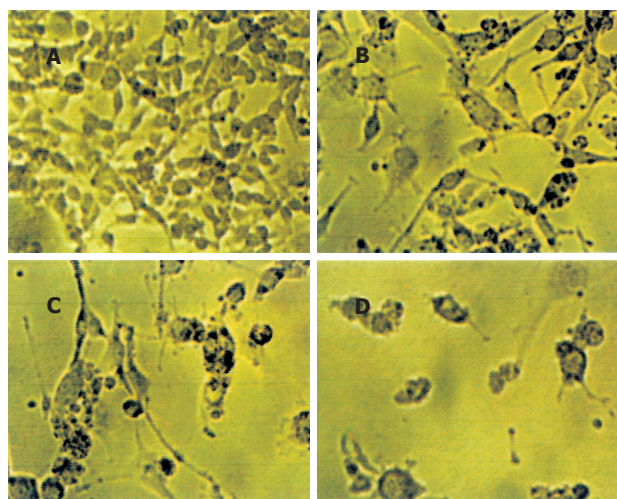


图1 GCV 72 h对 tk^+ 细胞的杀伤作用. A: GCV 0 mg/L; B: GCV 1 mg/L; C: GCV 10 mg/L; D: GCV 100 mg/L.

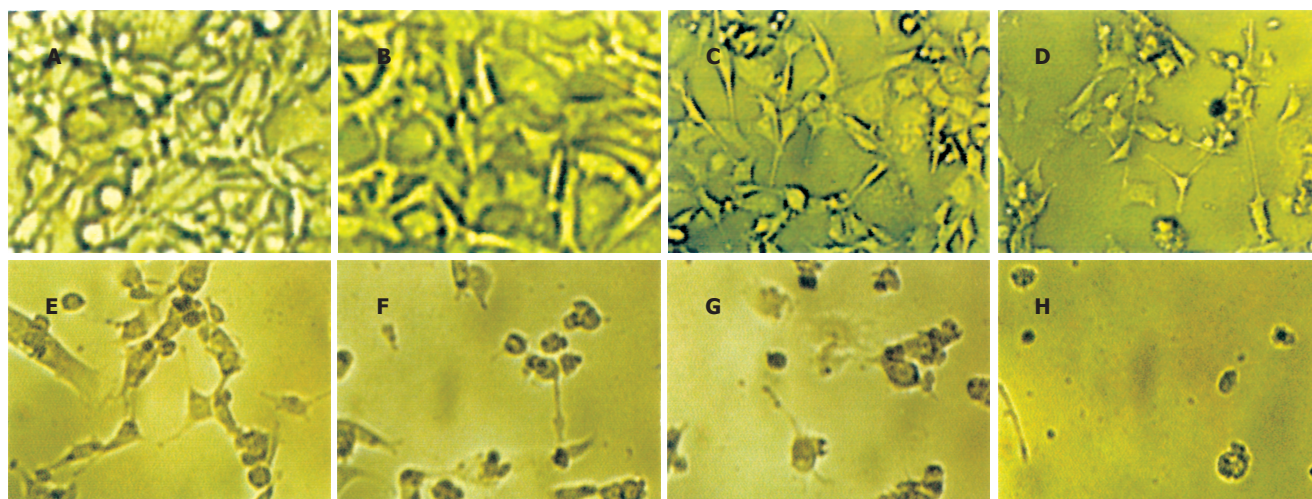


图3 GCV对含不同比例 tk^{+} 的 tk^{+} 、 tk^{-} 混合细胞旁观者效应的影响. A: 0% tk^{+} ; B: 5% tk^{+} ; C: 10% tk^{+} ; D: 20% tk^{+} ; E: 30% tk^{+} ; F: 50% tk^{+} ; G: 70% tk^{+} ; H: 100% tk^{+} .

针对大鼠肝癌的 tk /GCV系统. 旁观者效应机制主要有GJIC、细胞凋亡、免疫等介导^[5, 10-17], 但在细胞水平只能观测到通过GJIC或细胞凋亡等非整体因素介导的旁观者效应, 而不能观测免疫机制介导的旁观者效应. 我们建立了检测旁观者效应大小以及筛选其增效药物的细胞模型. 从含不同比例 tk^{+} 的混合细胞旁观者效应测定结果看, (1)CBRH7919的自杀基因旁观者效应和已报道的其他细胞系比较, 属于比较低的类型(肿瘤细胞旁观者效应普遍比正常细胞系低), 5%和10% tk^{+} 的混合细胞杀伤率分别为6.0%和25.2%, 旁观者效应仅使杀伤率增加了约1%和15%; (2)在5%和10% tk^{+} 的混合比例下 tk /GCV系统自身的旁观者效应程度较低, 有利于观察药物对旁观者效应的诱导促进作用; (3)用MTT法测定旁观者效应的大小变化时在5%和10%这两种比例下检测较灵敏: 5%组、10%组与20%组间存活率有显著差异, 而30-50%组间差异不显著, 70-100%组MTT法测定结果偏高. 另外, 10%左右 tk^{+} 的混合比例还能模拟目前临床水平10%左右较低的体内基因转染率. 因此, 结合上述结果我们把5-10% tk^{+} 确定为下一步体外筛选旁观者效应增效中药成分的 tk^{+} 、 tk^{-} 细胞混合比例.

目前, 应用HSV1- tk /GCV系统的基因疗法在国外已进入III期临床实验阶段. 然而与其他肿瘤基因治疗方案一样, 自杀基因疗法也存在缺乏高效转染载体的问题, 目的基因在体内的转染率仅为10%左右, 大大地影响了肿瘤基因治疗的临床推广应用^[18-20]. 通过寻找天然低毒的中药增强旁观者效应来提高自杀基因疗法的疗效是很有前景的增效策略. 另外, 通过细胞凋亡、GJIC等机制增强旁观者效应的药物, 本身也有直接抗肿瘤作用^[11-17]. 因此, 通过调整细胞生理, 诱导肿瘤细胞凋亡, 加强肿瘤与肿瘤细胞、肿瘤细胞与正

常细胞之间的GJIC功能, 从而使肿瘤细胞恶性生长逆转, 而且通过提高旁观者效应而增强自杀基因疗效, 有可能为肿瘤治疗提供新途径.

4 参考文献

- 1 邓洪新, 魏于全. 肿瘤生物治疗研究进展. 世界科技研究与进展 2004;26:1-6
- 2 Niculescu-Duvaz I, Springer CJ. Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy. *Mol Biotechnol* 2005;30:71-88
- 3 Seth P. Vector-Mediated cancer gene therapy: An overview. *Cancer Biol Ther* 2005;4:512-517
- 4 Perry MJ, Todryk SM, Dalglish AG. The role of herpes simplex virus thymidine kinase in the treatment of solid tumours. *Expert Opin Investig Drugs* 1999;8:777-785
- 5 杜标炎, 谭宇蕙, 吴映雅, 苏宁, 何彦丽, 钟子健. 自杀基因联合中医药治疗治疗肿瘤的设想. 广州中医药大学学报 2002;19:1-5
- 6 徐如祥, 涂艳阳, 邹春芽, 杨志林, 陈一招, 蔡颖谦, 杜谋选. 尼莫地平增强HyTK/ACV自杀基因对脑胶质瘤细胞的杀伤作用. 肿瘤防治杂志 2003;10:1129-1133
- 7 Zhang A, Wang Q, Han Z, Wu S, Chen G, Li J, Liao G, Lu Y, Ma D. Relationship between the expression of connexin43 and bystander effect of suicide gene therapy in ovarian cancer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004;24:476-479
- 8 邢毅飞, 肖亚军, 鲁功成, 曾甫清, 张齐钧, 熊平. 芹黄素提高胸苷激酶基因系统治疗前列腺癌疗效的研究. 中华实验外科杂志 2003;20:1023-1024
- 9 Huang GQ, Song Y, Zhang J, Lu YR, Xiao L, Yang Y, Guo YB. Enhancement of the bystander effect by tanshinone IIA in HSV-tk/GCV system is related to expression of connexin 43 mRNA. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004;26:146-149
- 10 Freeman SM, Whartenby KA, Freeman JL, Abboud CN, Marrogi AJ. In situ use of suicide genes for cancer therapy. *Semin Oncol* 1996;23:31-45
- 11 Kurozumi K, Tamiya T, Ono Y, Otsuka S, Kambara H, Adachi Y, Ichikawa T, Hamada H, Ohmoto T. Apoptosis induction with 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for human malignant glioma cells mediated by adenovirus. *J Neurooncol* 2004;66:117-127
- 12 陈道桢, 张丽珊. 自杀基因治疗中的旁观者效应及机制. 国外医学·遗传学分册 2002;25:199-201
- 13 Dilber MS, Abedi MR, Christensson B, Bjorkstrand B, Kidder

- GM, Naus CC, Gahrton G, Smith CI. Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo. *Cancer Res* 1997;57:1523-1528
- 14 Hamel W, Magnelli L, Chiarugi VP, Isvael MA. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res* 1996;56:2697-2702
- 15 王卫东, 陈正堂, 王志新. 缝隙连接与自杀基因旁观者效应研究进展. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2001;8:231-233
- 16 梁智勇, 史景泉. 缝隙连接细胞间通讯与肿瘤的关系. *临床与实验病理学杂志* 2001;17:432-434
- 17 Robe PA, Joloi O, N'Guyen M, Princen F, Malgrange B, Merville MP, Bours V. Modulation of the HSV-TK/ganciclovir bystander effect by n-butyrate in glioblastoma: correlation with gap-junction intercellular communication. *Int J Oncol* 2004;25:187-192
- 18 Fischer U, Steffens S, Frank S, Rainov NG, Schulze-Osthoff K, Kramm CM. Mechanisms of thymidine kinase/ganciclovir and cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy-induced cell death in glioma cells. *Oncogene* 2005;24:1231-1243
- 19 扬文字, 黄宗海. 自杀基因治疗恶性肿瘤的载体效率及基因表达. *世界华人消化杂志* 2004;12:194-198
- 20 Hadaczek P, Mirek H, Berger MS, Bankiewicz K. Limited efficacy of gene transfer in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy for brain tumors. *J Neurosurg* 2005;102:328-335

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第五届全国消化道恶性病变内镜/介入治疗研讨会会讯

本刊讯 第五届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会暨“消化道恶性梗阻的动脉内灌药联合内支架治疗应用技术”和“食管良恶性狭窄治疗新进展”国家级继续医学教育学习班定于2005-10-27至2005-10-30在江苏省南京市国际会议中心举行。“消化道恶性梗阻的动脉内灌药联合内支架治疗应用技术”是卫生部第二轮面向农村合基层适宜技术推广“十年百项”计划项目和上海市“重大医学成果转化”项目,也是国家级继续医学教育项目。本次会议由上海同仁医院和江苏省人民医院联合主办,中华消化内镜杂志、介入放射学杂志协办。会议内容涉及消化道肿瘤最新诊治进展、消化内镜操作及介入放射学操作技术。会议将邀请肖湘生、李麟荪、杨仁杰、徐克以及张齐联、林三仁、李兆生、吴云林、张志宏等国内著名的介入放射及消化内镜专家讲学研讨,并将进行食管、胆管及肠道支架安置和内镜操作技术演示。

1 会议具体安排

时间: 2005-10-27 全天报到, 2005-10-28 上午大会开幕仪式, 2005-10-28/10-29 讲座及研讨, 2005-10-30 操作演示。

地点: 南京国际会议大酒店(四星级), 会务费: 住宿代表 800 元, 非住宿代表 400 元, 未寄回执住宿代表加收 100 元。

2 会议主要议题

会议议题主要有: 消化内镜及介入医学发展现状与展望、消化道狭窄介入治疗进展、胃肠道肿瘤 CT 诊断、恶性梗阻性黄疸介入综合治疗的长期疗效及影响因素、胸腔胃痿的支架封堵技术、胃肠道支架应用技术、放疗支架临床应用、消化道恶性梗阻的动脉内灌药联合内支架治疗应用技术、食管、肠道支架并发症应对措施、胃肠道及胆道支架操作演示等。

3 其他事项

学分: 会议代表可获国家一类学分 12 分。

大会秘书处: 大会设有秘书处, 联系人程文芳、丁霞芬林征等。地址: 南京市广州路 300 号江苏省人民医院消化科。邮编: 210029。电话: 025-83674636 或 13062589271, 13851817168。Email: ruihuashi@126.com; maoaw@sohu.com。

三氧化二砷抑制小鼠体内肝癌细胞增殖的实验研究

唐印华, 田永刚, 刘铁夫, 徐洪雨, 庄丽维, 梁桃, 姜爱民

唐印华, 刘铁夫, 徐洪雨, 庄丽维, 梁桃, 姜爱民, 哈尔滨医科大学第一临床医学院消化内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001
田永刚, 哈尔滨医科大学第四临床医学院普通外科, 黑龙江省哈尔滨市 150001
唐印华, 女, 1974-06-13生, 黑龙江省大庆市人, 汉族, 1997年哈尔滨医科大学本科毕业, 2002年哈尔滨医科大学消化内科硕士研究生, 讲师, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究。
卫生部指导性课题, No. 98-2-269
黑龙江省九五攻关重大课题资助项目, No. G98L19-1
通讯作者: 唐印华, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学第一临床医学院消化内科. tangyinhu-302@163.com
电话: 0451-53643849-5263
收稿日期: 2005-06-30 接受日期: 2005-07-15

Inhibitory effect of arsenic trioxide on proliferation of hepatoma cells in mice

Yin-Hua Tang, Yong-Gang Tian, Tie-Fu Liu, Hong-Yu Xu, Li-Wei Zhuang, Tao Liang, Ai-Min Jiang

Yin-Hua Tang, Tie-Fu Liu, Hong-Yu Xu, Li-Wei Zhuang, Tao Liang, Ai-Min Jiang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Yong-Gang Tian, Department of General Surgery, the Forth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Supported by the 9th Five-Year Plan of Science and Technology of Heilongjiang Province, No. G98L19-1, and the Directive Project of Ministry of Health, No. 98-2-269
Correspondence to: Dr. Yin-Hua Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. tangyinhu-302@163.com
Received: 2005-06-30 Accepted: 2005-07-15

Abstract

AIM: To explore the arsenic trioxide(As_2O_3)-induced inhibition of the proliferation of mouse hepatoma cells *in vivo*.

METHODS: The mice bearing H_{22} solid and ascetic hepatoma cells were treated with different concentrations of arsenic trioxide. The growth of the solid tumor and the survival of the ascetic tumor-bearing mice were observed. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cyclinD₁ of the tumor cells were examined by immunohistochemical methods. The changes of cell cycle were measured by flow cytometry. The ultra-structural changes of the cells were observed under electron microscope.

RESULTS: Both high and low concentration of As_2O_3

inhibited the growth of the solid tumor and prolonged the survival time of ascetic-tumor-bearing mice, and the inhibitory rates were 39.1% and 45.7%, respectively. The life prolonging rates were 57.2% and 97.7%, respectively. The positive rates of PCNA and cyclinD₁ expression in the As_2O_3 -treated groups were significantly decreased from $57.9 \pm 6.6\%$ to $44.0 \pm 5.0\%$ ($P < 0.01$), and from $49.2 \pm 9.3\%$ to $37.6 \pm 6.3\%$ ($P < 0.01$), respectively. Flow cytometry showed that the percentage of G₀/G₁ phase cells was decreased and the percentage of G₂/M phase cells was increased. Electron microscopy showed the typical characteristics of cell apoptosis.

CONCLUSION: As_2O_3 can significantly inhibit the proliferation of mouse hepatoma cells.

Key Words: As_2O_3 ; Hepatoma; Mice

Tang YH, Tian YG, Liu TF, Xu HY, Zhuang LW, Liang T, Jiang AM. Inhibitory effect of arsenic trioxide on proliferation of hepatoma cells in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2074-2077

摘要

目的: 探讨三氧化二砷(As_2O_3)对小鼠 H_{22} 肝癌细胞增殖的抑制作用。

方法: 建立小鼠 H_{22} 肝癌实体型及腹水型移植瘤模型, 腹腔应用 As_2O_3 治疗后, 通过瘤体生长及生存时间的比较, PCNA及cyclinD₁免疫组化检测, 腹水细胞周期的流式术检测, 电镜观察等指标反映细胞增殖改变。

结果: As_2O_3 高剂量及低剂量组均有效地抑制实体瘤组荷瘤鼠皮下肿瘤的生长, 抑瘤率分别为39.1%和45.7%, 且明显延长腹水瘤组荷瘤鼠的生存时间, 延命率分别为57.2%和97.7%, 其作用呈一定的量效关系。PCNA及cyclinD₁阳性表达率均明显降低, 分别由 $57.9 \pm 6.6\%$ 降为 $44.0 \pm 5.0\%$ ($P < 0.01$), 由 $49.2 \pm 9.3\%$ 降为 $37.6 \pm 6.3\%$ ($P < 0.01$)。腹水流式细胞术可见细胞周期发生明显变化, 主要作用于G₀/G₁期及G₂/M期, 电镜观察可见细胞发生典型的凋亡形态学改变, 并可见早期凋亡小体形成。

结论: As_2O_3 对小鼠肝癌细胞的增殖具有明显的抑制作用, 具有治疗肝癌的潜在价值。

关键词: 三氧化二砷; 肝癌; 小鼠

唐印华, 田永刚, 庄丽维, 徐洪雨, 刘铁夫, 梁桃, 姜爱民. 三氧化二砷抑制小鼠体内肝癌细胞增殖的实验研究. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2074-2077

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2074.asp>

0 引言

恶性肿瘤细胞具有无限增殖的特点, 抑制肿瘤细胞生长是治疗肿瘤的重要途径之一. 砷剂是治疗恶性肿瘤的化疗药物. 近年来, As_2O_3 在急性早幼粒细胞白血病(APL)治疗的临床和基础研究上已取得很大进展^[1-4]. 国内体外研究证实, As_2O_3 能抑制多种消化道肿瘤细胞株增殖, 诱导其凋亡^[5-11], 其中对肝癌作用研究最广泛^[12-16], 但 As_2O_3 的体内抗癌抑癌作用研究尚少. 我们研究 As_2O_3 对小鼠肝癌的抑制作用, 来探讨其用于消化道肿瘤的治疗的可能性.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年昆明系小鼠, 质量18-22 g, 雌雄兼用, 由哈尔滨医科大学第一临床医学院动物室提供; H_{22} 小鼠肝癌细胞株由黑龙江省肿瘤医院检验科宋晓时老师惠赠; 1 g/L As_2O_3 溶液由哈尔滨医科大学第一临床医学院提供; PCNA, cyclinD₁mAb购于武汉博士德生物工程公司. 取 H_{22} 小鼠肝癌细胞株(荷 H_{22} 肝癌小鼠腹水), 活瘤细胞>90%, 调整细胞密度为 1×10^6 个/L, 分别接种于小鼠前肢外侧皮下制成实体型荷瘤鼠模型, 接种于小鼠腹腔内制成腹水型荷瘤鼠模型.

1.2 方法 次日实验随机分为3组, 分别腹腔注射. 对照组, 生理盐水0.2 mL; 低剂量给药组, As_2O_3 2 mg/kg约0.2 mL; 高剂量给药组, As_2O_3 4 mg/kg约0.2 mL. 每组10只, 每天给药1次, 连续10 d. 实体瘤组于停药后2 d处死, 取瘤体, 称质量, 计算抑制率=(1-给药组平均瘤质量/对照组平均瘤质量)×100%. 腹水瘤给药组与对照组小鼠比较生存时间, 计算延命率=(给药组平均存活时间/对照组平均存活时间-1)×100%. 实体瘤标本做石蜡切片, 经二甲苯脱蜡, 入水, 血清封闭, 依次加入抗PCNA及抗cyclinD₁抗体、生物素标记的二抗、ABC试剂, DAB显色, 苏木素复染, 显微镜观察. 腹水瘤组于停药后2 d, 分别自每组随机挑选小鼠8只抽取腹水, 离心, 700 mL/L乙醇固定12 h以上, 离心, 除去乙醇, 加入10 g/L RNA酶溶液200 μ L, 37℃水浴15 min, 加入碘化丙啶(PI)染色, 上流式细胞仪(美国BD公司, 型号FACSC alibur)检测细胞周期并用Lysis软件分析. 实体瘤标本用戊二醛固定, 脱水, 浸透, 环氧树脂812包埋, 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 超薄切片, 透射电镜下观察瘤细胞超微结构变化.

统计学处理 结果用平均数±标准差(mean±SD)表示, 所有资料经LYSIS II软件收集处理, 采用两组均数 t 检验.

2 结果

在实验过程中, 对照组荷瘤鼠活动减少, 步态不稳, 毛发稀疏, 进食水少, 形体消瘦呈恶病质, 其中一只在用药后5 d死亡, 而治疗组小鼠活动基本正常, 饮食状况无明显改变, 质量未见明显减轻. As_2O_3 低剂量组及高剂量组平均瘤质量低于对照组平均瘤质量, 有显著性差异(1.93 ± 0.36 g, 1.72 ± 0.42 g vs 3.17 ± 0.75 g, $P < 0.01$), 其抑瘤率分别为39.1%和45.7%, 说明 As_2O_3 能有效抑制肿瘤生长. 但高剂量组与低剂量组平均瘤重比较, 无明显差异($P > 0.05$). 同样, 腹水瘤治疗组平均生存时间明显长于对照组(17.50 ± 1.85 d, 22.0 ± 4.10 d vs 11.13 ± 2.64 d, $P < 0.01$), 延命率分别为57.2%和97.7%, 但高剂量组与低剂量组有显著性差异($P < 0.05$), 说明 As_2O_3 能明显延长肝癌小鼠的生命, 高剂量 As_2O_3 作用更明显.

2.1 PCNA及cyclinD₁免疫组织化学结果 阳性细胞为细胞核着棕黄色, 染色深度与其表达量有相关性(图1, 图2). 每张切片选染色最强、最集中的10个高倍视野(×400)共计数4000个肿瘤细胞中的阳性细胞数, 得出阳性细胞的百分数(表1). 治疗组肿瘤细胞的PCNA阳性表达率及cyclinD₁阳性表达率均低于对

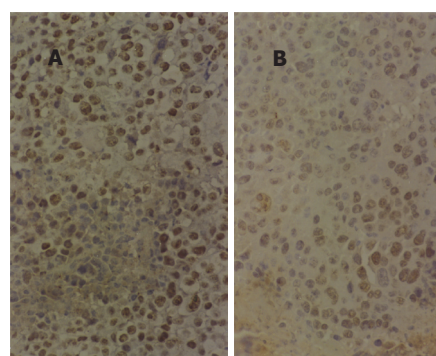


图1 各组中PCNA表达(×40). A: 生理盐水对照组; B: 高剂量 As_2O_3 治疗组.

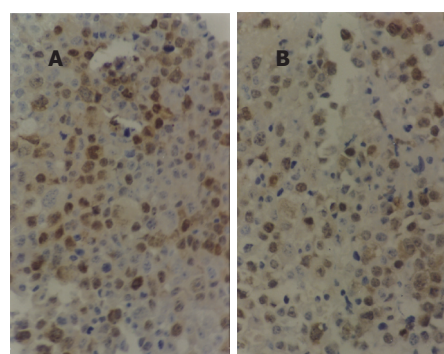


图2 各组中cyclinD₁表达(×40). A: 生理盐水对照组; B: 高剂量 As_2O_3 治疗组.

对照组 ($P < 0.01$), 有显著差异. 说明 As_2O_3 能下调 PCNA 及 cyclinD₁ 蛋白, 抑制小鼠 H_{22} 肝癌细胞的增殖.

2.2 腹水细胞周期分析结果(表1) 应用 As_2O_3 (高) 后, 小鼠腹水细胞周期发生了明显变化, G_0/G_1 期细胞从 35.8% 下降到 18.2% ($P < 0.05$), S 期细胞从 59.4% 上升到 63.5% ($P > 0.05$), 变化不明显, 而 G_2/M 期细胞由 4.8% 上升到 19.3% ($P < 0.05$). (低剂量 As_2O_3 作用后, 小鼠腹水细胞周期没有明显变化) 说明 As_2O_3 (高) 主要作用于 G_0/G_1 期及 G_2/M 期, 抑制细胞增殖作用.

表1 各组小鼠 PCNA 及 cyclinD₁ 阳性表达率和细胞周期的比较 (mean $\pm$ SD, $n = 10$)

分组	肿瘤组织		腹水细胞周期		
	PCNA 阳性	cyclinD ₁ 阳性	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	57.9 $\pm$ 6.6	49.2 $\pm$ 9.3	35.8	59.4	4.8
As_2O_3 低	49.0 $\pm$ 4.8 ^b	42.8 $\pm$ 9.0 ^b	33.9	58.4	7.7
As_2O_3 高	44.0 $\pm$ 5.0 ^b	37.6 $\pm$ 6.3 ^b	18.2 ^a	63.5 ^a	19.3 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

2.3 电镜观察结果 As_2O_3 高剂量及低剂量组均可见细胞变小, 细胞间隙增宽, 细胞表面微绒毛显著减少; 细胞核内染色质浓缩聚集, 呈团块状或花瓣状, 位于核膜内侧; 核中央可见低电子密度的染色质, 部分细胞可见核膜破裂, 胞核崩解, 形成早期凋亡小体; 胞质内线粒体轻微肿胀, 部分空泡样变, 其它细胞器结构基本正常(图3). 总的来说, 以细胞核及线粒体的变化为主, 这种变化以高剂量组更明显.

3 讨论

三氧化二砷诱导人白血病细胞株及其它肿瘤细胞株凋亡已有诸多报道^[17]. 目前, 人们已把重点转移到 As_2O_3 在动物体内抗肿瘤作用的实验研究上^[18-21]. 我们用 As_2O_3 对小鼠 H_{22} 肝癌进行体内抑癌研究, 结果表明, As_2O_3 可有效地抑制实体瘤组荷瘤鼠皮下肿瘤的生长, 并明显延长腹水瘤组荷瘤鼠的生存时间, 其作用呈一定的量效关系. 整个实验过程中, 治疗组无质

量变化等明显毒副作用. PCNA 及 cyclinD₁ 在细胞周期的调控中起关键作用^[22], 肿瘤细胞增殖越活跃, 其表达越高, 我们发现, 对照组 PCNA 及 cyclinD₁ 阳性表达率分别为 57.9% 和 49.2%, 而 As_2O_3 低剂量组二者的阳性表达率下降, 分别为 49.0% 和 42.8%, As_2O_3 高剂量组二者的阳性表达率下降的更明显, 分别为 44.0% 和 37.6%. 结果表明, As_2O_3 通过下调 PCNA 及 cyclinD₁ 蛋白的表达, 来抑制肿瘤细胞的增殖, 从而达到治疗肿瘤的目的. 应用高剂量 As_2O_3 作用后, 小鼠腹水细胞周期变化明显, G_0/G_1 期细胞从 35.8% 下降到 18.2%, G_2/M 期细胞则从 4.8% 上升到 19.3%, 说明 As_2O_3 主要作用于 G_0/G_1 期, 使其比率下降, 这种作用方式与众多 S 期抑制药物不同. G_1 期是转录过程的开始, 是细胞周期运行的关键时刻, 抑制这一时期, 能明显抑制细胞周期的正常运行. As_2O_3 这种抑制 G_1 期的作用方式, 与 Stephan *et al*^[23] 应用 hexahydrocolupulone (HHC, 25 mmol/l) 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 所报道的作用方式一致. 我们看到, As_2O_3 还作用于 G_2/M 期, 使细胞堆积于 S 期及 G_2/M 期, 阻滞细胞由 S 期- G_2 期及 G_2 -M 期的进程, 从而减慢癌细胞的增殖生长速度. 在实验中, 由于腹水里可能有一些吞噬细胞对肿瘤细胞有吞噬作用, 又由于一些坏死细胞在崩解之前难于与活的肿瘤细胞区别, 因此, FCM 显示 S 期细胞比率比 G_0/G_1 期细胞比率高, 这并不能代表癌细胞的 DNA 合成总量增多. 电镜观察下我们发现 As_2O_3 主要作用于细胞核及线粒体, 使其基本符合细胞凋亡的形态学特征, 且见到早期凋亡小体, 说明 As_2O_3 可诱导肝癌细胞凋亡.

本实验结果显示 As_2O_3 具有: (1) 抑制实体型荷肝癌小鼠皮下肿瘤的生长; (2) 延长腹水型荷肝癌小鼠的生存时间; (3) 下调 PCNA 及 cyclinD₁ 蛋白的表达; (4) 减少细胞周期中 G_0/G_1 期百分率, 提高 G_2/M 期百分率; (5) 形成早期凋亡小体. 这些方面均有力地证实了 As_2O_3 对体内肝癌细胞的作用, 为临床应用 As_2O_3 治疗肝癌提供了可靠依据. 至于 As_2O_3 这种体内抗肝癌作用的机制有待于我们进一步研究.

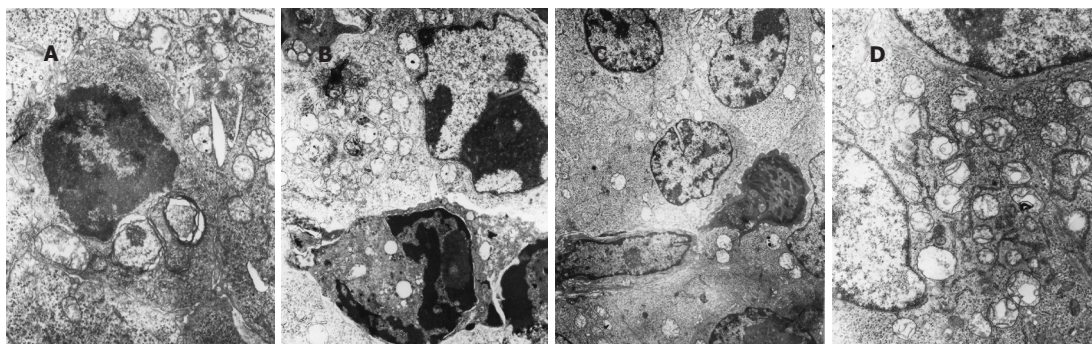


图3 As_2O_3 作用后电镜下细胞变化. A: 低剂量; B, D: 高剂量; C: 治疗组.

4 参考文献

- 1 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 施福东, 邱凤琴, 洪珞珈, 韩雪英, 杨惠芬, 宋颖昭, 刘艳平, 周晋, 金镇敏. 三氧化二砷注射液治疗72例急性早幼粒细胞白血病. 中华血液学杂志 1996;17:58-60
- 2 Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997;89:3354-3360
- 3 Jing Y, Dai J, Chalmers-Redman RM, Tatton WG, Waxman S. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood* 1999;94:2102-2111
- 4 高飞, 易静, 史桂英, 李慧, 金慧芳, 石学耕, 汤雪明. 活性氧水平决定白血病细胞对三氧化二砷诱导凋亡的敏感性. 生物化学与生物物理学报 2001;33:585-589
- 5 涂水平, 江石湖, 谭继宏, 蒋晓华, 乔敏敏, 章永平, 吴云林, 吴裕忻. 氧化砷抑制胃癌SGC-7901细胞增殖和诱导凋亡作用. 世界华人消化杂志 1999;7:18-21
- 6 邵钦树, 叶再元, 凌志强. 三氧化二砷诱导人胃癌MKN45细胞凋亡及其分子机制的初步研究. 中华胃肠外科杂志 2004;7:55-57
- 7 Gu QL, Li NL, Zhu ZG, Yin HR, Lin YZ. A study on arsenic trioxide inducing in vitro apoptosis of gastric cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2000;6:435-437
- 8 Shen ZY, Shen J, Cai WJ, Hong C, Zheng MH. The alteration of mitochondria is an early event of arsenic trioxide induced apoptosis in esophageal carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2000;5:155-158
- 9 Xie DX, Yin S, Ou YX. Arsenic trioxide (As₂O₃) induced apoptosis and its mechanisms in a human esophageal squamous carcinoma cell line. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:280-285
- 10 Chen QK, Yuan SZ, Huang ZQ. Arsenic trioxide-induced apoptosis and arrest of cell cycle in pancreatic cancer. *Zhonghua yixue zazhi* 1998;78:578-579
- 11 刘琳, 邱少敏, 赵伟, 夏海鸣, 秦叔逵, 陈惠英. 三氧化二砷诱导人类大肠癌细胞凋亡的分子机制. 世界华人消化杂志 2004;12:1550-1554
- 12 Oketani M, Kohara K, Tuvdendorj D, Ishitsuka K, Komorizono Y, Ishibashi K, Arima T. Inhibition by arsenic trioxide of human hepatoma cell growth. *Cancer Lett* 2002;183:147-153
- 13 陈惠英, 刘文虎, 秦叔逵. 三氧化二砷对肝癌细胞株凋亡的诱导作用. 世界华人消化杂志 2000;8:532-535
- 14 徐洪雨, 高媛媛, 武俏丽, 高光强, 杨幼林, 陈淑香, 刘铁夫. 三氧化二砷抑制人肝癌细胞株增殖和诱导凋亡作用. 世界华人消化杂志 2000;8:1233-1237
- 15 刘连新, 姜洪池, 朱安龙, 周津, 王秀琴, 吴旻. 三氧化二砷对肝癌细胞凋亡的诱导及机制的探讨. 中华医学杂志 2001;81:1526-1527
- 16 苏颖, 陈增, 林可焯, 邹长棣, 林华妹. 三氧化二砷抑制肝癌细胞端粒酶表达及诱导细胞凋亡作用. 世界华人消化杂志 2003;11:264-267
- 17 高虎, 赵治华, 杨峰. 三氧化二砷诱导细胞凋亡治疗消化道肿瘤的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:710-711
- 18 谭兵, 黄介飞, 魏群, 张弘, 倪润洲. 砷剂对实验性鼠肝癌血管生成的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:32-37
- 19 华海清, 秦叔逵, 王锦鸿, 陈惠英. 三氧化二砷抗肿瘤血管形成研究. 世界华人消化杂志 2004;12:27-31
- 20 陈洪, 秦叔逵, 潘麒麟, 陈惠英, 马军. 三氧化二砷抗肝癌作用的实验研究. 中华肝脏病杂志 2000;8:27-29
- 21 邓友平, 林晨, 张雪艳, 冯璞, 肖培根, 吴旻. 三氧化二砷抗肿瘤作用的研究. 中国中药杂志 1999;24:174-175
- 22 Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994;369:574-578
- 23 Stephan TE, Ngo EO, Nutter LM. Hexahydrocolupulone and its antitumor cell proliferation activity in vitro. *Biochem Pharmacol* 1998;55:505-514.

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

广东中西医结合、中医消化病学术会议

本刊讯 广东中西医结合、中医消化病学术会议定于 2005-11 在广州召开, 现将征稿通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文、结构式摘要(800 字左右)各一份, 电脑打印(附软盘), 2005-09-30 截稿。

2 联系方式

广东省广州市广州大道北 1838 号南方医院消化科 智发朝 教授, 电话: 020-65641531.

乙肝疫苗联合含CpG基序寡脱氧核苷酸和卡介苗对小鼠的免疫应答影响

王甦, 陈群, 王兴, 张燕, 马丽, 汪中强

王甦, 王兴, 张燕, 扬州大学医学院附属医院传染科 江苏省扬州市 225001

陈群, 扬州大学医学院形态学教研室 江苏省扬州市 225001

马丽, 汪中强, 扬州大学医学院附属医院血液科 江苏省扬州市 225001

王甦, 男, 1965-02-05生, 泰州市姜堰市人, 汉族, 2003年四川大学华西临床医学院医学博士, 副主任医师, 主要从事病毒性肝炎的研究。

扬州大学自然科学基金资助项目

江苏省扬州市卫生局资助项目, No. K0111237

通讯作者: 陈群, 225001, 江苏省扬州市淮海路11号, 扬州大学医学院形态学教研室。

收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-13

Effect of hepatitis B vaccine with CpG oligodeoxynucleotide or Bacilli Calmette Guerin on immune responses in mice

Su Wang, Qun Chen, Xing Wang, Yan Zhang, Li Ma, Zhong-Qiang Wang

Su Wang, Xing Wang, Yan Zhang, Department of Infection Diseases of Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Qun Chen, Department of Morphology of Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Li Ma, Zhong-Qiang Wang, Department of Blood Disease of Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Yangzhou University, and the Fund from Health Administration of Yangzhou, Jiangsu Province, No. K0111237

Correspondence to: Qun Chen, Department of Morphology of Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Received: 2005-05-28 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To investigate the effects of hepatitis B vaccine with CpG oligodeoxynucleotide (ODN) or Bacilli Calmette Guerin on the immune responses in mice.

METHODS: BALB/c mice were subcutaneously injected with different doses of hepatitis B vaccine (0.25, 0.75, 1.0 μ g) combined with CpG ODN or BCG. The levels of serum hepatitis surface antibody (anti-HBs) were detected by ELISA assays two and four weeks after injection. The changes of peripheral blood T lymphocyte subsets CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ ratio were detected by flow cytometry.

RESULTS: Four weeks after injection, the levels

of serum anti-HBs in the mice injected with the combination of CpG ODN and hepatitis B vaccine (0.75 and 1.0 μ g, respectively) were significantly higher than that with CpG ODN and 0.25 μ g hepatitis B vaccine (420.56 $\pm$ 55.66 vs 181.62 $\pm$ 41.25, $t = 0.013$, $P < 0.05$; 403.38 $\pm$ 63.85 vs 181.62 $\pm$ 41.25; $t = 0.024$, $P < 0.05$). Compared with that in the mice only injected with hepatitis B vaccine, the serum anti-HBs levels in the ones injected with the combination of CpG ODN and hepatitis B vaccine (0.25 and 0.75 μ g, respectively) were markedly higher (181.62 $\pm$ 41.25 vs 59.16 $\pm$ 18.43, $t = 0.022$, $P < 0.05$; 420.56 $\pm$ 55.66 vs 241.82 $\pm$ 23.84, $t = 0.018$, $P < 0.05$). The serum anti-HBs levels in the mice injected with the combination of BCG and hepatitis B vaccine were not significantly different from that with hepatitis B vaccine only. Whereas compared with that in the CpG ODN combination groups, the serum anti-HBs levels were lower in the mice injected with the combination of BCG and 0.25 or 0.75 μ g hepatitis B vaccine. The percentages of CD4⁺ and the CD4⁺/CD8⁺ ratio in the mice immunized by CpG ODN combined with hepatitis B vaccine increased significantly as compared with those with hepatitis B vaccine only and the BCG combination group (CD4⁺: 38.30 $\pm$ 1.68% vs 31.47 $\pm$ 2.15%, $t = 0.018$, $P < 0.05$; 38.30 $\pm$ 1.68 vs 29.31 $\pm$ 2.97, $t = 0.013$, $P < 0.05$; CD4⁺/CD8⁺: 9.01 $\pm$ 0.38 vs 6.45 $\pm$ 0.39, $t = 0.000$, $P < 0.05$; 9.01 $\pm$ 0.38 vs 6.99 $\pm$ 0.79, $t = 0.029$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: CpG ODN combined with hepatitis B vaccine not only induces high level of anti-HBs, but also enhances the cellular immune responses.

Key Words: CpG oligodeoxynucleotide; Bacilli Calmette Guerin; Hepatitis B vaccine; Anti-HBs; CD4⁺; CD8⁺

Wang S, Chen Q, Wang X, Zhang Y, Ma L, Wang ZQ. Immunogenic effect of hepatitis B vaccine with CpG oligodeoxynucleotide and BCG on mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2078-2081

摘要

目的: 观察乙肝疫苗联合CpG ODN和卡介苗免疫小鼠, 对小鼠抗HBs水平和细胞免疫的影响。

方法: 不同剂量乙肝疫苗单用或联合CpG ODN或卡介苗免疫小鼠, 用ELISA方法检测抗HBs水平, 流式细胞仪检测外周血CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞亚群的百分比和比值。

结果: 免疫4 wk后, 中、高剂量乙肝疫苗联合CpG ODN组抗HBs水平显著高于低剂量乙肝疫苗组 (420.56 ± 55.66 vs 181.62 ± 41.25 , $t = 0.013$, $P < 0.05$; 403.38 ± 63.85 vs 181.62 ± 41.25 ; $t = 0.024$, $P < 0.05$)。但中、高组间无差别。CpG ODN联合组与单用乙肝疫苗组比较, 联合低、中剂量乙肝疫苗抗HBs水平较单用乙肝疫苗明显升高 (181.62 ± 41.25 vs 59.16 ± 18.43 , $t = 0.022$, $P < 0.05$; 420.56 ± 55.66 vs 241.82 ± 23.84 , $t = 0.018$, $P < 0.05$)。但高剂量乙肝疫苗联合组与单用乙肝疫苗比较两组间未显示明显差别。且以CpG ODN联合中等量乙肝疫苗产生的抗HBs水平最高。卡介苗联合组与单用乙肝疫苗组无差别, 但在联合低、中剂量乙肝疫苗抗HBs水平低于CpG ODN联合组。CpG ODN联合组CD4⁺T淋巴细胞百分比和CD4⁺/CD8⁺比值明显高于单用乙肝疫苗组和卡介苗联合组 (CD4⁺: 38.30 ± 1.68 vs 31.47 ± 2.15 , $t = 0.018$, $P < 0.05$; 38.30 ± 1.68 vs 29.31 ± 2.97 , $t = 0.013$, $P < 0.05$; CD4⁺/CD8⁺: 9.01 ± 0.38 vs 6.45 ± 0.39 , $t = 0.000$, $P < 0.05$; 9.01 ± 0.38 vs 6.99 ± 0.79 , $t = 0.029$, $P < 0.05$)。

结论: CpG ODN联合乙肝疫苗不仅能诱导出高水平的抗HBs, 而且对细胞免疫也有调节作用。

关键词: CpG ODN; 卡介苗; 乙肝疫苗; 乙肝表面抗体; CD4⁺; CD8⁺

王甦, 陈群, 王兴, 张燕, 马丽, 汪中强. 乙肝疫苗联合含CpG基序寡脱氧核苷酸和卡介苗对小鼠免疫应答影响. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2078-2081

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2078.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染呈全球范围广泛流行。HBV感染可引起急性、慢性和重型肝炎, 并与肝硬化、肝癌的发生密切相关, 是严重危害人类健康的感染性疾病, 且目前尚缺乏可靠的治疗方法。因而人们不断寻求新的预防和治疗措施来控制乙型病毒性肝炎。近年来, 发现细菌DNA中含非甲基化CpG基序具有免疫刺激作用, 人工合成含非甲基化CpG基序的寡脱氧核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide, CpG ODN)也有同样免疫作用^[1,2]。大量研究表明CpG ODN不仅能诱导出高水平的保护性抗体, 而且能诱导出强烈的TH1型细胞免疫应答^[3,4]。我们探讨含CpG基序的寡脱氧核苷酸(CpG ODN)和卡介苗联合乙肝疫苗对小鼠抗HBs水平和细胞免疫的影响, 为乙肝的预防与特异性免疫治疗

提供新的方案。

1 材料和方法

1.1 材料 雌性BALB/c小鼠45只, 6-8周龄, 清洁级, 每只20-25 g, 购于扬州大学实验动物中心。CpG ODN碱基序列为5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3', 由上海博亚生物技术有限公司合成。乙肝疫苗为北京天坛生物制品股份有限公司生产。卡介苗为成都生物制品研究所提供。FITC标记的抗小鼠CD4 mAb和PE标记的抗小鼠CD8 mAb, 对照试剂分别为FITC标记的抗鼠IgG2b, PE标记的抗鼠IgG2a, 购自eBioscience公司。定量检测乙肝病毒表面抗体(抗HBs)试剂盒购自解放军总医院东亚免疫所。流式细胞仪为美国Becton-Dickon公司FACSCalibur。

1.2 方法 经小鼠尾根部皮下免疫BALB/c小鼠。乙肝疫苗与CpG ODN混合液配制: 乙肝疫苗分低、中、高剂量(0.25, 0.75, 1.0 μg), 分别溶于20 μg CpG ODN。乙肝疫苗与卡介苗混合液配制: 乙肝疫苗低、中、高剂量(0.25, 0.75, 1.0 μg), 分别与0.1 mg卡介苗溶于注射用水。实验小鼠共分3大组9小组(每组5只)。其中, A组单用乙肝疫苗组分: (A1)乙肝疫苗0.25 μg, (A2)乙肝疫苗0.75 μg, (A3)乙肝疫苗1.0 μg; CpG ODN联合乙肝疫苗联合组为B组分: (B1)乙肝疫苗0.25 μg+CpG ODN 20 μg, (B2)乙肝疫苗0.75 μg+CpG ODN 20 μg, (B3)乙肝疫苗1.0 μg+CpG ODN 20 μg; 卡介苗联合乙肝疫苗联合组为C组分: (C1)乙肝疫苗0.25 μg+卡介苗0.1 mg, (C2)乙肝疫苗0.75 μg+卡介苗0.1 mg, (C3)乙肝疫苗1.0 μg+卡介苗0.1 mg。免疫后2及4 wk采小鼠眼球血, 分离血清, -20 ℃保存。由专人用同一批号的ELISA检测抗-HBs, 操作按说明书进行, 测定吸光度值 A_{450nm} 。肝素抗凝血, 供T淋巴细胞亚群分析用。方法: 50 μL抗凝全血, 加FITC标记的抗小鼠CD4 mAb 1.5 μL, 加PE标记的抗鼠CD8 mAb 2.5 μL, 室温孵育15 min, 避光, 然后用NH₄Cl低渗溶液2 mL, 室温放置8 min, 裂解红细胞; 低速离心, 去上清, 沉淀加PBS 2 mL重悬, 再低速离心, 去上清; 沉淀加PBS 200 μL重悬上机, 开窗于淋巴细胞区域, 计数10000个细胞。机带软件分析CD4⁺, CD8⁺T淋巴细胞百分比。

统计学处理 采用SPSS 11软件统计, 两组间数据比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 小鼠抗HBs水平(IU/L) 单用乙肝疫苗组在接种后2 wk不同剂量产生的抗体产生水平没有明显差别。CpG ODN联合乙肝疫苗组接种2 wk后显示:

CpG ODN联合中、高剂量乙肝疫苗其抗HBs水平高于联合低剂量乙肝疫苗组,也高于单用乙肝疫苗组高($P<0.05$).卡介苗联合乙肝疫苗组接种2 wk后显示:随着乙肝疫苗的剂量增加,抗体水平逐渐升高($P<0.05$),且卡介苗联合高剂量乙肝疫苗组明显高于单用乙肝疫苗组和CpG ODN联合组($P<0.05$,图1).接种后4 wk后,单用乙肝疫苗组,随着疫苗量的增加,抗体水平逐渐升高,各组间有显著差异($P<0.05$).CpG ODN联合乙肝疫苗组显示联合中、高剂量乙肝疫苗组抗HBs水平显著高于联合低剂量乙肝疫苗组($P<0.05$).但中、高组间无差别.卡介苗联合乙肝疫苗组也显示抗体水平逐渐升高,且各组间也有差异($P<0.05$,图2).同时比较各组间接种4 wk后抗体水平时发现:CpG ODN联合低、中剂量乙肝疫苗抗HBs水平较单用乙肝疫苗明显升高($P<0.05$).但高剂量乙肝疫苗联合组与单用乙肝疫苗比较时,两组间未显示明显差别.卡介苗联合组与单用乙肝疫苗组未显示差别,但在联合低、中剂量乙肝疫苗组低于CpG ODN联合组($P<0.05$,图2).单用乙肝疫苗组、CpG ODN联合乙肝疫苗组以及BCG联合乙肝疫苗组免疫小鼠2 wk和4 wk后抗HBs水平的比较均显示各组免疫4 wk后抗体明显高于2 wk时抗体水平(图3).

2.2 各组免疫小鼠外周血T淋巴细胞亚群的变化 免疫4 wk后, CpG ODN联合乙肝疫苗组CD4⁺T淋巴细胞百分

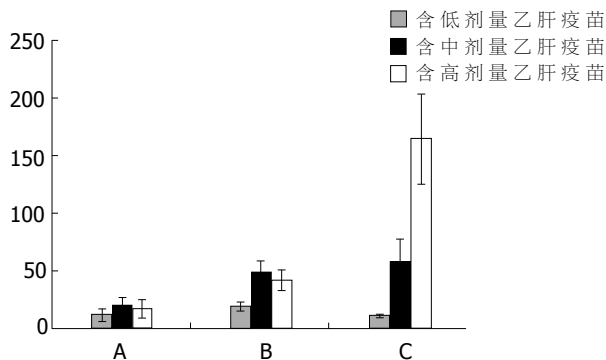


图1 小鼠免疫2 wk后抗HBs水平.

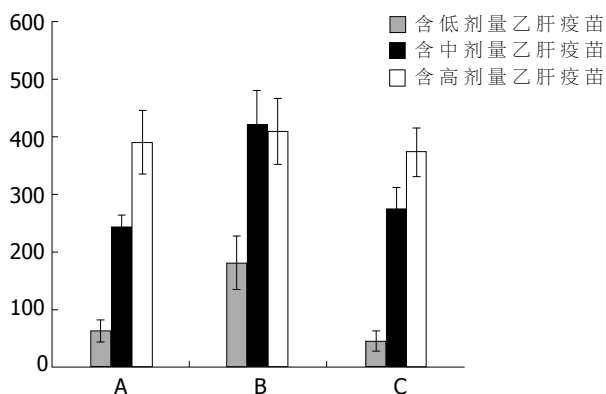


图2 小鼠免疫4 wk后抗HBs水平.

比较单用乙肝疫苗组和卡介苗联合组明显升高, CD4⁺/CD8⁺比例升高($P<0.05$). CD8⁺T淋巴细胞百分比与两组无差别.卡介苗联合组CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分比、CD4⁺/CD8⁺比例与单用乙肝疫苗组无明显差别(表1).

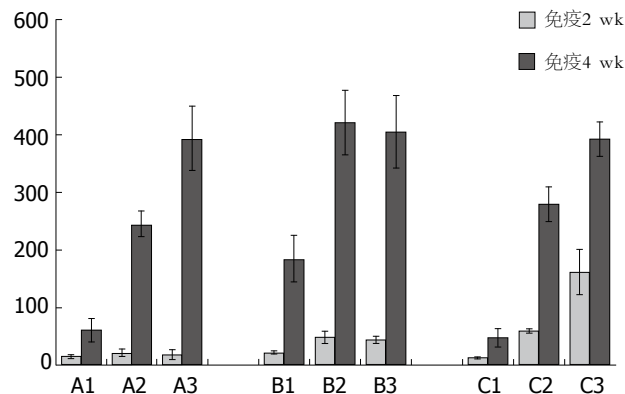


图3 小鼠免疫2 wk和4 wk后抗体水平.

表1 不同组别免疫小鼠CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞百分比和CD4⁺/CD8⁺比值

分组	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
单用乙肝疫苗	31.47 ± 2.15	4.89 ± 0.18	6.45 ± 0.39
CpG ODN联合乙肝疫苗	38.30 ± 1.68 ^a	4.33 ± 0.22	9.01 ± 0.38 ^a
卡介苗联合乙肝疫苗	29.31 ± 2.97	4.33 ± 0.20	6.99 ± 0.79

^a $P<0.05$ vs 单用乙肝疫苗组, ^c $P<0.05$ vs 卡介苗联合乙肝疫苗组.

3 讨论

CpG ODN对机体各种免疫细胞都具有免疫刺激作用. CpG ODN是一些含有CpG二核苷酸, 并且具有免疫激活作用的寡核苷酸. 它通过内吞作用和/与Toll样受体9 (TLR9) 相互作用能直接影响B细胞、巨噬细胞和树突状细胞. 能引起B细胞分化, 直接刺激B细胞分泌IL6, IL10等细胞因子和免疫球蛋白, 诱导B细胞表面共刺激分子的表达, 包括MHC II, B7-1和B7-2. 能直接激活抗原递呈细胞(APC), 包括单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞, 诱导其产生IL12, TNF- α 等Th1型为主的细胞因子, 并可上调MHC和共刺激分子的表达^[3,6,7]. 大量动物实验证明^[8], CpG ODN作为佐剂可增强多种外源性抗原, 包括HBsAg的免疫原性, 诱发HBsAg低反应动物(C57BL6小鼠, 新生小鼠)对HBsAg产生体液及细胞免疫反应, 是一种强的Th1型免疫. 我们选取雌性BALB/c小鼠, 采用CpG ODN和卡介苗联合不同剂量乙肝疫苗免疫小鼠. 结果显示CpG ODN具有明显的免疫刺激作用. 在免疫2 wk后, 联合组在联合中、高剂量乙肝疫苗免疫小鼠其抗HBs水平较单用乙肝疫苗组高($P<0.05$), 表明CpG ODN能早期提高抗体水平. 在免疫4 wk后, 将单用乙肝疫苗组与联合组比较发现,

CpG ODN联合低、中剂量乙肝疫苗较单用乙肝疫苗明显升高($P<0.05$). 但CpG ODN联合高剂量乙肝疫苗与单用乙肝疫苗($1.0\ \mu\text{g}$)比较时, 两组间未显示明显差别. 同时免疫4 wk后, 联合组显示CpG ODN联合中、高剂量乙肝疫苗组显著高于联合低剂量乙肝疫苗组($P<0.05$). 但中、高组间无差别. 而且我们发现CpG ODN联合中等剂量乙肝疫苗($0.75\ \mu\text{g}$)产生的抗体水平最高. 肖昕 *et al*^[5]在用不同剂量CpG ODN($10, 20, 40\ \mu\text{g}$)联合乙肝疫苗免疫小鼠, 同样也观察到抗体水平不随CpG ODN剂量的增加而增加. Davis^[1]研究发现, 少至 $10\ \mu\text{g}$ 量的CpG ODN就可以获得很完全的免疫刺激效果. 因此, 如果CpG ODN剂量太少, 刺激强度不够, 则会影响免疫效力; 而如果CpG ODN剂量太大, 则可能会增加不良反应, 且造成不必要的浪费. 提示CpG ODN与疫苗需有适当比例, 才能产生较好的免疫作用. 我们从另一角度(通过改变乙肝疫苗的量)阐明CpG ODN与乙肝疫苗适当比例可能产生较好的免疫效果.

目前大多研究显示卡介苗联合乙肝疫苗对HBsAb的产生, 有增强和优化作用^[9,10]. 本研究显示, 卡介苗联合乙肝疫苗组与单用乙肝疫苗组比较, 免疫2 wk后, 高剂量乙肝疫苗联合卡介苗组抗体水平较单用高剂量乙肝疫苗高, 但其它两组间无差别; 且免疫4 wk后, 联合组与单用组无差别. 在与CpG ODN联合组比较时, 4 wk后, 低、中剂量联合组抗体水平低于CpG ODN联合组($P<0.05$). 说明卡介苗联合乙肝疫苗, 没有明显增加抗体水平, 有待进一步研究. 应用流式细胞对T淋巴细胞CD4⁺和CD8⁺亚群分析显示: CpG ODN联合组CD4⁺T淋巴细胞百分比明显高于单用乙肝疫苗组和卡介苗组($P<0.05$), CD8⁺T淋巴细胞百分比两组无明显差别. CD4⁺/CD8⁺比值CpG ODN联合组也明显高于单用乙肝疫苗组和卡介苗组($P<0.05$). 因而可以看出, 乙肝疫苗联合CpG ODN不仅能诱导出高水平的抗HBs, 而且对细胞免疫也有调节作用. 这种体液/细胞免疫均衡应答对治疗慢性乙型肝炎可能是很有价值的: 抗体能降低病毒载量和防止HBV对未感染细胞的感染;

细胞免疫的激活可以通过凋亡机制或分泌炎症因子杀伤病毒感染的细胞或抑制感染细胞中的病毒复制, 使细胞破裂, 病毒释放出来, 可以通过特异性的抗体与之中, 使其失去再感染的能力, 从而可以达到清除病毒的目的.

本研究进一步证明CpG ODN对免疫激活作用, 同时显示CpG ODN联合乙肝疫苗在适当的比例时, 可产生最好的免疫效果(CpG ODN联合 $0.75\ \mu\text{g}$ 乙肝疫苗). 因此, 如何调整CpG ODN与疫苗的比例, 对更好地激活机体的免疫反应是非常重要的, 也是今后研究的方向. 因此, 随着对CpG ODN研究的深入, CpG ODN不仅可用于乙肝疫苗良好的佐剂, 而且也可能是低反应个体的有效预防性疫苗. CpG ODN联合乙肝疫苗还可能成为一种潜在的HBV持续感染患者的治疗性疫苗.

4 参考文献

- 1 Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 1998;160:870-876
- 2 何春艳, 刘文良. 包裹天然骨架CpG ODN和HBsAg的非磷脂脂质体疫苗的免疫效果. *现代免疫学* 2004;24:43-47
- 3 Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;374:546-549
- 4 马艳琴, 李光富. CpG DNA的免疫学作用及其应用. *国外医学·免疫学分册* 2003;26:318-321
- 5 肖昕, 徐春光, 熊爱华, 蒋建伟, 徐燕芳. 含CpG基序的寡聚脱氧核糖核苷酸辅助乙肝疫苗对孕鼠和仔鼠的免疫效果. *实用儿科临床杂志* 2004;19:484-486
- 6 Bauer M, Heeg K, Wagner H, Lipford GB. DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology* 1999;97:699-705
- 7 Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-745
- 8 Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997;186:1623-1631
- 9 常宝祥, 赵昌文, 王恩杰. 乙肝基因重组疫苗与卡介苗联合免疫效果观察. *实用新医学* 2002;4:332-333
- 10 崔玉梅, 白新卿, 裴晓春, 梁维民, 李群英. 卡介苗优化乙型肝炎疫苗、白百破、三联疫苗的免疫应答作用. *中国生物制品学杂志* 1994;7:80-82

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

荔枝核总黄酮的抗鸭乙型肝炎病毒作用

徐庆, 宋芸娟, 李丽亚, 侯巧燕

徐庆, 李丽亚, 侯巧燕, 桂林医学院药理教研室 广西壮族自治区桂林市 541004

宋芸娟, 广西药用植物园 广西壮族自治区南宁市 530023

徐庆, 男, 1956年生, 汉族, 山东省胶州市人, 1990年广西中医学院硕士, 教授, 主要从事抗病毒抗肿瘤天然药物研究。

广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能), No. 0330015-4C

通讯作者: 徐庆, 541004, 广西壮族自治区桂林市, 桂林医学院药理教研室. xq5895801@163.com

电话: 0773-5895801

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-08

Effect of total flavone of *Litchi Chinensis* Sonn on duck hepatitis B virus

Qing Xu, Yun-Juan Song, Li-Ya Li, Qiao-Yan Hou

Qing Xu, Li-Ya Li, Qiao-Yan Hou, Department of Pharmacology, Guilin Medical College, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yun-Juan Song, Medicinal Garden of Guangxi, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by the Science and Technology Plan of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0330015-4C

Correspondence to: Qing Xu, Department of Pharmacology, Guilin Medical College, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. xq5895801@163.com

Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-08

Abstract

AIM: To study the anti-duck hepatitis B virus (DHBV) action of the total flavone of *Litchi Chinensis* Sonn (TFL).

METHODS: Guilin ducklings with congenital infection of DHBV were used as the animal model. TFL was orally given to the ducks with the doses 2 g/(kg·d) and 1 g/(kg·d) for 15 days. The expression of DHBV DNA was detected by spot blot hybridization before and after TFL was given. The pathological changes of the duck liver were also examined by HE staining.

RESULTS: TFL at the dose of 2 g/(kg·d) can lower the level of serum DHBV DNA significantly (*vs* control group: 0.74 ± 0.42 *vs* 1.64 ± 0.68 , $P < 0.05$) 15 days after treatment. No marked necrosis was observed in the liver of high dose group (0/6), but 4 of 6 cases appeared obvious necrosis in control group after treatment. There was significant difference between them ($P < 0.05$).

CONCLUSION: TFL can protect duck liver against inflammation by the inhibition of DHBV.

Key Words: Total flavone of *Litchi Chinensis* Sonn; Anti-hepatitis B virus; Duck hepatitis B model

Xu Q, Song YJ, Li LY, Hou QY. Effect of total flavone of *Litchi Chinensis* Sonn on duck hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2082-2085

摘要

目的: 研究荔枝核总黄酮(TFL)抗鸭乙型肝炎病毒(DHBV)的作用。

方法: 采用桂林先天感染DHBV的麻鸭为动物模型, 荔枝核总黄酮灌胃给药, 2 g/(kg·d)与1 g/(kg·d), 共15 d, 斑点杂交法观察用药前与用药后(1、5、10、15 d)及停药后5 d血清中DHBV DNA表达, HE染色观察肝脏组织病理学变化。

结果: TFL 2 g/(kg·d)于用药后15 d血清DHBV DNA水平为 0.74 ± 0.42 , 与生理盐水对照组 1.64 ± 0.68 比较, 明显降低(*vs* 对照组, $P < 0.05$ (0/6)), 病理检查发现TFL大剂量组实验鸭肝细胞未发现明显的点灶坏死(0/6), 与生理盐水对照组(4/6)比较有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: TFL有抑制乙肝病毒的作用, 并具有明显的抗炎、保肝作用。

关键词: 荔枝核总黄酮; 抗乙肝病毒; 鸭乙肝模型

徐庆, 宋芸娟, 李丽亚, 侯巧燕. 荔枝核总黄酮的抗鸭乙型肝炎病毒作用. *世界华人消化杂志* 2005;13(17):2082-2085

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2082.asp>

0 引言

荔枝核是无患子科植物荔枝(*Litchi Chinensis* Sonn)的成熟种子。又名荔仁或荔枝核, 味甘、微苦, 归肝、肾经。功效行气散结、祛寒止痛。荔枝核的化学成份除含有皂甙、蒜质外, 还含有脂肪酸、聚合花色色素成份、氨基酸、挥发性成份、还原糖、淀粉及总糖、蛋白质, 及钙、磷、钠、钾、锌、铜、锰、铁、镉等元素^[1]。屠鹏飞 *et al*^[2]从700 mL/L乙醇荔枝核提取

物中首次分离、鉴定了13个化合物. 荔枝核具有降血糖、调血脂和抗氧化、保肝作用, 水提取物体外实验对HBsAg、HBV-DNA有明显的抑制作用^[3]. 杨燕^{et al}^[4,5]发现荔枝核提取物对HBsAg、HBeAg具有显著的抑制作用. 我们发现, 荔枝核提取物对HBsAg、HBeAg有明显的抑制作用与抑制HBV-DNA复制的作用^[6]. 肖柳英^{et al}报道荔枝核对小鼠免疫性肝炎有明显的保护作用与抗肿瘤作用^[7,8]. 我们采用先天感染DHBV的桂林麻鸭为模型, 研究了荔枝核总黄酮体内抗乙肝病毒的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 桂林市临桂县五通镇农贸市场5日龄麻鸭, 腿胫静脉采血, 血清应用PCR法检测先天感染DHBV的阳性雏鸭. DHBV质粒: 由广州中医药大学热带医学研究所技术人员自行提取. 缺口翻译试剂盒购自Promega公司. A-³²P-dCTP购自北京亚辉公司. NC膜购自Amersham公司. 96孔杂交点样器为美国Bio-Rad公司产品. 盖氏计数器由美国S. E. International公司生产. 酶联免疫检测仪由中国华东电子管厂生产. 荔枝核总黄酮(Total Flavone of *Litchi Chinensis* Sonn. TFL)经分光光度计法检测, 总黄酮含量为852 g/kg. 阳性药物拉米呋啶(LA)用无菌蒸馏水配成100 g/L.

1.2 方法 先天感染DHBV鸭24只, 随机分为4组, 每组6只: 阳性对照组(LA)、生理盐水对照组及TFL大、小剂量组. 阳性对照组给予配好的LA 100 mg/(kg·d), 生理盐水对照组给予生理盐水1 mL/(kg·d), TFL大剂量组给予药量为2 g/(kg·d), TFL小剂量组给予药量为1 g/(kg·d). 每天1次, 连续灌胃给药15 d. 在给药前1 d, 用药5 d, 用药10 d, 用药15 d, 停药后5 d, 自鸭腿胫静脉取血分离血清, -20℃冻存待检. DHBV-DNA的检测采用斑点杂交法^[9], 用地高辛标记探针将用药前后的血清统一对比检测, 以与探针同源的质粒DNA倍比稀释后点样于硝酸纤维薄膜上杂交显示的斑点颜色深浅为标准, 与待检测血清斑点杂交的斑点颜色深浅比较来半定量, 自动酶标仪检测数据后(A_{490nm}), 计算每组鸭用药后不同时间血清DHBV-DNA的抑制率, 将治疗组DHBV-DNA抑制率分别与对照组相同时间DHBV-DNA抑制率比较. 停药5 d将实验动物全部颈动脉放血处死, 立即摘取肝脏, 称肝湿重后取肝右叶组织一小块, 用中性福尔马林固定, 石蜡包埋切片, HE染色, 光镜观察. 将各组鸭肝病理表现进行分级评分.

统计学处理 用PEMS 3.1对实验数据进行多因素的分差分析及Ridit分析.

2 结果

2.1 血清DHBV DNA 拉米呋啶100 mg/(kg·d)可明

显降低鸭血清的DHBV-DNA滴度, 与生理盐水对照组比较, T_5 时, $P<0.01$; T_{10} 时, $P<0.01$; T_{15} 时, $P<0.01$; 与同组给药前比较, T_5 时, $P<0.01$, T_{10} 时, $P<0.01$; T_{15} 时, $P<0.01$, 但是停药后很快出现反跳. TFL小剂量组不能降低鸭血清中DHBV-DNA滴度, TFL大剂量组可缓慢降低血清中DHBV-DNA滴度, 与同组给药前比较, T_5 时, $P<0.01$; T_{10} 时, $P<0.01$; 与生理盐水对照组比较, T_{15} 时, $P<0.05$, TFL大剂量组用药后不同时间血清DHBV-DNA的抑制率在 T_5 时是62.5%, T_{10} 时是46.2%, T_{15} 时是28.8%, P_5 时是22.1%; 与生理盐水对照组相同时间DHBV-DNA的抑制率在 T_{10} 时是49.5%, T_{15} 时是54.9%, P_5 时是22.1%. 实验期间生理盐水对照组 T_5 时DHBV-DNA滴度下降($P<0.05$), 但在 T_{10} 后回升(表1).

表1 药物TFL对DHBV-DNA的抑制作用 (mean $\pm$ SD, A_{490nm})

分组	T_0	T_5	T_{10}	T_{15}	P_5
TFL小剂量	0.63 $\pm$ 0.45	0.25 $\pm$ 0.14 ^c	1.73 $\pm$ 0.66	1.41 $\pm$ 0.77	1.61 $\pm$ 0.79
TFL大剂量	1.04 $\pm$ 0.80	0.39 $\pm$ 0.32 ^d	0.56 $\pm$ 0.38 ^d	0.74 $\pm$ 0.42 ^a	0.81 $\pm$ 0.69
生理盐水	1.20 $\pm$ 0.65	0.41 $\pm$ 0.13 ^c	1.11 $\pm$ 0.59	1.64 $\pm$ 0.68	1.04 $\pm$ 0.61
阳性对照	0.73 $\pm$ 0.74	0.05 $\pm$ 0.03 ^{bd}	0.06 $\pm$ 0.04 ^{bd}	0.10 $\pm$ 0.08 ^{bd}	0.86 $\pm$ 0.72

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 生理盐水; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 给药前.

2.2 TFL对鸭肝病理的影响 各组实验鸭肝脏色泽均正常, 表面光滑, 质地柔软. 光镜下均可见肝细胞浊肿、气球样变; 生理盐水对照组实验鸭肝细胞出现点状坏死和片状坏死, 但未见桥接坏死, 出现了轻度的纤维化和间质炎细胞浸润(图1A); 阳性对照组实验鸭肝细胞出现点灶坏死、纤维化和间质炎细胞浸润(图1B), 但与生理盐水对照组比较不具有显著性差异($P>0.05$, 表2); TFL小剂量组实验鸭肝细胞出现轻度的点灶坏死, 比生理盐水对照组相比有一定的好转, 但不具有显著性差异($P>0.05$, 表2), 未见桥接坏死和纤维化, 但是间质炎细胞浸润的现象没有减轻(图1C). TFL大剂量组实验鸭肝细胞没有发现明显的点灶坏死、纤维化和间质炎细胞浸润(图1D), 肝细胞变性改变明显减轻, 与生理盐水对照组比较具有显著性差异($P<0.05$, 表2).

表2 各组鸭肝病理学变化

分组	浊肿				气球样变				间质炎细胞浸润				点灶坏死			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
生理盐水组	0	0	0	6	0	0	6	0	5	0	1	0	2	0	2	2
阳性对照组	0	0	1	5	0	0	6	0	3	0	3	0	2	0	3	1
TFL高剂量组	0	1	0	5	1	0	5	0	6	0	0	0	6 ^a	0	0	0
TFL低剂量组	0	2	0	4	2	0	4	0	3	0	3	0	4	0	1	1

^a $P<0.05$ vs 生理盐水组.

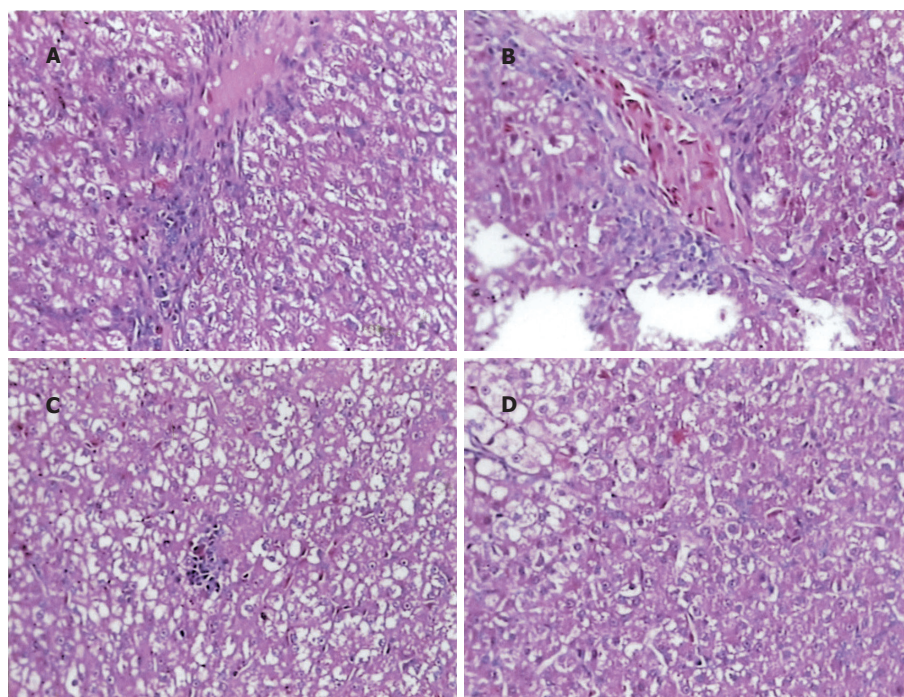


图1 TFL对鸭乙型肝炎病理检查结果. A: 生理盐水; B: 阳性对照; C: TFL小剂量; D: TFL大剂量.

3 讨论

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的一种严重的世界范围内危害人类健康的疾病,全世界大约有20亿人感染过HBV,在我国感染率高达10-20%,并有1亿多人是乙型肝炎表面抗原(HBsAg)携带者. HBV持续感染会导致肝硬化和原发性肝细胞肝癌等肝脏疾病^[10],虽然乙肝疫苗已经广泛使用,在一定范围内对乙型肝炎起到有效的预防,但存在有无应答和不良反应等问题,而且现有的抗病毒药物(如 α -干扰素、拉米呋啶、阿的福韦^[11]、泛昔洛韦^[12])的疗效仍然不能令人满意,因此寻找安全有效的抗HBV药物已成为当今医药学界一项迫切任务. 研究有效抗乙肝病毒药物的关键是寻求合适的病毒模型与建立合适的实验方法. 目前,药物抗乙型肝炎病毒的实验方法主要有:(1)利用中草药直接作用患者血清抑制HBV标志物^[13]. (2)利用体外细胞培养系筛选抗HBV的药物^[14]. (3)以噬肝DNA病毒感染动物模型评价中草药抗HBV的活性.

抗乙肝病毒药物体内实验可采用的动物包括对HBV敏感的黑猩猩、长臂猿、熊猴、树鼯、以及对WHBV敏感的土拨鼠、对DHBV敏感的北京鸭、麻鸭等^[15],黑猩猩、长臂猿稀少,价格昂贵,土拨鼠我国缺少,因此不宜用于抗乙肝病毒药物的筛选. DHBV属嗜肝DNA病毒科,其形态结构、核酸组成、生物学特性及发病机理等方面与HBV相似. 鸭对DHBV易感染,且来源丰富,价格低廉,易于饲养,是研究HBV分子生物学、发病机理及抗HBV药物最常用的动物模型,也是研究

乙型肝炎比较公认的模式^[16]. 国外多用先天感染的北京鸭雏鸭或康贝尔鸭作为乙型肝炎的动物模型,这种鸭带病毒时间长,在1 mo内病毒持续在较高的滴度,一个月末病毒颗粒仍能达到 5.8×10^{12} /L,之后逐渐下降,可一直持续2 a^[17]. 国内目前选用后天感染的北京鸭为肝炎的动物模型,但是其存在带病毒时间短的缺点,而且毒种的收集和保存也有一定难度. 后天感染麻鸭适宜的给药时间为11-15 d,先天感染麻鸭一出生即可给药,适宜的持续给药时间较长为26 d,并且病毒血症波动较小. 由于其有DHBV先天免疫耐受,因此无免疫因素的影响,可直接观察药物对DHBV的抑制作用,其缺点是要获得大量先天性感染DHBV的雏鸭,国外许多学者都证实DHBV的主要传播途径为垂直传播,而雌鸭起的作用更大,一般鸭群中雏鸭自然感染DHBV率都不高^[18,19]. 因此,饲养DHBV感染的母鸭与公鸭及孵化所需费用很大,虽然野水鸭DHBV垂直感染率为80%,是较为理想的HBV动物模型,但其饲养条件要求高,来源困难,价格昂贵,不适宜大批量做药物筛选. 要解决这个问题,就必须找到自然感染DHBV率较高的鸭种并建立快速灵敏的检测方法. DHBV感染率有明显的种属及地区差异,湖南长沙麻鸭的DHBV自染携带病毒率24.19%^[20],广东广州麻鸭的DHBV自染携带病毒率28%,广州野水鸭,学名绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)系由美国初步驯化引进,据考证公认家鸭祖先为野生绿头鸭与斑嘴鸭演化而来,在绿头鸭检测中发现DHBV垂直感染率为80%^[21]. 桂林地区麻鸭DHBV的感染率据我们考察约为35%,为较合适的

先天感染鸭乙肝病毒的模型。

实验结果表明荔枝核总黄酮TFL大剂量组在用药期间有一定抑制DHBV-DNA的作用, 血清中HBV-DNA均较给药前(T_0)明显下降, 但抑制率在5 d最高, 达到62.5%, 10 d的抑制率是46.2%, 15 d的抑制率是28.8%, 停药5 d后的抑制率为22.1%, 有反跳的趋势, 但反跳的趋势不大, 荔枝核总黄酮TFL在用药期间具有一定的抑制乙肝病毒的作用。拉米呋啶有较强的抗病毒作用, 用药后病毒滴度下降迅速, 但停药后反跳严重, 病理检查证实拉米呋啶没有明显的保肝作用, TFL大剂量组用药后病毒滴度下降缓慢, 但病理检查发现TFL大剂量组实验鸭肝细胞未发现明显的点灶坏死、纤维化和间质炎细胞浸润, 具有明显的肝组织病变减轻的现象(与生理盐水对照组比较具有显著性差异, $P<0.05$), 肝细胞坏死特别是点灶坏死是判断肝组织炎症活动的重要指标, 这说明荔枝核总黄酮大剂量组有明显的抗炎、保肝作用, 使肝脏炎症反应减轻, 肝细胞受损情况好转。荔枝核总黄酮抗乙型肝炎作用的有效成份、作用机制、体内代谢过程、毒性、质控标准等还需要进一步的研究。荔枝作为广西特产, 资源极其丰富, 目前荔枝核仍为废弃物, 如能利用荔枝核的抗乙肝病毒作用研制出抗乙肝病毒新药, 对乙型肝炎的治疗及发展地方经济将具有重大的意义。

4 参考文献

- 1 郑琳颖, 韩超, 潘竞锵. 荔枝核的化学、药理和临床研究概况. 中医药学报 1998;5:51-53
- 2 屠鹏飞, 罗青, 郑俊华. 荔枝核的化学成分研究. 中草药 2002;33:300-303
- 3 潘竞锵, 郭洁文, 韩超, 刘惠纯. 荔枝核的药理实验研究. 中国新药杂志 2000;9:14-16
- 4 杨燕, 义祥辉, 陈全斌, 谭明雄. 荔枝核对HBsAg和HBeAg的体外抑制作用. 化工时刊 2001;7:24-26
- 5 徐庆, 陈全斌, 义祥辉, 陈重阳. 荔枝核提取物对HepG2.2.15细胞系HBsAg与HBeAg表达的影响. 中国医院药学杂志 2004;24:393-395
- 6 徐庆, 宋芸娟, 陈全斌, 义祥辉. 荔枝核黄酮类化合物对HepG2.2.15细胞系HBsAg与HBeAg表达及HBV-DNA含量的影响. 第四军医大学学报 2004;25:1862-1866
- 7 肖柳英, 潘竞锵, 饶卫农, 韩超, 肖丽珊. 荔枝核对小鼠免疫性肝炎的实验研究. 中国新医药 2004;3:7-8
- 8 肖柳英, 张丹, 冯昭明, 陈筠文, 张宏, 林培英. 荔枝核对小鼠抗肿瘤作用研究. 中药材 2004;27:517-518
- 9 杨书兰, 黄正昌, 朱辨弦, 张奉学, 郭兴伯, 朱宇同. 柴胡与小柴胡汤对鸭乙型肝炎治疗作用的研究. 广州中医药大学学报 2003;20:289-292
- 10 陈志强, 董俊兴. 抗乙型肝炎病毒药物研究进展. 中国药理学杂志 2000;35:435-437
- 11 陈压西, 黄爱龙, 郭晖, 齐珍元. 阿的福韦在鸭乙型肝炎模型及2.2.15细胞中抗乙型肝炎病毒的药效研究. 重庆医科大学学报 2004;29:618-620
- 12 陈压西, 郭树华, 齐珍元, 张定凤. 泛昔洛韦体内抗鸭乙型肝炎病毒核酸的疗效研究. 中华肝脏病杂志 2000;8:51
- 13 郑民实, 邱健辉. 使用ELISA技术检测中草药抗HBeAg的实验研究. 天然产物研究与开发 1995;7:10-14
- 14 郑浩杰, 刘国强. 利用2.2.15细胞株筛选抗乙肝病毒中草药的体外实验研究进展. 陕西中医学院学报 2003;26:61-63
- 15 Msaon WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. J Virol 1980;36:829-836
- 16 邓学龙, 朱宇同, 方宏勋, 容秉培, 郭兴伯, 王新华, 刘妮, 符林春. 广州地区3个鸭种1日龄雏鸭垂直感染鸭乙肝病毒调查. 广东中医药大学学报 1997;14:274-275
- 17 谢青, 郭清, 周霞秋, 谷瑞瑛. 乳糖化清蛋白单磷酸阿糖腺苷的抗鸭乙型肝炎病毒作用. 世界华人消化杂志 1999;7:125-126
- 18 李虹, 陈文, 徐纬, 王平, 郭巨涛, 侯云德. 核酶对鸭乙型肝炎病毒感染体内抗病毒作用效果的观察. 中华实验和临床病毒学杂志 1998;12:118-121
- 19 莫小余, 李向阳, 潘宗奇, 朱宇同, 周红燕. 中药抗先天性华南绿头鸭乙肝病毒的实验研究. 中华医学研究杂志 2003;3:696-697
- 20 邹文, 杨旭. 长沙麻鸭携带鸭乙型肝炎病毒调查研究. 中国感染控制杂志 2003;2:168-169
- 21 夏瑾瑜, 李天望, 朱小红, 严春海, 李晓东. 补锌去铁对保肝康抗鸭乙肝病毒作用的实验研究. 中国中西医结合消化杂志 2001;9:225-227

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

HMGR基因多态性与乙型病毒性肝炎关联分析

邓春青, 邓国宏, 王宇明

邓春青, 邓国宏, 王宇明, 第三军医大学西南医院感染科 重庆市 400038
邓春青, 女, 1970-03-05生, 汉族, 山西省临汾市人, 1990年山西医科大学
学士, 副主任医师, 2003年第三军医大学西南医院感染科博士生, 主要从事
乙型肝炎遗传易感性研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30200234

通讯作者: 王宇明, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, 中国人民解
放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所。

wym417@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

Relationship between polymorphisms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene and hepatitis B virus infection

Chun-Qing Deng, Guo-Hong Deng, Yu-Ming Wang

Chun-Qing Deng, Guo-Hong Deng, Yu-Ming Wang, Institute of
Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical
University Chinese PLA, Chongqing 400038, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No.
30200234

Correspondence to: Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases,
Southwest Hospital, the Third Military Medical University Chinese
PLA, 30 Gaotanyan Zhengjie, Chongqing 400038, China.

wym417@mail.tmmu.com.cn

Received: 2005-04-04 Accepted: 2005-04-09

Abstract

AIM: To investigate the relationship between exon20 polymorphism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) gene and clinical outcome of the patients infected with hepatitis B virus (HBV).

METHODS: From the year 2002 to 2004 in Chongqing, the clinical data and blood samples of 2 400 patients with liver diseases were collected. The total DNA was extracted from the blood samples. After amplification, the exon20 polymorphisms of HMGCR gene (locus 18109T/C) were detected polymerase chain reaction (PCR), digestion of restriction enzyme and gel electrophoresis.

RESULTS: A total of 1 354 patients were diagnosed with hepatitis B. Hardy-Weinberg equilibrium test showed a favorable goodness for fit ($P = 0.016 > 0.01$). Significant differences of genotypes and allele frequency existed between the asymptomatic carriers (AsCs) and patients of any other subgroup except acute hepatitis B and liver cancer ($P < 0.01$). Under the condition of

codominance, the polymorphism of HMGCR 18109T/C was significantly correlated with the status of patients after HBV infection (liver cirrhosis/AsC: $OR = 0.676$, $P = 0.004$; AsC/severe hepatitis B: $OR = 0.672$, $P = 0.000$; AsC/chronic hepatitis B: $OR = 0.747$, $P = 0.000$; AsC/chronic hepatitis B+severe hepatitis B+liver cirrhosis: $OR = 0.756$, $P = 0.010$), and patients with C/C genotype tended to become AsCs more easily after HBV infection, as compared with patients with T/T and C/T genotype.

CONCLUSION: The exon20 (locus 18109T/C) polymorphism of HMGCR gene is correlated with HBV infection, and patients with C/C genotype are more susceptible to become AsCs after HBV infection.

Key Words: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene; Polymorphism; Viral hepatitis B

Deng CQ, Deng GH, Wang YM. Relationship between polymorphisms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene and Hepatitis B Virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2086-2089

摘要

目的: 探讨HBV感染临床转归与HMGR基因多态性的关系。

方法: 2002-02/2004-02无亲缘关系的重庆地区肝病
患者2 400人, 采用聚合酶链反应(PCR)及限制性内切
酶技术检测HMGR基因20外显子18109T/C位点多态
性, 应用SPSS软件 χ^2 检验以及非条件Logistic回归统计
学处理方法。

结果: Hardy-Weinberg平衡检验 $P > 0.01$ ($P = 0.016$),
拟合度优良; 以非条件Logistic回归校正年龄及性别因
素进行分析, 结果发现慢性乙型肝炎(CHB)、重型肝
炎(SHB)、肝硬化(LC)患者与乙肝病毒携带者(AsC)相
比, 其基因型和等位基因频率有显著差别 ($P < 0.01$),
在共显性模式下HMGR 18109T/C SNP与HBV感染
后携带状态显著关联(LC/AsC: $OR = 0.676$, $P = 0.004$;
AsC/S HB: $OR = 0.672$, $P = 0.000$; AsC/CHB:
 $OR = 0.747$; $P = 0.000$; AsC/CHB+SHB+LC: $OR = 0.756$,
 $P = 0.010$), 与T/T和C/T相比, C/C基因型个体在
HBV感染后转为无症状携带者的易感性显著增高。

结论: Hardy-Weinberg平衡拟合度检验优良, 说明所收集人群具有良好的代表性; 其次首次证实HMGCR基因20外显子18109T/C多态性与慢性乙型肝炎有关联存在。

关键词: HMGCR基因; 多态性; 乙型病毒性肝炎

邓春青, 邓国宏, 王宇明. HMGCR基因多态性与乙型病毒性肝炎关联分析. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2086-2089
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2086.asp>

0 引言

中国是乙型病毒性肝炎高发区, HBV感染慢性化程度较高, 与肝硬化和肝癌的发生关系密切, 部分尚可转变为重型肝炎, 因此有关其发病机制倍受关注. 已有研究发现即使相同的病毒分离株在感染不同的宿主时, 临床表现亦会有很大差异, 故而遗传因素可能为重要原因. 单核苷酸多态性(SNP)作为第三代基因遗传标记构成了不同个体与群体对疾病易感性的遗传学基础, 与乙型肝炎有关的基因多态性的研究正在国内悄然兴起^[1,2]. 3-羟基3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGCR)是肝脏胆固醇合成的限速酶, 其抑制剂在临床上被广泛用于治疗高胆固醇血症. 除降低胆固醇的作用外, 其抑制剂的使用可显著减轻缺血再灌注鼠的肝损伤^[3], 这与其提高血管内皮细胞中的eNOS的表达及活化功能是一致的, 因eNOS对肝脏具保护作用早已证实^[4]. 另有报道HMGCR抑制剂对鼠有肝切除和肝移植后的肝脏保护作用^[5]. 关于其多态性的研究目前很少, 仅发现与低胆固醇血症者易于自杀有关^[6]. 虽然HMGCR抑制剂与不同肝病的关系报道很多, 但有关HMGCR基因本身与不同肝病的关系报道很少, 到底HMGCR基因与HBV感染之间有无关系, 初探如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-02/2004-02诊治的无亲缘关系的重庆地区汉族居民2 400例, 男2 002例, 女398例, 年龄

2-72岁. 样本收集的同时填写详细的流行病学资料及临床资料录入计算机, 乙型肝炎诊断采用2000年西安第十次全国病毒性肝炎会议修订“病毒性肝炎防治方案”制定的标准, 采集标本获得患者的知情同意。

1.2 方法 晨取静脉血5 mL, EDTA抗凝, 改良Miller法抽提全血DNA^[7], 所抽提DNA加水稀释至终浓度5-10 mg/L制成分型所用96孔DNA模板; 参考GenBank已有的注释对基因进行注释, 选择HMGCR基因等位基因变异频率较高的20外显子18109T/C位点研究. 应用聚合酶链反应(PCR)及限制性酶切方法判定基因型, 应用primer premier 5.0软件设计引物、酶切位点, 所设引物(由北京奥科有限公司合成)如下: Sense 5'-3' tct ttc aga gag gtc tca ggt tc Anti-sense 5'-3' aat cca ttt tca act ggc cgg, 内切酶Nci I (NEB公司)识别位点为cc/sgg. PCR反应条件95℃预变性3 min, 94℃变性30 s, 54℃退火45 s, 72℃延伸30 s, 72℃延迟5 min, 循环次数30次. PCR及酶切产物分别以10 g/L及2 g/L琼脂糖凝胶电泳, 基因型的确定依酶切后凝胶电泳的片段判定, 送北京鼎国生物公司测序验证。

统计学处理 采用SPSS统计软件处理, 等位基因直接由基因型计算, Hardy-Weinberg平衡以及两组间的差异用列联表 χ^2 检验, 以非条件Logistic回归校正年龄及性别因素进行分层分析. 以 $P>0.01$ 视为Hardy-Weinberg平衡检验优良; $P<0.01$ 视为两组间有统计学差异。

2 结果

2.1 HMGCR(18109T/C)基因型的判定 依酶切后凝胶电泳片段判定基因型如下: TT: 252 bp; CT: 252 bp, 20 bp, 232 bp; CC: 20 bp, 232 bp(图1). 北京鼎国生物公司测序报告(图2)验证依酶切片段判定基因型正确无误。

2.2 Hardy-Weinberg平衡分析 诊断明确的乙型肝炎患者总计1354例, Hardy-Weinberg平衡分析 $P>0.01$ ($P = 0.016$), 检验优良; 乙肝病毒携带与慢

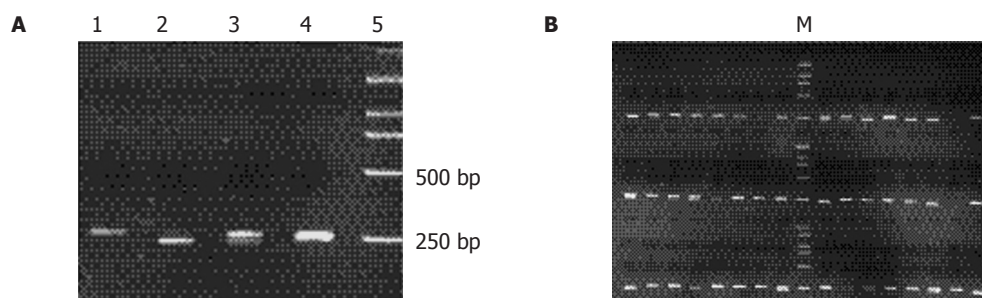


图1 HMGCR(18109T/C)基因型的判定. A: 1: TT; 2: CC; 3: CT; 4: TT; 5: DL2000 marker; B: 96孔模板基因型. M: DL2000 marker.

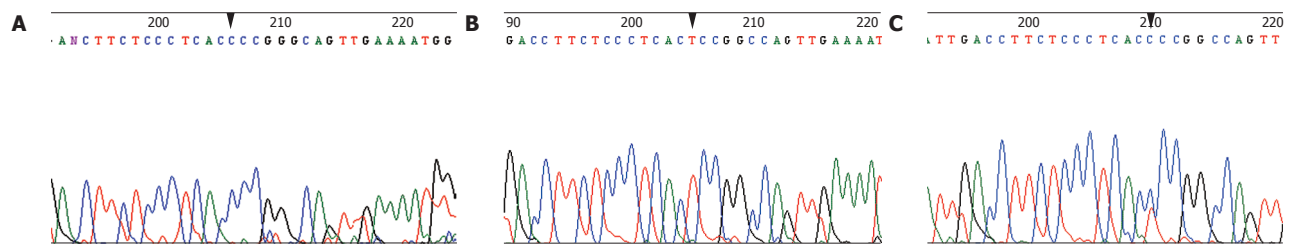


图2 HMGCR(18109T/C)基因型测序报告. A: CC; B: TT; C: CT.

乙肝两组之间等位基因频率相比 $P<0.01$, 乙肝病毒携带与慢乙肝+肝硬化+重症肝炎组之间等位基因频率相比 $P<0.01$, 均有显著性差异(表1).

2.3 非条件Logistic回归分析 为避免所收病例各组之间年龄或性别的差异, 有必要以非条件Logistic回归校正年龄及性别因素后进一步关联分析, 结果发现在共显性模式下HMGCR 18109T/C SNP与HBV感染后携带状态显著关联, 与T/T和C/T相比, C/C基因型个体在HBV感染后转为无症状携带者的易感性显著增高(表2, 共显性模式: $OR = 0.756$; $95\% CI = 0.611-0.937$).

3 讨论

胆固醇及HMGCR影响肝脏的功能, 而HMGCR是胆固醇合成的关键酶, 近期研究表明HMGCR抑制剂的使用可明显改善部分肝切除后的肝脏功能^[5], 也有研究认为其抑制剂的使用有时反而诱导HMGCR的活性, 刺激和激发了肝脏的再生^[8], 尽管结论不一, 但毫无疑问, HMGCR与肝脏有着极为密切的关系. 目前乙型肝炎等复杂性状疾病遗传易感性的研究方法有很多, 关联研究为其中一种. 进行疾病关联研究需要大样本同时应避免因群体混杂而出现虚假阳性关联. 我们收集样本的

表1 HBV感染后不同临床转归HMGCR 18109T/C基因型及等位基因

分组	n	性别M/F	年龄x(s)	基因型			等位基因(%)	
				CC	CT	TT	C	T
AsC	192	109/83	34.787(11.291)	58	78	56	50.52	49.48
AHB	10	8/2	30.253(10.244)	3	2	5		
CHB	837	653/184	34.311(11.561)	193	307	337	41.40	58.40
SHB	139	113/26	39.989(11.811)	31	52	56	41.01	58.99
LC	157	126/31	41.964(11.441)	40	60	57	44.59	55.41
HCC	19	13/6	49.263(12.253)	5	7	7		
LC+SHB	296	239/57	40.325(11.589)	71	112	113	42.91	57.09
CHB+AsC	1029	762/267	34.648(11.207)	251	385	393	43.10	56.90
LC+CHB+SHB	1133	892/241	35.597(10.207)	264	419	450	41.79	58.21

AsC为乙肝病毒携带, CHB为慢乙肝, LC为肝硬化, SHB为重症肝炎, AHB为急乙肝, HCC为肝癌, $P<0.01$ vs AsC.

表2 HMGCR 18109T/C SNP与HBV感染关联的分层分析

分层	显性模式		隐性模式		共显性模式	
	P	OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	P	OR(95%CI)
LC/CHB	0.354	0.823(0.545-1.242)	0.415	0.859(0.595-1.239)	0.205	1.150(0.926-1.429)
LC/SHB	0.578	0.858(0.499-1.474)	0.608	0.883(0.549-1.420)	0.399	1.108(0.873-1.406)
LC/AsC	0.051	1.898(0.997-3.610)	0.068	1.739(0.960-3.149)	0.004	0.676(0.517-0.884)
AsC/SHB	0.080	1.773(0.934-3.367)	0.064	1.739(0.967-3.125)	0.000	0.672(0.554-0.817)
AsC/CHB	0.070	1.414(0.973-2.057)	0.014	1.579(1.096-2.275)	0.000	0.747(0.662-0.844)
SHB/CHB	0.770	1.068(0.687-1.660)	0.890	1.027(0.706-1.494)	0.739	0.976(0.845-1.126)
AsC+CHB/LC+SHB	0.773	0.954(0.693-1.314)	0.909	0.984(0.743-1.303)	0.653	1.038(0.882-1.223)
AsC/CHB+SHB+LC	0.066	1.413(0.977-2.045)	0.013	1.583(1.103-2.272)	0.010	0.756(0.611-0.937)

AsC为乙肝病毒携带, CHB为慢乙肝, LC为肝硬化, SHB为重症肝炎, 显性模式为TT+TC/CC, 隐性模式为TT/TC+CC, 共显性模式为TT/TC/CC, 所有P值及OR均由非条件Logistic回归分析所得.

同时填写详尽的流行病学资料录入电脑, 排除同一患者多次化验导致所收标本重复的可能. 作为HBV感染率很高的中国, 我们收集的样本量之大是其它疾病无法比拟也是其它国家无法想象的. 本研究表明, 首先样本Hardy-Weinberg平衡检验 $P>0.01$, 拟合度检验优良, 说明收集样本人群具有良好的代表性; 其次首次证实HMGCR基因20外显子18109T/C多态性与HBV感染之间存在关联: 乙肝病毒携带与HBV感染临床转归其余组之间等位频率存在显著性差异; 以非条件Logistic回归校正年龄及性别因素进行分析发现在共显性模式下HMGCR 18109T/C SNP与HBV感染后携带状态显著关联, 与T/T和C/T基因型相比, C/C基因型个体在HBV感染后转为无症状携带者的易感性显著增高. 由于所收集样本急性乙型肝炎以及肝癌例数太少未纳入分析, 有待以后扩大样本另行研究. 我们的实验首次证实HMGCR基因本身与HBV感染有关, 至于HMGCR基因20外显子18109T/C SNP对其功能的影响还有待后续进一步研究证实.

4 参考文献

- 1 张凤珍, 郝岗平, 张媛英. 人类S N P多态性的研究及应用. 泰山医学院学报 2003;24:203-206
- 2 刘惠刚, 王福生, 洪卫国, 金磊, 周越塑, 侯静, 张冰, 刘明旭. 乙型肝炎、性病和HIV-1感染人群中CCR5, CCR2和SDF1等位基因多态性的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:19-23
- 3 Harada H, Pavlick KP, Hines IN, Lefer DJ, Hoffman JM, Bhargwani S, Wolf RE, Grisham MB. Sexual dimorphism in reduced-size liver ischemia and reperfusion injury in mice: role of endothelial cell nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:739-744
- 4 李海刚, 苏巧珠, 李树浓, 董书坤. 肝细胞癌一氧化氮合酶的表达及其临床意义. 中国病理生理杂志 2001;17:1243-1245
- 5 Cai SR, Motoyama K, Shen KJ, Kennedy SC, Flye MW, Ponder KP. Lovastatin decreases mortality and improves liver functions in fulminant hepatic failure from 90% partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2000;32:67-77
- 6 Lalovic A, Sequeira A, DeGuzman R, Chawky N, Lesage A, Seguin M, Turecki G. Investigation of completed suicide and genes involved in cholesterol metabolism. *J Affect Disord* 2004;79:25-32
- 7 Miller SA, Dykes DD, Folesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215
- 8 Zivna H, Zivny P, Palicka V, Simakova E. Influence of high cholesterol diet and pravastatin sodium on the initiation of liver regeneration in rats after partial hepatectomy. *Nutrition* 2002;18:51-55

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004 年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004 年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004 年版(第四版). 本版核心期刊研究, 被列为“2001 年国家社会科学基金项目”. 该书于 2004 年 7 月由北京大学出版社出版.

该书已于 1992, 1996, 2000 年出版过三版, 在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书. 为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 《中文核心期刊要目总览》2004 年版编委会, 开展了新版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况. 本版核心期刊定量评价, 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达 51 种, 统计文献量达到 943 万余篇次(1999-2001 年), 涉及期刊 1 万 2 千种. 本版还加大了专家评审力度, 1873 位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出 1800 种核心期刊, 分属七大编 75 个学科类目. 该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书.

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关单位的百余名专家和期刊工作参加了研究.

经兔肝动脉灌注平阳霉素碘油乳剂制作肝纤维化模型

李枫, 徐克, 刘瑞宝

李枫, 徐克, 刘瑞宝, 中国医科大学附属第一医院放射科 辽宁省沈阳市 110001

李枫, 男, 1973-5-16生, 辽宁省大连市人, 汉族, 中国医科大学2000级硕士研究生, 现工作于大连医科大学附属第一医院介入科, 主治医师, 主要从事肝胆疾病的介入治疗研究。

通讯作者: 徐克, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学附属第一医院放射科. xuke@cmuimaging.com

电话: 024-23252365

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-09

A new model of hepatic fibrosis induced by intra-arterial injection of iodized oil and pingyangmycin emulsions

Feng Li, Ke Xu, Rui-Bao Liu

Feng Li, Ke Xu, Rui-Bao Liu, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Ke Xu, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. xuke@cmuimaging.com

Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-09

Abstract

AIM: To investigate the feasibility of setting up a hepatic fibrosis model by intra-arterial injection of emulsions of iodized oil and pingyangmycin.

METHODS: Twenty-four Japanese big-ear rabbits were divided into sham-operation, experiment A and B group according to the doses of emulsions of iodized oil and pingyangmycin (1.2 and 2.0 mg for A and B, respectively) injected into the hepatic artery. The live specimens were obtained 1, 2, 4, 6, 10, and 14 wk after injection. The histological changes were determined by HE staining, and the contents of platelet derived growth factor-B (PDGF-B) were detected by immunohistochemical staining.

RESULTS: Six weeks after injection, typical features of fibrosis appeared in all the liver tissues of group A and B, and the pseudolobules formed in some tissues. In group B, sclerosis with a diameter of 1.0 cm was found in one of the four rabbits at 10th week under light microscope. The contents of PDGF-B were significantly increased in A and B group as compared with those in sham-operation group 1, 2, 4, and 6 wk after injection

(integral optical density: 118714 ± 14941 , 154344 ± 25102 vs 42745 ± 871 , $P < 0.01$; 130399 ± 11690 , 164855 ± 15486 vs 44052 ± 1043 , $P < 0.01$; 116594 ± 21230 , 147099 ± 20317 vs 41081 ± 769 , $P < 0.01$; 101732 ± 8794 , 124177 ± 20429 vs 46366 ± 975 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: The model of hepatic fibrosis can be established successfully by injection of iodized oil and pingyangmycin emulsions into the hepatic artery. PDGF-B plays an important role in the progress of fibrosis as a promoter.

Key Words: Pingyangmycin; Iodized oil; Hepatic fibrosis; Model

Li F, Xu K, Liu RB. A new model of hepatic fibrosis induced by intra-arterial injection of iodized oil and pingyangmycin emulsions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2090-2093

摘要

目的: 探讨经兔肝动脉灌注平阳霉素碘油乳剂 (PLE) 制作肝纤维化模型的可行性。

方法: 4-5 月龄日本大耳白兔24只, 按经肝动脉注入 PLE量的不同分成假手术组, 实验A组、实验B组, 分别于术后1、2、4、6、10、14 wk定期开腹取材, 做 HE染色及血小板衍生生长因子B(PDGF-B)免疫组化染色。

结果: 6 wk时A组及B组兔肝脏均可见明显纤维化改变, 部分肝组织假小叶形成。B组兔10 wk时4只兔中有一只出现一直径约1.0 cm大小的硬化结节, 光镜下为团状增生的纤维组织。PDGF-B免疫组化染色可见肝细胞胞膜及纤维间隔中大量阳性染色。A、B组积分光密度值在注射后1、2、4、6 wk比假手术组明显升高 (118714 ± 14941 , 154344 ± 25102 vs 42745 ± 871 , $P < 0.01$; 130399 ± 11690 , 164855 ± 15486 vs 44052 ± 1043 , $P < 0.01$; 116594 ± 21230 , 147099 ± 20317 vs 41081 ± 769 , $P < 0.01$; 101732 ± 8794 , 124177 ± 20429 vs 46366 ± 975 , $P < 0.01$)。

结论: 经肝动脉灌注PLE制作肝纤维化模型成功率高, 死亡率低。PDGF-B作为肝纤维化的启动因子参与了该模型的纤维化过程。

关键词: 平阳霉素; 碘油; 肝纤维化; 模型

李枫, 徐克, 刘瑞宝. 经兔肝动脉灌注平阳霉素碘油乳剂制作肝纤维化模型. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2090-2093
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2090.asp>

0 引言

平阳霉素(bleomycin A₅)作为一种国产抗肿瘤抗生素,其临床应用的主要副作用为肺炎样变或肺纤维化^[1-4].1985年, Matalon *et al*^[5]用bleomycin对鼠支气管行一次性灌注,造成鼠肺纤维化.1992年金洪 *et al*^[6]通过向大鼠气管内滴注平阳霉素导致大鼠肺纤维化,此后气管内滴注平阳霉素制作肺纤维化模型被广泛采用.我们利用平阳霉素的这种特性探索出一种制作肝纤维化模型的新方法.

1 材料和方法

1.1 材料 4-5月龄日本大耳白兔24只,雌雄不限,体重质量 2.5 ± 0.2 kg,由中国医科大学实验动物中心提供.所有实验兔随机分成3组,其中假手术组4只,实验A组10只,实验B组10只.

1.2 方法 所有实验兔均于术前24 h禁食,4 h禁水.速眠新注射液(长春农牧大学军事兽医研究所)0.8 mL im 麻醉,腹中线切口8 cm长,进腹腔后,剪断小网膜(在兔身上实际为少量透明系膜组织),于胃幽门上方找到肝门,可见明显的肝动脉搏动,走行朝向肝内,中途可见其发出胃十二指肠动脉,向幽门部走行,用5号半头皮针穿刺肝动脉成功后针头越过胃十二指肠动脉注药.其中假手术组4只兔注入0.4 mL生理盐水;A组10只兔注入0.2 mL碘油+1.2 mg平阳霉素+0.2 mL生理盐水制成的混悬乳剂;B组10只兔注入0.2 mL碘油+2.0 mg平阳霉素+0.2 mL生理盐水制成的混悬乳剂.注药后拔出针头用明胶海绵按压1 min,确定无出血后关腹缝合.术中严格采用无菌操作,以防感染.取材:假手术组4只兔,A组及B组中各自随机抽取5只兔(编号为A1, B1)分别于术后1, 2, 4, 6 wk行全麻,剑突下偏左或偏右切一2 cm长小口,分离肌肉组织,暴露肝脏,观察肝脏大体改变,并于肝脏表面用手术刀切取一块约3 mm×3 mm大小的肝组织块,再用18 G肝穿刺针于肝脏深处取两块组织,明胶海绵按压止血后缝合.取出的肝组织清水冲洗后立即用福尔马林液固定,至第6 wk取材后上述14只兔全部处死,A组及B组余下的5只兔(编号为A2, B2)再分别于术后10, 14 wk取材.取材标本采用常规石蜡包埋,5 μm连续切片,HE染色,光镜下观察肝脏组织学改变.血小板衍化生长因子B链(PDGF-B)免疫组织化学染色采用ABC法略加改良(试剂盒购于武汉博士德公司).常规石蜡脱水;2 g/L TWEEN-20PBS漂洗;4 g/L胃蛋

白酶抗原修复;加入PDGF-B一抗抗体;滴加二抗抗体;后加ABC复合物;DAB显色(棕黄色);封片.使用MetaMorph/DP10/BX5 彩色显微图象分析仪做组织化学定量分析.随机选取每张切片5个视野,测定其阳性染色(棕黄色)的积分光密度值(IOD),IOD值越高表明组织抗原含量越高.取5个视野的平均值作为该切片的IOD值.

统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件对上述数据做统计分析.

2 结果

除B1组兔2 wk时取材后死亡一只外(死亡原因考虑为麻醉过量及术后保暖欠佳),余实验兔均按照实验方法的操作步骤进行.

2.1 大体观 A组:1 wk, A1组5只兔中有3只兔肝脏外缘被膜颜色变白,全部5只兔肝缘欠锐利;2 wk, A1组全部5只兔肝脏部分区域表面覆盖白色被膜,肝缘变钝;4 wk,大体观与2 wk时相仿;6 wk, A1组5只兔肝脏部分区域外被白色被膜,肝脏边缘进一步变钝,肝表面凹凸不平;10 wk、14 wk时(A2组5只兔)大体观与6 wk相仿.B组:1 wk, B1组全部5只兔肝脏表面外被白色被膜,肝缘欠锐利;2 wk肝缘进一步变钝;4 wk时大体观与2 wk相仿(B1组兔第2次取材后死亡1只由B2组中补充1只);6 wk时肝脏边缘进一步变钝,肝表面凹凸不平;10 wk时B2组全部4只兔中有1只肝脏表面可见一直径约1 cm的硬化结节,质硬,切割质地如胶皮感;14 wk时大体观与10 wk相仿.假手术组兔肝缘锐利,表面光滑,色泽鲜亮.

2.2 光镜下 A组:1 wk HE染色可见肝细胞轻度水样变性,肿胀,肝索拥挤,肝窦充血,门管区淋巴细胞浸润;2wk HE染色肝细胞明显水样变性,胞质空亮,部分肝细胞可见嗜酸性改变,肝窦充血,汇管区大量淋巴细胞浸润(图1A);4 wk时HE染色可见肝细胞中度水样变性,汇管区可见纤维组织增生及部分淋巴细胞浸润,小叶间隔增厚,肝窦充血;6 wk时HE染色可见肝细胞轻度水样变性,汇管区纤维组织增生,向小叶内延伸扩展,形成分割包绕趋势,部分肝组织可见增生的纤维结缔组织重新分割包绕形成假小叶(图1B);10, 14 wk时光镜下改变与6 wk相仿.B组:1 wk HE染色可见肝细胞水样变性,肿胀,肝索拥挤,肝窦充血,门管区大量淋巴细胞浸润;2 wk HE染色肝细胞明显水样变性,胞质空亮,部分肝细胞可见嗜酸性改变,肝窦充血,汇管区大量淋巴细胞浸润;4 wk HE染色肝细胞仍有明显水样变,汇管区大量淋巴细胞浸润,纤维组织增生明显,小叶间隔增厚,肝窦充血;6 wk HE染色肝细胞水样变性较前减轻,汇管区纤维

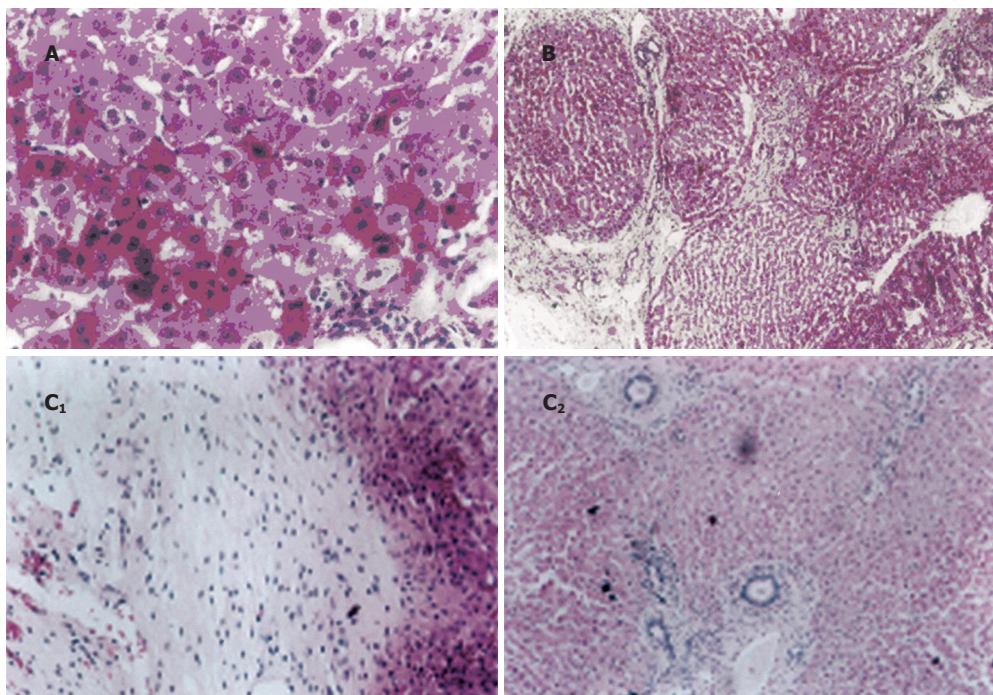


图1 平阳霉素所致兔肝脏纤维化 (HE). A: A1组2 wk ($\times 400$); B: A1组6 wk假小叶形成($\times 100$); C₁, C₂: B2组10 wk 广泛纤维化($\times 100$).

组织大量增生, 向小叶内延伸扩展, 形成分割包绕趋势, 部分肝组织可见增生的纤维结缔组织重新分割包绕形成假小叶. 10 wk光镜下肝组织呈广泛纤维化改变, 部分区域的肝组织可见大片团状增生的纤维结缔组织, 无明显肝细胞结构(图1C₁, C₂); 14 wk时光镜下改变与10 wk相仿. 假手术组兔肝细胞形态正常, 肝索排列整齐, 小叶结构清晰.

2.3 PDGF-B免疫组化染色结果 A1及B1组兔肝细胞膜及纤维间隔中均可见PDGF-B免疫组化阳性染色(棕黄色, 图2). 染色强度随取材时间不同有明显变

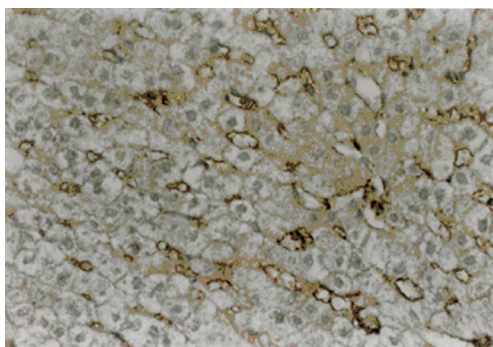


图2 A1组PDGF-B阳性 (ABC $\times 400$).

化. 显微病理图象分析仪对假手术组4只兔, A1及B1组各5只兔的免疫组化染色做图象分析, 采用积分光密度值(IOD)作为统计指标. A1及B1组兔IOD值均在2 wk时达高峰, 至6 wk时明显下降. A1和B1组IOD值与假手术组比较均明显升高, 统计学上有显著差异($P<0.01$) (表1).

表1 PDGF-B免疫组化定量分析 (mean $\pm$ SD)

分组	1 wk	2 wk	4 wk	6 wk
A组	118714 $\pm$ 14941 ^a	130399 $\pm$ 11690 ^a	116594 $\pm$ 21230 ^a	101732 $\pm$ 8794 ^a
B组	154344 $\pm$ 25102 ^a	164855 $\pm$ 15486 ^a	147099 $\pm$ 20317 ^a	124177 $\pm$ 20429 ^a
假手术组	42745 $\pm$ 871	44052 $\pm$ 1043	41081 $\pm$ 769	46366 $\pm$ 975

^a $P<0.01$ vs 假手术组.

3 讨论

平阳霉素属于博莱霉素(bleomycin)族A5成分, 它对血管内皮细胞存在非特异性抑制和破坏作用, 这种作用被称之为“祛血管作用”^[7]. 我们利用平阳霉素的这种“祛血管作用”, 将平阳霉素与碘油的混悬乳剂经兔肝动脉注入制成了兔肝纤维化模型, 并使用免疫组化染色法标记PDGF-B, 通过图象分析观察其动态变化来进一步探讨该纤维化形成的机制. PDGF-B是参与肝纤维化过程的最重要的细胞因子之一, 是促使肝脏纤维化形成的启动因子, 它的主要作用是促使肝星状细胞增殖, 促使肝星状细胞移行并诱导HSC合成TGF, IGF等细胞因子, 引发肝脏纤维化^[8-15]. 我们通过PDGF-B的免疫组织化学染色, 证实PLE介导的肝纤维化也是由PDGF-B启动并参与的. 通过A组5只兔取材标本的免疫组织化学定量分析, 我们看出PDGF-B最高表达出现在2 wk, 至6 wk时已有明显下降, 抗原表达主要集中在肝细胞膜和纤维间隔中. 综合分析光镜下HE染色结果和免疫组织化学定量分析结果可以得出如下结论: PLE可导致肝细胞损伤, 2 wk时肝细胞变性

最重, 随时间推移细胞变性在减轻, PDGF-B的最高表达也集中在2 wk, 随时间推移PDGF-B的表达也在逐渐减少, 肝纤维化则出现在4 wk并逐渐发展成肝硬化。

任何可引起肝损伤的因素长期作用于肝脏均可产生肝细胞变性, 坏死, 继而肝细胞再生和纤维组织增生, 导致肝纤维化^[16-23]。我们制成的肝纤维化模型属于化学损伤性模型, 其特点为纤维化首先发生在门管区, 随病程进展逐渐向小叶内延伸。肝内纤维化的发生呈不均衡性, 病变程度肝内各部分轻重不等, 6 wk时即可产生明显的纤维化改变, 部分肝组织假小叶形成, 至10 wk时可出现肝硬化结节。

PLE进入肝脏后, 由于碘油在正常肝组织中能停留近20 d^[24], 使得平阳霉素得以缓慢释放, 造成慢性肝损伤, 符合肝纤维化产生的条件。因此这种造模方法只需一次给药, 而不会导致大剂量注入毒性药物后产生肝坏死, 肝功能衰竭致动物死亡。此外由于本实验是直接肝动脉给药, 药物直接作用于肝脏, 避免了全身给药后产生的其他脏器的毒副作用, 因此死亡率低。本组实验除1只兔由于麻醉意外死亡余兔均成活。实验A组及B组共19只兔均不同程度出现肝纤维化, 模型出现率从本组实验统计可达100%。综上所述, PLE灌注法肝纤维化模型只需一次给药, 制作方法简便, 模型出现率高, 动物死亡率低, 影响因素少, 理论上模型可重复性应较好。

4 参考文献

- 1 吴洪斌, 陆国椿. 平阳霉素的不良反应. 中国临床药理学杂志 2001;10:53-55
- 2 Harrison JH Jr, Lazo JS. High dose continuous infusion of bleomycin in mice: a new model for drug-induced pulmonary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;243:1185-1194
- 3 Mir LM, Tounekti O, Orłowski S. Bleomycin: revival of an old drug. *Gen Pharmacol* 1996;27:745-748
- 4 Chandrasekaran L, Seethalakshmi S, Chandrakasan G, Dhar SC. Alterations in lung and skin compositions of rat in bleomycin-induced fibrosis. *Biochem Med Metab Biol* 1987;38:205-212
- 5 Matalon S, Harper WV, Goldinger JM, Nickerson PA, Olszowka J. Modification of pulmonary oxygen toxicity by bleomycin treatment. *J Appl Physiol* 1985;58:1802-1809
- 6 金洪, 田英麟, 姚汉德, 杨剑军, 蔡少华, 于国, 田亚军, 吴德政. 国产平阳霉素诱发肺损伤后的病理与生化改变的初步探讨. 中华病理学杂志 1992;21:278-280
- 7 Hay JG, Haslam PL, Dewar A, Addis B, Turner-Warwick M, Laurent GJ. Development of acute lung injury after the combination of intravenous bleomycin and exposure to hyperoxia in rats. *Thorax* 1987;42:374-382
- 8 Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. *J Gastroenterol* 1997;32:424-430
- 9 Malizia G, Brunt EM, Peters MG, Rizzo A, Broekelmann TJ, McDonald JA. Growth factor and procollagen type I gene expression in human liver disease. *Gastroenterology* 1995;108:145-156
- 10 Isbrucker RA, Peterson TC. Platelet-derived growth factor and pentoxifylline modulation of collagen synthesis in myofibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;149:120-126
- 11 Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, Housset C. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest* 2000;80:697-707
- 12 Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:413-423
- 13 Liu YK, Shen W. Inhibitive effect of cordyceps sinensis on experimental hepatic fibrosis and its possible mechanism. *World J Gastroenterol* 2003;9:529-533
- 14 Alcolado R, Arthur MJ, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci (Lond)* 1997;92:103-112
- 15 Pinzani M, Marra F, Caligiuri A, DeFranco R, Gentilini A, Failli P, Gentilini P. Inhibition by pentoxifylline of extracellular signal-regulated kinase activation by platelet-derived growth factor in hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 1996;119:1117-1124
- 16 Wu J, Norton PA. Animal models of liver fibrosis. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:1137-1143
- 17 Xu JW, Gong J, Chang XM, Luo JY, Dong L, Hao ZM, Jia A, Xu GP. Estrogen reduces CCL4-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:883-887
- 18 Garcia L, Hernandez I, Sandoval A, Salazar A, Garcia J, Vera J, Grijalva G, Muriel P, Margolin S, Armendariz-Borunda J. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. *J Hepatol* 2002;37:797-805
- 19 Fallowfield JA, Iredale JP. Reversal of liver fibrosis and cirrhosis-an emerging reality. *Scott Med J* 2004;49:3-6
- 20 Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001;5:315-334
- 21 刘秀英, 胡怡秀, 胡余明, 丘丰, 周月婵, 臧雪冰, 聂焱. 四氯化碳和猪血清肝纤维化模型组织病理比较. 世界华人消化杂志 2004;12:1875-1879
- 22 黄自平. 病毒性肝硬化的发生机理. 临床肝胆病杂志 1998;14:1-3
- 23 施新猷. 现代医学实验动物学. 北京: 人民军医出版社 2000;457-459
- 24 涂蓉, 郭俊渊, 王承缘, 胡国栋, 黄志程, 任大宏. 肝癌碘油栓塞后的碘油沉积与肿瘤坏死. 中华放射学杂志 1992;26:302-305

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

5-氮杂-2'-脱氧胞苷对SW48结肠腺癌细胞生物学行为的影响

李秀梅, 刘南植, 倪志, 张庆, 洪玮

李秀梅, 刘南植, 倪志, 张庆, 洪玮, 华中科技大学同济医学院附属同剂医院消化内科 湖北省武汉市 430030

李秀梅, 女, 1976年生, 湖北襄樊枣阳人, 汉族, 华中科技大学同济医学院附属同剂医院2003级硕士, 医师, 主要从事消化系统疾病的基础研究。

通讯作者: 刘南植, 430030, 湖北武汉市汉口解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同剂医院消化内科. lialixiumei@126.com
电话: 027-62134592

收稿日期: 2005-07-15 接受日期: 2005-08-03

Effect of demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine on human colonic carcinoma cell line SW48

Xiu-Mei Li, Nan-Zhi Liu, Zhi Ni, Qing Zhang, Wei Hong

Xiu-Mei Li, Nan-Zhi Liu, Zhi Ni, Qing Zhang, Wei Hong, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Nan-Zhi Liu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. lialixiumei@126.com

Received: 2005-07-15 Accepted: 2005-08-03

Abstract

AIM: To explore the effect of demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on the growth of human colonic carcinoma cell line SW48, and to investigate the possibility of its application in clinical treatment.

METHODS: Human colonic carcinoma SW48 cells were treated with 0.4, 1.6, 6.4, 25.8, and 102.4 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR, respectively. Then the growth of the cells was observed by MTT assay. The cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. The expression of the tumor suppressor gene RASSF1A mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: 5-Aza-CdR inhibited the proliferation of SW48 cells in a time- and concentration-dependent manner (1-5 d, 0.4-102.4 $\mu\text{mol/L}$). After 5-Aza-CdR treatment, the number of G_0/G_1 cells was increased, and 5-Aza-CdR blocked the cell cycle at G_1 phase. The apoptotic rate was also increased significantly.

RASSF1A gene was reactivated by 5-Aza-CdR in SW48 cells not expressing RASSF1A.

CONCLUSION: 5-Aza-CdR can inhibit the growth, and promote the apoptosis of SW48 cells by eliminating the methylation status of RASSF1A promoter.

Key Words: 5-Aza-2'-deoxycytidine; SW48 cell lines; Cell cycle; Apoptosis

Li XM, Liu NZ, Ni Z, Zhang Q, Hong W. Effect of demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine on human colonic carcinoma cell line SW48. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(17):2094-2097

摘要

目的: 研究去甲基化5-氮杂2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对SW48结肠腺癌细胞株生长周期及凋亡的影响, 探讨其临床治疗的可能性。

方法: 分别使用浓度为0.4, 1.6, 6.4, 25.6, 102.4 $\mu\text{mol/L}$ 特异型DNA甲基转移酶抑制剂5-Aza-CdR处理大肠腺癌细胞株。通过MTT来检测5-Aza-CdR对大肠癌细胞株存活率的影响。应用流式细胞检测甲基化5-Aza-CdR对SW48结肠腺癌细胞株生长周期及凋亡的影响。RT-PCR检测处理前后抑癌基因RASSF1A mRNA表达的改变。

结果: 5-氮杂2'-脱氧胞苷在1.6 $\mu\text{mol/L}$ 就可以明显的抑制SW48结肠腺癌细胞的增殖, 细胞周期中处于 G_0/G_1 期的细胞明显的增多, 阻滞于 G_1 期, 凋亡率增高, 而且以上作用与药物作用浓度, 时间在一定范围内呈正相关。5-Aza-CdR处理后, 无RASSF1A表达的SW48结肠腺癌细胞株可检测出基因RASSF1A的重新表达。

结论: 5-氮杂2'-脱氧胞苷可消除某些抑癌基因启动子甲基化状态, 使其重新表达而抑制SW48结肠腺癌细胞株的生长, 并促进其凋亡。

关键词: 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; SW48结肠腺癌细胞; 细胞周期; 细胞凋亡

李秀梅, 刘南植, 倪志, 张庆, 洪玮. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对SW48结肠腺癌细胞生物学行为的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2094-2097
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2094.asp>

0 引言

大肠癌的发生发展中DNA甲基化调节基因表达与某些抑癌基因高甲基化失活已得到广泛证实^[1-4]. 在癌变过程中, 使异常甲基化逆转, 特别是癌变早期的转变对肿瘤的防治尤为重要. 体外实验已证实甲基转移酶抑制剂5-氮杂2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine)通过去甲基化作用可使多种CpG 岛高甲基化的抑癌基因重新表达, 从而恢复抑癌功能. RASSF1A是2000年报道从3号染色体短臂克隆出来的肺癌新型候选抑癌基因^[5,6], 我们采用MTT, 及流式细胞仪来分别观察甲基转移酶抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷对人结肠腺癌细胞的成活率, 及细胞周期、凋亡率的影响. 并对RASSF1A转录本的表达情况进行了研究, 探讨5-氮杂-2'-脱氧胞苷应用于结肠癌临床治疗的可能性.

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠腺癌细胞株SW48由华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科惠赠, 用含100 mL/L小牛血清、100 kU/L链霉素和青霉素的RPMI1640培养基, 在37℃, 50 mL/L的CO₂, 湿度饱和的条件下培养. 5-Aza-CdR(Sigma, USA)用三蒸水充分溶解成储存液, -70℃保存. 取对数生长期的结肠腺癌细胞, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化癌细胞成单细胞悬液, 于显微镜下计数, 按 2×10^6 /L培养传代, 24 h后分别用0.4, 1.6, 6.4, 25.6, 102.4 μ mol/L(实验组1-5)浓度的特异型DNA甲基转移酶抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR)处理, 24 h后弃去药液并重新更换含新鲜培养液的药液, 浓度同前, 连续作用3 d后弃去药液, 用完全培养液继续培养4 d后进行实验, 以同体积的不含药液的培养液处理的细胞作对照组. 培养过程中用相差显微镜观察细胞形态变化.

1.2 方法

1.2.1 MTT法绘制生长曲线 药液处理前后的细胞继续培养4 d, 按每孔 3×10^3 个细胞接种于96孔板, 每孔200 μ L, 每4个孔为一组, 共接种5个板, 阴性对照组只换液, 不加药. 空白对照组是不含细胞的. 放入培养箱中继续培养, 每天取出一板, 每孔加入5 g/L MTT溶液20 μ L, 37℃作用4 h后弃去, 用PBS漂洗2次, 加入DMSO 150 μ L, 振荡器振荡15 min充分溶解结晶, 置酶标免役检测仪上测定波长为570 nm下的A值(OD值), 最后以细胞生存率为纵坐标, 以时间(d)为横坐标, 绘制不同浓度的5-Aza-CdR作用下的生长曲线. 按以下公式计算细胞生存率. 细胞生存率(%) = (试验组A值 - 空白对照组A值) / (阴性对照组 - 空白对照组) $\times 100\%$.

1.2.2 细胞周期和凋亡率检测 收集经药物处理前后培

养的细胞, PBS漂洗2次, 调整细胞密度为每 1×10^9 /L个细胞, 700 mL/L的冰已醇5 mL-20℃固定24 h以上, 加入RNaseA至终浓度为1 g/L, 37℃温育30 min, 加入碘化丙啶(PI)至终浓度50 mg/L, 1 h内测定, 以流式细胞仪进行细胞周期和凋亡率的分析.

1.2.3 RT-PCR检测用药前后RASSF1A基因mRNA表达 用TRIZOL试剂一步法提取经5-Aza-CdR处理和未经处理细胞的总RNA, 以OligodT为引物逆转录(Promega, USA), 取2 μ g总RNA进行纯化: 1 μ L 10 $\times$ reaction Buffer with MgCl₂, 1 μ L DNaseI, DEPC水加到10 μ L, 37℃ 30 min, 1 μ L 12.5 mmol/L EDTA, 65℃ 10 min, 1 μ L OligodT18轻混, 70℃孵育5 min, 离心, 收集到管底, 置冰上依次加入5 $\times$ M-MLV Buffer 5 μ L, dNTPmix 1.25 μ L, M-MLV 1 μ L, RNasin 0.5 μ L, DEPC水至25 μ L, 42℃ 60 min, 72℃孵育15 min. 25 μ L的PCR体系: 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, dNTPmix 0.5 μ L, MBI TaqDNA polymerase 0.625 μ L, 灭菌蒸馏水至20.5 μ L, primer1(10 μ mol/L) 1 μ L, primer2(10 μ mol/L) 1 μ L, MgCl₂ 1.5 μ L, cDNA 1 μ L. 以RASSF1A特异引物进行PCR扩增, 因为GAPDH在组织中稳定表达^[7], 所以以GAPDH为内参照. RASSF1A引物序列参考^[8]: 5'-GGCGTCGTGCGCAAAGGCC-3' (sense)和5'-GGGTGGCTTCTTGCTGGAGGG-3' (antisense). 扩增片断为329 bp, 内参照GAPDH的上游引物序列为: 5'-ACCA CAGTCCATGCCATCAC-3'; 下游引物序列为: 5'-TCCACCA CCCTGTTGCTGTA-3'; 产物长度452 bp, 反应条件: 在95℃变性5 min后, 按94℃变性30 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸60 s, 共35个循环. 最后72℃延伸5 min. 扩增产物于20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 观察.

统计学处理 试验数据分析采用SPSS软件对相关数据进行F检验, 及t检验.

2 结果

2.1 结肠腺癌细胞形态及生长速度的变化 在倒置显微镜下观察5-AZA-CDR处理前后癌细胞的变化, 可见癌细胞体积缩小, 死亡, 细胞密度减少. 经MTT检测, 发现5-Aza-CdR对SW48腺癌细胞增殖的抑制作用呈剂量和时间依赖性, 经方差分析同一作用时间的不同药物浓度组之间的细胞生存率差异均有显著性意义($P < 0.01$); 同一药物浓度的不同作用时间组之间的细胞生存率差异也有显著性意义($P < 0.01$). 在一定范围内随着剂量的增高和作用时间的延长, 对SW48结肠腺癌细胞增殖的抑制作用越明显(表1).

2.2 5-AZA-CDR使细胞生长停滞在G₀/G₁期, 增高癌细胞凋亡的发生率, 以上作用呈剂量依赖性, 经流式细胞仪检测分析, 对照组0 μ mol/L的凋亡率为1.78%, 而

表1 5-Aza-CdR对SW48结肠腺癌细胞生存率的影响(%)

药物溶度($\mu\text{mol/L}$)	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
0.4	98	95	93	92	91
1.6	90	84	75	66	53
6.4	80	74	69	56	40
25.8	72	43	30	12	6
102.4	49	40	9	8	5

^b $P < 0.01$, 不同药物溶度 $F = 44.079$, 不同作用时间度 $F = 12.250$.

6.4 $\mu\text{mol/L}$ 5-AZA-CDR处理组的凋亡率为49.25%, 两者间有明显的统计学差异($P < 0.05$) (表2). 当浓度达到102.4 $\mu\text{mol/L}$ 时, 更多的细胞表现为细胞坏死而不是凋亡, 因为成活细胞过少未能做流式细胞术检测.

2.3 结肠癌细胞SW48 RASSF1A基因mRNA的表达
经5-AZA-CDR处理培养后, 没有RASSF1A mRNA表达的SW48大肠癌细胞株可检测到RASSF1A mRNA的重新表达(图1).

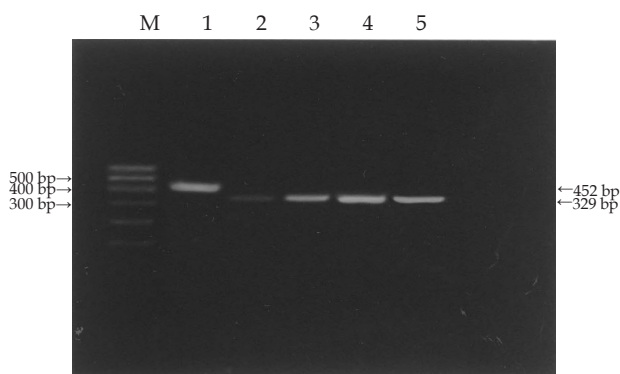


图1 不同浓度的5-Aza-CdR对RASSF1A mRNA 表达水平的影响.

Mark: DNA分子量标准; 1: GAPDH内参照及阴性(无5-Aza-CdR作用)
2: 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR; 3: 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR; 4: 6.4 $\mu\text{mol/L}$ 5-AzaCdR; 5: 25.6 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-CdR.

3 讨论

5-AZA-CDR治疗复发性和顽固性急性白血病和慢性髓性白血病危象具明显疗效, 在实体瘤中的作用尚不清楚^[9]. 肿瘤中基因组甲基化改变常见两种方式: 一方面DNA广泛性低甲基化导致染色体不稳定性, 从而引起基因突变; 另一方面, 位于抑癌基因启动子区CPG岛高甲基化异常, 引起基因表达沉默, 细胞异常增殖导致恶化. 同时基因甲基化异常可通过一种凋亡途径对化疗药物产生耐受, 作用机制可能为甲基化腺嘌呤影响蛋白质-DNA相互作用而抑制基因转录. 由于DNA的甲基化不涉及DNA序列本身的改变, 所以这种改变是可逆的, 因此可以通过消除基因启动子区域的甲基化状态, 使被封闭的基因尤其是肿瘤抑制基因重新表达, 从而抑制肿瘤生长, 达到治疗肿瘤的目的^[10, 14]. 我们选用去甲基化制剂处理结肠癌细胞株, 结果显: 5-Aza-CdR在浓度为0.4 $\mu\text{mol/L}$ 时即可抑制结肠癌细胞增

表2 5-AZA-CDR对SW48结肠腺癌细胞周期及细胞凋亡率的影响(%)

药物溶度($\mu\text{mol/L}$)	Sub-G ₁ 期	G ₁ 期	S期	G ₂ 期
0	1.78	57.26	22.10	15.27
0.4	19.64	57.21	15.99	8.94
1.6	38.71	46.27	9.89	7.56
6.4	49.25 ^a	38.46	9.35	5.09
25.6	38.27	45.68	6.74	3.85

$t = 3.98$, ^a $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$.

殖, 随着浓度的提高其抑制作用也增高($P < 0.01$), 同一浓度5-Aza-CdR随着作用时间的延长, 其生长抑制作用也越明显($P < 0.01$). 倒置显微镜下观察, 可见癌细胞体积缩小, 死亡, 细胞密度减少. 进一步研究发现, 5-Aza-CdR使细胞生长停滞在G₀/G₁期, 增高癌细胞凋亡的发生率, 以上作用呈剂量依赖性, 在浓度达到6.4 $\mu\text{mol/L}$ 时效果最明显, 倒置显微镜下观察, 可见当浓度102.4 $\mu\text{mol/L}$ 时, 更多的细胞表现为破碎, 形态不完整, 呈坏死的表现, 这和其他的化疗药物相似, 即在低浓度时引起细胞的凋亡, 而高浓度引起细胞的坏死. 无RASSF1A基因mRNA表达的大肠癌细胞使用5-Aza-CdR处理后, 均检出基因的重新表达. 并连续培养5代以上仍可检测出RASSF1A基因mRNA的表达, 究其原因, 5-Aza-CdR具有诱发因高甲基化封闭的基因重获表达的去甲基化功能, 从而导致其抑制肠癌细胞生长的作用. 不可否认, 药物本身如存在细胞毒效应也可产生抑制作用. 为确切证实5-AZA-CDR抑制细胞生长的内在机制, Bender *et al*^[15, 17]应用具有同等细胞毒性作用的药物Ara-C(无去甲基化作用)作用于膀胱癌细胞, 结果并未显示出抑制肿瘤细胞生长的可遗传性, 细胞毒效应均存在着时效性, 因而提示5-Aza-CdR抑制肿瘤细胞生长并非由于其本身的毒性作用.

RASSF1A作为抑癌基因的具体机制还不清楚, Dammann *et al*^[18, 22]目前已证实, Ras-GTPase是调节增殖与凋亡的分子开关超家族一员, 它的不同功能取决于细胞外信号分子的不同, 由此活化的Ras可能因与一系列不同的下游效应分子相互作用而发挥2种截然不同的功能: 即可以促进细胞生长和分化, 又可通过诱发细胞休眠, 诱导终末分化和凋亡来抑制细胞生长. Lee *et al*^[23, 24]用甲基化特定PCR方法, 检测正常结肠组织($n = 24$), 结肠腺瘤($n = 95$), 结直肠癌($n = 149$), 结果发现RASSF1A CpG岛甲基化在结直肠癌灶很频繁, 远比癌灶旁及癌远隔部位的甲基化概率高. Kuroki *et al*^[25, 26]和Byun *et al*^[27, 29]先后用甲基化特定的PCR对22个食管癌细胞株、47列食管癌组织标本、对15个胃癌细胞株、90例原发性胃癌组织以及膀胱癌细胞株进行分析后发现RASSF1A明显甲基化(有统计学意义), 并且甲基化程度与临床分期

显著相关, 进一步表明RASSF1A的表达失活部分是由RASSF1A启动子区CpG岛的高甲基化所引起的。

大量研究表明RASSF1A表达缺失和启动子高甲基化有着广泛的肿瘤谱, Muller *et al*^[30]在研究乳腺癌患者血清中DNA异常甲基化的意义时, 发现有血清RASSF1A DNA异常甲基化或APC血清DNA异常甲基化的患者预后很差, 并指出该基因有望在多种肿瘤的早期诊断、预后指标评估中发挥重大作用. 针对肿瘤细胞中区域性高甲基化存在的广泛性, 去甲基化制剂5-AZA-CDR具有广阔的抗肿瘤治疗前景。

4 参考文献

- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D. Analysis of the NaRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes* 1999; 13:1924-1935
- Prokhortchouk A, Hendrich B, Jorgensen H, Ruzoo A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, Prokhortchouk E. The p120 catenin partner kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes* 2001;15:1613-1618
- Bird AP. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv* 1996;28:87-101
- Bird A. DNA methylation de novo. *Science* 1999;286:2287-2288
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumor suppressor locus 3p21.3. *Nature Genet* 2000;25:315-319
- Dammann R, Takahashi T, Pfeifer GP. The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene* 2001;20:3563-3567
- Bartling B, Hoffmann J, Holtz J, Schulz R, Heusch G, Darmer D. Quantification of cardioprotective gene expression in porcine short-term hibernating myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:147-158
- Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zabarovsky E, White M, Minna JD. Epigenetic Inactivation of RASSF1A in Lung and Breast Cancers and Malignant Phenotype Suppression. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:691-699
- Zochbauer MS, Fung KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in nonsmall cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249-255
- Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, Guldberg P, Kohler G, Wijermans P, Jones PA, Lubbert M. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* 2002;100:2957-2964.
- Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH. Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. *Br J Cancer* 2002;86:1888-1892
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-3229
- Lubbert M, Tobler A, Daskalakis M. Cytosine demethylation of the proteinase-3/myeloblastin primary granule protease gene during phagocyte development. *Leukemia* 1999;13:1420-1427
- Kim SH, Bae SI, Lee HS, Kim WH. Alteration of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in colorectal neoplasms in sporadic and familial adenomatous polyposis patients. *Mol Carcinog* 2003;37:32-38
- Bender CM, Pao MM, Janes PA. Inhibition of DNA methylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 1998;58:95-101
- Gonzalzo ML, Hayashida T, Bender CM, Pao MM, Tsai YC, Gonzales FA, Nguyen HD, Nguyen TT, Jones PA. The role of DNA methylation in expression of the p19/p16 locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Res* 1998;58:1245-1252
- Xiong Z, Wu AH, Bender CM, Tsao JL, Blake C, Shibata D, Jones PA, Yu MC, Ross RK, Laird PW. Mismatch repair deficiency and CpG island hypermethylation in sporadic colon adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol* 2001;10:799-803.
- Dammann R, Schagdarsurengin U, Strunnikova M, Rastetter M, Seidel C, Liu L, Tommasi S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of the Ras-association domain family 1 (RASSF1A) gene and its function in human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2003;18:665-677
- Liu L, Tommasi S, Lee DH, Dammann R, Pfeifer GP. Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene* 2003;22(50):8125-36.
- Strunnikova M, Schagdarsurengin U, Kehlen A, Garbe JC, Stampfer MR, Dammann R. Chromatin inactivation precedes de novo DNA methylation during the progressive epigenetic silencing of the RASSF1A promoter. *Mol. Cell. Biol* 2005;25:3923-3933
- Chow LS, Lo KW, Kwong J, To KF, Tsang KS, Lam CW, Dammann R, Huang DP. RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2004;109:839-847
- Tommasi S, Dammann R, Zhang Z, Wang Y, Liu L, Tsark WM, Wilczynski SP, Li J, You M, Pfeifer GP. Tumor susceptibility of RASSF1A knockout mice. *Cancer Res* 2005; 65:92-98
- Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest* 2004;87:884-893.
- Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH, Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am. J. Pathol* 2003;163:1551-1556
- Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, Croce CM. Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63:3724-3728
- Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, Croce CM. Promoter hypermethylation of RASSF1A in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1441-1445
- Byun DS, Lee MG, Chae KS, Ryu BG, Chi SG. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A by aberrant promoter hypermethylation in human gastric adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:7034-7038
- Lee MG, Kim HY, Byun DS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG, Chi SG. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:6688-6692
- Chan MW, Chan LW, Tang NL, Lo KW, Tong JH, Chan AW, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Frequent hypermethylation of promoter region of RASSF1A in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. *Int J Cancer* 2003;104:611-616
- Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, Ivarsson L, Goebel G, Perkmann E, Marth C, Widschwendter M. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res* 2003;63:7641-7645

低氧对胰腺癌细胞株PC-3中IAP-2表达的影响机制

赵秋, 谷华, 杜静, 覃华, 刘南植

赵秋, 谷华, 杜静, 覃华, 刘南植, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

赵秋, 男, 1963-09-01生, 湖北省黄冈市人, 汉族, 1985年同济医科大学本科毕业, 1988年同济医科大学硕士, 副主任医师, 主要从事消化系胰腺病学研究。

通讯作者: 赵秋, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. tongji461@sina.com
电话: 027-83663611

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-08

Effect of hypoxia on apoptosis inhibitory protein 2 expression and its mechanism in pancreatic cancer cell line PC-3

Qiu Zhao, Hua Gu, Jing Du, Hua Qin, Nan-Zhi Liu

Qiu Zhao, Hua Gu, Jing Du, Hua Qin, Nan-Zhi Liu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Qiu Zhao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tongji461@sina.com

Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of apoptosis inhibitory protein 2 (IAP-2) in pancreatic cancer cell PC-3 under severe hypoxia, and to explore its relation with hypoxia inducible factor 1(HIF-1).

METHODS: PC-3 cells were cultured under different conditions as follows: normoxia; 20 mL/L O₂, 50 mL/L CO₂, and 930 mL/L N₂ for 4 h (hypoxia); 950 mL/L N₂ and 50 mL/L CO₂ for 1, 3, and 5 h, respectively (severe hypoxia); reoxygenation after 1 h of severe hypoxia; normoxia with colalt chloride (300 μmol/L). Immunocytochemistry was used to qualitatively evaluate the expression of IAP-2 protein. After extraction of cytoplasmic and nuclear proteins, Western blot was used to quantitatively determine the expression of IAP-2 protein, which was compared with the expression of HIF-1 protein. Then the expression of IAP-2 mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: IAP-2 protein was positively expressed in

the cytoplasm of PC-3 cells. There was no significant difference between the expression levels of IAP-2 protein under normoxia and hypoxia. The expression of IAP-2 protein was markedly increased ($t = 3.300$, $P < 0.05$) 1 h after severe hypoxia and remained high at 3 or 5 h. There was no significant difference among different time points ($P < 0.05$). Reoxygenation led to basal expression of IAP-2 protein and mRNA. HIF-1 expression was undetectable in normoxic PC-3 cells, but it was induced by hypoxia. Under severe hypoxia, HIF-1 was modestly expressed, but IAP-2 was abundantly expressed. After reoxygenation, the expression of HIF-1 disappeared, and IAP-2 returned to the basal level. Colalt chloride activated HIF-1 but not IAP-2. One hour after severe hypoxia, the expression of IAP-2 mRNA was evidently higher than that under normoxia ($t = 6.900$, $P < 0.05$) and remained high at 3, 5 h. There was no significant different among different time points ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Severe hypoxia induces the up-regulation of IAP-2 in PC-3 cells through HIF-1-independent pathways.

Key Words: Hypoxia; Pancreatic cancer; Apoptosis inhibitory protein 2; Hypoxia inducible factor 1

Zhao Q, Gu H, Du J, Qin H, Liu NZ. Effect of hypoxia on apoptosis inhibitory protein 2 expression and its mechanism in pancreatic cancer cell line PC-3. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2098-2102

摘要

目的: 研究极度低氧下人胰腺癌细胞株PC-3中IAP-2表达的变化, 初步探讨其与HIF-1的相关机制。

方法: PC-3细胞株分组孵育: 常氧组, 体积分数为20 mL/L O₂/50 mL/L CO₂/930 mL/L N₂低氧组4 h, 950 mL/L N₂/50 mL/L CO₂极度低氧组1、3、5 h, 950 mL/L N₂/50 mL/L CO₂低氧3 h后复氧, 另取一组加入300 μmol/L氯化钴常氧孵育。用细胞免疫化学定性检测IAP-2蛋白表达; 蛋白裂解液提取胞质胞核蛋白, 用Western blot检测IAP-2蛋白水平变化, 同时对比HIF-1蛋白表达; 用RT-PCR检测IAP-2基因水平改变。

结果: 免疫细胞化学检测IAP-2蛋白在PC-3细胞中呈阳性表达, 定位于胞质. Western blot显示常氧、低氧4 h可检测到IAP-2蛋白, 表达无差异, 极度低氧1 h IAP-2蛋白表达明显增加($t = 3.300, P < 0.05$), 3、5 h IAP-2持续高表达, 各时间段无显著性差异, 复氧后恢复基线水平. 实验还显示了HIF-1和IAP-2蛋白的表达差异: 常氧组HIF-1未表达, 低氧4 h可诱发, IAP-2保持基线水平; 极度低氧HIF-1无变化, IAP-2表达明显增高; 复氧后HIF-1不表达, IAP-2恢复基线表达; 加入氯化钴后HIF-1恢复表达, IAP-2保持基线, 初步表明IAP-2蛋白表达上调有独立于HIF-1的作用机制. RT-PCR检测表明, 极度低氧1、3、5 h后IAP-2 mRNA表达明显高于常氧组($t = 6.900, P < 0.05$), 各时间组无显著差异, 复氧后恢复基线水平. 该结果与上述IAP-2蛋白表达上调一致, 初步表明IAP-2上调发生在转录水平.

结论: 极度低氧下IAP-2在人胰腺癌细胞株PC-3表达上调, 并具有独立于HIF-1的抗凋亡机制.

关键词: 低氧; 胰腺癌; 凋亡抑制蛋白2; 缺氧诱导因子1

赵秋, 谷华, 杜静, 覃华, 刘南植. 低氧对胰腺癌细胞株PC-3中IAP-2表达的影响机制. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2098-2102
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2098.asp>

0 引言

在肿瘤形成和组织缺血中缺氧是普遍存在的, 缺氧的程度决定了细胞是走向凋亡或是适应缺氧存活下来, 长期的缺氧形成细胞对缺氧诱导的凋亡抵抗性, 这些产生抗性的瘤体具有更强的侵袭性, 同时降低了对放疗化疗的反应. 现国外正着手研究于不同缺氧环境表达的各种调节因子对细胞凋亡、抗凋亡及增殖的影响及相互关系, 目前缺氧诱导因子1(hypoxia inducible factor 1, HIF-1)研究较多, 结论显示HIF-1在缺氧时可起到诱导凋亡或抗凋亡的作用^[1-4]. 在大鼠肾近曲小管(RPTC)研究中发现, 极度低氧(近乎无氧)可诱发凋亡抑制蛋白2(apoptosis inhibitory protein 2, IAP-2)表达上调并表现出抗凋亡性, 其机制可能是IAP-2协同其他因子阻止Bak转位以保持线粒体完整性, 通过抑制caspase活化发挥抗凋亡作用, 具体机制不清^[5]; 在人实体瘤中, IAP-2表达的变化和对凋亡的影响及机制探讨尚未报道. 我们选用人胰腺癌细胞株PC-3作为研究对象, 于极度低氧下观察IAP-2表达的变化, 同时观察HIF-1的表达, 以探讨缺氧时IAP-2的表达与HIF-1之间有无相关性, 为进一步研究实体瘤抗凋亡性提供新的思路及临床治疗提供可靠实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株PC-3由本研究所提供, DMEM高糖培养基、胎牛血清购自HyClone公司, Oxyrase购自Oxyrase公司, 六孔板、免疫组化试剂盒购自Santa Cruz公司, 兔抗人IAP-2多克隆抗体购自美国Proteintech公司, 羊抗人HIF-1mAb购自Novus公司, 羊抗兔IgG购自三鹰科技公司, 羊抗小鼠IgG(H+L)购自凌飞公司, IAP-2引物合成自生工生物工程公司, PCR试剂盒购自TaKaRa公司, HEPES, NP40, EDTA, PMSF等蛋白裂解试剂, 核酸裂解试剂购自Sigma公司, DTT, 丙烯酰胺, TMEMD, SDS, NC膜等Western blot试剂购自Ameresco公司, ECL发光试剂购自Pierce公司. PC-3细胞株分组繁育^[6,7]: 常氧组, 20 mL/L O₂/50 mL/L CO₂/930 mL/L N₂低氧组4 h, 950 mL/L N₂/50 mL/L CO₂极度低氧组1 h, 3 h, 5 h, 950 mL/L N₂/50 mL/L CO₂低氧3 h后复氧, 另取一组加入300 μmol/L氯化钴常氧繁育. 常氧培养时, 细胞株采用含100 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基, 常规培养于50 mL/L CO₂/950 mL/L空气、37℃孵箱中, 待其2-3 d贴壁生长至70-80%融合时, 用胰蛋白酶消化传代. 低氧培养时, 将细胞株提前转入20 mL/L O₂/50 mL/L CO₂/930 mL/L N₂, 37℃低氧培养箱. 极度低氧培养时, 先用PBS清洗细胞, 然后转入含950 mL/L N₂/50 mL/L CO₂的厌氧板, 于Krebs-Ringer碳酸氢盐缓冲液中培养, 该缓冲液提前经950 mL/L N₂/50 mL/L CO₂处理并按1:10体积比(Oxyrase:缓冲液)加入Oxyrase以除去残余O₂, 复氧时, 细胞再转移到50 mL/L CO₂/950 mL/L空气孵箱.

1.2 方法 将经消毒的20 mm盖玻片置于直径90 mm培养皿中, 按 2×10^7 /L细胞接种, 3 d左右转入950 mL/L N₂/50 mL/L CO₂缺氧环境培养3 h, 以常氧培养作为对照, 行免疫细胞化学检测. PBS清洗, 冰丙酮固定, 用TritonX-100孵育, 30 mL/L H₂O₂孵育, 血清封闭, 再加一抗IAP-2于37℃作用1 h, 二抗37℃作用0.5 h, DAB显色, 苏木素复染, 树胶封片, 光镜下观察.

1.2.1 Western blot检测IAP-2, HIF-1蛋白 收集各组细胞, 冰PBS清洗2次, 加Buffer A(含HEPES-KOH, KCl, EDTA, NP40, PMSF, Aprotinin)冰育30 min, 1300 r/min离心5 min, 上清作为胞质蛋白, 沉淀加Buffer B(含HEPES-KOH, KCl, EDTA, MgCl₂, 甘油, PMSF, Aprotinin)冰育30 min, 15000 g离心30 min, 上清作为核蛋白, 用考马斯亮蓝法检测蛋白浓度, 其余低温保存^[8]. 取各组蛋白高温变性, 100 g/L聚丙烯酰胺电泳分离约1 h, 100 EV、低温2 h转至NC膜, 室温封闭1 h, 各组分别加入一抗IAP-2,

HIF-1, 4℃孵育过夜, 漂洗, 加二抗, 室温孵育1 h, 漂洗, 用ECL试剂显示蛋白条带, 以 β -actin作为内对照. 采用Image-Pro Plus 5.1图象分析软件测定Western blot条带净灰度值, 并与内参照的测定结果比较, 计算其比值, 比较各组差异以及IAP-2, HIF-1之间的关系.

1.2.2 RT-PCR 检测IAP-2 mRNA 取常氧、极度低氧及复氧组细胞提取总RNA: PBS清洗2遍, 加入Trizol 1 mL溶液裂解. 按Trizol试剂盒说明书提取总RNA, 用分光光度计测定RNA的浓度和纯度. cDNA的合成: 反应体系中加入提取的RNA 1 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 10 $\times$ 逆转录缓冲液1 μ L, 10 mmol/L 脱氧核苷三磷酸(dNTP)1 μ L, 4 $\times$ 10⁷ U/L RNA酶抑制剂0.25 μ L, 5 $\times$ 10⁶ U/L 鸟类成髓细胞瘤病毒(AMV)逆转录酶0.5 μ L, 0.5 g/L寡聚脱氧核苷酸(Oligo Dt-Adaptor Primer) 0.5 μ L, 双脱氢水3.75 μ L; 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min. 低温保存. PCR检测: IAP-2基因PCR引物序列为, 上游: 5' TCTTCATCGAGGAC TAACCCCTAC3', 下游: 5' GCATCATCCTTTGGTTCCAGT 3'. 反应条件: 94℃变性2 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环29次. 以 β -actin为内对照检测转录效率, RT-PCR产物用15 g/L琼脂糖凝胶电泳, GoldView显色, IAP-2基因及 β -actin PCR产物长度分别为200 bp, 600 bp. 利用Image-Pro Plus 5.1图象分析软件测定RT-PCR条带净灰度值, 并与内参照的测定结果比较, 计算其比值.

统计学处理 数据以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 采用SPSS11.5软件进行统计学处理, 多组间均数比较用方差分析, 两组均数间比较用 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有显著性.

2 结果

2.1 IAP-2蛋白的表达 IAP-2蛋白在PC-3细胞中呈阳性表达, 显棕黄色, 定位于胞质, 常氧低氧表达无显著差异(图1). 蛋白免疫印迹显示各组灰度值/ β -actin

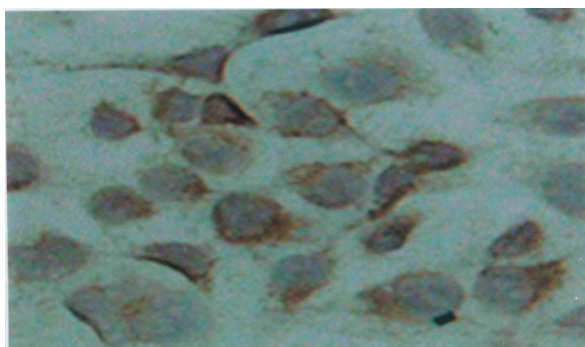


图1 低氧下IAP-2在PC-3中阳性表达.

值分别为: 常氧组(0.94 $\pm$ 0.02)、20 mL/L O₂ 4 h组(0.92 $\pm$ 0.03)之间IAP-2蛋白表达均无显著性差异($t = 1.124, P>0.05$), 950 mL/L N₂/50 mL/L CO₂作用1 h IAP-2表达量开始增加(1.02 $\pm$ 0.01), 与常氧组差异有显著性意义($t = 3.300, P<0.05$), 3 h(1.01 $\pm$ 0.03), 5 h(1.01 $\pm$ 0.02) IAP-2持续表达, 各时间段之间无显著性差异($F = 1.194, P>0.05$), 复氧后(0.93 $\pm$ 0.02)恢复低表达, 与常氧组无显著性差异($t = 2.018, P>0.05$). 胞核均无表达. 可见IAP-2于极度低氧表达增高, 翻译后转至胞质通过一定机制发挥抗凋亡作用(图2). 对比PC-3细胞中HIF-1表达, 常氧组HIF-1无表达, IAP-2可表达; 低氧组4 h后胞核可显示HIF-1条带, IAP-2保持基线水平; 转入极度低氧IAP-2表达明显增高, HIF-1表达(0.98 $\pm$ 0.02)与低氧组(0.98 $\pm$ 0.03)无显著性差异($t = 1.372, P>0.05$); 复氧后IAP-2恢复基线表达, HIF-1不表达; 加入氯化钴4 h后HIF-1表达(0.97 $\pm$ 0.02), 与低氧组无差异($t = 0.399, P>0.05$), IAP-2保持基线, 初步表明IAP-2的表达上调有独立于HIF-1的作用机制(图3).

2.2 IAP-2 mRNA的水平 RT-PCR检测显示, 对比常氧组(0.79 $\pm$ 0.01), 极度低氧1 h(0.87 $\pm$ 0.02) IAP-2 mRNA表达明显增加, 两者具有显著性差异($t = 6.900, P<0.01$), 3 h(0.86 $\pm$ 0.01), 5 h(0.88 $\pm$ 0.01)持续表达, 各时间段无显著性差异($F = 1.068, P>0.05$), 复氧

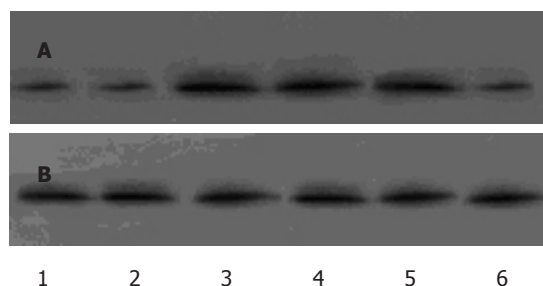


图2 PC-3细胞中IAP-2蛋白水平. A: IAP-2; B: β -actin; 1-6: 常氧; 20 mL/L O₂ 4 h; 950 mL/L N₂ 1 h, 3 h, 5 h; 950 mL/L N₂作用3 h后复氧

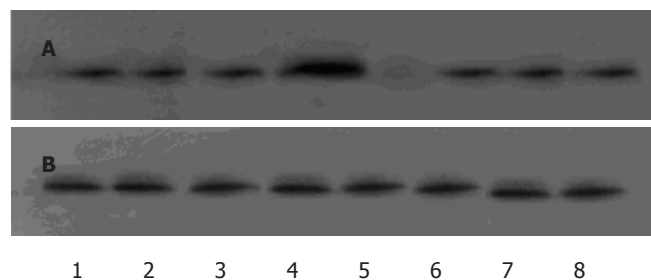


图3 PC-3细胞中IAP-2, HIF-1蛋白水平比较. A: IAP-2, HIF-1; B: β -actin; 1-4: 常氧; 20 mL/L O₂ 4 h; 氯化钴 4 h; 950 mL/L N₂ 3 h IAP-2蛋白 5-8: 常氧; 20 mL/L O₂ 4 h; 氯化钴 4 h; 950 mL/L N₂ 3 h HIF-1蛋白.

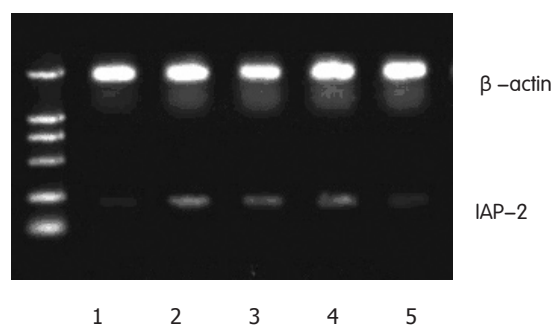


图4 PC-3细胞中IAP-2 mRNA水平. 1-5:常氧, 950 mL/L N_2 1 h, 3 h, 5 h; 950 mL/L N_2 3 h后复氧.

(0.80 ± 0.02)恢复表达, 与常氧组无差异($t = 0.286$, $P > 0.05$). 该结果与上述IAP-2蛋白表达一致, 初步表明IAP-2上调发生于转录水平(图4).

3 讨论

在实体瘤中缺氧是普遍存在的, 长期的缺氧形成细胞对缺氧诱导的凋亡抵抗性, 这些产生抗性的瘤体可能表现出更强的侵袭性, 同时降低了对放疗化疗的反应^[9, 11]. 低氧下表达的各种凋亡调节因子在诱发凋亡、对抗凋亡及促进增殖中保持着精细的平衡, 理解各种因子的作用机制及相关性对治疗实体瘤会产生新的突破^[12, 14]. HIF-1可发挥凋亡或抗凋亡作用^[15, 19]. 目前涉及低氧细胞凋亡或抗凋亡的相关因子及机制仍未完全阐明, 对这些机制的探讨将更有助于实体瘤的治疗^[20, 22]. 严格的缺氧(接近无氧)环境能诱发IAP-2表达上调, IAP家族(inhibitor of apoptosis family of proteins, IAPs)通过抑制caspase, 参与TNFR介导的信号转导, 与NF- κ B相互作用发挥抗细胞凋亡作用^[23, 25]. 目前研究表明低氧诱导IAP-2对细胞色素C刺激的caspase活化产生抑制作用, 将IAP-2自胞质清除可恢复caspase活性^[6, 7].

但目前该研究仅限于大鼠, 尚未用于人类实验. 我们首次选用人胰腺癌细胞株PC-3作为研究对象, 探讨实体瘤中IAP-2的表达变化及相关机制, 以加深对肿瘤细胞相关生长调节因子的认识, 为新型药物开发及临床治疗提供实验依据. 本研究显示, IAP-2表达于PC-3胞质, 极度低氧环境表达较多, IAP-2在缺氧1 h后表达增加, 3-5 h未见减弱, mRNA和蛋白表达具有时间和数量的一致性, 初步显示IAP-2因子改变发生在转录水平. HIF-1蛋白常氧未见表达, 20 mL/L低氧4 h后可显示条带, 极度低氧环境条带未加深; IAP-2于常氧和20 mL/L低氧表达适量, 极度低氧明显增高; 加入氯化钴后4 h HIF-1可显示条带, IAP-2无变化, 上述结果表明HIF-1可因物理因素(低氧)或化学因素(加入氯化钴, 去铁敏等)表达, 缺氧的程度对

HIF-1无明显影响, IAP-2仅在极度缺氧表达上调, 初步表明HIF-1这种介导多种基因缺氧反应的转录因子与IAP-2的表达无关, IAP-2上调及抗凋亡另有不同于HIF-1的独立作用机制. 结合对RTPC的研究成果及对人IAP-2的抗凋亡研究机制^[23, 26], 初步表明IAP-2在人肿瘤细胞株于极度低氧下表达增加、以独立于HIF-1的机制发挥抗凋亡作用.

通常, 在近乎无氧的条件下, 许多在适度低氧下表达的转录因子可能无法参与IAP-2的调节, 但目前研究表明, IAP-2并非在无氧下获得的唯一具有凋亡抗性的因子, IAP-2协同其他因子阻止Bax转位并保持线粒体的完整性, 可在组织缺血和肿瘤形成中维持细胞存活^[27, 29], 故下一步的研究应着眼于极度低氧诱导IAP-2上调的作用机理及IAP-2基因启动子元件和信号传导通路, 以及与其他因子的关联性, 并继续探寻其他低氧调节因子^[26, 30], 以期加深对肿瘤细胞凋亡抗性的认识, 并为进一步开展临床实验和开发新型临床抗癌药物提供可靠的理论依据和治疗靶点.

4 参考文献

- 1 Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1 alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 2002;64:889-892
- 2 Semenza GL, Agani F, Feldser D, Iyer N, Kotch L, Langhner E, Yu A. Hypoxia, HIF-1, and the pathophysiology of common human diseases. *Adv Exp Med Biol* 2000;475:123-130
- 3 Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002;8:S62-S67
- 4 Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000;60:4693-4696
- 5 Greijer AE, Van der wall E. The role of hypoxia inducible factor 1(HIF-1)in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004;57:1009-1014
- 6 Dong Z, Venkatachalam MA, Wang J, Patel Y, Saikumar P, Semenza GL, Force T, Nishiyama J. Up-regulation of Apoptosis Inhibitory Protein IAP-2 by Hypoxia. *J Biol Chem* 2001;276:18702-18709
- 7 Dong Z, Wang JZ, Yu F, Venkatachalam MA. Apoptosis-Resistance of Hypoxic Cells: Multiple Factors Involved and a Role for IAP-2. *Am J Pathol* 2003;163:663-671
- 8 Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J, Niizeki H, Kawamura Ki, Hosokawa M, Asaka M. Constitutive Expression of Hypoxia-inducible Factor-1alpha Renders Pancreatic Cancer Cells Resistant to Apoptosis Induced by Hypoxia and Nutrient Deprivation. *Cancer Res* 2001;61:6548-6554
- 9 Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47
- 10 Lacasse EC, Baird S, Korneluk RG, Mackenzie AE. The inhibitors of apoptosis(IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998;17:3247-3259
- 11 Tsang RW, Fyles AW, Li Y, Raiaraman MM, Chapman W, Pintilie M, Wong CS. Tumour proliferation and apoptosis in human uterine cervix carcinoma II: correlations with clinical outcome. *Radiother Oncol* 1999;50:93-101
- 12 Alvarez-Tejado M, Naranjo-Suarez S, Jimenez C, Carrera AC, Landazuri MO, del Peso L. Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway

- in PC12 cells: protective role in apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:22368-22374
- 13 Gottlieb RA, Granville DJ. Analyzing mitochondrial changes during apoptosis. *Methods* 2002;26:341-347
- 14 Tsang RW, Fyles AW, Milosevic, Syed A, Pintilie M, Levin W, Manchul LA. Interrelationship of proliferation and hypoxia in carcinoma of the cervix. *Int Radiat Oncol Phys* 2000;46:95-99
- 15 Chen J, Zhao S, Nakada K, Kuge Y, Tamaki N, Okada F, Wang J, Shindo M, Higashino F, Takeda K, Asaka M, Katoh H, Sugiyama T, Hosokawa M, Kabayashi M. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. *Am J Pathol* 2003;162:283-291
- 16 樊利芳, 刁路明, 陈德基, 刘铭球, 朱丽琴, 李红钢, 唐志佼, 夏东, 刘绚, 陈洪雷. 肺癌组织中缺氧诱导因子-1 α 的表达及其与凋亡和增殖关系. *癌症* 2002;21:254-258
- 17 李玉军, 纪祥瑞. 缺氧诱导因子-1 α 的表达与胰腺癌增殖、凋亡和新生血管形成的关系. *中华消化杂志* 2004;24:496-497
- 18 Moritz W, Meier F, Stroka DM, Giuliani M, Kugelmeier P, Nett PC, Lehmann R, Candinas D, Gassmann M, Weber M. Apoptosis in hypoxic human pancreatic islets correlates with HIF-1 alpha expression. *FASEB J* 2002;16:745-747
- 19 Zhong H, Agani F, Baccala AA, Langhner E, Riosco-Camacho N, Isaacs WB, Simons JW, Semenza GL. Increased expression of hypoxia inducible factor-1 alpha in rat and human prostate cancer. *Cancer Res* 1998;58:5280-5284
- 20 Zhong H, Chiles K, Feldser D, Langhner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1a expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000;60:1541-1545
- 21 Gottlieb RA, Grancville DJ. Analyzing mitochondrial changes during apoptosis. *Methods* 2002;26:341-347
- 22 Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47
- 23 Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:401-441
- 24 LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, Mackenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998;17:3247-3259
- 25 Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:239-252
- 26 Dong Z, Nishiyama J, Yi X, Venkatachalam MA, Denton M, Gu S, Li S, Qiang M. Gene promoter of apoptosis inhibitory protein IAP-2: identification of enhancer elements and activation by severe hypoxia. *Biochem J* 2002;364:413-421
- 27 Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002;111:331-342
- 28 Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA. Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:12825-12830
- 29 Santore MT, McClintock DS, Lee VY, Budinger GR, Chandel NS. Antoxia-induced apoptosis occurs through a mitochondria-dependent pathway in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L727-L734
- 30 Ameri K, Lewis CE, Rada M, Sowter H, Hai T, Harris AL. Antic induction of ATF-4 through HIF-1-independent pathways of protein stabilization in human cancer cells. *Blood* 2004;103:1876-1882

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2006 年《世界华人消化杂志》

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

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

《世界华人消化杂志》2006 年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号 CN 14 - 1260/R,邮发代号 82-262,出版日期 8, 18, 28 日,页码 160,月价 72.00,年价 864 元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址:100023 北京市 2345 信箱,世界胃肠病学杂志社。联系电话:010-85381901-1020;传真:010-85381893;E-mail:wcjd@wjgnet.com;网址:www.wjgnet.com。

重症胰腺炎肾脏损伤中细胞凋亡相关基因的作用

朱明德, 方驰华, 史学深

朱明德, 方驰华, 史学深, 南方医科大学珠江医院肝胆外科 广东省广州市 510282

朱明德, 男, 1970-11-25生, 湖北省武汉市人, 汉族, 2003年南方医科大学硕士生, 主要从事肝胆胰外科疾病的研究.

通讯作者: 方驰华, 510282, 广东省广州市工业大道中, 珠江医院普外科. fch58520@sina.com

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-08

Renal cells apoptosis and *bax*, *bcl-2* expression in rats with severe acute pancreatitis

Ming-De Zhu, Chi-Hua Fang, Xue-Shen Shi

Ming-De Zhu, Chi-Hua Fang, Xue-Shen Shi, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Correspondence to: Chi-Hua Fang, Department of General Surgery, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. fch58520@sina.com

Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-08

Abstract

AIM: To explore the roles of renal cell apoptosis and expression of *bax* and *bcl-2* in renal injury in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Thirty rats were randomized into sham operation (SO, $n = 15$) and SAP group ($n = 15$). The model of SAP was established by retrograde injection of 50 g/L sodium taurocholate into the biliopancreatic duct in the rats. Serum creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN) were determined 6, 12, and 18 h after injection. The pathological changes were observed by light and electron microscopy. The apoptosis of renal cells was determined by TUNEL method, and the expression of *bax* and *bcl-2* was detected by immunohistochemical staining (SABC assay).

RESULTS: As compared with those in SO group at the same phase, serum Cr and BUN in SAP group increased markedly. Significant injuries of renal tissue were observed under light and electron microscope. The apoptotic index of renal glomerular cells increased significantly 6, 12, and 18 h after injection (3.2 ± 1.1 vs 0.8 ± 0.1 , $P < 0.05$; 3.9 ± 1.8 vs 0.9 ± 0.1 , $P < 0.05$; 4.8 ± 1.7 vs 0.8 ± 0.2 , $P < 0.01$, respectively). The apoptotic index of renal tubule cells also increased significantly (9.8 ± 1.1

vs 1.3 ± 0.5 , $P < 0.01$; 12.6 ± 2.3 vs 1.2 ± 0.3 , $P < 0.01$; 15.7 ± 2.6 vs 1.3 ± 0.3 , $P < 0.01$, respectively). The expression of *bax* in renal glomerulus and tubule increased significantly at 6, 12, and 18 h, respectively (glomerulus: 3.05 ± 0.86 vs 1.01 ± 0.04 , $P < 0.05$; 3.37 ± 1.13 vs 1.06 ± 0.05 , $P < 0.05$; 4.11 ± 1.24 vs 1.09 ± 0.03 , $P < 0.05$; tubule: 8.17 ± 2.16 vs 1.53 ± 0.07 , $P < 0.01$; 12.92 ± 1.81 vs 1.61 ± 0.05 , $P < 0.01$; 13.08 ± 2.53 vs 1.59 ± 0.05 , $P < 0.01$), and increased continuously. *bcl-2* was mainly expressed in the regions of renal tubule, and it also increased in SAP group at 6, 12, and 18 h, respectively (3.38 ± 1.07 vs 1.58 ± 0.02 , $P < 0.05$; 4.26 ± 1.13 vs 1.59 ± 0.06 , $P < 0.05$; 7.21 ± 1.04 vs 1.61 ± 0.02 , $P < 0.01$). The level of *bcl-2* expression in renal glomerulus was higher in SAP group than that in SO group at 6, 12, and 18 h, respectively (2.18 ± 0.65 vs 1.04 ± 0.02 ; 2.42 ± 0.63 vs 1.03 ± 0.05 , $P < 0.05$; 2.69 ± 0.47 vs 1.08 ± 0.04 , $P < 0.05$), but decreased with the duration of the injuries.

CONCLUSION: Renal cell apoptosis, which relates to the up-regulated expression of *bax* and down-regulated expression of *bcl-2*, may be involved in the pathogenesis of renal injury in patients with SAP.

Key Words: Severe acute pancreatitis; *bax*; *bcl-2*; Renal cell apoptosis

Zhu MD, Fang CH, Shi XS, Renal cells apoptosis and expression of correlative gene in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2103-2107

摘要

目的: 探讨细胞凋亡及*bax*, *bcl-2*基因表达在重症胰腺炎(SAP)肾脏损伤中的作用.

方法: 大鼠30只随机分为假手术组(SO组, $n = 15$)和SAP组($n = 15$), 采用50 g/L牛磺胆酸钠逆行胆胰管注射法建立SAP模型, 建模后6, 12, 18 h测定血Cr, BUN, 光镜、电镜观察肾组织病理变化, TUNEL法测定肾脏细胞凋亡, SABC免疫组化染色法测定*bax*, *bcl-2*基因表达.

结果: SAP组血Cr, BUN较假手术组升高, 光电镜下见肾组织损害明显. 肾小球细胞凋亡数明显高于对照

组(6, 12, 18 h分别为 3.2 ± 1.1 vs 0.8 ± 0.1 , $P < 0.05$; 3.9 ± 1.8 vs 0.9 ± 0.1 , $P < 0.05$; 4.8 ± 1.7 vs 0.8 ± 0.2 , $P < 0.01$), 肾小管细胞凋亡数明显高于对照组(6, 12, 18 h分别为 9.8 ± 1.1 vs 1.3 ± 0.5 , $P < 0.01$; 12.6 ± 2.3 vs 1.2 ± 0.3 , $P < 0.01$; 15.7 ± 2.6 vs 1.3 ± 0.3 , $P < 0.01$), 肾小球***bax***表达水平明显高于对照组(6, 12, 18 h分别为 3.05 ± 0.86 vs 1.01 ± 0.04 , $P < 0.05$; 3.37 ± 1.13 vs 1.06 ± 0.05 , $P < 0.05$; 4.11 ± 1.24 vs 1.09 ± 0.03 , $P < 0.05$), 肾小管***bax***表达水平也明显高于对照组(6, 12, 18 h分别为 8.17 ± 2.16 vs 1.53 ± 0.07 , $P < 0.01$; 12.92 ± 1.81 vs 1.61 ± 0.05 , $P < 0.01$; 13.08 ± 2.53 vs 1.59 ± 0.05 , $P < 0.01$), 并且随病程延长而逐渐增高. ***bcl-2***表达主要在肾小管区, 其表达水平也高于对照组(6, 12, 18 h分别为 3.38 ± 1.07 vs 1.58 ± 0.02 , $P < 0.05$; 4.26 ± 1.13 vs 1.59 ± 0.06 , $P < 0.05$; 7.21 ± 1.04 vs 1.61 ± 0.02 , $P < 0.01$), 肾小球区的***bcl-2***表达水平也高于对照组(6, 12, 18 h分别为 2.18 ± 0.65 vs 1.04 ± 0.02 ; 2.42 ± 0.63 vs 1.03 ± 0.05 , $P < 0.05$; 2.69 ± 0.47 vs 1.08 ± 0.04 , $P < 0.05$), 但随病程延长而逐渐下降.

结论: SAP肾脏损伤的发病与肾脏细胞凋亡有关, 可能是通过上调***bax***表达并下调***bcl-2***表达而引起细胞凋亡.

关键词: 重症胰腺炎; ***bax***; ***bcl-2***; 肾细胞凋亡

朱明德, 方驰华, 史学深. 重症胰腺炎肾脏损伤中细胞凋亡相关基因的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2103-2107
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2103.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)常并发多器官功能障碍, 其胰外器官损伤中肾功能障碍(胰性肾病)发生率约14-43%, 仅次于肺功能障碍, 发展至急性肾功能衰竭后死亡率高达71-84%^[1]. 目前对其发病机制尚不完全清楚. 过去认为SAP能致动物肾病与磷脂酶A₂、内毒素、肿瘤坏死因子、脂质过氧化损伤等有关^[2-7], 近年的研究发现, 在一些继发性肾损伤过程中可发现肾脏细胞凋亡现象^[8-14]. 我们检测SAP肾脏损伤大鼠肾组织细胞凋亡及凋亡相关基因蛋白表达情况, 探讨细胞凋亡及其相关基因蛋白表达在SAP肾脏损伤发病过程中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠30只, 体质量250-300 g, 由南方医科大学实验动物中心提供. 随机分成2组: 假手术组(S0组)和SAP组各15只. 每组再分为6, 12, 18 h三个时间点, 每个时间点分配5只大鼠. 动物术前禁食不禁水12 h, SAP组用30 g/L 戊巴比妥钠(30 mg/kg)ip麻醉, 作上腹正中切口入腹, 近肝门处暂时夹闭胆总管, 于十二指肠降部找到胰胆管开口, 在对侧肠壁上选一无血管区, 用穿刺针扎穿肠壁, 将穿刺导管从针

孔送入肠腔后穿入胰胆管内1 cm, 注入50 g/L牛磺胆酸钠(10 mL/kg)制备SAP模型(注射速度0.2 mL/min), 指压穿刺点, 查无漏胆, 逐层关腹; S0组仅行胰胆管穿刺操作, 不注射药物. 造模后6, 12, 18 h等各时间点处死大鼠, 心脏穿刺抽血, 快速切取左侧肾脏, 测定各项指标.

1.2 方法 全自动生化分析仪测定血Cr, BUN. 各组织标本以多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、HE染色, 光镜观察; 电镜标本以30 g/L戊二醛-10 g/L锇酸双重固定, 环氧树脂包埋, 超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅电子染色, 透射电镜观察.

1.2.1 肾脏细胞凋亡的测定 采用DNA末端原位标记法(TUNEL法, 试剂盒购自武汉博士德公司). 切片常规脱蜡入水, 经30 mL/L H₂O₂处理、蛋白酶K消化后, 加入TDT和Dig. dUTP4℃过夜, 封闭后加生物素化抗地高辛抗体, 洗涤, 加SABC, DAB显色, 光镜下计算肾脏细胞凋亡指数(apoptotic index, AI). AI计算方法: 细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡细胞, 每张切片均分别统计20个正切肾小球及100个正切肾小管凋亡细胞数和总细胞数, $AI = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$.

1.2.2 基因*bax***, ***bcl-2***的测定** 采用SABC免疫组化染色法(免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司). 染色模式: 胞膜或胞质. 各组切片均采用图像分析系统对免疫组化染色阳性反应产物进行定量分析. 具体操作为: 每张切片分别测量10个肾小球及10个高倍视野的肾小管, 利用图像分析系统分析阳性面积和阳性区域平均灰度值, 并将阳性面积和平均灰度值按文献方法^[15]换算成阳性单位(positive unit, PU), 以PU值大小代表阳性产物表达的多少.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件建立数据库, 两组均数比较用完全随机设计资料的方差分析, 细胞凋亡与肾功能损害的相关性用相关性分析. $P < 0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结果

2.1 肾组织病理学改变 S0组大体未见异常; SAP组6 h时腹腔见少量渗液, 肾脏轻度水肿; 12 h时肾脏充血水肿加重, 并可见少量出血点, 腹腔渗液增多, 淡红色; 18 h时肾脏充血水肿更为明显, 可见局灶性坏死, 腹腔渗液呈血性. 光镜下S0组未见异常; SAP组6 h时肾小球轻度肿胀, 肾小管肿胀较为明显, 肾间质见炎细胞浸润; 12 h时肾小球、肾小管肿胀加重, 间质炎细胞增多; 18 h时肾小球可见淤血, 肾小管上皮细胞可见坏死. 电镜下S0组未见异常; SAP组6 h时肾小球毛细血管扩张, 足细胞核不规则, 线粒体凝集和肿胀, 溶酶体

增多, 内质网扩张, 基膜局部增厚, 肾小管上皮细胞水肿, 表面微绒毛减少, 排列紊乱, 微绒毛末端呈杆状膨大. 随病程延长, 上述病理改变加重. 18 h时尚出现肾小球毛细血管淤血, 粒细胞凝集, 基膜内有纤维素沉积, 肾小管上皮细胞胞浆空泡化, 线粒体空泡变性, 表面微绒毛脱落, 部分线粒体破裂, 各时段均可见细胞核固缩, 集合管内可见坏死的肾小管上皮细胞和红细胞. SAP时血Cr, BUN明显升高, 且随着病程延长而逐渐增高(表1).

表1 SAP大鼠肾功能 (mean±SD)

肾功能	分组	6 h	12 h	18 h
Cr(umol/L)	SO	40.2±3.2	43.0±5.0	41.2±3.3
	SAP	60.2±7.2 ^a	125.6±14.9 ^a	178.3±32.6 ^b
BUN(mmol/L)	SO	5.0±0.4	4.9±0.5	5.1±0.5
	SAP	10.2±1.0 ^a	16.7±3.5 ^b	22.5±3.5 ^b

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs SO组.

2.2 肾脏细胞凋亡情况 SO组肾小球和肾小管仅偶见凋亡细胞, SAP组凋亡细胞明显增多, 凋亡指数升高, 并随着病程延长而逐渐增高, 肾小管凋亡现象较肾小球严重(图1-2, 表2). 肾小管细胞凋亡与血Cr呈正相关($r = 0.812$, $P<0.05$), 与血BUN也呈正相关($r = 0.807$, $P<0.05$).

2.3 肾脏细胞**bax**, **bcl-2**表达 SO组肾小球和肾小管**bax**的表达都很弱; SAP组**bax**在肾小球和肾小管的表达均较SO组明显增强, 且随着病程延长而逐渐增高(表2). SO组**bcl-2**在肾小管和肾小球的表达都很弱; SAP组**bcl-2**的表达明显增强, 其表达值也有随着病程延长而逐渐上升的趋势(表2). SAP组肾小球和肾小管的**bcl-2/bax**比值均较同时相SO组明显下降, 并且随着

病程的延长而逐渐下降(表2).

3 讨论

急性肾功能衰竭时肾小管上皮细胞出现凋亡早于肾功能的变化^[16]. 凋亡作为细胞丢失的途径之一, 同样可造成肾小管基底膜裸露、转运功能丧失及小管液回漏等功能障碍, 成为少尿或无尿的病理生理基础, 说明凋亡在肾功能损害中发挥重要的作用^[17-22]. 细胞凋亡也参与胰性肾病的发病过程. Takase *et al*^[23]在诱发实验性SAP 6 h后, 并发ARF的小鼠肾脏肾小管细胞出现凋亡, 用SAP小鼠产生的腹水注射到健康小鼠, 也导致肾小管细胞的凋亡; SAP时血中内毒素(ET)、肿瘤坏死因子(TNF- α)等明显升高, 而经ET注射的小鼠肾脏可见到明显的细胞凋亡^[24], TNF- α 增加了ET诱导的肾小管细胞的凋亡^[25]. 我们发现, SAP大鼠肾脏的细胞凋亡数明显增多, 凋亡指数增高, 肾小管凋亡现象较肾小球严重, 肾脏细胞凋亡指数与肾功能的损害程度呈正相关, 说明SAP肾脏损伤至少部分是通过细胞凋亡机制引起的, 而且细胞凋亡是造成肾功能进一步恶化的重要因素之一.

细胞凋亡是受基因调控的, 在调控细胞凋亡的基因中, **bcl-2**家族是最受重视者之一, 其中**bcl-2**是最重要的凋亡抑制基因, 它的生理功能主要是阻遏细胞凋亡, 延长细胞寿命.**bax**也是**bcl-2**基因家族成员, 它的功能与**bcl-2**相反, 主要是促进细胞凋亡^[26-28], **bax**和**bcl-2**分别可以以同源二聚体形式存在, 他们之间也可形成异源二聚体, **bax-bcl-2**异源二聚体较稳定, 无诱导凋亡的作用, 而当**bax**较**bcl-2**绝对或相对增高, 即细胞内**bcl-2**与**bax**的比例(**bcl-2/bax**)下降时, **bax-bax**同源二聚体形成, 便诱导凋亡^[29, 30]. 我们的实验发现, SAP时**bax**在肾小球和肾小管的表达均明显上升, 且随着病程延长而逐渐增

表2 SAP大鼠肾小球和肾小管细胞凋亡, **bax**, **bcl-2**表达 (mean±SD)

指标	分组	肾小球			肾小管		
		6 h	12 h	18 h	6 h	12 h	18 h
AI	SO	0.80±0.10	0.90±0.10	0.80±0.20	1.30±0.50	1.20±0.30	1.30±0.30
	SAP	3.20±1.10 ^a	3.90±1.80 ^a	4.80±1.70 ^b	9.80±1.10 ^b	12.60±2.30 ^b	15.7±2.6 ^b
bax (PU)	SO	1.01±0.04	1.06±0.05	1.09±0.03	1.53±0.07	1.61±0.05	1.59±0.05
	SAP	3.05±0.86 ^a	3.37±1.13 ^a	4.11±1.24 ^a	8.17±2.16 ^b	12.92±1.81 ^b	13.08±2.53 ^b
bcl-2 (PU)	SO	1.04±0.02	1.03±0.05	1.08±0.04	1.58±0.02	1.59±0.06	1.61±0.02
	SAP	2.18±0.65	2.42±0.63 ^a	2.69±0.47 ^a	3.38±1.07 ^a	4.26±1.13 ^a	7.21±1.04 ^b
bcl-2/bax	SO	1.02±0.06	0.98±0.05	0.99±0.03	1.03±0.05	0.99±0.07	1.01±0.05
	SAP	0.72±0.01 ^a	0.70±0.03 ^a	0.65±0.03 ^a	0.66±0.02 ^a	0.62±0.03 ^a	0.55±0.01 ^b

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs SO组.

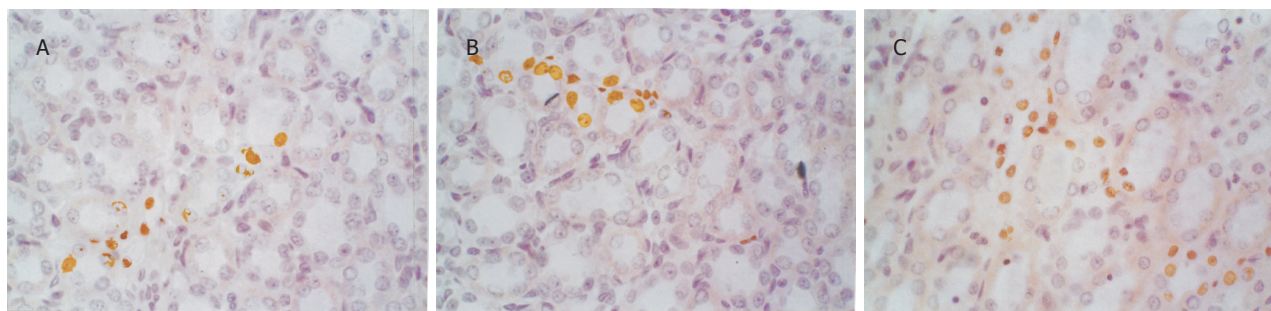


图1 SAP组造模后肾小管凋亡细胞(TUNEL × 400) . A: 6 h; B:12 h; C:18 h.

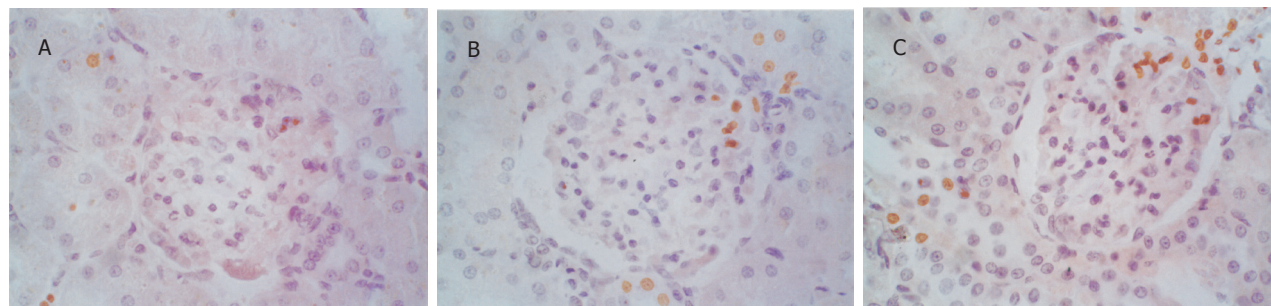


图2 SAP组肾小球凋亡细胞(TUNEL × 400) . A:6 h; B:12 h; C:18 h.

高, *bcl-2*的表达也有所上升,但幅度相对较小,可能是机体代偿所致,通过*bcl-2*表达的增加发挥其抗凋亡作用,减轻细胞损伤,总体上, *bcl-2/bax*比值逐渐下降,导致细胞凋亡逐渐增加。我们认为SAP能致病鼠肾脏损伤,可能是由于SAP产生的肾毒性物质上调诱导凋亡的基因蛋白表达并相对下调抑制凋亡的基因蛋白表达,使肾小球、肾小管细胞凋亡,引起肾小球滤过膜通透性增加,肾小管重吸收功能障碍所致。通过降低*bax*活性、提高*bcl-2*的活性以干预细胞凋亡从而减轻SAP时的肾脏损伤,无疑为胰性肾病的防治提供了新的途径。

4 参考文献

- 1 Pupelis G. Renal failure in acute pancreatitis. Timing of dialysis and surgery. *Przegl Lek* 2000;57:29-31
- 2 Hietaranta AJ, Aho HJ, Gronroos JM, Hua ZY, Nevalainen TJ. Pancreatic phospholipase A2 in proximal tubules of rat kidney in experimental acute pancreatitis and after intravenous injection of the enzyme. *Pancreas* 1992;7:326-333
- 3 Isaji S, Hayashi J, Higashiguchi T, Yokoi H, Ogura Y, Noguchi T, Kawarada Y. Effect of IS-741(a new synthetic antiinflammatory agent) on acute necrotizing pancreatitis in dogs. Significance of its inhibitory effect on cytosolic phospholipase A2. *Digestion* 1999;60:47-51
- 4 Hughes CB, Gaber LW, Mohey el-Din AB, Grewal HP, Kotb M, Mann L, Gaber AO. Inhibition of TNF alpha improves survival in an experimental model of acute pancreatitis. *Am Surg* 1996;62:8-13
- 5 Lindsey DC, Emerson TE, Thompson TE, John AE, Duerr ML, Valdez CM, Kuo HS, Bouffard RB, Irwin RG, Canivel D, et al. Characterization of an endotoxemic baboon model of metabolic and organ dysfunction. *Circ Shock* 1991;34:298-310
- 6 Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton C, Falkner J, Gower WR, Franz MG. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable

mechanism for distant organ dysfunction. *Dig Dis Sci* 1997;42:1783-1788

- 7 Plusczyk T, Witzel B, Menger MD, Schilling M. ETA and ETB receptor function in pancreatitis-associated microcirculatory failure, inflammation, and parenchymal injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:145-153
- 8 李树全,阳冠明.细胞凋亡及其相关基因蛋白在阿霉素肾病中的作用. *中国病理生理杂志* 2002;18:G704-G705
- 9 蔡智荣,孙婷.依那普利对心力衰竭大鼠肾细胞凋亡及凋亡基因 Bcl-2、Bax的影响. *山东医药* 2003;43:22-23
- 10 张艳玲,段惠军,郝文田,李英敏,史永红,李英,顾连方.苯那普利对糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡及Bax和Bcl-2表达的影响. *中华物理医学与康复杂志* 2001;23:237-239
- 11 Mountz JD, Zhou T, Su X, Wu J, Cheng J. The role of programmed cell death as an emerging new concept for the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:S2-S14
- 12 Hattori T, Shindo S, Kawamuea H. Apoptosis and expression of Bax protein and Fas antigen in glomeruli of a remnant-kidney model. *Nephron* 1998;79:186-191
- 13 Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993;43:1160-1178
- 14 Ito K, Chen J, El Chaar M, Stern JM, Seshan SV, Khodadadian JJ, Richardson I, Hyman MJ, Vaughan ED Jr, Poppas DP, Felsen D. Renal damage progresses despite improvement of renal function after relief of unilateral ureteral obstruction in adult rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F1283-F1293
- 15 申洪.免疫组织化学显色反应强度定量方法研究. *中国组织化学与细胞化学杂志* 1995;4:89-92
- 16 靳风烁,梁培禾,岳明.大鼠急性肾功能衰竭时肾小管上皮细胞凋亡及其意义. *中华创伤杂志* 2000;16:529-532
- 17 Hauser P, Oberbauer R. Tubular apoptosis in the pathophysiology of renal diseases. *Wien Klin Wochenschr* 2002;114:671-677
- 18 Saikumar P, Venkatachalam MA. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol* 2003;23:511-521
- 19 Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:301-308
- 20 Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am*

- J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F608-F627
- 21 Ortiz A, Justo P, Sanz A, Melero R, Caramelo C, Guerrero MF, Strutz F, Müller G, Barat A, Egido J. Tubular cell apoptosis and cidofovir-induced acute renal failure. *Antivir Ther* 2005;10:185-190
 - 22 Dieguez-Acuna FJ, Polk WW, Ellis ME, Simmonds PL, Kushleika JV, Woods JS. Nuclear factor kappaB activity determines the sensitivity of kidney epithelial cells to apoptosis: implications for mercury-induced renal failure. *Toxicol Sci* 2004;82:114-123
 - 23 Takase K, Takeyama Y, Nishikawa J, Ueda T, Hori Y, Yamamoto M, Kuroda Y. Apoptotic cell death of renal tubules in experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 1999;125:411-420
 - 24 张文芳,周云丽,张鹏,陈琪.内毒素诱发小鼠肾细胞凋亡的动态观察. *天津医药* 2000;28:99-100
 - 25 Sood A, Mathew R, Trachtman H. Cytoprotective effect of curcumin in human proximal tubule epithelial cells exposed to Shiga toxin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:36-41
 - 26 Eschwege P, Paradis V, Conti M, Loric S, Dumas F, Berteau P, Ahmed M, Droupy S, Charpentier B, Legrand A, Bedossa P, Benoit G. Bcl-2 and Bax expression on rat ischemic kidney. *Transplant Proc* 1998;30:2861-2862
 - 27 Rawat S, Gray C, Johnson TS, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor J. Apoptosis and expression of BCL-2 and BAX in cyclosporine-induced experimental renal fibrosis. *Transplant Proc* 2003;35:187-188
 - 28 Yamamoto K, Tomita N, Yoshimura S, Nakagami H, Taniyama Y, Yamasaki K, Ogihara T, Morishita R. Hypoxia-induced renal epithelial cell death through caspase-dependent pathway: role of Bcl-2, Bcl-xL and Bax in tubular injury. *Int J Mol Med* 2004;14:633-640
 - 29 Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999;59:1693s-1700s
 - 30 Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:125-132

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006 年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行

本刊讯 世界华人消化杂志主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

据中国科技期刊引证报告(潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 1-289)统计, 世界华人消化杂志 2003 年发表文章 594 篇, 地区分布 25 个, 机构分布 191 个, 基金论文比 31%, 总被引频次 5249 次, 影响因子 2.924, 即年指标 0.529, 引用期刊数 260 种, 被引半衰期 3.06. 中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的 10 个科学计量指标, 并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊。世界华人消化杂志获得 2001 年和 2003 年中国百种杰出学术期刊。

据《中文核心期刊要目总览 2004 年版》(戴龙基, 蔡蓉华主编. 北京: 北京大学出版社, 2004: 1-678), 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库有 51 种, 统计到的文献数量共计 9435301 篇次, 涉及期刊 39893 种次. 参加核心期刊评审的学科专家达 1873 位。经过定量筛选和专家定性评审, 从中国正在出版的近 1 万 2 千种中文期刊中评选出 1800 种核心期刊。世界华人消化杂志被评为中文核心期刊要目总览。

世界华人消化杂志发表的英文摘要被美国《化学文摘 (Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库 / 医学文摘 (EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志 (Abstracts Journals)》收录。

世界华人消化杂志 2006 年由北京报刊发行局发行, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 邮发代号 82-262, 出版日期 8, 18, 28 日, 页码 160, 月价 72.00。(世界胃肠病学杂志社 2005-09-15)

幽门螺杆菌感染与细胞因子单核苷酸多态性

陈威, 袁媛

陈威, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所 辽宁省沈阳市 110001

通讯作者: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所. yyuan@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-22703576 024-23256666-6153

收稿日期: 2005-07-15 接受日期: 2005-07-18

摘要

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)指基因组内特定核酸位置上存在两种不同的碱基, 其中最少一种在群体中的频率不小于1%。研究发现SNP与疾病的遗传易感性密切相关。细胞因子(cytokine, CK)是由活化的免疫细胞和某些基质细胞分泌的具有高活性、多功能的小分子多肽类物质, 通过与特异性受体结合发挥前炎症因子的生物学效应。目前的分类有: 白细胞介素(IL)、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)等。幽门螺杆菌*H pylori*感染能导致细胞因子表达增加, 胃黏膜炎症反应加重, 引起炎症损伤。近年来, 细胞因子单核苷酸多态性与*H pylori*感染在胃疾病的发生过程中的关系的研究备受重视, 现综述如下。

关键词: 幽门螺杆菌; 细胞因子; 单核苷酸多态性

陈威, 袁媛. 幽门螺杆菌感染与细胞因子单核苷酸多态性. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2108-2114

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2108.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)于1994年被定为I类致癌因子, 研究认为它是胃癌发生的启动和促进因子。*H pylori*感染的患者其结局不尽相同, 绝大部分没有明显的临床症状, 少部分可表现为慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、萎缩性胃炎、异型增生、甚至胃癌。为什么*H pylori*感染会有如此多样的临床表现? 研究中发现*H pylori*感染能刺激胃黏膜细胞因子表达的增加, 加重炎症反应, 导致黏膜的损伤与胃酸分泌的异常。在*H pylori*感染导致胃疾病发生的过程中, 宿主的遗传因素也发挥十分重要的作用。单核苷酸多态性(SNP)指基因组序列中单核苷酸改变时发生的DNA序列的多态性变化, 即指基因组内特定核苷酸位置上存在两种不同的碱基, 其中最少一种在群体中的频率不小于1%。但SNP通常只是1种二倍体基因(biallelic), 或二态的遗传变异。其决定了个体之间的差异。暴露于相同的危险因素下, 不同的人群有不同的结局。近年来, 细胞因子单核苷酸多态性与*H pylori*感染在胃疾病发生、发展过程中是否存在

联系, 有何联系, 这种联系对疾病的发生、发展有何作用成为研究的焦点, 我们对此进行综述。

1 *H pylori*感染与IL-1单核苷酸多态性

IL-1是重要的炎症介质, 免疫效应激素之一。它的基因簇包含IL-1A, IL-1B, IL-1RN 3个相互关联的基因, 位于染色体2q13-q14由7个外显子和6个内含子组成。在全长430 kb的区域内依次编码IL-1a, IL-1 β 和内源性受体拮抗物IL-1ra。IL-1基因中IL-1A在-899位点存在T/C单核苷酸多态性, IL-1B在-31, -511和+3953位点存在的C/T单核苷酸多态性, 除了IL-1A, IL-1B的单核苷酸多态性外, 还存在IL-1RN核心序列为86 bp的可变数串联重复序列多态性, 在疾病的发生中发挥重要的作用。Garcia-Gonzalez *et al*^[1]发现IL-1B(+3594)*2和IL-1RN*2的复合等位基因与十二指肠溃疡的发生危险性减低相关。Rad *et al*^[2]研究发现前炎症因子[IL-1RN*2/IL-1B-511T/-31C(+)]增加IL-1 β 的表达, 加重了炎症的程度, 也增加了肠上皮化生和萎缩性胃炎的发生。Hwang *et al*^[3]发现携带IL-1 β -511T/T或IL-1RN*2多态基因型个体黏膜中IL-1 β 蛋白水平高于非携带者, 且同时携带有IL-1 β -511T/T和IL-1RN*2基因型的个体的IL-1 β 水平最高。IL-1RN*1/*2与胃萎缩相关, IL-1B-511T/T与胃炎症的严重程度相关, 认为是胃腺癌的危险因素。Figueiredo *et al*^[4]在联合检测菌体和宿主基因型时发现vacAs1/IL-1B-511*T, vacAm1/IL-1B-511*T, cagA+/IL-1B-511*T, vacAs1/IL-1RN*2/*2, vacAm1/IL-1RN*2/*2, cagA+/IL-1RN*2/*2携带者胃癌发生率最高, 表明对两者进行联合检测对确定胃疾病高发个体可能是一个良好的手段。Perri *et al*^[5]在意大利南北部胃癌高低发区研究比较发现, IL-1 β -511C/IL-1RN*2单倍体是南部胃癌低发的一个保护性因素。Graziano *et al*^[6]发现, 携带有IL-1B多态(IL-1B-511C/T, IL-1B-31T/C)与IL-1RN的野生型(IL-1RN long/long)单倍体的进展期胃癌个体, 半数生存期减短, 提示此单倍体可能是疾病预后的危险因素。Hellmig *et al*^[7]发现IL-1B-31 C基因型增加了*H pylori*感染的危险性, 但没有统计学意义, 同时也发现IL-1RN*2明显地增加胃癌发生的危险性。Rocha *et al*^[8]研究非贲门癌发生的危险因素发现, 应用多因素的logistic方法分析, IL-1RN2多态与胃癌的发生密切相关。台湾Chen *et al*^[9]等发现携带IL-1RN*2基因型的个体, 其患肠型和弥漫型胃癌的危险性均增

加. 另外, 这些人胃体肠化生的比率高出非感染非携带者. 在Glas *et al*^[10]发现IL-1RN*2/2纯合型与早期胃癌的发生高度相关. Kang *et al*^[11]对IL-B多态研究发现, 肠型胃癌中IL-1RN*1/1纯合子频率较高. IL-1B-31C频率在*H pylori*感染腺癌组高于对照组. 在中国胃癌高发区(陕西)和低发区(广东)对照研究发现, 高发区胃癌组与对照组间IL-1B+3954T/T、-511T/T和IL-1RN*2/*2基因型分布相似. 将高发区对照组与低发区进行比较, 发现前者IL-1B-511T/T基因型高于后者.*H pylori*感染联合IL-1B-511T/T基因型明显增加了胃癌发生的危险性^[12]. 隋国平*et al*^[13]研究发现临朐和北京的病例中IL-1 β -31单核苷酸多态性和IL-1RN基因VNTR, 在弥漫型和肠型胃癌中均不增加胃癌的发病风险, 而IL-1 β -511T单核苷酸多态增加了胃癌的发病风险. El-Omar *et al*^[14]将低胃酸分泌与正常或高胃酸分泌的胃癌亲属相比较, 发现在*H pylori*感染阳性时IL-1RN*2和IL-1B-31T/IL-1B511T在前者出现的频率高于后者. IL-1B31T+/IL-1RN*2/*2基因型增强了*H pylori*感染所致的慢性低胃酸反应, 增加了胃癌发生的危险性. 何向民*et al*^[15]于辽宁地区的研究发现, IL-1B基因启动子区域-31C/T单核苷酸多态性和IL-1RN基因1/2、2/2多态性与中国人的胃癌易感性有关. Furuta *et al*^[16]证明, 在*H pylori*阳性时, IL-1B-511T基因型的个体胃萎缩最重. IL-1 β 的基因多态与日本人的胃酸分泌过少和萎缩性胃炎有关. 这种影响有赖于*H pylori*感染的有无. Garza-Gonzalez *et al*^[17]在墨西哥的结论与高加索一致, IL-1B-31C与远端胃癌发生危险性增加有关. Katsuda *et al*^[18]在日本对健康者体检发现, 在吸烟者中IL-1-31T基因型与*H pylori*持续感染相关, 提示这个多态可能是影响*H pylori*持续感染的一个遗传因素. Chang *et al*^[19]在韩国研究发现肠型胃癌患者表现为高频率的IL-1B31T纯合型, IL-1B-31T纯合型的*H pylori*感染的胃癌患者胃黏膜IL-1B水平高于杂合型.*H pylori*感染与IL-1B-31T/IL-1B-511C共同作用会促进肠型胃癌的发生发展. Sakuma *et al*^[20]在日本人群中的研究表明, IL-1B+3953C/T在胃体胃癌中更为常见, IL-1B+3953C/T多态与胃体胃癌的发生密切相关. 可见, IL-1作为重要的炎症介子, 其多个位点的多态与不同阶段的胃部疾病发生有关, 尤其是IL-1B的单核苷酸多态性. 也发现不同人群中多态与疾病的发生关系不同, 这就表示不同的遗传背景影响疾病的发生、发展.

2 *H pylori*感染与IL-8单核苷酸多态性

IL-8是由72个氨基酸残基组成的低分子质量蛋白质, 属于趋化因子家族中一个亚类. IL-8位于染色体4q12-21, 长度为5.1 kb, 有3个内含子和4个外显子. 在体内主要来源于3类细胞(1)抗原或植物凝集素(PHA)激活的T细胞;(2)脂多糖(LPS)、IL-1或TNF- α 激活的单核细胞、成纤维细胞;(3)中性粒细胞、血小板和各种肿

瘤细胞株. IL-8是一种重要的白细胞趋化因子, 与受体结合后, 导致白细胞运动、游走、并通过细胞内信号诱导细胞骨架蛋白的重组, 促进白细胞的黏附、趋化运动. IL-8基因存在251 A/T, -353 A/G, 738 T/A, 781 C/T, 845 T/C, +1530 T/C, 1663 C/T, 2767 A/T, +3331 A/G, 396 G/T, 多个单核苷酸多态位点. Heinzmann *et al*^[21]在儿童中的研究发现前4种基因多态均与哮喘有关. 启动子区251T基因型与哮喘呈正相关, 与呼吸性合胞病毒感染的细支气管炎呈负相关, 这可能暗示这两种疾病具有不同的遗传因素. 同时儿童性关节炎与哮喘相比, 所有的基因多态在前者更为常见. 近期在英国家庭中的研究证实幼年的细支气管炎与IL-8-251A等位基因有关. IL-8-251A等位基因位于两个单倍体上, 其中一个与儿童细支气管炎有关, 认为IL-8-251A不是一个功能性等位基因. 欧洲人表现出由在许多位点存在差异两个普通单倍体支配的一个不同寻常的单倍体家系, 然而非洲人单倍体差异性更大^[22]. 首次在肺癌危险因素中研究细胞因子基因多态的作用时发现, 携带IL-8-251A纯和子或杂和子基因的女性个体患肺癌的危险性显著降低^[23]. Duymaz-Tozki *et al*^[24]将Behcet's病例组与对照组比较发现, 两组间IL-8 -353 A/G, +1530 T/C, +3331 A/G不存在差异, 并且多态也不能增加病例组IL-8的表达. 以翻译起始点为标准, 存在3个位点的单核苷酸多态: 845 T/C, 738 T/A和353 A/T. Rovin *et al*^[25]首先在非籍美国人中发现, 845 T/C, 738 T/A是异常的. 重度系统性红斑狼疮肾炎与对照以及非重度系统性红斑狼疮肾炎相比, 845位点T-C的转换分别是后两者的3倍和7.5倍. 认为IL-8-845C可能是通过影响IL-8的表达使患有系统性红斑狼疮肾炎的非籍美国人更倾向于严重的肾脏损伤. 通过检测血管球性肾炎病人的IL-8的多态来预测疾病的临床表现和进行个性化的治疗可能是有用的. 通过病例对照研究发现与艾滋病相关的卡波西肉瘤46%发生在IL-8的TT基因型的个体, 66%发生在AA/AT基因型的个体, 携带有IL-8-251 TT基因型的个体很少发生内脏的Kaposi's恶性肉瘤, 表明此基因型可能是一个保护性因素^[26]. Amoli *et al*^[27]发现随意选取的皮肤脉管炎患者中携带IL-8-251A基因型的个体其肾脏更易受累. 对肠集合性大肠杆菌进行研究在近期的数据中观察到携带有IL-8启动子区域的单核苷酸多态251AA纯合子基因型的个体对大肠杆菌性痢疾更具有易感性^[28]. Jiang *et al*^[29]近期发现IL-8-251AA与埃希氏菌属大肠杆菌感染的菌痢有关, 且排泄物中IL-8水平增高. 动物实验和流行病学观察表明持续性炎症刺激易引发大肠癌, Landi *et al*^[30]于西班牙巴塞罗那的研究显示IL-8-251A基因型与散发性大肠癌的危险性降低有关. Ohyauchi *et al*^[31]在日本的研究中发现, IL-8-251A多态可能与*H pylori*感染的胃萎缩过程有关. 可能增加胃癌和溃疡的危险性. Gyulai *et al*^[32]在匈牙利的研究发现IL-8-251 A/T突变多态在

十二指肠溃疡中明显高于对照组. Lu *et al*^[33] 在中国人群中的研究发现, 胃癌发生的危险性在IL-8-251AA基因型个体明显增高, 这提示IL-8多态在胃癌的发生过程中发挥十分重要的作用. Takagi *et al*^[34] 发现基因型为IL-1B-511C/C或IL-1B-31TT的Hp阳性的比Hp阴性的胃体部IL-8水平增高. 在细胞毒性*H pylori*菌株中, 高运动性的菌株比低运动性的引起更多的IL-8的分泌^[35]. Yamaoka *et al*^[36] 在日本人群中发现, cagA阳性菌株诱导IL-8 mRNA表达, 提示IL-8在*H pylori*感染相关性胃十二指肠疾病的病因学方面有十分重要的地位. *H pylori*感染引起IL-8蛋白水平发生变化, 但IL-8单核苷酸多态性与胃疾病的关系少见报道, *H pylori*感染时IL-8单核苷酸多态性是否增加胃癌的发病风险, IL-8单核苷酸多态性是否可作为胃疾病的遗传标志, 是否可作为胃疾病高危个体的一个筛选指标来指导临床诊断, 是否可作为胃癌高发个体发病学预防的一个“准入”标准, 这些都有待于深入研究.

3 *H pylori*感染与IL-6单核苷酸多态性

IL-6是由184个氨基酸残基组成的糖蛋白, 人的IL-6基因位于染色体7P15-21, 长度为5 kb, 有4个内含子和5个外显子, 血液中的IL-6主要来源于活化的单核细胞, 局部组织的IL-6主要来源于成纤维细胞或局部巨噬细胞. IL-6参与T细胞的活化、增殖和分化; 促进骨髓瘤等瘤细胞的生长. 研究中发现IL-6在启动子区域存在的174 G/C、572 G/C、597 G/A单核苷酸多态. D'Aiuto *et al*^[37] 在重度牙周炎患者中发现, 174 G/C多态与血IL-6、C-反应蛋白水平增高有关. Illig *et al*^[38] 研究IL-6多态与糖尿病关系时发现, IL-6-174G and -598G与II型糖尿病密切相关. Basturk *et al*^[39] 发现肾细胞癌组IL-6 C/C频率明显低于健康对照组, 可能是健康人群的保护性因素. 有人应用COX危险模型在健康人和乳腺癌存活者的人群中进行IL-6基因型作用的评估, 将IL-6-174C与174 G/G相比前者是这两种人群保护性基因型^[40]. 在俄罗斯对多发性骨髓瘤进行研究发现, IL-6-174C基因型在病历组与对照组无明显差异. 但IL-6-174CC基因型在低度恶性的多发性骨髓瘤出现频率高于高度恶性的^[41]. 意大利研究阿茨默病(AD)与IL-6多态时观察到, IL-6-174G/C基因型与基因型频率在病历组与对照组之间无相关性, 且在病情的早期与晚期之间也无差异, IL-6G/G基因型频率随着从欧洲北部向南部的地域转移而有明显的增高趋势, 且IL-6G/C基因型也伴随增加^[42]. 在巴塞罗那关于大肠癌的病例对照研究中可见IL-6-174C基因型与大肠癌危险性增高有关^[30]. EL-Omar *et al*^[43] 发现IL-6基因多态与非贲门癌和食管癌均无相关性. 在美国研究IL-6多态与胃癌和十二指肠疾病关系时发现, IL-6-174与597位点的等位基因密切连锁(174G/597G或174C/597A)且IL-6任

何位点等位基因的频率在两种疾病中无差异. 认为IL-6单核苷酸多态是由于人种的差异与*H pylori*感染的临床结局无关^[44]. 以上研究发现, IL-6-174位点的单核苷酸多态与胃疾病的发生关系不是很密切, 但其他位点的多态与胃疾病是否相关, 文献报道很少, 是否多态的发生仅因为人种的差异, 这些问题都需要进一步证实.

4 *H pylori*感染与TNF单核苷酸多态性

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是由细菌性物质刺激单核巨噬细胞产生的一种蛋白质, 具有较强的杀伤肿瘤细胞的作用, 分TNF- α 、TNF- β . TNF- α 主要由单核/巨噬细胞产生, TNF- β 主要由活化的T细胞产生又称淋巴毒素(LT). 两种TNF具有相似的生物学功能, 例如: 可杀伤肿瘤细胞, 激活并加强中性粒细胞和单核/巨噬细胞的功能, 刺激其合成并分泌IL-1、IL-8、TNF促进炎症反应等. TNF的编码基因位于6号染色体, 在多个位点存在单核苷酸多态性: TNF- α -238 G/A, -308 G/A, -857 G/T, -863 C/A, 1031 T/C; TNF- β +249 A/G, -252 G/A, 329 A/G, +365 C/G, +720 C/A, 804 C/A. 有人对日本牙周炎发病人群调查发现TNF- α -1031, -863 or -857等位点的单核苷酸多态在疾病组高于健康人群, 表明这些多态与疾病的发生密切相关^[45]. 在台湾对TNF多态研究发现, TNF- α 308A基因型与肝细胞癌危险性增加有关, 且肝细胞癌的危险性随基因型从TNF- α 308 G/G、TNF- α 308 G/A到TNF- α 308 A/A的变化逐渐增高^[46]. Grunenfelder *et al*^[47] 通过心肺旁路术后观察发现, TNFB*A329G多态携带者其IL-8、TNF- α 的表达, 插管时间和输血量均高于非携带者. Cipriano *et al*^[48] 发现TNF- α -308A可能是老年人易患感染性疾病的一个易感因素, 尤其TNF- α -308A与前炎症细胞因子释放增加和锌释放减少有关. 对儿童期哮喘进行研究时Albuquerque *et al*^[49] 发现病例组TNF-A-308G明显高于对照组. 在日本的研究发现, TNF- α 857 C/T和TNF- β 252 A/G因型与*H pylori*血清学阳性无明显的联系, 基因型为TNF- α 857 CC和1031 CC的个体显现出最低的幽门螺杆菌血清学阳性, 而TNF- α 857 TT和TNF- α 1031 TT基因型却表现为最高的幽门螺杆菌血清学阳性率^[50]. Yea *et al*^[51] 在韩国胃疾病患者中发现, TNF- α -308A与*H pylori* cagA亚型感染阳性密切相关. Kunstmann *et al*^[52] 发现在*H pylori*感染的女性个体TNF- α 308 G/G基因型是患十二指肠溃疡的一个危险因素. Zambon *et al*^[53] 在研究*H pylori*感染性疾病与细胞因子基因多态之间关系时发现, 十二指肠患者更常见TNF-A-857 TT基因型, 且此基因型与胃癌也具有相关性. 在西班牙的研究将胃溃疡的患者和十二指肠的患者相比, 前者TNF-308等位基因2(TNF-308A)的频率低TNF-I(TNF-308G)单倍型较高, TNF-I单倍体是*H pylori*感染患者胃溃疡的危险因素^[54]. Machado *et al*^[55]

发现, TNF- α -308*A基因型增加其携带者胃癌发生的危险性, 而且*H. pylori*和TNF- α 308基因型联合作用并未严重影响胃癌的危险性. Watanabe *et al*^[56] TNF-308*A与重症疾病时IL-6水平的急剧增高与疾病的结局有关. Goto *et al*^[57]在研究中发现TNF- α 857 G/T多态可能与肥厚性增生性胃炎和不伴有严重萎缩的胃癌有关. 但Wu *et al*^[58]发现台湾地区胃癌与对照组之间没有TNF- α 基因型的差异. Wu *et al*^[59]发现TNF- α -857 T多态在胃黏膜相关性淋巴瘤组明显低于对照组, 可能此基因型改变了疾病的发生危险性. Lu *et al*^[60]于台湾地区的调查发现, 携带TNF-1031 C or -863 A基因型的*H. pylori*感染患者中性粒细胞浸润程度重于非携带者, 且此两种基因型是*H. pylori*感染患者患十二指肠溃疡和非肠化胃溃疡的独立危险因素. 这表明-863 CC基因型胃溃疡患者更易发生肠化生. 中国汉族人群中的研究表明LT- α NcoI A/G杂合基因型与*H. pylori*感染的非贲门胃癌有关^[61]. 大量的研究集中在TNF- α 的单核苷酸多态性与胃疾病的关系, 而TNF- β 多态与胃部疾病的报道少见, 但发现TNF- β 多态与一些其他的疾病发生相关, 那么TNF- β 多态是否影响胃疾病的发生, 两者之间有何关系, 这就为我们的进一步研究提出新的问题.

5 *H. pylori*感染与IFN单核苷酸多态性

干扰素(interferon, IFN)是由病毒感染的细胞产生的一种能干扰其他细胞病毒复制的因子, 本身不能直接杀伤病毒, 通过诱导宿主细胞产生多种酶, 干扰病毒的基因转录或蛋白组分的翻译而发挥作用. 可分为 α -干扰素(IFN- α)、 β -干扰素(IFN- β)和 γ -干扰素(IFN- γ). 人的IFN- α 与 β 基因均位于9号染色体, 主要由经细菌、DNA或RNA病毒刺激的白细胞、成纤维细胞等产生, 两者具有相似的抗病毒、抑制和杀伤肿瘤细胞等生物学作用. IFN- γ 基因位于染色体12q24. 1, 包括3个内含子和4个外显子, 主要由活化T细胞产生, 诱导单核细胞、巨噬细胞等MHC II类抗原的表达, 参与抗原提呈和特异性免疫的识别过程; 协同IL-2诱导LAK活性, 促进T细胞IL-2R表达等. 现已发现IFN- γ 874T/A多态、IFN- γ 183G/T、IFN- γ 155A/G、IFN- γ 179G/T等. Zhu *et al*^[62]研究宫内HBV感染与细胞因子多态关系时发现, IFN- γ 874 A基因型与HBV宫内感染相关. Govan *et al*^[63]在对宫颈癌研究时发现IFN-874 AA基因型在非洲人种中明显高于南非的混合人种, 而且两组人群同意大利高加索人相比较也存在差异, 表明基因型与人种之间存在明显相关性, 但基因型与人种间的差异不影响宫颈癌的恶性侵袭. Lio *et al*^[64]研究发现874TT基因型在肺结核病人组明显低于对照组^[26]. Howell *et al*^[65]研究发现IFN- γ 874 T/A单核苷酸多态性与皮肤的恶性黑色素瘤的发生无关. Tsiavou *et al*^[66] IFN- γ 874(*)A在II型糖尿病病例

组明显高于对照组. Kamali-Sarvestani *et al*^[67]发现携带IFN- γ 874 T/T基因型的伊朗女性肺癌发生的危险性增加. Hoffmann *et al*^[68]研究移植排斥反应时发现, IFN-874 T与慢性同种异体移植后的肾病的发生密切相关. Rad *et al*^[69]研究发现IFN- γ 874 A/T多态不影响黏膜细胞因子的表达或者对*H. pylori*的炎症反应. Zamboni *et al*^[53]研究与*H. pylori*感染疾病结局有关的遗传因素时发现, IFN-G+874 AA与*H. pylori* cagA阳性菌株感染疾病相关. Thye *et al*^[70]的发现提示IFN- γ 发出的信号在*H. pylori*感染过程中发挥重要作用. IFN作为细胞因子之一, 其多态较集中在IFN- γ , 这些单核苷酸多态与多种疾病相关, IFN- α β γ 来源不同, 功能不同, 那么其多态与疾病的发生也不尽相同, 这些不同之处有待于研究探讨.

总之, 在*H. pylori*感染引发胃疾病的同时, 宿主的遗传因素也在发挥其重要的作用. 我们仅对*H. pylori*感染与几个细胞因子单核苷酸多态性的关系进行综述, 发现*H. pylori*感染与细胞因子的单核苷酸多态性之间存在某种联系, 对胃疾病的发生、发展发挥一定的作用. 随着研究的深入, 会对这两者之间的关联有更加明朗的解释, 也将会发现更多的基因多态. 研究宿主的细胞因子单核苷酸多态性, 我们可以了解不同的个体暴露于同种危险因素下疾病的易感性, 从而可以判断疾病的高危个体. 可以对高危个体采取预防措施, 以减少疾病的发病率, 对*H. pylori*感染的患者进行根治性治疗, 减少疾病的恶性转化率或死亡率, 明确细胞因子单核苷酸多态性与*H. pylori*感染之间的关系, 更为关键的是可以为胃部疾病的临床诊断提供一个可能的新的指标, 为胃癌高危人群的发病学预防提供一个理论依据, 为可能的将来的基因治疗提供新思路.

6 参考文献

- 1 Garcia-Gonzalez MA, Lanás A, Santolaria S, Crusius JB, Serrano MT, Pena AS. The polymorphic IL-1B and IL-1RN genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. *Clin Exp Immunol* 2001;125:368-375
- 2 Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, Gerhard M, Prinz C. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2004;53:1082-1089
- 3 Hwang IR, Kodama T, Kikuchi S, Sakai K, Peterson LE, Graham DY, Yamaoka Y. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1 β production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2002;123:1793-1803
- 4 Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, Capelinha AF, Quint W, Caldas C, van Doorn LJ, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1680-1687
- 5 Perri F, Piepoli A, Bonvicini C, Gentile A, Quitadamo M, Di Candia M, Cotugno R, Cattaneo F, Zagari MR, Ricciardiello L, Gennarelli M, Bazzoli F, Ranzani GN, Andriulli A. Cytokine gene polymorphisms in gastric cancer patients from two

- Italian areas at high and low cancer prevalence. *Cytokine* 2005;30:293-302
- 6 Graziano F, Ruzzo A, Santini D, Humar B, Tonini G, Catalano V, Berardi R, Pizzagalli F, Arduini F, Bearzi I, Scartozzi M, Cascinu S, Testa E, Ficarelli R, Magnani M. Prognostic role of interleukin-1beta gene and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with advanced gastric cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2339-45
- 7 Hellmig S, Titz A, Steinel S, Ott S, Folsch UR, Hampe J, Schreiber. Influence of IL-1 gene cluster polymorphisms on the development of H. pylori associated gastric ulcer. *Immunol Lett* 2005;100:107-112
- 8 Rocha GA, Guerra JB, Rocha AM, Saraiva IE, da Silva DA, de Oliveira CA, Queiroz DM. IL1RN polymorphic gene and cagA-positive status independently increase the risk of noncardia gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2005;115:678-683
- 9 Chen A, Li CN, Hsu PL, Lai KH, Tseng HH, Hsu PN, Lo GH, Lo CC, Lin CK, Hwang IR, Yamaoka Y, Chen HC. Risks of interleukin-1 genetic polymorphisms and Helicobacter pylori infection in the development of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:203-211
- 10 Glas J, Torok HP, Schneider A, Brunnler G, Kopp R, Albert ED, Stolte M, Folwaczny C. Allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early gastric cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4746-4752
- 11 Kang WK, Park WS, Chin HM, Park CH. The role of interleukin-1beta gene polymorphism in the gastric carcinogenesis. *Korean J Gastroenterol* 2004;44:25-33
- 12 Zeng ZR, Hu PJ, Hu S, Pang RP, Chen MH, Ng M, Sung JJ. Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. *Gut* 2003;52:1684-1689
- 13 隋国平, 潘凯枫, 周彤, 张联, 季加孚, 徐光炜. 白细胞介素-1 β 及RN基因多态性与胃癌发病风险的病例对照研究. *中华医学杂志* 2003;83:1479-1483
- 14 El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404:398-402
- 15 何向民, 姜莉, 傅宝玉, 张学. 白细胞介素1B及RN基因多态性与胃癌易感性的关系. *中华医学杂志* 2002;82:685-688
- 16 Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H, Sugimura H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology* 2002;123:92-105
- 17 Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, El-Omar E, Hold G, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI. Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer* 2005;114:237-241
- 18 Katsuda N, Hamajima N, Matsuo K, Saito T, Ito LS, Inoue M, Takezaki T, Tajima K, Tominaga S. Association between the interleukin 1B (C-31T) polymorphism and Helicobacter pylori infection in health checkup examinees. *Nippon Koshu Eisei Zasshi* 2001;48:604-612
- 19 Chang YW, Jang JY, Kim NH, Lee JW, Lee HJ, Jung WW, Dong SH, Kim HJ, Kim BH, Lee JL, Chang R. Interleukin-1B (IL-1B) polymorphisms and gastric mucosal levels of IL-1beta cytokine in Korean patients with gastric cancer. *Int J Cancer* 2005;114:465-471
- 20 Sakuma K, Uozaki H, Chong JM, Hironaka M, Sudo M, Ushiku T, Nagai H, Fukayama M. Cancer risk to the gastric corpus in Japanese, its correlation with interleukin-1beta gene polymorphism (+3953*T) and Epstein-Barr virus infection. *Int J Cancer* 2005;115:93-97
- 21 Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:671-676
- 22 Hull J, Ackerman H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A, Kwiatkowski D. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet* 2001;69:413-419
- 23 Campa D, Zienolddiny S, Maggini V, Skaug V, Haugen A, Canzian F. Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2004;25:229-235
- 24 Duymaz-Tozkir J, Yilmaz V, Uyar FA, Hajeer AH, Saruhan-Direskeneli G, Gul A. Polymorphisms of the IL-8 and CXCR2 genes are not associated with Behcet's disease. *J Rheumatol* 2005;32:93-97
- 25 Rovin BH, Lu L, Zhang X. A novel interleukine-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis. *Kidney Int* 2002;62:261-265
- 26 van der Kuyl AC, Polstra AM, Weverling GJ, Zorgdrager F, van den Burg R, Cornelissen M. An IL-8 gene promoter polymorphism is associated with the risk of the development of AIDS-related Kaposi's sarcoma: a case-control study. *AIDS* 2004;18:1206-1208
- 27 Amoli MM, Thomson W, Hajeer AH, Calvino MC, Garcia-Porrúa C, Ollier WE, Gonzalez-Gay MA. Interleukin 8 gene polymorphism is associated with increased risk of nephritis in cutaneous vasculitis. *J Rheumatol* 2002;29:2367-2370
- 28 Huang DB, Okhuysen PC, Jiang ZD, DuPont HL. Enterotoxigenic Escherichia coli: an emerging enteric pathogen. *Am J Gastroenterol* 2004;99:383-389
- 29 Jiang ZD, Okhuysen PC, Guo DC, He R, King TM, DuPont HL, Milewicz DM. Genetic susceptibility to enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea: polymorphism in the interleukin-8 promoter region. *J Infect Dis* 2003;188:506-511
- 30 Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, Guino E, Navarro M, de Oca J, Capella G, Canzian F. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin(IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFkB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res* 2003;63(13):3560-3566
- 31 Ohyauchi M, Imatani A, Yonechi M, Asano N, Miura A, Iijima K, Koike T, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T. The polymorphism interleukin 8-251 A/T influences the susceptibility of Helicobacter pylori related gastric diseases in the Japanese population. *Gut* 2005;54:330-335
- 32 Gyulai Z, Klausz G, Tiszai A, Lenart Z, Kasa IT, Lonovics J, Mandi Y. Genetic polymorphism of interleukin-8 (IL-8) is associated with Helicobacter pylori-induced duodenal ulcer. *Eur Cytokine Netw* 2004;15:353-358
- 33 Lu W, Pan K, Zhang L, Lin D, Miao X, You W. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor [alpha] and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2005;26:631-636
- 34 Takagi A, Deguchi R, Kobayashi K, Miwa T. Cytokine expressions and H. pylori-associated gastric mucosal lesion. *Keio J Med* 2002;51:51-52
- 35 Watanabe S, Takagi A, Tada U, Kabir AM, Koga Y, Kamiya S, Osaki T, Miwa T. Cytotoxicity and motility of Helicobacter pylori. *J Clin Gastroenterol* 1997;25:S169-171
- 36 Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Imanishi J. Helicobacter pylori cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology* 1996;110:1744-1752
- 37 D'Aiuto F, Parkar M, Brett PM, Ready D, Tonetti MS. Gene polymorphisms in pro-inflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections. *Cytokine* 2004;28:29-34
- 38 Illig T, Bongardt F, Schopfer A, Muller-Scholz S, Rathmann W, Koenig W, Thorand B, Vollmert C, Holle R, Kolb H, Herder C. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes. *J*

- Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5053-5058
- 39 Basturk B, Yavascaoglu I, Vuruskan H, Goral G, Oktay B, Oral HB. Cytokine gene polymorphisms as potential risk and protective factors in renal cell carcinoma. *Cytokine* 2005;30:41-45
 - 40 DeMichele A, Martin AM, Mick R, Gor P, Wray L, Klein-Cabral M, Athanasiadis G, Colligan T, Stadtmauer E, Weber B. Interleukin-6-174G→C polymorphism is associated with improved outcome in high-risk breast cancer. *Cancer Res* 2003;63:8051-8056
 - 41 Iakupova EV, Grinchuk OV, Kalimullina DKh, Bakirov BA, Galimova RR, Makarova OV, Khusnutdinova EK, Viktorova TV. Molecular genetic analysis of the interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in multiple myeloma. *Mol Biol (Mosk)* 2003;37:420-424
 - 42 Capurso C, Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso SA, Capurso A, Panza F. Interleukin 6-174 G/C promoter gene polymorphism and sporadic Alzheimer's disease: geographic allele and genotype variations in Europe. *Exp Gerontol* 2004;39:1567-1573
 - 43 El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, Stanford JL, Mayne ST, Goedert J, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2003;124:1193-1201
 - 44 Hwang IR, Hsu PI, Peterson LE, Gutierrez O, Kim JG, Graham DY, Yamaoka Y. Interleukin-6 genetic polymorphisms are not related to *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases. *Helicobacter* 2003;8:142-148
 - 45 Soga Y, Nishimura F, Ohyama H, Maeda H, Takashiba S, Murayama Y. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol* 2003;30:524-531
 - 46 Ho SY, Wang YJ, Chen HL, Chen CH, Chang CJ, Wang PJ, Chen HH, Guo HR. Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the -308 tumor necrosis factor-alpha promoter gene. *Cancer Causes Control* 2004;15:657-663
 - 47 Grunenfelder J, Umbehr M, Plass A, Bestmann L, Maly FE, Zund G, Turina M. Genetic polymorphisms of apolipoprotein E4 and tumor necrosis factor beta as predisposing factors for increased inflammatory cytokines after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;128:92-97
 - 48 Cipriano C, Caruso C, Lio D, Giacconi R, Malavolta M, Muti E, Gasparini N, Franceschi C, Mocchegiani E. The -308G/A polymorphism of TNF-alpha influences immunological parameters in old subjects affected by infectious diseases. *Int J Immunogenet* 2005;32:13-18
 - 49 Albuquerque RV, Hayden CM, Palmer LJ, Laing IA, Rye PJ, Gibson NA, Burton PR, Goldblatt J, Lesouef PN Association of polymorphisms within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 1998;28:578-584
 - 50 Hamajima N, Shibata A, Katsuda N, Matsuo K, Ito H, Saito T, Tajima K, Tominaga S. Subjects with TNF-A-857TT and -1031TT genotypes showed the highest *Helicobacter pylori* seropositive rate compared with those with other genotypes. *Gastric Cancer* 2003;6:230-236
 - 51 Yea SS, Yang YI, Jang WH, Lee YJ, Bae HS, Paik KH. Association between TNF-alpha promoter polymorphism and *Helicobacter pylori* cagA subtype infection. *J Clin Pathol* 2001;54:703-706
 - 52 Kunstmann E, Epplen C, Elitok E, Harder M, Suerbaum S, Peitz U, Schmiegell W, Epplen JT *Helicobacter pylori* infection and polymorphisms in the tumor necrosis factor region. *Electrophoresis* 1999;20:1756-1761
 - 53 Zambon CF, Basso D, Navaglia F, Belluco C, Falda A, Fogar P, Greco E, Gallo N, Rugge M, Di Mario F, Plebani M. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. *Cytokine* 2005;29:141-152
 - 54 Lanás A, García-González MA, Santolaria S, Crusius JB, Serrano MT, Benito R, Pena AS. TNF and LTA gene polymorphisms reveal different risk in gastric and duodenal ulcer patients. *Genes Immun* 2001;2:415-421
 - 55 Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, Castro Alves C, Campos ML, Van Doorn LJ, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003;125:364-371
 - 56 Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, Matsuda K, Hatano M, Tokuhisa T. Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor- and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit Care Med* 2005;33:89-97
 - 57 Goto H. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *Nagoya J Med Sci* 2003;66:77-85
 - 58 Wu MS, Wu CY, Chen CJ, Lin MT, Shun CT, Lin JT. Interleukin-10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese. *Int J Cancer* 2003;104:617-623
 - 59 Wu MS, Chen LT, Shun CT, Huang SP, Chiu HM, Wang HP, Lin MT, Cheng AL, Lin JT. Promoter polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with risk of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Int J Cancer* 2004;110:695-700
 - 60 Lu CC, Sheu BS, Chen TW, Yang HB, Hung KH, Kao AW, Chuang CH, Wu JJ. Host TNF-alpha-1031 and -863 promoter single nucleotide polymorphisms determine the risk of benign ulceration after *H. pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1274-1282
 - 61 Li C, Xia B, Yang Y, Li J, Xia HH. TNF gene polymorphisms and *Helicobacter Pylori* infection in gastric carcinogenesis in Chinese population. *Am J Gastroenterol* 2005;100:290-294
 - 62 Zhu QR, Gu SQ, Yu H, Wang JS, Gu XH, Dong ZQ, Fei LE. Relationship between cytokine gene polymorphism and susceptibility to hepatitis B virus intrauterine infection. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2005;26:236-239
 - 63 Govan VA, Carrara HR, Sachs JA, Hoffman M, Stanczuk GA, Williamson AL. Ethnic differences in allelic distribution of IFN-gamma in South African women but no link with cervical cancer. *J Carcinog* 2003;2:3
 - 64 Lio D, Marino V, Serauto A, Gioia V, Scola L, Crivello A, Forte GI, Colonna-Romano G, Candore G, Caruso C. Genotype frequencies of the +874T→A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-gamma gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Eur J Immunogenet* 2002;29:371-374
 - 65 Howell WM, Turner SJ, Theaker JM, Bateman AC. Cytokine gene single nucleotide polymorphisms and susceptibility to and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Immunogenet* 2003;30:409-414
 - 66 Tsiavou A, Hatzigelaki E, Chaidaroglou A, Koniavitou K, Degiannis D, Raptis SA. Correlation between intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) production by CD4+ and CD8+ lymphocytes and IFN-gamma gene polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes of adults (LADA). *Cytokine* 2005;31:135-141
 - 67 Kamali-Sarvestani E, Merat A, Talei AR. Polymorphism in the genes of alpha and beta tumor necrosis factors (TNF-alpha and TNF-beta) and gamma interferon (IFN-gamma) among Iranian women with breast cancer. *Cancer Lett* 2005;223:113-119
 - 68 Hoffmann S, Park J, Jacobson LM, Muehrer RJ, Lorentzen D, Kleiner D, Becker YT, Hullett DA, Mannon R, Kirk AD, Becker BN. Donor genomics influence graft events: the effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2004;66:1686-1693
 - 69 Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D,

Gerhard M, Prinz C. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2004;53:1082-1089

70 Thye T, Burchard GD, Nilius M, Muller-Myhsok B, Horstmann RD. Genomewide linkage analysis identifies polymorphism in the human interferon-gamma receptor affecting *Helicobacter pylori* infection. *Am J Hum Genet* 2003;72:448-453

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

WJG 和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传, 于 2003-04-15 开通. WJG 包括: 1995-2005 年 1-48 期及特刊. 世界华人消化杂志包括: 1993-2005 年第 1-24 期及特刊.

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索 (期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者). 高影响力论文排序: 点击次数, 下载次数, 引用次数. 高影响力论文即特别受同行关注, 影响范围广, 被点击次数、下载次数、引用次数多的论文. 一篇论文如果能进入高影响力论文行列, 其研究成果一般多有创新性, 学术水平较高, 学术价值较大, 因而影响力大. 投稿须知包括: 投稿细则, 述评, 研究原著, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告等要求及书写格式.

2 网址

WJG (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)

世界华人消化杂志 (<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)

3 论文摘要格式

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护.

世界华人消化杂志 2004 年 5 月;12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠.

100101, 北京市, 中国人民解放军第 306 医院载人航天主着陆场医疗救护队. yuemx@ns.cetin.net.cn

目的: 探讨中国首次载人航天主着陆场区航天员医疗保障及救护的经验体会. 方法: 结合我们参加中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的体会, 8 次在直升机上的医疗救护演练经验, 2 次突发意外事故乘直升机远距离实施医疗救护的体会, 多次在载人航天医疗救护车上的医疗救护演练体会. 并参考国内外相关资料, 对载人航天航天员意外伤害提出有效的防治预案. 结果: 主要针对首飞载人航天航天员可能发生意外伤害的原因, 创新地把一个高质量的 ICU 全天候前移至草原上、沙漠里, 载体是载人航天医疗救护直升机及医疗救护车, 可以确保意外情况下航天员的安全. 创造了反应速度第一; 技术装备第一. 使救治规则、卫勤保障原则更趋于合理, 抢救成功率更高. 载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求. 航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应, 立体救护”的理念. 载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用, 他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可着落实施救护. 结论: 返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护, 能保障航天员安全, 圆满完成载人航天任务.

论文目次

目次网页包括: 岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004 年 5 月;12(5):1009-1014. 功能目次包括: 点击率: 71, 下载率: 9, 引用率: 0, 摘要, 相关文章, 被引用次数, HTML, PDF.

4 全文

全文网页包括: 投稿, 摘要, PDF, 被引用, 点击率: 301, 下载率: 9, 相关文章, 相关评论, 图片及参考文献外链接.

5 投稿查询

投稿查询网页包括: 编号, 刊名, 题目, 作者, E-mail, 收稿, 送审, 审回, 退稿, 接受, 审稿费, 出版费, 彩色图制作费, 黑白图制作费, 英文摘要加工费, 英文全文加工费, 加急费, 其他, 发票编号, 送修, 修回, 重修, 编辑, 入库, 卷号, 期号, 起止页.

微机器人在消化道内摩擦行为的研究

罗海堤, 李洁, 黄平

罗海堤, 李洁, 黄平, 华南理工大学机械工程学院 广东省广州市 510640
通讯作者: 黄平, 510640, 广东省广州市, 华南理工大学机械工程学院机械设计及理论研究所. mephuang@scut.edu.cn
电话: 020-87114588
收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-13

摘要

主要研究微型机器人在消化道内运动的影响因素, 通过理论分析和实验研究得到几组摩擦力变化曲线. 理论和实验曲线均有相似的变化趋势, 所有理论和实验所得的摩擦力大小都小于1 N. 实验结果显示, 微机器人试样直径对摩擦力影响曲线区分明显. 但在试样长度对摩擦力影响实验中, 曲线变化未有明显的区别. 微机器人试样的外壳是由几种不同材料如: 铝、树脂和有机玻璃制成. 从试样材料对摩擦力影响实验中得到的曲线则有较大的起伏. 根据理论和实验的对比分析, 认为微机器人的直径、材料对于其在肠道中运动时的摩擦力具有较大的影响, 胃肠道微型机器人在具有较小直径的同时应尽量选用树脂或有机玻璃类材料.

关键词: 微机器人; 消化道; 摩擦

罗海堤, 李洁, 黄平. 微机器人在消化道内摩擦行为的研究. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2115-2118
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2115.asp>

0 引言

医用机器人的研究是当前的研究热点, 试验样机及商业化产品的种类和数量不断增加, 同时还出现了以进入人体微细管道进行诊疗和检查为目的的微小管道检测机构的研究热潮. 美国、法国、日本、以色列等国家的管道检测机构技术处于世界领先地位. 其中, 以色列的医用胃肠道内微型机器人研究成果格外引人注目, 也已在全世界范围内得到了推广应用. 近几年我国的微小型检测机构技术研究也在快速发展中, 上海交通大学研制了一种全方向蠕动式机器人驱动内窥镜系统^[3], 浙江大学研制了无损伤体内医用微型机器人^[4], 中国科技大学研制了基于SMA(形状记忆合金)导向的用于人体肠道检查和腹腔手术的医用蠕动式管道微机器人^[5], 重庆大学也有相关的研究成果.

医用机器人的出现为人体消化道系统疾病的诊断和治疗带来福音, 它克服了传统导管式内窥镜的弊端, 不但在给患者诊断时更安全舒适, 而且诊断范围能扩大传统内窥镜所不能检测的小肠段等. 目前已处于应用阶段的医用微机器人是被动式窥视微机器人, 而对于

给药、取样等功能的被动式微机器人亦已有相应的样机出现, 对于主动式微机器人则一直处于实验室研究阶段. 为了真正能够安全地在人体生物管道内运作, 任何一种微机器人都需要进行微机器人在生物管道内摩擦行为的研究. 我们研究胶囊形状的微机器人其材料、尺寸及重量对微机器人在肠道内前进时所受摩擦力的影响. 本文先进行理论分析, 然后以离体动物肠道进行实验, 最后进行对比分析得出结论.

1 微机器人动力学

作为微机器人工作环境和对象的人体消化道尤其是小肠段部分情况颇为复杂. 下面主要探讨的是微机器人在小肠段内运行时的摩擦行为. 小肠段消化道蜿蜒曲折地徘徊在人体腹腔内, 成人全长5-7 m, 分为十二指肠、空肠和回肠, 食物通过肠道的蠕动推向前进. 微机器人在肠道内运行示意图如下图1中A部分所示.

为简化起见, 设蠕动波近似为正弦波, 并根据现有微机器人的尺寸、肠道的直径及肠道曲折度的大小关系, 认为微机器人作用处仍是近似的笔直肠段, 从而有利于问题的分析. 在图中所示肠道环境中微机器人左端处小肠壁收缩, 右边的小肠壁扩张, 肠壁上有不少皱襞, 皱襞面上分布着肠道黏液. 微机器人剖面线段为肠道对微机器人的挤压部分.

微机器人运动的动力来源正是肠道蠕动收缩对微机器人的向前挤压推力. 肠道以一定的规律蠕动, 微机器人则以一定规律向前运动, 前进过程中受到肠壁的摩擦阻力. 探讨的是微机器人参数的变化对摩擦阻力的影响. 将微机器人从系统中独立出来进行受力分析如图1中B部分所示.

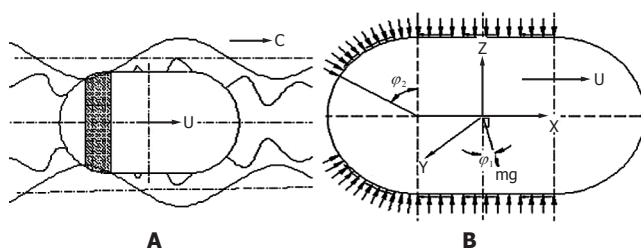


图1 微机器人受力示意图.

微机器人在运动过程中表面大部分受到压力和切应力, 这种切应力与摩擦阻力有所不同, 它的大小还与消

化道内黏液的特性及机器人的速度有关. 设机器人全长 l , 半径 r_0 , 质量 m . 根据机器人在肠道中运行的情况, 认为机器人右边的圆形部分不受压, 中间和左端圆形部分各自受到不同的压力. 设中间部分受到的压力和前进阻力分别为 T_1 、 τ_1 (合力分别为 F_1 、 F_2), 左端部分受到的压力和前进阻力分别为 T_2 、 τ_2 (合力分别为 F_3 、 F_4), 受压的范围夹角 φ_2 . 微机器人所受的重力为体力, 图示为其在质心 o 处的合力 mg , 在机器人实际运动过程中重力的方向不一定垂直, 而是有一定的夹角 φ_1 . 由于一般微小机器人的质量很小, 所以忽略由重力引起的应力分布的不均.

取连体坐标系如图1(B)所示, 根据上述的假设, 可以分析得出机器人各部分的合力只有 x 轴的方向上不为零, 其它方向上为零, 因此只需考虑这个方向上的分力:

$$F_{1x} = 0 \quad (1)$$

$$F_{2x} = 2\pi r_0 \int_{x_1}^{x_2} \tau_1 dx \quad (2)$$

$$F_{3x} = \iint_{\Sigma} T_2 \cos \varphi ds = r_0^2 \int_0^{2\pi} d\theta \int_{\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}+\varphi_2} T_2 \sin \varphi \cos \varphi d\varphi \quad (3)$$

$$F_{4x} = \iint_{\Sigma} \tau_2 \sin \varphi ds = r_0^2 \int_0^{2\pi} d\theta \int_{\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}+\varphi_2} \tau_2 \sin^2 \varphi d\varphi \quad (4)$$

机器人的动力学方程为:

$$mg \sin \varphi_1 - F_{1x} - F_{2x} + F_{3x} - F_{4x} - ma = 0 \quad (5)$$

这里 T_1 、 τ_1 和 T_2 、 τ_2 都是位置和时间的函数, 它们的大小、变化的周期取决于蠕动波, 同时 φ_1 、 φ_2 也是时间的函数. 考虑到在一定实验条件下, 不妨设 T_1 、 T_2 和 τ_1 、 τ_2 只是时间函数, 则有:

$$F_{2x} = 2\pi r_0 \int_{x_1}^{x_2} \tau_1 dx = \pi d \tau_1 (l - kd) \quad (6)$$

$$F_{3x} = \iint_{\Sigma} T_2 \cos \varphi ds = r_0^2 \int_0^{2\pi} d\theta \int_{\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}+\varphi_2} T_2 \sin \varphi \cos \varphi d\varphi = \pi T_2 r_0^2 \sin^2 \varphi_2 \quad (7)$$

$$F_{4x} = \iint_{\Sigma} \tau_2 \sin \varphi ds = r_0^2 \int_0^{2\pi} d\theta \int_{\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}+\varphi_2} \tau_2 \sin^2 \varphi d\varphi = \pi \tau_2 r_0^2 (\varphi_2 + \frac{1}{2} \sin 2\varphi_2) \quad (8)$$

2 实验分析

2.1 实验设计 为了客观地分析机构外壳的材料及尺寸对于其在肠道内运动阻力的影响, 我们使用五个重量相同的试样进行一组实验, 并将实验数据分为三组来进行讨论. 该六个试样的物理参数如表1所示. 所有试样均采用机械加工方法制造而成, 其表面粗糙度控制在2.3以下. 重量相同通过在空心试样内部填充数量不等的重物来实现.

实验原理如图2所示. 直流稳压电源驱动带减速箱的电机旋转以拉动细线, 细线的另一端绕过滑轮固定在试样一端的中心点, 并将试样放置在一段离体动物(猪)小肠中, 这样细线就会拉动试样沿肠道运动. 试样与肠道

之间的摩擦力大小与细线的拉力成线性关系, 而细线拉力的改变即代表电机负载的变化, 电机则由直流稳压电源供电, 所以摩擦力的变化也必然使电机的输入电流产生变化. 在电机正极串联一个固定阻值的电阻, 用自动数据采集系统测量该电阻两端电压的变化即可分析电机负载的变化规律.

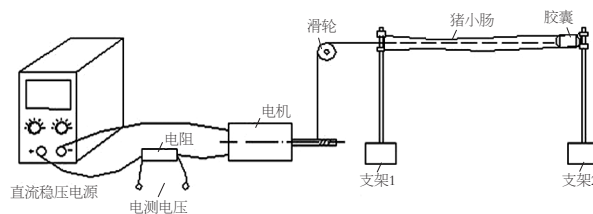


图2 实验装置示意图.

实验中采用的自动数据采集系统主要由数据采集卡和计算机组成. 其采用计算机作为数据采集系统的控制系统, 通过计算机外部总线与数据采集卡进行通讯, 将数据采集卡采集到的信号输入到计算机里. 为了更加直观地研究被测信号的变化规律, 数据采集系统采用曲线图的形式实时动态的显示测量到的数据. 同时, 计算机还将这些数据以文档形式保存下来, 以便于实验后进行数据的处理和分析. 实验选用离体的猪小肠一段50 cm, 测量发现直径和厚度不均匀分布, 大体上一端较小然后过渡到另一较大端, 其中最小直径是11 mm, 最大直径是22 mm, 平均直径15 mm, 直径趋势是先稍有增大而后减小到最小值再慢慢增大(有点类似于正弦曲线), 平均厚度1.5 mm. 自动数据采集系统的采样时间为60 s, 采样频率为40 Hz, 即数据采集卡将每隔25 ms的时间读取一次电平信号, 每个试样在一次实验中可获取2400个数据.

实验首先将各试样充填入一定量的重物, 用精度为0.01 g的天平称重, 使其重量相等. 同时将一段约50 cm长的肠道用清水冲洗干净, 两端固定在支架并尽量拉直. 滑轮、电机、电阻、直流稳压电源和数据采集系统均连接好备用. 为尽量避免试样引起的肠道变形影响实验结果, 各试样将按直径由小到大的顺序一一进行实验. 实验时, 试样与电机主轴用一定长度的细线连接, 并由肠道直径较大端(近滑轮端)塞入, 一直推到另一端. 打开电源, 电机开始转动, 同时按下键盘S键, 计算机开始采样和保存数据; 试样在细线拉动下开始往前滑动; 60 s后, 采样会自动停止, 这时关闭电源, 电机停转, 将试样从肠道中取出, 实验告一段落. 依次替换试样进行实验, 最后得到5组实验数据.

2.2 实验条件下的理论分析 在给定如上实验所述条件下, 肠道半径的变化很难以一个准确的函数表述, 为能与实验有个比较, 取肠道半径的变化为正弦曲线, 同时认为各试样运动速度近似相等, 则肠道半径变化函数可

表1 试样参数表

编 号	试样1	试样2	试样3	试样4	试样5
材 料	铝	树脂	树脂	树脂/有机玻璃	树脂/有机玻璃
密度(g/cm ³)	2.74	1.43	1.43	1.43/1.19	1.43/1.19
直径(mm)	11.1	13.6	13.6	17.5	21.8
长度(mm)	28.0	26.1	28.0	28.5	28.5

写成如下形式:

$$h(t) = 15 + 3\sin 0.125t \quad 0 \leq t \leq 60 \quad (9)$$

分析机器人在实验状态下的受力, 可以看到电动机的牵引力代替了蠕动推进力, 机器人前进所受摩擦力正是 F_{2x} , 为此需要讨论此时的切应力. 根据实验的情况, 认为在实验时间内, 各试样周长大于小肠萎缩周长, 即 πd 大于 $2D$, 即当塞入试样周长大于小肠周长时, 肠道还将扩张产生张力, 对机器人有应力 T_1 . 这里为简单起见, 认为在实验低速条件下, 切应变为:

$$\tau_1 = k_1 T_1 = 2k_1 s f \left(\frac{\pi d - 2D}{D} \right) / d = 2k_1 k_2 s (\pi d - 2D) / (dD) \quad (10)$$

代入公式(6)得:

$$F_{2x} = 2\pi k_1 k_2 s (\pi d - 2D) (l - kd) / D \quad (11)$$

其中 s 为肠道的厚度, D 既是 h .

k 取 0.2, k_1 的取值与材料有关, 这里试样1时取 0.9, 其他试样取 0.4, k_2 取 3, s 取平均值. 由上式计算得实验状态下模型所受摩擦力随时间变化的趋势.

3 结果分析与讨论

由前面的表1可知, 试样4与试样5材料相同, 长度也相同, 只有直径不同; 试样2与试样3材料相同, 直径相同, 仅在长度上略有不同, 因此可先进行分析试样直径和试样长度对摩擦力的影响. 由于数据量较大, 变化剧烈, 所绘制的是实验结果的多点移动平均线. 图3(A)是试样4与试样5实验结果的200点移动平均线, 图4(A)是试样2与试样3实验结果的200点移动平均线. 图5(A)是试样1与试样3实验结果的200点移动平均线. 对应相应的实验条件, 我们按照公式9-11进行了计算, 图3至5的(B)部分是理论计算曲线. 下面对这些结果进行分析和讨论.

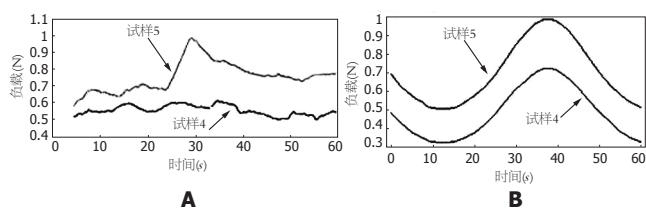


图3 试样直径对摩擦力的影响曲线.

在图3(A)中, 两曲线基本相似, 试样5进行实验时电机电流明显大于试样4的电流, 尤其是在25 s (1000 × 25 ms) 之后, 试样5的电流突然增大. 究其原因, 试样5的直径比试样4大, 则其表面积较大, 摩擦力也较大, 所以电机的输入电流也较大. 而肠道各点的直径不是等大, 在约25 s时试样进入直径较小的肠道段, 而试样5的直径较大, 它经过的时候引起了该段肠道的变形, 肠道的内表面紧贴在试样5的表面, 使得摩擦力突然增大. 试样4及其他直径更小的试样就不会产生这种电流突然明显增大的现象. 将理论曲线和实验曲线相比较, 可以发现有如下一特点: 从图3(A)与(B)对比分

析可看到, 试样4和试样5的曲线无论是实验还是理论上的都基本相似; 在(A)与(B)中, 都是直径较大的试样5的值大于直径较小的试样4; 在0-60 s内, 无论是实验还是理论图都有个峰值.

从图4(A)中可以看出, 较长的试样3与较短的试样2的曲线在图中均有程度相似的起伏. 考虑到计时开始和结束时刻两试样在肠中的位置有差异, 若将试样3的曲线向右平移适当的距离, 则两曲线中段还有基本吻合之处. 这说明两试样长度相差毕竟较小, 从而使长度对试样与肠道之间摩擦力的影响在实验中表现不明显. 分析试样长度对摩擦力的影响. 图4(A)与(B)是只有长度不一样的试样2和试样3的实验与理论曲线图. 首先, 无论是实验还是理论图, 试样2与试样3的摩擦曲线走势具有相似之处; 其次, 试样2的摩擦力虽然比试样3大些, 但不明显, 在图中试样2和试样3的摩擦曲线近似重合; 另外, 曲线在0-60 s内也有个最大值.

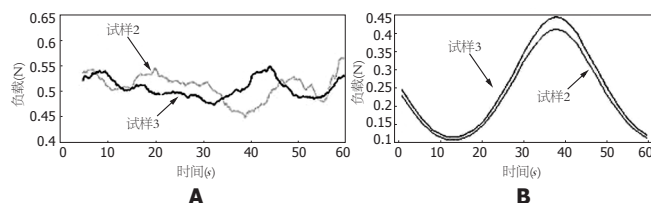


图4 试样长度对摩擦力的影响曲线.

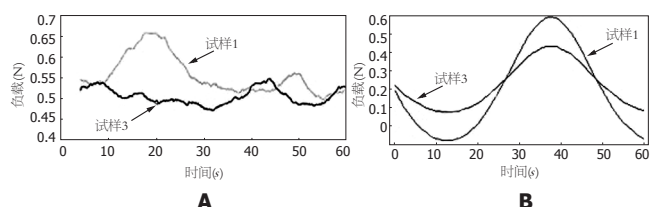


图5 试样材料对摩擦力的影响曲线.

我们采用了多个不同材料制成的微机器人模型, 因此还可探讨试样材料对摩擦力的影响. 在图5(A)中可看到有大部分时间段试样1的摩擦力大于试样3. 而由表1可知, 试样3的直径大于试样1的直径, 由前面所分析的直径对摩擦力大小的影响可知, 试样3的摩擦力应是大于试样1. 由此可见其原因应是二者的材料不同. 试样1是用铝材加工而成的, 试样3则是树脂材料制成的, 树脂具有自润滑性能, 摩擦系数小, 所以试样3所受的摩擦力小于试样1, 这个差值甚至抵消了直径增大所造成的摩擦力的变化. 由图5分析试样材料对摩擦力的影响. 试样1和试样3不但材料不同, 而且直径也有所不同, 实验和理论曲线分别如图5(A)和(B)所示. 在这两图中可以看到, 试样1和试样3的曲线不同前面的情况, 两者不相似; 在0-60 s内, 在曲线最大值附近都是试样1大于试样3, 而且试样1曲线爬升更为陡峭.

从上述分析可知, 所有试样在运行时间内都通过了

肠道的最小直径处,表现在曲线上即是摩擦力都有一个最大值.实验曲线中最大值出现的时间不同是因为各试样的速度有所不同,而理论曲线则是在假设它们速度相同情况下得到的,从而出现峰值的时间相同.

总之,微机器人的直径对于其在肠道中运动的摩擦力或者说是运动速度具有较大的影响,这主要是直径的变化不但引起接触面积的变化,还引起接触应力的变化.机器人的长度对摩擦力的影响不是很大,实验效果不明显.试样材料对微机器人所受摩擦力的有较大的影响.对于胃肠道微型机器人来说,选取何种材料制造是极为重要的,良好的材料使机器人更好地在肠道中运行,更容易通过肠道,在不影响其加工性能和满足使用条件的情况下,应尽量选用具有自润滑性能、摩擦系数小、生物适应性好的树脂或有机玻璃类材料.在胃肠道微型机器人的设计制造过程中,制造材料和机器人直径的选取主要从摩擦角度考虑;机器人长度的选取则不是从这一角度出发,应是从另一角度即肠道的蜿蜒曲折所决定.

4 参考文献

- 1 郑小林. 无线胶囊式小肠内窥镜技术进展. 中国医疗器械信息 2004;10:6-8
- 2 皮喜田, 彭承琳, 郑小林, 侯文生, 樊华, 崔建国, 刘洪英. 消化道药丸式微型诊疗系统研究进展. 中国医疗器械杂志 2004;02:120-124
- 3 曹长江, 张琛, 张凯宾. 基于超微马达的医用内窥监视系统研究. 仪表技术与传感器 2001;4:34-36
- 4 周银生, 贺惠农, 全永昕. 无损伤肠道机器人运行速度的研究. 摩擦学学报 1999;19: 299-303
- 5 杨杰, 中村仁彦, 吴月华, 张松, 吉本坚一. 医用微型机器人——SMA内窥镜与SMA腹腔手术钳子. 中国科学技术大学学报 1996;26:444-449
- 6 孙立宁, 刘品宽, 吴善强, 刘涛. 管内移动微型机器人研究与发展现状. 光学精密工程 2003;11:326-332
- 7 迟冬祥, 颜国正, 林良明. 基于蚯蚓运动原理的肠道检查微机器人内窥镜系统. 机器人 2002;24:222-238
- 8 梁浩, 朱文坚, 黄平. 体内胶囊式药物释放微机电系统机构设计研究. 现代制造工程 2004;2:19-21
- 9 刘文光, 陈和恩, 陈扬枝. 医用管道微机器人的研究进展. 现代制造工程 2004;5:14-16
- 10 王亚珍, 朱文坚, 黄平. 胶囊式胃肠道取样微机电系统的设计研究. 现代制造工程 2004;5:16-18
- 11 J Peirs, D Reynaerts, H Van Brussel. A miniature manipulator for integration in a self-propelling endoscope. *Sensors and Actuators A* 2001;92:343-349
- 12 Etsuko Kobayashi, Kim Daeyong, Ichiro Sakuma, Takeyoshi Dohi. A new wide-angle view endoscopic robot using wedge prisms. *International Congress Series* 2001;1230:149-153
- 13 Dumbor Laateh Ngaage, Rajesh Shah, Sukumara Pillai Sanjay, Alexander Ronald John Cale. Cardiopulmonary endoscopy: an effective and low risk method of examining the cardiopulmonary system during cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;19:152-155
- 14 J Peirs, D Reynaerts, H Van Brussel. Design of miniature parallel manipulators for integration in a self-propelling endoscope. *Sensors and Actuators* 2000;85:409-417
- 15 John L Wallace, G Cirino, G Webb McKnight, Susan N Elliott. Reduction of gastrointestinal injury in acute endotoxic shock by flurbiprofen nitroxybutylester. *Eur J Pharmacol* 1995;280:63-68
- 16 Charles Mosse, Tim Mills, Mark Appleyard, Paul Swain. Electrostimulation to move endoscopes in the small bowel. *Proc. SPIE Vol* 2001;4158:24-28
- 17 Shinya Itoh, Shoji Kawahito, Tomoyuki Akahori, Susumu Terakawa. Design and implementation of a one-chip wireless camera device for a capsule endoscope. *SPIE-IS&T/Vol* 2005;5677:109-118
- 18 M Sendoh, K Ishiyama, K-I Arai. Fabrication of magnetic actuator for use in a capsule endoscope. *Ieee Trans Magn* 2003;39:3232-3234
- 19 Tong Boon Tang, Erik A Johannessen, Lei Wang, Alexander Astaras, Mansour Ahmadian, Alan F Murray, Jonathan M Cooper, Steve P Beaumont, Brian W Flynn, David R S Cumming. Toward a Miniature Wireless Integrated Multisensor Microsystem for Industrial and Biomedical Applications. *Ieee Sens J* 2002;2:628-635
- 20 樊艳华, 窦艳玲, Hans Gregersen. 在体鼠小肠应力-应变实验研究. 医用生物力学 2002;17:141-146
- 21 田余祥, 王冬梅, 孙立梅, 王冰. 健卫颗粒对胃肠运动功能的影响. 中国中西医结合外科杂志 2003;9:388-390
- 22 齐清会, 曹沛宏, 韩耀辉. 胆囊切除术后胃电图及胃肠道压力变化. 中华外科杂志 1998;36:611-613
- 23 何斌, 杨灿军, 陈鹰, 周银生. 粘弹性肠道能动性模型的建立与数值模拟. 中国生物医学工程学报 2003;22:267-273
- 24 张子其, 陈孝, 张建平, 张钰. 胶囊内镜对小肠疾病的诊断价值分析. 中华消化内镜杂志 2003;20:227-229
- 25 张敏敏, 李兆申. 内脏感觉研究进展. 国外医学·消化系疾病分册 2002;22:82-84
- 26 曾衍钧, 许传青, 杨坚, 徐小虎. 软组织的生物力学特性. 中国科学 2003;33:1-5
- 27 刘作广, 赵洪伦, 周慧峰. 生物组织有限元建模与分析. 同济大学学报 2002;30:356-358
- 28 莫思健. 小肠出血的诊治进展. 现代中西医结合杂志 2004;13:2214-2215
- 29 吴江红. 肠道微型机器人无损驱动原理方法及其仿真模型研究. 重庆大学博士学位论文 2000
- 30 梁浩. 胃肠道用微胶囊药物释放微机电系统的设计与研究. 华南理工大学硕士学位论文 2004

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

自身免疫性肝炎发病机制研究进展

鲍启德, 崔东来, 杨兰兰

鲍启德, 崔东来, 杨兰兰, 河北医科大学第二医院消化科 河北省石家庄市 050000

通讯作者: 崔东来, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科. Liver369@sohu.com

电话: 0311-87708261 传真: 0311-87708261

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-07-28

摘要

自身免疫性肝炎是一种慢性进行性炎症性肝病, 女性多见, 免疫抑制剂治疗有效. 临床上主要分为两型: 抗平滑肌抗体和(或)抗核抗体阳性为1型, 抗肝肾微粒体抗体1阳性为2型. 发病机制目前尚不完全清楚. 其遗传易感性可能与特异性人类白细胞抗原等位基因HLADRB1 * 0301、* 0401、* 0404和 * 0405等有关. 触发肝细胞免疫反应的机制以交叉反应性分子模拟机制为主: 外来抗原如病毒等与肝自身抗原结构相似而发生交叉反应, 免疫调节受损. 近来报道自身免疫性肝炎也可继发于肝移植后, 其机制尚待进一步研究.

关键词: 自身免疫性肝炎; 机制; 交叉反应性

鲍启德, 崔东来, 杨兰兰. 自身免疫性肝炎发病机制研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2119-2121

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2119.asp>

0 引言

自身免疫性肝炎(AIH)是一种病因未明的慢性进行性炎症性肝病, 组织学表现为汇管区大量单核细胞浸润, 血清学表现为非肝特异性循环自身抗体的出现, 转氨酶升高, γ 球蛋白或IgG升高. 目前临床上主要分成两大类型: 抗核抗体(ANA)和(或)抗平滑肌抗体(SMA)阳性为1型, 抗肝肾微粒体抗体1(LKM1)阳性为2型. AIH的诊断需综合临床表现、血清学和免疫学特征并排除其他肝损伤的因素后方能得出, 诊断一经明确必须治疗, 免疫抑制剂通常有效. 本病以女性多见. 目前其发病机制尚不完全清楚, 我们综述AIH发病机制的研究现状与进展.

1 AIH的遗传相关基因

早在1965年, Mackay就提出AIH可能存在遗传基础, 这种设想被后来的学者证实. 最近研究表明1型AIH有很强的遗传易感性, 氨基酸序列分析发现: 人类白细胞抗原(HLA)DR3(DRB1 * 0301)和HLADR4(DRB1 * 0401)是北欧白人种人1型AIH的两个独立易感等位基因, 其 β 链在67-72位的氨基酸序列相同, 均为LLEQKR, 在第71位为一个赖氨酸(K)残基. 日本、阿根廷和墨西哥人的易感等位基

因是DRB1 * 0405和DRB1 * 0404, 其第71位氨基酸是精氨酸(R)而非赖氨酸, 但两类人种享有共同的氨基酸基序LLEQ-R, 因此在第71位的K或R就成为1型AIH的重要危险因素^[1].

目前初步的资料显示2型AIH的发生可能与HLADR7有关. 但相关研究资料较少.

2 AIH的病理损伤机制

免疫组织化学研究证实AIH患者肝组织中炎症细胞的类型主要是表达 α/β 受体的T细胞, 其中多数是CD4阳性的辅助型/诱导型, 少数是CD8阳性的细胞毒型/抑制型. 次要的炎症细胞有杀伤/自然杀伤细胞(CD16/CD56)、巨噬细胞和B细胞等. 炎症细胞介导的免疫攻击性肝损伤的可能途径是: 特异性自身抗原肽被HLA2型分子识别并结合成复合物, 被抗原提呈细胞(APC)提呈给未分化的 T_H0 细胞, 并将其激活, 活化的 T_H0 随后分化为 T_H1 和 T_H2 两个亚型, T_H2 主要分泌白细胞介素-4(IL-4)和IL-10, 并促进B细胞生成抗体; T_H1 分泌IL-2和 γ -干扰素、刺激细胞毒型T细胞、增强HLA1型并诱导HLA2型分子在肝细胞的表达、刺激巨噬细胞并促使其释放IL-1和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等细胞因子. 如果此时抑制性T细胞功能缺陷, 则多种效应器机制被触发: 细胞毒性T细胞被活化后杀伤肝细胞; T_H1 细胞分泌细胞因子并募集巨噬细胞, 通过附着于肝细胞表面的自身抗体, 补体被激活, 杀伤性淋巴细胞参与反应(图1)^[2].

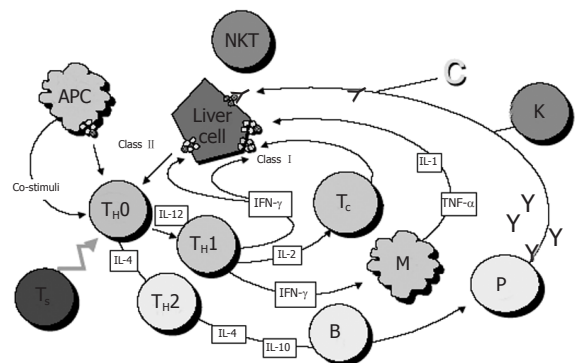


图1 肝细胞的自身免疫性攻击途径.

该图归纳了参与AIH免疫病理损伤机制的一些因子, 由 T_H1 和 T_H2 组成的细胞因子网络调节着机体的免疫反应, 同样影响着自身免疫的发病、临床表现及预

后,免疫调节受损成为自身免疫性肝损伤过程中的重要机制.研究显示^[3],AIH患者的T细胞亚群存在着抗原特异性缺陷,尤其是抗原特异性抑制型T细胞(Ts)功能缺陷,虽然非抗原特异性Ts功能缺陷也见于其他非器官和器官特异性自身免疫性疾病,但是抗原特异性Ts缺陷似乎对AIH的免疫损伤更为重要.

与正常肝细胞不同,AIH患者的肝细胞可表达HLA2型分子,虽然缺乏APC典型的抗原处理机制,但可通过其他途径呈递抗原肽.因此,免疫调节机制受损,肝细胞异常表达HLA2型分子,自身抗原肽被呈递给辅助型/诱导型T细胞,使T细胞被激活,这些被激活的T细胞呈CD4阳性,在疾病活跃期数量最多.虽然目前尚缺乏自身抗原肽被呈递和识别的证据,但已有T细胞被激活的报道^[4].

研究发现^[5],来自AIH患者肝活检的表达 γ/δ 受体的T细胞克隆,对多种靶细胞具有杀伤作用,但与其他器官细胞株相比,对肝细胞具有优先杀伤力.最近自然杀伤性T细胞(NKT)已被认为是一个特殊的细胞群,同时表达NK细胞标志CD56和T细胞标志CD3.虽然NKT出现于正常肝中,但可能参与了肝脏的病理反应过程.其在肝脏的分布状态及在AIH发生中的作用尚待进一步研究.在伴刀豆素蛋白诱导的小鼠AIH模型,NKT表达的Fas配体与肝损伤有关,而缺乏Fas配体,疾病发展迟滞.

肝特异性膜蛋白(LSP)是肝细胞膜上的一类大分子复合体,作为其主要特征性成分之一的去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)可能是吸引致敏肝浸润淋巴细胞的主要靶抗原.各型AIH均可见其抗体(抗-ASGPR),其滴度与AIH严重性相关;最近发现LSP的另一特征性成分乙醇脱氢酶(ADH)亦出现在AIH的发生过程中^[6].对AIH患者的肝细胞单分散悬液进行免疫荧光研究,发现所有细胞均被抗体包被,细胞毒性实验显示将被抗体包被的肝细胞与同源或异源的淋巴细胞一起孵育时,肝细胞被杀伤.自身抗体在AIH发生中的作用于此可见一斑^[7],其中的效应细胞被证实为Fc受体阳性的单核细胞^[8].

AIH细胞株的建立和克隆显示,来源于外周血的多数T细胞克隆和肝脏的部分T细胞克隆是CD4阳性并表达 α/β 受体^[9],进一步研究发现,这些CD4阳性T细胞克隆与LSP、ASGPR或CYP2D6二聚体的反应被HLA2型分子限制.鉴于CD4是辅助型T细胞的表现型,Wen *et al*^[9,10]为证实是否这些克隆有助于同源B细胞产生免疫球蛋白,将CD4阳性T细胞克隆与B细胞一起培养,发现自身抗体的产生大量增加.

3 AIH的可能发生路径

适应性免疫系统的核心问题是产生T、B淋巴细胞,二者可特异性的识别大量潜在的非自身性抗原.这种随机产生的大量的特异性T、B细胞经克隆扩增和募集效应器机制而识别其特异性抗原.尽管已经清楚该系统并不能完

全应对外来抗原的多样性,但是过去10年的研究表明,交叉反应作为免疫发生的本质属性发挥了重要作用.关于交叉反应首先是对T细胞的研究,T细胞的修饰肽配体(APL)结构与初次遇到的肽抗原的结构相似,既能诱导刺激性又能诱导抑制性T细胞反应.事实上,正是APL主导着胸腺内T细胞库的选择.这意味着单个T细胞不仅只对单一抗原发生特异性反应,而且能够对大量抗原发生交叉反应.免疫系统抗原特异性的扩展已足以反映外部环境抗原多样性水平.

2型AIH的特征是血清LKM1抗体阳性,LKM1抗体的靶抗原是细胞色素P4502D6,是细胞色素P450酶家族成员之一.由于LKM1抗体与2型AIH联系紧密,且最近报道肝细胞膜表达CYP2D6,因此LKM1抗体被认为是AIH的一个重要的致病因子^[11].值得注意的是LKM1抗体同样在至少10%的丙型肝炎病毒(HCV)感染者中被发现,与疾病的严重性相关,干扰素疗效差^[12],且少数LKM1抗体阳性的2型AIH患者同时合并有HCV感染,目前尚不清楚HCV感染在AIH发生中的作用,但是二者在临床上有可区别之处:作为AIH首选治疗的免疫抑制剂,如用于HCV感染有害无益,而干扰素用于治疗AIH,反而有诱发加重自身免疫性疾病的危险.在1型AIH患者中,LKM1抗体识别CYP2D6的线性表位主要在第257-269之间(85%).有人报道^[13]CYP2D6193-212作为B细胞的主要表位被93%的2型AIH患者和50%的LKM1抗体阳性的HCV感染者识别.又有研究显示^[14],HCV和巨细胞病毒(CMV)的交叉反应抗体的识别同源区在LKM1抗体阳性的HCV感染者所识别的区域内(CYP2D6204-209).因此有人试图用交叉反应机制来阐述LKM1抗体的产生.Manns *et al*^[15]推测LKM1抗体识别CYP2D6的活动来源于与HCV或单纯疱疹病毒(HSV)的交叉反应,其理由是E1HCV的310-324和IE175HSV1的156-170氨基酸序列与CYP2D6免疫决定区254-271氨基酸序列享有序列同源.该假设虽有吸引力,但仍缺少实验室证据.最新研究^[16]显示LKM1抗体阳性的HCV感染者同时存在着对CYP2D6254-271和E1HCV的310-324高度特异性的刺激性抗体活动,对比研究提示这种“倍增”活动是交叉反应.

由于LKM1抗体可与CYP2D6、HCV、HSV和CMV的同源区发生交叉反应,因此有关LKM1抗体产生和AIH发生的“复合攻击”机制逐渐受到重视:最初的CMV或HSV等病毒感染触发T细胞发生交叉反应的某一环节,在易感者体内建立起一种“免疫许可”状态,一旦合并慢性HCV感染则通过交叉反应机制致LKM1抗体产生,依赖于遗传易感性的强度,免疫反应被触发的程度及病原体抗原的剂量,少数人可能发展为自身免疫性疾病,因此,推测一个目前尚不为人知的病毒感染构成了免疫攻击的起源,这与Aich *et al*^[17]提出的自身免疫性疾病是一种暂不知道的病毒性疾病的概念是一致的.

对于1型AIH,由于疾病特异性自身抗体尚未阐明,

故无法研究其交叉反应。

4 肝移植后继发性AIH

1998年Kerkar *et al*^[18]首次报道了肝移植后肝功能失调的表现: 自身抗体出现(如ANA、SMA、LKM)、IgG升高、慢性肝炎的组织学表现(如静脉周围细胞坏死, 桥接性纤维化和塌陷), 与典型的AIH表现一致, 按AIH的标准疗法治疗有效, 抗排斥反应治疗无效等。随后又有一些研究证实了该现象。但至今尚无一个对此确切的定义和命名。有人称之为“移植后免疫性肝炎”, 也有人称为“模拟AIH移植功能失调”, 我们暂称为肝移植后继发性AIH(*De novo* autoimmune hepatitis after liver transplantation)。

该病的发生机制尚不清楚, 相关的解释也较多。除受损组织抗原释放外, 另一可能机制是分子模拟: 感染病毒抗原与自身抗原享有同源氨基酸序列, 发生交叉反应性模拟^[14], Salcedo *et al*^[19]观察到他们所有继发性AIH患者都合并有CMV、EB病毒、麻疹病毒感染, 支持后一解释。此外, 病毒感染作为肝移植后的常见现象, 可能还有一些其他的致自身免疫的机制, 如多克隆刺激、MHC I型和2型抗原膜表达的增强和诱导、干扰免疫调节细胞和(或)独特型/抗独特型网络等。与之相呼应的动物实验^[19]表明, 给予钙调磷酸酶阻断剂, 易发生自身免疫和自身免疫性疾病, 可能与干扰T细胞成熟、干扰自身反应性T细胞克隆的发生与活化有关。钙调磷酸酶诱导的自身免疫有一个较强的未被MHC编码的基因成分^[20]。

最近发现, 肝移植后继发性AIH患者体内出现针对谷胱甘肽-S-转移酶T1的抗体^[21], 由于五分之一的高加索人存在编码该酶的基因缺陷, 继发AIH患者体内先天缺失该基因编码的酶, 而所有供者体内该酶阳性, 据此推测, 移植性功能失调可能来源于患者将获得的谷胱甘肽-S-转移酶T1作为异物的识别反应。肝移植后继发性AIH究竟是免疫攻击还是排斥反应的一种形式, 尚待进一步研究确定。

5 参考文献

- Czaja AJ, Donaldson PT. Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis. *Immunol Rev* 2000;174:250-259
- Vergani D, Mieli-Vergani G. Mechanisms of autoimmune hepatitis. *Pediatr Transplant* 2004;8:589-593
- Vento S, Hegarty JE, Bottazzo G, Macchia E, Williams R, Eddleston AL. Antigen specific suppressor cell function in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 1984;1:1200-1204
- Senaldi G, Portmann B, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis. *Arch Dis Child* 1992;67:1447-1453
- Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5498-5503
- Ma Y, Gaken J, McFarlane BM, Foss Y, Farzaneh F, McFarlane IG, Mieli-Vergani G, Vergani D. Alcohol dehydrogenase: a target of humoral autoimmune response in liver disease. *Gastroenterology* 1997;112:483-492
- Vergani D, Mieli-Vergani G, Mondelli M, Portmann B, Eddleston AL. Immunoglobulin on the surface of isolated hepatocytes is associated with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and liver damage. *Liver* 1987;7:307-315
- Vergani GM, Vergani D, Jenkins PJ, Portmann B, Mowat AP, Eddleston AL, Williams R. Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in HBsAg-negative chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1979;38:16-21
- Wen L, Peakman M, Lobo-Yeo A, McFarlane BM, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. T-cell-directed hepatocyte damage in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 1990;336:1527-1530
- Lohr H, Treichel U, Poralla T, Manns M, Meyer zum Buschenfelde KH. Liver-infiltrating T helper cells in autoimmune chronic active hepatitis stimulate the production of autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor in vitro. *Clin Exp Immunol* 1992;88:45-49
- Muratori L, Parola M, Ripalti A, Robino G, Muratori P, Bellomo G, Carini R, Lenzi M, Landini MP, Albano E, Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* 2000;46:553-561
- Vergani D. LKM antibody: getting in some target practice. *Gut* 2000;46:449-450
- Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, Bianchi F, Williams R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Cytochrome P450D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 2003;170:1481-1489
- Bogdanos DP, Choudhuri K, Vergani D. Molecular mimicry and autoimmune liver disease: virtuous intentions, malign consequences. *Liver* 2001;21:225-232
- Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest* 1991;88:1370-1378
- Bogdanos DP, Lenzi M, Okamoto M, Rigopoulou EI, Muratori P, Ma Y, Muratori L, Tsantoulas D, Mieli-Vergani G, Bianchi FB, Vergani D. Multiple viral/self immunological cross-reactivity in liver kidney microsomal antibody positive hepatitis C virus infected patients is associated with the possession of HLA B51. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004;17:83-92
- Aichele P, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM. Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. *Immunol Rev* 1996;152:21-45
- Kerkar N, Hadzic N, Davies ET, Portmann B, Donaldson PT, Rela M, Heaton ND, Vergani D, Mieli-Vergani G. De-novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Lancet* 1998;351:409-413
- Salcedo M, Vaquero J, Banares R, Rodriguez-Mahou M, Alvarez E, Vicario JL, Hernandez-Albujar A, Tiscar JL, Rincon D, Alonso S, De Diego A, Clemente G. Response to steroids in de novo autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Hepatology* 2002;35:349-356
- Sakaguchi S, Sakaguchi N. Role of genetic factors in organ-specific autoimmune diseases induced by manipulating the thymus or T cells, and not self-antigens. *Rev Immunogenet* 2000;2:147-153
- Aguilera I, Wichmann I, Sousa JM, Bernardos A, Franco E, Garcia-Lozano JR, Nunez-Roldan A. Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation. *Clin Exp Immunol* 2001;126:535-539

丹参治疗急性胰腺炎的机制

张喜平, 李志军

张喜平, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006
李志军, 浙江中医学院 浙江省杭州市 310053
浙江省中医药卫生科技计划项目, No. 2003C130, No. 2004C142
杭州市重大科技发展计划项目, No. 2003123B19
杭州市医药卫生重点项目, No. 2004Z006.
浙江省医药卫生科技计划项目, No.2003B134
杭州市科技计划项目, No.2005224
杭州市医药卫生科技计划项目, No.2003A004
通讯作者: 张喜平, 310006, 浙江省杭州市第一人民医院普外科.
zxp99688@yahoo.com
电话: 0571-87065701
收稿日期: 2005-07-02 接受日期: 2005-07-28

摘要

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急腹症, 死亡率高, 并发症多, 发病机制复杂, 至今仍不明确, 目前中、西医都缺乏十分有效的治疗措施. 丹参的价格低廉, 临床应用广泛, 具有活血化瘀, 祛瘀止痛的功效, 在治疗AP方面具有独到之处, 临床疗效明显, 已成为AP治疗过程中的首选药物之一. 本文主要阐述丹参治疗AP机制方面的研究进展.

关键词: 丹参; 急性胰腺炎; 机制

张喜平, 李志军. 丹参治疗急性胰腺炎的机制. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2122-2124
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2122.asp>

0 引言

丹参的有效成分为丹参酮 I、IIA、IIB(tanshinone I、tanshinone IIA、tanshinone IIB)、异丹参酮 I、IIA(isotanshinone I、IIA). 现代药理学研究表明, 丹参具有防止钙超载, 清除氧自由基(oxygen free radical, OFR), 抗炎, 改善微循环等作用, 目前已广泛用于AP的治疗, 且疗效显著^[1], 我们就丹参治疗AP的作用机制作一综述.

1 改善微循环障碍

近年研究^[2]表明, AP的发生与发展不一定或不完全取决于胰酶的消化, 而与胰腺微循环障碍及炎性介质造成的多脏器损害有关. 在AP的发病过程中, 胰腺微循环障碍作为一种持续的损伤机制贯穿于AP的整个发展过程^[3]. 血管活性物质与AP微循环障碍关系密切, 内皮素(ET)和一氧化氮(NO)是一对血管活性物质, 两者的平衡对维持正常的血管张力起着重要的作用. ET是一种强烈的血管收缩剂, 能使胰腺微血管持续痉挛. ET可通过胰腺腺泡内皮素受体, 促进钙离子内流, 损伤胰腺组织细胞, 并且

收缩冠脉血管, 影响心肌血供, 减少心输出量, 加重胰腺缺血, 导致胰腺微循环障碍^[4,5]. 而NO则相反, 能扩张血管, 调节局部血流, 抑制血小板聚集及白细胞黏附, 降低血液黏稠度, 改善微循环障碍, 保护胰腺组织细胞^[6-10]. 两者比例失调可导致血管收缩, 毛细血管通透性增加, 引起微循环障碍和引起胰腺细胞损伤. 丹参具有活血化瘀、抗凝、抑制血小板黏附、聚集^[11]和钙拮抗剂作用^[12], 能有效降低细胞聚集指数, 调节血液黏稠度, 改善血液流变性^[13-16], 增加毛细血管张力, 减轻毛细血管损伤, 促进纤维蛋白原溶解, 从而改善微循环^[17,18]. 丹参还能明显降低ET水平^[19]并升高NO水平^[20,21], 提高心肌抗缺氧能力, 增加心肌收缩力, 改善心脏功能, 从而增加胰腺血流量, 改善胰腺缺血情况, 防止AP时微循环障碍的进一步发展^[22,23].

2 清除氧自由基

大量实验研究表明在AP早期由于胰腺细胞受损, 释放大量的OFR^[24], OFR同AP的严重程度密切相关^[25], 也是胰腺与其他器官损害的重要调节因子^[26,27]. 氧自由基可以破坏多不饱和脂肪酸、蛋白质、黏多糖等重要的生物分子, 并且可促进内源性细胞间黏附分子(ICAM-1)表达, 损伤血管内皮细胞, 使毛细血管通透性升高, 导致微循环障碍. 过多的氧自由基还可引发胰腺再灌注损伤, 以及引起胰酶的激活, 加重胰腺腺泡细胞损害, 导致AP时胰腺损伤的一系列恶性循环. 实验证明, 氧自由基清除剂可以减少ICAM-1表达和白细胞黏附, 改善AP微循环障碍^[28]. 丹参具有清除氧自由基的作用, 能提高SOD活性, 降低丙二醛(MDA)水平, 从而减少OFR的产生, 保护胰腺血管内皮细胞, 稳定毛细血管通透性, 改善微循环, 稳定细胞膜减少胰酶释放, 减少磷脂酶A的激活, 减轻胰腺病变^[29-32].

3 调节脂质炎症介质的代谢

无论AP的病因如何, 其最终结果是导致局部和全身炎症反应, 这同炎症介质过度生成相关^[33]. 自从1886年Chiara提出“急性胰腺炎自身消化学说”的经典理论以来, 该理论已被人们广泛接受. 胰腺自身消化学说认为AP是以胰腺细胞自身损伤为主的炎症性疾病, 异常激活的胰酶在造成胰腺损伤的同时, 激活了胰腺内的炎症介质细胞, 进而引起炎症介质释放. 这些炎症介质逸入血液循环激活机体其他炎症细胞, 使之形成瀑布效应, 炎症

介质的多少决定了AP病情的轻重^[34], 并在AP继发多器官衰竭(MOF)中扮演重要角色^[35]. 炎症介质不仅可以损伤血管内皮细胞, 增加毛细血管通透性, 导致微循环障碍, 还可引起其它脏器损害, 导致多器官损害. 丹参能调节脂质炎症介质的代谢, 减少TXA₂的产生^[36, 37], 减轻TXA₂引起的中性粒细胞活化, OFR释放, 血管内皮细胞损伤和导致的微循环障碍^[38, 39]. 丹参还能降低重症AP血中白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子(TNF- α)等炎症介质的水平^[40-42]. 沙建平*et al*^[43]研究证实, 丹参治疗组CD11a/CD18、CD11b/CD18及中性粒细胞和內皮细胞(PMN-EC)黏附率均较生理盐水组显著降低, 表明丹参能通过降低黏附分子表达而抑制PMN-EC黏附, 从而减轻PMN所致的微循环障碍和组织病理损伤^[44].

4 阻止钙内流, 防止钙超载

近年来国内外对AP发病机制的研究重点从“胰腺自身消化学说”、“胰腺微循环障碍学说”、“自由基损伤学说”转至“胰腺腺泡细胞钙超载学说”及“细胞因子学说”^[45, 46]. 钙超载参与AP的发生与发展, 并且促使大鼠由水肿性胰腺炎向坏死性胰腺炎转变^[47]. AP早期即有腺泡细胞膜稳定性下降, 钙通道受损, 细胞内Ca²⁺浓度增高, 激活PLA₂, 催化磷脂生成血栓素(TXA₂)、血小板活化因子(PAF), 进而造成胰腺微循环障碍^[48, 49]. 其作用机制如下: (1) 钙超载可使胰液分泌受阻, 胰蛋白酶在细胞内积聚和胰蛋白酶原过度激活, 引起胰酶自身消化^[50, 51]. (2) Ca²⁺进入线粒体使含锰的超氧化物歧化酶(SOD)减少, 导致OFR增多^[52]. 细胞内过量的Ca²⁺同OFR可共同作用, 导致胰腺腺泡细胞能量代谢障碍和超微结构的改变^[53]. (3) 细胞内Ca²⁺参与AP时腹腔内巨噬细胞过度活化^[54], 是细胞因子产生的重要调节因素. 近年研究^[55]表明, AP发生时Ca²⁺不仅是TNF- α 释放的信使, 也是促使TNF- α 在胰外器官发挥致病作用的关键因子. 丹参具有钙拮抗剂作用, 能阻止Ca²⁺内流, 使Ca²⁺浓度维持在正常生理许可范围内, 由此阻断细胞内钙超载这一引起再灌注及组织细胞损伤的重要环节, 抑制神经递质P物质(substance P, SP)的释放^[56], 减少和清除OFR, 保护溶酶体稳定性, 避免消化酶及炎症介质的释放, 改善胰腺微循环障碍, 从而减轻胰腺及其他器官损伤.

5 其他

AP时大量细胞因子、炎症介质释放及血液微循环障碍, 不仅使胰腺自身发生病变, 而且累及肝、肺、肾、肠、胃等器官^[57-61], 导致多器官损害^[62]. 丹参所含的丹参素对胰腺坏死组织有较快的清除功能, 有增强巨噬细胞功能的作用, 能促进胰腺细胞的再生, 扩张胰腺血管, 解除血管闭塞和痉挛, 因而有保护胰腺组织的作用, 防止胰腺炎进一步发展, 改善胰腺炎预后^[63]. 丹参还能够减轻AP时肝、肺、肾、肠、胃的病变, 防止多器官功能衰竭^[64-70].

总之, 丹参能有效降低AP的死亡率, 减少AP的并发症, 但现在对于丹参治疗AP的临床作用机制研究甚少, 而且在临床上缺乏大规模随机双盲对照试验, 在AP发展的哪个阶段给予丹参才能取得最好的疗效, 丹参同其他药物合用能否取得更好的疗效仍不明确, 有待于进一步研究, 其治疗机制也会更加明确.

6 参考文献

- 阮利群, 蔡爱群. 丹参注射液治疗重症胰腺炎72例疗效观察. 浙江预防医学 2003;15:78
- 王兴鹏, 王国良, 巫协宁, 袁耀宗, 徐家裕. 急性胰腺炎血循环障碍的意义. 新消化病学杂志 1997;5:55-56
- 刘全芳, 李少华. 生长抑素类似物对急性胰腺炎大鼠胰腺微血流的影响及作用. 微循环学杂志 1996;6:3-5
- Zhao HP, Wang WX, Yang CW, Shou NY. Therapeutic effects of naltrexone in plasma adotoxin in experimental acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:400-402
- 任晓葆, 何振平, 冯华芳, 段恒春. 急性胰腺炎大鼠血浆ET/NO比值的变化及其与胰腺血流量的关系. 第三军医大学学报 1999;21:344-346
- Stoclet JC, Muller B, Andriantsitohaina R, Kleschyov A. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. *Biochemistry (Mosc)* 1998;63:826-832
- Endlich K, Muller C, Barthelmebs M, Helwig JJ. Role of shear stress in nitric oxide-dependent modulation of renal angiotensin II vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 1999;127:1929-1935
- Olczanek R, Chlopicki S. Endotoxaemia in rats: role of NO, PAF and TXA₂ in pulmonary neutrophil sequestration and hyperlactataemia. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:443-454
- Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Heliadis N, Herodotou A, Hatjopoulou E, Petridou E, Sarris K. The implication of nitric oxide in the process of bacterial translocation. *Int Surg* 2000;85:23-26
- Werner J, Fernandez-del Castillo C, Rivera JA, Kollias N, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. On the protective mechanisms of nitric oxide in acute pancreatitis. *Gut* 1998;43:401-407
- 李鲁杨, 唐占府, 孔令钧. 复方丹参注射液对冠心病患者血小板活化率的影响. 山东中医杂志 2001;20:204-205
- 秦仁义, 邹声泉, 吴在德, 裘法祖. 丹参对胆源性胰腺炎的防治作用. 中华实验外科杂志 2000;17:333-334
- 赵晓晏, 夏时海, 郭萍, 周渝. 丹参治疗重症急性胰腺炎的血流变学及其相关指标的实验研究. 微循环学杂志 2001;11:31-34
- 孙艳芳, 吕晓, 韩广明, 王佃云. 复方丹参注射液治疗糖尿病多发性末梢神经病变34例. 山东中医杂志 2002;21:472-473
- 王莉, 赵长云, 赵国瑞, 张颖. 复方丹参注射液加黄芪注射液治疗冠心病58例疗效观察. 中国中医药科技 2002;9:252
- 赵淑云, 尹旭斌. 复方丹参滴丸对冠心病患者血液流变学的影响. 现代中西医结合杂志 2001;10:799-800
- 范林军, 顾红光, 王敖川. 微循环障碍在急性出血坏死性胰腺炎病程中的作用及丹参的治疗效果. 普外基础与临床杂志 1997;4:7-9
- 张连峰, 李丽, 李继昌. 改善微循环在重症胰腺炎治疗中的应用. 中国实用内科杂志 2002;22:163-164
- 刘建生, 张晓红, 付极, 卫新革, 袁耀宗, 吴云林. 急性胰腺炎时内皮素和一氧化氮变化及丹参治疗作用研究. 医师进修杂志 2003;26:21-22
- 范学良, 姜东, 李永渝, 魏玉. 实验性急性胰腺炎时血浆NO的变化及大黄、丹参的影响. 贵阳医学院学报 1997;22:231-233
- 屈振亮, 渠江海, 杨春明, 靳世津. 重症急性胰腺炎并发多脏器功能失常综合征时内皮素和一氧化氮的变化及药物的治疗作用. 中国危重病急救医学 1998;10:599-602
- 吴志光, 陈冬阳. 复方丹参注射液合复方丹参滴丸治疗冠心病心绞痛75例. 长春中医学院学报 2002;18:14
- 刘锡钧. 实用药物指南(第1版). 北京: 人民军医出版社 2000:29
- Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P,

- Matkovics B, Lonovics J. Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1998;43:1770-1777
- 25 Park BK, Chung JB, Lee JH, Suh JH, Park SW, Song SY, Kim H, Kim KH, Kang JK. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2266-2269
- 26 Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nussler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? *Ann Surg* 2000;231:352-360
- 27 Poch B, Gansauge F, Rau B, Wittel U, Gansauge S, Nussler AK, Schoenberg M, Beger HG. The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation. *FEBS Lett* 1999;461:268-272
- 28 Keck T, Werner J, Banafsche R, Stalman A, Schneider L, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Oxygen radicals promote ICAM-1 expression and microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. *Pancreatol* 2003;3:156-163
- 29 张铁良, 陈铁良. 丹参对急性胰腺炎大鼠氧自由基水平的影响. 中国中西医结合外科杂志 2004;10:34-36
- 30 姚富和, 张义善, 黄麦华, 刘洪爱, 孙一圣. 复方丹参滴丸治疗稳定型心绞痛50例. 山东中医杂志 2002;21:147-149
- 31 马永刚, 刘世清, 彭昊, 王钢. 复方丹参对大鼠实验性脊髓损伤的保护作用. 山东中医药大学学报 2002;26:216-218
- 32 马庆文, 石景森. 复方丹参对大鼠急性胰腺炎预防作用. 中国医学论坛报 1999;5:11
- 33 Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998;175:76-83
- 34 Yamauchi J, Shibuya K, Sunamura M, Arai K, Shimamura H, Motoi F, Takeda K, Matsuno S. Cytokine modulation in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:195-203
- 35 Brady M, Christmas S, Sutton R, Neoptolemos J, Slavin J. Cytokines and acute pancreatitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999;13:265-289
- 36 裘正军, 花天放, 夏强, 陈雨强, 刘小弟, 李宝华, 钟福全. 丹参对急性坏死性胰腺炎大鼠脂质炎症介质的影响. 上海医学 1999;22:57-58
- 37 裘正军, 花天放, 夏强, 陈雨强, 李宝华, 钟福全. 丹参和大剂量补液对急性坏死性胰腺炎大鼠脂质炎症介质的影响. 中华肝胆外科杂志 1999;5:78
- 38 周新泽, 毛勤生, 陈玉泉, 沈洪熏. 大鼠急性胰腺炎病理学特征与氧自由基变化的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:108-109
- 39 Hirano T, Hirano K. Thromboxane A2 receptor antagonist prevents pancreatic microvascular leakage in rats with caerulein-induced acute pancreatitis. *Int J Surg Invest* 1999;1:203-210
- 40 邝钢, 李勇, 陈少轩, 赵群, 张铁, 杨进强. 重症急性胰腺炎时 IL-1、IL-6和TNF- α 变化及丹参注射液干预的实验研究. 中华实用中西医结合杂志 2004;4:1969-1971
- 41 王文俊, 吴咸中, 姚智, 李会强. 大黄素、丹参素对单核细胞分泌炎性细胞因子的调节. 中医中药与免疫 1995;11:370-372
- 42 黄双盛, 吴勇杰. 丹参的抗氧化与抗炎作用研究进展. 中国中医药信息杂志 2002;9:86-87
- 43 沙建平, 祝彼得, 徐艳, 陈炫, 赵艳, 刘啸, 芦殿荣, 刘舟. 丹参对兔急性胰腺炎早期中性粒细胞与内皮细胞黏附抑制作用的实验研究. 中国中西医结合急救杂志 2003;10:279-281
- 44 Takeda K. Role of increase in permeability and circulatory failure in the development of organ dysfunction in severe acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004;62:1999-2004
- 45 张红, 李永渝. 急性胰腺炎的发病机制研究进展. 中国危重病急救医学 2000;12:121-125
- 46 李永渝, 张红. 胰腺腺泡钙超载与急性胰腺炎. 中国中西医结合外科杂志 2001;7:123-125
- 47 蒲青凡, 严律南, 沈骥, 刘占培, 谭建三, 左凤琼, 吴兆锋. 胰腺腺泡细胞钙超负荷在诱发大鼠由水肿性向坏死性胰腺炎转变中的作用. 中华医学杂志 1999;79:143-145
- 48 Rattner DW, Napolitano LM, Corsetti J, Compton C, Stanford GG, Warshaw AL, Chernow B. Hypocalcemia in experimental pancreatitis occurs independently of changes in serum nonesterified fatty acid levels. *Int J Pancreatol* 1990;6:249-262
- 49 van Ooijen B, Ouwendijk RJ, Kort WJ, Zijlstra Fj, Vincent JE, Wilson JH, Westbroek DL. Raised plasma thromboxane B2 levels in experimental acute necrotizing pancreatitis in rats. The effects of flunarizine, dazoxiben, and indomethacin. *Scand J Gastroenterol* 1988;23:188-192
- 50 Mithofer K, Fernandez-del Castillo C, Frick TW, Lewandowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. Acute hypercalcemia causes acute pancreatitis and ectopic trypsinogen activation in the rat. *Gastroenterology* 1995;109:239-246
- 51 Zhou W, Shen F, Miller JE, Han Q, Olson MS. Evidence for altered cellular calcium in the pathogenetic mechanism of acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* 1996;60:147-155
- 52 金惠铭. 病理生理学. 第4版. 北京:人民卫生出版社 1998;146-150
- 53 Weber H, Roesner JP, Nebe B, Rychly J, Werner A, Schroder H, Jonas L, Leitzmann P, Schneider KP, Dummmler W. Increased cytosolic Ca²⁺ amplifies oxygen radical-induced alterations of the ultrastructure and the energy metabolism of isolated rat pancreatic acinar cells. *Digestion* 1998;59:175-185
- 54 Yamaguchi Y, Akizuki E, Matsumura F, Okabe K, Liang J, Matsuda T, Yamada S, Ogawa M. Intracellular calcium affects neutrophil chemoattractant expression by macrophages in rats with cerulein-induced pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1998;43:863-869
- 55 Hughes CB, el-Din AB, Kotb M, Gaber LW, Gaber AO. Calcium channel blockade inhibits release of TNF alpha and improves survival in a rat model of acute pancreatitis. *Pancreas* 1996;13:22-28
- 56 余晓兵, 陈玉石. 丹参治疗急性坏死性胰腺炎的实验研究. 中华医院感染学杂志 2004;14:174-176
- 57 Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol* 2001;128:13-16
- 58 Lubianskii VG, Nasonov SV. Acute pancreatitis after resection of stomach for low duodenal ulcer. *Khirurgiia (Mosk)* 2001;8-11
- 59 Akhtar M, Yashpal, Jetley V, Dham SK. Renal failure in acute pancreatitis. *J Assoc Physicians India* 1995;43:176-178
- 60 Rahman SH, Ammori BJ, Holmfeld J, Larvin M, McMahon MJ. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2003;7:26-35
- 61 Hagry O, Coosemans W, De Leyn P, Naftoux P, Van Raemdonck D, Van Cutsem E, Hausterman K, Lerut T. Effects of preoperative chemoradiotherapy on postsurgical morbidity and mortality in cT3-4 +/- cM1 lymph cancer of the oesophagus and gastro-oesophageal junction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;24:179-186
- 62 Foitzik T, Eibl G, Hotz B, Hotz H, Kahrau S, Kasten C, Schneider P, Buhr HJ. Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: experimental findings and clinical implications. *Dig Dis Sci* 2002;47:130-138
- 63 韩敏. 复方丹参注射液改善急性胰腺炎预后的临床评价. 胃肠病和肝病杂志 1999;8:116-144
- 64 李钢, 王凯诚, 陈海平. 活血化瘀药对实验性急性出血坏死性胰腺炎肝损伤的保护作用. 中国中西医结合外科杂志 2001;7:393-395
- 65 张建新, 程国祚, 李龙, 陈吉祥, 张青. 丹参对大鼠急性坏死性胰腺炎并发肺损伤的影响. 中华急诊医学杂志 2002;11:101-104
- 66 张建新, 瞿建国, 李龙, 谢嵘, 程国祚. 急性坏死性胰腺炎并发肾损害的机制及对丹参的效应. 中华急诊医学杂志 2003;12:97-102
- 67 王梅. 丹参对重症急性胰腺炎并发肾功能损害的保护作用. 中国药业 2004;13:65-66
- 68 吴建农, 张建新, 刘敏, 孙亚军. 丹参对急性坏死性胰腺炎肾脏损害的干预作用. 江苏大学学报(医学版) 2004;14:500-502
- 69 张建新, 程国祚, 李龙, 瞿建国. 急性胰腺炎大鼠胃粘膜微循环的动态变化及丹参对其的影响. 江苏医药杂志 2002;28:496-498
- 70 张建新, 程国祚, 李龙, 瞿建国. 丹参对急性胰腺炎大鼠肠微循环的影响及其保护作用. 中华肝胆外科杂志 2002;8:753-754

Ghrelin与能量代谢和肥胖的关系

张兴渝, 杨刚毅

张兴渝, 杨刚毅, 重庆医科大学附属第二医院内分泌科 重庆市 400010
国家教委春晖计划资助项目(2003-56)
国家自然科学基金, No. 30270631, No. 30370671
通讯作者: 杨刚毅, 400010, 重庆市渝中区临江路76号, 重庆医科大学附属第二医院内分泌科. yanggangyi@hotmail.com
电话: 023-66871512 传真: 023-68486115
收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-08

摘要

Ghrelin是含28个氨基酸残基的具有多种生理功能的脑肠肽, 其中一个重要功能就是参与代谢的调节. Ghrelin具有启动摄食、增进食欲、增加营养物质尤其是脂类的吸收、促进脂肪形成等多方面的作用, 分泌过多可导致代谢紊乱和肥胖. 因此, Ghrelin系统被认为是能量代谢紊乱和肥胖形成的分子生物学靶点之一.

关键词: Ghrelin; 能量代谢; 肥胖

张兴渝, 杨刚毅. Ghrelin与能量代谢和肥胖的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2125-2127
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2125.asp>

0 引言

生活水平普遍提高, 生活方式改变, 生活节奏加快, 使肥胖发病率显著升高. 许多与肥胖相关的代谢紊乱, 如糖尿病、高脂血症、高血压、冠心病等发病率正不断攀升. 因此, 研究肥胖及其相关代谢紊乱已成为当今热点. Ghrelin是1999年由Kojima *et al*^[1]从大鼠胃黏膜分离纯化后发现的, 为生长激素促分泌素受体(growth hormone secretagogue receptor GHS-R)的内源性配体, Ghrelin是多功能脑肠肽, 其中一个重要功能就是参与代谢的调节. 现重点介绍Ghrelin与能量代谢和肥胖相关性的研究进展.

1 Ghrelin的概述

1.1 Ghrelin的产生与分布 Ghrelin由28个氨基酸残基组成, Mr3314, 大鼠和人类Ghrelin氨基酸序列具有较高的同源性, Ghrelin第3位丝氨酸残基被乙酰基化, 该乙酰基结构是Ghrelin生物活性所必需的^[1]. 免疫组化和原位杂交研究发现胃肠道黏膜均有Ghrelin分泌细胞, 以胃底细胞为主, 十二指肠、回肠、盲肠、结肠的分泌量很少^[2]. 胃肠道黏膜均有Ghrelin mRNA的表达^[2,3]. 原位杂交和RT-PCR均证实Ghrelin mRNA还在中枢神经系统有表达, 下丘脑弓状核、垂体、脑干等中枢神经系统亦有Ghrelin的分泌^[1,4,5]. 机体许多组织器官均有Ghrelin

mRNA表达^[3]. 最近还有人通过免疫组化发现了人类和大、小鼠软骨细胞合成与分泌Ghrelin的证据. 此外, 据报道人红白血病细胞系也产生Ghrelin. 由此可见Ghrelin的产生和分布是非常广泛的.

1.2 Ghrelin的受体和功能 Ghrelin的受体(GHS-R)是典型的G-蛋白耦连受体(GPCR)家族中的一员, 含有7个跨膜域^[1]. 该受体组织分布广泛, 有2个亚型分别为GHS-R_{1a}和GHS-R_{1b}, 功能性受体GHS-R_{1a}在多种组织中均有表达, 主要在垂体表达, 同时在下丘脑弓状核、甲状腺、胰腺、脾、心肌、肾上腺也有低水平表达, 非功能性受体GHS-R_{1b}也在多种组织中有广泛表达^[3,6].

Ghrelin刺激生长激素释放的作用很强^[1,7]. Ghrelin还可促进肾上腺皮质激素(ACTH), 肾上腺皮质激素(cortisol)和催乳素(PRL)的释放^[7,8]. Ghrelin在心血管系统亦有作用, 发现Ghrelin可以降低心脏后负荷及在不影响心率的情况下增加心输出量, 给慢性心衰患者注射Ghrelin后发现Ghrelin诱导血管舒张、抑制交感神经活性、改善左室功能. Ghrelin还通过对迷走神经的作用参与胃酸分泌的中枢调节^[9,10].

2 Ghrelin在进食启动方面的作用

通过大量的动物及临床实验证明Ghrelin在启动进食方面有很明显的作用, 其机制可能有以下几点.

2.1 Ghrelin对胃的作用 胃是食物消化的主要器官, 其黏膜分泌大量Ghrelin^[1-3]. 有报告显示在大鼠静脉或脑室内给予Ghrelin处理后, 胃酸分泌和胃动力的增加呈剂量依赖性^[9,10]. 同时Ghrelin还表现出类似于motilin的促胃动力的作用^[11]. 胃酸的增多和胃动力的增强促进了摄食的增加和食欲的增强.

2.2 Ghrelin对下丘脑的作用 下丘脑是控制食物摄取、食欲、能量平衡的神经体液调节的关键部位, 存在着分泌神经肽Y(NPY)和AGRP(agouti-related protein)的神经元, 已知NPY和AGRP具有较强的刺激食欲和调节能量代谢的作用, 这些神经肽在进食时显著升高. Cowley *et al*^[4]发现Ghrelin反应性神经元存在于下丘脑室旁核、弓状核、腹正中核、背侧核、穹隆区及第三脑室等部位, 通过突触传递作用支配下丘脑分泌NPY和AGRP的神经元, 刺激并增加NPY/AGRP神经元的自发性活动, 进而增加NPY、AGRP和的释放, 促进食物摄取和使能量消耗降低. 有人经在大鼠脑室内和外周给予Ghrelin后, 在含NPY/AGRP神经元区域均诱导了c-Fos表达增加, 提示

该区域神经元兴奋性增强^[12,13]. Leptin可使NPY基因的表表达下调引起食欲下降, 当Ghrelin和Leptin一同给予时Leptin的这种作用被清除^[12,14], 提示Ghrelin和Leptin在进食调控方面的作用是对立的. Chen *et al*^[15]通过敲除小鼠的NPY和AGRP基因使Ghrelin促进食欲的功能被清除, 也进一步说明了Ghrelin与它们的关系. Ghrelin及其受体在下丘脑的解剖学分布和生理学作用说明Ghrelin可能是通过对NPY/AGRP系统的激活进而涉及进食行为的启动.

2.3 血浆Ghrelin水平对摄食的影响 人和啮齿类动物血浆Ghrelin水平在餐前1-2 h平均升高78%, 在餐后的1 h内下降至低谷. 啮齿类动物进食或灌注营养物质后血浆Ghrelin水平被抑制, 但进水则没有变化, 正常人餐后血浆Ghrelin水平的抑制程度与进餐的热卡成正比^[16-18]. 血浆Ghrelin水平餐前升高和餐后的抑制也进一步说明了其在启动进食中的作用.

3 Ghrelin在肥胖方面的作用

3.1 Ghrelin优先增加脂肪摄取和促进脂肪合成 Shimbara *et al*^[19]给予高碳水化合物喂养(HC)大鼠和高脂喂养(HF)大鼠脑室内注射Ghrelin后, 发现大鼠摄取高脂食物明显增加. Thompson *et al*^[20]对生长激素不同程度缺乏的大鼠模型研究中发现Ghrelin直接作用于外周促进骨髓脂肪合成, 去辛酰基化的Ghrelin(不能激活GHS-R)也有类似作用, GHS-R_{1a}激动剂却没有这个作用, 提示促进脂肪合成是由不同GHS-R受体介导的, 并认为Ghrelin在体内具有促进脂肪合成的作用.

3.2 营养物质过度摄取对Ghrelin的影响 Overduin *et al*^[21]分别将3 kcal的葡萄糖、氨基酸、脂类分别灌入大鼠的胃或小肠中, 发现葡萄糖和氨基酸抑制血浆Ghrelin水平70%, 脂类抑制血浆Ghrelin约50%. 人类也发现了类似的结果^[22]. 这种营养物质对血浆Ghrelin水平抑制程度的差异可能导致摄取过量的高脂食物而引起肥胖. 有证据显示肥胖者的Ghrelin餐后的抑制程度较体重正常者明显减小^[18], 肥胖者这种餐后较高的Ghrelin水平可能导致食欲增强、营养物质摄取过度, 机体将过剩的能量转化为脂肪进而引起肥胖程度加重.

3.3 长期给予外源性Ghrelin对体重的影响 在啮齿类动物长期给予外源性Ghrelin后显示出能量消耗的减少和脂肪形成的增加, 进而导致脂肪体积增大和体重增加^[17]. 在给予外源性Ghrelin的最初48 h内体重显著增加, 在随后的2 wk里体重呈持续性增加(主要是脂肪组织的增加)^[17]. 目前尚无人类长期给予外源性Ghrelin的报道, 给健康志愿者短期静脉注射外源性Ghrelin后发现进餐量增加28%, 但对胃排空无影响^[23]. 此外一些研究者发现在遗传性生长激素缺乏的侏儒大鼠中这种作用并没有改变^[12,14], 提示Ghrelin使体重增加不依赖生长激素的作用.

4 Ghrelin与能量代谢

较多的研究发现肥胖患者血浆Ghrelin水平显著下降^[18,24], 在摄取食物后血浆Ghrelin水平也显著下降^[16-18]. 正常人血浆Ghrelin水平与BMI成负相关, 而肥胖者血浆Ghrelin水平与BMI不相关^[24]. 经过饮食干预体重减轻后血浆Ghrelin水平升高, 但仍不能达到正常对照组的水平. 这些结果提示血浆Ghrelin水平的变化与能量的储存和消耗有密切的关系.

在饥饿、神经性厌食和恶病质时血浆Ghrelin水平显著升高^[16-18,24,25], 经过饮食干预, 体重增加后血浆Ghrelin水平下降, 恢复到正常对照组的水平. 说明能量平衡状态的改变引起血浆Ghrelin水平的相应改变, 提示Ghrelin是一个反映机体营养状态的标志, 并以负反馈的模式对维持能量平衡产生影响. 另外, 在2型糖尿病患者中^[26], 肥胖患者较非肥胖患者血浆Ghrelin水平显著下降, 其血浆Ghrelin水平与BMI成负相关, 还与内脏及皮下的脂肪面积以及总脂肪面积呈负相关. 与血浆胰岛素水平、葡萄糖代谢率也呈负相关, 进一步说明血浆Ghrelin水平具有密切的关系.

有关Ghrelin与能量代谢的关系的研究结果并不一致. Ghrelin基因敲除小鼠的实验结果与预期完全相反, 小鼠没有出现厌食性的侏儒, 它们的大小、生长速度、食物摄取、身体构成等与正常野生型小鼠没有差别, 还表现出对饥饿和饮食诱导肥胖的正常反应. 并且与正常小鼠一样, 给予外源性Ghrelin后也使食欲增进^[27]. Ghrelin受体敲除小鼠也得到了类似的结果^[28]. 这些实验似乎质疑了Ghrelin对能量平衡调节作用.

总之, Ghrelin通过启动进食、增进食欲、增加营养物质, 尤其是脂类的摄取、促进脂肪形成等多方面作用调节着机体能量代谢的平衡和体重的变化. 因此, 它可能在肥胖的形成中具有一定的作用. 然而, 目前的研究结果并不完全一致, Ghrelin的确切生理作用机制和可能的信号转导通路也不十分清楚, 这些都需要进一步地深入研究.

5 参考文献

- 1 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-660
- 2 Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000;141:4255-4261
- 3 Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2988
- 4 Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M,

- Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003;37:649-661
- 5 Korbonsits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:881-887
- 6 Nogueiras R, Tovar S, Mitchell SE, Rayner DV, Archer ZA, Dieguez C, Williams LM. Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes* 2004;53:2552-2558
- 7 Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4908-4911
- 8 Muccioli G, Tschop M, Papotti M, Deghenghi R, Heiman M, Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J pharmacol* 2002;440:235-254
- 9 Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:905-908
- 10 Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:904-907
- 11 Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001;120:337-345
- 12 Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001;409:194-198
- 13 Hewson AK, Dickson SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 2000;12:1047-1049
- 14 Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 2001;50:227-232
- 15 Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, Frazier EG, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan XM, Ye Z, Nargund RP, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, MacNeil DJ, Qian S. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 2004;145:2607-2612
- 16 Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50:1714-1719
- 17 Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000;407:908-913
- 18 le Roux CW, Patterson M, Vincent RP, Hunt C, Gbatei MA, Bloom SR. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1068-1071
- 19 Shimbara T, Mondal MS, Kawagoe T, Toshinai K, Koda S, Yamaguchi H, Date Y, Nakazato M. Central administration of ghrelin preferentially enhances fat ingestion. *Neurosci Lett* 2004;369:75-79
- 20 Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, Wells T. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2004;145:234-242
- 21 Overduin J, Frayo RS, Grill HJ, Kaplan JM, Cummings DE. Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology* 2005;146:845-850
- 22 Monteleone P, Bencivenga R, Longobardi N, Serritella C, Maj M. Differential responses of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meal in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5510-5514
- 23 Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Gbatei MA, Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5992
- 24 Soriano-Guillen L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr* 2004;144:36-42
- 25 Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Kohno N. Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res* 2003;9:774-778
- 26 Katsuki A, Urakawa H, Gabazza EC, Murashima S, Nakatani K, Togashi K, Yano Y, Adachi Y, Sumida Y. Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2004;151:573-577
- 27 Sun Y, Ahmed S, Smith RG. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol* 2003;23:7973-7981
- 28 Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4679-4684

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

SNP的研究现状及在MMPs研究中的应用

葛金梅, 张忠英, 彭宣宪, 任建林

葛金梅, 彭宣宪, 厦门大学生命科学院 福建省厦门市 361005
张忠英, 厦门市临床检验中心 福建省厦门市 361004
任建林, 厦门大学中山医院消化内科 厦门市消化病研究所 福建省厦门市 361004
通讯作者: 张忠英, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门市临床检验中心. zhangzy@yahoo.com.cn
电话: 0592-8778328
收稿日期: 2005-08-03 接受日期: 2005-08-26

摘要

对单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)的研究分析近几年被广泛应用于生物及医学研究的诸多领域, 筛查SNPs的方法很多, 各具特色, 并一直不断地发展. 本文对筛查SNP的几种常用及最新方法做一简要介绍, 其中包括PCR-RFLP, 分子信标等. 细胞外基质的降解和改变是肿瘤转移的基本条件, 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类依赖锌离子的蛋白水解酶, 可以降解细胞外基质、基底膜、以及间质基质, 在肿瘤转移中具有重要作用. 有些MMP基因序列存在单基因多态性即SNP现象, 且最终影响MMP蛋白的功能. 对MMPs的单基因多态性研究为进一步从分子水平研究MMPs的结构和功能及MMPs与肿瘤转移的关系提供了一个新的方向.

关键词: 肿瘤转移; SNPs; MMPs

葛金梅, 张忠英, 彭宣宪, 任建林. SNP的研究现状及在MMPs研究中的应用. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2128-2137
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2128.asp>

0 引言

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是第三代遗传诊断标记, 近几年被广泛应用于生物以及医学研究的诸多领域, 筛查SNP的方法自从1996年SNP被正式定为第三代遗传标记以来得到很大的发展, 进一步促进了对SNP的研究. 尤其是芯片技术的应用使SNP研究进入一个新的阶段. 基质金属蛋白酶(matrix Metalloproteinases, MMPs)在肿瘤转移中具有重要作用, 对MMPs的研究可以揭示肿瘤转移的原因以及机制, 有些MMP基因序列存在SNP现象, 并与肿瘤转移有密切联系. 研究MMPs的SNP为进一步从分子水平探讨MMPs的作用开辟了一条新的途径.

1 单基因多态性

单核苷酸多态性即SNPs是指基因组DNA序列中由于单个核苷酸(A, G, C, T)替换而引起的多态性, 它是一种单核苷酸的变异, 是继限制性酶切片断长度多态性即

RFLP(restriction fragment length polymorphism)以及可变数串联重复序列即VNTR(variable number of tandem repeat)和微卫星多态性(microsatellite polymorphism)之后的又一代多态性遗传标记, 自从1994年第一次被提出之后, 它渐渐成为与分子标记有关各领域研究的焦点^[1-24].

作为第三代遗传标记, SNPs在基因组中具有高密度和高保守的特点, 人类30亿个碱基中每千个碱基出现一次, 初步估计在整个基因组共有300万以上的SNPs. 大多数SNPs位于基因组的非编码区, 并且有些位于基因组编码区的SNPs所致编码序列的改变并不影响翻译后的氨基酸序列, 这种SNPs对个体的表现型是无影响的. 但是有的SNPs位于基因启动子中, 导致基因转录活性的上升或下降, 造成该蛋白的表达量上升或下降, 进一步影响其生物学活性. 有些位于蛋白质编码区的SNPs可能影响翻译后关键的功能基团的氨基酸序列, 从而影响蛋白质的功能, 最终导致对特定环境或病因的反应敏感性. 目前很多机构都在检测SNP, 做SNP图, 建立SNP与各种疾病之间的联系, 如果得出某些SNP或某些SNP的特定组合与特定疾病、特定地区发病人群乃至个别患者有明显相关性, 疾病的诊断和治疗将可以更有针对性, 甚至做到个体化. 近几年来, SNP筛查在遗传病的研究, 药学的应用研究, 以及肿瘤研究中都得到应用.

2 SNP的筛查方法

自从SNP受到重视以来, 人们对SNP的筛查方法进行了许多探索和改进. 传统的方法有单链构象多态性分析(single-strand conformation polymorphism, SSCP)^[25-37]、^[38-41]等. 比较新兴的方法包括Taqman探针技术^[42-50]、焦磷酸测序(pyrosequencing)^[51-63]、DNA芯片(DNA chip)^[64-73]分析、变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)^[74-88]、能量转移标记的等位特异PCR^[89]、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF)^[72,90-113]等. 下面仅介绍几种常用的SNP筛查方法.

2.1 PCR-RFLP方法^[38-41] 利用限制性内切酶的酶切位点的特异性, 用两种或两种以上的限制性内切酶作用于同一DNA片断, 如果存在SNP位点, 酶切片断的长度和数量则会出现差异, 根据电泳的结果就可以判断是否有SNP

位点以及出现的碱基替换的类型. 该技术应用的前提是SNP的位点必须含有该限制内切酶的识别位点, 它是SNP筛查中最经典的方法之一.

2.2 分子信标(molecular beacons)法^[114-117] 分子信标(molecular beacons)法由Tyagi *et al*^[114]于1998年建立, 作者构建了4种分子U型探针, 其核苷酸序列除中央位点处分别为T、C、A、G外完全相同, 探针的5'端分别用四种荧光物质标记: 香豆素(coumarin, 发蓝光)-T, 荧光素(fluorescein, 发绿光)-C, 4甲基苾香红(tetramethylrhodamine, 发桔红色光)-A, 德州红(Texas red, 发红光)-G, 探针的3'端均结合4-[4' -二甲基胺基苯基氮]安息香酸(DABCYL, 可淬灭很多荧光物质发出的荧光, 可作为一种常用的淬灭物质), 将这4种探针分别与四种模板链(中央位点处分别为A、G、T、C)互补配对结合. 未结合时探针均不发荧光(通过荧光共振能量传递作用), 只有探针与模板链完全互补配对时构象才会由U型变为直线型, 从而发出大量荧光, 即便只存在一个碱基的错配也不会发出荧光. 可以通过荧光的颜色不同, 识别出该位点的碱基种类.

2.3 Taqman荧光探针法^[42-50] Taqman荧光探针法的原理是在PCR反应中, 将一对荧光染料和荧光淬灭物质的染料对分别结合到Taqman探针的两端. 探针未与目标序列结合时, 通过荧光共振能量传递作用使荧光染料不发荧光; 完全互补配对后, 由于Taqman DNA聚合酶具有5'核酸酶活性, 可将荧光染料从探针上切下来, 其发出的荧光可用荧光计检测. 如果探针与目标序列中存在错配碱基, 就会减少探针与目标序列结合的紧密程度及Taqman DNA聚合酶切割荧光染料的活性, 也就影响了荧光释放量, 从而使碱基突变链与正常链得以区分.

2.4 DHPLC法^[74-88] DHPLC即变性高效液相色谱技术是近年来新发展的一种SNP筛查方法, 一种自动、快速、高通量的基因突变筛查技术, 在与疾病相关的基因突变检测SNP筛查方面得到了推广应用.

其突变检测的基本原理是^[6-9]: 含有突变位点的PCR扩增产物经变性、逐步降温退火后, 将形成同源和异源双链(即一条为突变链, 另一条为正常链)两种DNA分子. 在部分变性条件下, 发生错配的异源双链DNA更易于解链为单链DNA, 与DNAsep柱结合力降低, 比同源双链DNA分子更易于被乙腈洗脱下来, 从而与同源双链DNA分离. 一般来说, 含变异成分的PCR产物将在DHPLC图谱上比PCR非变异产物多1-2个峰型, 因而两者可以被鉴别.

该方法有赖于DNA同源双链与异源双链之间物理性质的差异, 根据异源双链和同源双链在变性反向高压液相离子柱层析过程中滞留时间不一致而分离.

2.5 PCR和测序结合法 将可能的SNP位点进行特异性PCR扩增, 为了增加其特异性和准确性可采用巢式PCR, 然后结合DNA测序(直接测序或克隆载体测序)找到SNP存在

位点并确定其碱基替换类型.

该方法原理简单, 容易掌握, 适合对短基因片断的SNP筛查, 因此, 仍然被许多科研工作者应用, 最新发表的科研文献中有很多是用该方法进行SNP筛查的.

2.6 PCR-MALDI-MS(PCR-matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry)法^[72,90-113] 生命科学的发展总是与分析技术的进步相关联, 基质辅助激光解吸电离(matrix assistant laser desorption ionization, MALDI)是由两位德国的科学家Franz Hillenkamp和Michael Karas于1988年发明的, 并且因此获得了美国质谱协会(ASMS)1997年度杰出贡献奖. 这种技术所具有的高灵敏度和高质量检测范围, 使得能在pmol(10^{-12})乃至fmol(10^{-15})水平检测分子量高达几十万的生物大分子, 从而开拓了质谱学一个崭新的领域——生物质谱, 促使质谱技术在生命科学领域获得广泛应用和发展.

其基本原理是将分析物分散在基质分子(尼古丁酸及其同系物)中并形成晶体. 当用激光(337 nm的氮激光)照射晶体时, 由于基质分子吸收辐射光能量, 导致能量蓄积并迅速产热, 从而使基质晶体升华, 导致基质和分析物膨胀并进入气相. 由于MALDI常与TOF连在一起, 称为基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS), 俗称飞行质谱. 自发明以来, MALDI-TOF-MS常被应用于蛋白质序列分析, 制作肽指纹图谱, 测量化合物分子量等, 在基因领域的研究有DNA序列测定、DNA点突变、遗传病诊断等. 在SNP筛查中, PCR和质谱技术结合, 具有精确, 灵敏, 高通量的特点.

该方法的缺点是受仪器的限制, 费用较高, 质谱操作前的纯化技术要求高, 否则容易引起误差.

2.7 基因芯片(DNA chip)^[64-73] 基因芯片又称DNA芯片(DNA chip), DNA微集阵列(DNA microarray)等, 指采用寡核苷酸原位合成或显微打印手段将大量的DNA片段有序地固定排列在固相支持物如尼龙膜, 玻片等表面形成探针阵列, 然后与标记的样品进行杂交, 通过对杂交信号的检测实现快速、高效、并行的多态信息分析. 利用基因芯片技术筛查SNP是随着近几年芯片技术的快速发展、应用、普及而建立的一种高度并行性、高通量、微型化和自动化的检测手段, 应用该方法可以寻找新的SNP位点, 并实现SNP位点在基因组中的精确定位.

近几年来SNP的筛查方法取得了很大的进展, 但大都以PCR方法为基础, 结合电泳技术, 或结合荧光、质谱、酶联免疫等方法. 除了我们上述的几种方法外, 还有以分子杂交为基础的寡核苷酸连接分析(oligonucleotide ligation assay, OLA)^[118-121], 等位基因特异性寡核苷酸探针杂交法(allele-specific oligonucleotide hybridization, ASO)^[122-125], 动态等位基因特异性杂交(dynamic allele-specific

hybridization, DASH)^[126-129]法, 单个碱基延伸标记(single base extension-tag, SBE-Tag)^[130]法等, 各种方法的应用使检测SNP越来越快速, 准确, 并且高通量, 极大地丰富了现有的SNP库, 激发了科学家们寻找SNP的热情.

3 MMPs与肿瘤转移的关系

3.1 肿瘤转移 肿瘤转移是制约临床治疗效果的一种恶性生物学行为^[131-136], 是造成肿瘤患者死亡的主要原因. 肿瘤转移包括一系列过程, 必须多次穿透基底膜(basement membrane, BM), 细胞外基质(extracellular cell matrix, ECM)等, 其中细胞外基质的降解和改变是肿瘤转移和血管生成的基本条件, 因为肿瘤细胞必须具备降解细胞外基质, 基底膜, 甚至间质基质的能力, 才能向周围浸润, 并向血管、淋巴管及远处转移. 其中ECM和BM的降解需要多种基质降解酶即MMPs的协同参与才能完成, 因此患者肿瘤组织中MMPs的含量和肿瘤的转移往往呈相关性.

3.2 基质金属蛋白酶 基质金属蛋白酶即MMPs是一类依赖锌离子的蛋白水解酶, 迄今为止已经发现了26种. MMPs能够降解细胞外基质和基底膜, 参与许多生理和病理过程, 是肿瘤浸润转移过程中最重要的调控分子之一, 涉及肿瘤浸润和转移, 血管的生成, 在肿瘤的发展中起关键作用. 现已在多种人类肿瘤中检测到MMPs的存在, 并显示与肿瘤浸润转移力呈正相关. 如早期肝癌和甲状腺癌中有MMP-1的表达, 在人类结肠癌中MMP-2, MMP-7和MMP-9均过量表达, 在乳腺癌中, 已检测到MMP-8, MMP-9和MMP-11并且有望作为肿瘤转移诊断标记. 有实验表明, 表达MMP-9的乳腺癌肿瘤的浸润和转移发生较早, 预后差^[137-162].

SNP作为近几年来兴起的第三代分子遗传标记, 具有密度大, 遗传性稳定的特点. MMPs家族部分成员的启动子已经测序, 分子水平的调控研究, 尤其是对其启动子SNP的研究已经展开并取得进展, 本文的后半部分将对此做一阐述. 总之, 研究MMPs基因的SNP现象, 为进一步从转录水平了解MMPs的作用机制提供了一个很好的方向.

4 MMPs中有关SNP的研究

4.1 MMP-1启动子中SNP研究现状 MMP-1是少数可以降解I型以及III型胶原的酶之一, I型和III型胶原是构成胞外基质的主要成分, 与肿瘤细胞的侵袭有密切关系^[163-165]. MMP-1启动子在-1607存在一个SNP, 分别为5'-GAT-3' (1G)和5'-GGAT-3' (2G). Walter *et al*^[166]应用PCR-RFLP方法研究了31例黑色素瘤转移病例的MMP-1启动子序列-1607位点1G/2G多态性, 发现在11q22.23 (MMP-1基因的所在位点)处的杂合性缺失(loss of heterogeneity, LOH)与2G基因型有关; 在12例有LOH的黑色素瘤患者中, 83%保留有2G基因型, 17%保留有1G基

因型. 由此推测2G基因型与肿瘤的浸润和转移有关.

Zhu *et al*^[167]应用PCR-RFLP方法研究MMP-1启动子-1607位点SNP现象发现, 2G/2G基因型提高了MMP-1的转录活性, 因此2G/2G个体更易患肺癌, 尤其在吸烟个体中危险更高. 研究还发现: 2G/2G个体比1G/1G或1G/2G个体更易提早发展为肺癌.

Nishioka *et al*^[168]利用PCR和测序结合法分析了23例子宫颈上皮肿瘤(cervical intraepithelial neoplasias, CIN)标本和86例子宫颈癌(cervical cancer)标本的MMP-1启动子-1607 SNP, 并进行统计学分析, 发现MMP-1启动子2G SNP和MMP-1的表达之间存在相关性, 并和子宫颈癌的临床分期有关. 这表明MMP-1启动子的2G SNP可能影响MMP-1基因的转录活性, 进而影响子宫颈癌的侵袭和浸润活性.

但也许SNP的作用效果在不同人群中存在差异, 据Ju *et al*^[45]报道: 用TaqMan法对韩国232例子宫颈癌患者血液和332例健康对照个体血液进行MMP-1启动子-1607位点SNP分析发现: 2G频率在宫颈癌患者中为66.1%, 而在对照组中为68.2%, 二者之间没有明显差异. 因此, 2G SNP既不导致韩国妇女对子宫颈癌易感, 又不促进子宫颈癌的发展.

Matsumura *et al*^[169]用PCR-RFLP法分析了215个胃癌患者和166个健康对照个体, 发现二者1G/2G的比率接近, 并且无论在肿瘤的侵袭程度, 淋巴结转移, 和临床分期上都无明显的差别. 但另一方面, 发现SNP和胃癌患者的组织分化和性别分布有着显著关联($P < 0.05$), 由此可见, MMP-1的启动子中2G等位基因的存在并不会提高患胃癌的危险, 但是可以对胃癌的分化产生影响.

Wyatt *et al*^[170]利用PCR和测序结合法测定34例人类包皮成纤维细胞中MMP-1启动子1G/2G多态性和相应MMP-1蛋白表达水平之间的关系, 结果表明2G SNP的存在并不会显著提高MMP-1蛋白的含量, 但是会提高MMP-1基因对外界刺激因子(如细胞因子, 生长因子)的敏感性. 此外可以采用PCR和测序结合法发现新的SNP位点, 如Jurajda *et al*^[171]应用PCR和测序结合法发现了MMP-1启动子中一个新的SNP位点: 159A/G, 通过对该位点和已经发现的1607 1G/2G的连锁分析发现A等位基因常和-1607的2G等位基因连锁, 而G等位基因则常和1G等位基因连锁, 从而为以后研究MMP-1表达在肿瘤转移中的意义提供了一个新的方向.

另外, 关于MMP-1在转录水平调控机制的研究也早已展开. 研究表明MMP-1的表达受有丝分裂素激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径的调控, MAPK途径由三部分组成, 分别是胞外信号调控激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK), p38和c-Jun N端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK). 它们都是以核转录因子家族活性蛋白一

1(activated protein-1, AP-1)和ETS转录因子家族为底物的.MMP-1启动子-1607位点的2G SNP提供了一个ETS结合位点,和-1602位点的AP-1结合位点共同作用,促进MMP-1的转录,因此,2G SNP与1G SNP相比,MMP-1的转录活性提高^[172, 173].黑色素瘤细胞系A2058是一个2G纯合体,具有高水平的MMP-1组成型表达.Tower *et al*^[172]利用Northern blotting, Western blotting, 荧光素酶活性分析和PCR为基础的定点突变方法研究发现,如果加入一个针对ERK途径的特异性抑制剂PD098059,则MMP-1的表达受阻,由此可见ERK1/2途径主要以MMP-1的2G多态型为靶点,促进MMP-1基因的转录,从而提高相应肿瘤细胞的转移能力.Tower *et al*^[174]再次用乳腺癌细胞MCF-7/ADR研究发现,AP-1位点在2G SNP存在的情况下可以提高MMP-1基因的转录活性,相反在1G SNP存在的情况下则抑制MMP-1基因的转录,从而抑制I型胶原的降解,最终降低了MCF-7/ADR细胞的侵袭能力.可见,2G SNP和ERK1/2途径以及AP-1位点共同协作促进MMP-1的高表达,最终导致乳腺癌细胞的侵袭能力提高.

同样Tower *et al*^[175]发现FRA-1(Fos-like region antigen)和AP-1转录因子共同促进A2058中MMP-1蛋白的表达.抑制FRA-1,与1G SNP相比,会明显下调含2G SNP的MMP-1启动子的转录活性.

Zinzindohoue *et al*^[176]研究了结肠癌患者的MMP-1启动子2G/2G基因型与患者存活率之间的关系发现,具有2G/2G基因型的各个临床分期患者和同期非2G/2G基因型患者相比较都具有显著较低的存活率,统计分析结果是:I期和II期, $P<0.01$;从I期到III期, $P<0.001$;总体, $P<0.04$.因此,经过临床阶段,年龄,以及化疗辅助各方面因素的校正后,2G SNP可以作为独立的诊断结肠癌不良预后的指标.而同时进行的MMP-3启动子SNP和结肠癌存活率相关性研究则表明,二者无显著相关性.

4.2 MMP-3中SNP研究现状 MMP-3可以降解层黏连蛋白和纤黏连蛋白,对肿瘤发生和肿瘤生长具有重要意义.MMP-3启动子-1171位点存在5A/6A的多态现象.Krippel *et al*^[177]应用Taqman荧光标记法对500例已经组织确诊为乳腺癌的患者和500个健康对照个体做了MMP-3启动子的SNP研究,发现5A/5A、5A/6A、6A/6A三种基因型在患者和对照中的分布大致相似,其中患者分别为20.6%、51.8%、27.6%,而对照则分别为23.3%、47.3%、29.4%.但患者中基因型为5A/5A者和5A/6A或6A/6A相比有较高的淋巴结转移率,因此MMP-3启动子的5A/6A多态性不会影响个体对乳腺癌的易感性,但是会提高患者的癌细胞转移能力.

Zhang *et al*^[178]用PCR-RFLP方法分析了中国北方417位患者,其中食道鳞细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)234例,胃贲门腺癌(gastric cardiac adenocarcinoma, GCA)183例,以及350例健

康对照个体的MMP-3启动子的5A/6A SNP,发现ESCC患者中SNP至少含一个5A等位基因的个体具有明显的淋巴转移倾向,而在GCA患者中却没有观察到,因此MMP-3的5A SNP和ESCC的肿瘤发展以及淋巴转移有关.

Fang *et al*^[179]为了研究MMP-3启动子5A/6A SNP和基因易感性、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)以及淋巴结转移之间的关系,利用PCR-RFLP方法分析了173例NSCLC患者和350例健康对照个体的MMP-3启动子SNP,结果是:6A/6A、5A/6A、5A/5A三种基因型在NSCLC患者中的比例分别是65.3%、30.6%、4.1%,在健康个体中的比例分别是67.7%、30.0%、2.3%,可见总体基因型在患者和对照之间并没有明显的差异.但是,5A SNP在吸烟的患者中比在健康吸烟者中更常见.还发现:5A/5A基因型的患者和6A/6A基因型患者相比,具有更大的淋巴结转移的危险.因此,MMP-3 5A等位基因可能与吸烟者中NSCLC的易感性有关,并且5A/5A基因型可能会提高NSCLC患者的淋巴转移.

4.3 MMP-7中的SNP研究现状 众多的研究表明,MMP-7与人的子宫内膜癌以及胃肠消化道癌的肿瘤转移有关.在MMP-7启动子-181有一个A/G SNP位点.Zhang *et al*^[180]用PCR-RFLP方法分析了258例ESCC,201例GCA,243例NSCLC,以及350例健康个体的MMP-7启动子A/G SNP现象,发现A/G或G/G SNP明显提高对以上三种癌症的易感性,方差分析表明-181G和GCA以及NSCLC之间有显著相关性,因此MMP-7的-181A/G SNP可以作为GCA和NSCLC的基因易感标记物.

4.4 MMP-9中的SNP研究现状 MMP-9是IV型胶原酶,是可以降解ECM主要骨架蛋白IV型胶原的蛋白水解酶之一,已经成为近几年肿瘤研究的焦点,是极具吸引力的肿瘤治疗的靶标,已经针对它们设计了一些有希望的抗肿瘤药物.

MMP-9启动子-1562存在一个C/T SNP,影响基因的表达,Matsumura *et al*^[181]应用PCR-RFLP方法分析了177例胃癌和224例健康个体的MMP-9启动子SNP,结果发现二者的基因型没有明显的差别,但是SNP和肿瘤侵袭、临床阶段、以及淋巴转移有明显的相关性($P<0.05$),因此MMP-9启动子中T等位基因和胃癌的侵袭性有关.

5 展望

迄今为止,SNP的筛查技术和方法越来越简便,精确,高通量,SNP筛查水平的提高必将为肿瘤的发生、发展、恶化、转移等各阶段的作用机制提供一个更微观的研究方法和思路,现阶段对26种MMPs中的SNP筛查仅着力于其中的一部分,比如MMP-1、MMP-3、MMP-9,并且大都集中研究基因启动子的SNP现象,而对结构基因的SNP筛查和研究尚未见报道.可以预见,随着MMPs对肿瘤转移的作用机制在蛋白质结构水平的研究进展,将会揭

示有关结构基因SNP影响MMPs蛋白功能基团的氨基酸序列,进而影响酶的活性,以及肿瘤转移程度等各方面的信息.另外,现阶段大多从研究MMPs在病理组和正常对照组之间是否有显著差异方面入手,今后可进一步深入研究MMPs的SNP与其他的肿瘤转移因子的相互作用.总之,相信随着研究的进展,随着基因芯片技术的应用以及对人类基因组的日新月异的深入了解,必将发现更多MMPs的SNPs,揭示更多SNPs与肿瘤转移的相关性,为相应肿瘤诊断,预后评估,抗肿瘤药物研究甚至基因诊断和基因治疗提供依据.

6 参考文献

- Nordborg M, Borevitz JO, Bergelson J, Berry CC, Chory J, Hagenblad J, Kreitman M, Maloof JN, Noyes T, Oefner PJ, Stahl EA, Weigel D. The extent of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 2002;30:190-193
- Primmer CR, Borge T, Lindell J, Saetre GP. Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Mol Ecol* 2002;11:603-612
- Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol* 2002;5:94-100
- Pritchard JK, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet* 2001;69:1-14
- Remington DL, Thornsberry JM, Matsuoka Y, Wilson LM, Whitt SR, Doebley J, Kresovich S, Goodman MM, Buckler ES 4th. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11479-11484
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409:928-933
- See D, Kanazin V, Talbert H, Blake T. Electrophoretic detection of single-nucleotide polymorphisms. *Biotechniques* 2000;28:710-714, 716
- Stumpf MP. Haplotype diversity and the block structure of linkage disequilibrium. *Trends Genet* 2002;18:226-228
- Syvanen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet* 2001;2:930-942
- Tenaillon MI, Sawkins MC, Long AD, Gaut RL, Doebley JF, Gaut BS. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9161-9166
- Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 1996;14:303-308
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998;280:1077-1082
- Wang RL, Stec A, Hey J, Lukens L, Doebley J. The limits of selection during maize domestication. *Nature* 1999;398:236-239
- Nasu S, Suzuki J, Ohta R, Hasegawa K, Yui R, Kitazawa N, Monna L, Minobe Y. Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers. *DNA Res* 2002;9:163-171
- Howell WM, Jobs M, Gyllenstein U, Brookes AJ. Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms. *Nat Biotechnol* 1999;17:87-88
- Ching A, Caldwell KS, Jung M, Dolan M, Smith OS, Tingey S, Morgante M, Rafalski AJ. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genet* 2002;3:19
- Goldstein DB. Islands of linkage disequilibrium. *Nat Genet* 2001;29:109-111
- Griffin TJ, Hall JG, Prudent JR, Smith LM. Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6301-6306
- Gut IG. Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* 2001;17:475-492
- Hoskins RA, Phan AC, Naeemuddin M, Mapa FA, Ruddy DA, Ryan JJ, Young LM, Wells T, Kopczynski C, Ellis MC. Single nucleotide polymorphism markers for genetic mapping in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 2001;11:1100-1113
- Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 1999;22:139-144
- Lindblad-Toh K, Winchester E, Daly MJ, Wang DG, Hirschhorn JN, Laviolette JP, Ardlie K, Reich DE, Robinson E, Sklar P, Shah N, Thomas D, Fan JB, Gingeras T, Warrington J, Patil N, Hudson TJ, Lander ES. Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse. *Nat Genet* 2000;24:381-386
- Marth GT, Korf I, Yandell MD, Yeh RT, Gu Z, Zakeri H, Stitzel NO, Hillier L, Kwok PY, Gish WR. A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. *Nat Genet* 1999;23:452-456
- Mogg R, Batley J, Hanley S, Edwards D, O'Sullivan H, Edwards J. Characterization of the flanking regions of *Zea mays* microsatellites reveals a large number of useful sequence polymorphisms. *Theor Appl Genet* 2002;105:532-543
- Mellon I, Hock T, Reid R, Porter PC, States JC. Polymorphisms in the human xeroderma pigmentosum group A gene and their impact on cell survival and nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2002;1:531-546
- Chave KJ, Ryan TJ, Chmura SE, Galivan J. Identification of single nucleotide polymorphisms in the human gamma-glutamyl hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms. *Gene* 2003;319:167-175
- Cho SM, Kim J, Ryu HJ, Kim JJ, Kim HH, Park JH, Kim HT, Kim KH, Cho HY, Oh B, Park C, Kimm K, Jo I, Lee JE, Shin HD, Lee JK. Identification of single nucleotide polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor superfamily in the Korean population. *Hum Immunol* 2004;65:710-718
- Kamio K, Matsushita I, Tanaka G, Ohashi J, Hijikata M, Nakata K, Tokunaga K, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Direct determination of MUC5B promoter haplotypes based on the method of single-strand conformation polymorphism and their statistical estimation. *Genomics* 2004;84:613-622
- Brym P, Kaminski S, Wojcik E. Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits. *J Appl Genet* 2005;46:179-185
- Maekawa M, Taniguchi T, Uramoto T, Higashi H, Horii T, Takeshita A, Sugimura H, Kanamori M. Pilot study of arbitrarily primed PCR-single stranded DNA conformation polymorphism analysis for screening genetic polymorphisms related to specific phenotypes. *Clin Chim Acta* 2005;355:181-184
- Bertin I, Zhu JH, Gale MD. SSCP-SNP in pearl millet-a new marker system for comparative genetics. *Theor Appl Genet* 2005;110:1467-1472
- Park JY, Park MH, Park H, Ha J, Kim SJ, Ahn C. TNF-alpha

- and TGF-beta1 gene polymorphisms and renal allograft rejection in Koreans. *Tissue Antigens* 2004;64:660-666
- 33 Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Kuroda T, Ochiuni T, Matsumura S, Oue N, Yasui W, Kaneyasu M, Tanimoto K, Nishiyama M, Chayama K. Single nucleotide polymorphism in the hypoxia-inducible factor-1alpha gene in colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2004;12:1033-1037
 - 34 Ceriotti G, Chessa S, Bolla P, Budelli E, Bianchi L, Duranti E, Caroli A. Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *J Dairy Sci* 2004;87:2606-2613
 - 35 Alvarez-Busto J, Ruiz-Nunez A, Mazon LL, Jugo BM. Detection of polymorphisms in the tumour necrosis factor alpha candidate gene in sheep. *Eur J Immunogenet* 2004;31:155-158
 - 36 Xiao WH, Liu WW. Analysis of methylation and loss of heterozygosity of RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:227-230
 - 37 Kuraoka K, Oue N, Yokozaki H, Kitadai Y, Ito R, Nakayama H, Yasui W. Correlation of a single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter with tumorigenesis and progression of gastric carcinoma in Japan. *Int J Oncol* 2003;23:421-427
 - 38 Tseng LH, Chen PJ, Lin MT, Singleton K, Martin EG, Yen AH, Martin PJ, Hansen JA. Simultaneous genotyping of single nucleotide polymorphisms in the IL-1 gene complex by multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *J Immunol Methods* 2002;267:151-156
 - 39 Wen AQ, Wang J, Feng K, Zhu PF, Jiang JX. Analysis of polymorphisms in the promoter region of interleukin-1beta by restriction fragment length polymorphism-PCR. *Chin J Traumatol* 2004;7:271-274
 - 40 Zhang XF, Wang YM, Wang R, Wei LZ, Li Y, Guo W, Wang N, Zhang JH. Correlation of E-cadherin Polymorphisms to Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Gastric Cardiac Adenocarcinoma. *Ai Zheng* 2005;24:513-519
 - 41 Hamai Y, Matsumura S, Matsusaki K, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, Imai K, Nakachi K, Toge T, Yasui W. A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of the EGF gene is associated with occurrence and malignant progression of gastric cancer. *Pathobiology* 2005;72:133-138
 - 42 Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. *Cytokine* 2004;27:135-141
 - 43 Rickert AM, Borodina TA, Kuhn EJ, Lehrach H, Sperling S. Refinement of single-nucleotide polymorphism genotyping methods on human genomic DNA: amplifluor allele-specific polymerase chain reaction versus ligation detection reaction-TaqMan. *Anal Biochem* 2004;330:288-297
 - 44 Saito K, Miyake S, Moriya H, Yamazaki M, Itoh F, Imai K, Kurosawa N, Owada E, Miyamoto A. Detection of the four sequence variations of MDR1 gene using TaqMan MGB probe based real-time PCR and haplotype analysis in healthy Japanese subjects. *Clin Biochem* 2003;36:511-518
 - 45 Ju W, Kang S, Kim JW, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP. Promoter polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and risk of cervical cancer in Korean women. *Cancer Lett* 2005;217:191-196
 - 46 Gopalraj RK, Zhu H, Kelly JF, Mendiondo M, Pulliam JF, Bennett DA, Estus S. Genetic association of low density lipoprotein receptor and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005;26:1-7
 - 47 Aoki-Suzuki M, Yamada K, Meerabux J, Iwayama-Shigeno Y, Ohba H, Iwamoto K, Takao H, Toyota T, Suto Y, Nakatani N, Dean B, Nishimura S, Seki K, Kato T, Itohara S, Nishikawa T, Yoshikawa T. A family-based association study and gene expression analyses of netrin-G1 and -G2 genes in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2005;57:382-393
 - 48 Yamada K, Nakamura K, Minabe Y, Iwayama-Shigeno Y, Takao H, Toyota T, Hattori E, Takei N, Sekine Y, Suzuki K, Iwata Y, Miyoshi K, Honda A, Baba K, Katayama T, Tohyama M, Mori N, Yoshikawa T. Association analysis of FEZ1 variants with schizophrenia in Japanese cohorts. *Biol Psychiatry* 2004;56:683-690
 - 49 Isla D, Sarries C, Rosell R, Alonso G, Domine M, Taron M, Lopez-Vivanco G, Camps C, Botia M, Nunez L, Sanchez-Ronco M, Sanchez JJ, Lopez-Brea M, Barneto I, Paredes A, Medina B, Artal A, Lianes P. Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:1194-1203
 - 50 Ren Z, Cai Q, Shu XO, Cai H, Cheng JR, Wen WQ, Gao YT, Zheng W. Genetic polymorphisms in the human growth hormone-1 gene (GH1) and the risk of breast carcinoma. *Cancer* 2004;101:251-257
 - 51 Pettersson M, Bylund M, Alderborn A. Molecular haplotype determination using allele-specific PCR and pyrosequencing technology. *Genomics* 2003;82:390-396
 - 52 Pacey-Miller T, Henry R. Single-nucleotide polymorphism detection in plants using a single-stranded pyrosequencing protocol with a universal biotinylated primer. *Anal Biochem* 2003;317:166-170
 - 53 Wieser F, Fabjani G, Tempfer C, Schneeberger C, Sator M, Huber J, Wenzl R. Analysis of an interleukin-6 gene promoter polymorphism in women with endometriosis by pyrosequencing. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10:32-36
 - 54 Tuziak T, Jeong J, Majewski T, Kim MS, Steinberg J, Wang Z, Yoon DS, Kuang TC, Baggerly K, Johnston D, Czerniak B. High-resolution whole-organ mapping with SNPs and its significance to early events of carcinogenesis. *Lab Invest* 2005;85:689-701
 - 55 Garsa AA, McLeod HL, Marsh S. CYP3A4 and CYP3A5 genotyping by Pyrosequencing. *BMC Med Genet* 2005;6:19
 - 56 Meng H, Hager K, Rivkees SA, Gruen JR. Detection of Turner syndrome using high-throughput quantitative genotyping. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3419-3422
 - 57 Huang XQ, Roder MS. Development of SNP assays for genotyping the puroindoline b gene for grain hardness in wheat using pyrosequencing. *J Agric Food Chem* 2005;53:2070-2075
 - 58 Alexander AM, Pecoraro C, Styche A, Rudert WA, Benos PV, Ringquist S, Trucco M. SOP3: a web-based tool for selection of oligonucleotide primers for single nucleotide polymorphism analysis by Pyrosequencing. *Biotechniques* 2005;38:87-94
 - 59 Darimont J, Grosch S, Skarke C, Geisslinger G, Lotsch J. Comparison of two screening methods for in-house genotyping in clinical pharmacology units. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2005;43:17-22
 - 60 Watters JW, Zhang W, Meucci MA, Hou W, Ma MK, McLeod HL. Analysis of variation in mouse TPMT genotype, expression and activity. *Pharmacogenetics* 2004;14:247-254
 - 61 Nilsson TK, Johansson CA. A novel method for diagnosis of adult hypolactasia by genotyping of the -13910 C/T polymorphism with Pyrosequencing technology. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:287-290
 - 62 Ellnebo-Svedlund K, Larsson L, Jonasson J, Magnusson P. Rapid genotyping of the osteoporosis-associated polymorphic transcription factor Sp1 binding site in the COL1A1 gene by pyrosequencing. *Mol Biotechnol* 2004;26:87-90
 - 63 Lavebratt C, Sengul S, Jansson M, Schalling M. Pyrosequencing-based SNP allele frequency estimation in DNA pools. *Hum Mutat* 2004;23:92-97
 - 64 Huber M, Mundlein A, Dornstauder E, Schneeberger C, Tempfer CB, Mueller MW, Schmidt WM. Accessing single nucleotide polymorphisms in genomic DNA by direct multiplex polymerase chain reaction amplification on oligonucleotide microarrays. *Anal Biochem* 2002;303:25-33
 - 65 Sapolsky RJ, Hsie L, Berno A, Ghandour G, Mittmann M, Fan JB. High-throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays. *Genet Anal* 1999;14:187-192

- 66 Kulle B, Schirmer M, Toliat MR, Suk A, Becker C, Tzvetkov MV, Brockmoller J, Bickeboller H, Hasenfuss G, Nurnberg P, Wojnowski L. Application of genomewide SNP arrays for detection of simulated susceptibility loci. *Hum Mutat* 2005;25:557-565
- 67 Herr A, Grutzmann R, Matthaei A, Artelt J, Schrock E, Rump A, Pilarsky C. High-resolution analysis of chromosomal imbalances using the Affymetrix 10K SNP genotyping chip. *Genomics* 2005;85:392-400
- 68 Khan AS. Genomics and microarray for detection and diagnostics. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2004;51:463-467
- 69 Russom A, Haas S, Ohlander A, Mayr T, Brookes AJ, Andersson H, Stemme G. Genotyping by dynamic heating of monolayered beads on a microheated surface. *Electrophoresis* 2004;25:3712-3719
- 70 Schwonbeck S, Krause-Griep A, Gajovic-Eichelmann N, Ehrentreich-Forster E, Meinel W, Glatt H, Bier FF. Cohort analysis of a single nucleotide polymorphism on DNA chips. *Biosens Bioelectron* 2004;20:956-966
- 71 Wakai J, Takagi A, Nakayama M, Miya T, Miyahara T, Iwanaga T, Takenaka S, Ikeda Y, Amano M, Urata T. A novel method of identifying genetic mutations using an electrochemical DNA array. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e141
- 72 Nelson MR, Marnellos G, Kammerer S, Hoyal CR, Shi MM, Cantor CR, Braun A. Large-scale validation of single nucleotide polymorphisms in gene regions. *Genome Res* 2004;14:1664-1668
- 73 Mishihiro S. DNA chip, expression profile, and SNP analyses applied for clinical gastroenterology. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2004;101:121-126
- 74 Giordano M, Mellai M, Hoogendoorn B, Momigliano-Richiardi P. Determination of SNP allele frequencies in pooled DNAs by primer extension genotyping and denaturing high-performance liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2001;47:101-110
- 75 Ezzeldin H, Hoffmayer C, Soong R, Johnson MR, Lee A, Heslin M, Diasio R. Simultaneous detection of variable number tandem repeats, single nucleotide polymorphisms, and allelic imbalance in the thymidylate synthase gene enhancer region using denaturing high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 2004;334:276-283
- 76 Coussens AK, van Daal A. Linkage disequilibrium analysis identifies an FGFR1 haplotype-tag SNP associated with normal variation in craniofacial shape. *Genomics* 2005;85:563-573
- 77 D'Alfonso S, Mellai M, Giordano M, Pastore A, Malferrari G, Naldi P, Repice A, Liguori M, Cannoni S, Milanese C, Caputo D, Savettieri G, Momigliano-Richiardi P. Identification of single nucleotide variations in the coding and regulatory regions of the myelin-associated glycoprotein gene and study of their association with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2002;126:196-204
- 78 Eklund AC, Belchak MM, Lapidus K, Raha-Chowdhury R, Ober C. Polymorphisms in the HLA-linked olfactory receptor genes in the Hutterites. *Hum Immunol* 2000;61:711-717
- 79 Bagwell AM, Bailly A, Mychaleckyj JC, Freedman BI, Bowden DW. Comparative genomic analysis of the HNF-4alpha transcription factor gene. *Mol Genet Metab* 2004;81:112-121
- 80 Mellai M, Giordano M, D'Alfonso S, Marchini M, Scorza R, Giovanna Danieli M, Leone M, Ferro I, Liguori M, Trojano M, Ballerini C, Massacesi L, Cannoni S, Bompreszi R, Momigliano-Richiardi P. Prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2003;64:274-284
- 81 Han W, Lou DH, Wang J, Yip S, Yap M. Application of DHPLC in human genomic SNP screening and genotyping for all-trans-retinol dehydrogenase. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005;34:248-254
- 82 Yu B, Sawyer NA, Caramins M, Yuan ZG, Saunderson RB, Pamphlett R, Richmond DR, Jeremy RW, Trent RJ. Denaturing high performance liquid chromatography: high throughput mutation screening in familial hypertrophic cardiomyopathy and SNP genotyping in motor neurone disease. *J Clin Pathol* 2005;58:479-485
- 83 Nie Q, Lei M, Ouyang J, Zeng H, Yang G, Zhang X. Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. *Genet Sel Evol* 2005;37:339-360
- 84 Nie Q, Zeng H, Lei M, Ishag NA, Fang M, Sun B, Yang G, Zhang X. Genomic organisation of the chicken ghrelin gene and its single nucleotide polymorphisms detected by denaturing high-performance liquid chromatography. *Br Poult Sci* 2004;45:611-618
- 85 Abbas A, Lepelley M, Lechevrel M, Sichel F. Assessment of DHPLC usefulness in the genotyping of GSTP1 exon 5 SNP: comparison to the PCR-RFLP method. *J Biochem Biophys Methods* 2004;59:121-126
- 86 Tournier I, Raux G, Di Fiore F, Marechal I, Leclerc C, Martin C, Wang Q, Buisine MP, Stoppa-Lyonnet D, Olschwang S, Frebourg T, Tosi M. Analysis of the allele-specific expression of the mismatch repair gene MLH1 using a simple DHPLC-Based Method. *Hum Mutat* 2004;23:379-384
- 87 Schwarz G, Sift A, Wenzel G, Mohler V. DHPLC scoring of a SNP between promoter sequences of HMW glutenin x-type alleles at the Glu-D1 locus in wheat. *J Agric Food Chem* 2003;51:4263-4267
- 88 Han W, Yip SP, Wang J, Yap MK. Using denaturing HPLC for SNP discovery and genotyping, and establishing the linkage disequilibrium pattern for the all-trans-retinol dehydrogenase (RDH8) gene. *J Hum Genet* 2004;49:16-23
- 89 Howell WM, Jobs M, Brookes AJ. iFRET: an improved fluorescence system for DNA-melting analysis. *Genome Res* 2002;12:1401-1407
- 90 Shifman S, Pisante-Shalom A, Yakir B, Darvasi A. Quantitative technologies for allele frequency estimation of SNPs in DNA pools. *Mol Cell Probes* 2002;16:429-434
- 91 Kim S, Shi S, Bonome T, Ulz ME, Edwards JR, Fodstad H, Russo JJ, Ju J. Multiplex genotyping of the human beta2-adrenergic receptor gene using solid-phase capturable dideoxynucleotides and mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003;316:251-258
- 92 Tost J, Gut IG. Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem* 2005;38:335-350
- 93 Edwards JR, Ruparel H, Ju J. Mass-spectrometry DNA sequencing. *Mutat Res* 2005;573:3-12
- 94 Jurinke C, Denissenko MF, Oeth P, Ehrich M, van den Boom D, Cantor CR. A single nucleotide polymorphism based approach for the identification and characterization of gene expression modulation using MassARRAY. *Mutat Res* 2005;573:83-95
- 95 Petkovski E, Keyser-Tracqui C, Hienne R, Ludes B. SNPs and MALDI-TOF MS: tools for DNA typing in forensic paternity testing and anthropology. *J Forensic Sci* 2005;50:535-541
- 96 Liao HK, Su YN, Kao HY, Hung CC, Wang HT, Chen YJ. Parallel minisequencing followed by multiplex matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry assay for beta-thalassemia mutations. *J Hum Genet* 2005;50:139-150
- 97 Vallone PM, Fahr K, Kostrzewa M. Genotyping SNPs using a UV-photocleavable oligonucleotide in MALDI-TOF MS. *Methods Mol Biol* 2005;297:169-178
- 98 Sobrino B, Carracedo A. SNP typing in forensic genetics: a review. *Methods Mol Biol* 2005;297:107-126
- 99 Powell N, Dudley E, M orishita M, Bogdanova T, Tronko M, Thomas G. Single nucleotide polymorphism analysis in the human phosphatase PTPRJ gene using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:2249-2254
- 100 James MR, Hayward NK, Dumenil T, Montgomery GW, Martin NG, Duffy DL. Epidermal growth factor gene (EGF) polymorphism and risk of melanocytic neoplasia. *J Invest Dermatol* 2004;123:760-762

- 101 Gut IG. DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat* 2004;23:437-441
- 102 Lowe CA, Diggle MA, Clarke SC. A single nucleotide polymorphism identification assay for the genotypic characterisation of *Neisseria meningitidis* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Br J Biomed Sci* 2004;61:8-10
- 103 Stanssens P, Zabeau M, Meersseman G, Remes G, Gansemans Y, Storm N, Hartmer R, Honisch C, Rodi CP, Bocker S, van den Boom D. High-throughput MALDI-TOF discovery of genomic sequence polymorphisms. *Genome Res* 2004;14:126-133
- 104 Bocker S. SNP and mutation discovery using base-specific cleavage and MALDI-TOF mass spectrometry. *Bioinformatics* 2003;19:i44-53
- 105 Maksimowicz WP, Reeve JP, Reveille JD, Akey JM, Buenviaje H, O'Brien L, Peloso PM, Thomson GT, Jin L, Russell AS. High-throughput single-nucleotide polymorphism analysis of the IL1RN locus in patients with ankylosing spondylitis by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Arthritis Rheum* 2003;48:2011-2018
- 106 Sauer S, Lehrach H, Reinhardt R. MALDI mass spectrometry analysis of single nucleotide polymorphisms by photocleavage and charge-tagging. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e63
- 107 Tost J, Gut IG. Genotyping single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2002;21:388-418
- 108 Yang H, Wang H, Wang J, Cai Y, Zhou G, He F, Qian X. Multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003;314:54-62
- 109 Sauer S, Gut IG. Genotyping single-nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;782:73-87
- 110 Pusch W, Wurmbach JH, Thiele H, Kostrzewa M. MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Pharmacogenomics* 2002;3:537-548
- 111 Nakai K, Habano W, Fujita T, Nakai K, Schnackenberg J, Kawazoe K, Suwabe A, Itoh C. Highly multiplexed genotyping of coronary artery disease-associated SNPs using MALDI-TOF mass spectrometry. *Hum Mutat* 2002;20:133-138
- 112 Lechner D, Lathrop GM, Gut IG. Large-scale genotyping by mass spectrometry: experience, advances and obstacles. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6:31-38
- 113 Sauer S, Gelfand DH, Boussicault F, Bauer K, Reichert F, Gut IG. Facile method for automated genotyping of single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e22
- 114 Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol* 1998;16:49-53
- 115 Mhlhanga MM, Malmberg L. Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. *Methods* 2001;25:463-471
- 116 Shi MM. Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes. *Am J Pharmacogenomics* 2002;2:197-205
- 117 Lu CW, Chen ZL, Diao ZH, Wang FY. Investigation of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of mannan-binding lectin gene in a Han population from Guangdong. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003;23:1165-1168
- 118 Genissel A, Pastinen T, Dowell A, Mackay TF, Long AD. No evidence for an association between common nonsynonymous polymorphisms in delta and bristle number variation in natural and laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2004;166:291-306
- 119 Nickerson DA, Taylor SL, Fullerton SM, Weiss KM, Clark AG, Stengard JH, Salomaa V, Boerwinkle E, Sing CF. Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res* 2000;10:1532-1545
- 120 Iannone MA, Taylor JD, Chen J, Li MS, Rivers P, Slentz-Kesler KA, Weiner MP. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry* 2000;39:131-140
- 121 Delahunty C, Ankener W, Deng Q, Eng J, Nickerson DA. Testing the feasibility of DNA typing for human identification by PCR and an oligonucleotide ligation assay. *Am J Hum Genet* 1996;58:1239-1246
- 122 Stimpson DI, Knepper SM, Shida M, Obata K, Tajima H. Three-dimensional microarray platform applied to single nucleotide polymorphism analysis. *Biotechnol Bioeng* 2004;87:99-103
- 123 Azuma H, Obayashi S, Hamasaki H, Koyama T, Aso T. Role of endothelium in the human uterine arteries during normal menstrual cycle. *Br J Pharmacol* 1995;114:902-908
- 124 Iwasaki H, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Knight J, Daniel S, Shi M, Emi M. Accuracy of genotyping for single nucleotide polymorphisms by a microarray-based single nucleotide polymorphism typing method involving hybridization of short allele-specific oligonucleotides. *DNA Res* 2002;9:59-62
- 125 Wen SY, Wang H, Sun OJ, Wang SQ. Rapid detection of the known SNPs of CYP2C9 using oligonucleotide microarray. *World J Gastroenterol* 2003;9:1342-1346
- 126 Jobs M, Howell WM, Stromqvist L, Mayr T, Brookes AJ. DASH-2: flexible, low-cost, and high-throughput SNP genotyping by dynamic allele-specific hybridization on membrane arrays. *Genome Res* 2003;13:916-924
- 127 Breen G. Novel and alternate SNP and genetic technologies. *Psychiatr Genet* 2002;12:83-88
- 128 Prince JA, Brookes AJ. Towards high-throughput genotyping of SNPs by dynamic allele-specific hybridization. *Expert Rev Mol Diagn* 2001;1:352-358
- 129 Prince JA, Feuk L, Howell WM, Jobs M, Emahazion T, Blennow K, Brookes AJ. Robust and accurate single nucleotide polymorphism genotyping by dynamic allele-specific hybridization (DASH): design criteria and assay validation. *Genome Res* 2001;11:152-162
- 130 Fan JB, Chen X, Halushka MK, Berno A, Huang X, Ryder T, Lipshutz RJ, Lockhart DJ, Chakravarti A. Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. *Genome Res* 2000;10:853-860
- 131 Ata N, Oku T, Hattori M, Fujii H, Nakajima M, Saiki I. Inhibition by galloylglucose (GG6-10) of tumor invasion through extracellular matrix and gelatinase-mediated degradation of type IV collagens by metastatic tumor cells. *Oncol Res* 1996;8:503-511
- 132 Ikeda T, Murakami K, Hayakawa Y, Fujii H, Ohkoshi M, Saiki I. Anti-invasive activity of synthetic serine protease inhibitors and its combined effect with a matrix metalloproteinase inhibitor. *Anticancer Res* 1998;18:4259-4265
- 133 Kammerer R, Ehret R, von Kleist S. Isolated extracellular matrix-based three-dimensional in vitro models to study orthotopically cancer cell infiltration and invasion. *Eur J Cancer* 1998;34:1950-1957
- 134 Ikuta M, Podyma KA, Maruyama K, Enomoto S, Yanagishita M. Expression of heparanase in oral cancer cell lines and oral cancer tissues. *Oral Oncol* 2001;37:177-184
- 135 Rabbani SA, Mazar AP. The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 2001;10:393-415
- 136 Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:221-233
- 137 Mira E, Lacalle RA, Buesa JM, de Buitrago GG, Jimenez-Baranda S, Gomez-Mouton C, Martinez AC, Manes S. Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. *J Cell Sci* 2004;117:1847-1857
- 138 Matsumoto K, Minamitani T, Orba Y, Sato M, Sawa H, Ariga H. Induction of matrix metalloproteinase-2 by tenascin-X deficiency is mediated through the c-Jun N-terminal kinase and protein tyrosine kinase phosphorylation pathway. *Exp Cell*

- Res 2004;297:404-414
- 139 Cha BY, Park CJ, Lee DG, Lee YC, Kim DW, Kim JD, Seo WG, Kim CH. Inhibitory effect of methanol extract of *Euonymus alatus* on matrix metalloproteinase-9. *J Ethnopharmacol* 2003;85:163-167
- 140 Oba K, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kamiya K, Ohta M, Kaneko T, Shouji T, Igarashi A, Nakamura S. Prevention of liver metastasis of human colon cancer by selective matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166. *Cancer Lett* 2002;175:45-51
- 141 Okada N, Ishida H, Murata N, Hashimoto D, Seyama Y, Kubota S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in bile as a marker of liver metastasis in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:212-216
- 142 Suzuki S, Sato M, Senoo H, Ishikawa K. Direct cell-cell interaction enhances pro-MMP-2 production and activation in co-culture of laryngeal cancer cells and fibroblasts: involvement of EMMPRIN and MT1-MMP. *Exp Cell Res* 2004;293:259-266
- 143 Lopata A, Agresta F, Quinn MA, Smith C, Ostor AG, Salamonsen LA. Detection of endometrial cancer by determination of matrix metalloproteinases in the uterine cavity. *Gynecol Oncol* 2003;90:318-324
- 144 Vasala K, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein as a prognostic marker in bladder cancer. *Urology* 2003;62:952-957
- 145 Miyata Y, Kanda S, Nomata K, Hayashida Y, Kanetake H. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology* 2004;63:602-608
- 146 Curry TE, Jr., Osteen KG. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* 2003;24:428-465
- 147 Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000;10:415-433
- 148 Sasaki H, Yukiue H, Moiriyama S, Kobayashi Y, Nakashima Y, Kaji M, Kiriyama M, Fukai I, Yamakawa Y, Fujii Y. Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 and Ets-1 gene expression in patients with lung cancer. *J Surg Res* 2001;101:242-247
- 149 Yukiue H, Sasaki H, Kobayashi Y, Nakashima Y, Moriyama S, Yano M, Kaji M, Kiriyama M, Fukai I, Yamakawa Y, Fujii Y. Clinical significance of tissue inhibitor of metalloproteinase and matrix metalloproteinase mRNA expression in thymoma. *J Surg Res* 2003;109:86-91
- 150 Bloomston M, Shafii A, Zervos EE, Rosemurgy AS. TIMP-1 overexpression in pancreatic cancer attenuates tumor growth, decreases implantation and metastasis, and inhibits angiogenesis. *J Surg Res* 2002;102:39-44
- 151 Bloomston M, Zervos EE, Rosemurgy AS, 2nd. Matrix metalloproteinases and their role in pancreatic cancer: a review of preclinical studies and clinical trials. *Ann Surg Oncol* 2002;9:668-674
- 152 Hornebeck W, Maquart FX. Proteolyzed matrix as a template for the regulation of tumor progression. *Biomed Pharmacother* 2003;57:223-230
- 153 Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001;11:S37-43
- 154 Ishihara Y, Nishikawa T, Iijima H, Matsunaga K. Expression of matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of metalloproteinase and adhesion molecules in silicotic mice with lung tumor metastasis. *Toxicol Lett* 2003;142:71-75
- 155 Lengyel E, Schmalfeldt B, Konik E, Spathe K, Harting K, Fenn A, Berger U, Fridman R, Schmitt M, Prechtel D, Kuhn W. Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2001;82:291-298
- 156 Nuttall RK, Pennington CJ, Taplin J, Wheal A, Yong VW, Forsyth PA, Edwards DR. Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 2003;1:333-345
- 157 Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, de Bont ES. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50:87-100
- 158 McKenna GJ, Chen Y, Smith RM, Meneghetti A, Ong C, McMaster R, Scudamore CH, Chung SW. A role for matrix metalloproteinases and tumor host interaction in hepatocellular carcinomas. *Am J Surg* 2002;183:588-594
- 159 Seiki M, Mori H, Kajita M, Uekita T, Itoh Y. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase and cell migration. *Biochem Soc Symp* 2003;253:262
- 160 Hernandez-Barrantes S, Bernardo M, Toth M, Fridman R. Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol* 2002;12:131-138
- 161 Liu LT, Chang HC, Chiang LC, Hung WC. Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. *Cancer Res* 2003;63:3069-3072
- 162 Sanceau J, Truchet S, Bauvois B. Matrix metalloproteinase-9 silencing by RNA interference triggers the migratory-adhesive switch in Ewing's sarcoma cells. *J Biol Chem* 2003;278:36537-36546
- 163 Poola I, DeWitty RL, Marshalleck JJ, Bhatnagar R, Abraham J, Leffall LD. Identification of MMP-1 as a putative breast cancer predictive marker by global gene expression analysis. *Nat Med* 2005;11:481-483
- 164 Kondo S, Wakisaka N, Schell MJ, Horikawa T, Sheen TS, Sato H, Furukawa M, Pagano JS, Yoshizaki T. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces the matrix metalloproteinase-1 promoter via an Ets binding site formed by a single nucleotide polymorphism: enhanced susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2005;115:368-376
- 165 Lai HC, Chu CM, Lin YW, Chang CC, Nieh S, Yu MH, Chu TY. Matrix metalloproteinase 1 gene polymorphism as a prognostic predictor of invasive cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2005;96:314-319
- 166 Noll WW, Belloni DR, Rutter JL, Storm CA, Schned AR, Titus-Ernstoff L, Ernstoff MS, Brinckerhoff CE. Loss of heterozygosity on chromosome 11q22-23 in melanoma is associated with retention of the insertion polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter. *Am J Pathol* 2001;158:691-697
- 167 Zhu Y, Spitz MR, Lei L, Mills GB, Wu X. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 2001;61:7825-7829
- 168 Nishioka Y, Sagae S, Nishikawa A, Ishioka S, Kudo R. A relationship between Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphism and cervical cancer progression. *Cancer Lett* 2003;200:49-55
- 169 Matsumura S, Oue N, Kitadai Y, Chayama K, Yoshida K, Yamaguchi Y, Toge T, Imai K, Nakachi K, Yasui W. A single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter is correlated with histological differentiation of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:259-265
- 170 Wyatt CA, Coon CI, Gibson JJ, Brinckerhoff CE. Potential for the 2G single nucleotide polymorphism in the promoter of matrix metalloproteinase to enhance gene expression in normal stromal cells. *Cancer Res* 2002;62:7200-7202
- 171 Jurajda M, Muzik J, Izakovicova Holla L, Vacha J. A newly identified single nucleotide polymorphism in the promoter of the matrix metalloproteinase-1 gene. *Mol Cell Probes* 2002;16:63-66
- 172 Tower GB, Coon CC, Benbow U, Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Erk 1/2 differentially regulates the expression from the 1G/2G single nucleotide polymorphism in the MMP-1 promoter in melanoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1586:265-274

- 173 张键, 高福祿, 刘芝华. ETS因子家族在发育和肿瘤发生中作用的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1624-1627
- 174 Tower GB, Coon CI, Brinckerhoff CE. The 2G single nucleotide polymorphism (SNP) in the MMP-1 promoter contributes to high levels of MMP-1 transcription in MCF-7/ADR breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82:75-82
- 175 Tower GB, Coon CI, Belguise K, Chalbos D, Brinckerhoff CE. Fra-1 targets the AP-1 site/2G single nucleotide polymorphism (ETS site) in the MMP-1 promoter. *Eur J Biochem* 2003;270:4216-4225
- 176 Zinzindohoue F, Lecomte T, Ferraz JM, Houllier AM, Cugnenc PH, Berger A, Blons H, Laurent-Puig P. Prognostic significance of MMP-1 and MMP-3 functional promoter polymorphisms in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:594-599
- 177 Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Koppel H, Leithner A, Wascher TC, Paulweber B, Samonigg H. The 5A/6A polymorphism of the matrix metalloproteinase 3 gene promoter and breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:3518-3520
- 178 Zhang J, Jin X, Fang S, Li Y, Wang R, Guo W, Wang N, Wang Y, Wen D, Wei L, Kuang G, Dong Z. The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric cardiac adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004;25:2519-2524
- 179 Fang SM, Jin X, Li Y, Wang R, Guo W, Wang N, Zhang JH. Correlation of matrix metalloproteinase-3 polymorphism to genetic susceptibility and lymph node metastasis of non-small cell lung cancer. *Ai Zheng* 2005;24:305-310
- 180 Zhang J, Jin X, Fang S, Wang R, Li Y, Wang N, Guo W, Wang Y, Wen D, Wei L, Dong Z, Kuang G. The functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-7 promoter increases susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma, gastric cardiac adenocarcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis* 2005;26:1748-1753
- 181 Matsumura S, Oue N, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Yamaguchi Y, Imai K, Nakachi K, Matsusaki K, Chayama K, Yasui W. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:19-25

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会 暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于 2006-11 月底或 12 月初在武汉举行。

在各方面的大力支持下, 国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会已于 2004-12 在武汉成功举办, 与会代表一千余人, 中国人大副委员长吴阶平院士、国际肝胆胰前主席刘允怡教授、Jim Tooli 教授, 国际肝胆胰协会候任主席 Buechler 教授和欧洲肝胆胰协会主席 Broelsch 教授等亲自到会。会议受到国内外专家及到会代表的一致赞赏, 并受到国际肝胆胰协会的通报好评, 会议取得巨大成功。

第二届会议将邀请国外和国内著名专家做专题讲座, 针对国际国内肝胆胰外科进展及近年来的热点、难点问题进行讨论; 并交流诊治经验, 推广新理论、新技术、新方法, 了解国内外肝胆胰疾病诊断、治疗发展趋势; 同时放映手术录像。大会热烈欢迎全国各地肝胆胰领域的内科、外科、影像科各级医师以及科研人员积极投稿和报名参加。

会议同时召开第三届全国普外科主任论坛, 因此也欢迎从事医疗卫生管理的各级医院正、副院长及正、副主任积极投稿和报名参加。

本次会议已列入 2006 年国家继续医学教育项目, 参会代表均授予国家级继续医学教育学分 10 分。

来稿要求: 寄全文及 500-800 字论文摘要, 同时寄论文的软盘一份或发电子邮件。以附件的形式发送至 chenxp@medmail.com.cn, 也可将稿件打印后寄至: 武汉市解放大道 1095 号, 武汉华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所张志伟、黄志勇副教授(收), 邮编: 430030; 联系电话: 027-83662599。(世界胃肠病学杂志社 2005-09-15)

二甲基亚硝胺诱发大鼠肝纤维化模型中库普弗细胞与星状细胞的分布

朴金花, 金京顺, 崔京淑, 朴东明

朴金花, 金京顺, 崔京淑, 朴东明, 延边大学医院病理科 吉林省延吉市 133000

通讯作者: 朴东明, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学医院病理科, pdm11172000@yahoo.com.cn

电话: 0433-2660121 传真: 0433-2513610

收稿日期: 2005-08-03 接受日期: 2005-08-10

Distribution of Kupffer Cells and hepatic stellate cells in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Jin-Hua Piao, Jing-Shun Jin, Jing-Shu Cui, Dong-Ming Piao

Jin-Hua Piao, Jing-Shun Jin, Jing-Shu Cui, Dong-Ming Piao, Department of pathology, Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Correspondence to: Dong-Ming Piao, Department of pathology, Hospital of Yanbian University, 119 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. pdm11172000@yahoo.com.cn

Received: 2005-08-03 Accepted: 2005-08-10

Abstract

AIM: To investigate the distribution and significance of Kupffer cells (KCs) and hepatic stellate cells (HSCs) in dimethylnitrosamine(DMN)-induced liver fibrosis in rats.

METHODS: Rat liver fibrosis was induced by peritoneal injection of DMN(10 g/L)for 4 wk. The activities of serum alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), the contents of total proteins(TP), the ratio of liver/body weight and the area density of collagenous fiber were examined 4 and 7 wk after injection. Meanwhile, the pathological changes of the liver tissues were observed under light microscope. The expression of ED1 and α -smooth muscle actin(α -SMA) were detected by immunohistochemical SP method.

RESULTS: Compared with those in the control group, the levels of ALT and AST were significantly elevated 4 and 7 wk after injection(4 wk: 1201.91 ± 215.04 , 5741.15 ± 1000.20 nkat/L vs 398.91 ± 106.35 , 1365.27 ± 435.09 nkat/L, $P < 0.01$; 7 wk: 745.15 ± 413.42 , 2355.47 ± 1418.62 nkat/L vs 289.72 ± 43.01 , 1018.54 ± 215.04 nkat/L, $P < 0.05$). TP content was significantly decreased 4 wk after injection (50.32 ± 9.81 g/L vs 69.67 ± 6.09 g/L, $P < 0.01$), but returned to normal after 7 wk. The ratio of liver/body

weight was decreased(4 wk: $2.156 \pm 0.539\%$ vs $2.950 \pm 0.147\%$, $P < 0.01$; 7 wk: $2.250 \pm 0.638\%$ vs $2.863 \pm 0.158\%$, $P < 0.01$), but the area density of collagenous fiber was increased 4 and 7 wk after injection ($9.90 \pm 1.93\%$ vs $1.27 \pm 0.28\%$, $P < 0.01$; $9.20 \pm 0.97\%$ vs $1.46 \pm 0.67\%$, $P < 0.01$). Diffuse cirrhosis was observed in most model rats after 4 wk and it was still significant after 7 wk. The ED1 and α -SMA positive cells aggregated prominently in the fibrotic tissue and septa in the model rats.

CONCLUSION: DMN induces obviously liver dysfunction and diffuse cirrhosis in rats, and KCs are closely associated with the activation of HSCs.

Key Words: Dimethylnitrosamine; Liver fibrosis; Rats; Hepatic stellate cell; Kupffer cell

Piao JH, Jin JS, Cui JS, Piao DM. Distribution of Kupffer cells and hepatic stellate cells in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rat. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2138-2141

摘要

目的: 探讨二甲基亚硝胺(DMN)诱发大鼠肝纤维化库普弗细胞(kupffer cell, KC)与肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的分布及意义。

方法: 用10 g/L DMN腹腔注射4 wk制备大鼠肝纤维化模型, 实验第4、7周末检测大鼠血清ALT、AST活性及总蛋白(total proteins, TP)含量, 测定肝/体质量比及肝组织胶原纤维的面密度、观察肝组织的病理变化, 免疫组化采用SP法观察KC和HSC标志物ED1及 α -SMA的表达及分布。

结果: 第4周模型组与正常组比较血清ALT、AST活性显著升高($P < 0.01$), TP含量和肝/体质量比明显下降($P < 0.01$), 肝组织内胶原纤维面密度明显升高, 大部分形成弥漫性肝硬化; 第7周模型组除了血清TP含量无变化外ALT、AST活性仍维持较高水平, 并维持肝硬化的特点。免疫组化染色第4、7周模型组ED1和 α -SMA阳性细胞数量明显增加, 两种细胞分布的部位相同, 主要在增生的纤维组织及纤维间隔弥漫分布, 在肝实质内少量散在分布。

结论: DMN引起大鼠肝功能明显障碍, 大部分形成弥漫肝

硬化, KC与HS的分布表明KC与激活、活化HSC密切相关.

关键词: 二甲基亚硝胺; 肝硬化; 大鼠; 肝星状细胞; 库普弗细胞

朴金花, 金京顺, 崔京淑, 朴东明. 二甲基亚硝胺诱发大鼠肝纤维化库普弗细胞与星状细胞的分布. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2138-2141
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2138.asp

0 引言

在各种原因引起肝脏疾病时, 库普弗细胞 (Kupffer cell, KC) 可在内毒素的介导下产生多种细胞因子, 通过多种机制参于肝纤维化的调控, 其中心环节是激活肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC). 近10多年来国内外利用二甲基亚硝胺 (DMN) 研究大鼠肝纤维化的报道较多, 但有关该模型肝KC与HSC的研究报道甚少. 本实验用DMN制备大鼠肝纤维化模型, 观察KC和HSC的表达, 探讨肝纤维化形成过程中两种细胞的分布及意义.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar ♂ 大鼠32只, 清洁级, 体质量160-180 g (延边大学实验动物中心提供). 血清ALT、AST及TP检测试剂盒购自Eiken Chemical (Tokyo, Japan) 公司; DMN购自美国Sigma公司; 直接红 (Direct Red 80) 购自美国Aldrich Chem公司; 免疫组化试剂: Mous抗Rat ED1是英国Serotec公司产品, 单克隆鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 是Denmark Dako公司产品, SP试剂盒购自北京中山生物技术公司.

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 参照Matsuda *et al*^[1]的方法, 实验动物随机分为2组, 模型组 ($n = 20$): 10 g/L DMN (生理盐水稀释) 1 mL/kg连续3 d/wk, 腹腔内注射共4 wk. 正常组 ($n=12$): 注射用生理盐水1 mL/kg连续3 d/wk, 腹腔内注射共4 wk. **实验第4、7周末模型组各选10只、正常组各选6只大鼠**, 测定体质量后用乙醚麻醉, 心脏采血离心处理.

1.2.2 血清生化指标的测定 血清ALT、AST活性测定采用Reiman氏方法, TP含量采用Biuret法, 严格按Kit说明书进行操作, 利用分光光度计 (Uitraspec 4050, LKB, Switzerland) 测定吸光度, 对照标准曲线计算AST、ALT

活性和TP的含量.

1.2.3 病理学检查 肝/体质量百分比: 采血后立即取肝脏称质量, 计算肝/体质量百分比. 病理学观察: 取肝左叶组织经40 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 行HE染色光镜下观察肝组织的病理变化: 直接红染色 (1 g/L直接红苦味酸饱和液) 观察纤维组织的增生程度, 并利用彩色病理图象分析系统 (CMIAS, 北京航空航天大学) 检测胶原纤维的面密度, **观察条件: 物镜4倍, 每张切片随机选4个视野**, 图象采集、分割处理, 参数统计分析, 得出目标总面积/统计场总面积之比值. 免疫组织化学染色: 切片厚4-5 μ m, 常规脱蜡至水, 用SP法进行免疫组织化学染色, **ED1工作浓度为1:500, α -SMA工作浓度为1:50.**

统计学处理 资料采用SPSS10.0软件进行统计学分析, $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 模型制备过程第3周时模型组大鼠死亡1只, 第7周时死亡2只. 第4周模型组血清ALT和AST活性明显升高, TP含量明显下降 ($P<0.01$); 第7周模型组血清ALT及AST仍维持较高水平 ($P<0.05$), TP含量与正常组相似; 第4、7周模型组肝/体质量比明显下降 ($P<0.01$), 胶原纤维面密度明显增加 ($P<0.01$, 表1).

2.2 病理学变化 正常组肝小叶结构正常, 无变性、坏死及出血, 汇管区见少量纤维组织. 第4周模型组肝小叶结构紊乱, 肝细胞变性、灶状或片状坏死, 汇管区内大量纤维组织增生, 并形成较粗的纤维间隔深入肝组织内形成大小不等的假小叶 (7/9). 第7周肝组织病理变化较第4周略减轻, 但仍维持肝硬化的特点 (7/8). 免疫组化染色结果: 正常组ED1阳性细胞在汇管区、中央静脉周围和肝实质内少量散在分布; 在中央静脉壁有少量 α -SMA阳性表达, 汇管区各种血管壁阳性表达, 肝细胞间无阳性细胞. 模型组第4、7周肝组织内KC (ED1+) 和HSC (α -SMA+) 数量明显增多, 两种细胞分布的部位相同, 主要在增生的纤维组织及纤维间隔弥漫分布, 在肝实质内少量散在分布 (图1-2).

3 讨论

DMN是一种具有肝毒性、基因毒性和免疫毒性的化学物

表1 实验第4 wk、7 wk末各项指标的检测结果

时间	组别	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	TP (g/L)	肝/体质量比 (%)	面密度 (%)
4 wk	正常组	398.91 $\pm$ 106.35	1365.27 $\pm$ 435.09	69.67 $\pm$ 6.09	2.950 $\pm$ 0.147	1.27 $\pm$ 0.28
	模型组	1201.91 $\pm$ 215.04 ^b	5741.15 $\pm$ 1000.20 ^b	50.32 $\pm$ 9.81 ^b	2.156 $\pm$ 0.539 ^b	9.90 $\pm$ 1.93 ^b
7 wk	正常组	289.72 $\pm$ 43.01	1018.54 $\pm$ 215.04	63.56 $\pm$ 4.55	2.863 $\pm$ 0.158	1.46 $\pm$ 0.67
	模型组	745.15 $\pm$ 413.42 ^a	2355.47 $\pm$ 1418.62 ^a	63.10 $\pm$ 5.69	2.250 $\pm$ 0.638 ^b	9.20 $\pm$ 0.97 ^b

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 正常组.

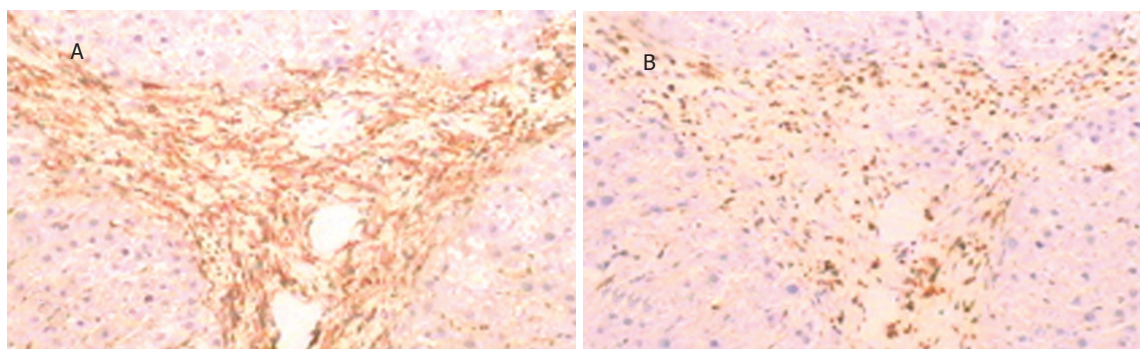


图1 第4周模型组 (×100). A: α -SMA; B: ED-1.

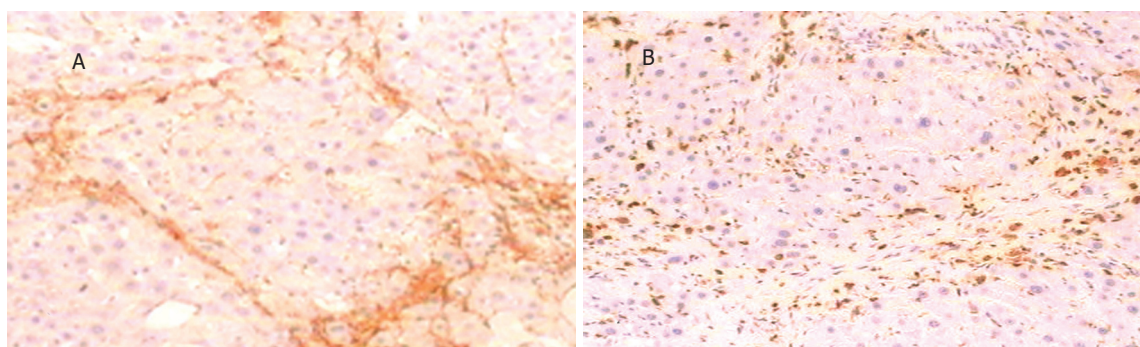


图2 第7周模型组 (×100). A: α -SMA; B: ED-1.

质, 小剂量长期给药可发生肝肿瘤, 大剂量发生肝细胞坏死和肝纤维化, 给药途径主要是腹腔内注射. 实验动物腹腔注射DMN 4 wk后形成与人酒精性肝硬化相似的病理所见. CCl_4 诱发大鼠肝纤维化的模型在停止攻击后有自然恢复的倾向, 但DMN模型有停药后仍维持肝硬化几个月的特点^[2,3].

本实验第4周模型组与正常组比较, 血清ALT、AST活性明显升高, TP含量明显下降, 表明肝功能损伤严重, 第7 wk末除TP含量无明显变化以外, ALT、AST活性仍维持较高水平, 表明肝功能损伤仍较明显, 与陈文慧 *et al*^[4]报道相似. 第4周模型组肝/体质量比明显减少, 胶原纤维面密度明显增高; 病理学观察表明肝细胞排列紊乱, 失去正常结构, 汇管区大量纤维组织增生, 并形成较粗的纤维间隔深入肝实质, 大部分形成大小不等的假小叶. 第7周模型组与第4周比较肝/体质量比稍增加, 胶原纤维面密度略减少, 肝组织病理变化略减轻, 但仍维持肝硬化的特点.

肝纤维化形成的中心通路是肝细胞损伤、坏死, 刺激和激活KC, 是启动纤维化的重要因素. KC参与肝纤维化的形成, 主要通过释放转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、血小板衍生生长因子(PDGF)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等细胞因子, 作用于HSC使其增殖和合成细胞外基质. HSC转化为成纤维样细胞或肌纤维细胞后表达 α -SMA. 正常肝组织中有两种KC, 第一种是小的、ED1阳性而ED2阴性的细胞, 主要位于门脉血管和中央静脉周围; 第二种是大的、ED1和ED2均阳性, 沿着血窦分布的细胞称为肝组织

巨噬细胞^[5]. 单克隆抗体ED1可识别全部单核巨噬细胞系统的细胞, 包括几乎全部肝KC. Orfila *et al*^[6]用 CCl_4 诱发大鼠肝纤维化, 9 wk后ED1阳性细胞明显增加, 主要位于纤维间隔; Bhunchet *et al*^[7]用猪血清诱发大鼠肝纤维化, ED1阳性细胞在新、旧纤维间隔和肝被膜纤维变性部位显著聚集; Hori *et al*^[8]用硫代乙酰胺诱发大鼠肝纤维化, 6 wk后ED1阳性细胞数量明显增加, 位于纤维间隔部位. Baba *et al*^[9]用猪血清诱发3种不同种系大鼠(BN、SD及Wistar)肝纤维化, 8 wk后3种大鼠都形成很多小的假小叶, 免疫组化染色表明CD3、ED1及 α -SMA阳性细胞数量增加. Jeong *et al*^[10]用 CCl_4 诱发大鼠肝纤维化, 免疫组化染色发现肝纤维化发展时肝巨噬细胞和肌纤维母细胞的数量增加, 而发生肝硬化后减少. 最近国内应用巨噬细胞标志物CD68, 采用免疫组化SP法观察肝癌及肝硬化组织中巨噬细胞的数量和分布的报道^[11-12]. 范建高 *et al*^[13]采用免疫组化二步法观察了大鼠非酒精性脂肪性肝炎组织中的KC, 结果模型组KC数显著增加, 但利用DMN制备肝纤维化动物模型观察肝KC和HSC的研究尚未见报道. 本组结果表明模型组第4、7周KC和HSC分布的部位相同, 均在增生的纤维组织及纤维间隔弥漫分布, 与国外报道的其他肝纤维化模型中的分布相似, 表明在DMN诱发大鼠肝纤维化的发生中KC与HSC关系密切, 深入研究KC在肝纤维化发生、发展中的作用机制, 明确其在肝纤维化中的作用才有可能解决肝纤维化的治疗问题, 与KC有关的抗肝纤维化的治疗已有研究报道^[14], 最近Imamura *et al*^[15]认为阻断巨噬细胞

浸润,抑制HSC激活,可制止肝纤维化的发生.

4 参考文献

- 1 Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, Ichida T, Asakura H, Komoriya Y, Nishiyama E, Nakamura T. Preventive and Therapeutic Effects in Rats of Hepatocyte Growth Factor Infusion on Liver Fibrosis/ Cirrhosis. *Hepatology* 1997;26:81-89
- 2 徐光福, 张凤朝. DMN诱发大鼠肝硬化模型MMP-2活性的动态变化. *世界华人消化杂志* 2005;13:902-905
- 3 Tsukamoto H, Matsuoka M, French S. Experimental Models of Hepatic Fibrosis: A Review. *Seminars in Liver Dis* 1990;10:56-65
- 4 陈文慧, 刘平, 徐光福等. 脂质过氧化在二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化形成过程中的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:645-648
- 5 Armbrust T, Ramadori G. Functional characterization of two different Kupffer cell populations of normal rat liver. *J of Hepatol* 1996;25:518-528
- 6 Orfila C, Lepert JC, Alric L, et al. Expression of THF-alpha and immuno-histochemical distribution of hepatic macrophage surface markers in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rat. *Histochem J* 1999;31:677-85
- 7 Bhunchet E, Eishi Y, Wake K. Contribution of immune response to the hepatic fibrosis induced by porcine serum. *Hepatology* 1996;23:811-817
- 8 Hori Y, Sato S, Yamate J, Kurasaki M, Nishihira J, Hosokawa T, Fujita H, Saito T. immunohistochemical study of macrophage migration inhibitory factor in rat liver fibrosis induced by thioacetamide. *Eur J Histochem* 2003;47:317-324
- 9 Baba Y, Uetaska K, Nakayama H, Dot K. Rat strain differences in the early stage of porcine-serum-induced hepatic fibrosis. *Exp Toxicol Pathol* 2004;55:325-330
- 10 Jeong WI, Lee CS, Park SJ, et al. Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res* 2002;22:869-877
- 11 Liu K, He X, Lei XZ, Zhao LS, Tang H, Liu L, Lei BJ. Pathomorphological study on location and distribution of Kupffer cells in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1946-1949
- 12 陈罡, 罗殿中, 郭芳, 李萍. 肝癌及肝硬化组织中巨噬细胞和NK细胞的研究. *现代肿瘤医学* 2005;13:307-310
- 13 范建高, 钟岚, 王国良, 巫协宁, 李明升, 靖大道, 张丕利. 枯否氏细胞在大鼠非酒精性脂肪性肝炎发病中的作用. *中华肝脏病杂志* 2001;9:16-18
- 14 周馨, 李宣海, 李定国. 库普弗细胞与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2002;10:65-68
- 15 Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, et al. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* 2005;128:138-146

编辑 王谨辉 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

胃癌组织环氧合酶-2表达与幽门螺杆菌cagA⁺菌株感染

张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 王钊, 陈虹彬

张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 王钊, 陈虹彬, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083

通讯作者: 张勇, 610083, 四川省成都市天回镇, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科. zhangyol967@163.com

电话: 028-86570349

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-07-28

General Hospital of Chengdu Military Command of Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China.

Correspondence to: Yong Zhang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. zhangyol967@163.com

Received: 2005-07-19 Accepted: 2005-07-28

Relationship between expression of cyclooxygenase-2 and cagA⁺ *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinoma

Yong Zhang, Ming-De Jiang, Wei-Zheng Zeng, Hui Xu, Zhao Wang, Hong-Bin Chen

Yong Zhang, Ming-De Jiang, Wei-Zheng Zeng, Hui Xu, Zhao Wang, Hong-Bin Chen, Department of Gastroenterology,

Abstract

AIM: To explore the relations of cagA⁺ *Helicobacter pylori* infection with the expression of cyclooxygenase-2 (COX2) in human gastric carcinogenesis.

METHODS: In situ polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the expression of *H. pylori* cagA gene, and immunohistochemical technique was used to detect the expression of COX2 in 56 patients with gastric carcinoma.

RESULTS: The rates of *cagA*⁺ *H. pylori* infection and COX2 expression were 55.4% and 71.4%, respectively, in gastric carcinoma. The level of COX2 expression was significantly higher in the gastric carcinoma of III-IV stage than I-II stage (14/30 vs 5/26, $P < 0.05$), and was also higher in gastric carcinoma with lymph node metastasis than that without lymph node metastasis (4/19 vs 15/37, $P < 0.01$). *CagA*⁺ *H. pylori* infection was not correlated with TNM stage and lymph node metastasis in gastric carcinoma ($P > 0.05$). The level of COX2 expression was significantly higher in *cagA*⁺ *H. pylori* group than that in *cagA*⁻ *H. pylori* group (15/31 vs 4/25, $P < 0.05$).

CONCLUSION: *CagA*⁺ *H. pylori* infection is not related with the malignant progression of gastric carcinoma, but COX2 expression is involved in the carcinogenesis and malignant progression of gastric carcinoma. *CagA*⁺ *H. pylori* infection up-regulates the expression of COX2 in gastric cancer.

Key Words: *CagA*⁺ *H. pylori*; Cyclooxygenase-2; *In situ* polymerase chain reaction; Immunohistochemical technique

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Wang Z, Chen HB. Relationship between expression of cyclooxygenase-2 and *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13 (17):2141-2144

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)*cagA*菌株感染及环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX2) 表达在胃癌发生中的作用及两者的关系。

方法: 采用原位聚合酶链反应(PCR)技术及免疫组织化学技术检测56例胃癌手术标本*cagA*基因及COX2蛋白表达情况。

结果: 胃癌组织*H. pylori cagA*菌株感染率为55.4%, COX2在胃癌组织中表达率为71.4%。COX2表达水平在Ⅲ-Ⅳ期胃癌组显著高于Ⅰ-Ⅱ期胃癌组(14/30 vs 5/26, $P < 0.05$); 有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组(4/19 vs 15/37, $P < 0.01$); *H. pylori cagA*菌株感染与TNM分期及淋巴结转移无关($P > 0.05$)。COX2表达水平在*H. pylori cagA*阳性组显著高于*H. pylori cagA*阴性组(15/31 vs 4/25, $P < 0.05$)。

结论: *H. pylori cagA*菌株感染与胃癌的恶性进展无关; COX2的表达参与胃癌的发生及恶性进展。 *H. pylori cagA*菌株感染能上调胃癌组织COX2的表达。

关键词: *CagA*⁺ *H. pylori*感染; 环氧合酶-2; 原位聚合酶链反应; 免疫组织化学

张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 王钊, 陈虹彬. 胃癌组织环氧合酶-2表达与幽门螺杆菌*cagA*⁺菌株感染. *世界华人消化杂志* 2005;13(17):2141-2144
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2141.asp>

0 引言

在胃癌发生的诸多因素中, 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)被世界卫生组织国际癌症研究机构列为一类致癌因子。而含*cagA*基因的*H. pylori*菌株为高毒菌株, 与胃癌的关系可能更为密切^[1], 但其确切的致癌机制仍不清楚。环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX2)是与肿瘤发生密切相关的前列腺素合成酶之一, 许多类型的炎症细胞因子、各种促癌因素等均可诱导体内组织产生COX2。*H. pylori cagA*菌株能引起胃黏膜的炎症反应, 其能否诱导COX2的表达及两者在胃癌发生、发展中的关系值得探讨。我们采用原位聚合酶链反应(PCR)及免疫组织化学技术检测胃癌组织中*H. pylori cagA*基因及COX2表达情况, 探讨*H. pylori cagA*菌株感染、COX2表达在胃癌发生中的作用及其相互关系, 为胃癌的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选择我院1998年以来手术切除胃癌胃组织标本56例。诊断均经病理检查证实。其中男31例, 女25例, 年龄32-69岁, 平均50.8岁。有淋巴结转移37例, 无淋巴结转移19例。TNM分期: 参照1978年制定的我国胃癌TNM分期法, I期 11例, II期15例, III期 17例, IV期13例。

1.2 方法

1.2.1 原位PCR扩增检测*cagA*基因感染率 *H. pylori cagA*基因引物序列由中国军事医学科学院二所合成。引物序列: 引物1: 5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3'; 引物2: 5'-TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT-3'。常规石蜡切片, 二甲苯脱蜡、梯度酒精水化, 0.2 mmol/L HCl酸化, 1 mg/L蛋白酶K消化, RNA酶消化, 40 g/L多聚甲醛固定; PCR扩增: 在10 μL/张切片的反应液中, 含4 mmol/L MgCl₂、400 μmol/L dNTPs (其中1/4 dUTP由Bio-11-dUTP取代)、1 U Taq酶、*cagA*基因引物各2 mg/L, 加盖硅化玻片, 指甲油密封, 热循环条件: 94℃ 预变性5 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 10 min延伸。检测: 30 g/L BSA封闭1 h, AV-AP 37℃ 30 min, BCIP和NBT显色, 核固红复染, 紫蓝色颗粒为阳性。分别以无Bio-11-dUTP, 无Taq酶及无引物条件下作为阴性对照。

1.2.2 免疫组织化学检测环氧合酶蛋白表达 常规石蜡切片; 10 mL/L H₂O₂甲醇孵育15 min, 山羊血清封闭15 min; 滴加1:50稀释的COX2一抗, 37℃孵育2 h, 滴加生物素化二抗(1:200), 37℃ 30 min; 滴加辣根过氧

化物酶标记的卵白素, 37℃ 30 min; DAB显色; 苏木素复染; 脱水透明、中性树脂封片. 同时用PBS代替一抗作为空白对照, 以已知阳性反应的大肠癌组织作阳性对照. 光镜下($\times 400$)随机选取10个视野, 每个视野计数100个细胞, 取其均值, 无表达或阳性细胞数5%为表达阴性(-), <30%为弱阳性(+), 30-50%为阳性(++), >50%为强阳性(+++).

统计学处理 各组*H. pylori* cagA感染率用百分数表示, 进行 χ^2 检验, COX2用等级资料表示, 进行秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有显著意义.

2 结果

2.1 胃癌组织*H. pylori* cagA基因、COX2表达及其临床病理特征 *H. pylori* cagA基因在胃癌组织中表达率为55.4%, COX2在胃癌组织中表达率为71.4%. COX2表达水平在III-IV期胃癌组显著高于I-II期胃癌组($P < 0.05$); 有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组($P < 0.01$), 提示COX2表达水平与TNM分期及淋巴结转移有关. *H. pylori* cagA基因表达水平与TNM分期及淋巴结转移无关($P > 0.05$) (表1).

表1 COX2表达及幽门螺杆菌感染与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征		<i>n</i>	COX2				cagA	
			-	+	++	+++	-	+
TNM分期	I-II期	26	10	5	6	5	11	15
	III-IV期	30	6	1	9	14 ^a	14	16
淋巴结转移	有	37	7	5	10	15	19	18
	无	19	9	1	5	4 ^b	6	13

^a $P < 0.05$ vs TNM I-II期; ^b $P < 0.01$ vs 淋巴结转移组.

cagA基因阳性信号为紫蓝色颗粒, cagA基因分布于癌组织及癌旁组织胞浆、胃腺腔、黏膜上皮细胞表面(图1), 且以癌旁组织表达为主. COX2阳性信号为棕黄色颗粒, 主要表达于肿瘤细胞胞浆及核膜, 间质细胞少量表达(图2).

2.2 胃癌组织COX2表达与*H. pylori* cagA表达的关系 COX2表达水平在*H. pylori* cagA阳性组显著高于*H. pylori* cagA 阴性组($P < 0.05$, 表2).

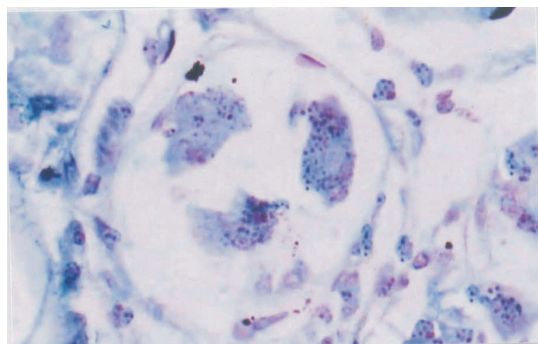


图1 胃癌组织cagA基因表达(原位PCR法, $\times 400$).

表2 胃癌组织COX2表达与*H. pylori* cagA表达的关系

分组	<i>n</i>	COX2			
		-	+	++	+++
cagA ⁺	31	6	2	8	15
cagA ⁻	25	10	4	7	4 ^b

^b $P < 0.01$ vs cagA⁺组.

3 讨论

流行病学资料提示长期*H. pylori*感染可导致胃黏膜萎缩、肠上皮化生及异型增生, 最终形成胃癌^[2]. cagA基因株为高毒菌株, 与胃癌及癌前疾病关系更为密切^[3,4]. Kuiper *et al*^[5]发现血清cagA抗体阳性患者萎缩性胃炎发生率为62.0%, 阴性组为32.0%, 差异显著. Parsonnet *et al*^[6]通过对14 a前库存血液作*H. pylori* cagA抗体的检测及随访, 发现cagA阳性感染者与*H. pylori*阴性者相比, 发生胃癌的危险性明显增高(OR值约为2.2). 我们在以往的研究^[7]显示cagA基因在癌前病变中有较高的表达率, 且能引起胃黏膜更为明显的炎症反应, 导致胃黏膜上皮细胞的损伤. 提示cagA菌株感染是胃癌发生的一个早期事件. 其引起胃癌发生的机制尚不清楚, 可能与以下因素有关: cagA菌株感染后胃黏膜壁细胞损害, 导致胃酸分泌减少, 胃内细菌过度生长, 促使硝酸盐降解为亚硝酸盐和亚硝胺等致癌物^[1]; 激活炎症反应中多种细胞因子、自由基和一氧化氮(NO)的释放, 导致DNA损伤及刺激细胞增生; cagA蛋白可能促进细胞凋亡抑制基因Bcl-2表达, 诱导抑癌基因p53突变, 从而使细胞增生和凋亡失平衡, 最终导致胃癌的发生^[8]. 其与进展期胃癌的关系如何? 该研究结果提示cagA基因在III-IV期、I-II期胃癌组中均表达; 有、无淋巴结转移组无显著差异, 且cagA基因在胃癌组织中的表达以癌旁组织为主, 推测随着疾病由慢性胃炎→萎缩→肠化→异型增生→胃癌的发展, *H. pylori*生存的局部环境发生变化, 不利于细菌生长, 使*H. pylori*难以定植, 或导致*H. pylori*死亡, *H. pylori*的致病作用逐渐减小, 故*H. pylori* cagA菌株感染与胃癌的恶性进展无关.

许多研究显示COX2在胃癌前病变及胃癌组织中表达增加. Lim *et al*^[9]检测胃癌组织标本104例, 发现70.2%

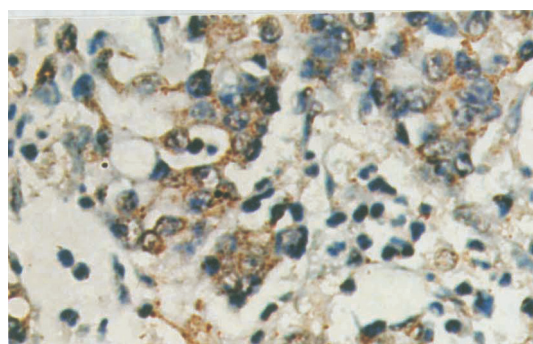


图2 胃癌组织COX2蛋白表达(SP法, $\times 400$).

的病例有COX2蛋白的高表达,而正常黏膜没有COX2蛋白表达.汪步海 *et al*^[10]对内镜诊断并手术证实的36例 *H. pylori*阳性胃癌患者的癌组织及其邻近组织标本中COX2的表达状况进行了回顾性分析,免疫组化染色显示,COX2蛋白在肠上皮化生、异型增生和胃癌中阳性率分别为72.2% (13/18)、77.8% (14/18)和83.3% (15/18),三组间无显著性差异.但也有研究^[11]认为,随着癌前病变的进展COX2蛋白表达递增.说明COX2的过表达是胃癌发生的早期事件,其与胃癌的恶性进展关系如何?该研究结论显示COX2在胃癌组织中表达率为71.4%,且COX2表达水平在III-IV期胃癌组显著高于I-II期胃癌组($P<0.05$)、有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组($P<0.01$),提示COX2表达水平与TNM分期及淋巴结转移相关.说明COX2不仅与早期胃癌的发生有关,同时与胃癌的恶性进展密切相关,在胃癌的发生、发展中起着重要的作用.其机制可能经多种途径^[12, 13]如促进细胞增生、抑制细胞凋亡、调节肿瘤新生血管形成和增加癌细胞的侵袭性等而发挥致癌和促癌作用.

cagA菌株感染及COX2表达两者在胃癌变中的作用是两个独立的因素或是相互关联尚不清楚.近来体外研究^[14]显示 *H. pylori*能诱导胃黏膜细胞株COX2的表达.国内陆红 *et al*^[15]研究显示 *H. pylori*感染可使慢性胃炎患者胃黏膜COX2表达增加,根除 *H. pylori*后其COX2表达水平下降. *H. pylori*的高毒菌株-cagA阳性菌株感染与胃癌中COX2的表达关系如何值得探讨.我们的结果显示COX2表达在cagA阳性组明显高于cagA阴性组,提示胃癌组织中cagA菌株感染能上调COX2的表达.cagA菌株感染可通过介导COX2的表达在胃癌的发生中起重要作用.cagA菌株诱导COX2表达可能与其引起胃黏膜炎性反应、上皮细胞损伤、刺激生长因子及炎症介质的释放有关.本组资料显示cagA阴性的胃癌组织中仍有COX2表达,提示除 *H. pylori* cagA菌株感染之外尚有其他因素及机制参与调节COX2的表达.因此根除 *H. pylori*和COX2抑制剂是预防和控制胃癌发生的重要途径.

4 参考文献

- 1 Farinati F, Cardin R, Russo VM, Busatto G, Franco M, Rugge M. *Helicobacter pylori* CagA status, mucosal oxidative damage and gastritis phenotype: a potential pathway to cancer? *Helicobacter* 2003;8:227-234
- 2 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
- 3 张沥, 张玲霞, 张宁霞, 刘永国, 阎小君, 韩锋产, 侯瑜. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A与胃癌关系的病例对照研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:593-595
- 4 卢启明, 张丽萍, 姜瑞, 张岫兰, 李淑兰, 曹萍, 石丽清, 陈翔, 薛群基. 胃癌高发区人群CagA⁺幽门螺杆菌与胃黏膜病变的关系. *世界华人消化杂志* 2005;13:408-410
- 5 Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1777-1780
- 6 Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997;40:297-301
- 7 张勇, 曾维政, 蒋明德, 陈晓斌, 徐辉, 陈虹彬. 胃癌组织中 *H. pylori* cagA基因表达. *第四军医大学学报* 2002;23:451-454
- 8 杜雅菊, 赵晶, 赵瑞波, 李宝杰. 幽门螺杆菌CagA蛋白与胃癌组织中Bcl-2、p53蛋白表达的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:554-557
- 9 Lim HY, Joo HJ, Choi JH, Yi JW, Yang MS, Cho DY, Kim HS, Nam DK, Lee KB, Kim HC. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:519-525
- 10 汪步海, 汪竹, 童建东, 钱伟, 侯晓华. 环氧化酶-2蛋白在胃癌患者肠上皮化生、异型增生及癌灶中的表达. *中华消化内镜杂志* 2003;20:179-181
- 11 孙为豪, 俞谦, 曹大中, 欧希龙, 俞婷, 钱斌, 朱峰, 孙运良. 幽门螺杆菌感染和环氧合酶-2表达在胃癌发生中的作用. *肿瘤* 2004;24:38-41
- 12 朱瑞平, 邓长生, 朱尤庆, 黄俊军. 环氧合酶-2调控血管内皮生长因子表达的研究. *中华消化杂志* 2003;23:470-472
- 13 Kim JM, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. Upregulated cyclooxygenase-2 inhibits apoptosis of human gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 2000;45:2436-2443
- 14 Smith GV, Farthing MJ. The effect of ascorbic acid on *Helicobacter pylori* induced cyclooxygenase 2 expression and prostaglandin E2 production by gastric epithelial cells *in vitro*. *Helicobacter* 2005;10:83-89
- 15 陆红, 陈晓宇, 刘文忠, 彭延申, 萧树东. 幽门螺杆菌感染对胃黏膜环氧合酶-2表达的影响. *中华消化杂志* 2001;21:287-289

编辑 王谨辉 审读 张海宁

三种H₂受体拮抗剂诱导鼠胃壁细胞H₂受体脱敏的比较

李玲, 罗和生, 刘艳

李玲, 罗和生, 刘艳, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

通讯作者: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市解放路238号, 武汉大学人民医院消化内科. luotang@public.wh.hb.cn

电话: 027-88041919

收稿日期: 2005-06-30 接受日期: 2005-07-15

Differences among desensitization of histamine H₂ receptor induced by three H₂ receptor antagonists on rat gastric parietal cells

Ling Li, He-Sheng Luo, Yan Liu

Ling Li, He-Sheng Luo, Yan Liu, Department of Gastroenterology, Renmin hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, 238 Jiefang road, Wuhan 430060, Hubei Province, China. luotang@public.wh.hb.cn

Received: 2005-06-30 Accepted: 2005-07-15

Abstract

AIM: To investigate the differences of the desensitization of the histamine H₂ receptor induced by three H₂ receptor antagonists on the gastric parietal cells in rats.

METHODS: The gastric parietal cells were isolated by pronase digestion and then divided into three groups: cimetidine, ranitidine and famotidine treatment group. The activity of the H⁺-K⁺-ATPase was detected by H⁺-K⁺-ATPase kit after the cells were treated with different concentrations of the antagonists for different times.

RESULTS: Significant changes of the H⁺-K⁺-ATPase activity were observed after the cells were treated with different concentrations of the antagonists at different times. The activities of H⁺-K⁺-ATPase were significantly higher in famotidine group at 1, 2, and 4 h (589.34±2.7, 812.82±8.35, 637.15±4.59) than those in ranitidine (169.38±93.64, 343.46±44.88, 234.07±4.72) and cimetidine (118.42±5.91, 110.62±1.28, 102.43±3.44) group ($P < 0.01$). The activity in ranitidine group was markedly higher than that in cimetidine group at 2 and 4 h. Famotidine increased the activities of H⁺-K⁺-ATPase significantly at the concentrations of 10 and 100 mg/L (178.21±20.38, 225.65±16.41) as compared with ranitidine and cimetidine did (70.88±21.44,

128.03±8.22; 123.62±4.32, 125.40±7.45) ($P < 0.01$).

At the concentration of 1000 mg/L, both famotidine and ranitidine increased the activity of H⁺-K⁺-ATPase obviously as compared with cimetidine did (233.44±6.24, 131.58±11.50 vs 109.88±0.69, $P < 0.01$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Three H₂ receptor antagonists can induce different desensitization of the H₂ receptor, among which famotidine induces the strongest and cimetidine does the weakest.

Key Words: Desensitization; H₂ receptor; H₂ receptor antagonist; H⁺-K⁺-ATPase

Li L, Luo HS, Liu Y. Differences among desensitization of histamine H₂ receptor induced by three H₂ receptor antagonists on rat gastric parietal cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2145-2147

摘要

目的: 研究3种H₂受体拮抗剂对鼠胃粘膜壁细胞H₂受体脱敏的诱导能力。

方法: 用酶消化法分离壁细胞后分为西咪替丁, 雷尼替丁和法莫替丁3组, 检测不同时间、不同浓度的H₂受体拮抗剂对各组壁细胞H⁺-K⁺-ATP酶活力的影响。

结果: 不同时间、不同药物浓度干预后, 各组细胞酶活力均发生显著变化。法莫替丁组细胞酶活力在1、2、4 h时(589.34±2.7, 812.82±8.35, 637.15±4.59)均明显高于雷尼替丁组(169.38±93.64, 343.46±44.88, 234.07±4.72)和西咪替丁组(118.42±5.91, 110.62±1.28, 102.43±3.44), $P < 0.01$), 而雷尼替丁组在2、4 h时才与西咪替丁组有显著性差异($P < 0.01$)。在10、100 mg/L条件下, 法莫替丁组细胞酶活力(178.21±20.38, 225.65±16.41)均明显高于雷尼替丁组(70.88±21.44, 128.03±8.22)和西咪替丁组(123.62±4.32, 125.40±7.45, $P < 0.01$), 当浓度增高至1000 mg/L法莫替丁、雷尼替丁组均明显高于西咪替丁组(233.44±6.24, 131.58±11.50 vs 109.88±0.69, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。

结论: 三种H₂受体拮抗剂对壁细胞H₂受体脱敏的诱导能力存在一定的差别, 其中法莫替丁最强, 西咪替丁最弱。

关键词: 脱敏; H₂受体; H₂受体拮抗剂; H⁺-K⁺-ATP酶

李玲, 罗和生, 刘艳. 三种H₂受体拮抗剂诱导鼠胃壁细胞H₂受体脱敏的比较. *世界华人消化杂志* 2005;13(17):2145-2147

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2145.asp>

0 引言

受体脱敏^[1] (desensitization) 是指使用受体激动剂后, 细胞或组织对激动剂的敏感性下降, 可能是机体的一种自我保护机制. 组胺H₂受体是G蛋白耦联受体家族中的一员, 该家族大多存在脱敏现象. H₂受体在体内分布广泛, 虽有多项研究显示多种细胞均存在H₂受体脱敏现象, 但大多集中在人白血病HL-60细胞和U937细胞上^[2-5], 利用脱敏和耐受进行检索, 目前尚未看到关于胃壁细胞H₂受体的相关研究. 我们针对三种H₂受体拮抗剂对壁细胞H₂受体脱敏的作用进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级♂健康SD大鼠4只, 体质量150-200 g, 由武汉大学医学院实验动物中心提供. 链霉菌蛋白酶 (pronase), Roche公司; Percoll, Pharmacia公司; EDTA、DTT、HEPES及BSA, Amresco公司; Ham's F12/DMEM, Gibco公司; FBS, Hyclone合资公司; 西咪替丁、雷尼替丁和法莫替丁均为市售针剂; H⁺-K⁺-ATP酶试剂盒, 南京建成生物工程研究所. 缓冲液: A₁液: NaH₂PO₄ 0.5 mmol/L, Na₂HPO₄ 1.0 mmol/L, NaHCO₃ 20 mmol/L, NaCl 80 mmol/L, KCl 5.0 mmol/L, HEPES 50 mmol/L, glucose 11 mmol/L, BSA 10 g/L, EDTA 2.0 mmol/L, 调节pH值7.4. A₂液: A₁液中去掉EDTA, 加入CaCl₂ 1.0 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 调节pH值7.4. A₃液: A₁液中去掉EDTA、BSA, 加入CaCl₂ 1.0 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, DTT 1.0 mmol/L, 调节pH值7.4. 消化液: pronase溶于A₁液中, 1 g/L. Percoll: 用A₃液配成40%和60%. 细胞培养液: Ham's F12/DMEM, 调节pH值在7.1-7.3, 过滤除菌后分装备用. 细胞干预液: 用细胞培养液分别配制10, 100, 1000 mg/L西咪替丁, 雷尼替丁和法莫替丁, 调节pH值7.4后过滤初菌.

1.2 方法 将大鼠处死后剖腹取胃, 放入生理盐水中, 在胃底作一小切口, 用玻璃棒将胃翻转并用生理盐水清洗, 然后在幽门部结扎制成胃囊, 注入消化酶并放入A₁液中, 置于37℃消化90 min. 将胃囊放入A₂液中, 用磁力搅拌器搅拌60 min, 收集细胞后离心. 沉淀用A₃液洗涤后制成细胞悬液, 与Percoll按密度顺序置于离心管中, 离心20 min后收集壁细胞. 用含有FBS100 mL/L的细

胞培养液制成细胞悬液并接种到培养瓶中, 时差贴壁培养30 min后取出细胞并离心, 再用无血清的细胞培养液重新制成细胞悬液, 接种到培养瓶中^[6,7]. 实验分为两部分. (1) 时间对壁细胞H₂受体脱敏的影响: 调节细胞浓度为1×10⁹/L并分为西咪替丁、雷尼替丁和法莫替丁3组, 先用100 mg/L干预液孵育细胞, 各组孵育时间均分为0, 1, 2和4 h, 孵育结束后用A₃液洗涤细胞, 再加入100 mg/L干预液, 1 h后测定细胞酶活力; (2) 浓度对壁细胞H₂受体脱敏的影响: 分组方法同前, 先用干预液孵育细胞2 h, 各组干预液浓度均分为0, 10, 100和1000 mg/L四种, 然后用A₃液洗涤细胞, 再加入100 mg/L干预液, 2 h后测定细胞酶活力. 按照H⁺-K⁺-ATP酶试剂盒使用说明, 测定各组细胞的吸光度并计算H⁺-K⁺-ATP酶活力, 以每小时每毫克组织蛋白的ATP酶分解ATP产生1 μmol无机磷的量为一个ATP酶活力单位 [μmol Pi/(mg prot·hour)].

统计学处理 采用SPSS 12.0统计软件进行统计学分析, 数据用mean±SD表示, 组间差异和两两比较分别用F检验和LSD, SNK检验.

2 结果

2.1 时间对壁细胞H₂受体脱敏的影响(表1) 经过不同时间干预后, 各组细胞酶活力均发生显著变化, 在3种干预时间下, 法莫替丁组细胞酶活力均明显高于雷尼替丁组和西咪替丁组, 雷尼替丁组则在干预时间延长至2 h或4 h时才与西咪替丁组有显著性差异. 表明3种H₂受体拮抗剂在相同干预时间下对壁细胞H₂受体脱敏的诱导能力不同, 导致干预后3者的抑酸作用出现不同程度的减弱, 其中法莫替丁的诱导能力最强, 因此干预后抑酸作用最弱, 其次为雷尼替丁, 西咪替丁则最弱.

2.2 浓度对壁细胞H₂受体脱敏的影响(表2) 经过不同浓度干预后, 各组细胞酶活力均发生显著变化, 在10, 100 mg/L条件下, 法莫替丁组细胞酶活力均明显高于雷尼替丁组和西咪替丁组, 当浓度增高至1000 mg/L雷尼替丁组、法莫替丁组均明显高于西咪替丁组. 表明3种H₂受体拮抗剂在相同干预浓度下对壁细胞H₂受体脱敏的诱导能力不同, 导致干预后3者的抑酸作用出现不同程度的减弱, 其中法莫替丁的诱导能力最强, 并随浓度增加而增强, 雷尼替丁与西咪替丁则相对较弱.

表1 壁细胞H₂受体经H₂受体拮抗剂干预后H⁺-K⁺-ATP酶的活力 (mean±SD)

药物	0 h	1 h	2 h	4 h
西咪替丁	4.18±0.32	118.42±5.91	110.62±1.28	102.43±3.44
雷尼替丁	1.42±0.42	169.38±93.64	343.46±44.88 ^b	234.07±4.72 ^b
法莫替丁	0.63±0.02	589.34±2.70 ^{bd}	812.82±8.35 ^{bd}	637.15±4.59 ^{bd}
F	—	68.22	522.18	12685.50

^bP<0.01 vs 西咪替丁组; ^dP<0.01 vs 雷尼替丁组; 0 h为实测值. [μmol Pi/(mg prot·hour)], 余组 = (各组酶活力实测值/0 h组实测值均值) × 100%.

表2 壁细胞H₂受体经H₂受体拮抗剂干预2 h后H⁺-K⁺-ATP酶的活力 (mean±SD)

药物	0 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1000 mg/L
西咪替丁	3.69±0.15	123.62±4.32	125.40±7.45	109.88±0.69
雷尼替丁	3.27±0.19	70.88±21.44 ^a	128.03±8.22	131.58±11.50 ^a
法莫替丁	1.92±0.14	178.21±20.38 ^{bd}	225.65±16.41 ^{bd}	233.44±6.24 ^{bd}
F	—	29.00	74.87	228.35

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 西咪替丁组; ^dP<0.01 vs 雷尼替丁组; 0 mg/L为实测值. 余组 = (各组酶活力实测值/0 mg/L组实测值均值) × 100%.

3 讨论

胃壁细胞上的H₂受体活化后,通过胞内第二信使活化壁细胞H⁺-K⁺-ATP酶,分泌胃酸.西咪替丁、雷尼替丁和法莫替丁等H₂受体拮抗剂能够诱导胃壁细胞H₂受体出现脱敏现象.在相同干预条件下,各组细胞酶活力变化(百分比)均呈上升趋势,但上升幅度各不相同,其中法莫替丁组最高,其次为雷尼替丁组,西咪替丁组则相对较低,说明法莫替丁对脱敏的诱导能力最强,导致干预后细胞对其敏感性最低,再次加入法莫替丁作用于细胞时,其抑酸效果显著降低,壁细胞H⁺-K⁺-ATP酶活力明显上升,雷尼替丁的诱导能力次之,西咪替丁则最弱.

自H₂受体拮抗剂问世以来,人们对三代药物的抑酸作用进行了许多比较,发现西咪替丁起效较快,而法莫替丁的抑酸强度及维持时间较长,雷尼替丁则居中^[8-10].结合本次研究结果对三种H₂受体拮抗剂的抑酸作用和脱敏能力进行排序,均为法莫替丁>雷尼替丁>西咪替丁,可能与药物的结构、理化性质有关.三种H₂受体拮抗剂均是对组胺的咪唑环或者侧链进行某种程度的改造而诞生的,西咪替丁的结构主要为咪唑环以及侧链的氰基胍,雷尼替丁主要为呋喃环和侧链的硝基烯炔基团,法莫替丁则主要为噻唑环和侧链的硫酰胺乙炔基团.其中碱性芳杂环结构是H₂受体与配体结合的关键,且碱性越强,药物作用越强.H₂受体第3、第5跨膜区各有一个天冬氨酸残基,其酸性较强,且在H₂受体与配体结合中具有关键作用.基于结构决定功能的原理假设:咪唑环、呋喃环和噻唑环,一方面可能与天冬氨酸发生某种反应,引导受体与配体结合,发挥抑酸作用;另一方面则可能导致天冬氨酸变性,干预后再次加入H₂受体拮抗剂时,天冬氨酸尚未复性,受配体无法结合,细胞即出现脱敏,而且本次研究中法莫替丁组胃壁细胞H₂受体脱敏更明显,雷尼替丁组则在干预条件增加至一定程度时才与西咪替丁组存在显著性差异,可能是由于咪唑环、呋喃环和噻唑环的碱性呈递增趋势,引起天冬氨酸变性程度及复性难易程度也呈递增趋势所致.

目前虽有关于H₂受体拮抗剂耐受的报道,但机制不

明,可能与H₂受体脱敏有关^[11,12].但是药物在体内代谢过程十分复杂,除了受药物本身结构及理化性质的影响外,还与肝细胞色素P450酶系统有关,西咪替丁能够抑制该系统,雷尼替丁对其影响较小,法莫替丁则对其无影响.

4 参考文献

- 1 戴体俊.受体研究的若干进展.国外医学·麻醉学与复苏分册 2001;22:272-273
- 2 Shayo C, Legnazzi BL, Monczor F, Fernandez N, Riveiro ME, Baldi A, Davio C. The time-course of cyclic AMP signaling is critical for leukemia U-937 cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:798-804
- 3 Legnazzi BL, Shayo C, Monczor F, Martin ME, Fernandez N, Brodsky A, Baldi A, Davio C. Rapid desensitization and slow recovery of the cyclic AMP response mediated by histamine H₂ receptors in the U937 cell line. *Biochem Pharmacol* 2000;60:159-166
- 4 Smit MJ, Leurs R, Shukrula SR, Bast A, Timmerman H. Rapid desensitization of the histamine H₂ receptor on the human monocytic cell line U937. *Eur J Pharmacol* 1994;288:17-25
- 5 Brodsky A, Davio C, Shayo C, Legnazzi BL, Barbosa M, Lardo M, Morelli A, Baldi A, Avalos JCS, Rivera E. Forskolin induces U937 cell line differentiation as a result of a sustained cAMP elevation. *Eur J Pharmacol* 1998;350:121-127
- 6 乔伟丽,张咏梅,阎长栋,王琳.改良的大鼠胃黏膜壁细胞分离方法.徐州医学院学报 2004;24:242-243
- 7 陈蕾,黄威权,孙绪德,吕宝真,蒲若蕾.大鼠胃壁细胞的分离及培养.第四军医大学学报 2002;23:769-771
- 8 Katsu K, Yabe S. Comparison of gastric mucosal surface pH response times after intravenous administration of histamine₂-receptor antagonists. *Clinical Therapeutics* 1995;17:433-440
- 9 Chassany O, Bergmann JF, Simoneau G, Blanc LE, Segrestaa JM, Caulin C. The comparative effects of single intravenous doses of cimetidine, ranitidine, famotidine, and omeprazole on intragastric pH. *Current Therapeutic Research* 1996;57:159-167
- 10 Olsen KM, Hiller FC, Ackerman BH, Landwehr KC, Pedro GS. Effect of single intravenous doses of histamine₂-receptor antagonists on volume and pH of gastric acid secretions in critically ill patients. *Current Therapeutic Research* 1995;56:756-768
- 11 钟碧慧,袁育红,陈湖,林金坤,胡品津.24小时胃内酸度监测评价多种抑酸剂静脉使用对十二指肠溃疡患者的抑酸效果.中华消化杂志 1999;19:315-317
- 12 Labenz J, Peitz U, Leusing C, Tillenburg B, Blum AL, Borsch G. Efficacy of primed infusions with high dose ranitidine and omeprazole to maintain high intragastric pH in patients with peptic ulcer bleeding: a prospective randomised controlled study. *Gut* 1997;40:36-41

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

腹腔冲洗液和腹膜组织检测胃癌腹腔微转移的临床意义

王夫景, 高 岩, 黄跃南, 佟佰峰, 张秀云, 杨维良

王夫景, 黄跃南, 佟佰峰, 杨维良, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086

高岩, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
张秀云, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研中心 黑龙江省哈尔滨市 150086

黑龙江省十五科技攻关资金资助项目, No. GC02C140-02
通讯作者: 高岩, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科.

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-08

Clinical significance of free cancer cells in peritoneal washes and tissues of patients with gastric cancer

Fu-Jing Wang, Yan Gao, Yue-Nan Huang, Bai-Feng Tong, Xiu-Yun Zhang, Wei-Liang Yang

Fu-Jing Wang, Yue-Nan Huang, Bai-Feng Tong, Wei-Liang Yang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Yan Gao, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Xiu-Yun Zhang, Research Center of the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by the Tenth Five-Year Program of Science and Technology of Heilongjiang Province, No. GC02C140-02

Correspondence to: Yan Gao, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-08

Abstract

AIM: To detect the free cancer cells in the peritoneal washes and tissues, and to explore their significances in the prediction of peritoneal metastasis of gastric cancer.

METHODS: The peritoneal washes and tissues were collected during laparotomy from 38 patients with gastric cancer and 5 with benign gastric disease. Peritoneal lavage cytology was performed for the washes, and the carcinoembryonic antigen (CEA) mRNA of the free cancer cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The CEA mRNA positive rates of the free cancer cells in the peritoneal washes and tissues were 36.8% (25/68) and 38.2% (26/68), respectively, which were both higher than that of cytological examination [25.0% (17/68)]. The TNM staging, depth of invasion,

lymph node metastasis, serosal involvement were correlated with the positive rate of CEA mRNA.

CONCLUSION: CEA mRNA is more sensitive and specific in the detection of peritoneal micrometastasis of gastric cancer.

Key Words: Reverse transcription polymerase chain reaction; Carcinoembryonic antigen; Gastric cancer; Peritoneal metastasis; Peritoneal wash; Peritoneal lavage cytology

Wang FJ, Gao Y, Huang YN, Tong BF, Zhang XY, Yang WL. Clinical significance of free cancer cells in peritoneal washes and tissues of patients with gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2148-2150

摘要

目的: 运用细胞学及RT-PCR方法对胃癌患者术中腹腔冲洗液、腹膜组织进行检测, 以探讨对预测胃癌腹腔微转移的意义。

方法: 胃癌68例和胃良性病变5例, 收集患者术中腹腔冲洗液, 并同时切除少量大网膜、腹膜作为对照。用RT-PCR方法测定冲洗液中游离细胞的CEAmRNA表达, 同时作冲洗液细胞学检查(PLC)。

结果: 腹腔冲洗液和腹膜组织中的CEAmRNA的阳性率分别为36.8%(25/68), 和38.2%(26/68), 皆高于腹腔冲洗液细胞学25.0%(17/68)。CEAmRNA的阳性率与肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移、浆膜侵犯深度呈正相关。

结论: CEART-PCR方法对于检测腹腔微量游离癌细胞较PLC有更高的灵敏度和特异性, 是一种检测胃癌腹腔微转移的有效方法。

关键词: RT-PCR; CEA; 胃癌; 腹膜转移; 腹腔冲洗液; 细胞学检查

王夫景, 高岩, 黄跃南, 佟佰峰, 张秀云, 杨维良. 腹腔冲洗液和腹膜组织检测胃癌腹腔微转移的临床意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(17):2148-2150

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2148.asp>

0 引言

已侵及浆膜的胃癌患者, 术后易发生腹膜转移, 5 a生

存率低于35%^[1]. 如何正确地筛检腹膜复发高危病例并予以有效的治疗是提高进展期胃癌手术效果的关键问题之一. 研究表明, 细胞学检查的阳性结果与低生存率之间有明显的统计学意义, 但传统的细胞学检查, 缺乏灵敏度, 一些阴性结果的患者, 术后仍有腹膜复发. 目前RT-PCR已被广泛地应用于检查外周血、淋巴结、骨等微转移病灶^[2, 3], 显示了较高的灵敏度和特异性. 我们采用RT-PCR法, 检测术中收集的腹水或腹腔冲洗液CEAmRNA的表达, 并与常规细胞学检测结果比较, 同时对腹膜转移病灶和腹膜组织亦进行CEAmRNA的检测如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-3/2005-4胃癌手术患者68例, 胃良性病变5例. 依据术中所见及术后病理分期, 浆膜类型, 病理类型分组. 根据病理结果和恶性肿瘤国际临床病期(TNM)分期. 组织学类型中将乳头状腺癌和管状腺癌 I II级归入分化类, 其余病理类型归入未分化类. 同时用人大肠癌细胞系株CCL187作为阳性对照. Trizol试剂购于Inlitrigen公司; RT-PCR试剂盒购于Promega公司; 大肠癌细胞系株CCL187取自校科研中心. 手术开腹后, 于Douglas窝或左膈下置入一根导尿管, 注入无菌生理盐水250 mL, 轻轻搅动后吸出. 若有自然腹水的病例则直接吸出. 吸取后将冲洗液或腹水于4℃下用2000 r/min离心20 min. 取少许沉渣做涂片, HE染色后, 行细胞学检查, 其余沉渣于-80℃下保存. 如有腹膜转移病灶则予部分切除, 否则切除少量大网膜、盆腔腹膜和膈腹膜, 也置于-80℃下保存.

1.2 方法 将标本内加入Trizol试剂, 按Trizol说明书所示步骤进行RNA提取, 得到RNA. 先行逆转录, 按说明书操作; 再行PCR, 引物序列参照文献^[4]. CEA巢式PCR特殊引物序列为: A(outersense): 5-TCT GGA ACT TCT CCT GGT CTC TCA GCT GG-3', B(antisense): 5-TGT AGC TGT TGC AAA TGC TTT AAG GAA GAA GC-3', C(inner sense): 5-GGG CCA CTG TCG GCA TCA TGA ATT GG-3'. 第1轮采用引物A和B, 第2轮采用引物B和C. 反应条件相同, 94℃变性1 min, 72℃退火和延伸2.5 min; 反应体系为25μL. 将第1轮产物1 μL在第2轮中扩增, 皆为30个循环; 第2轮产物5 μL置于20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 呈现131 bp条带为阳性, 凝胶成像仪扫描记录. 取阳性产物测序鉴定. 另外, 每例标本均用管家基因β-actin作为内参照以检验RNA样本的完整性, 同时用CCL187大肠癌细胞系株RNA样本作阳性对照以排除假阴性, 用不含RNA的样本扩增作阴性对照以排除假阳性. 对5例胃良性病变的腹腔冲洗液和12个腹膜组织标本行CEAmRNA的巢式检测, 作为阴性对照. 涂片后作HE染色行细胞学检查.

统计学处理 χ^2 检验或确切概率法, $P < 0.05$ 为有显著

性差异.

2 结果

胃癌68例腹腔液和腹膜组织中CEAmRNA的阳性率为36.8%(25/68)和38.2%(26/68), 均高于腹腔液细胞学阳性率25.0%(17/68). 胃良性病变5例的腹腔液均为阴性, 但其15个腹膜标本中有1个CEAmRNA阳性. 同时5例肉眼腹膜转移病例的腹膜转移病灶CEAmRNA腹水或冲洗液中细胞学和CEAmRNA均阳性. 腹膜组织CEAmRNA阳性者细胞学检查均阳性; 腹腔液细胞学阳性者CEAmRNA亦阳性, 腹腔液CEAmRNA阳性者中有8例腹腔液细胞学检查阴性; 腹腔液CEAmRNA阳性者腹膜组织CEAmRNA皆阳性.

2.1 病期和阳性率 在早中期22例病例中, 有3例CEAmRNA结果阳性, PLC均为阴性($P < 0.05$); 在晚期1组中, CEA mRNA阳性率均明显高于PLC($P < 0.05$); 晚期2组CEAmRNA阳性率与PLC阳性率无差别(表1).

表1 不同病期胃癌腹腔液CEAmRNA和PLC阳性率的比较

病期	n	RT-PCR(+)	PLC(+)
早中期	22	3(13.0%) ^a	0
晚期1组	41	17(41.5%) ^a	12(29.3%)
晚期2组	5	5(100%)	5(100%)
总计	68	25(36.8%)	17(25%)

^a $P < 0.05$ vs PLC(+); 早中期: m-m p癌; 晚期1组: ss-si癌无大体腹膜转移; 晚期2组: ss-si癌有大体腹膜转移.

2.2 CEA mRNA 表达与临床病理因素 CEA mRNA表达与淋巴结转移、浆膜侵犯程度、肿瘤分化程度和分期呈明显相关性($P < 0.05$). 浆膜侵犯者、淋巴结转移者、肿瘤分化程度差者、TNM分期越晚者CEAmRNA表达阳性的可能性大(表2).

表2 CEA mRNA表达与临床病理因素的关系

临床病理因素	n	腹腔液CEAmRNA	
		阳性	阴性
肿瘤大小<5 cm	29	10	19
肿瘤大小≥5 cm	39	15	24
分化	28	7	21
未分化	40	18	22 ^a
浆膜侵犯(-)	25	2	23
浆膜侵犯(+)	43	23	20 ^a
淋巴结转移(-)	23	5	18
淋巴结转移(+)	45	20	25 ^a
I+II期	26	6	20
III+IV期	42	19	23 ^a

^a $P < 0.05$.

3 讨论

近年来, 虽然胃癌的外科手术治疗有了长足的进步, 但手术仍然不能解决浆膜受侵胃癌术后腹膜复发的问题,

许多术中直视下貌似完整的浆膜,实际上已被各种水解酶溶解,癌细胞裸露并脱落入腹腔.进展期胃癌腹膜转移率约为10%^[5],而术后腹膜复发率高达50%^[6].但无论是复发或腹膜转移均与腹腔存在的癌细胞有关,检测这些癌细胞对于诊断和预测腹膜转移和复发有重要意义,但常规细胞学检查检出率低,尤其是那些无腹水或腹腔癌细胞较少的患者常会漏诊,这也是有些患者虽然细胞学阴性但术后仍有复发的原因之一.

近年来,RT-PCR方法已被用于检测微量癌细胞中的特殊mRNA,如淋巴结、肝脏和血液癌细胞的微转移检测,显示了较高的灵敏性.我们采用该方法检测腹腔冲洗液的游离细胞,因为腹膜间皮细胞不表达CEA,所以选择CEA的mRNA作为标志,从而明确地区分开皮细胞和肿瘤细胞.但值得注意的是,腹腔液中白细胞可以表达CEA相关基因,因此在进行PCR扩增的时候,应将退火温度控制在65℃以下,以避免由于白细胞表达CEA所造成的假阳性^[7].尽管5例胃良性病变的15个腹膜标本中有1个CEAmRNA阳性,使其特异性有所下降,这可能与白细胞少量表达CEA相关基因有关.作者认为,对胃癌患者术中切除少许网膜、腹膜组织行CEAmRNA的检查,至少可辅助证实腹腔液CEAmRNA的检测结果.我们以细胞系为标本作为阳性对照,获得阳性结果的最低细胞数量级为 10^3 ,说明RT-PCR实验可以检测很微量的癌细胞,并与细胞学检查进行比较,结果敏感性明显提高,特别在无明显大体腹膜转移以前,统计学表明有显著差异.结果表明,RT-PCR方法检测腹腔液CEAmRNA表达较细胞学检

查的敏感性显著升高,而且与淋巴结转移、肿瘤浸润深度、浆膜侵犯程度和TNM分期呈正相关,对腹膜组织同时行此检查,可进一步证实其结果.对于CEAmRNA表达阳性者可在随访中作为高危人群监测.

4 参考文献

- 1 Koder Y, Yamamura Y, Torii A, Uesaka K, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Kato T, Kito T. Postoperative staging of gastric carcinoma. A comparison between the UICC stage classification and the 12th edition of the Japanese General Rules for Gastric Cancer Study. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:476-480
- 2 Johnson PW, Burchill SA, Selby PJ. The molecular detection of circulating tumour cells. *Br J Cancer* 1995;72:268-276
- 3 Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, O'Reilly S, Shousha S, Sinnett HD, Coombes RC. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1994;54:2986-2990
- 4 Koder Y, Nakanishi H, Yamamura Y, Shimizu Y, Torii A, Hirai T, Yasui K, Morimoto T, Kato T, Kito T, Tatematsu M. Prognostic value and clinical implications of disseminated cancer cells in the peritoneal cavity detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytology. *Int J Cancer* 1998;79:429-433
- 5 Tsujitani S, Oka S, Suzuki K, Saito H, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Prognostic factors in patients with advanced gastric cancer treated by noncurative resection: a multivariate analysis. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1504-1508
- 6 Yoo CH, Noh SH, Shin DW, Choi SH, Min JS. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma. *Br J Surg* 2000;87:236-242
- 7 Koder Y, Isobe K, Yamauchi M, Satta T, Hasegawa T, Oikawa S, Kondoh K, Akiyama S, Itoh K, Nakashima I. Expression of carcinoembryonic antigen (CEA) and nonspecific crossreacting antigen (NCA) in gastrointestinal cancer; the correlation with degree of differentiation. *Br J Cancer* 1993;68:130-136

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

恶性消化道肿瘤晚期患者血TNF- α 与胰岛素抵抗和胰岛素分泌的功能关系

冯青青, 王占科, 吕小林, 刘亚诚, 余文, 涂云

冯青青, 王占科, 余文, 涂云, 解放军第九四医院 江西省南昌市 330002

吕小林, 江西医学院第一附属医院 江西省南昌市 330006

刘亚诚, 江西省人民医院 江西省南昌市 330006

通讯作者: 冯青青, 330002, 江西省南昌市, 解放军第九四医院.

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-07-28

Relations of plasma TNF- α with insulin resistance and insulin

excretion in terminal patients with malignant gastrointestinal tumor

Qing-Qing Feng, Zhan-Ke Wang, Xiao-Lin Lv, Ya-Cheng Liu, Wen Yu, Yun Tu

Qing-Qing Feng, Zhan-Ke Wang, Wen Yu, Yun Tu, the 94th Hospital

of Chinese PLA, Nanchang 330002, Jiangxi Province, China
Xiao-Ling Lv, the First Affiliated Hospital of Jiangxi Medical College,
Nanchang 330002, Jiangxi Province, China
Ya-Cheng Liu, the People's Hospital of Jiangxi, Nanchang 330002,
Jiangxi Province, China

Correspondence to: Qing-Qing Feng, the 94th Hospital of Chinese
PLA, Nanchang 330002, Jiangxi Province, China

Received: 2005-07-19 Accepted: 2005-07-28

Abstract

AIM: To explore the relations of plasma TNF- α with insulin resistance and insulin excretion in the disorder of glucose metabolism in the terminal patients with enteron malignant tumor.

METHODS: The levels of the fasting glucose, insulin, lactic acid, postprandial glucose, lactic acid were measured in 40 terminal patients with enteron malignant tumor as well as in 40 normal controls, and the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and HOMA- β were calculated.

RESULTS: The levels of the plasma TNF- α , the fasting glucose, insulin and lactic acid, and the values of HOMA-IR and HOMA- β in the terminal patients with enteron malignant tumor were significantly higher than those in the controls (3.27 ± 0.92 vs 1.23 ± 0.36 , $P < 0.01$; 5.19 ± 0.75 vs 4.05 ± 0.28 , $P < 0.01$; 14.24 ± 6.52 vs 8.27 ± 4.84 , $P < 0.01$; 7.11 ± 0.69 vs 3.27 ± 0.41 , $P < 0.01$; 3.48 ± 0.85 vs 1.55 ± 0.77 , $P < 0.01$; 181 ± 39 vs 326 ± 47 , $P < 0.01$), but the content of the fasting glucose was in normal range. The level of the plasma TNF- α was positively correlated with the contents of the fasting glucose, insulin and lactic acid and the value of HOMA-IR ($r = 0.4352$, $P < 0.05$; $r = 0.3136$, $P < 0.05$; $r = 0.7893$, $P < 0.01$; $r = 0.6531$, $P < 0.01$), but negatively correlated with the value of HOMA- β in terminal patients with enteron malignant tumor ($r = -0.5874$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The plasm TNF- α plays an important role in the insulin resistance, the hyposecretion of insulin and the disorder of glucose-metabolism in the terminal patients with malignant gastrointestinal tumor.

Key Words: Malignant gastrointestinal tumor; TNF- α ; Insulin resistance; Insulin excretion; Glucose-metabolism; Lactic acid

Feng QQ, Wang ZK, Lv XL, Liu YC, Yu W, Tu Y. Relationship between plasma TNF α and Insulin resistance, Insulin excretion in terminal patients with enteron malignant tumor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2150-2153

摘要

目的: 证明恶性消化道肿瘤晚期患者血浆肿瘤坏死因子

α (TNF- α)与胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能相关性, 阐明恶性消化道肿瘤晚期患者糖代谢障碍机制。

方法: 测定40例恶性消化道肿瘤晚期患者和40例正常人员血浆TNF- α 和空腹血糖、胰岛素、乳酸含量, 并计算稳态模式评估法胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)和胰岛素分泌指数(HOMA- β)。

结果: 恶性消化道肿瘤晚期患者血浆TNF- α 、空腹血糖、空腹胰岛素、空腹乳酸、HOMA-IR和HOMA- β 均明显高于正常对照组(3.27 ± 0.92 vs 1.23 ± 0.36 , $P < 0.01$; 5.19 ± 0.75 vs 4.05 ± 0.28 , $P < 0.01$; 14.24 ± 6.52 vs 8.27 ± 4.84 , $P < 0.01$; 7.11 ± 0.69 vs 3.27 ± 0.41 , $P < 0.01$; 3.48 ± 0.85 vs 1.55 ± 0.77 , $P < 0.01$; 181 ± 39 vs 326 ± 47 , $P < 0.01$), 但空腹血糖仍在正常参考范围内。恶性消化道肿瘤晚期患者血TNF- α 与空腹血糖、空腹胰岛素、空腹乳酸明显正相关($r = 0.4352$, $P < 0.05$; $r = 0.3136$, $P < 0.05$; $r = 0.7893$, $P < 0.01$), 与HOMA-IR明显正相关($r = 0.6531$, $P < 0.01$), 与HOMA- β 明显负相关($r = -0.5874$, $P < 0.01$)。

结论: 恶性消化道肿瘤晚期患者血浆TNF α 在胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能下降及糖代谢障碍中发挥重要作用。

关键词: 消化道肿瘤; TNF- α ; 胰岛素抵抗; 胰岛素分泌; 糖代谢; 乳酸

冯青青, 王占科, 吕小林, 刘亚诚, 余文, 涂云. 恶性消化道肿瘤晚期患者血TNF- α 与胰岛素抵抗和胰岛素分泌的功能关系. *世界华人消化杂志* 2005;13(17):2150-2153

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2150.asp>

0 引言

恶性消化道肿瘤晚期患者一方面存在对外来葡萄糖消化吸收不足, 另一方面又存在糖代谢障碍, 不利于患者营养支持和康复。恶性肿瘤患者糖代谢障碍涉及胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能下降, 但导致恶性肿瘤患者胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能下降的详细机制尚未完全阐明。已经证实, 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)在2型糖尿病及创伤糖代谢障碍中发挥重要作用^[1, 2]。但恶性肿瘤患者血浆TNF- α 与胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能及糖代谢障碍之间的关系, 国内外报道不多。我们以恶性消化道肿瘤晚期患者为研究对象, 观察血浆TNF- α 与糖代谢相关指标及胰岛素抵抗和胰岛素分泌指数的相关性, 旨在探讨TNF- α 在恶性消化道肿瘤晚期患者糖代谢障碍中的作用, 为临床改善恶性消化道肿瘤晚期患者糖代谢障碍及其危害提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2001-2004年收治的消化道恶性肿瘤晚期患者40例, 男27例, 女13例, 平均年龄61岁, 其中食管癌14例、胃癌12例, 结肠癌14例。所有患者临床和病理

诊断明确,并伴有不同程度转移,无手术指征,无糖尿病史.正常对照组为南昌某干部修养所老干部体检正常人员40例,男26例,女14例,平均年龄63岁,无糖尿病史.正常对照组和消化道恶性肿瘤晚期组年龄、男女比例等指标均无显著性差异($P>0.05$).中国人群空腹血糖正常参考范围为3.5-6.1 mmol/L,所有人员空腹血糖均高于3.5 mmol/L.40例恶性消化道肿瘤晚期患者中,除3例空腹血糖高于6.1 mmol/L外,其他均在正常参考范围内.

1.2 方法 血浆TNF- α 测定采用酶联免疫吸附试验标准曲线比色法(深圳晶美公司);血糖采用葡萄糖氧化酶动力学测定(中生公司);胰岛素采用放射免疫法测定(3V公司);乳酸采用乳酸氧化酶终点比色法测定(英国郎道公司). $HOMA-IR = \text{空腹胰岛素} \times \text{空腹血糖} / 22.5$, $HOMA-\beta = \text{空腹胰岛素} \times 20 / (\text{空腹血糖} - 3.5)^{[3]}$.各组人员抽血前情绪稳定,无剧烈运动.

统计学处理 各组数据均以mean $\pm$ SD表示,先对数据进行正态分布性检验, $HOMA-IR$ 和 $HOMA-\beta$ 不呈正态分布,对其进行自然对数处理呈正态分布后,通过SPSS 11.0统计软件,行单因素方差分析(t)检验. $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 恶性消化道肿瘤晚期患者糖代谢相关指标变化 恶性消化道肿瘤晚期患者血浆TNF- α 、空腹胰岛素、空腹血糖、空腹乳酸均明显高于正常对照组($P<0.01$) (表1).

2.2 恶性消化道肿瘤晚期患者胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能变化 恶性消化道肿瘤晚期患者胰岛素抵抗指数明显高于正常对照组($P<0.01$),胰岛素分泌指数明显低于正常对照组($P<0.01$) (表2).

表1 恶性消化道肿瘤晚期患者血浆TNF- α 、空腹胰岛素、空腹血糖和空腹乳酸变化 (mean $\pm$ SD)

组别	<i>n</i>	TNF- α (μ g/L)	空腹胰岛素 (mIU/L)	空腹血糖 (mmol/L)	空腹乳酸 (mmol/L)
正常对照组	40	1.23 $\pm$ 0.36	8.27 $\pm$ 4.84	4.05 $\pm$ 0.28	3.27 $\pm$ 0.41
恶性肿瘤组	40	3.27 $\pm$ 0.92 ^b	14.24 $\pm$ 6.52 ^b	5.19 $\pm$ 0.75 ^b	7.11 $\pm$ 0.69 ^b

^b $P<0.01$ vs 正常对照组.

表2 恶性消化道肿瘤患者 HOMA-IR和HOMA- β 变化 (mean $\pm$ SD)

组别	<i>n</i>	HOMA-IR	HOMA- β
正常对照组	40	1.55 $\pm$ 0.77	326 $\pm$ 47
恶性肿瘤组	40	3.48 $\pm$ 0.85 ^b	181 $\pm$ 39 ^b

^b $P<0.01$ vs 正常对照组.

2.3 恶性消化道肿瘤晚期患者TNF- α 与胰岛素抵抗和胰岛素分泌相关性 恶性消化道肿瘤晚期患者血TNF- α 与空

腹血糖、空腹胰岛素和空腹乳酸明显正相关($P<0.05$),与胰岛素抵抗指数明显正相关($P<0.01$),与胰岛素分泌指数明显负相关($P<0.01$) (表3).

表3 恶性消化道肿瘤晚期患者血TNF- α 与胰岛素抵抗指数和胰岛素分泌指数相关系数分析 ($n=40$)

统计值	空腹血糖	空腹胰岛素	空腹乳酸	HOMA-IR	HOMA- β
<i>r</i>	0.4352	0.3136	0.7893	0.6531	-0.5874
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

糖的有效利用障碍指机体葡萄糖生成CO₂和水以及大量ATP的功能障碍,主要表现为高血糖反应和糖酵解增强造成的高乳酸血症.肿瘤组织存在糖有效利用障碍是肿瘤患者整体糖代谢障碍组成部分^[4].肿瘤患者尽管血糖不一定高于正常参考范围,但存在胰岛素抵抗和外来葡萄糖的有效利用障碍^[5,6],我们研究发现,尽管恶性消化道肿瘤晚期患者空腹血糖尽管正常,但空腹乳酸明显升高.由于血糖变化受多种因素影响,乳酸升高可能是恶性肿瘤患者糖代谢障碍的主要表现.高乳酸血症导致恶性肿瘤晚期患者酸中毒和电解质紊乱,应引起临床高度重视.

胰岛素抵抗指单位胰岛素在体内促进葡萄糖有效利用的功能下降.胰岛素分泌功能下降指机体胰岛素相对血糖的分泌不足胰岛素代偿分泌增多能够补偿胰岛素抵抗的后果,因此,胰岛素抵抗合并胰岛素相对血糖分泌不足,是导致糖代谢障碍的重要原因^[7].我们发现,恶性消化道肿瘤晚期患者存在胰岛素抵抗指数增加和胰岛素分泌指数下降,提示胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足是恶性肿瘤晚期患者糖代谢障碍的重要原因.胰岛素是促进葡萄糖有氧氧化的主要激素,有效降低胰岛素抵抗程度和增强胰岛素代偿分泌功能可能是防治恶性肿瘤患者高乳酸血症及其危害的有效措施.恶性肿瘤晚期患者胰岛素分泌指数下降,但空腹血糖正常,这似乎难以理解.恶性消化道肿瘤晚期患者空腹血糖正常,可能与空腹血糖正常参考范围较大以及消化道糖营养吸收功能障碍有关.

胰岛素分泌指数下降可能与胰岛 β 细胞凋亡及胰岛素抵抗进行性加重有关.我们的结果证实,恶性消化道肿瘤晚期患者血浆TNF- α 明显升高,并与胰岛素抵抗程度明显正相关,与胰岛素分泌指数下降明显负相关,与糖代谢障碍指标明显正相关,提示血浆TNF- α 升高通过诱导胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能下降,在恶性肿瘤患者糖代谢障碍中发挥重要作用.基础研究证实,血浆TNF- α 能够抑制胰岛素受体信号传导和胰岛 β 细胞相对血糖分泌胰岛素功能障碍^[8].恶性肿瘤患者血浆TNF- α 主要来源于机体单核巨噬细胞和肿瘤细胞,恶性肿瘤患者单核巨噬细胞和肿瘤细胞分泌的TNF- α 可作用于肿瘤

细胞及其他正常组织细胞,导致恶性肿瘤患者糖代谢障碍.恶性肿瘤细胞分泌TNF- α 及其调控的制,有待进一步研究.感染是单核巨噬细胞过度表达TNF- α 的主要诱导剂,有效避免恶性肿瘤患者感染,降低血浆TNF- α 水平,可能对改善恶性肿瘤患者糖代谢障碍具有重要意义.TNF- α 作为抗肿瘤的有效药物,其在糖代谢障碍中的作用,应引起临床高度重视.

4 参考文献

- 1 韩萍,何冰,崔力,张金苹,张咏言. C反应蛋白和白细胞介素6以及肿瘤坏死因子 α 对2型糖尿病和代谢综合征发生的影响. 中国糖尿病杂志 2003;11:57-58
- 2 王占科,许霖水. 严重烫伤小鼠血浆TNF- α 与胰岛素抵抗相关性研究. 中华外科杂志 1998;36:260
- 3 Ikeda Y, Suehiro T, Nakamura T, Kumon Y, Hashimoto K. Clinical significance of the insulin resistance index as assessed by homeostasis model assessment. *Endocr J* 2001;48:81-86
- 4 黄勇奇,吴耀生. 己糖激酶- II 与肿瘤的糖代谢. 生命的化学 2004;24:342-344
- 5 Trevisan M, Liu J, Muti P, Misciagna G, Menotti A, Fucci F. Markers of insulin resistance and colorectal cancer mortality. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:937-941
- 6 杜炜,尘爱云,代进富. 肝癌的糖代谢、胰岛素和C肽变化的研究. 肿瘤防治研究 2000;27:199-200
- 7 张素华,任伟,李晨钟,余路,兰帆,汪志红,邱鸿鑫. 2型糖尿病家系胰岛素分泌功能的研究. 中华内分泌代谢杂志 1999;15:339-341
- 8 Yazdani-Biuki B, Stelzl H, Brezinschek HP, Hermann J, Mueller T, Kripl P, Graninger W, Wascher TC. Improvement of insulin sensitivity in insulin resistant subjects during prolonged treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. *Eur J Clin Invest* 2004;34:641-642

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

肠道动静脉畸形的诊断与治疗8例

柴新群, 邓飞涛, 蒋春舫, 冯贤松

柴新群, 邓飞涛, 蒋春舫, 冯贤松, 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

通讯作者: 柴新群, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科. xinqunc@yahoo.com

电话: 027-85726399 传真: 027-85726399

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-07-28

Diagnosis and treatment of arteriovenous malformation of gastrointestinal tract: an analysis of 8 cases

Xin-Qun Chai, Fei-Tao Deng, Chun-Fang Jiang, Xian-Song Feng

Xin-Qun Chai, Fei-Tao Deng, Chun-Fang Jiang, Xian-Song Feng, Department of General Surgery, the Affiliated Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Xin-Qun Chai, Department of General Surgery, the Affiliated Union Hospital of Tongji Medical College,

Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. xinqunc@yahoo.com

Received: 2005-07-19 Accepted: 2005-07-28

Abstract

AIM: To summarize the clinical diagnosis and treatment of gastrointestinal hemorrhage induced by arteriovenous malformation of the gastrointestinal tract.

METHODS: From December 1999 to January 2005, 8 patients were diagnosed with arteriovenous malformation of the gastrointestinal tract in our hospital, and their clinical data were retrospectively analyzed.

RESULTS: Of the 8 patients, enteroscopy was totally performed 12 times on 5 patients due to the hemorrhage of unknown reasons, but no lesions were found. Arteriovenous malformations were confirmed in 3 cases

by angiography and two by angiography integrated with intraoperative endoscopy. Blind surgeries were totally performed 5 times on 3 patients, and therapeutic embolization was successfully followed on 2 of them. One case died of severe hemorrhage. The 7 patients were in the follow up for 6-66 mo, and 1 died of cerebral apoplexy.

CONCLUSION: Angiography and intraoperative endoscopy are more effective in the diagnosis of arteriovenous malformation of the gastrointestinal tract.

Key Words: Arteriovenous malformation; Angiography; Intraoperative endoscopy

Chai XQ, Deng FT, Jiang CF, Feng XS. Diagnosis and treatment of arteriovenous malformation of gut: an analysis of 8 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2153-2156

摘要

目的: 总结肠道动静脉畸形导致消化道出血的临床诊断及治疗过程。

方法: 对我院1999-12/2005-01收治的8例肠道动静脉畸形导致消化道出血患者的临床资料进行回顾性分析。

结果: 本组8例, 5例由于不明原因出血(大便潜血试验为阳性)先后行胃镜检查12次, 均未见出血灶; 血管造影5例, 其中3例明确诊断; 另2例结合术中内镜检查发现病灶, 此5例行病变肠段切除病理证实为小肠单发或多发血管畸形。3例先后行盲目手术(盲目胃大部切除术和盲目剖腹探查术)共5次, 均未解决根本问题, 其中2例行2次介入栓塞治疗成功; 另1例死于大出血。7例患者随访6-66 mo, 1例死于脑出血, 其余6例在随访中。

结论: 血管造影及术中内镜检查有利于发现肠道动静脉畸形病灶, 以便更准确的确定病变部位从而成功切除。

关键词: 动静脉畸形; 血管造影; 术中内镜检查

柴新群, 邓飞涛, 蒋春舫, 冯贤松. 肠道动静脉畸形的诊断与治疗8例. *世界华人消化杂志* 2005;13(17):2153-2156
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2153.asp>

0 引言

动静脉畸形(arteriovenous malformation)可发生在肠管任何部位, 是引起急、慢性消化道出血的少见原因之一。主要表现为出血, 贫血, 或肠套迭(如形成肿块), 大多数病变可无症状。少数患者有明显的遗传性。有些患者可伴发其他部位的血管异常, 特别是皮肤。诊断通常依靠内窥镜或血管造影检查。1999-12/2005-01我院收治了8例肠道动静脉畸形导致消化道出血患者。现将临床资

料报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 1999-12/2005-01我院收治肠道动静脉畸形导致消化道出血患者8例, 男5例, 女3例, 年龄23-63岁, 平均42.5岁。本组8例患者均表现黑便(大便潜血试验为阳性), 贫血貌。2例伴呕血。慢性隐性出血5例。有规律出血3例: 1例每月黑便1次; 1例每2-3 mo黑便1次; 1例每年黑便1-2次。急性大出血伴休克1例。病程30 d-12 a。

1.2 方法 辅助检查: 胃镜检查5例, 共12次, 均未见出血灶, 仅1例2次胃镜发现十二指肠降部有鲜血; 肠系钡餐2例, 均未见病灶; 胶囊内镜检查2例, 其中1例提示小肠多发隆起病灶, 另1例提示十二指肠降部隆起病变; 结肠镜检查3例, 均未见异常; 发射式计算机断层扫描(ECT)检查2例, 共5次, 有4次提示相当于1、2组小肠间断微量出血; 血管造影5例, 共7次, 有3例提示肠道动静脉畸形, 另2例结合术中内镜检查发现病灶。治疗情况: 5例行病变肠段切除, 术后病理报告: 小肠单发或多发血管畸形, 其中1例伴小肠低度恶性间质瘤。3例行盲目手术(盲目胃大部切除术和盲目剖腹探查术)共5次, 均未发现病灶和解决根本问题, 随后2例行介入治疗2次成功; 另1例由于无微导管及弹簧钢圈, 未能行栓塞治疗而死于大出血。

2 结果

7例患者随访6-66 mo, 1例死于脑出血, 其余6例在随访中。

3 讨论

血管畸形是由于血管发生定位错误, 大多数位于皮肤, 称为血管痣。血管畸形也可发生在内脏器官, 比如呼吸道和消化道。这些畸形系各种大小和形状弯曲血管, 其内衬以连续的内皮, 周围包绕不正常的组织。血管畸形由于阻塞、出血或充血性心力衰竭而威胁生命。肠道血管畸形可发生在任何年龄和肠管的任何部位, 可以单发, 但多数是弥漫多发^[1]。

3.1 病因病理 其病因不明, 可能与先天性血管发育异常、后天性获得性血管退行性变或慢性黏膜缺血有关。血管畸形是一种慢性、间断的黏膜下静脉轻度阻塞导致的血管退行性变, 由于肠腔内压增高, 使肠壁肌肉紧张而压迫静脉, 故使静脉回流受阻, 小静脉如毛细血管逐渐淤血、扩张, 进而累及毛细血管前括约肌, 使动-静脉交通支开放。大多数异常发生是偶发性; 少数患者有遗传倾向, 有些家庭表现为常染色体显性遗传^[1,2]。

3.2 临床特点 消化道血管畸形发生在肠壁黏膜或黏膜下, 平时大多没有症状。发病时唯一的临床表现是消化道出血, 表现为出血、贫血, 如形成肿块性病损, 可导致肠套叠^[1]。其临床特点: (1)不明原因无症状消化道出血

或大便潜血试验为阳性. 病史长, 可达10 a之久; (2)出血多为少量、间断, 也可发生急性大出血; (3)多伴有慢性贫血; (4)诊断常较困难. 本组8例均表现黑便、贫血; 仅2例伴呕血; 有2例反复发病10多年, 其中1例先后就诊于国内四家大型医院, 反复胃镜检查共6次, 接受探查手术3次, 血管造影4次才明确诊断.

在临床上, 由于缺乏对该病的认识; 未能广泛开展内镜检查, 并且在出血停止后内镜检查常因黏膜血管塌陷而不显露致诊断困难; 目前对血管造影认识不够或不普及; 误诊为并存或并发症等, 从而导致该病误诊.

另有作者^[3]首次报道一例罕见横结肠腔外动静脉畸形引起腹腔大出血休克. 剖腹探查发现为右半结肠浆膜面大出血. 术后病理证实为动静脉畸形.

3.3 诊断方法 胃肠钡餐检查对该病无法获得正确诊断, 但可排除其他疾病. 本组有2例行肠系钡餐检查均未见病灶. 目前认为可靠的诊断方法是: 内镜和血管造影检查^[2]. 早期内镜检查是大多数上消化道出血诊断的首选方法, 内镜对于内脏血管畸形的评估是必须的, 特别是当出血为主要症状时. 某些病变在内镜下有特定的表现. 先进的内镜方法包括内镜超声波检查和各种止血技术, 可用于评估受累胃肠道壁的深度和特征以及提供适当的微创治疗^[4]. 最近, 推进式肠镜检查(PE)已成为隐性消化道出血患者的重要检查方法, 还可避免一些不精确的或侵袭性检查^[5,6]. 缺铁性贫血患者, 当上下消化道内镜检查为阴性而大便潜血试验为阳性时, 应首选小肠镜检查. 小肠镜检查似乎比其他诊断方法更优越^[6,7]. 但总的来说内镜对肠道血管畸形进行诊断是有限的. 对于消化道出血病情不稳定、出血位置不清患者, 经常采用其他技术, 比如核素扫描、血管造影和手术探查^[8]. 本组有5例接受胃十二指肠镜检查共12次, 均未见出血灶. 核素检查: 常用⁹⁹Tc胶体或标记红细胞核素注射后行腹部扫描, 出血速度达0.05–0.1 mL/min, 即可被测出, 对消化道出血的检测有相当敏感性, 但定位的精确性有限. 血管造影检查对确定出血部位, 尤其作为急诊手术前定位诊断有很大的意义, 适应于内窥镜检查未能发现出血部位, 尤其是急性出血, 胃十二指肠腔内有大量血块者, 出血速度>0.5 mL/min. 经选择性腹腔动脉、肠系膜上动脉有关分支插管, 注射造影剂即可发现造影剂外溢、血管畸形或肿瘤血管影像. 需要强调的是检查最好在出血时进行, 以有利于发现出血部位. 本组有1例患者先后行血管造影4次, 其中2次在未出血时进行, 结果3次血管造影均发现十二指肠降部动静脉畸形; 另3例患者行血管造影3次, 均见肠系膜上动脉空肠动脉分支单个或多发血管畸形, 其中有1例伴活动性出血.

3.4 治疗 内镜治疗: 包括硬化剂治疗、激光治疗、电凝治疗和综合治疗^[2,9]. 但是首先必须发现病灶. 肠道动静脉畸形雌激素治疗的作用还不清楚. 有人^[10]报告1例盲肠、十二指肠和胃多发性动静脉畸形引起消化道出血

患者, 采用雌激素治疗, 己烯雌二醇0.05 mg 口服, 每天一次, 随访10 mo没有出血. 导管治疗: 包括药物灌注和栓塞治疗. 随着介入技术及导管材料的进一步完善, 国内外不断有关于介入技术治疗肠道动静脉畸形所致消化道出血的病例报告. 超选择性插管和微导管材料已使这一措施安全、有效. 对于不适合手术的患者, 其是一个非常好的治疗选择^[11]. 目前常用栓塞材料有: 明胶海绵、鱼肝油酸钠、氰基丙烯酸脂和不锈钢圈等. 一般联合应用, 单用明胶海绵不能有效控制出血. 金属钢圈为不吸收永久性栓塞材料, 栓塞效果可靠. 介入栓塞在肠道动静脉畸形所致消化道出血的治疗中处于十分重要的地位, 其优点是简单、安全、对患者创伤小、效果迅速、可靠, 对消化道大出血患者, 可起到挽救生命的作用. 但一定要注意介入栓塞的并发症及有关问题^[12]. 手术治疗: 手术切除血管畸形肠段是最有效而又确切的治疗方法. 关键在术前或/术中要准确定位, 不要遗漏病变肠段. 肠道动静脉畸形采用超选择性微导管行血管造影定位和术中亚甲蓝染色定位, 以便确定切除病变肠段^[13]. 盲目剖腹探查常难以发现病灶部位, 甚至采取盲目手术而不能切除病灶. 本组有3例行盲目手术(盲目胃大部切除术和盲目剖腹探查术)共5次, 均未发现病灶.

通过回顾性分析和综合有关文献, 我们认为: (1)消化道出血病例应尽量在术前明确出血的部位和原因, 不要盲目剖腹探查, 否则术中可能找不到出血灶; (2)血管造影检查最好在出血时进行, 以利于发现出血部位; (3)术中配合内镜检查是十分必要的; (4)手术探查时不满足于一个病灶, 勿遗漏其他病灶.

4 参考文献

- 1 Vikkula M, Boon LM, Mulliken JB. Molecular genetics of vascular malformations. *Matrix Biol* 2001;20:327-335
- 2 Gordon FH, Watkinson A, Hodgson H. Vascular malformations of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2001;15:41-58
- 3 Nissman SA, Mann BD, Vitvitsky EV, Fyfe BS. Spontaneous nontraumatic hemoperitoneum due to a bleeding arteriovenous malformation on the serosal surface of the transverse colon: a case report. *Am Surg* 2002;68:911-912
- 4 Fishman SJ, Fox VL. Visceral vascular anomalies. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2001;11:813-834
- 5 Bezet A, Cuillerier E, Landi B, Marteau P, Cellier C. Clinical impact of push enteroscopy in patients with gastrointestinal bleeding of unknown origin. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:921-927
- 6 Banai J, Szanto I. Endoscopic diagnosis of gastrointestinal bleeding of unknown origin. *Magy Seb* 2001;54:155-157
- 7 Annibale B, Capurso G, Baccini F, Lahner E, D'Ambra G, Di Giulio E, Delle Fave G. Role of small bowel investigation in iron deficiency anaemia after negative endoscopic/histologic evaluation of the upper and lower gastrointestinal tract. *Dig Liver Dis* 2003;35:784-787
- 8 Enns R. Acute lower gastrointestinal bleeding: part 1. *Can J Gastroenterol* 2001;15:509-516
- 9 Irish MS, Caty MG, Azizkhan RG. Bleeding in children caused by gastrointestinal vascular lesions. *Semin Pediatr Surg* 1999;8:210-213

- 10 Siple JF, Joseph CL, Pagel KJ, Leigh S. Use of estrogen therapy in a patient with gastrointestinal bleeding secondary to arteriovenous malformations. *Ann Pharmacother* 1997;31:1311-1314
- 11 Luchtefeld MA, Senagore AJ, Szomstein M, Fedeson B, Van Erp J, Rupp S. Evaluation of transarterial embolization for lower gastrointestinal bleeding. *Dis Colon Rectum* 2000;43:532-534
- 12 柴新群. 介入治疗在胆道大出血中的应用及应注意的有关问题. *中国实用外科杂志* 2003;23:712-713
- 13 Schechter S, Deorchis D, Bass J, Marcoux DA. Angiographic selective methylene blue staining of an occult small-bowel arteriovenous malformation. *Am Surg* 2002;68:15-17

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

胃癌前哨淋巴结体外检测的临床意义

程黎阳, 陈晓东, 谢正勇, 周洪锋, 钟世镇

程黎阳, 谢正勇, 周洪锋, 广州军区广州总医院普通外科 广东省广州市 510010

陈晓东, 广州军区广州总医院病理科 广东省广州市 510010

钟世镇, 南方医科大学临床解剖研究所 广东省广州市 510515

广东省自然科学基金资助项目, No. 032204

通讯作者: 程黎阳, 510010, 广州市流花路111号, 广州军区广州总医院普通外科. chliyang2001@yahoo.com

电话: 020-36653547

收稿日期: 2005-02-22 接受日期: 2005-07-15

Clinical significance of *ex vivo* detection of sentinel lymph node in gastric cancer

Li-Yang Cheng, Xiao-Dong Chen, Zheng-Yong Xie, Hong-Feng Zhou, Shi-Zhen Zhong

Li-Yang Cheng, Zheng-Yong Xie, Hong-Feng Zhou, Department of General Surgery, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China
Xiao-Dong Chen, Department of Pathology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Shi-Zhen Zhong, Institute of Clinical Anatomy of Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Supported by Nature Science Foundation of Guangdong Province, No. 032204

Correspondence to: Dr. Li-Yang Cheng, Department of General Surgery, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China.
chliyang2001@yahoo.com

Received: 2005-02-22 Accepted: 2005-07-15

Abstract

AIM: To investigate the feasibility of *ex vivo* sentinel lymph node (SLN) mapping and its clinical significance in improving the staging of gastric cancer.

METHODS: Nineteen patients received curative resection of primary gastric cancer with extended lymph node dissection were included in this study. Gastric specimens were submucosally or subserosally injected with 10 g/L Patent Blue. The blue-stained SLNs were excised for routine pathological examination (hematoxylin and eosin staining). The SLNs, which were negative after HE staining, were further examined by cytokeratin immunohistochemistry.

RESULTS: The SLNs were identified in 89.5%(17/19) cases, with a mean number of 1.4 (1-3) for each case. After HE staining, the accuracy of the SLNs in diagnosis of the regional lymph node metastasis was 70.5% (12/17), and the false-negative rate was 38.4%. However, one case (25%) was upstaged by cytokeratin immunohistochemistry. Thus, the diagnostic accuracy increased to 88.2% and the false-negative rate decreased to 14.2%.

CONCLUSION: *Ex vivo* SLN mapping in gastric cancer

is technically feasible and may upstage some of the gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Sentinel lymph node; Mapping

Cheng LY, Chen XD, Xie ZY, Zhou HF, Zhong SZ. Clinical significance of *ex vivo* detection of sentinel lymph node in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2156-2159

摘要

目的: 探讨胃癌前哨淋巴结(sentinel lymph node, SLN)体外测图技术的可行性及其对提高胃癌淋巴结病理分期准确性的临床意义。

方法: 整块切除的新鲜胃癌标本19例病灶周围浆膜或粘膜下注入10 g/L专利蓝, 将标本内蓝染淋巴结视为SLN, 予以切除行常规病理检查, 对阴性结果者进一步行细胞角蛋白免疫组化(immunohistochemistry, IHC)染色。

结果: SLN检测阳性率89.5%(17/19), 获取SLN 1-3个/例, 平均1.4个/例。常规HE染色时, SLN诊断胃癌淋巴结转移的准确性为70.5%(12/17), 假阴性率为38.4%(5/13); IHC染色后使25.0%(1/4)胃癌病例的淋巴结病理分期得到上调, 诊断准确性提高至88.2%(15/17), 假阴性率降低至14.2%(2/14)。

结论: 胃癌SLN体外检测可作为辅助手段使部分胃癌病例的病理分期得到上调。

关键词: 胃癌; 前哨淋巴结; 测图

程黎阳, 陈晓东, 谢正勇, 周洪峰, 钟世镇. 胃癌前哨淋巴结体外检测的临床意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(17):2156-2159
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2156.asp>

0 引言

胃癌术中体内前哨淋巴结活检(sentinel lymph node biopsy, SLNB)已有成功经验^[1,2], 但关于胃癌术后体外SLN检测迄今尚无报道。我们用专利蓝对外科切除的新鲜胃癌标本进行淋巴显像(lymphatic mapping, LM), 在体外定位和识别胃癌SLN, 并对其进行重点病理检查, 以研究胃癌体外SLN检测的可行性及其对提高胃癌淋巴结病理分期准确性的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 术前胃镜确诊、影像学 and 超声内镜检查未发现明显邻近器官浸润和区域淋巴结转移的胃癌患者19例, 男13例, 女6例, 年龄32-76岁。上1/3(U)、中1/3(M)和下1/3(L)胃癌分别为2, 1和16例; Borrmann 1-4型胃癌各3, 5, 9和2例; 乳头状腺癌、管状腺癌、印戒细胞癌和粘液腺癌分别为4, 9, 3和3例; T1-T4期胃癌分别

为2, 12, 5和0例; 行远端胃大部分切除16例, 行全胃切除3例。行D2和D3淋巴结清扫的分别为12和7例。专利蓝(Sigma)配制成10 g/L溶液, 灭菌后分装备用。鼠抗细胞角蛋白(cytokeratin, CK)广谱mAb AE1/AE3, S-100蛋白和CD68 mAb, 及免疫组化二步法Elivision试剂盒均为Maxim Bio公司产品。剖腹后常规探查腹腔, 行D2-D3胃癌根治。手术遵循整块切除的原则, 尽量将胃区域淋巴结一并包涵在整块切除的标本内, 并保持相应淋巴通道的完整。胃癌淋巴结的分组分站参照日本胃癌处理规范第13版^[3]。No 9-11和No 13-16淋巴结分别予以单独切除。

1.2 方法 前16例为单独行体外LM, 后3例先在术中行体内LM, 并将染色淋巴结用缝线标记, 整块切除后在体外对标本再进行LM。标本切除离体后30 min内, 用5 mL注射器接4号半针头于胃癌病灶周围4点浆膜下分别注入1 mL 10 g/L的专利蓝溶液, 揉按注射部位约2-5 min, 10-15 min后可见胃壁表面和网膜内的蓝色淋巴管, 并循蓝色淋巴管追踪至蓝染淋巴结(图1), 将其视为SLN, 逐一解剖获取标本内的SLN和其他淋巴结, 标本固定包埋后, 每间隔200 μ m取4张厚度为4 μ m的石蜡切片, 其中1张作为常规HE染色用, 另3张分别用于CK、S-100蛋白和CD68免疫组化染色。非SLN仅行常规病理检查; SLN经HE染色诊断为转移阴性或可疑阳性, 则以AE1/AE3为探针, 采用二步法Eli Vision对其行IHC染色。用已知AE1/AE3阳性的结肠腺癌标本切片作阳性对照, 用磷酸缓冲盐液(PBS)代替特异性抗体(一抗)为阴性对照。当淋巴结边缘内的上皮样细胞浆内或细胞膜上仅表达AE1/AE3, 只要镜下见有染色的细胞团或散在的染色细胞即视为淋巴结微转移(lymph node micrometastasis, LNMM)阳性。通过SLN的病理状态预测胃癌周围淋巴结转移情况的各项诊断指标(诊断敏感率、诊断准确率、阴性预测率和假阴性率)按Veronesi *et al*^[4]报道的方法计算。

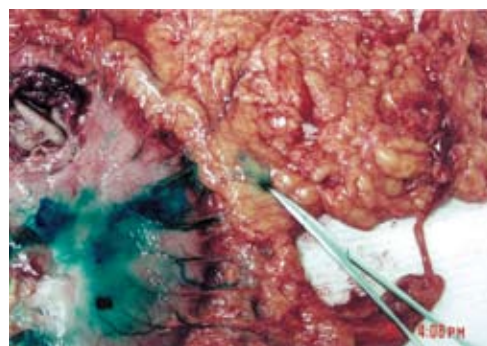


图1 新鲜胃癌手术切除标本内大弯侧蓝染淋巴结(SLN)。

2 结果

2.1 HE染色结果 在19例中至少获得1个或1个以上染色淋巴结的有17例, 成功率89.5%(17/19)。检测失败的2例中有1例染色组织经镜下检查证实为非淋巴结, 还有1例

未发现染色组织. SLN检出为1-3个/例, 平均1.4个/例. 3例先行体内后体外LM的病例中, 先前缝线标记的蓝染淋巴结染色进一步加深, 未发现新的蓝染淋巴结. 19例共获取非染色淋巴结295个, 平均每例15.5个. SLN检测成功的17例胃癌中有13例发生了淋巴结转移, 其中SLN转移阳性者占8例, SLN阴性而其他淋巴结阳性(假阴性)5例, SLN和非SLN皆阴性者4例. 这样SLN诊断胃癌淋巴结转移状况的敏感性为61.5%(8/13), 准确率为70.5%(12/17), 阴性预测值为44.4%(4/9), 假阴性率为38.4%(5/13).

2.2 IHC染色结果 假阴性SLN 5例中发现3例IHC染色阳性(图2), SLN和非SLN皆阴性4例中发现1例SLN有微转移灶, 这样就使25%(1/4)胃癌病例的淋巴结病理分期得到上调(upstaged), SLN诊断胃癌淋巴结转移状况的敏感性、准确率和阴性预测值分别提高到85.6%(12/14), 88.2%(15/17)和60%(3/5), 假阴性率降至14.2%(2/14).

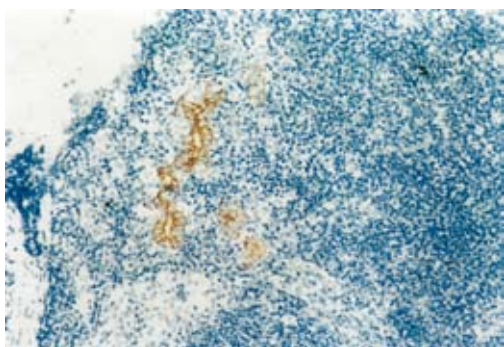


图2 胃癌SLN微转移灶 (CK-IHC, $\times 100$).

3 讨论

既往多认为恶性肿瘤的SLN检测应在体内生理状态下进行, 在体外对手术切除胃癌标本进行胃癌的SLN检测方法难被认同, 主要原因在于: (1) 失去了活体中生理性的淋巴流动和手术对淋巴管网的解剖性破坏; (2) 胃癌的SLN虽然多数在临近病灶处(N1), 但也可以是远离病灶的N2或N3淋巴结, 而即便是整块切除的胃癌手术标本也不可能将N1-N3的所有淋巴结都包括在内, 这是本研究的主要不足之处, 也可能是研究结果不尽满意、假阴性率偏高的原因所在. 但本研究的立论依据和临床意义在于: (1) 体内SLNB可能对患者产生不利影响: 为促进染料播散而对注射部位进行的揉按和为了显示隐蔽染色淋巴结而进行的解剖显露, 可能增加肿瘤扩散的机会和破坏整块切除的肿瘤手术原则; 人体内注入染料示踪剂可能出现过敏反应并增加污染机会和手术时间等^[5-7]. 而体外SLN检测无此弊端; (2) 体外检测SLN在胃癌中虽无报道, 但在结直肠癌中已有成功经验^[5, 6, 8], 其机理也得到了说明, 提示胃肠道肿瘤SLN体外检测的可行性; (3) Kitagawa *et al*^[9]指出: SLNB的本意是对较早期肿瘤病例的SLN进

行重点病理检查, 以提高判断肿瘤淋巴结转移情况的准确性. 本研究显示体外SLN检测已基本能达此目的. 目前在胃癌术中进行的体内SLNB, 终极目标是能据其结果指导胃癌的淋巴结清扫, 但实际上术中体内SLNB可能带来的缩小淋巴结清扫范围在胃癌外科中的意义目前并不明确^[10]; (4) 毕竟胃癌的SLN多数还是在病灶周围, 尤其是在较早期胃癌, 整块切除的手术标本应能包括多数的SLN(除外少数“跳跃性”转移的远处淋巴结)^[11]. 本研究IHC染色结果显示: 体外SLN检测在判断胃癌区域淋巴结转移情况的准确性高达88.2%, 此数据与体内SLNB结果相比虽有差距, 但已能说明该技术的可行性和有效性. 因此具有简便和成本效益优势的体外技术, 特别是在体内LM失败的情况下, 可作为一种补充手段, 结合目前的常规病理检查方法, 可能有助提高胃癌病理分期的准确性; (5) 区域淋巴结的转移状态是指导胃癌临床病理分期、评估胃癌预后及制定术后辅助治疗方案的最重要依据. 但目前对其诊断的方法存在着不全面和不彻底的缺陷. 现行的胃癌广泛性淋巴结清扫主要目的之一在于获得尽可能多的淋巴结, 以准确判定胃癌的临床病理分期, 但仍不能保证胃癌周围所有可能转移的淋巴结都得到了检查, 也无法用繁琐的连续切片、IHC染色或逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)等方法, 对胃癌D2根治所获得的数十个甚至上百个淋巴结都进行彻底的病理检查, 导致约有9-31%的LNMM不能被检出^[12]. 临床上胃癌清扫淋巴结病理检查皆阴性而术后复发的情况并不少见, 原因可能就在于此^[13]. 而体外标本中检出的胃癌SLN不但可代表其它淋巴结的病理状态, 又使病理医师可集中精力和物力对1至数个转移风险最大的SLN进行彻底病理检查. 本研究上调了25%(1/4)胃癌病例的淋巴结病理分期, 将为胃癌患者的预后评估和制定术后辅助治疗方案提供更可靠的依据.

4 参考文献

- 1 Miwa K, Kinami S, Taniguchi K, Fushida S, Fujimura T, Nonomura A. Mapping sentinel nodes in patients with early-stage gastric carcinoma. *Br J Surg* 2003;90:178-182
- 2 Ryu Kw, Lee JH, Kim HS, Kim YW, Choi IJ, Bae JM. Prediction of lymph nodes metastasis by sentinel node biopsy in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003;29:895-899
- 3 陈峻青. 日本胃癌处理规约第13版重要修改内容简介. *中国实用外科杂志* 2000;20:60-62
- 4 Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrida S, Bedoni M, Costa A, de Cicco C, Geraghty JG, Luini A, Sacchini V, Veronesi P. Sentinel node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. *Lancet* 1997;349:1864-1867
- 5 Fitzgerald TL, Khalifa MA, Al Zaharani M, Law CH, Smith AJ. Ex vivo sentinel lymph node biopsy in colorectal cancer: a feasibility study. *J Surg Oncol* 2002;80:27-32
- 6 Wong JH, Johnson DS, Namiki T, Tauchi-Nishi P. Validation of ex vivo lymphatic mapping in hematoxylin-eosin node-negative carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg Oncol* 2004;11:772-777

- 7 Cimmino VM, Brown AC, Szocik JF, Pass HA, Moline S, De SK, Domino EF. Allergic reactions to isosulfan blue during sentinel node biopsy-a common event. *Surgery* 2001;130:439-442
- 8 Wood TF, Saha S, Morton DL, Tsioulis GJ, Rangel D, Hutchinson W Jr, Foshag LJ, Bilchik AJ. Validation of lymphatic mapping in colorectal cancer: in vivo, ex vivo, and laparoscopic techniques. *Ann Surg Oncol* 2001;8:150-157
- 9 Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubota T, Ando N, Watanabe M, Ohgami M, Otani Y, Ozawa S, Hasegawa H, Furukawa T, Kumai K, Ikeda T, Nakahara T, Kubo A, Kitajima M. The role of the sentinel lymph node in gastrointestinal cancer. *Surg Clin North Am* 2000;80:1799-1809
- 10 程黎阳, 钟世镇, 黄宗海. 胃癌前哨淋巴结活检中存在的问题及思考. *中国实用外科杂志* 2003;23:569-572
- 11 Kosaka T, Ueshige N, Sugaya J, Nakano Y, Akiyama T, Tomita F, Saito H, Kita I, Takashima S. Lymphatic routes of the stomach demonstrated by gastric carcinomas with solitary lymph node metastasis. *Surg Today* 1999;29:695-700
- 12 Nieweg OE, Bartelink H. Implications of lymphatic mapping for staging and adjuvant treatment of patients with breast cancer. *Eur J Cancer* 2004;40:179-181
- 13 郑树. 胃肠肿瘤研究新热点. *中华胃肠外科杂志* 2001;4:207-209

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

气囊扩张术联合肉毒素注射序贯治疗贲门失弛缓症的近期及远期疗效

弭希峰, 黄子成, 王木成, 李水淼

弭希峰, 黄子成, 王木成, 李水淼, 福建医科大学临床教学医院泉州市第一医院内窥镜科 福建省泉州市 362000

通讯作者: 弭希峰, 362000, 福建省泉州市鲤城区东街250号, 福建省泉州市第一医院内窥镜科.

电话: 0595-22277329

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-28

Short-term and long-term effect of pneumatic dilation and botulinum toxin injection in treatment of cardiac achalasia

Xi-Feng Mi, Zi-Cheng Huang, Mu-Cheng Wang, Shui-Miao Li

Xi-Feng Mi, Zi-Cheng Huang, Mu-Cheng Wang, Shui-Miao Li, Department of Endoscopy, the First Hospital of Quanzhou City, Clinical Teaching Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Correspondence to: Xi-Feng Mi, Department of Endoscopy, the First Hospital of Quanzhou, 250 Dong Road, Licheng District, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Received: 2005-06-28 Accepted: 2005-07-28

Abstract

AIM: To evaluate the short-term and long-term effect of the pneumatic dilation and botulinum toxin A (BTXA)

injection for the cardiac achalasia.

METHODS: From July 2000 to May 2004, 35 patients with cardiac achalasia received pneumatic dilation and BTXA injection in our hospital. The improvement of the dysphagia was observed 1 and 12 mo after the treatment.

RESULTS: Of the 35 patients, their conditions of dysphagia were significantly improved. The efficacy rates were 100% and 93.9% in the following up (1 and 12 mo, respectively). Two patients were lost to follow up while dysphagia relapsed in three patients during the following up.

CONCLUSION: The pneumatic dilation and BTXA injection for cardiac achalasia is safe, stable and effective in the treatment of cardiac achalasia.

Key Words: Pneumatic dilation; Botulinum toxin A; Achalasia

Mi XF, Huang ZC, Wang MC, Li SM. Short-term and long-term effect of pneumatic dilation and botulinum toxin injection in treatment of cardiac achalasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2159-2161

摘要

目的: 探讨气囊扩张术联合A型肉毒素(botulinum toxin A, BTXA)注射序贯治疗贲门失弛缓症的近期及远期疗效。

方法: 收集2000-07/2004-05在我院确诊的行内镜下气囊扩张术联合肉毒素注射治疗的贲门失弛缓症患者35例, 观察术后1及12 mo以上吞咽困难症状改善情况。

结果: 共35例患者, 所有患者术后吞咽困难消失或明显改善, 随访1及12 mo有效率分别为100%和93.9%。1 a失访共2例, 复发共3例。

结论: 气囊扩张术联合内镜下肉毒素注射治疗贲门失弛缓症疗效好, 长期疗效稳定, 操作安全, 有进一步研究应用的前景。

关键词: 气囊扩张术; A型肉毒素; 失弛缓症

强希峰, 黄子成, 王木成, 李水淼. 气囊扩张术联合肉毒素注射序贯治疗贲门失弛缓症的近期及远期疗效. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2159-2161 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2159.asp>

0 引言

贲门失弛缓症为食管运动功能障碍性疾病, 吞咽困难症状顽固且不断加重, 药物治疗效果差. 单纯扩张治疗或肉毒素注射治疗远期疗效低, 我们近年来开展了内镜下气囊扩张术联合肉毒素注射治疗此病, 取得了满意效果及一些经验, 现总结如下。

1 材料和方法

1.1 材料 自2000-07/2004-05我院收治的贲门失弛缓症病人35例, 其中男16例, 女19例, 年龄17-68岁, 平均38.5岁, 病程3 mo-24 a, 平均5.5 a. 既往治疗: 口服药物治疗28例(80.0%), 单纯其他扩张治疗3例(8.6%), 未经任何治疗4例(11.4%)。

1.2 方法

1.2.1 临床症状 所有患者均有不同程度的吞咽困难(100%), 其吞咽困难按stooley分级法^[1]分4级: I级: 能进软食; II级: 能进半流饮食; III级: 能进流质饮食; IV级: 不能进食. 其中I级6例(17.1%), II级11例(31.4%), III级11例(31.4%), IV级7例(20%), 呕吐与反流30例(85.7%), 胸骨后疼痛29例(82.9%)。

1.2.2 X线碘水造影检查 35例患者术前均行放射线下碘水造影检查, 一般均用20 mL泛影葡胺, 通过贲门口受阻, 漏斗状或鸟嘴样改变, 食管中下段均有不同程度的扩张, 有3例患者食管全程扩张, 食管横径最大达8 cm. 于造影后第2天依次行以下治疗。

1.2.3 扩张方法 应用GIF-240型电子胃镜(Olympus)及美国波士顿公司生产的直径3 cm或3.5 cm的Rigiflex扩张气囊及其专用气泵, 术前静脉注射杜冷丁25 mg、安定

5 mg. 术中先行胃镜检查以排除器质性梗阻病变, 明确定位. 我们应用的导丝在导丝弹簧头的前端有一根3 cm的引导线, 经内镜活检孔道插入活检钳, 钳夹导丝前端引导线一次进镜可完成内镜直视扩张过程. 延导丝将直径3 cm或3.5 cm的气囊中部置放于贲门区, 缓慢加压注气3次, 压力分别约为20、34、48 kPa, 每次持续1-3 min, 间隔1-3 min, 然后将气囊及导丝一起退出. 镜下观察了解贲门口扩张及其撕裂出血等情况. 术后视病情禁食8-24 h, 适量应用抗生素及局部止血药。

1.2.4 肉毒素注射方法 于扩张治疗后1-3 wk内进行, 应用GIF-240型电子胃镜和NM-3KM硬变治疗注射针(Olympus), 针尖长0.4 cm, 于贲门齿状线上方约0.5 cm, 尽可能垂直于黏膜面刺入注射针, 以保证注入固有肌层, 分别于12点、3点、6点、9点各注射BTXA(兰州生物制品研究所产)20 U(1 mL), 术后当日进温凉流质饮食, 次日即可进普食。

1.2.5 疗效判定 吞咽困难减轻1级为有效, 减轻2级或无吞咽困难为显效, 随访观察治疗1 mo及12 mo时病人的吞咽困难症状的情况, 治疗后1 mo的疗效作为近期疗效, 治疗后1 a以上的疗效作为远期疗效。

2 结果

2.1 疗效 35例共行气囊扩张36次、BTXA注射治疗36次, 其中1例于治疗后第2个月再行第2次序贯治疗. 随访1 mo后者35例, 症状轻度反弹1例; 1 a后者33例, 失访2例, 有4例症状较治疗后早期加重, 但仍好于治疗前. 有2例复发且症状回复到治疗前状态, 其中1例为3 mo内复发, 1例为术后3 mo-1 a内复发(表1), 均为女性患者。

表1 气囊扩张术联合肉毒素注射治疗后近期及远期疗效

时间	显效	有效	无效
治疗后1 mo	34 (97.1%)	1 (2.9%)	0
治疗后12 mo	27 (81.8%)	4 (12.1%)	2 (6.1%)

2.2 并发症 1例术后内镜复查见贲门撕裂口深, 出血较多, 经吞碘剂造影未排除食道穿孔, 经严格的禁食、减压及药物治疗好转, 5 d后恢复饮食. 明显的反流性食管炎19例(54.3%), 气囊扩张及BTXA注射术中患者均出现程度不一的胸痛, 无上消化道大出血及明显感染等并发症。

3 讨论

贲门失弛缓症被认为是食管壁肌间神经丛内抑制性神经元的选择性丧失, 导致乙酰胆碱能神经无对抗性兴奋, 使食管下括约肌(LES)不能松弛^[2], 治疗主要是减轻由于LES不完全松弛导致的远端食管梗阻, 以缓解症状, 改善和恢复食管排空以及防止巨食管形成. 目前的治疗方法有探条扩张、长短期金属支架置入、气囊扩张、手术及LES内注射肉毒杆菌毒素等^[3-5]. 探条扩张术因其较

差的治疗效果和较多的并发症而被弃用. 外科手术治疗因创伤大、复发率高有衰减趋势. 气囊扩张治疗是使用外力强行扩张失去弛缓功能的LES, 使其部分肌纤维断裂, 使LES压力下降, 部分或完全纠正LES松弛障碍, 改善食管排空, 缓解症状, 因此其治疗效果跟气囊的直径、压力有关. 较多学者证实分级扩张治疗效果较好^[6-12], 但分级的压力和气囊直径大小是导致食管穿孔的两项独立危险因素, 国外文献^[3]报道最高穿孔率达18%, 国内报道的穿孔并发症相对较低. 并且单纯扩张治疗远期疗效不能令人满意, Dobrucali *et al*^[13]报道经内镜下气囊分级扩张治疗后随访平均2.4 a的有效率为88%, West *et al*^[14]近年完成的较大样本远期疗效观察发现总有效率仅为50%, 且大部分患者经历了3-6次扩张治疗, 病情复发后再次扩张增加了患者的痛苦、经济负担和发生出血、穿孔等并发症的机会, 因此我们认为单纯的扩张方法有待改进. 最近有学者^[15, 16]研究了短期(3-7 d)和长期持续放置金属支架与单纯扩张气囊扩张治疗进行对比治疗贲门失弛缓症, 认为效果较好, 其机制同样是对贲门肌纤维的慢性撕裂过程, 该方法有待进一步大样本临床试验验证. 肉毒素注射治疗是贲门失弛缓症的又一治疗方法. 肉毒素是肉毒杆菌产生的外毒素, 以其抗原的不同分为7个不同类型, 其中对A型的研究较多, 其作用于运动神经末梢神经肌肉接头处, 抑制突触前膜乙酰胆碱的释放, 阻断神经冲动的传递, 导致肌肉松弛麻痹^[17, 18]. 王社论^[19]综述了肉毒素的作用机制和国内外的临床应用情况, 认为BTXA治疗贲门失弛缓症近期疗效好, 痛苦小, 无明显毒副作用. 一般认为单次注射肉毒杆菌毒素疗效保持约6-7 mo, 78%的患者需要注射两次或两次以上^[20]; Pasricha *et al*^[17]观察了BTXA治疗本病的长期疗效, 即时有效率90%(28/31), 3 mo有效率65%. 有人^[18]认为扩张疗法和手术治疗贲门失弛缓症失败后, 经内镜注射BTXA治疗仍有效. Katzka *et al*^[21]认为BTXA作为诊断性治疗试验在选择贲门失弛缓症的进一步根本性治疗中有重要作用. 我们结合国内外的经验选择先气囊扩张后肉毒素注射的序贯治疗, 目前的资料还不完全, 从现有的35例治疗结果看, 序贯治疗同样有较好的可操作性, 治疗后全部患者的症状有极明显的改善, 无明显副作用或并发症发生, 随访1 a后仅2例无效(6.1%)复发, 说明经内镜下气囊扩张和肉毒素注射序贯治疗的确是一种安全、可靠、近远期疗效好的治疗方法. 该方法和单纯气囊扩张或肉毒素注射治疗的疗效对比还在进一步的观察中.

4 参考文献

- 1 胡运彪. 食管狭窄的扩张治疗. 内镜 1991;8:15
- 2 陈达民. 肉毒杆菌毒素的胃肠应用. 国外医学·消化系疾病分册 1998;18:169-171
- 3 Kadakia SC, Wong RK. Graded pneumatic dilation using Rigiflex achalsia dilators in patients with primary esophageal achalasia. *Am J Gastroenterol* 1993;88:34-38
- 4 Vaezi MF, Richter JE. Current therapies for achalasia: comparison and efficacy. *J Clin Gastroenterol* 1998;27:21-35
- 5 Peracchia A, Bonavina L. Achalasia: dilation, injection or surgery? *Can J Gastroenterol* 2000;14:441-443
- 6 Hoogerwerf WA, Pasricha PJ. Achalasia: treatment options revisited. *Can J Gastroenterol* 2000;14:406-409
- 7 Scarpignato C. New therapeutic modalities for benign oesophageal disease: an overview. *Dig Liver Dis* 2001;33:260-265
- 8 Urbach DR, Hansen PD, Khajanchee YS, Swanson LL. A decision analysis of the optimal initial approach to achalasia: laparoscopic Heller myotomy with partial fundoplication, thoracoscopic Heller myotomy, pneumatic dilatation, or botulinum toxin injection. *J Gastrointest Surg* 2001;5:192-205
- 9 Kadakia SC, Wong RK. Pneumatic balloon dilation for esophageal achalasia. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2001;11:325-346
- 10 Bittinger M, Wienbeck M. Pneumatic dilation in achalasia. *Can J Gastroenterol* 2001;15:195-199
- 11 陈维雄, 程英升, 杨仁杰, 李明华, 庄奇新, 陈尼维, 许建荣, 尚克中. 暂时性金属内支架扩张术介入治疗贲门失弛缓及其远期疗效分析. 世界华人消化杂志 2000;8:896-899
- 12 程英升, 杨仁杰, 李明华, 尚克中, 陈维雄, 陈尼维, 储榆德, 庄奇新. 上胃肠道良恶性狭窄或阻塞的介入治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:1354-1360
- 13 Dobrucali A, Erzin Y, Tuncer M, Dirican A. Long-term results of graded pneumatic dilatation under endoscopic guidance in patients with primary esophageal achalasia. *World J Gastroenterol* 2004;10:3322-3327
- 14 West RL, Hirsch DP, Bartelsman JF, de Borst J, Ferwerda G, Tytgat GN, Boeckxstaens GE. Long term results of pneumatic dilation in achalasia followed for more than 5 years. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1346-1351
- 15 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
- 16 陈维雄, 程英升, 杨仁杰, 李明华, 尚克中, 庄奇新, 陈尼维. 食管良性狭窄金属内支架介入治疗随访研究. 世界华人消化杂志 2002;10:333-336
- 17 Pasricha PJ, Rai R, Ravich WJ, Hendrix TR, Kalloo AN. Botulinum toxin for achalasia: long-term outcome and predictors of response. *Gastroenterology* 1996;110:1410-1415
- 18 Jankovic J, Brin MF. Therapeutic uses of botulinum toxin. *N Engl J Med* 1991;324:1186-1194
- 19 王社论. 肉毒毒素治疗贲门失弛缓症. 世界华人消化杂志 2000;8:327-328
- 20 Richter JE. Comparison and cost analysis of different treatment strategies in achalasia. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2001;11:359-370
- 21 Katzka DA, Castell DO. Use of botulinum toxin as a diagnostic/therapeutic trial to help clarify an indication for definitive therapy in patients with achalasia. *Am J Gastroenterol* 1999;94:637-642

肝硬化患者糖代谢变化临床分析46例

罗庆锋, 许乐, 傅亮

罗庆锋, 许乐, 傅亮, 卫生部北京医院消化内科 北京市 100730
通讯作者: 罗庆锋, 100730, 北京市东单大华路1号, 北京医院消化内科.
luoqf2000@sohu.com
电话: 010-65132266-6142
收稿日期: 2005-08-01 接受日期: 2005-08-20

Changes of glucose metabolism in patients with liver cirrhosis: an analysis of 46 cases

Qing-Feng Luo, Le Xu, Liang Fu

Qing-Feng Luo, Le Xu, Liang Fu, Department of Gastroenterology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China
Correspondence to: Qing-Feng Luo, Department of Gastroenterology, Beijing Hospital, 1 Dongdan Dahua Road, Beijing 100730, China.
luoqf2000@sohu.com
Received: 2005-08-01 Accepted: 2005-08-20

Abstract

AIM: To investigate the changes of glucose metabolism and the possible mechanism.

METHODS: The levels of plasma glucose, insulin and C-peptide were measured in 46 patients with liver cirrhosis and 25 healthy people before (fasting) and 2 h after the oral glucose tolerance test (OGTT). The insulin sensitivity index (ISI) was calculated. All the results were analyzed comparatively.

RESULTS: In patients with liver cirrhosis, the levels of fasting plasma glucose and C-peptide were 5.58 ± 2.14 mmol/L and 593 ± 156 pmol/L, respectively ($P > 0.05$); 2 h after OGTT, the levels of plasma glucose and C-peptide were 11.97 ± 4.20 mmol/L and 3411 ± 964 pmol/L, respectively, which were significantly higher than those in the healthy controls ($P < 0.05$). In the liver cirrhosis patients, the levels of plasma insulin before (fasting) and 2 h after the OGTT were 12.23 ± 5.4 mU/L and 105.16 ± 40.70 mU/L, respectively, which were significantly higher than those in the healthy controls ($P < 0.05$). The value of ISI in liver cirrhosis patients was significantly lower than that in the healthy controls (1.47 ± 0.54 vs 2.73 ± 0.62 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Abnormal glucose metabolism exists in patients with liver cirrhosis, and its mechanism may be related to the insulin resistance.

Key Words: Liver cirrhosis; Glucose metabolism; Insulin

Luo QF, Xu L, Fu L. Changes of glucose metabolism in patients with liver cirrhosis: an analysis of 46 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(17):2162-2164

摘要

目的: 探讨肝硬化患者糖代谢变化及其可能的致病机制。

方法: 对46例肝硬化患者及25例正常人分别测定空腹及口服75 g葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)2 h后的血糖、血浆胰岛素及C肽水平, 计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI), 并对各项结果进行比较分析。

结果: 肝硬化组空腹血糖、C肽水平分别为 5.58 ± 2.14 mmol/L、 593 ± 156 pmol/L, 较对照组差异均没有显著性意义($P > 0.05$); OGTT 2 h后血糖、C肽水平分别为: 11.97 ± 4.20 mmol/L、 3411 ± 964 pmol/L, 均明显高于对照组($P < 0.05$); 而胰岛素测定结果可见肝硬化患者空腹及OGTT 2 h后胰岛素水平分别为: 12.23 ± 5.4 mU/L、 105.16 ± 40.70 mU/L, 均明显高于对照组; 肝硬化组ISI显著低于对照组(1.47 ± 0.54 vs 2.73 ± 0.62 , $P < 0.05$)。

结论: 肝硬化患者存在明显的糖代谢异常, 这种糖代谢异常与胰岛素抵抗有关。

关键词: 肝硬化; 糖代谢; 胰岛素

罗庆锋, 许乐, 傅亮. 肝硬化患者糖代谢变化临床分析46例. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2162-2164
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2162.asp>

0 引言

肝脏对体内葡萄糖的代谢起着重要的调节作用, 是维持血糖稳定的重要器官. 而肝硬化是累及全身各脏器的慢性疾病. 肝硬化患者合并糖尿病是影响生存期的一个危险因素, 患者有较高的死亡率^[4,8]. 为了探讨肝硬化患者糖代谢变化及其可能的发病机制, 我们对46例肝硬化患者及25例正常人进行了空腹及口服75 g葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)2 h后的血糖、血浆胰岛素及C肽水平的测定。

1 材料和方法

1.1 我院2002-06/2003-11根据病史、临床表现、肝功能检查及腹部B超、腹部CT、胃镜结果确诊的肝硬化患

者46例,其中男性37例,女性9例,年龄28-73岁,平均55.4岁.根据Child-Pugh计分及分级:A级17例,B级21例,C级8例.其中病毒性肝炎性肝硬化28例,酒精性肝硬化9例,血吸虫性肝硬化2例,原发性胆汁性肝硬化2例,原因未明5例.体重指数 $19.5 \pm 2.7 \text{ kg/m}^2$.所有病例均无糖尿病家族史,无胰腺疾患史.同期无心、肝、肾疾患及家族史的正常人25例,年龄29-74岁,平均59.3岁,其中女性9例,男性16例,体重指数 $21.1 \pm 3.5 \text{ kg/m}^2$.

1.2 方法

1.2.1 受试者试验前一天晚12点后禁食,次晨空腹取静脉血后口服葡萄糖75 g,120 min后再取静脉血,分别测定血糖(葡萄糖氧化酶法测定)、血浆胰岛素及C肽水平(采用化学发光法测定).

1.2.2 计算胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)测定参照文献^[3]计算ISI的方法: $ISI = 1 / [\text{空腹血糖}(\text{mmol/L}) \times \text{空腹胰岛素}(\text{mU/L})]$.

统计学处理 所有数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,两组计量资料的比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 肝硬化患者组空腹血糖水平较对照组略高,但 $P > 0.05$ 差异没有显著性意义;口服75 g葡萄糖后,46例肝硬化患者中,25例显示糖耐量异常,其中6例诊断为糖尿病(1例空腹血糖升高,5例口服75 g葡萄糖2 h后的血糖升高均达到糖尿病的诊断标准).

2.2 口服75 g葡萄糖后,胰岛素测定结果可见肝硬化患者空腹及120 min后胰岛素水平均明显高于对照组, $P < 0.05$ 差异有显著意义.

2.3 C肽测定结果显示肝硬化患者的空腹水平较正常组无明显差异,但口服葡萄糖负荷后120 min时的C肽水平显著高于对照组.

2.4 计算肝硬化组及对照组的ISI并进行检验,两组ISI分别为 1.47 ± 0.54 和 2.73 ± 0.62 ,两组比较 $P < 0.05$,差异有显著意义(表1).

3 讨论

肝硬化患者60-80%可发生糖耐量异常,而10-15%在疾病的自然病程中可最终发展为糖尿病^[6,8,13].本研究肝硬化患者中空腹及口服75 g葡萄糖2 h后的血糖结果显示糖

耐量异常为54.3%,其中6例诊断为糖尿病,而且5例空腹血糖正常,在葡萄糖负荷后才达糖尿病诊断标准.因此对肝硬化患者,除常规检查空腹血糖外,最好再行口服葡萄糖耐量实验,以早期发现糖耐量异常或糖尿病.

肝硬化与相关的糖代谢异常的发生机制尚未完全阐明,目前认为胰岛素抵抗可能是最主要的原因^[4].本研究结果显示肝硬化患者组空腹血糖水平较对照组略高,但 $P > 0.05$ 差异没有显著性意义,但其胰岛素基础水平较正常人增高,说明存在高胰岛素血症,口服葡萄糖后2 h胰岛素水平亦明显高于对照组,而口服75 g葡萄糖后糖耐量异常,可以推测胰岛素敏感性下降.基于空腹血糖及空腹胰岛素浓度的指标与胰岛素的敏感性有很好的相关性^[5],本研究以空腹胰岛素水平与血糖水平乘积的倒数作为胰岛素敏感性指数,用该指数分析本组肝硬化患者的胰岛素敏感性,结果低于正常组,差异有显著意义,提示患者存在胰岛素抵抗.

胰岛素抵抗是指组织对胰岛素不敏感,包括肝内及肝外胰岛素抵抗.肝硬化患者的一个显著特征是外周组织(主要是骨骼肌,其次是脂肪组织)胰岛素抵抗.肝硬化骨骼肌胰岛素抵抗表现为葡萄糖摄取减少和非氧化葡萄糖处置(糖原合成)减少;此外,肝硬化脂肪组织也存在胰岛素抵抗^[4].

肝硬化引起胰岛素抵抗的因素有^[1,4,10,12]:(1)高胰岛素血症:胰岛素需与靶细胞表面的特异性胰岛素受体结合,才能启动内在的代谢效应,而胰岛素受体数目与亲和力主要受血浆胰岛素水平的影响.血清胰岛素浓度增加可引起受体数目的减少;当胰岛素与受体结合后,可使毗邻受体与胰岛素的亲和力降低.(2)肝硬化时肝内胰岛素抵抗主要由肝功能减退及门体静脉分流造成.肝功能减退使胰岛素降解减少,分流引起的门脉血流降低使肝细胞摄取胰岛素减少,分流阻断后糖耐量可以改善;同时肝内胰岛素受体减少和生理效应减低,也引起肝脏胰岛素抵抗.(3)胰高血糖素、生长激素增加:胰高血糖素、生长激素能拮抗胰岛素的作用,可导致肝硬化患者空腹血浆胰岛素水平升高.另外,Lin *et al*报道^[6],血清可溶性肿瘤坏死因子受体水平升高与肝硬化胰岛素抵抗相关,提示肿瘤坏死因子系统在调节胰岛素活性上起重要作用.

在我国,病毒性肝炎是导致肝硬化最常见的原因.文献报道,在慢性病毒性肝炎的早期阶段胰岛素抵

表1 肝硬化组与正常对照组空腹及口服75 g葡萄糖2 h后的血糖、血浆胰岛素、C肽水平及ISI的比较 ($\text{mean} \pm \text{SD}$)

组别	空腹			口服75 g葡萄糖120 min后			ISI($\times 100$)
	血糖(mmol/L)	胰岛素(mU/L)	C肽(p mol/L)	血糖(mmol/L)	胰岛素(mU/L)	C肽(p mol/L)	
肝硬化组($n = 46$)	5.58 ± 2.14	12.23 ± 5.4	593 ± 156	9.97 ± 4.20	105.16 ± 40.70	3411 ± 964	1.47 ± 0.54
正常组($n = 25$)	5.15 ± 1.77	7.12 ± 4.21	569 ± 133	5.66 ± 2.15	26.93 ± 11.76	1211 ± 539	2.73 ± 0.62
t 值	0.86	4.10	0.65	4.79	9.37	10.53	8.91
P 值	$P > 0.05$	$P < 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$

抗便已存在,且随肝纤维化的加重而进展.慢性病毒性肝炎患者中,OGTT发现27.5%的患者出现糖耐量下降、糖尿病等糖代谢异常,胰岛素抵抗和 β 细胞功能不良是主要原因.肝炎病毒感染与胰岛素抵抗间存在基因特异性联系,同时胰岛素抵抗增加肝纤维化的进程. β 细胞分泌功能不全与基因及病毒因素有关,肝炎病毒虽在肝内复制,但其基因组可出现在肝内胆管、胰腺等其他多种组织,肝炎病毒诱导的免疫过程中产生的细胞因子也参与引起 β 细胞分泌功能不全.老年、肥胖、严重肝纤维化、糖尿病家族史是病毒性肝炎合并糖尿病的潜在危险因素^[7,9,11,15].

测定C肽能反映胰岛 β 细胞的生成和分泌胰岛素的能力,且受肝、肾功能的影响较小,因此较测定胰岛素水平更好^[2].本研究肝硬化患者OGTT结果也显示有胰岛素分泌异常.患者空腹C肽水平与正常人的差异不显著,葡萄糖负荷C肽水平升高,且明显高于正常,提示存在胰岛素的高分泌.由于胰岛素抵抗和葡萄糖效应减小引起的糖负荷后高血糖血症,致使胰岛 β 细胞增生,胰岛体积增大, β 细胞对高葡萄糖应答增强.但如 β 细胞长期处于胰岛素高分泌状态,最终可致衰竭^[4,14].肝移植可以缓解胰岛素抵抗,只能治愈约67%的肝源性糖尿病,而剩下的33%不能治愈是因为 β 细胞功能降低依然存在.因此胰岛素抵抗只是肝硬化初期的表现, β 细胞功能障碍是发展为糖尿病的关键因素^[13].

肝硬化糖耐量异常或糖尿病的发生与肝硬化的原因及病程无明显相关,但老年人和营养不良者更易发生糖代谢异常^[1,4],因此临床上应引起重视.

4 参考文献

- 1 漆德芳,孟申,刘健.肝硬化.第一版.北京:北京科学技术出版社 2000;631-632
- 2 胡绍文,郭瑞林,童光焕.实用糖尿病学.第二版.北京:人民军医出版社 2003;76-81
- 3 李光伟,潘孝仁, Lillioja S, Bennett P.H. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数.中华内科杂志 1993;32:656-660
- 4 钱学敏.肝硬化糖代谢异常发生机制.国外医学内科学分册 2001;28:380-383
- 5 Perseghin G, Caumo A, Mazzaferro V, Pulvirenti A, Piceni Sereni L, Romito R, Lattuada G, Coppa J, Costantino F, Regalia E, Luzi L. Assessment of insulin sensitivity based on a fasting blood sample in men with liver cirrhosis before and after liver transplantation. *Transplantation* 2003;76:697-702
- 6 Lin SY, Wang YY, Sheu WH. Increased serum soluble tumor necrosis factor receptor levels are associated with insulin resistance in liver cirrhosis. *Metabolism* 2004;53:922-926
- 7 Narita R, Abe S, Kihara Y, Akiyama T, Tabaru A, Otsuki M. Insulin resistance and insulin secretion in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2004;41:132-138
- 8 Tietge UJ, Selberg O, Kreter A, Bahr MJ, Pirlich M, Burchert W, Muller MJ, Manns MP, Boker KH. Alterations in glucose metabolism associated with liver cirrhosis persist in the clinically stable long-term course after liver transplantation. *Liver Transpl* 2004;10:1030-1040
- 9 Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, McCaughan GW, George J. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression [corrected]. *Gastroenterology* 2003;125:1695-1704
- 10 Petrides AS, Vogt C, Schulze-Berge D, Matthews D, Strohmeier G. Pathogenesis of glucose intolerance and diabetes mellitus in cirrhosis. *Hepatology* 1994;19:616-626
- 11 Petit JM, Bour JB, Galland-Jos C, Minello A, Verges B, Guiguet M, Brun JM, Hillon P. Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;35:279-283
- 12 Tanabe N, Ishii M, Sato Y, Akahane T, Kobayashi N, Gama H, Iwasaki T, Toyota T. Effects of collateral vessel occlusion on oral glucose tolerance test in liver cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2000;45:581-586
- 13 Perseghin G, Mazzaferro V, Sereni LP, Regalia E, Benedini S, Bazzigaluppi E, Pulvirenti A, Leao AA, Calori G, Romito R, Baratti D, Luzi L. Contribution of reduced insulin sensitivity and secretion to the pathogenesis of hepatogenous diabetes: effect of liver transplantation. *Hepatology* 2000;31:694-703
- 14 Greco AV, Mingrone G, Mari A, Capristo E, Manco M, Gasbarrini G. Mechanisms of hyperinsulinaemia in Child's disease grade B liver cirrhosis investigated in free living conditions. *Gut* 2002;51:870-875
- 15 Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004;126:840-848

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

干扰素- α 联合乙型肝炎疫苗治疗慢性乙型肝炎16例

任粉玉, 朴熙绪, 任淑子

任粉玉, 朴熙绪, 任淑子, 吉林省延边大学医学院附属医院消化内科
吉林省延吉市 133000

通讯作者: 任粉玉, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学医学院附属医院消化内科. fenyu65@yahoo.com.cn

电话: 0433-2660061 传真: 0433-2513610

收稿日期: 2005-05-31 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨干扰素- α 联合乙型肝炎疫苗治疗慢性乙型肝炎的疗效。

方法: 选择HBV DNA阳性的慢性乙型肝炎32例, 分为A、B两组: A组16例接受干扰素- α (赛若金)单独治疗, 每次注射干扰素- α 5 MU, 3次/wk, 连续给予6 mo. B组16例接受干扰素- α 和乙型肝炎疫苗联合治疗, 每次注射干扰素- α 5 MU, 3次/wk, 连续给予6 mo, 另外, 干扰素- α 注射4 wk和12 wk时注射乙型肝炎蛋白疫苗10 μ g. 治疗前检查ALT与HBV DNA, HBeAg, anti-HBe; 治疗开始后每2 mo检查1次HBV DNA, ALT, HBeAg, anti-HBe; 治疗结束后每3 mo复查HBV DNA, ALT, HBeAg, anti-HBe, 共随访6 mo.

结果: 治疗结束后与随访6 mo的结果显示, B组的血清HBV DNA阴转率(分别为37.5%与50.0%)显著高于A组(分别为25.0%与37.5%, $P<0.05$); B组血清HBe/抗-HBe转换率(分别为25.0%与37.5%)显著高于A组(分别为12.5%与18.8%, $P<0.05$), 两组间具有显著差异。

结论: 干扰素- α 联合乙型肝炎疫苗治疗慢性乙型肝炎的抗病毒效果显著优于单独使用干扰素治疗效果。

关键词: 干扰素- α ; 乙型肝炎疫苗; 慢性乙型肝炎

任粉玉, 朴熙绪, 任淑子. 干扰素- α 联合乙型肝炎疫苗治疗慢性乙型肝炎16例. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2165-2166

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2165.asp>

0 引言

干扰素是目前治疗慢性乙型肝炎的有效药物之一, 它可以显著抑制乙型肝炎病毒(HBV)的复制, 促进HBV DNA阴转和乙型肝炎e抗原(HBeAg)的血清学转换, 促进肝功能的复常, 但是HBeAg, HBV DNA阴转率均在30-40%左右^[1]. 乙型肝炎蛋白疫苗治疗慢性乙型肝炎, 抑制HBV DNA复制率可达到30%左右^[2-4]. 如何提高抗病毒治疗效果, 是当前急需解决的问题^[5]. 为此, 我们选用干扰素- α 和乙型肝炎疫苗联合治疗法, 进行了前瞻性的临床研究, 获得较好的临床疗效如下。

1 材料和方法

1.1 材料 根据2000年西安会议修订的病毒性肝炎防治方案指定的慢性乙型肝炎诊断标准^[6], 2003-01/2005-04住院HBV DNA阳性的慢性乙型肝炎32例, 未进行过抗病毒治疗, 且排除HCV, HDV感染. 分为A, B两组, 治疗前两组间HBV DNA, HBeAg阳性率、ALT水平无明显差异(表1).

1.2 方法 A组16例接受干扰素- α 独治疗, 每次注射干扰素- α 5 MU, 3次/wk, 连续给予6 mo. B组16例接受干扰素- α 和乙型肝炎疫苗联合治疗, 每次注射干扰素- α 5 MU, 3次/wk, 连续给予6 mo, 另外, 干扰素- α 注射4 wk和12 wk时注射乙型肝炎蛋白疫苗10 μ g. 治疗前检查ALT与HBV DNA, HBeAg, anti-HBe; 治疗开始后每2 mo检查1次HBV DNA, ALT, HBeAg, anti-HBe; 治疗结束后每3 mo复查HBV DNA, ALT, HBeAg, anti-HBe, 共随访6 mo.

统计学处理 数据做 t 检验, χ^2 检验。

表1 慢性乙型肝炎患者治疗前的临床特征

临床特征	A组	B组
患者(n)	16	16
男/女	3/13	5/11
年龄(岁)	43 $\pm$ 12	41 $\pm$ 13
HBV DNA (copies/L)	1.8 $\times$ 10 ⁶ $\pm$ 1.9 $\times$ 10 ³	1.9 $\times$ 10 ⁶ $\pm$ 2.5 $\times$ 10 ³
ALT (nkat/L)	1402.8 $\pm$ 350.7	1436.2 $\pm$ 317.3

2 结果

治疗结束及随访6 mo, 血清HBV DNA阴转率以及HBe/抗-HBe转换率结果均提示, 干扰素- α 联合乙型肝炎疫苗治疗慢性乙型肝炎的抗病毒效果显著优于单独使用干扰素治疗效果($P<0.05$) (表2)。

3 讨论

干扰素和拉米夫定在HBV治疗中的效果, 已获得一致认同, 具有较好的抗病毒治疗效果, 但均存在疗效有限和各自的缺陷^[1, 7], 如何提高抗病毒治疗效果, 是当前急需解决的问题^[5]. 近几年的国外及我们的前期研究结果均提示, 乙型肝炎蛋白疫苗治疗慢性乙型肝炎, 抑制HBV DNA复制率可达到30-40%左右^[2-4], 并已经证实其作用机制是通过HBsAg特异的CD4+ T细胞介导的免疫反应来抑制HBV DNA的复制. 为此, 我们选择干扰素和乙型肝炎蛋白疫苗联合用药法, 解决各自的短处, 观察了其抑制HBV DNA复制的效果及HBe/抗-HBe转换率, 结果表明干扰素- α 联合乙型肝炎疫苗治疗慢性乙型肝炎的抗病毒效

果显著优于单独使用干扰素治疗效果($P<0.05$)(表2)。

表2 慢性乙型肝炎患者干扰素- α 联合乙型肝炎疫苗的治疗效果 $n(\%)$

指标	治疗结束		随访6 mo	
	A组	B组	A组	B组
HBeAg 转阴率	3 (18.8)	4 (25.0)	4 (25.0)	5 (31.3)
HBV DNA 转阴率	4 (25.0)	6 (37.5) ^a	6 (37.5)	8 (50.5) ^a
HBe 血清转换率	2 (12.5)	4 (25.0) ^b	3 (18.8)	6 (37.5) ^b
ALT 复常率	5 (31.3)	6 (37.5)	7 (43.8)	8 (50.0)

$\chi^2 = 4.83$, $^aP = 0.030$; $\chi^2 = 4.91$, $^bP = 0.026$ vs A组。

临床应用的抗HBV的药物虽然有很大进展,但是目前尚无任何一种药物可以单独解决乙型肝炎的治疗问题,大多数对HBV复制有明显的抑制,但是HBe/抗-HBe血清学转换率不高,不易达到彻底清楚HBV基因的目的,今后的发展方向是联合治疗^[8],联合用药可能会有助于增加疗效,但联合用药的模式,应用的疗程和选择,尚未形成一致的意见,有待于临床工作中进一步研究观察。

4 参考文献

- 1 Niederau C, Heintges T, Lange S, Goldmann G, Niederau CM, Mohr L, Haussinger D. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1996;334:1422-1427
- 2 Pol S, Michel ML, Brechot C. Immune therapy of hepatitis B virus chronic infection. *Hepatology* 2000;31:548-549
- 3 Couilllin I, Pol S, Mancini M, Driss F, Brechot C, Tiollais P, Michel ML. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B: induction of T cell proliferative responses specific for envelope antigens. *J Infect Dis* 1999;180:15-26
- 4 Ren F, Hino K, Yamaguchi Y, Funatsuki K, Hayashi A, Ishiko H, Furutani M, Yamasaki T, Korenaga K, Yamashita S, Konishi T, Okita K. Cytokine-dependent anti-viral role of CD4-positive T cells in therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 2003;71:376-384
- 5 Chin R, Locarnini S. Treatment of chronic hepatitis B: current challenges and future directions. *Rev Med Virol* 2003;13:255-272
- 6 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志 2000;8:324-329
- 7 Kiyosawa K, Tanaka E. Strategy for lamivudine-resistant YMDD mutant-associated chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2001;36:139-141
- 8 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-1129

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

马来酸曲美布汀胶囊治疗肠易激综合症46例

陈克河, 李士坤, 卢世健

陈克河, 李士坤, 河南省信阳市中心医院消化内科 河南省信阳市 464000
卢世健, 河南省驻马店市第一人民医院 河南省驻马店市 463000
通讯作者: 陈克河, 464000, 河南省信阳市, 信阳市中心医院消化内科.
收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-18

摘要

目的: 探讨马来酸曲美布汀胶囊治疗肠易激综合症的临床疗效。

方法: 选择符合1992年罗马Ⅱ诊断标准的46例肠易激综合症患者口服马来酸曲美布汀胶囊治疗, 观察治疗前后症状

变化, 并按症状进行分级记分评估。

结果: 46例肠易激综合症患者经用马来酸曲美布汀胶囊治疗后总体改善率达70.13%, 且治疗中未发现不良反应。

结论: 马来酸曲美布汀胶囊是一种治疗肠易激综合症较理想的药物。

关键词: 马来酸曲美布汀; 肠易激综合症

陈克河, 李士坤, 卢世健. 马来酸曲美布汀胶囊治疗肠易激综合症46例. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2166-2168

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2166.asp>

0 引言

肠易激综合症(irritable bowel syndrome, IBS)是一种十分常见的胃肠功能紊乱性疾病,临床上以腹痛和大便习惯改变为主要特征^[1],治疗药物有平滑肌松弛剂,肠容积性药物,促动力药物和影响精神药物,但疗效不够理想.本组应用马来酸曲美布汀胶囊治疗IBS 46例,疗效满意,报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2004-7/2005-3在我院就诊的符合1992年罗马II诊断标准的IBS患者46例,男20例,女26例,年龄20-72岁,平均年龄42.6岁,病程3 mo-8 a,平均4.8 a,治疗前排除以下情况:(1)孕妇及哺乳期妇女;(2)有胃肠道器质性疾病者;(3)对该药物过敏者;(4)有腹腔手术史者;(5)有严重的心、肝、肾及内分泌等疾病者.

1.2 方法 治疗前均经电子结肠镜或数字减影钡灌肠检查,排除肠道器质性疾病.检验血、尿、粪常规、肝肾功能、电解质.口服马来酸曲美布汀胶囊,每次2粒(0.2 g),3次/d,疗程2 wk,治疗期间每周复诊一次,记录病情变化.疗程结束时,再行上述所有化验检查.

1.2.1 症状判断标准 对腹痛、腹胀及大便频率、形状和排便异常等症状按轻、中、重分三级.症状程度分级:0级=无;1级=轻度(提示后方觉有症状);2级=中度(有症状,但能正常活动);3级=重度(有症状,影响正常活动).频率分级:0级=无;1级=偶尔(1-24%时间内出现);2级=经常(25-50%时间内出现);3级=持续(50%以上时间内出现).腹痛分级标准:0级=无疼痛症状;I级=有疼痛症状,不影响工作或不需要服药;II级=有疼痛症状,部分影响工作或需要服药;III级=有疼痛症状,必须全休、服药或进食无效.评分标准:0级0分;I级1分;II级2分;III级3分.

1.2.2 疗效判断标准 对显效:症状消失;有效:症状减轻1-2级以上;无效:症状无改善.

1.2.3 总体评估 (1)记录治疗前、后总分(各项症状分数相加).(2)治疗后症状改善评估(记录症状改善率):症状改善率(%)=[(治疗前总分-治疗后总分)/治疗前总

分]×100%,总有效率=显效+有效.

统计学处理 所得的数据采用Ridit分析, $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 通过对治疗前后症状分级、评分变化对比,马来酸曲美布汀胶囊对肠易激综合症的总体症状改善率为70.13%(表1).

2.2 通过对治疗前后各项症状改善率的比较可以看出,马来酸曲美布汀胶囊对腹痛、腹胀、腹泻等症状改善均较好,但对恶心、呕吐等症状改善不明显(表2).治疗中未见不良反应(患者记录及血、尿、粪常规、肝肾功能、电解质化验).

3 讨论

IBS临床以腹痛、腹泻、腹胀、便秘或腹泻与便秘交替出现为特征.在以往的治疗中一般以缓解平滑肌痉挛及腹泻疗效明显^[2],而同时可以缓解腹泻及便秘者较少.本组通过应用马来酸曲美布汀胶囊治疗IBS患者46例,由于其对消化道运动具有兴奋和抑制两方面作用,对于缓解腹泻及排便困难均有效果,从而使总体症状改善率较高(70.13%).马来酸曲美布汀的化学名称为:3,4,5-三甲氧基苯甲酸-2-二氨基-2-苯基丁酯顺丁烯二酸盐,动物实验表明马来酸曲美布汀对消化道运动的兴奋和抑制具有双向调节作用:通过抑制细胞膜钾离子通道,产生去极化,从而提高平滑肌细胞的兴奋性;另一方面通过阻断钙离子通道,抑制钙离子内流,从而抑制细胞收缩,使胃肠道平滑肌松弛.此外,马来酸曲美布汀对平滑肌神经受体也具有双向调节作用:在低运动状态下作用于肾上腺素能受体,抑制去甲肾上腺素的释放,增加运动节律;在运动亢进时,作用于胆碱能受体及阿片受体,抑制乙酰胆碱释放,从而抑制平滑肌运动.

本组观察疗效与动物实验结果相符合,表明马来酸曲美布汀胶囊对IBS有较好的疗效.同时患者在治疗过程中未发现明显不良反应,治疗后血、尿、粪常规、肝肾功能、电解质检验未发现异常,提示IBS患者对马来酸曲美布汀胶囊有较好的耐受性,与报道相符^[3].因此我们认为马来酸曲美布汀胶囊是一种治疗IBS较理想的药物.

表1 入选病例治疗前后症状分级情况

症状	n	治疗前分级(n)				评分	治疗后分级(n)				评分	P
		0	I	II	III		0	I	II	III		
腹痛	45	0	5	29	11	96	26	15	3	1	24	<0.01
腹胀	40	0	4	28	8	84	20	15	4	1	26	<0.01
腹泻	41	0	3	28	10	89	23	14	4	0	22	<0.01
黏液便	29	0	5	20	4	57	18	8	3	0	14	<0.01
排便困难	10	0	3	4	3	20	5	5	0	0	5	<0.01
里急后重	18	0	10	6	2	28	10	5	2	1	12	<0.01
排便未尽	26	0	6	15	5	51	8	15	3	0	21	<0.01
恶心呕吐	13	0	10	2	1	17	5	8	0	0	8	<0.01

表2 治疗后各项症状改善情况

症状	n	显效		有效		无效		总有效率%
		n	%	n	%	n	%	
腹痛	45	26	57.8	15	33.3	4	8.9	91.1
腹胀	40	19	47.5	16	40.0	5	12.5	87.5
腹泻	41	26	63.4	10	24.4	5	12.2	87.8
黏液便	29	18	62.1	6	20.7	5	17.2	82.8
排便困难	10	5	50.0	3	30.0	2	20.0	80.0
里急后重	18	8	44.4	6	33.3	4	22.2	77.7
排便未尽	26	16	61.5	5	19.2	5	19.2	80.7
恶心呕吐	13	4	30.8	2	15.4	7	53.8	46.2

4 参考文献

- 1 Cash BD, Chey WD. Diagnosis of irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Clin North Am* 2005;34:205-220
- 2 Talley NJ. New and emerging treatments for irritable bowel

syndrome and functional dyspepsia. *Expert Opin Emerg Drugs* 2002;7:91-98

- 3 王惠吉, 于中麟, 周丽雅, 林三仁, 刘新光, 陈宝雯, 程留芳, 郑文尧, 杨昭徐. 马来酸曲美布汀治疗肠易激综合征的疗效及安全性. *中国新药杂志* 2001;10:207-209

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

重症急性胰腺炎继发感染临床研究

郑晓梅, 黄宗文, 薛平, 刘芳, 郭佳

郑晓梅, 黄宗文, 薛平, 刘芳, 郭佳, 四川大学华西医院中西医结合科 四川省成都市 610041
通讯作者: 黄宗文, 610041, 四川大学华西医院中西医结合科. huangzongwen@medmail.com.cn
电话: 028-85422556
收稿日期: 2005-05-31 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探索重症急性胰腺炎(SAP)继发感染的危险因素和临床特点.

方法: 2000-2003年SAP继发感染患者(感染组, $n = 68$), 与SAP未并发感染患者(非感染组, $n = 54$)进行回顾性分析, 比较两组的临床特点, 相关危险因素.

结果: 感染组APACHE II 评分、胰周积液范围、ICU治疗、使用多种抗生素和激素、完全胃肠道外静脉营养(TPN)时间以及早期手术介入均比非感染组高($P < 0.01$). 本组共检出菌株181株, 其中 G^- 杆菌占53.6%, 主要为铜绿假单胞菌25.8%, 鲍曼溶血不动杆菌25.8%, 大肠埃希菌16.5%; G^+ 球菌18.8%, 主要为金黄色葡萄球菌44.4%; 真菌27.6%, 其中似酵母样菌52.0%, 白色念珠菌20.0%. 感染部位以肺部感染为主(73.5%), 其次为胰周感染(47.1%). 其中肺部感染、胰周感染和血行感染多为 G^- 杆菌感染, 尿道、静脉导管、肠道多为真菌感染.

结论: APACHE II 评分, 胰周积液范围, ICU 治疗, 多种抗生素及激素的使用, TPN时间, 早期手术介入是感染的主要危险因素. 以 G^- 杆菌为主占53.6%, 真菌次之占27.6%, G^+ 球菌占18.8%. 感染部位以肺部和胰周感染为主. 其中肺部感染、胰周感染和血行感染多为 G^- 杆菌感染, 尿道, 静脉

导管, 肠道多为真菌感染.

关键词: 重症急性胰腺炎; 继发感染

郑晓梅, 黄宗文, 薛平, 刘芳, 郭佳. 重症急性胰腺炎继发感染临床研究. *世界华人消化杂志* 2005;13(17):2168-2170

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2168.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)是外科常见的急腹症之一, 并发症多, 病死率高. 有报道认为: 80%的死亡病例与SAP继发感染有关^[1], 目前尚无SAP继发感染的大宗报道. 我们将1996-2003年四川大学华西医院收治的122例SAP进行回顾性分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 1996-2003年我院收治符合中华医学会外科学分会胰腺外科学组《重症急性胰腺炎诊治草案》诊断标准^[2]的SPA共1161例, 其中男695例, 女466例, 中位年龄48.5(8-87)岁.

1.2 方法 检索其中SPA继发感染者(感染组, $n = 68$), 男45例, 女23例, 平均年龄 50.2 ± 14.5 (28-76)岁; 2003-01/2003-12中西医结合科收治SPA未继发感染者(非感染组, $n = 54$), 男36例, 女18例, 平均年龄 49.9 ± 15.2 (33-85)岁. SPA诊断标准采用. 感染诊断标准: 各种标本或CT、B超引导下细针穿刺(FNA)抽吸物涂片或培养检查有病原菌者.

统计学处理 使用统计软件SPSS 12.0作统计学处理. 检验水准: $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 危险因素 感染组和非感染组性别、年龄比较均无统计学意义, APACHE II 评分、胰周积液范围、ICU治疗、使用多种抗生素和激素、TPN时间相比较有统计学意义 ($P < 0.01$), (表1-2). 感染组有41例进行手术治疗, 术后感染组19例, 其中早期手术13例 (68.4%), 其手术原因为腹腔室间隔综合征或因误诊为单纯胆囊结石行急诊手术; 术前感染组22例, 早期手术仅1例 (4.6%), 其手术原因为短期内发生感染行急诊手术. 感染组早期手术率明显高于非感染组 ($P < 0.05$).

表1 SPA感染组和非感染组相关参数比较

相关参数	感染组 ($n = 68$)	非感染组 ($n = 54$)
APACHE II 评分	30.51 ± 15.32	13.74 ± 7.58^b
抗生素种类	6.15 ± 2.97	2.58 ± 1.26^b
TPN时间(d)	31.74 ± 30.15	7.36 ± 10.00^b
ICU治疗	62(91.2%)	30(55.6%) ^d
用激素	55(80.9%)	32(59.3%) ^d
手术治疗	41(64.7)	5(9.3) ^e

^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 非感染组.

表2 SPA感染组和非感染组胰周积液范围比较(n)

组别	n	1个区	2个区	3个区	4个区	≥ 5 个区
感染组	68	4	5	20	14	25
非感染组	54	17	21	15	1	0
合计	122	21	26	35	15	25

$P < 0.01$ vs 非感染组.

2.2 菌谱特点 共检出细菌和真菌181株, G^- 杆菌多于 G^+ 球菌 (53.6% vs 18.8%), 真菌感染占27.6%. 在 G^- 杆菌中, 铜绿假单胞菌占25.8%, 鲍曼溶血不动杆菌占25.8%, G^+ 球菌以金黄色葡萄球菌为主44.4%, 似酵母样菌占52.0%, 白色念珠菌占20.0%(表3).

2.3 感染部位分布情况及菌谱特点 单一部位感染39例 (57.4%), 2个部位混合感染16例 (23.5%), 3个部位混合感染9例 (13.2%), 4个部位混合感染2例 (2.9%). 感染部位以肺部感染为主50例 (73.5%), 胰周感染32例 (47.1%). 感染菌株的检出以肺部为主 (50.8%), 其次为胰周组织 (25.4%). 其中肺部感染菌株 G^- 菌占51.1%, G^+ 菌占16.1%, 真菌占33.7%. 胰周组织感染菌株 G^- 菌占67.4%, G^+ 菌占19.5%, 真菌占15.2%. 血液感染菌株 G^- 菌占56.3%, G^+ 菌占33.3%, 真菌占15.6%. 尿道, 静脉导管, 肠道多为真菌感染.

表3 SPA感染组菌谱特点

G^-	株数	G^+	株数	真菌	株数
铜绿假单胞菌	25	金黄色葡萄球菌	15	似酵母样菌	26
鲍曼溶血不动杆菌	25	粪肠球菌	6	白色念珠菌	10
大肠埃希氏菌	16	表皮葡萄球菌	4	热带念珠菌	7
阴沟肠杆菌	8	模仿葡萄球菌	2	曲霉菌	3
嗜麦芽黄单胞菌	7	腐生葡萄球菌	2	丙种念珠菌	2
肺炎克雷伯氏菌	7	微球菌属细菌	1	霉菌	1
洋葱假单胞菌	2	人葡萄球菌	1	涂片查尿真菌孢子	1
产气肠杆菌	1	腹水涂片阳性球菌	1		
		血浆凝固酶阴性葡萄球菌	1		
多雷氏普罗威登氏菌	1	华纳氏葡萄球菌	1		
阳性杆菌	1				
普通变形杆菌	1				
产酸克雷伯氏菌	1				
嗜酸重毛单胞菌	1				
脑膜炎败血性黄杆菌	1				
合计	97		34		50

3 讨论

感染是SAP后期死亡的主要原因^[3], 针对SAP继发感染的研究已成为提高SAP生存率的重要环节. 本资料分析表明APACHE II 评分、胰周积液范围、ICU治疗、使用多种抗生素和激素、TPN时间、早期手术是SAP继发感染的危险因素. 机体免疫功能的损害是SAP继发感染的易感因素之一. SAP时肠蠕动减弱, 致病性 G^- 杆菌过度生长, 肠道微生态失调, 菌群紊乱, SAP早期的缺血再灌注损伤, 天然免疫物质—小肠隐凹素的表达下调和获得性免疫受抑制, 肠道细菌和内毒素穿透肠黏膜屏障移位, 导致胰周及胰外器官感染^[4]. 本研究中SAP继发感染宿主因素可能为APACHE II 评分高, 长期禁食, 机体免疫功能明显下降. SAP继发感染者多有入住ICU病史, ICU为胰腺继发感染的重要因素^[5]. 在温暖, 潮湿, 不通风的环境中真菌能迅速繁殖, 而入住ICU患者多气道开放, 进行有创性监测治疗等. 长期使用多种广谱抗生素和激素, 使真菌感染和获得性感染发生率明显上升. 此外, 长时间TPN, 导管相关性感染机率增加, 肠黏膜萎缩, 肠道细菌移位继发感染. 我们发现, SAP继发感染的医源性因素可能与ICU治疗, 使用多种抗生素和激素, TPN时间有关. 胰周积液范围越大, 细菌滋生, 肠道细菌移位, 越易发生胰腺继发感染.

本组共检出菌株181株, 其中 G^- 杆菌占53.6%, 主要为铜绿假单胞菌25.8%, 鲍曼溶血不动杆菌25.8%, 大肠埃希菌16.5%; 真菌占27.6%, 其中似酵母样菌占52.0%, 白色念珠菌占20.0%; G^+ 球菌18.8%, 主要为金黄色葡萄球菌44.4%. 分析结果显示, 肺部是感染发生的主要部位, 其次为胰周. 其中, 肺、胰周组织、血行感染多为 G^- 杆菌感染, 尿道, 静脉导管, 肠道多为真菌感染. 感染通常有两个途径, 一是内源性途径, 另一个是外源性途径. 胰周感染多为内源性感染, 可能与胰周

广泛积液与胰腺坏死范围大,肠道细菌移位有关.肺部感染可以由于SAP患者抵抗力下降,肠道细菌移位,通过血行播散途径入肺而发生内源性感染,也可以发生外源性感染,如机械通气过程中合并呼吸机相关感染.Fry *et al*^[7]提出:“肠道可以是外科临床病人全身性感染的起源”.正常情况下,肠道中占优势的常驻菌与肠黏膜上皮细胞表面的特异性受体结合,形成菌膜结构,能阻止病原菌的黏附,抵抗病原菌对机体的侵袭.当SAP时,厌氧菌数量减少,异常增生的G⁻杆菌附着于肠黏膜,穿透十二指肠经腹膜移位至胰腺^[6],或经逆行胆道感染,或经淋巴途径,或经门静脉系统的血源性途径发生胰周及胰外感染.SAP时肠道细菌移位不仅导致SAP继发感染,还诱发及加重SIRS,促使MODS的发生.通过对胰腺继发感染危险因素及临床特点的认识,能指导我们预防

SAP继发感染的发生,选用针对性强的敏感抗生素,减少SAP死亡率.

4 参考文献

- 1 Wyncoll DL. The management of severe acute necrotising pancreatitis: an evidence-based review of the literature. *Intensive Care Med* 1999;25:146-156
- 2 张圣道. 中华医学会外科学会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治草案. *胃肠病学* 2002;7:53-54
- 3 薛平, 黄宗文, 张鸿彦, 郭佳, 赵建蕾, 郑晓梅. 暴发性胰腺炎67例. *世界华人消化杂志* 2005;13:680-681
- 4 王伯瑶, 吴琦. 内源性抗生素肽-天然免疫的重要介质. *生命科学* 1999;11:64-66
- 5 刘琳, 邱海波, 周韶霞, 代静泓, 莎瑞娟, 杨毅. ICU深部真菌感染的流行病学调查. *中国危重病急救医学* 2001;13:302-303
- 6 McCutcheon AD. Neurological damage and duodenopancreatic reflux in the pathogenesis of alcoholic pancreatitis. *Arch Surg* 2000;135:278-285
- 7 Fry DE, Klammer TW, Garrison RN, Polk HC Jr. Atypical clostridial bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 1981;153:28-30

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006 年第 5 届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知

本刊讯 为了加快国内肝病学术交流、促进我国肝病学科的发展,由中华医学会肝病学会、中华肝脏病杂志编辑委员会主办的“第5届全国肝脏疾病学术研讨会”定于2006-05在辽宁省大连市召开.届时国内知名肝病专家将就国内外肝病研究的进展及热点问题继续进行继续教育讲座,并授予参会代表国家级继续教育I类学分.现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1) 病毒性肝炎发病机制的研究进展;(2) 病毒性肝炎的治疗策略;(3) 乙型病毒性肝炎的长期治疗;(4) 丙型肝炎的抗病毒治疗;(5) 肝纤维化发病机制研究进展;(6) 肝纤维化的防治;(7) 肝硬化的规范化治疗;(8) 肝细胞癌的病因学研究进展;(9) 肝癌的发病机制研究进展;(10) 肝癌的早期诊断;(11) 肝癌的手术治疗及方案选择;(12) 肝癌的非手术治疗;(13) 肝癌的生物治疗;(14) 自身免疫性肝病的发病机制;(15) 自身免疫性肝病的诊断和治疗;(16) 肝移植后肝炎复发的诊断预防和治疗;(17) 生物人工肝的应用及进展;(18) 小儿自身免疫性肝病;(19) 肝肾综合征;(20) 肝功能衰竭;(21) 肝干细胞的研究进展及临床应用;(22) 脂肪肝及酒精性肝病;(23) 非酒精性脂肪性肝病.

2 征稿要求

参加会议论文要求全文(中文)及500字(词)左右中文摘要各一份,应包括目的、材料与方法、结果、讨论,并写清单位、作者姓名及邮编(请自留底稿,恕不退稿).凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文,不再受理.

3 论文寄至地址

400010, 重庆市渝中区临江路74号, 中华肝脏病杂志编辑部收.请在信封左下角注明“会议征文”.欢迎用软盘和电子邮件方式投稿.电子邮件地址:zhgz@vip.163.com.征文截稿日期:2006-02-28(以邮戳为准).

欢迎从事肝病临床和基础研究工作的医务人员及科研工作者踊跃投稿,参加会议.

过氧乙酸致食管烧伤后严重狭窄1例

尹勇, 王中林, 陆一民

尹勇, 王中林, 陆一民, 苏州大学附属第三医院外科 江苏省常州市 213003

通讯作者: 尹勇, 213003, 江苏省常州市局前街185号, 苏州大学附属第三医院外科. yinyong1973@163.com

电话: 0519-6180171

收稿日期: 2005-08-05 接受日期: 2005-08-25

摘要

介绍1例成人吞服高浓度过氧乙酸导致食管中下段烧伤后严重狭窄的少见病例。报告本例患者的详细病历资料和诊治经过。患者烧伤后6 mo手术切除严重狭窄的食管段, 行食管-胃底胸顶吻合术重建消化道。过氧乙酸致食管烧伤急性期处理极为重要, 后期食管严重狭窄应采取手术治疗。

关键词: 过氧乙酸; 食管烧伤; 狭窄

尹勇, 王中林, 陆一民. 过氧乙酸致食管烧伤后严重狭窄1例. 世界华人消化杂志 2005;13(17):2171

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2171.asp>

0 引言

过氧乙酸(peracetic acid)致消化道烧伤的病例过去甚属少见, 非典时期由于大量使用本品进行消毒, 有误服过氧乙酸致小儿消化道烧伤的报道^[1]. 本院最近收治1例成人吞服高浓度过氧乙酸导致食管中下段烧伤后严重狭窄的患者, 现将诊治经过报告如下。

1 病例报告

患者, 女, 26岁. 2004-05-31因情绪激动吞服20%过氧乙酸原液约80 mL, 当即出现口咽部麻木、胸骨后烧灼样疼痛、剧烈呕吐、呼吸困难, 送外院紧急行气管切开、洗胃及抗炎、补液等治疗, 烧伤后第3 wk出现吞咽困难, 先后4次行食管狭窄扩张术, 但效果欠佳, 吞咽困难逐渐加重, 2004-12-04收住本院, 当时患者水和涎液也难下咽, 体重下降11 kg. 查体除消瘦外未见其它异常. 辅助检查: 外周血WBC $12.53 \times 10^9/L$, NO 747, HB 115 g/L. 食道吞钡示食管中下段黏膜不规则破坏, 管腔狭窄, 食管下段完全闭塞钡剂无法通过. 胃镜下距门齿25-30 cm处食管腔环形缩窄, 无法进镜观察. 全身状况改善后手术治疗, 术中见主动脉弓下烧伤段食管增粗、

僵硬、瘢痕形成, 与周围组织广泛粘连, 剖开见狭窄段长径8 cm, 表面被覆黄白色坏死组织, 中央见一3.2 cm $\times$ 1.5 cm深溃疡, 行胸腹段食管切除、食管-胃底胸顶吻合术, 术后2 wk康复出院. 门诊随访6 mo无吻合口狭窄、返流等并发症, 体重增长近5 kg.

2 讨论

过氧乙酸是强氧化剂, 其主要成分为过氧化氢, 另含有少量冰乙酸、硫酸等, 遇有机物时释放出生态氧而起氧化作用. 20%以上的高浓度过氧乙酸腐蚀性强, 吞服后强烈的刺激使环咽肌紧急收缩, 将腐蚀剂推向食管远端, 达贲门部因食管下括约肌的作用致使腐蚀剂在食管停留时间长, 故损伤主要发生在食道中下段. 过氧乙酸烧伤初期食管黏膜水肿、组织坏死, 1 wk左右坏死组织脱落, 食管黏膜溃疡形成, 此时急性炎症明显, 可合并喉头水肿、食管穿孔、纵隔炎、食管气管瘘甚至因全身中毒性休克而死亡. 至第2 wk时, 急性炎症和水肿减退, 烧伤周围深部组织反应性增生可致粘连和瘢痕形成. 严重烧伤后期的合并症是食管狭窄, 一般在烧伤6 wk以后, 狭窄发生在食管损伤最严重的部位^[2].

过氧乙酸烧伤的早期处理除立即洗胃、维持呼吸道通畅、营养支持外, 恰当使用抗生素和激素可控制或预防感染, 减轻食管黏膜和喉头水肿, 减低食管瘢痕狭窄的程度, 同时留置胃管也至关重要, 早期用以吸引减压, 并可防止食管瘢痕狭窄致管腔完全闭塞, 后期可用于肠内营养及做为扩张食管的引导. 烧伤后期的食管狭窄应在停用激素后试行扩张, 如数次扩张后食管狭窄无明显改善, 应在伤后6 mo待瘢痕形成稳定后施行手术^[2]. 本例患者因吞服高浓度过氧乙酸导致食管中下段烧伤后严重瘢痕狭窄, 食管腔完全闭塞, 在早期处理中由于过早拔除胃管, 使肠内营养和引导食管扩张难以实施, 最终采取手术治疗, 胃移植重建消化道, 取得较满意的效果。

3 参考文献

- 1 张可仞, 郝晶, 李旭, 李心元. 过氧乙酸致小儿消化道烧伤的临床特点. 中华小儿外科杂志 2004;25:251-253
- 2 王吉甫. 胃肠外科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社 2000:63-66

编辑 张海宁

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!

石雪迎 讲师
北京大学医学部病理学系

苏鲁 主任医师
海南省人民医院消化内科

许玲 副教授
中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

张宗明 教授
清华大学第一医院院长办公室

陈立波 副教授
武汉华中科技大学同济医学院附属协和医院外科

江学良
长海医院研究生公寓201房间

吴梧桐 教授
中国药科大学生物制药学院

向德兵 讲师
中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科

牛建昭 教授
北京中医药大学

谷俊朝 副教授
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

石统东 副教授
中国人民解放军第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所

钟鸣 副研究员
广西民族医药研究所

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院

秦环龙 副教授
上海交通大学附属第六人民医院

徐小元 教授
北大医院感染科

周士胜
大连大学医学院医学研究中心

许洪卫 教授
上海同济大学附属铁路医院普通外科

魏来 教授
北京大学人民医院肝病研究所

来茂德 教授
浙江大学医学院病理学教研室

郝俊鸣 副主任医师
中国康复研究中心北京博爱医院功能检查科

岳茂兴 教授
北京解放军第306医院(总装备部总医院)普通外科

宋振顺 教授
中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

张万岱 教授
中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化内科研究所

聂青和 副教授
中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染科全军感染病治疗中心