

世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 11 月 15 日 第 13 卷 第 21 期 (Volume 13 Number 21)



21 / 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
刘锬教授
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
杨思凤教授
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 11 月 15 日 第 13 卷 第 21 期 (总第149期)

述 评	2521 胃黏膜保护的基础与临床研究进展 任建林, 卢雅丕, 潘金水
基础 研究	2530 应用载体介导的 RNAi 技术抑制人胃癌和腹膜间皮细胞中 TGF- β_1 的表达 吴涛, 徐惠绵, 吴晓华, 姜成钢, 于森 2535 发酵莲子乳对小鼠胃肠道运动、吸收功能的调节作用 吴小南, 陈洁, 汪家梨, 林建银 2540 丹参注射液和三七总皂甙对大鼠肝癌细胞及自杀基因旁观者效应的影响 谭宇蕙, 杜标炎, 吴映雅, 李杰芬, 刘晓东, 钟富有 2545 SNRPN 基因在 HepG2 细胞中的印迹状态研究 晏泽辉, 邓国宏, 王宇明 2549 利用 SELDI-TOF-MS 技术研究巨细胞病毒感染致婴儿肝炎综合征的血清蛋白标志物 张妍, 刘华林, 王斌, 钱冬萌, 闫志勇, 丁守怡, 宋旭霞, 宋广辉 2554 HBV 携带者T细胞亚群状况与肝组织病理学对比 游晶, 庄林, 陈红英, 俞岚, 黄俊华, 高惠芸, 乔燕伟, 唐宝璋, 曲俊彦, 吴国斌 2559 乌拉坦和戊巴比妥钠对手术后长期饲养动物的影响 王春晓, 曹荣月, 蔡曼玲, 杜鹏, 刘承初, 刘景晶 2565 胃癌组织中法尼基转移酶基因表达与临床病理特点及 H-ras 突变的关系 顾华丽, 田宇彬, 王其新
临床 研究	2570 奥曲肽治疗肝硬化门静脉高压食管胃底静脉曲张急性出血的多中心对照研究 朱长清, 董胜翔, 茅益民, 曾民德, 蒋义斌, 许建明, 田德安, 刘吉勇, 徐三平, 孙樱, 罗和生, 王炳元
焦 点 论 坛	2574 胃黏膜保护的基础与临床研究 任建林 2575 三叶因子与胃黏膜保护的研究进展 任建林, 潘金水, 卢雅丕 2578 胃黏液屏障与胃黏膜保护的研究进展 叶震世, 任建林 2582 氧自由基与胃黏膜损伤 施华秀, 任建林 2586 幽门螺杆菌与胃黏膜保护研究进展 林辉, 任建林 2591 乙醇对胃黏膜作用机制的研究进展 何绍珍, 任建林 2597 NSAIDs 相关性胃肠病 卢雅丕, 任建林 2601 一氧化氮与胃黏膜保护和损伤 王琳, 任建林 2605 胃黏膜免疫机制研究进展 张波, 任建林 2610 门脉高压性胃病 董菁, 任建林 2615 急性胰腺炎与胃黏膜损伤 林振和, 任建林 2620 胃黏膜保护剂临床应用进展 陈建民, 任建林
研究 快报	2623 塞莱昔布对结肠癌细胞生长及肝转移瘤血管生长因子表达的影响 张超, 刘伟, 安杰, 刘占奎 2627 银杏叶类黄酮对人胃癌细胞 BGC823 体外的增殖抑制作用 张凤, 杨桂文, 张金凤, 安利国
临床 经验	2630 端端吻合胆道重建在活体肝移植中的应用 徐三荣, 王学浩, 李相成, 张峰, 成峰, 李国强, 王科
病 例 报 告	2634 脾脏原发类癌 1 例 张艺军, 李亚南, 陈晓清, 余中逊, 张晓峰, 毕向军, 肖丽萍

致 谢	2636 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2529 我国科技论文总数连续三年世界第五 2534 专家门诊 2544 更正与说明专栏 2548 第一届全国临床营养支持学术会议通知 2553 欢迎订阅2006年《实用儿科临床杂志》 2558 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2564 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2569 中国生物医学基金论文摘要注册方法 2581 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知 2596 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 2604 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2609 首届北京地坛感染病学术会议 2614 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知 2619 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2622 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 2633 《世界华人消化杂志》发表文章配发内容通知 2635 消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛征文通知
封面故事	2521 胃黏膜保护的基础与临床研究进展 任建林, 卢雅丕, 潘金水. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2521-2529 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2521.asp
国际会议	10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com 7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference Annual Postgraduate Course May 25-26, 2006 www.asge.org/education 71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006

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 2005-11-15 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 英文编辑 张海宁 管鑫妍 中文编辑 潘伯荣 张海宁 管鑫妍 电子编辑 张敏 张勇 李琪 本期审读 王瑾晖	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: wjcd@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
--------------------------------	----------------------------	-------------------------	--------------------------

World Chinese Journal of Digestology

November 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 21

EDITORIAL

Advance in basic and clinical research of gastric mucosal protection

Ren JL, Lu YP, Pan JS 2521

BASIC RESEARCH

RNAi-mediated gene silencing of transforming growth factor- β 1 expression in human gastric cancer cell line SGC-7901 and peritoneal mesothelial cells

Wu T, Xu HM, Wu XH, Jiang CG, Yu M 2530

Modulatory role of lotus-seed milk fermented product on gastrointestinal motility and absorption in mice

Wu XN, Chen J, Wang JL, Lin JY 2535

Effects of *Danshen* and Total Saponins of *Panax Notoginseng* on rat hepatocarcinoma cells and bystander effect of suicide gene

Tan YH, Du BY, Wu YY, Li JF, Liu XD, Zhong FY 2540

Analysis on expression and imprinting style of small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N in hepatic cancer cell line HepG2

Yan ZH, Deng GH, Wang YM 2545

Identification of serum biomarkers in human cytomegalovirus infected hepatitis infants by SELDI-TOF-MS

Zhang Y, Liu HL, Wang B, Qian DM, Yan ZY, Ding SY, Song XX, Song GH 2549

Comparative analysis of peripheral T-cell subsets and liver histopathology in asymptomatic hepatitis B virus carriers

You J, Zhuang L, Chen HY, Yu L, Huang JH, Gao HY, Qiao YW, Tang BZ, Qu JY, Wu GB 2554

Comparison between effects of urethane and pentobarbital sodium on animals demanding long-term breeding

Wang CX, Cao RY, Cai ML, Du P, Liu CC, Liu JJ 2559

Relations of farnesyltransferase beta-subunit mRNA expression with clinicopathological features and H-ras mutation in gastric cancer tissues

Gu HL, Tian ZB, Wang QX 2565

CLINICAL RESEARCH

A multicentred clinical comparative study on curative effect and safety of acetic octreotide in treatment of esophageal varices bleeding

Zhu CQ, Dong SX, Mao YM, Zeng MD, Jiang YB, Xu JM, Tian DA, Liu JY, Xu SP, Sun Y, Luo HS, Wang BY 2570

HIGHLIGHT TOPIC

Advance in relationship between trefoil factor and gastric

mucosal protection

Ren JL, Pan JS, Lu YP 2575

Advance in relationship between gastric mucus barrier and gastric mucosal protection

Ye ZS, Ren JL 2578

Relationship between oxygen-derived free radicals and gastric mucosal injury

Shi HX, Ren JL 2582

Advance in relationship between *Helicobacter pylori* and gastric mucosal protection

Lin H, Ren JL 2586

Advance in mechanism of effect of alcohol on gastric mucosa

He SZ, Ren JL 2591

Research on nonsteroidal anti-inflammatory drugs related gastroenteropathy

Lu YP, Ren JL 2597

Relationship between nitric oxide and gastric mucosal protection and injury

Wang L, Ren JL 2601

Advance in mechanism of gastric mucosal immunity

Zhang B, Ren JL 2605

Research on portal hypertensive gastropathy

Dong J, Ren JL 2610

Relationship between acute pancreatitis and gastric mucosal injury

Lin ZH, Ren JL 2615

Advance in clinical application of gastric mucosa protective agent

Chen JM, Ren JL 2620

BRIEF REPORT

Effects of celecoxib on cell proliferation and expression of vascular endothelial growth factor in colonic cancer with hepatic metastasis

Zhang C, Liu W, An J, Liu ZK 2623

Inhibitory effects of *Ginkgo biloba* leaf flavonoids on proliferation of human gastric cancer cell line BGC823 *in vitro*

Zhang F, Yang GW, Zhang JF, An LG 2627

CLINICAL PRACTICE

Application of duct-to-duct biliary reconstruction in living donor liver transplantation

Xu SR, Wang XH, Li XC, Zhang F, Cheng F, Li GQ, Wang K 2630

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology SemiMonthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date November 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: wjcd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

胃黏膜保护的基础与临床研究进展

任建林, 卢雅丕, 潘金水

任建林, 卢雅丕, 潘金水, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化疾病研究所 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, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化疾病研究所。jianlin.ren@xmzsh.com

电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017

收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

摘要

长期以来胃黏膜保护一直是基础和临床研究的重点与热点。近年来人们对胃黏膜保护的细胞和分子机制已有了全面深入的认识, 发现具有胃黏膜细胞保护作用的物质有很多种, 具有细胞保护作用的器官和组织也不仅仅限于胃黏膜, 在胰腺、肝脏、肾脏、心脏和脑等都发现有类似现象。因此细胞保护概念的内涵和外延都有拓展。我们对三叶因子、氧自由基、幽门螺杆菌、酒精、非甾体类抗炎药及细胞因子等研究热点与胃黏膜保护相互作用的机制进行初步的探讨。

关键词: 胃黏膜; 保护; 基础与临床研究

任建林, 卢雅丕, 潘金水. 胃黏膜保护的基础与临床研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2521-2529

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2521.asp>

0 引言

1975年美国密歇根Upjohn药厂Andre Robert发现前列腺素(prostaglandins, PGs)可明显防止或减轻皮质类固醇、非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、酸化阿司匹林、酸化牛磺酸盐、沸水、应激、结扎幽门(Shay大鼠)等对胃黏膜的损伤, 其效果呈剂量依赖性, 与抑制胃酸分泌无关。据此Andre Robert提出细胞保护(cytoprotection)的概念。很多现象提示其在胃黏膜保护的病理生理过程中居主导地位。

胃黏膜保护是指黏膜能耐受经常接触的各种损伤因子包括大幅度pH、渗透压和温度变化, 以及具有去垢作用的物质或能引起全身或局部炎性反应的细菌代谢产物及抗原等, 而结构与功能不受明显伤害的现象。胃黏膜并不是不受食物或自身分泌的内源性因子损伤, 而是经常发生损伤, 但胃黏膜能快速地修复损伤, 使损伤发生在上皮最表浅层, 阻止有害因子进入黏膜组织或体循环。当胃黏膜受刺激后, 黏膜的抵御能力相

应增强, 即出现适应性细胞保护现象, 提示胃黏膜细胞保护是动态过程而非静态过程。

胃黏膜保护作用由多种因素介导, 这些因素相互联系、相互作用, 形成复杂的网络体系, 并受全身和局部神经、体液及腔内物质的调节。从解剖结构上可将这些因素分为五个层次。第一层次由分泌入胃腔的成分组成, 包括酸、碱、黏液、免疫球蛋白和其它抗菌成分(如乳铁蛋白)、表面活性磷脂(surface active phospholipid, SAPL)等。第二层次是上皮层, 具有显著的抗酸损伤功能并形成紧密连接防止被动扩散。如果上皮层连续性破坏, 能够快速修复。第三层次由黏膜微循环与黏膜、黏膜下感觉传入神经组成。酸或其它损伤因子逆流流入黏膜引起神经介导的胃黏膜血流(gastric mucosal blood flow, GMBF)升高, 这对限制损伤和促进修复有重要意义。第四层次由黏膜免疫细胞构成, 包括肥大细胞、巨噬细胞, 可感受进入黏膜的异物成分, 形成适当的炎性反应。第五层次即胃黏膜自身修复机能包括胃腺的生长和重建、外来和内在神经系统的再生、微循环的重建, 许多生长因子在其中的重要意义已经被认识。现将近年来胃黏膜保护的基础与临床方面研究进展综述如下:

1 三叶因子与胃黏膜保护

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。目前在哺乳动物体内发现的三叶肽(trefoil peptide)有3种, 即乳癌相关肽(pS2或TFF1)、解痉多肽(SP或TFF2)和肠三叶因子(ITF或TFF3)。其共同特征为均含一特殊结构——P结构域, 由一段38-39个氨基酸序列通过6个高度保守的半胱氨酸残基经由3个分子内的二硫键(Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6)相互联接, 使整个肽链扭曲、折叠形成三叶状结构, 由此命名。这种三叶形结构的稳定性使TFFs具有明显的抗蛋白酶水解、酸消化及耐热特性, 因而能在消化道复杂的环境中保持生物活性。在哺乳动物体内, 三叶肽具有肿瘤抑制、信号传导、诱导细胞凋亡以及减轻各种理化因素引起的胃黏膜损伤并促进黏膜修复等功能, 但其发挥功能的具体机制尚不明^[1-13]。

国外已有大量的实验证明, 三叶肽在胃肠道黏膜保护中发挥了重要的作用。其作用机制目前有2种假

说: (1)物理方式, 与黏液中的糖蛋白结合形成稳定的凝胶复合物, 加强黏液凝胶层, 减少胃表面有害物质及机械应力等因素对黏膜的损伤; (2)生物化学方式, 三叶肽可能通过与其受体或转运蛋白结合而发挥生理功能, 但具体的受体或结合蛋白并未明确确定。除保护作用外, 研究结果证明三叶肽参与了损伤组织的修复过程, 可增强受损黏膜周围完好的上皮细胞向损伤黏膜表面迁移覆盖, 促进损伤黏膜的重建。三叶肽是一种快速反应肽, 在黏膜损伤后30 min内即可见表达上调。体外实验显示, 无论是重组TFF3或重组TFF2, 都能刺激肠道上皮细胞的迁移, 促进伤口愈合, 改变上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)的表达和细胞定位。

目前认为TFFs可能具有特异性受体, 是通过配体-受体或配体-结合蛋白方式传导其生物学功能的, 并且其表达受多种细胞因子或配体的调控^[14-16]; 同时它本身可能也扮演着某些病原微生物受体的角色^[17]。TFFs在黏膜保护及修复过程中发挥了重要的作用, 深入探讨TFFs的作用机理对于黏膜保护、溃疡治疗及肿瘤诊治等方面均有重要的意义^[18-20]。体外研究业已证实了它们能促进上皮细胞修复, 其在肿瘤生成、生长过程中所扮演的角色及与胃酸分泌、胃动力之间的关系亦不明确, 主要问题在于未能自分子水平阐明TFFs分子的作用机制, 而家族各成员与结合蛋白或受体之间的相互作用成为进一步的研究重点^[21-23]。因此, 进一步研究TFFs各成员的作用机制是目前的主要研究突破方向, 由于TFFs具有明确的调节肽功能, 研究下游的受体/结合蛋白除阐明作用机制以外, 还可能提出新的研究方向、肿瘤的生成假说或新的药物。

2 氧自由基与胃黏膜保护

自由基指具有未配对电子的原子、原子团或分子, 由氧分子衍生的自由基称氧自由基(oxygen free radical, OFR)。主要包括超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基($OH^{\cdot}$), 它们与过氧化氢、单线态氧(O_1)统称为活性氧。正常人体内存在清除OFR的防御系统, 使其生成量不至于达到损伤组织的程度。OFR具有杀菌、细胞毒和促进炎症渗出、水肿等重要炎症介质作用。由于OFR作用的靶细胞和分子无特异选择性, 故OFR在参与杀菌等防御作用的同时, 也会给组织细胞造成损伤。*H. pylori*感染、NSAIDs、乙醇等坏死因子、缺血再灌注损伤、应激、幽门结扎等所致胃黏膜损伤的模型中, 均涉及OFR的作用^[24-30]。可以认为, OFR参与了绝大多数致溃疡因子的致病过程, 与慢性胃炎、急性胃黏膜损伤、胃溃疡和胃癌的形成有密切关系^[31,32]。

与其他组织的炎症相似, 胃黏膜在各种损伤因子作用下发生炎症时产生大量的炎症因子, 造成中性粒

细胞浸润, 通过呼吸爆发产生OFR, 因此中性粒细胞可能是OFR的主要来源^[33-36]。胃肠黏液在化学物质作用或缺血等情况下, 可产生大量的OFR^[33,37]。缺血时, 黏膜细胞内氧化磷酸化减少, ATP生成减少。有报道鼠出血休克15 min后, 胃黏膜内ATP减少75%, ADP减少27%, 而AMP增至50%, AMP可进一步代谢为腺苷、肌苷及次黄嘌呤。另一方面, 细胞能量不足时, 不能维持正常的离子梯度, 细胞内 Ca^{2+} 增多, 激活一种蛋白酶, 使黄嘌呤脱氢酶快速不可逆地转变成黄嘌呤氧化酶。缺血黏膜中同时有黄嘌呤氧化酶和其底物之一(次黄嘌呤)的聚集, 当组织再灌注提供另一底物(O_2)时, 就可产生大量的超氧自由基。超氧自由基和过氧化氢通过Haber-Weiss反应可生成细胞毒性更大的羟自由基。正常情况下, Haber-Weiss反应的速度非常缓慢。当存在金属离子时, 特别是有铁离子存在的情况下, 反应速度显著加速, 即所谓Fenton型Haber-Weiss反应。缺血时细胞外铁水平增加, 由此可增加羟自由基的生成。此外, 线粒体呼吸链受损和花生四烯酸代谢中也可产生部分OFR。在许多种系中, 胃肠道黄嘌呤脱氢酶的含量远高于其他任何组织。故一旦有条件, 胃肠黏膜将产生大量OFR。

自从Itoh和Guth 1985年报道给予超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶可以明显减轻缺血-再灌注引起的胃黏膜损伤以来, 进一步研究证实它们也可以减轻酒精和非甾体类抗炎药等引起的急性胃黏膜损害, 从而间接提示在急性胃黏膜损害发病过程中, 反应性氧族(ROS)起了重要作用。Alarcon *et al*^[24]发现给鼠动脉灌注自由基可引起胃黏膜损伤, 而SOD同时灌注可以减轻胃黏膜损伤。因此, OFR是急性胃黏膜损害的重要致病因子。急性胃黏膜损害时OFR的来源因病因不同而异^[38-40]。缺血-再灌注损伤时主要来自黄嘌呤氧化酶; NSAIDs引起的胃黏膜损伤时OFR主要来源于白细胞; 酒精性胃黏膜损伤可能来自醛氧化酶。另一方面, 是共价键结合性损伤。OFR作用于含巯基的氨基酸, 使蛋白质变性和酶失活; 作用于辅酶, 使辅酶活性下降; 作用于碳水化合物, 使表面受体改变。特别值得注意的是, OFR能破坏上皮间质中的透明质酸和胶原纤维网, 促进黏膜损伤^[41]。

流行病学调查提示, 自由基清除剂维生素C和维生素E的缺乏与胃癌发生有关, 补充维生素C可减少胃黏膜中DNA损害。临床研究发现胃癌和萎缩性胃炎患者血浆与组织中脂质过氧化物明显高于对照组, 并且发现胃癌组织中自由基浓度明显比对照组高, 提示自由基可能参与胃癌的发生。自由基清除剂对胃黏膜损伤的保护作用, 瑞巴派特(rebamipide)是一种新的黏膜保护药, 通过抗氧化作用对多种OFR产生损伤

的动物模型具有抗损伤保护作用; 促进胃黏膜内源性前列腺素(PG)的合成释放, 保护胃黏膜, 增加胃黏膜血流量, 从而对溃疡的发生和发展产生抑制作用, 减少溃疡的发生^[42,43].

3 幽门螺杆菌与胃黏膜保护

幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, *H pylori*)产生的毒素和有毒毒素作用的酶能破坏胃黏膜屏障;*H pylori*感染还能使机体产生炎症和免疫反应, 影响胃酸、胃肠激素的分泌, 引起胃上皮细胞的凋亡, 导致一系列疾病的形成^[44-46].

*H pylori*感染时胃上皮细胞可递呈抗原, 起着"非专业性"抗原递呈细胞(APC)的作用, 可介导免疫反应^[47]. APC是指能捕捉、加工和处理抗原, 并将抗原递呈给抗原特异性淋巴细胞的一类免疫细胞.*H pylori*感染可刺激浆细胞产生局部和全身的*H pylori*特异性抗体, 参与体液免疫反应, 这种抗体多半为非分泌型IgA, 不能很好地与补体结合清除细菌, 却可造成宿主自身的损伤, 如自身抗体可造成胃上皮的损伤^[48].

*H pylori*感染时胃窦黏膜、胃液中的胃液生长抑素(SS)含量均下降, D细胞数目和SS的mRNA表达也减少; 根除*H pylori*后这些指标均恢复, 提示*H pylori*抑制SS的释放^[49]. 研究表明: *H pylori*感染时胃液中TNF- α 和IL-8分泌增多, TNF- α 能剂量依赖地增加SS释放, 且此效应可被IL-8所增强^[50]. SS对G细胞有抑制作用, SS减少时促胃液素分泌增多, 同时SS在人胃腔中有抑制*H pylori*增殖的作用^[51]. 促胃液素刺激和SS抑制壁细胞释放胃酸, 共同保持胃酸分泌的平衡.

表皮生长因子(EGF)和TGF α 通过同一受体(即EGFr)而起作用. 它们对胃肠道的作用有促进细胞增生、溃疡愈合、抑制胃酸分泌等.*H pylori*急性接触体外培养的胃黏膜细胞, 即引起细胞损伤, 并损及细胞的移行和增殖; EGF相关生长因子, 能保护胃黏膜免受损伤, 且使损伤的黏膜愈合.*H pylori*抑制EGF与其受体结合, 和抑制EGF刺激的胃细胞增殖, 是溃疡生成和难以愈合的机制^[52,53]. 而最近Liu *et al* ^[54]报道在*H pylori*感染的慢性胃炎患者EGFr明显增高, *H pylori*感染可以促进胃黏膜细胞的增殖. Schiemann *et al* ^[55]报道根除*H pylori*后, 萎缩性胃炎胃黏膜中的TGF α 的mRNA表达明显上调.*H pylori*感染时胃黏膜的C-myc基因蛋白和EGFr呈过表达, 可能为胃黏膜上皮过分增殖的分子基础^[56].

*H pylori*感染可导致胃上皮细胞的凋亡^[57]. *H pylori*感染所致的细胞凋亡机制可能与以下因素有关^[58]: (1) *H pylori*感染后产生的炎性细胞因子可增加Fas抗原的表达, Fas抗原是一种细胞表面的膜蛋白, 与Fas配体结合后可诱导细胞的凋亡; (2) *H pylori*感染时呼吸爆发产生的反应性氧代谢物(ROS)可导致DNA的单链裂解, 碱

基损伤. DNA损伤后可诱导产生P53蛋白, 造成细胞凋亡; (3) *H pylori*感染时中性粒细胞和巨噬细胞可表达一氧化氮(NO)合成酶, 产生反应性氮代谢产物(RNS). NO合成酶产生的NO与过氧化物反应可形成过氧亚硝酸盐(ONOO⁻). ONOO⁻可自行裂解形成羟基或单氧, 两者均能与DNA作用, 损伤DNA导致凋亡; (4) 炎性细胞因子如TGF α 和IFN- γ 除了可直接诱导细胞凋亡外, 还可促进上皮细胞表达主要组织相容复合物II(MHC-II)抗原, 通过TH1应答介导的损伤造成细胞凋亡. 胃上皮细胞的过度凋亡有利于糜烂和溃疡形成, 凋亡时程序错误或凋亡与增生不平衡则可导致肿瘤形成.

4 酒精与胃黏膜保护

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^[59-61].

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NSAIDs(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^[62,63]. 此外, 慢性酗酒者*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.

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⁻、PG、表皮生长因子、上皮细胞更新等. 侵袭因素相对增强表现为: 促进胃酸、胃蛋白酶分泌: 试验表明, 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^[64]; 慢性乙醇中毒也存在酸高分泌现象^[65], 但也有不同观点^[66]. 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、乙醛脱氢酶等表达, 使得乙醛产生量多于被氧化量, 有潜在致癌活性^[67-69]; 产生过多的

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, 并可氧化蛋白质中巯基以及造成DNA断裂. 应用巯基化合物清除OFR有助于黏膜修复^[70,71].

5 NSAIDs与胃黏膜保护

自1898年阿司匹林上市以来的一个多世纪里, NSAIDs已增至百余种, 成为全球最畅销的药品, 被广泛应用于治疗各种风湿性疾病及心脑血管疾病. 但NSAIDs的广泛应用引起了一系列并发症, 其中最重要的是NSAIDs相关性胃肠病, 轻者黏膜充血、水肿、糜烂及一过性浅表溃疡形成, 重者造成大面积溃疡合并消化道出血、穿孔甚至危及生命. 由于NSAIDs的镇痛作用, 使用NSAIDs的患者发生胃肠病时多数是无症状的, 当相应症状出现时, 往往病情已较严重. 这正是NSAIDs相关性胃肠病可导致高死亡率的原因. 据统计, 在美国每年有超过10万的患者因为服用NSAIDs导致胃肠道并发症而住院治疗, 死亡人数达1.65万^[72]. 因此, 阐明NSAIDs相关性胃肠病的发病机制, 制定系统性防治措施是目前胃肠黏膜保护领域的一个重要课题.

NSAIDs相关性胃病病变主要位于胃窦、幽门、胃体部, 临床表现多样, 可毫无症状, 或表现为消化不良、腹胀、腹痛、溃疡、出血、穿孔等. 有时也表现为胃食管反流^[73]. Roberts *et al* ^[74]对1991年至2002年之间PubMed收录的多篇关于NSAIDs的文章进行统计分析, 总结NSAIDs相关性胃肠病的危险因素如下: 与长期低剂量阿司匹林联用, 高龄, 既往有胃肠道溃疡、出血或穿孔史, 性别(男性高于女性), 与皮质激素联用, 与抗凝剂联用, 用药剂量大、用药时间长等. 其中, 合并多种危险因素者其胃肠病发生率明显高于仅有一种危险因素者.

细胞膜中的花生四烯酸在磷脂酶A2的作用下释放出来, 通过两条途径代谢: 一是在环氧化酶(COX)的作用下转化为PG和血栓素A2(TXA2); 二是在脂氧化酶(LOX)作用下产生白三烯(LT)^[75]. PGs可增加黏液和HCO₃⁻分泌、促进上皮修复和细胞更新、增加胃黏膜血流、抑制胃酸分泌, 具有胃黏膜保护作用及适应性细胞保护作用. NSAIDs通过抑制COX从而抑制花生四烯酸生成PGs, 减少PGs对胃黏膜的保护作用, 最终导致胃黏膜损伤^[76]. 同时, COX的抑制也使血栓素A2的合成减少, 从而抑制血小板凝集, 易诱发损伤的胃黏膜出血. 有研究发现, 口服NSAIDs后数小时至几天, 即可致胃黏膜瘀点、糜烂, 并进一步发展成急性溃疡, 停药后几天由于药物对血小板聚集及PGs合成的抑制作用

仍然存在, 故仍可继续导致消化道出血^[77]. 在哺乳动物体内, COX有两种形式. COX-1为基础性酶, 正常存在于多数器官, 产生维持正常生理功能所需要的PGs和血栓素A2, 以保持胃黏膜的完整性; COX-2为诱导性酶, 在组织损伤过程中可诱导产生炎性PGs, 从而引起炎症、疼痛和发热^[78]. COX-2在大多数器官不能检出, 但在炎症部位的炎症细胞中高浓度存在, 其PGs产物介导炎症发生. 传统的NSAIDs同时抑制两种COX, 因而在发挥其抗炎作用的同时, 也干扰了生理性PGs及血栓素A2的合成而产生胃肠损害作用.

目前认为*H pylori*和NSAIDs是消化性溃疡发生的两个重要独立危险因素, 两者相互作用. 单纯根除*H pylori*本身虽然不足以预防NSAIDs溃疡, 但较多意见倾向于根除*H pylori*对减少NSAIDs溃疡的发生有一定帮助. 到目前为止, 关于NSAIDs和*H pylori*相互作用的基础、临床和流行病学研究很多, 但来自各家的报道并不一致, 甚至结果相互矛盾. 这可能与不同的地理环境、不同*H pylori*亚型、疾病的不同阶段、有无消化性溃疡病史等因素有关. 对长期服用NSAIDs的患者, *H pylori*的感染是加重还是保护胃黏膜损害的发生, 以及如何治疗和预防消化性溃疡等问题仍未达成共识^[79-83]. 然而, 近年有许多研究显示, 在*H pylori*感染者中, NSAIDs仍可引起黏膜PGs合成显著减少, 提示在NSAIDs存在时, *H pylori*引起PGs合成增加的作用并无明显意义. 因此, 从理论上推导, 由于*H pylori*与NSAIDs对黏膜的损害在许多方面有一致性, 两者对胃肠黏膜的损害作用会有相加效果^[84,85].

总之, 到目前为止, 关于NSAIDs和*H pylori*相互作用及其关系的认识还未形成共识, 进一步明确两者之间的关系, 需要进行更多设计严谨的大规模前瞻性临床研究.

6 上皮屏障与胃黏膜保护

处于高酸环境的胃黏膜上皮层有其自身特性. 胃上皮层在调节黏膜对食入抗原的反应过程中有一定意义. 给过敏体质动物食入抗原可刺激胃酸分泌、胃排空延缓. 胃上皮是紧密连接上皮, 可限制抗原进入黏膜固有层及体循环, 但白蛋白大小的分子(80 ku)可以以免疫特性完整的分子形式通过大鼠胃上皮, 提示胃内存在"抗原递呈"('antigen sampling')形式, 允许免疫系统探及胃腔内潜在有害的物质, 然后限制这些抗原性物质排空入肠腔.

整复(restitution)或重建(reconstitution)是指胃小凹健康细胞快速迁移以覆盖裸露基底膜的上皮修复过程. 离体研究发现该过程需数小时. 在体情况下需15-60 min. 离体情况下整复需要基底膜提供HCO₃⁻, 在

体情况下需要正常的黏膜血供. 上皮细胞黏附的基底膜对酸的损伤特别敏感. 在上皮受损、腔内pH较低情况下, 细胞碎片、黏液、血浆(纤维素、白蛋白等蛋白)组成的覆盖于损伤部位的"mucoid cap"保护基底膜作为整复上皮迁移的支撑.

尚不明确趋化因子(chemotactic factors)是否参与该过程. 有证据提示某些生长因子可能参与该过程^[86-92]. 如碱性成纤维生长因子(bFGF)影响整复过程. 腔内应用硫酸铝以结合bFGF, 防止其被酸降解, 使上皮细胞在pH低于3的情况下仍可整复, 而无硫酸铝时, 不会发生整复. 腔内应用bFGF也可在低pH时整复. TGF α 在肠道具有调节上皮整复作用. 培养的小肠上皮细胞加TGF α 可加速迁移.

胃黏膜血流量(GMBF)在胃黏膜保护机制中处于非常基础的地位, PGs及NO等因子可通过改善GMBF而发挥胃黏膜保护作用^[93-95]. 胃表面上皮层下致密毛细血管网给上皮提供营养物质、氧, 清除和稀释从胃腔逆流入黏膜内的毒性物质(H^+). 当上皮层损伤时, 微循环为损伤部位修复创造必需的微环境(包括维持黏液帽内pH). 通常凡能刺激胃分泌的因素也能升高GMBF, 反之凡能抑制胃分泌的因素也能降低GMBF, 即胃分泌与GMBF相耦合. 这有利于胃黏膜发挥生理功能, 也有利于胃黏膜自身保护. 黏膜血管结构特别适合 HCO_3^- 运输至上皮细胞, 当壁细胞每分泌1 mol H^+ 入胃腺腔内时, 就有1 mol HCO_3^- 通过其基底侧分泌入有窗孔的毛细血管内, 并被运输至黏膜表面, 弥散入上皮细胞, 通过与 Cl^- 交换, 主动排出 HCO_3^- , 进入胃黏液层. 酸活跃分泌过程中胃碱运输至黏膜表面上皮增多, 即形成碱潮. 很多内源性物质调节黏膜血流, 其中最重要的是CGRP、PG、NO. 当黏膜暴露于刺激剂或酸逆流发生时, GMBF明显而快速地升高, 其意义在于清除或稀释逆流的损伤因子. 国外有文献认为胃黏膜pH/GMBF比值是评价胃黏膜损伤的敏感指标. 但也有在某些干预情况下二者出现分离现象. CGRP和NO在调节腔内刺激引起黏膜充血效应中起重要作用.

当黏膜防御机制都被破坏后, 便发生溃疡, 侵及整个黏膜层和黏膜肌层, 这时便通过最后防线进行修复. 愈合过程首先发生于溃疡周边, 渐渐向溃疡中心进行. 肉芽组织为新分化的上皮细胞迁移和形成黏膜结构提供支撑, 肉芽组织内新生血管形成为重建胃腺提供条件.

溃疡修复过程有多种生长因子和细胞因子参与, 但其具体作用有待阐明^[96,97]. EGF由唾液腺产生, 对胃黏膜有多种作用, 增强其抗损伤能力. 但发生溃疡时, 溃疡边缘新形成的细胞系可表达EGF. 在大鼠实验性溃疡模型修复过程中EGFR明显上调. 其他生长因子如bFGF、TGF α 等也参与修复过程, 但其作用尚未阐明.

7 PG、NO与胃黏膜保护

很多化学介质参与协调黏膜对损伤刺激的保护性反应, 大量证据表明PG、NO是最基本的重要介质, 影响黏膜防御的每一种成分: 抑制酸分泌、促进黏液和胃碱分泌、升高GMBF、促进溃疡愈合. 多种药物或理化因素通过调节PGs及NO的合成而影响胃黏膜损伤的修复^[98-126]. PG、NO对肥大细胞激活和白细胞黏附血管内皮有抑制作用, 可能为张力性免疫调制剂. 抑制PG、NO的合成将增加黏膜对损伤的敏感性^[127,128].

NO由NOS催化生成. NOS有三种亚型: NOS I (nNOS)、NOS II (iNOS)及NOS III (eNOS), 其中NOS I及NOS III为 Ca^{2+} -CaM依赖型. 许多文献采用不同方法证实正常胃黏膜均有3种NOS表达, 以eNOS表达高于iNOS, 其中nNOS主要在胃黏液上皮细胞表达, eNOS主要在胃腺底部、固有层组织细胞及血管内皮表达. 三种NOS均位于胞浆, 催化生成的NO作用不同. NO对效应细胞作用机制为以其高脂溶性通过细胞膜激活GC, 升高cGMP浓度, 发挥效应. 此外还可促进ADP核糖化, 促进ADP-核糖基与受体分子结合, 可引起3-磷酸甘油醛脱氢酶核糖基化, 封闭糖酵解过程而阻断ATP产生. 外源性NO可预防或减轻缺血-再灌注、乙醇、盐酸、PAF、内毒素、ET及应激等引起的急性胃黏膜损伤, 抑制内源性NO合成则加重上述因素引起的损伤, 拮抗NO合成抑制剂则可逆转其加重胃黏膜损伤效应. 内源性NO参与介导硫酸铝等药物的胃黏膜保护作用. 具有释放NO作用的新型NSAIDs无严重的胃黏膜毒性. NO胃黏膜保护机制与升高GMBF、抑制胃酸分泌、促进黏液分泌等因素有关. NO调节基础状态及 H^+ 、五肽胃泌素、CCK刺激状态下胃微血管张力, 扩张微血管, 升高GMBF. NO不影响基础状态下胃酸分泌, 但可抑制五肽胃泌素促肠嗜铬样细胞(ECL)释放组胺的效应, 并抑制组胺的促胃酸分泌效应. NO对 HCO_3^- 分泌的影响报告不一.

人体胃黏膜PGs主要为PGA、PGE、PGF及PGI类, 以PGE和PGI₂含量最高, 主要生理作用为抑制胃酸分泌和保护胃黏膜. PG参与介导直接和适应性细胞保护作用, 后者与其通过EP₂/EP₃受体作用促进黏液、 HCO_3^- 分泌及维持黏膜血流等因素有关. 至少有两种COX参与PG合成. 胃内主要表达结构性COX-1, COX-2仅在暴露于某些细胞因子、有丝分裂原、内毒素和炎症部位诱导表达. 胃内炎症部位COX-2表达程度和其产生的PG对胃黏膜防御有何作用尚未阐明.

8 参考文献

- 1 Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, Chen D, Zhao CM, Podolsky DK, Wang TC. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased

- susceptibility to NSAID injury. *J Clin Invest* 2002; 109: 193-204
- 2 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
- 3 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
- 4 Ren JL, Luo JY, Lu YP, Wang L, Shi HX. Relationship between trefoil factor 1 expression and gastric mucosa injuries and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2674-2677
- 5 Koitabashi A, Shimada T, Fujii Y, Hashimoto T, Hosaka K, Tabei K, Namatame T, Yoneda M, Hiraishi H, Terano A. Indometacin up-regulates TFF2 expression in gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 (Suppl 1): 171-176
- 6 Chi AL, Lim S, Wang TC. Characterization of a CCAAT-enhancer element of trefoil factor family 2 (TFF2) promoter in MCF-7 cells. *Peptides* 2004; 25: 839-847
- 7 Beck PL, Wong JF, Li Y, Swaminathan S, Xavier RJ, Devaney KL, Podolsky DK. Chemotherapy- and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor. *Gastroenterology* 2004; 126: 796-808
- 8 Zhang BH, Yu HG, Sheng ZX, Luo HS, Yu JP. The therapeutic effect of recombinant human trefoil factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat. *Regul Pept* 2003; 116: 53-60
- 9 Verburg M, Renes IB, Einerhand AW, Buller HA, Dekker J. Isolation-stress increases small intestinal sensitivity to chemotherapy in rats. *Gastroenterology* 2003; 124: 660-671
- 10 Renes IB, Verburg M, Van Nispen DJ, Taminiau JA, Buller HA, Dekker J, Einerhand AW. Epithelial proliferation, cell death, and gene expression in experimental colitis: alterations in carbonic anhydrase I, mucin MUC2, and trefoil factor 3 expression. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 317-326
- 11 Eliakim R, Fan QX, Babyatsky MW. Chronic nicotine administration differentially alters jejunal and colonic inflammation in interleukin-10 deficient mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 607-614
- 12 Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Gespach C, Emami S. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *Faseb J* 2003; 17: 7-16
- 13 Rodrigues S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Rodrigue CM, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Emami S, Gespach C. Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 4488-4497
- 14 Shimada T, Koitabashi A, Kuniyoshi T, Hashimoto T, Yoshiura K, Yoneda M, Hiraishi H, Terano A. Up-regulation of TFF expression by PPARgamma ligands in gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 Suppl 1: 119-125
- 15 Blanchard C, Durual S, Estienne M, Bouzakri K, Heim MH, Blin N, Cuber JC. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol* 2004; 172: 3775-3783
- 16 Khan ZE, Wang TC, Cui G, Chi AL, Dimaline R. Transcriptional regulation of the human trefoil factor, TFF1, by gastrin. *Gastroenterology* 2003; 125: 510-521
- 17 Clyne M, Dillon P, Daly S, O'Kennedy R, May FE, Westley BR, Drumm B. *Helicobacter pylori* interacts with the human single-domain trefoil protein TFF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 7409-7414
- 18 卢雅丕, 任建林. 三叶因子家族研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 2019-2021
- 19 任建林, 卢雅丕, 陈建民, 王琳, 叶震世, 施华秀, 吴艳环, 钟燕, 罗金燕. 三叶因子1表达与胃黏膜损伤及胃癌的关系. 中华消化杂志 2003; 23: 671-673
- 20 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
- 21 Thim L, Mortz E. Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regul Pept* 2000; 90: 61-68
- 22 Newton JL, Allen A, Westley BR, May FE. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut* 2000; 46: 312-320
- 23 Muskett FW, May FE, Westley BR, Feeney J. Solution structure of the disulfide-linked dimer of human intestinal trefoil factor (TFF3): the intermolecular orientation and interactions are markedly different from those of other dimeric trefoil proteins. *Biochemistry* 2003; 42: 15139-15147
- 24 Alarcon de la Lastra C, Nieto A, Martin MJ, Cabre F, Herrerias JM, Motilva V. Gastric toxicity of racemic ketoprofen and its enantiomers in rat: oxygen radical generation and COX-expression. *Inflamm Res* 2002; 51: 51-57
- 25 Bandyopadhyay D, Biswas K, Bhattacharyya M, Reiter RJ, Banerjee RK. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. *Curr Mol Med* 2001; 1: 501-513
- 26 Danese S, Cremonini F, Armuzzi A, Candelli M, Papa A, Ojetti V, Pastorelli A, Di Caro S, Zannoni G, De Sole P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* CagA-positive strains affect oxygen free radicals generation by gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 247-250
- 27 Jung HK, Lee KE, Chu SH, Yi SY. Reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1336-1340
- 28 Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek PC, Pawlik MW, Pawlik WW, Kwiecien N, Konturek SJ. The role of reactive oxygen species and capsaicin-sensitive sensory nerves in the pathomechanisms of gastric ulcers induced by stress. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 423-437
- 29 Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 39-50
- 30 Naito Y, Yoshikawa T. Reactive oxygen species and free radical reactions are involved in the pathogenesis of non-steroidal anti-inflammatory drugs-induced gastric mucosal injury. *Nippon Rinsho* 2002; 60 Suppl 2: 211-216
- 31 Bandyopadhyay D, Biswas K, Bhattacharyya M, Reiter RJ, Banerjee RK. Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration: protection by melatonin. *Indian J Exp Biol* 2002; 40: 693-705
- 32 Lazaratos S, Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Goto K, Nakahara A. Oxygen radicals mediate the final exacerbation of endothelin-1-induced gastric ulcer in rat. *Eur J Pharmacol* 2001; 413: 121-129
- 33 Handa O, Naito Y, Takagi T, Shimozawa M, Kokura S, Yoshida N, Matsui H, Cepinskas G, Kvietyts PR, Yoshikawa T. Tumor necrosis factor-alpha-induced cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) production by rat gastric epithelial cells: role of reactive oxygen species and nuclear factor-kappaB. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309: 670-676
- 34 Kasazaki K, Yasukawa K, Sano H, Utsumi H. Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in NH₄OH-induced gastric lesions of rats using a 300 MHz *in vivo* ESR technique. *Free Radic Res* 2003; 37: 757-766
- 35 Shimoyama T, Fukuda S, Liu Q, Nakaji S, Fukuda Y, Sugawara K. *Helicobacter pylori* water soluble surface proteins prime human neutrophils for enhanced production of reactive oxygen species and stimulate chemokine production. *J Clin Pathol* 2003; 56: 348-351
- 36 Shimoyama T, Fukuda S, Liu Q, Nakaji S, Munakata A, Sugawara K. Ecabet sodium inhibits the ability of *Helicobacter pylori* to induce neutrophil production of reactive oxygen species and interleukin-8. *J Gastroenterol* 2001; 36: 153-157

- 37 Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek Pch, Konturek SJ. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 761-773
- 38 Hiraishi H, Oinuma T, Sasai T, Yoshiura K, Shimada T, Terano A. Mechanism of gastric mucosal cell injury induced by reactive oxygen species and nitric oxide. *Nippon Rinsho* 2002; 60 Suppl 2: 130-136
- 39 Ding SZ, O'Hara AM, Denning TL, Dirden-Kramer B, Mifflin RC, Reyes VE, Ryan KA, Elliott SN, Izumi T, Boldogh I, Mitra S, Ernst PB, Crowe SE. *Helicobacter pylori* and H₂O₂ increase AP endonuclease-1/redox factor-1 expression in human gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2004; 127: 845-858
- 40 Yasukawa K, Kasazaki K, Hyodo F, Utsumi H. Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in rats with water immersion restraint-induced gastric lesions using *in vivo* electron spin resonance spectroscopy. *Free Radic Res* 2004; 38: 147-155
- 41 Yoshida N, Sugimoto N, Ochiai J, Nakamura Y, Ichikawa H, Naito Y, Yoshikawa T. Role of elastase and active oxygen species in gastric mucosal injury induced by aspirin administration in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 Suppl 2: 191-197
- 42 Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Sliwowski Z, Pajdo R, Duda A, Ptak A, Hahn EG. Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 320-329
- 43 Hong WS, Jung HY, Yang SK, Myung SJ, Kim JH, Min YI, Chung MH, Lee HS, Kim HW. The antioxidant effect of rebamipide on oxygen free radical production by *H pylori*-activated human neutrophils: in comparison with N-acetylcysteine, ascorbic acid and glutathione. *Pharmacol Res* 2001; 44: 293-297
- 44 Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 20-31
- 45 Xiao S, Liu W. Changes in the treatment of peptic ulcer. *Zhonghua NeiKe ZaZhi* 1996; 35: 3-4
- 46 Hou P, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Ji XH, Li ZS. *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA status and their relationship to associated diseases. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 605-607
- 47 Zevering Y, Jacob L, Meyer TF. Naturally acquired human immune responses against *Helicobacter pylori* and implications for vaccine development. *Gut* 1999; 45: 465-474
- 48 Rathbone BJ, Wyatt JL, Worsley BW, Shires SE, Trejdosiewicz LK, Heatley RV, Losowsky MS. Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia. *Gut* 1986; 27: 642-647
- 49 Yamashita K, Kaneko H, Yamamoto S, Konagaya T, Kusugami K, Mitsuma T. Inhibitory effect of somatostatin on *Helicobacter pylori* proliferation *in vitro*. *Gastroenterology* 1998; 115: 1123-1130
- 50 Beales I, Calam J, Post L, Srinivasan S, Yamada T, DelValle J. Effect of transforming growth factor alpha and interleukin 8 on somatostatin release from canine fundic D cells. *Gastroenterology* 1997; 112: 136-143
- 51 Calam J. The somatostatin-gastrin link of *Helicobacter pylori* infection. *Ann Med* 1995; 27: 569-573
- 52 Seto K, Hayashi-Kuwabara Y, Yoneta T, Suda H, Tamaki H. Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in HeLa cells. *FEBS Lett* 1998; 431: 347-350
- 53 Tunio AM, Holton J, Hobsley M. Gastric juice epidermal growth factor concentration and *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer. *Br J Surg* 1995; 82: 1204-1206
- 54 Liu ZX, Chen BW, Yang GB, Zhang XQ, Jia BQ. Effect of *helicobacter pylori* on gastric mucosal cell proliferation in gastritis. *Beijing DaXue XueBao* 2004; 36: 297-299
- 55 Schiemann U, Konturek J, Assert R, Rembiesz K, Domschke W, Konturek S, Pfeiffer A. mRNA expression of EGF receptor ligands in atrophic gastritis before and after *Helicobacter pylori* eradication. *Med Sci Monit* 2002; 8: CR53-CR58
- 56 高晋华, 梁后杰, 刘为纹, 房殿春, 王振华. 幽门螺杆菌清除前后胃黏膜Cmyc蛋白和表皮生长因子受体的变化. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 1018-1019
- 57 Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996; 38: 498-501
- 58 Uno H, Arakawa T, Fukuda T, Yu H, Fujiwara Y, Higuchi K, Inoue M, Kobayashi K. Nitric oxide stimulates prostaglandin synthesis in cultured rabbit gastric cells. *Prostaglandins* 1997; 53: 153-162
- 59 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
- 60 Haber PS. Metabolism of alcohol by the human stomach. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 407-408
- 61 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
- 62 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
- 63 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
- 64 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
- 65 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
- 66 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
- 67 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
- 68 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
- 69 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
- 70 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
- 71 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
- 72 Singh G. Recent considerations in nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Am J Med* 1998; 105: 31S-38S
- 73 Bazzoli F. Definitions and classification of dyspepsia: pH, *Helicobacter pylori*, non-steroidal anti-inflammatory drugs--should we include gastro-oesophageal reflux disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21 Suppl 1: 15-16, 21-24
- 74 Roberts H, Liabo K, Lucas P, DuBois D, Sheldon TA. Mentoring to reduce antisocial behaviour in childhood. *BMJ* 2004; 328: 512-514
- 75 Tseng CC, Wolfe MM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Med Clin North Am* 2000; 84: 1329-1344
- 76 Pennisi E. Building a better aspirin. *Science* 1998; 280: 1191-1192
- 77 Godil A, DeGuzman L, Schilling RC 3rd, Khan SA, Chen YK. Recent nonsteroidal anti-inflammatory drug use increases the risk of early recurrence of bleeding in patients presenting with

- bleeding ulcer. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 146-151
- 78 Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl* 1997; 49: 15-19
- 79 Chan FK. NSAID-induced peptic ulcers and *Helicobacter pylori* infection: implications for patient management. *Drug Saf* 2005; 28: 287-300
- 80 Tzourmakliotis D, Economou M, Manolakopoulos S, Bethanis S, Bergele C, Lakoumentas J, Sclavos P, Milionis H, Margeli A, Vogiatzakis E, Avgerinos A. Clinical significance of cytotoxin-associated gene A status of *Helicobacter pylori* among non-steroidal anti-inflammatory drug users with peptic ulcer bleeding: a multicenter case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1180-1185
- 81 Bobrzynski A, Konturek PC, Konturek SJ, Plonka M, Bielanski W, Karcz D. *Helicobacter pylori* and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in perforations and bleeding of peptic ulcers. *Med Sci Monit* 2005; 11: CR132-135
- 82 Di Leo V, D'Inca R, Bettini MB, Podswiadek M, Punzi L, Mastropaolo G, Sturniolo GC. Effect of *Helicobacter pylori* and eradication therapy on gastrointestinal permeability. Implications for patients with seronegative spondyloarthritis. *J Rheumatol* 2005; 32: 295-300
- 83 Arkkila PE, Seppala K, Kosunen TU, Sipponen P, Makinen J, Rautelin H, Farkkila M. *Helicobacter pylori* eradication as the sole treatment for gastric and duodenal ulcers. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 93-101
- 84 Perez-Aisa MA, Del Pino D, Siles M, Lanas A. Clinical trends in ulcer diagnosis in a population with high prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 65-72
- 85 Chang CC, Chen SH, Lien GS, Lou HY, Hsieh CR, Fang CL, Pan S. Eradication of *Helicobacter pylori* significantly reduced gastric damage in nonsteroidal anti-inflammatory drug-treated Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 104-108
- 86 Shih SC, Tseng KW, Lin SC, Kao CR, Chou SY, Wang HY, Chang WH, Chu CH, Wang TE, Chien CL. Expression patterns of transforming growth factor-beta and its receptors in gastric mucosa of patients with refractory gastric ulcer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 136-141
- 87 Gonul B, Akbulut KG, Ozer C, Yetkin G, Celebi N. The role of transforming growth factor alpha formulation on aspirin-induced ulcer healing and oxidant stress in the gastric mucosa. *Surg Today* 2004; 34: 1035-1040
- 88 Natale G, Lazzeri G, Blandizzi C, Ferrucci M, Del Tacca M. Differential distribution of transforming growth factor-alpha immunohistochemistry within whole gastric mucosa in rats. *Eur J Histochem* 2003; 47: 359-364
- 89 Hsieh JS, Wang JY, Lin SR, Hsieh TJ, Huang TJ. Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor mRNA in the gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1305-1310
- 90 Tuccillo C, Manzo BA, Nardone G, D'Argenio G, Rocco A, Di Popolo A, Della VN, Staibano S, De Rosa G, Ricci V, Del Vecchio BC, Zarrilli R, Romano M. Up-regulation of heparin binding epidermal growth factor-like growth factor and amphiregulin expression in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 498-505
- 91 Akbulut KG, Gonul B, Turkiymaz A, Celebi N. The role of epidermal growth factor formulation on stress ulcer healing of the gastric mucosa. *Surg Today* 2002; 32: 880-883
- 92 Hori K, Shiota G, Kawasaki H. Expression of hepatocyte growth factor and c-met receptor in gastric mucosa during gastric ulcer healing. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 23-31
- 93 Gronbech JE, Varhaug JE, Svanes K. Restituted gastric mucosa: tolerance against low luminal pH and restricted mucosal blood flow in the cat. *Gastroenterology* 1989; 96: 50-61
- 94 Balint GA, Sagi I, Dobronte Z, Varro V. Effect of different prostaglandin analogues on gastric acid secretion and mucosal blood flow in the dog: action on stimulated and resting mucosa. *Acta Med Hung* 1984; 41: 149-155
- 95 Konturek SJ, Robert A. Cytoprotection of canine gastric mucosa by prostacyclin: possible mediation by increased mucosal blood flow. *Digestion* 1982; 25: 155-163
- 96 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
- 97 Kang W, Rathinavelu S, Samuelson LC, Merchant JL. Interferon gamma induction of gastric mucous neck cell hypertrophy. *Lab Invest* 2005; 85: 702-715
- 98 Bandyopadhyay U, Biswas K, Bandyopadhyay D, Ganguly CK, Banerjee RK. Dexamethasone makes the gastric mucosa susceptible to ulceration by inhibiting prostaglandin synthetase and peroxidase--two important gastroprotective enzymes. *Mol Cell Biochem* 1999; 202: 31-36
- 99 Ranta-Knuuttila T, Mustonen H, Kivilaakso E. Topical prostaglandin E2 protects isolated gastric mucosa against acidified taurocholate-but not ethanol-or aspirin-induced injury. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 99-104
- 100 Schmidt C, Baumeister B, Kipnowski J, Miederer SE, Vetter H. Magaldrate stimulates endogenous prostaglandin E2 synthesis in human gastric mucosa *in vitro* and *in vivo*. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 2443-2446
- 101 Suetsugu H, Ishihara S, Moriyama N, Kazumori H, Adachi K, Fukuda R, Watanabe M, Kinoshita Y. Effect of rebamipide on prostaglandin EP4 receptor gene expression in rat gastric mucosa. *J Lab Clin Med* 2000; 136: 50-57
- 102 Synnerstad I, Holm L. Prostaglandin E2 and aggressive factors increase the gland luminal pressure in the rat gastric mucosa *in vivo*. *Gastroenterology* 1998; 114: 1276-1286
- 103 Bago J, Renic M, Kucisec N, Culo F, Bilic A, Eljuga D, Jurcic D. Effects of smoking and *Helicobacter pylori* on prostaglandin concentrations in gastric and duodenal mucosa of patients with duodenal ulcer and duodenitis. *Coll Antropol* 1997; 21: 507-515
- 104 Bamba H, Ota S, Kato A, Matsuzaki F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may delay the repair of gastric mucosa by suppressing prostaglandin-mediated increase of hepatocyte growth factor production. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 567-571
- 105 Bode C, Maute G, Bode JC. Prostaglandin E2 and prostaglandin F2 alpha biosynthesis in human gastric mucosa: effect of chronic alcohol misuse. *Gut* 1996; 39: 348-352
- 106 Sarosiek J, Marcinkiewicz M, Parolisi S, Peura DA. Prostaglandin E2 content in residual gastric juice reflects endoscopic damage to the gastric mucosa after naproxen sodium administration. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 873-878
- 107 Akahoshi T, Tanigawa T, Sarfeh IJ, Chiou SK, Hashizume M, Maehara Y, Jones MK. Selective cyclooxygenase (COX) inhibition causes damage to portal hypertensive gastric mucosa: roles of nitric oxide and NF-kappaB. *Faseb J* 2005; 19: 1163-1165
- 108 Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Pajdo R, Stachura J, Hahn EG, Konturek SJ. Lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* protects gastric mucosa via generation of nitric oxide. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 699-717
- 109 Calatayud S, Barrachina D, Esplugues JV. Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa. *Microsc Res Tech* 2001; 53: 325-335
- 110 Gallego-Sandin S, Novalbos J, Rosado A, Gisbert JP, Galvez-Mugica MA, Garcia AG, Pajares JM, Abad-Santos F. Effect of ibuprofen on cyclooxygenase and nitric oxide synthase of gastric mucosa: correlation with endoscopic lesions and adverse reactions. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1538-1544
- 111 Helmer KS, Cui Y, Chang L, Dewan A, Mercer DW. Effects of ketamine/xylazine on expression of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase, and cyclo-oxygenase-2 in rat gastric mucosa during endotoxemia. *Shock* 2003; 20: 63-69

- 112 Iwata F, Joh T, Yokoyama Y, Itoh M. Role of endogenous nitric oxide in ischaemia-reperfusion injury of rat gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 997-1001
- 113 Kiuchi Y, Isobe Y, Kijima H, Higuchi S, Fukushima K. Effect of pibutidine hydrochloride on nitric oxide production in rat gastric mucosa. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1998; 100: 273-282
- 114 Konturek PC, Brzozowski T, Kania J, Konturek SJ, Hahn EG. Nitric oxide-releasing aspirin protects gastric mucosa against ethanol damage in rats with functional ablation of sensory nerves. *Inflamm Res* 2003; 52: 359-365
- 115 Konturek PC, Brzozowski T, Ptak A, Kania J, Kwiecien S, Hahn EG, Konturek SJ. Nitric oxide releasing aspirin protects the gastric mucosa against stress and promotes healing of stress-induced gastric mucosal damage: role of heat shock protein 70. *Digestion* 2002; 66: 160-172
- 116 Lamarque D, Whittle BJ. Involvement of peroxynitrite in the lipid peroxidation induced by nitric oxide in rat gastric mucosa. *Eur J Pharmacol* 1996; 313: R5-R7
- 117 Lazaratos S, Kashimura H, Nakahara A, Fukutomi H, Osuga T, Goto K. L-arginine and endogenous nitric oxide protect the gastric mucosa from endothelin-1-induced gastric ulcers in rats. *J Gastroenterol* 1995; 30: 578-584
- 118 Middleton SJ, Reynolds PD, Shorthouse M, Hunter JO, Moss S. Nitric oxide synthase in gastric mucosa. *Gut* 1995; 36: 942
- 119 Ohta M, Tarnawski AS, Itani R, Pai R, Tomikawa M, Sugimachi K, Sarfeh IJ. Tumor necrosis factor alpha regulates nitric oxide synthase expression in portal hypertensive gastric mucosa of rats. *Hepatology* 1998; 27: 906-913
- 120 Price K, Hanson P. Constitutive nitric oxide synthases in rat gastric mucosa: subcellular distribution, relative activity and different carboxyl-terminal antigenicity of the neuronal form compared with cerebellum. *Digestion* 1998; 59: 308-313
- 121 Tripp MA, Tepperman BL. Effect of nitric oxide on integrity, blood flow and cyclic GMP levels in the rat gastric mucosa: modulation by sialoadenectomy. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 344-348
- 122 Wada K, Kamisaki Y, Ohkura T, Kanda G, Nakamoto K, Kishimoto Y, Ashida K, Itoh T. Direct measurement of nitric oxide release in gastric mucosa during ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol* 1998; 274: G465-471
- 123 Wang HY, Ma L, Li Y, Cho CH. The role of nitric oxide on cigarette smoke-induced programmed cell death in the gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 235-240
- 124 Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Szlachcic A, Pytko-Polonczyk J. Implications of nitric oxide in the action of cytoprotective drugs on gastric mucosa. *J Clin Gastroenterol* 1993; 17 Suppl 1: S140-S145
- 125 Tepperman BL, Soper BD. Nitric oxide synthase induction and cytoprotection of rat gastric mucosa from injury by ethanol. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72: 1308-1312
- 126 Whittle BJ, Boughton-Smith NK, Moncada S. Biosynthesis and role of the endothelium-derived vasodilator, nitric oxide, in the gastric mucosa. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 664: 126-139
- 127 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
- 128 Wallace JL, Ma L. Inflammatory mediators in gastro-intestinal defense and injury. *Exp Biol Med* 2001; 226: 1003-1015

电编 张勇 编辑 管鑫妍 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 ●

我国科技论文总数连续三年世界第五

本刊讯 2004年度中国科技论文统计结果于2005-12-06在北京揭晓,与上一年度相比,我国科技论文SCI论文数增长15.2%,论文被引用篇数和次数分别增长4.4%和4.3%。更可喜的是,在过去十年间,我国论文被引用数已排在世界第14位,与上一年同一数据相比,位次提高了4位,

据介绍,2004年度《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP)共收录我国作者的论文111 356篇,比上年增加93 352篇,增长率为19.3%。我国科技论文占世界论文总数的6.3%,较上年增加1.2%,连续3年保持在世界第5位,前4位国家是美国、日本、英国和德国。根据生物医学专家的建议,今年在统计中新增加了美国《医学索引》(MEDLINE)检索系统,该系统是当今较权威的生物医学文献检索系统,我国大陆75种期刊被收录其中。

2004年度我国国内论文最多的学科仍是临床医学,基础医学名列第六。国内被引用次数最多的学科也是临床医学,基础医学名列第五。国际被引用论文篇数,基础医学与临床医学名列第八和第九。由于综合大学并校,高校论文产出前20位排名榜中已不见了医学院校,但在MEDLINE收录的高等院校排名中,仍可看到医学科技论文对综合大学论文排名的贡献。2004年排在SCI收录论文数第一的医疗机构是北京大学第一医院,解放军总医院在国内论文被引用次数、国内论文数和国际国内论文总数三个统计项目中,均名列医疗机构第一。

在同时公布的第四届中国百种杰出学术期刊中,22种医药卫生类期刊榜上有名。[摘自《健康报(记者张荔子)》]

应用载体介导的 RNAi 技术抑制人胃癌和腹膜间皮细胞中 TGF- β_1 的表达

吴涛, 徐惠绵, 吴晓华, 姜成钢, 于淼

吴涛, 徐惠绵, 姜成钢, 于淼, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科 辽宁省沈阳市 110001

吴晓华, 秦皇岛市第一医院普外科 河北省秦皇岛市 066000

吴涛, 男, 1972-09-08生, 辽宁省丹东市人, 2003年中国医科大学博士生, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤侵袭、转移的研究。

国家重点基础研究发展规划973项目资助, No. G1998051203

辽宁省自然科学基金资助, No. 2001225002-3

通讯作者: 徐惠绵, 110001, 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科. xuhuijian@126.com

电话: 024-23256666-6227

收稿日期: 2005-08-03 接受日期: 2005-08-26

RNAi-mediated gene silencing of transforming growth factor- β_1 expression in human gastric cancer cell line SGC-7901 and peritoneal mesothelial cells

Tao Wu, Hui-Mian Xu, Xiao-Hua Wu, Cheng-Gang Jiang, Miao Yu

Tao Wu, Hui-Mian Xu, Cheng-Gang Jiang, Miao Yu, Department of Oncology, the First Hospital of Chinese Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Xiao-Hua Wu, Department of General Surgery, the First Hospital of Qinhuangdao 066000, Hebei Province, China

Supported by the 973 Project of National Key Fundamental Research and Development, No. G1998051203, and Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 2001225002-3

Correspondence to: Hui-Mian Xu, Department of Oncology, the First Hospital of Chinese Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. xuhuijian@126.com

Received: 2005-08-03 Accepted: 2005-08-26

Abstract

AIM: To silence the expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) gene in human gastric cancer cell line SGC-7901 and peritoneal mesothelial cells using vector based RNA interference (RNAi) technique.

METHODS: A vector, which was used to transcribe functional short interfering RNA (siRNA), was constructed, and 62 mer oligonucleotide fragment was inserted into the downstream of the hU6 promoter. Mesothelial cells were isolated from human omenta by trypsin-EDTA disaggregation, and identified by morphology and streptomycin anti-biotin protein-peroxidase method. The plasmids containing TGF- β_1 target sequences were transfected into the two kinds of cells mentioned above, and then the expression level of TGF- β_1 was

detected by semiquantitative RT-PCR and Western blot technique.

RESULTS: Electrophoresis and DNA sequencing confirmed that the TGF- β_1 -specific siRNA was synthesized and cloned into the expression vector pcPUR β iCassette successfully. Immunohistochemistry showed positive staining for cytokeratin and vimentin, but negative staining for leukocyte common antigen and factor VIII-related antigen in cultured mesothelial cells. As compared with their respective untreated group, the TGF- β_1 mRNA and protein expression in the two kinds of transfected cells were remarkably decreased, especially TGF- β_1 protein. TGF- β_1 protein was reduced by a percent of 65.8% and 61.8% in human gastric cancer cell line SGC-7901 and mesothelial cells, respectively.

CONCLUSION: TGF- β_1 expression can be notably inhibited in human gastric cancer cell line SGC-7901 and peritoneal mesothelial cells using plasmid-based TGF- β_1 -RNAi technique.

Key Words: Vector-based; RNA interference; Transforming growth factor- β_1 ; Gastric cancer; peritoneal mesothelium

Wu T, Xu HM, Wu XH, Jiang CG, Yu M. RNAi-mediated gene silencing of transforming growth factor- β_1 expression in human gastric cancer cell line SGC-7901 and peritoneal mesothelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(21):2530-2534

摘要

目的: 应用载体介导的RNAi技术特异地干扰TGF- β_1 在人胃癌细胞株SGC-7901和腹膜间皮细胞中的表达。

方法: 使用线性化的pcPUR β iCassette质粒构建针对TGF- β_1 基因的siRNA表达载体; hU6载体启动子下游插入含TGF- β_1 基因特异性序列的62 mer寡核苷酸片段; 采用胰蛋白酶-EDTA消化法, 从人的腹膜组织中分离腹膜间皮细胞。采用形态学和链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法对培养细胞进行鉴定。将TGF- β_1 -siRNA载体转染人的上述两种细胞, 以半定量RT-PCR和Western印迹方法检测转染后两种细胞中TGF- β_1 的表达水平的变化。

结果: 电泳、DNA测序证实合成的siRNA基因序列正确并已准确克隆入pcPUR β iCassette载体. 免疫组化染色结果显示腹膜间皮细胞角蛋白, 波形蛋白表达阳性, 而白细胞共同抗原(CD45), 第VIII因子相关抗原阴性. 与各自未处理组比较, 两种细胞TGF- β_1 -siRNA载体组的mRNA和蛋白均明显下降, 并以蛋白下降更为明显. 人胃癌细胞株SGC-7901 TGF- β_1 蛋白下降约65.8%, 人腹膜间皮细胞TGF- β_1 蛋白下降约61.8%.

结论: 载体介导的RNAi技术可成功地干扰TGF- β_1 在人胃癌细胞株SGC-7901和腹膜间皮细胞中的表达, 为今后胃癌腹膜转移的基因靶向治疗奠定了基础.

关键词: 载体介导; RNAi; TGF- β_1 ; 胃癌; 腹膜间皮

吴涛, 徐惠绵, 吴晓华, 姜成钢, 于淼. 应用载体介导的RNAi技术抑制人胃癌和腹膜间皮细胞中TGF- β_1 的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2530-2534

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2530.asp>

0 引言

转化生长因子(transforming growth factor)因其功能的多样性而受到广泛的关注. TGF- β_1 可上调肿瘤细胞的黏附分子表达, 抑制机体免疫细胞活性, 促进肿瘤血管生成等, 与多种肿瘤转移关系密切^[1]. 同时, TGF- β_1 不仅刺激细胞或基质的合成, 也能抑制细胞外基质的降解, 是纤维化过程的中心环节^[2], 在腹膜纤维化的病理过程中起重要作用. 而胃癌腹膜转移是特殊的肿瘤细胞和腹膜适宜环境相互作用的结果. RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA(double-stranded RNA, DsRNA)诱导与之同源的mRNA降解, 从而引发的转录后基因沉默机制(post-transcriptional gene silencing, PTGS). 目前已成功用于基因功能和信号传递系统上下游分子相互关系的研究, 有可能成为继反义核酸, 核酶之后的又一新手段^[3]. 我们自行构建能在细胞内转录出功能性siRNA的载体, 并将其用于干扰人胃癌细胞株SGC-7901和人腹膜间皮细胞TGF- β_1 的表达, 为胃癌腹膜转移的防治研究奠定基础.

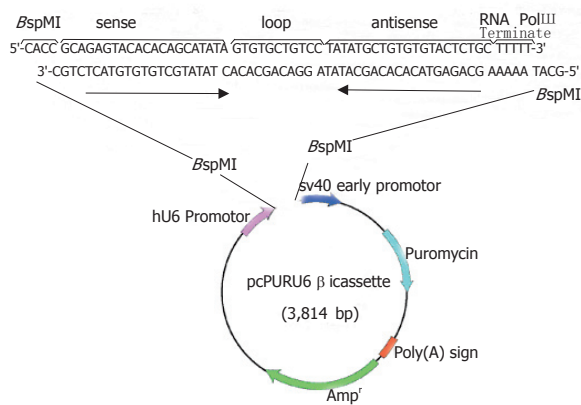
1 材料和方法

1.1 材料 线性化的pcPUR β iCassette载体, Takara DNA Ligation Kit, EndoFree[®] Plasmid MAXI Kit, *E. coli* DH5 α Competent Cells, PCR引物, RT-PCR试剂盒购于日本Takara公司. Trizol, FCS, RPMI-1640购于Gibco公司. 梭华-Sofast基因转染试剂购于厦门太阳马公司. TGF- β_1 兔抗人多克隆抗体购Santa Cruz公司. 抗细胞角蛋白抗体, 抗波形蛋白抗体, 抗白细胞CD45抗体, 抗第VIII因子相关抗原抗体购于福州迈新公司. 人胃癌细胞株SGC-7901由中国医科大学细胞生物教研室提供. 取

择期手术良性病变患者的大网膜, 大小约6 cm $\times$ 6 cm, 严格按无菌要求操作, 摘除血管及脂肪组织. PBS洗数次后置于2 g/L胰蛋白酶-EDTA消化液中, 37 $^{\circ}$ C温箱孵育10 min, 取出大网膜置于含200 mL/L胎牛血清的RPMI-1640培养液中, 用吸管反复吹打15 min, 吸取培养液接种在1 g/L明胶包被的25 cm²培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养箱中培养. 6 h后轻轻将培养液置于另一个1 g/L明胶包被的25 cm²培养瓶中继续培养. 以后每3 d换1次培养液, 大约5-7 d可传代, 传至2代, 细胞行免疫组织化学染色鉴定. 免疫组织化学染色采用SP法, 行抗人角蛋白, 抗人波形蛋白, 抗人白细胞CD45, 抗VIII因子相关抗原抗体组化染色. 第2, 3代细胞可用于试验. 刚从大网膜消化下来的间皮细胞在倒置显微镜镜下为葡萄串状, 大约24 h左右贴壁, 呈多形性, 边缘不整, 以后细胞生长融合呈多角形, 似铺路鹅卵石样外观. 免疫组化鉴定细胞角蛋白, 波形蛋白抗原阳性, 白细胞CD45, 第VIII因子相关抗原阴性.

1.2 方法

1.2.1 TGF- β_1 的siRNA表达载体构建 根据TGF- β_1 的基因序列, 使用siRNA Design Support System设计出合适的靶序列5'-GCAGAGTACACACAGCATA-3', NCBI GenBank提供的BLAST软件, 对选择的靶序列进行同源分析, 排除siRNA非特异性抑制其他基因片段的可能. 合成编码发夹结构siRNA的正义链(5'-CACCGCAGAGTACACACAGCATATAGTGTGCTGCTCTATATGCTGTGTGTACTCTGCTTTTT-3')和反义链(5'-GCATAAAAAGCAGAGTACACACAGCATATAGGACAGCACACTATATGTCTGTGTACTCTGT-3'), 正、反义链均为62 mer的寡核苷酸片段, 退火, 形成双链DNA. 反应体系: 取正、反义链(浓度均为100 mg/L)5.0 μ L; 条件: 99 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 90 min, 缓慢降温到30 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C保存. 退火产物用dH₂O稀释20倍, 取1 μ L进行40 g/L琼脂糖凝胶电泳. 使用TakaRa DNA Ligation Kit中的Solution I, 将目的片段与pcPUR β iCassette载体连接后, 热转化至*E. coli* DH5 α Competent Cells中, 涂布平板后, 37 $^{\circ}$ C过夜培养. 检菌、挑选阳性菌落植菌, 提取质粒后进行测序, 结果符合要求. 再挑取菌落植菌, 过夜培养. 使用EndoFree[®] Plasmid MAXI Kit, 进行去掉内毒素的质粒提取. 使用100 μ L Endotoxin-free TE buffer充分溶解, 取1 μ L稀释10倍后, 取1 μ L进行10 g/L琼脂糖凝胶电泳. 本实验同时设计G:C:A:T同样为4:5:8:2的非特异性序列5'-GACTAGGTAGCCAAACCAA-3'为阴性对照组, 经BLAST软件排除非特异性抑制其他基因片段的可能, 通过上述相同方法构建非特异性片段的siRNA表达载体. 下图为TGF- β_1 特异性表达载体构建示意图.



1.2.2 人胃癌细胞株SGC-7901和人腹膜间皮细胞细胞转染 转染前1 d, 将对数生长期的人胃癌细胞株SGC-7901和人腹膜间皮细胞分别以 4×10^5 和 6×10^5 个/孔接种于6孔板上, 第2天当细胞融合达60%左右时进行转染. 实验分4组: (1)对照组: 加入RPMI-1640培养液200 μ L; (2)TGF- β_1 -siRNA表达载体组: 2 μ g特异性质粒及4 μ L Sofast转染试剂复合物, 稀释液总体积200 μ L; (3)非特异性片段表达载体组: 2 μ g非特异性质粒及4 μ L Sofast转染试剂复合物, 稀释液总体积200 μ L; (4)空白载体组: 加入4 μ L Sofast转染试剂和196 μ L RPMI-1640培养液. 具体操作步骤按说明书执行. 于转染后72 h弃培养液, PBS冲洗2次, 加入Trizol提取各实验组细胞的总RNA. 实验步骤按试剂说明进行, 将沉淀的RNA进行干燥处理, 用无RNase污染的水将RNA溶解, 在260-280 nm测吸光度 A 值, 要求 $A_{260}/A_{280} \geq 2.0$, 计算出RNA含量, 并用其合成cDNA, 反应体系: 30 $^{\circ}$ C 10 min, 45 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min. 人TGF- β_1 引物上游从基因的第894个碱基开始 5'-CAACAATTCCTGGCGATACCTCA-3', 下游引物从基因的第1 279个碱基开始, 5'-ATCCACTTCCAGCCGAGGTCCTT-3', 扩增长度为386 bp. 内参照(人 β -actin)上游引物为5'-AAATCGTGC GTGACATTA-3', 下游引物5'-CTCGTCATACTCCTGCTT-3', 扩增片段长度为381 bp. 反应体系: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 57.5 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C

1 min, 循环30次. PCR产物在15 g/L的琼脂糖凝胶中电泳(电泳仪为: DYY-III 33A型), 于自动电泳凝胶成像分析系统(Chemi Imager 5500, Alpha InnCh, USA)下成像, FluorChen V.2.0系统采集扩增条带的整合吸光度 A 值, 作为电泳条带的强度指标, 以 β -actin为内对照, 并以 β -actin表达条带的强度为标准, 采用各条带 A 值与相应 β -actin A 值的比值作为指标进行比较, 重复试验3次. 转染72 h后, 胰蛋白酶消化细胞, PBS冲洗2次, 加细胞裂解液(50 mmol/L Tris $\cdot$ Cl, 1 mmol/L EDTA, 20 g/L SDS, 5 mmol/L DTT, 10 mmol/L PMSF)裂解, 超声破碎, Bradford方法测定细胞蛋白浓度. 细胞蛋白样品于100 $^{\circ}$ C水浴5 min. 将各组细胞样品的蛋白浓度调整一致后, 各取20 μ L上样进行SDS-PAGE, 电泳完毕后, 将凝胶中的蛋白转移至PVDF膜上, PVDF膜以含2%脱脂奶粉的TTBS室温封闭2 h, 加TGF- β_1 多克隆抗体(工作浓度1:200), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 鼠抗兔二抗(1:2 000)室温孵育2 h, ECL试剂于暗室自显影. 于自动电泳凝胶成像分析系统(Chemi Imager 5500, Alpha InnCh, USA)下成像, FluorChen V.2.0系统采集扩增条带的整合光密度值, 作为条带的强度指标. 重复试验3次.

统计学处理: 采用SPSS 11.5软件对各实验数据进行统计分析.

2 结果

2.1 TGF- β_1 的siRNA表达载体构建 退火产物各用dH₂O

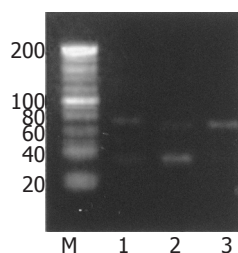


图1 退火产物琼脂糖凝胶电泳图. M: 20 bp DNA Ladder Marker; 1: 编码发夹结构TGF- β_1 siRNA的正义链. 上面一条带是sense和antisense形成的互补结构; 2: 编码发夹结构TGF- β_1 siRNA的正、反义链退火产物; 3: 阴性对照组非特异性片段正、反义链退火产物. 上面一条带为退火产物, 下面的为未结合成双链的正、反义链.

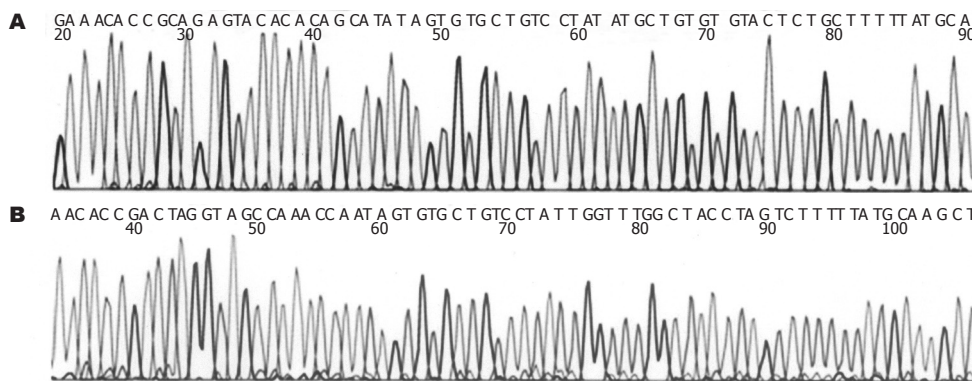


图2 DNA测序图. A: TGF- β_1 的siRNA表达载体; B: 含非特异性片段的阴性对照表达载体.

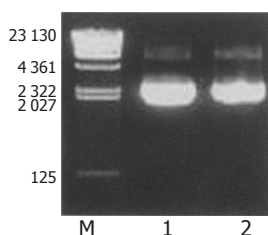


图3 去掉内毒素的质粒琼脂糖凝胶电泳图。M: λ -Hind III DNA Marker; 1: TGF- β_1 的siRNA表达载体; 2: 阴性对照表达载体。可见下面的超螺旋结构形式的浓度大, 上面有缺口的极少, 故构建的质粒纯度高。

稀释20倍, 取1 μ L进行40 g/L琼脂糖凝胶电泳, 电压150 V(图1)。基因测序证实合成的siRNA基因序列正确, 并已准确克隆入线性化的pcPUR β iCassette载体中, 质粒符合要求(图2)。表达载体构建成功后为环形结构, 去掉内毒素的质粒经100 μ L Endotoxin-free TE buffer充分溶解, 取1 μ L稀释10倍后, 再取1 μ L进行10 g/L琼脂糖凝胶电泳(图3)。

2.2 TGF- β_1 mRNA和蛋白表达的变化 人胃癌细胞株SGC-7901和腹膜间皮细胞的内参照 β -actin扩增产物, 均在381 bp处出现基因条带(图4 AB)。两种细胞的各处理组之间条带亮度基本相同; 人胃癌细胞株SGC-7901和人腹膜间皮细胞TGF- β_1 扩增产物, 均在386 bp处出现基因条带(图4 CD)。蛋白印记显示人胃癌细胞株SGC-7901和腹膜间皮细胞均表达25 ku的产物。人胃癌细胞株SGC-7901和腹膜间皮细胞的TGF- β_1 -siRNA表达载体组和各自对照组相比较, TGF- β_1 mRNA和蛋白均下降显著, 有统计学意义。其中蛋白下降水平更为明显, 分别下降65.8%和61.8% (图4 EF)。

3 讨论

在胃癌转移复发因素中, 腹膜种植性转移最为多见, 导致以顽固性腹水为特征的癌性腹膜炎, 是胃癌患者

最主要的死亡原因。腹膜转移是特殊的肿瘤细胞和腹膜适宜环境相互作用的结果。TGF- β_1 是一种多功能生长调节因子, 可能成为胃癌腹膜转移治疗的重要靶点。TGF- β_1 可使间皮细胞变形, 腹膜纤维化; TGF- β_1 可使胃癌细胞表达的黏附分子如CD44表达增多; 抑制腹腔内淋巴细胞活性使其无法有效的杀伤腹腔内游离癌细胞以及血管生成等^[4-6]。我们证实人胃癌细胞株SGC-7901及原代培养的人腹膜间皮细胞均有TGF- β_1 表达。RNAi技术通过导入一段与内源基因同源的dsRNA序列, 可以高效、特异地降解有关基因的mRNA, 诱使细胞表现出特定基因缺失的表型^[7]。Spankuch-Schmitt *et al*^[8]在乳腺癌细胞系, 子宫颈癌细胞系, 结肠癌细胞系等细胞中进行了成功的RNA干扰实验, 并观察到癌细胞增殖明显减少, 凋亡显著增加。而直接向细胞内导入siRNA存在基因沉默维持时间短, 体内运载难和转染效果不稳定等问题, 因此限制了该技术的应用, 而利用载体介导的RNAi技术将有望克服上述困难^[9]。鉴于此, 我们以人胃癌细胞和腹膜间皮细胞这一对相互作用的细胞作为研究对象, 以TGF- β_1 基因作为靶分子, 通过自行构建能在细胞内转录出功能性siRNA的载体, 探讨其对TGF- β_1 表达的影响。本研究应用siRNA Design Support System, 主要参照了Elbashir *et al*^[10]的经验, 对其中反向互补的19 mer目的基因序列的选择按照以下原则: siRNA序列的长度设计为21个碱基(Target 19个碱基+Overhang 2个碱基)较为有效; GC含量为50%左右时最佳, 过高的G%+C%会带来操作上的困难, 如退火、测序鉴定等, 并且由于其在62 mer插入片段中呈反向互补排列, 可能会影响其在细胞内转录。通常在编码区域(coding region: CR)内进行设计, 但为了避开转录翻译因子的结合位置, 应在起始密码子后的50-100个碱基

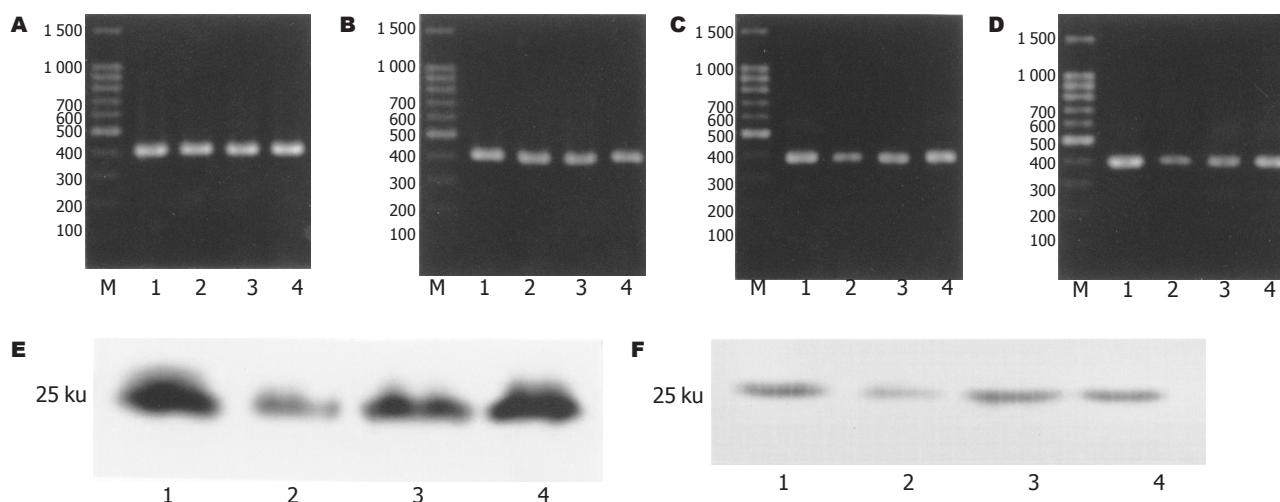


图4 TGF- β_1 蛋白及mRNA的表达。A: 胃癌细胞SGC-7901 β -actin扩增产物; B: 腹膜间皮细胞 β -actin扩增产物; C: 胃癌细胞SGC-7901 TGF- β_1 mRNA扩增产物; D: 腹膜间皮细胞TGF- β_1 mRNA扩增产物; E: 胃癌细胞SGC-7901 TGF- β_1 蛋白印记产物; F: 腹膜间皮细胞TGF- β_1 蛋白印记产物; 1: 对照组; 2: TGF- β_1 -siRNA表达载体组; 3: 非特异性片段siRNA表达载体组; 4: 空白载体组。

后进行设计. 使用Pol III Promoter进行转录时, 如遇上4个碱基的T或A的连续结构(即TTTT或AAAA)时, 其转录反应会被终止. 因此, 具有4个碱基的T或A的连续结构的序列不适用于使用Pol III Promoter的表达载体. 具有G或C的4个碱基以上的连续结构(即: GGGG或CCCC), 容易形成复杂的立体结构, 最好不要使用. 注意设计特异性较好的序列, 不要设计和其他基因具有较高同源性的siRNA序列. 包含这段双链DNA的质粒载体转染到细胞之后, 在RNA聚合酶III的作用下, 以负链为模板, 从起始位点开始转录, 转录出的RNA由于具有回文序列, 会形成一个发卡样结构, 从而得到了双链RNA. 片段后面加了5个胸腺嘧啶, RNA转录到这个位置时就会终止. 而且转录出的RNA形成发卡样结构后, 会在3'端形成2个突出的尿嘧啶, 这类类似于天然的siRNA, 因而有利于双链RNA诱发RNAi. 最有效的siRNA双链长度为21个核苷酸, 包括19 bp的双链序列. 通过电泳及质粒测序证实合成的siRNA基因序列正确, 并已准确克隆入pcPUR β iCassette载体, 符合要求. 最后通过对人胃癌细胞株SGC-7901和人腹膜间皮细胞进行干扰, RT-PCR和Western蛋白印迹结果显示TGF- β_1 -siRNA载体可以显著特异性地在基因转录和蛋白表达两个水平上抑制上述两种细胞TGF- β_1 的表达, 这就为今后胃癌腹膜转移的阻断治疗提供了新的思路及依据.

4 参考文献

- 1 Ye SC, Foster JM, Li W, Liang J, Zborowska E, Venkateswarlu S, Gong J, Brattain MG, Willson JK. Contextual effects of transforming growth factor beta on the tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1999; 59: 4725-4731
- 2 Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292
- 3 Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 110-119
- 4 Nakashio T, Narita T, Akiyama S, Kasai Y, Kondo K, Ito K, Takagi H, Kannagi R. Adhesion molecules and TGF-beta1 are involved in the peritoneal dissemination of NUGC-4 human gastric cancer cells. *Int J Cancer* 1997; 70: 612-618
- 5 Choi YH, Choi KC, Park YE. Relationship of transforming growth factor beta 1 to angiogenesis in gastric carcinoma. *J Korean Med Sci* 1997; 12: 427-432
- 6 Yoon SJ, Heo DS, Kang SH, Lee KH, Kim WS, Kim GP, Lee JA, Lee KS, Bang YJ, Kim NK. Natural killer cell activity depression in peripheral blood and ascites from gastric cancer patients with high TGF-beta 1 expression. *Anticancer Res* 1998; 18: 1591-1596
- 7 Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-366
- 8 Spankuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, Strebhardt K. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1863-1877
- 9 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
- 10 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498

电编 张敏 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 •

专家门诊

《世界华人消化杂志》特设"专家门诊"固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 邀请本刊编委为专栏撰稿, 每期1-3个专家门诊. 写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm $\times$ 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间

发酵莲子乳对小鼠胃肠道运动、吸收功能的调节作用

吴小南, 陈洁, 汪家梨, 林建银

吴小南, 陈洁, 汪家梨, 福建医科大学公共卫生学院 福建省福州市 350004

林建银, 福建医科大学分子医学研究中心 福建省福州市 350004

吴小南, 男, 1963-07-28生, 福建省南安人, 汉族, 2004年福建医科大学病原生物学博士, 教授, 主要从事营养与保健资源开发研究。

教育部重点项目基金资助项目, No.02074

通讯作者: 林建银, 350004, 福建省福州市交通路88号, 福建医科大学分子医学研究中心, jylin@fjmu.edu.cn

电话: 0591-83569450 传真: 0591-83351345

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

Modulatory role of lotus-seed milk fermented product on gastrointestinal motility and absorption in mice

Xiao-Nan Wu, Jie Chen, Jia-Li Wang, Jian-Yin Lin

Xiao-Nan Wu, Jie Chen, Jia-Li Wang, School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China

Jian-Yin Lin, Research Center of Molecular Medicine, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China

Supported by the Key Program Foundation of Ministry of Education of China, No.02074

Correspondence to: Dr. Jian-Yin Lin, Research Center of Molecular Medicine, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China. jylin@fjmu.edu.cn

Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-06

Abstract

AIM: To explore the modulatory role of lotus-seed milk fermented product (LMFP) on gastrointestinal motility and absorption function in mice.

METHODS: Mice were divided into groups by the randomized complete weight-block design and treated with distilled water, different drugs and different concentrations of LMFP accordingly. L-arginine was intraperitoneally injected into the mice to observe the state of gastric emptying, small intestinal propelling, and the nitric oxide (NO) concentration in gastric homogenate; Compound Diphenoxylate was used to establish the mouse model of constipation, and the time, weight, quantity and the water content of black feces were measured; Reserpine was subcutaneously injected into the mice to calculate the small intestinal propellant rate and the content of uric xylose.

RESULTS: The delay of gastric emptying was positively correlated with the NO concentration ($r = 0.475$, $P = 0.001$). As compared with those in the L-Arginine

model group, the volumns of phenol red leaving in the stomach of 250, 500 mL/L LMFP groups and Domperidone group were significantly decreased ($22.78 \pm 6.95\%$, $27.12 \pm 5.73\%$, $22.82 \pm 5.63\%$ vs $34.76 \pm 9.15\%$, $P < 0.05$) and the NO concentration of gastric homogenate in 250 mL/L LMFP group and Domperidone group were lower ($26.13 \pm 4.95 \mu\text{mol/g pro}$, $26.33 \pm 4.06 \mu\text{mol/g pro}$ vs $38.33 \pm 9.82 \mu\text{mol/g pro}$, $P < 0.05$). The volumns of phenol red leaving in the distal 3 small intestinal segments of 500 mL/L, 750 mL/L LMFP group and Domperidone group were markedly higher, and the volumns leaving in the distal 4 small intestinal segments in 750 mL/L LMFP group and Domperidone group were also notably increased ($P < 0.05$), in comparison with those in the model group. The time of black feces excreted was reduced and the water content of the feces were significantly increased in 250, 500, 750 mL/L LMFP groups than those in the model group (133.63 ± 18.28 , 113.25 ± 26.25 , $141.75 \pm 25.95 \text{ min}$ vs $175.50 \pm 24.04 \text{ min}$, $P < 0.05$). The weights of black feces in 250 and 500 mL/L LMFP groups were increased than those in the model group (0.68 ± 0.16 , $0.82 \pm 0.23 \text{ g}$ vs $0.37 \pm 0.13 \text{ g}$, $P < 0.05$). As compared with that in the reserpine model group, the propellant rate of powdered charcoal in pure LMFP (1 000 mL/L) group was lower ($79.93 \pm 14.52\%$ vs $97.64 \pm 5.68\%$, $P = 0.002$), while the uric xylose level in 500 mL/L, pure LMFP group were higher (10.54 ± 2.48 , $12.24 \pm 2.15 \text{ mg}$ vs $7.86 \pm 1.71 \text{ mg}$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: LMFP can regulate the gastrointestinal motility in a bidirectional way, and it can ease the constipation and improve the absorption function of small intestine.

Key Words: Lotus-seed milk fermented product; Dietary supplement; Nitric Oxide; Constipation

Wu XN, Chen J, Wang JL, Lin JY. Modulatory role of lotus-seed milk fermented product on gastrointestinal motility and absorbing in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(21):2535-2539

摘要

目的: 探讨发酵莲子乳(LMFP)对胃肠道运动、吸收的调节作用。

方法:小鼠按体质量区组随机分组并以蒸馏水、不同药物及不同浓度的LMFP进行相应干预。左旋精氨酸腹腔注射建模,测定胃及小肠酚红残留率及胃组织一氧化氮(NO)含量;复方地芬诺酯灌胃制造便秘模型,观测炭末排出时间、黑便排出量、质量及含水率;皮下注射小剂量利血平建模,计算小肠推进率、尿木糖排出量。

结果:胃组织NO含量与胃排空延缓正相关($r = 0.475$, $P = 0.010$);较之左旋精氨酸模型组,250, 500 mL/L LMFP组、吗叮啉组胃酚红滞留率降低($22.78 \pm 6.95\%$, $27.12 \pm 5.73\%$, $22.82 \pm 5.63\%$ vs $34.76 \pm 9.15\%$, $P < 0.05$),250 mL/L LMFP组、吗叮啉组胃NO含量降低($26.13 \pm 4.95 \mu\text{mol/g pro}$, $26.33 \pm 4.06 \mu\text{mol/g pro}$ vs $38.33 \pm 9.82 \mu\text{mol/g pro}$, $P < 0.05$),500, 750 mL/L LMFP组和吗叮啉组远端1/2小肠、750 mL/L LMFP组和吗叮啉组远端2/3小肠酚红含量均增高($P < 0.05$)。与复方地芬诺酯模型组相较,各浓度LMFP组炭末排出时间缩短(133.63 ± 18.28 , $113.25 \pm 26.25 \text{ min}$, $141.75 \pm 25.95 \text{ min}$ vs $175.50 \pm 24.04 \text{ min}$, $P < 0.05$)、黑便含水率升高($39.72 \pm 3.06\%$, $42.48 \pm 3.07\%$, $40.58 \pm 4.29\%$ vs $19.67 \pm 2.53\%$, $P < 0.05$);250, 500 mL/L LMFP组黑便质量增加($0.68 \pm 0.16 \text{ g}$, $0.82 \pm 0.23 \text{ g}$ vs $0.37 \pm 0.13 \text{ g}$, $P < 0.01$);1 000 mL/L LMFP组小肠推进率低于利血平模型组($79.93 \pm 14.52\%$ vs $97.64 \pm 5.68\%$, $P = 0.002$),500, 1 000 mL/L LMFP组木糖排出量较利血平模型组增高(10.54 ± 2.48 , $12.24 \pm 2.15 \text{ mg}$ vs $7.86 \pm 1.71 \text{ mg}$, $P < 0.05$)。

结论:LMFP对胃肠运动具有双相调节作用,可缓解便秘症状,促进小肠吸收功能。

关键词:发酵莲子乳;膳食补充;一氧化氮;便秘

吴小南, 陈洁, 汪家梨, 林建银. 发酵莲子乳对小鼠胃肠道运动、吸收功能的调节作用. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2535-2539
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2535.asp>

0 引言

近几年来对发酵乳制品及所含益生菌的保健功效及机制开展了广泛研究,证实发酵乳制品具有改善消化系统功能的作用,但针对发酵乳制品调整肠道运动和吸收功能的研究不多。胃肠道运动和吸收功能紊乱是包括功能性消化不良、功能性便秘、功能性腹泻等在内的功能性胃肠疾病(functional gastric-intestine disease, FGID)常见病因,通过膳食补充新型发酵乳制品——发酵莲子乳(lotus-seed milk fermented product, LMFP)来调整胃肠运动、吸收功能具有重大的现实意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 发酵莲子乳制作工艺 速冻新鲜莲子→解冻浸泡→磨浆→预煮糊化→调配→均质化处理→杀菌→冷却

→恒温42.5℃发酵→装瓶→冷藏(3-7℃)→成品。置于4℃冰箱冷藏,各浓度发酵莲子乳现用现配,灌胃前放置至室温。

1.1.2 实验动物 清洁级ICR小鼠,体质量 $20 \pm 2 \text{ g}$,福建医科大学动物中心提供。

1.1.3 主要试剂 左旋精氨酸(L-Arginine, L-Arg中国医药集团上海化学试剂公司),吗叮啉(Domperidone 西安扬森制药有限公司),利血平(广东邦民制药有限公司),右旋木糖(中国医药集团上海化学试剂公司),健胃消食片(随州制药有限公司),一氧化氮(NO)试剂盒(硝酸还原酶法 南京建成生物工程研究所)等。

1.2 方法

1.2.1 发酵莲子乳促进小鼠肠内容物推进实验 (1)拮抗左旋精氨酸所致小肠酚红推进减缓实验:清洁级♂小鼠48只,按体质量区组随机分组。阴性对照组、模型组以蒸馏水20 mL/kg 体质量灌胃,每日一次,连续10 d;低、中、高剂量干预组、吗叮啉组分别以250 mL/L、500 mL/L、750 mL/L发酵莲子乳、0.1 g/L吗叮啉代替蒸馏水灌胃;第6天,2-6组以L-Arg按5.2 g/kg 体质量腹腔注射,第7-10天2.6 g/kg 体质量腹腔注射建模^[1,2],同时阴性对照组以生理盐水同体积腹腔注射。以参考文献[3]方法测定各组小鼠灌服0.6 mL 0.05 g/L酚红糊20 min后胃及各段小肠酚红含量;依据NO试剂盒提供方法测定100 mL/L胃组织匀浆上清液NO含量,并以Lowry法测定上清液蛋白质含量。(2)炭末排出实验:清洁级♂小白鼠40只,按体质量区组随机分组。阴性对照组、模型组以蒸馏水灌胃,低、中、高剂量干预组分别以250 mL/L、500 mL/L、750 mL/L发酵莲子乳灌胃,20 mL/kg 体质量连续5 d,实验前禁食不禁水24 h,给予复方地芬诺酯0.01 g/kg 体质量灌胃,0.5 h后100 g/L阿拉伯胶配制的50 g/L炭末混悬液灌胃,观测炭末排出时间、6 h粪便排出个数及质量、烤箱60℃干燥至质量不再改变后称取粪便质量^[4]。

1.2.2 发酵莲子乳调节利血平所致小鼠小肠功能异常实验 (1)拮抗利血平所致小肠推进加快实验:清洁级小鼠40只,雌雄各半,按体质量区组随机分组。模型组、高、低剂量组及阳性对照组以利血平0.2 mg/kg 体质量皮下注射连续14 d,阴性对照组以生理盐水皮下注射;第7-14天同时进行干预:阴性对照组以蒸馏水20 mL/kg 体质量灌胃,每天2次;高、低剂量干预组及阳性对照组分别给予500 mL/L、1 000 mL/L发酵莲子乳、30 g/L健胃消食片悬液。禁食不禁水24 h,50 g/L炭末混悬液灌胃20 min后处死小鼠,测量自幽门起到墨汁最远端以及回盲端的长度,折算炭末推进率^[3]。(2)发酵莲子乳促进利血平造模小鼠小肠右旋木糖吸收实验:动物分组干预方法同前。禁食不禁水24 h,给予

50 g/L右旋木糖液20 mL/kg 体质量, 收集5 h尿样稀释250倍并测定木糖浓度, 计算5 h木糖排出量^[5]。

统计学处理 数据均以mean±SD表示, 应用SPSS 10.0软件分析。胃及远端小肠酚红滞留率、胃组织NO含量、黑便排出时间、木糖排出量、小肠推进率使用方差分析(One-Way ANOVA), 组间比较采用最小显著差值法(LSD)检验, 排出黑便质量、黑便个数比较采用Kruskal-Wallis H多组秩和检验, 组间比较采用Tamhane's T2检验; 胃组织匀浆NO含量与胃酚红残留率相关关系采用Correlate-Pearson检验。

2 结果

2.1 发酵莲子乳促进小鼠肠内容物推进

2.1.1 发酵莲子乳对小鼠胃排空的影响 模型组胃酚红滞留率、胃组织匀浆NO含量较阴性对照组增高($P = 0.024$, $P < 0.001$), 250 mL/L、500 mL/L发酵莲子乳组、吗叮啉组胃酚红滞留率均较模型组降低, 差异具有统计学意义($P = 0.002$, $P = 0.044$, $P = 0.002$); 250 mL/L发酵莲子乳组、吗叮啉组NO含量均低于模型组, 且差异具有统计学意义($P = 0.009$, $P = 0.010$); 胃组织匀浆NO含量与胃酚红残留率存在相关关系, 相关性检验 $r = 0.475$, 双侧检验 $P = 0.001$ (表1)。

2.1.2 发酵莲子乳对小鼠小肠推进的实验研究 灌胃20 min后酚红糊多移行至第4, 5肠段, 模型组小鼠远端小肠(第5, 6段小肠、第4, 5, 6段小肠、第3, 4, 5, 6段小肠)总酚红含量显著低于阴性对照组, 且差异具有统计学意义($P = 0.004$, $P = 0.015$, $P = 0.034$); 500 mL/L发酵莲子乳组、吗叮啉组小肠远端酚红含量显著高于模型组(第4, 5, 6段: $P = 0.005$, $P = 0.006$; 第3, 4, 5, 6段: $P =$

表1 发酵莲子乳对小鼠胃排空及胃组织NO含量的影响

组别	<i>n</i>	胃酚红残留率 (%)	胃组织NO浓度 (μmol/g pro)
阴性对照组	8	26.16 ± 5.90 ^c	19.02 ± 6.48 ^d
模型组 (L-Arg组)	8	34.76 ± 9.15 ^a	38.33 ± 9.82 ^b
250 mL/L LMFP干预组	8	22.78 ± 6.95 ^d	26.13 ± 4.95 ^d
500 mL/L LMFP干预组	8	27.12 ± 5.73 ^c	29.59 ± 13.11 ^a
750 mL/L LMFP干预组	8	30.02 ± 9.59	30.81 ± 11.04 ^a
阳性对照组 (吗叮啉组)	8	22.82 ± 5.63 ^d	26.33 ± 4.06 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

0.034, $P = 0.001$), 750 mL/L发酵莲子乳组小鼠第4, 5, 6段小肠总酚红含量高于模型组($P = 0.023$), 差异具统计学意义(表2)。

2.1.3 炭末排出实验 与阴性对照组相较, 模型组黑便排出时间延长, 质量减少, 水分含量降低, 差别具有统计学意义($P < 0.001$, $P = 0.002$, $P < 0.001$); 较模型组, 250 mL/L、500 mL/L、750 mL/L发酵莲子乳干预组小鼠炭末排出时间均缩短($P = 0.002$, $P < 0.001$, $P = 0.010$), 250 mL/L、500 mL/L发酵莲子乳干预组小鼠黑便质量增加($P = 0.008$, $P = 0.005$), 250 mL/L、500 mL/L、750 mL/L发酵莲子乳干预组水分含量均增加, 差异具有统计学意义($P < 0.001$)(表3)。

2.2 发酵莲子乳对利血平所致小鼠小肠运动及吸收功能异常的干预 模型组小肠推进百分率高于阴性对照组($P = 0.033$), 1 000 mL/L发酵莲子乳干预组小鼠小肠推进百分率较模型组减缓($P = 0.002$), 差异具有统计学意义。模型组的5 h木糖排出量较阴性对照组减少30.44%, 差异具有统计学意义($P = 0.002$); 500 mL/L、

表2 发酵莲子乳对小鼠小肠推进功能的影响

组别	<i>n</i>	第5, 6段小肠总酚红含量 (%)	第4, 5, 6段小肠总酚红含量 (%)	第3, 4, 5, 6段小肠总酚红含量 (%)
阴性对照组	8	25.10 ± 11.31 ^d	39.01 ± 12.74 ^c	51.54 ± 8.93 ^c
模型组 (L-Arg组)	8	9.40 ± 9.36 ^b	21.75 ± 15.05 ^a	40.64 ± 7.86 ^a
250 mL/L LMFP干预组	8	13.82 ± 13.92 ^a	33.62 ± 11.73	48.25 ± 11.71
500 mL/L LMFP干预组	8	12.92 ± 7.34 ^a	41.89 ± 13.62 ^d	55.90 ± 9.63 ^d
750 mL/L LMFP干预组	8	19.59 ± 9.54	37.90 ± 11.97 ^c	49.97 ± 8.61
阳性对照组 (吗叮啉组)	8	9.57 ± 8.23 ^b	41.47 ± 16.32 ^d	57.76 ± 12.22 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

表3 发酵莲子乳对小鼠炭末排出时间、6 h粪便排出个数及质量、黑便含水率的影响

组别	<i>n</i>	炭末排出时间 (min)	黑便质量 (g) ^e	黑便个数	黑便含水率 (%)
阴性对照组	8	102.38 ± 28.35 ^d	0.82 ± 0.20 ^d	24.25 ± 9.74	33.08 ± 2.14 ^d
模型组 (L-Arg组)	8	175.50 ± 24.04 ^b	0.37 ± 0.13 ^b	17.88 ± 5.67	19.67 ± 2.53 ^b
250 mL/L LMFP干预组	8	133.63 ± 18.28 ^{ad}	0.68 ± 0.16 ^d	26.00 ± 6.85	39.72 ± 3.06 ^{bd}
500 mL/L LMFP干预组	8	113.25 ± 26.25 ^d	0.82 ± 0.23 ^d	27.25 ± 8.45	42.48 ± 3.07 ^{bd}
750 mL/L LMFP干预组	8	141.75 ± 25.95 ^{bc}	0.55 ± 0.44	25.75 ± 16.05	40.58 ± 4.29 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组; ^e $P = 0.010$, Kruskal-Wallis H Test: $\chi^2 = 13.207$ 。

表4 发酵莲子乳对小鼠小肠推进百分率、5 h尿液木糖排出量的影响

组别	<i>n</i>	小肠推进百分率 (%)	5 h尿液木糖排出量 (mg)
阴性对照组	8	85.74 ± 11.13 ^c	11.30 ± 2.04 ^d
利血平模型组	8	97.64 ± 5.68 ^a	7.86 ± 1.71 ^b
500 mL/L LMFP干预组	8	93.35 ± 12.75	10.54 ± 2.48 ^c
1 000 mL/L LMFP干预组	8	79.93 ± 14.52 ^d	12.24 ± 2.15 ^d
健胃消食片干预组	8	93.78 ± 6.79	9.10 ± 1.94 ^a

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 阴性对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 模型组。

1 000 mL/L发酵莲子乳干预组小鼠5 h木糖排出量与模型组相比较分别增高30.10%, 55.73%, 差异具有统计学意义(*P* = 0.014, *P*<0.001)(表4)。

3 讨论

据美国国家健康中心统计: FGID患病率为1.8%, 占消化系统疾病的40%; FGID发病呈现生物-心理-社会综合模式, 患者常常具有躯体方面的症状, 在一定程度上影响患者的生活质量, 对其经济、社会生活造成很大负担; 而FGID的重要发病机制之一是弥散性和非特异性的胃肠运动功能异常, 因此药物治疗的疗效尚缺乏可靠临床证据, 且存在用药安全问题, 仍属经验性治疗^[6]。若能验证通过膳食补充发酵莲子乳能够对胃肠运动、吸收功能加以调整将具有重大的现实意义。

内源性NO由L-Arg在一氧化氮合酶(NOS)介导下合成, NOS具有神经元型(nNOS)、内皮型(eNOS)和诱生型(iNOS)三种异构型。NO作为胃肠道非肾上腺素非胆碱能(NANC)抑制性递质, NO活化鸟苷酸环化酶, 使三磷酸鸟苷(GTP)转变为环磷酸鸟苷(cGMP), 升高cGMP水平, 继而影响离子通道、磷酸二酯酶活性, 激活cGMP依赖的蛋白激酶, 促使肌蛋白磷酸化, 引起NANC样平滑肌松弛作用, 降低胃肠平滑肌张力^[6-10]。

胃容量舒张反射的传出神经纤维为NO介导的NANC神经元, 其他参与反射弧的神经递质最终也通过NO发挥作用^[11,12]; 同时研究表明nNOS基因在幽门括约肌的表达高于其他组织, 幽门的开放也与NO存在着密切的关系^[13,14]。但NO对胃排空速率的影响仍存在加速与减缓的不同看法^[15-18]。本研究腹腔注射L-Arg后, 胃组织NO含量升高, 胃食糜滞留时间延长, 小肠内食糜蠕动减缓, 表明腹腔注射NO合成原料L-Arg可成功建立胃肠功能障碍模型; 胃组织NO含量与胃酚红残留量呈正相关关系, 说明胃组织NO含量升高与胃排空延缓有关。研究发现NOS抑制剂可以清除胃容受性舒张和迷走神经刺激性胃舒张, 并可被L-Arg逆转^[6], 考虑NO作为介导上述两种舒张类型的递质, 其水平的升高致使胃容受性舒张和迷走神经刺激性胃舒张时间延长, 引起胃排空延长。NO合成主要受NOS调节, 细

胞因子、消化道内的细菌均可以通过激活核因子-κB诱导上皮细胞表达iNOS, 此外还受底物、辅助因子以及NOS亚基装配等多种因素调节, 低、中浓度发酵莲子乳能够通过上述复杂的调节机制抑制小鼠腹腔注射L-Arg所致的NO含量增加, 加速胃排空。已知十二指肠、回肠、空肠肠壁均存在酸、脂肪、左旋色氨酸、渗透压等感受器, 高浓度发酵莲子乳具有较高渗透压、营养密度和较低pH值, 刺激感受器, 通过调节NO的产生和释放, 引起近端胃持续性舒张, 幽门压力增加, 延迟胃排空; β-酪啡肽可由原料奶中的β-酪蛋白在乳酸菌酶作用下产生, 其氨基酸序列具阿片活性肽特点, 呈现吗啡样作用, 可降低大鼠胃排空和肠活动^[19], β-酪啡肽含量较高也是750 mL/L发酵莲子乳未能逆转排空速率减缓的可能原因之一。连接小肠平滑肌的抑制性突触后神经元也是NANC神经元, 释放的NO作用短暂, 仅在局部发挥作用, 在生理状态下, 内源性NO周期性释放与失活是导致小肠间断性收缩的主要原因^[6]。本实验以腹腔注射L-Arg造成NO过量释放引起小肠张力性收缩减弱、平滑肌松弛, 肠内容物推进减慢; 低、中浓度发酵莲子乳通过调节NO的释放, 缩短推进性蠕动的潜伏期和提高蠕动速率, 改进小肠运动功能。

由上述实验结果可知高浓度发酵莲子乳未能促进胃排空及小肠推进, 故考虑其是否对利血平所致小肠蠕动亢进及其引发的小肠吸收功能降低具有调整作用。慢性给予小剂量利血平, 使小鼠单胺类介质耗竭, 可出现交感神经功能低下, 副交感神经功能偏高, 胃肠蠕动加快, 吸收功能障碍^[3], 以皮下注射0.2 mg/kg利血平14 d, 成功建立小肠蠕动加快、吸收功能减弱的模型。1 000 mL/L发酵莲子乳能够抑制注射利血平造成的小肠运动亢进, 而500 mL/L、1 000 mL/L发酵莲子乳可改进小肠吸收功能; 考虑高浓度发酵莲子乳可通过延缓小肠推进速率, 避免食物胃肠通过时间过短造成的吸收障碍, 进一步提示高浓度发酵莲子乳持续灌胃可造成胃肠道适应性运动减缓。

在结肠, 血管活性肠肽(VIP)与NO相互作用将冲动传至NANC抑制性神经元引起肠壁扩张而调节肠蠕动期的下行松弛。NO的大量释放导致结肠推进性收缩受抑制, 而肠黏膜产生的大量NO弥散至肌层导致中毒性肠扩张发生便秘^[6,20]。预实验以腹腔注射L-Arg的方法未能造成便秘模型, 故以复方地芬诺酯灌胃制作小鼠便秘模型对发酵莲子乳缓解小鼠便秘症状进行评价: 成功建立小鼠便秘模型, 较之模型组250 mL/L、500 mL/L、750 mL/L发酵莲子乳组炭末排出时间缩短、水分含量升高, 250 mL/L、500 mL/L发酵莲子乳组小鼠排出黑便质量增加, 说明发酵莲子乳可缓解小鼠便秘症状。发酵莲子乳中所含嗜酸乳杆菌、双歧杆

菌等能经受胃酸和胆汁杀伤作用的乳酸菌, 在肠道中生长繁殖, 产生乳酸、醋酸等有机酸, 降低肠内容物的pH值和氧化还原电位, 对肠道有刺激和加强蠕动的作用; 莲子含有大量棉子糖, 在140℃、pH5-6下仍很稳定, 可成为发酵成品中的益生元, 促进肠道有益菌群如双歧杆菌的增殖, 分解产物刺激肠道蠕动. 一方面发酵莲子乳使小鼠结肠运动加快, 粪便肠内滞留时间较短, 减少结肠吸收的水分; 另一方面发酵莲子乳含有的膳食纤维结构含有许多亲水基团, 具有吸水膨胀性能, 能够吸收、保留水分. 持续性摄入发酵制品, 结肠内发生肠动力、pH、菌群等适应性改变, 从而改善便秘症状.

总之, 发酵莲子乳对胃肠道运动具有双向调节功效, 而FGID患者的胃肠道运动功能紊乱具有非特异性的特点, 考虑膳食补充发酵莲子乳对于FGID患者有辅助治疗作用.

致谢: 感谢福建农林大学食品科技学院郑宝东教授对本研究工作的热情指导和大力支持.

4 参考文献

- 1 Delaney CP, McGeeney KF, Dervan P, Fitzpatrick JM. Pancreatic atrophy: a new model using serial intra-peritoneal injections of L-arginine. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 1086-1090
- 2 李涯松, 单兆伟, 沈洪, 马骋, 吴静. 和胃胶囊对实验大鼠胃动力的影响. *中国中西医结合脾胃杂志* 2000; 8: 327-329
- 3 李仪奎. *中药药理实验方法学*. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社 1991: 222-321
- 4 李业鹏, 崔生辉, 江涛, 李燕俊, 李玉伟, 韩春卉, 刘红蕾, 张靖. 小鼠便秘模型的建立. *中国食品卫生杂志* 2000; 12: 1-4
- 5 盛惟, 黎明, 杨志燕. 木糖吸收实验方法的探讨. *时珍国医国药* 2001; 12: 112-113
- 6 萧树东. *胃肠道和肝病学——基础理论与临床进展*. 第1版. 上海, 西安, 北京, 广州: 世界图书出版公司 2004: 52-59, 346-350, 364-371
- 7 汪长东, 胡还忠, 刘子龙, 马立群, 田琴, 余承高, 王晓敏. 一氧化氮抑制大鼠空肠平滑肌收缩. *胃肠病学和肝病杂志* 2004; 13: 588-590
- 8 Thyagarajan B, Malli R, Schmidt K, Graier WF, Groschner K. Nitric oxide inhibits capacitative Ca^{2+} entry by suppression of mitochondrial Ca^{2+} handling. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 821-830
- 9 Altdorfer K, Bagameri G, Donath T, Feher E. Nitric oxide synthase immunoreactivity of interstitial cells of Cajal in experimental colitis. *Inflamm Res* 2002; 51: 569-571
- 10 金景玉, 李哲浩, 李贞姬, 金正元, 金南革, 李英, 许文燮, 李在琬. 一氧化氮对豚鼠胃窦环行肌电活动和收缩运动的影响. *中国药理学报* 2000; 21: 369-372
- 11 Daniel EE, Haugh C, Woskowska Z, Cipris S, Jury J, Fox-Threlkeld JE. Role of nitric oxide-related inhibition in intestinal function: relation to vasoactive intestinal polypeptide. *Am J Physiol* 1994; 266: G31-G39
- 12 Jin JG, Murthy KS, Grider JR, Makhlof GM. Stoichiometry of neurally induced VIP release, NO formation, and relaxation in rabbit and rat gastric muscle. *Am J Physiol* 1996; 271: G357-G369
- 13 Chakder S, Bandyopadhyay A, Rattan S. Neuronal NOS gene expression in gastrointestinal myenteric neurons and smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997; 273: C1868-C1875
- 14 Mashimo H, Kjellin A, Goyal RK. Gastric stasis in neuronal nitric oxide synthase-deficient knockout mice. *Gastroenterology* 2000; 119: 766-773
- 15 Chiba T, Bharucha AE, Thomforde GM, Kost LJ, Phillips SF. Model of rapid gastrointestinal transit in dogs: effects of muscarinic antagonists and a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14: 535-541
- 16 Anvari M, Paterson CA, Daniel EE. Role of nitric oxide mechanisms in control of pyloric motility and transpyloric flow of liquids in conscious dogs. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 506-512
- 17 Konturek JW, Thor P, Domschke W. Effects of nitric oxide on antral motility and gastric emptying in humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 97-102
- 18 Gentilecore D, Visvanathan R, Russo A, Chaikomin R, Stevens JE, Wishart JM, Tonkin A, Horowitz M, Jones KL. Role of nitric oxide mechanisms in gastric emptying of, and the blood pressure and glycemic responses to, oral glucose in healthy older subjects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1227-G1232
- 19 牛胜田. 功能性肽类的有益作用. *国外医学·卫生学分册* 1999; 26: 115-118
- 20 Vannucchi MG, Corsani L, Azzena GB, Faussone-Pellegrini MS, Mancinelli R. Functional activity and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in muscle of the isolated distal colon of mdx mice. *Muscle Nerve* 2004; 29: 795-803

电编 张敏 编辑 张海宁

丹参注射液和三七总皂甙对大鼠肝癌细胞及自杀基因旁观者效应的影响

谭宇蕙, 杜标炎, 吴映雅, 李杰芬, 刘晓东, 钟富有

谭宇蕙, 吴映雅, 刘晓东, 钟富有, 广州中医药大学生化教研室 广东省广州市 510405

杜标炎, 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, 1991年中山大学分子生物学硕士, 2005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, 广东省广州市机场路12号, 广州中医药大学病理教研室. tyuhui@gzhtcm.edu.cn

电话: 020-36585454

收稿日期: 2005-08-06 接受日期: 2005-08-26

Effects of *Danshen* and Total Saponins of *Panax Notoginseng* on rat hepatocarcinoma cells and bystander effect of suicide gene

Yu-Hui Tan, Biao-Yan Du, Ying-Ya Wu, Jie-Fen Li, Xiao-Dong Liu, Fu-You Zhong

Yu-Hui Tan, Ying-Ya Wu, Xiao-Dong Liu, Fu-You Zhong, Department of Biochemistry, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Biao-Yan Du, 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 Natural Science Foundation of China, No. 30171201, and the Science and Technology Plan of Guangzhou City, No. 2002J1-C7041

Correspondence to: Biao-Yan Du, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. tyuhui@gzhtcm.edu.cn

Received: 2005-08-06 Accepted: 2005-08-26

Abstract

AIM: To explore the effects of *Danshen* and Total Saponins of *Panax Notoginseng* (PNS) on rat hepatocarcinoma cells and the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase gene/ganciclovir (HSV-*tk*/GCV).

METHODS: Rat hepatocarcinoma cell line CBRH7919 (*tk*⁻), CBRH7919 (*tk*⁺) and the 5-10% *tk*⁺ mixed cells were treated with diverse concentrations of *Danshen* injection, PNS, GCV separately, or *Danshen* injection plus GCV and PNS plus GCV ($n = 3, 6$). The survival rate of the cells in each group was examined by MTT

method, and q -value analysis was used to estimate the synergistic effect of traditional Chinese medicine on the suicide gene system. The q -value was equal to the ratio of the actual effect of combined treatment to its theoretical effect. The effect was classified into three categories: antagonistic effect ($q \leq 0.85$), additive effect ($0.85 \leq q < 1.15$), and synergistic effect ($q \geq 1.15$).

RESULTS: After the treatment of 5, 10, 20, 40 mL/L *Danshen* injection for 72 h, the survival rate of CBRH7919 (*tk*⁻) was $81.0 \pm 17.3\%$, $55.6 \pm 12.0\%$, $14.6 \pm 4.4\%$, and $11.5 \pm 0.9\%$, respectively. IC_{50} was 11.4 mL/L. The survival rate of the hepatocarcinoma cells was $78.9 \pm 27.9\%$ in the 5% *tk*⁺/GCV group, and $84.3 \pm 18.2\%$ in the GCV group, and the survival rate in the former was 7.6% lower than that in the latter. The survival rate of the cells was $47.8 \pm 16.5\%$ ($q = 1.60$) in the group of 5 mL/L *Danshen* injection combined with 5% *tk*⁺/GCV, and $72.8 \pm 4.5\%$ in the group of 5 mL/L *Danshen* injection combined with GCV, and the survival rate in the former was 34.3% lower than that in the latter. The survival rate was $12.2 \pm 5.9\%$ ($q = 1.46$) in the group of 10 mL/L *Danshen* injection combined with 5% *tk*⁺/GCV, and $36.5 \pm 2.7\%$ in the group of 10 mL/L *Danshen* injection combined with GCV, and the survival rate in the former was 66.3% lower than that in the latter. The survival rate of CBRH7919 (*tk*⁻) was $104.1 \pm 3.7\%$, $107.6 \pm 3.1\%$, $69.7 \pm 8.5\%$, and $59.3 \pm 2.9\%$, respectively, after the treatment of 10, 50, 100, and 140 mg/L PNS for 72 h. IC_{50} was 220 mg/L. The survival rate in the 10% *tk*⁺/GCV group was 17.2% ($P < 0.05$) lower than that in the GCV group. In the group of 50 mg/L and 100 mg/L PNS combined with 10% *tk*⁺/GCV ($q = 0.89, 0.87$), the survival rates were 17.7% and 18.3% lower than those in the corresponding groups of PNS combined with GCV, respectively.

CONCLUSION: *Danshen* injection can inhibit the proliferation of hepatocarcinoma cells significantly, and can synergically enhance the killing and bystander effect of *tk*/GCV system. PNS can also inhibit the proliferation of hepatocarcinoma cells to some extent, but it has only additive effect on the *tk*/GCV system, while no synergistic effect.

Key Words: Suicide gene; Bystander effect; Hepatocarcinoma; *Danshen* injection; Total Saponins of *Panax Notoginseng*

Tan YH, Du BY, Wu YY, Li JF, Liu XD, Zhong FY. Effects of *Danshen* and Total Saponins of *Panax Notoginseng* on rat hepatocarcinoma cells and bystander effect of suicide gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(21):2540-2544

摘要

目的: 探讨丹参注射液和三七总皂甙对大鼠肝癌细胞及自杀基因旁观者效应影响。

方法: 丹参注射液和三七总皂甙以不同浓度与GCV分别或共同作用于大鼠肝癌CBRH7919的 tk^- 细胞, 以及含5-10% tk^+ 细胞的 tk^+ 和 tk^- 混合细胞, MTT检测各组存活率($n = 3, 6$), 两两比较分析各组存活率的差异, 并用 q 值分析中药与自杀基因系统联合的相互作用是否具有协同性。 q 值为联合用药时实测药效与理论药效的比值, $q \leq 0.85$ 为拮抗作用, $0.85 \leq q < 1.15$ 为相加作用, $q \geq 1.15$ 为协同作用。

结果: 5, 10, 20, 40 mL/L的丹参注射液作用于CBRH7919细胞, 72 h存活率分别为 $81.0 \pm 17.3\%$, $55.6 \pm 12.0\%$, $14.6 \pm 4.4\%$, $11.5 \pm 0.9\%$; IC_{50} 为11.4 mL/L。丹参注射液联合 tk^- /GCV系统对肝癌细胞的作用: 5% tk^+ /GCV组存活率为 $78.9 \pm 27.9\%$, GCV组为 $84.3 \pm 18.2\%$, 前者比后者仅多了5% tk^+ 细胞, 相对抑制率7.6%; 5 mL/L丹参联合5% tk^+ /GCV组存活率为 $47.8 \pm 14.5\%$ ($q = 1.60$), 5 mL/L丹参+GCV组的存活率为 $72.8 \pm 4.5\%$, 前者比后者唯一差异条件也是多了5% tk^+ 细胞, 相对抑制率34.3% ($P = 0.049$); 10 mL/L丹参联合5% tk^+ /GCV组的存活率为 $12.2 \pm 5.9\%$ ($q = 1.46$), 10 mL/L丹参+GCV组的存活率为 $36.5 \pm 2.7\%$, 前者比后者仅多了5% tk^+ 细胞, 相对抑制率66.6% ($P = 0.003$)。10, 50, 100, 140 mg/L三七总皂甙作用72 h细胞存活率分别为 $104.1 \pm 3.7\%$, $107.6 \pm 3.1\%$, $69.7 \pm 8.5\%$, $59.3 \pm 2.9\%$; IC_{50} 为220 mg/L。三七总皂甙联合 tk^- /GCV系统对肝癌细胞的作用: 10% tk^+ /GCV组比GCV组存活率下降了17.2% ($P < 0.05$), 50 mg/L和100 mg/L三七总皂甙联合10% tk^+ /GCV组存活率 ($q = 0.89, 0.87$) 分别比相应的三七总皂甙+GCV组下降了17.7%和18.3%。

结论: 丹参注射液有明显抑制癌细胞生长作用, 并能协同性增强 tk^- /GCV系统对癌细胞的杀伤作用, 增强自杀基因旁观者效应。三七总皂甙能一定程度抑制癌细胞生长, 但对 tk^- /GCV系统杀伤癌细胞只有加和作用, 未发现协同性作用。

关键词: 自杀基因; 旁观者效应; 肝癌; 丹参注射液; 三七总皂甙

谭宇蕙, 杜标炎, 吴映雅, 李杰芬, 刘晓东, 钟富有. 丹参注射液和三七总皂甙对大鼠肝癌细胞及自杀基因旁观者效应的影响. 世界华人消化杂志

2005;13(21):2540-2544

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2540.asp>

0 引言

自杀基因系统是目前研究应用最多的肿瘤基因疗法之一, 常用的如单纯疱疹病毒胸苷激酶基因/丙氧鸟苷(HSV- tk /GCV)系统, 其原理是胸苷激酶TK把无毒的前体药物GCV磷酸化生成有毒的核苷类似物GCV-TP, 抑制核酸合成从而杀死转染了 tk 基因的肿瘤细胞。此疗法的一个突出优点是“旁观者效应”(bystander effect), 即导入自杀基因的肿瘤细胞对邻近未导入自杀基因的肿瘤细胞也有杀伤作用^[1]。体内转染率低造成对肿瘤杀伤力不足是肿瘤自杀基因疗法存在的主要问题, 增强旁观者效应可大大提高其对肿瘤杀伤力, 目前已成为提高自杀基因疗效的重要策略。对旁观者效应机制的大量研究表明, 改善缝隙连接细胞通讯(GJIC)或诱导肿瘤细胞凋亡, 或提高肿瘤机体免疫功能, 都有可能增强旁观者效应^[2-10]。我们旨在探讨中药的活性成分能否通过GJIC或细胞凋亡机制而增强自杀基因的旁观者效应, 这方面报道很少, 已报道的有丹参脂溶性代表成分丹参酮II A能增强GJIC而提高旁观者效应^[11]。丹参素、三七皂甙等能诱导多种肿瘤细胞株的凋亡^[13-15], 丹参素、芦荟的提取物还能促进GJIC^[12,16], 但是否能增强旁观者效应未见报道。我们初步观察了丹参注射液和三七皂甙对大鼠肝癌细胞生长抑制的影响及其对自杀基因 tk^- /GCV系统旁观者效应的增效作用, 探讨活血中药成分联合肿瘤自杀基因疗法的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝癌细胞株CBRH7919购自中山大学实验动物中心, 重组逆转录病毒包装细胞株PT67/ tk 和CBRH7919/ tk 为本研究组构建^[17]。细胞培养液RPMI 1640, DMEM为Gibco公司产品, GCV(丙氧鸟苷), MTT(四甲基偶氮唑盐)均为Sigma公司产品; 胎牛血清为杭州四季青公司产品。丹参注射液为广东永康药业有限公司生产(国药准字Z44022073), 含生药1.5 kg/L。三七总皂甙由广州中医药大学脾胃研究所提供, 浓度为1.4 g/L。BNA-3210型CO2培养箱(日本ESPEC), 酶标仪(BioRad)。

1.2 方法

1.2.1 丹参注射液和三七总皂甙对CBRH7919细胞的作用 大鼠肝癌细胞CBRH7919(tk^-)用RPMI 1640培养液培养24 h后传代, 按每孔 5×10^3 个细胞、200 μ L总体积进行培养, 加入丹参注射液至终浓度为5, 10, 20, 40 mL/L共4个浓度组, 三七总皂甙10, 50, 100, 140 mg/L共4个浓度组, 每一浓度有3个复孔, PBS补足体积, 测定癌细胞对中药的敏感程度, 确定下面实验药物的合适浓度。

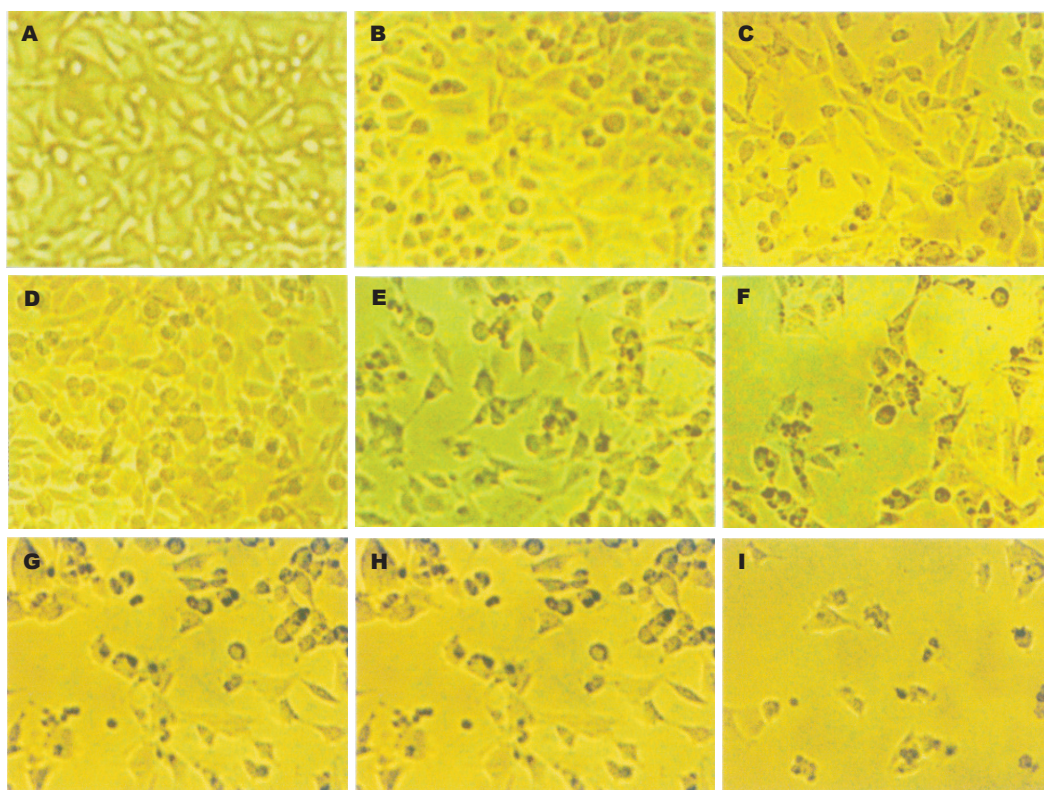


图1 丹参注射液联合5% tk^+ /GCV对大鼠肝癌细胞的作用。A: 对照组; B: GCV; C: 5% tk^+ /GCV; D: 低浓度中药; E: 低浓度中药+GCV; F: 低浓度中药+5% tk^+ /GCV; G: 高浓度中药; H: 高浓度中药+GCV; I: 高浓度中药+5% tk^+ /GCV。

1.2.2 丹参注射液和三七总皂甙联合 tk /GCV系统对肝癌细胞的杀伤作用 把CBRH7919/ tk (tk^+)和CBRH7919(tk^-)细胞按5%:95%或10%:90%的比例混合,接种到96孔板作为5%或10% tk^+ 对照组、 tk /GCV组和中药联合 tk /GCV组的观察细胞;而100% tk^- 细胞作为 tk^- 对照组、GCV组、中药组、中药加GCV组的观察细胞,均按每孔 5×10^3 个细胞接种,另各组均设对应浓度药剂的无细胞对照组,以消除丹参注射液等药物本身的吸光背景。培养12 h使细胞贴壁生长后再加中药和GCV, GCV浓度均为5 mg/L,丹参注射液又再分为低浓度5 mL/L和高浓度10 mL/L两组,每组3个复孔。三七总皂甙又再分为50, 100 mg/L两个浓度组,每组设6个复孔。作用72 h后MTT法检测各组细胞的杀伤情况及存活率,并两两比较各加药组存活率差异。

1.2.3 金正均 q 值法^[18]判断中药与 tk /GCV系统联合作用效果 $q = \text{实际联合药效} E'_{(A+B)} / \text{理论联合药效} E_{(A+B)}$, $E_{(A+B)} = E_A + E_B - E_A \times E_B$, E_A 、 E_B 为单独用药药效。 $q < 0.85$ 为拮抗作用; $0.85 \leq q < 1.15$ 为相加作用; $q \geq 1.15$ 为协同作用。

统计学处理 用SPSS统计软件分析,多组间比较用One-Way ANOVA, LSD法。

2 结果

2.1 丹参注射液对CBRH7919细胞的作用 镜下可见随着丹参注射液浓度和孵育时间的增加,贴壁细胞逐渐变圆、脱落,至20 mL/L 72 h几乎100%杀死癌细胞。

5, 10, 20, 40 mL/L的丹参注射液作用于CBRH7919细胞72 h, MTT检测各组存活率(%)分别为 81.0 ± 17.3 , 55.6 ± 12.0 , 14.6 ± 4.4 , 11.5 ± 0.9 ; IC_{50} 为11.4 mL/L。可见丹参注射液对CBRH7919细胞生长有较为明显的抑制效应,且作用呈时间和剂量依赖性。

2.2 丹参注射液联合 tk /GCV系统对肝癌细胞的杀伤作用 为了观察中药对旁观者效应的影响,选择了旁观者效应较低而且MTT法检测与苔盼蓝计数法较吻合的5-10% tk^+ 的混合比例,以及对肿瘤细胞杀伤程度较轻的中药浓度进行实验。结果表明,两种浓度的丹参注射液联合 tk /GCV组的细胞存活率明显比丹参注射液+GCV组和单纯 tk /GCV组低,两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1, 图1),说明丹参注射液联合 tk /GCV系统能显著提高 tk^+ 和 tk^- 混合细胞对GCV的敏感性, $q \geq 1.15$ 说明丹参注射液具有协同性增强 tk /GCV系统杀伤效应的作用。

由于丹参注射液、GCV单独对体外细胞生长都有抑制作用,丹参注射液对 tk /GCV系统的作用是否协同性,还可进行单一差异因素结果的两两比较分析(表2)。两两比较中前者比后者唯一差异因素均是多了5% tk^+ 细胞,可消除丹参、GCV自身的细胞毒影响,结果表明中药的加入大大增强了 tk /GCV系统的杀伤力,也说明丹参注射液与 tk /GCV系统产生了协同性相互作用。

2.3 三七总皂甙对CBRH7919肝癌细胞及 tk /GCV系统杀伤效应的影响 10, 50, 100, 140 mg/L的三七总皂

表1 MTT法测定各组细胞存活率 (mean ± SD, $n = 3$)

分组	存活率(%)	q 值
1 tk^{-} 对照	100.0 ± 14.9	
5% tk^{+} 对照	100.0 ± 5.6	
2 GCV	84.3 ± 18.2	1.06
3 5% tk^{+} /GCV	78.9 ± 27.9 ^a	
4 低浓度丹参	85.3 ± 21.4 ^a	1.07
5 低浓度丹参+GCV	72.8 ± 4.5 ^b	
6 低浓度丹参+5% tk^{+} /GCV	47.8 ± 14.5 ^{bc}	1.60
7 高浓度丹参	50.5 ± 9.8 ^b	
8 高浓度丹参+GCV	36.5 ± 2.7 ^b	1.14
9 高浓度丹参+5% tk^{+} /GCV	12.2 ± 5.9 ^{bd}	

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 组1; ^c $P = 0.049 < 0.05$ vs 组5; ^d $P = 0.003 < 0.01$ vs 组8.

表2 两两比较存活率和相对抑制率 (mean ± SD, $n = 3$)

两两比较的分组	差异因素	相对抑制率 (%)
1 5% tk^{+} /GCV比GCV	5% tk^{+}	7.6
2 低浓度丹参+5% tk^{+} /GCV比低浓度丹参+GCV	5% tk^{+}	34.3
3 高浓度丹参+5% tk^{+} /GCV比高浓度丹参+GCV	5% tk^{+}	66.6

相对抑制率 (%) = (后组存活率 - 前组存活率) / 后组存活率 × 100.

表3 MTT法测定各组细胞存活率 (mean ± SD, $n = 6$)

分组	存活率 (%)	q 值
1 tk^{-} 对照	100.00 ± 6.73	
10% tk^{+} 对照	100.00 ± 2.02	
2 GCV	83.79 ± 3.83 ^a	1.38
3 10% tk^{+} /GCV	65.96 ± 6.72 ^{bc}	
4 50 mg/L三七总皂甙	107.59 ± 3.13	0.89
5 50 mg/L三七总皂甙+GCV	84.53 ± 8.05 ^a	
6 50 mg/L三七总皂甙联合10% tk^{+} /GCV	69.59 ± 7.28 ^a	0.87
7 100 mg/L三七总皂甙	69.74 ± 8.54 ^a	
8 100 mg/L三七总皂甙+GCV	64.95 ± 6.74 ^b	
9 100 mg/L三七总皂甙联合10% tk^{+} /GCV	53.07 ± 5.23 ^b	

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 组1; ^c $P = 0.019 < 0.05$ vs 组2.

甙作用下细胞存活率(%)分别为104.1 ± 30.7, 107.6 ± 3.1, 69.7 ± 8.5, 59.3 ± 2.9. 72 h的 IC_{50} 为220 mg/L. 结果表明, 大于100 mg/L的三七总皂甙对肿瘤细胞生长有一定抑制作用, 其诱导细胞凋亡的活性不高. 10% tk^{+} /GCV组比GCV组的存活率下降了17.2%, 50 mg/L和100 mg/L三七总皂甙联合10% tk^{+} /GCV组存活率分别比相应浓度的三七总皂甙+GCV组下降了17.7%和18.3%. 说明三七总皂甙的加入并没有提高自杀基因系统的杀伤效应; 10% tk^{+} /GCV组 $q = 1.38$, 说明10% tk^{+} 比例自杀基因系统自身已有明显的旁观者效应, 而50 mg/L和100 mg/L三七总皂甙联合10% tk^{+} /GCV组 q 值分别为0.85, 0.87, 也说明三七总皂甙对 tk /GCV系统

只有相加作用, 未见协同性作用(表3).

3 讨论

中药丹参(*Salvia Miltiorrhiza*)有活血化瘀、行气止痛的功效, 是中医临床常用的活血化瘀药. 丹参的主要化学成分为水溶性酚酸类和脂溶性二萜醌类化合物. 丹参的脂溶性有效成分主要为丹参酮, 其中以丹参酮II A含量较高; 水溶性酚酸类成分包括丹参素、原儿茶醛、丹参酚酸A、丹参酚酸B等, 其中丹参素即 β -3, 4-二羟基苯乳酸含量较高, 是最主要的水溶性成分^[19,20]. 丹参的活性成分丹参素、Tan II A有一定抗肿瘤、诱导癌细胞凋亡作用^[21-24]. 丹参注射液是单味中药材丹参经过水提取、乙醇沉淀、超滤浓缩等工艺过程精制的临床静脉滴注或肌注用制剂, 为澄清透明、浅棕色的水溶液, 是丹参素等多种水溶性成分的混合液. 我们所用丹参注射液含生药1.5 g/mL, 有人用高效液相色谱仪检测丹参生药材的丹参素含量为0.18%^[20], 以此推算本实验丹参注射液丹参素含量约为3 mg/mL, 推测本实验丹参注射液5 mL/L组的丹参素含量约为15 mg/L, 10 mL/L组约为30 mg/L, 但药材产地、批次不同, 丹参素含量会有变化. 我们发现丹参注射液体外直接作用于大鼠CBRH7919肝癌细胞有明显抑制生长和杀伤作用, 且有浓度依赖性, IC_{50} 为11.4 mL/L(估算含丹参素约为34 mg/L), IC_{50} 浓度较低说明丹参注射液的细胞毒活性较高. 丹参注射液、GCV分别作用和联合作用于 tk^{-} 癌细胞以及含5% tk^{+} 的 tk^{+} 和 tk^{-} 混合癌细胞, 发现丹参注射液联合 tk /GCV系统对肝癌细胞的杀伤力明显大于丹参注射液+GCV组和单纯 tk /GCV组, 联合组 q 值均大于1.15, 重复实验得到近似的结果, 丹参注射液对自杀基因系统的增效作用是一种协同性相互作用, 而不是简单加和作用. 丹参注射液很可能通过提高旁观者效应来实现这种协同性增效作用. 使用5-10% tk^{+} 是因为模拟临床自杀基因10%左右的低转染率, 还因为考察中药能否增强旁观者效应, 在5-10% tk^{+} 细胞的混合比例下MTT法检测灵敏度较高. 三七总皂甙联合 tk /GCV系统对肝癌细胞的作用在两种中药浓度下 q 值均小于1.15, 提示是一种加和作用.

旁观者效应主要由缝隙连接细胞通讯、细胞凋亡和免疫介导, 丹参注射液具体是通过哪一机制增强旁观者效应, 还有待进一步研究. 丹参酮II A也有旁观者效应增效作用^[11], 但丹参酮II A的水溶解度很低, 我们使用的注射液是丹参水溶性成分, 丹参酮含量极低, 推测增效作用不是丹参酮引起的, 究竟是哪一种丹参的单体成分发挥主要作用, 是否为水溶性代表成分——丹参素的作用, 还有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 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
- 2 Nicholas TW, Read SB, Burrows FJ, Kruse CA. Suicide gene therapy with Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects. *Histol Histopathol* 2003; 18: 495-507
- 3 Hamel W, Magnelli L, Chiarugi VP, Israel MA. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res* 1996; 56: 2697-2702
- 4 Carystinos GD, Katabi MM, Laird DW, Galipeau J, Chan H, Alaoui-Jamali MA, Batist G. Cyclic-AMP induction of gap junctional intercellular communication increases bystander effect in suicide gene therapy. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 61-68
- 5 Park JY, Elshami AA, Amin K, Rizk N, Kaiser LR, Albelda SM. Retinoids augment the bystander effect *in vitro* and *in vivo* in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated gene therapy. *Gene Ther* 1997; 4: 909-917
- 6 Robe PA, Jolois 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
- 7 Huard C, Druesne N, Guyonnet D, Thomas M, Pagniez A, Le Bon AM, Martel P, Chaumontet C. Diallyl disulfide (DADS) enhances gap-junctional intercellular communication by both direct and indirect mechanisms in rat liver cells. *Carcinogenesis* 2004; 25: 91-98
- 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 Wang AX, Huang HZ. All-trans retinoic acid augments the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in the treatment of tongue carcinoma cell line. *Zhonghua KouQiang YiXue ZaZhi* 2003; 38: 24-26
- 10 Robe PA, Princen F, Martin D, Malgrange B, Stevenaert A, Moonen G, Gielen J, Merville M, Bours V. Pharmacological modulation of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system: effects of dibutyl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, alpha-glycyrrhetic acid, and cytosine arabinoside. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 241-249
- 11 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 ZhongLiu ZaZhi* 2004; 26: 146-149
- 12 Abdullah KM, Abdullah A, Johnson ML, Bilski JJ, Petry K, Redmer DA, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. Effects of Aloe vera on gap junctional intercellular communication and proliferation of human diabetic and nondiabetic skin fibroblasts. *J Altern Complement Med* 2003; 9: 711-718
- 13 方杰. 丹参素对乳腺癌MCF细胞株的作用. *中国老年学杂志* 2003; 23: 168-169
- 14 睦建, 林枫. 丹参素对胃癌NGCC细胞株的作用. *镇江医学院学报* 1997; 7: 384-385
- 15 王国俊, 周黎明, 王莉, 陶大昌, 朱玲. 三七皂甙R1诱导HL-60细胞凋亡的初步研究. *四川生理科学杂志* 2004; 26: 14-16
- 16 陈晓光, 大谷周造, 李燕, 韩锐. d-宁烯、丹参及姜黄素衍生物对ras基因产物膜结合和细胞间隙信息传导的影响. *药理学报* 1998; 33: 821-827
- 17 杜标炎, 谭宇蕙, 吴映雅, 赵鹏, 周联, 赵亚刚. 逆转录病毒载体介导HSV1-tk/GCV肿瘤自杀基因治疗系统的构建. *广州中医药大学学报* 2004; 21: 395-398
- 18 戴体俊. 合并用药的定量分析. *中国药理学通报* 1998; 14: 479-480
- 19 王娟, 桂常青, 周静, 宋建国. 丹参注射液在鼠体内的毒效药理学研究. *皖南医学院学报* 2003; 22: 248-250
- 20 朱立彬. 高效液相色谱法测定丹参药材中丹参素的含量. *湖北中医学院学报* 2004; 6: 33-34
- 21 李旭芬, 李天琅. 丹参及复方丹参注射液的体外抗肿瘤作用. *浙江中西医结合杂志* 1999; 9: 291-292
- 22 陈坚. 丹参酮抗肿瘤的研究进展. *复旦学报* 2003; 30: 626-628
- 23 陈良良, 吴良村, 李庆霞, 陈卫星, 沈敏鹤. 丹参注射液对肿瘤浸润淋巴细胞的体外扩增及抗肿瘤作用. *浙江中医学院学报* 2002; 26: 49-54
- 24 李庆彦, 李春忠, 黄智武, 罗远英, 韦光刚, 梅桂色. 3种丹参制剂对Be1-7402细胞和外周血干细胞生长的影响. *实用癌症杂志* 2001; 16: 467-468

电编 张敏 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 •

更正与说明专栏

《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道, 特设"更正与说明"固定专栏, 包括"事实纠错"、"文字更正"、"解释说明"三个子栏目, 不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明, 而且针对文章的学术水平等进行讨论. 在此, 我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》, 给更正与说明栏目投稿. 投稿者凭文章的编号, 可免费注册(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/39.doc>) 使用中国生物医学基金论文摘要库3年. 中国生物医学基金论文摘要库(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>) 收录了1994-2005年国内发表在1204种生物医学类期刊总计20万以上的论文摘要. 这些论文受国家、军队和省部级自然科学基金、杰出青年基金、重大计划项目基金资助, 内容丰富、数据准确, 体现了我国生物医学的发展历程、脉络和方向, 可为相关领域广大学者和研究人员了解并掌握当前研究动态、开辟新的研究领域提供思路. (世界胃肠病学杂志社)

SNRPN 基因在 HepG2 细胞中的印迹状态研究

晏泽辉, 邓国宏, 王宇明

晏泽辉, 邓国宏, 王宇明, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038

晏泽辉, 男, 1978-12-16生, 湖北省罗田县, 汉族, 2003年第三军医大学西南医院硕士生, 医师。

国家自然科学基金资助项目, No. 30470964

通讯作者: 王宇明, 400038, 重庆市, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所。wym417@mail.tmmu.com.cn

电话: 023-68754141

收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-09-30

Analysis on expression and imprinting style of small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N in hepatic cancer cell line HepG2

Ze-Hui Yan, Guo-Hong Deng, Yu-Ming Wang

Ze-Hui Yan, Guo-Hong Deng, Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30470964

Correspondence to: Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases of PLA, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. wym417@mail.tmmu.com.cn

Received: 2005-09-10 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To investigate the expression and imprinting style of small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN) in hepatic cancer cell line HepG2.

METHODS: Human hepatic cancer cell line HepG2 was cultured *in vitro* by routine method. The expression of SNRPN gene in the cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The single nucleotide polymorphisms (SNP) of SNRPN at exon 4 nt 1654312 (numbered according to NT_026446, SNP rs705) was genotyped in a genomic DNA sample and a cDNA sample of HepG2 cell line with restriction fragment length polymorphism (RFLP) based on RT-PCR.

RESULTS: SNRPN was stably expressed in HepG2 cells. The heterozygote C/T was found at exon 4 nt 1654312 of SNRPN. In cell lines heterozygous with respect to this SNP, only one of the two alleles (T allele) present in the genomic DNA produced an mRNA transcript.

CONCLUSION: SNRPN mRNA is expressed in HepG2 cells, and there is no loss of imprinting.

Key Words: Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N; Genomic imprinting; Restriction fragment length polymorphism; Heterozygote

Yan ZH, Deng GH, Wang YM. Analysis on expression and imprinting style of small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N in hepatic cancer cell line HepG2. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(21):2545-2548

摘要

目的: 研究小核核糖核蛋白多肽N基因(SNRPN)在肝癌肿瘤HepG2细胞株的表达及基因印迹状态。

方法: 采用RT-PCR方法检测出SNRPN基因在肝癌肿瘤HepG2细胞株中的表达状况, 对HepG2细胞株基因组DNA和cDNA中的SNRPN基因外显子4 nt 1654312位点用RT-PCR为基础的RFLP方法进行基因分型。

结果: HepG2细胞稳定表达SNRPN, SNRPN外显子4 nt 1654312(数字依据NT_026446, SNP rs705)为杂合子(C/T); RT-PCR为基础的RFLP分析表明, SNRPN的双等位基因中只有T等位基因产生mRNA转录本。

结论: SNRPN基因在HepG2肝癌细胞株中有表达, 其基因印迹状态未丢失。

关键词: 小核核糖核蛋白多肽N; 基因印迹; 限制性片段长度多态性; 杂合子

晏泽辉, 邓国宏, 王宇明. SNRPN基因在HepG2细胞中的印迹状态研究. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2545-2548

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2545.asp>

0 引言

小核核糖核蛋白多肽N基因(small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N, SNRPN)是编码小核核糖核蛋白多肽N的印迹基因^[1], 与印迹基因IGF2一样, 他也是仅父源等位基因表达, 其印迹状态的维持与DNA的甲基化^[2]、染色质的紧缩^[3]以及组蛋白的乙酰化^[4,5]密切相关。IGF2印迹缺失在肝癌的发生中起到重要作用^[6], 与其类似的SNRPN基因在肝癌细胞中的表达及其印迹状态的研究还未见相关报道。本实验的目的就是利用逆转录PCR(RT-PCR)的方法研究出SNRPN基因在HepG2肝癌细胞株的表达状况, 并以RT-PCR为基础的

限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)的方法检测出SNRPN基因的印迹状态, 探讨印迹基因SNRPN在肝癌细胞株中的印迹状态是否发生改变。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌来源的传代HepG2细胞株购自中科院上海细胞生物研究所, 本研究所实验室保存。RPMI-1640培养基干粉、优级胎牛血清(FCS)、胰蛋白酶、HEPES购自Hyclone公司; TriPure、DEPC等购自Roche公司; AMV逆转录酶、RNA酶抑制剂、oligo dT购自Promega公司; DL2000 DNA分子量标准、Taq DNA聚合酶、dNTP、内切酶*Bst*UI、*Pst*I购自Takara公司; 氯仿、异丙醇、无水乙醇、Tris碱、EDTA、青霉素、链霉素等其他试剂为国内产品, 购自北京鼎国生物技术公司。PCR引物由北京奥科生物公司合成, SNRPN基因鉴定正向引物S4: 5'-CTACTCTTT-GAAGCTTCTGCC-3'; 反向引物AS4: 5'-TGAA-GATTCGGCCATCTTGC-3'。

1.2 方法

1.2.1 HepG2细胞培养 按常规方法传代培养。HepG2肝癌细胞在含有100 mL/L的胎牛血清、终浓度为 1×10^5 U/L的青霉素和链霉素的RPMI1640培养基中37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养数天, 每2 d换液一次, 4 d传代。

1.2.2 核酸的提取 利用TriPure试剂提取HepG2细胞DNA和总RNA。用1 mL TriPure试剂收集细胞, 混匀, 室温静置5 min, 以确保核蛋白复合体完全溶解; 添加0.2 mL氯仿, 剧烈摇动15 s, 然后再次室温静置15 min; 然后4℃, 12 000 g, 离心15 min, 溶液分三层。将无色水样上层转移到一新的离心管中, 加入0.5 mL异丙醇, 混匀, 室温静置15 min, 然后4℃, 12 000 g, 离心15 min, 去上清, 添加1 mL 750 mL/L酒精洗涤RNA沉淀, 再次4℃, 12 000 g, 离心15 min, 去上清, 空气中倒置5-10 min使酒精挥发以除去残留的氯仿, 然后用DEPC水溶解RNA沉淀, 用10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA提取质量。另外向中间层和底部红色层中(要将无色水样上层去除干净)添加纯无水乙醇0.3 mL, 混匀, 室温静置5 min, 然后4℃, 2 000 r/min, 离心5 min, 去上清, 添加750 mL/L酒精1.5 mL, 室温保留20 min, 偶尔摇动, 再次4℃, 2 000 r/min, 离心5 min, 去上清后空气中自然晾干5-10 min以去除残留的氯仿, TE溶解DNA沉淀。最后用核酸蛋白定量仪测定HepG2细胞总RNA和基因组DNA含量。

1.2.3 HepG2细胞SNRPN基因分型 采用PCR-RFLP方法对HepG2细胞SNRPN外显子4 nt 1654312(数字依据NT_026446, SNP rs705)位点进行基因分型。首先利

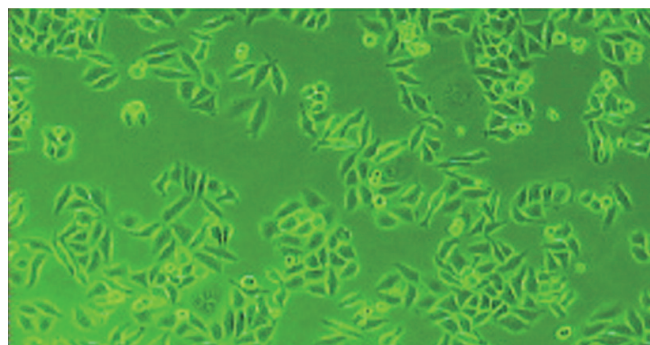


图1 本研究中传代培养的HepG2细胞(24 h, $\times 100$).

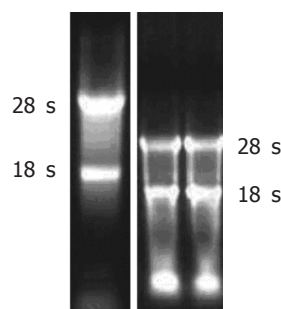


图2 HepG2细胞提取的总RNA质量电泳鉴定。

用S4、AS4做引物, 基因组DNA为模板扩增出包含nt 1654312位点的SNRPN基因片段, 然后利用内切酶*Bst*UI(酶切位点: CG⁺CG)和*Pst*I(酶切位点: CTGCA⁺G)对PCR产物进行双酶切, 最后利用20 g/L琼脂糖凝胶电泳来进行限制性片段长度多态性分析。

1.2.4 RT-PCR及RFLP分析 参照RT-PCR试剂盒操作程序采用二步法进行逆转录以及PCR扩增。逆转录反应体系和反应条件为: 总RNA模板5 μ L约2 μ g, oligo dT 1 μ g, 无RNA酶DEPC处理水3 μ L, 混匀后在70℃变性5 min, 冰上冷却5 min后加入5 $\times$ AMV buffer 5 μ L、AMV逆转录酶3 μ L、RNA酶抑制剂1.5 μ L、dNTP 2 μ L, 补加无RNA酶DEPC处理水到总体积25 μ L, 然后42℃逆转录60 min, 完成后再70℃加热5 min以灭活逆转录酶。随后我们以逆转录的cDNA产物为模板按照Sakatani *et al* [7]所述的方法利用*Bst*UI对SNRPN的nt 1654312位点SNP进行PCR-RFLP分型。

2 结果

2.1 HepG2细胞培养 HepG2细胞融合单层贴壁生长, 显微镜下观察为梭形、三角形或小圆形, 生长旺盛(图1)。

2.2 核酸的提取 采用核酸蛋白定量仪对所提取的总RNA定量, 产量在50 μ g左右(细胞数大约 6×10^6 个); 采用10 g/L琼脂糖凝胶电泳进行总RNA质量鉴定, 显示所提取的RNA完整性良好(图2)。

2.3 HepG2细胞SNRPN基因分型 HepG2细胞基因组

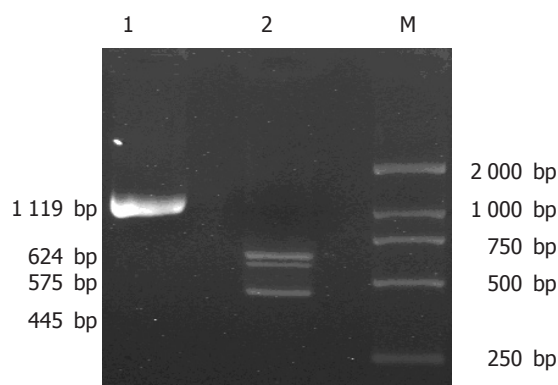


图3 HepG2细胞SNRPN外显子4 nt 1654312位点基因分型. 1: SNRPN PCR产物; 2: PCR产物 Bst UI和 Pst I双酶切; M: DL2000分子质量标准.

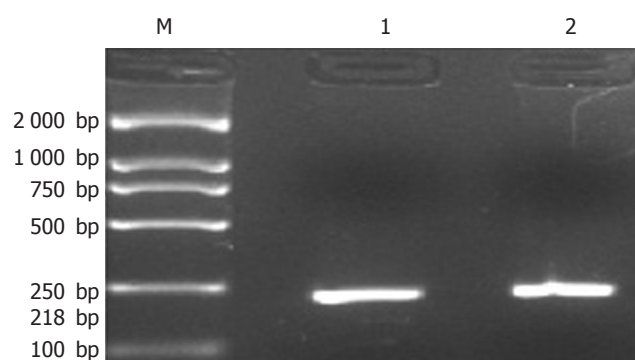


图4 HepG2细胞SNRPN外显子4 nt 1654312位点RT-PCR及RFLP分析. M: DL2000分子质量标准; 1: SNRPN RT-PCR产物; 2: RT-PCR产物 Bst UI限制性酶切.

DNA PCR扩增及 Bst UI和 Pst I双酶切后20 g/L琼脂糖电泳分析结果(图3)证明HepG2细胞株SNRPN基因nt 1654312位点SNP为C/T杂合子基因型.

2.4 HepG2细胞SNRPN RT-PCR及RFLP分析 HepG2细胞cDNA扩增及 Bst UI酶切后30 g/L琼脂糖电泳分析结果(图4)证明HepG2细胞株SNRPN基因印迹状态未丢失, 仅出现一种等位即T等位表达.

3 讨论

基因印迹也称作基因组印迹、配子印迹或亲源印迹, 是近年来发现的一种不遵从孟德尔定律的依靠单亲传递某些遗传学性状的现象, 也就是某些基因呈亲源依赖性的单等位基因表达(父源性或母源性), 其另一等位基因不表达或表达极弱^[8-13], 仿佛这些基因的不同亲本来源的一对等位基因上带有某种可供识别的印迹, 故名. 具有这种现象的基因被称为印迹基因. 在人类基因中, 预计印迹基因的总数大约100-200个, 已经明确的印迹基因超过40个. 基因印迹在人类遗传性疾病尤其是肿瘤发生中的作用正引起越来越多的注意^[14-18].

SNRPN是编码小核核糖核蛋白多肽N的印迹基因^[19-21], 与印迹基因IGF2一样, 也是仅父源等位基因被

表达, 其印迹状态的维持与DNA的甲基化^[22-24], 染色质的紧缩^[25]以及组蛋白的乙酰化^[4,5]密切相关. 鉴于IGF2印迹缺失在肝癌的发生中起到重要作用^[26-31], 与其类似的SNRPN基因在肝癌细胞中的表达及其印迹状态的研究也是值得我们关注的一个课题. 本实验的目的就是利用RT-PCR的方法研究出SNRPN基因在HepG2肝癌细胞株的表达状况, 并以RFLP分析的方法检测SNRPN的基因印迹状态.

SNRPN是一个印迹基因, 其两个等位基因根据父系来源的不同有显著的不同表达水平(仅父源等位基因表达). 为了区分不同表达量的等位基因, 我们选择HepG2细胞SNRPN外显子4上nt 1654312(数字依据NT_026446来确定)为杂合子C/T的SNP位点作为研究对象, 以研究该C/T SNP(dbSNP rs705)的等位特异性表达情况, 并以cDNA的PCR-RFLP检验双等位的差异性表达. 实验发现, C/T杂合子HepG2细胞系中, SNRPN基因依然维持其印迹状态, 逆转录PCR产物酶切实验证实SNRPN等位基因仅仅只有一个等位产生mRNA的转录, 即仅父源的T等位出现转录.

本研究提示SNRPN基因在HepG2肝癌细胞株中稳定表达, 其基因印迹状态未丢失, 更进一步的实验来研究证明印迹基因SNRPN在肝癌组织以及正常人群中的表达和基因印迹丢失情况是必要的, 相信随着对SNRPN研究的深入, 必将为肝癌的发病机制研究提供新的思路.

4 参考文献

- Ozcelik T, Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A, Francke U. Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nat Genet* 1992; 2: 265-269
- Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993; 366: 362-365
- Feil R, Khosla S. Genomic imprinting in mammals: an interplay between chromatin and DNA methylation? *Trends Genet* 1999; 15: 431-435
- Hu JF, Oruganti H, Vu TH, Hoffman AR. The role of histone acetylation in the allelic expression of the imprinted human insulin-like growth factor II gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 403-408
- Saitoh S, Wada T. Parent-of-origin specific histone acetylation and reactivation of a key imprinted gene locus in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1958-1962
- Ohlsson R, Nystrom A, Pfeifer-Ohlsson S, Tohonen V, Hedborg F, Schofield P, Flam F, Ekstrom TJ. IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet* 1993; 4: 94-97
- Sakatani T, Wei M, Katoh M, Okita C, Wada D, Mitsuya K, Meguro M, Ikeguchi M, Ito H, Tycko B, Oshimura M. Epigenetic heterogeneity at imprinted loci in normal populations. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 1124-1130
- Takahashi Y, Rayman JB, Dynlacht BD. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* 2000; 14: 804-816
- Sun X, Ding H, Hung K, Guo B. A new MALDI-TOF based

- mini-sequencing assay for genotyping of SNPS. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E68
- 10 Barlow DP. Gametic imprinting in mammals. *Science* 1995; 270: 1610-1613
- 11 Neumann B, Barlow DP. Multiple roles for DNA methylation in gametic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 159-163
- 12 Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP. Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 1997; 389: 745-749
- 13 Wutz A, Barlow DP. Imprinting of the mouse Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 140: 9-14
- 14 Jirtle RL. Genomic imprinting and cancer. *Exp Cell Res* 1999; 248: 18-24
- 15 Murphy SK, Jirtle RL. Imprinted genes as potential genetic and epigenetic toxicologic targets. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 5-11
- 16 Jirtle RL, Sander M, Barrett JC. Genomic imprinting and environmental disease susceptibility. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 271-278
- 17 Murphy SK, Jirtle RL. Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays* 2003; 25: 577-588
- 18 Luedi PP, Hartemink AJ, Jirtle RL. Genome-wide prediction of imprinted murine genes. *Genome Res* 2005; 15: 875-884
- 19 Tsai TF, Chen KS, Weber JS, Justice MJ, Beaudet AL. Evidence for translational regulation of the imprinted Snurf-Snrpn locus in mice. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1659-1668
- 20 Tsai TF, Bressler J, Jiang YH, Beaudet AL. Disruption of the genomic imprint in trans with homologous recombination at Snrpn in ES cells. *Genesis* 2003; 37: 151-161
- 21 Geuns E, De Rycke M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2873-2879
- 22 Landers M, Bancescu DL, Le Meur E, Rougeulle C, Glatt-Deeley H, Brannan C, Muscatelli F, Lalande M. Regulation of the large (approximately 1000 kb) imprinted murine Ube3a antisense transcript by alternative exons upstream of Snurf/Snrpn. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 3480-3492
- 23 Rodriguez-Jato S, Nicholls RD, Driscoll DJ, Yang TP. Characterization of cis- and trans-acting elements in the imprinted human SNURF-SNRPN locus. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 4740-4753
- 24 El-Maarri O, Seoud M, Riviere JB, Oldenburg J, Walter J, Rouleau G, Slim R. Patients with familial biparental hydatidiform moles have normal methylation at imprinted genes. *Eur J Hum Genet* 2005; 13: 486-490
- 25 Perk J, Makedonski K, Lande L, Cedar H, Razin A, Shemer R. The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman regional control center. *EMBO J* 2002; 21: 5807-5814
- 26 Song BC, Chung YH, Kim JA, Lee HC, Yoon HK, Sung KB, Yang SH, Yoo K, Lee YS, Suh DJ. Association between insulin-like growth factor-2 and metastases after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Cancer* 2001; 91: 2386-2393
- 27 Fan ZR, Yang DH, Cui J, Qin HR, Huang CC. Expression of insulin like growth factor II and its receptor in hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 285-288
- 28 Scharf JG, Braulke T. The role of the IGF axis in hepatocarcinogenesis. *Horm Metab Res* 2003; 35: 685-693
- 29 Li H, Zhang N. Study on the expression and genomic imprinting status of insulin-like growth factor 2 gene in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua GanZangBing ZaZhi* 2004; 12: 347-349
- 30 Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, You HL, Wang LY, Hsieh MY, Chen SC, Chuang WL, Lin ZY, Yu ML, Dai CY. Serum insulin-like growth factor-II as a serologic marker of small hepatocellular carcinoma. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 68-75
- 31 Dong ZZ, Yao DF, Yao DB, Wu XH, Wu W, Qiu LW, Jiang DR, Zhu JH, Meng XY. Expression and alteration of insulin-like growth factor II-messenger RNA in hepatoma tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4655-4660

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 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•

第一届全国临床营养支持学术会议通知

本刊讯 经中华医学会外科学分会批准,“第十届全国临床营养支持学术会议”将于2006-05在上海召开。本次会议由中华医学会外科学分会营养支持学组主办、复旦大学附属中山医院承办,主要内容为临床营养支持领域的基础和临床实践总结。现将征文要求通知如下:

1 征文要求

请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要邮寄到上海市医学院路136号,上海中山医院外科吴国豪收,邮编:200032;同时请用Email将论文全文及摘要发送到prowugh@yahoo.com.cn,注明上海中山医院外科吴国豪收。征文请自留底稿,恕不退稿。

2 截稿日期

征文截止日期:2006-03-15。

本次会议举行优秀论文评奖活动,欢迎踊跃投稿。会议向正式代表颁布中华医学会继续教育学分。

利用 SELDI-TOF-MS 技术研究巨细胞病毒感染致婴儿肝炎综合征的血清蛋白标志物

张妍, 刘华林, 王斌, 钱冬萌, 闫志勇, 丁守怡, 宋旭霞, 宋广辉

张妍, 王斌, 钱冬萌, 闫志勇, 丁守怡, 宋旭霞, 宋广辉, 青岛大学医学院医药生物技术重点实验室 山东省青岛市 266021

刘华林, 青岛市妇女儿童医疗保健中心内二科 山东省青岛市 266011

张妍, 女, 1980-03-11生, 山东省莱州市人, 汉族, 2003年青岛大学医学院硕士生。

国家自然科学基金资助项目, No.C30471527

通讯作者: 王斌, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大学医学院医药生物技术重点实验室, wangbin31@yahoo.com

收稿日期: 2005-09-21 接受日期: 2005-09-30

Identification of serum biomarkers in human cytomegalovirus infected hepatitis infants by SELDI-TOF-MS

Yan Zhang, Hua-Lin Liu, Bin Wang, Dong-Meng Qian, Zhi-Yong Yan, Shou-Yi Ding, Xu-Xia Song, Guang-Hui Song

Yan Zhang, Bin Wang, Dong-Meng Qian, Zhi-Yong Yan, Shou-Yi Ding, Xu-Xia Song, Guang-Hui Song, Key Laboratory of Medicine and Biotechnology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Hua-Lin Liu, the Second Department of Internal Medicine, Medicare Center for Women and Children, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. C30471527

Correspondence to: Dr. Bin Wang, Key Laboratory of Medicine and Biotechnology, Medical College of Qingdao University, 8 Dengzhou Road, Qingdao 266021, Shandong Province, China. wangbin31@yahoo.com

Received: 2005-09-21 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To identify the serum protein biomarkers in infants with hepatitis syndrome resulted from congenital human cytomegalovirus (hCMV) infected using surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS).

METHODS: Serum samples were collected from 20 hCMV infected hepatitis infants and 25 controls. Of the 25 infants, 5 were infected with hCMV but without hepatitis, 10 with hepatitis but no hCMV infection, and 10 were healthy infants. The proteomic expression in the serum was detected by WCX2 chips and SELDI-TOF-MS.

RESULTS: Fifteen protein peaks were distinctly different among the four groups in the mass range of M_r 2 000-20 000. Of the 15 peaks, four at M_r 4 349.8, M_r 5 808.7, M_r 7 935.6 and M_r 8 885.9 were significantly different between the congenital hCMV infected hepatitis

infants and the controls. Five peaks were distinctly up-regulated in the infants with hCMV infection (M_r 3 266.8, M_r 5 638.5, M_r 5 909.1, M_r 7 771.4 and M_r 15 835.6) as compared with those in the infants without hCMV infection. In comparison with other infants, two proteins at M_r 4 600.1 and M_r 5 704.3, respectively, were up-regulated in the infants with hCMV infection but no hepatitis. Four protein peaks were markedly different (M_r 7 567.0, M_r 13 744.8, M_r 15 100.7 and M_r 15 915.0) between the infants with hepatitis and other controls.

CONCLUSION: Some specific serum protein such as augmentor of liver regeneration, prealbumin, and haptoglobin were closely related to liver function. Cytokines such as beta-defensin 31, 8, and macrophage-derived chemokine, and etc were involved in the hCMV infection and the pathogenesis hCMV-induced hepatitis in infants.

Key Words: Surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; Proteomics; Neonatal hepatitis syndrome; Congenital cytomegalovirus infection

Zhang Y, Liu HL, Wang B, Qian DM, Yan ZY, Ding SY, Song XX, Song GH. Identification of serum biomarkers in human cytomegalovirus infected hepatitis infants by SELDI-TOF-MS. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(21):2549-2553

摘要

目的: 用表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)技术研究人巨细胞病毒(hCMV)感染致婴儿肝炎综合征患儿血清蛋白质谱的差异表达, 寻找特异性蛋白标志物, 为研究hCMV感染引起婴儿肝炎综合征的蛋白质组学发病机制奠定基础。

方法: 实验组为hCMV感染所致的婴儿肝炎综合征患儿20例; 对照组 I 为感染hCMV但未发生婴儿肝炎者5例; 对照组 II 为hCMV感染阴性的婴儿肝炎10例; 对照组 III 为健康对照10例。采集全血, 分离血清, 用SELDI-TOF-MS技术和WCX2芯片检测各组蛋白质谱的表达。

结果: hCMV感染引起的婴儿肝炎综合征组与其他对照组比较, 血清中有4个蛋白质表达水平发生明显变化, 分别为 M_r 4 349.8、 M_r 5 808.7、 M_r 7 935.6和 M_r 8 885.9的蛋白峰。hCMV感染的两个组与未感染的对照

组婴儿比较,血清中共有5个蛋白质表达水平发生明显变化,分别为 M_r 3 266.8、 M_r 5 638.5、 M_r 5 909.1、 M_r 7 771.4和 M_r 15 835.6的蛋白峰。hCMV感染但未发生婴儿肝炎组与其他组婴儿比较,血清中有2个蛋白质表达水平发生明显变化,分别为 M_r 4 600.1和 M_r 5 704.3的蛋白峰。两个婴儿肝炎组与肝功能正常的另两组婴儿比较,血清中有4个蛋白质表达水平发生明显变化,分别为 M_r 7 567.0、 M_r 13 744.8、 M_r 15 100.7和 M_r 15 915.0的蛋白峰。

结论:一些特定的血清蛋白质分子如肝再生增强因子、前白蛋白和结合珠蛋白是与肝功能密切相关的因子;细胞因子 β -防御素31, β -防御素8和巨细胞源性趋化因子等,可能与hCMV感染、感染后发病及感染后保护相关。

关键词: SELDI-TOF-MS; 蛋白质组学; 婴儿肝炎综合征; 先天性巨细胞病毒感染

张妍, 刘华林, 王斌, 钱冬萌, 闫志勇, 丁守怡, 宋旭霞, 宋广辉. 利用SELDI-TOF-MS技术研究巨细胞病毒感染致婴儿肝炎综合征的血清蛋白标志物. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2549-2553
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2549.asp>

0 引言

婴儿肝炎综合征(infant hepatitis syndrome, 简称婴肝)指1岁以内婴儿未明病因引起的以肝功能损害及病理学肝脏体征为主要表现的临床征候群,可伴有黄疸(直接胆红素升高)或无黄疸;是一组多病因,主要是病毒感染引起的一种综合征^[1]。其中hCMV感染为病毒感染的首位病因,但其导致婴肝的确切致病机制仍然不明,许多临床病例显示hCMV感染阳性的小儿并无婴肝的症状表现,因此需要用新的研究手段和方法去探讨hCMV感染与婴肝之间的确切关系。蛋白质组学研究近年取得长足的进展,尤其是表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)的出现为全世界寻找多种疾病的标志物提供了新的技术平台,同时也为研究许多疾病的致病机制提供了新的手段。本研究采用SELDI技术和WCX2芯片对hCMV引起的婴肝患儿与三组对照组婴儿的血清标本进行检测,寻找各组间蛋白表达谱的差异,从而为从血清蛋白质组水平研究hCMV引起婴肝的发病机制、治疗和预后监控奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 实验组:2004-11/2005-7住院的hCMV感染引起的婴肝20例,男10例,女10例,年龄1-8 mo(平均2.5 mo)。对照组 I 为感染hCMV但未发生婴肝5例;对照组 II 为hCMV感染阴性的婴肝10例;对照组 III 为健

康对照10例。肝功能检测用Dade Behring公司的自动生化分析仪检测ALT、AST、总胆红素、直接胆红素、间接胆红素、总蛋白、白蛋白、球蛋白、总胆汁酸等。肝炎全套检测使用相应试剂盒。尿CMV基因定量检测使用hCMV核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒(深圳市匹基生物工程股份有限公司),严格按照操作说明书进行。

1.2 方法 采集全血1-2 mL,立即放入4℃,静置4 h,4℃ 4 000 r/min离心30 min,每管20 μ L分装后置-86℃冰箱保存备用。使用前取出血清样品,冰上融化后,4℃ 10 000 g离心10 min,除去血清中的不溶物。在标记好的1.5 mL Ep管中依次加入20 μ L U_9 缓冲液(9 mol/L urea, 20 g/L CHAPS, 50 mmol/L Tris-HCl, pH9.0, 10 g/L DTT)和10 μ L血清样品,将样品混匀后500 r/min冰浴振荡30 min。然后向30 μ L稀释样品中加入360 μ L醋酸钠缓冲液(50 mmol/L, pH4.0),迅速混匀后加样。将WCX2芯片安装于加样器(bioprocessor)内,每加样孔加入醋酸钠缓冲液200 μ L,室温500 r/min振荡5 min,弃去缓冲液,重复上述操作1次。每孔加入稀释后的血清样品100 μ L,室温500 r/min振荡孵育1 h。甩去液体,每孔加入醋酸钠缓冲液200 μ L,室温振荡5 min,洗去未结合样品。弃去缓冲液后,重复上述操作1次。每孔加入HPLC水200 μ L,立刻弃去。卸下加样器,待芯片表面自然晾干后,每点各加饱和SPA 0.5 μ L,待芯片表面风干后,重复1次。采用PBS II c型蛋白芯片阅读仪读取芯片信息,仪器用标准多肽校正,系统的质量偏差为0.1%。芯片阅读仪参数设置如下:激光强度180,检测灵敏度8,优化范围 M_r 2 000-20 000,最高相对分子质量 M_r 50 000,芯片上的每个点采集130次。用Ciphergen ProteinChip 3.1.1软件自动采集数据。结果用Biomarker Wizard软件将2 000-20 000的质荷比峰首先用信噪比(S/N)大于5和大于2各过滤1次。筛出的质荷比峰在10%以上的样品中同时存在,且同一质荷比峰在不同样品中的偏差小于0.3%,以去除原始数据中的噪音。分析hCMV引起的婴肝组与各对照组婴儿的血清蛋白质谱的差异。

2 结果

2.1 实验室检查结果 实验组20例转氨酶均升高,其中有16例同时有胆红素升高,且以直接胆红素升高为主,临床表现为黄疸及肝大,符合黄疸型婴肝;另外4例胆红素正常,且无黄疸表现,为非黄疸型婴肝。对照组 II 中10例转氨酶均高于正常值。对照组 I, III各例肝功能各项指标均在正常范围内。肝炎全套检测结果显示:实验组及各对照组肝炎全套检测结果均为阴性,排除了其他肝炎病毒感染的可能。尿CMV基因定量检测实验

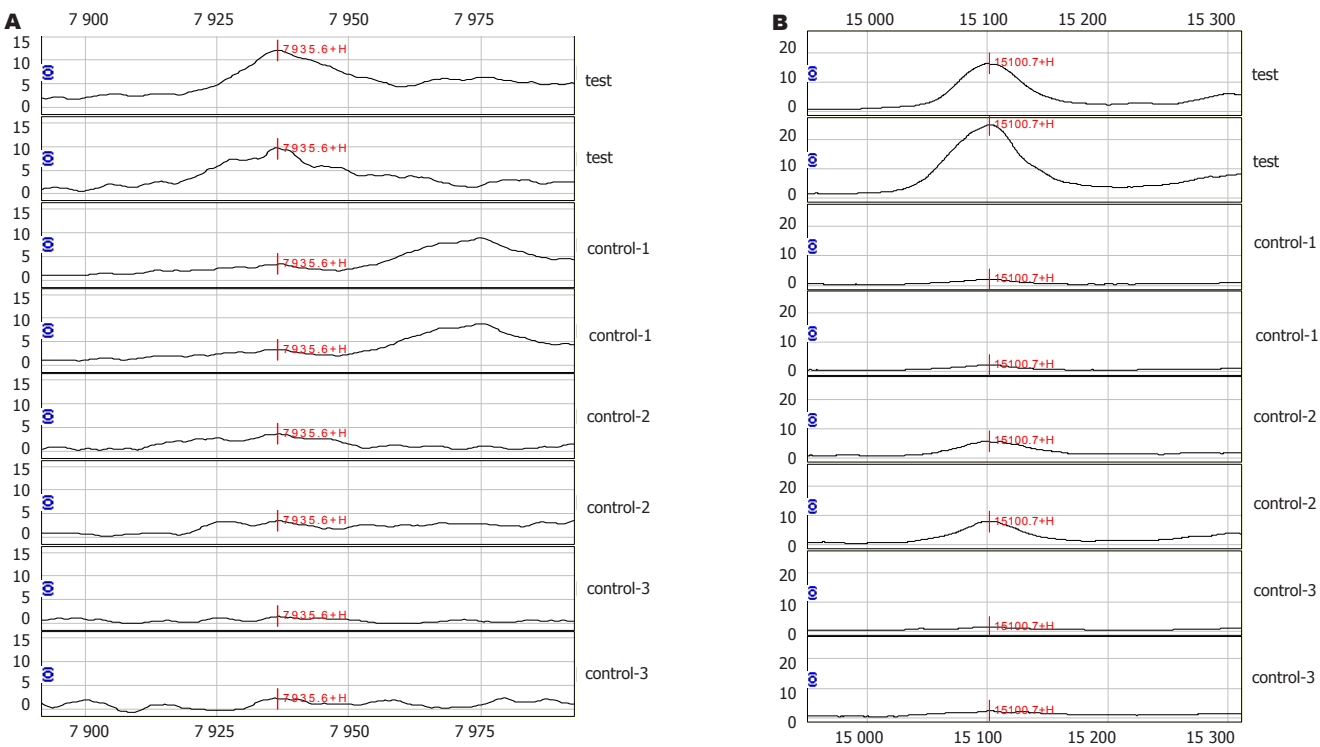


图 1 hCMV引起的婴儿肝炎综合征组血清蛋白表达谱. A: 相对分子质量为 M_r 7 935.6的蛋白峰在hCMV引起的婴肝中表达明显上调; B: 相对分子质量为 M_r 15 100.7的蛋白峰在hCMV婴肝组表达上调较hCMV感染阴性的婴肝组更明显.

组及对照组 I 的基因定量均为阳性(2.0×10^7 - 1.17×10^9 copy/L). 对照组 II, III基因定量结果均为阴性.

2.2 质谱分析结果 用CIPHERGEN Biomarker Wizard 软件对各组样品进行质谱分析, 在相对分子质量 M_r 2 000-20 000范围内, 寻找各组之间的差异蛋白. 其中hCMV引起的婴儿肝炎综合征组与三个对照组比较, 相对分子质量为 M_r 4 349.8、 M_r 8 885.9的蛋白峰表达明显下调, 分子质量为 M_r 5 808.7、 M_r 7 935.6的蛋白峰表达明显上调(表1, 图1A). hCMV感染的两个组与未感染的对照组比较, 相对分子质量为 M_r 3 266.8、 M_r 5 638.5、 M_r 5 909.1、 M_r 7 771.4及 M_r 15 835.6的蛋白峰表达均明显上调(表1). hCMV感染但未发生婴肝组与其他组比较, 相对分子质量为 M_r 4 600.1、 M_r 5 704.3的蛋白峰明显上调(表1). 两个婴肝组与肝功能正常的两组比较, 相对分子质量为 M_r 7 567.0、 M_r 15 100.7的蛋白峰明显上调, 且hCMV感染导致的婴肝组较hCMV感染阴性的婴肝组上调更明显. 相对分子质量为 M_r 13 744.8、 M_r 15 915.0的蛋白峰明显下调(表1, 图1B).

3 讨论

蛋白质组(proteome)是对应于一个基因组的所有蛋白质构成的整体. 蛋白质组学(proteomics)以蛋白质组为研究对象, 从整体的角度, 分析细胞内外动态变化的蛋白质组成与活动规律^[2-5]. SELDI结合蛋白质芯片能对原始样品进行高通量检测, 检测相对分子质量在 M_r

表1 hCMV引起的婴儿肝炎综合征蛋白峰的表达

蛋白峰分子质量 (M_r)	实验组	对照组 I	对照组 II	对照组 III
4 349.8	0	↑	↑	↑
5 808.7	↑	0	0	0
7 935.6	↑	0	0	0
8 885.9	0	↑	↑	↑
3 266.8	↑	↑	0	0
5 638.5	↑	↑	0	0
5 909.1	↑	↑	0	0
7 771.4	↑	↑	0	0
15 835.6	↑	↑	0	0
4 600.1	0	↑	0	0
5 704.3	0	↑	0	0
7 567.0	↑↑	0	↑	0
13 744.8	0	↑	0	↑
15 100.7	↑↑	0	↑	0
15 915.0	0	↑	0	↑

↑↑明显上调; ↑上调; 0无蛋白峰.

500-500 000之间的蛋白或多肽, 而且所需样本体积小(0.5-400 μ L). 由于其具有高分辨力, 应用简便, 敏感性高得到越来越广泛的应用^[6-10]. 目前SELDI蛋白质芯片技术主要用于检测血清中的肿瘤蛋白质标志物, 已经发现了膀胱癌^[11,12], 卵巢癌^[13,14], 前列腺癌^[15,16], 乳腺癌^[17,18]以及其他癌症特异的标志分子. 有研究小组^[19]用SELDI技术研究艾滋病与正常人血清时发现并确定了一种相关蛋白——防御素1, 2, 3, 从而为艾滋病的研究与治疗提供了一定的基础. 婴肝病因复杂, 其中病毒感染是其主要病因之一. hCMV感染则是首位的病毒学

病因。hCMV是宫内病毒感染最常见的原因。母亲孕期原发性hCMV感染或再感染可将病毒传播给胎儿,而导致胎儿先天性hCMV感染。10%先天性hCMV感染的婴儿将出现严重的临床表现,常见的有肝脾肿大、黄疸、小头畸形、体质量低下、紫癜、先天畸形等^[20,21],但其导致婴儿肝的确切致病机制仍然不明。有报道在母亲原发感染期间,白细胞携带病毒到达微脉管上皮细胞^[22-24],微脉管上皮细胞与锚在母体微动脉绒毛上的细胞滋养层直接相联,被感染的滋养层细胞将继而感染绒毛核心下的组织,包括成纤维细胞和胎儿内皮细胞,这样病毒就感染了胎儿。原发感染时的另外一种传播机制可能是感染了母体白细胞通过破坏合体滋养层而感染绒毛层的基质^[25]。同时,合体滋养层细胞可以直接被病毒感染^[26]。另外病毒感染机体后可抑制机体的免疫功能,特别是细胞介导的免疫反应,如巨噬细胞及CD14⁺单核细胞等均参与机体对hCMV的免疫应答反应^[26]。尽管近年来对hCMV的研究颇多,但对于其导致婴儿肝脏损伤的机制仍不十分明确,因此在本实验中我们采用SELDI-TOF-MS技术,意图从蛋白质水平发现与hCMV感染及致病有关的蛋白标志物,进而揭示hCMV感染引起婴儿肝炎综合征的致病机制。

我们首先进行了肝炎全套检测,排除了其他肝炎病毒感染的可能。然后对各组婴儿进行尿CMV基因定量检测,结合肝功能检测结果及临床表现(如黄疸、肝脾肿大等)将所有标本分为4个组,检测各组之间血清中蛋白表达谱的差异。我们根据发现的差异蛋白的分子质量及等电点(WCX2芯片捕获的蛋白质PI>4)在Swiss蛋白数据库中检索(<http://us.expasy.org/tools/tagident.html>),得到一些趋化因子和细胞因子,在等电点和分子质量上与我们得到的蛋白差异峰非常接近。结合结果分析,我们发现在hCMV引起的婴儿肝炎综合征组与3个对照组之间存在4个蛋白差异峰,则这4种蛋白是与hCMV感染并且导致婴儿肝的发病密切相关的。在数据库中检索到相对分子质量为 M_r 5 808.7和 M_r 7 935.6的蛋白峰分别与 β -防御素8和巨噬细胞源性趋化因子(MDC)^[27,28]两种蛋白非常接近;将hCMV感染的两个组与无hCMV感染的两个组血清蛋白表达谱比较,发现有5个蛋白峰在hCMV感染组是增高的,提示这5个蛋白峰与hCMV感染相关。其中 M_r 7 771.4和 M_r 15 835.6的蛋白峰分别与血小板因子4(CXCL4)和白细胞介素-25(IL-25)非常接近;将hCMV感染但未发生婴儿肝的婴儿与其他组婴儿血清蛋白质表达谱比较,发现有2个蛋白峰表达明显上调,则这2种分子质量的蛋白质的作用可能是保护感染后的机体,使之有效对抗病毒对机体的侵害,是一种对机体具有保护性的细胞因子。其中 M_r 5 704.3的蛋白峰能够在Swiss数据库中

检索到与 β -防御素31非常接近;将肝功能异常的两个组与肝功能正常组比较发现4个蛋白峰表达有明显差异,则这4种蛋白是与肝脏损伤修复有关的蛋白质。其中相对分子质量为 M_r 7 567.0和 M_r 15 100.7的两种蛋白峰在hCMV感染引起的婴儿肝组增高较非hCMV感染的婴儿肝组更高。在数据库中检索到 M_r 15 100.7的蛋白峰与人肝再生增强因子(hALR)^[29,30]非常接近,该细胞因子恰是与肝脏的损伤后再生密切相关的,从而提示了hCMV感染对婴儿肝脏的损伤较其他损伤更为严重。另外两种蛋白峰相对应的前白蛋白、结合珠蛋白等也是反映肝脏功能的蛋白,其在肝脏损伤时的变化均与我们的实验结果一致。

总之,我们在实验中发现的这些与hCMV感染及感染后婴儿肝炎综合征的发病与否相关的血清蛋白因子,以及根据这些因子的分子质量对照已知的细胞因子数据库分析可能参与hCMV感染及感染致婴儿肝的相关细胞因子,将有助于我们从血清蛋白质组水平上探讨hCMV引起的婴儿肝的发病机制,如巨噬细胞源性趋化因子,白细胞介素-25等可能是参与机体免疫反应的白细胞在机体对hCMV感染后的免疫应答过程中产生的。本结果仍需要更进一步的分析及实验来验证,为揭示巨细胞病毒导致婴儿肝的机制提供蛋白质组学的分子基础。

4 参考文献

- 1 朱启镒, 王晓红, 王建设. 婴儿肝病综合征诊治修订方案. 中华传染病杂志 2004; 22: 357
- 2 Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 2001; 36: 1083-1091
- 3 丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌. 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1684-1687
- 4 Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 1998; 19: 1853-1861
- 5 Kavallaris M, Marshall GM. Proteomics and disease: opportunities and challenges. *Med J Aust* 2005; 182: 575-579
- 6 Seibert V, Ebert MP, Buschmann T. Advances in clinical cancer proteomics: SELDI-ToF-mass spectrometry and biomarker discovery. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2005; 4: 16-26
- 7 Persidsky Y, Gendelman HE. Mononuclear phagocyte immunity and the neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 691-701
- 8 Seibert V, Wiesner A, Buschmann T, Meuer J. Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and ProteinChip technology in proteomics research. *Pathol Res Pract* 2004; 200: 83-94
- 9 Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; 21: 1164-1177
- 10 Bischoff R, Luidert TM. Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 803: 27-40
- 11 Verma M, Wright GL Jr, Hanash SM, Gopal-Srivastava R, Srivastava S. Proteomic approaches within the NCI early detection research network for the discovery and identification of cancer biomarkers. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 103-115
- 12 Ord JJ, Streeter E, Jones A, Le Monnier K, Cranston D, Crew J, Joel SP, Rogers MA, Banks RE, Roberts IS, Harris AL. Phase I

- trial of intravesical Suramin in recurrent superficial transitional cell bladder carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 92: 2140-2147
- 13 Fung ET, Yip TT, Lomas L, Wang Z, Yip C, Meng XY, Lin S, Zhang F, Zhang Z, Chan DW, Weinberger SR. Classification of cancer types by measuring variants of host response proteins using SELDI serum assays. *Int J Cancer* 2005; 115: 783-789
- 14 Moshkovskii SA, Serebryakova MV, Kuteykin-Teplyakov KB, Tikhonova OV, Goufman EI, Zgoda VG, Taranets IN, Makarov OV, Archakov AI. Ovarian cancer marker of 11.7 kDa detected by proteomics is a serum amyloid A1. *Proteomics* 2005; 5: 3790-3797
- 15 Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, Wright GL Jr. Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem* 2001; 47: 1901-1911
- 16 Semmes OJ, Feng Z, Adam BL, Banez LL, Bigbee WL, Campos D, Cazares LH, Chan DW, Grizzle WE, Izbicka E, Kagan J, Malik G, McLerran D, Moul JW, Partin A, Prasanna P, Rosenzweig J, Sokoll LJ, Srivastava S, Srivastava S, Thompson I, Welsh MJ, White N, Winget M, Yasui Y, Zhang Z, Zhu L. Evaluation of serum protein profiling by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of prostate cancer: I. Assessment of platform reproducibility. *Clin Chem* 2005; 51: 102-112
- 17 Hu Y, Zhang S, Yu J, Liu J, Zheng S. SELDI-TOF-MS: the proteomics and bioinformatics approaches in the diagnosis of breast cancer. *Breast* 2005; 14: 250-255
- 18 Pawlik TM, Fritsche H, Coombes KR, Xiao L, Krishnamurthy S, Hunt KK, Pusztai L, Chen JN, Clarke CH, Arun B, Hung MC, Kuerer HM. Significant differences in nipple aspirate fluid protein expression between healthy women and those with breast cancer demonstrated by time-of-flight mass spectrometry. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 89: 149-157
- 19 Zhang L, Yu W, He T, Yu J, Caffrey RE, Dalmasso EA, Fu S, Pham T, Mei J, Ho JJ, Zhang W, Lopez P, Ho DD. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* 2002; 298: 995-1000
- 20 Azam AZ, Vial Y, Fawer CL, Zufferey J, Hohlfield P. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 443-448
- 21 Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 680-715
- 22 Gerna G, Percivalle E, Sarasini A, Revello MG. Human cytomegalovirus and human umbilical vein endothelial cells: restriction of primary isolation to blood samples and susceptibilities of clinical isolates from other sources to adaptation. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 233-238
- 23 Revello MG, Percivalle E, Arbustini E, Pardi R, Sozzani S, Gerna G. *In vitro* generation of human cytomegalovirus pp65 antigenemia, viremia, and leukoDNAemia. *J Clin Invest* 1998; 101: 2686-2692
- 24 Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, Percivalle E, Simoncini L, Gerna G. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. *J Infect Dis* 1998; 177: 1170-1175
- 25 Hemmings DG, Kilani R, Nykiforuk C, Preiksaitis J, Guilbert LJ. Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblasts. *J Virol* 1998; 72: 4970-4979
- 26 Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997; 91: 119-126
- 27 Jahnz-Rozyk K, Targowski T, Paluchowska E, Owczarek W, Kucharczyk A. Serum thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine and eotaxin as markers of severity of atopic dermatitis. *Allergy* 2005; 60: 685-688
- 28 Shimauchi T, Imai S, Hino R, Tokura Y. Production of thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine by CCR4+ adult T-cell leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2427-2435
- 29 Liu Q, Wang Z, Luo Y. The cDNA clone and sequence analysis of the coding region of human augmenter of liver regeneration (hALR) gene. *Zhonghua GanZangBing Za Zhi* 1999; 7: 156-158
- 30 Liu Q, Yu HF, Sun H, Ma HF. Expression of human augmenter of liver regeneration in pichia pastoris yeast and its bioactivity *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3188-3190

电编 张敏 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《实用儿科临床杂志》

本刊讯 《实用儿科临床杂志》为儿科学类核心期刊、中国科技核心期刊、中国科技论文统计源期刊、俄罗斯《文摘杂志》来源期刊。本刊办刊宗旨为贯彻党和国家的卫生工作方针、政策, 贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针, 反映国内外儿科医疗、科研等方面的新技术、新成果及新进展, 促进学术交流。本刊辟有专家论坛、论著、小儿神经基础与临床、实验研究、儿童保健、误诊分析、药物与临床、综述、小儿外科、病例(理)讨论、病例报告、临床应用研究等栏目。2006年起本刊由月刊改为半月刊, A4开本, 64页, 每月5、20日出版, ISSN 1003-515X, CN 41-1106/R。国内外公开发行, 国内邮发代号: 36-102, 国外邮发代号: M1763。欢迎广大儿科医务工作者和医学科教人员、各级图书馆(室)订阅邮购。国内定价: 6.50元/期, 156.00元/年; 国外定价: 10.00美元/期, 240美元/年。联系地址: 453003 河南省新乡市新乡医学院《实用儿科临床杂志》编辑部。联系电话: 0373-3029144, 0373-3831456; 传真: 0373-3029144; E-mail: syqk@chinajournal.net.cn; syqk@xxmc.edu.cn。

HBV 携带者T细胞亚群状况与肝组织病理学对比

游 晶, 庄 林, 陈红英, 俞 岚, 黄俊华, 高惠芸, 乔燕伟, 唐宝璋, 曲俊彦, 吴国斌

游晶, 陈红英, 俞岚, 黄俊华, 高惠芸, 乔燕伟, 唐宝璋, 曲俊彦, 吴国斌, 昆明医学院第一附属医院感染病科 云南省昆明市 650032
庄 林, 昆明市第三人民医院肝病科 云南省昆明市 650032
游晶, 女, 1962-03-20生, 云南省昆明市人, 汉族. 1984年昆明医学院医学系本科毕业, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事内科消化系统疾病和感染病的诊治研究, 发表论文40多篇.
云南省教育厅科研课题基金项目, No. 028Y213
通讯作者: 游晶, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院感染病科. jingyoukum@163.com
电话: 0871-5324888
收稿日期: 2005-04-21 接受日期: 2005-04-27

Comparative analysis of peripheral T-cell subsets and liver histopathology in asymptomatic hepatitis B virus carriers

Jing You, Lin Zhuang, Hong-Ying Chen, Lan Yu, Jun-Hua Huang, Hui-Yun Gao, Yan-Wei Qiao, Bao-Zhang Tang, Jun-Yan Qu, Guo-Bin Wu

Jing You, Hong-Ying Chen, Lan Yu, Jun-Hua Huang, Hui-Yun Gao, Yan-Wei Qiao, Bao-zhang Tang, Jun-Yan Qu, Guo-Bin Wu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Lin Zhuang, Department of Hepatopathy, the Third Municipal People's Hospital of Kunming, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Supported by Scientific Research Foundation of Yunnan Education Office, No.028Y213
Correspondence to: Dr. Jing You, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. jingyoukum@163.com
Received: 2005-04-21 Accepted: 2005-04-27

Abstract

AIM: To investigate the influences of serum hepatitis B virus DNA and HBeAg levels on the function of cellular immunity and the changes of liver histopathology in asymptomatic chronic HBV carriers, and to explore the mechanism involved in it.

METHODS: Peripheral T-cell subsets were determined in 109 asymptomatic chronic HBV carriers and 40 normal controls by flow cytometry. Of the 109 carriers, histopathological examinations were performed in 28 ones. HBV markers were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and serum HBV DNA levels were measured by polymerase chain reaction (PCR).

RESULTS: The rates of CD3⁺ and CD4⁺ cells and the

value of CD4⁺/CD8⁺ were significantly reduced in HBV carriers as compared with those in the normal controls (67.2±9.0% vs 71.0±3.5%, $P < 0.05$; 33.1±6.6% vs 40.3±2.8%, $P < 0.001$; 1.10±0.36 vs 2.01±0.19, $P < 0.001$), and the rate of CD8⁺ cells was significantly increased (33.8±8.4% vs 20.2±1.9%, $P < 0.001$). The rates of CD3⁺ cells in HBV DNA(+) and in HBeAg(+) carriers showed no significant difference from those of HBV DNA(-) and HBeAg(-) carriers, respectively; However, the rate of CD4⁺ cells (31.2±6.3% vs 37.2±5.4%, $P < 0.001$; 31.0±6.0% vs 35.8±6.5%, $P < 0.001$) and the value of CD4⁺/CD8⁺ (0.91±0.32 vs 1.35±0.26, $P < 0.001$; 0.89±0.30 vs 1.26±0.33, $P < 0.001$) were markedly decreased, while the rate of CD8⁺ cells (36.7±8.4% vs 27.9±4.2%, $P < 0.001$; 37.3±8.4% vs 29.5±6.0%, $P < 0.001$) was increased in HBV DNA(+) and in HBeAg(+) carriers. The pathological changes that reached G1S1 stage covered a percentage of 68.8% in HBV DNA(+) carriers, which was significantly higher than that (16.7%) in HBV DNA(-) ones ($\chi^2 = 5.57$, $P < 0.01$). The rate of CD3⁺ cells was notably reduced ($F = 2.919$, $P < 0.05$) in G1S1 carriers as compared with that in G1S0 ones, but the rate of CD4⁺ cells showed no significant difference between them. Compared with those in G1S0 carriers, the rates of CD3⁺ and CD4⁺ cells and the value of CD4⁺/CD8⁺ tended to reduce, but the rate of CD8⁺ cells was tended to increase in G2S1 ones.

CONCLUSION: HBV infection can lead to disorder of cellular immunity in chronic HBV carriers, and the disorder and liver damages can be promoted by the increased serum levels of HBV DNA and HBeAg.

Key Words: Hepatitis B virus carrier; HBV DNA; Liver histopathology; T cell subsets; Immune function

You J, Zhuang L, Chen HY, Yu L, Huang JH, Gao HY, Qiao YW, Tang BZ, Qu JY, Wu GB. Comparative analysis of peripheral T-cell subsets and liver histopathology in asymptomatic hepatitis B virus carriers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(21):2554-2558

摘要

目的: 研究HBV携带者的细胞免疫功能变化及其与血清HBV DNA, HBeAg的关系, 并对T细胞亚群与肝组织病理学改变进行对比分析, 探讨HBV携带及其所导致

肝组织病理改变的机制。

方法: 应用流式细胞仪检测109例HBV携带者和40例健康对照外周血T细胞亚群百分率, 并对其中28例行肝组织病理学检查, ELISA法检测HBV标志物, PCR法检测HBV DNA。

结果: HBV携带者外周血CD3⁺、CD4⁺细胞百分率及CD4⁺/CD8⁺比值较正常对照组显著降低($67.2 \pm 9.0\%$ vs $71.0 \pm 3.5\%$, $P < 0.05$; $33.1\% \pm 6.6\%$ vs $40.3 \pm 2.8\%$, $P < 0.001$; 1.10 ± 0.36 vs 2.01 ± 0.19 , $P < 0.001$), CD8⁺细胞百分率明显升高($33.8 \pm 8.4\%$ vs $20.2 \pm 1.9\%$, $P < 0.001$)。HBV DNA(+)组及HBeAg(+)组分别与HBV DNA(-)组及HBeAg(-)组比较, CD3⁺细胞无统计学差异, CD4⁺细胞显著降低($31.2 \pm 6.3\%$ vs $37.2 \pm 5.4\%$, $P < 0.001$; $31.0 \pm 6.0\%$ vs $35.8 \pm 6.5\%$, $P < 0.001$), CD8⁺细胞明显升高($36.7 \pm 8.4\%$ vs $27.9 \pm 4.2\%$, $P < 0.001$; $37.3 \pm 8.4\%$ vs $29.5 \pm 6.0\%$, $P < 0.001$), CD4⁺/CD8⁺比值明显降低(0.91 ± 0.32 vs 1.35 ± 0.26 , $P < 0.001$; 0.89 ± 0.30 vs 1.26 ± 0.33 , $P < 0.001$)。HBV DNA(+)组肝病理组织学改变68.8%达到G1S1及以上程度, 而HBV DNA(-)组仅为16.7%, 二组间差异显著($\chi^2 = 5.57$, $P < 0.01$)。G1S1组CD3⁺细胞较G1S0组明显降低($F = 2.919$, $P = 0.047$), CD4⁺细胞降低($P > 0.05$)。G2S1组与G1S0组相比, CD3⁺细胞及CD4⁺细胞百分率有降低趋势, CD8⁺细胞百分率有升高趋势, CD4⁺/CD8⁺比值有明显降低趋势。

结论: HBV感染可导致HBV携带者细胞免疫功能改变, HBV DNA复制增加可进一步加重HBV携带者的细胞免疫功能紊乱, 并加重肝组织损害。

关键词: HBV携带者; HBV DNA; 肝组织病理学; T细胞亚群; 免疫功能

游晶, 庄林, 陈红英, 俞岚, 黄俊华, 高惠芸, 乔燕伟, 唐宝璋, 曲俊彦, 吴国斌. HBV携带者T细胞亚群状况与肝组织病理学对比研究. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2554-2558

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2554.asp>

0 引言

慢性病毒性肝炎是全球慢性肝病、肝硬化(LC)和肝细胞肝癌(HCC)的主要原因^[1-4]。乙型肝炎病毒(HBV)感染易于慢性化, 并逐渐发展成LC甚至HCC, 而严重威胁人类健康^[5-7]。我国约7亿人曾感染过HBV, 其中1.2亿人长期携带HBV, 其中的35%可发展为慢性乙型肝炎(CHB), 65%可演变为LC, 80%的HCC与HBV感染有关^[8-9]。机体免疫功能状况与HBV长期携带有重要关系。各种免疫细胞特别是T细胞亚群之间的调节紊乱, 不论原因来自宿主还是病毒, 是体内不能清除病原体及HBV在肝内持续复制的主要原因^[10-11]。我们采用流式细胞仪检测HBV携带者外周血T淋巴细胞亚群[CD3⁺, CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺(CD4⁺)(Th), CD3⁺/CD4⁺

CD8⁺(CD8⁺)(Tc), CD4⁺/CD8⁺(Th/Tc)], 以评价HBV感染人体后细胞免疫功能的变化及其与血清HBV DNA的关系, 并对T淋巴细胞亚群检测结果与肝组织病理学结果进行对比分析, 从免疫学角度对HBV携带的机理及所导致的肝组织病理改变作一些探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 HBV携带者109例均为我院住院及门诊病人。男67例, 女42例, 年龄13-50岁。诊断符合2000年西安会议修订的诊断标准(HBsAg阳性, 但无肝炎症状和体征, 各项肝功能检查正常, 经半年观察无变化者)^[12]。其中HBsAg(+), HBeAg(+), HBcAb(+), 61例; HBsAg(+), HBeAb(+), HBcAb(+), 44例; HBsAg(+), HBcAb(+), 4例。HBV DNA(+)74例, HBV DNA(-)35例。全部患者排除甲、丙、丁、戊型肝炎及免疫缺陷性疾病, 以及肝癌、各种感染、风湿病和结核等, 半年内无应用免疫制剂史。健康对照组(health control, HC)(HBsAg阴性)40例。年龄16-46岁, 均为健康体检合格人员, 无肝病病史及肝病证据。

1.2 方法 取全血(EDTA抗凝)100 μ L加三色mAb(CD3-PE-CY5/CD4-FITC/CD8-PE, 苏州生物基因公司)20 μ L, 混匀, 室温放置20 min.放入Muti-Q-Prep处理仪(美国Coulter公司)后, 用流式细胞仪(Coulter Epics-XL型流式细胞仪)进行检测。阴性对照取全血100 μ L加小鼠IgG-PE-CY5/IgG-FITC/IgG-PE(苏州生物基因公司)20 μ L, 其余步骤同上。血清乙肝标志物(HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Anti-HBcAb IgM)检测用ELISA法, 血清HBV DNA检测用PCR法。操作严格按试剂盒使用说明进行。肝组织均采用快速抽吸术取得, 然后经固定, 石蜡包埋切片染色后镜检, 并依据2000年西安会议修订的病毒性肝炎病理诊断标准, 进行炎症和纤维化程度的分级(G)和分期(S)诊断。

统计学处理 结果以均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 部分以百分率表示。采用SPSS 11.0软件包对各组间检测结果进行方差分析检验, 部分结果行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 HBV携带者T细胞亚群 HBV携带者外周血CD3⁺细胞百分率及CD4⁺细胞百分率较正常对照组有明显降低($P < 0.05$ 及 $P < 0.001$); CD8⁺细胞百分率高于正常对照组($P < 0.001$); CD4⁺/CD8⁺比值明显降低($P < 0.001$, 表1)。HBV携带者HBV DNA(+)组与HBV DNA(-)组间, CD3⁺细胞比较无显著性差异($P = 0.079$), 但与HBV DNA(-)组相比, HBV DNA(+)组CD4⁺细胞百分率降低超过了6.06个百分点($P = 0.0001$), CD8⁺细胞百分率升高超过了8.81个百分点($P = 0.0001$), CD4⁺/CD8⁺比值显著下降($P = 0.0001$)。HBV携带者HBeAg(+)组与HBeAg(-)组间, CD3⁺细胞比较无显著性差异($P = 0.068$), 但

表 1 HBV携带者T细胞亚群 (mean ± SD)

分组	<i>n</i>	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
HBV(+)	109	67.2 ± 9.0 ^a	33.1 ± 6.6 ^d	33.8 ± 8.4 ^d	1.10 ± 0.36 ^d
HBV(-)	40	71.0 ± 3.5	40.3 ± 2.8	20.2 ± 1.9	2.01 ± 0.19
HBV DNA(+)	74	68.3 ± 8.7	31.2 ± 6.3 ^{fd}	36.7 ± 8.4 ^{fd}	0.91 ± 0.32 ^{fd}
HBV DNA(-)	35	65.0 ± 9.4 ^d	37.2 ± 5.4 ^b	27.9 ± 4.2 ^d	1.35 ± 0.26 ^d
HBeAg (+)	61	68.6 ± 9.1	31.0 ± 6.0 ^{hd}	37.3 ± 8.4 ^{hd}	0.89 ± 0.30 ^{hd}
HBeAg (-)	48	65.4 ± 8.7 ^d	35.8 ± 6.5 ^d	29.5 ± 6.0 ^d	1.26 ± 0.33 ^d

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01, ^d*P* < 0.001 vs HBV(-); ^f*P* < 0.001 vs HBV DNA (-); ^h*P* < 0.001 vs HBeAg (-).

表 2 HBV携带者肝组织学结果

分组	<i>n</i>	G1S0	G1S1	G2S1	≥G1S1
HBV DNA(+)	16	31.3 (5/16) ^b	56.3 (9/16) ^a	12.5 (2/16)	68.8 (11/16) ^b
HBV DNA(-)	12	83.3 (10/12)	16.7 (2/12)	0	16.7 (2/12)
χ ² 值		5.57	4.71	0.86	5.57
<i>P</i> 值		0.006	0.034	0.204	0.006

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs HBV DNA(-).

HBeAg(+)组CD4⁺细胞百分率降低超过了4.73个百分点(*P* = 0.000 1), CD8⁺细胞百分率升高超过了7.84个百分点(*P* = 0.000 1), CD4⁺/CD8⁺比值显著下降(*P* = 0.000 1).

2.2 HBV携带者肝组织学结果 HBV携带者, 28例行肝穿刺术病理组织学检查, 其中HBV DNA(+)16例, 68.8%(11/16)病理组织学诊断达G1S1及其以上程度; 而HBV DNA(-)12例中, 绝大多数(83.3%)仅达G1S0程度, 二组间比较差异有显著性(*P* < 0.01, 表2). HBV DNA(+)组与HBV DNA(-)组比较, CD3⁺细胞较HBV DNA(-)组升高, CD4⁺细胞较HBV DNA(-)组下降, 但差异均无显著性; CD8⁺细胞百分率HBV DNA(+)组显著升高超过了8.03个百分点(*P* = 0.008), CD4⁺/CD8⁺比值显著下降(*P* = 0.001, 表3). HBeAg(+)组与HBeAg(-)组之间, HBeAg(+)组CD4⁺细胞百分率降低超过了4.82个百分点(*P* = 0.039), 而CD3⁺细胞及CD8⁺细胞百分率升高分别超过了7.81, 7.47个百分点(*P* = 0.030及*P* = 0.014), CD4⁺/CD8⁺比值显著下降(*P* = 0.000 1).

病理组织改变为G1S0组CD3⁺细胞显著高于G1S1组(*F* = 2.919, *P* = 0.047), 病理组织改变为G1S1组CD4⁺细胞低于G1S0组, 但差异无显著性, CD8⁺细胞及CD4⁺/CD8⁺比值在各病理组织改变组间差异均无显著性.

3 讨论

长期以来, 人们普遍认为HBV感染的慢性化主要是机体细胞免疫功能低下所致, 但其机制并未完全阐明. 对HBV呈完全免疫耐受则表现为慢性携带者, 对HBV免疫功能低下, 即对HBV抗原有一定识别和清除能力, 从而导致一定的肝细胞损害, 则表现为慢性肝炎^[13]. 研究^[14-27]发现, 慢性乙肝患者及HBV携带者与健康对照比较CD4, CD4/CD8下降, CD8升高. 而CD3的检测结果显示各不相同, 如有研究发现CD3较健康对照降低^[18-20, 24, 28-29]、升高^[20], 或与正常组比较无显著差异^[22, 30-31]. 本研究支持CD3较健康对照降低的结论, 发现HBV携带者较健康对照者CD4显著下降, CD8明显升高, CD4/CD8比值降低, 差异具有显著性. 表明HBV携带者体内细胞免

表 3 28例肝活检HBV携带者T细胞亚群检测结果 (mean ± SD)

分组	<i>n</i>	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
HBV DNA(+)	16	69.1 ± 10.6	35.01 ± 6.8 ^d	37.3 ± 9.2 ^{fd}	0.99 ± 0.26 ^{hd}
HBV DNA(-)	12	66.3 ± 8.3 ^b	38.4 ± 5.0	29.2 ± 2.9 ^d	1.32 ± 0.16 ^d
HBeAg (+)	12	72.4 ± 9.0 ^a	33.7 ± 4.2 ^{ad}	38.1 ± 9.3 ^{ad}	0.94 ± 0.26 ^{gd}
HBeAg (-)	16	64.6 ± 8.9 ^d	38.5 ± 6.7	30.6 ± 5.7 ^d	1.27 ± 0.19 ^d
HBV(-)	40	71.0 ± 3.5	40.3 ± 2.9	20.2 ± 1.9	2.01 ± 0.19
G1S0	15	71.4 ± 10.3	37.7 ± 5.7	34.7 ± 9.4	1.16 ± 0.33
G1S1	11	62.8 ± 7.3	35.2 ± 7.3	32.3 ± 7.3	1.12 ± 0.22
G2S1	2	69.5 ± 0.8	34.8 ± 0.5	35.6 ± 0.9	0.98 ± 0.01
G1S1+G2S1	13	63.9 ± 7.1	35.1 ± 6.7	32.8 ± 6.8	1.10 ± 0.20

^b*P* < 0.01, ^d*P* < 0.001 vs HBV(-); ^f*P* < 0.01, ^h*P* < 0.001 vs HBVDNA(-); ^a*P* < 0.05, ^g*P* < 0.001 vs HBeAg (-); G1S0, G1S1, G2S1及G1S1+G2S1四组间CD3见显著性差异(*F* = 2.919, *P* = 0.047).

免疫功能低下, 这与HBV阳性患者血中CD4⁺细胞易被感染而成为靶细胞有关^[32], 因而也可能是病毒持续存在而导致感染慢性化的原因之一^[33]. HBV DNA(+)组与HBV DNA(-)组比较, CD3⁺细胞无显著性差异, CD4⁺细胞减低、CD8⁺细胞增高, 且CD4⁺/CD8⁺比值下降均具显著性差异($P<0.001$). HBeAg(+)组与HBeAg(-)组比较, CD3⁺细胞无显著性差异, CD4⁺细胞减低、CD8⁺细胞增高, 且CD4⁺/CD8⁺比值下降均具显著性差异($P<0.001$). 提示HBV携带者各T细胞亚群改变不仅与HBV感染有关, 也与HBV DNA复制与否有关, 随着HBV DNA复制增加, 可能进一步导致HBV携带者细胞免疫功能紊乱. Baroja *et al*^[34-35]认为HBV携带者HBV DNA(+)组、HBV DNA(-)组与对照组相比, CD3⁺细胞百分率无统计学差异, HBeAg(+)和HBeAb(+)的HBV携带者与正常对照组相比, CD4⁺下降, CD8⁺增高, CD4⁺/CD8⁺显著减低, 与本文结果相似. 提示HBeAg在导致HBV携带者T细胞亚群改变中起关键作用. 首先, 在HBV感染的垂直传播中可起耐受原作用^[36-37], 在血液中主要使Th1缺失, 特异的Th2可能启动或维持慢性携带状态, 故特异的Th2细胞与Th1相比, 优势诱导免疫耐受性, 这种Th2对Th1细胞的优势性进一步抑制机体的细胞免疫功能, 导致病毒不能被机体清除, 形成出生后的慢性感染^[38]. 在HBeAg转基因小鼠, Th1对HBeAg的应答低于Th2样细胞. 其次, 起诱导原的作用, 诱导Ts细胞增值, 加重免疫抑制^[39-42]. 所以HBV携带者T细胞亚群较健康人发生一系列改变: CD4⁺(主要为Th1细胞)减少, CD8⁺增高, CD4⁺/CD8⁺比值下降(提示免疫功能下降).

HBV利用寄居的肝细胞的生命机构进行复制, 但不太妨碍细胞代谢, 无直接致细胞病变效应, 因而不出现明显的病变^[43]. 肝细胞损伤是免疫应答的结果. HBV携带者肝组织可无改变, 也可出现由轻微病变至肝硬化的系列慢性肝病谱. 肝活体组织检查结果正常者仅约10%, 灶性炎症和非特异性反应性炎症45%, 轻度慢性肝炎约25%, 有明显小叶病变的慢性肝炎和活动性的慢性肝炎各约10%, 其中有个别已是早期肝硬化^[43]. Chon *et al*^[44]对ALT正常、无肝大的110例HBV携带者(ASC)肝组织学研究结果提示, 24.5%(27/110)肝组织学诊断正常, 46.4%(51/110)有慢性肝病[其中LC 3例, 有LC的慢性活动性乙型肝炎(CAH) 4例, CAH 11例, 慢性迁延性肝炎(CPH) 33例], 其余29.1%(32/110)有非特异的组织学异常. 并认为ASC无肝组织病变的报告多来自HBV感染的低发地区. Agalar *et al*^[45]研究认为ALT正常的ASC肝活体组织检查未发现中、重度肝炎. 本研究结果表明, 所有(28例行肝组织病理学检查者)HBV携带者均有不同程度的炎症和纤维化改变, 其中的16例HBV DNA(+)者中68.8%(11/16)病理学诊断达G1S1及其以上程度, 但无重度肝炎和肝硬化改

变者; 而HBV DNA(-)者中绝大多数(83.3%)仅达G1S0程度. 提示HBV携带者的肝组织炎症及纤维化改变程度与HBV复制水平相关. 与HBV DNA(-)组相比, HBV DNA(+)组CD4⁺细胞下降(但差异无显著性), CD8⁺细胞则明显升高, CD4⁺/CD8⁺比值显著下降. 与HBeAg(-)组相比, HBeAg(+)组CD4⁺细胞显著下降, CD8⁺细胞则明显升高, CD4⁺/CD8⁺比值显著下降. 提示HBV携带者的T细胞亚群改变与HBV复制水平相关. 以上结果间接提示HBV携带者的肝组织学改变程度与其T淋巴细胞亚群改变程度相关, 进一步对不同程度肝病理组织改变的HBV携带者T细胞亚群检测结果的分析表明, 肝组织学G1S1组CD3⁺细胞显著低于G1S0组, 差异有显著性; G1S1组CD4⁺细胞低于G1S0组, 但差异无显著性; CD8⁺细胞及CD4⁺/CD8⁺比值在各病理组织改变组间差异无显著性, 但G2S1组与G1S0组相比, 有CD8⁺细胞升高、CD4⁺细胞降低及CD4⁺/CD8⁺比值降低趋势. 提示随肝组织病理改变程度的加重, CD4⁺细胞相应降低, CD8⁺细胞相应增高, CD4⁺/CD8⁺比值下降.

4 参考文献

- 1 Hoofnagle JH, Bisceglie AM. The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med* 1997; 336: 347-356
- 2 Bellentani S, Tiribelli C, Saccoccio G, Sodde M, Fratta N, Martin CD, Cristianini G. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study. *Hepatology*. 1994; 20: 1442-1449
- 3 Alter MJ, Mast EE. The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterol Clin North Am* 1994; 23: 437-455
- 4 Belle SH, Beringer KC, Detre KM. Liver transplantation in the United States: results from the National Pitt-UNOS Liver Transplant Registry. In: Terasaki PI, Cecka JM, eds. *Clinical transplants* 1994. Los Angeles: UCLA Tissue-Typing Laboratory, 1994: 19-35
- 5 Chisari FV, Ferraric C. Hepatitis B virus immunopathology. *Springer semin Immunopathol* 1995; 17: 261-281
- 6 Wild CP, Hall AJ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. *Mutate Res* 2000; 462: 381-393
- 7 Maddrey WC. Hepatitis B: an important public health issue. *J Med Viro* 2000; 61: 362-366
- 8 Lin CL, Liao LY, Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, Kao JH, Chen DS. Hepatitis B genotypes and precore/basal core promoter mutants in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2002; 37: 283-287
- 9 彭文伟. 现代感染性疾病与传染病学. 北京: 科学出版社, 2000: 617
- 10 陈慰峰. 医学免疫学(第3版). 北京: 人民卫生出版社, 2001: 92-97
- 11 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床(第2版). 北京: 人民卫生出版社, 2001: 188-189
- 12 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝脏病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝病杂志* 2000; 8: 324
- 13 王季午主编. 传染病学(第3版). 上海: 上海医科大学出版社, 1998: 251-252
- 14 辛永宁, 孙樱, 张健, 吕维红, 张梅, 初蕾蕾, 李宁, 孙珍娟. 拉米夫定对慢性乙肝患者T细胞亚群影响的研究. *临床肝胆病杂志* 2002; 6: 192-193
- 15 王九平, 连建奇, 王爱莲, 朱勇, 贾战生, 谢玉梅. 慢性乙型肝炎患者T细胞亚群、sIL-2 R, TNF- α , IL-6变化及意义. *第四军医大学学报* 2000; 21: 814-816
- 16 吴文瀚, 陈明, 韩方正, 张言超, 李秀华. LAK细胞治疗慢性活动型乙型肝炎的疗效与机理研究. *徐州医学院学报* 1997; 17: 1-4
- 17 范淳, 刘林. 慢性乙肝患者杀伤性免疫细胞功能的研究. *免疫学杂*

- 志 1996; 12: 43-44
- 18 詹丽萍, 李培成. T细胞亚群和TNF- α 与慢性肝病的关系. 临床肝胆病杂志 1998;14:175-177
- 19 王国华, 张玉, 吴旦. 慢性乙肝患者T细胞亚群与自然杀伤细胞活性的临床观察. 铁道医学 1999; 27: 230-232
- 20 李鸣, 林蔚. 慢性乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞亚群的变化. 现代临床生物医学工程杂志 2002; 8: 36
- 21 蔡莉静, 薛容, 姜长林. 乙型肝炎儿童T细胞亚群的变化. 东南大学学报(医学版) 2003; 22: 49-50
- 22 李乐, 蔡鹏威, 伍严安, 陈旭征. 慢性乙肝病毒携带者的细胞免疫功能变化及其与血清HBV DNA的关系. 福建医药杂志 2003; 25: 18-20
- 23 殷樱, 张盈华, 张利朝. 乙肝病程发展中CD4/CD8、TNF- α 及SiL-2R水平变化及意义. 免疫学杂志 2002; 18: 74
- 24 侯治富, 张伟, 杨绍娟, 王维忠, 莫秀芬, 段翼英. T细胞亚群改变与乙型肝炎病毒携带关系的初探. 吉林医学 1997; 18: 138-139
- 25 何浩明, 冯岚, 尹正康, 苏彩女, 庄惠琴, 南德琦. 乙肝外周血B细胞和T细胞及其亚群的研究. 临床肝胆病杂志 1996; 3: 160-162
- 26 郑茉莉, 李灼亮, 王宝奎, 黄振国, 谢庆. 病毒性肝炎患者外周血T细胞亚群的变化. 上海免疫学杂志 1993; 2: 122-123
- 27 马存根, 刘淑璋, 王力生, 赵富喜, 胡世昭, 丰玲, 王雁春. 乙肝患者T细胞亚群变化与血清HBV DNA关系的观察. 中华微生物和免疫学杂志 1992; 12: 301
- 28 王克霞, 朱玉霞, 许礼发, 杨庆贵. 乙肝病人外周血T细胞亚群和mIL-2R表达水平的研究. 中国基层医药 2002; 9: 589-591
- 29 刘映霞, 胡国龄, 何淑雅, 李红梅. 慢性乙肝患者PBMC中HBV感染及其对T细胞亚群的影响. 中国现代医学杂志 2002; 12: 70-73
- 30 蔡莉静, 薛容, 姜长林. 乙型肝炎儿童T细胞亚群的变化. 东南大学学报(医学版) 2003; 22: 49-50
- 31 崔雯, 董永绥, 方峰, 李革. 病毒性肝炎T细胞亚群和几种细胞因子变化的研究. 中华儿科杂志 1997; 35: 641-644
- 32 Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shaplo M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999; 284: 825-829
- 33 Shen HD, Choo KB, Lee SD. Hepatitis B virus DNA in leukocytes of patients with hepatitis B virus-associated liver diseases. *J Med Virol* 1986; 18: 201-211
- 34 Baroja ML, Sirit FL, Caldera DJ, Toro FI, Zabaleta ME, Colmenares CJ, Blanco NE, Machado IV. Anti-CD3-activated T cells from chronic nonviremic HBV carriers are hyperreactive to monocytic accessory signals. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 69: 180-188
- 35 Chu CM, Liaw YF. Peripheral T-cell subsets in asymptomatic hepatitis B-virus carriers. *Cell Immunol* 1986; 98: 533-537
- 36 Milich DR, Jones JE, Hughes JL, Maruyama T, Price K, Melhado I, Jirik F. Extrathymic expression of the intracellular hepatitis B core antigen results in T cell tolerance in transgenic mice. *J Immunol* 1994; 152: 455-466
- 37 Milich DR, Jones J, Hughes J. Role of T-cell tolerance in the persistence of hepatitis B virus infection. *J Immunotherapy* 1993; 14: 226
- 38 Milich DR. Influence of T-helper cell subsets and crossregulation in hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 1997; 4: 48-59
- 39 朱传武, 罗端德, 曾令兰, 李淑莉, 李伟. 慢性重型乙型肝炎患者T细胞免疫状态与HBV前C区基因变异的关系. 中华传染病杂志 2003;21:137
- 40 王玉梅, 乔光彦, 王兆荃, 冯国和, 黄芬. 慢性乙型肝炎e抗原阳性和阴性患者细胞免疫功能的研究. 胃肠病学和肝病学杂志 1997; 6: 52-56
- 41 高金华, 李丽君. IL-6和T细胞亚群与慢性乙型肝炎的关系. 交通医学 2001;15:387-388
- 42 宣世英, 孙樱, 张健, 李清华, 吕维红, 姜岭梅, 吴树华, 邹波. 慢性乙型肝炎病人外周血单个核细胞HBV感染后对其细胞免疫功能影响的研究. *Chin J Epidemiol* 1997;18:81
- 43 骆抗先主编. 乙型肝炎基础和临床(第2版). 北京: 人民卫生出版社, 2001: 318-319
- 44 Chon CY, Han KH, Lee KS, Moon YM, Kang JK, Park IS, Park C. Peritoneoscopic liver biopsy findings in asymptomatic chronic HBsAg carriers with normal liver function tests and no hepatomegaly. *Yonsei Med J* 1996; 37: 295-301
- 45 Agalar C, Diri C, Usubutun S. The role of HBVDNA and liver histopathology in HBsAg carriers. *Hepato-gastroenterology* 1997; 44: 1196-1199

电编 李琪 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研人员、各大图书馆订阅. 联系地址:100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 联系电话:010-85381901-1020; 传真:010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

乌拉坦和戊巴比妥钠对手术后长期饲养动物的影响

王春晓, 曹荣月, 蔡曼玲, 杜鹏, 刘承初, 刘景晶

王春晓, 刘承初, 上海水产大学食品学院海洋生物制药学科点 上海市 200090

曹荣月, 刘景晶, 中国药科大学生命科学与技术学院微生物药理学实验室 江苏省南京市 210009

蔡曼玲, 云南省药物研究所药理室 云南省昆明市 650111

杜鹏, 湖北大学生命科学学院 湖北省武汉市 430062

王春晓, 女, 1968-03-13生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 2004年中国药科大学博士, 讲师, 主要从事生物制药方面的研究。

国家高技术“863”计划资助项目, No. 2002 AA217031-2

国家自然科学基金委员会资助项目, No. 30270298

上海市重点学科建设资助项目, No. T1102

通讯作者: 刘景晶, 210009, 江苏省南京市童家巷24号, 中国药科大学生命科学与技术学院. liujingj@public1.ptt.js.cn

电话: 025-83271369 传真: 025-83204240

收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-05-21

Comparison between effects of urethane and pentobarbital sodium on animals demanding long-term breeding

Chun-Xiao Wang, Rong-Yue Cao, Man-Ling Cai, Peng Du, Cheng-Chu Liu, Jing-Jing Liu

Chun-Xiao Wang, Cheng-Chu Liu, Branch of Marine Biopharmaceutics, College of Food Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China

Rong-Yue Cao, Jing-Jing Liu, Laboratory of Minigene Pharmacy, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Man-Ling Cai, Department of Pharmacology, Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, Yunnan Province, China

Peng Du, School of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei Province, China

Supported by National High Technology “863” Programs of China, No. 2002 AA217031-2, National Natural Science Foundation of China, No.30270298, and Shanghai Key Disciplines Construction Project, No. T1102

Correspondence to: Jing-Jing Liu, Laboratory of Minigene Pharmacy, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. liujingj@public1.ptt.js.cn

Received: 2005-05-08 Accepted: 2005-05-21

Abstract

AIM: To explore the side effects of urethane and the anesthetic selection for animals which demand long-term breeding.

METHODS: Sprague Dawley rats were anesthetized by urethane ($n = 90$) or pentobarbital sodium ($n = 48$), and the relatively long-term existence and mortality were compared between the two groups. The effects of these two anesthetics on the animal's viscera were observed by naked eyes, and the morphological char-

acteristics of the intestinal villus were observed under electron microscope.

RESULTS: The mortality rate of the rats after urethane administration was extraordinarily high (33.3-40.0%), while the mortality rate of the pentobarbital sodium treated rats was comparatively lower (8.3%). The viscera of these died rats were seriously damaged. In the sham-operation and operation groups, the spleen coefficient was markedly decreased (0.78 ± 0.38 , 0.77 ± 0.21 vs 3.44 ± 1.16 , $P < 0.01$), and the diameters of the caecum and ileum were notably increased (3.20 ± 0.79 , 2.23 ± 0.34 vs 1.26 ± 0.24 , $P < 0.01$; 1.68 ± 0.44 , 1.46 ± 0.36 vs 0.46 ± 0.07 , $P < 0.01$) as compared with those in the normal controls. The denaturalization of the cells was severe. There was obvious edema in the intestinal mucous membrane epithelium of urethane treated rats (19 wk). The overall number of the villi was decreased, and some on the surface were desquamated.

CONCLUSION: Urethane is not suitable in anaesthesia for the animals which demand long-term breeding after operation, while the pentobarbital sodium is a better option.

Key Words: Intestine; Urethane; Pentobarbital sodium; Long-term breeding

Wang CX, Cao RY, Cai ML, Du P, Liu CC, Liu JJ. Comparison between effects of urethane and pentobarbital sodium on animals demanding long-term breeding. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(21):2559-2564

摘要

目的: 探讨麻醉药乌拉坦的副作用及手术造模后需长期饲养的动物麻醉用药的选择。

方法: 将大鼠用乌拉坦($n = 90$)及戊巴比妥钠($n = 48$)分别进行麻醉, 观察较长期的生存及死亡状态, 并对乌拉坦对动物脏器的影响做了肉眼观察, 度量比较, 扫描电子显微镜下观察肠内壁绒毛, 腺体以及微绒毛的形态特征。

结果: 使用乌拉坦的动物死亡率非常高, 达33.3-40.0%, 死亡动物的内脏严重受损。使用戊巴比妥钠的大鼠死

亡率在假手术组为8.3%，在手术组为6.25%。假手术组以及手术组与正常组比较，脾系数极度减小(0.78 ± 0.38 , 0.77 ± 0.21 vs 3.44 ± 1.16 , $P < 0.01$)，盲肠与回肠直径极度增加(3.20 ± 0.79 , 2.23 ± 0.34 vs 1.26 ± 0.24 , $P < 0.01$; 1.68 ± 0.44 , 1.46 ± 0.36 vs 0.46 ± 0.07 , $P < 0.01$)，细胞变性严重。透射电镜下观察到用乌拉坦19 wk的大鼠，小肠黏膜上皮细胞明显水肿，表面有的微绒毛已脱落，整体数量减少。

结论：乌拉坦不适用于对手术后需长期饲养的动物进行麻醉，而戊巴比妥钠可作为术后需长期饲养动物的手术麻醉用药。

关键词：肠；乌拉坦；戊巴比妥钠；长期饲养

王春晓，曹荣月，蔡曼玲，杜鹏，刘承初，刘景晶. 乌拉坦和戊巴比妥钠对手术后长期饲养动物的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2559-2564
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2559.asp>

0 引言

新药进行药理活性研究^[1-2]需要动物造模。手术造模后的动物有的需长期饲养^[3-7]，例如骨质疏松症的模型，按FDA的标准是去除卵巢的雌性大鼠，需要长期饲养^[8-10]。为使大鼠骨质疏松的状态更加完全，充分体现药物的治疗作用，给药安排在去除卵巢后14 wk；而且给药本身即需要16-24 wk，即手术后须动物安全存活8-10 mo，而且此存活期间动物不应产生由麻醉药引起的生理生化异常^[11]。有些麻醉药可引起动物组织、细胞的生理生化变化，在饲养一段时间后才会出现明显的症状，甚至死亡^[12-13]。探讨如何经济实用，又能保证数据可靠地选择麻醉用药，从而避免错误选择麻醉用药而造成结果的不可靠性，可以使药理工作者站在更高的起点上统筹安排实验，得到满意的结果。

1 材料和方法

1.1 材料 SD♀大鼠，体质量180-220 g，购自上海BK实验动物中心。实验前置动物于室内适应环境1 wk，室温21-25℃。乌拉糖(乌拉坦，Urethane)和戊巴比妥钠，均购自中国医药集团上海化学试剂公司，后者为进口分装。上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂生产的JA2003型上皿电子天平，德国LEICA包埋机，法国MICROM半自动转移系统切片机，日本樱花全自动脱水机，樱花全自动染色仪，图象分析系统工作站，美国NIKON五人共览显微镜，NIKON DS-5M-L1一体化数

表1 不同麻醉剂在手术后不同阶段对大鼠死亡率影响的比较

麻醉剂种类	假手术组			卵巢摘除组		
	0-2 wk	2-12 wk	合计	0-2 wk	2-12 wk	合计
乌拉坦	15.0%(3/20)	25.0%(5/20)	40.0%(8/20)	22.2%(20/90)	11.1%(10/90)	33.3%(30/90)
戊巴比妥钠	8.3%(1/12)	0(0/12)	8.3%(1/12)	6.25%(3/48)	0(0/48)	6.25%(3/48)

码相机系统，日本明石制作所生产的ISI-SX-40扫描电子显微镜，日本产日立600型透射电子显微镜。

1.2 方法 SD大鼠110只，饲养1 wk后，随机分20只为假手术组，其余90只在200 g/L乌拉坦ip麻醉(1.0 g/kg)下，腹位固定，行双侧卵巢摘除术，常规无菌手术，术后缝合，肌注青霉素、链霉素抗感染^[14]。另外60只大鼠随机分取12只为假手术组，其余48只均在戊巴比妥钠(33-40 mg/kg)ip麻醉下，腹位固定，行双侧卵巢摘除术^[15-16]。观察外观体态(毛、色、形)；解剖内脏肉眼检视(颜色、外观)——解剖死亡大鼠，观察内脏各器官形态变化；光学显微镜下观察细胞形态——将病变组织放入40 g/L甲醛溶液中，脱水、包埋、常规切片，HE染色，光镜观察；扫描电子显微镜下观察肠内壁绒毛、腺体以及微绒毛的形态特征——将病变组织放入40 g/L戊二醛溶液中固定，PBS清洗，10 g/L锇酸固定，清洗，乙醇梯度脱水，丙酮、醋酸异戊酯置换，液态CO₂临界点干燥，镀金，ISI-SX-40扫描电子显微镜下观察，加速电压20 kV；透射电子显微镜下观察细胞形态以及各种细胞器的形态改变——将病变组织放入40 g/L戊二醛溶液中固定，PBS清洗，10 g/L锇酸固定，清洗，丙酮梯度脱水，半浸透，纯浸透，包埋，聚合，半薄切片定位，超薄切片定位及电子染色，电子显微镜下观察，加速电压75 kV。称取大鼠体质量、脾脏质量以及测量肠直径。算出脾指数及肠膨胀率，将各组的脾指数及肠膨胀率做统计学分析。计算用乌拉坦及戊巴比妥钠麻醉的大鼠在各阶段的死亡率。计算用乌拉坦及戊巴比妥钠麻醉的大鼠各自的腹部膨胀百分率，计算有腹部膨胀现象的大鼠在2-12 wk内的死亡率。

2 结果

2.1 病理改变 手术后各阶段用乌拉坦麻醉的大鼠的死亡率均高于用戊巴比妥钠麻醉的大鼠的相应值。用乌拉坦麻醉的大鼠腹部膨胀百分率显著高于用戊巴比妥钠麻醉的相应值(35.3% vs 0)。而且用乌拉坦麻醉的腹部膨胀大鼠的死亡率极高。用乌拉坦麻醉的手术组90只大鼠1 wk后尚存72只，其中13只在术后1-2 wk出现明显腹部膨胀现象，至2 wk时这13只中已有2只死亡。假手术组20只大鼠在1 wk后尚存者为17只，其中有6只出现腹部膨胀现象，至2 wk时死亡例数并未增加。2 wk后可见病鼠多发生腹部膨胀后继发死亡。在用戊巴比妥钠麻醉的手术组45只大鼠及假手术组11只大鼠中均未出现腹部膨胀现象。另外手术组3只，假手术



图1 腹部膨大大鼠与正常大鼠外观形态以及解剖后肠部位的比较. A: 腹部膨大大鼠; B: 正常大鼠; C: 左侧: 腹部膨大大鼠的肠部位; 右侧: 正常大鼠的肠部位.

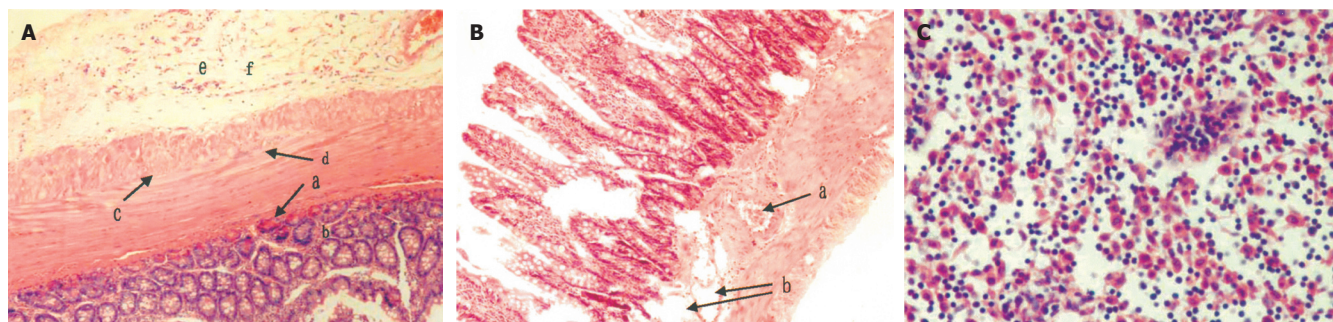


图2 腹部膨大大鼠小肠壁病理切片. A: a 肠黏膜上皮尤其其基底部上皮显著嗜酸性变. b 间质大量炎细胞浸润, 并见少量嗜酸性细胞浸润. c 肌层平滑肌细胞水样变性. d 神经节细胞变性. e 浆膜层水肿. f 少量炎细胞浸润; B: 血管扩张, 充血. a 动脉. b 静脉; C: 系膜淋巴结的窦组织细胞增生.

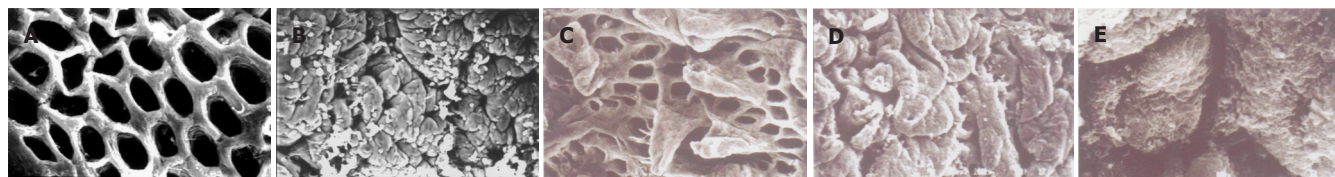


图3 小肠内壁的扫描电镜图. A: 正常大鼠盲肠 ($\times 300$); B: 腹部膨大大鼠盲肠 ($\times 300$); C: 正常大鼠回肠远端 ($\times 200$); D: 腹部膨大大鼠回肠远端 ($\times 200$); E: 微绒毛破损处 ($\times 3\,000$).

组1只在手术后几小时内即因麻醉过量死亡(表1).

将一腹部膨大大鼠(图1A, 照片中所用大鼠为用乌拉坦15 wk后尚存活的腹部膨大大鼠)处死后解剖, 与另一正常大鼠(图1B)的肠部位做一比较, 显示前者的肠(回肠及盲肠)直径是后者的2-4倍(图1C). 光镜照片显示肠黏膜上皮尤其基底部上皮显著嗜酸性变, 间质大量炎细胞浸润, 并见少量嗜酸性细胞浸润. 肌层平滑肌细胞水样变性, 神经节细胞变性, 浆膜层水肿, 血管扩张, 充血, 少量炎细胞浸润. 系膜淋巴结的窦组织

细胞增生(图2 A-C).

2.2 超微结构 扫描电子显微镜下观察回肠远端及盲肠部位(所用大鼠为用乌拉坦19 wk后尚存活的腹部膨大大鼠)见肠壁分泌腺的外周细胞有肿胀增生现象, 而回肠最远端的绒毛则有肿胀及破损现象(图3A-E). 透射电镜下小肠黏膜上皮细胞明显水肿, 有些细胞已崩解, 细胞膜破裂, 部分细胞质成分已流失. 柱状上皮细胞中, 细胞内线粒体肿胀, 内质网扩张, 有的地方显示空泡, 已不呈内质网的特定构型; 表面有的微绒毛已

表2 乌拉坦对脾质量和肠直径的影响

组别	动物数	脾系数 (mg/g)	盲肠		回肠	
			直径 (cm)	膨胀率 (%)	直径 (cm)	膨胀率 (%)
正常组	8	3.44 ± 1.16	1.26 ± 0.24		0.46 ± 0.07	
假手术组	5	0.78 ± 0.38^b	3.20 ± 0.79^b	254	1.68 ± 0.44^b	365
卵巢摘除组	9	0.77 ± 0.21^b	2.23 ± 0.34^b	177	1.46 ± 0.36^b	317

^b $P < 0.01$ vs 正常 [脾系数=脾质量(mg)/体质量(g)], [肠膨胀率=腹部膨大大鼠的肠直径(cm)/正常大鼠的肠直径(cm)].

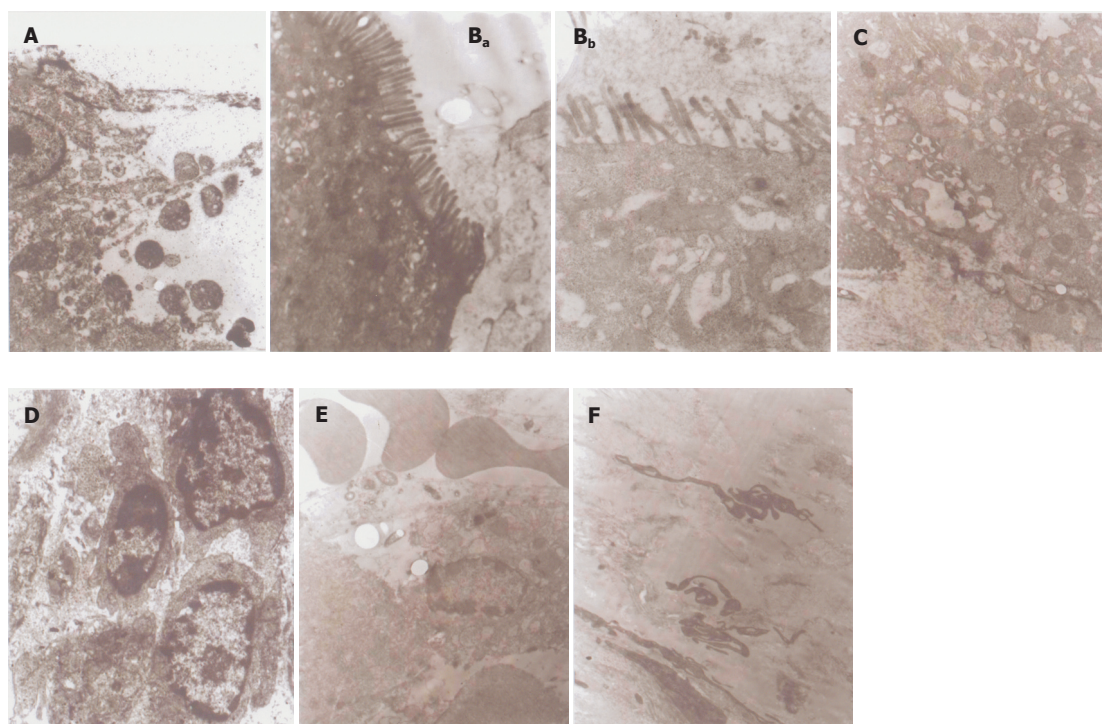


图4 小肠壁的透射电镜图. A: 崩解的小肠黏膜上皮细胞 小肠黏膜上皮细胞明显水肿, 有些细胞已崩解, 细胞膜破裂, 部分细胞质成分已流失. 个别细胞中尚存线粒体的残迹以及无结构的细胞质片段 ($\times 10\ 000$); B: 腹部膨胀大鼠回肠上柱状上皮细胞与正常回肠上的比较; B₁: 正常回肠上的柱状上皮细胞. 细胞表面的微绒毛浓密且排列规则 ($\times 10\ 000$); B₂: 腹部膨胀大鼠回肠上的柱状上皮细胞. 细胞表面的微绒毛数量少, 分布稀疏, 有些微绒毛呈现倒伏, 断裂状态, 胞质中可见内质网扩张 ($\times 15\ 000$); C: 粗面内质网扩张散布着空泡, 内质网已辨别不出 ($\times 8\ 000$); D: 可见间质局部有炎细胞浸润 ($\times 8\ 000$); E: 血管内皮肿胀以及间质中的细胞变性, 变性细胞的类型已辨别不出, 密度染色后染色体边聚于核膜, 呈现凋亡趋势 ($\times 6\ 000$); F: 浆膜层水肿, 水肿区可见少量成纤维细胞及其突起 ($\times 5\ 000$).

脱落, 整体来看数量减少, 分布稀疏, 并有倒伏, 断裂现象. 间质中间有的细胞变性, 并有凋亡趋势; 细胞线粒体肿胀, 空化; 有炎细胞浸润, 可见较多的淋巴细胞; 有出血现象, 血管内皮有肿胀; 细胞有崩解, 有红血球散布到个别细胞中. 浆膜层水肿, 水肿区可见少量成纤维细胞及其突起(图4A-F).

2.3 脾系数及肠膨胀率 采用给予乌拉坦后2-12 wk内自发死亡片刻后的大鼠的或在此期间处于濒死状态而处死的腹部膨胀大鼠的脾系数(表2).

3 讨论

注射过乌拉坦后腹部膨胀大鼠中脾脏严重萎缩说明了其免疫系统被严重破坏^[16], 肌层平滑肌细胞及神经节细胞都有变性现象, 小肠各层的细胞有不同程度的变性、崩解, 各种细胞器也有不同程度的恶性改变. 这与乌拉坦具有细胞毒作用相一致^[18-21]. 乌拉坦的麻醉作用施加于神经节细胞, 估计是乌拉坦麻醉引起巨肠的原因^[22-24]. 乌拉坦的离子通道作用谱与其它麻醉剂是有区别的. 气态的, 可挥发的或可注射的麻醉剂作为一个原发作用(primary action)或者对GABA能神经有兴奋作用, 或者对谷氨酸能神经的神经传递(glutamatergic neurotransmission)有抑制作用; 而乌拉坦对抑制及激动系统都有影响, 在10-300 mmol/L浓度

范围是可逆的, 浓度依赖地显著加强GABA_A受体和甘氨酸受体的电流反应(增加激动剂的表观亲和力), 加强nACh受体的功能, 可逆地非竞争性地抑制NMDA受体及AMPA受体的反应. 而乌拉坦(上至300 mmol/L)自身对任何研究过的受体都不能产生电流. 与那些只对一种系统有选择性的麻醉剂(如氯胺酮与NMDA受体, 异丙酚与GABA_A受体)相比, 乌拉坦引起的变化幅度较小. 乌拉坦的离子通道作用谱较广, 唯一与乌拉坦有类似作用谱的化合物是乙醇^[25]. 推测乌拉坦的副作用与其离子通道作用的广谱性存在一定关联.

乙醚是一种较常用的麻醉剂^[26-27]. 但用乙醚麻醉持续时间短, 需要在手术过程中不断补充给药; 其剂量不易控制, 并需要特殊装置进行监控^[28]及给药. 这使操作者不能全力以赴地进行手术.

水合氯醛也是一种动物实验较常用的麻醉剂. 水合氯醛在通常情况下对血压、心率及呼吸均无影响, 口服对胃有刺激作用, 皮下给药能导致内脏的炎症反应及无力性肠闭塞. 还有味感差、腹上部损害(epigastric distress), 恶心、呕吐、肠胃气胀的副作用及轻微头痛、抑郁、运动失调、噩梦、喉痉挛、悖理的震颤性谵妄等中枢神经系统的危害^[29].

国外学者在做卵巢切除手术时是用氯醛酮/赛拉嗪(Ketamine/Xylazine)组合肌内麻醉^[30], 但提到了需在整

个手术过程随时监控动物的呼吸。氯醛酮通过对在中脑及下丘脑区域中非特异途径的选择性解体(selective disorganization), 产生痛感丧失、健忘症及无意识, 产生中枢交感刺激(central sympathetic stimulation), 伴有体动脉、肺动脉压升高, 心率增加, 心输出量增加。具有催涎及引发痉挛的副作用, 对心律、血压有增效(协同)作用^[29]。

本文采用的另一种麻醉用药戊巴比妥钠起效快, 麻醉持续时间为3-5 h, 给药后对动物循环和呼吸系统无显著抑制。其价格跟乌拉坦相比似乎相对较贵(中国医药集团上海化学试剂公司: 乌来糖58元/500 g, 戊巴比妥钠490元/25 g), 但由于单位体质量用量少(33-40 mg/kg), 不到乌拉坦(1.0 g/kg)用量的1/20, 因此换算下来麻醉100只体质量为250 g的大鼠所需的戊巴比妥钠只需花费人民币约20元[(490元/25 g)×(0.040 g/kg)×(0.25 kg/只)×(100只)=19.6元], 与一只大鼠的价钱大体相当。

综合分析比较乌拉坦及戊巴比妥钠麻醉后各自的动物死亡率, 表明戊巴比妥钠更适宜作为术后需长期饲养的动物的手术麻醉用药, 而且是最经济可靠的选择。

此外, 乌拉坦尚可作为发酵的副产物自然产生。人类对乌拉坦的摄入(无意识地)主要来自发酵食物以及各种酒精饮料。因此, 相信本文结果对过量饮酒之人以及发酵过程的工艺合理改进亦有一定提示作用^[20,31]。

4 参考文献

- 江泽民.《中华人民共和国药品管理法》中华人民共和国主席令第四十五号 2001.2.28
- 郑筱萸.《药品注册管理办法》(局令第17号)国家食品药品监督管理局令 第17号 2005.2.28
- Sun X, Kimura T, Kobayashi T, Noriki S, Imamura Y, Fukuda M, Yamaguchi A. Viability of liver grafts from fasted donor rats: relationship to sinusoidal endothelial cell apoptosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 268-273
- Saudek F, Cihalova E, Karasova L, Kobylka P, Lomsky R. Increased glucagon-stimulated insulin secretion of cryopreserved rat islets transplanted into nude mice. *J Mol Med* 1999; 77: 107-110
- O'Bichere A, Shurey S, Sibbons P, Green C, Phillips RK. Experimental model of anorectal transplantation. *Br J Surg* 2000; 87: 1534-1539
- Gutierrez Gutierrez A, Vargas Aguirre MA, Corona Martha A, Becerra E, Gonzalez Ortega C, Mendoza Hurtado S, Monroy Avendano E, Tovar Caballero G. Gestation in sheep after autotransplantation with cryopreserved ovarian tissue: evidence for oocyte viability after the freezing and transplantation procedures. *Ginecol Obstet Mex* 2003;71:5-11
- Brodner RA, Markowitz RS, Lantner HJ. Feasibility of intracranial surgery in the primate fetus. Model and surgical principles. *J Neurosurg* 1987; 66: 276-282
- Kalu DN. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1984; 115: 507-512
- FitzPatrick DP, McCormack BAO, Dickson GR. Proceedings of the 8th Annual Conference of the Section of Bioengineering of the Royal Academy of Medicine in Ireland and the 16th Meeting of the Northern Ireland Biomedical Engineering Society, Joint Conference, Sligo, 26th & 27th January, 2002. Published by the Department of Mechanical Engineering, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland, Copyright 2002
- Carvalho DCLD, Jr AC. Low intensity ultrasound effects over osteopenic female rats bones. *Acta ortop bras* 2003; 11: 17-24
- Søgaard CH, Mosekilde L, Thomsen JS, Richards A, McOsker JE. A comparison of the effects of two anabolic agents (Fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in an osteopenic rat model. *Bone* 1997; 20: 439-449
- Kaufman MH, Chang HH. Influence of anaesthetic agent on limb abnormalities observed following amniotic sac puncture. *Eur J Morphol* 1998; 36: 217-226
- Brodsky JB. Anesthesia and surgery during early pregnancy and fetal outcome. *Clin Obstet Gynecol* 1983; 26: 449-457
- 程志安, 沈慧勇, 刘翰林, 萧劲夫, 曾志勇, 黄涛. 续断对去势大鼠骨量和血清IGF- I 的影响. *中华现代中西医杂志* 2004; 2: 769-772
- 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学(第3版). 北京: 人民卫生出版社 2001; 1530-1568
- Ima-Nirwana S, Jamaludin M, Khalid BAK, FRACP, Z Merican, and Baharom S. Serum lipids of castrated rats given hormonal replacement and fed diets with added soybean oil or palm oil. *Asia Pacific J Clin Nutr* 1995; 4: 244-248
- Maeda T, Eto M, Nishimura Y, Nomoto K, Kong YY, Nomoto K. Direct evidence for clonal destruction of allo-reactive T cells in the mice treated with cyclophosphamide after allo-priming. *Immunology* 1993; 78: 113-121
- Guidelines for the Use of Anesthesia, Analgesia and Tranquilizers Modified from the CCAC, Guide Vol. 1 (2nd Ed.)1993 Chapter XI - Anesthesia. cited 2005-10-21 Available from <http://www.bgsu.edu/offices/spar/orc/iacuc/Guidelines%20for%20Anes,%20Anal,%20Tran.doc>
- Appendix F. Guidelines for anesthesia and analgesia in laboratory animals. Portions extracted and modified from University of California, Berkeley Animal Care and Use Training Handbook and Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals, Academic Press 1997; cited 2005-10-21; Available from: <http://www.unmc.edu/Education/Animal/guide/appenF1.html>
- Toxicology and carcinogenesis. Studies of urethane, ethanol, and urethane/ethanol (urethane, CAS No. 51-79-6; ethanol, CAS No. 64-17-5) in B6C3F1 mice (drinking water studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 2004; 1-346
- Gorelik E, Herberman RB. Inhibition of the activity of mouse natural killer cells by urethan. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 543-548
- Sternberg SS. 回允中主译. 诊断外科病理学.(第3版)北京: 北京大学医学出版社, 1390-1391
- 王子栋, 徐有恒. 植物性神经系统生理学—基础与临床(第一版)北京: 科学出版社, 1994; 234-257
- 张镜如. 生理学(第4版), 北京: 人民卫生出版社, 1996; 187-188, 210
- Hara K, Harris RA. The anesthetic mechanism of urethane: The Effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesthetic Pharmacology* 2002; 94: 313-318
- 陈小野, 邹世洁, 王震, 吕爱平, 艾景录. 大鼠肾上腺次全切除肾阳虚模型胃、舌病理观察. *中国中医基础医学杂志* 1999; 5:20-22
- Kaech S, Brinkhaus H, Matus A. Volatile anesthetics block actin-based motility in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10433-10437
- Flegal MC, Kuhlman SM. Anesthesia monitoring equipment for laboratory animals. *Lab Anim (NY)* 2004; 33: 31-36
- Meade FTGG. Sedation/analgesia patient monitor course. 2001. cited 2005-10-21 Available from: <http://www.narmc.amedd.army.mil/kacc/Employees/Education/monitor.pdf>
- Verstegen J, Fargetton X, Donnay I, Ectors F. Comparison of the clinical utility of medetomidine/ketamine and xylazine/

ketamine combinations for the ovariectomy of cats. *Vet Rec* 1990; 127: 424-426

31 Beland FA, Benson RW, Mellick PW, Kovatch RM, Roberts DW,

Fang JL, Doerge DR. Effect of ethanol on the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 1-19

电编 李琪 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年第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: 对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.

胃癌组织中法尼基转移酶基因表达与临床病理特点及H-ras突变的关系

顾华丽, 田字彬, 王其新

顾华丽, 王其新, 青岛大学医学院附属医院急诊内科 山东省青岛市 266003

田字彬, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003

顾华丽, 女, 1973-11-13生, 江苏省丹阳县人, 汉族, 2005年青岛大学医学院内科学消化系病硕士, 主治医师。

通讯作者: 顾华丽, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院急诊内科. qdguhuali@163.com

电话: 0532-82911345

收稿日期: 2005-08-03 接受日期: 2005-08-26

Relations of farnesyltransferase beta-subunit mRNA expression with clinicopathological features and H-ras mutation in gastric cancer tissues

Hua-Li Gu, Zi-Bin Tian, Qi-Xin Wang

Hua-Li Gu, Qi-Xin Wang, Department of Emergency for Internal Medicine, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Dr. Hua-Li Gu, Department of Emergency for Internal Medicine, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China. qdguhuali@163.com

Received: 2005-08-03 Accepted: 2005-08-26

Abstract

AIM: To investigate the expression of farnesyltransferase (FTase) beta-subunit mRNA in gastric cancer tissues and its relations with the clinicopathological features and point mutation in codon 12 of H-ras gene.

METHODS: Specimens were collected from 43 cases of gastric cancer and their corresponding normal tissues. The expression of FTase beta-subunit mRNA was investigated by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The point mutation in codon 12 of H-ras gene was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Wilcoxon Signed-Rank Test was used to analyze the difference of the matching data of FTase beta-subunit mRNA expression between gastric cancer and normal tissues. Multiple linear regression analysis was used to explore the relations of FTase activity with the clinicopathological

features and H-ras mutation in gastric cancer.

RESULTS: The mean level of FTase beta-subunit mRNA expression were significantly higher in gastric cancer tissues than that in the corresponding normal ones (0.89 ± 0.48 vs 0.69 ± 0.40 , $Z = 2.469$, $P = 0.014$). Of the 43 cases, the mutation of H-ras 12 codon was found in 1 case of cancer tissue (1/43, 2.3%), and no mutation appeared in the all the normal tissues. The expression of FTase beta-subunit mRNA was not related to the age, tumor location, histological differentiation, lymph node metastasis and H-ras 12 codon mutation. But the female patients with signetring cell carcinoma had higher expression of FTase beta-subunit mRNA.

CONCLUSION: The expression of FTase beta-subunit mRNA is up-regulated in gastric cancer. The point mutation in codon 12 of H-ras gene is not related to the expression of FTase beta-subunit mRNA.

Key Words: Gastric cancer; Farnesyltransferase; H-ras gene; Mutation; Polymerase chain reaction

Gu HL, Tian ZB, Wang QX. Relations of farnesyltransferase beta-subunit mRNA expression with clinicopathological features and H-ras mutation in gastric cancer tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(21):2565-2569

摘要

目的: 检测人胃癌及相应癌旁组织中法尼基转移酶 (FTase) β -亚单位mRNA表达和H-ras基因第12密码子点突变探讨FTase β -亚单位基因在胃癌中的表达与临床病理特点、H-ras基因突变的关系。

方法: 收集胃癌及相应癌旁正常组织标本43例。应用半定量逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)测定FTase β -亚单位mRNA基因表达水平, 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析H-ras基因第12密码子点突变情况。采用秩和检验分析胃癌和癌旁组织的FTase β 亚单位mRNA表达的配对数据的差异; 采用多元逐步回归分析胃癌组织中FTase β 亚单位mRNA表达活性与临床病理特点及H-ras基因突变间的关系。

结果: 胃癌组织中FTase β 亚单位mRNA的平均值明显高于癌旁组织(0.89 ± 0.48 vs 0.69 ± 0.40), 两者相比有显著性差异($Z = 2.469$, $P = 0.014$). 在43例胃癌组织中有1例发现突变(1/43, 2.3%), 癌旁组织中未发现突变. 胃癌组织的FTase β 亚单位mRNA表达活性与年龄、肿瘤部位、组织学分级、有无淋巴结转移及有无H-ras基因突变无关, 在女性, 病理分型为印戒细胞癌的胃癌组织中有较高的FTase β 亚单位mRNA表达活性.

结论: FTase β 亚单位mRNA在胃癌组织中表达升高. 胃癌组织中H-ras基因第12密码子点突变率低, 在胃癌的发生中不起主要作用, 并且与FTase β 亚单位mRNA的表达无相关.

关键词: 胃癌; 法尼基转移酶; H-ras基因; 突变; 聚合酶链反应

顾华丽, 田宇彬, 王其新. 胃癌组织中法尼基转移酶基因表达与临床病理特点及H-ras突变的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2565-2569
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2565.asp>

0 引言

法尼基转移酶(Farnesyltransferase, FTase)是一种细胞溶质中的酶, 广泛存在于哺乳动物细胞、酵母及卵蛙细胞中, 催化一些细胞多肽翻译后修饰的第一步(法尼基化), 底物包括: Ras蛋白, 核纤层蛋白A, B(lamin A, lamin B), 视紫红质激酶(rhodopsin kinase), 磷酸化酶激酶, cGMP磷酸二酯酶的 α 亚单位和转导素(transducin)的 γ 亚单位等^[1]. FTase是由 α 和 β 亚单位组成的异二聚体, α 亚单位识别法尼基焦磷酸(FPP), β 亚单位结合至Ras蛋白^[2]. 研究表明, 约30%的人类肿瘤有ras基因突变, 并有Ras蛋白高表达^[3], 突变的Ras蛋白可刺激细胞增殖和抑制凋亡, 从而促使肿瘤发生、发展. Ras蛋白的生物活性与法尼基化修饰有密切关系. 因此, FTase已成为抗癌治疗的一个重要靶标和研究热点. FTase抑制剂正在肺癌、头颈部癌、结肠癌和胰腺癌等实体瘤中进行I, II和III期临床试验^[4-10]. 近期的研究表明, FTase在多种肿瘤组织中活性增强, 提示FTase可能是肿瘤发生的标志物, 有望成为肿瘤诊断的一项指标^[11-13]. 我们检测人胃癌和癌旁组织中FTase β -亚单位mRNA表达水平和H-ras基因第12密码子点突变情况, 探讨法FTase β -亚单位基因在胃癌中的表达及其与临床病理特点、H-ras基因突变的关系, 了解其在胃癌诊断、判断预后的价值, 为FTase抑制剂治疗胃癌提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌和癌旁组织标本43例来源于2000-06/2001-06青岛大学医学院附属医院行胃大部切除并经病理证实的胃癌患者. 均于术中取新鲜胃癌组织和相

应癌旁组织(距离癌组织5 cm以上), 放入经DEPC(焦碳酸二乙酯)水处理且高压灭菌的15 mL离心管中, -70℃冻存储用. 男35例, 女8例, 年龄31-81(56.9 ± 14.0)岁. 病变部位: 胃窦部23例, 胃底/体部17例, 贲门部3例. 腺癌41例, 印戒细胞癌2例. 高分化1例, 中分化9例, 低分化33例. 临床分期均为进展期. 淋巴结转移32例, 无淋巴结转移11例. UICC I期11例, II期28例, III期14例. PCR扩增仪480型(美国PE公司); 恒压恒流电泳仪、微型水平电泳槽(Bio-Rad公司); 高速低温台式离心机3K30型(德国Hereaus公司); 紫外投射仪(美国PE公司); 影像分析系统(北京亚力恩明胶分析系统2000); Reverse Transcription System(美国Promega公司); TRIzol D-Hanks液(美国GIBCO公司); 蛋白酶K(德国Merck公司); PCR引物及反应体系, 饱和酚, 氯仿, 异戊醇, Tris, EDTA, 硼酸和琼脂糖等(上海生工生物技术服务有限公司).

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR法检测FTase β 亚单位mRNA的表达 TRIzol试剂提取组织总RNA, 每例取总RNA 2 μ L用AMV反转录酶进行反转录, 反转录所得cDNA用作PCR反应的模板, 扩增FTase β 亚单位基因和内参照基因GADPH基因. FTase β 亚单位 mRNA基因引物参考文献[11]设计, 引物序列(316 bp): 5' -ATCCAGGCCACTACATACTTT-3' (正义), 5' -GGCTGATAGATTTTTGGTTTG-3' (反义); 内参照基因GADPH基因引物序列(450 bp): 5' -CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA-3' (正义), 5' -ATGATCTTGAGGCTGTTGTCATA-3' (反义). 94℃预变性5 min, 然后94℃ 40 s, 56℃ 40 s, 72℃ 1 min扩增35个循环, 最后72℃延伸10 min. 扩增产物5 μ L于含溴化乙锭(0.5 mg/L)的15 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 紫外投射仪下观察结果并拍照, 以影像分析系统测定的表达比例(FTase β 亚单位/GADPH)进行半定量分析. 大于或等于正常平均值+2 SD者确定为过度表达.

1.2.2 H-ras基因聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析 依据制造商说明提取胃癌及癌旁组织的DNA, 每例取DNA模板1 μ L进行PCR扩增H-ras基因第12密码子, 引物参考文献[14]设计, 引物序列(170 bp): 5' -CAGGGCCCTCCTTGGCAGG-3' (正义), 5' -GTCGTATTTCGTCCACAAAATGG-3' (反义). 94℃预变性5 min, 然后94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s扩增35个循环, 最后72℃延伸5 min. 取PCR扩增产物5 μ L于含溴化乙锭(0.5 mg/L)的15 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 与PCR Marker对照, 紫外投射仪下出现170 bp条带表明扩增成功. 扩增产物用限制性内切酶Hpa II酶切, 酶切产物于80 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对照PCR Marker判断扩增产物是否被切开, 野生型可

观察到66+56+48 bp三条电泳带, 突变型只能观察到122+48 bp两条电泳带。

统计学处理 应用SPSS10.0软件进行统计学分析. 采用Wilcoxon 秩和检验分析胃癌和癌旁组织的FTase β 亚单位mRNA表达的配对数据的差异, $P < 0.05$ 为有显著性. 采用多元逐步回归分析胃癌组织的FTase β 亚单位mRNA 表达活性与临床病理特点各参数、H-ras基因第12密码子点突变间的关系, 前者为应变量, 后者为自变量, $P < 0.05$ 为有相关关系。

2 结果

2.1 FTase β 亚单位mRNA的表达 胃癌组织43例中FTase β 亚单位mRNA测定的平均数为 0.89 ± 0.48 , 四分位数间距为0.66-0.96; 癌旁组织中的平均数为 0.69 ± 0.40 , 四分位数间距为0.56-0.89, 两者相比有显著性差异($Z = 2.469$, $P = 0.014$, 图1). 胃癌组织中有3例过度表达, 癌旁组织中有1例过度表达, 两组过度表达比较无显著性差异($P = 0.0698$).

2.2 H-ras基因突变 43对标本H-ras基因第12密码子PCR扩增均成功, 43例胃癌组织中有1例发现突变(1/43, 2.3%), 癌旁组织中未发现突变(图2, 3). 胃癌组织FTase β 亚单位mRNA表达活性增高与性别、病理分型有关, 与年龄、肿瘤部位、组织学分级及有无H-ras

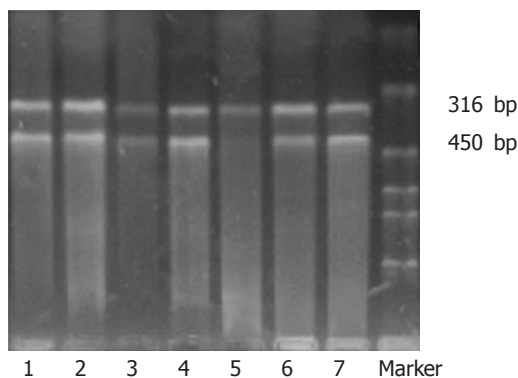


图1 FTase β 亚单位mRNA电泳图. 316 bp: FTase β 亚单位mRNA; 450 bp: GAPDH mRNA; 1-7: 胃癌组织标本。

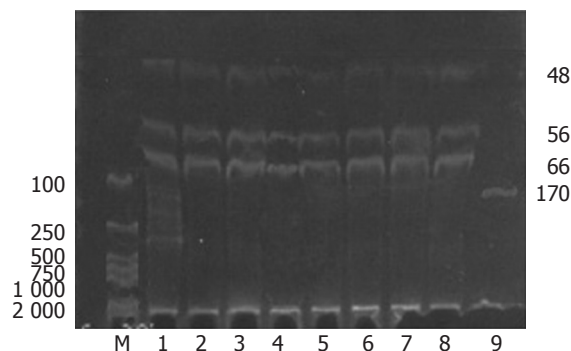


图2 H-ras基因第12密码子酶切产物电泳图. M: Marker; 1-8: 胃癌和癌旁组织标本, 均为野生型; 9: PCR产物。

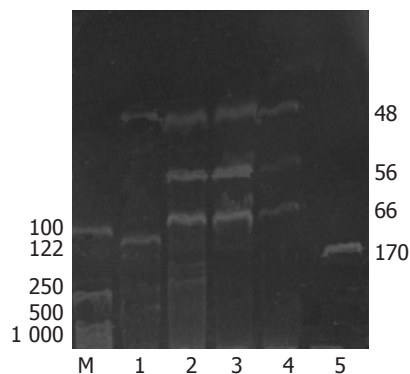


图3 H-ras基因第12密码子酶切产物电泳图. 1: 1例胃癌组织标本, 突变型; 2-4: 部分胃癌组织标本, 均为野生型; 5: PCR产物; M: Marker

表1 胃癌FTase β 亚单位mRNA表达与临床病理特点的多元逐步回归分析

临床病理	<i>n</i>	FTase β 亚单位mRNA	<i>t</i>	<i>P</i>
< 50岁	14	0.94 ± 0.39	0.356	0.754
≥ 50 岁	29	0.82 ± 0.38		
男	35	0.81 ± 0.28	2.566	0.014
女	8	1.26 ± 0.91		
高中分化	10	1.0 ± 0.41	0.797	0.430
低分化	33	0.86 ± 0.51		
胃窦癌	23	0.96 ± 0.62	0.531	0.592
胃底/体癌	17	0.82 ± 0.28		
贲门癌	3	0.75 ± 0.10		
淋巴结转移 -	11	0.92 ± 0.49	0.259	0.797
+	32	0.88 ± 0.49		
UICC I 期	11	0.95 ± 0.50	0.284	0.755
II 期	28	0.92 ± 0.63		
III 期	14	0.81 ± 0.18		

组间比较 F 值。

基因突变无关, 发生在女性、病理分型为印戒细胞癌的胃癌组织有显著升高的FTase β 亚单位mRNA表达(表1)。

3 讨论

FTase属于蛋白异戊二烯转移酶超家族, 是细胞增殖所必需和潜在的生长调控者^[12]. 目前FTase已成为抗癌治疗的一个重要靶标和研究热点. 因此FTase已成为抗癌治疗的一个重要靶标和研究热点. FTase抑制剂在肺癌、头颈部癌、结肠癌和胰腺癌等实体癌中正在进行I, II和III期临床试验^[4-10]. Khan *et al*^[11]观察到与正常组织比较, 人皮肤基底细胞癌中法尼基转移酶mRNA表达增加; Nagase *et al*^[12]发现人卵巢癌中FTase β 亚单位mRNA表达过度, 并与K-ras突变有关; Caruso *et al*^[13]发现人结肠癌中FTase活性高于正常黏膜, 且与K-ras突变有关, 其 β 亚单位蛋白水平也较正常组织明显增高, 但 β 亚单位mRNA水平无差异. 以上研究表明, FTase在多种肿瘤组织中活性增强, 提示FTase活性可能是肿瘤发生的标志物, 有望成为肿瘤诊断的一项指标. 我们的

结果显示,胃癌组织中FTase β 亚单位mRNA的表达明显高于癌旁组织,两者相比有显著性差异($Z = 2.469$, $P = 0.014$). FTase活性可能是胃癌发生的标志物.

研究表明,约30%的人类肿瘤有ras基因突变,并有Ras蛋白高表达,突变的Ras蛋白可刺激细胞增殖和抑制凋亡,从而促使肿瘤发生、发展. 因此Ras蛋白可作为抗肿瘤治疗的靶点. 业已证明,ras基因群第12, 13, 61位密码子点突变可使其获得转化细胞的能力,ras基因单点突变足以引发恶性转化. ras基因突变率在不同人类肿瘤有明显不同,国外文献报道,最高为胰外分泌腺癌,达90%,结肠癌为40-50%,肺癌和膀胱癌为40%^[3,15],而胃癌较低,在10%以下. 但后者各家报道并不一致,日本学者报告胃癌主要是K-ras基因点突变, Kihana *et al*^[16]发现43%的胃腺瘤、95%的胃腺癌有K-ras基因点突变,无H-ras突变;南朝鲜人群中亦无H-ras突变;对欧洲胃癌高发区人群研究未发现ras突变^[17, 18], Deng *et al*^[19]报道我国胃癌主要为H-ras基因点突变,达41%. 此后国内多家学者报道胃癌中H-ras基因点突变率为13.6-33.3%, K-ras基因点突变率为0-4.8%,与邓国仁的结果相似,并推测H-ras基因第12密码子点突变是中国人胃癌的特点之一^[20, 21]. 我们对标本H-ras基因第12密码子PCR扩增均成功,43例胃癌组织中有1例发现突变(1/43, 2.3%),癌旁组织中未发现突变. 此结果与国内相关报道并不一致,原因可能为胃癌的发生,发展受诸如饮食、地理环境、种族差异等多因素的影响,文献报道也证实某些胃癌相关基因(如ras)在不同地域、种族的表达确有差异,所以虽同为中国人,因所处地域不同,饮食习惯差异,因而H-ras基因的第12位密码子点突变率可以有很大差异.

我们的结果显示,胃癌组织的FTase β 亚单位mRNA表达活性在女性、病理分型为印戒细胞癌的胃癌组织有显著升高,与年龄、肿瘤部位、组织学分级、有无淋巴结转移及有无H-ras基因突变无关. 由于女性标本、印戒细胞癌的例数较少,目前尚难定论女性或印戒细胞癌的胃癌病人FTase表达增高. 理论上,FTase是Ras蛋白在合成后加工修饰的关键酶,通过它的作用Ras蛋白才可定位于细胞膜内侧,才可发挥其在调控细胞的增殖、分裂与分化的作用,FTase活性的增高可能是源于ras基因的突变、Ras蛋白的高表达,这一理论假说在近期的研究^[12, 13]中得到了证实. 本实验中FTase β 亚单位mRNA的表达增高与H-ras基因的第12位密码子点突变无相关,此结果的出现可能有以下原因:(1)哺乳动物的ras基因家族有3个成员,分别是H-ras, K-ras, N-ras, 基因突变的最常见的方式就是点突变,多发生在N端第12, 13和61密码子,其中又以第12密码子突变最常见. 我们只检测了H-ras的第12位密码子点突变情况,可能存在此基因其它位点或其他两型基因

的不同位点的突变,而导致Ras蛋白的高表达,从而引起FTase β 亚单位mRNA的表达增高;(2)Ras蛋白只是FTase催化底物之一,是否存在其他生物学因子调节胃癌组织中FTase表达还有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 Clarke S. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 355-386
- 2 Reiss Y, Seabra MC, Armstrong SA, Slaughter CA, Goldstein JL, Brown MS. Nonidentical subunits of p21H-ras farnesyltransferase. Peptide binding and farnesyl pyrophosphate carrier functions. *J Biol Chem* 1991; 266: 10672-10677
- 3 Lebowitz PF, Prendergast GC. Non-Ras targets of farnesyltransferase inhibitors: focus on Rho. *Oncogene* 1998; 17: 1439-1445
- 4 Vogt A, Qian Y, Blaskovich MA, Fossum RD, Hamilton AD, Sefti SM. A non-peptide mimetic of Ras-CAAX: selective inhibition of farnesyltransferase and Ras processing. *J Biol Chem* 1995; 270: 660-664
- 5 Wright J, Blatner GL, Cheson BD. Clinical trials referral resource. Clinical trials with the farnesyl transferase inhibitor R115777. *Oncology (Williston Park)* 1999; 13: 1527, 1530, 1533
- 6 Adjei AA, Erlichman C, Davis JN, Cutler DL, Sloan JA, Marks RS, Hanson LJ, Svingen PA, Atherton P, Bishop WR, Kirschmeier P, Kaufmann SH. A Phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor SCH66336: evidence for biological and clinical activity. *Cancer Res* 2000; 60: 1871-1877
- 7 Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, Schoffski P, Post S, Verslype C, Neumann H, Safran H, Humblet Y, Perez Ruixo J, Ma Y, Von Hoff D. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1430-1438
- 8 Izbicka E, Campos D, Carrizales G, Patnaik A. Biomarkers of anticancer activity of R115777 (Tipifarnib, Zarnestra) in human breast cancer models *in vitro*. *Anticancer Res* 2005; 25: 3215-3223
- 9 Morrow PK, Kim ES. New biological agents in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Semin Respir Crit Care Med* 2005; 26: 323-332
- 10 Kim ES, Kies MS, Fossella FV, Glisson BS, Zaknoen S, Statkevich P, Munden RF, Summey C, Pisters KM, Papadimitrakopoulou V, Tighiouart M, Rogatko A, Khuri FR. Phase II study of the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib with paclitaxel in patients with taxane-refractory/resistant nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2005; 104: 561-569
- 11 Khan SG, Dummer R, Siddiqui J, Bickers DR, Agarwal R, Mukhtar H. Farnesyltransferase activity and mRNA expression in human skin basal cell carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 795-801
- 12 Nagase T, Kawata S, Nakajima H, Tamura S, Yamasaki E, Fukui K, Yamamoto K, Miyagawa J, Matsumura I, Matsuda Y, Matsuzawa Y. Effect of farnesyltransferase overexpression on cell growth and transformation. *Int J Cancer* 1999; 80: 126-133
- 13 Caruso MG, Notarnicola M, Bifulco M, Laezza C, Guerra V, Altomare DF, Memeo V, Lorusso D, Demma I, Di Leo A. Increased farnesyltransferase activity in human colorectal cancer: relationship with clinicopathological features and K-ras mutation. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 80-85
- 14 罗元辉, 房殿春, 鲁荣, 门荣甫, 晋华源. 采用PCR-RFLP技术分析石蜡包埋胃癌组织ras和p53基因点突变. 肿瘤防治研究 1995; 22: 68-70
- 15 Grunewald K, Lyons J, Frohlich A, Feichtinger H, Weger RA, Schwab G, Janssen JW, Bartram CR. High frequency of K-ras codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1989; 43: 1037-1041
- 16 Kihana T, Tsuda H, Hirota T, Shimosato Y, Sakamoto H, Terada M, Hirohashi S. Point mutation of c-Ki-ras oncogene in gastric adenoma and adenocarcinoma with tubular differentiation. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 308-314

- 17 Koshiba M, Ogawa O, Habuchi T, Hamazaki S, Shimada T, Takahashi R, Sugiyama T. Infrequent ras mutation in human stomach cancers. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 163-167
- 18 Victor T, Du Toit R, Jordaan AM, Bester AJ, van Helden PD. No evidence for point mutations in codons 12, 13, and 61 of the ras gene in a high-incidence area for esophageal and gastric cancers. *Cancer Res* 1990; 50: 4911-4914
- 19 Deng GR, Liu XH, Wang JR. Correlation of mutations of oncogene C-Ha-ras at codon 12 with metastasis and survival of gastric cancer patients. *Oncogene Res* 1991; 6: 33-38
- 20 杨定成, 徐文怀, 李通, 黎家庆, 吕有勇. 胃癌c-Ha-ras基因突变分析方法的建立及临床应用研究. *肿瘤防治研究* 1995; 22: 5-8
- 21 郝莹, 张锦坤, 吕有勇, 易粹琼. 应用多种方法检测胃癌演变过程中ras基因的突变. *中华内科杂志* 1997; 36: 595-598

电编 李琪 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 •

中国生物医学基金论文摘要注册方法

0 引言

中国生物医学基金论文摘要库(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)收录了1994-2005年国内发表在1204种生物医学类期刊总计20万以上的论文摘要. 这些论文受国家、军队和省部级自然科学基金、杰出青年基金、重大项目基金资助, 内容丰富、数据准确, 核心的体现了我国生物医学的发展历程、脉络和方向, 可为相关领域广大学者和研究人员了解并掌握当前研究动态、开辟新的研究领域提供了思路. 本摘要库为世界胃肠病学杂志社所有, 从2006年起, 对其使用方法作如下调整:

1 开放政策

中国生物医学基金论文摘要的使用实行会员制, 凡注册者均可使用. 个人注册: 150元/年, 300元/3年. 机构注册: 1000元/年, 2500元/3年. 《世界华人消化杂志》和《世界胃肠病学杂志》(英文版)编委, 以及给以上两种杂志投稿者(包括已发表), 可免费注册使用3年, 医药类大学在校学生(学士、硕士、博士), 凭学生证和身份证也可免费注册使用3年. 订购《世界华人消化杂志》或《世界胃肠病学杂志》(英文版)者, 凭订购单可免费注册使用1年.

2 注册方法

分三种: (1) 免费注册须填写免费会员注册表(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/39.doc>), 附本人学生证和身份证. (2) 个人注册须填写个人会员注册表(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/40.doc>), 附本人身份证; (3) 机构注册须填写机构会员注册表(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/41.doc>). 以上材料通过邮局寄送至: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 另外, 注册表还需要通过E-mail发送至: cmfa@wjgnet.com.

3 用户设置

用户名和密码均由注册用户自己提供, 用户名必须为使用者的E-mail地址.

4 注册对象

中国生物医学基金论文摘要库的注册对象包括: 各大医药类高校、图书馆、研究所以及医疗机构, 从事医药领域基础及临床研究的学生、医生以及科研人员.

总之, 《世界华人消化杂志》将始终贯彻质量第一的方针, 满足广大作者和读者的需求. 在此, 我们热烈欢迎再次投稿.

奥曲肽治疗肝硬化门静脉高压食管胃底静脉曲张急性出血的多中心对照研究

朱长清, 董胜翔, 茅益民, 曾民德, 蒋义斌, 许建明, 田德安, 刘吉勇, 徐三平, 孙 樱, 罗和生, 王炳元

朱长清, 董胜翔, 上海第二医科大学附属仁济医院急诊科 上海市 200127
茅益民, 曾民德, 上海第二医科大学附属仁济医院消化内科 上海市 200127
蒋义斌, 复旦大学附属华山医院消化内科 上海市 200040
许建明, 安徽医科大学第一附属医院消化内科 安徽省合肥市 230022
田德安, 徐三平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院 湖北省武汉市 430030
刘吉勇, 山东省立医院 山东省济南市 250021
孙 樱, 青岛市立医院 山东省青岛市 266011
罗和生, 武汉大学人民医院 湖北省武汉市 430060
王炳元, 中国医科大学附属第一医院 辽宁省沈阳市 110001
朱长清, 1965-12-24生, 江苏省江都市人, 医学硕士, 副教授, 副主任医师, 主要从事内科危重病的诊治研究。
通讯作者: 朱长清, 200127, 上海市, 上海第二医科大学附属仁济医院急诊科。zcqd@public8.sta.net.cn
电话: 021-58752345
收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-06

A multicentred clinical comparative study on curative effect and safety of acetic octreotide in treatment of esophageal varices bleeding

Chang-Qing Zhu, Sheng-Xiang Dong, Yi-Min Mao, Min-De Zeng, Yi-Bin Jiang, Jian-Ming Xu, De-An Tian, Ji-Yong Liu, San-Ping Xu, Ying Sun, He-Sheng Luo, Bing-Yuan Wang

Chang-Qing Zhu, Sheng-Xiang Dong, Department of Emergency, the Affiliated Renji Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai 200127, China
Yi-Min Mao, Min-De Zeng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Renji Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai 200127, China
Yi-Bin Jiang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200127, China
Jian-Ming Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China
De-An Tian, San-Ping Xu, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Ji-Yong Liu, Shandong Provincial Hospital, Ji'nan 250021, Shandong Province, China
Ying Sun, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, China
He-Sheng Luo, Wuhan People's Hospital, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Bing-Yuan Wang, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Chang-Qing Zhu, Department of Emergency, the Affiliated Renji Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai 200127, China. zcqd@public8.sta.net.cn
Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-06

Abstract

AIM: To evaluate curative effect and safety of acetic octreotide in the treatment of esophageal varices bleeding

(EVB) in comparison with octreotide (Sandostatin).

METHODS: EVB patients were randomly and double-blinded assigned into acetic octreotide group ($n = 70$) and Sandostatin group ($n = 66$). Both kinds of drugs were dissolved in normal saline and then given to the patients at the rate of $50 \mu\text{g/h}$ for 48 h. The amount of bleeding and vital signs of all the patients were observed and comparatively analyzed.

RESULTS: The frequencies and amount of hematemesis, the excreted frequencies and amount of black feces were significantly different before and after treatment with both kinds of drugs ($P < 0.05$), but there was no marked difference between the two groups ($P > 0.05$). The vital signs such as heart rate, systolic and diastolic blood pressure as well as symptoms of nausea, swirling, heart-throb, sweatiness, and thirst were notably improved after treatment ($P < 0.05$), but there was still no obvious difference between the two groups ($P > 0.05$). Adverse drug reaction was not significantly different between the two groups (1.43% vs 1.52%, $P > 0.05$). The total effective rates in acetic octreotide and Sandostatin group were 97.14% and 92.42%, respectively ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Acetic octreotide is safe and effective in the treatment of EVB, and its effect is not significantly different from Sandostatin's.

Key Words: Acetic octreotide; Sandostatin; Esophageal varices bleeding; Curative effect; Safety

Zhu CQ, Dong SX, Mao YM, Zeng MD, Jiang YB, Xu JM, Tian DA, Liu JY, Xu SP, Sun Y, Luo HS, Wang BY. A multicentred clinical comparative study on curative effect and safety of acetic octreotide in treatment of esophageal varices bleeding. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(21):2570-2573

摘要

目的: 与善宁对照, 评价国产醋酸奥曲肽注射液治疗肝硬化门静脉高压食管胃底静脉曲张急性出血的疗效和安全性。

方法: 采用随机、双盲、多中心、阳性药物平行对照的方法治疗肝硬化食管胃底静脉曲张急性出血。在基

础治疗(禁食、输液、输血、对症处理)的基础上, 试验组70例将试验药醋酸奥曲肽注射液溶于生理盐水中, 以50 $\mu\text{g/h}$ 的速度连续滴注48 h. 对照组66例同样用善宁治疗并评估和比较其疗效及安全性.

结果: 治疗第1, 2天和停药后24 h, 两组呕血次数和呕血量、黑便次数和黑便量也均显著减少, 组内比较均有显著的统计学差异($P<0.05$), 而组间比较无统计学差异($P>0.05$). 两组治疗后生命体征如心率、收缩压、舒张压以及患者的恶心、头晕、心悸、出汗、口渴症状均明显改善($P<0.05$), 但是组间相比没有显著性差异($P>0.05$). 两组患者治疗后的不良反应分别为1.43%和1.52%, 也无显著性差异($P>0.05$). 治疗后试验组总有效率为97.1%, 与对照组的92.4%相似($P=0.222\ 3$).

结论: 奥曲肽治疗肝硬化门静脉高压食管胃底静脉曲张出血的疗效和安全性与善宁相当.

关键词: 醋酸奥曲肽; 善宁; 硬化食管胃底静脉曲张急性出血; 疗效; 安全性

朱长清, 董胜翔, 茅益民, 曾民德, 蒋义斌, 许建明, 田德安, 刘吉勇, 徐三平, 孙樱, 罗和生, 王炳元. 奥曲肽治疗肝硬化门静脉高压食管胃底静脉曲张急性出血的多中心对照研究. 世界华人消化杂志. 2005;13(21):2570-2573
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2570.asp>

0 引言

奥曲肽是一种人工合成的生长抑素的八肽衍生物, 临床已广泛用于治疗食管胃底静脉曲张出血. 我们按GCP的要求, 采用随机、双盲、多中心、阳性药物平行对照的试验设计, 对北京泰德制药有限公司制备的醋酸奥曲肽注射液治疗肝硬化食管胃底静脉曲张急性出血疗效进行研究如下.

1 材料和方法

1.1 材料 病例的入选标准: (1)有肝硬化门静脉高压病史, 入选前24 h内有呕血或黑便的上消化道出血的临床表现, 并经胃镜证实为食管胃底静脉曲张出血; (2)近2 wk内未使用过降门脉压药物及其他影响本品疗效观察的药物(如垂体后叶素、硝酸甘油类、 β 受体阻滞剂、钙通道阻滞剂等); (3)年龄18-65岁, 男女均可. 病例的排除标准: (1)其他原因引起的上消化道出血(包括非肝硬化门静脉高压所致的食管胃底静脉曲张出血); (2)肝功能衰竭、肝昏迷者; (3)1 mo内接受硬化剂、套扎或三腔管压迫止血治疗者; (4)有严重心、肺、肾功能不全者. 实验药由北京泰德制药有限公司制备的醋酸奥曲肽注射液(100 μg /支), 对照药由瑞士诺华制药有限公司生产的善宁注射液(100 μg /支).

1.2 方法 在基础治疗(禁食、输液、输血、对症处理)的基础上, 试验组采用醋酸奥曲肽注射液溶于生理盐

水中, 以50 $\mu\text{g/h}$ 的速度连续滴注48 h. 对照组采用善宁治疗, 给药方法及剂量与试验组一致. 治疗中患者应严格禁食, 但可予以输液和输血, 以维持血容量稳定和对症处理, 禁止合并使用其他降门脉压力药物. 分别于给药前、给药后1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 停药后24 h测定心率和血压; 记录呕血量/次数/颜色、黑便量/次数/颜色或再次出血情况, 记录恶心、头昏、心悸、出汗、口渴、晕厥等出血相关症状, 记录输液、输血、血浆代用品数量; 治疗前后分别行血、尿、便常规检查、大便隐血试验、呕吐物隐血试验; 治疗前后测肝功能(ALT, AST, ALP, 总胆红素, 总蛋白, 白蛋白, PT)、肾功能(BUN, Cr)及血糖; 治疗前24 h内胃镜检查. 停药后24 h判断疗效. 显效: 用药后呕血停止24 h及以上直至疗效判断时点; 生命体征平稳; 有效: 用药后至疗效判断时点, 呕血次数或呕血量呈逐天减少50%及以上; 黑便次数或黑便量呈逐天减少50%及以上; 生命体征平稳; 无效: 未达上述标准者.

统计学处理 应用SAS 8.0统计分析软件, 计量资料采用 t 检验或Wilcoxon秩和检验; 定资料采用 χ^2 检验或精确概率检验; 有效性分析采用Cochran-Mantel-Haenszel法中Row Mean Scores Differ统计量进行; 安全性分析采用 χ^2 检验或精确概率检验进行. 不良反应发生率 = 至少发生一个不良反应的例数/评价安全性人数 $\times 100\%$.

2 结果

符合入选标准进入本研究136例, 其中试验组70例, 对照组66例. 研究中共有4例(2.94%)脱落, 其中试验组3例, 对照组1例; 被剔除5例(3.68%), 试验组2例, 对照组3例. 两组治疗前年龄、身高、体重、心率、相关生命体征、肝硬化门脉高压病程、发病时间、胃底静脉曲张程度、既往食管胃底静脉曲张出血史及治疗史、治疗前呕血次数、呕血量、治疗前黑便次数、黑便量等方面均无显著差异($P>0.05$), 具有可比性.

2.1 治疗前后呕血或黑便的变化 治疗第1, 2天和停药后24 h, 两组呕血次数和呕血量、黑便次数和黑便量也均显著减少, 组内比较均有显著的统计学差异($P<0.05$), 而组间比较无统计学差异($P>0.05$, 表1). 根据疗效判断标准, 治疗后试验组达显效和有效的病例数分别为65例和3例, 对照组达显效和有效的病例数分别为59例和2例, 两组疗效比较无显著差异($P=0.472\ 7$); 试验组和对照组的总有效率分别为97.1%和92.4%, 两组比较无显著差异($P=0.222\ 3$).

2.2 生命体征等变化情况 治疗后心率变化试验组由治疗前的 $93.8\pm 15.7/\text{min}$ 下降至停药后24 h的 $77.8\pm 9.9/\text{min}$, 对照组由治疗前的 $90.9\pm 14.4/\text{min}$ 下降至停

表1 用药前后试验组 ($n = 70$) 和对照组 ($n = 66$) 呕血或黑便的变化情况

指标	治疗前		治疗1 d		治疗2 d		停药24 h	
	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组
呕血例数	59 (84.3%)	49 (74.2%)	9 (12.9%)	10 (15.2%)	2 (2.9%)	1 (1.5%)	3 (4.4%)	2 (3.0%)
呕血次数 ^a	2.16 ± 2.02^a	1.59 ± 1.63^a	0.24 ± 0.77^a	0.23 ± 0.58^a	0.04 ± 0.27^a	0.02 ± 0.12^a	0.07 ± 0.35^a	0.09 ± 0.63^a
呕血量 ^a	539 ± 495^a	515 ± 574^a	66 ± 252^a	42 ± 128^a	16 ± 93^a	1.0 ± 6.2^a	23 ± 109^a	29 ± 190.36^a
黑便例数	59 (84.2%)	54 (81.8%)	34 (48.6%)	44 (66.7%)	21 (30.0%)	23 (34.8%)	16 (22.9%)	18 (27.3%)
黑便次数	2.6 ± 3.1^a	2.83 ± 2.81^a	1.0 ± 1.3^a	1.3 ± 1.2^a	0.6 ± 1.2^a	0.6 ± 1.0^a	0.40 ± 0.91^a	0.50 ± 1.1^a
黑便量 (mL)	400 ± 451^a	421 ± 411^a	109 ± 191^a	155 ± 210^a	47 ± 110^a	56 ± 149^a	30 ± 91^a	57 ± 1577^a

^a $P < 0.05$, 组内比。

药后24 h的 78.1 ± 9.0 mmHg; 收缩压变化试验组由治疗前的 104.6 ± 19.2 mmHg回升至停药后24 h的 111.1 ± 12.5 mmHg, 对照组由治疗前的 107.6 ± 18.4 mmHg回升至停药后24 h的 112.2 ± 16.5 mmHg; 舒张压变化试验组由治疗前的 62.0 ± 11.0 mmHg回升至停药后24 h的 67.1 ± 7.5 mmHg, 对照组由治疗前的 64.1 ± 12.5 mmHg回升至停药后24 h的 68.5 ± 9.3 mmHg. 两组心率、收缩压和舒张压治疗前后变化组内均有显著差异($P < 0.05$), 而组间无显著差异($P > 0.05$). 治疗后两组患者恶心、头昏、心悸、出汗、口渴症状均显著改善($P < 0.05$), 组间无显著差异($P > 0.05$); 昏厥症状试验组有显著改善($P = 0.0039$), 对照组无显著变化($P = 0.6250$), 组间比较无差异($P = 0.0578$). 治疗后, 两组红细胞计数和血红蛋白均无显著变化($P > 0.05$), 组间比较也无差异($P > 0.05$). 可能与研究时都有输血或检查时间间隔太短(仅72 h)有关. 两组治疗前后输血量或输血量均无显著差异($P > 0.05$). 在本试验中, 试验组有18例、对照组有15例有合并用药, 合并用药比例两组无显著差异($P = 0.6950$). 合并用药中包括PPSB, PAMBA, 奥美拉唑, 血凝酶, 白蛋白, 乳果糖, 甘利欣, 法莫替丁, 还原性谷胱甘肽, 门冬氨酸钾镁, 凝血酶, 头孢曲松钠, 头孢他定, 头孢噻肟, 支链氨基酸, 止血敏和维生素等. 试验组和对照组各有1例发生不良反应. 不良反应发生率分别为1.43%和1.52%, 均表现为轻度腹胀, 两组间比较无显著差异($P = 1.000$). 治疗前实验室检查正常而治疗后异常的病例, 主要表现为总蛋白、白蛋白、ALT、AST、总胆红素、ALP、血糖、BUN、PT、尿蛋白、尿酮体变化. 由于本研究的入组患者均为肝功能失代偿的患者, 门静脉高压出血后会加重这些肝功能的变化, 因此, 实验室指标治疗前正常而治疗后异常经判断与试验药物无关.

3 讨论

食管静脉曲张破裂出血是最严重威胁生命安全的上消化道出血形式之一, 有效合理地使用止血药物对于提高治疗食管胃底静脉曲张出血的成功率非常重要. 目

前内镜直视下注射硬化剂、套扎及喷洒药物已成为治疗的首要方法. 然而, 由于技术及设备的原因, 药物治疗仍是首选的方法^[1-5]. 醋酸奥曲肽作为一种人工合成的生长抑素的八肽衍生物, 有较长的作用半衰期, 约为90 min, 具有生长抑素类似的药理作用, 能选择性收缩内脏血管、降低门脉血流量^[6-11]. 可减少门脉主干血流量25-35%, 降低门脉压力12.5-16.7%, 从而达到止血目的^[12-15]. 此外, 奥曲肽能使奇静脉侧支循环血量和曲张静脉压力持续降低30-45%, 但不收缩肝动脉, 不减少肝血流量, 对肝功能无明显影响^[16-19]. 根据国内外文献报道, 醋酸奥曲肽在治疗食管胃底静脉曲张出血的疗效确切, 目前已成为国内外临床上治疗食管、胃底静脉曲张破裂出血的首选药物之一, 与质子泵受体抑制剂联合使用具有协同作用^[20-25]. 本研究结果显示, 疗效方面, 醋酸奥曲肽注射液以50 μ g/h的速度连续滴注48 h, 试验组的呕血例数由治疗前的59例下降为疗效判断时点(停药24 h)的3例; 呕血次数由治疗前的 2.16 ± 2.02 次下降为疗效判断时点的 0.07 ± 0.35 次; 呕血量由治疗前的 539 ± 495 mL下降为疗效判断时点的 23 ± 109 mL; 黑便例数由治疗前的59例下降为疗效判断时点的16例; 黑便次数由治疗前的 2.63 ± 3.08 次下降为疗效判断时点的 0.39 ± 0.92 次; 黑便量由治疗前的 400 ± 451 mL下降为疗效判断时点的 30 ± 91 mL. 无论治疗第1天、治疗第2天和停药后24 h, 试验组、对照组呕血次数和呕血量、黑便次数和黑便量与治疗前相比, 均有统计意义的显著减少($P < 0.05$), 而组间比较无统计学差异($P > 0.05$). 根据疗效判断标准, 治疗后试验组总有效率为97.1%, 与对照组的92.4%相似, 组间比较无显著差异($P = 0.2223$).

安全性方面, 已知的奥曲肽的主要副作用是局部和胃肠道反应. 皮下注射后的局部反应包括注射部位疼痛、红肿等. 胃肠道副作用包括食欲不振、恶心、呕吐、痉挛性腹痛、腹胀、胀气、稀便、腹泻及脂肪痢. 另外, 长期使用奥曲肽可能导致胆石形成、血糖升高、低钠血症等. 亦有报道应用奥曲肽出现严重的心

律失常如窦性心动过缓的报道^[26-29]。本试验中, 试验组和对照组各有1例发生不良反应, 不良反应发生率分别为1.43%和1.52%, 均表现为轻度腹胀, 两组间比较无显著差异($P = 1.000$)。最近, 有学者报道奥曲肽可诱发肝硬化患者尿硝酸盐排量, 自由水清除率, 肾钠滤过分数减少, 血浆内皮素升高, 从而损伤肾功能^[30], 本研究中未发现此类病例。试验组发生严重不良事件(SAE)两起, 均死亡, 死亡原因与疾病进展有关, 而与治疗药物无关。因此, 我们认为, 北京泰德制药有限公司开发的醋酸奥曲肽注射液在本研究中其疗效和安全性与对照药善宁相当, 可以安全有效地治疗肝硬化门静脉高压食管胃底静脉曲张出血。

4 参考文献

- 唐鑫, 汪婷. 善得定与垂体后叶素治疗肝硬化并发上消化道出血的疗效比较. 临床军医杂志 2004; 32: 93-94
- Helmy A, Hayes PC. Review article: current endoscopic therapeutic options in the management of variceal bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 575-594
- Boyer TD. Pharmacologic treatment of portal hypertension: past, present, and future. *Hepatology* 2001; 34: 834-839
- Yang WL, Tripathi D, Therapondos G, Todd A, Hayes PC. Endoscopic use of human thrombin in bleeding gastric varices. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1381-1385
- Nidegger D, Ragot S, Berthelemy P, Masliah C, Pilette C, Martin T, Bianchi A, Paupard T, Silvain C, Beauchant M. Cirrhosis and bleeding: the need for very early management. *J Hepatol* 2003; 39: 509-514
- Zhou Y, Qiao L, Wu J, Hu H, Xu C. Comparison of the efficacy of octreotide, vasopressin, and omeprazole in the control of acute bleeding in patients with portal hypertensive gastropathy: a controlled study. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 973-979
- Abraldes JG, Bosch J. Somatostatin and analogues in portal hypertension. *Hepatology* 2002; 35: 1305-1312
- McCormick PA, Patch D, Greenslade L, Chin J, McIntyre N, Burroughs AK. Clinical vs haemodynamic response to drugs in portal hypertension. *J Hepatol* 1998; 28: 1015-1019
- Seewald S, Seitz U, Yang AM, Soehendra N. Variceal bleeding and portal hypertension: still a therapeutic challenge? *Endoscopy* 2001; 33: 126-139
- Mela M, Mancuso A, Burroughs A. Drug treatment for portal hypertension. *Ann Hepatol* 2002; 1: 102-120
- D'Amico G, Politi F, Morabito A, D'Antoni A, Guerrera D, Giannuoli G, Traina M, Vizzini G, Pasta L, Pagliaro L. Octreotide compared with placebo in a treatment strategy for early rebleeding in cirrhosis. A double blind, randomized pragmatic trial. *Hepatology* 1998; 28: 1206-1214
- de Franchis R. Somatostatin, somatostatin analogues and other vasoactive drugs in the treatment of bleeding oesophageal varices. *Dig Liver Dis* 2004; 36: S93-S100
- Freitas DS, Sofia C, Pontes JM, Gregorio C, Cabral JP, Andrade P, Rosa A, Camacho E, Ferreira M, Portela F, Romaozinho JM, Tome L, Gouveia H, Leitao M, Pimenta I, Donato A. Octreotide in acute bleeding esophageal varices: a prospective randomized study. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1310-1314
- Silva G, Quera R, Fluxa F, Sanhueza E, Segovia R, Brahm J, Munoz C, Morales A, Munoz L, Urzua L, Biagini L. Octreotide administration and/or endoscopic treatment in cirrhotic patients with acute variceal bleeding: a multicentric study. *Rev Med Chil* 2004; 132: 285-294
- Corley DA, Cello JP, Adkisson W, Ko WF, Kerlikowske K. Octreotide for acute esophageal variceal bleeding: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2001; 120: 946-954
- 杨根领, 甄中峰, 王仙芝. 善得定用于肝炎肝硬化上消化道大出血49例效果分析. 山东医药 2004; 44: 29
- Lowe RC, Grace ND. Pharmacologic therapy for portal hypertension. *Curr Gastroenterol Rep* 2001; 3: 24-29
- Abraldes JG, Bosch J. Novel approaches to treat portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: S232-S241
- Wang SS, Chan CC, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Chen CT, Huang HC, Tai CC, Lai IN, Lee SD. Effects of long-term octreotide treatment on the response of portal-systemic collaterals to vasopressin in portal hypertensive rats. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 316-321
- Dagher L, Burroughs A. Variceal bleeding and portal hypertensive gastropathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 81-88
- Banares R, Albillos A, Rincon D, Alonso S, Gonzalez M, Ruizdel-Arbol L, Salcedo M, Molinero LM. Endoscopic treatment versus endoscopic plus pharmacologic treatment for acute variceal bleeding: a meta-analysis. *Hepatology* 2002; 35: 609-615
- Chung S. Management of bleeding in the cirrhotic patient. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 355-360
- Lata J, Hulek P, Vanasek T. Management of acute variceal bleeding. *Dig Dis* 2003; 21: 6-15
- Seewald S, Mendoza G, Seitz U, Salem O, Soehendra N. Variceal bleeding and portal hypertension: has there been any progress in the last 12 months? *Endoscopy* 2003; 35: 136-144
- Mottet C, Sieber CC, Nauer A, Drewe J, Fried R, Larsen F, Beglinger C. Hemodynamic effects of the somatostatin analog lanreotide in humans: placebo-controlled, cross-over dose-ranging Echo-Doppler study. *Hepatology* 1998; 27: 920-925
- Dilger JA, Rho EH, Que FG, Sprung J. Octreotide-induced bradycardia and heart block during surgical resection of a carcinoid tumor. *Anesth Analg* 2004; 98: 318-320
- 顾掌生, 王大力. 奥曲肽致严重心律失常11例. 中国医院药学杂志 2004; 24: 724-725
- 甄永存, 谢东晓. 奥曲肽静滴引起心律失常. 药物不良反应杂志 2001; 3: 119-120
- Moller S, Brinch K, Henriksen JH, Becker U. Effect of octreotide on systemic, central, and splanchnic haemodynamics in cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26: 1026-1033
- Guney Duman D, Tuney D, Bilsel S, Benli F, Karan S, Avsar E, Ozdogan O, Tozun N. Octreotide in liver cirrhosis: a salvage for variceal bleeding can be a gunshot for kidneys. *Liver Int* 2005; 25: 527-535

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

胃黏膜保护的基础与临床研究

任建林

任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化疾病研究所 福建省厦门市 361004

通讯作者: 任建林, 361004 福建省厦门市湖滨南路201号 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化疾病研究所. jianlin.ren@xmzsh.com

收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2574.asp>

编者按 胃黏膜保护是指黏膜能耐受经常接触的各种损伤因子而结构与功能不受明显伤害的现象. 当胃黏膜受刺激后, 黏膜的抵御能力相应增强, 即出现适应性细胞保护现象, 提示胃黏膜细胞保护是动态过程而非静态过程. 胃黏膜保护作用由多种因素介导, 这些因素相互联系、相互作用, 形成复杂的网络体系, 并受全身和局部神经、体液及腔内物质的调节. 探讨三叶因子、氧自由基、幽门螺杆菌、酒精、非甾体类抗炎药、胃黏膜免疫及细胞因子等研究热点与胃黏膜保护相互作用的机制有重要意义.

厦门大学附属中山医院消化内科、厦门市消化疾病研究所在任建林博士、教授、主任医师的领导下, 经过4 a左右的努力, 使消化内科学科建设的整体水平取得了长足的进步. 在胃黏膜保护的基础与临床研究, 消化内镜的综合应用研究方面, 获得了一系列研究结果, 对于认识胃黏膜保护的细胞及分子生物学发生机制有十分重要的意义.

1	胃黏膜保护的基础与临床研究进展.....	2521
2	三叶因子与胃黏膜保护的研究进展.....	2575
3	胃黏液屏障与胃黏膜保护的研究进展.....	2578
4	氧自由基与胃黏膜损伤.....	2582
5	幽门螺杆菌与胃黏膜保护研究进展.....	2586
6	乙醇对胃黏膜作用机制的研究进展.....	2591
7	NSAIDs相关性胃肠病.....	2597
8	一氧化氮与胃黏膜保护和损伤.....	2601
9	胃黏膜免疫机制研究进展.....	2605
10	门脉高压性胃病.....	2610
11	急性胰腺炎与胃黏膜损伤.....	2615
12	胃黏膜保护剂临床应用进展.....	2620

三叶因子与胃黏膜保护的研究进展

任建林, 潘金水, 卢雅丕

任建林, 潘金水, 卢雅丕, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化病研究所 福建省厦门市 361004

通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化病研究所. jianlinr@msn.com

电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017

收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

摘要

三叶因子家族是一群主要由胃肠道黏液细胞分泌的小分子多肽. 其共同特征为均含一特殊的P结构域及三叶状结构. 这种稳定的结构使三叶因子家族具有明显的抗蛋白酶水解、酸消化及耐热特性, 因而能在消化道复杂的环境中保持生物活性. 目前在哺乳动物体内发现的有pS2/TFF1、SP/TFF2和ITF/TFF3三种, 它们具有黏膜保护与修复、肿瘤抑制、信号传导、调节细胞凋亡等功能. 本文阐述了三叶因子家族发现的历史, 并初步探讨了其作用. 同时也对三叶因子受体这一热点的研究现状进行总结.

关键词: 三叶因子; 胃黏膜保护

任建林, 潘金水, 卢雅丕. 三叶因子与胃黏膜保护的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2575-2577

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2575.asp>

0 引言

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. 目前在哺乳动物体内发现的三叶肽(trefoil peptide)有3种, 即乳癌相关肽(pS2或TFF1)、解痉多肽(SP或TFF2)和肠三叶因子(ITF或TFF3). 其共同特征为均含一特殊结构——P结构域, 由一段38-39个氨基酸序列通过6个高度保守的半胱氨酸残基经由3个分子内的二硫键(Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6)相互连接, 使整个肽链扭曲、折叠形成三叶状结构, 由此命名^[1,2]. 这种三叶形结构的稳定性使三叶因子家族具有明显的抗蛋白酶水解、酸消化及耐热特性, 因而能在消化道复杂的环境中保持生物活性. 在哺乳动物体内, 三叶肽具有黏膜保护与修复、肿瘤抑制、信号传导、调节细胞凋亡等功能, 但其发挥功能的具体机制尚不明^[3-13].

1 TFF的发现历史

1982年由Masiakowski *et al*^[14]在雌激素诱导的人乳腺

癌细胞系MCF-7中获得TFF1, 分子由60个氨基酸组成, 内部有7个半胱氨酸残基, 6个参与构成P结构域. Chadwick *et al*^[15]应用平衡超速离心、凝胶过滤、聚丙烯酰胺凝胶电泳及质谱分析, 发现TFF1可通过第7个半胱氨酸与另一个TFF1分子形成分子间二硫键而形成二聚体. 有实验表明TFF1生物活性可能与同源二聚体的形成或与其他蛋白结合形成低聚体有关. 在正常组织中, TFF1主要在胃体及胃窦黏膜上皮表面细胞表达, 其次在空回肠、结肠、唾液腺、胰腺及呼吸道、乳腺等黏液上皮细胞中亦有低水平表达. 多种恶性肿瘤中可见TFF1高水平表达, 如胃、乳腺、胰腺、肺、子宫内膜、卵巢、前列腺、膀胱、胆管、食管、甲状腺及皮肤癌等均有报道. 1982年, Jorgensen *et al*^[16]在从猪胰腺提纯胰岛素过程中分离到了TFF2, 分子由106个氨基酸组成, 含有2个对称的P结构域, 其位于第6位与第104位的半胱氨酸残基(P结构域外)亦形成1个二硫键(第7个分子内二硫键), 使其结构极其稳定. TFF2主要在胃体及胃窦的黏液颈细胞和下段十二指肠腺表达, 此外, 在黏膜损伤部位如消化性溃疡、炎症性肠病等及胃肠道肿瘤、胰腺癌、肠增生性息肉、Barrett食管等均可见TFF2表达增高. 1991年Suemori *et al*^[17]从大鼠空肠中发现了TFF3, 分子仅由59个氨基酸组成, 含有1个P结构域, 质谱分析表明, TFF3亦存在单聚体及二聚体2种形式, 其同源二聚体亦通过2个C末端半胱氨酸(Cys58)形成分子间二硫键连接而成^[18]. TFF3主要在小肠及结肠杯状细胞中表达, 在人子宫、正常乳腺、下丘脑、垂体、肺等组织中的低水平表达亦有报道. 在肿瘤组织如皮肤黏液癌、乳腺癌、结肠癌等中可见TFF3表达上调.

2 TFF的作用

国外已有大量的实验证明, 三叶肽在胃肠道黏膜保护中发挥了重要的作用^[10,19,20]. 其作用机制目前有2种假说: (1)物理方式, 与黏液中的糖蛋白结合形成稳定的凝胶复合物, 加强黏液凝胶层, 减少胃表面有害物质及机械应力等因素对黏膜的损伤. (2)生物化学方式, 三叶肽可能通过与其受体或转运蛋白结合而发挥生理功能, 但具体的受体或结合蛋白并未明确确定. 除保护作用外, 研究结果证明三叶肽参与了损伤组织的修复过程, 可增强受损黏膜周围完好的上皮细胞向损伤黏膜表面

迁移覆盖,促进损伤黏膜的重建^[21-24]。三叶肽是一种快速反应肽,在黏膜损伤后30 min内即可见表达上调。体外实验显示,无论是重组TFF3或重组TFF2,都能刺激肠道上皮细胞的迁移,促进伤口愈合,改变上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)的表达和细胞定位。

肿瘤与三叶肽之间的因果关系尚不明了。TFF1基因敲除小鼠模型中,所有小鼠胃上皮细胞均表现为严重增生、高度发育不良及胃窦部腺瘤形成,部分发展为胃浸润型癌。Farrell *et al*^[6]研究发现缺乏TFF2老鼠的胃黏膜厚度及黏膜细胞增殖率均明显下降,壁细胞数量及胃酸分泌量增多2倍。TFF1转基因鼠乳房组织过量表达TFF1,但并不导致乳腺增生及发育异常。这提示TFF1可能是一种肿瘤抑制因子。研究结果还表明三叶肽在诱导细胞凋亡方面有一定作用。Efsthathiou^[25]发现rTFF3可引起HT29细胞系细胞钙黏蛋白下调,减弱细胞与细胞、细胞与基底层之间的黏附作用,下调 α -链蛋白、 β -链蛋白的表达,诱导细胞凋亡。

3 TFF受体研究现状

目前认为三叶因子家族可能具有特异性受体,是通过配体-受体或配体-结合蛋白方式传导其生物学功能的^[19,26,27]。Playford *et al*^[28]对吡啶美辛诱导的大鼠胃溃疡模型皮下注射小剂量hTFF2,发现TFF2可发挥其黏膜保护作用,提示三叶肽受体存在的可能。Poulsen *et al*^[29]用¹²⁵I标记的TFF2静脉注射到大鼠体内,6 min后约有14%在胃肠道显影,胃体及幽门部对放射性TFF2的摄取可被非放射性标记的TFF2所代替,且这种过程呈剂量依赖性,这更证实了受体存在的可能。1997年,美国学者Tan *et al*^[30]应用配体斑点杂交(ligand blotting)法提出TFF3受体可能为一50 Ku的糖蛋白。2000年,Thim *et al*^[31]提取猪TFF2作为配体进行亲和层析,提取物经聚丙烯酰胺凝胶电泳及质谱分析发现了一个分子量约220 Ku及3个分子量约为140 Ku的蛋白质。前者是一个CRP-Ductin 基因产物,含有一个短小的细胞质区、一个跨膜区及一个长细胞外区,推测这可能是三叶肽受体或某种三叶肽结合蛋白^[31]。Newton *et al*^[32]研究发现TFF1在正常胃黏膜中有3种形式:单聚体、二聚体及一种分子量约25 Ku的TFF1复合物。其中,TFF1复合物浓度最高,而二聚体仅少量存在。已有大量实验证明,TFF1二聚体在细胞迁移及黏膜保护方面较单聚体有更强的生物活性,而实验中发现二聚体含量甚微,因此,推测该25 Ku的TFF1复合物可能由TFF1与某种蛋白结合而成,且发挥了重要的生物作用^[32]。但上述研究结果均未得到公认,这些假说的意义有待于进一步验证^[33-35]。

三叶因子家族在黏膜保护及修复过程中发挥了重要的作用,深入探讨三叶因子家族的作用机理对于黏

膜保护、溃疡治疗及肿瘤诊治等方面均有重要的意义。体外研究业已证实了它们能促进上皮细胞修复^[3],其在肿瘤生成、生长过程中所扮演的角色及与胃酸分泌、胃动力之间的关系亦不明确,主要问题在于未能自分子水平阐明三叶因子家族分子的作用机制,而家族各成员与结合蛋白或受体之间的相互作用成为进一步的研究重点^[31,32,36]。因此,进一步研究三叶因子家族各成员的作用机制是目前的主要研究突破方向,由于三叶因子家族具有明确的调节肽功能,研究下游的受体/结合蛋白除阐明作用机制以外,还可能提出新的研究方向、肿瘤的生成假说或新的药物。

4 参考文献

- 1 Lin J, Nadroo AM, Chen W, Holzman IR, Fan QX, Babyatsky MW. Ontogeny and prenatal expression of trefoil factor 3/TFF in the human intestine. *Early Hum Dev* 2003; 71: 103-109
- 2 Yu K, Jiang SF, Lin MF, Wu JB, Lin J. Extraction and purification of biologically active intestinal trefoil factor from human meconium. *Lab Invest* 2004; 84: 390-392
- 3 Wong WM, Poulsom R, Wright NA. Trefoil peptides. *Gut* 1999; 44: 890-895
- 4 Bossenmeyer-Pourie C, Kannan R, Ribieras S, Wendling C, Stoll I, Thim L, Tomasetto C, Rio MC. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol* 2002; 157: 761-770
- 5 Eliakim R, Fan QX, Babyatsky MW. Chronic nicotine administration differentially alters jejunal and colonic inflammation in interleukin-10 deficient mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 607-614
- 6 Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, Chen D, Zhao CM, Podolsky DK, Wang TC. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury. *J Clin Invest* 2002; 109: 193-204
- 7 Renes IB, Verburg M, Van Nispen DJ, Taminiau JA, Buller HA, Dekker J, Einerhand AW. Epithelial proliferation, cell death, and gene expression in experimental colitis: alterations in carbonic anhydrase I, mucin MUC2, and trefoil factor 3 expression. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 317-326
- 8 Rodrigues S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Rodrigue CM, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Emami S, Gespach C. Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 4488-4497
- 9 Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Gespach C, Emami S. Trefoil peptides as proangiogenic factors *in vivo* and *in vitro*: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *Faseb J* 2003; 17: 7-16
- 10 Beck PL, Wong JF, Li Y, Swaminathan S, Xavier RJ, Devaney KL, Podolsky DK. Chemotherapy-and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor. *Gastroenterology* 2004; 126: 796-808
- 11 Chi AL, Lim S, Wang TC. Characterization of a CCAAT-enhancer element of trefoil factor family 2 (TFF2) promoter in MCF-7 cells. *Peptides* 2004; 25: 839-847
- 12 Koitabashi A, Shimada T, Fujii Y, Hashimoto T, Hosaka K, Tabei K, Namatame T, Yoneda M, Hiraishi H, Terano A. Indometacin up-regulates TFF2 expression in gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 171-176
- 13 Ren JL, Luo JY, Lu YP, Wang L, Shi HX. Relationship between trefoil factor 1 expression and gastric mucosa injuries and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2674-2677
- 14 Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A,

- Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 7895-7903
- 15 Chadwick MP, Westley BR, May FE. Homodimerization and hetero-oligomerization of the single-domain trefoil protein pNR-2/pS2 through cysteine 58. *Biochem J* 1997; 327: 117-123
- 16 Jorgensen KH, Thim L, Jacobsen HE. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. Preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regul Pept* 1982; 3: 207-219
- 17 Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: tissue- and cell-specific member of the trefoil protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11017-11021
- 18 Thim L, Woldike HF, Nielsen PF, Christensen M, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast. *Biochemistry* 1995; 34: 4757-4764
- 19 Blanchard C, Durual S, Estienne M, Bouzakri K, Heim MH, Blin N, Cuber JC. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol* 2004; 172: 3775-3783
- 20 Verburg M, Renes IB, Einerhand AW, Buller HA, Dekker J. Isolation-stress increases small intestinal sensitivity to chemotherapy in rats. *Gastroenterology* 2003; 124: 660-671
- 21 Hahm KB, Im YH, Parks TW, Park SH, Markowitz S, Jung HY, Green J, Kim SJ. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; 49: 190-198
- 22 Taupin D, Pedersen J, Familiar M, Cook G, Yeomans N, Giraud AS. Augmented intestinal trefoil factor (TFF3) and loss of pS2 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium. *Lab Invest* 2001; 81: 397-408
- 23 Cook GA, Familiar M, Thim L, Giraud AS. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett* 1999; 456: 155-159
- 24 Moro F, Levenez F, Durual S, Plaisancie P, Thim L, Giraud AS, Cuber JC. Secretion of the trefoil factor TFF3 from the isolated vascularly perfused rat colon. *Regul Pept* 2001; 101: 35-41
- 25 Efsthathiou JA, Noda M, Rowan A, Dixon C, Chinery R, Jawhari A, Hattori T, Wright NA, Bodmer WF, Pignatelli M. Intestinal trefoil factor controls the expression of the adenomatous polyposis coli-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3122-3127
- 26 Khan ZE, Wang TC, Cui G, Chi AL, Dimaline R. Transcriptional regulation of the human trefoil factor, TFF1, by gastrin. *Gastroenterology* 2003; 125:510-521
- 27 Shimada T, Koitabashi A, Kuniyoshi T, Hashimoto T, Yoshiura K, Yoneda M, Hiraishi H, Terano A. Up-regulation of TFF expression by PPARgamma ligands in gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 Suppl 1: 119-125
- 28 Playford RJ, Marchbank T, Chinery R, Evison R, Pignatelli M, Boulton RA, Thim L, Hanby AM. Human spasmolytic polypeptide is a cytoprotective agent that stimulates cell migration. *Gastroenterology* 1995; 108: 108-116
- 29 Poulsen SS, Thulesen J, Nexø E, Thim L. Distribution and metabolism of intravenously administered trefoil factor 2/porcine spasmolytic polypeptide in the rat. *Gut* 1998; 43: 240-247
- 30 Tan XD, Hsueh W, Chang H, Wei KR, Gonzalez-Crussi F. Characterization of a putative receptor for intestinal trefoil factor in rat small intestine: identification by *in situ* binding and ligand blotting. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 673-677
- 31 Thim L, Mortz E. Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regul Pept* 2000; 90: 61-68
- 32 Newton JL, Allen A, Westley BR, May FE. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut* 2000; 46: 312-320
- 33 任建林, 卢雅丕, 陈建民, 王琳, 叶震世, 施华秀, 吴艳环, 钟燕, 罗金燕. 三叶因子1表达与胃黏膜损伤及胃癌的关系. *中华消化杂志* 2003; 23: 671-673
- 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 卢雅丕, 任建林. 三叶因子家族研究进展. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 2019-2021
- 36 Muskett FW, May FE, Westley BR, Feeney J. Solution structure of the disulfide-linked dimer of human intestinal trefoil factor (TFF3): the intermolecular orientation and interactions are markedly different from those of other dimeric trefoil proteins. *Biochemistry* 2003; 42: 15139-15147

胃黏液屏障与胃黏膜保护的研究进展

叶震世, 任建林

叶震世, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化病研究所 福建省厦门市 361004

通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化疾病研究所. Jianlin.ren@xmzsh.com

电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017

收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

摘要

胃黏液屏障是指覆盖于胃黏膜上皮细胞表面的一层连续性凝胶层, 由糖蛋白、水、电解质、肽以及脂类组成。胃黏液凝胶层呈一定的厚度变化, 黏蛋白多聚结构稳定, 具有较高的黏滞性和水不溶性。能不断更新, 处于分泌和降解的动态平衡之中。作为胃黏膜保护的第一道屏障, 胃黏液凝胶层具有润滑作用, 拮抗 H^+ 逆弥散和消化酶的消化作用, 参与对损伤因子的防御和损伤后修复。其独特的生理特征和生理作用在胃黏膜保护中起重要的作用。

关键词: 胃黏液; 屏障; 胃黏膜保护

叶震世, 任建林. 胃黏液屏障与胃黏膜保护的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2578-2581

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2578.asp>

0 引言

胃黏液屏障是指覆盖于胃黏膜上皮细胞表面的一层凝胶层, 是由胃上皮细胞、贲门腺、幽门腺以及泌酸腺的颈黏液细胞共同分泌的。具有较高的黏滞性和水不溶性, 和黏膜上皮细胞分泌的碳酸氢根离子构成了黏膜保护的第一道屏障。胃黏液含有5%的糖蛋白和95%的水分, 包括糖蛋白、水、电解质、肽以及脂类。其中黏蛋白多聚体相互重叠形成一层黏液凝胶层附着在黏膜上皮表面, 在正常生理条件下, 处于分泌和降解的动态平衡之中。胃黏液合成和分泌以及黏液层厚度的变化受神经、体液、内分泌激素、局部刺激和食物、药物等多种因素的调节^[1-3]。现就胃黏液生理特征、生理作用在胃黏膜保护中作用的研究进展综述如下。

1 胃黏液生理特征和胃黏膜保护

1.1 胃黏液厚度 黏液凝胶层的厚度是评价胃黏液屏障保护功能的主要参数之一。是黏液屏障的形态基础。测量胃黏液凝胶层厚度的方法很多, 如冷冻切片、超声测定、微电极裂隙灯辅助测定等。因测量方法不同,

胃黏液凝胶层厚度的数值变化很大。文献[4]指出用裂隙灯和厚度仪测量发现黏液凝胶层厚度为: $234 \pm 9 \mu\text{m}$ (豚鼠)、 $500 \pm 652 \mu\text{m}$ (人)、 $425 \pm 17 \mu\text{m}$ (狗)、 $166 \pm 10 \mu\text{m}$ (鼠); 用相差显微镜测量的结果是: $73 \pm 5 \mu\text{m}$ (鼠)、 $192 \pm 7 \mu\text{m}$ (人)和 $75 \pm 5 \mu\text{m}$ (蛙)。Jordan *et al*^[5]应用改良的Periodic acid Schiff/Alcian Blue 染色技术使黏液凝胶层原位显影后再测量其厚度, 这项技术第一次能够保存和显影完整的黏液凝胶层和其下面的黏膜层。国内湛先保*et al*^[6]采用厚片法测定大鼠胃壁黏液凝胶层的厚度, 具有取材简单、操作方便、直接测量、接近生理等优点。不同部位、不同生理状态黏液凝胶的厚度各不相同, Svestka *et al*^[7]用敏感的pH微电极检测方法, 证实禁食24 h后, 大鼠的黏液凝胶层明显减少。另有文献[8]报道, 在休眠条件下, 胃黏液的厚度无明显变化。通过对大鼠标本的体内研究发现^[9], 黏液凝胶层的厚度与表面上皮组织的细胞内酸化作用呈负相关, 这表明较厚的黏液凝胶层更能保护上皮细胞对氢离子的弥散。Atumal *et al*^[10]提出在体内黏液凝胶层是连续的, 存在两类分泌类型的黏液层, 一层是较宽松的凝胶层, 可通过实验抽吸方法移去并快速再生, 与体内对食物的润滑作用和对微生物的束缚作用有关。另一层是其下面黏附于黏膜表面的坚固的凝胶层, 真正起稳定的保护屏障的作用。这2层的比例在胃内不同部位是不同的, 在胃窦部坚固凝胶层厚 $154 \mu\text{m}$, 而胃体则为 $80 \mu\text{m}$ 。根据此检测的黏液的总的厚度要比过去的体外研究报告的数值大。由于黏液层厚占胃体腺厚的1/4-1/2, 占表面上皮层的约30倍。因此, 能形成稳定的非流动层, 使离子要以团块的形式在其中扩散, 从而增加了黏液层的黏膜保护作用。最近的研究提示胃黏液层的厚度并不受 $H. pylori$ (cagA阳性或阴性)感染的影响^[11]。

1.2 胃黏液的稳定、连续性 黏蛋白的多聚结构决定了黏液结构的稳定性, 因此黏蛋白多聚体含量也是衡量胃黏液屏障保护功能的指标。黏蛋白多聚体相互重叠、相互穿插形成一凝胶附着在黏膜上皮表面。凝胶呈网状结构, 较疏松, 可容纳大量水分以及截留脂类、血浆蛋白、酶和离子等有机物。黏液中黏蛋白多聚体含量和凝胶特性间呈线性关系, 糖蛋白多聚体含量下降, 黏液的凝胶状特性就改变而成为黏性液体。当构成糖蛋白的多聚体共价结构裂开后, 可导致凝胶结构的塌陷。文献[3]指出, 胃溃疡患者以含小分子的黏蛋白为

多. 十二指肠溃疡患者黏蛋白分子则介于胃溃疡与正常人之间. 它们都含有同样的六氨基己糖结构, 且分子大小比例不因加入蛋白水解抑制因子而发生变化. 故可推测胃溃疡患者黏液的多聚体含量较小, 凝胶结构不稳定, 导致保护功能下降. 研究表明^[12-14], 黏液层是连续的, 其连续性较黏液层厚度更重要, 因黏液层的厚度随部位而变化. 但较厚的黏液层才能保证连续性覆盖, 更有效地提供一个稳定的、非流动层来中和胃酸, 抵御胃蛋白酶.

1.3 胃黏液的更新 胃黏液凝胶层在正常生理状态下, 处在分泌和降解的动态平衡中. 分泌黏液的细胞具有强大的修复和更新能力, 平均3-5 d更新一次, 但黏液层的更新率较难测定, 测定胃液中糖蛋白的代谢产物如6-氨基己糖或N-乙酰神经氨酸只能间接反映其更新率. 文献[3]研究推测, 在保持黏液厚度不变, 如黏液层厚度为0.4 mm, 共同扩散率为1.75, 为保持上皮表面的pH为7, 而腔内pH为2, 则黏液层需达更新10次/s. 这提示了黏液的更新在胃黏膜保护的重要性. 当胃黏膜受各种有害因素作用(例如: 酒精、药物、细菌等)后, 上皮被破坏后细胞内黏液释放, 坏死的上皮细胞脱落于其表面的黏液中. 在损伤局部就由细胞碎片、黏液和血液成分等构成“黏液状帽”. 这种黏液状帽的主要成份是纤维蛋白. 其主要作用是保护其基底膜免受酸的损害. 在黏膜损害周围, 胃小凹内健康细胞伸出板样足突, 沿裸露的基底膜向上皮剥脱面移动, 从而使损伤处再上皮化. 并且, 黏液状帽能使中和胃酸、稀释毒素的能力加强, 为黏膜的修复提供较好的环境.

2 胃黏液生理作用与黏膜保护

2.1 机械润滑作用 由于胃黏液具有很强的黏滞性, 使黏液凝胶层能黏附于胃黏膜上皮细胞表面, 具有润滑作用. 在机械消化过程中, 具有黏滞性润滑特性的黏液层能消除各种机械性刺激对黏膜上皮细胞的磨损, 从而保护胃黏膜屏障的完整性. 分子生物学研究表明^[15], 胃内主要有两种黏蛋白基因产物: 一是表面上皮分泌的MUC5AC, 另一是胃小凹附近颈细胞分泌的MUC6. 故胃黏液凝胶的宽松、坚固层两类分层可能是2种不同的黏蛋白基因产物或不同基因产物的混合, 也可能是含有不同的糖基化作用. 宽松黏液层在被移开后能快速复位再生, 发挥润滑作用.

2.2 拮抗H⁺逆弥散和消化酶的消化作用 胃黏膜主要通过三个部分来防御H⁺的逆弥散^[3]: (1)胃黏液防止H⁺和消化酶渗透入黏膜上皮. (2)维持细胞内pH和离子组成比例的恒定, 防止消化酶作用于细胞内的成分和基质. (3)上皮、黏膜及黏膜下血流营养黏膜, 促进愈合. 黏液凝胶层一方面能够减缓H⁺逆弥散的速度(H⁺在其中的扩散速度仅为水中的1/4-1/3), 另一方面黏液中的

HCO₃⁻可不断中和扩散进入黏液层的H⁺, 用酸敏感微电极直接测量人和兔、大鼠等动物黏液层不同水平的pH值, 发现在黏液层的胃腔侧与黏膜侧之间存在着pH梯度. 当胃腔内的pH为2-3时, 靠近黏膜表面的pH接近中性, 当胃腔内的pH小于2时, pH梯度便消失. 从而阻挡胃腔内H⁺对黏膜的损伤作用. 研究表明随着黏液凝胶层厚度的降低, H⁺逆弥散增加程度明显提高, 在应激状态下, 随着黏液量的减少, 黏液层厚度减少, H⁺逆增加, 加剧了胃黏膜的损害. 在参与胃黏液屏障作用的黏液成分, 除了黏蛋白外, 逐步认识到脂类, 特别是磷脂的作用, 亦为胃黏膜保护机制组成成分之一. 多篇文献^[16-17]均指出胃黏液凝胶层中磷脂的存在, 脂质能增强胃黏液层拮抗H⁺的渗透, 并以磷脂作用最强. 该层中的磷脂主要由上皮细胞分泌, 小部分来源于脱落的上皮细胞. 实验表明^[16]损伤后, 大鼠胃黏膜表面黏液凝胶层中总磷脂明显减少. 外源性双饱和卵磷脂混悬液使0.6 mol/L盐酸所致的胃黏膜溃疡指数和溃疡面积与胃黏膜总面积之比变小. 进一步电镜细胞化学研究发现, 正常情况下, 磷脂在覆盖上皮细胞表面参与构成黏液层结构. 无黏液层的腺上皮细胞及损伤后修复过程中的覆盖上皮细胞表面, 磷脂则形成层状结构覆盖细胞膜表面. 磷脂的作用类似于肺表面活性物质中的磷脂, 其分子在黏液层中呈疏水端向外的线状排列, 形成疏水层, 能抑制水的吸收, 维持组织的电势, 共同参与了阻止H⁺逆弥散. 但磷脂的产生与黏液、碳酸氢盐的关系尚未完全清楚.

胃蛋白酶是胃液中最重要消化酶, 只有在酸性较强的环境中才能发挥作用, pH为1-3时, 具有最大的分解蛋白质活性, pH为6.0时则几乎丧失活性. 跨黏液层pH梯度的形成, 使黏膜表面的胃蛋白酶丧失分解蛋白质的作用. 另外, 黏液凝胶层的特殊结构对分子和离子可自由通过, 但蛋白酶和分子量大的则不能通过, 在分泌H⁺和胃蛋白酶的胃腺和胃腔表面之间形成静水压. 当胃蛋白酶分泌进入胃腔后, 就不能反渗入黏液凝胶层. 至于胃腔表面被胃蛋白酶水解的黏液, 则快速被新分泌的黏液更新. 因此, 胃黏液屏障能抵抗消化酶的自身消化作用. 研究指出^[18]黏液糖蛋白分子能参与调控胃蛋白酶的水解活动, 抑制胃蛋白酶的蛋白水解作用, 在pH高于正常时激活胃蛋白酶原, 控制胃蛋白酶形成, 从而调节消化活动. 其参与这些活动的基因可能是硫酸化黏液糖蛋白和葡萄糖甘油酯^[3].

3 防御损伤因子的作用和参与损伤后修复

黏液凝胶层将黏膜面与胃腔分隔开, 黏膜得以避免与胃腔内的有害物质的直接接触, 根据分子的极性、大小、和残基性质, 黏液凝胶层可选择性的阻断某些大分子有害物质通过而造成的胃黏膜屏障的损害, 如细

菌微生物、毒素和一些药物等. 对能通过黏液凝胶层的小分子损伤因子, 如乙醇、胆汁、吡啶美辛、自由基等, 能通过局部形成"黏液状帽"^[19], 防御损伤进一步加剧和为损伤后修复提供良好环境. 体内实验表明^[20,21]黏液凝胶层可减缓乙醇、NSAIDs的吸收, 防止胃酸、胃蛋白酶对损伤部位造成更严重的后果. 当去除黏液层后, 则损伤持续存在且加重.

4 抑菌: 胃黏液与*H pylori*

胃黏液凝胶含有较丰富的磷脂, 细菌不易黏附生长, 能发挥一定的抵抗细菌感染的作用. 幽门螺旋菌(*H pylori*)现已公认是消化性溃疡和慢性胃炎的重要致病因素. *H pylori*对胃黏液屏障的破坏是其致病机制之一. 胃黏膜上皮细胞膜糖蛋白和糖脂中的唾液酸和含硫酸酯的糖基被认为是*H pylori*的受体, *H pylori*通过血凝素与这些结构结合而黏附于细胞表面. 胃黏液凝胶层中的大量含硫酸酯的糖蛋白和糖酯, 可竞争地干扰*H pylori*与细胞膜的黏附. *H pylori*分泌糖基硫酸酯酶移去黏液层中的糖蛋白和糖酯结构中的硫酸酯, 既破坏了黏液层的有机结构, 也去除了对其黏附细胞的干扰, 进而得以定植于上皮细胞膜上. 有研究^[22]显示*H pylori*感染者的黏液凝胶层黏稠度下降, 黏蛋白的浓度减少, 这可导致胃上皮易受各种因素的损害, 并且在损伤后延迟修复. Byrd *et al*^[23]报道, *H pylori*感染可以抑制黏蛋白的分泌. 其机制尚不清楚, 可能为*H pylori*的分泌产物直接影响黏蛋白的基因转录, 或影响其mRNA的易位和绞接.

*H pylori*的脂多糖、膜结合蛋白和致病岛的其他基因产物可能参与抑制黏蛋白的合成. 一项关于*H pylori*感染与胃黏蛋白多聚体含量、黏液层厚度变化的体内研究表明^[24,25]: *H pylori*感染使黏蛋白多聚体比例下降了18%; 在胃黏膜没有萎缩时, *H pylori*的感染没有改变胃黏液层的厚度, 在胃黏膜萎缩时, *H pylori*感染使黏液层厚度明显减少. 众所周知, *H pylori*可产生尿素酶、脂肪酶、磷脂酶A、蛋白酶、糖基硫酸酯酶等多种酶类. 文献[26-28]指出这些酶均能对胃黏液层的结构起破坏作用, 从而损伤胃黏液屏障功能. 如尿素酶分解尿素产生的氨和局部固有的碳酸氢盐, 可在黏膜表面形成25-50 mmol/L、pH为9的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液, 使黏液层中微胶粒解体而降低其屏障作用; 脂肪酶和磷脂酶A可以分解黏液中的脂质和磷脂, 使黏液的黏性、疏水性降低, 防止H⁺反向弥散的能力下降; 蛋白酶能分解蛋白质, 使黏液层中黏蛋白多聚体解体.

总之, 胃黏液凝胶层具有的生理特性和生理功能, 使其成为胃黏膜保护的重要屏障. 但是, 黏液只有和HCO₃⁻结合才能形成有效的细胞外屏障. 其次, 该屏障对胃酸和胃蛋白酶的防御能力有一定的限度, 所以, 该

屏障是黏膜保护的第一道屏障, 但不是唯一的屏障.

5 参考文献

- 1 Allen A, Flemstrom G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C1-19
- 2 Kaunitz JD. Barrier function of gastric mucus. *Keio J Med* 1999; 48: 63-68
- 3 李兆申主编. 胃黏膜损伤与保护—基础与临床. 第1版. 上海: 科技出版社, 2004: 69-87
- 4 李松华, 连超. 胃黏液与胃黏膜保护的研究进展. 国外医学消化疾病分册 2002; 22: 1-3
- 5 Jordan N, Newton J, Pearson J, Allen A. A novel method for the visualization of the in situ mucus layer in rat and man. *Clin Sci* 1998; 95: 97-106
- 6 湛先保, 李兆申, 许国铭, 崔忠敏, 段义民. 厚片法测定大鼠胃壁黏液凝胶层的厚度. 第二军医大学学报 2000; 21: 594
- 7 Svestka T, Krechler T, Zak A, Zak A, Fabry TL, Zhang ZG. Effect of fasting on gastric mucosa thickness: experimental study in laboratory rats. *Cas Lek Cesk* 2003; 142: 751-754
- 8 Bjorne H H, Petersson J, Phillipson M, Weitzberg E, Holm L. Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness. *J Clin Invest* 2004; 113: 106-114
- 9 Mia Phillipson, Christer Atuma, Johanna Henriksnäs. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G211-G219
- 10 Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G922-G929
- 11 Al-Marhoon MS, Nunn S, Soames RW. Effects of cagA⁺ and cagA⁻ strains of *Helicobacter pylori* on the human gastric mucus layer thickness. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1246-1252
- 12 Schreiber S, Nguyen TH, Konradt H, Scheid P. Recovery from gastric mucusdepletion in the intact guinea pig mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2003; 38: 1136-1143
- 13 Bi LC, Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defense: an integrated protective response. *Curr Opin Gastroenterology* 2003; 19: 526-532
- 14 Zhou D, Li J, Li N, Yan G. Study on viscosity property of gastrotestinal mucus. *ShenWu YiXue GongChengXue ZaZhi* 2004; 21: 72-73
- 15 Ho SB, Takamura K, Anway R, Shekels LL, Toribara NW, Uta H. The Adherent Gastric Mucous Layer Is Composed of Alternating Layers of MUC5AC and MUC6 Mucin Proteins. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1598-1606
- 16 马述春, 李石, 李少华. 磷脂在胃黏液屏障中作用的实验研究. 第二军医大学学报 1996; 17: 370-373
- 17 Hills BA. Surface-active phospholipid: a Pandora's box of clinical applications. Part II. Barrier and lubricating properties. *Internal Medicine Journal* 2002; 32: 242-251
- 18 Schreiber S, Scheid P. Gastric mucus of the guinea pig: proton carrier and diffusion barrier. *Am J Physiol* 1997; 272: G63-G70
- 19 Penissi AB, Fogal TH, Guzman JA, Piezzi RS. Gastroduodenal mucosal protection induced by dehydroleucodine: mucus secretion and role of monoamines. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 791-798
- 20 Ma L, Wang WP, Chow JY, Lan SK, Cho CH. The role of polyamines in gastric mucus synthesis inhibited by cigarette smoke or its extract. *Gut* 2000; 47: 170-177
- 21 Ikezawa T, Goso Y, Ichikawa T, Hayashida H, Kurihara M, Okaysu I, Saigenji K, Zshihara K. Appearance of specific mucins recognized by monoclonal antibodies in rat gastric mucosa healing from HCl-induced gastric mucosal damage. *J Gastroenterol* 2004; 39: 113-119
- 22 Kawakubo M, Ito Y, Okimura Y, Kobayashi M, Sakura K, Kasama S, Fukuda MN, Fukada M, Katsayama T, Nakayama

- J. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. *Science* 2004; 305: 1003-1006
- 23 Byrd JC, Yunker CK, Xu QS, Sternberg LR, Bresalier RS. Inhibition of gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2000; 118: 1072-1079
- 24 Sidebotham RL, Worku ML, Karim QN, Dhir NK, Baron JH. How *Helicobacter pylori* urease may affect external pH and influence growth and motility in the mucus environment: evidence from *in-vitro* studies. *European Journal of Gastro-enterology & Hepatology* 2003; 15: 395-401
- 25 Newton JL, Jordan N, Oliver L, Strugala V, Pearson J, James OF, Allen A. *Helicobacter pylori* *in vivo* causes structural changes in the adherent gastric mucus layer but barrier thickness is not compromised. *Gut* 1998;43: 470-475
- 26 马述春, 李石. 幽门螺旋菌产生的酶类对胃黏液屏障的破坏作用. 国外医学消化疾病分册 1994; 14: 16-19
- 27 Allen A, Newton J, Oliver L, Jordan N, Strugala V, Pearson JP, Dettmar PW. Mucus and *H pylori*. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 297-305
- 28 Sherwood, PV, Wibawa, JI, Atherton, JC, Jordan N, Jenkins D, Barrett DA, Shaw PN, Spiller RC. Impact of acid secretion, gastritis, and mucus thickness on gastric transfer of antibiotics in rats. *Gut* 2002; 51: 490-495

电编 张勇 编辑 管鑫妍 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 论文寄送地址

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。

氧自由基与胃黏膜损伤

施华秀, 任建林

施华秀, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化疾病研究所 福建省厦门市 361004

通讯作者: 施华秀, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化病研究所. huaxiu.shi@xmzsh.com
电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017

收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

摘要

我们在概述了氧自由基的概念、来源和氧自由基反应的损伤作用后, 综述了其在胃部疾病中的作用, 提示氧自由基与急性胃黏膜损害、慢性胃炎、消化性溃疡和胃癌的发病密切相关, 并阐述自由基清除剂对胃黏膜损伤的保护作用。

关键词: 氧自由基; 胃黏膜; 损伤

施华秀, 任建林. 氧自由基与胃黏膜损伤. 世界华人消化杂志 2005; 13(21):2582-2585

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2582.asp>

0 引言

自由基指具有未配对电子的原子、原子团或分子, 由氧分子衍生的自由基称氧自由基. 主要包括超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)和羟自由基($OH^{\cdot}$), 它们与过氧化氢、单线态氧(O^1)统称为活性氧。

1 氧自由基的产生

据文献[1-3]报道, 人体内总自由基中约95%以上属氧自由基, 因此, 氧自由基对人体有特殊意义, 常见的氧自由基有超氧阴离子($\cdot O_2^-$)、氢过氧基($HO_2^{\cdot}$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($HO^{\cdot}$)、氧有机自由基($RO^{\cdot}$)、有机过氧基($ROO^{\cdot}$)、单线态氧(1O_2)、活性氧(ROS)、脂自由基($L^{\cdot}$)和脂过氧基($LOO^{\cdot}$)。

正常情况下, 98%的氧还原为水, 1-2% 的氧通过单价还原形成氧自由基. 造成机体的氧自由基增多的原因有两种: 外源性因素, 主要是离子辐射、紫外线照射、超声、毒物、食物、药物及污染物; 内源性因素, 包括炎症时中性粒细胞"呼吸爆发"、线粒体损伤和缺血、金属中毒等。

2 氧自由基反应的损伤作用

正常人体内存在清除氧自由基的防御系统, 使其生成量不至于达到损伤组织的程度. 机体自身抗氧化系统

主要包括酶系清除系统和非酶系清除系统. 前者包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等; 后者包括维生素E、A、C和硒, 以及半胱氨酸和谷胱甘肽等. 然而机体清除氧自由基的能力是有限的, 氧自由基产生过多时, 就会造成组织损伤^[4-5]。

氧自由基具有杀菌、细胞毒和促进炎症渗出、水肿等重要炎症介质作用. 由于氧自由基作用的靶细胞和分子无特异选择性, 故氧自由基在参与杀菌等防御作用的同时, 也会给组织细胞造成损伤. 幽门螺旋杆菌(*H. pylori*)感染、NSAIDs、乙醇等坏死因子、缺血再灌注损伤、应激、幽门结扎等所致胃黏膜损伤的模型中, 均涉及氧自由基的作用. 可以认为, 氧自由基参与了绝大多数致溃疡因子的致病过程, 与慢性胃炎、急性胃黏膜损伤、胃溃疡和胃癌的形成有密切关系^[6-8]。

与其他组织的炎症相似, 胃黏膜在各种损伤因子作用下发生炎症时产生大量的炎症因子, 造成中性粒细胞浸润, 通过"呼吸爆发"产生氧自由基, 因此中性粒细胞可能是氧自由基的主要来源. 胃黏液在化学物质作用或缺血等情况下, 可产生大量的氧自由基. 缺血时, 黏膜细胞内氧化磷酸化减少, 三磷酸腺苷(ATP)生成减少. 有报道鼠出血休克15 min后, 胃黏膜内ATP减少75%, 二磷酸腺苷(ADP)减少27%, 而一磷酸腺苷(AMP)增至50%, AMP可进一步代谢为腺苷、肌苷及次黄嘌呤. 很多实验研究证明, 氧自由基对缺血再灌注性胃黏膜损伤机制主要是氧自由基导致胃黏膜上皮细胞和黏膜血管内皮细胞多价不饱和脂肪酸过氧化^[9-11]. 此外, 细胞能量不足时, 不能维持正常的离子梯度, 细胞内 Ca^{2+} 增多, 激活一种蛋白酶, 使黄嘌呤脱氢酶快速不可逆地转变成黄嘌呤氧化酶(XO). 缺血黏膜中同时有XO和次黄嘌呤的聚集, 当组织再灌注时, 就可产生大量的超氧自由基. 超氧自由基和过氧化氢通过Haber-Weiss反应可生成细胞毒性更大的羟自由基. 正常情况下, Haber-Weiss反应的速度非常缓慢. 当存在金属离子时, 反应速度显著加速, 即所谓Fenton型Haber-Weiss反应. 缺血时细胞外铁水平增加, 由此可增加羟自由基的生成. 线粒体呼吸链受损和花生四烯酸代谢中也可产生部分氧自由基. 在许多种系中, 胃肠道黄嘌呤脱氢酶的含量远高于其他任何组织. 所以一旦有条件, 胃黏膜将产生大量氧自由基^[12,13]。

3 氧自由基与胃部疾病

3.1 急性胃黏膜损害 自从Itoh和Guth 1985年报道给予SOD和过氧化氢酶可以明显减轻缺血-再灌注引起的胃黏膜损伤以来, 进一步研究证实它们也可以减轻乙醇和NSAIDs引起的急性胃黏膜损害, 从而间接提示在急性胃黏膜损害发病过程中, ROS起了重要作用. Alarcon *et al*^[14]发现给鼠动脉灌注自由基可引起胃黏膜损伤, 而SOD同时灌注可以减轻胃黏膜损伤. Yashimura *et al*^[15]研究表明, 鼠胃腔灌注乙醇后胃黏膜脂质过氧化物(LPO)增加, 自由基清除剂别嘌呤醇能缓解酒精性胃黏膜损伤, 提示乙醇引起的胃黏膜损伤与氧自由基有关. Sakai *et al*^[16]研究兔胃黏膜氧自由基的变化, 发现胃黏膜损伤与氧自由基有密切关系. Brzozowski *et al*^[17]研究证实阿司匹林所致的急性胃黏膜病变过程中存在氧自由基反应, 黏膜组织中LPO产物丙二醛(MDA)的含量明显增高. 其他一些研究也支持上述观点, 但详细机制有待进一步研究^[18-20]. 因此, 氧自由基是急性胃黏膜损害的重要致病因子.

急性胃黏膜损害时氧自由基的来源因病因不同而异: 缺血-再灌注损伤时主要来自黄嘌呤氧化酶; NSAIDs引起的胃黏膜损伤时氧自由基主要来源于白细胞; 酒精性胃黏膜损伤可能来自醛氧化酶^[21-25].

3.2 慢性胃炎 *H. pylori*是慢性胃炎的最主要病因之一, 但其致病机制尚不清楚, 近年来研究提示, *H. pylori*致病可能同氧自由基有关. Shimoyama *et al*^[26]发现*H. pylori*的可溶性蛋白可刺激单核-巨噬细胞产生 $\cdot\text{O}_2^-$; Shimizu *et al*^[27]观察到*H. pylori*提取液在引起鼠胃黏膜急性损伤的同时, 也诱发了胃黏膜MDA的明显增加, 而氧自由基清除剂可明显减轻胃黏膜损伤. Danese *et al*^[28]发现*H. pylori*的超声分解产物对多形核白细胞和单核细胞有趋化活性. Jung *et al*^[29]发现*H. pylori*的无细胞培养上清液可激活白细胞的氧爆发; 与*H. pylori*阴性组比较, *H. pylori*感染者胃黏膜内所有抗氧化物浓度无明显区别, 但氧反应物质化学荧光和丙二酰二醛的浓度升高, 肯定了*H. pylori*阳性患者胃黏膜中存在氧自由基. Suzuki *et al*^[30]研究发现感染*H. pylori*的胃窦黏膜ROS明显增加, 未感染的胃窦黏膜不产生可检测的ROS, 并且ROS与*H. pylori*感染相关. 其他研究亦说明, ROS在*H. pylori*致病中起重要作用, 激活的中性粒细胞"呼吸爆发"可能是氧自由基的主要来源^[31-34].

3.3 消化性溃疡 关于氧自由基致消化性溃疡的机制, 目前认为很可能是氧自由基对黏膜的损伤作用. Lazaratos *et al*^[35]发现自由基生成系亚铁离子/维生素C黏膜内注射可以诱发胃溃疡, 并且伴有脂质过氧化终末产物MDA升高, 给予SOD可以缩小溃疡面积, 降低MDA含量. Bandyopadhyay *et al*^[36]利用药物诱导胃溃疡发生, 也证明氧自由基可直接损害黏膜细胞, 脂质过氧

化参与胃肠黏膜损伤.

Demir *et al*^[37]研究发现胃溃疡患者血清LPO含量明显高于正常对照组, 认为胃溃疡的发生与氧自由基关系较密切. 食物中的超氧化物和过氧化物与铁离子结合, 通过Fenton反应产生羟自由基($\cdot\text{OH}$). $\cdot\text{OH}$ 能引发细胞膜的脂过氧化, 产生过氧化磷脂. 而在金属离子的作用下, 过氧化磷脂又产生碱化脂或过氧化基团, 使氧化链反应进一步放大, 造成广泛的细胞膜和重要生物分子的损害和组织损伤^[38-41].

氧自由基引起消化性溃疡的机制, 可能与以下两方面有关: 一是脂质过氧化损害. 氧自由基与膜内多价不饱和脂肪酸结合, 形成多种LPO, 导致生物膜多价不饱和脂肪酸与蛋白质比例失常, 影响细胞膜的流动性和通透性, 破坏膜上酶和受体功能, 形成新的离子通道, 以致线粒体有大量的 Ca^{2+} 内流, 形成更多的氧自由基. 周而复始, 会使线粒体渗透转运孔开放, 其结果是线粒体膜电位不能保持, 最后造成细胞死亡, 这一过程完成大约需要60 min.

另一方面, 是共价键结合性损伤. 氧自由基作用于含巯基的氨基酸, 使蛋白质变性和酶失活; 作用于辅酶, 使辅酶活性下降; 作用于碳水化合物, 使表面受体改变. 尤其是氧自由基能破坏上皮间质中的透明质酸和胶原纤维网, 促进黏膜损伤^[42-47].

3.4 胃癌 Chang *et al*^[48]研究发现胃癌患者血浆与组织中LPO明显高于对照组, 并且发现胃癌组织中自由基浓度明显比对照组高, 提示自由基可能参与胃癌的发生. 流行病学调查提示, 自由基清除剂维生素C和维生素E的缺乏与胃癌发生有关, 补充维生素C可减少胃黏膜中DNA损害^[49-51].

4 自由基清除剂对胃黏膜损伤的保护作用

4.1 预防性抗氧化剂 包括抗氧化酶和金属络合剂、SOD、CAT、GSH-Px等. SOD是理想的清除自由基的抗氧化剂, 但由于半衰期极短, 且不稳定, 限制了它的临床应用. 研究报道^[52-57], 自由基清除剂别嘌呤能促进溃疡愈合, 明显降低溃疡的复发率. 含SH的化合物有清除自由基的作用, 研究证明氧化型的SH化合物如硫糖铝有促进溃疡愈合, 防止复发的作用. 此外, 某些中药成分如银杏内酯A能明显减轻束缚水浸应激引起的大鼠胃黏膜溃疡的产生, 其抗溃疡作用也可能和减少自由基产生和增加其清除有关.

4.2 连锁反应阻断剂 包括水溶性抗氧化剂谷胱甘肽、维生素C、葡萄糖等, 脂溶性抗氧化剂维生素E、类胡萝卜素、甘露醇等.

瑞巴派特(rebamipide)是一种新的黏膜保护药, 通过抗氧化作用对多种氧自由基产生损伤的动物模型具有抗损伤保护作用; 促进胃黏膜内源性PG的合成释放,

保护胃黏膜, 增加胃黏膜血流量, 从而对溃疡的发生和发展产生抑制作用, 减少溃疡的发生^[58]。

5 参考文献

- Shi X, Zhao F, Dai X, Dong X, Fang J, Yang H. Effects of san qi on gastric secretion and protective factors of gastric mucosa in the rat with precancerous lesion of stomach. *J Tradit Chin Med* 2003; 23: 220-224
- Morgan C, Jenkins GJ, Ashton T, Griffiths AP, Baxter JN, Parry EM, Parry JM. Detection of p53 mutations in precancerous gastric tissue. *Br J Cancer* 2003; 89: 1314-1319
- Kasazaki K, Yasukawa K, Sano H, Utsumi H. Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in NH₄OH-induced gastric lesions of rats using a 300 MHz *in vivo* ESR technique. *Free Radic Res* 2003; 37: 757-766
- Waluga M, Hartleb M. Alcoholic liver disease. *Wiad Lek* 2003; 56: 61-70
- Baldari CT, Lanzavecchia A, Telford JL. Immune subversion by *Helicobacter pylori*. *Trends Immunol* 2005; 26: 199-207
- Muraoka S, Miura T. Salicylic acid-induced inactivation of creatine kinase in the presence of lactoperoxidase and H₂O₂. *Chem Biol Interact* 2005; 151: 63-70
- Villegas I, Martin AR, Toma W, de la Lastra CA. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia-reperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation. *Eur J Pharmacol* 2004; 505: 195-203
- De Luca A, Iaquinto G. *Helicobacter pylori* and gastric diseases: a dangerous association. *Cancer Lett* 2004; 213:1-10
- Maity P, Biswas K, Roy S, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer recent mechanistic update. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 329-338
- Kim CJ, Cho YG, Park CH, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Genetic alterations of the MYH gene in gastric cancer. *Oncogene* 2004; 23: 6820-6822
- Yasukawa K, Kasazaki K, Hyodo F, Utsumi H. Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in rats with water immersion restraint-induced gastric lesions using *in vivo* electron spin resonance spectroscopy. *Free Radic Res* 2004; 38: 147-155
- Singh P, Bhargava VK, Garg SK. Effect of melatonin and beta-carotene on indomethacin induced gastric mucosal injury. *Indian J Physiol Pharmacol* 2002; 46: 229-234
- Nagahashi S, Suzuki H, Miyazawa M, Nagata H, Suzuki M, Miura S, Ishii H. Ammonia aggravates stress-induced gastric mucosal oxidative injury through the cancellation of cytoprotective heat shock protein 70. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1073-1081
- Alarcon de la Lastra C, Nieto A, Martin MJ, Cabre F, Herrerias JM, Motilva V. Gastric toxicity of racemic ketoprofen and its enantiomers in rat: oxygen radical generation and COX-expression. *Inflamm Res* 2002; 51:51-57
- Yoshimura T, Sugata H. Alcohol scavenges nitric oxide in gastric lumen. *Nitric Oxide* 2002; 6: 347-352
- Sakai H, Ohira Y, Tanaka A, Suzuki T, Ikari A, Morii M, Takeguchi N. Inhibition of small-conductance Cl⁻ channels by the interleukin-1beta-stimulated production of superoxide in rabbit gastric parietal cells. *J Physiol* 2003; 551: 207-217
- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Sliwowski Z, Pajdo R, Duda A, Ptak A, Hahn EG. Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 320-329
- Brzozowski T, Kwiecien S, Konturek PC, Konturek SJ, Mitis-Musiol M, Duda A, Bielanski W, Hahn EG. Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. *Med Sci Monit* 2001; 7: 592-599
- Pohle T, Brzozowski T, Becker JC, Van der Voort IR, Markmann A, Konturek SJ, Moniczewski A, Domschke W, Konturek JW. Role of reactive oxygen metabolites in aspirin-induced gastric damage in humans: gastroprotection by vitamin C. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 677-687
- Izgit-Uysal VN, Agac A, Derin N. Effect of carnitine on stress-induced lipid peroxidation in rat gastric mucosa. *J Gastroenterol* 2001; 36: 231-236
- Dobrilla G. Nitric oxide and gastroduodenal damage caused by NSAIDs. Recent findings and clinical implications. *Recent Prog Med* 2001; 92: 234-238
- Sieron A, Kawczyk-Krupka A, Gadowska-Cicha A. The role of free radicals in inflammatory states, ulceration, and ulcers of the stomach and duodenum. *Pol Merkuriusz Lek* 2001; 10: 113-116
- Beck PL, Xavier R, Lu N, Nanda NN, Dinanuer M, Podolsky DK, Seed B. Mechanisms of NSAID-induced gastrointestinal injury defined using mutant mice. *Gastroenterology* 2000; 119: 699-705
- Villegas I, Martin MJ, La Casa C, Motilva V, Alarcon de la Lastra C. Effects of meloxicam on oxygen radical generation in rat gastric mucosa. *Inflamm Res* 2000; 49: 361-366
- 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
- Shimoyama T, Fukuda S, Liu Q, Nakaji S, Fukuda Y, Sugawara K. *Helicobacter pylori* water soluble surface proteins prime human neutrophils for enhanced production of reactive oxygen species and stimulate chemokine production. *J Clin Pathol* 2003; 56: 348-351
- Shimizu T, Lee T, Shoji H, Kudo T, Satoh Y, Yamashiro Y. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in children before and after therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Acta Paediatr* 2003; 92: 1026-1028
- Danese S, Cremonini F, Armuzzi A, Candelli M, Papa A, Ojetti V, Pastorelli A, Di Caro S, Zannoni G, De Sole P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* CagA-positive strains affect oxygen free radicals generation by gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 247-250
- Jung HK, Lee KE, Chu SH, Yi SY. Reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1336-1340
- Suzuki M, Suzuki H, Kitahara T, Miyazawa M, Nagahashi S, Suzuki K, Ishii H. Proton pump inhibitor modifies inflammatory reaction in human gastric mucosa infected by *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:229-334
- Bhattacharjee M, Bhattacharjee S, Gupta A, Banerjee RK. Critical role of an endogenous gastric peroxidase in controlling oxidative damage in *H pylori*-mediated and nonmediated gastric ulcer. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 731-743
- Gurer MA, Erel A, Erbas D, Caglar K, Atahan C. The seroprevalence of *Helicobacter pylori* and nitric oxide in acne rosacea. *Int J Dermatol* 2002; 41: 768-770
- Tennenberg SD, Dekhne N, Gordon D, Weller J, McCurdy B, Lange P, Kozol RA. *Helicobacter pylori* products upregulate neutrophil superoxide anion production. *Int J Surg Investig* 1999; 1: 301-306
- Santra A, Chowdhury A, Chaudhuri S, Das Gupta J, Banerjee PK, Mazumder DN. Oxidative stress in gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Indian J Gastroenterol* 2000; 19: 21-23
- Lazaratos S, Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Goto K, Nakahara A. Oxygen radicals mediate the final exacerbation of endothelin-1-induced gastric ulcer in rat. *Eur J Pharmacol* 2001; 413: 121-129
- Bandyopadhyay D, Biswas K, Bhattacharyya M, Reiter RJ, Banerjee RK. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced

- by oxygen-derived reactive species: protection by melatonin. *Curr Mol Med* 2001; 1: 501-513
- 37 Demir S, Yilmaz M, Koseoglu M, Akalin N, Aslan D, Aydin A. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. *Turk J Gastroenterol* 2003; 14: 39-43
- 38 Sanchez S, Martin MJ, Ortiz P, Motilva V, Herrerias JM, Alarcon de la Lastra C. Role of prostaglandins and nitric oxide in gastric damage induced by metamizol in rats. *Inflamm Res* 2002; 51: 385-392
- 39 Uslu E, Aydin S, Carkman S, Uzun H, Altinli E, Apaydin BB, Memisoglu K, Erginoz E. Effects of gender on stress ulcer formation in rats. *Tohoku J Exp Med* 2002; 197: 17-26
- 40 Villegas I, Martin MJ, La Casa C, Motilva V, De La Lastra CA. Effects of oxicam inhibitors of cyclooxygenase on oxidative stress generation in rat gastric mucosa. A comparative study. *Free Radic Res* 2002; 36: 769-777
- 41 Bilici D, Suleyman H, Banoglu ZN, Kiziltunc A, Avci B, Ciftcioglu A, Bilici S. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 856-861
- 42 Moriya A, Grant J, Mowat C, Williams C, Carswell A, Preston T, Anderson S, Iijima K, McColl KE. *In vitro* studies indicate that acid catalysed generation of N-nitrosocompounds from dietary nitrate will be maximal at the gastro-oesophageal junction and cardia. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 253-261
- 43 Snygg J, Fandriks L, Bengtsson J, Holm M, Pettersson A, Aneman A. Jejunal luminal nitric oxide during severe hypovolemia and sepsis in anesthetized pigs. *Intensive Care Med* 2001; 27: 1807-1813
- 44 Kawanaka H, Tomikawa M, Jones MK, Szabo IL, Pai R, Baatar D, Tsugawa K, Sugimachi K, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. Defective mitogen-activated protein kinase (ERK2) signaling in gastric mucosa of portal hypertensive rats: potential therapeutic implications. *Hepatology* 2001; 34: 990-999
- 45 Motilva V, Cabeza J, Alarcon de la Lastra C. New issues about melatonin and its effects on the digestive system. *Curr Pharm Des* 2001; 7: 909-931
- 46 Cabeza J, Motilva V, Martin MJ, de la Lastra CA. Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats. *Life Sci* 2001; 68: 1405-1415
- 47 Hariganesh K, Prathiba J. Effect of dimethylglycine on gastric ulcers in rats. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 1519-1522
- 48 Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2232-2240
- 49 Du MQ, Isaccson PG. Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. *Lancet Oncol* 2002; 3: 97-104
- 50 Teshima S, Kutsumi H, Kawahara T, Kishi K, Rokutan K. Regulation of growth and apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells by mitogenic oxidase 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: 1169-1176
- 51 Zullo A, Rinaldi V, Hassan C, Diana F, Winn S, Castagna G, Attili AF. Ascorbic acid and intestinal metaplasia in the stomach: a prospective, randomized study. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1303-1309
- 52 Colpaert EE, Timmermans JP, Lefebvre RA. Immunohistochemical localization of the antioxidant enzymes biliverdin reductase and heme oxygenase-2 in human and pig gastric fundus. *Free Radic Med* 2002; 32: 630-637
- 53 El-Missiry MA, El-Sayed IH, Othman AI. Protection by metal complexes with SOD-mimetic activity against oxidative gastric injury induced by indomethacin and ethanol in rats. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 694-700
- 54 Stetinova V, Grossmann V. Effects of known and potential antioxidants on animal models of pathological processes (diabetes, gastric lesions, allergic bronchospasm). *Exp Toxicol Pathol* 2000; 52: 473-479
- 55 Snygg J, Aneman A, Pettersson A, Fandriks L. Jejunal mucosal nitric oxide production and substrate dependency during acute mesenteric hypoperfusion in pigs. *Crit Care Med* 2000; 28: 2563-2566
- 56 Konturek PC, Duda A, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecien S, Drozdowicz D, Pajdo R, Meixner H, Hahn EG. Activation of genes for superoxide dismutase, interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and intercellular adhesion molecule-1 during healing of ischemia-reperfusion-induced gastric injury. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 452-463
- 57 Othman AI, El-Missiry MA, Amer MA. The protective action of melatonin on indomethacin-induced gastric and testicular oxidative stress in rats. *Redox Rep* 2001; 6: 173-177
- 58 Hong WS, Jung HY, Yang SK, Myung SJ, Kim JH, Min YI, Chung MH, Lee HS, Kim HW. The antioxidant effect of rebamipide on oxygen free radical production by *H pylori*-activated human neutrophils: in comparison with N-acetylcysteine, ascorbic acid and glutathione. *Pharmacol Res* 2001; 44: 293-297

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

幽门螺杆菌与胃黏膜保护研究进展

林辉, 任建林

林辉, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化病研究所 福建省厦门市 361004
通讯作者: 林辉, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化病研究所. niliuhfz@yahoo.com.cn
电话: 0592-2292016 传真: 0592-2292017
收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

摘要

幽门螺杆菌(*H pylori*)是一种革兰阴性, S形或弧形弯曲的细菌, 基因序列呈环形, 大小为1 667 867 bp(*H pylori* 26 695), 有1 590个开放阅读框(ORFs), 定居于胃上皮细胞表面, 与慢性胃炎、消化性溃疡、胃腺癌等上消化道疾病关系密切。*H pylori*产生的毒素(如空泡细胞毒素与细胞毒素相关蛋白)和酶能破坏胃黏膜屏障, 使机体产生炎症和免疫反应, 影响胃酸、胃肠激素的分泌, 引起胃上皮细胞的凋亡。

关键词: 幽门螺杆菌; 胃黏膜保护

林辉, 任建林. 幽门螺杆菌与胃黏膜保护研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2586-2590
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2586.asp>

0 引言

1983年澳大利亚皇家佩思医院的病理科医师Warren和实习医师Marshall^[1]首次成功分离出幽门螺杆菌(*H pylori*), 揭开了人类研究*H pylori*与胃肠疾病关系的序幕, 彻底改变了很多胃肠道疾病的理论. 现已明确, *H pylori*与慢性胃炎、消化性溃疡、胃腺癌和黏膜相关性淋巴样组织(MALT)淋巴瘤密切相关^[2-6]. *H pylori*呈螺旋形, 有鞭毛、适应性的酶和蛋白, 使它能在胃腔不利的酸性环境中定植和生存. *H pylori*产生的毒素和有毒素作用的酶能破坏胃黏膜屏障; *H pylori*感染还能使机体产生炎症和免疫反应, 影响胃酸、胃肠激素的分泌, 引起胃上皮细胞的凋亡, 导致一系列疾病的形成。

1 *H pylori*的形态结构特征

*H pylori*是一种革兰阴性, S形或弧形弯曲的细菌. 电镜下, 菌体的一端可见4-7条带鞘的鞭毛. 分裂时, 则两端均可见鞭毛^[7,8]. *H pylori*有很强的运动能力, 可以穿透覆盖于胃黏膜上皮细胞的黏液层, 定居于胃上皮细胞表面. 1997年*H pylori* 26 695的全基因序列

已测序完毕, 基因序列呈环形, 大小为1 667 867 bp, 有1 590个开放阅读框(ORFs), 占到其染色体DNA的91%^[9].

2 *H pylori*对胃黏膜屏障的损害

在正常的胃黏膜上, 由黏膜上皮分泌的黏液和上皮细胞以及细胞连结组成了胃黏膜屏障. 这种屏障起着防止H⁺反向弥散的作用. 1998年Goodwin *et al*^[10]提出了"漏屋顶"假说, 比较形象地比喻了*H pylori*对胃黏膜屏障损害的后果. 他把胃黏膜屏障比喻为"屋顶", 它能保护其下方的黏膜组织免受胃酸("雨")的损伤, 当黏膜受到*H pylori*的损害时(形成"漏屋顶"), 就会造成H⁺反向弥散(形成"泥水浆"), 导致黏膜的损伤和溃疡形成. *H pylori*的毒素和有毒素作用的酶以及*H pylori*诱导的黏膜炎症反应均能造成胃黏膜屏障的损伤。

2.1 空泡细胞毒素与细胞毒素相关蛋白 1988年Leunk *et al*^[11]等发现*H pylori*肉汤培养基的上清液中含有一种相对分子质量为M_r87 000的细胞毒素, 它能使Hela细胞造成不同程度的空泡变性. 这种毒素称为空泡细胞毒素(vacuolating cytotoxin, VacA). 编码VacA的基因为vacA, vacA基因在所有的*H pylori*菌株中均存在, 但仅有50%左右的*H pylori*菌株有VacA蛋白的表达. VacA对胃上皮细胞有直接的毒性作用^[12], 可造成胃黏膜的损伤和延缓胃上皮的修复. Li *et al*^[13]研究表明VacA诱导的后期细胞吞颗粒的聚集与核周重分布是VacA致细胞空泡变性的重要机制, 有利于*H pylori*持续地定植于胃黏膜表面. 而Suzuki *et al*^[14]却发现VacA能使胃黏膜凝血酶的产生增加, 而凝血酶在*H pylori*相关性上胃肠道疾病中起了积极的保护作用。

Cover *et al*^[15]发现, 在VacA阳性的*H pylori*培养液中存在一种相对分子质量为M_r128 000的蛋白质, 这种物质被称为细胞毒素相关蛋白(cytotoxin associating gene protein, CagA). 编码CagA的基因为cagA, 它仅存在于60-70%的*H pylori*菌株中, 但几乎所有的cagA阳性菌株均可产生CagA蛋白. CagA是一种免疫显性抗原, 可诱导宿主产生抗CagA抗体. 但无论循环抗体或胃黏膜局部抗体, 均不能清除体内*H pylori*感染, 表明CagA为非保护性抗原。

Censini *et al*^[16]对CagA阳性的CCUG17874 *H pylori*菌株进行DNA分析后, 提出cagA致病岛(pathogenicity island, PAI)的概念. CagA PAI是*H pylori*环状基因组中

40 kb长的DNA插入序列, 可编码31个推测与毒素及毒素装配和分泌机能相关的蛋白. CagA PAI可分为cagA I区域和cagA II区域, 其中cagA I区域含cagA-cagI, cagL-cagR等开放读框, cagA II区域含cagS, cagT等开放读框. CagA被认为是一新的毒素外排分泌系统, 即cagA致病岛的血清学标志之一^[17]. Xiang *et al*^[18]根据其cagA蛋白的有无将大多数*H pylori*临床分离菌分为两型, I型菌: 有cagA, 表达CagA蛋白, 具有毒素活性; II型菌: 无cagA, 不表达CagA蛋白, 无毒素活性. 研究证实cagA基因的存在是产生有活性的空泡毒素(VacA)所必须的, 并能促进细胞因子IL-8的释放及激活转录因子NF- κ B, 加重胃黏膜的组织损伤, 故而目前认为含cagA基因的*H pylori*菌株是高毒株^[19].

目前研究表明^[20-22], CagA能被cagA-PAI编码的IV型分泌系统转运入宿主细胞, 并在其中被磷酸化; 磷酸化CagA聚集在细菌黏附部位的宿主细胞中, 形成圆柱状结构, 并募集细胞骨架中的肌动纤维等成分, 形成底座结构, 导致宿主细胞出现极度延伸、分散生长等类似于肝细胞生长因子作用的效应. 这些作用可能与CagA⁺菌株致胃癌有关. 不同*H pylori*菌株CagA分子内磷酸化位点多少不一致, 其中有些菌株可缺如(J99), 而有些菌株则可因IV型分泌系统功能缺陷而无法将CagA转运入宿主细胞(26695), 这些因素都可能影响CagA磷酸化和相应功能的发挥. 这可能是CagA⁺菌株感染与疾病关系在各地呈现复杂多样性的原因之一. Bauer *et al*^[23]发现不仅细菌而且宿主细胞的因素共同决定胃黏膜上皮细胞对*H pylori*感染的反应, 从而产生不同的临床表现: 胃炎、胃溃疡或胃癌.

2.2 尿素酶 尿素酶产生的氨能降低黏液中黏蛋白的含量, 破坏黏液的离子完整性, 削弱屏障功能, 造成H⁺反向弥散^[24]. 氨还消耗需氧细胞的 α -酮戊二酸, 破坏三羧酸循环, 干扰细胞的能量代谢, 造成细胞变性^[25]. 有研究显示, 高浓度的氨可导致细胞的空泡变性, 其结果类似于VacA所致的空泡变性^[26]. 从细菌表面脱落的尿素酶除了可使细菌逃避宿主的免疫防御机制外, 尿素酶本身还可直接造成宿主的组织损害, 或改变宿主的免疫反应^[27].

2.3 黏液酶 胃黏液胶层的主要成分为黏蛋白, 是富含碳水化合物的高分子糖蛋白, 在胃黏液屏障中起重要的作用. 这些黏蛋白可防止胃黏膜受到化学物质(如胃酸), 各种消化酶、食物的机械磨擦和微生物因素的损害. *H pylori*能产生一种溶解黏液的酶, 体外研究显示黏液酶使猪胃黏液的黏性和弹性丧失^[28]. 胃黏液的降解会促进H⁺的反向弥散, 造成黏膜损害, 黏液的稠度降低有利于*H pylori*的运动, 使*H pylori*易于定植. *H pylori*感染可抑制黏蛋白的分泌, 机制尚不清楚^[29], 可能为*H pylori*的分泌产物直接影响黏蛋白的基因转录, 或影响其mRNA的易位和绞接. 而Al-Marhoon *et al*^[30]检测

了*H pylori*阳性和阴性胃黏液层的厚度, 发现两者之间的差别无统计学意义.

2.4 脂多糖 层黏连蛋白是维持上皮完整性所需的一种细胞外基质, *H pylori*产生的脂多糖(LPS)能抑制宿主层黏连蛋白和嵌有脂质体的层黏连蛋白受体的结合, 造成宿主胃上皮发生渗漏, 导致胃黏膜的损害^[31], 抑制程度与LPS的量呈正相关. 此外, *H pylori*还可与细胞外基质的IV型胶原、纤溶酶原和玻璃体结合蛋白等物质作用, 造成上皮下组织的损伤.

2.5 脂酶和磷脂酶A 正常上皮细胞膜由磷脂双分子层构成, 胃黏液中的脂质和磷脂在维持其黏性, 防止H⁺反向弥散, 保持疏水性上起重要作用. *H pylori*的脂酶和磷脂酶A可分解细胞膜及黏液中的脂质和磷脂, 破坏细胞膜的完整性和黏液的屏障功能^[32]. 磷脂酶A还能促使花生四烯酸的释放, 形成前列腺素和血栓素等炎症介质, 介导炎症反应. 磷脂类物质的降解产物溶血卵磷脂对细胞亦有毒性作用.

3 *H pylori*介导炎症和免疫反应

3.1 炎症反应 *H pylori*一旦定植于胃黏膜上, 胃上皮细胞就会发生细胞骨架重组和酪氨酸磷酸化, 进而激活核因子NF- κ B. NF- κ B是一种转录因子, 可使上皮细胞或其他细胞分泌IL-8以及其他趋化因子, 趋化和激活炎症细胞, 使它们从血管内移行至胃上皮处, 导致炎症反应^[24,26,33]. 此外, *H pylori*感染后中性粒细胞和巨噬细胞释放的炎性介质和细胞因子包括前列腺素、白三烯、血栓素、TNF α 和各种IL等, 对胃上皮细胞有直接的细胞毒性作用. 在炎症反应中炎症细胞的迁移可破坏黏膜上皮的紧密连接, 肥大细胞脱颗粒释放的组胺, 前列腺素PGD2和白三烯能扩张血管, 增加血管的通透性, 使胃黏膜产生水肿. 炎症细胞还可产生反应性氧代谢物(ROS), 反应性氮代谢物(RNS), 损害胃黏膜^[34].

3.2 免疫反应 *H pylori*感染时胃上皮细胞可递呈抗原, 起着"非专业性"APC的作用, 可介导免疫反应^[35]. APC是指能捕捉、加工和处理抗原, 并将抗原递呈给抗原特异性淋巴细胞的一类免疫细胞. T淋巴细胞激活后引起两种应答: Th1和Th2应答. Th1细胞参与细胞介导的免疫应答, 分泌IL-2、IFN- γ 和TNF β , 对宿主造成胃上皮的损伤; Th1应答释放的炎性细胞因子可增加Fas抗原的表达, 诱导上皮细胞的凋亡. Th2细胞参与黏膜表面的分泌性免疫应答和过敏反应, 分泌IL-4、IL-5、IL-6、IL-10等细胞因子, 有利于宿主消除细菌. *H pylori*感染时以Th1应答为主, *H pylori*的菌株类型, 宿主的遗传因素, 环境因素及胃黏膜上皮表达的淋巴细胞功能抗原(LFA-3)可增强Th1应答^[34,36,37].

*H pylori*感染可刺激浆细胞产生局部和全身的*H pylori*特异性抗体, 参与体液免疫反应, 这种抗体多半为非分泌型IgA, 不能很好地与补体结合清除细菌,

却可造成宿主自身的损伤,如自身抗体可造成胃上皮的损伤^[38].

4 *H pylori*影响胃酸、胃肠激素的分泌

4.1 对胃酸分泌的影响 *H pylori*感染后胃酸的分泌取决于所致胃炎的类型(是胃体为主还是胃窦为主)以及胃黏膜的萎缩程度.非萎缩性胃窦为主的胃炎可增加胃酸分泌,其机制可能是生长抑素分泌减少,胃泌素水平增加促使胃酸分泌增加.萎缩性全胃炎(累及胃窦和胃体,并以胃体为主)可导致胃酸分泌减少,可能的机制:胃窦部的黏膜萎缩造成G细胞数量减少,胃泌素分泌减少;胃体部黏膜萎缩导致壁细胞的数量减少,使胃酸分泌减少;胃体部的炎症损害了壁细胞的功能,炎症产生的细胞因子可影响胃酸的分泌,有研究证实*H pylori*感染产生的IL-1 β 可强有力地抑制胃酸分泌. Liu *et al*^[39]报道*H pylori*感染使胃黏膜G细胞增多, D细胞减少,从而影响胃酸的分泌.多数*H pylori*感染者的胃黏膜萎缩很轻,胃炎以胃窦部较为明显,但亦影响部分胃体黏膜,胃酸分泌没有改变^[40,41]. Thong-Ngam *et al*^[42]研究发现慢性胃炎中胃黏膜H⁺/K⁺-ATP酶的活性与*H pylori*的感染状态无关.

4.2 对胃肠激素分泌的影响

4.2.1 促胃液素 *H pylori*感染致高促胃液素血症是公认事实,根除*H pylori*则血清促胃液素水平下降至正常范围^[43,44].促胃液素的生理-病理意义之一,是胃酸产生和胃酸形成. *H pylori*感染出现的高促胃液素血症为细胞素所致, TNF- α 及IL-8均可刺激G细胞,增加促胃液素的释放^[45,46].此外, *H pylori*的脂多糖(LPS)通过抑制SS与胃黏膜上的受体结合,减少SS在胃黏膜G细胞上的SS-受体结合,减少SS对G细胞的抑制,促胃液素分泌增多^[47,48].

4.2.2 生长抑素(SS) *H pylori*感染时胃窦黏膜、胃液中的SS含量均下降, D细胞数目和SS的mRNA表达也减少;根除*H pylori*后这些指标均恢复,提示*H pylori*抑制SS的释放^[49].研究表明: *H pylori*感染时胃液中TNF- α 和IL-8分泌增多^[50-52], TNF- α 能剂量依赖地增加SS释放,且此效应可被IL-8所增强^[53]. SS对G细胞有抑制作用, SS减少时促胃液素分泌增多,同时SS在人胃腔中有抑制*H pylori*增殖的作用^[54,55].促胃液素刺激和SS抑制壁细胞释放胃酸,共同保持胃酸分泌的平衡.

4.2.3 生长因子EGF及TGF α EGF和TGF α 通过同一受体(即EGFr)而起作用.它们对胃肠道的作用有促进细胞增生、溃疡愈合、抑制胃酸分泌等^[56]. *H pylori*急性接触体外培养的胃黏膜细胞,即引起细胞损伤,并损及细胞的移行和增殖; EGF相关生长因子,能保护胃黏膜免受损伤,且使损伤的黏膜愈合. *H pylori*抑制EGF与其受体结合,和抑制EGF刺激的胃细胞增殖,是溃疡生

成和难以愈合的机制^[57,58].而最近Liu *et al*^[59]报道在*H pylori*感染的慢性胃炎患者EGFr明显增高, *H pylori*感染可以促进胃黏膜细胞的增殖. Schiemann *et al*^[60]报道根除*H pylori*后,萎缩性胃炎胃黏膜中的TGF α 的mRNA表达明显上调. *H pylori*感染时胃黏膜的C-myc基因蛋白和EGFr呈过分表达,可能为胃黏膜上皮过分增殖的分子基础^[61,62].

5 *H pylori*引起胃上皮细胞的凋亡

*H pylori*感染可导致胃上皮细胞的凋亡^[63,64].有研究显示^[65], *H pylori*感染者胃黏膜上有平均数为16.8%的上皮细胞发生凋亡,主要位于胃腺的深部,而根除感染后凋亡数下降至3.1%.无*H pylori*感染者仅有2.9%的上皮细胞发生凋亡,主要位于胃腺的表浅部位. *H pylori*感染所致的细胞凋亡机制可能与以下因素有关^[66]: (1) *H pylori*感染后产生的炎性细胞因子可增加Fas抗原的表达, Fas抗原是一种细胞表面的膜蛋白,与Fas配体结合后可诱导细胞的凋亡; (2) *H pylori*可通过两种通路导致胃上皮细胞凋亡, Caspase-8在II型通路中起了非常重要的作用; (3) 炎性细胞因子如TGF α 和IFN- γ 除了可直接诱导细胞凋亡外,还可促进上皮细胞表达主要组织相容复合物II (MHC-II)抗原,通过Th1应答介导的损伤造成细胞凋亡. TNF相关凋亡诱导因子(TRAIL)和它的受体、FasL及*H pylori*在诱导胃黏膜上皮细胞凋亡中有着复杂的相互作用^[67]; (4) Das *et al*^[68]用蛋白芯片技术发现*H pylori*感染后胃黏膜上皮细胞的Annexin II表达升高可能是*H pylori*引起胃上皮细胞的凋亡和增生机制之一.胃上皮细胞的过度凋亡有利于糜烂和溃疡形成,凋亡时程序错误或凋亡与增生不平衡则可导致肿瘤形成^[69]. Hritz *et al*^[70]研究表明长期的PPI治疗并没有显著地增加胃上皮细胞增殖和表皮生长因子受体的表达,对胃上皮细胞凋亡和p53基因的表达没有影响.

总之, *H pylori*感染与胃黏膜保护的研究至今已20 a,取得了许多可喜的成绩,但以后的研究道路将更加坎坷;随着后基因组时代的到来,分子生物学高通量分析方法的广泛应用,人类征服*H pylori*已为期不远.

6 参考文献

- 1 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315
- 2 Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 20-31
- 3 Hou P, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Ji XH, Li ZS. *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA status and their relationship to associated diseases. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 605-607
- 4 Pinto-Santini D, Salama NR. The Biology of *Helicobacter pylori* Infection, a Major Risk Factor for Gastric Adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1853-1858
- 5 庄小强, 林三仁. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展. *世界华人消化杂志*

- 志 2000; 8: 206-207
- 6 Morgner A, Bayerdorffer E, Neubauer A, Stolte M. Gastric MALT lymphoma and its relationship to *Helicobacter pylori* infection: management and pathogenesis of the disease. *Microsc Res Tech* 2000; 48: 349-356
- 7 张振华, 杜佩英, 俞爱琴. 幽门弯曲菌超微结构及其与胃黏膜上皮的关系. 上海第二医科大学学报 1989; 9: 2277-2812
- 8 Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 1-13
- 9 Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk H pylori, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547
- 10 Goodwin CS, Duodenal ulcer, *Campylobacter pylori*, and the "leaking roof" concept. *Lancet* 1988; 2: 1467-1469
- 11 Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxin activity in broth culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988; 26: 93-99
- 12 Figueiredo C, Machado JC, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2005; 10 Suppl 1:14-20
- 13 Li Y, Wandering-Ness A, Goldenring JR, Cover TL. Clustering and redistribution of late endocytic compartments in response to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 1946-1959
- 14 Suzuki Y, Gabazza EC, Imoto I, James RF, Hirayama T, Wada A, Horiki N, Nakamura M, Inoue H, Kuroda M, Ogura A, Taguchi Y, Yano Y, Taguchi O, Suzuki K, Adachi Y. Vacuolating cytotoxin A is associated with increased thrombin generation in gastric mucosa. *Helicobacter* 2005; 10: 323-331
- 15 Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 1990; 58: 603-610
- 16 Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I specific and disease associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14648-14653
- 17 Atherton JC, *H pylori* virulence factors. *Br Med Bull* 1998; 54: 105-120
- 18 Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A. Analysis of expression of cagA and vacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that cagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 1995; 63: 94-98
- 19 Yokoyama K, Higashi H, Ishikawa S, Fujii Y, Kondo S, Kato H, Azuma T, Wada A, Hirayama T, Aburatani H, Hatakeyama M. Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9661-9666
- 20 Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; 287: 1497-1500
- 21 Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14559-14564
- 22 Bourzac KM, Guillemin K. *Helicobacter pylori*-host cell interactions mediated by type IV secretion. *Cell Microbiol* 2005; 7: 911-919
- 23 Bauer B, Moese S, Bartfeld S, Meyer TF, Selbach M. Analysis of cell type-specific responses mediated by the type IV secretion system of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2005; 73: 4643-4652
- 24 Hazell SL, Lee A. *Campylobacter pyloridis*, urease, hydrogen ion back diffusion, and gastric ulcer. *Lancet* 1986; 2: 15-17
- 25 Marshall BJ, *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: S116-S128
- 26 Xu JK, Goodwin CS, Cooper M, Robinson J. Intracellular vacuolization caused by the urease of *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* 1990; 161: 1302-1304
- 27 Windsor hm, O'Rourke J. Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 633-648
- 28 Sarosiek J, Bilski J, Murty VL, Slomiany A, Slomiany BL. Colloidal bismuth subcitrate (De-Nol) inhibits degradation of gastric mucus by *Campylobacter pylori* protease. *Am J Gastroenterol* 1989; 84: 506-510
- 29 Byrd JC, Yunker CK, Xu QS, Sternberg LR, Bresalier RS. Inhibition of gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2000; 118: 1072-1079
- 30 Al-Marhoon MS, Nunn S, Soames RW. Effects of cagA⁺ and cagA⁻ strains of *Helicobacter pylori* on the human gastric mucus layer thickness. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1246-1252
- 31 Slomiany BL, Piotrowski J, Sengupta S, Slomiany A. Inhibition of gastric mucosal laminin receptor by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; 175: 963-970
- 32 Slomiany BL, Nishikawa H, Piotrowski J, Okazaki K, Slomiany A. Lipolytic activity of *Campylobacter pylori*: Effect of sofalcone. *Digestion* 1989; 43: 33-40
- 33 Brandt S, Kwok T, Hartig R, Konig W, Backert S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9300-9305
- 34 Go MF, Crowe S E. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 649-670
- 35 Zevering Y, Jacob L, Meyer TF. Naturally acquired human immune responses against *Helicobacter pylori* and implication for vaccine development. *Gut* 1999; 45: 465-474
- 36 Blanchard TG, Czinn S J. Immunology of *Helicobacter pylori* and prospects for vaccine. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 671-685
- 37 Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, Brooks EG, Graham DY, Reyes VE, Ernst PB. Lymphocytes in the human gastric tissue during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 1998; 114: 482-492
- 38 Rathbone BJ, Wyatt JL, Worsley BW, Shires SE, Trejdosiewicz LK, Heatley RV, Losowsky MS. Systemic and local antibody responses to gastric campylobacter pyloridis in non-ulcer dyspepsia. *Gut* 1986; 27: 642-647
- 39 Liu Y, Vosmaer GD, Tytgat GN, Xiao SD, Ten Kate FJ. Gastrin (G) cells and somatostatin (D) cells in patients with dyspeptic symptoms: *Helicobacter pylori* associated and non-associated gastritis. *J Clin Pathol* 2005; 58: 927-931
- 40 McColl KE, El-Omar E, Gillen D. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 687-703
- 41 McColl KE, El-Omar E, Gillen D. Interactions between *Helicobacter pylori* infection, gastric-acid secretion and antiseptary therapy. *Bri Med Bull* 1998; 54: 121-138
- 42 Thong-Ngam D, Tangkijvanich P, Sampatanukul P, Prichakas P, Mahachai V, Tosukowong P. Direct measurement of gastric H⁺/K⁺-ATPase activities in patients with or without *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3514-3517
- 43 Maconi G, Lazzaroni M, Sangaletti O, Bargiggia S, Vago L, Porro GB. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastric histology, serum gastrin and pepsinogen I levels, and gastric emptying in patients with gastric ulcer. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1844-1848
- 44 Ohkusa T, Takashimizu I, Fujiki K, Araki A, Honda K, Shimoi

- K, Sakurazawa T, Horiuchi T, Suzuki S, Ariake K, Ishii K. Changes in serum pepsinogen gastrin, and immunoglobulin G antibody titers in *Helicobacter pylori*-positive gastric ulcer after eradication of infection. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25: 317-322
- 45 Beales IL, Post L, Calam J, Yamada T, Delvalle J. Tumour necrosis factor alpha stimulates gastrin release from canine and human antral G cells: possible mechanism of the *Helicobacter pylori*-gastrin link. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 609-611
- 46 Beales I, Blaser MJ, Srinivasan S, Calam J, Perez-Perez GI, Yamada T, Scheiman J, Post L, Del Valle J. Effect of *Helicobacter pylori* products and recombinant cytokines on gastrin release from cultured canine G cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 465-471
- 47 Piotrowski J, Slomiany A, Slomiany BL. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide inhibition of gastric somatostatin receptor: effect of sucralfate. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 42: 545-551
- 48 Piotrowski J, Skrodzka D, Slomiany A, Slomiany BL. Reversal of gastric somatostatin receptor inhibition by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with ebrotidine and sulglycotide. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 705-718
- 49 Yamashita K, Kaneko H, Yamamoto S, Konagaya T, Kusugami K, Mitsuma T. Inhibitory effect of somatostatin on *Helicobacter pylori* proliferation *in vitro*. *Gastroenterology* 1998; 115: 1123-1130
- 50 Xuan J, Deguchi R, Yanagi H, Ozawa H, Urano T, Ogawa Y, Fukuda R, Kojima S, Nishina M, Sudo H, Kijima H, Koga Y, Takagi A. Relationship between gastric mucosal IL-8 levels and histological gastritis in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Tokai J Exp Clin Med* 2005; 30: 83-88
- 51 Xing CZ, Guo XL, Xu HM, Yuan Y. The relationship between *helicobacter pylori* infection and IL-8 expression in remnant stomach mucosa. *XiBao Yu FenZi MianYiXue ZaZhi* 2005; 21: 503-505
- 52 Beswick EJ, Das S, Pinchuk IV, Adegboyega P, Suarez G, Yamaoka Y, Reyes VE. *Helicobacter pylori*-induced IL-8 production by gastric epithelial cells up-regulates CD74 expression. *J Immunol* 2005; 175: 171-176
- 53 Beales I, Calam J, Post L, Srinivasan S, Yamada T, DelValle J. Effect of transforming growth factor alpha and interleukin 8 on somatostatin release from canine fundic D cells. *Gastroenterology* 1997; 112: 136-143
- 54 Calam J. The somatostatin-gastrin link of *Helicobacter pylori* infection. *Ann Med* 1995; 27: 569-573
- 55 Calam J. *Helicobacter pylori* and hormones. *Yale J Biol Med* 1996; 63: 39-49
- 56 陈元方, yamada T主编. 胃肠肽类激素基础与临床. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997: 304-316
- 57 Tunio AM, Holton J, Hobsley M. Gastric juice epidermal growth factor concentration and *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer. *Br J Surg* 1995; 82: 1204-1206
- 58 Seto K, Hayashi-Kuwabara Y, Yoneta T. Vacuolation induced by cytotoxin from *Helicobacter pylori* is mediated by the EGF receptor in Hela cells. *FEBS Lett* 1998; 431: 347-350
- 59 Liu ZX, Chen BW, Yang GB, Zhang XQ, Jia BQ. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric mucosal cell proliferation in gastritis. *Beijing DaXue XueBao* 2004; 36:297-299
- 60 Schiemann U, Konturek J, Assert R, Rembiasz K, Domschke W, Konturek S, Pfeiffer A. mRNA expression of EGF receptor ligands in atrophic gastritis before and after *Helicobacter pylori* eradication. *Med Sci Monit* 2002; 8: CR53-CR58
- 61 高晋华, 梁后杰, 刘为纹. 幽门螺杆菌清除前后胃黏膜C-myc蛋白和表皮生长因子受体的变化. 世界华人消化杂志 1999; 7: 1018-1019
- 62 Joh T, Kataoka H, Tanida S, Watanabe K, Ohshima T, Sasaki M, Nakao H, Ohhara H, Higashiyama S, Itoh M. *Helicobacter pylori*-Stimulated Interleukin-8 (IL-8) promotes cell proliferation through transactivation of epidermal growth factor receptor (EGFR) by disintegrin and metalloproteinase (ADAM) activation. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 2081-2089
- 63 Xu H, Chaturvedi R, Cheng Y, Bussiere FI, Asim M, Yao MD, Potosky D, Meltzer SJ, Rhee JG, Kim SS, Moss SF, Hacker A, Wang Y, Casero RA Jr, Wilson KT. Spermine oxidation induced by *Helicobacter pylori* results in apoptosis and DNA damage: implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 8521-8525
- 64 Basak C, Pathak SK, Bhattacharyya A, Pathak S, Basu J, Kundu M. The secreted peptidyl prolyl cis,trans-isomerase H pylori0175 of *Helicobacter pylori* induces apoptosis of gastric epithelial cells in a TLR4- and apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent manner. *J Immunol* 2005; 174: 5672-5680
- 65 Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996; 38: 498-501
- 66 Ledig S, Wagner S, Manns MP, Beil W, Athmann C. Role of the receptor-mediated apoptosis in *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Digestion* 2004; 70:178-186
- 67 Martin JH, Potthoff A, Ledig S, Cornberg M, Jandl O, Manns MP, Kubicka S, Flemming P, Athmann C, Beil W, Wagner S. Effect of *H pylori* on the expression of TRAIL, FasL and their receptor subtypes in human gastric epithelial cells and their role in apoptosis. *Helicobacter* 2004; 9: 371-386
- 68 Das S, Sierra JC, Soman KV, Suarez G, Mohammad AA, Dang TA, Luxon BA, Reyes VE. Differential protein expression profiles of gastric epithelial cells following *Helicobacter pylori* infection using ProteinChips. *J Proteome Res* 2005; 4: 920-930
- 69 Leite KR, Darini E, Canavez FC, Carvalho CM, Mitteldorf CA, Camara-Lopes LH. *Helicobacter pylori* and cagA gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsies: correlation with histological findings, proliferation and apoptosis. *Sao Paulo Med J* 2005; 123: 113-118
- 70 Hritz I, Herszenyi L, Molnar B, Tulassay Z, Pronai L. Long-term omeprazole and esomeprazole treatment does not significantly increase gastric epithelial cell proliferation and epithelial growth factor receptor expression and has no effect on apoptosis and p53 expression. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4721-4726

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

乙醇对胃黏膜作用机制的研究进展

何绍珍, 任建林

何绍珍, 福建医科大学2004级内科学系研究生 福建省福州市 350004
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: 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. jianlin.ren@xmzsh.com

电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017

收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

摘要

乙醇是一种无色有特殊香味的液态有机溶剂, 是饮酒及乙醇性饮料的主要成分. 高浓度乙醇可直接腐蚀胃黏膜组织, 引起胃黏膜急性炎症, 黏膜出现充血、水肿、出血、糜烂及溃疡形成等. 慢性饮酒对胃十二指肠黏膜的影响较为复杂. 慢性酗酒可致胃肠功能紊乱、慢性萎缩性胃炎, 与胃癌发生关系密切. 此外, 慢性适量饮酒可能对胃黏膜具有适应性细胞保护作用. 乙醇在胃内经乙醇脱氢酶作用可被氧化成乙醛而损伤胃黏膜. 乙醇尚可影响胃酸分泌、引起胃组织产生损伤性介质使胃黏膜损伤性因素增强, 损伤胃黏膜屏障、减少胃黏膜保护性物质含量、影响胃黏膜微循环等使胃黏膜保护性因素削弱, 影响胃、十二指肠动力等而致胃黏膜损伤.

关键词: 乙醇; 胃黏膜; 作用机制

何绍珍, 任建林. 乙醇对胃黏膜作用机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13(21):2591-2596

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2591.asp>

0 引言

世界上有饮酒习惯者众多, 可饮用的酒类或乙醇性饮料有很多种, 其主要成分为乙醇. 乙醇是无色有特殊香味的液体, 易挥发, 是一种有机溶剂, 能溶解多种有机物和无机物. 乙醇的分子式是 C_2H_6O , 其中含有一个OH基团称为羟基.

人们饮酒后, 乙醇首先在胃内滞留, 并与胃十二指肠黏膜接触, 其对胃十二指肠黏膜生理的影响非常显著, 与多种急慢性胃十二指肠黏膜发病和修复关系密切. 我们就其对胃黏膜的损伤作用和保护作用及其机制的研究进展做一简要综述.

1 乙醇对胃黏膜的损伤作用

乙醇对胃黏膜的损害, 可分为急性乙醇中毒所引起的

胃黏膜急性损害和慢性乙醇中毒所引起的胃黏膜慢性损伤.

1.1 急性乙醇中毒所引起的胃黏膜损害 动物实验证实胃腔内乙醇浓度>14%时可直接损伤胃黏膜屏障, 使胃黏膜炎症加剧, 黏膜出现糜烂、出血、甚至急性溃疡. 陆震宇^{et al}^[1]发现无水乙醇1 mL灌胃后, 光镜: 无水乙醇组大鼠的胃黏膜出现广泛浅表性糜烂, 黏膜表面有较多的炎性渗出物, 黏膜浅层细胞有明显变性、坏死或脱落, 固有膜内有灶性出血及急性炎症反应, 与正常大鼠的胃黏膜比较显著不同. 扫描电镜: 无水乙醇组大鼠的胃黏膜遭到极严重的破坏, 表层上皮脱落, 表面呈蜂窝状, 与正常的胃黏膜超微结构完全不同. 透射电镜: 无水乙醇组大鼠的壁细胞、黏液细胞膜结构不清, 线粒体肿胀, 嵴断裂, 甚至溶解, 与正常胃黏膜细胞超微结构完全不同. 夏敏^{et al}^[2]也发现75%或95%乙醇灌胃后, 可引起小鼠胃黏膜上皮细胞不同程度地变性、坏死, 间质血管瘀血, 电镜下壁细胞核、线粒体等结构异常, 且胃黏膜损伤程度, 随乙醇浓度升高而加重. Sibilis^{et al}^[3]研究发现乙醇处理后胃黏膜出现的坏死性改变主要表现为腺体凝固性坏死伴黏膜弥漫性出血. Knoll^{et al}^[4]对47名健康志愿者分别予4%、10%、40%乙醇及等渗盐水作为对照喷洒胃黏膜, 0.5 h、1 h、4 h、24 h后运用内镜评分系统评估胃、十二指肠黏膜损伤情况. 发现胃黏膜损伤程度与乙醇浓度呈剂量依赖性, 1 h后内镜下黏膜损伤评分分别为: 4%乙醇=1.3; 10%乙醇=1.8; 40%乙醇=3.8; 等渗盐水=1.5, 内镜检查显示喷洒40%乙醇的志愿者胃黏膜出现充血、黏膜下出血等损伤, 组织学检查显示胃黏膜表面上皮细胞脱落和变性, 黏膜固有层出血及嗜酸粒细胞等炎性细胞浸润的炎症性病理改变. 以上研究均证实乙醇可致急性胃黏膜损伤而且损伤与乙醇浓度呈正相关.

1.2 慢性乙醇中毒引起的胃黏膜损伤 慢性饮酒对胃的影响观点不一致. 饮酒者常出现胃肠功能紊乱^[5]. 酗酒者胃食管反流病、Barrett's综合征、食管癌、Mallory-Weiss综合征及出血糜烂性胃炎患病率比正常人高. 许多研究者认为慢性饮酒可导致胃炎(包括慢性浅表性胃炎和萎缩性胃炎)或消化性溃疡(peptic ulcer, PU). 胃黏膜的损伤程度与酒精浓度和接触时间有关, 如果有胃酸存在且随着酸浓度的增加可加重损伤. Bienia^{et al}^[6]研究证实持续酗酒易致胃黏膜萎缩性炎症, 并且

这型炎症变化的出现与嗜酒时间长短有关。酗酒时间越长, 盐酸分泌越少。研究并未显示萎缩性胃炎的患病率与酒的种类或酒中乙醇含量有关。在与饮酒相关的胃十二指肠黏膜病变中PU也是人们争议和关注的焦点。一些报道显示慢性饮酒并不增加PU的发病率, 而另一些调查却显示饮酒是十二指肠溃疡发病的危险因子。还有人认为长期大量饮酒可能导致肝硬化, 而肝硬化患者胃黏膜屏障功能常常削弱, 从而增加了PU的发病危险性。所以, 慢性饮酒在PU的发病中所起的作用有待进一步研究。另有研究发现^[7-10], 长期饮酒是胃癌发生的危险因子, 饮酒可致胃黏膜上皮化生, 胃癌的上升与饮用啤酒、葡萄酒和伏特加等有关。由上可见慢性饮酒对胃十二指肠黏膜的影响较为复杂。

2 乙醇损伤胃黏膜的作用机制

乙醇是一种有机溶剂, 对胃黏膜组织具有很强的腐蚀性, 破坏表面黏液层和颈黏液细胞, 并破坏胃黏膜的正常代谢所需的生理环境。乙醇在胃黏膜代谢分解为乙醛后, 乙醛与胃黏膜蛋白结合, 参与了对胃黏膜的损伤。无水乙醇或高浓度乙醇具有很强的脱水作用, 能凝固组织蛋白。除上述直接损伤作用外, 乙醇还可通过增强胃黏膜损伤因素、削弱胃黏膜保护因素和使细胞内钙超载等机制引起胃黏膜损伤。

2.1 增强胃黏膜损伤因素

2.1.1 损伤性介质产生增多

2.1.1.1 自由基产生增多 醇从口摄取后, 80%以上由消化道迅速吸收, 其中胃占吸收量的30%, 其余70%被小肠上段吸收。乙醇经胃吸收后, 由于胃内存在有乙醇脱氢酶和黄嘌呤氧化酶, 前者催化乙醇生成乙醛, 后者可催化乙醛代谢产生自由基。自由基在酒精性胃黏膜损伤过程中具有重要作用^[11,12]。因为胃内给予超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)可保护胃黏膜免受乙醇的损伤。Huh *et al*^[13]研究发现用插管法予无水乙醇(4 g/kg)明显引起大鼠胃的出血损伤和脂质过氧化反应, 而口服予DA-9601(40 mg/kg)明显减轻乙醇引起的胃出血损伤和脂质过氧化反应, 这与DA-9601对乙醇引起的黄嘌呤类别转换和酶活性的抑制效应成比例。Chow *et al*^[14]也发现乙醇可增强黄嘌呤氧化酶活性。这些结果显示乙醇引起的胃黏膜损伤可能在一定程度上归因于乙醇引起黄嘌呤氧化酶活性增加和该酶发生类别转换, 而该酶类别转换对自由基产生深远影响。动物实验还发现别嘌呤醇具有预防乙醇对胃黏膜损伤作用。已知正常胃黏膜表层内富含还原型黄嘌呤氧化酶, 经乙醇作用转化为氧化型黄嘌呤氧化酶并增强其活性, 促进组织内黄嘌呤在代谢过程中产生超氧离子自由基, 并可转复 H_2O_2 为羟自由基($\cdot\text{OH}$), 其结果均使自由基增多。

氧自由基特别是羟自由基极易与膜脂肪酸中的不饱和键反应, 从而启动脂质过氧化链式反应, 使得不饱和脂肪酸含量下降, 引起细胞膜流动性降低。自由基引起黏膜细胞脂质过氧化反应明显增强, 毛细血管内皮细胞也受损致使通透性升高。胃黏膜含有高浓度的非蛋白质巯基, 氧自由基作用于巯基使蛋白质变性、酶失活, 从而导致黏膜损伤。

2.1.1.2 胃黏膜脂质过氧化物产生增多 乙醇引起胃损伤的直接作用可能是引起胃上皮的脂质过氧化^[15-19]。乙醇使胃黏膜中的超氧化阴离子、羟基产物增多及增强脂质过氧化反应。脂质过氧化过程由细胞膜和羟基的相互作用介导, 结果产生脂源性自由基和脂质氢过氧化物。已知这些基团是活性极强的引起氧化损伤的产物。乙醇引起细胞内氧化反应并引起线粒体通透性改变及线粒体去极化, 这加速了胃黏膜细胞的死亡。

2.1.1.3 产生其它损伤性介质 在胃黏膜损伤中, 炎性细胞尤其是活化的中性粒细胞极为重要^[16,20]。乙醇使白细胞浸润于胃黏膜, 并释放髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、氧自由基、活性氧化代谢产物如超氧化阴离子(O_2^-)、蛋白酶并黏附于血管内皮造成大血管闭塞等方式导致黏膜损伤。同时, 还激活胃肠道的肥大细胞使其释放组胺、血小板活性因子、内皮素、白三烯及各种超氧化物。其中组胺、血小板活性因子可增加黏膜的通透性; 内皮素、白三烯可增加胃黏膜损伤的敏感性。

2.1.2 影响胃酸分泌 Lenz *et al*^[21]的实验发现5%乙醇及威士忌酒明显增加基础胃酸分泌及五肽胃泌素峰值($P<0.01$), 10%及20%乙醇溶液比等热量、等渗透压的对照液明显增加3 h胃酸分泌量。一般认为饮料的乙醇浓度与刺激胃酸分泌呈负相关, 低浓度乙醇(5%)是酸分泌的温和刺激剂, 而高浓度乙醇要么无此作用, 要么轻度抑制酸分泌^[22,23]。任何途径给予纯乙醇都不引起人胃泌素释放^[24]。低浓度酒精性饮料(啤酒、葡萄酒)通过两条途径促进胃泌素释放而强烈刺激胃酸分泌: 一是增加壁细胞内钙离子浓度, 二是刺激嗜铬细胞释放组织胺。啤酒可致最大排酸量。高浓度酒精性饮料不刺激胃酸分泌和胃泌素释放。热稳定性物质和阴离子极性物质是否是存在于啤酒中的强有力的胃酸分泌刺激剂还有待证实。慢性酗酒对胃酸分泌的作用不确定。慢性饮酒病人酸分泌能力表现各异, 可正常、增强或减弱。

2.2 胃、十二指肠动力障碍 乙醇可降低食管下括约肌压力, 导致食管运动功能失调, 增加食管酸暴露时间, 利于胃食管反流病的发生。有报道, 浓度为4%、10%和40%的乙醇溶液抑制胃排空, 啤酒和红酒对胃排空的抑制作用强于相同浓度的乙醇溶液。胃排空功能障碍致胃内酸性胃液滞留过久, 增加了胃黏膜的损伤^[25]。乙醇还可降低Oddi氏括约肌基础压和抑制其位相收缩, 并呈乙醇浓度依赖关系。Oddi氏括约肌运动功能障碍

可致十二指肠反流而使十二指肠内容物对胃黏膜的损伤机会增加。

2.3 削弱胃黏膜保护性因素

2.3.1 胃黏膜屏障受损 胃黏膜屏障指胃黏膜具有阻止胃腔内 H^+ 向组织内弥散及组织内 Na^+ 向胃腔内弥散的特性^[26]。其形态学基础包括黏膜表面的胃壁结合黏液层、黏膜表面的单层上皮及上皮细胞间紧密连接。乙醇能引起胃黏膜上皮细胞肿胀, 溶解胃黏膜上脂蛋白层使上皮细胞之间的紧密连接受到损伤, 破坏胃黏膜屏障。乙醇对胃黏液代谢的影响非常显著。乙醇经过血流损害腺体的颈黏液细胞, 使胃黏液减少。乙醇抑制黏液合成、转运和黏液糖蛋白的加工合成过程, 并且抑制黏液颗粒向上皮表面的转运过程。这些均可引起胃黏膜屏障的损害, 导致氢离子逆向渗透, 引起炎症渗出、出血、溃疡。陆震宇 *et al*^[1]发现无水乙醇降低胃黏膜 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性, 而 $Na^+-K^+-ATPase$ 是位于细胞膜上的一种糖蛋白, 对维持细胞内外钠钾离子梯度, 保证细胞正常生理功能具有极重要的作用。如果胃黏膜 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性受到抑制, 就会造成黏膜渗透性增加, 大量氢离子反流, 引起上皮细胞破坏。Iino *et al*^[27]也发现无水乙醇灌胃后, 反映胃黏膜完整性的跨壁电位压也显著下降, Na^+ 、 K^+ 向胃腔内弥散增加, 而胃腔内 H^+ 反渗也增加。

2.3.2 黏膜保护性物质含量减少 巯基物质是体内一种重要的非酶类氧自由基清除剂, 分为非蛋白巯基物质和蛋白巯基物质。巯基物质可以直接或间接与氧自由基和活性亲电子物质反应, 具有细胞保护作用: 可维持细胞骨架的完整; 有解毒作用; 非蛋白巯基物质的氧化先于蛋白巯基物质氧化, 前者明显保护了后者, 对维护细胞的结构与功能至关重要。动物实验发现^[28-32]乙醇处理后, 受试动物胃黏膜谷胱甘肽总浓度、谷胱甘肽还原酶和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性下降。谷胱甘肽是含巯基的非蛋白质化合物, 是细胞中的重要抗氧化剂, 对过氧化物造成黏膜损伤有保护作用。胃黏膜保持充足谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量对维持黏膜细胞的稳定和完整性有重要作用。由于GSH含量减少, 使细胞内各种蛋白维持功能所必需的非蛋白巯基被氧化而减少。补充巯基化合物半胱氨酸或GSH可防止乙醇所致的胃黏膜损伤。

实验研究^[33,34]认为前列腺素(prostaglandins, PGs)合成减少可能在乙醇引起胃黏膜损伤中起着重要作用。陆震宇 *et al*^[1]发现大鼠无水乙醇1 mL灌胃后, 血浆前列环素的稳定代谢产物6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-Keto-PGF $_{1\alpha}$)含量下降。PGs能增加胃黏膜上皮黏液和碳酸氢盐的分泌, 抑制胃酸分泌, 增加胃黏膜血流, 防止胃黏膜损伤, 刺激胃黏膜再生。胃黏膜内的大量PGs是通过环氧合酶作用而合成, 但乙醇可灭活环氧合酶而阻

碍PG合成^[35-38]。

2.3.3 胃黏膜微循环障碍 胃黏膜微循环障碍被认为是乙醇引起胃损伤的主要致病机制。乙醇可引起胃黏膜静脉收缩、胃黏膜血流量(gastric mucosal blood flow, GMBF)降低, 而且其损伤程度与GMBF呈负相关。GMBF减少, 将导致胃黏膜缺乏营养和不能及时清除有害物质, 因而造成胃黏膜损伤。GMBF降低被认为与乙醇促进胃动脉血管内皮释放内皮素(endothelin, ET)^[39-43]及降低胃黏膜一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)活性使内源性NO合成减少有关^[44-48]。ET是一种由血管内皮细胞产生的含有21个氨基酸的血管活性多肽, 是迄今所知最强烈而持久的缩血管因子, 它可引起胃黏膜损伤。Iaquinto *et al*^[49]研究证实, 口服40%乙醇刺激人胃黏膜ET-1的释放, 引起人血浆ET-1水平迅速且呈时间依赖的升高。NOS是NO生物合成的关键因素, NO是新近发现的重要细胞信息分子, 它通过增加胃黏膜血流量、减轻炎症反应等机制, 在胃黏膜保护中起着重要作用。该研究发现, 在胃黏膜损伤过程中NOS和ET含量呈负相关。NO可拮抗ET的作用, 并抑制ET的释放。在乙醇损伤胃黏膜过程中, NO减少失去对ET的抑制作用, 使ET显著增加, 两者共同作用加剧胃黏膜损伤。

乙醇还可引起胃黏膜血管通透性升高、黏膜血流淤滞。研究发现胃黏膜接触乙醇后出现肥大细胞脱颗粒^[50-52], 并伴有胃黏膜组胺^[53]及白三烯(leukotriene, LT)^[54,55]含量升高, 以肥大细胞稳定剂酮替芬或组胺 H_1 受体拮抗剂、LTC $_4$ 合成抑制剂预处理, 则胃黏膜微循环明显改善, 胃黏膜损伤明显减轻。表明肥大细胞及组胺、LTC $_4$ 在乙醇引起的胃黏膜损伤中具有重要作用。组胺和LT可扩张小动脉, 增加毛细血管通透性, 而乙醇又可使胃黏膜小静脉收缩, 所以毛细血管内压力增加, 黏膜出现淤血、水肿、出血, 继而组织坏死。

2.4 其他因素 乙醇可降低胃黏膜疏水性及表面活性磷脂含量: 减慢胃黏膜上皮迁移和增殖, 损伤细胞内微丝、微管等细胞骨架系统, 破坏细胞间连接蛋白; 诱导细胞凋亡, 从而损伤胃黏膜的修复功能^[56,57]; 通过刺激三磷酸酯产生, 引起细胞膜钙通道开放, 胞外钙内流, 造成细胞内钙超载^[58]。夏敏 *et al*^[2]证明95%乙醇灌胃后, 大鼠胃黏膜内 Ca^{2+} 浓度升高。乙醇对胃肠肽的影响也非常显著, 在乙醇性胃黏膜损伤中, 生长抑素(somatostatin, SS)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)含量显著下降^[59], 说明乙醇可破坏D细胞或抑制SS和VIP的分泌。有研究证实^[60,61]SS对胃黏膜具有保护作用, 可抑制胃酸、胃蛋白酶和胃泌素分泌, 促进胃黏液生成, 促进胃局部血液循环, 提高胃黏膜对氧自由基的清除能力, 预防细胞膜的脂质过氧化损伤。VIP可促进NO释放, 抑制ET-1的释放, 扩张血管, 抑制平滑肌收缩。在乙醇所致的胃黏膜损伤中, VIP的减少可能

通过减少NO释放和增加ET-1生成而参与胃黏膜的损伤过程. 酗酒者可出现原发性或继发性营养不良, 出现多种维生素和微量元素缺乏. 其中, 叶酸和锌的缺乏较常见. 叶酸缺乏影响蛋白合成, 锌缺乏可使谷胱甘肽转移酶减少, 这些都可以加重乙醇对胃黏膜的损伤作用.

3 乙醇对胃黏膜的保护作用

少数学者认为^[62]低浓度乙醇可能对胃黏膜产生适应性细胞保护作用. 适当浓度的乙醇刺激可引起胃黏膜干细胞热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)的表达^[63,64]. Konturek *et al*^[65]给大鼠100%乙醇灌胃处理后1 h, 测得大鼠胃黏膜HSP70表达明显上调, 而予阿司匹林组则黏膜HSP70表达减少. 夏玉亭 *et al*^[66]通过体内外实验证明胃黏膜细胞中的HSP70具有保护作用. HSP70可帮助新生蛋白质成熟和移位, 帮助异常蛋白质降解; 作为"分子伴侣"对于维持胃黏膜细胞的稳定与生存至关重要^[67]; 提高细胞SOD及过氧化氢酶活性, 减轻乙醇引起的过氧化反应损伤. 适当低浓度乙醇还可以防止非甾体抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)引起的细胞死亡而产生对胃黏膜的适应性细胞保护作用^[68]. Uehigashi *et al*^[69]研究表明适度的低浓度乙醇可通过提高胃黏膜的前列腺素的水平而对胃黏膜有保护作用. 一些酒精性饮料, 像红葡萄酒, 有抗幽门螺杆菌活动性感染的保护作用^[22], 这一作用可能与饮料中所含乙醇的抗微生物效应有关.

总之, 乙醇引起的胃黏膜急性损伤明确, 临床上利用无水乙醇或高浓度乙醇能使组织蛋白凝固的特点, 采用内镜下局部注射无水酒精来治疗上消化道出血, 达到止血目的. 在动物实验模型中, 用于探讨胃黏膜急性损伤的病理生理机制, 并被广泛用于药理学研究, 用于药物的疗效评估. 但慢性饮酒对胃黏膜的影响还存在争议, 其与慢性胃炎的关系研究报道不一致. 慢性饮酒是否会引起胃、十二指肠溃疡也无定论. 乙醇与胃癌的关系, 人们认为乙醇不是直接致癌物质, 但在一定实验条件下是一种辅助致癌物质. 乙醇代谢产生乙醛和自由基, 乙醛具致癌作用和致突变作用, 可与DNA和蛋白质相结合, 破坏叶酸, 引起继发性过度增生. 有证据表明乙醛是乙醇致癌的主要原因. 近期研究发现乙醇对胃黏膜有适应性细胞保护作用, 可抗*H pylori*感染、促进胃黏膜上皮细胞更新及HSP70表达, 但这些保护作用的分子机制尚不清楚. 乙醇对胃黏膜的影响较为复杂, 深入研究其对胃黏膜的作用机制, 对于胃黏膜保护有积极意义.

4 参考文献

- 1 陆震宇, 刘菲, 王莉, 陆伟, 陈光明, 杨若才, 杨富强. 胃安素对胃黏膜保护作用的动物实验及临床研究. 新消化病学杂志 1996; 4: 185-188
- 2 夏敏, 陶嘉泳. 乙醇对小鼠胃黏膜的损伤机制. 新消化病学杂志 1997; 5: 211-212
- 3 Sibilia V, Rindi G, Pagani F, Rapetti D, Locatelli V, Torsello A, Campanini N, Deghenghi R, Netti C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology* 2003; 144: 353-359
- 4 Knoll MR, Kolbel CB, Teyssen S, Singer MV. Action of pure ethanol and some alcoholic beverages on the gastric mucosa in healthy humans: a descriptive endoscopic study. *Endoscopy* 1998; 30: 293-301
- 5 Keshavarzian A, Fields JZ, Vaeth J, Holmes EW. The differing effects of acute and chronic alcohol on gastric and intestinal permeability. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 2205-2211
- 6 Bienia A, Sodolski W, Luchowska E. The effect of chronic alcohol abuse on gastric and duodenal mucosa. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska* 2002; 57: 570-582
- 7 Iishi H, Tatsuta M, Baba M, Taniguchi H. Promotion by ethanol of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Br J Cancer* 1989; 59: 719-721
- 8 Vakevainen S, Mentula S, Nuutinen H, Salmela KS, Jousimies-Somer H, Farkkila M, Salaspuro M. Ethanol-derived microbial production of carcinogenic acetaldehyde in achlorhydric atrophic gastritis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 648-655
- 9 Borriello SP, Reed PJ, Dolby JM, Barclay FE, Webster AD. Microbial and metabolic profile of achlorhydric stomach: comparison of pernicious anaemia and hypogammaglobulinaemia. *J Clin Pathol* 1985; 38: 946-953
- 10 Ko JK, Cho CH. Alcohol drinking and cigarette smoking: a "partner" for gastric ulceration. *Zhonghua YiXue ZaZhi* 2000; 63: 845-854
- 11 Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Sliwowski Z, Pajdo R, Duda A, Ptak A, Hahn EG. Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 320-329
- 12 Kwiecien S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53: 39-50
- 13 Huh K, Kwon TH, Shin US, Kim WB, Ahn BO, Oh TY, Kim JA. Inhibitory effects of DA-9601 on ethanol-induced gastrophemorrhagic lesions and gastric xanthine oxidase activity in rats. *J Ethnopharmacol* 2003; 88: 269-273
- 14 Chow JY, Ma L, Cho CH. Involvement of free radicals and histamine in the potentiating action of cigarette smoke exposure on ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 1285-1293
- 15 Bagchi D, Carryl OR, Tran MX, Krohn RL, Bagchi DJ, Garg A, Bagchi M, Mitra S, Stohs SJ. Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *J Appl Toxicol* 1998; 18: 3-13
- 16 Repetto M, Maria A, Guzman J, Giordano O, Llesuy S. Protective effect of Artemisia douglasiana Besser extracts in gastric mucosal injury. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55: 551-557
- 17 Khosla P, Karan RS, Bhargava VK. Effect of garlic oil on ethanol induced gastric ulcers in rats. *Phytother Res* 2004; 18: 87-91
- 18 Ozdil S, Yanardag R, Koyuturk M, Bolkent S, Arbak S. Protective effects of ascorbic acid, DL-alpha-tocopherol acetate, and sodium selenate on ethanol-induced gastric mucosal injury of rats. *Biol Trace Elem Res* 2004; 99: 173-189
- 19 Liu MY, Chiang JP, Hsu DZ, Deng JF. Abamectin attenuates gastric mucosal damage induced by ethanol through activation of vagus nerve in rats. *Alcohol* 2003; 30: 61-65
- 20 苏红, 曹之宪, 林兆鑫. 乙醇对大鼠胃黏膜的影响. 世界华人消化杂志 2000; 8: 355-356
- 21 Lenz HJ, Ferrari-Taylor J, Isenberg JI. Wine and five percent

- ethanol are potent stimulants of gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology* 1983; 85: 1082-1087
- 22 Stermer E. Alcohol consumption and the gastrointestinal tract. *Isr Med Assoc J* 2002; 4: 200-202
- 23 Chari S, Teyssen S, Singer MV. Alcohol and gastric acid secretion in humans. *Gut* 1993; 34: 843-847
- 24 Matsuno K, Tomita K, Okabe S. Wine stimulates gastric acid secretion in isolated rabbit gastric glands via two different pathways. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 Suppl 2: 107-114
- 25 杨春敏, 毛高平, 朱明, 张秀荣, 张映辉. 乙醇对清醒兔 Oddi 括约肌运动功能的影响. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 653-657
- 26 李兆申, 湛先保, 许国铭. 胃黏膜损伤与保护 - 基础与临床. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 498-503
- 27 Iino T, Nakahara K, Miki W, Kiso Y, Ogawa Y, Kato S, Takeuchi K. Less damaging effect of whisky in rat stomachs in comparison with pure ethanol. Role of ellagic acid, the nonalcoholic component. *Digestion* 2001; 64: 214-221
- 28 Bilici D, Suleyman H, Banoglu ZN, Kiziltunc A, Avci B, Ciftcioglu A, Bilici S. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 856-861
- 29 La Casa C, Villegas I, Alarcon de la Lastra C, Motilva V, Martin Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol* 2000; 71: 45-53
- 30 Ajaikumar KB, Asheef M, Babu BH, Padikkala J. The inhibition of gastric mucosal injury by Punicagranatum L. (pomegranate) methanolic extract. *J Ethnopharmacol* 2005; 96: 171-176
- 31 Arafa HM, Sayed-Ahmed MM. Protective role of carnitine esters against alcohol-induced gastric lesions in rats. *Pharmacol Res* 2003; 48: 285-290
- 32 Raphael KR, Kuttan R. Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by *Phyllanthus amarus* extract. *J Ethnopharmacol* 2003; 87: 193-197
- 33 Liu ES, Wong BC, Cho CH. Influence of gender difference and gastritis on gastric ulcer formation in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 740-747
- 34 Saeki T, Ohno T, Kamata K, Arai K, Mizuguchi S, Katori M, Saigenji K, Majima M. Mild irritant prevents ethanol-induced gastric mucosal microcirculatory disturbances through actions of calcitonin gene-related peptide and PGI₂ in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G68-G75
- 35 Kawabata A, Nishikawa H, Saitoh H, Nakaya Y, Hiramatsu K, Kubo S, Nishida M, Kawao N, Kuroda R, Sekiguchi F, Kinoshita M, Kakehi K, Arizono N, Yamagishi H, Kawai K. A protective role of protease-activated receptor 1 in rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 2004; 126: 208-219
- 36 Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Drozdowicz D, Bielanski W, Pajdo R, Ptak A, Nikiforuk A, Pawlik WW, Hahn EG. Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage. *Regul Pept* 2004; 120: 39-51
- 37 Komori M, Tsuji S, Sun WH, Tsujii M, Kawai N, Yasumaru M, Kakiuchi Y, Kimura A, Sasaki Y, Higashiyama S, Kawano S, Hori M. Gastrin enhances gastric mucosal integrity through cyclooxygenase-2 upregulation in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1368-G1378
- 38 Miyake K, Tsukui T, Wada K, Tatsuguchi A, Futagami S, Hiratsuka T, Shinoki K, Iizumi T, Akamatsu T, Sakamoto C, Kobayashi M. Irritant-induced cyclooxygenase-2 is involved in the defense mechanism of the gastric mucosa in mice. *J Gastroenterol* 2002; 37: 164-171
- 39 Kawano S, Tsuji S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl: D1-D6
- 40 Ohta M, Nguyen TH, Tarnawski AS, Pai R, Kratzberg YP, Sugimachi K, Sarfeh II. Overexpression of endothelin-1 mRNA and protein in portal hypertensive gastric mucosa of rats: a key to increased susceptibility to damage? *Surgery* 1997; 122: 936-942
- 41 Masuda E, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Takei Y, Hayashi N, Tsujii M, Oshita M, Michida T, Kobayashi I, et al. Role of endogenous endothelin in pathogenesis of ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Am J Physiol* 1993; 265: G474-G481
- 42 Masuda E, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Ishigami Y, Tsujii M, Hayashi N, Fusamoto H, Kamada T. Effect of intravascular ethanol on modulation of gastric mucosal integrity: possible role of endothelin-1. *Am J Physiol* 1992; 262: G785-G790
- 43 Morales RE, Johnson BR, Szabo S. Endothelin induces vascular and mucosal lesions, enhances the injury by HCl/ethanol, and the antibody exerts gastroprotection. *Faseb J* 1992; 6: 2354-2360
- 44 Zayachkivska OS, Konturek SJ, Drozdowicz D, Konturek PC, Brzozowski T, Ghegotsky MR. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56 Suppl 1: 219-231
- 45 Pan LR, Tang Q, Fu Q, Hu BR, Xiang JZ, Qian JQ. Roles of nitric oxide in protective effect of berberine in ethanol-induced gastric ulcer mice. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 1334-1338
- 46 Zayachkivska OS, Konturek SJ, Drozdowicz D, Brzozowski T, Gzhegotsky MR. Influence of plant-originated gastroprotective and antiulcer substances on gastric mucosal repair. *Fiziol Zh* 2004; 50: 118-127
- 47 Sibilia V, Torsello A, Pagani F, Rapetti D, Lattuada N, Locatelli V, Bulgarelli I, Guidobono F, Netti C. Effects of hexarelin against acid-independent and acid-dependent ulcerogens in the rat. *Peptides* 2004; 25: 2163-2170
- 48 Li YH, Li J, Huang Y, Lu XW, Jin Y. Gastroprotective effect and mechanism of amlolmetin guacyl in mice. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3616-3620
- 49 Iaquinto G, Giardullo N, Taccone W, Leandro G, Pasquale L, De Luca L, Szabo S. Role of endogenous endothelin-1 in ethanol-induced gastric mucosal damage in humans. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 663-669
- 50 Kalia N, Bardhan KD, Reed MW, Jacob S, Brown NJ. Mast cell stabilization prevents ethanol-induced rat gastric mucosal injury: mechanisms of protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 133-141
- 51 Ishizuka Y, Kamisaki T, Sato M. Anti-gastric acid secretory mechanism of 1,6-dihydro-2-[2-(2-methylpropoxy)anilino]-6-oxo-5-pyrimidinecarboxylic acid. Effect on mucosal mast cell. *Arzneimittelforschung* 1996; 46: 919-922
- 52 Erkasap S, Erkasap N, Aral E, Koken T, Kahraman A, Aydin Y, Yilmaz S, Ates E. Mast cell stabilizer and antioxidant effects of epidermal growth factor (EGF) on gastric mucosal injury induced by ethanol in rats. *Chin J Physiol* 2005; 48: 1-6
- 53 Kahraman A, Erkasap N, Koken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* 2003; 183: 133-142
- 54 Ko JK, Cho CH, Lam SK. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2503-2508
- 55 Karmeli F, Eliakim R, Okon E, Rachmilewitz D. Role of vasoactive intestinal peptide (VIP) in pathogenesis of ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1210-1219
- 56 Asai K, Buurman WA, Reutelingsperger CP, Schutte B, Kaminishi M. Modular effects of estradiol on ethanol-induced apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 326-335
- 57 Tsutsumi S, Tomisato W, Takano T, Rokutan K, Tsuchiya T, Mizushima T. Gastric irritant-induced apoptosis in guinea pig gastric mucosal cells in primary culture. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1589: 168-180
- 58 Mustonen H, Kiviluoto T, Paimela H, Puolakkainen P, Kivilaakso E. Calcium signaling is involved in ethanol-induced volume decrease and gap junction closure in cultured rat gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 103-110
- 59 Koko V, Todorovic V, Varagic J, Micev M, Korac A, Bajcetic

- M, Cakic-Milosevic M, Nedeljkovic M, Drndarevic N. Gastrin producing G-cells after chronic ethanol and low protein nutrition. *Indian J Exp Biol* 1998; 36: 1093-1101
- 60 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
- 61 Karmeli F, Eliakim R, Okon E, Rachmilewitz D. Somatostatin effectively prevents ethanol- and NSAID-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 617-625
- 62 Sikiric P, Seiwerth S, Deskovic S, Grabarevic Z, Marovic A, Rucman R, Petek M, Konjevoda P, Jadrijevic S, Sosa T, Perovic D, Aralica G, Turkovic B. New model of cytoprotection/adaptive cytoprotection in rats: endogenous small irritants, antiulcer agents and indomethacin. *Eur J Pharmacol* 1999; 364: 23-31
- 63 Ueyama T, Saika M, Senba E. Distinct gene expression in the stomach following stress and alcohol exposure. *Kaibogaku Zasshi* 2001; 76: 435-441
- 64 Tsukimi Y, Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 1-9
- 65 Konturek PC, Brzozowski T, Kania J, Konturek SJ, Hahn EG. Nitric oxide-releasing aspirin protects gastric mucosa against ethanol damage in rats with functional ablation of sensory nerves. *Inflamm Res* 2003; 52: 359-365
- 66 夏玉亭, 于中麟. 胃炎临床研究进展. 第1版. 上海:上海科学技术出版社, 2003: 303-309
- 67 Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15 Suppl:D12-D19
- 68 Tanaka K, Nishimoto K, Tomisato W, Tsutsumi S, Hoshino T, Tsuchiya T, Mizushima T. Adaptive cytoprotection induced by pretreatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 210-217
- 69 Uehigashi Y, Yakabi K, Nakamura T. Pretreatment with mild irritant enhances prostaglandin E2 release from isolated canine gastric mucosal mast cells. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1384-1389

电编 张勇 编辑 管鑫妍 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 •

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2006-10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Büechler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)

NSAIDs相关性胃肠病

卢雅丕, 任建林

卢雅丕, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化疾病研究所 福建省厦门市 361004

通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化疾病研究所. jianlin.ren@xmzsh.com

电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017

收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

摘要

长期以来, 非甾体类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)被广泛应用于治疗各种风湿性疾病及心脑血管疾病, 但由于其可引起多系统并发症, 尤其是胃肠黏膜损伤作用, 即NSAIDs相关性胃肠病, 表现为消化吸收功能不良、腹胀、腹痛、溃疡、出血、穿孔、贫血、低蛋白血症等, 而限制了其进一步广泛使用; NSAIDs相关性胃肠病发病机制主要有环氧化酶(COX)抑制理论、NSAIDs对黏膜的直接毒性作用、LOX活化理论等; 我们就近年来NSAIDs相关性胃肠病发病机制及防治方面的情况作一简要综述。

关键词: 非甾体类抗炎药; 胃肠病

卢雅丕, 任建林. NSAIDs相关性胃肠病. 世界华人消化杂志 2005;13(21): 2597-2600

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2597.asp>

0 引言

自1898年阿司匹林上市以来的一个多世纪里, 非甾体类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)已增至百余种, 成为全球最畅销的药品, 被广泛应用于治疗各种风湿性疾病及心脑血管疾病; 但NSAIDs的广泛应用引起了一系列并发症, 其中最重要的是NSAIDs相关性胃肠病, 轻者黏膜充血、水肿、糜烂及一过性浅表溃疡形成, 重者造成大面积溃疡合并消化道出血、穿孔甚至危及生命; 由于NSAIDs的镇痛作用, 使用NSAIDs的患者发生胃肠病时多数无症状, 当相应症状出现时, 往往病情已较严重, 这正是NSAIDs相关性胃肠病可导致高死亡率的原因; 据统计, 在美国每年有超过10万名患者因为服用NSAIDs导致胃肠道并发症而住院治疗, 年死亡人数达1.65万^[1]; 因此, 阐明NSAIDs相关性胃肠病的发病机制, 制定系统性防治措施是目前胃肠黏膜保护领域的一个重要课题。

1 NSAIDs相关性胃病

NSAIDs相关性胃病主要是指长期服用NSAIDs后引

起胃窦、幽门前、胃体部的损伤; 临床表现多种多样, 也可毫无症状, 或表现为消化不良、腹胀、腹痛、溃疡、出血、穿孔等。

1.1 危险因素 Dubois *et al*^[2]对1991年至2002年之间PubMed收录的多篇关于使用NSAIDs的文章进行统计分析后, 总结出NSAIDs相关性胃肠病的危险因素有: 与长期低剂量阿司匹林联用, 高龄, 既往有胃肠道溃疡、出血或穿孔史, 性别(男性高于女性), 与皮质激素联用, 与抗凝剂联用, 用药剂量大、用药时间长等; 其中, 如使用NSAIDs患者同时存在多种危险因素时, 其胃肠病发生率明显高于仅存有一种危险因素的患者。

1.2 NSAIDs相关性胃病发病机制

1.2.1 环氧化酶(COX)抑制理论 细胞膜中的花生四烯酸在磷脂酶A₂的作用下释放出后, 通过两条途径进行代谢: 一是在环氧化酶(COX)的作用下转化为前列腺素和血栓素A₂(TXA₂); 二是在脂氧化酶(LOX)作用下产生白三烯(LT)^[3]; 前列腺素可增加黏液和HCO₃⁻分泌、促进上皮修复和细胞更新、增加胃黏膜血流、抑制胃酸分泌, 具有胃黏膜保护作用及适应性细胞保护作用, NSAIDs通过抑制COX从而抑制花生四烯酸生成前列腺素, 从而削弱了对胃黏膜的保护作用, 最终导致胃黏膜损伤^[4-6]; 同时, COX的抑制也使血栓素A₂的合成减少, 进而抑制血小板凝集, 易诱发损伤的胃黏膜出血; 有研究发现, 口服NSAIDs后数小时至几天, 即可使胃黏膜发生瘀血点及糜烂, 并进一步发展成急性溃疡, 停药后几天由于对血小板聚集及前列腺素合成的抑制作用仍然存在, 故仍可继续导致消化道出血^[7]; 在哺乳动物体内, COX有两种形式, 即COX-1与COX-2, COX-1为基础性酶, 存在于多数正常器官, 可产生维持正常生理功能所需要的前列腺素和血栓素A₂, 从而保持胃黏膜的完整性, COX-2为诱导性酶, 在组织损伤过程中可诱导产生炎性前列腺素, 从而引起炎症、疼痛和发热^[8]; COX-2在大多数器官不能检出, 但在炎症部位的炎症细胞中高浓度存在, 其诱导产生的炎性前列腺素则可介导炎症发生; 传统的NSAIDs同时抑制两种环氧化酶, 因而在发挥其抗炎作用的同时, 也干扰了生理性前列腺素及血栓素A₂的合成而产生胃肠损害作用; 而选择性COX-2抑制剂对生理性前列腺素及血栓素A₂的合成的抑制作用较小, 因此对胃肠黏膜损害作用明显减少^[9-11]。

1.2.2 NSAIDs对黏膜的直接毒性作用 NSAIDs多呈弱

酸性,在胃内酸性环境下呈脂溶性非离子状态,自由弥散出入黏膜上皮细胞,造成细胞渗透性增加;在细胞内接近中性的环境中,药物离解度增加,形成大量的 H^+ ,可直接产生细胞毒作用,干扰细胞代谢,导致细胞死亡,破坏上皮细胞层的完整性;另外,NSAIDs也可在胃腔内形成大量的 H^+ ,与黏液层中的 HCO_3^- 作用,产生 CO_2 ,削弱黏液- HCO_3^- 对胃黏膜的保护屏障,使胃黏膜易于被 H^+ 、*H. Pylori*及胃蛋白酶等侵袭性因子侵袭而遭受破坏。

1.2.3 LOX活化 NSAIDs抑制COX,使花生四烯酸无法通过COX途径代谢,大量的花生四烯酸在LOX的催化下代谢,白三烯生成增多,白三烯对嗜酸粒细胞、中性粒细胞和巨噬细胞具有强大的趋化作用,造成血管内皮细胞损伤、黏膜细胞缺血脱落,也可引起胃黏膜损伤。

1.3 NSAIDs相关性胃病的防治

1.3.1 抑酸药及胃黏膜保护剂的应用 严格掌握NSAIDs使用适应证,不滥用NSAIDs,同时使用抑酸药或胃黏膜保护剂是预防NSAIDs相关性胃病的有效措施;大量的研究发现使用质子泵抑制剂、 H_2 受体阻滞剂、米索前列醇及各种胃黏膜保护剂均可有效防治NSAIDs相关性胃病的发生^[2,12-15];对服用NSAIDs后出现的胃黏膜损伤,如情况允许应立即停药,并予常规剂量常规疗程的 H_2 受体阻滞剂或质子泵抑制剂治疗;如病情不允许,可换用对黏膜损伤少的NSAIDs如COX-2抑制剂,同时给予质子泵抑制剂治疗(H_2 受体阻滞剂疗效差),胃黏膜损伤愈合后,如仍需继续服用NSAIDs,则必须长期同时给予质子泵抑制剂或米索前列醇,争取减少或防止再次发生胃黏膜损伤。

但是,虽然对NSAIDs副反应的认识已很深入,忽视预防性用药的现象目前仍非常严重;Herings *et al*^[16]对10 121个使用NSAIDs超过100 d的病人进行回顾性分析,发现仅有27.7%的患者采取充分的预防性胃黏膜保护措施,甚至在同时存在4个或4个以上危险因素的患者中,也仅有61.9%采取了充分的预防措施,因此,加强各科医师及患者的预防性用药意识至关重要;在各类抑酸药及胃黏膜保护剂中,对NSAIDs相关性胃病预防及治疗效果最好的是质子泵抑制剂^[14],它具有高效抑制胃酸分泌、扩张胃黏膜血管、改善胃黏膜血流、增加内源性前列腺素合成等作用,可有效改善胃肠道症状、预防消化道出血、提高胃黏膜对NSAIDs的耐受性,因此是防治NSAIDs相关性胃病的首选药物。

1.3.2 选用新型NSAIDs药物 目前使用较多的是高选择性COX-2抑制剂,大量的研究表明,使用高选择性COX-2抑制剂时胃肠道副反应的发生率较传统NSAIDs明显减少,患者具有良好的胃肠道耐受性^[17,18]。但这类药物较传统NSAIDs昂贵,在一定程度上限制

了进一步广泛应用,且随着选择性COX-2抑制剂在临床应用的增多,一些作者发现其对心血管系统有一定副作用^[19-21],因此,在选择时需权衡利弊,认真评估此类药物的优势和风险;一氧化氮释放型非甾体类抗炎药(NO-NSAIDs)是近年来倍受关注的另一类新型NSAIDs,它是在传统NSAIDs上偶联一个能释放一氧化氮的部分,当药物进入体内后,可立即释放出一氧化氮和NSAIDs,NSAIDs发挥其解热、镇痛、抗炎作用,而NO则通过降低胃黏膜对损伤的敏感性,并与其他胃黏膜保护因子如PGs、巯基物质、生长因子等起协同作用,抑制中性粒细胞聚集、增强黏膜血流量和黏液分泌及减少氧自由基生成,从而保持胃黏膜的完整性,减少或阻断传统NSAIDs对胃肠道的副反应^[22-28]。目前已有许多研究证实NO-NSAIDs较传统NSAIDs及COX-2抑制剂具有更好的胃肠道安全性^[29-32]。

1.3.3 开发应用NSAIDs药物新剂型 NSAIDs的肠溶制剂、缓释制剂、控释制剂等新剂型问世,既减少了普通制剂在短时间内大量释放而引起的胃肠刺激症状,又方便了患者服药,但是,这些剂型在降低胃肠道出血、穿孔等严重不良反应方面并无优势;外用剂型的使用,可避免药物对胃肠的直接刺激,且很少引起内脏损害,但仅适用于局部抗炎镇痛,且疗效并不理想;如能开发新的无活性的前体药物或研制复方制剂则有望在保证疗效的前提下尽量减少不良反应发生率。

1.3.4 NSAIDs与*H. pylori* 由于许多研究对*H. Pylori*与NSAIDs之间的关系缺乏一致性认识,因此对于有*H. Pylori*感染的NSAIDs服用者是否要给予*H. Pylori*根除治疗多年来一直存在争论,许多专家一直在关注着这个问题,随着研究的深入,这个问题正在逐渐明朗化;2000年Maastricht-2共识报告指出,在服用NSAIDs前根除*H. Pylori*可降低消化性溃疡和伴发症状的发生率,然而,对于继续服用NSAIDs、接受抑酸治疗的患者,根除*H. Pylori*并不能增强胃溃疡或十二指肠溃疡的愈合;有学者认为,为消除*H. Pylori*感染作为随后发生消化性溃疡和消化不良症状的混杂因素,对计划进行NSAIDs治疗的患者根除*H. Pylori*是合适的,因此建议对服用低剂量阿司匹林的有消化性溃疡史的患者,应采取*H. Pylori*的检测和根除措施^[33];2002年8月中华医学会消化病学分会第三次全国幽门螺杆菌学术会议指出,*H. Pylori*和NSAIDs是消化性溃疡发生的两个重要独立危险因素,如两种危险因素同时存在,则发生消化性溃疡的几率更高;单纯根除*H. Pylori*本身虽然不足以预防NSAIDs溃疡,但较多意见倾向于根除*H. Pylori*对减少NSAIDs溃疡的发生有一定帮助。

2 NSAIDs相关性肠病

2.1 NSAIDs还可引起小肠出血、蛋白质丢失性肠病、

回肠吸收功能障碍、肠通透性升高及结肠出血、穿孔等, 统称为NSAIDs相关性肠病; 目前认为NSAIDs相关性小肠黏膜损伤比NSAIDs相关性胃黏膜损伤更为常见^[34]; Graham *et al*^[35]对慢性NSAIDs服用者行胶囊内镜检查发现有71%的患者发生了小肠损伤; 另有学者研究证实, 在服用NSAIDs患者中, 炎症及失血部位主要位于小肠而非胃及十二指肠^[36]; 因小肠镜及胶囊内镜检查费用昂贵, 无法在临床上广泛开展, 所以NSAIDs相关性肠病临床漏诊率极高, 但在服用NSAIDs、经胃镜检查未发现胃黏膜损伤的患者, 如出现不明原因的贫血及低白蛋白血症时, 应注意是否存在NSAIDs相关性肠病. NSAIDs相关性小肠黏膜损伤是一个逐步发生的过程, 关于其发病机制, 目前比较推崇的是"三级打击"学说(three-hit hypothesis)^[34]: (1)首先是NSAIDs的酸性部分直接损伤膜磷脂, 并使氧化磷酸化解偶联而损伤线粒体, 这种作用似乎可被甲硝唑所阻断, 可能与甲硝唑可降低线粒体氧耗有关; (2)线粒体损伤导致细胞能量耗竭、Ca²⁺超载及大量自由基产生, 结果使细胞间结构完整性破坏及小肠通透性增加; (3)细胞间完整性破坏, 黏膜屏障受损使肠黏膜细胞易受肠内容物包括胆汁、食物、细菌及各种酶的损伤; NSAIDs引起的直接损伤是增加肠壁的通透性, 肠病的炎症则继发于细菌的侵袭和中性粒细胞的浸润; 除"三级打击"学说外, COX依赖性机制可能也在NSAIDs相关性小肠病的发生中发挥了一定的作用, 这可能与COX在黏膜屏障功能、黏膜修复机制及调节肠绒毛血流中具有重要作用有关; 另有学者研究发现, NSAIDs可上调肠黏膜中诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)活性^[37], 产生大量NO, NO在基础状态下对胃肠黏膜有保护作用, 但其过度表达可直接引起细胞毒作用或通过氧自由基氧化生成毒性更大的ONOO⁻, ONOO⁻是一种强氧化剂, 具有强烈的抑制细胞线粒体氧化呼吸作用, 可导致能量代谢障碍, 细胞脂质过氧化损伤, 最终引起肠黏膜损伤^[38,39]; 此外, NSAIDs的肠肝循环在NSAIDs相关性肠病的发病机制中也扮演了重要的角色, 阿司匹林因不能经胆汁分泌, 故其肠道损伤较小.

2.2 短期服用NSAIDs肠道副作用较少, 但当服药超过半年后NSAIDs相关性肠病发生率很高, 这种副反应可持续到停药后1 a甚至更长时间; 所以当发生NSAIDs相关性小肠损伤时, 理想的处理方法是停药, 并结合药物治疗; 过去已有学者证实, 抗菌治疗在防治NSAIDs相关性小肠病中并无意义, 但近来有实验数据表明, 甲硝唑对NSAIDs相关性小肠病具有一定的作用, 其机制并非源于甲硝唑的抗菌作用, 而与其可能直接影响线粒体氧化磷酸化有关^[40]; 另外, 有研究发现口服柳氮磺胺吡啶能降低NSAIDs服用者的肠通透性, 说明柳氮磺胺吡啶对NSAIDs相关性肠病也具有一定的治疗作用; 早期曾有学者用大剂量米索前列醇治疗吡哌美辛所致的

肠渗透性升高有效^[41], 但无进一步的数据证实米索前列醇的这一作用.

3 参考文献

- 1 Singh G. Recent considerations in nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Am J Med* 1998; 105: 31S-38S
- 2 Dubois RW, Melmed GY, Henning JM, Bernal M. Risk of Upper Gastrointestinal Injury and Events in Patients Treated With Cyclooxygenase (COX)-1/COX-2 Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs), COX-2 Selective NSAIDs, and Gastroprotective Cotherapy. *Journal of Clinical Rheumatology* 2004; 10: 178-189
- 3 Tseng CC, Wolfe MM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Med Clin North Am* 2000; 84: 1329-1344
- 4 Pennisi E. Building a better aspirin. *Science* 1998; 280: 1191-1192
- 5 Takeeda M, Hayashi Y, Yamato M, Murakami M, Takeuchi K. Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isoenzymes in mucosal defense of inflamed rat stomach. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 193-205
- 6 Takeeda M, Yamato M, Kato S, Takeuchi K. Cyclooxygenase isozymes involved in adaptive functional responses in rat stomach after barrier disruption. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 713-719
- 7 Godil A, DeGuzman L, Schilling RC 3rd, Khan SA, Chen YK. Recent nonsteroidal anti-inflammatory drug use increases the risk of early recurrence of bleeding in patients presenting with bleeding ulcer. *Gastrointestinal Endoscopy* 2000; 51: 146-151
- 8 Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol* 1997; 24: 15-19
- 9 Shafiq N, Malhotra S, Pandhi P, Nada R. Comparative gastrointestinal toxicity of selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. *Indian J Exp Biol* 2005; 43: 614-619
- 10 Hiratsuka T, Futagami S, Tatsuguchi A, Suzuki K, Shinji Y, Kusunoki M, Shinoki K, Nishigaki H, Fujimori S, Wada K, Miyake K, Gudis K, Tsukui T, Sakamoto C. COX-1 and COX-2 conversely promote and suppress ischemia-reperfusion gastric injury in mice. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 903-913
- 11 Scheiman JM, Cryer B, Kimmey MB, Rothstein RI, Riff DS, Wolfe MM. A randomized, controlled comparison of ibuprofen at the maximal over-the-counter dose compared with prescription-dose celecoxib on upper gastrointestinal mucosal injury. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 290-295
- 12 Hooper L, Brown TJ, Elliott R, Payne K, Roberts C, Symmons D. The effectiveness of five strategies for the prevention of gastrointestinal toxicity induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review. *BMJ* 2004; 329: 948
- 13 Sturkenboom MCJM, Burke TA, Dieleman JP, Tangelder MJD, Lee F, Goldstein JL. Underutilization of preventive strategies in patients receiving NSAIDs. *Rheumatology* 2003; 42: III23-III31
- 14 Fialova P, Vlcek J. The role of anti-ulcerative drugs in treatment and prevention of gastropathies induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Vnitr Lek* 2004; 50: 858-866
- 15 Fornai M, Natale G, Colucci R, Tuccori M, Carazzina G, Antonioli L, Baldi S, Lubrano V, Abramo A, Blandizzi C, Del Tacca M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2005; 372: 79-87
- 16 Herings RM, Goettsch WG. Inadequate prevention of NSAID-induced gastrointestinal events. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 760-763
- 17 Watson DJ, Bolognese JA, Yu C, Krupa D, Curtis S. Use of gastroprotective agents and discontinuations due to dyspepsia with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor etoricoxib compared with non-selective NSAIDs. *Curr Med Res Opin* 2004; 20: 1899-1908
- 18 Ramey DR, Watson DJ, Yu C, Bolognese JA, Curtis SP, Reicin

- AS. The incidence of upper gastrointestinal adverse events in clinical trials of etoricoxib vs. non-selective NSAIDs: an updated combined analysis. *Curr Med Res Opin* 2005; 21: 715-722
- 19 Fauler J. Undesired effects of NSAIDs and coxibs. *MMW Fortschr Med* 2005; 147: 31-35
- 20 Pham K, Hirschberg R. Global safety of coxibs and NSAIDs. *Curr Top Med Chem* 2005; 5: 465-473
- 21 Bijlsma JW. Withdrawal of rofecoxib: a sign to be careful with coxibs in patients with increased cardiovascular risk. *Ned Tijdschr Geneesk* 2004; 148: 2162-2164
- 22 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
- 23 West SD, Mercer DW. Bombesin-induced gastroprotection. *Ann Surg* 2005; 241: 227-231
- 24 Sugata H, Ueno T, Shimosegawa T, Yoshimura T. Direct detection of nitric oxide and its roles in maintaining gastric mucosal integrity following ethanol-induced injury in rats. *Free Radic Res* 2003; 37: 159-169
- 25 Uno K, Iuchi Y, Fujii J, Sugata H, Iijima K, Kato K, Shimosegawa T, Yoshimura T. *In vivo* study on cross talk between inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase in rat gastric mucosa: effect of cyclooxygenase activity on nitric oxide production. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309: 995-1002
- 26 Ehrlich K, Sicking C, Respondek M, Peskar BM. Interaction of cyclooxygenase isoenzymes, nitric oxide, and afferent neurons in gastric mucosal defense in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 277-283
- 27 Li YH, Li J, Huang Y, Lu XW, Jin Y. Gastroprotective effect and mechanism of amlolmetin guacyl in mice. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3616-3620
- 28 Konturek PC, Brzozowski T, Kania J, Konturek SJ, Hahn EG. Nitric oxide-releasing aspirin protects gastric mucosa against ethanol damage in rats with functional ablation of sensory nerves. *Inflamm Res* 2003; 52: 359-365
- 29 Lohmander LS, McKeith D, Svensson O, Malmgren M, Bolin L, Kalla A, Genti G, Szechinski J, Ramos-Remus C, for the STAR Multinational Study Group. A randomised, placebo controlled, comparative trial of the gastrointestinal safety and efficacy of AZD3582 versus naproxen in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 449-456
- 30 Skelly MM, Hawkey CJ. Dual COX inhibition and upper gastrointestinal damage. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 2191-2195
- 31 Zacharowski P, Breese E, Wood E, Del Soldato P, Warner T, Mitchell J. NSAIDs increase GM-CSF release by human synoviocytes: comparison with nitric oxide-donating derivatives. *Eur J Pharmacol* 2005; 508: 7-13
- 32 Goel A, Gasche C, Boland CR. Chemoprevention goes gourmet: different flavors of NO-aspirin. *Mol Intery* 2005; 5:207-210
- 33 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G, European *Helicobacter Pylori* Study Group (EH PYLORISG). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 167-180
- 34 Fortun PJ, Hawkey CJ. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 169-175
- 35 Graham DY, Opekun AR, Willingham FF, Qureshi WA. Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAID users. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 55-59
- 36 Bjarnason I, Hayllar J, Smethurst P, Price A, Gumpel MJ. Metronidazole reduces intestinal inflammation and blood loss in NSAID-induced enteropathy. *Gut* 1992; 33: 1204-1208
- 37 Takeuchi K, Tanaka A, Ohno R, Yokota A. Role of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 165-182
- 38 Hsu DZ, Liu MY. Involvement of nitric oxide in gastric protection of epinephrine in endotoxin intoxication in rats. *Toxicology* 2004; 204: 203-208
- 39 Whittle BJ. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17: 301-313
- 40 Leite AZ, Sipahi AM, Damiao AO, Coelho AM, Garcez AT, Machado MC, BuchH.Pyloriiguel CA, Lopasso FP, Lordello ML, Agostinho CL, Laudanna AA. Protective effect of metronidazole on uncoupling oxidative phosphorylation induced by NSAID: a new mechanism. *Gut* 2001; 48: 163-167
- 41 Bjarnason I, Smethurst P, Clark P, Menzies I, Levi J, Peters T. Effect of prostaglandin on indomethacin-induced increased intestinal permeability in man. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989; 164: 97-102

一氧化氮与胃黏膜保护和损伤

王琳, 任建林

王琳, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化疾病研究所 福建省厦门市 361004
通讯作者: 王琳, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化疾病研究所. sycjm@21cn.com
电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017
收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

摘要

自从1989年MacNaughton首次证实外源性一氧化氮(NO)能减轻70%乙醇对胃黏膜的损伤后, 越来越多的研究认为, NO是一种具有广泛生物效应的小分子化合物, 既是一种内源性活性物质, 有广泛的生理作用; 同时又是一种重要的炎症介质. 正常生理情况下它具有直接细胞保护和介导耐受性细胞保护作用; 维持胃黏膜上皮细胞的完整性; 改善胃黏膜血液循环; 增加黏膜自我修复和抗氧化自由基等作用. 病理状态下NO参与*H. pylori*感染后胃黏膜损伤和门脉高压性胃病的形成; 具有促进肿瘤生长和抗凋亡作用; 因此深入了解NO的特性对胃黏膜损伤和防御机制的认识极有帮助.

关键词: NO; 胃黏膜; 保护; 损伤

王琳, 任建林. 一氧化氮与胃黏膜保护和损伤. 世界华人消化杂志 2005; 13(21):2601-2604
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2601.asp>

0 引言

1980年Furchgott和Zawad发现内皮细胞能释放一种舒血管因子(EDRF), 但其结构和特性不明, 1987年才证实EDRF是一种气体物质——一氧化氮(nitric oxide, NO). 1989年MacNaughton首次证实外源性NO能减轻70%乙醇对胃黏膜的损伤, 提示NO对胃黏膜具有保护作用. 多年来研究认为NO作为一种生物活性分子, 对胃黏膜具有双向调节作用, 一方面对胃黏膜有保护作用; 另一方面介导胃黏膜损伤性炎症反应, 表现为细胞毒性作用.

1 NO的生物学特性

NO的生物合成主要受一氧化氮合酶(NOS)调节. 它由NOS催化并以L-2精氨酸为底物, 在还原性辅酶、黄素单核苷酸及四氢喋呤等因子辅助下生成. NOS是NO合成过程中唯一的酶, 根据NOS生物学特性和编码基因, 可将NOS分为两类3型, 神经型(I型 nNOS)和内皮型(III型 eNOS), 它们属于原生型一氧化氮合酶(cNOS), II

型NOS属于诱导型一氧化氮合酶(iNOS). cNOS主要分布于神经细胞和血管内皮细胞中, 由它催化生成的NO主要起神经递质和第二信使的作用, 在正常情况下它持续产生少量NO. NO作为一种内源性血管舒张因子, 可调节血管紧张性和内皮细胞连续性, 有效舒张血管, 增加胃黏膜血流量; iNOS主要分布于巨噬细胞、内皮细胞等处, 正常情况下iNOS的基因并不表达, 在内毒素和某些细胞因子的刺激下它才进行转录和翻译产生iNOS, 活化产生大量NO, 催化生成的NO往往量较大, 此时过度表达的NO可直接引起细胞毒作用或通过氧自由基氧化生成毒性更大的ONOO⁻, 而ONOO⁻作为一种强氧化剂还具有强烈的抑制细胞线粒体氧化呼吸作用, 从而导致能量代谢障碍使细胞死亡, 导致细胞脂质过氧化损伤.

2 NOS的分布及其生理意义

胃黏膜中NOS分布广泛, 说明NO参与了胃的各种生理功能, NO分泌过多或过少及平滑肌对NO敏感性的改变都将使胃功能发生障碍. nNOS在胃黏膜中较其它两种NOS分布更广, 它存在于大量的内分泌细胞中, 与胃肠激素相互协调参与胃肠功能的调节; 内分泌细胞中也有iNOS表达, 提示同胃肠一些肽类有一定相互作用; eNOS主要分布于血管内皮, 它的主要作用为调节胃肠血液循环. NO在黏膜损伤时的生理作用见表1.

表1 胃黏膜一氧化氮的生理意义

	NOS		
	nNOS	iNOS	eNOS
血流量调节	↑	↓	↑↑
血管通透性调节	↓	↑	↓
血小板功能调节	抑制血小板黏附、集聚		
中性粒细胞功能调节	抑制中性粒细胞的黏附、集聚		
胃酸分泌	间接减少胃酸分泌		
黏液与碳酸氢盐屏障	促进黏液和黏蛋白合成, 增加黏液厚度		
自由基	正常生理情况下NO抑制其细胞毒作用 过度表达NO可产生细胞毒作用		

3 一氧化氮与胃黏膜保护

3.1 NO的胃黏膜保护 NO对胃黏膜具有直接的细胞保护作用, 研究发现应用小剂量的NO供体以提供外源性NO, 可以防止或明显减轻胃黏膜的损伤; 大量研究还

表明胃黏膜适应性细胞保护作用可能是通过NO的介导而产生,尤其是应激状态下的胃黏膜适应性更是如此^[1].有研究^[1-3]证实内源性NO通过调节胃黏膜血流量(GMBF)而介导了耐受性细胞保护作用,而阻断NO的合成可大大减弱这种保护.

3.2 维持胃黏膜上皮的完整性 胃黏膜上皮的完整性取决于局部保护因子和损伤因子之间的相互作用,以L-NAME抑制内源性NO的合成可明显增强胃黏膜对损伤因子的易感性,而加入L-Arg后,胃黏膜对损伤的敏感性大大下降.说明NO能通过降低胃黏膜对损伤的敏感性来维持胃黏膜上皮的完整性^[4-6].NO还与其他胃黏膜保护因子如PGs、巯基物质、生长因子等起协同作用保持胃黏膜的完整性^[7-10].NO作为一种脂溶性神经传递介质在黏膜损伤时与降钙素基因相关肽协作调控胃的分泌与运动,限制胃黏膜的进一步损伤,创造了损伤胃黏膜快速愈合和重建的良好条件^[11].

3.3 改善胃黏膜血液循环 在生理状态下,胃黏膜的血管系统可合成并释放NO,调节血管壁平滑肌的基础张力,从而实现其对黏膜血流动力学的调节作用,使GMBF维持在基础水平上.药物引起的急性胃黏膜损伤时,NO具有扩张黏膜血管增加血流量的作用,因此是一个重要的黏膜保护因子^[12].当损伤因素作用于胃黏膜后,在胃黏膜损伤的同时,受损的黏膜组织发生局部充血反应,血管的通透性也常常增加,研究发现冷冻束缚及浸水束缚应激造成黏膜损伤,血管通透性明显增加,而给予L-Arg可促使NO合成,明显抑制血管通透性增加,因此它可通过降低血管通透性以维持血管壁的完整性^[13].同时血管内皮细胞产生的NO还可迅速弥散至黏附于血管内壁上的血小板内,抑制其黏附、聚集,阻止血栓形成,保持血流畅通.

3.4 抑制胃酸分泌 研究表明,NO并不影响基础状态下的胃酸分泌.当胃黏膜损伤时,黏膜肥大细胞脱颗粒,一方面释放组胺,刺激胃酸分泌^[14,15];另一方面促进内源性NO合成增加,抑制胃酸分泌,而且后者作用大于前者,最终结果是酸分泌减少.内源性NO在黏膜损伤时抑制胃酸分泌^[16],在损伤局部造成一种碱性环境,不但可减轻黏膜损伤,也有利于损伤后的修复过程.

3.5 增强黏膜自我修复、重建能力 实验研究表明^[17,18],抑制NO合成后不但延迟急、慢性损伤的自然愈合过程,也减弱某些药物促溃疡愈合的作用.高渗NaCl作用于胃黏膜可致广泛的表层上皮细胞的损伤脱落,但很快即通过RER恢复了上皮的完整性及连续性.因此研究认为内源性NO在损伤后的修复、愈合过程中发挥重要作用^[19].

3.6 抗氧自由基的作用 氧自由基是重要的黏膜损伤因子,在黏膜损伤时,可产生大量的氧自由基,脂质过氧化产物增加,使黏膜损伤进一步加重^[20].NO具有氧化作用,能与超氧阴离子反应,消除超氧阴离子,抑制其

细胞毒作用,同时还通过抑制黄嘌呤氧化酶和NADPH氧化酶而减少氧自由基大量产生^[21,22].李春艳^{et al}^[23]使用酒精灌胃后,大鼠门脉血NO含量降低,MDA水平升高;加用L-Arg与L-NAME后,NO和MDA含量均有所恢复,黏膜损伤减轻.认为内源性NO能够清除氧自由基,减少急性胃黏膜损伤程度.

3.7 其他 胃黏液细胞可表达高水平的NOS活性,它合成的NO可促进黏液细胞合成及分泌黏蛋白,增加黏液厚度,加强黏液屏障功能^[5,9,24];正常状态下抑制NO的产生可使HCO₃⁻分泌增加,用L-NAME抑制NO合成,明显减弱"碱反应",L-Arg可逆转上述现象,表明内源性NO参与介导了弱刺激产生的"碱反应"现象;应激状态下NO和COX-2、pS2、三叶因子等协同可减少黏膜损伤^[10];内外源性NO可维持黏膜内GSH水平^[25-27],从而起到其黏膜保护作用;相关分析发现,无论应激前使用L-NAME、L-Arg或氨基胍与否,应激后MPO活性与cNOS显著负相关,而与iNOS活性无关,提示cNOS以及产生的NO可抑制中性粒细胞浸润,减轻应激性黏膜损伤.

4 一氧化氮对胃黏膜的损伤

NO在机体内既有保护作用,又有其杀伤毒性与促炎的作用.NO在基础状态下对胃肠黏膜有保护作用.但过量的NO也可造成自身正常组织的损伤;还影响多种免疫活性物质的合成、分泌.NO除参与调节免疫功能外,还会产生细胞毒作用.内毒素血症时iNOS被激活产生大量NO,导致胃黏膜损伤^[28].

4.1 NO与*H pylori*感染 *H pylori*感染是慢性胃炎和消化道溃疡的主要病因,胃黏膜在感染*H pylori*后除了产生各种毒素和有毒的酶直接破坏胃黏膜屏障外,还能诱发机体产生炎症和免疫反应,后者产生的细胞因子和炎症介质能诱导NO的释放.蔡东霞^{et al}^[29]研究发现*H pylori*阳性胃炎胃黏膜NOS活性及胃液NO水平显著高于*H pylori*阴性组.Uchiyama^{et al}^[30]研究发现*H pylori*阳性患者胃黏膜iNOS表达上升.

4.2 NO与胃癌 iNOS主要在巨噬细胞、中性粒细胞、枯否细胞、自然杀伤细胞、黏膜上皮细胞等细胞中表达.前三种细胞与瘤细胞一起培养,可以发现NO对瘤细胞有细胞毒性.研究表明NO与胃癌的发生、发展有关^[31].NO在肿瘤生长中是一种重要的介质,不同的肿瘤中都有原生型或诱导型NOS增加,提示NO在肿瘤发生,发展中的不同阶段都是重要分子,有促进肿瘤生长作用^[32].徐亮^{et al}^[33]对胃癌组织和血清NO及NOS做了定量分析,结果显示:癌组织中NO和NOS含量均明显高于癌旁组织,且癌组织中NO和NOS活性是一致的,但癌组织的NO含量高,而血清中的NO含量低.认为可能是由于血液中大量的NO广泛分布于各组织中发挥其免疫作用,或直接作用于肿瘤细胞,使血中NO水平下降,从而癌组织NOS含量比癌旁组织高,合

成含量也高,可能起着调节细胞增殖相关基因的表达。Chang *et al*^[34]研究认为在胃癌的发生过程中NO参与抗凋亡作用。

4.3 NO与门脉高压性胃病 门脉高压性胃病(PHG)的发病机理至今尚未完全明了, Moreira *et al*^[35]研究表明NO在门脉高压性胃病发病中扮演着重要角色, 早先El-Newihi *et al*^[36]研究即发现门脉高压性胃病的胃黏膜中iNOS与cNOS的阳性强度明显高于对照组, 轻型PHG的NO也较重型为高, 提示局部组织内iNOS、cNOS活性增高。目前认为局部NO增高其生物意义在于: (1)胃黏膜局部NO浓度增高, 使血管扩张形成独特的组织病理学及高动力学变化; (2)血管扩张及高动力学有利于建立广泛的侧枝循环, 缓解门脉高压, 在初期具有代偿意义; (3)PHG胃黏膜NOS活性增高是NO生成的重要来源, 促进PHT 高动力循环发展, 进一步损伤了胃黏膜, 反过来又促进更多的NO的生成和释放, 形成了恶性循环。过量的NO直接扩张血管, 也可作为其他扩血管物质的协同和终末介质, 介导胃黏膜病理性充血^[37]。同时NO对PG具有调节作用^[38], 导致内源性的胃黏膜保护因子紊乱。胃黏膜瘀血使胃肠黏膜缺氧, 功能下降, 致使正常屏障机能削弱, 大量的毒性物质入血, 引起内毒素血症, 使更多的NO产生, 又加重肝脏的损害。

NO是一种具有广泛生物效应的小分子化合物, 对机体具有“双刃”作用, 既是一种内源性活性物质, 有广泛的生理作用; 同时又是一种重要的炎症介质。NO对胃黏膜的作用也极其复杂, 众多的机制之间又有着相互的联系。有些结果也不尽相同, 甚至相互矛盾, 需要进一步细致的研究阐明。了解NO对胃黏膜保护及损伤的机制, 可进一步加深对胃黏膜损伤、防御机制的认识。

5 参考文献

- West SD, Mercer DW. Bombesin-induced gastroprotection. *Ann Surg* 2005; 241: 227-231
- Suzuki H, Shimosegawa T, Satoh A, Kimura K, Ohara S, Asaki S, Toyota T. Gastric mucosal blood flow response to stress in streptozotocin diabetic rats: regulatory role of nitric oxide. *J Gastroenterol* 1997; 32: 726-733
- 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
- Sugata H, Ueno T, Shimosegawa T, Yoshimura T. Direct detection of nitric oxide and its roles in maintaining gastric mucosal integrity following ethanol-induced injury in rats. *Free Radic Res* 2003; 37: 159-169
- Ohta Y, Nishida K. L-arginine protects against stress-induced gastric mucosal lesions by preserving gastric mucus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29: 32-38
- Ohta Y, Nishida K. Protective effect of L-arginine against stress-induced gastric mucosal lesions in rats and its relation to nitric oxide-mediated inhibition of neutrophil infiltration. *Pharmacol Res* 2001; 43: 535-541
- Uno K, Iuchi Y, Fujii J, Sugata H, Iijima K, Kato K, Shimosegawa T, Yoshimura T. *In vivo* study on cross talk between inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase in rat gastric mucosa: effect of cyclooxygenase activity on nitric oxide production. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309: 995-1002
- Ehrlich K, Sicking C, Respondek M, Peskar BM. Interaction of cyclooxygenase isoenzymes, nitric oxide, and afferent neurons in gastric mucosal defense in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 277-283
- Rokutan K, Teshima S, Kawai T, Kawahara T, Kusumoro K, Mizushima T, Kishi K. Geranylgeranylacetone stimulates mucin synthesis in cultured guinea pig gastric pit cells by inducing a neuronal nitric oxide synthase. *J Gastroenterol* 2000; 35: 673-681
- Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci* 1999; 65: PL27-PL32
- 李兆申, 湛先保, 许国铭. 胃黏膜损伤与保护—基础与临床. 第1版. 上海:上海科学技术出版社, 2004: 305-306
- Li YH, Li J, Huang Y, Lu XW, Jin Y. Gastroprotective effect and mechanism of amlolmetin guacyl in mice. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3616-3620
- Yu H, Sato EF, Minamiyama Y, Arakawa T, Kobayashi K, Inoue M. Effect of nitric oxide on stress-induced gastric mucosal injury in the rat. *Digestion* 1997; 58: 311-318
- Takeuchi K, Kato S, Abe Y, Kinoshita M, Tsuchimoto M. Nitric oxide, histamine, and sensory nerves in the acid secretory response in rat stomach after damage. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25 Suppl 1: S39-S47
- Maity P, Biswas K, Roy S, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer—recent mechanistic update. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 329-338
- Berg A, Redeen S, Ericson AC, Sjostrand SE. Nitric oxide—an endogenous inhibitor of gastric acid secretion in isolated human gastric glands. *BMC Gastroenterol* 2004; 4: 16
- Brzozowska I, Targosz A, Sliwowski Z, Kwiecien S, Drozdowicz D, Pajdo R, Konturek PC, Brzozowski T, Pawlik M, Konturek SJ, Pawlik WW, Hahn EG. Healing of chronic gastric ulcers in diabetic rats treated with native aspirin, nitric oxide (NO)-derivative of aspirin and cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 773-790
- Araki H, Komoike Y, Matsumoto M, Tanaka A, Takeuchi K. Healing of duodenal ulcers is not impaired by indomethacin or rofecoxib, the selective COX-2 inhibitor, in rats. *Digestion* 2002; 66: 145-153
- Zayachkivska OS, Konturek SJ, Drozdowicz D, Brzozowski T, Gzhegotsky MR. Influence of plant-originated gastroprotective and antiulcer substances on gastric mucosal repair. *Fiziol Zh* 2004; 50: 118-127
- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Sliwowski Z, Pajdo R, Duda A, Ptak A, Hahn EG. Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 320-329
- Brzozowski T, Kwiecien S, Konturek PC, Konturek SJ, Mitis-Musiol M, Duda A, Bielanski W, Hahn EG. Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. *Med Sci Monit* 2001; 7: 592-599
- Konturek PC, Brzozowski T, Kania J, Konturek SJ, Hahn EG. Nitric oxide-releasing aspirin protects gastric mucosa against ethanol damage in rats with functional ablation of sensory nerves. *Inflamm Res* 2003; 52: 359-365
- 李春艳, 刘丽娜, 吕中. 一氧化氮与氧自由基在大鼠急性乙醇性胃黏膜损伤中的作用. 中国病理生理杂志 2004; 20: 1777-1813
- Slomiany BL, Slomiany A. Nitric oxide as a modulator of gastric mucin synthesis: role of ERK and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *IUBMB Life* 2002; 54: 267-273
- Arrieta J, Benitez J, Flores E, Castillo C, Navarrete A.

- Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med* 2003; 69: 905-909
- 26 Kim H, Hwan Kim K. Role of nitric oxide and mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacology* 2001; 62: 200-207
- 27 Kim H, Kim KH. Effect of nitric oxide on hydrogen peroxide-induced damage in isolated rabbit gastric glands. *Pharmacology* 1998; 57: 323-330
- 28 Hsu DZ, Liu MY. Involvement of nitric oxide in gastric protection of epinephrine in endotoxin intoxication in rats. *Toxicology* 2004; 204: 203-208
- 29 蔡东霞, 黄月红, 卢贤立. 幽门螺杆菌感染者胃黏膜NOS、胃液NO的变化及意义. *福建医科大学学报* 2003; 137
- 30 Uchiyama K, Ida K, Okuda J, Asai Y, Ohyama Y, Kuroda M, Matsumoto N, Takami T, Ogawa T, Takaori K. Correlations of hemoglobin index (IHb) of gastric mucosa with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection and inflammation of gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1054-1060
- 31 Wang L, Shi GG, Yao JC, Gong W, Wei D, Wu TT, Ajani JA, Huang S, Xie K. Expression of endothelial nitric oxide synthase correlates with the angiogenic phenotype of and predicts poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric Cancer* 2005; 8: 18-28
- 32 Wang YZ, Cao YQ, Wu JN, Chen M, Cha XY. Expression of nitric oxide synthase in human gastric carcinoma and its relation to p53, PCNA. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 46-50
- 33 徐亮, 李代渝, 易小全等. 胃癌组织和血清一氧化氮及一氧化氮合酶定量分析. *肿瘤研究临床* 2000; 12: 226-227
- 34 Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2232-2240
- 35 Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, Marroni N, Gonzalez-Gallego J. Quercetin prevents oxidative stress and NF-kappaB activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1939-1946
- 36 El-Newihi HM, Kanji VK, Mihas AA. Activity of gastric mucosal nitric oxide synthase in portal hypertensive gastropathy. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 535-538
- 37 Ferraz JG, Wallace JL. Underlying mechanisms of portal hypertensive gastropathy. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25 Suppl 1: S73-S78
- 38 Ko JK, Cho CH, Lam SK. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2503-2508

电编 张勇 编辑 管鑫妍 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2005-06-29)

胃黏膜免疫机制研究进展

张波, 任建林

张波, 福建医科大学研究生 福建省福州市 350004
任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化病研究所 福建省厦门市 361004
通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化病研究所. jianlin.ren@xmzsh.com
电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017
收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-11-10

摘要

胃黏膜与肠黏膜组织学上的差异决定了两者在免疫相关机制上的不同。胃黏膜固有层可在抗原的刺激下浸润淋巴细胞, 产生淋巴滤泡对抗原发生免疫应答及对黏膜组织产生损伤。

关键词: 胃黏膜; 免疫机制

张波,任建林. 胃黏膜免疫机制研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13 (21): 2605-2609
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2605.asp>

0 引言

一般认为正常人胃黏膜组织结构中没有黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)^[1]. 在正常情况下, 胃黏膜固有层靠近黏膜肌仅有少量散在的淋巴细胞, 在抗原的刺激下可形成淋巴组织. 上皮层在阻止病原进入体内的同时向固有层发出抗感染的信号, 信号包括表面抗原、细胞因子、黏附因子. 这些因子诱导激活免疫、炎症细胞. 胃黏膜上皮成功启动宿主反应并将非特异性急性炎症转变为抗原特异的免疫反应, 同时不当的免疫反应又会伤及胃黏膜. 上皮细胞与免疫炎症细胞的相互交流是胃黏膜免疫系统发育与发生功能的过程. 了解其交流内容与调控机制有助于完善免疫学理论, 更有助于相关疾病的防治. 根据对这一网络的认识, 已经开展了包括幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)疫苗、提高胃癌细胞黏附分子或MHC分子表达诱导淋巴细胞杀伤肿瘤等新的疾病治疗方法的研究.

1 胃黏膜的组织结构

胃黏膜层由内到外分为上皮层、固有层、黏膜肌层. 胃黏膜上皮为单层柱状上皮, 它构成了黏膜表层并延伸入胃小凹, 在胃腺峡部与腺上皮连接. 在胃贲门与食管连接处, 食管的复层扁平上皮转变为胃的单层柱状上皮. 在幽门与十二指肠相交处, 胃上皮逐渐转变为小

肠上皮. 固有层主要由胃的腺体组成, 此外还有少量结缔组织. 结缔组织由细胞胶原纤维与网状纤维构成网架, 内有成纤维细胞、少量浆细胞、肥大细胞、淋巴细胞, 正常状态时没有中性粒细胞和嗜酸细胞. 黏膜肌层可对黏膜层起支持作用, 它由平滑肌细胞组成.

2 胃黏膜本身的免疫状态

2.1 胃酸及胃黏蛋白 胃酸主要成分是由壁细胞分泌的 H^+ , 在黏液的胃腔侧pH值可达到1.0. 胃酸是抵御细菌侵入胃黏膜的第一道防线, 胃酸是减少胃内细菌定植最有效的因子. 胃酸过少症和胃酸缺乏症患者易于感染并加剧细菌和某些寄生虫感染的程度. 胃黏蛋白由胃黏膜表面黏液细胞胃腺颈黏液细胞分泌. 胃黏蛋白含85%的碳水化合物, 15%蛋白质和0.3-0.4%共价结合脂肪酸, 约30%胃黏蛋白含有唾液酸的羧基和巯基基因而带大量负电荷^[2]. 胃黏蛋白可以作为一种抗氧化剂减少细菌及免疫细胞产生的自由基引起的损伤. 胃上皮是紧密连接上皮, 可限制抗原进入黏膜固有层及体循环, 但白蛋白大小的分子(相对分子质量 M_r 80 000)可以以免疫特性完整的分子形式通过大鼠胃上皮, 提示胃内存在"抗原递呈"形式, 允许免疫系统探及胃腔内潜在有害物质, 然后减少、限制抗原物质对胃黏膜损害.

2.2 免疫球蛋白SIgA 胃黏膜固有层浆细胞产生并分泌IgA到黏膜表面. SIgA可结合到黏膜表面上皮细胞内或固有层中细菌, 防止细菌在黏膜表面黏附和呈集落生长, SIgA可中和细菌毒素结合病毒阻止病毒复制和扩散. SIgA结合抗原后并不能促进吞噬细胞吞噬抗原, 但可借助溶菌酶等杀死结合微生物. 近来研究表明SIgA Fc段功能与IgM、IgG Fc段不同, 不能经经典途径激活补体, 没有调理吞噬作用, 所以SIgA通常不引起炎症反应^[3]. 这一点对机体维持胃肠道环境的稳定避免胃肠道的免疫损伤十分重要. IgE 胃黏膜中有IgE产生细胞和肥大细胞, 结合在肥大细胞上的IgE与相应抗原交联后可引起肥大细胞脱颗粒, 释放过敏介质LT等对胃黏膜引起保护和损伤双重作用. IgG胃黏膜中产生IgG的B细胞较少, 但在黏膜炎症性疾病时IgG产生的细胞量显著增加. 正常胃黏膜抗原物质主要由IgA清除, 而黏膜炎症则由IgG介导. IgG主要通过激活补体, 调理吞噬和刺激炎症细胞释放炎症介质引起胃肠道炎症反应.

2.3 兼职抗原呈递细胞 胃黏膜柱状上皮细胞在通常

情况下并不表达MHC II类分子,无抗原呈递功能,当在某些炎症过程中接受某些活性分子(IFN- γ)的刺激也可表达MHC II类分子. Barrera *et al*^[4]研究证实胃黏膜上皮细胞表面分子呈现极化表达现象,与内化抗原有关的受体(GM1、DEC-205及FcRn等)在细胞腔面优势表达,与抗原呈递有关的分子(HLA-A、B、C、CDLd、HLA-II类分子等)和协同刺激有关分子(CD58、ICAM-1等)主要表达于细胞的基底面. 上皮细胞还能够表达CD86(B7.2)、CD80(B7.1)等与抗原呈递有关分子^[5],这些表面分子在黏膜炎症状态时表达增加. 实际结果证实,胃黏膜上皮细胞内小体有*H pylori*抗原时,并且胃上皮细胞内表达的多聚免疫球蛋白受体(polymeric immunoglobulin receptor, PIGR)能促进抗原-Ig抗体复合物的摄入,而IgA是黏膜免疫系统所共有的成分. Barrera *et al*^[4]证实胃上皮细胞内存在把摄入胞内的抗原消化为多肽片段的酶系统(主要是蛋白酶B与组织蛋白酶D,E)其蛋白降解机制与传统的抗原呈递细胞相似. 胃黏膜上皮细胞与抗原直接接触的同时,又与局部浸润T细胞直接接触,因而能活化T细胞,胃黏膜Th1细胞分泌IFN- γ ,后者造成局部炎症并对上皮屏障功能造成破坏. 由此可认为胃上皮细胞损害可能是其本身激活了有害的辅助T细胞反应的结果. 现代研究多集中在*H pylori*感染时抗原呈递细胞与浸润淋巴细胞的相互作用及对黏膜上皮的影响上. Suzuki *et al*^[6]认为胃固有层中的巨噬细胞在胃黏膜感染*H pylori*时可作为抗原呈递细胞,他们的依据是胃黏膜固有层中巨噬细胞除可以将抗原呈递给T细胞外,自身表达B7.1(CD80)和B7.2(CD86)共刺激分子了,从而为T细胞的分化与激活提供双信号. Krauss-Etschmann *et al*^[7]通过免疫组化技术认为CD14⁺巨噬细胞在感染的胃黏膜中非常稀少,不可能象在外周血中那样丰富,进而支持胃黏膜中存在有其它类型的抗原呈递细胞的说法. 众多的实验证实胃黏膜上皮感染*H pylori*后,上皮细胞表达MHC II类分子显著增高,并且MHC II抗原表达区与特异单核细胞浸润区毗邻,局灶浸润CD4⁺T细胞数量显著增多,这是*H pylori*感染者胃黏膜IFN- γ 分泌增多刺激的结果. Krauss-Etschmann对*H pylori*感染儿童胃黏膜上皮进行活检,并进行免疫组化处理证实上皮细胞存在辅助刺激因子CD80/CD86. 抗CD80及抗CD86抗体能够阻断胃上皮细胞对CD4⁺的激活. 此外,胃上皮细胞还表达细胞间黏附分子(ICAM-1),淋巴细胞功能抗原3(LFA-3)以调节免疫反应^[8]. B7分子、ICAM-1表达增加对抗原呈递细胞活化T细胞非常重要^[9]. 随后, Barrera *et al*^[10]证实胃上皮细胞表达的MHC II类分子与传统APC表达MHC II类分子电泳动度不同,原因在于两种分子的糖基有差别,这种差别对于胃黏膜上皮细胞的潜在作用是非常重要的. 胃黏膜上皮MHC II分子相关不变链Ii(CD74)组成

性表达的测定界定了胃黏膜上皮是实质意义上的抗原呈递细胞^[11].

3 胃黏膜免疫损伤与相关疾病

3.1 消化性溃疡中黏膜免疫对黏膜上皮直接损害 *H pylori*感染产生的免疫应答对胃黏膜、十二指肠黏膜直接损伤破坏了胃黏膜防御机制,又能间接促进H⁺对十二指肠的损伤,加强了对十二指肠直接侵袭因素. 免疫损伤在消化性溃疡中占重要地位.

从细菌在胃上皮细胞黏附定居开始,机体免疫系统即被激活,表现为黏膜上皮合成IL-8, IL-12, 单核细胞趋化因子MCP-1, 粒单集落刺激因子GM-CSF及肿瘤坏死因子TNF- α 等促炎因子能力明显增强. Yamaoka *et al*^[12]检测了*H pylori*感染者上皮细胞各种趋化因子mRNA表达和蛋白分泌,趋化因子超家族C-C、C-X-C mRNA表达和蛋白分泌增加,其中IL-8通过激活NF-KB途径^[13]. NF-KB/Rel家族成员能激活各种具有免疫或炎症反应物质的基因^[14]. 这些细胞因子可使中性粒细胞、淋巴、单核等炎症免疫细胞活化并聚集到胃黏膜组织,激活后免疫炎症细胞进一步分泌IL-6、IFN- γ 、IL-1、IL-8等细胞因子,并使黏膜上皮细胞的主要MHC II类分子和CD54(细胞间黏附分子-1)表达增加,从而将*H pylori*抗原成分有效呈递给T、B细胞产生针对抗原特异性细胞免疫和体液免疫,也造成黏膜上皮损伤.

3.1.1 体液免疫及其损伤机制 *H pylori*特异性体液免疫表现为感染局部和全身抗*H pylori*抗体增加,包括IgG、IgA和IgE等抗体型. 其中IgA,尤其是分泌型IgA(sIgA)被认为是黏膜免疫中起保护作用抗体. 然而有研究表明^[15], *H pylori*感染者胃内的特异性IgA抗体多数为非分泌型IgA,其原因可能为*H pylori*感染损害了胃黏膜屏障,导致IgA抗体绕过正常的分泌转运系统. 尚不知Th₁细胞分泌的细胞因子是否有分解sIgA的作用. IgG可激活补体及诱导粒-单细胞在感染部位聚集,释放炎性介质及活性氧等物质损害胃上皮细胞,从而产生免疫损伤作用. IgE则可趋化固有层中的肥大细胞产生超敏反应和脱颗粒^[16,17]. 肥大细胞的胞浆颗粒中含有组胺,肝素,蛋白酶和某些趋化因子. 脱颗粒后肥大细胞还分泌释放前列腺素、白三烯、PAF等炎症介质和IL-8、IL-4、IL-5、IL-6、TNF- α 等炎症细胞因子,造成血管扩张和通透性增加以及其它炎症细胞移行至感染部位,加重黏膜损伤. 此外*H pylori*某些抗原成分与胃黏膜上皮组织有相似结构,可通过"分子模拟"导致*H pylori*抗体与胃腺上皮或肠细胞发生交叉反应. 这种自身免疫也是*H pylori*的一种免疫致病机制,尤其在*H pylori*与慢性萎缩性胃炎的关系方面^[18]. 自身免疫能够解释*H pylori*感染清除后胃黏膜仍继续发生萎缩性改变. 目前认为可能导致自身免疫反应的

抗原包括*H pylori*鞭毛蛋白、脂多糖、热休克蛋白等。

3.1.2 细胞免疫及其损伤机制 体外研究发现, *H pylori*有中等程度促T细胞增生作用。 *H pylori*粗提物诱导*H pylori*感染者外周血单核细胞(PBMC)和固有层淋巴细胞(LPLS)的增生, 主要是CD4⁺T细胞增生反应。感染过程中大量T细胞在胃黏膜中聚集, 但不清楚浸润T细胞中有多少是特异于*H pylori*感染的。浸润的T细胞以TCR $\alpha\beta$ ⁺T细胞为主, TCR $\gamma\zeta$ ⁺T细胞是否增加尚有争议。*H pylori*感染自然免疫以Th₁为主^[19], 它既不能清除*H pylori*感染也无保护作用, 而是参与了*H pylori*相关胃、十二指肠疾病的发病。感染性疾病中根据细胞因子产生情况及功能可将CD4⁺Th细胞分为Th₀、Th₁、Th₂亚群。Th₁亚群分泌IL-2、IFN- γ 和TGF- β , 主要介导细胞免疫反应, 并辅助B细胞产生IgG2a等具有调理及补体结合功能的抗体。Th₂亚群分泌IL-4、IL-5、IL-10、IL-6介导体液免疫反应辅助了B细胞产生IgG、IgE抗体。Th₀在适当条件下向Th₁、Th₂转化, Th₁和Th₂可通过各自分泌的细胞因子制约对方功能。IFN- γ 下调Th₂反应, IL-10下调Th₁反应^[20]。一般而言Th₁反应主要是针对细胞内病原体感染, 如病毒; Th₂反应则主要针对细胞外感染的病原体, 如某些细菌寄生虫等。不同感染诱导的免疫反应对于感染的最后转归是很重要的。研究指出无论动物还是在人体内*H pylori*自然感染均导致Th₁型反应, 表现为黏膜组织内特异型CD4⁺Th细胞增加, T细胞产生IL-2、IL-12、IFN- γ 等细胞分子增加, 以及B细胞分泌IgG2a型抗体增加, Th₁应答分泌大量的IFN- γ ^[21], 可增强各种炎症细胞, 如巨噬细胞、中性粒细胞活性, 并释放各种炎性细胞因子、ROS和RNS等造成上皮损伤。Th₁应答释放的炎性因子还可增加Fas抗原的表达, 通过FasL-Fas途径诱导上皮细胞的凋亡^[22]。对感染*H pylori*小鼠用IL-12治疗或输入Th₁细胞可加重胃部炎症, 反之若给予IFN- γ 单抗治疗则可使炎症减轻。用基因剔除小鼠所做实验进一步表明缺乏IFN- γ 基因小鼠感染*H pylori*后不发生炎症反应。Fox *et al*^[23]研究发现p53基因敲除的小鼠感染*H pylori*后, Th₁免疫反应下调, 减轻了慢性炎症, 间接抑制胃上皮向癌前转变。对恒河猴*H pylori*感染实验证明*H pylori*感染早期主要是Th₁介导免疫为主, Th₁免疫可能是一种病理性反应, 是一种迟发型过敏反应。测定慢性胃炎与消化性溃疡患者胃黏膜中CD4⁺T细胞介导的免疫反应谱也证明Th₁介导的免疫在消化性溃疡的发生中起重要作用。

3.2 原发性胃淋巴瘤与胃黏膜免疫 胃肠道原发淋巴瘤多数为黏膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤, 这类肿瘤特征起源于黏膜MALT, 胃部淋巴瘤可能起源于胃的MALT。正常生理状态下胃黏膜并无MALT, 胃黏膜一般没有或仅有少量淋巴细胞, 胃黏膜淋巴瘤的发病却相对高于淋巴组织丰富的小肠组织。Parsonnet *et al*^[24], Fischbach *et al*^[25]基础临床研究证实*H pylori*感染与

原发性胃淋巴瘤特别是胃MALT淋巴瘤发病相关。*H pylori*诱发慢性活动性胃炎中胃黏膜固有层出现B淋巴滤泡的生发中心。少量的*H pylori*可以进入黏膜固有层形成黏膜炎症和免疫的恶性循环。MALT淋巴瘤是在淋巴滤泡形成的基础上发生。*H pylori*抗原持续刺激促使胃黏膜淋巴滤泡边缘T淋巴细胞、B淋巴细胞增生、分裂, 部分患者可导致淋巴瘤的产生。目前的证据表明低度恶性B淋巴细胞与幽门螺杆菌感染有一定关系, 但不足以明确胃MALT淋巴瘤的具体发病机制。有推测: 胃MALT淋巴瘤是在特异性抗原的作用下由边缘区域细胞形成, 这些抗原可能直接来源于幽门螺杆菌, 也可能间接通过T淋巴细胞形成, 并通过某种抗原受体形成对肿瘤细胞产生一种显性选择作用。体外研究表明, 低分化原始B细胞来源的胃MALT淋巴瘤对*H pylori*的增生反应必须有非瘤样T淋巴细胞存在, 从培养基中去除这种T细胞可以中止这一增生反应, 此结果提示这种T细胞在*H pylori*感染有关黏膜相关性淋巴瘤发病中起重要作用。*H pylori*刺激T细胞活化有助于肿瘤细胞的增生。在体外缺乏T细胞时可使用CD40系统替代促进需T细胞辅助的B细胞增生。正常情况下, CD40系统可以通过B细胞的抗原特异性交联刺激B细胞增生并分泌免疫球蛋白^[26]。使用CD40系统替代T细胞后*H pylori*并不能刺激肿瘤细胞增生, 说明*H pylori*刺激肿瘤细胞生长的作用需T细胞的介导。Noy *et al*^[27]进行的临床研究显示, 24名对*H pylori*根除不敏感的胃MALT淋巴瘤患者进行化疗后进行了均期为63 mo的追踪。22名患者PCR显示B细胞仍有克隆, 但组织学显示恶性组织已经消退, 可能是放射杀死浸润的对*H pylori*特异T细胞消除了刺激单克隆B细胞分化的作用。Guindi^[28], D'Elia *et al*^[18,29]研究认为T细胞的CD40L(CD154), 细胞因子在胃MALT淋巴瘤的发生、发展中起作用, 同时与慢性胃炎的T细胞克隆相比, 胃MALT淋巴瘤中的T细胞克隆不能通过穿孔素、FasL-Fas机制杀伤B细胞。*H pylori*相关性胃MALT淋巴瘤呈现自身免疫疾病本质。胃MALT淋巴瘤分泌的免疫蛋白对滤泡树突状细胞, IgG、IgA、IgM相关抗原决定簇发生反应, 提示肿瘤分泌的免疫球蛋白具有自身免疫活性。其他研究也发现, 大多数MALT淋巴瘤可以识别自身抗原, 特别是滤泡树突状细胞^[30]存在于淋巴瘤组织中, 为外来抗原处理和沉积的部位, 为浆细胞的转化和淋巴细胞的增生提供持续的抗原刺激。Griener提纯并克隆淋巴瘤特异性抗体, 这一抗体可以与所有的分泌免疫球蛋白的MALT淋巴瘤细胞产生反应, 同时发现这一抗体可以与*H pylori*胃炎黏膜中决大多数浆细胞发生反应, 这种特异性抗原为MALT中产生免疫球蛋白的浆细胞的普通抗原, 而非*H pylori*菌体成分, 这提示自身免疫机制参与淋巴瘤的发病过程。Montalban *et al*^[31]进行了一项为期10 a的前瞻性研

究证实了胃MALT淋巴瘤自身免疫机制的参与: 在胃低度恶性B淋巴瘤进行抗*H pylori*清除后96%的患者存在IgV(H)基因单克隆, 且与t(11;18)等位融合无关, I期胃低度恶性淋巴瘤中90%患者组织学特征消失, 但多数患者B细胞自身免疫分子依然存在。 *H pylori*清除无反应的胃MALT淋巴瘤可能有基因变异。 Wotherspoon *et al*^[32]证实具有恶性增生潜力的淋巴瘤前体细胞的出现可能是基因变异所致。 Nakamura *et al*^[33]在胃淋巴滤泡*H pylori*清除无反应型发现t(11;18)(q21;q21)平衡易位后API2-MALT1嵌合转录体存在。 Du^[34]发现3号染色体三体化阳性阶段肿瘤对*H pylori*根除治疗有效, 在t(1;14)(p22;q32)与t(11;18)(q21;q21)阳性阶段肿瘤发展对*H pylori*根除治疗无效。

胃MALT淋巴瘤发生机制复杂。 *H pylori*持续感染是胃MALT淋巴瘤发生的背景, 自身免疫、基因突变起推动作用。 *H pylori*感染者中很少发生胃MALT淋巴瘤, 遗传、免疫背景等众多因素参与其中。

总之, 胃黏膜组织结构没有黏膜相关淋巴样组织, 在抗原如*H pylori*刺激下固有层会存在淋巴细胞浸润、形成淋巴滤泡发生对抗原的免疫应答的同时造成对黏膜的损伤, 淋巴细胞的来源、免疫表型、免疫途径、具体分子作用机制还都不清楚。 胃黏膜上皮细胞具有抗原呈递细胞的功能, 酒精会通过专职抗原呈递的单核细胞的作用来影响免疫类型^[35], 那么酒精会不会影响胃黏膜上皮细胞的抗原呈递功能, 长期饮酒的人*H pylori*感染率低于对照组^[36], 是否是胃黏膜上皮表面抗原的改变及分泌细胞因子的不同影响胃黏膜的免疫类型而清除*H pylori*, 这些问题有待于进一步的研究。

4 参考文献

- 1 萧树东. 消化疾病的基础与临床进展. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2005: 125-131
- 2 Ma L, Wang WP, Chow JY, Lam SK, Cho CH. The role of polyamines in gastric mucus synthesis inhibited by cigarette smoke or its extract. *Gut* 2000; 47: 170-177
- 3 Otten MA, van Egmond M. The Fc receptor for IgA (FcalphaRI, CD89). *Immunol Lett* 2004; 92: 23-31
- 4 Barrera C, Ye G, Espejo R, Gunasena S, Almanza R, Leary J, Crowe S, Ernst P, Reyes VE. Expression of cathepsins B, L, S, and D by gastric epithelial cells implicates them as antigen presenting cells in local immune responses. *Hum Immunol* 2001; 62: 1081-1091
- 5 Ye G, Barrera C, Fan X, Gourley WK, Crowe SE, Ernst PB, Reyes VE. Expression of B7-1 and B7-2 costimulatory molecules by human gastric epithelial cells: potential role in CD4⁺ T cell activation during *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Invest* 1997; 99: 1628-1636
- 6 Suzuki T, Kato K, Ohara S, Noguchi K, Sekine H, Nagura H, Shimosegawa T. Localization of antigen-presenting cells in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Pathol Int* 2002; 52: 265-271
- 7 Krauss-Etschmann S, Gruber R, Plikat K, Antoni I, Demmelmair H, Reinhardt D, Koletzko S. Increase of antigen-presenting cells in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori*-infected children. *Helicobacter* 2005; 10: 214-222
- 8 Go MF, Crowe SE. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 649-670
- 9 Gemmell E, Walsh LJ, Savage NW, Seymour GJ. Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *J Periodontol Res* 1994; 29: 46-53
- 10 Barrera C, Espejo R, Reyes VE. Differential glycosylation of MHC class II molecules on gastric epithelial cells: implications in local immune responses. *Hum Immunol* 2002; 63: 384-393
- 11 Barrera CA, Beswick EJ, Sierra JC, Bland D, Espejo R, Mifflin R, Adegboyega P, Crowe SE, Ernst PB, Reyes VE. Polarized Expression of CD74 by Gastric Epithelial Cells. *J Histochem Cytochem* 2005
- 12 Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Tanahashi T, Kashima K, Imanishi J. Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1998; 42: 609-617
- 13 Shi T, Liu WZ, Gao F, Xiao SD. The role of nuclear factor kappa B in secretion of interleukin-8 by gastric cancer cell line SGC 7901 induced by *Helicobacter pylori*. *Zhonghua YiXue ZaZhi* 2003; 83: 133-136
- 14 Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 1099-1109
- 15 Birkholz S, Schneider T, Knipp U, Stallmach A, Zeitz M. Decreased *Helicobacter pylori*-specific gastric secretory IgA antibodies in infected patients. *Digestion* 1998; 59: 638-645
- 16 Nakajima S, Bamba N, Hattori T. Histological aspects and role of mast cells in *Helicobacter pylori*-infected gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 165-170
- 17 de Bernard M, Cappon A, Pancotto L, Ruggiero P, Rivera J, Del Giudice G, Montecucco C. The *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin activates RBL-2H3 cells by inducing cytosolic calcium oscillations. *Cell Microbiol* 2005; 7: 191-198
- 18 D'Elia MM, Amedei A, Benagiano M, Azzurri A, Del Prete G. *Helicobacter pylori*, T cells and cytokines: the "dangerous liaisons". *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44: 113-119
- 19 Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, Brooks EG, Graham DY, Reyes VE, Ernst PB. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 1998; 114: 482-492
- 20 Blanchard TG, Czinn SJ. Immunology of *Helicobacter pylori* and prospects for vaccine. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 671-685
- 21 Monteleone G, Del Vecchio Blanco G, Palmieri G, Vavassori P, Monteleone I, Colantoni A, Battista S, Spagnoli LG, Romano M, Borrelli M, MacDonald TT, Pallone F. Induction and regulation of Smad7 in the gastric mucosa of patients with *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2004; 126: 674-682
- 22 Hahn S, Erb P. The immunomodulatory role of CD4-positive cytotoxic T-lymphocytes in health and disease. *Int Rev Immunol* 1999; 18: 449-464
- 23 Fox JG, Sheppard BJ, Dangler CA, Whary MT, Ihrig M, Wang TC. Germ-line p53-targeted disruption inhibits *helicobacter*-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 proinflammatory responses. *Cancer Res* 2002; 62: 696-702
- 24 Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelstein JH, Friedman GD. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 1994; 330: 1267-1271
- 25 Fischbach W. *Helicobacter pylori* eradication therapy in primary high-grade gastric MALT lymphoma. *Gastroenterology* 2002; 123: 393
- 26 Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 40-43
- 27 Noy A, Yahalom J, Zaretsky L, Brett I, Zelenetz AD. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma detected by clonotypic polymerase chain reaction despite continuous pathologic remission induced by involved-field radiotherapy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3768-3772
- 28 Guindi M. Role of activated host T cells in the promotion of

- MALT lymphoma growth. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 341-344
- 29 D'Elios MM, Amedei A, Manghetti M, Costa F, Baldari CT, Quazi AS, Telford JL, Romagnani S, Del Prete G. Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* 1999; 117: 1105-1112
- 30 Foester E, Kock P, Kak D. Serum response to *Helicobacter pylori* in primary B-cell gastric lymphoma. *Gut* 1995; 37: A6
- 31 Montalban C, Santon A, Redondo C, Garcia-Cosio M, Boixeda D, Vazquez-Sequeiros E, Norman F, de Argila CM, Alvarez I, Abaira V, Bellas C. Long-term persistence of molecular disease after histological remission in low-grade gastric MALT lymphoma treated with *H pylori* eradication. Lack of association with translocation t(11;18): a 10-year updated follow-up of a prospective study. *Ann Oncol* 2005; 16:1539-1544
- 32 Wotherspoon AC, Finn TM, Isaacson PG. Trisomy 3 in low-grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood* 1995; 85: 2000-2004
- 33 Nakamura T, Inagaki H, Seto M, Nakamura S. Gastric low-grade B-cell MALT lymphoma: treatment, response, and genetic alteration. *J Gastroenterol* 2003; 38: 921-929
- 34 Du MQ. Molecular biology of gastric MALT lymphoma: application in clinical management. *Hematology* 2002; 7: 339-344
- 35 Latif O, Peterson JD, Waltenbaugh C. Alcohol-mediated polarization of type 1 and type 2 immune responses. *Front Biosci* 2002; 7: a135-a147
- 36 Kuepper-Nybelen J, Rothenbacher D, Brenner H. Relationship between lifetime alcohol consumption and *Helicobacter pylori* infection. *Ann Epidemiol* 2005; 15: 607-613

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 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 •

首届北京地坛感染病学术会议

本刊讯 为庆祝建院60周年,北京地坛医院决定于2006-03-02/04在北京召开全国性的“首届北京地坛感染病学术会议”,预计全国的同行500人参加这次重要的会议.会议邀请了40余位我国德高望重、年富力强的感染病专家作专题学术讲演.

1 会议征稿内容

这次感染病学术会议征文的内容包括病毒性肝炎、HIV/AIDS、各种传染性疾病和感染性疾病,抗生素的合理使用,也包括新发/复燃的传染病.论文全文和摘要请发到电子信箱: cj@genetherapy.com.cn; 或 hy@genetherapy.com.cn.

2 与会专家名单

首届北京地坛感染病学术会议邀请的专题报告专家(按照汉语拼音排序)有:白雪帆,陈智,陈志海,成军,段钟平,窦晓光,范小玲,高志良,郭利民,侯金林,贾继东,郎振为,李长青,李兰娟,李太生,李兴旺,刘沛,刘庄,伦文辉,毛羽,缪晓辉,穆毅,宁琴,牛俊奇,任红,施光峰,斯崇文,谭德明,唐红,唐小平,万谟彬,王风水,王福生,王贵强,王磊,王玲,王宇明,王宪波,魏红山,魏来,翁心华,谢青,谢雯,谢尧,邢卉春,徐道振,杨东亮,杨钧,袁正宏,赵红心,庄辉.

3 联系方式

首届北京地坛感染病学术会议组织委员会主席为成军教授.地址:北京市东城区安外大街地坛公园13号,邮编:100011;电话:010-64481639;传真:010-64481639. Email: cj@genetherapy.com.cn

欢迎全国感染病学界的各位专家和同仁来北京参加这次盛会.

门脉高压性胃病

董菁, 任建林

董菁, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化疾病研究所 福建省厦门市 361004
通讯作者: 董菁, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化疾病研究所. dj@xmzsh.com
电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017
收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

摘要

门脉高压性胃病(PHG)是肝硬化的一种胃肠道表现,也是肝硬化严重程度和肝病导致上消化道出血的一个重要原因. 大于60%的肝硬化患者可有PHG, 随着肝硬化病期的延长, PHG检出率逐步增加. PHG的原因是胃黏膜淤血性病变, 局部激素、炎症因子、微生物对PHG的形成所起的作用目前尚无明确定论. 目前关于PHG的治疗推荐 β 受体阻滞剂或生长抑素及其类似物, 门腔静脉分流术或经颈静脉肝内门腔静脉支架分流术可缓解PHG情况.

关键词: 门脉高压性胃病; 影响因素; 诊断; 治疗; 病理生理

董菁, 任建林. 门脉高压性胃病. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2610-2614
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2610.asp>

0 引言

门脉高压性胃病(portal hypertensive gastropathy, PHG)^[1]是1985年由McCormack提出的一个新概念, 他们的研究小组连续观察了127例门静脉高压患者的内镜表现, 发现患者出现的胃炎样表现与肝病的严重程度、门静脉扩张程度、年龄、药物无关, 其显微镜下的特征是胃黏膜淤血性病变, 炎症细胞的浸润相对较少. PHG是在肝硬化或非肝硬化基础上发生消化道出血的重要原因之一, 与食道静脉曲张破裂出血同为肝硬化出血的两大重要原因. 之后的研究认为PHG的病理特征是: 局部充血和血流灌注不足. PHG主要定位于胃底, 常伴有胃底腺体萎缩. 65%的肝硬化患者出现PHG, PHG往往伴有食道和/或胃底静脉曲张. 目前认为PHG是肝硬化严重程度的一个指标, 与门脉高压性十二指肠病(portal hypertensive duodenopathy, PHD)^[2]、门脉高压性结肠病(portal hypertensive colopathy, PHC)^[3]一同成为肝硬化消化道出血的重要原因和预报因子.

1 发生率

Gupta *et al*^[4]观察了230例诊断为肝硬化和食道静脉曲张

张的患者群, 其中61%的患者有PHG, 14%的患者有PHD, 这提示PHG和PHD与食道胃底静脉曲张具有明显的相关关系. PHG组中85%为轻度PHG, 15%为重度PHG. 观察结论认为PHG或PHD与上消化道出血史、食道静脉曲张程度、肝硬化病因学和Child分级无关. 他们发现同时具有食道胃底静脉曲张的患者出现PHG的比例(69%)高于仅有食道静脉曲张组(55%, $P < 0.05$); 硬化剂治疗可增加PHG的发生率. Zaman *et al*^[5]研究认为PHG的发生与Child分级有明显相关关系, 他们观察了120例患者, 其中87%的Child C级肝病患者有PHG, 而仅仅13%的Child A级肝病患者有PHG. 埃及学者Elnaser *et al*^[6]报道了一组300例肝硬化患者的内镜研究, 发现PHG和PHD的检出率分别为19.5%和14.5%, 他们认为肝炎肝硬化或混合病因导致的肝硬化患者组中PHG和PHD的检出率相对较高. 由此可见, 关于PHG发生的预测因子方面还需要进一步研究.

1993年, Hyams *et al*^[7]早期报道了儿童门静脉高压患者群中出现PHG的比例. 22例患儿中17例为肝硬化, 5例为门静脉高压, 随访后发现前组中有7例PHG, 后组中有2例. 2004年Poddar *et al*^[8]报道了内镜下硬化组(EST)对肝硬化患儿的影响, 结果发现186例EST组患儿PHG发生率自术前的3.2%增加到术后的15.6%($P < 0.05$). 关于PHG患儿的报道还需要进一步资料支持.

早期的研究发现PHG也发生于未发生肝硬化患者. Amarapurkar *et al*^[9]观察了365例患者, 其中肝硬化285例, 非肝硬化门静脉纤维化(NCPF)50例, 肝外门静脉梗阻(EHPVO)30例, 随访2 a. 这组患者总的PHG检出率为56.4%, 其中60.6%的肝硬化, 54%的NCPF和20%的EHPVO有PHG, 非肝硬化患者群中PHG的检出率高于肝硬化组(60.7% vs 41.25%, $P < 0.05$).

2 PHG影响因素

2.1 医疗干预措施 随着内镜下硬化治疗(EST)和套扎(EVL)治疗的开展, 有学者开始注意研究医疗干预与PHG发生之间的关系, Sarin *et al*^[10]早先观察了107例肝硬化患者, EST前, 仅仅4例(3.7%)PHG; EST术后随访52 mo增加了21例, 有明显的差异. de la Pena *et al*^[11]在一组小样本88例患者的实验中, 患者分别被给与EST或EVL治疗, 结果发现EVL患者有更高的静脉再

出血率和PHG严重程度加重(17 vs 6, $P < 0.01$). 而另一组^[12]95例患者的治疗实验提示相反结果: 2组阻止急性出血的成功率相近, EVL组具有更高的再出血率和并发症发生率, 注射EST组发展成为PHG的几率却远高于EVL组, 分别为20.5%和2.3%. Elnaser *et al*^[6]研究发现经过EVL或EST治疗后, PHG和PHD的检出率较对照组都有所增加, 但没有统计学意义. 印度学者Sarin *et al*^[13]的报道提示: 967例上消化道出血的患者中仅有88例(9.1%)患者被诊断为PHG, 其中22例为出血前即发现PHG, 而另64例系经过静脉曲张硬化治疗后出现PHG, 前组患者出现消化道出血的几率较后者为高(32% vs 4.7%, $P < 0.02$). Sarin *et al*^[13]认为EST后出现的PHG是暂时性的, 病变并不严重, 但如果在EST之前就有PHG情况存在, 手术会加重病情演变, 出血的可能性反而增加.

意大利学者Primignani *et al*^[14]长期观察了315例肝硬化患者, 每6 mo进行一次内镜检查, 随访3 a. 结果发现: 80%的患者并发有PHG, 随着肝病期限的延长PHG的检出率增加; PHG的发生与食道静脉曲张的发生率成正比, 进行静脉曲张硬化治疗的患者组PHG的检出率也有所增高. 观察中期数为18 mo, 结果提示: 23%在观察过程中出现恶化, 23%得到改善, 25%出现病情波动, 29%PHG稳定在初始水平. PHG发生消化道出血的几率较低, 2.5%的急性出血和10.8%的慢性出血由PHG造成, 其导致的死亡率仅为12.5%, 而食道静脉曲张破裂出血导致的死亡率高达39.1%. 该研究的一个重要理论是提出PHG病变是可逆的, 也有可能出现好转, 甚至病变消失. Merli *et al*^[15]观察了222例肝硬化患者, 每12 mo进行一次胃镜随访, 随访 47 ± 28 mo, 发现一共48例PHG. 随访1 a时, PHG检出率为3.0%, 3 a时为24%, 观察期间有16例患者因PHG出现上消化道出血.

上述研究提出EST或EVL可能是PHG发生的原因, 至少是重要的影响因素, 但其结论需要进一步证据证实.

2.2 胃肠道局部激素 不同的研究组结论对于肝硬化动物模型前列腺素水平报道不一^[16,17]. Beck *et al*^[16]认为肝硬化大鼠模型胃黏膜血流是由内源性前列腺素所调节的, 而模型鼠前列腺素的水平是下降的; Kishihara *et al*^[17]则认为相反. 在人类实验中Ohta *et al*^[18]观察到PHG患者前列腺素水平上升. 实验证实无论人类或动物, 在PHG背景下, 前列腺素的下降导致胃黏膜损伤敏感性增加. 目前还观察到发生PHG的动物模型中血清胃泌素的水平下降, 相应的胃壁细胞的数目明显减少.

2.3 炎症因子 目前研究认为一些关键炎症因子在PHG患者中有重要变化, 表现在一氧化氮(NO)合成、肿瘤坏死因子 α (TGF- α)表达等方面. NO的增加与PHG的发生有密切关系^[19]. NO在肝硬化患者内明显增加, 其作为强有力的血管扩张剂可作为PHG的基本病理条

件. 研究人员检测出PHG患者血清中NO水平增高, 胃黏膜可诱导和基本的NO合成酶水平也增加. 但是, Lee *et al*^[20]报道在门静脉高压的大鼠模型体内应用可诱导NO合成酶抑制剂后, 可改善高张力循环状态, 不能阻止门静脉高压和PHG的发展. 因此, NO不是PHG发生、发展的主要因素. TNF- α 被认为是与门静脉高压状态下高张力循环和PHG有关. 诊断为PHG的患者与PHG动物模型体内血清中TNF- α 水平增高^[21]. 作为炎症前因子, TNF- α 是通过NO或环前列腺素发挥作用的, 有研究^[22]表明给PHG大鼠模型注射抗TNF- α 中和抗体可导致胃黏膜NO合成酶水平下降, 同时有胃黏膜血流量的正常化.

2.4 生长因子类 转化生长因子 α (TGF- α)^[23]和表皮生长因子(EGF)^[24]在大鼠PHG模型中表达水平升高. PHG患者胃与十二指肠活检检查提示: 与非肝硬化患者相比, 胃体部TGF- α 水平无明显增高, 十二指肠部EGF水平明显减低, 这种减低导致PHG患者出现十二指肠溃疡的可能性大大增加. Tsugawa *et al*^[25]发现PHG患者胃黏膜血管内皮生长因子(VEGF)的浓度增加, 可能与PHG的淤血状态有关.

2.5 微生物 目前认为幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与PHG的发生无关. Arafa *et al*^[26]2003年发表的研究报告采取了60例肝硬化患者和21例正常人胃黏膜标本, 检测诱导型NO合成酶(iNOS)和*H pylori*感染情况, PHG患者在不*H pylori*感染的情况下, iNOS表达明显增加; *H pylori*感染对iNOS的表达增加并无促进作用. 研究还证实重度的PHG胃黏膜iNOS的表达量较轻、中度PHG的胃黏膜标本的表达量更高. Batmanabane *et al*^[27]认为PHG未能给*H pylori*的定植提供良好的环境, 导致了PHG患者群中*H pylori*的检测阳性率下降, 相应的, *H pylori*与PHG的发生、发展没有明确关系.

2.6 热休克蛋白(HSP) 近期, 有学者^[28]观察到热休克蛋白具有胃黏膜保护作用. 2004年Watanabe *et al*^[29]的研究首先在大鼠体内制造了PHG模型, 以Western Blot法检测HSP72的表达, 结果发现基线水平时PHG组HSP72表达量较正常对照组为低; 低浓度盐酸试验表明对照组胃黏膜损伤可被HSP72抑制, 而PHG组不能. 说明HSP72在胃黏膜保护中起重要作用. 但其生物学意义需要进一步研究.

2.7 饮酒 Auroux *et al*^[30]观察肝硬化患者时还发现饮酒, 尤其是大量饮酒是PHG严重程度的一个因素.

3 病理生理

PHG状态下血流灌注是减少还是增加, 不同研究组的研究结论是不同的. 有学者认为胃总的血流量^[31,32]是增加的, 但血液分布与正常胃血液供应是有差别的. 有学者^[33,34]认为在PHG情况下, 胃黏膜的血流量是减少的, 而黏膜下层、肌层、浆膜层的血流量是增加的, 而且

在损伤状态下,胃黏膜血流增加量减少,不能达到修复目的。PHG状态下胃黏液层厚度下降,从而导致胃表层防御作用下降。

Agnihotri *et al*^[35]研究了PHG时壁细胞状态,首先他们在Wistar大鼠身上制造了门静脉高压模型,之后应用Neubaur血细胞计数仪对壁细胞进行计数,同时以病理组织切片方法进行验证。结果证实PHG患者的壁细胞数目有明显下降。

4 诊断

PHG的诊断是基于胃镜检查所做出的。肝硬化内镜下表现主要是3种:食道静脉曲张,胃底部静脉曲张和PHG。新意大利内镜俱乐部(new Italian endoscopic club)^[36]将PHG内镜下表现归纳为4种基本表现:马赛克样损害、红点损害、樱桃红斑点状损害、黑棕斑点损害。轻度PHG表现为:胃黏膜在内镜下表现为红色并伴水肿,呈现为蛇皮或马赛克样表现。严重的PHG表现为:樱桃红斑点状损害,黏膜脆性增高,较易在胃镜检查时诱发出血。PHG典型表现往往集中于胃体或胃底部,但内镜下检查时发现相应表现可存在于直肠、结肠、小肠,遍及整个胃肠道。McCormack *et al*^[1]将PHG的程度分为2度,轻度与重度,轻度:粉红色小斑点,蛇皮样改变与马赛克征;重度:散在樱桃红点、广泛出血点。

5 PHG的治疗

5.1 内科治疗 β 受体阻滞剂是目前针对PHG得到广泛认可的治疗方法,早在1991年西班牙学者^[37]就发表文章认为普萘洛尔(心得安)治疗组30 mo随访期内的出血事件发生率远小于对照组。他们观察发现应用12 mo普萘洛尔患者组未出血率为65%,对照组为38%,有显著差异;观察到30 mo时,普萘洛尔患者组未出血率为52%,对照组为7%。他们提出长期服用普萘洛尔对PHG患者有明显益处。两个小组^[38,39]的研究发现在导致门脉血流下降的同时降低胃黏膜血流,并可以降低PHG再出血率。Sarin *et al*^[40]的最新研究结果表明在EVL基础上应用普萘洛尔将降低术后出血的可能。普萘洛尔推荐剂量是10-20 mg/次,2次/日,可逐渐加量,每1-3天加原剂量的50%。

生长抑素及其类似物^[41]对PHG有效。实验研究^[42]发现生长抑素可以明显减低胃血流灌注。临床观察^[41]发现在PHG急性出血时应用生长抑素类似物或生长抑素,结果有3例(26例)持续出血,其中一例需要外科干预,其他23例获得良好疗效。

Macormick *et al*^[43]观察到一例女性伴有GAVE的PHG患者,应用奥美拉唑、氨酰心安/普那洛尔、经颈静脉肝内门腔静脉支架分流术(TIPS)均无效后,应用传统止血剂-氨甲环酸,1 g/次,3次/日,患者的血红蛋白

白逐步稳定在正常范围内,内镜检查提示黏膜出血停止。上述研究还需要进一步资料支持。无对照研究^[44]发现雌二醇和孕酮可以减少PHG导致的出血,原理是应用雌二醇或孕酮可以减低门脉压力,减少PHG发生、发展。

H₂受体阻滞剂^[45]和质子泵抑制剂(PPI)^[46]对于PHG基本无效。胃黏膜保护剂:如蔗糖铝等,基本无效。瑞巴派特^[47]部分肝脏肿瘤动脉癌栓患者,应用瑞巴派特可减少PHG样损害,是一种试验性治疗方案,需要进一步验证。

5.2 外科干预 门腔静脉分流术是控制PHG出血的一种外科干预方法。一组研究^[48]发现12例患者进行门腔静脉分流术后6 a随访发现PHG均已消失,无外科手术导致的死亡,仅1例发生肝性脑病。另有学者^[49]研究8例患者经过脾肾分流手术,PHG消退。

经颈静脉肝内门腔静脉支架分流术(TIPS)也在1990年末被引进到PHG治疗领域,有学者^[50]发现PHG的内镜下特征在TIPS术后明显改善,另一组^[51]报告认为90%的PHG经过TIPS后有好转。近来日本学者^[52]的研究表明TIPS可以改善PHG情况。

作为最后的手段,食道或胃切除术是一种选择。肝移植是彻底改善门静脉高压的一种方法,对PHG的改善是肯定的。

总之,针对PHG的治疗方法原则是减轻门脉压力,改善胃黏膜血流,其主旨是加强有效血流,改善胃黏膜局部微血管血液淤滞状态。目前PHG的发生机制、重要影响因素、干预方法尚未明晰,仍需要进一步研究。

6 参考文献

- 1 McCormack TT, Sims J, Eyre-Brook I, Kennedy H, Goepel J, Johnson AG, Triger DR. Gastric lesions in portal hypertension: inflammatory gastritis or congestive gastropathy. *Gut* 1985; 26: 1226-1232
- 2 Shudo R, Yazaki Y, Sakurai S, Uenishi H, Yamada H, Sugawara K. Duodenal erosions, a common and distinctive feature of portal hypertensive duodenopathy. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 867-873
- 3 Keiichi Ito, Katsuya Shiraki, Takahisa Sakai, Hitoshi Yoshimura, Takeshi Nakano. Portal hypertensive colopathy in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3127-3130
- 4 Gupta R, Saraswat VA, Kumar M, Naik SR, Pandey R. Frequency and factors influencing portal hypertensive gastropathy and duodenopathy in cirrhotic portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 728-733
- 5 Zaman A, Hapke R, Flora K, Rosen H, Benner K. Prevalence of upper and lower gastrointestinal tract findings in liver transplant candidates undergoing screening endoscopic evaluation. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 895-899
- 6 Elnaser MS, Elebiary S, Bastawi MB, El Shafei A, Elmagd IM, Hamza MM. The prevalence of portal hypertensive gastropathy and duodenopathy in some Egyptian cirrhotic patients. *J Egypt Soc Parasitol* 2004; 34: 915-923
- 7 Hyams JS, Treem WR. Portal hypertensive gastropathy in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17: 13-18
- 8 Poddar U, Thapa BR, Singh K. Frequency of gastropathy and

- gastric varices in children with extrahepatic portal venous obstruction treated with sclerotherapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1253-1256
- 9 Amarapurkar DN, Dhawan PS, Chopra K, Shankaran K, Kalro RH. Stomach in portal hypertension. *J Assoc Physicians India* 1993; 41: 638-640
- 10 Sarin SK, Sreenivas DV, Lahoti D, Saraya A. Factors influencing development of portal hypertensive gastropathy in patients with portal hypertension. *Gastroenterology* 1992; 102: 994-999
- 11 de la Pena J, Rivero M, Sanchez E, Fabrega E, Crespo J, Pons-Romero F. Variceal ligation compared with endoscopic sclerotherapy for variceal hemorrhage: prospective randomized trial. *Gastrointest Endosc* 1999; 49: 417-423
- 12 Sarin SK, Govil A, Jain AK, Gupta RC, Issar SK, Jain M, Murthy NS. Prospective randomized trial of endoscopic sclerotherapy versus variceal band ligation for esophageal varices: influence on gastropathy, gastric varices and variceal recurrence. *J Hepatol* 1997; 26: 826-832
- 13 Sarin SK, Shahi HM, Jain M, Jain AK, Issar SK, Murthy NS. The natural history of portal hypertensive gastropathy: influence of variceal eradication. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2888-2893
- 14 Primignani M, Carpinelli L, Preatoni P, Battaglia G, Carta A, Prada A, Cestari R, Angeli P, Gatta A, Rossi A, Spinzi G, De Franchis R. Natural history of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis. The New Italian Endoscopic Club for the study and treatment of esophageal varices (NIEC). *Gastroenterology* 2000; 119: 181-187
- 15 Merli M, Nicolini G, Angeloni S, Gentili F, Attili AF, Riggio O. The natural history of portal hypertensive gastropathy in patients with liver cirrhosis and mild portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1959-1965
- 16 Beck PL, McKnight W, Lee SS, Wallace JL. Prostaglandin modulation of the gastric vasculature and mucosal integrity in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1993; 265: G453-G458
- 17 Kishihara F, Hashizume M, Ohta M, Kawanaka H, Tomikawa M, Higashi H, Tanoue K, Sugimachi K. The effect of prostacyclin on the gastric mucosa in portal-hypertensive rats. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 279-284
- 18 Ohta M, Kishihara F, Hashizume M, Kawanaka H, Tomikawa M, Higashi H, Tanoue K, Sugimachi K. Increased prostacyclin content in gastric mucosa of cirrhotic patients with portal hypertensive gastropathy. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1995; 53: 41-45
- 19 Ferraz JG, Wallace JL. Underlying mechanisms of portal hypertensive gastropathy. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25: S73-S78
- 20 Lee FY, Wang SS, Tsai YT, Lin HJ, Lin HC, Chu CJ, Wu SL, Tai CC, Lee SD. Aminoguanidine corrects hyperdynamic circulation without ameliorating portal hypertension and portal hypertensive gastropathy in anesthetized portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1997; 26: 687-693
- 21 Munoz J, Albillos A, Perez-Paramo M, Rossi I, Alvarez-Mon M. Factors mediating the hemodynamic effects of tumor necrosis factor- α in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999; 276: G687-G693
- 22 Ohta M, Tarnawski AS, Itani R, Pai R, Tomikawa M, Sugimachi K, Sarfeh IJ. Tumor necrosis factor α regulates nitric oxide synthase expression in portal hypertensive gastric mucosa of rats. *Hepatology* 1998; 27: 906-913
- 23 Wang JY, Hsieh JS, Huang TJ. The effect of portal hypertension on transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in the gastric mucosa of rats. *Int Surg* 1998; 83: 220-223
- 24 Romano M, Meise KS, Suozzo R, Sessa G, Persico M, Coffey RJ. Regional distribution of transforming growth factor- α and epidermal growth factor in normal and portal hypertensive gastric mucosa in humans. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 263-267
- 25 Tsugawa K, Hashizume M, Migou S, Kishihara F, Kawanaka H, Tomikawa M, Sugimachi K. Role of vascular endothelial growth factor in portal hypertensive gastropathy. *Digestion* 2000; 61: 98-106
- 26 Arafa UA, Fujiwara Y, Higuchi K, Shiba M, Uchida T, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Matsumoto T, Arakawa T. No additive effect between *Helicobacter pylori* infection and portal hypertensive gastropathy on inducible nitric oxide synthase expression in gastric mucosa of cirrhotic patients. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 162-168
- 27 Batmanabane V, Kate V, Ananthakrishnan N. Prevalence of *Helicobacter pylori* in patients with portal hypertensive gastropathy-study from south India. *Med Sci Monit* 2004; 10: CR133-CR136
- 28 Zeniya A, Otaka M, Itoh H, Kuwabara T, Fujimori S, Otani S, Tashima Y, Masamune O. Induction and intracellular localization of a 72-kDa heat shock protein in rat gastric mucosa after water-immersion stress. *J Gastroenterol* 1995; 30: 572-577
- 29 Watanabe D, Otaka M, Mikami K, Yoneyama K, Goto T, Miura K, Ohshima S, Lin JG, Shibuya T, Segawa D, Kataoka E, Konishi N, Odashima M, Sugawara M, Watanabe S. Expression of a 72-kDa heat shock protein, and its cytoprotective function, in gastric mucosa in cirrhotic rats. *J Gastroenterol* 2004; 39: 724-733
- 30 Auroux J, Lamarque D, Roudot-Thoraval F, Deforges L, Chaumette MT, Richardet JP, Delchier JC. Gastroduodenal ulcer and erosions are related to portal hypertensive gastropathy and recent alcohol intake in cirrhotic patients. *Digestive Diseases and Sciences* 2003; 48: 1118-1123
- 31 Ohta M, Hashizume M, Higashi H, Ueno K, Tomikawa M, Kishihara F, Kawanaka H, Tanoue K, Sugimachi K. Portal and gastric mucosal hemodynamics in cirrhotic patients with portal-hypertensive gastropathy. *Hepatology* 1994; 20: 1432-1436
- 32 Panes J, Bordas JM, Pique JM, Bosch J, Garcia-Pagan JC, Feu F, Casadevall M, Teres J, Rodes J. Increased gastric mucosal perfusion in cirrhotic patients with portal hypertensive gastropathy. *Gastroenterology* 1992; 103: 1875-1882
- 33 Gupta R, Sawant P, Parameshwar RV, Lele VR, Kulhalli PM, Mahajani SS. Gastric mucosal blood flow and hepatic perfusion index in patients with portal hypertensive gastropathy. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 921-926
- 34 Yoshikawa I, Murata I, Nakano S, Otsuki M. Effects of endoscopic variceal ligation on portal hypertensive gastropathy and gastric mucosal blood flow. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 71-74
- 35 Agnihotri N, Karu S, Dilawari JB, Bhusnurmath SR, and Kaur U. Diminution in parietal cell number in experimental portal hypertensive gastropathy. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 431-439
- 36 Carpinelli L, Primignani M, Preatoni P, Angeli P, Battaglia G, Beretta L, Bortoli A, Capria A, Cestari R, Cosentino F, Crotta S, Gerunda G, Lorenzini I, Maiolo P, Merighi A, Rossi A, Sangiovanni A, de Franchis R. Portal hypertensive gastropathy: reproducibility of a classification, prevalence of elementary lesions, sensitivity and specificity in the diagnosis of cirrhosis of the liver. A NIEC multicentre study. New Italian Endoscopic Club. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997; 29: 533-540
- 37 Perez-Ayuso RM, Pique JM, Bosch J, Panes J, Gonzalez A, Perez R, Rigau J, Quintero E, Valderrama R, Viver J, Esteban R, Rodrigo L, Bordas JM, Rodes J. Propranolol in prevention of recurrent bleeding from severe portal hypertensive gastropathy in cirrhosis. *Lancet* 1991; 337: 1431-1434
- 38 Lo GH, Lai KH, Cheng JS, Hsu PI, Chen TA, Wang EM, Lin CK, Chiang HT. The effects of endoscopic variceal ligation and propranolol on portal hypertensive gastropathy: a prospective, controlled trial. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 579-584
- 39 Shigemori H, Iwao T, Ikegami M, Toyonaga A, Tanikawa K. Effects of propranolol on gastric mucosal perfusion and serum gastrin level in cirrhotic patients with portal hypertensive gastropathy. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 2433-2438
- 40 Sarin SK, Wadhawan M, Agarwal SR, Tyagi P, Sharma BC. Endoscopic variceal ligation plus propranolol versus endoscopic variceal ligation alone in primary prophylaxis of

- variceal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 797-804
- 41 Kouroumalis EA, Koutroubakis IE, Manousos ON. Somatostatin for acute severe bleeding from portal hypertensive gastropathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 509-512
- 42 Panes J, Pique JM, Bordas JM, Casadevall M, Teres J, Bosch J, Rodes J. Effect of bolus injection and continuous infusion of somatostatin on gastric perfusion in cirrhotic patients with portal-hypertensive gastropathy. *Hepatology* 1994; 20: 336-341
- 43 McCormick PA, Ooi H, and Crosbie O. Tranexamic acid for severe bleeding gastric antral vascular ectasia in cirrhosis. *Gut* 1998; 42: 750-752
- 44 Panes J, Casadevall M, Fernandez M, Pique JM, Bosch J, Casamitjana R, Cirera I, Bombi JA, Teres J, Rodes J. Gastric microcirculatory changes of portal-hypertensive rats can be attenuated by long-term estrogen-progestagen treatment. *Hepatology* 1994; 20: 1261-1270
- 45 Trevino HH, Brady CE 3rd, Schenker S. Portal hypertensive gastropathy. *Dig Dis* 1996; 14: 258-270
- 46 Burak KW, Lee SS, Beck PL. Portal hypertensive gastropathy and gastric antral vascular ectasia (GAVE) syndrome. *Gut* 2001; 49: 866-872
- 47 Orloff MJ, Orloff MS, Orloff SL, Haynes KS. Treatment of bleeding from portal hypertensive gastropathy by portacaval shunt. *Hepatology* 1995; 21: 1011-1017
- 48 Nomura H, Miyake K, Hirakata R, Migita S, Okamoto O, Shiraishi G. Rebamipide prevents occurrence of gastric lesions following transcatheter arterial embolization in the hepatic artery. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 495-499
- 49 Soin AS, Acharya SK, Mathur M. Portal hypertensive gastropathy in noncirrhotic patients: the effect of lienorenal shunt. *J Clin Gastroenterol* 1998; 26: 64-67
- 50 Urata J, Yamashita Y, Tsuchigame T, Hatanaka Y, Matsukawa T, Sumi S, Matsuno Y, Takahashi M. The effects of transjugular intrahepatic portosystemic shunt on portal hypertensive gastropathy. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 1061-1067
- 51 Sezai S, Ito M, Sakurai Y, Kamisaka K, Abe T, Ikegami F, Yamamoto Y, Hirano M. Effects on gastric circulation of treatment for portal hypertension in cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1302-1306
- 52 Mezawa S, Homma H, Ohta H, Masuko E, Doi T, Miyanishi K, Takada K, Kukitsu T, Sato T, Niitsu Y. Effect of transjugular intrahepatic portosystemic shunt formation on portal hypertensive gastropathy and gastric circulation. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1155-1159

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 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11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知

本刊讯 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议定于2006-03在广东省深圳市召开, 本次会议由中国中西医结合学会主办, 现将有关征文事项通知如下。

1 征文内容

本次会议的征文内容包括: (1) 介绍结直肠肛门基础研究的新动态、新进展、新成果; (2) 结直肠肛门肿瘤疾病的诊断及治疗的新技术、新成果, 直肠癌扩大根治术式和疗效, 中低位直肠癌保肛手术方法、适应症和效果, 肛管直肠癌会阴肛门重建术的术式、方法、效果; (3) 中西医结合治疗结肠慢传输型、出口梗阻型及结肠、直肠、盆腔、盆底解剖生理功能异常等便秘疾病的诊断治疗方法、适应症、临床疗效和经验教训; (4) 中西医结合治疗炎症性肠病的经验及手术方式选择; (5) 中西医结合预防、治疗肛肠常见疾病的新方法、新经验; (6) 采用中西医结合治疗结直肠肛门疾病的临床护理及造口护理的新方法、新经验; (7) 肛门、结直肠损伤及异物处理的经验; (8) 介绍国内外肛肠疾病检查、治疗的新器械、新设备、新药物。

2 征文要求

文章应有临床实用性, 基础研究应具有科学性和先进性; 全文4000字以内, 要求寄打印稿(欢迎用软盘或电子信箱投稿), 并附500字以内的摘要一份, 关键词3-5个; 征文稿件请寄: (1) 广东省公安边防总队医院(深圳武警医院)肛肠外科柯玮收, 邮编518029, 电话: 0755-82699768, 手机: 13714327555, email: kewe1968@126.com; (2) 深圳市第二人民医院肛肠科舒洪权收, 邮编: 518039, 电话: 0755-26250353, 手机: 13923803457, email: ssshhhqqq66@163.com。

3 其他

本次会议可授予国家级继续教育I类学分6分, 会议具体日期及详细地址另行通知。欢迎广大相关领域工作及研究人员参加。

急性胰腺炎与胃黏膜损伤

林振和, 任建林

林振和, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化病研究所 福建省厦门市 361004
通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化病研究所. jianlinr@msn.com
电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017
收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

摘要

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的危重疾病, 其中约有20%以上为重症患者, 目前已知氧自由基、应激、细胞因子和炎症介质、内毒素血症等均参与了其发病机制, 而上述因素和幽门螺杆菌感染已被证实参与了胃黏膜损伤, 探讨AP时胃黏膜损伤的特点及其发生机制和防治可为SAP患者的综合治疗提供帮助。

关键词: 急性胰腺炎, 胃黏膜损伤

林振和, 任建林, 急性胰腺炎与胃黏膜损伤. 世界华人消化杂志 2005; 13(21): 2615-2619
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2615.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的危重疾病, 病死率高, 重症急性胰腺炎(SAP)患者可出现多种全身并发症, 如心、肝、肺、肾、肠道等, 近年来许多学者对急性胰腺炎合并的胃黏膜损伤进行了相关的研究, 现介绍如下。

1 急性胰腺炎时胃黏膜损伤的特点

范子荣^{et al}^[1]总结了急性水肿型胰腺炎合并胃黏膜损伤的患病率: 116例急性胰腺炎患者中有80例合并胃黏膜损伤, 患病率为69.0%, 其中活动性胃炎的患病率为60.3%, 消化性溃疡的患病率为8.6%, 10例消化性溃疡中胃溃疡4例, 十二指肠球部溃疡6例, 胃及十二指肠球部溃疡病变均为A1-A2期。胃炎的内镜表现以糜烂性胃窦、体炎多见, 少部分为红斑渗出性胃窦、体炎。刘玉兰^{et al}^[2]研究急性水肿型胰腺炎合并胃炎及消化性溃疡的发生率: 72例急性水肿型胰腺炎患者中有62.5%合并胃损伤, 其中活动性胃炎的发生率为48.6%; 消化性溃疡的发生率为13.9%。10例消化性溃疡中十二指肠球部溃疡4例、胃溃疡6例。胃镜下表现: 以糜烂充血性胃窦及胃体炎较多见, 少部分为痘疹性胃炎; 消

化性溃疡的病变处于A1-H1期。上述患者无1例合并呕血和黑便。另外, 王智峰^{et al}^[3]共研究了66例急性胰腺炎患者合并胃黏膜损伤的情况, 所有患者在10 d之内均完成胃镜检查, 结果发现: 胃黏膜花斑48.49%、条状或片状充血31.82%、糜烂37.88%、溃疡18.19%。病变部位: 胃底16.67%, 胃体68.18%, 胃窦71.21%, 胃角71.58%, 十二指肠球部22.73%, 幽门6.06%, 食道9.09%。因而认为急性胰腺炎合并胃黏膜损伤以充血、糜烂、溃疡为主, 而病变部位以多部位病变为主。此外, 台湾 Lin ^{et al}^[4]回顾性分析了1999/2000 87例确诊为胰腺炎并接受内镜检查的患者。结果发现46例(52.9%)并发消化性溃疡, 其中有8例食管溃疡, 4例食管和胃溃疡, 单纯胃溃疡13例, 单纯十二指肠溃疡15例, 而胃十二指肠复合性溃疡6例。并发溃疡与未并发溃疡患者的性别、年龄、导致AP的病因、既往是否有溃疡史和临床症状等均无明显差别。溃疡与无溃疡患者的血清淀粉酶水平亦无明显差别。然而, 40例MAP患者(CT分级为A和B级)只有16例(40%)发生溃疡, 而47例SAP患者(CT分级为C、D和E级)中则有30例(63.8%)发生溃疡, 两者相比差别有统计学意义。7例并发上消化道出血的患者中SAP占了6例, 因而他们研究表明AP患者并发上消化道溃疡的发生相当常见。在别的研究中, 急性胃黏膜损伤通常是多发浅溃疡, 并大多分布于胃底部, 很少分布于胃窦和十二指肠, 然而在Lin等的研究中, 急性胰腺炎并发的应激性溃疡在胃(23/46)和十二指肠(21/46)均有分布, 而且部分溃疡还是多发的(10/46)。

2 急性胰腺炎时胃黏膜损伤的发病机制

2.1 氧自由基与胃黏膜损伤 已知重症胰腺炎包括多器官功能障碍, 更多地是由活化的中性粒细胞及其释放的产物而不是由活性的胰酶所引起的。初期的损伤在腺泡, 其机制未明。但发现受损区存在缺血, 因缺血而产生氧自由基, 其可累及细胞膜, 趋化中性粒细胞进入损伤区, 而后是巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和其它细胞。从而过度释放各种炎症介质, 包括各种氧自由基。有很多证据表明, 来自中性粒细胞的氧自由基在重症胰腺炎及其并发症中起重要作用。利用电子自旋共振分光镜(ESR)或组织的化学发光方法直接测定氧自由基, 或间接地检测氧自由基与生物底物的反应产物, 或通过氧自由基清除剂的干预, 均已观察到急性胰腺

炎时氧自由基的损伤作用. 而已有大量的研究证实氧自由基是急性胃黏膜损伤的重要致病因子, SAP时通常都并有微循环障碍, 而胃黏膜需有丰富的血供, 在各种应激反应胃黏膜缺血或化学物质(如非甾体抗炎药)作用时, 也可产生大量的氧自由基, 进一步加重微循环障碍, 导致恶性循环. 在胃黏膜损伤中, 炎性细胞尤其是活化的中性粒细胞极为重要. 浸润的中性粒细胞受到SAP时释放的各种促炎症细胞因子的激发, 释放出活性氧、活性氮和各种水解酶, 导致组织损伤. 细胞膜上的还原型辅酶I (NADPH)经氧化还原作用, 使超氧阴离子合成增加; 缺血黏膜中黄嘌呤及其底物次黄嘌呤聚集, 在组织再灌注提供氧、产生爆发性氧消耗的同时, 产生大量超氧自由基并再次被转换成其他毒性更大的羟自由基. 线粒体呼吸链受损和花生四烯酸代谢中也可产生氧自由基. 氧自由基与膜内多价不饱和脂肪酸结合造成脂质过氧化损伤. 胃黏膜含有高浓度的非蛋白质巯基, 氧自由基作用于巯基使蛋白质变性、酶失活, 从而导致黏膜损伤. 但目前笔者所见国内外有关氧自由基对SAP并发胃黏膜损伤时作用的研究不多^[5-7].

2.2 应激与胃黏膜损伤 目前已知急性胃黏膜病变多数与缺血引起的胃黏膜损伤有关, 危重病患者的胃酸和消化酶的分泌可能是正常, 甚至低于正常. 胃黏膜缺血基本条件是应激性溃疡形成的基本条件. H^+ 逆向弥散是应激性溃疡形成的必要条件. 胃黏膜缺血应激时儿茶酚胺增多, 内脏血流减少, 胃肠黏膜缺血, 黏膜上皮产生的碳酸氢盐及黏液减少, 使黏膜上皮细胞间的紧密连接和黏膜表面的碳酸氢盐-黏液层所组成的胃黏膜屏障遭到破坏, 致胃腔内的 H^+ 在黏膜内集聚. 应激状况下胃黏膜血流减少, 逆向弥散至黏膜的过量 H^+ 无法被血流中的 HCO_3^- 中和或带走, 使 H^+ 在黏膜内集聚. 胃肠道是人的重要器官, 由于其自身功能和结构的特点, 血液灌注较为丰富, 同时对缺血缺氧较为敏感. 一些研究发现, 胃肠道黏膜最先受到缺氧的损伤, 而整个机体的缺氧状态被纠正后, 胃肠道黏膜的缺氧最后被缓解. SAP时存在各种应激因素, 有人^[3]对其合并胃黏膜病变的原因作了如下解释: 在AP时, 急性炎症反应可作为内源性刺激因子, 使机体释放大量肾上腺糖皮质激素, 使胃黏液分泌不足, 前列腺素合成减少而削弱胃黏膜抵抗力. 前列腺素合成的减少却使血栓素及白三烯的合成相对增多, 此二者具有强烈的血管收缩作用, 从而导致局部黏膜缺血、缺氧, 引起毛细血管通透性增加, 红细胞外渗. 另一方面, 胰腺急性炎症可兴奋交感神经及迷走神经, 使胃黏膜血管痉挛性收缩, 血流量下降, 黏膜下动静脉短路开放, 促进黏膜缺血、缺氧, 导致胃黏膜上皮损伤, 发生糜烂、溃疡甚至出血^[8-10]. Cosen-Binker *et al*^[9,11]用十二指肠闭袢AP

模型研究应激对AP并发胃黏膜损伤的影响, 结果观察到AP诱导后可发生胃溃疡形成、出血、黏膜坏死, 血清淀粉酶、脂肪酶、CRP、IL-6、IL-10、HSP72及胰腺和肺髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)明显升高, 迷走神经、交感神经和CCK-A受体参与了上述的病理生理过程. 而用麻醉剂阻断应激反应后, 可改善AP和胃黏膜病变的病理过程.

2.3 细胞因子、炎症介质与胃黏膜损伤 AP时单核巨噬细胞系统激活, 其代谢产物过度刺激中性粒细胞, 使其产生大量的细胞因子、趋化因子和炎症介质等物质, 而且单核巨噬细胞自身能合成和释放多种细胞因子和炎症介质^[12]. 细胞因子和炎症介质不仅作用于胰腺局部, 而且可扩展至全身, 引起系统性炎症反应综合征(SIRS)的发生. 同时, SIRS作为机体的防御反应必然会导致炎性细胞的趋化活动并即时合成和释放多种细胞因子, 还能通过级联效应引发更多的细胞和细胞因子连锁反应, 从而对机体产生重大影响. 人们已经认识到在AP时正是由于炎症介质的瀑布反应使胰腺局限性炎症反应进展为具有潜在危险的全身炎症反应, 最终导致多器官功能衰竭. 国内有人^[13]研究发现诱导SAP后2 h与12 h, 作为SAP时引起全身多器官损害的重要炎症介质 PLA_2 和IL-1 β 均较对照组显著增高, Spearman相关分析提示二者与胃黏膜损伤程度均呈密切相关. IL-1 β 作为一种重要的促炎性细胞因子, 通过促进白细胞在血管内皮细胞表面黏附和聚集以及激活其它炎症介质而发挥作用, 在SAP病情加重及胰腺远隔器官损害的发病过程中起到重要的作用. 血清中 PLA_2 活力的升高不仅与疾病的严重程度, 而且与胃肠道功能不全的严重程度有关. PLA_2 不但通过破坏细胞的脂质细胞膜使细胞坏死而损伤组织, 同时它与IL-1 β 均可激活前列腺素、白三烯、血小板活化因子等炎症介质而参与炎症过程所致的组织细胞损伤. PLA_2 、IL-1 β 引起急性胃黏膜损伤的机制可能还与二者所调控的炎症介质所导致的胃黏膜缺血有关. 血栓素 A_2 、血小板活化因子、内皮素21等均可通过其强烈收缩血管, 促进白细胞与血小板聚集, 血栓形成以及损伤内皮细胞的作用而导致胃黏膜缺血性损伤. 而上述炎症介质的调控均与 PLA_2 、IL-1 β 的活性有关. 该实验结果提示, 制模后2 h与12 h, 血清 PLA_2 、活性IL-1 β 水平与胃黏膜血流均呈密切负相关. 由此他们认为在SAP时, 循环内 PLA_2 、IL-1 β 增高可通过诱导与激活大量的炎症介质引起包括胃黏膜在内的组织器官缺血, 而组织的缺血又可导致组织细胞损伤而释放包括 PLA_2 、IL-1 β 在内的炎症介质, 如此互相影响, 互为因果, 最终导致急性胃黏膜损伤. 此外, SAP时还释放产生大量的TNF- α 、IL-6、PAF、NO等其他细胞因子和炎症介质, 而所有上述物质均已被证实可参与胃黏膜损伤的发生机制,

但其中确切的发病机制仍未详细阐明^[14]。

2.4 内毒素血症与胃黏膜损伤 Soong^[15,16]认为, 急性胰腺炎特别是SAP时合并内脏血流灌注不足可产生内毒素血症, 引起胃黏膜血流灌注减少, 削弱了胃黏膜屏障, 由之可导致肠源性内毒素血症, 内毒素从消化道泄漏入血液循环后可促发IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10等促炎症细胞因子的级联反应。Maeda *et al*^[17]用内毒素诱导急性胃黏膜损伤, 结果发现胃黏膜血流并未明显减少, 但胃黏膜内硫代巴比土酸反应物(thiobarbituric acid reactants)则在内毒素处理后明显增加, 他们进一步用血小板活化因子(PAF) 抑制剂CV3988处理后, 发现伴随着急性胃黏膜损伤的减轻, 胃黏膜内硫代巴比土酸反应物的含量进一步增加, 因而认为内毒素血症可能通过PAF和自由基介导急性胃黏膜损伤, 而与胃黏膜血流的减少无关。McNaught *et al*^[18]通过检测AP病人胃细菌定值(gastric colonisation)的程度、胃肠通透性(IP)的改变, 并研究它们与AP病情的严重度和败血症并发症的发生之间的关系, 结果发现SAP患者中胃细菌定值的比例明显高于MAP患者, SAP患者中29%并发败血症, 而MAP患者中只有11%, 鼻胃管引流液中检测发现肠细菌定植的患者中有33%的患者发展为败血症, 而检测阴性的患者中只有16%, 而肠道通透性的改变则与AP病情的严重性及败血症的发生无关。结果他们认为SAP患者中肠源性细菌移居到胃内定值的发生率明显高于MAP。肠源性细菌对于AP患者败血症的发生起着重要的作用, 上述发现进一步支持了AP时肠源性败血症的假说。但目前有关SAP时由于微循环障碍、肠功能衰竭、细菌移位、胰腺继发感染导致的内毒素血症引起的急性胃黏膜损伤报道甚少^[17]。

2.5 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)与胃黏膜损伤 由于*H pylori*刺激释放的NH₃、lypopolysaccharides等侵袭性因子以及激活白细胞促进促炎症细胞因子的释放, 所有上述因素理论上均可影响胰腺的病理生理过程以及临床转归^[19]。Jaworek *et al*^[20]将NH₄OH注入狗十二指肠腔后发现可以以剂量依赖地促进胰腺蛋白的输出和提高血浆胃泌素水平, 在离体的胰腺腺泡细胞NH₄OH可以以浓度依赖性地刺激淀粉酶的分泌。Hori *et al*^[21]发现用*H pylori*的空泡毒素预孵育胰腺腺泡细胞可以以剂量依赖方式地抑制CCK8/carbachol诱导的淀粉酶的释放。上述两项研究在动物和体外水平论证了*H pylori*的两大主要成分对胰腺病理生理的影响。而对于人类^[22-24], 我们已知*H pylori*可以抑制胃D细胞生长抑素的合成和释放, 这种抑制作用是通过降低胃窦内D细胞的密度而实现的, 而在*H pylori*根除后其抑制作用得以消除。由于*H pylori*导致的胃D细胞生长抑素的合成和释放的抑制, 导致G细胞

密度和胃泌素的合成和释放大大增加, 所有上述激素的改变导致胃酸分泌的大大增加而胃壁细胞对胃泌素的敏感性保持不变。已知胰腺的外分泌可以受到生长抑素的抑制, 虽然胃内生长抑素的旁分泌并不太可能影响胰腺的外分泌, 但其所致十二指肠内过高的酸负荷则可能通过促进胃泌素的释放来刺激胰腺的分泌。而且, 胃泌素可以起到轻微类CCK效应, 从而影响到胰腺的外分泌。尽管如此, 但目前关于*H pylori*在AP发生、发展过程中的作用尚无定论, 然而*H pylori*似乎不太可能作为AP的诱因之一, 即使是在特发性AP患者中, 但并不能就此排除*H pylori*可能在一定程度上影响AP的病情。*H pylori*通过上述机制促进胃泌素的释放导致胰腺的高分泌, 或使十二指肠酸化以及AP早期通过*H pylori*毒素从胃和十二指肠黏膜移位到胰腺, 所有上述因素都是*H pylori*可能影响AP病情演变的原因之一。Warzecha *et al*^[25]在缺血一再灌注大鼠AP动物模型中研究胃黏膜*H pylori*感染对其AP病情的影响, 他们发现*H pylori*感染导致胰腺血流量大大减少, 并加重再灌注大鼠胰腺的损伤和缺血程度, 血浆淀粉酶、脂肪酶、IL-1 β 和IL-10水平在*H pylori*阳性组中升高更为明显, 胰腺坏死、水肿、中性粒细胞浸润加重。因而他们认为*H pylori*感染可加重缺血一再灌注大鼠AP模型的严重度, *H pylori*的感染可促进IL-1 β 等促炎症细胞因子的产生, *H pylori*感染可促进AP时胰腺微循环的紊乱。作者认为胃内*H pylori*的感染可加重AP的病情, 这很可能是通过*H pylori*脂多糖的释放从而导致粒细胞的激活和胰腺及全身炎症反应程度的加重。虽然上述研究发现幽门螺杆菌感染能明显增加消化间期胰腺和胃酸的分泌, 可能影响AP的病情, 但有人^[4]认为可以肯定的是, 幽门螺杆菌感染不是造成急性胰腺炎胃黏膜病变的直接原因。范子荣 *et al*^[1]研究发现急性水肿型胰腺炎合并胃黏膜损伤时*H pylori*的感染率仅为31.3%, 与无合并胃黏膜损伤的*H pylori*感染率(41.7%)相比较差异无显著性, 提示在急性水肿型胰腺炎合并的胃黏膜损伤中, *H pylori*感染可能并不起主要作用。王智峰 *et al*^[3]研究发现急性胰腺炎组*H pylori*阳性率33.33%, 慢性胃炎组*H pylori*阳性率44.44%, 两组比较无显著性差异。刘玉兰 *et al*^[2]总结分析72例急性水肿型胰腺炎合并胃损伤的情况, 结果显示*H pylori*的感染率为37.8%, 明显低于消化性溃疡患者高达85%的感染率。台湾的一项研究发现AP并发溃疡的患者中只有19%合并*H pylori*感染, 提示*H pylori*在AP合并消化性溃疡的发生过程中可能并不起到重要的作用^[4]。

2.6 AP时胃黏膜损伤与AP病因及病情的关系 已知酒精是急性胰腺炎的常见病因之一, 同时又可引起各种胃黏膜损伤, 但范子荣 *et al*^[1]通过临床病例分析, 发现胆源性和酒精源性胰腺炎合并胃黏膜损伤的患病率

并无明显差异,表明急性水肿型胰腺炎合并胃黏膜损伤的主要因素并不是酒精的直接作用,可能有其他更重要的机制参与.他们还发现急性胰腺炎合并活动性胃炎和消化性溃疡的发生率与病情严重程度有关,轻度胰腺炎合并胃黏膜损伤的发生率低于中、重度的发生率,提示胃黏膜损伤可能与急性胰腺炎本身的病理生理改变有关.刘玉兰^{et al}^[2]总结分析72例急性水肿型胰腺炎合并胃黏膜损伤的情况,结果显示胆源性和酒精源性胰腺炎合并胃损伤的发生率分别为68.3%和60.7%,无显著性差异.轻度胰腺炎合并胃损伤的发生率低于中、重度的发生率,他们认为急性水肿型胰腺炎合并胃黏膜损伤的发生可能主要与胰蛋白酶、溶血磷脂活性增加,使胃黏膜血流减少,从而导致胃黏膜抗力下降等因素有关,而与胃泌素、酒精刺激及*H pylori*的感染关系不大.台湾的一项研究也证实SAP患者中溃疡的发病率较MAP患者明显偏高^[4].

3 急性胰腺炎时胃黏膜损伤的防治

3.1 积极治疗原发病 禁食、补液、纠正酸中毒和微循环障碍,吸氧.

3.2 控制胃内pH值 H_2 受体拮抗剂或质子泵抑制剂,可通过抑制胃酸分泌而抑制胰液分泌,同时又预防应激性溃疡的发生,以保证胃液pH值高于3.5.但胃液pH过高,可能增加医院获得性肺炎的发生机会.

3.3 治疗并发症 包括针对消化道出血和消化性溃疡的治疗.

3.4 胃黏膜保护剂 硫糖铝:不升高胃液pH值,但刺激局部胃黏膜前列环素释放,增加胃黏膜血流量,刺激黏液分泌.胶体次枸橼酸铋:在溃疡面形成保护膜.

3.5 生长抑素及其衍生物 如思他林、奥曲肽等,可抑制胰腺分泌,改善试验动物的胰腺和消化道的病理损伤而改善SAP患者预后,并可降低门脉压控制并发的消化道出血^[26].

3.6 早期肠内营养 可恢复肠道屏障功能,防止细菌移位所导致的肠源性败血症的发生^[23].

3.7 抗氧自由基 已有众多的研究证实NAC(N-Acetylcysteine)和PDTC(pyrrolidine dithiocarbamate)等抗氧化剂对实验性AP具有治疗价值,目前在胃黏膜保护剂中又增加了抗氧自由基的新型药物,如瑞巴派特(rebamipide, Mucosta),具有抑制中性粒细胞产生超氧阴离子、清除羟自由基的作用,用于治疗胃炎、消化性溃疡.

3.8 其他药物 如前列腺素、三叶肽等.新近研究发现的三叶肽家族已证实对胃黏膜具有保护性作用,并可促进黏膜的愈合,研究SAP时胃黏膜三叶肽表达的变化对研究SAP合并胃黏膜损伤的发病机制及其防治可能具有一定的价值^[8].

4 参考文献

- 1 范子荣,杨冬华,覃汉荣,陈新杰.急性水肿型胰腺炎相关的胃黏膜损害.临床荟萃 2000;15: 736-737
- 2 刘玉兰,张国艳,张会利.急性胰腺炎合并胃损害的临床分析.中华消化杂志 1998; 6: 379-380
- 3 王智峰,宋素合.急性胰腺炎的胃黏膜病变.北京医学 2001; 23: 149-150
- 4 Lin CK, Wang ZS, Lai KH, Lo GH, Hsu PI. Gastrointestinal mucosal lesions in patients with acute pancreatitis. *Zhonghua YiXue ZaZhi*. 2002;65:275-278
- 5 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
- 6 Tadao M, Yuji O. Role of free radicals in the development of severe acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2015-2020
- 7 Demir S, Yilmaz M, Koseoglu M, Akalin N, Aslan D, Aydin A. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. *Turk J Gastroenterol* 2003; 14: 39-43
- 8 Nie SN, Qian XM, Wu XH, Yang SY, Tang WJ, Xu BH, Huang F, Lin X, Sun DY, Sun HC, Li ZS. Role of TFF in healing of stress-induced gastric lesions. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1772-1776
- 9 Cosen-Binker LI, Binker MG, Negri G, Tiscornia O. Influence of stress in acute pancreatitis and correlation with stress-induced gastric ulcer. *Pancreatolgy* 2004; 4: 470-484
- 10 Letoha T, Somlai C, Takacs T, Szabolcs A, Jarmay K, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Varga I, Kaszaki J, Krizbai I, Boros I, Duda E, Kusz E, Penke B. A nuclear import inhibitory peptide ameliorates the severity of cholecystokinin-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 990-999
- 11 Pap A. Stress and acute biliary pancreatitis. *Pancreatolgy* 2004; 4: 468-469
- 12 Gomez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, Cassinello N, Camps B, Vina J, Sastre J. Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1: 393-403
- 13 瞿建国,张建新,程国祚,杨家红,谢嵘,党胜春.急性坏死性胰腺炎时胃黏膜缺血与炎症介质相关性的实验研究.肝胆外科杂志 2003; 11: 65-66
- 14 Meng Y, Ma QY, Kou XP, Xu J. Effect of resveratrol on activation of nuclear factor kappa-B and inflammatory factors in rat model of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 525-528
- 15 Soong CV, Lewis HG, Halliday MI, Rowlands BJ. Intramucosal acidosis and the inflammatory response in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2423-2429
- 16 Hynninen M, Valtonen M, Markkanen H, Vaara M, Kuusela P, Jousela I, Piilonen A, Takkunen O. Intramucosal pH and endotoxin and cytokine release in severe acute pancreatitis. *Shock* 2000; 13: 79-82
- 17 Maeda Y. Study of acute gastric mucosal lesion induced by endotoxemia. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1990; 87: 1483-1490
- 18 McNaught CE, Woodcock NP, Mitchell CJ, Rowley G, Johnstone D, MacFie J. Gastric colonisation, intestinal permeability and septic morbidity in acute pancreatitis. *Pancreatolgy* 2002; 2: 463-468
- 19 Manes G, Balzano A, Vaira D. *Helicobacter pylori* and pancreatic disease. *JOP* 2003; 4: 111-116
- 20 Jaworek J, Bilski J, Jachimczak B, Cieszkowski M, Kot M, Bielanski W, Konturek SJ. The effects of ammonia on pancreatic enzyme secretion *in vivo* and *in vitro*. *J Physiol Pharmacol* 2000; 51: 315-332
- 21 Hori Y, Takeyama Y, Shinkai M, Ueda T, Yamamoto M, Sugiyama T, Kuroda Y. Inhibitory effect of vacuolating toxin of *Helicobacter pylori* on enzyme secretion from rat pancreatic acini. *Pancreas* 1999; 18: 324-327
- 22 Odum L, Petersen HD, Andersen IB, Hansen BF, Rehfeld JF. Gastrin and somatostatin in *Helicobacter pylori* infected antral

- mucosa. *Gut* 1994; 35: 615-618
- 23 McHenry L Jr, Vuyyuru L, Schubert ML. *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer disease: the somatostatin link? *Gastroenterology* 1993; 104: 1573-1575
- 24 Queiroz DM, Moura SB, Mendes EN, Rocha GA, Barbosa AJ, de Carvalho AS. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on G-cell and D-cell density in children. *Lancet* 1994; 343: 1191-1193
- 25 Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Dembinski M, Sendur R, Pawlik WW, Konturek SJ. Deleterious effect of *Helicobacter pylori* infection on the course of acute pancreatitis in rats. *Pancreatology* 2002; 2: 386-395
- 26 Yabuki K, Maekawa T, Satoh K, Tamasaki Y, Maekawa H, Kudoh K, Aoki E. Extensive hemorrhagic erosive gastritis associated with acute pancreatitis successfully treated with a somatostatin analog. *J Gastroenterol* 2002; 37: 737-741

电编 张勇 编辑 管鑫妍 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》欢迎投稿

本刊讯 《世界华人消化杂志》2006年重点报道消化内科, 肝、胆、胰、胃肠外科, 介入、中医、中西医结合治疗, 内镜, 护理, 医学影像, 检验, 预防医学, 误诊误治, 康复, 微创, 肿瘤等相关内容的文章. 欢迎各位踊跃投稿, 促进我国消化临床研究的快速发展. 为适应我国消化病学研究领域的飞速发展, 从2006-01-01起《世界华人消化杂志》改为旬刊出版发行, 160页, 每月8、18、28出版.

2006年, 《世界华人消化杂志》在线办公系统将正式开通(<http://www.wjgnet.com/wjg/index.jsp>), 从投稿到出版所有环节一律在网上实现, 将会大大缩短从投稿到出版的时间.

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 我们对所有来稿均进行同行评议. 采用匿名方式, 通常每篇文章邀请3位专家进行同行评议. 至少二位同行评议人通过为录用, 否则为退稿. 每期的最后一页致谢本期所有的同行评议人(包括退稿). 每期在印刷版和电子版固定位置刊登全体《世界华人消化杂志》的同行评议专家的名单.

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》入选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. 2005年, 《世界华人消化杂志》正式向The National Library of Medicine for MEDLINE递交申请, 计划在2006年初进入MEDLINE, 以进一步实现国际索引.

总之, 《世界华人消化杂志》将始终贯彻质量第一的方针, 满足广大作者和读者的需求. 在此, 我们热烈欢迎再次投稿.

胃黏膜保护剂临床应用进展

陈建民, 任建林

陈建民, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化疾病研究所 福建省厦门市 361004

通讯作者: 陈建民, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门市消化病研究所. sycjm@21cn.com

电话: 0592-2292017 传真: 0592-2292017

收稿日期: 2005-09-20 接受日期: 2005-10-10

摘要

胃黏膜保护在胃肠道疾病的发生、发展中起到十分重要的作用。胃黏膜保护剂可以增强胃黏膜保护能力, 加速胃黏膜修复速度, 在胃肠道疾病治疗中有不可替代的地位。我们就近年来胃黏膜保护剂的临床应用进展作一简要综述。

关键词: 胃黏膜保护剂; 临床应用

陈建民, 任建林. 胃黏膜保护剂临床应用进展. 世界华人消化杂志 2005; 13(21):2620-2622

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2620.asp>

0 引言

生理状况下, 胃黏膜不断受到各种物理和化学因子的损伤, 由于胃黏膜自身有一系列保护机制, 包括黏膜前、黏膜和黏膜后保护, 使得胃黏膜在形态和功能上能保持完整。胃黏膜保护机制损害时, 即使各种损害因子无增强, 胃黏膜的形态和功能也可出现明显损害。胃黏膜保护剂能明显增强胃黏膜保护能力, 有利于胃黏膜的修复, 因此越来越受到临床医师的重视。近年来, 随着人们对胃黏膜保护机制认识的加深, 越来越多的胃黏膜保护剂应用于临床, 使胃肠道疾病的治疗水平有了明显提高。

1 传统胃黏膜保护剂

1.1 前列腺素及其衍生物 前列腺素(prostaglandins, PG) 是由必须脂肪酸合成的二十碳的氧合脂肪酸。PG不能在细胞中贮存, 当需要时由细胞内一系列酶促反应迅速使花生四烯酸转化成PG, 外源性PG对胃黏膜上皮细胞有直接保护作用, 其主要机制有 (1)促进黏液和HCO₃⁻的分泌。 (2)增加胃黏膜血流量。 (3)刺激胃基底细胞向表面迁移, 加快胃黏膜修复。 (4)提高黏膜磷脂含量, 防止水溶性攻击因子对黏膜的损害。 (5)促进Na⁺、Cl⁻的转运, 稳定细胞膜和溶酶体膜^[1]。外源性前列腺素口服后被胃酸和胃蛋白酶迅速消化分解, 不能

发挥其细胞保护作用, 而人工合成的PG衍生物可以耐受胃酸和胃蛋白酶的消化作用, 口服后可以发挥其抗酸和细胞保护作用。目前上市的PG衍生物有米索前列醇(misoprostol, MPS, 商品名喜克溃)、沙前列醇(rosaprostol)、恩前列腺醇(enprostil)。动物试验表明, 预先或同时给予MPS可以防止大剂量阿斯匹林、无水乙醇、强酸和强碱诱导的胃黏膜出血和溃疡形成, 且这种作用和胃酸分泌抑制无关^[2]。临床使用MPS 800 μg/d, 十二指肠溃疡4 wk愈合率达60%, 胃溃疡4 wk愈合率达64%, 和H₂受体拮抗剂无显著差异^[3]。在使用NSAID时同时加用MPS, 4 wk胃溃疡发生率为0, 而未加用MPS组胃溃疡发生率为4%^[4]。PG同时也有抑制胃酸分泌的作用, 但所需剂量较大, 临床常用剂量的药理作用主要是其胃黏膜保护作用。PG的主要副作用是可以引起腹泻, 其发生率为6-8%, 其他有轻微恶心、上腹痛等, 另外PG对妊娠子宫有收缩作用, 因此, 孕妇不能使用PG。

1.2 铝剂

1.2.1 硫糖铝(sucralfate) 硫糖铝为蔗糖八硫酸铝盐复合物, 含铝量为18.2-20.7%, 口服后98%不吸收经肠道排除, 2%吸收后以二糖硫酸盐形式经肾脏排除。硫糖铝在酸性环境下解离为带负电荷的八硫酸蔗糖, 和溃疡面带正电荷的变性蛋白结合, 形成一层保护性屏障, 阻断胃酸、胃蛋白酶对溃疡的消化作用, 防止胃黏膜进一步损伤。硫糖铝还可以促进胃黏膜合成内源性PG, 后者是一种重要的胃黏膜保护因子。此外, 硫糖铝可以和表皮生长因子(EGF)结合并促进EGF在溃疡周围聚集, EGF可以促进上皮细胞、肉芽组织、新生血管的生长, 从而促进溃疡愈合。临床研究表明, 硫糖铝对十二指肠溃疡和胃溃疡的4 wk愈合率和H₂RA相似^[5]。对反流性食管炎、急性糜烂性胃炎的预防也有一定作用。硫糖铝水溶剂比片剂疗效更佳^[6]。硫糖铝的主要副作用是便秘, 其发生率大约4%。此外, 硫糖铝可以影响H₂RA、四环素、地高辛、氨茶碱等药物的吸收, 降低其生物利用度^[7]。

1.2.2 铝碳酸镁(hydrotalcite) 铝碳酸镁是一种抗酸剂, 同时也具有胃黏膜保护作用。铝碳酸镁的胃黏膜保护作用机制有: (1)增加胃黏膜上皮细胞的内源性前列腺素合成, 增加胃黏膜血流量。 (2)铝碳酸镁具有抗脂质过氧化作用, 清除氧自由基的氧化作用, 氧自由基在黏膜损伤和溃疡复发中起重要作用。 (3)增加胃黏膜上皮细

胞EGF和EGF受体的表达, EGF可以促进胃黏膜上皮细胞增值^[8].

1.3 铋剂 枸橼酸铋钾(colloidal bismuth subcitrate, CBS) CBS在酸性环境下, 在溃疡基底部和溃疡肉芽组织形成一层坚固的氧化铋胶体沉淀保护膜, 从而隔绝胃酸、胃蛋白酶对胃黏膜和溃疡的侵蚀作用. CBS能刺激内源性前列腺素的释放, 促进黏膜修复和溃疡愈合. 此外, CBS还能改善胃黏膜的血液循环、抑制和杀灭*H pylori*^[9].

2 新型胃黏膜保护剂

2.1 替普瑞酮(teprenone)为一萜类化合物, 动物实验表明, 替普瑞酮可以显著减轻盐酸、乙醇等多种损害因子对胃黏膜的损害作用^[10,11]. 其可能的作用机制有: (1)通过增加黏膜组织一氧化氮环合酶(NOS)和一氧化氮(NO)的含量, 增加胃黏液的分泌. (2)增加黏膜上皮细胞中花生四烯酸的合成, 从而增加内源性PG的生成. (3)促进胃黏膜的再生功能, 并维持黏膜增生部位细胞的平衡^[12]. (4)增加胃黏膜血流量^[13]. 国内外临床研究表明, 替普瑞酮可以促进溃疡愈合, 提高溃疡愈合质量. Shirakabe *et al*^[14]应用内镜评价了1 249例胃溃疡的愈合质量, 其中合用替普瑞酮和H₂RA组的愈合质量明显高于单独使用H₂RA组. Tanoue *et al*^[15]发现替普瑞酮可以提高门脉高压病人胃黏膜血流量, 并对胃黏膜损害有改善作用, 提示替普瑞酮可用以防治门脉高压胃病. 国内学者也报道, 加用替普瑞酮和单用H₂RA相比, 前者可以显著加快胃溃疡的愈合速度, 愈合质量明显提高^[16].

2.2 伊索拉定(irsogladine) 化学名为2,4-二氨基-6-(2,5-二氯苯基)-1,3,5-三嗪顺丁烯二酸动物实验表明, 伊索拉定对实验性胃黏膜损害(盐酸、乙醇、阿司匹林等所致)有明显的保护作用^[17]. Ueda *et al*^[18]发现合用伊索拉定和H₂RA比单独使用H₂RA能明显减轻动物应激性溃疡的发生, 对已经形成的应激性溃疡, 合用伊索拉定也能明显提高愈合质量. 伊索拉定通过强化胃黏膜上皮细胞间的结合, 抑制上皮细胞的剥离、脱落和细胞间隙的扩大, 增强黏膜细胞本身的稳定性, 以发挥黏膜防御作用, 抑制有害物质透过黏膜. 其作用机制与提高胃黏膜细胞内cAMP、前列腺素、还原型谷胱甘肽及黏膜糖蛋白含量有关^[19].

2.3 瑞巴派特(rebamipide, 商品名, 膜固思达mucosta) 瑞巴派特是一种新型的胃黏膜保护剂. 动物实验表明, 瑞巴派特可以清除黏膜上皮细胞内氧自由基, 对嗜中性粒细胞产生的O₂⁻有显著的抑制作用, 而对细胞损害作用非常强的羟自由基(OH[•])也有消除作用^[20]. 瑞巴派特通过刺激胃上皮细胞生长、血管生成促进组织重建, 直接刺激胃微小血管内皮细胞生长的作用^[21]. 同时, 瑞巴派特可以促进前列腺素合成、增加胃黏膜血流

量. 瑞巴派特也可以减少再灌注引起的小肠黏膜上皮细胞凋亡^[22]. 临床研究证明瑞巴派特可以使*H pylori*相关性胃炎和NSAID引起的胃炎的组织学明显改善^[23]. Fujioka *et al*^[24]在一项206例多中心随机双盲对照研究表明, 使用12 wk瑞巴派特使溃疡愈合处组织学积分明显优于未用瑞巴派特组, 而对*H pylori*的根除率未有影响.

2.4 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF) EGF主要存在于唾液腺中, 也可由胰腺和12指肠Brunner腺分泌产生, 胃和小肠上皮细胞均有EGF受体, EGF具有很强的生物学活性, 可促进上皮细胞DNA、RNA和蛋白的合成, 促进上皮细胞的分裂增殖, 增强黏膜修复能力^[25]. EGF还可以刺激内源性前列腺素释放, 增加黏膜血流量、黏液和HCO₃⁻的分泌、抑制胃酸分泌, 有利于黏膜保护. 动物实验表明, 经口服或皮下注射人工合成的EGF均可以显著增强大鼠胃黏膜对乙醇损伤的保护作用^[26].

3 参考文献

- 1 Gyires K. Gastric mucosal protection: from prostaglandins to gene-therapy. *Curr Med Chem* 2005; 12: 203-215
- 2 Walt RP. Prostaglandins and peptic ulcer therapy. *Scand J Gastroenterol* 1990; 174(suppl): 29-36
- 3 Wang BE, Pei Y, Pan GZ. A multiclinic double-blind, comparative clinical trial on misoprostol in the treatment of duodenal ulcer. *Zhonghua NeiKe ZaZhi* 1991; 30: 226-229 254-255
- 4 Roth SH. Misoprostol in the prevention of NSAID-induced gastric ulcer: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *J Rheumatol* 1990; 20(suppl): 20-24
- 5 Hoffenberg P, Reyes V, Palma J, Ossa P, Maggiolo P, Klinger J. Treatment of gastric ulcer with sucralfate and famotidine. *Rev Med Chil* 1991; 119: 45-49
- 6 Iwamori M, Suzuki H, Ito N, Iwamori Y, Hanaoka K. Lipid compositions of human gastric fluid and epithelium: the role of sulfated lipids in gastric cytoprotection. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 129-133
- 7 Grimling B, Pluta J. Study of interaction of gastroenterological agents in the presence of cytoprotective drugs. Part I: Adsorption of the chosen inhibitors of histamine H₂ receptors on sucralfat *in vitro*. *Acta Pol Pharm* 2000; 57: 239-244
- 8 Tarnanski AS, Tomikawa M, Ohta M, Sarfeh IJ. Antacid talcid activates in gastric mucosa genes encoding for EGF and its receptor. The molecular basis for its ulcer healing action. *J Physiol Paris* 2000; 94: 93-98
- 9 Zhang L, Zhang ST, Yu ZL, Shao Y. The effect of *Helicobacter pylori* eradication therapy on bismuth absorption of colloidal bismuth subcitrate. *Zhonghua NeiKe ZaZhi* 2005; 44: 272-275
- 10 Ohta Y, Kobayashi T, Inui K, Yoshino J, Nakazawa S. Protective effect of teprenone against acute gastric mucosal lesions induced by compound 48/80, a mast cell degranulator, in rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 487: 223-232
- 11 Katoh Y, Tanaka M, Kawashima H. Protective effects of teprenone and gefarnate against taurocholate/hydrochloric acid-induced acute gastric mucosal lesions in rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1998; 112: 323-331
- 12 Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Teprenone, an anti-ulcer agent, increases gastric mucosal mucus level via nitric oxide in rats. *Jpn J Pharmacol* 1998; 78: 519-522
- 13 Hachiya A, Bessho M, Iwasaki T, Iida K, Otsuka S. Protective effect of teprenone on blood flow and incidence of histologic

- lesions in rat gastric mucosa after hemorrhage and retransfusion. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 326-334
- 14 Shirakabe H, Take moto T, Kobayashi, et al. clinical evaluation of teprenone, a mucosal protective agent in the treatment of patient with gastric ulcers: a nation wide multicenter clinical study *clin Ther* 1995; 17: 924-935
- 15 Tanoue K, Tarnawski AS, Kishihara F, Ohta M, Hashizume M, Sugimachi K, Sarfeh IJ. Effect of teprenone on portal hypertensive gastric mucosa. *Digestion* 1996; 57: 35-40
- 16 胡伏莲, 贾博琦, 陈寿坡, 林三仁, 董秀芸, 戴希真, 张希全. 替普瑞酮对胃溃疡愈合及其愈合质量的影响. *中华内科杂志* 1996; 35: 807-809
- 17 Tatsumi Y, Tanino M, Kodama T, Kashima K, Katsura M, Okuma S. Irsogladine maleate may preserve gastric mucosal hydrophobicity against ethanol in phospholipids independent way in rats. *Jpn J Pharmacol* 1998; 77: 293-299
- 18 Ueda F, Kyoi T, Kimura K. Synergistic effect of irsogladine maleate and histamine H₂-receptor antagonists on experimental gastric ulcers in rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1989; 94: 181-188
- 19 Kyoi T, Oka M, Noda K, Ukai Y. Phosphodiesterase inhibition by a gastroprotective agent irsogladine: preferential blockade of cAMP hydrolysis. *Life Sci* 2004; 75: 1833-1842
- 20 Sakurai K, Sasabe H, Koga T, Konishi T. Mechanism of hydroxyl radical scavenging by rebamipide: identification of mono-hydroxylated rebamipide as a major reaction product. *Free Radic Res* 2004; 38: 487-494
- 21 Tarnawski AS, Chai J, Pai R, Chiou SK. Rebamipide activates genes encoding angiogenic growth factors and Cox2 and stimulates angiogenesis: a key to its ulcer healing action? *Dig Dis Sci* 2004; 49: 202-209
- 22 Kojima M, Iwakiri R, Wu B, Fujise T, Watanabe K, Lin T, Amemori S, Sakata H, Shimoda R, Oguzu T, Ootani A, Tsunada S, Fujimoto K. Effects of antioxidative agents on apoptosis induced by ischaemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 139-145
- 23 Haruma K, Ito M. Review article: clinical significance of mucosal-protective agents: acid, inflammation, carcinogenesis and rebamipide. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 153-159
- 24 Fujioka T, Arakawa T, Shimoyama T, Yoshikawa T, Itoh M, Asaka M, Ishii H, Kuwayama H, Sato R, Kawai S, Takemoto T, Kobayashi K. Effects of rebamipide, a gastro-protective drug on the *Helicobacter pylori* status and inflammation in the gastric mucosa of patients with gastric ulcer: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 146-152
- 25 Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Ernst H. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α : role in protection and healing of gastric mucosal lesions. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 933-937
- 26 许春娣, 奚容平, 丁红珍, 甘人宝, 陈年, 徐家裕. 基因重组人表皮生长因子对胃黏膜保护的实验研究. *中华儿科杂志* 1997; 35: 635-639

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 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4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, 1 873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1 800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。

塞来昔布对结肠癌细胞生长及肝转移瘤血管生长因子表达的影响

张超, 刘伟, 安杰, 刘占奎

张超, 刘伟, 刘占奎, 第三军医大学西南医院普外科 重庆市 400038
安杰, 白求恩国际和平医院病理科 河北省石家庄市 050082
通讯作者: 张超, 400038, 重庆市第三军医大学西南医院普外科.
zhangchao5642@163.com
电话: 023-68773121
收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-17

Effects of celecoxib on cell proliferation and expression of vascular endothelial growth factor in colonic cancer with hepatic metastasis

Chao Zhang, Wei Liu, Jie An, Zhan-Kui Liu

Chao Zhang, Wei Liu, Zhan-Kui Liu, Department of General Surgery, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Jie An, Department of Pathology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China
Correspondence to: Chao Zhang, Department of General Surgery, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. zhangchao5642@163.com
Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-17

Abstract

AIM: To explore the role of celecoxib in the proliferation and cycle distribution of colon cancer cells cultured *in vitro* as well as its effect on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the animal model of colon cancer with hepatic metastasis.

METHODS: The human colon cancer cells HT-29 and HCT-116 were employed in the study. After treatment with celecoxib, the inhibitory effect of celecoxib on the proliferation of cancer cells was determined by MTT assay, and the cell cycle distribution was detected by flow cytometry. The tumor cells were inoculated in the nude mice, and the expression of VEGF in the model was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Celecoxib inhibited the proliferation of the tumor cells in a time- and dose-dependent manner. The inhibitory effect on HT-29 cells was stronger than that on HCT-116 cells ($P < 0.01$). Celecoxib changed the cell cycle distribution of both cells, and decreased the proliferation index of cells obviously ($P < 0.05$). Celecoxib significantly inhibited the expression of VEGF in the animal model of colon cancer with hepatic metastasis ($P = 0.00$).

CONCLUSION: Celecoxib can inhibit the division and proliferation of the tumor cells through inhibiting the activity of COX-2, consequently it play an important role in the prevention of hepatic metastasis and relapse of colon cancer.

Key Words: Colonic neoplasm; Cyclooxygenase; Celecoxib

Zhang C, Liu W, An J, Liu ZK. Effects of celecoxib on cell proliferation and expression of vascular endothelial growth factor in colonic cancer with hepatic metastasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(21):2623-2626

摘要

目的: 探讨塞来昔布对体外培养的结肠癌细胞生长及肝转移瘤模型血管生长因子(VEGF)表达的影响。

方法: 以人结肠癌细胞株HT-29, HCT-116为对象, 体外药物敏感实验(MTT)法检测塞来昔布对肿瘤细胞的增殖抑制效应, 流式细胞术检测肿瘤细胞各细胞周期分布变化情况, 肿瘤细胞接种裸鼠, 观察肝转移瘤VEGF表达情况。

结果: 塞来昔布对人结肠癌细胞株生长的抑制作用呈时间、剂量依赖性效应, 且对HT-29细胞作用强于HCT-116细胞 ($P < 0.01$); 塞来昔布可改变结肠癌细胞株细胞周期的分布, 明显降低增殖指数 ($P < 0.05$)。塞来昔布具有明显的抑制肝转移瘤VEGF表达的作用 ($P = 0.00$)。

结论: 塞来昔布可通过抑制COX-2酶活性而抑制肿瘤细胞的分裂和增殖, 诱导其凋亡, 并抑制肿瘤血管生成, 干预结肠癌的转移与复发。

关键词: 结肠肿瘤; 环氧合酶; 塞来昔布

张超, 刘伟, 安杰, 刘占奎. 塞来昔布对结肠癌细胞生长及肝转移瘤血管生长因子表达的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(21):2623-2626
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2623.asp>

0 引言

结肠癌是我国的高发恶性肿瘤, 其治疗技术已取得长足进步, 但术后转移仍是成功根治的最大障碍. 有研究显示结肠癌的血行转移、淋巴转移及复发与环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的高表达有关^[1,2], 而非甾体类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)可通过抑制COX活性, 影响结肠肿瘤的发生和发展过

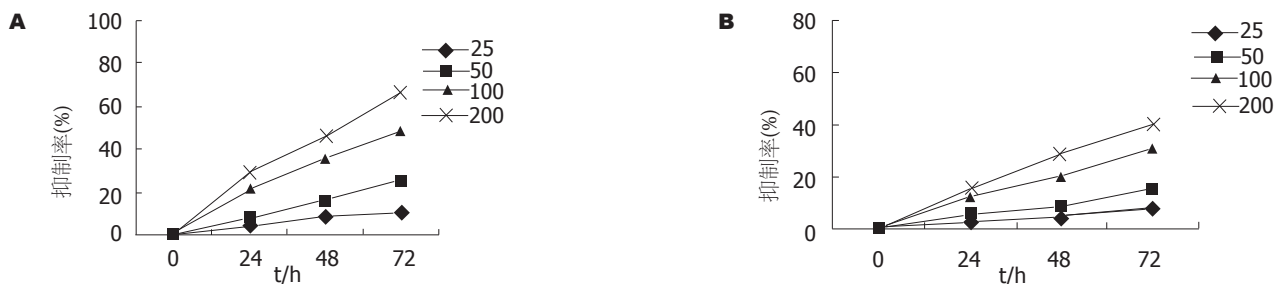


图1 塞来昔布对结肠癌细胞株HT-29和HCT-116的增殖抑制作用. A: HT-29; B: HCT-116.

程^[3,4],但因抑制COX-1表达而出现胃肠道、肾和血小板功能异常等不良反应,因此COX-2选择性抑制剂的研究成了新近的热点^[5-7].我们以COX-2选择性抑制剂塞来昔布作用于结肠癌细胞,并将肿瘤细胞接种BALB/c裸鼠,建立结肠癌肝转移动物模型,观察肿瘤细胞体外生长、细胞周期分布以及接种动物肝转移瘤VEGF表达的情况,探讨塞来昔布干预结肠癌转移与复发的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 DMEM培养液(Hyclony公司),小牛血清(Gibco公司),胰蛋白酶、MTT、DMSO、塞来昔布(Sigma公司);CO₂培养箱(Thermo Forma公司)、流式细胞仪(FACS Beckman, 美国);兔抗鼠VEGF多克隆抗体、SABC免疫组化试剂盒(即用型)、浓缩型DAB显色试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司.

1.1.2 细胞株与实验动物 结肠癌细胞株HT-29(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所),结肠癌细胞株HCT-116(第三军医大学大坪医院病理科向德兵博士惠赠)培养于含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液中,细胞贴壁生长后取对数生长期的细胞以备实验之用. BALB/c-nu/nu裸小鼠36只,鼠龄4-6 wk,体质量15-20 g,♀,购自华中科技大学同济医学院动物研究所,饲养条件按SPF(无特殊病原体动物, specific pathogen free animals)要求.

1.2 方法

1.2.1 体外药物敏感实验 按照噻唑蓝(MTT)法,取HT-29和HCT-116细胞按每孔 5×10^3 的密度接种于96孔板中,24 h后更换培养基,加入不同剂量的塞来昔布原液,使其终浓度分别为25, 50, 100, 200 μmol/L^[5],同时设只加等体积溶剂DMSO对照组和不接种细胞的空白对照组,继续培养24, 48和72 h.每一浓度每一时间点重复设8孔,每孔加入MTT液(5 g/L)20 μL,37℃孵育4 h后弃去上清,每孔加入DMSO 150 μL,轻轻振荡10 min,充分溶解结晶物;在酶联免疫检测仪上以570 nm波长测定各孔吸光度值(A值).以时间为横轴,吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线.计算不同药物浓度对HT-29和HCT-116两种细胞的生长抑制率.生长抑制率=(对照组A值-实验组A值)/对照组A值 $\times 100\%$.

1.2.2 流式细胞法检测 对数生长期的细胞,胰酶消化后,

以 1.0×10^8 /L的密度传代、接种,贴壁后加入DMEM培养基培养24 h,加入新培养液及不同浓度的塞来昔布原液,使其终浓度分别为50, 100, 200 μmol/L,设加等体积溶剂DMSO作为对照组;继续培养至72 h,胰酶消化成单细胞悬液,冰PBS洗涤两次,800 r/min离心5 min,弃上清,缓慢加入-20℃预冷的700 mL/L乙醇,4℃过夜.取细胞悬液,PBS洗涤,1 600 r/min离心5 min后,弃上清.PI染液1.0 mL染30 min,混合液过300目滤网以除去杂质,488 nm激发波长测定样品,620 nm带通滤片检测PI荧光.每样本收集多于10 000个荧光信号.MultiCycle软件分析,计算细胞增殖指数(proliferation index, PI): $PI = (S\% + G_2\%) / (G_1\% + S\% + G_2\%) \times 100$.

1.2.3 动物模型建立及分组 脾切除法建立结肠癌肝转移动物模型,36只裸鼠随机分为HT-29组($n = 24$)和HCT-116组($n = 12$),两组裸小鼠脾内分别注入HT-29和HCT-116细胞悬液0.1 mL,细胞含量为 1×10^6 个,注射时间为1 min. HT-29组24只裸鼠随机分为两组,每组12只,用灌胃法于次日给予塞来昔布10 mg/(kg·d)溶液.接种后的小鼠自由进食、饮水,活跃如常,体形无改变,每日观察. HT-29组,2 wk后小鼠消瘦,腹部渐膨隆.行动渐迟缓,精神差,摄食量减少.于接种后第21天即发现HT-29组有一只裸鼠死亡,40 d所有裸鼠颈椎脱臼处死,死亡小鼠均剖腹观察腹腔内肿瘤生长情况,分别取肝脏置于40 g/L甲醛溶液中固定作病理组织学观察和置液氮冻存.

1.2.4 免疫组化结果判定 VEGF主要在肿瘤细胞的胞质内,内皮细胞也可表达,含有棕黄色或棕褐色颗粒的细胞被计为阳性细胞.应用Image-pro plus 4.5免疫组化彩色图像分析系统对免疫组化结果进行定量分析,以图片中的一个阳性点(单个细胞或小腺腔、细胞团)为基础,分析、测定整幅图片的阳性点的个数、面积、积分光密度值(IOD)等参数.

统计学处理 所有数据采用SPSS 10.0统计分析软件包进行处理,所得到的数值均以mean $\pm$ SD表示,组间以 t 检验进行处理, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异非常显著.

2 结果

2.1 塞来昔布对HT-29和HCT-116细胞增殖的影响(图1) 随

表1 塞莱昔布对HT-29结肠癌细胞周期分布的影响(%, mean $\pm$ SD)

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	各周期细胞比例			增殖指数
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
0	67.15 $\pm$ 1.56	18.54 $\pm$ 2.12	13.68 $\pm$ 2.35	31.50 $\pm$ 2.42
50	72.53 $\pm$ 5.44	14.78 $\pm$ 4.45	13.55 $\pm$ 3.86	28.56 $\pm$ 5.14
100	77.45 $\pm$ 4.25 ^a	11.66 $\pm$ 3.86 ^a	13.56 $\pm$ 7.86	25.86 $\pm$ 4.42 ^a
200	80.77 $\pm$ 2.00 ^b	10.86 $\pm$ 3.89 ^a	9.35 $\pm$ 4.56 ^a	19.86 $\pm$ 2.42 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.表2 塞莱昔布对HCT-116结肠癌细胞周期分布的影响(%, mean $\pm$ SD)

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	各周期细胞比例			增殖指数
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
0	65.52 $\pm$ 3.86	18.42 $\pm$ 4.88	15.65 $\pm$ 7.99	34.55 $\pm$ 3.57
50	68.86 $\pm$ 5.52	16.75 $\pm$ 3.57	15.55 $\pm$ 7.73	31.54 $\pm$ 5.53
100	73.42 $\pm$ 8.42	12.75 $\pm$ 3.45	14.45 $\pm$ 6.29	26.37 $\pm$ 8.94
200	79.42 $\pm$ 6.45 ^a	6.24 $\pm$ 1.45 ^a	14.37 $\pm$ 7.65	20.44 $\pm$ 6.46 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

表3 裸鼠肝转移瘤VEGF蛋白表达情况比较

分组	面积	积分光密度
HT-29组	288 399.71 $\pm$ 5 058.67 ^{bd}	111 591.42 $\pm$ 14 748.63 ^{db}
塞莱昔布组	123 376.92 $\pm$ 39 786.92	59 817.79 $\pm$ 12 305.14
HCT-116组	140 129.00 $\pm$ 35 796.87	24 776.03 $\pm$ 2 458.57

^b $P = 0.00 < 0.01$ vs HCT-116组; ^d $P = 0.00 < 0.01$ vs 塞莱昔布组.

着塞莱昔布浓度的增加,作用时间的延长,药物对HT-29和HCT-116细胞增殖的抑制率明显增高.塞莱昔布对HT-29细胞(COX-2高表达)的抑制作用较对HCT-116细胞(COX-2低表达)的作用明显.

2.2 塞莱昔布对结肠癌细胞周期分布的影响 塞莱昔布作用于肿瘤细胞72 h后,呈浓度依赖性改变细胞周期的分布,一方面G₀/G₁期细胞比例增高,另一方面S期和G₂/M期细胞比例降低.随着塞莱昔布浓度的提高,细胞的增殖指数明显降低,表明塞莱昔布具有明显的G₀/G₁期阻滞作用(表1,表2).

2.3 各组肝脏转移瘤VEGF免疫组化表达(表3) HT-29组较HCT-116组VEGF表达增强,而塞莱昔布组肝脏转移瘤VEGF表达减弱,与HT-29组比较有显著统计学意义($P < 0.01$);塞莱昔布组与HCT-116组比较无显著性差异($P > 0.05$).

3 讨论

传统的NSAIDs大多属COX非选择性抑制剂,因此在发挥抗炎作用的同时对胃肠道及肾脏产生不良反应^[8-10].塞莱昔布是COX-2特异性抑制剂.体外及体内试验均表明他与COX-1的亲合力极弱,治疗剂量的塞莱昔布不影响COX-1的激活,从而不影响生理性前列腺素的合成.因此,

塞莱昔布具有与传统非甾体抗炎药相同的抗炎、镇痛和退热作用,而没有此类药物的不良反应^[11,12].

凋亡是机体维持内环境自稳的重要内容,细胞对凋亡的抵抗会增加基因突变的机率,可能导致恶性转化.近年来的报道显示,NSAIDs对结肠肿瘤生长产生抑制作用,其机制可能和降低肿瘤细胞增殖力、细胞周期停滞和诱导细胞的凋亡有关^[13].我们在倒置显微镜下动态观察了塞莱昔布对两种肿瘤细胞生长的影响,随药物浓度的增加,培养基中悬浮细胞增多,细胞质混浊明显.MTT比色法显示塞莱昔布可以抑制HT-29和HCT-116细胞的增殖.随时间的延长、药物剂量的增加,其抑制作用也明显增强,呈现时间-剂量依赖性方式,且对HT-29细胞的生长抑制作用较HCT-116细胞明显,提示塞莱昔布对结肠癌细胞作用的敏感程度与细胞COX-2的表达水平密切相关.为进一步验证塞莱昔布抑制HT-29细胞、HCT-116细胞生长的机制,我们检测了细胞周期分布和增殖情况,结果显示塞莱昔布可使两种细胞G₀/G₁期比例增高,S、G₂/M期比例降低,表明塞莱昔布具有明显的G₀/G₁期阻滞作用,并使处于S期的肿瘤细胞明显减少,从而抑制细胞的生长、诱导其凋亡.

肿瘤组织中COX-2高表达是一种普遍现象,运用COX-2选择性抑制剂可显著抑制肿瘤组织的血管生成,这表明COX-2与肿瘤血管生成密切相关.COX-2主要在新生血管内皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞和肿瘤细胞自身表达,在肿瘤新生血管生成过程中VEGF又起到了重要作用,那么COX-2与VEGF的关系如何呢?有资料证实,COX-2可使肿瘤中的VEGF表达上调,抑制COX-2则可抑制VEGF的表达.Tsujii *et al*^[14]将内皮细胞及表达COX-2的大肠癌细胞联合培养,可诱导大肠癌细胞产生VEGF,以旁分泌的形式作用于内皮细胞,促进内皮细胞迁移及管样结构的形成,这一过程可被COX-2选择性抑制剂及VEGF抗体抑制.同时VEGF可诱导大肠癌细胞上调COX-2的表达,从而形成一个正反馈网络,协同刺激肿瘤血管生成.我们用免疫组化法检测到肝脏转移瘤VEGF表达,HT-29组与HCT-116组比较表达增强($P < 0.01$),而应用塞莱昔布处理后,肝脏转移瘤VEGF蛋白表达减弱,有显著统计学意义和($P < 0.05$);塞莱昔布组与HCT-116组比较无显著性差异($P > 0.05$).那么COX-2促进VEGF表达上调的途径是什么呢?有文献表明^[15],COX-2通过前列腺素途径促进VEGF的表达上调,本研究表明COX-2与结肠癌肝转移瘤新生血管生成密切相关,其高表达可能上调促血管生成因子VEGF的表达;COX-2的选择性抑制剂塞莱昔布对结肠癌肝转移瘤的血管生成有一定的抑制作用.这提示COX-2在结肠癌肝转移过程中起重要作用,使用COX-2选择性抑制剂可能是防治结肠癌肝转移的可行性途径之一.同时本研究也为COX-2选择性抑制剂应用于结肠癌的预防和治疗提供了一定的实验依据.

4 参考文献

- 1 Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 83: 324-328
- 2 Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Kawai N, Yasumaru M, Kimura A, Komori M, Irie T, Miyoshi E, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res* 2002; 62: 1567-1572
- 3 DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, Entingh AJ. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* 1996; 110: 1259-1262
- 4 Williams CS, Luongo C, Radhika A, Zhang T, Lamps LW, Nanney LB, Beauchamp RD, DuBois RN. Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. *Gastroenterology* 1996; 111: 1134-1140
- 5 Czembirek C, Eder-Czembirek C, Erovic BM, Turhani D, Selzer E, Thurnher D. Inhibition of cytotoxicity of cisplatin by cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide in head and neck cancer cell lines. *Oncol Rep* 2005; 14: 1523-1526
- 6 Backhus LM, Petasis NA, Uddin J, Schonthal AH, Bart RD, Lin Y, Starnes VA, Bremner RM. Dimethyl celecoxib as a novel non-cyclooxygenase 2 therapy in the treatment of non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 1406-1412
- 7 Hauser B, Froba G, Bracht H, Strater J, Chkhouta AB, Vassilev D, Schoaff MJ, Huber-Lang M, Bruckner UB, Radermacher P, Schelzig H. Effects of intrarenal administration of the cox-2 inhibitor parecoxib during porcine suprarenal aortic cross-clamping. *Shock* 2005; 24: 476-481
- 8 Takeuchi K, Tanaka A, Ohno R, Yokota A. Role of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 165-182
- 9 Shattuck-Brandt RL, Varilek GW, Radhika A, Yang F, Washington MK, DuBois RN. Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stroma of colon carcinomas from IL-10(-/-) mice. *Gastroenterology* 2000; 118: 337-345
- 10 Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000; 60: 1306-1311
- 11 Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83: 493-501
- 12 Ragel BT, Jensen RL, Gillespie DL, Prescott SM, Couldwell WT. Ubiquitous expression of cyclooxygenase-2 in meningiomas and decrease in cell growth following *in vitro* treatment with the inhibitor celecoxib: potential therapeutic application. *J Neurosurg* 2005; 103: 508-517
- 13 Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 145-182
- 14 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-716
- 15 Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells *in vivo*. *Cancer Res* 2002; 62: 625-631

电编 张敏 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 •

技法与经验

《世界华人消化杂志》2006年设置"技法与经验"专栏,及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验.我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿,免费刊登彩色照片.写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法

1.1 原理

1.2 适应证

1.3 器材准备

1.4 步骤

1.5 实例

2 结果

3 讨论

3.1 并发症

3.2 优点和缺点

3.3 经验与技巧

4 参考文献

银杏叶类黄酮对人胃癌细胞 BGC823 体外的增殖抑制作用

张凤, 杨桂文, 张金凤, 安利国

张凤, 杨桂文, 张金凤, 安利国, 山东师范大学生命科学学院动物抗性重点实验室 山东省济南市 250014

通讯作者: 安利国, 250014, 山东省济南市文化东路88号, 山东师范大学生命科学学院. anlg@sdsu.edu.cn

电话: 0531-86180143

收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-16

Inhibitory effects of *Ginkgo biloba* leaf flavonoids on proliferation of human gastric cancer cell line BGC823 *in vitro*

Feng Zhang, Gui-Wen Yang, Jin-Feng Zhang, Li-Guo An

Feng Zhang, Gui-Wen Yang, Jin-Feng Zhang, Li-Guo An, Key Laboratory of Animal Resistance, College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, Shandong Province, China

Correspondence to: Li-Guo An, College of Life Sciences, Shandong Normal University, 88 Wenhua East Road, Jinan 250014, Shandong Province, China. anlg@sdsu.edu.cn

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

Abstract

AIM: To extract the flavonoids from *Ginkgo biloba* leaf, and to investigate its inhibitory effects on the proliferation of human gastric cancer cell line BGC823 cultured *in vitro*.

METHODS: Ethanol (700 mL/L) was used to extract the flavonoids from the leaf of *Ginkgo biloba*. Three wavelength spectrophotometry was used to determine the content of flavonoids in the extracts. Human gastric cancer cells BGC823 cultured *in vitro* were treated with different concentrations of the flavonoids, and then the proliferation of the cells was detected by MTT assay and flow cytometry.

RESULTS: The content of flavonoids in the extracts was 140 mg/g. The flavonoids from *Ginkgo biloba* leaf inhibited the proliferation of BGC823 cells in a dose-dependent manner. The rate of cells in S phase was notably increased as compared with that in the controls ($42.17 \pm 0.50\%$ vs $32.13 \pm 0.45\%$, $P = 0.001$), and the apoptotic rate of the cells was also increased ($4.10 \pm 0.03\%$ vs $2.21 \pm 0.01\%$, $P = 0.002$).

CONCLUSION: *Ginkgo biloba* leaf flavonoids can inhibit the proliferation of human gastric cancer cell line BGC823 by affecting the cycle the cells.

Key Words: *Ginkgo biloba* leaf flavonoids; Gastric cancer

Zhang F, Yang GW, Zhang JF, An LG. Inhibitory effects of *Ginkgo biloba* leaf flavonoids on proliferation of human gastric cancer cell line BGC823 *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(21):2627-2629

摘要

目的: 提取并测定银杏叶类黄酮(芦丁)的含量; 探讨银杏叶类黄酮对体外培养的人胃癌细胞BGC823的增殖抑制作用。

方法: 乙醇法(700 mL/L)提取银杏叶类黄酮; 三波长分光光度法测定提取物中类黄酮(芦丁)的含量; MTT法及流式细胞技术观察提取物对人胃癌细胞BGC823的增殖抑制作用。

结果: 提取物中类黄酮(芦丁)含量为140 mg/g. MTT法证实银杏叶类黄酮对人胃癌细胞BGC823增殖有抑制作用, 且呈剂量依赖效应. 流式细胞术分析表明银杏叶类黄酮将胃癌细胞BGC823的生长周期阻滞于S期, 与对照组相比明显增加($42.17 \pm 0.50\%$ vs $32.13 \pm 0.45\%$, $P = 0.001$), 凋亡细胞数与对照组相比也显著增加($4.10 \pm 0.03\%$ vs $2.21 \pm 0.01\%$, $P = 0.002$).

结论: 银杏叶类黄酮对人胃癌细胞BGC823增殖有抑制作用, 并能阻滞细胞周期进程, 诱导细胞凋亡。

关键词: 银杏叶类黄酮; 胃癌

张凤, 杨桂文, 张金凤, 安利国. 银杏叶类黄酮对人胃癌细胞BGC823体外的增殖抑制作用. 世界华人消化杂志 2005;13(21):2627-2629

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2627.asp>

0 引言

银杏(*Ginkgo biloba* L.)又名白果树, 银杏叶提取物(GBE)主要药用成分之一为类黄酮^[1-3], 用于对心血管、动脉硬化、高血压等疾病的治疗, 具有独特药理活性和巨大的临床应用价值^[4-9]. Lee *et al*^[10]报道银杏提取物中的双黄酮—银杏黄素或异银杏黄素10 $\mu\text{mol/L}$ 能抑制ConA或LPS诱导的淋巴细胞增殖, Chao *et al*^[11]研究表明, 银杏提取物EGb761能够抑制肝癌细胞HepG2和Hep3B的增殖, Kim *et al*^[12]研究显示, 银杏提取物EGb761能够激活caspase-3诱导口腔牙槽癌细胞凋亡. 据此我们推测银杏叶提取物也许能够通过抑制细胞增殖从而抑制胃癌细胞的生长, 在胃癌治疗中发挥有益作用. 我们研究银杏叶提

取物中类黄酮含量并探讨其对胃癌细胞BGC823细胞增殖的抑制作用,为进一步开发银杏这一我国特有植物物种资源的应用价值提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料 银杏叶; BGC823细胞株; RPMI-1640培养基(Gibco); 小牛血清(杭州四季清公司); 二甲基亚砜(DMSO); 噻唑蓝(MTT)(Sigma); 芦丁标准品(中国药品检验所). 类黄酮的提取(700 mL/L乙醇法)参照秦雪莲 *et al*^[13-15]的方法,称取银杏叶干粉10 g,加700 mL/L乙醇400 mL,混匀,40℃超声振荡50 min,8 000 g离心20 min,收集上清. 滤渣再加700 mL/L乙醇300 mL,混匀,40℃超声振荡30 min,8 000 g离心20 min,收集上清. 滤渣再加700 mL/L乙醇100 mL,混匀,40℃超声振荡20 min,8 000 g离心20 min,收集上清. 将所得的3次上清液合并,减压浓缩并将浓缩液置于硫酸纸上,40℃干燥箱中干燥,所得干燥品即为银杏叶粗黄酮. 称取芦丁标准品5 mg溶于水并定容于100 mL容量瓶中,即为芦丁母液;取母液0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mL于容量瓶中,每一容量瓶用水加至3.5 mL,再用10 g/L AlCl₃定容至5 mL;测定 $\lambda_1 = 470$ nm, $\lambda_2 = 420$ nm, $\lambda_3 = 370$ nm三波长处的吸光度A值. 按公式 $\Delta A = A_2 - \{[(\lambda_2 - \lambda_3)A_1 + (\lambda_1 - \lambda_2)A_3]/(\lambda_1 - \lambda_3)\}$ 计算 ΔA ,根据 ΔA 与浓度关系绘制标准曲线. 样品中类黄酮含量的测定:称取银杏叶粗黄酮5 mg溶于水中,并定容于5 mL容量瓶中,即为粗黄酮溶液,取此液2.5 mL于5 mL容量瓶中,用水加至3.5 mL,用10 g/L AlCl₃定容至刻度,测定 $\lambda_1 = 470$ nm, $\lambda_2 = 420$ nm, $\lambda_3 = 370$ nm三波长处的吸光度A值,计算样品中黄酮含量. 10 g银杏叶中提取得到类黄酮1.95 g,得率为19.5%. 根据 ΔA 与浓度关系绘制标准曲线,回归方程为: $Y = 31.096x + 0.0134$, $R^2 = 0.9997$. 样品中类黄酮含量计算可知1 mg提取物中含黄酮140 μ g,进而根据提取物得率计算银杏叶中类黄酮含量为2.73%.

1.2 方法 取对数生长期的胃癌细胞BGC823细胞以 5×10^7 /L浓度接种于96孔培养板,每孔100 μ L, 37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养. 24 h后分别接入不同浓度的无菌的银杏叶类黄酮溶液100 μ L,使最终浓度分别为60, 80, 100, 150, 200, 250 g/L,各组设8个重复孔,对照组加100 μ L培养液,在37℃, 50 mL/L CO₂条件下继续培养48 h. 实验终止前加入新配制的5 g/L的MTT溶液20 μ L,混匀,再继续培养4 h. 弃去上清,每孔加DMSO 200 μ L,充分振荡30 min,溶解MTT沉淀物,490 nm测定每孔的吸光度A值^[16-19]. 计算抑制率:抑制率=(1-实验组A值/对照组A值)×100%. 另将 5×10^7 /L细胞接种于2个6 cm培养皿中,24 h后加入无菌银杏叶类黄酮溶液,使其终浓度为150 g/L,对照组加等量的培养液.继续培养48 h,终止培养后制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^9 /L,离心,用同体积700 mL/L的冷乙醇固定1 h,离心, PBS洗涤2次,

将细胞悬液和碘化丙啶(PI)等体积混合,4℃放置30 min,放入流式细胞仪样品室,488 nm检测细胞周期和细胞凋亡的情况^[20,21].

统计学处理 用SPSS 10.0统计学软件和t检验处理数据,所有数据均用mean±SD表示.

2 结果

2.1 银杏叶类黄酮对胃癌细胞BGC823的抑制作用 银杏叶类黄酮对肿瘤细胞BGC823增殖有抑制作用,并呈现明显的剂量依赖效应(表1).

表1 银杏叶类黄酮对胃癌细胞增殖的抑制作用

黄酮(mg/L)	吸光度(A)	抑制率(%)
0	0.675 ± 0.096	—
60	0.596 ± 0.084 ^b	11.5 ± 1.4
80	0.555 ± 0.164 ^a	17.4 ± 6.6
100	0.484 ± 0.057 ^b	28.1 ± 2.4
150	0.361 ± 0.094 ^b	46.4 ± 2.8
200	0.168 ± 0.022 ^b	75.2 ± 0.5
250	0.096 ± 0.013 ^b	85.9 ± 0.4

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 0 mg/L.

2.2 流式细胞仪分析结果 银杏叶类黄酮使胃癌细胞BGC823的细胞周期滞留于S期,并且能够诱导细胞凋亡(表2).

表2 流式细胞仪分析的BGC823细胞周期分布(mean±SD %)

银杏叶黄酮类	G ₀ -G ₁ 期	S期	G ₂ -M期	凋亡率
对照	58.45 ± 0.35	32.13 ± 0.45	9.41 ± 0.14	2.21 ± 0.11
150 mg/L	57.72 ± 0.45	42.17 ± 0.50 ^b	0.11 ± 0.08 ^b	4.10 ± 0.03 ^b

^bP<0.01 vs 对照.

3 讨论

在类黄酮化合物的紫外光谱吸收中,主要吸收带是由304-350 nm的吸收带I和240-280 nm的吸收带II组成. 因为银杏叶类黄酮提取物中其它成分在带I和带II范围内也有一定程度的吸收,会对类黄酮的测定产生干扰. 加入铝盐使类黄酮与铝离子形成稳定的配合物,吸收带I会明显红移,同时吸光度也大大增加. 因此,选择铝配合物显色体系来测定总黄酮的含量可以去除其他成分的干扰^[22,23],同时选择三波长—光谱法能够有效地消除吸收峰不对称给定量分析造成的影响,提高定量分析的准确度. 通过数据分析可知银杏叶粗提取物中类黄酮含量为140 mg/g,银杏叶中类黄酮的含量约为2.73%.

通过MTT法观察银杏叶类黄酮对人胃癌细胞增殖的影响表明,银杏叶类黄酮对人胃癌细胞的增殖有抑制作用,而且存在明显的剂量依赖效应. 我们在中效浓度附近选择了150 mg/L进一步用流式细胞仪分析其对胃癌细胞BGC823的作用,结果表明处理的胃癌细胞BGC823 S期细

胞比例明显增加(42.17 ± 0.50 vs 32.13 ± 0.45 , $P = 0.001$), 并且能够诱导细胞凋亡(4.10 ± 0.03 vs 2.21 ± 0.01 , $P = 0.002$), 这说明银杏叶类黄酮能够把胃癌细胞BGC823的细胞周期阻滞在S期, 阻碍其向G₂/M期的转换, 减缓其分裂的速度, 从而抑制其增殖并诱导细胞凋亡. 这与许多研究者对抗癌活性物质研究的实验结果类似^[24-28], 其诱导癌细胞凋亡的机制可能与p53和Fas有关^[29,30]. 然而, 银杏叶类黄酮如何通过阻抑细胞周期进程并诱导细胞凋亡起到抗肿瘤作用的至今还不清楚. 因此, 对于银杏叶类黄酮抗肿瘤的作用机制尚需进一步研究.

4 参考文献

- 1 黄沛力, 李建新, 张淑华, 王晖. 银杏叶不同有效成分抑制金属离子诱导人血浆低密度脂蛋白氧化修饰的比较研究. 中药材 2004; 27: 654-656
- 2 Gaudineau C, Beckerman R, Welbourn S, Auclair K. Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the *Ginkgo biloba* extract. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 1072-1078
- 3 Nishida S, Satoh H. Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in *Ginkgo biloba* extract. *Clin Chim Acta* 2004; 339: 129-133
- 4 Lin SJ, Yang TH, Chen YH, Chen JW, Kwok CF, Shiao MS, Chen YL. Effects of *Ginkgo biloba* extract on the proliferation of vascular smooth muscle cells *in vitro* and on intimal thickening and interleukin-1 β expression after balloon injury in cholesterol-fed rabbits *in vivo*. *J Cell Biochem* 2002; 85: 572-582
- 5 潘洪平. 银杏叶制剂药理作用和临床应用研究进展. 中国中药杂志 2005; 30: 93-96
- 6 Satoh H, Nishida S. Electropharmacological actions of *Ginkgo biloba* extract on vascular smooth and heart muscles. *Clin Chim Acta* 2004; 342: 13-22
- 7 Villaseñor-García MM, Lozoya X, Osuna-Torres L, Viveros-Paredes JM, Sandoval-Ramírez L, Puebla-Pérez AM. Effect of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 on the nonspecific and humoral immune responses in a hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation model. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 1217-22
- 8 Yao ZX, Han Z, Drieu K, Papadopoulos V. *Ginkgo biloba* extract (Egb 761) inhibits beta-amyloid production by lowering free cholesterol levels. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 749-56
- 9 朱贵月, 朱兴雷, 耿庆信, 张兴华, 邵建华. 冠心病患者外周血单核细胞清道夫受体活性变化及银杏叶提取物的干预作用. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 1069-1072
- 10 Lee SJ, Choi JH, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Suppression of mouse lymphocyte proliferation *in vitro* by naturally-occurring biflavonoids. *Life Sci* 1995; 57: 551-558
- 11 Chao JC, Chu CC. Effects of *Ginkgo biloba* extract on cell proliferation and cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 37-41
- 12 Kim KS, Rhee KH, Yoon JH, Lee JG, Lee JH, Yoo JB. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) induces apoptosis by the activation of caspase-3 in oral cavity cancer cells. *Oral Oncol* 2005; 41: 383-389
- 13 秦雪莲. 甜茶叶中黄酮类化合物提取条件研究. 四川化工与腐蚀控制 2003; 6: 13-15
- 14 刘心平, 徐文弟. 银杏叶黄酮提取工艺及对Hela细胞*Bcl-2* mRNA表达的影响. 哈尔滨医科大学学报 2005; 39: 250-252
- 15 侯冬岩, 回瑞华, 杨梅, 李铁纯, 刘晓媛, 朱永强. 绿茶及其饮料中总黄酮的分析. 分析实验室 2003; 22: 86-88
- 16 Huang C, Liu LY, Song TS, Ni L, Yang L, Hu XY, Hu JS, Song LP, Luo Y, Si LS. Apoptosis of pancreatic cancer BXPc-3 cells induced by indole-3-acetic acid in combination with horseradish peroxidase. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4519-4523
- 17 Wu K, Yuan LH, Xia W. Inhibitory effects of apigenin on the growth of gastric carcinoma SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4461-4464
- 18 Wang D, Xiang DB, He YJ, Li ZP, Wu XH, Mou JH, Xiao HL, Zhang QH. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4008-4012
- 19 Zhang R, Gong J, Wang H, Wang L. Bile salts inhibit growth and induce apoptosis of human esophageal cancer cell line. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5109-5116
- 20 Matsumoto K, Akao Y, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. Xanthones induce cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer DLD-1 cells. *Bioorg Med Chem* 2005
- 21 Manthey KC, Rodriguez-Melendez R, Hoi JT, Zemleni J. Riboflavin deficiency causes protein and DNA damage in HepG2 cells, triggering arrest in G1 phase of the cell cycle. *J Nutr Biochem* 2005
- 22 回瑞华, 侯冬岩, 关崇新, 刘晓媛. 三波长-光谱法测定沙棘果汁中黄酮的含量. 光谱学与光谱分析 2005; 25: 266-269
- 23 侯冬岩, 回瑞华, 杨梅, 刘晓媛, 关崇新. 苦丁茶中总黄酮的三波长-光谱法定量分析. 分析化学 2004; 32: 783-786
- 24 Lee HZ, Leung HW, Lai MY, Wu CH. Baicalein induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *Anticancer Res* 2005; 25: 959-964
- 25 Zhang M, Chen H, Huang J, Li Z, Zhu C, Zhang S. Effect of lycium barbarum polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *Life Sci* 2005; 76: 2115-2124
- 26 Espinosa A, Marchal JA, Aranega A, Gallo MA, Aiello S, Campos J. Antitumoural properties of benzannulated seven-membered 5-fluorouracil derivatives and related open analogues. Molecular markers for apoptosis and cell cycle dysregulation. *Farmacol* 2005; 60: 91-97
- 27 Leung HW, Wu CH, Lin CH, Lee HZ. Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2005; 508: 77-83
- 28 Iguchi T, Miyakawa Y, Yamamoto K, Kizaki M, Ikeda Y. Nitrogen-containing bisphosphonates induce S-phase cell cycle arrest and apoptosis of myeloma cells by activating MAPK pathway and inhibiting mevalonate pathway. *Cell Signal* 2003; 15: 719-727
- 29 Katayama K, Ueno M, Yamauchi H, Nagata T, Nakayama H, Doi K. Ethylnitrosourea induces neural progenitor cell apoptosis after S-phase accumulation in a p53-dependent manner. *Neurobiol Dis* 2005; 18: 218-225
- 30 N'cho M, Brahmi Z. Evidence that Fas-induced apoptosis leads to S phase arrest. *Hum Immunol* 2001; 62: 310-319

电编 张勇 编辑 张海宁

端端吻合胆道重建在活体肝移植中的应用

徐三荣, 王学浩, 李相成, 张峰, 成峰, 李国强, 王科

徐三荣, 王学浩, 李相成, 张峰, 成峰, 李国强, 王科, 南京医科大学第一附属医院肝移植中心 江苏省南京市 210029

通讯作者: 李相成, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院肝移植中心. doclix@hotmai.com

收稿日期: 2005-09-21 接受日期: 2005-09-30

Application of duct-to-duct biliary reconstruction in living donor liver transplantation

San-Rong Xu, Xue-Hao Wang, Xiang-Cheng Li, Feng Zhang, Feng Cheng, Guo-Qiang Li, Ke Wang

San-Rong Xu, Xue-Hao Wang, Xiang-Cheng Li, Feng Zhang, Feng Cheng, Guo-Qiang Li, Ke Wang, Center of Liver Transplantation, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Xiang-Cheng Li, Center of Liver Transplantation, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. doclix@hotmai.com

Received: 2005-09-21 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To evaluate the operative outcome, complication, and managing principles of the duct-to-duct biliary reconstruction in living donor liver transplantation (LDLT).

METHODS: The clinical data of 24 patients who underwent LDLT (6 for right lobe, 16 for left lobe, and 2 for left lateral lobe) were analyzed retrospectively. The duct-to-duct biliary anastomosis with T tube drainage was used in the biliary reconstruction.

RESULTS: Of the 24 patients underwent duct-to-duct biliary reconstruction, 18 were treated by connecting the donors' right hepatic duct with the recipients' common bile duct, and 5 by connecting the donors' left hepatic duct with the recipients' common hepatic duct. For the other patient, the two opens of hepatic duct were respectively connected to the recipient's common hepatic and bile duct. Biliary leakage appeared in 2 patients, and stenosis of biliary tract happened in 1 patient. Two patients had cholangitis after the operation. One case developed biliary peritonitis after the T tube was taken out, but recovered after treatment with biliary duct drainage. The overall rate of biliary tract

complication was 25%, and the complication appeared at 2 d-9 mo after the operation.

CONCLUSION: The duct-to-duct biliary reconstruction is feasible and effective in LDLT.

Key Words: Living donor liver transplantation; Biliary reconstruction; Biliary complication

Xu SR, Wang XH, Li XC, Zhang F, Cheng F, Li GQ, Wang K. Application of duct-to-duct biliary reconstruction in living donor liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(21):2630-2633

摘要

目的: 探讨端端吻合胆道重建在临床活体肝移植中的应用效果、并发症及处理原则。

方法: 回顾性分析活体肝移植24例临床资料;其中右半肝活体肝移植6例,左半肝移植16例,左外叶2例;胆道重建均采用供肝肝管与受体胆管端端吻合,并置"T"管外引流。

结果: 24例活体肝移植中,18例采用供肝的左肝管和受体的胆总管吻合,5例采用供肝的右肝管和受体的肝总管吻合,1例右肝管是两个开口,将右前肝管和受体的肝总管行端端吻合,右后肝管与胆总管行端侧吻合。2例患者发生胆漏;1例出现胆道狭窄;术后胆管炎2例;1例术后3 mo拔"T"管后出现胆汁性腹膜炎,再次行胆道引流术,术后恢复。胆道并发症总发生率为25%;发生时间在术后2 d-9 mo。

结论: 端端吻合胆管重建是活体肝移植中胆管重建的可行、有效的方法。

关键词: 活体肝移植;胆道重建;胆道并发症

徐三荣, 王学浩, 李相成, 张峰, 成峰, 李国强, 王科. 端端吻合胆道重建在活体肝移植中的应用. *世界华人消化杂志* 2005;13(21):2630-2633

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2630.asp>

0 引言

活体肝移植(LDLT)是解决供肝短缺的最好方法,特别是在急症的情况下。现在有越来越多的移植中心,开展了LDLT。但LDLT胆道并发症明显高于尸体全肝移植,既往报道胆道并发症高达15-64%^[1-2]。LDLT术后胆道并发症已成为影响移植物功能、受体生存的主要因素。我们回顾

性分析24例LDLT临床资料,探讨端端吻合胆管重建技术的应用,着重讨论吻合技术和保留胆管血供的经验,评估吻合方式和支架管的放置与胆道并发症的关系,并提出胆道并发症的处理方法。

1 材料和方法

1.1 材料 2000-09/2003-05, 我院24例活体肝移植, 年龄8-40岁; 男12例, 女12例; 其中右半肝移植6例, 左半肝移植16例, 左外叶肝移植2例, 再次肝移植2例。术前诊断肝豆状核变性21例, 终末期肝炎后肝硬化2例, 急性肝功能衰竭1例。供体年龄36-49岁; 与受体的关系分别为: 母亲18例, 父3例, 兄弟1例, 姐妹1例, 侄儿1例; 所有供受体的血型相同。

1.2 方法 供体经过仔细评估, 包括血液、肝肾功能, B型超声波, CT影像学检查及心理评估以确认供者无禁忌。术前行常规血管造影, ERCP及MR胆道重建。

供体手术: 先行胆囊切除, 经胆囊管插管行术中胆道造影; 仔细解剖肝门, 辨清左、右肝管, 在距左右肝管的分叉3 mm处, 用钛夹夹住需要切断的肝管, 以确定可能的肝管切面。再经胆囊管注入不稀释的造影剂, 以便了解肝内胆管的走向。左右肝管分叉的距离及钛夹放置的位置均应在术中仔细研究决定。造影后再决定切断肝管的位置, 并标明肝左中叶(第四段)胆管的起源及走向。解剖肝动脉时应尽量不要游离肝管切面以上的肝右动脉与右肝管之间的组织, 以避免损伤右肝管的血供。游离肝静脉和门静脉分支。沿正中裂离断肝实质。用超声电刀切肝, 无需肝门阻断。当离断肝实质到肝门时, 用直角钳通过右肝管和肝门板, 再次行术中胆道造影, 以确定右肝管及其他胆管的解剖, 切断肝管及肝门板, 仔细检查肝管的开口, 如有活动性出血, 则用6-0的Prolene线缝合。并缝扎小的尾状叶肝管。修肝时, 再次检查肝管的开口, 如果右肝管的两个开口相邻, 则将其成形为一个开口。

受体手术: 仔细分离肝门, 保留胆管的血供。受体胆总管的血供一般是来自十二指肠向上的血管, 禁止在胆管外作过多的游离, 以免损伤胆管的血供。采用胆管对胆管端端吻合的方法, 一般在肝动脉吻合后进行。将受体胆管剪整齐, 并检查受体胆管切断是否出血, 这也是受体胆管血供良好的标志。用6-0的PDS线, 先缝合肝管的两侧, 如胆管直径大于5 cm, 可采用后壁连续缝合前壁间断缝合的方法; 如胆管直径小于5 cm, 则采用间断缝合的方法吻合胆管, 将线节打在胆管壁外。采用T管引流: 用12号的T管, 将T管短臂剪成单片状, 供体侧要短, 当后壁吻合完毕后, 将T管置入, 然后再吻合前壁; T管的长臂从胆管的吻合口引出。吻合完毕后可注入生理盐水检查胆道吻合口是否渗漏。并行术中造影以检查吻合口的情况。

术中记录供肝的冷缺血时间; 门静脉、肝动脉的吻合时间; 右肝管及肝门板出血与否; 记录肝管的大小及

重建方法。术后随访观察并发症是否发生, 进一步行术中胆道造影检查可能的原因。

术后免疫抑制剂的使用采用FK506和激素二联用药。胆道并发症通过临床和放射诊断; 如发现有胆道并发症的则可能立即急诊行胆道造影; 术后1-2 wk常规经T管胆道造影; 3 mo后拔除T管。

2 结果

本组24例, 16例左半肝(II、III、IV段, 包括肝中静脉), 2例左外叶(II、III段), 6例右半肝(V、VI、VII、VIII段, 不包括肝中静脉); 术中造影显示: 22例左右肝管均为单支, 1例左右肝管分叉较高, 在肝实质内, 1例右肝管为2支, 分右前肝管和右后肝管。

移植物的冷缺血时间: 1.9 ± 0.5 h; 无肝期时间: 98 ± 26 min; 移植物质质量/受体质量(%) $1.2 \pm 0.26\%$ 。

胆管重建: 24例活体肝移植采用左或右肝管和受体胆总管端端吻合; 其中18例是采用供肝的左肝管和受体的肝总管吻合, 5例是采用供肝的右肝管和受体的肝总管吻合, 1例右肝管是两个开口, 将右前肝管和受体的肝管行端端吻合, 右后肝管与胆总管行端侧吻合。所有病例均置T管引流: 采用12号的" T "管, 且将T管直接从胆道吻合口引出; 对两支右肝管的病例, 我们采用将细的硅胶管劈开成" Y "状, 一段置入右前肝管, 一段置入右后肝管, 然后长臂从胆总管下端重新开口牵出。术中造影显示胆管吻合口良好。

术后胆道并发症: 术后随访2-24 mo, 24例患者中, 1例患者发生胆道吻合口漏(病例8), 患者是右半肝移植, 术后大量腹水, 移植肝功能不良。术后68 d再次行手术探查发现: 吻合口周围有胆汁积聚, 继发感染。行再次肝移植后仍恢复不良, 死于继发感染。1例患者出现移植肝创面胆漏(病例5), 患者是左半肝移植, 因肝中静脉和肝左静脉成型不佳, 吻合肝静脉后肝中静脉回流不良, 使得左内叶血液回流不畅, 特别是左肝管处局部缺血。患儿术后1 d, B超和血管造影均示肝动脉栓塞, 术后第2天行剖腹探查见邻近肝动脉和胆管处肝组织坏死, 胆汁积聚, 再次行自体脾动脉搭桥重建, 未成功。术后第5 d行再次肝移植, 术后恢复良好, 术后3 mo拔除T管。1例4 mo后出现胆道狭窄(病例18), 再次行肝管空肠吻合。发生术后胆管炎2例, 经抗感染治疗好转。1例术后3 mo拔" T "管后出现胆汁性腹膜炎, 再次行胆道引流术, 术后恢复。本组总的胆道并发症发生率为25%, 发生的时间在术后2 d-9 mo。

3 讨论

胆道重建是肝移植中最具挑战的部分, 也是最易发生并发症的环节。肝移植中胆道重建的方式, 一是Roux-en-Y胆总管空肠吻合; 二是胆总管—胆总管端端吻合。对活体肝移植来说, 特别是右半肝移植, 肝管空肠吻合是胆

道重建的标准术式,但由于肝管的开口常常很小,且血供差,冷缺血的损伤等因素的影响,并发症的发生率约为30%^[3-4],且常是导致死亡的因素.临床研究表明外科技术仍是导致胆道并发症的主要原因.近来不少中心开始采用胆管-胆管端端吻合的方法重建胆道^[5-7].其优点是手术简单易行;避免切开肠道,防止继发感染;保留了胆道括约肌的功能,符合生理重建;置"T"管引流可观察胆汁,以便术后了解移植肝功能.本组24例肝移植均采用此法,收到了较好的效果.

胆管端端吻合成功的关键主要有二.一方面,对供受体胆管血供的保护,尽量减少对胆管分离.胆管的血供是胆道重建技术改进的基础,胆管缺血可导致术后胆漏和胆道狭窄.胆道的动脉血供的研究以往已有报道,胆管的表面有很好的动脉血管网,一旦切断肝管,则移植肝上肝管就失去了来自胆总管血管网的血供和来自尾状叶的血供.移植肝肝管的血供主要来自肝动脉分支倒流的血供.因此在行供体手术时,不要靠胆管壁太近分离胆管,尽量保留Glisson氏鞘,以免损伤肝管的血管网;不要分离肝动脉分支和肝管之间的间隙;可保留肝管表面的部分肝组织,从而保留血供和静脉回流.受体手术时同样应减少对胆管的分离,尤其要保护胆管3点和9点位置向上走向的血管分支.理论上可选择受体胆管的任何位置进行吻合,但如受体胆总管太长可能末端的血供不好.我们选择胆管吻合的位置取决于:供肝肝管口径的大小和受体胆管切缘的血供.有研究表明^[8-9]:移植肝胆管越短,越有助于术后胆管血供的形成,防止术后胆漏和胆管狭窄的形成.另一个重要的方面,是移植肝血供的建立.肝动脉的吻合技术和肝静脉重建的方式不仅会直接导致胆管的并发症,而且可导致患者的死亡或移植植物功能丧失.早期可能会出现此类并发症,本组2例胆道并发症均是由于血管并发症所致.我们自采用显微外科技术行肝动脉吻合和改良的肝静脉重建技术后,大大减少了血管并发症的发生^[10-11].

临床研究表明,移植后胆道并发症与手术的方式和吻合口的多少直接相关^[3],因此选择适当的位置切断肝管,尽可能获得单一的吻合口相当重要.是否获得单一的肝管主要取决于肝管的解剖变异和选择的切面.肝内胆管的变异较多,特别是右肝管,右前肝管和右后肝管常常分叉较早,右肝管主干长度小于1 cm约占25.2%,或是三分叉(11.2%),甚至右后肝管从左肝管分出(2.55-37.4%)^[12].这种情况要获得单一开口的肝管非常困难,或者是不可能.从供体的安全考虑,如果太靠近分叉则容易损伤左肝管和胆总管,因此肝管的切面应稍远离胆管分叉,这样就很容易导致移植肝上2个或2个以上的肝管开口.我们的经验是根据术中胆道造影,选择合适的胆管切面.但因为术中造影是二维的,因此有时仍很难判断胆管的分叉和起源,我们借鉴香港大学的方法^[13],将X线球管旋转30度,

进一步辨清每一段胆管的分支和走向情况.特别是第7段的肝管可能来自于左肝管,尾状叶的肝管可能从胆管分叉的后方分出.

胆管的成形技术也是一个重要的技术改进,虽然术中尽量避免多个胆管开口,但仍有遇到2支肝管的可能.对这种情况,如肝管相距较远,大多数中心是采用Roux-en-Y行胆肠吻合.本组采用一支肝管开口直接与受体肝总管吻合,另一个肝管开口与胆总管行端侧吻合或与胆囊管吻合.也有报道可以分别与受体的左右肝管吻合.这要根据术中情况而定.如肝管相距较近,许多中心采用胆管直接成形的方法将之成形为一个吻合口^[13],如成形时发现肝管管腔的缩小,且张力大,常采用纵切横缝的方法扩大吻合口.目前尚无研究表明间断缝合和连续缝合的术后并发症的差异.根据情况我们也选择缝合的方法:如胆管直径大于5 cm,可采用后壁连续缝合前壁间断缝合的方法;如胆管直径小于5 cm,则采用间断缝合的方法吻合胆管,将线节打在胆管壁外.本组均采用6-0可吸收缝线(PDS)间断缝合.总之,要建立一个良好的胆道吻合需考虑吻合口的血供,吻合口的张力等.

是否应用T管引流也是一个争论性的话题,Scotton *et al*^[14]报道采用T管组的并发症较低,但最常见的并发症是拔T管后的胆漏.Ishiko *et al*^[15]报道采用支架管组的术后吻合口狭窄的发生率小于不用支撑管组;进一步研究表明,拔除支架管后胆漏的发生率仅为3%.本组采用T管支撑,未出现胆道狭窄并发症,可能的原因是我们直接从吻合口牵出T管.事实上我们只吻合了2/3周的胆管,是否这种情形发生胆管狭窄的可能较低,尚需进一步的观察.另外置支架管可以观察到胆汁的质量、性状和量,以便进一步判断移植物的功能.现在很多中心已采用不放置T管的端端吻合,有待进一步的临床随机化研究.

处理活体肝移植中胆漏是很困难的.既往亦鲜有这方面的报道.许多医师选择再次行吻合术,但问题是手术的时间很难掌握.另外,腹腔置管引流可成功地控制胆漏;但这也不能完全控制,因为引流管仍有可能堵塞和滑出.对于胆管狭窄的患者,有报道表明活体肝移植术后胆道吻合口狭窄引起胆道梗阻时,肝内胆管常常不扩张,其原因目前尚未明了,可能是热缺血损伤胆管壁的缘故.因为肝内胆管不扩张,故行经皮穿刺胆管引流很困难,且很容易损伤门静脉和肝动脉^[13].因此对这类患者术前最好不采用经皮穿刺胆管引流,而是采用术中B超,很容易找到肝门部的肝管.随着外科技术的改进,胆道并发症的发生率已明显降低,但并发症的发生率远未降低到零,仍须进一步研究导致并发症的发生因素.

4 参考文献

- 1 Miller CM, Gondolesi GE, Florman S, Matsumoto C, Munoz L, Yoshizumi T, Artis T, Fishbein TM, Sheiner PA, Kim-Schluger L, Schiano T, Shneider BL, Emre S, Schwartz ME.

- One hundred nine living donor liver transplants in adults and children: a single-center experience. *Ann Surg* 2001;234:301-311
- 2 Bak T, Wachs M, Trotter J, Everson G, Trouillot T, Kugelmas M, Steinberg T, Kam I. Adult-to-adult living donor liver transplantation using right-lobe grafts: results and lessons learned from a single-center experience. *Liver Transpl* 2001;7:680-686
- 3 Egawa H, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Kiuchi T, Fujita S, Hayashi M, Matamoros MA, Ito K, Tanaka K. Biliary anastomotic complications in 400 living related liver transplantations. *World J Surg* 2001;25:1300-1307
- 4 Marcos A, Ham JM, Fisher RA, Olzinski AT, Posner MP. Single-center analysis of the first 40 adult-to-adult living donor liver transplants using the right lobe. *Liver Transpl* 2000;6:296-301
- 5 Testa G, Malago M, Valentin-Gamazo C, Lindell G, Broelsch CE. Biliary anastomosis in living related liver transplantation using the right liver lobe: techniques and complications. *Liver Transpl* 2000;6:710-714
- 6 Azoulay D, Marin-Hargreaves G, Castaing D, ReneAdam, Bismuth H. Duct-to-duct biliary anastomosis in living related liver transplantation: the Paul Brousse technique. *Arch Surg* 2001;136:1197-1200
- 7 Shokouh-Amiri MH, Grewal HP, Vera SR, Stratta RJ, Bagous W, Gaber AO. Duct-to-duct biliary reconstruction in right lobe adult living donor liver transplantation. *J Am Coll Surg* 2001;192:798-803
- 8 陈规划, 陆敏强, 何晓顺, 朱晓峰, 王国栋, 杨扬, 蔡常洁, 黄洁夫. 原位肝移植术后胆道并发症的预防与诊治. *中华外科杂志* 2003; 41: 3-5
- 9 Patkowski W, Nyckowski P, Zieniewicz K, Pawlak J, Michalowicz B, Kotulski M, Smoter P, Grodzicki M, Skwarek A, Ziolkowski J, Oldakowska-Jedynak U, Niewczas M, Paczek L, Krawczyk M. Biliary tract complications following liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35: 2316-2317
- 10 李相成, 王学浩, 张峰, 钱建民, 孔连宝, 张浩, 孙倍成, 王科, 成峰, 李国强. 显微外科技术在肝移植动脉重建中的应用. *中华外科杂志* 2002; 40: 205-207
- 11 王学浩, 李相成, 张峰, 钱建民, 李国强, 孔连宝, 张浩, 成峰, 孙倍成. 活体肝移植的几点关键外科技术. *中华外科杂志* 2003; 41: 13-16
- 12 Huang TL, Cheng YF, Chen CL, Chen TY, Lee TY. Variants of the bile ducts: clinical application in the potential donor of living-related hepatic transplantation. *Transplant Proc* 1996;28:1669-1670
- 13 Fan ST, Lo CM, Liu CL, Tso WK, Wong J. Biliary reconstruction and complications of right lobe live donor liver transplantation. *Ann Surg* 2002;236:676-683
- 14 Scatton O, Meunier B, Cherqui D, Boillot O, Sauvanet A, Boudjema K, Launois B, Fagniez PL, Belghiti J, Wolff P, Houssin D, Soubrane O. Randomized trial of choledochoch oledochostomy with or without a T tube in orthotopic liver transplantation. *Ann Surg* 2001;233:432-437
- 15 Ishiko T, Egawa H, Kasahara M, Nakamura T, Oike F, Kaihara S, Kiuchi T, Uemoto S, Inomata Y, Tanaka K. Duct-to-duct biliary reconstruction in living donor liver transplantation utilizing right lobe graft. *Ann Surg* 2002;236:235-240

电编 李琪 编辑 菅鑫妍 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》发表文章配发内容通知

本刊讯 从2006年开始,《世界华人消化杂志》将对述评、食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、基础研究、临床研究、前沿综述、研究快报、临床经验等主要栏目,每篇文章配发以下内容,请广大作者投稿前将以下内容补上。

(1) 背景资料: 简要、精确概括此文的相关背景,使读者更广泛的了解文章的相关知识,更深入的理解文章的意义。(2) 研发前沿: 简要介绍此文研究领域中的研究热点、重点。(3) 相关报道: 为了方便读者对您文章有更深入的理解,或得到更系统,详实的相关知识,请您提供与您文章有关的其他发表的研究报道的文章出处、链接等,以方便读者进行更广泛的阅读。(4) 创新盘点: 总结、提炼此文与其他相关或类似文章、报道的不同点以及创新之处,以方便读者比较,并有重点的阅读您的文章。(5) 应用要点: 总结此文在实际应用中的价值,或对应用的指导、改进作用,以及在将来应用中的前景。(6) 名词解释: 将文章中出现的,对文章的理解有重要意义,而大部分读者可能不太熟悉,或理解的不是很全面、准确,或者这些词在此文中的意思异于他处的名词给予简单、直白、明了的解释说明。(7) 同行评论: 编辑部将同行评议时审稿专家的意见中最能概括文章特点、价值、意义的词语、句子进行概括总结,使读者可以对文章有个比较客观的认识。以上各项表达用通俗易懂的1-3句话描述。(世界胃肠病学杂志社 2005-11-05)

脾脏原发类癌1例

张艺军, 李亚南, 陈晓清, 余中逊, 张晓峰, 毕向军, 肖丽萍

张艺军, 李亚南, 陈晓清, 余中逊, 张晓峰, 毕向军, 肖丽萍, 广州军区广州总医院老年二科 广东省广州市 510010
通讯作者: 张艺军, 510010, 广东省广州市流花路111号, 广州军区广州总医院老年二科.
电话: 020-36653497
收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2005-09-30

摘要

脾脏类癌肝转移患者1例, 经手术探查, 脾脏切除后病理检测确诊; 术后行全身PET-CT, 胃肠镜检查, 腹部核磁共振扫描复查. 脾脏类癌十分罕见, 生长缓慢, 病程长, 预后好; 但发生转移的类癌恶性程度高, 预后极差. 因此, 提高其早期诊断率, 对改善患者预后将十分有益.

关键词: 脾脏类癌

张艺军, 李亚南, 陈晓清, 余中逊, 张晓峰, 毕向军, 肖丽萍. 脾脏原发类癌1例. 世界华人消化杂志 2005;(21):2634-2635
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2634.asp>

0 引言

类癌属于神经内分泌肿瘤, 是一种低度恶性、生长缓慢的肿瘤, 主要发生于胃肠道. 脾脏类癌非常罕见, 迄今国内外仅见2例报道^[1,2].

1 病例报告

患者, 男, 63岁. 因发现脾脏占位6 a, 伴进行性长大1 a, 发现肝脏占位1 mo, 于2005-04-06入院. 患者自1999/2004每年行腹部B超检查, 均发现脾脏一高回声光团, 约75 mm×53 mm, 包绕脾血管周围, 考虑为"脾脏血管瘤", 未予任何治疗. 2005-03复查腹部B超见脾脏一95 mm×60 mm高回声光团, 边界清, 呈分叶状, 内部回声欠均匀, 包绕脾血管周; 肝脏右后叶一低回声光团, 约61 mm×50 mm. 复查腹部CT见脾脏多个低密度肿块影, 总体大小约95 mm×60 mm, 肝脏占位约35 mm×45 mm. 患者自患病以来无发热、腹痛、腹胀或腹泻, 无恶心、呕吐、黄疸、纳差、消瘦, 无咳嗽、气喘、头昏、头痛等不适. 入院后查肝功能正常, 查血AFP、CEA、CA19-9、CA125均正常. 患者有糖尿病病史10 a, 一直口服降糖药, 血糖控制尚可. 入院诊断"(1) 脾脏占位性质待查: 恶性淋巴瘤? (2) 肝脏占位性质待查: 转移性肿瘤? (3) 糖尿病". 于2005-04-11在我院行脾脏切除术. 术中探查见: 腹腔无积液, 大网膜无异常结节. 肝脏稍肿大, 质韧, 色淡红, 未见异常硬化结节, 肝右叶内可触及一肿物. 脾脏轻度肿大, 质较硬, 色暗红, 近脾门有一直径约5 cm肿物, 质硬, 侵

及脾蒂. 胃肠未见明显异常. 胰腺未见转移结节. 手术切除脾脏. 术后病理检查结果显示: 瘤细胞中等大小, 胞浆清亮; 核圆、染色质靠边, 核仁不明显; 核分裂相易见; 小灶状坏死和凋亡. 免疫组织化学结果: CK、Syn、CD99均为阳性, LCA、CD3、CD20、CgA、S-100、EMA、Myogenin、SMA、AFP以及Vimentin皆为阴性. 病理诊断"非典型类癌, 分化中等". 术后修正诊断 "(1) 脾脏类癌伴肝转移; (2) 糖尿病". 术后行全身PET-CT检查结果显示: 脾脏缺如; 肝右后叶一低密度影, 并未见高代谢灶, 其余未见明显异常. 胃肠镜检查未见明显异常. 2005-05-11行肝转移灶局部光子刀治疗1疗程. 因患者不愿继续治疗, 于2005-06-10自动出院, 继续观察. 2005-09-07患者无明显不适, 复查肝功能正常, 血AFP及CEA均正常. 行腹部核磁共振扫描复查发现: 肝脏多发占位性病变, 最大病灶直径为6.1 mm×5.9 mm. 考虑患者病情进展, 再次住院治疗.

2 讨论

类癌是一种可发生于全身多种器官的神经内分泌肿瘤, 尤以胃肠道常见, 并占全部类癌的85%, 脾脏类癌罕见. 一般认为, 类癌生长缓慢, 很少发生转移, 预后较好. 但一旦出现转移, 其预后极差. 该患者由于一直缺乏典型的类癌综合征的表现, 且长时间的腹部B超随访, 均提示脾脏包块生长缓慢, 被误诊为"脾脏血管瘤", 继续观察随访. 直至近期发现肝转移病灶, 仍被误诊为"脾脏淋巴瘤, 伴肝脏浸润". 最后经手术探查, 并切除病灶, 病理检测才得以确诊. 此外, 因患者不愿接受半肝切除的治疗方案, 以致于在原发灶切除3 mo后, 肝转移灶迅速发展增多累及左右肝叶, 病情进展难以控制, 再次失去了好的治疗时机. 由此可见, 类癌生长缓慢, 早期应视为良性肿瘤, 但具潜在恶性. 一旦发生转移, 肿瘤则迅速进展, 表现出恶性肿瘤的生物学行为. 因此, 对于转移病灶我们认为仍应尽可能地予以切除, 有望控制病情. 据有关资料报道, 当类癌合并肝转移时, 应首选手术. 手术切除范围包括原发灶和转移灶, 无论转移灶能否去除, 均应争取切除. 对于已施行治愈性肝脏切除的患者, 其5 a生存率明显高于姑息性肝切除者. 因此, 对于集中在一叶的病灶应尽可能切除, 可获根治性效果. 对于病灶多发、且病灶较大不能切除者, 可以采用生长抑素、化疗、免疫佐剂等综合性治疗^[3,4]. 目前, 认为影响患者预后的因素主要有: (1) 肿瘤的直径大小. 若瘤径大于2 cm者, 转移率高, 预后也较差^[5]. (2) 肿瘤发生的部位. 如在胃肠道类癌中, 其5 a生存率从高到低依次为: 直肠、阑尾、小肠^[6]. (3) 肿瘤局部侵袭和

转移情况. 出现转移者, 预后均较差. (4)手术治疗的效果. 已经对原发和转移病灶行根治性清除者预后较好. (5)有类癌综合征表现者, 一般预后较差.

3 参考文献

- 1 Hsiao CW, Yu JC, Yu CY. Carcinoid tumor of the spleen: report of a case. *Surg Today* 2001;31:1107-1109
- 2 Ng JW, Liu KW, Mak KO. Carcinoid tumour of the spleen.

Aust N Z J Surg 1999;69:70-72

- 3 钱明富. 类癌肝转移手术治疗的效果. 国外医学外科学分册 2001;5:308
- 4 Sutcliffe R, Maguire D, Ramage J. Management of neuroendocrine liver metastases. *AM J Surg* 2004;187:39-46
- 5 Koura AN, Giacco GG, Curley SA. Carcinoid tumors of the rectum: effect of size, histopathology, and surgical treatment on metastasis free survival. *Cancer* 1997;79:1294-1298
- 6 Modlon IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13, 715 carcinoid tumors. *Cancer* 2003;97:934-959

电编 张勇 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 •

消化道肿瘤外科治疗 2006 年高级论坛征文通知

本刊讯 《中华胃肠外科杂志》与浙江省人民医院定于2006-04-21/25在杭州共同举办“消化道肿瘤外科治疗专题”高级论坛, 主要探讨消化道肿瘤手术治疗的有关问题, 包括不同术式的选择及手术的规范化问题、腹腔镜下进行各种手术的选择及相关问题. 为活跃学术论坛, 促进消化道肿瘤外科治疗的发展, 特向广大普外科工作者征稿.

1 会议具体内容

论坛的具体内容包括: (1)肝移植手术适应证及相关问题(黄洁夫主讲); (2)肝胆系统肿瘤手术的选择(郑树森主讲); (3)消化系统肿瘤的综合治疗(樊代明主讲); (4)胰腺肿瘤外科治疗进展(赵玉沛主讲); (5)胃癌的根治性手术(詹文华主讲); (6)腹腔镜下的胃癌根治术(余佩武主讲); (7)胃癌腹膜转移的外科治疗(朱正纲主讲); (8)低位直肠癌的保肛手术(汪建平主讲); (9)腹腔镜下的结直肠癌手术(郑民华主讲); (10)规范的TME手术及相关问题(顾晋主讲); (11)胃癌外科治疗的新进展(叶再元主讲).

2 征文要求

内容应与消化道肿瘤(以胃肠道为主)外科治疗有关. 采用word文档格式, 字数3500字符左右, 摘要500字左右(宋体、小四号).

3 文章投送形式

分两种: (1)电子邮件投稿: 将征文以附件形式提交, 注明“消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛”征文, 文件名为会议名称加第一作者姓名; 电子信箱: zhwcwk@21cn.com. (2)邮寄: 打印稿用A4纸(附软盘), 软盘请注明研讨题目、作者.

4 联系地址及截稿

截稿日期: 2006-01-31(以当地邮戳为准). 联系地址: 广州市中山二路58号(510080)中山大学附属第一医院《中华胃肠外科杂志》编辑部一室; 电话: 020-87335945.

• 致谢 •

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!

蔡淦 教授
上海中医药大学附属曙光医院

陈立波 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院外科

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

董蕾 教授
西安交通大学第二医院消化内科

房殿春 教授
第三军医大学西南医院消化内科

侯晓华 教授
华中科技大学同济医学院协和医院消化内科

胡以平 教授
上海第二军医大学细胞生物学教研室

黄恒青 副主任医师
福建省第二人民医院

来茂德 教授
浙江大学医学院病理学教研室

劳绍贤 教授
广州中医药大学

李岩 教授
沈阳中国医科大学第二临床学院消化内科

刘连新 教授
哈尔滨医科大学附属第一医院普通外科

刘正稳 教授
西安交通大学第一医院

吕宾 主任医师
浙江中医院附属医院

罗和生 教授
武汉大学人民医院消化内科

聂青和 副教授
第四军医大学唐都医院感染科全军感染病治疗中心

钱会南 副教授
北京中医药大学

秦环龙 副教授
上海交通大学附属第六人民医院

王苑本 教授
中国人民解放军二七一医院消化内科

吴育连 教授
浙江大学附属第二医院普外科

徐德忠 教授
西安第四军医大学流行病学教研室

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院 (东部) 肝二科

许玲 副教授
第二军医大学长征医院中医科

姚希贤 教授
河北医科大学附属第二医院消化内科

于颖彦 教授
上海第二医科大学附属瑞金医院消化外科研究所

张吉翔 教授
江西医学院第二附属医院

张万岱 教授
第一军医大学南方医院全军消化内科研究所

周丁华 副教授
解放军二炮总医院

周士胜 教授
大连大学医学院医学研究中心

周总光 教授
四川大学华西医院普外科三科