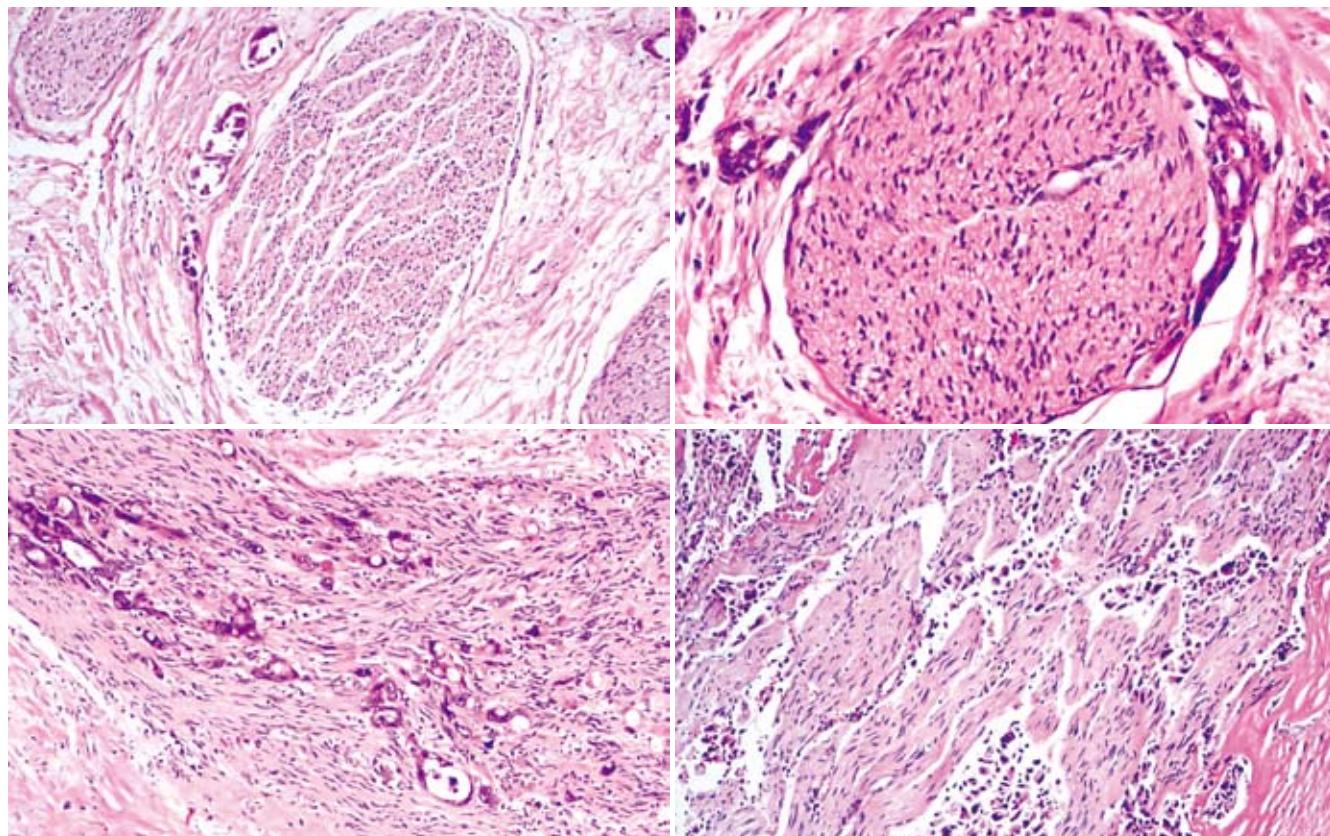


世界华人消化杂志[®]

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008年2月8日 第16卷 第4期 (Volume 16 Number 4)



4 / 2008

名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

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

世界华人消化杂志[®]

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问	陈卫昌教授	马金城教授	张吉翔教授	谷俊朝主任医师
陈可冀教授	陈贻胜教授	马欣主任医师	张集昌主任医师	顾岩教授
黄象谦教授	陈玉林教授	毛高平主任医师	张军教授	郭克建教授
黄志强教授	程斌副教授	倪润洲教授	张小晋主任医师	韩天权教授
裘法祖教授	迟宝荣教授	欧希龙副教授	张晓岚教授	郝纯毅主任医师
王宝恩教授	邓长生教授	潘秀珍教授	张筱茵副教授	何超教授
危北海研究员	丁士刚主任医师	朴熙绪主任医师	张志坚教授	何生教授
吴孟超教授	董蕾教授	朴云峰教授	赵晓晏教授	何裕隆教授
杨春波教授	杜雅菊主任医师	秦成勇教授	郑鹏远教授	何振平教授
周殿元教授	樊晓明主任医师	曲智威副主任医师	智发朝教授	黄志勇副教授
	房静远教授	任粉玉副教授	周国雄主任医师	季加孚教授
名誉总编辑	冯红主任医师	任建林教授	朱春兰主任医师	姜波健教授
潘伯荣教授	冯志杰主任医师	邵先玉教授	朱人敏教授	蒋龙元副教授
社长/总编辑	傅春彬主任医师	沈琳主任医师		兰平教授
马连生教授	高峰副教授	沈守荣教授	消化外科学	黎乐群教授
	戈之铮教授	沈薇教授	别平教授	李国威教授
副总编辑	关晓辉主任医师	施瑞华教授	蔡开琳副教授	李华山副主任医师
房殿春教授	关玉盘教授	宋于刚教授	蔡三军主任医师	李靖副教授
纪小龙教授	郭晓钟教授	孙富强副教授	曹杰主任医师	李奇林教授
姜洪池教授	郭新宁教授	孙侃教授	陈光教授	李胜研究员
王苑本教授	洪天配教授	唐采白副教授	陈海龙教授	李涛主治医师
吴云林教授	侯晓华教授	唐芙蓉教授	陈积圣教授	李小荣教授
徐克成教授	胡伏莲教授	唐丽安教授	陈建荣副教授	李旭副教授
杨思凤教授	胡和平主任医师	田德安主任医师	陈克能主任医师	李志霞教授
姚希贤教授	黄晓东副主任医师	童强主任医师	陈力教授	李宗芳教授
岳茂兴教授	黄颖秋教授	王邦茂教授	陈立波副教授	梁建教授
张万岱教授	黄裕新教授	王炳元教授	陈凛教授	林胜璋副教授
周学文教授	霍丽娟主任医师	王承党副教授	陈强谱教授	刘建教授
	季国忠副教授	王吉耀教授	陈亚军主任医师	刘颖斌副教授
常务编委	姜春萌教授	王莉瑛教授	陈知水教授	刘志苏教授
成军教授	姜慧卿教授	王晓艳副教授	陈祖林副教授	刘作金副教授
程英升副教授	金懋林教授	闻勤生教授	程爱国教授	卢实春教授
范学工教授	金瑞教授	吴萍主任医师	程爱群主任医师	陆才德教授
高毅主任医师	蓝宇教授	徐秀英副教授	程树群副教授	陆云飞教授
江学良主任医师	李定国教授	许春舫主任医师	迟强教授	禄韶英主治医师
李岩教授	李继强教授	许乐主任医师	仇毓东副教授	吕明德教授
刘连新教授	李淑德教授	许亚平副教授	崔彦教授	吕云福教授
吕宾教授	李晓宇主任医师	杨冬华教授	崔云甫教授	梅铭惠教授
罗和生教授	李延青教授	杨建民教授	代文杰教授	彭波副教授
聂青和教授	李瑜元教授	杨希山教授	戴朝六教授	彭吉润主任医师
王小众教授	李玉民教授	杨幼林主任医师	戴冬秋教授	彭心宇教授
	李玉明教授	杨云生教授	丁义涛教授	彭志海教授
编委	李兆申教授	杨昭徐教授	董明教授	钱建民教授
消化内科学	林志辉教授	姚树坤教授	房林副教授	乔岐禄主任医师
白爱平副教授	刘冰熔教授	叶红军主任医师	傅红副教授	秦春宏副主任医师
白文元教授	刘改芳主任医师	于红刚副教授	傅华群教授	秦华东教授
苌新明教授	刘海林主任医师	于晓峰主任医师	傅志仁主任医师	秦环龙教授
陈洪副教授	刘铁夫教授	袁伟建教授	高成新教授	秦仁义教授
陈尼维主任医师	刘占举教授	展玉涛副主任医师	葛海燕教授	邱宝安主任医师
陈其奎教授	陆伦根教授	张方信主任医师	龚建平教授	邱双健副教授
	吕志武教授	张国梁主任医师	巩鹏副教授	

世界华人消化杂志[®]

编辑委员会

邱伟华副主任医师	徐智教授	钱林学主任医师	消化肿瘤学	高峰教授
裘正军教授	许戈良教授	秦波教授	白玉贤教授	高英堂研究员
任建安教授	严律南教授	石统东副教授	曹秀峰主任医师	管冬元副教授
荣大庆教授	严以群主任医师	孙殿兴主任医师	曹志成院士	黄文林教授
邵成浩讲师	杨广顺教授	谭德明教授	陈公琰主任医师	李东辉教授
邵永孚教授	杨维良教授	唐霓副研究员	李瑗教授	李杰副教授
沈柏用副教授	杨尹默教授	唐世刚教授	刘宝瑞教授	李永哲副研究员
沈世强教授	伊力亚尔·夏合丁教授	唐晓鹏教授	刘彬彬副研究员	李增山副教授
沈岩主任医师	殷正丰教授	王凯教授	刘云鹏教授	梅林教授
师英强博士	于聪慧教授	王怡主任医师	马力文主任医师	彭曦副研究员
施诚仁教授	于恩达教授	魏来教授	吴晴教授	钱睿哲教授
宋世兵主任医师	于健春教授	吴建国教授	熊斌教授	任超世研究员
宋振顺教授	于良副教授	吴君主任医师	张凤春教授	孙秀发教授
孙诚信教授	于则利教授	谢青教授		谭学瑞教授
孙家邦教授	郁宝铭教授	徐小元教授	消化影像学	屠红副研究员
孙学英教授	郁正亚副教授	宣世英教授	程红岩教授	汪思应教授
孙延平副主任医师	曾勇教授	闫惠平研究员	韩新巍教授	吴晓东教授
邵升副教授	张柏和教授	杨林副研究员	黄金华副教授	夏建川研究员
谭群友副教授	张群华教授	姚鹏副教授	匡安仁教授	徐存拴教授
汤恢煥教授	张水军教授	张继明教授	李健丁教授	徐德忠教授
汤展宏副教授	张肇达教授	张明辉副主任医师	鲁华玉研究员	徐宁志研究员
唐文皓副主任医师	张宗明教授	张绪清副教授	魏经国教授	徐迎新研究员
田素礼教授	赵增仁副主任医师	张占卿主任医师	肖恩华教授	许文燮教授
田晓峰教授	郑民华教授	赵桂鸣主任医师	徐爱民副教授	姚登福教授
万德森教授	钟德卉教授	赵桂珍教授	杨建勇教授	阴赪宏研究员
汪波副主任医师	周丁华主任医师	赵连三教授		喻荣彬副教授
汪根树副教授	周伟平教授	周伯平教授	消化内镜学	张青云研究员
王春友教授	朱立元教授	周文兴教授	崔毅主任医师	张学教授
王凤山副教授	邹小明教授	周霞秋教授	丁佑铭教授	赵平副教授
王广义教授		朱传武副主任医师	范志宁主任医师	周士胜教授
王济明教授	消化感染病学	庄林主任医师	郝俊鸣副主任医师	周晓东研究员
王健生副教授	陈国凤主任医师		潘林娜教授	周晓武副主任医师
王烈主任医师	陈红松副研究员	消化中医学	沈俊教授	左国营副主任药师
王鲁副教授	陈建杰教授	蔡淦教授	孙明军教授	
王蒙副教授	陈仕珠主任医师	陈治水主任医师	万军教授	
王石林主任医师	陈耀凯副教授	杜群副研究员		消化病理学
王文跃主任医师	党双锁副教授	黄恒青主任医师	杜祥教授	
王效民教授	丁惠国教授	劳绍贤教授	刘勇钢副主任医师	
王振宁教授	范建高教授	李军祥教授	吕宁主任医师	
王正康教授	范小玲主任医师	李勇副教授	茅爱武主任医师	
王志刚副主任医师	高润平教授	李振华教授	吴硕东教授	
王忠裕教授	高泽立副教授	刘成海研究员	袁友红副教授	
卫洪波教授	龚国忠教授	刘平教授	郑加生主任医师	
吴德全教授	管世鹤副教授	刘绍能主任医师	消化中西医结合学	
吴河水教授	郝春秋副教授	龙致贤教授	崔乃强教授	
吴健雄教授	何生松教授	牛建昭教授	李方儒教授	
吴金术教授	江家骥教授	沈洪教授	刘鲁明教授	
吴泰璜教授	李智伟教授	唐旭东主任医师	唐文富主治医师	
吴志勇教授	林菊生教授	唐志鹏研究员	王学美研究员	
席启主任医师	刘杞教授	王新月教授	消化基础研究	
谢敏主任医师	刘正稳教授	徐列明教授	曹洁副教授	
谢晓华副教授	孟庆华教授	许玲副教授	樊红副教授	
邢光明教授	宁琴教授	张声生教授	高春芳研究员	
徐大华主任医师	牛俊奇教授			

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2008 年 2 月 8 日 第 16 卷 第 4 期 (总第228期)

述 评	343 高脂血症性急性胰腺炎的发病机制及诊疗进展 孙诚谊, 潘耀振
基础研究	350 ARIP2蛋白在小鼠肝细胞中的表达及其生物学作用 张红军, 柳忠辉, 陈芳芳, 马迪, 周静, 台桂香 356 茶多酚对酒精性肝病大鼠TNF- α 及肝细胞的影响 李芬, 管小琴, 刘利 361 TLR2在大鼠急性坏死性胰腺炎中末端回肠的表达及意义 马继民, 崔杰, 杨志军 366 小肠CT造影对比剂的优选 宋富珍, 程英升, 朱悦琦, 赵培荣, 赵俊功, 赵炳辉 372 PAF对肠上皮细胞紧密连接的影响及ITF的保护作用 许玲芬, 董亚珞, 孙梅, 马力, 毛志芹
临床研究	379 肝门部胆管癌神经浸润特征的临床病理学分析 李成刚, 黄志强, 韦立新, 董家鸿, 刘军桂, 王燕生
文献综述	385 急性胰腺炎肝损伤的发病机制和治疗 于洪海, 冯志杰 392 IL-23及其受体IL-23R与克罗恩病的关系 李媚, 高翔, 胡品津 399 炎症性肠病与免疫学关系研究进展 施华秀, 任建林, 董卫国 406 肝素酶: 肿瘤治疗的新靶标 田曙光, 高红伟, 常宏宇, 李素波, 王璇琳, 章扬培, 宫锋
研究快报	413 抗胃癌抗体重链可变区序列分析及空间结构模拟 杨丽娟, 侯颖春, 药立波, 苏成芝 417 注射用血栓通对肝星状细胞基因表达的影响 李国力, 魏红山, 邱爽, 曾辉 422 血红素氧化酶2在吗啡诱导的结肠慢传输型便秘小鼠结肠中的表达及意义 姜柳琴, 林琳, 张红杰, 胡晔东, 林征, 王美峰 426 Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b和HMT在不同结肠癌细胞系的表达及意义 翟荣林, 蔡开琳, 王国斌, 许飞, 田元, 张景辉
临床经验	431 血管内皮生长因子C(VEGF-C)与其受体VEGFR-3在食管鳞癌中的表达及其临床意义 刘鹏飞, 刘兵团, 沈卫东, 施瑞华, 朱宏 436 进展期胃癌化疗疗效的中国文献分析 曹妮达, 赵爱光, 朱莹杰, 杨金坤 443 含左氧氟沙星、雷贝拉唑的三联方案治疗幽门螺杆菌94例 张喜梅, 张振玉 446 肠胆反流与Oddi括约肌压力之间的关系 孙韶龙, 崔东旭, 戴显伟, 吴硕东, 许永庆 450 实时荧光定量PCR检测IL-8 mRNA在大肠癌的表达 周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林, 吴金民

会议纪要	454 《世界胃肠病学杂志》西安地区编委及作者读者座谈会纪要 李宗芳, 张澍
致 谢	456 致谢世界华人消化杂志编委
编读往来	378 党双锁编委 西安交大二院感染科
消 息	355 WJG 2007年1-12月份收稿及发稿数字统计结果 371 欢迎订阅2008年《世界华人消化杂志》 398 中国学术期刊综合引证报告(2007) 405 《世界华人消化杂志》简介 412 WCJD和WJG 2008年对同行评议将开始实行公开策略 416 WCJD和WJG 2008年对作者贡献分布将开始实行公开策略 421 WCJD 和WJG即将开始实行网络版文章与该文章发表前纪录的链接 425 世界华人消化杂志在线办公系统 430 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 435 世界华人消化杂志个性化服务订购活动 442 世界华人消化杂志的同行评价 445 世界华人消化杂志2007年1-12月份收稿及发稿数字统计结果 453 世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版 455 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知
封面故事	李成刚, 黄志强, 韦立新, 董家鸿, 刘军桂, 王燕生. 肝门部胆管癌神经浸润特征的临床病理学分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 379-384 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/379.asp
本期责任人	编务 江艳; 送审编辑 程剑侠; 组版编辑 何基才; 责任编辑 程剑侠; 英文编辑 王先林; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

<p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊) 创刊 1993-01-15 改刊 1998-01-25 出版 2008-02-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总编辑 马连生 常务副主编 张海宁 编辑部主任 张海宁 期刊名称 世界华人消化杂志 主管单位 山西省科学技术厅 主办单位 太原消化病研治中心</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>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)</p> <p>订购 全国各地邮电局 邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</p>
		2008年版权归世界华人消化杂志所有

World Chinese Journal of Digestology

February 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 4

EDITORIAL	343 Advances in pathogenesis of hyperlipidemic acute pancreatitis and its diagnosis and treatment <i>Sun CY, Pan YZ</i>
BASIC RESEARCH	350 Activin receptor-interacting protein 2 expression and its biological function in mouse hepatocytes <i>Zhang HJ, Liu ZH, Chen FF, Ma D, Zhou J, Tai GX</i> 356 Effect of tea polyphenols on TNF- α and hepatocytes in rats with alcoholic liver disease <i>Li F, Guan XQ, Liu L</i> 361 Expression of Toll-like receptor 2 in distal ileum of rats with acute necrotizing pancreatitis and its significance <i>Ma JM, Cui J, Yang ZJ</i> 366 Optimization of contrast agents for small intestine computed tomography enteroclysis <i>Song FZ, Cheng YS, Zhu YQ, Zhao PR, Zhao JG, Zhao BH</i> 372 Effect of platelet-activating factor on tight junction in intestinal epithelial cells and protective effect of intestinal trefoil factor <i>Xu LF, Dong YL, Sun M, Ma L, Mao ZQ</i>
CLINICAL RESEARCH	379 Clinical pathology of perineural invasion in hilar cholangiocarcinoma <i>Li CG, Huang ZQ, Wei LX, Dong JH, Liu JG, Wang YS</i>
REVIEW	385 Pathogenesis and treatment of acute pancreatitis with liver injury <i>Yu HH, Feng ZJ</i> 392 IL-23 and IL-23 receptor in Crohn's disease <i>Li M, Gao X, Hu PJ</i> 399 Advances in studies on relation between inflammatory bowel disease and immunity <i>Shi HX, Ren JL, Dong WG</i> 406 Heparanase: a novel target of tumor metastasis therapy <i>Tian SG, Gao HW, Chang HY, Li SB, Wang XL, Zhang YP, Gong F</i>
RAPID COMMUNICATION	413 Analysis of primary structure and modeling of spatial structure of heavy chain variable region of antibody against human gastric cancer <i>Yang LJ, Hou YC, Yao LB, Su CZ</i> 417 Effect of panax notoginseng saponins on gene expression of cultured human hepatic stellate cells <i>Li LG, Wei HS, Qiu S, Zeng H</i> 422 Expression of heme oxygenase-2 in mouse model of colon slow transit motility constipation induced by morphine and its significance <i>Jiang LQ, Lin L, Zhang HJ, Hu YD, Lin Z, Wang MF</i> 426 Expression of Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b and HMT in different colonic cancer cell lines and its significance <i>Zhai RL, Cai KL, Wang GB, Xu F, Tian Y, Zhang JH</i>
CLINICAL PRACTICE	431 Expression of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and its receptor VEGFR-3 in esophageal squamous carcinoma tissues and its clinical significance <i>Liu PF, Liu BT, Shen WD, Shi RH, Zhu H</i>

	<p>436 Chinese Reports on the effect and safety of systemic chemotherapy for advanced gastric cancer <i>Cao ND, Zhao AG, Zhu YJ, Yang JK</i></p> <p>443 Levofloxacin and rebeprazole-based triple regimen therapy for 94 cases of <i>Helicobacter pylori</i> infection <i>Zhang XM, Zhang ZY</i></p> <p>446 Relationship between duodenobiliary reflux and pressure of Oddi sphincter <i>Sun SL, Cui DX, Dai XW, Wu SD, Xu YQ</i></p> <p>450 Expression of interleukin-8 mRNA in patients with colorectal carcinoma detected by real-time quantitative PCR <i>Zhou WP, Fan QX, Fan KS, Wang RL, Wu JM</i></p>
MEETING MINUTES	454 Editors and readers in Xi'an <i>Zhang ZF, Zhang S</i>
ACKNOWLEDGMENT	456 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Li CG, Huang ZQ, Wei LX, Dong JH, Liu JG, Wang YS.</i> Clinical pathology of perineural invasion in hilar cholangiocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 379-384 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/379.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jian-Xia Cheng</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> Editor-in-Charge: <i>Jian-Xia Cheng</i> English Language Editor: <i>Xian-Lin Wang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date February 8, 2008

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

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

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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



述评 EDITORIAL

高脂血症性急性胰腺炎的发病机制及诊疗进展

孙诚谊, 潘耀振

孙诚谊, 潘耀振, 贵阳医学院附属医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550001
孙诚谊, 教授, 主要从事肝胆胰脾基础与临床.

作者贡献分布: 此课题由孙诚谊设计, 并由孙诚谊, 潘耀振共同收集资料及数据分析, 本文论写作由孙诚谊, 潘耀振完成.

通讯作者: 孙诚谊, 550001, 贵州省贵阳市, 贵医街28号, 贵阳医学院附属医院肝胆外科. chengyisun@medmail.com.cn

电话: 0851-6773083

收稿日期: 2007-05-14 修回日期: 2008-01-05

Advances in pathogenesis of hyperlipidemic acute pancreatitis and its diagnosis and treatment

Cheng-Yi Sun, Yao-Zhen Pan

Cheng-Yi Sun, Yao-Zhen Pan, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Correspondence to: Cheng-Yi Sun, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, 28 Guiyi Street, Guiyang 550001, Guizhou Province, China. chengyisun@medmail.com.cn

Received: 2007-05-14 Revised: 2008-01-05

Abstract

Hyperlipidemia is one of the causes for acute pancreatitis. Hyperlipidemic acute pancreatitis often occurs in patients with type I, V or IV hyperlipidemia. It results from chemical irritation to the pancreas and disturbance of pancreatic microcirculation due to the toxicity of free fatty acids released from massive triglycerides. When the serum triglyceride level is elevated, the incidence of complications may increase accordingly. However, serum amylase levels may be normal in serum of some patients or lightly elevated. The diagnosis of hyperlipidemic acute pancreatitis is mainly based on the clinical manifestations of acute pancreatitis and the serum triglyceride level. Therefore, hyperlipidemic acute pancreatitis patients are treated mainly by reducing their serum triglyceride level.

Key Words: Acute pancreatitis; Hyperlipidemia; Triglyceride; Diagnosis; Treatment

Sun CY, Pan YZ. Advances in pathogenesis of

hyperlipidemic acute pancreatitis and its diagnosis and treatment. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 343-349

摘要

高脂血症(HL)是急性胰腺炎(AP)的病因之一. 高脂血症性急性胰腺炎通常见于I型、V型或IV型HL患者. 而其发病机制主要是由于高水平甘油三酯(TG)分解的游离脂肪酸(FFA)对胰腺本身的毒性作用及其引起的胰腺微循环障碍, 并且随着血液中TG水平的升高, HL性AP的并发症发生率也会升高. 但部分HL性AP患者的血、尿淀粉酶水平可正常或稍增高. 目前, HL性AP的诊断主要依靠AP的临床表现以及血液中TG水平, 治疗上通常以降低血液中TG水平为主.

关键词: 急性胰腺炎; 高脂血症; 甘油三酯; 诊断; 治疗

孙诚谊, 潘耀振. 高脂血症性急性胰腺炎的发病机制及诊疗进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 343-349

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/343.asp>

0 引言

自从Klaskin(1952年)报告1例原发性高脂血症(hyperlipidaemia, HL)导致胰腺炎反复发作以后, 高脂血症与胰腺炎的相关性引起了人们的重视. 此后的临床资料也证明高脂血症是急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的危险因素之一, 他是继胆源性, 酒精性之后AP的常见病因, 急性胰腺炎与高脂血症的并存率约为12%-38%, 且常常在病程中导致或者加重^[1-2]. 过去在我国AP的发病原因中, 以胆道疾病为主, 占50%以上. 但是近年来随着生活水平的提高和饮食结构的改变, 高脂血症与AP的关系越来越引起人们的关注. 国外大样本资料表明, 高脂血症性AP占AP病例1.3%-3.8%^[3]. 我国台湾地区的多中心临床流行病学研究认为, 急性胰腺炎发病率升高, 且其中HL占急性胰腺炎全部病因的12.3%^[4]. 虽然国内外学者从基础到临床开展大量研究, 并且取得

背景资料
高脂血症为急性胰腺炎(AP)少见病因之一, 但随着我国人民生活水平的提高和饮食结构的改变, 高脂血症所致急性胰腺炎的发病率呈上升趋势, 其临床表现和治疗方法均有其不同的特点. 本文就高脂血症性急性胰腺炎的病因、发病机制、临床表现、诊断及治疗方面进行了系统阐述. 其重点在治疗方面, 强调早期进行降血脂治疗.

同行评议者
沈柏用, 副教授,
上海交通大学医学院附属瑞金医院微创外科

研发前沿

目前, 尚无法清楚地阐明高甘油三酯血症加重急性胰腺炎的确切发病机制。所以, HL性AP是一个较新的课题。其发病机制非常复杂, 这还将需要大量的临床研究和实验探索, 以了解其确切发病机制。诊断上期望能有更敏感的检测指标和更新的检查方法以早期确诊。其治疗应采取将降脂与其他多种有效手段相结合, 另外采取基因治疗以降低家族性高TG血症的血TG值有望成为研究的方向, 应用前景广阔。

了令人瞩目的成绩。但是, 目前高脂血症诱发和加重急性胰腺炎的确切发病机制尚不清楚。因此, 对于高脂血症性急性胰腺炎的及时诊断和合理治疗, 医务工作者仍面临着巨大的挑战。如何在现有条件下提高高脂血症性急性胰腺炎的早期诊断率, 加强合理的综合治疗, 改善预后, 需要我们高度重视并进一步努力。

1 高脂血症

高脂血症通常是指血浆总胆固醇(TC)和/或甘油三酯(TG)含量的增高。血中TG主要以乳糜微粒(CM)和极低密度脂蛋白(VLDL)形式存在。血浆TG有内、外源性两条生成途径, 正常情况下外源性途径是TG的主要来源。即食物中的TG在胃肠道水解、吸收, 形成富含TG的乳糜微粒(CM), 经过淋巴管进入静脉系统。内源性TG来自肝脏合成分泌的VLDL。乳糜微粒、VLDL与载脂蛋白C-II结合后在脂蛋白脂酶(LPL)的参与下进行脂质代谢。乳糜微粒通常在餐后1-3 h出现, 8 h后被清除, 当血浆TG水平达到1000 mg/dL时则可持续存在。HL分为5型。I型和V型的特点是显著的高TG血症, II型、III型、IV型表现为单纯的高TC血症或同时合并轻、中度高TG血症。临床报道I型、IV和V型HL发生AP最为多见^[5]。原发性HL常见于家族性LPL缺乏^[6]和家族性apo-CII缺乏^[7]。继发性HL主要原因为酗酒、糖尿病、肥胖、血吞噬综合征、高脂饮食、服用三苯氧胺、利尿剂等药物^[8-11]及妊娠^[12]。

2 高脂血症与急性胰腺炎

大量动物实验、临床研究表明高脂血症是急性胰腺炎的病因之一^[13], 但同时高脂血症也是急性胰腺炎代谢异常的表现。急性胰腺炎可引起一过性TG升高, Chikamune *et al*^[14]在实验性诱导犬胰腺炎后检测到血TG水平升高。分析其原因: (1)胰腺炎时, 全身应激, 血清儿茶酚胺、胰高血糖素、生长激素等脂解激素水平升高, 这些激素作用于脂肪细胞的激素敏感性脂酶, 使脂肪组织的TG分解。(2)应激时胰岛素分泌相对减少或出现胰岛素抵抗, 脂蛋白脂酶LPL活性依赖于胰岛素, 因而LPL的活性下降, 引起高TG, 同时卵磷脂酰基转移酶活性也下降, 对HDL表面的胆固醇不能酯化进入HDL核心, 使HDL水平下降。Hofbauce *et al*研究发现静脉注入去污剂Tritum WR1339导致内源性高TG血症, 能使蛙皮素诱导的鼠胰腺炎病理损害加重。

近十几年来, 在我国由于饮食结构的改变

和对高脂血症认识的加强, 高脂血症性(主要是高甘油三酯)胰腺炎已经成为AP的常见原因之一^[15]。据统计资料显示, 临幊上以甘油三酯升高为主的I, IV, V型高脂血症引起的急性胰腺炎最为常见。国外报道胰腺炎发生率在I型高脂血症为30%, IV型为15%, V型为27%-41%, 血清TG水平>26 mmol/L是AP发生的明确的危险因素, 此类胰腺炎称之为“高脂血症性胰腺炎”或“高三酰甘油血症性胰腺炎”^[16-18]。而且, 随着血浆甘油三酯水平的升高, 发生AP的危险性也迅速上升。

动物实验显示, 研究者从犬离体胰腺的肠系膜上动脉和门静脉注入甘油三酯、游离脂肪酸(FFA), 发现其胰腺的水肿、出血加重, 血淀粉酶也明显升高, 支持高脂血症引起AP和FFA对胰腺的损伤作用。Kimura *et al*^[19]分别采用蛙皮素、牛磺胆酸钠以及结扎胰管的方法建立大鼠的AP模型, 然后将病变的胰腺制成灌注模型, 用TG离体灌注, 发现血淀粉酶、脂肪酶明显增高, 说明甘油三酯可以加重不同病因诱发的AP。Mossner *et al*^[20]在同样的大鼠胰腺泡细胞培养液中加入脂肪酸, 胰腺泡细胞的损伤程度与脂肪酸作用的时间和浓度呈正比。

临床报道中I型和V型HL发生AP最为多见, 也有少数IV型患者发生AP。因此, AP的发生与高TG的关系更为密切。Cameron *et al*^[21]研究发现, 当血TG值>3.4-4.5 mmol/L, 且空腹血清呈乳状, 可能诱发AP。Hofbauce *et al*^[22]指出, 血TG值>10-20 mmol/L是AP发生的危险因素。Berger *et al*^[23]则认为, 血TG值>11.3 mmol/L就可以引起AP。

3 高脂血症性急性胰腺炎的可能机制

目前普遍认为, 高脂血症能导致AP发生, 其机制目前还不是很清楚。经过国内外许多学者的研究, 目前比较公认的高甘油三酯血症导致胰腺炎的机制如下。

3.1 TG分解产物对腺泡细胞的直接损伤 在正常情况下, FFA与白蛋白结合, 这种结合物对细胞没有毒性。如FFA产生过多, 超出自蛋白的结合能力, 胰腺内高浓度聚集的FFA就会产生组织毒性, 损伤胰腺泡细胞和小血管, 导致AP发生。FFA对胰腺泡细胞损伤的机制可能存在3种情况^[24]: FFA增多诱发酸中毒, 激活胰蛋白酶原, 导致腺泡细胞自身消化; 高浓度FFA可引起胰腺毛细血管内皮损伤, 导致胰腺微循环障碍; FFA通

过细胞膜脂质过氧化反应对细胞膜有毒性作用, 损伤胰腺腺泡细胞。

3.2 胰蛋白酶原激活加速 生理状况下, 胰蛋白酶原及溶酶体水解酶均由腺泡细胞粗面内质网合成, 被输送至高尔基复合体, 溶酶体水解酶再被输送至溶酶体, 而胰蛋白酶则被输送至浓缩泡进行浓缩, 最后浓缩的酶原与腔浆膜融合, 借助胞吐作用, 将酶原释放至胰导管内, 胰腺炎一旦发生, 由于某种尚不清楚的机制, 酶原向导管管腔释放受阻, 酶原与溶酶体水解酶形成大空泡, 酶原被水解酶激活, 引起腺细胞自身消化, 促使胰腺病理进一步进展^[25-26]。高TG血症时, 胰腺组织TG分解产物FFA增多, 腺泡细胞内pH下降, 在酸性环境, 溶酶体水解酶组织蛋白酶B活性增强, 胰蛋白酶原激活加速, 腺泡细胞自身消化及胰腺炎的病理损害加重。

3.3 胰腺微循环障碍 近年来, 胰腺微循环障碍在AP的发病及病程进展中的作用已成共识。(1)从解剖学角度分析: 胰腺小叶内中央动脉是唯一一支供应胰腺腺叶的动脉, 缺乏交通支, 一旦供血动脉因各种因素导致循环障碍, 就可诱发相应部位的AP发生。当血清TG>2.15 mmol/L时, 患者的血液黏滞度就增高, 高TG时, VII因子活性、血液和血浆黏滞度均上升, 并使纤溶酶原激活抑制物(PAI21)活性增高干扰纤溶, 易于形成血栓。(2)国外有报道将动物模型进行胰腺缺血再灌注后观察其血清淀粉酶与胰腺组织学改变, 发现试验组毛细血管与小血管内黏附的血小板数量显著增加, 毛细血管的血小板流动速率显著下降^[27]: 再灌注后胰腺组织显著水肿, 发生炎症反应: 毛细血管通透性的增加和内皮损伤是急性胰腺炎早期重要的病理现象, 血清TC、TG增高能诱发动脉粥样硬化, 使内皮细胞损伤, 从而使内皮合成与分泌前列环素(PGI2)减少。高脂血症时可激活血小板, 同时产生一种强烈的缩血管物质-血栓素A2(TXA2), 继而导致胰腺血液循环障碍。(3)长期HTG血症及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)可致动脉粥样硬化以及TG血症中大分子的乳糜微粒作用于毛细血管, 使原已狭窄的血管发生栓塞, 从而使胰腺缺血、坏死。

近年来有研究指出, 高脂饮食可以导致细胞膜和细胞器膜脂肪酸含量及其构成的比例发生变化, 因此影响信号传导过程, 引起细胞内钙的异常增加。而钙离子是细胞内重要的第二信使, 参与细胞内众多的生理功能和代谢过程, 包括

酶原激活、细胞凋亡。

又有实验发现, 分离高脂肪饮食的大鼠胰腺腺泡细胞, 再予CCK刺激后, 其细胞内Ca²⁺的上升高于正常细胞。细胞释放的淀粉酶、LDH也明显上升^[28]; 当给予不同浓度的棕榈酸刺激胰腺腺泡细胞, 细胞内Ca²⁺持续上升(主要来自于内质网), 而细胞内钙的上升已经被认为是细胞酶原激活的重要途径之一^[29]。

4 高脂血症性急性胰腺炎的临床特点

4.1 临床症状 高TG性急性胰腺炎临床症状与其他病因所致AP相似, 轻重程度不等, 反复发作, 并发症较多^[30-31]; 少数表现为暴发性; 部分高脂血症伴反复腹痛发作者, 可无胰腺炎的临床特征与实验室检查异常, 但按胰腺炎治疗, 可使腹痛缓解。个体肥胖, 或有家族肥胖史, 日常饮食不规律, 有暴饮暴食史。病后腹痛症状和腹膜炎体征不明显, 早期仅表现为腹胀痛、恶心、发热, 而中毒性休克在进展期出现。有学者认为胰腺有适应性分泌功能, 高血脂症状胰腺炎胰脂肪酶活性增高, 血清脂肪酶及FFA水平升高。FFA与血清钙结合可致低血钙, 手足抽搐。与非高TG血症性胰腺炎相比较: 肥胖、暴饮暴食、乳糜血、血尿淀粉酶正常, 早期低钙血症、低钠血症、低蛋白血症及横结肠中断征等临床征象出现频次高且明显。空腹高TG血症伴腹痛应想到原发性高TG血症性胰腺炎; 慢性饮酒、暴饮暴食后腹痛, 应想到伴发性高TG血症胰腺炎。

多数AP患者发病与血TG水平升高有关。当TG浓度达到11.3-22.6 mmol/L以上才会产生临床症状明显的AP。有学者研究发现, TG水平与AP病变程度存在着显著的相关性, TG水平升高, Ranson评分呈上升趋势, 表明高TG血症可导致或加重AP的病变。TG浓度达到22-55 mmol/L时可有轻微腹痛, 66 mmol/L以上有明显腹痛, 但也有个体反应差异。若TG极度增高, 则会出现剧烈腹痛, 发生暴发性AP, 甚至死亡。但亦有相反报道, 认为TG对AP可能只起触发作用, 而对AP的轻重不起决定性作用。起病初期TG值很高, 峰值均在起病后3 d内查出, 4-5 d内迅速降至安全水平(5.65 mmol/L)以下, 但仍高于正常上限, 且维持此水平15 d以上。有报道在此期间TG可能波动, 再次升至危险水平, 应提高警惕。

乳糜血清可在起病后3 d内查出, 4-5 d内消失。由于乳糜微粒在体内清除极快, 一般在禁食48-72 h后即可完全清除(亦有人认为禁食12-14

相关报道
王兴鹏, 曾锐 *et al* 的“高脂血症相关性胰腺炎发病机制的研究现状”, 通过动物实验详尽探讨了该疾病的发病机制。苏军凯, 李兆申 *et al* 的“血液净化治疗高脂血症性胰腺炎研究进展”在该疾病的治疗方面给予了详述。

应用要点

本文对高脂血症性急性胰腺炎的病因、发病机制、临床表现、诊断及治疗方面进行了详细的阐述，对该疾病的临床诊断与治疗有一定的指导意义。

h即可清除)，故AP患者入院时应立即检查血脂，或将血标本低温保存(4℃冰箱过夜后可在表面形成乳白奶油状层)备次日检测。

4.2 实验室检查 高TG性胰腺炎血尿淀粉酶可无明显升高(50%可正常)，这就给临床诊断造成一定困难。其原因可能是由于血浆中存在一种抑制血淀粉酶活性的因子，这种非脂类抑制因子还能通过肾脏进入尿液，抑制尿淀粉酶的活性。

4.3 影像学检查 超声检查简便易行，为AP首选影像学检查，通过对肝、胆的观察可排除胆源性胰腺炎。但AP患者多有明显肠胀气，影响检查致使诊断价值降低。如B超阴性疑为AP者均应行CT检查，CT可清楚显示胰腺形态，有无出血、坏死及囊肿形成，测定胰外炎症范围与手术对照有较高的符合率，尤其对重症胰腺炎的临床病理分类预测准确性高。因此，CT检查既可提高不典型病例的诊断率，又有助于对患者实施有效的治疗方案，以提高治愈率。

5 高脂血症性急性胰腺炎的临床诊断

高脂血症性AP的诊断主要依靠AP临床症状结合高脂血症而定。(1)SAP诊断标准参照中国急性胰腺炎诊治指南：具备AP的临床表现和生化改变，且Ranson评分 ≥ 3 ；CT分级D或E；APACHE II评分 ≥ 8 。(2)TG $>11.3 \text{ mmol/L}$ ，或TG值在5.65-11.3 mmol/L之间，但血清呈乳状，并且排除AP的其他致病因素如胆道结石、微结石、Oddi括约肌功能障碍、药物性AP、细菌病毒感染等。如同时存在高TG血症的继发性因素或其他家族性脂蛋白异常，有助于诊断。

6 高脂血症性急性胰腺炎的治疗

高脂血症性急性胰腺炎(HAP)既表现出AP的共性，又有其自身的特殊性。虽然HAP目前尚无统一、有效的治疗方案，但在规范化治疗AP的基础上，HAP治疗的关键是迅速降低血TG值^[23]。当血TG值降至5.65 mmol/L以下时，便可阻止HAP病情的进一步发展^[5]，其具体的治疗措施可归纳为：(1)常规AP治疗，包括禁饮食、胃肠减压、胰酶抑制剂、营养支持和抗感染治疗等。因为AP与HL互为因果，所以缓解HAP的临床症状便可阻断此恶性循环，抑制HAP的病程演进。HAP患者血液黏度增高，常导致胰腺微循环障碍，而胰腺微循环障碍是AP发病的始动因子与病情不断恶化的促进因子^[32]。因此，可常规静脉滴注丹参以改善胰腺微循环障碍从而减轻HAP临床症状。

(2)全胃肠外营养(TPN)。HAP患者实施TPN治疗时，脂肪乳剂的摄入应慎重：HAP发病72 h内绝对禁止静脉输入各种脂肪乳剂，防止血TG值进一步升高，加重胰腺病理损伤；当患者腹痛减轻，血TG值 $\leq 5.65 \text{ mmol/L}$ 而单纯静脉输注高糖补充能量难以控制血糖者，可输入短、中链脂肪乳剂，使之直接经门静脉代谢而不产生全血乳糜微粒^[33]；HAP后期，患者一般状态差而无法实施肠内营养时，若血TG值在1.7-3.4 mmol/L，在严格监测血脂条件下，可输入短、中链脂肪乳剂24 h量 $\leq 750 \text{ mL}$ ，长链脂肪乳剂24 h量 $\leq 250 \text{ mL}$ 。脂肪乳剂输入12 h后，若血TG值 $>5.65 \text{ mmol/L}$ ，应立即停用。脂肪乳剂使用过程中，应定期复查脂肪廓清试验，实验阳性者应及时停用。目前，对于高脂血症性 SAP脂肪乳的应用尚存争议，Asakura *et al*^[34]给原发性HTG患者100%中链甘油三酯饮食并不增加其血浆油三酯的浓度，但是患者血胆固醇水平显著升高。有个案报道1例反复发作AP的家族性高脂血症的女性患者在妊娠期间通过控制饮食和MCT支持治疗顺利渡过妊娠期^[35]。所以，HAP患者早期应用肠内营养不仅可以促进胃肠蠕动、保护肠黏膜屏障功能、防止肠道菌群易位，还可缓解因限制脂肪乳剂输入而导致机体能量不足的矛盾。(3)脂蛋白脂肪酶(LPL)是内、外源性脂肪代谢的关键酶，可水解极低密度脂蛋白中的TG和乳糜微粒，对血TG的清除起重要作用。大量临床研究证明，持续静脉滴注肝素和胰岛素能够激活LPL、加速乳糜微粒降解，显著降低血TG值，是治疗HAP的有效手段。Monga *et al*^[36]对1名HAP患者进行肝素、胰岛素联合治疗发现，血TG值降低且HAP症状明显缓解。Berger *et al*^[23]对5名HAP患者持续静脉滴注肝素和胰岛素，3 d后，5名患者血TG值 $<2.8 \text{ mmol/L}$ ，无并发症且全部存活。皮下注射低分子质量肝素亦可防止中性粒细胞激活，促进乳糜微粒降解，改善胰腺微循环障碍，降低血TG值。(4)血浆置换(PE)：血浆置换多用于重症高TG血症性胰腺炎。通过将患者血液在体外分离成血浆和血细胞成分，弃去血浆后再把细胞成分与血浆等量的置换液(冰冻血浆及白蛋白)一起回输体内，可去除血浆中的病理性物质，起到降低淀粉酶、降低血脂、去除炎症介质及免疫调控作用，有很好的治疗效果。PE的时机是此疗法的关键。PE越早，患者的预后也将更显著地得以改善^[37-38]。Furuya *et al*^[38]对1例HAP患者在发病后20 d实施PE，结果患者死于多器官衰竭。

和感染; 另1例HAP患者入院后迅速采取PE, 血TG值很快降到正常水平, 62 d后痊愈. Yeh *et al*^[39]对17例HAP患者实施单程和双程连续PE, 全组血TG、胆固醇、淀粉酶和脂肪酶值显著下降; 其中13例完全康复, 仅2例死于感染性休克和多器官衰竭. Yeh *et al*^[39]也比较了血浆置换和双重血液滤过2种方法对清除血脂的疗效, 经治疗后, TG和总胆固醇(TC)的平均血清浓度分别从51.40 mmol/L和11.35 mmol/L降至18.01 mmol/L和5.77 mmol/L, 血浆置换对胆固醇的清除率更高($P = 0.008$), 并且治疗期间溶血的发生率低($P = 0.403$).

Mao *et al*报道^[41], 通过4 L的血浆置换, TG可下降73%-82%, 血黏度下降50%, 胰腺炎可较快获得缓解. (5)血液滤过: 血液滤过是治疗HAP的有效手段^[42], 他可清除和调整循环内的炎症介质, 同时血滤器又能吸附TG, 故用于SAP早期(起病72 h内), 作为阻断炎症反应的主要有效治疗措施, 尤其是高脂血症性SAP的主要有效治疗措施之一. 由于TG会阻塞聚砜中空纤维而无法清除中分子质量物质, 所以对高脂血症胰腺炎必须多次更换血滤器(每1-2 h更换滤器, 约更换4-5次), 首先吸附血脂, 然后才可行血液滤过, 以提高细胞因子清除率. (6)中医中药: HL性AP患者多体态肥胖, 腹内压升高和膈肌抬高, 严重影响呼吸、循环功能, 易诱发急性呼吸窘迫综合征. 可采用皮硝全腹外敷等中医疗法协助腹腔内水肿吸收及患者排气、排便, 从而有效降低腹内压, 改善症状. 有作者提出, 除AP的常规治疗措施外, 加用“五联疗法”^[42][血液净化(血脂吸附与血液滤过)、降血脂药物、低分子质量肝素、胰岛素、全腹皮硝外敷]是治疗HL性AP的有效措施. 他们对32例重症急性胰腺炎患者除常规治疗措施外, 均加用“五联疗法”. 结果, 血液净化结束或发病后7 d内, 31例患者血清甘油三酯和TNF- α 及APACHE II评分较血液净化前显著降低; 而IL-10浓度在血液净化结束时显著升高, 发病后7 d则显著降低. 大部分HLP发作24-48 h后, 因禁食而吸收乳糜微粒到血中的途径被切断, HLP患者血TG水平迅速降低^[43]. 是否所有的HLP患者均需血液净化, 其费用以及疗效是否对患者更为有利, 都有待进一步研究. 另外, 血液净化治疗自身的问题同样困扰他治疗HLP. 首先是血滤对炎性介质是否有足够的清除作用? 如TNF- α 的生物活性形式是三聚体(分子质量52 000), 似乎不可能通过一般的滤过膜. 许

多临床研究结果也是相矛盾的. 其次血滤的清除作用是否总是对机体有益? 众所周知, 血滤的清除作用是非选择性的, 也就是说他既能清除促炎因子, 又能清除抗炎因子, 而促炎因子也并不总是对机体有害. 适当量的TNF- α 是机体抗感染所必需的, 只是在SIRS时, 过量的TNF- α 才对机体有害. 因此, 血滤的时机非常重要. 然而在疾病的不同阶段, 血液净化对促炎和抗炎因子的平衡作用还是难以预料. 其三是血液净化的不良反应, 包括由于血-膜长时间相互作用所诱导的炎症反应; 糖、氨基酸、维生素及微量元素的丧失; 基于抗凝的出血并发症等. 常用置换液中并无蛋白质成分, 血浆蛋白丢失过多, 必须及时补充白蛋白使治疗成本大幅度上涨. 无论血液净化技术如何发展, 他也只能是HLP综合治疗的一个方面, 并不能取代必要的手术、引流等治疗措施. 另外, 血液净化会影响药物的代谢, 缩短其半衰期, 在实施的过程中应注意到这一点. 对基础研究方面, 高脂血症如何诱发AP以及血液净化对机体代谢的影响, 有待于以基因或蛋白质代谢组学等分子生物学手段来进一步明确. 在临床中, 由于单个医疗机构HLP血液净化治疗的病例是不多的, 更需要多中心联合对血液净化的疗效、费用与疗效等进行循证医学研究, 以提出HLP血液净化的适应证、血液净化模式与血液净化次数等治疗指南. (7)对于妊娠期妇女, 虽然妊娠期HAP患病率低, 但母婴病死率高^[44-45]. 因此, 妊娠期妇女应于整个妊娠期间随访血TG和脂蛋白浓度的变化, 以便早期发现并控制血脂升高. 妊娠期妇女不宜服用降脂药物, 一旦发现血脂升高, 应及时调整饮食结构以控制血脂浓度. (8)HAP患者常因脂质代谢障碍导致心、脑、肾等器官的微血管病变. 治疗时, 应密切监测患者全身器官功能和血流动力学的改变. HAP治愈后仍应长期控制血TG值, 从根本上解决HL状况, 预防其复发; 措施包括禁酒、避免暴饮暴食、低脂饮食、口服降脂药及治疗引起血TG升高的相关性疾病(如糖尿病等). (9)对于暴发性HAP, 他是HAP的一个亚型. 若HAP经非手术治疗病情仍逐渐加重, 或当HL诱发暴发性HAP时, 应立即采取手术措施(如坏死组织清除、腹腔灌洗引流等), 及时阻止HAP病情的持续恶化.

目前, 尚无法清楚地阐明高甘油三酯血症加重急性胰腺炎的确切发病机制. 甘油三酯的分解代谢产物究竟是通过哪些途径加重胰腺的损

同行评价
本文内容详尽, 有一定的参考价值

伤？在这些途径中又有哪些信号传导通路参与到其中？是否能够锁定一些关键的靶分子从而阻断高脂血症对胰腺的损伤？这将是现在以及未来我们大家所面临的课题和研究方向。所以，HL性AP是一个较新的课题。其发病机制非常复杂，这将需要大量的临床研究和实验探索，以了解其确切发病机制。诊断上除了注意检测血脂水平外，期望能有更敏感的检测指标和更新的检查方法以早期确诊。其治疗应采取将降脂与其他多种有效手段相结合，另外采取基因治疗以降低家族性高TG血症的血TG值有望成为研究的方向。

高脂血症性AP复发率高，因此在AP缓解后控制血脂水平在安全范围内对预防HLP的复发很重要。在缓解期，为避免AP再次发作，应避免接触各种继发性因素，并控制饮食，限制脂肪摄入，包括饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸，也可使用中链TG来替代长链TG，因为中链TG能被直接吸收入门静脉而不会产生乳糜微粒或TG的升高，但长期使用可致肝纤维化。国外有报道，低脂饮食与药物治疗对反复发作AP的HTG患者控制血脂水平、预防AP复发很有效。对于遗传性LPL缺乏引起的原发性HTG患者，国外学者已提出使用基因疗法，他们在LPL缺乏的鼠科和猫科动物模型imAAVI-LPLS447X后使成肌细胞产生和分泌具有酶活性的LPL，从而使血清TG水平下降97%并维持1年以上时间^[47]。从他们目前的研究结论来看，基因疗法有很好的应用前景。

随着人们生活条件的改善，HAP的发病率会逐年上升。我们临床医师应对此予以高度重视，血脂测定也应列为AP的入院常规检查之一，以便能够早期诊断、及时治疗。肥胖是AP的独立危险因素，也是判断AP预后的重要指标，与HL有着较强的相关性。肥胖患者的胰周和腹膜后间隙中过多的脂肪沉积可使胰周脂肪坏死及胰腺出血、皂化，从而诱发HAP。故肥胖患者应增加运动量、控制体质量，采取低热、低糖饮食，降低HAP的发病率。虽然降脂治疗是HAP治疗的核心环节，但HAP是多因素参与的复杂的病理生理过程；各因素间既相互独立，又相互渗透，共同促进HAP的发生、发展。因此，只有将降脂治疗与HAP综合治疗中的其他手段相结合，同时控制引发HAP的多种因素，才能提高治疗的依从性，显著改善HAP的预后，防止其复发。

7 参考文献

1 Toskes PP. Hyperlipidemic pancreatitis.

- Gastroenterol Clin North Am* 1990; 19: 783-791
- 2 Searles GE, Ooi TC. Underrecognition of chylomicronemia as a cause of acute pancreatitis. *CMAJ* 1992; 147: 1806-1808
- 3 Fortson MR, Freedman SN, Webster PD 3rd. Clinical assessment of hyperlipidemic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 2134-2139
- 4 Chang MC, Su CH, Sun MS, Huang SC, Chiu CT, Chen MC, Lee KT, Lin CC, Lin JT. Etiology of acute pancreatitis—a multi-center study in Taiwan. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1655-1657
- 5 Yadav D, Pitchumoni CS. Issues in hyperlipidemic pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 54-62
- 6 Jap TS, Jenq SF, Wu YC, Chiu CY, Cheng HM. Mutations in the lipoprotein lipase gene as a cause of hypertriglyceridemia and pancreatitis in Taiwan. *Pancreas* 2003; 27: 122-126
- 7 Sattler AM, Bock K, Schmidt S, Maisch B, Schaefer JR. LDL-Apheresis for the treatment of hyperchylomicronemia-induced pancreatitis. *Z Kardiol* 2003; 92: III64-III67
- 8 Athyros VG, Giouleme Ol, Nikolaidis NL, Vasiliadis TV, Boulokos VI, Kontopoulos AG, Eugenidis NP. Long-term follow-up of patients with acute hypertriglyceridemia-induced pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 472-475
- 9 Buse GJ, Riley KD, Dress CM, Neumaster TD. Patient with gemfibrozil-controlled hypertriglyceridemia that developed acute pancreatitis after starting ketogenic diet. *Curr Surg* 2004; 61: 224-226
- 10 Coman T, Dalloz MA, Coolen N, Heshmati F, Pene F, Cariou A, Claessens YE. Plasmapheresis for the treatment of acute pancreatitis induced by hemophagocytic syndrome related to hypertriglyceridemia. *J Clin Apher* 2003; 18: 129-131
- 11 Huang DB, Raskin P. Diabetic hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis masquerading as biliary pancreatitis. *J Diabetes Complications* 2002; 16: 180-182
- 12 黄维江, 胡汉华. 妊娠合并胰腺炎7例报告. 中国普通外科杂志 2005; 14: 394-395
- 13 段丽萍, 陈洪, 李渊, 王进, 吕愈敏. 复发性急性胰腺炎高危因素及预后分析. 中国实用内科杂志 2003; 23: 478-479
- 14 Chikamune T, Katamoto H, Nomura K, Ohashi F. Lipoprotein profile in canine pancreatitis induced with oleic acid. *J Vet Med Sci* 1998; 60: 413-421
- 15 吴建新, 陈源文, 罗声政, 胡颖, 董国芳, 李定国, 陆汉明. 急性胰腺炎合并高甘油三酯血症的发病类型和预后. 中国实用内科杂志 2004; 24: 667-669
- 16 Castro MR, Nguyen TT, O'Brien T. Clomiphene-induced severe hypertriglyceridemia and pancreatitis. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 1125-1128
- 17 Pardo JM. Massive hypertriglyceridemia complicating estrogen therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1649-1650
- 18 Hozumi Y, Kawano M, Miyata M. Severe hypertriglyceridemia caused by tamoxifen-treatment after breast cancer surgery. *Endocr J* 1997; 44: 745-749
- 19 Kimura W, Mossner J. Role of hypertriglyceridemia in the pathogenesis of experimental acute pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1996; 20: 177-184
- 20 Mossner J, Bodeker H, Kimura W, Meyer F, Bohm S, Fischbach W. Isolated rat pancreatic acini as a model to study the potential role of lipase in

- the pathogenesis of acinar cell destruction. *Int J Pancreatol* 1992; 12: 285-296
- 21 Cameron JL, Capuzzi DM, Zuidema GD, Margolis S. Acute pancreatitis with hyperlipidemia: the incidence of lipid abnormalities in acute pancreatitis. *Ann Surg* 1973; 177: 483-489
- 22 Hofbauer B, Friess H, Weber A, Baczkó K, Kisling P, Schilling M, Uhl W, Dervenis C, Buchler MW. Hyperlipaemia intensifies the course of acute oedematous and acute necrotising pancreatitis in the rat. *Gut* 1996; 38: 753-758
- 23 Berger Z, Quera R, Poniachik J, Oksenberg D, Guerrero J. heparin and insulin treatment of acute pancreatitis caused by hypertriglyceridemia. Experience of 5 cases. *Rev Med Chil* 2001; 129: 1373-1378
- 24 王刚, 孙备, 姜洪池. 高脂血症急性胰腺炎的研究进展. 中国普通外科杂志 2005; 19: 777-779
- 25 Steer ML. How and where does acute pancreatitis begin? *Arch Surg* 1992; 127: 1350-1353
- 26 Sabiston DC. Textbook of surgery. 15th ed. Beijing: Science Press, 1999: 1156-1159
- 27 Hackert T, Pfeil D, Hartwig W, Gebhard MM, Buchler MW, Werner J. Platelet function in acute experimental pancreatitis induced by ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 2005; 92: 724-728
- 28 Martinez MA, Lajas AI, Yago MD, Redondo PC, Granados MP, Gonzalez A, Rosado JA, Martinez-Victoria E, Manas M, Pariente JA. Dietary virgin olive oil enhances secretagogue-evoked calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Nutrition* 2004; 20: 536-541
- 29 Huang G, Yao J, Zeng W, Mizuno Y, Kamm KE, Stull JT, Harding HP, Ron D, Mualem S. ER stress disrupts Ca²⁺-signaling complexes and Ca²⁺ regulation in secretory and muscle cells from PERK-knockout mice. *J Cell Sci* 2006; 119: 153-161
- 30 严际慎, 金海涛, 李佳, 王卫星, 王竹平. 高甘油三脂血症与急性胰腺炎关系的研究. 临床外科杂志 2003; 11: 76-78
- 31 Navarro S, Cubiella J, Feu F, Zambon D, Fernández-Cruz L, Ros E. Hypertriglyceridemic acute pancreatitis. Is its clinical course different from lithiasic acute pancreatitis? *Med Clin (Barc)* 2004; 123: 567-570
- 32 Strate T, Mann O, Kleinhans H, Schneider C, Knoefel WT, Yekebas E, Standl T, Bloechle C, Izbicki JR. Systemic intravenous infusion of bovine hemoglobin significantly reduces microcirculatory dysfunction in experimentally induced pancreatitis in the rat. *Ann Surg* 2003; 238: 765-771
- 33 Chen HH, Lin LH. Recurrent pancreatitis secondary to type V hyperlipidemia: report of one case. *Acta Paediatr Taiwan* 2000; 41: 276-278
- 34 Asakura L, Lottenberg AM, Neves MQ, Nunes VS, Rocha JC, Passarelli M, Nakandakare ER, Quintao EC. Dietary medium-chain triacylglycerol prevents the postprandial rise of plasma triacylglycerols but induces hypercholesterolemia in primary hypertriglyceridemic subjects. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 701-705
- 35 Mizushima T, Ochi K, Matsumura N, Ichimura M, Ishibashi T, Tsuboi K, Harada H. Prevention of hyperlipidemic acute pancreatitis during pregnancy with medium-chain triglyceride nutritional support. *Int J Pancreatol* 1998; 23: 187-192
- 36 Monga A, Arora A, Makkar RP, Gupta AK. Hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis-treatment with heparin and insulin. *Indian J Gastroenterol* 2003; 22: 102-103
- 37 Chen JH, Yeh JH, Lai HW, Liao CS. Therapeutic plasma exchange in patients with hyperlipidemic pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2272-2274
- 38 Furuya T, Komatsu M, Takahashi K, Hashimoto N, Hashizume T, Wajima N, Kubota M, Itoh S, Soeno T, Suzuki K, Enzan K, Matsuo S. Plasma exchange for hypertriglyceridemic acute necrotizing pancreatitis: report of two cases. *Ther Apher* 2002; 6: 454-458
- 39 Yeh JH, Chen JH, Chiu HC. Plasmapheresis for hyperlipidemic pancreatitis. *J Clin Apher* 2003; 18: 181-185
- 40 汤耀卿. 血液净化与重症急性胰腺炎. 中国实用外科杂志 2003; 23: 527-529
- 41 Mao EQ, Tang YQ, Zhang SD. Formalized therapeutic guideline for hyperlipidemic severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2622-2626
- 42 Iskandar SB, Olive KE. Plasmapheresis as an adjuvant therapy for hypertriglyceridemia-induced pancreatitis. *Am J Med Sci* 2004; 328: 290-294
- 43 Qin HD, Zhang JG, Li CL, Zou XM. Three cases of hyperlipidemic pancreatitis in late pregnancy. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 314-315
- 44 Sanduende Otero Y, Figueira Moure A, Rama-Maceiras P, Bautista Guillén A, Diéguez Fernández M. Hypertriglyceridemic pancreatitis and pregnancy. *Rev Esp Anestesiol Reanim* 2003; 50: 477-480
- 45 Nierman MC, Rip J, Twisk J, Meulenbergh JJ, Kastelein JJ, Stroes ES, Kuivenhoven JA. Gene therapy for genetic lipoprotein lipase deficiency: from promise to practice. *Neth J Med* 2005; 63: 14-19

编辑 程剑侠 电编 何基才



ARIP2蛋白在小鼠肝细胞中的表达及其生物学作用

张红军, 柳忠辉, 陈芳芳, 马迪, 周静, 台桂香

背景资料
激活素以自分泌/旁分泌形式作用于肝实质细胞, 抑制肝细胞的增殖, 还可以通过活化肝星形细胞, 促进肝细胞外基质异常分泌, 参与肝纤维化的形成和发展。

张红军, 牡丹江医学院病原生物学教研室 黑龙江省牡丹江市 157011
柳忠辉, 陈芳芳, 马迪, 周静, 台桂香, 吉林大学基础医学院免疫学教研室 吉林省长春市 130021
张红军, 副教授, 主要从事神经内分泌免疫学研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30170478 和 No. 30771957
吉林省科技厅资助项目, No. 20060928-01
作者贡献分布: 此课题由张红军, 柳忠辉, 台桂香设计; 研究过程由张红军, 陈芳芳, 马迪操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由柳忠辉提供; 数据分析由张红军, 周静, 台桂香完成; 本论文写作由张红军, 柳忠辉, 周静, 台桂香完成。
通讯作者: 台桂香, 130021, 吉林省长春市新民大街126号, 吉林大学基础医学院免疫学教研室。taiguixiang@163.com
电话: 0431-85619403
收稿日期: 2007-08-06 修回日期: 2008-01-10

Activin receptor-interacting protein 2 expression and its biological function in mouse hepatocytes

Hong-Jun Zhang, Zhong-Hui Liu, Fang-Fang Chen, Di Ma, Jing Zhou, Gui-Xiang Tai

Hong-Jun Zhang, Department of Pathogenobiology, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

Zhong-Hui Liu, Fang-Fang Chen, Di Ma, Jing Zhou, Gui-Xiang Tai, Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30170478 and 30771957) and Science Projects of Jilin Province of China (No. 20060928-01)

Correspondence to: Gui-Xiang Tai, Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, 126 Xinmin Street, Changchun 130021, Jilin Province, China. taiguixiang@163.com

Received: 2007-08-06 Revised: 2008-01-10

Abstract

AIM: To investigate the activin receptor-interacting protein 2 (ARIP2) expression and its biological function in hepatocytes.

METHODS: Expression of ARIP2 in mouse liver tissue and hepatoma cell line Hepal-6 cells was detected by Western blot, immunohistochemistry and cytochemical staining. Effect of ARIP2 on activin-induced gene transcription was analyzed using CAGA-lux plasmid. Effect of over-expression of ARIP2 on the proliferation of Hepal-6 cells was assayed with MTT method.

同行评议者
李涛, 主治医师,
北京大学人民医院
肝胆外科

RESULTS: ARIP2 was expressed in mouse liver tissue and Hepal-6 cells. The expression of ARIP2 in activin A-stimulated Hepal-6 cells was increased in a time-dependent manner, and peaked at 24 h. There was a significant difference in the expression level of ARIP2 on Hepal-6 cells at 12 and 24 h in contrast with the control group (1.01 ± 0.16 , 1.62 ± 0.26 vs 0.82 ± 0.11 , $P < 0.05$, $P < 0.01$). pcDNA3-ARIP2-transfected Hepal-6 cells obviously suppressed the gene transcription induced by activin A. MTT assay displayed that activin A (5 μ g/L and 10 μ g/L) remarkably inhibited the proliferation of Hepal-6 cells, the A_{570} nm value was 1.59 ± 0.03 and 1.49 ± 0.04 vs 1.79 ± 0.07 , respectively ($P < 0.05$, $P < 0.01$). ARIP2 over-expression in Hepal-6 cells significantly blocked the inhibitory effects of activin A (5 μ g/L and 10 μ g/L) on the proliferation of Hepal-6 cells.

CONCLUSION: ARIP2 can be expected to become a regulation target of genes in treatment of liver injury induced by activin.

Key Words: Activin; Activin receptor-interacting protein 2; Signal transduction; Hepal-6 cells; Proliferation

Zhang HJ, Liu ZH, Chen FF, Ma D, Zhou J, Tai GX. Activin receptor-interacting protein 2 expression and its biological function in mouse hepatocytes. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 350-355

摘要

目的: 探讨激活素受体相互作用蛋白2(ARIP2)在肝细胞内的表达形式及其介导的生物学作用。

方法: 采用免疫组织化学及细胞化学染色、Western blot检测ARIP2蛋白在小鼠肝组织及肝癌细胞系Hepal-6细胞内的表达; 采用激活素特异应答的CAGA-lux报告基因质粒分析ARIP2对激活素诱导的特异基因转录的影响; MTT法检测ARIP2过表达对Hepal-6细胞增殖的影响。

结果: ARIP2蛋白可在小鼠肝组织及Hepal-6

细胞表达. 激活素A刺激Hepal-6细胞ARIP2蛋白表达呈时间依赖性升高, 于24 h达到高峰; 12 h、24 h测定值与对照组相比有显著性意义(1.01 ± 0.16 , 1.62 ± 0.26 vs 0.82 ± 0.11 , $P < 0.05$). pcDNA3-ARIP2转染Hepal-6细胞, 可以明显抑制激活素诱导的特异基因转录; MTT检测显示激活素A(5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{L}$)可以明显抑制Hepal-6细胞增殖, 其570 nm吸光度值与对照组相比有显著差异(1.59 ± 0.03 、 1.49 ± 0.04 vs 1.79 ± 0.07 , $P < 0.05$, $P < 0.01$). 在Hepal-6细胞内过表达ARIP2可以阻断激活素A对Hepal-6细胞的增殖抑制作用.

结论: ARIP2有望成为治疗激活素诱导的肝脏损伤性疾病的基因调控靶点.

关键词: 激活素; 激活素受体相互作用蛋白2; 信号传导; Hepa1-6细胞; 细胞增殖

张红军, 柳忠辉, 陈芳芳, 马迪, 周静, 台桂香. ARIP2蛋白在小鼠肝细胞中的表达及其生物学作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 350-355

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/350.asp>

0 引言

激活素(Activin)属于转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β)超家族的多功能生长、分化因子^[1-4]. 近年研究发现激活素与肝脏疾病关系密切, Activin A不仅以自分泌/旁分泌形式作用于肝实质细胞, 抑制肝细胞的增殖、影响肝组织再生, 还可以通过活化肝星形细胞(HSC), 促进肝细胞外基质(extracellular matrix, ECM)异常分泌, 参与肝纤维化的形成和发展^[5-7].

激活素受体属于丝/苏氨酸激酶型受体^[8-9], 激活素首先与靶细胞表面的II型受体(ActR II)结合, ActR II再活化I型受体(ActR I), 进而激活细胞内下游信号传导蛋白Smads, 发挥生物学作用. 激活素受体相互作用蛋白(ARIP)是最近发现的一组信号传导调控蛋白^[10-13], 作为Smad上游信号调控蛋白可特异结合激活素II型受体, 影响激活素诱导的细胞内信号传导. 研究发现ARIP2具有抑制激活素信号传导的作用, Northern blot检测显示ARIP2 mRNA在肝组织内高表达^[10], 我们的研究还显示肝癌细胞系Hepal-6高表达ARIP2 mRNA^[10]. 因此推测, ARIP2表达与激活素调控肝细胞活性有关, 但是ARIP2在肝细胞中介导激活素信号传导及其对激活素诱导的肝细胞增殖抑制的影响作用仍不

清楚. 本研究采用Hepal-6细胞^[14], 进一步探讨了ARIP2蛋白的表达规律及其参与激活素信号传导和细胞增殖的作用, 为进一步寻找治疗肝脏疾病的基因作用靶点奠定研究基础.

研发前沿
激活素受体相互作用蛋白2(ARIP2)是新发现的激活素信号传导的负向调控蛋白, 有关其组织学分布、生物学作用等仍不清楚.

1 材料和方法

1.1 材料 Activin A、MTT购自Sigma公司, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)高糖培养基是GIBCO产品, Lipofectamine 2000由Invitrogen公司提供, Glutathione-Sepharose 4B以及Protein A-Sepharose 4B为Amersham Biosciences产品. 免疫组织化学染色用Ultrasensitive SP试剂盒购置福建迈新公司. Hepal-6细胞株来源于小鼠肝癌细胞系, 由中科院上海细胞库提供, 采用100 mL/L牛血清(FCS)-DMEM培养.

1.2 方法

1.2.1 质粒构建: 根据编码ARIP2全氨基酸cDNA序列(1-153氨基酸残基), 分别设计并引入Eco R I酶切位点的上游引物: 5'-ggaattcatgatttctcagg gctggg-3'和引入Xho I酶切位点及终止密码子的下游引物5'-gctcgagctattcacaagaacagtgtaaa-3'. 经一步法RT-PCR扩增目的基因片段, TA克隆入pMD18-T质粒, 再亚克隆入真核表达载体pcDNA3, 构建pcDNA3-ARIP2. 同时构建原核表达质粒pGEX-4T-1-ARIP2(编码ARIP2 COOH端的98-153氨基酸残基).

1.2.2 兔抗ARIP2抗体制备: 构建的pGEX-4T-1-ARIP2表达质粒转染大肠杆菌BL21, 采用Glutathione-Sepharose 4B亲和层析柱纯化表达的GST-ARIP2融合蛋白(按产品说明书操作). 取GST-ARIP2融合蛋白500 μg 与完全弗氏佐剂混匀, 多点接种免疫家兔, 加强免疫两次后, 静脉采血、分离血清. 经Protein A亲和层析纯化抗GST-ARIP2融合蛋白抗体, 再经GST-Sepharose 4B亲和层析除去抗GST抗体^[13]. 获得纯化的抗ARIP2特异性IgG型抗体, 用于免疫组织及细胞化学染色.

1.2.3 免疫组织化学及细胞化学染色检测ARIP2蛋白表达: 取C57BL/6小鼠肝脏经40 g/L多聚甲醛固定, 常规石蜡切片, 再经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化; 同时将处于对数生长期的Hepal-6细胞接种在放有盖玻片的12孔培养板内, 继续培养过夜, 贴有Hepal-6细胞的盖玻片经40 g/L多聚甲醛固定. 上述标本经3 mL/L H₂O₂孵育1 h除去内源性过氧化物酶后, 用20 mL/L BSA-PBS

相关报道

前期研究主要集中在ARIP2在细胞内介导激活素信号传导作用及其方式,但有关其在肝细胞的生物学作用研究仅有本实验室的一篇报道。

室温封闭1 h,滴加兔抗ARIP2抗体(1:200稀释),4℃过夜。PBS洗3次,采用Ultrasensitive SP试剂盒,按照说明书操作进行显色;苏木精复染,水冲洗返蓝,常规梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,树胶封片,光学显微镜观察。实验同时以未免疫健康兔IgG做阴性对照,操作过程同抗体组。

1.2.4 Western blot检测ARIP2蛋白的动态表达: 将对数生长期的Hepa1-6细胞接种于12孔细胞培养板,细胞数 2×10^5 /孔,37℃培养过夜后,更换培养液为20 mL/L FCS-DMEM培养基,各孔加入刺激物Activin A(5 mg/L),同时设培养液单纯培养细胞做对照孔,继续培养8 h、12 h、24 h,收集细胞,每孔细胞加入50 μL组织裂解缓冲液(1 mL/L Triton X-100; pH7.5 50 mmol/L Tris-HCl; 150 mmol/L NaCl; 2 mmol/L EDTA; 2 mmol/L PMSF; 1 mmol/L NaF; 4 ng/L leupeptin; 1 ng/L aprotinin),4℃,制备细胞匀浆,以2000 r/min,4℃离心10 min,取上清液再以12 000 r/min,4℃离心30 min,回收上清液,加入2×SDS-PAGE上样缓冲液25 μL,100℃变性样本5 min,SDS-PAGE凝胶电泳分离样本,电转印至PVDF膜,用抗ARIP2抗体做探针进行Western杂交,采用ECL化学发光检测试剂盒检测杂交结果,以β-actin为参照,将条带进行灰度扫描。

1.2.5 激活素诱导的特异应答基因转录分析: 为了研究ARIP2介导的激活素信号传导作用,实验选择对激活素特异应答的CAGA-lux质粒提供荧光素酶报告基因。采用Lipofectamine 2000将CAGA-lux、CMV-gal(用于荧光素酶活性标准化计算)及pcDNA3-ARIP2质粒共转染体外培养的Hepa1-6细胞,采用5 μg/L Activin A刺激,检测细胞内报告基因转录荧光素酶的活性^[10,13]。

1.2.6 MTT法检测Hepa1-6细胞增殖: 取对数生长期的Hepa1-6细胞接种于96孔细胞培养板,2×10⁴/孔。根据ARIP2抑制激活素信号传导情况选择0.03 μg pcDNA3-ARIP2及0.03 μg pcDNA3空质粒,采用Lipofectamine 2000分别将pcDNA3-ARIP2及pcDNA3转染培养的Hepa1-6细胞,设单纯培养液对照及5 μg/L Activin A和10 μg/L Activin A刺激组,每组设3复孔,培养24 h后,常规MTT法检测细胞增殖,全自动酶标仪读取波长570 nm的光吸收值($A_{570\text{nm}}$),以 $A_{570\text{nm}}$ 值表示细胞生长情况^[15]。

统计学处理 实验数据以mean±SD表示,采

用统计学处理软件SPSS9.0进行统计学分析,组间比较采用t检验,各实验组与对照组差异的显著性以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示。

2 结果

2.1 ARIP2在肝脏及Hepa1-6细胞的表达 在肝实质细胞及Hepa1-6细胞均有明显的抗ARIP2抗体染色(图1),提示ARIP2蛋白在小鼠肝脏及肝癌细胞系Hepa1-6细胞内均存在。因此实验选择Hepa1-6细胞进一步研究ARIP2在肝细胞内的生物学活性。

2.2 Activin A刺激Hepa1-6细胞ARIP2蛋白的动态表达 Activin A作用8 h后,ARIP2蛋白表达开始出现时间依赖性增加,12, 24 h蛋白的表达与对照组比较差异显著明显(1.01 ± 0.16 , 1.62 ± 0.26 vs 0.82 ± 0.11 , $P<0.05$, $P<0.01$, 图2),尤以24 h蛋白表达增加最为明显。

2.3 在Hepa1-6细胞内ARIP2表达抑制激活素信号传导 ARIP2呈剂量依赖性的抑制激活素诱导的特异基因转录活性(图3)。上述结果提示在激活素A刺激Hepa1-6细胞后,升高的ARIP2可能参与激活素信号传导的负反馈调节,对终止激活素的病理损伤作用具有重要意义。

2.4 ARIP2过表达对Hepa1-6细胞增殖的影响 Activin A能明显抑制Hepa1-6细胞的增殖,并具有一定的剂量依赖关系,5 μg/L和10 μg/L Activin A组570 nm吸光度值与0 μg/L Activin A组相比有显著差异(1.59 ± 0.03 , 1.49 ± 0.04 vs 1.79 ± 0.07 , $P<0.05$, $P<0.01$)。而ARIP2过表达后可以明显阻断Activin A对Hepa1-6细胞的生长抑制作用(图4),5 μg/L和10 μg/L Activin A组570 nm吸光度值与0 μg/L Activin A组相比无差异(1.69 ± 0.09 , 1.7 ± 0.08 vs 1.65 ± 0.06 , $P>0.05$)。上述资料提示ARIP2在Hepa1-6细胞内表达可能是通过阻断激活素特异信号传导途径,进而翻转激活素A对Hepa1-6细胞的增殖抑制作用。

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病重要的病理特征,是慢性肝损伤引起肝脏代谢和细胞间相互作用紊乱的结果^[17-18]。大量研究表明Activin A在调节肝细胞生长^[19-20],促进肝纤维化发生发展过程中发挥重要作用^[21-28]。TGF-β是重要的致肝纤维化因子,Wada *et al*^[3]的新近研究发现TGF-β在作用于肝星形细胞(HSC)诱导胶原产生的过程中,主要依赖于其对内源性Activin A自分泌的诱导。该研究

创新盘点

本研究通过蛋白水平首次证实了在肝癌细胞系Hepa1-6细胞中ARIP2参与激活素A作用的晚期信号传导调控,并具有阻断激活素A抑制Hepa1-6细胞增殖的作用。

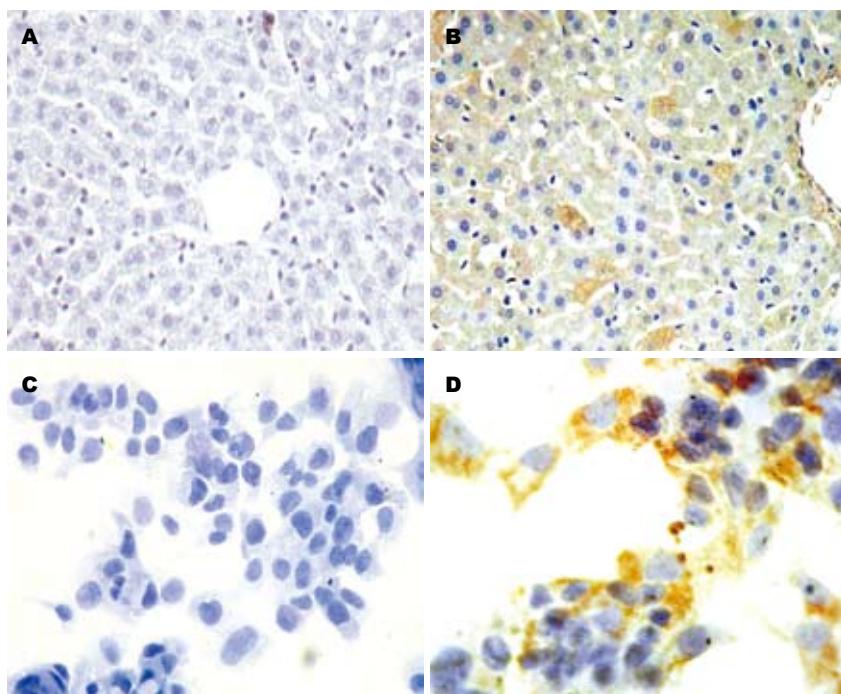


图 1 ARIP2免疫组织(细胞)化学染色. A: 小鼠肝组织阴性对照(1×100); B: 小鼠肝组织抗ARIP2抗体免疫组织化学染色(1×100); C: Hepa1-6细胞阴性对照(1×200); D: Hepa1-6细胞抗ARIP2抗体免疫细胞化学染色(1×200).

应用要点
ARIP2作为激活素信号传导抑制蛋白, 可以反转激活素对Hepa1-6细胞的增殖抑制作用, 因此, ARIP2有望成为治疗激活素诱导的肝损伤性疾病的基因调控靶点.

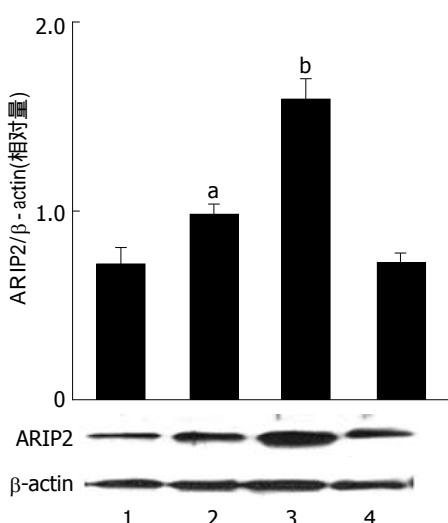


图 2 Activin A刺激Hepa1-6细胞ARIP2蛋白的动态表达. 1: 8 h; 2: 12 h; 3: 24 h; 4: 对照. ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组.

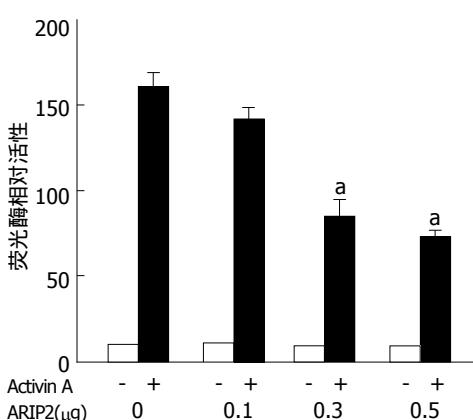


图 3 ARIP2 在Hepa1-6细胞抑制激活素诱导的基因转录活性. ^a $P<0.05$ vs Activin A (+)+ARIP2 (0)组.

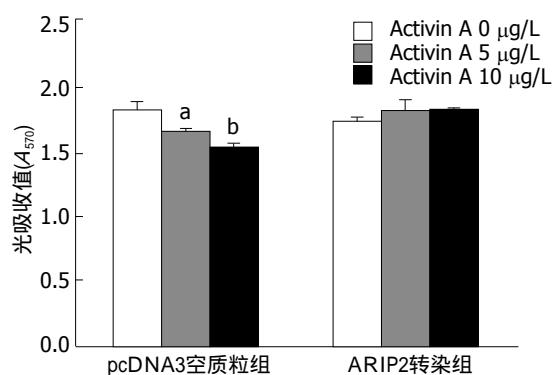


图 4 ARIP2过表达对Hepa1-6细胞增殖的影响. ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs Activin A 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 组.

证实在肝纤维化发病机制中, TGF- β 与Activin A二者不仅仅是功能相似, 而且存在协同和依赖的关系, TGF- β 诱导肝纤维化的功能部分依赖于Activin A的自分泌, 因此如果能够阻断肝细胞自分泌激活素, 或抑制其受体后特异信号传导, 都可能减轻或抑制激活素介导的肝损伤进程, 发挥治疗肝脏疾病的作用.

激活素受体相互作用蛋白(ARIP)具有明显的组织学特异性, 在不同的组织中不仅表达、分布不同, 其生物学活性也存在很大差异, 是决定激活素组织学作用特异性的关键分子. 研究发现ARIPs均能特异结合激活素II型受体, 调控激活素诱导的细胞内信号传导^[11-13]. 其中ARIP1与Smad3蛋白结合, 抑制ActRI向细胞内传递信号^[11]; ARIP2/2a通过Rai/RaiBP1依赖的途径, 促进ActRII内吞, 降低细胞膜上的ActR II受体表

名词解释

ARIP2: 激活素受体相互作用蛋白2, 具有特异结合激活素型受体, 并抑制激活素信号传导作用的蛋白.

达, 具有抑制激活素诱导的信号传导作用^[8,29]; ARIP2b、2c可以上调ActR II受体表达, 具有促进激活素诱导的信号传导作用^[13]. 我们的研究发现ARIP2 mRNA在肝脏细胞及Hepal-6细胞中表达^[16], 提示ARIP2与激活素作用肝细胞的信号传导调控有关.

为了探讨ARIP2蛋白在肝细胞中的表达形式及其生物学作用, 本研究采用免疫组织化学以及细胞化学染色, 确定在小鼠肝脏组织细胞以及Hepal-6细胞均有成熟的ARIP2蛋白表达. 研究通过Western blot进一步分析了ARIP2蛋白的动态表达情况, 结果显示在Activin A刺激的晚期12、24 h ARIP2的表达显著增加, 这一结果与我们前期研究发现的ARIP2 mRNA动态转录水平一致^[16], 进一步提示ARIP2可能参与激活素作用后期信号传导调节过程. 为明确ARIP2对激活素的信号传导调控作用, 实验分析了ARIP2对激活素诱导的特异基因转录的影响, 结果显示ARIP2在肝细胞中能够明显抑制激活素诱导的信号传导. 由此可见ARIP2可能作为激活素信号传导负调控蛋白, 参与激活素作用晚期的信号传导的负反馈调节过程.

为了进一步阐述ARIP2作为激活素信号传导的负调控分子在肝细胞中的生物学作用, 本研究采用来源于肝实质细胞的肝癌细胞系Hepal-6细胞作为研究对象, 研究发现Activin A对Hepal-6细胞增殖具有明显的抑制作用, Activin A 10 μg/L刺激24 h生长抑制率达27%, 具有剂量依赖关系. Activin A对Hepal-6细胞增殖抑制与有关报道的Activin A抑制小鼠肝实质细胞增殖的结果一致^[4-5,17-18]. 实验进一步将pcDNA3-ARIP2转染至小鼠肝癌细胞系Hepal-6细胞, 观察ARIP2表达对激活素诱导的肝细胞增殖抑制的影响, 结果显示ARIP2过表达可以明显减弱或消除Activin A对Hepal-6细胞的增殖抑制作用, 表明ARIP2可能通过抑制激活素信号传导, 对激活素的生物学作用具有明显的阻断作用.

上述资料显示ARIP2是一种可在肝细胞内表达, 具有抑制激活素信号传导作用的负调控蛋白, 在肝细胞内上调ARIP2的表达, 可以反转激活素在肝脏介导的生物学作用. 因此在肝细胞内上调ARIP2的表达对预防和减轻激活素在肝脏的致病作用, 具有重要意义, ARIP2有望成为治疗肝病的有效靶点.

参考文献

- Werner S, Alzheimer C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 157-171
- Zhang XJ, Li Y, Tai GX, Xu GY, Zhang PY, Yang Y, Lao FX, Liu ZH. Effects of activin A on the activities of the mouse peritoneal macrophages. *Cell Mol Immunol* 2005; 2: 63-67
- Wada W, Kuwano H, Hasegawa Y, Kojima I. The dependence of transforming growth factor-beta-induced collagen production on autocrine factor activin A in hepatic stellate cells. *Endocrinology* 2004; 145: 2753-2759
- Takamura K, Tsuchida K, Miyake H, Tashiro S, Sugino H. Activin and activin receptor expression changes in liver regeneration in rat. *J Surg Res* 2005; 126: 3-11
- Sugiyama M, Ichida T, Sato T, Ishikawa T, Matsuda Y, Asakura H. Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers. *Gastroenterology* 1998; 114: 550-558
- Smith C, Yndestad A, Halvorsen B, Ueland T, Waehre T, Otterdal K, Scholz H, Endresen K, Gullestad L, Froland SS, Damas JK, Aukrust P. Potential anti-inflammatory role of activin A in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 369-375
- De Bleser PJ, Niki T, Xu G, Rogiers V, Geerts A. Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver. *Hepatology* 1997; 26: 905-912
- Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 1991; 65: 973-982
- Attisano L, Wrana JL, Montalvo E, Massague J. Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1066-1073
- Matsuzaki T, Hanai S, Kishi H, Liu Z, Bao Y, Kikuchi A, Tsuchida K, Sugino H. Regulation of endocytosis of activin type II receptors by a novel PDZ protein through Ral/Ral-binding protein 1-dependent pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 19008-19018
- Shoji H, Tsuchida K, Kishi H, Yamakawa N, Matsuzaki T, Liu Z, Nakamura T, Sugino H. Identification and characterization of a PDZ protein that interacts with activin type II receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 5485-5492
- Tsuchida K, Nakatani M, Matsuzaki T, Yamakawa N, Liu Z, Bao Y, Arai KY, Murakami T, Takehara Y, Kurisaki A, Sugino H. Novel factors in regulation of activin signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 225: 1-8
- Liu ZH, Tsuchida K, Matsuzaki T, Bao YL, Kurisaki A, Sugino H. Characterization of isoforms of activin receptor-interacting protein 2 that augment activin signaling. *J Endocrinol* 2006; 189: 409-421
- Darlington GJ. Liver cell lines. *Methods Enzymol* 1987; 151: 19-38
- Miljkovic D, Cvetkovic I, Momcilovic M, Maksimovic-Ivanic D, Stosic-Grujicic S, Trajkovic V. Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase-dependent toxicity in mouse beta cells. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2658-2668
- Zhang HJ, Tai GX, Zhou J, Ma D, Liu ZH. Regulation of activin receptor-interacting protein 2 expression in mouse hepatoma Hepal-6 cells and its relationship with collagen type IV. *World J*

- Gastroenterol 2007; 13: 5501-5505
- 17 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 18 Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol* 2002; 27: 63-68
- 19 Endo D, Maku-Uchi M, Kojima I. Activin or follistatin: which is more beneficial to support liver regeneration after massive hepatectomy? *Endocr J* 2006; 53: 73-78
- 20 Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Tahashi Y, Sakitani K, Inoue K. Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. *J Hepatol* 2000; 32: 251-260
- 21 Patella S, Phillips DJ, de Kretser DM, Evans LW, Groome NP, Sievert W. Characterization of serum activin-A and follistatin and their relation to virological and histological determinants in chronic viral hepatitis. *J Hepatol* 2001; 34: 576-583
- 22 Pirisi M, Fabris C, Luisi S, Santuz M, Toniutto P, Vitulli D, Federico E, Del Forno M, Mattiuzzo M, Branca B, Petraglia F. Evaluation of circulating activin-A as a serum marker of hepatocellular carcinoma. *Cancer Detect Prev* 2000; 24: 150-155
- 23 Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 37-41
- 24 Sugiyama M, Ichida T, Sato T, Ishikawa T, Matsuda Y, Asakura H. Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers. *Gastroenterology* 1998; 114: 550-558
- 25 Gold EJ, Francis RJ, Zimmermann A, Mellor SL, Cranfield M, Risbridger GP, Groome NP, Wheatley AM, Fleming JS. Changes in activin and activin receptor subunit expression in rat liver during the development of CCl₄-induced cirrhosis. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 201: 143-153
- 26 Gold EJ, Zhang X, Wheatley AM, Mellor SL, Cranfield M, Risbridger GP, Groome NP, Fleming JS. betaA- and betaC-activin, follistatin, activin receptor mRNA and betaC-activin peptide expression during rat liver regeneration. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 505-515
- 27 Yuen MF, Norris S, Evans LW, Langley PG, Hughes RD. Transforming growth factor-beta 1, activin and follistatin in patients with hepatocellular carcinoma and patients with alcoholic cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 233-238
- 28 Hughes RD, Evans LW. Activin A and follistatin in acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 127-131
- 29 Cui XL, Tai GX, Zhang HJ, Fang L, Liu ZH. Cloning of the full-length gene of activin receptor-interacting protein2a and characterization of its interaction with ActR II A. *Progress in Natural Science* 2007; 17: 172-176

同行评价
本文有一定的科学意义和创新性.

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

WJG 2007 年 1 - 12 月份收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)* 2007年1-48期共发表文章1120篇, 其中国际文章791篇, 占71%; 国内文章329篇, 占29%. 社论63篇, 综述30篇, 专题亮点139篇, 文章663篇(基础研究和临床研究), 病例报告193篇, 读者来信等32篇, 评论性文章占发文总量的21%. 2007年1-12月份共收稿2628篇, 其中国内稿件980篇, 占37%; 国外稿件1648篇, 占63%; 退稿1052篇, 退稿率为40%. (常务副主任: 刘晔 2008-01-01)



茶多酚对酒精性肝病大鼠TNF- α 及肝细胞的影响

李芬, 管小琴, 刘利

背景资料

酒精性肝病是长期大量饮酒引起的肝脏疾病。近年来发病率不断上升。其病因复杂，虽然近年来研究颇多，但在酒精性肝炎、肝硬化的临床治疗上进展缓慢。

李芬, 管小琴, 刘利, 重庆医科大学基础医学院病理教研室
重庆市 400016

李芬, 医学硕士, 主要从事肝脏病理的研究。

作者贡献分布: 李芬及管小琴对本文所作贡献均等; 此课题李芬及管小琴设计; 研究过程由李芬、刘利操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由管小琴提供; 数据分析由李芬完成; 本论文写作由李芬撰写、管小琴修改校正完成。

通讯作者: 管小琴, 400016, 重庆市, 重庆医科大学基础医学院
病理教研室, guanxiaoqin2003@yahoo.com.cn

电话: 023-68485789

收稿日期: 2007-07-02 修回日期: 2008-01-15

± 0.83 vs 14.33 ± 1.87 , $P < 0.05$) were lower in the tea polyphenols-intervened group than in the model group.

CONCLUSION: Tea polyphenols can protect hepatocytes from damage, decrease lipid peroxidation and TNF- α release.

Key Words: Alcoholic liver disease; Tea polyphenols; Tumor necrosis factor-alpha; Enzyme linked immunosorbent assay; RT-PCR

Li F, Guan XQ, Liu L. Effect of tea polyphenols on TNF- α and hepatocytes in rats with alcoholic liver disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 356-360

摘要

目的: 探讨茶多酚对酒精性肝病大鼠TNF- α 表达及肝细胞病变的影响。

方法: 29只大鼠随机分为: 对照组、模型组、茶多酚干预组。白酒ig建模, 茶多酚干预。常规切片及特染评价肝组织病变, 检测血清AST、ALT、MDA含量, ELISA法检测血清TNF- α 、RT-PCR检测肝组织TNF- α mRNA表达。

结果: 与模型组相比, 茶多酚干预组大鼠肝组织学评分(3.00 ± 1.59 vs 4.50 ± 1.31 , $P < 0.05$), 血清AST、MDA绝对值(87.33 ± 61.00 vs 226.40 ± 81.34 , 2.75 ± 0.72 vs 7.34 ± 3.06 , $P < 0.05$), 肝组织TNF- α mRNA表达与TNF- α 血清含量均降低(0.55 ± 0.05 vs 0.73 ± 0.07 , 4.45 ± 0.83 vs 14.33 ± 1.87 ; $P < 0.05$)。

结论: 茶多酚保护肝细胞线粒体, 减轻脂质过氧化, 减少TNF- α 的合成释放。

关键词: 酒精性肝病; 茶多酚; 肿瘤坏死因子 α ; 酶联免疫吸附法; 逆转录聚合酶链式反应

李芬, 管小琴, 刘利. 茶多酚对酒精性肝病大鼠TNF- α 及肝细胞的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 356-360
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/356.asp>

0 引言

酒精性肝病(ALD)是由于长期大量饮酒所致的

同行评议者
朴熙绪, 教授, 延边大学医院消化内科

肝脏疾病。临幊上分轻症酒精性肝病、酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化、酒精性肝硬化。由于其机制复杂,涉及乙醇的直接毒性、乙醛的化学性损伤、氧应激和脂质过氧化、线粒体损伤、遗传等多个方面。近年来ALD的治疗进展缓慢,对ALD早期疾病的预防显得尤为重要。

茶多酚(TP)是茶叶的主要活性成分,其主要成分为儿茶素占茶多酚总量的60%-80%,TP经消化道吸收后进入全身各组织,体内广泛分布^[1],抗氧化是其的主要作用。本研究在建立大鼠ALD模型的基础上,利用茶多酚能直接溶于乙醇的物理特性,建模的同时给与茶多酚干预,观察茶多酚对肝细胞病变及其对血清、肝组织中TNF- α 的影响,探讨茶多酚用于酒精性肝病早期预防和治疗的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级成年♀Wistar大鼠29只,体质量 200 ± 50 g,购自重庆医科大学实验动物中心。实验期间饲养于重庆医科大学动物中心IVC饲养间。实验仪器: Thermo Hybaid PCR仪为英国产品,Bio-Rad凝胶成像系统为美国产品,Bio-Tec酶标仪为美国产品,透射电镜(Hitachi-7500)为日本产品。试剂有55度红星二锅头白酒:北京红星二锅头酒厂生产,苏丹IV特染试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司,丙二醛(MDA)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,TNF- α 兔抗鼠多克隆抗体及免疫组化SABC试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,ELISA定量检测细胞因子TNF- α 试剂购自深圳晶美生物工程有限公司,RT-PCR引物、TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0试剂盒、DNA marker购自宝生物工程(大连)有限公司,茶多酚TP98购自无锡世纪生物药业公司(茶多酚≥98%,其中儿茶素≥85%)。

1.2 方法

1.2.1 动物实验: Wistar大鼠29只,随机分为三组,对照组5只,ALD模型组11只,茶多酚干预组13只。灌胃溶液:(1)ALD模型组:55度白酒+玉米油。(2)茶多酚干预组:55度白酒+玉米油+茶多酚。(3)对照组:玉米油。每日上午九点ig 1次。其中:55%白酒以8-15 mL/(kg·d)剂量,每周递增。TP:0.25 g/(kg·d),玉米油:2 mL/(kg·d)。实验结束得到大鼠:对照组5只,模型组9只、干预组9只。7 wk末处死大鼠,下腔静脉穿刺抽血5-6 mL,分

离血清。取相同部位肝组织40 g/L甲醛固定,石蜡包埋切片及冰冻切片做脂肪特殊染色,光镜观察。取1 mm³肝组织,固定于4℃预冷的20 g/L戊二醛中,备电镜检测。另取50-100 mg大小的肝组织若干,分别用1 mL/L DEPC水处理过的锡箔纸包裹后存放于液氮中,备RT-PCR检测。其余肝脏组织保存在-80℃冰箱。

1.2.2 光镜观察: 各组动物肝组织病理切片经HE染色,冰冻切片苏丹IV染色确认细胞内脂滴储积情况。依照2006年修订的酒精性肝病诊疗指南^[2]标准进行组织评分,评分主要内容包括:肝细胞脂变及坏死、肝小叶炎症细胞浸润、纤维化程度。

1.2.3 电镜观察肝细胞超微结构: 按常规透射电镜样品制备方法固定、脱水、浸透、包埋,光镜半薄切片定位后行超薄切片。枸橼酸铅电子染色后,在透射电镜(Hitachi-7500)下观察超微结构。

1.2.4 血清和肝组织指标检测: 用全自动生化仪测定大鼠血清ALT、AST水平,血清MDA检测严格按照说明书进行,ELISA法检测血清TNF- α ,严格按照说明书进行。肝组织TNF- α mRNA表达检测采用半定量RT-PCR法。内参: β -actin。应用TRIzol试剂提取总RNA,参照RT-PCR试剂盒说明逆转录成cDNA,10 μ L体系。PCR扩增: 50 μ L体系: 5×PCR Buffer 10 μ L,灭菌蒸馏水28.75 μ L, TaKaRa Taq HS 0.25 μ L, TNF- α 上下游引物各0.5 μ L, 逆转录产物10 μ L。反应条件: (94℃ 3 min)1 cycle; (94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 30 s)40 cycles; (72℃ 5 min) 1 cycle, TNF- α 上游引物: 5'-TACTGAACCTCGGGTGATTGGTCC, 下游引物: 3'-CAGCCTTGTCCCTTGAAGAGAGAAC, 扩增产物295 bp, β -actin: 反应体系同TNF- α , 反应条件: (94℃ 3 min)1 cycle; (94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 30 s)30 cycles; (72℃ 5 min)1 cycle, β -actin上游引物: 5'-AGAGCTATGAGCTGCCTGAC-3', 下游引物: 5'-GTACTCCTGCTGCTGATCC-3', 扩增产物374 bp, PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后用Bio-Rad Gel Doc2000型凝胶电泳成像系统照相后并用Quantity One软件计算基因相对表达值。被检测的目的基因相对表达值 = 目的基因条带灰度值/ β -actin基因条带灰度值。

1.2.5 免疫组化检测: SABC法检测肝组织中的TNF- α 蛋白表达。石蜡切片脱蜡至水,30 mL/L H₂O₂灭活内源性过氧化物酶。封闭非特异性抗原,加1:400稀释的TNF- α 一抗,4℃过夜。二抗、三抗工作液37℃孵育各20 min。DAB显色,

创新盘点
本研究着眼于肝脏病变的早期干预和预防,选用与日常生活相关的茶多酚作为干预药物,源于其较强的抗氧化特性,本文研究其对于肝细胞结构及功能的影响,较全面地了解茶多酚对重要作用的细胞因子TNF- α 的影响。

应用要点

本研究结果为将茶多酚应用酒精性肝病发病的早期阶段,也可将他用作抗炎治疗的辅助剂,减轻肝脏的病损程度提供了一定的理论依据。

表1 TNF- α 的检测结果(mean \pm SD)

分组	肝组织mRNA	血清含量	免疫组化
对照	0.43 \pm 0.09	3.77 \pm 1.02	0.03 \pm 0.02
模型	0.73 \pm 0.07	14.33 \pm 1.87	0.39 \pm 0.19
茶多酚	0.55 \pm 0.05	4.45 \pm 0.83	0.09 \pm 0.07

表3 酒精组与茶多酚组血清AST/ALT的四格表

处理	比值>2	比值<2	合计
酒精	7	2	9
茶多酚组	1	8	9
合计	8	10	18

表2 各组血清ALT、AST、MDA含量比较(mean \pm SD)

分组	n	AST(U/L)	ALT(U/L)	MDA(μ mol/mL)
对照	5	123.20 \pm 60.19 ^a	37.20 \pm 17.42 ^a	3.22 \pm 1.27 ^a
模型	9	226.40 \pm 81.34	97.14 \pm 37.92	7.34 \pm 3.06
茶多酚	9	87.33 \pm 61.00 ^c	57.11 \pm 19.12	2.75 \pm 0.72 ^a

^aP<0.05 vs 模型; ^cP<0.05 vs 对照, 模型.

苏木素复染, 封片, 以磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照. 结果判断: 北航CM-2000B型生物医学图像分析系统, 每张切片随机选取10个高倍视野, 取面密度, 以平均值结果统计分析.

统计学处理 结果以mean \pm SD表示. 各组均数先进行方差齐性检验, 计量资料单因素方差分析. 等级资料采用 χ^2 检验. 多组样本均数之间两两比较采用SNK检验. P<0.05有统计学差异.

2 结果

2.1 实验动物一般情况 对照组被毛光滑, 活泼, 体质量增加, 大便正常. 灌白酒的大鼠精神萎靡、行动迟缓, 皮毛黄、无光泽, 有激惹征象, 部分大鼠大便稀软.

2.2 肝脏大体及组织病理改变 石蜡切片评分: 对照组: 2.60 \pm 1.40. 模型组: 4.50 \pm 1.31. TP干预组: 3.00 \pm 1.59(图1), 模型组与TP干预组有显著性差异. 对照组大鼠肝组织肉眼及光镜下改变不明显, 其他二组肝脏体积稍增大, 边缘变钝, 色泽晦暗, 切面油腻感. 模型组大鼠肝细胞胞质疏松化, 部分细胞气球样变, 胞质内见大小不等的空泡, 苏丹IV染色证实空泡变性的肝细胞内含大小不等、被染成猩红色的脂质. 偶见Mallory小体, 小叶内少量点状坏死, 汇管区及小叶内少量淋巴细胞、嗜中性粒细胞浸润, 但纤维增生不明显. 茶多酚组上述改变明显轻于模型组, 未见纤维增生(图2).

2.3 肝细胞超微结构 模型组大鼠肝细胞内易见脂滴, 线粒体肿胀, 并能见到环状线粒体、内质网扩张, 而茶多酚干预组肝细胞超微结构基本正常(图3).

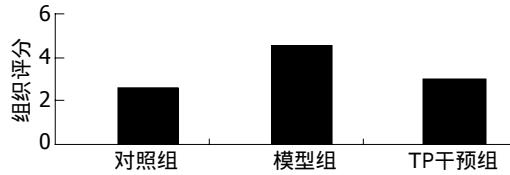


图1 各组HE染色组织切片评分.

2.4 各组血清指标含量和TNF- α 的检测结果 肝组织TNF- α mRNA RT-PCR琼脂糖凝胶电泳图见图4; 肝组织TNF- α 蛋白表达, 免疫组化结果见表1. 免疫组化结果显示: 模型组肝组织TNF- α 阳性细胞数明显多于茶多酚组, 表达强度(面密度)明显高于茶多酚组(P<0.05). 阳性细胞在肝小叶内弥漫分布, 小叶中央静脉周围细胞数相对较多. 枯否细胞有表达(图5). 各组血清ALT、AST、MDA含量比较见表2, 表3.

3 讨论

乙醇进入细胞内, 除了经线粒体氧化代谢, 还可以活化细胞色素P4502E1, 产生大量ROS. 当ROS的量超出机体抗氧化系统的清除能力时, 发生氧应激, 氧应激达到一定强度, ROS氧化细胞膜上不饱和脂肪酸, 导致脂质过氧化, 损伤膜结构. 线粒体是细胞内重要的膜性细胞器, 线粒体膜结构的异常与细胞功能损伤相关联. 肝细胞中AST大约有80%存在于线粒体中. 而ALT主要位于肝细胞的细胞质中, 临幊上对酒精性肝病患者血清检测结果呈现AST/ALT>2的特点, 也提示ALD中肝细胞的超微损伤主要在线粒体. 我们的实验结果显示: 茶多酚组血清AST明显低于模型组, 同时组内动物血清AST/ALT>2的比例小于模型组. 超微结构显示虽然实验动物给与高浓度的白酒7 wk, 但线粒体的结构未见明显异常, 说明同时给予的茶多酚对线粒体有保护作用. 病理切片及特染结果提示该组大鼠肝细胞脂变程度、肝小叶内炎症情况也轻于模型组, 同时血清中脂质过氧化产物丙二醛的含量也低于模型组. 提示茶多酚可减轻ALD病程中的脂质过氧化损伤.

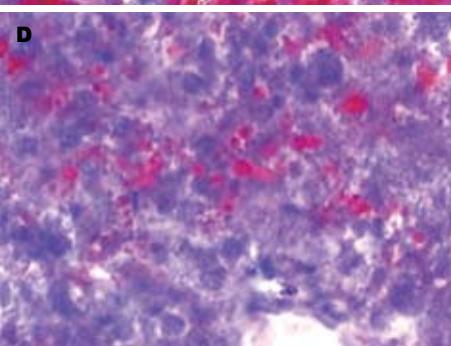
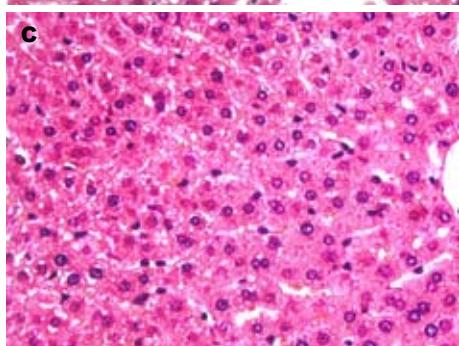
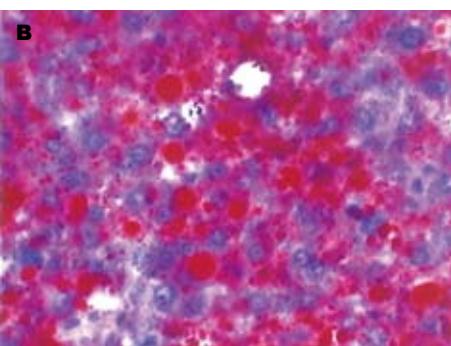
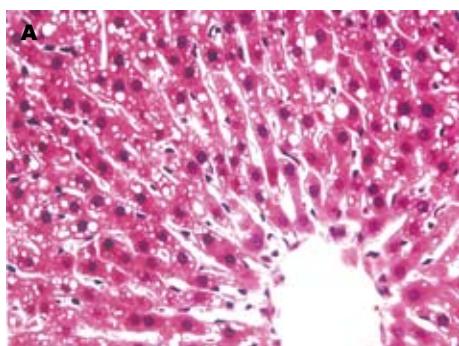


图 2 各组HE染色组织切片及苏丹IV染色. A-B: 模型组, 肝细胞脂变; C-D: 茶多酚组, 肝细胞脂变明显减少. A, C: HE $\times 200$; B, D: 苏丹 $\times 400$.

同行评价
本文设计合理, 方法先进, 逻辑性较强, 具有一定实验价值和理论依据.

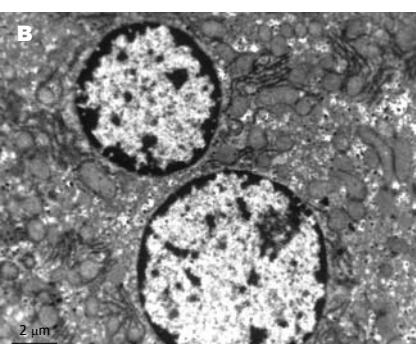
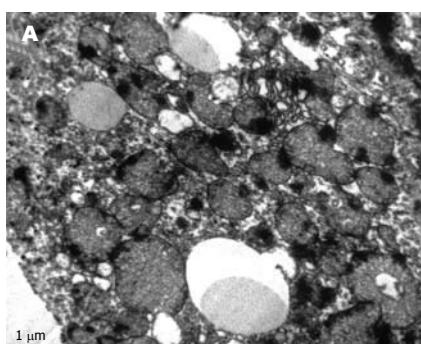


图 3 模型组与茶多酚组肝细胞超微结构比较(TEM $\times 10\,000$). A: 模型组; B: 茶多酚组.

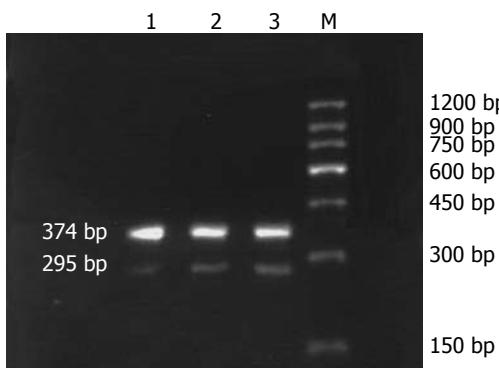


图 4 RT-PCR肝组织TNF- α mRNA表达($n = 3$). 1: 对照组; 2: 茶多酚组; 3: 模型组; M: DNA marker; β -actin: 374 bp, TNF- α : 295 bp.

茶多酚抗氧化作用与结构有关, 他的几种主要成分物质中都含多个羟基, 其B环上的邻二羟基(3', 4'-OH), A环上5和7位上的两个羟基, 以及C环上的3位上的羟基, 提供氢与活性氧的孤电子结合. 儿茶素结构上的3', 4'邻二羟基可将游离金属离子螯合, 减少金属离子活化而产生的

活性氧离子^[3]. 另外, 茶多酚还可以保护抗氧化酶, 提高抗氧化酶的活性^[4], 减少酒精代谢造成的抗氧化剂的过度消耗, 提高细胞抗脂质过氧化能力.

我们的实验还发现: 茶多酚对肝细胞的保护作用不仅直观地体现在形态学上, 还影响ALD病程中的炎症介质. TNF- α 是ALD病程中多效能的前炎症因子, 处于肝细胞损伤的细胞因子网络的核心, 当机体处于应激损伤、急慢性感染情况下, 机体的多种细胞可以合成分泌. 他介导肝细胞的炎症反应, 免疫反应及肝细胞的凋亡和扩增, 肝纤维化等多种病理生理活动^[5]. 应用TNF- α 抑制剂降低TNF- α 水平可减轻酒精性肝损伤^[6-7]. 由于血清中TNF- α 的量并不能完全说明TNF- α 对肝细胞的作用, 近年来人们越来越关心其在不同组织中的表达和变化.

本研究应用RT-PCR、免疫组化、ELISA法分别检测了肝组织及血清中TNF- α 的含量, 从mRNA与蛋白水平证明了茶多酚可以减少ALD

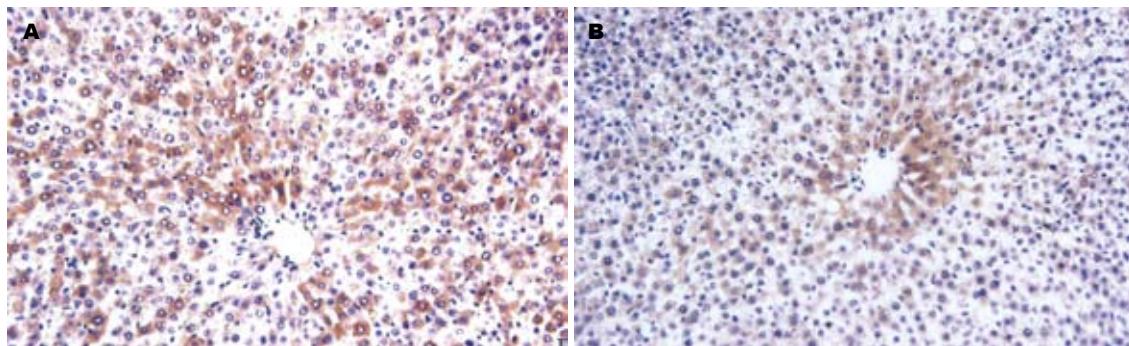


图 5 肝组织TNF- α 免疫组化结果(SABC $\times 100$). A: 模型组; B: 茶多酚组.

病程中TNF- α 的合成和释放。这与张宇、周晓蓉等人的研究结果相近^[8-9]。同时发现这三种方法检测出的TNF- α 的变化方向一致。相对于肝组织中的TNF- α 量的变化，血清中TNF- α 变化更加敏感。分析的茶多酚使TNF- α 减少的原因：(1)茶多酚的抗氧化作用直接减少活性氧，减少ROS引起的转录因子NF- κ B活化，减少受NF- κ B转录调节TNF- α 的基因表达。(2)ALD肠源性内毒素血症也是TNF- α 增多的原因^[10-11]。过量酒精摄入，不仅会改变肠黏膜的通透性，而且会增加肠道内细菌的移位，影响枯否细胞，导致来源于枯否细胞NADPH氧化酶的超氧阴离子以及其他种类的活性氧增多，而茶多酚本身还有抑菌杀菌调节免疫的功能，抑制肠道细菌的过度生长，降低ALD大鼠血清中内毒素含量。减轻LPS对枯否细胞的刺激，减少他所产生的氧自由基。茶多酚可以通过阻断内毒素诱导的枯否细胞NF- κ B的活化而减少TNF- α 的量^[12-13]。

茶多酚作为一种安全高效的抗氧化剂，大量存在于茶叶特别是绿茶中，而现在抗TNF- α 治疗在酒精性肝病的治疗越来越引起人们的重视，我们的研究结果提示：茶多酚对ALD病程中TNF- α 和肝细胞病变有影响，这为茶多酚预防性的应用ALD发病的早期阶段或者将它用作抗炎治疗的辅助剂，减轻肝脏的病损程度提供一定的理论依据。

4 参考文献

1 Suganuma M, Okabe S, Oniyama M, Tada Y,

Ito H, Fujiki H. Wide distribution of [3 H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1771-1776

- 2 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南. 肝脏 2006; 11: 66-68
- 3 刘本英, 王平盛. 茶多酚生物学活性的研究进展. 热带农业科技 2006; 29: 28-30
- 4 Kaviarasan S, Ramamurthy N, Gunasekaran P, Varalakshmi E, Anuradha CV. Epigallocatechin-3-gallate(-)-protects Chang liver cells against ethanol-induced cytotoxicity and apoptosis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 100: 151-156
- 5 高采平, 彭燕. 肿瘤坏死因子- α 与酒精性肝病. 国际消化病杂志 2005; 6: 379-381
- 6 Ponnappa BC, Israel Y, Aini M, Zhou F, Russ R, Cao QN, Hu Y, Rubin R. Inhibition of tumor necrosis factor alpha secretion and prevention of liver injury in ethanol-fed rats by antisense oligonucleotides. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 569-577
- 7 Day CP. Treatment of alcoholic liver disease. *Liver Transpl* 2007; 13: S69-S75
- 8 张宇, 陈韶华, 张幸国, 任国平, 萨小婴, 虞朝辉, 厉有名. 茶多酚治疗慢性酒精性肝损伤的实验研究. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 125-127
- 9 周晓蓉, 龚作炯, 袁光金, 张频. 绿茶多酚对实验性酒精性肝损伤大鼠的治疗作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 50-56
- 10 Bode C, Bode JC. Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 575-592
- 11 韩德五. 肠源性内毒素血症与肝病: 肝衰竭的IETM学说. 第1版. 北京: 中国科学技术出版社, 2004; 2: 78-109
- 12 Yang F, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr* 1998; 128: 2334-2340
- 13 McVicker BL, Tuma DJ, Kharbanda KK, Kubik JL, Casey CA. Effect of chronic ethanol administration on the in vitro production of proinflammatory cytokines by rat Kupffer cells in the presence of apoptotic cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: 122-129

编辑 李东辉 电编 何基才



TLR2在大鼠急性坏死性胰腺炎中末端回肠的表达及意义

马继民, 崔杰, 杨志军

马继民, 崔杰, 杨志军, 皖南医学院附属马鞍山中心医院急诊外科 安徽省马鞍山市 243000
马继民, 2002年安徽医科大学硕士, 副主任医师, 主要从事急诊与危重病医学方向研究。
作者贡献分布: 此课题有马继民、崔杰设计; 研究过程由马继民、杨志军完成; 本论文写作由马继民、崔杰、杨志军完成。
通讯作者: 马继民, 243000, 安徽省马鞍山市湖东北路, 马鞍山市中心医院急诊外科. shixined@hotmail.com
电话: 0555-2881119
收稿日期: 2007-10-09 修回日期: 2008-01-16

Expression of Toll-like receptor 2 in distal ileum of rats with acute necrotizing pancreatitis and its significance

Ji-Min Ma, Jie Cui, Zhi-Jun Yang

Ji-Min Ma, Jie Cui, Zhi-Jun Yang, Department of Emergency Surgery, Maanshan Central Hospital, Wannan Medical College, Maanshan 243000, Anhui Province, China
Correspondence to: Ji-Min Ma, Department of Emergency Surgery, Maanshan Central Hospital, Wannan Medical College, Hudong Northern Road, Maanshan 243000, Anhui Province, China. shixined@hotmail.com
Received: 2007-10-09 Revised: 2008-01-16

Abstract

AIM: To investigate the expression of Toll-like receptor 2 (TLR2) in distal ileum of rats with acute necrotizing pancreatitis (ANP) and its significance.

METHODS: Sixty SD rats were randomly divided into ANP group ($n = 40$) and sham-operation group ($n = 20$). TLR2 mRNA expression in distal ileum of rats was detected by real-time PCR, and its protein expression was determined by immunohistochemistry and Western blot.

RESULTS: The expression levels of TLR2 mRNA and its protein were significantly higher in the ANP group than in the sham-operation group. Western blot showed that the TLR2 mRNA expression level was correlated with the pathological scores ($r = 0.42, P < 0.01$) and permeability ($r = 0.41, P < 0.01$) of intestinal mucosa. Immunohistochemistry displayed that the TLR2 protein expression was rather high on ileum mucosa surface, in T and B lymphocytes,

histoleucocytes, histoleucocytes and eosinocytes of lamina propria, arteries and veins of submucosa, longitudinal and circular muscular layers of the ANP group.

CONCLUSION: Expression of TLR2 is increased in the distal ileum of rats with ANP. Its overexpression may correlate with intestinal mucosa injury and development of enterogenic infection.

Key Words: Acute necrotizing pancreatitis; Toll-like receptor 2; Intestinal mucosa permeability; Enterogenic infection; Western blotting; Immunohistochemistry

Ma JM, Cui J, Yang ZJ. Expression of Toll-like receptor 2 in distal ileum of rats with acute necrotizing pancreatitis and its significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 361-365

摘要

目的: 研究大鼠急性坏死性胰腺炎(ANP)末端回肠组织中Toll样受体2(TLR2)的表达及意义。

方法: 60只大鼠随机分为2组: 假手术组20只, ANP组40只。采用逆行胰胆管注射5%牛磺胆酸钠制作大鼠ANP模型, 并又分为8 h和16 h组。应用实时定量PCR检测不同组、不同时点末端回肠组织TLR2 mRNA的表达, 应用Western blot和免疫组化分析各组TLR2蛋白表达变化及组织学定位。

结果: 与假手术组相比, ANP时末端回肠组织TLR2 mRNA及蛋白表达显著升高, TLR2的表达水平分别与肠黏膜的病理学评分($r = 0.42, P < 0.01$)和肠黏膜通透性($r = 0.41, P < 0.01$)呈正相关。免疫组化发现, ANP组的回肠黏膜表面、黏膜固有层的T、B淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性细胞、黏膜下层的动静脉、纵形和环形肌层等处都有比较强的TLR2的表达。

结论: ANP时末端回肠组织内TLR2 mRNA和蛋白表达上调, 可能与ANP肠黏膜的病理改变和肠源性感染的发生与发展有关。

关键词: 急性坏死性胰腺炎; Toll样受体2; 肠黏膜

背景资料
急性坏死性胰腺炎(ANP)是一类起病急、病死率高、涉及多个脏器的危重症疾病, 胰腺坏死组织继发感染是ANP患者死亡的主要原因。Toll样受体(TLRs)是新近被认识的病原相关分子模式(PAMP)的受体, 是内毒素信号转导链中致病的关键环节, 且被认为是炎症瀑布链式反应的闸门。探讨TLRs在急性坏死性胰腺炎肠源性感染中可能的作用, 可望为阐明ANP肠源性感染的发病机制, 寻找ANP新的干预途径和治疗靶点提供理论基础。

同行评议者
洪天配, 教授, 北京大学第三医院
内分泌科

研发前沿

迄今ANP继发肠源性感染的机制尚不清楚。ANP时发生的肠道屏障损害可能是肠道细菌移位的一个重要原因，TLRs的激活及引发的下游一系列信号分子活化则可能是过度炎症反应造成肠黏膜屏障功能受损的关键点。

通透性；肠源性感染；免疫印迹；免疫组化

马继民, 崔杰, 杨志军. TLR2在大鼠急性坏死性胰腺炎中末端回肠的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 361 - 365
<http://www.wjnet.com/1009-3079/16/361.asp>

0 引言

急性坏死性胰腺炎(ANP)是一类起病急、病死率高、涉及多个脏器的危重症疾病，胰腺坏死组织继发感染是ANP患者死亡的主要原因^[1]。在急性胰腺炎早期，肠道是全身炎症反应的一个靶器官，而肠道屏障损害所致的肠道细菌或毒素移位是ANP时细菌入侵的主要途径^[2-4]。Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)是病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)的受体，是内毒素信号转导链中致病的关键环节^[5]。TLR2作为脂多糖(LPS)受体，可能作为急性炎症反应损伤的扳机点，启动机体的这种病理过程。本实验制作大鼠ANP模型，观察ANP时末端回肠组织TLR2的表达情况，探讨TLR2在ANP肠源性感染中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年SD大鼠60只，体质量200±20 g，由东南大学医学院实验动物中心提供。牛磺胆酸钠(Sigma公司)，TRIzol试剂盒(Invitrogen公司)，Taq聚合酶、MMLV反转录酶(Promega公司)，10 000×Sybergreen(Molecular Probes公司)，Rotor-Gene 3000 Real time PCR仪(Corbett Research公司)，一抗为羊抗大鼠TLR2多克隆抗体(Santa cruz公司)，鼠抗羊二抗购自Jacksonimmuno公司。

1.2 方法

1.2.1 模型制备：60只大鼠随机分为2组，假手术组20只，ANP组40只。试验前大鼠禁食12-16 h，自由饮水。ANP组采用逆行胰胆管注射50 g/L牛磺胆酸钠(1 mL/kg体质量)，假手术组仅轻轻翻动胰腺3次后关腹。关腹后背部sc生理盐水4-6 mL作为补液，术后将大鼠放回代谢笼。假手术组在术后8 h处死大鼠，ANP组分别于术后8 h和16 h两个时相点(P8、P16)处死大鼠，提取部分末端回肠组织。新鲜回肠组织于40 g/L甲醛溶液中固定12 h后，常规石蜡包埋、切片。其余组织-70℃冻存备用。

1.2.2 肠黏膜通透性检测及病理学评分：采用^{99m}锝-亚锡喷替酸法(^{99m}technetium diethlene

表 1 PCR引物核苷酸序列

基因	引物序列	产物长度(bp)
TLR2	上游引物: 5' - AGAGGGAAATCGTCGTGAC - 3' 下游引物: 5' - CCATACCCAGGAAGGAAGGCT - 3'	137
β-actin	上游引物: 5' - ACTGGCGTGTTCATCCGTTCT - 3' 下游引物: 5' - CGCAATCCAGGCCACTACTTC - 3'	195

triamine pentacetic acid, ^{99m}Tc-DTPA)检测肠黏膜通透性^[6]：术中于近端空肠内缓慢注入1.5 mCi ^{99m}Tc-DTPA。术后放入代谢笼，留取8 h和16 h尿液，用放射免疫γ计数器测定上述时点尿中^{99m}Tc-DTPA脉冲数。末端回肠用40 g/L的甲醛固定后，石蜡包埋、切片，常规HE染色，光镜下观察。按参考文献进行肠黏膜病理学评分^[2]。

1.2.3 总RNA抽提：用TRIzol法抽提总RNA，紫外分光光度计测定总RNA的纯度，变性琼脂糖凝胶电泳初步评价总RNA。符合标准的总RNA A_{260}/A_{280} 在1.8-2.1之间，琼脂糖凝胶电泳，18 S和28 S电泳条带清晰，28 S和18 S亮度之比≥2.1。抽提的总RNA于-70℃保存备用。

1.2.4 实时定量PCR：应用Primer premier 5.0软件，参照TLR2基因序列设计引物，β-actin作为内参基因(表1)。引物由上海康成生物公司合成。每份标本取5 μg总RNA，在MMLV反转录酶作用下合成cDNA，针对每一需要测量的基因和管家基因，进行PCR反应以制备用于绘制标准曲线的梯度稀释DNA模板，反应体系：cDNA 1 μL，上下游引物各0.5 μL，Sybergreen 0.5 μL，总反应体积为25 μL，反应条件：94℃ 20 s, 58℃ 20 s, 72℃ 30 s, 45个循环；72℃延伸5 min。将PCR产物进行10倍梯度稀释：设定PCR产物浓度为1，分别稀释为 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} 和 1×10^{-7} 这几个梯度浓度的DNA。几个梯度稀释的DNA模板以及所有cDNA样品分别配置Real time PCR反应体系：cDNA 1 μL，上下游引物各0.5 μL，Sybergreen 0.5 μL，总反应体积为25 μL。反应条件：β-actin：94℃ 5 min; 35个PCR循环(94℃ 20 s, 60℃ 20 s, 72℃ 20 s, 88℃ 10 s, TLR2: 94℃ 5 min; 40个PCR循环(94℃ 20 s, 59℃ 20 s, 72℃ 20 s, 85℃ 10 s, TLR4: 94℃ 5 min; 35个PCR循环(94℃ 20 s, 58℃ 20 s, 72℃ 20 s, 87.5℃ 10 s)。为建立PCR产物的熔解曲线，每次扩增反

表 2 肠黏膜组织病理学评分及肠黏膜通透性(%) 的比较
(mean ± SD)

分组	假手术组	ANP组	
		8 h	16 h
肠黏膜	0.58 ± 0.18	1.90 ± 0.74 ^b	3.10 ± 0.99 ^b
病理学评分			
^{99m} Tc-DTPA 排泄率	5.39 ± 0.78	24.61 ± 2.51 ^b	37.12 ± 2.71 ^b

^bP<0.01.

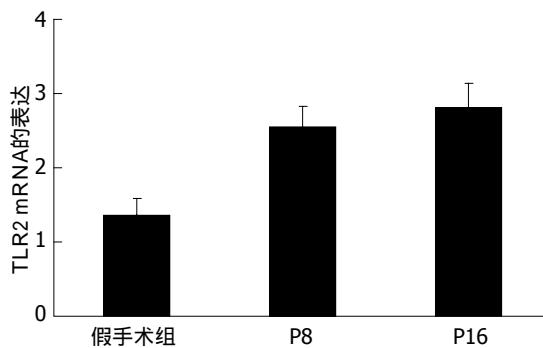


图 1 对照组和ANP肠组织中TLR2 mRNA的表达.

应结束后均继续从72℃缓慢加热到99℃(每5 s升高1℃). 最后, 用标准曲线法定量.

1.2.5 免疫印迹: 称取200 mg组织研磨粉碎后, 抽提总蛋白, 按蛋白质定量试剂盒操作说明测定蛋白浓度, 配制含50 μg总蛋白的样品液. 将准备好的样品液和生物素标记的蛋白质分子量标准分别上样, 行SDS-PAGE电泳. 电转移到膜上, 用50 g/L BSA封闭. 封闭过的膜加入一抗(1:300)室温孵育1.5 h, PBS洗膜3次, 加入HRP标记的二抗(1:5000)以结合一级抗体及HRP标记的生物素抗体, 室温孵育1 h, PBS洗膜3次. 对反应好的膜进行化学发光, 以X光胶片曝光、显影、定影, 图片扫描保存为电脑文件, 并用Image J分析软件将图片上每个特异条带灰度值数字化.

1.2.6 免疫组化: 石蜡切片常规脱蜡至水, 30 g/L H₂O₂封闭内源性过氧化物酶10 min, 将切片浸入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)煮沸, 10 min后重复1次, 加入一抗(1:100)孵育1 h. 加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:100)孵育20 min; PBS洗3次, 加SABC工作液, DAB显色, 最后苏木素复染, 脱水、透明、封片, 光镜下观察.

统计学处理 实验数据用mean±SD表示. 用Prism软件包(美国圣地亚哥GraphPad软件公司)进行统计学分析. 组间差异用Mann-Whitney U

检验或精确χ²检验. 相关性分析用Spearmann相关性分析法. P<0.05为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 淀粉酶测定值和病理形态学观察 ANP组血清淀粉酶值在相应时间点均显著高于对照组, 且随时间推移, 其测定值逐渐增加. 开腹后肉眼观察所见: ANP组大鼠腹腔内可见较多血性腹水, 肠系膜、大网膜出现皂化斑, 胰腺可见充血水肿、出血坏死灶及皂化斑, 病变以胰头、体部为重, 结肠及小肠管壁充血水肿, 小肠色泽暗红, 肠蠕动明显减少, 弹力减弱, 对照组大鼠腹腔内无腹水, 胰腺和肠管未见明显异常改变. 肠黏膜组织病理学评分见表2.

2.2 肠黏膜通透性检测 与假手术对照组相比, ANP发生8 h后^{99m}Tc-DTPA排泄率明显增加, 到16 h时, 其排泄率仍在增加, 提示肠黏膜通透性增加(表2).

2.3 末端回肠组织TLR2 mRNA表达的变化 TLR2 mRNA在假手术组表达水平较低, 而ANP组8 h则开始明显增高(P<0.05), 8 h后仍继续升高, 到16 h仍维持较高水平(图1).

2.4 ANP时TLR2的表达与肠黏膜损害的关系 将所检测的TLR2的mRNA表达量分别与肠黏膜的病理学评分及通透性指数进行相关性分析, 结果发现, TLR2的表达水平分别与肠黏膜的病理学评分($r = 0.42, P < 0.01$)和肠黏膜通透性指数($r = 0.41, P < 0.01$)明显相关(图2).

2.5 末端回肠组织TLR2蛋白表达水平的变化 Western blot结果显示, 假手术组末端回肠组织中, TLR2蛋白的表达处于较低水平, 呈一条较淡的灰色蛋白条带. 在ANP组中, TLR2表达则明显增加, 与前者相比, 灰度值间差别具有统计学意义($P < 0.05$), ANP 8 h和16 h组间, TLR2蛋白的表达则无显著差别($P > 0.05$, 图3).

2.6 TLR2的组织学定位 应用免疫组化技术进行假手术组和ANP大鼠末端回肠组织中TLR2的组织学定位. 正常对照组仅在肠黏膜的表面有比较弱的TLR2的表达. 与之相比, ANP组的回肠黏膜表面、黏膜固有层的T、B淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性细胞、黏膜下层的动静脉、纵形和环形肌层等处都有比较强的TLR2的表达. 至术后16 h上述细胞仍保持高表达(图4).

3 讨论

胰腺及胰周感染是ANP的严重并发症, 临幊上

相关报道
有文献报道TLRs的激活在ALI中具有重要作用, 应用TLRs抗体能有效降低脓毒症引起的ALI; 在多病原菌导致的脓毒症中, TLR2/4表达的上调与死亡率的增加密切相关; TLRs作为天然免疫的受体在启动ALI早期的炎症反应及连接特异性免疫中起到了桥梁的作用, 对ALI发生发展及改善预后发挥了重要的作用.

创新盘点

本文通过制作大鼠ANP模型，观察ANP时末端回肠组织TLR2的表达情况及其与肠黏膜通透性改变的关系，探讨TLR2在ANP肠源性感染中的作用。

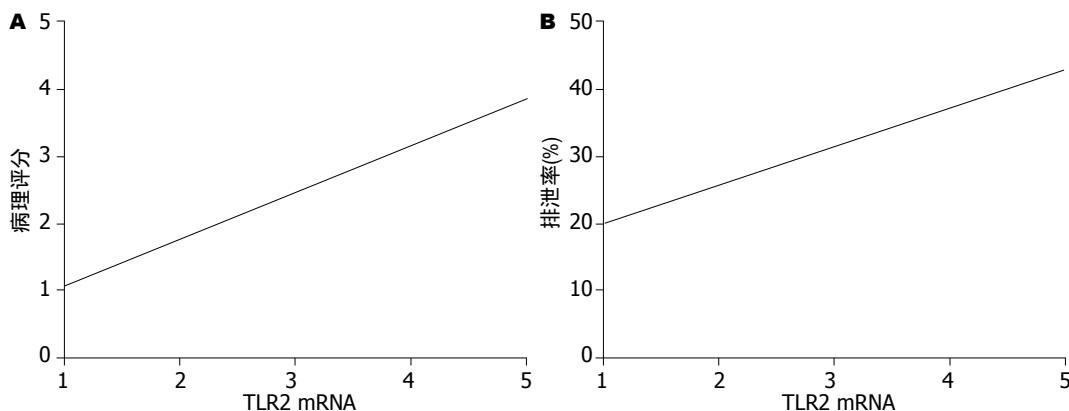


图 2 TLR2的mRNA表达量. A: 肠黏膜的病理学评分; B: 肠黏膜通透性.

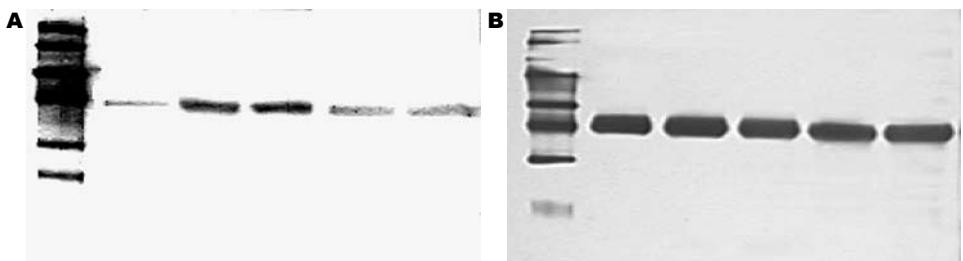


图 3 Western blot检测TLR2和 β -actin在假手术组和ANP肠组织中的表达. A: TLR2表达结果; B: β -actin表达结果.

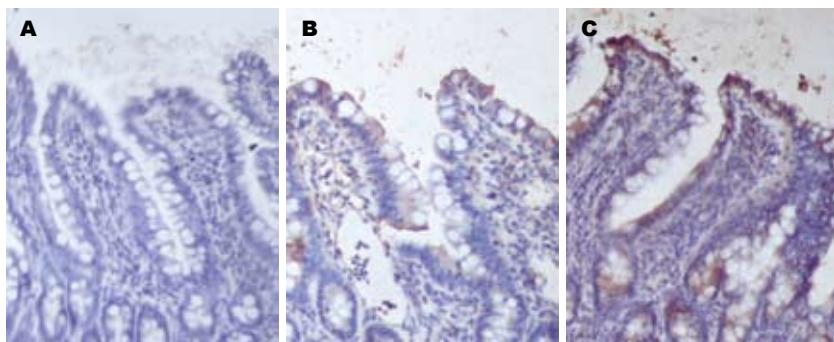


图 4 假手术组和ANP组织TLR2的表达(免疫组织化学染色 $\times 200$). A: 假手术组; B: ANP 8 h; C: ANP 16 h.

ANP患者的死亡主要是由于胰腺坏死组织继发感染所致^[7]。胰腺感染主要是由移位的肠道细菌或毒素所致的肠源性感染。在急性胰腺炎早期，肠道是全身炎症反应的一个靶器官，而发生的肠道屏障损害则成为肠道细菌移位的一个重要原因。发生移位的细菌和内毒素进一步使循环中的细胞因子和炎症介质升高，对全身各脏器造成再次损害，形成所谓的“二次打击”^[8-10]，即使程度并不严重，也可引发不同程度全身炎症反应综合征(SIRS)，SIRS过程中将会引起链式反应，产生大量的炎症介质，如肿瘤坏死因子(TNF)、IL-6、IL-8、IL-2和白三烯等，加重肠黏膜屏障损伤，导致肠黏膜通透性继续增高，如此形成恶性循环^[11-12]。因此，如何保护急性胰腺炎时的肠道屏障功能、降低肠黏膜通透性，进而减少肠道细菌移位，成为防治胰腺感染的重要

途径。

TLRs属于I类跨膜受体，广泛分布于单核巨噬细胞系统、内皮细胞、树突细胞、部分消化道上皮等^[13-14]，其配体包括肽聚糖(PGN)、脂磷壁酸(LTA)和脂蛋白等，是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁。目前已发现人类的TLR有11位成员(TLR1-11)，其中对TLR4和TLR2的研究最为广泛。TLR2主要识别革兰氏阳性菌细胞壁成分。TLRs的激活将引起一系列下游分子的活化，最后激活通用转录因子NF- κ B，最终引起以TNF- α 等为中心的前炎症因子激活，导致多种炎症因子的瀑布式释放而产生生物学效应^[15]。因此，TLRs的激活及引发的下游一系列信号分子活化可能是过度炎症反应造成肠黏膜屏障功能受损的关键点。

本试验结果显示：假手术组大鼠末端回肠

组织中仅有少量TLR2的表达, 而ANP时TLR2表达均明显上调, 且TLR2的表达与肠黏膜病理改变和通透性相关。此结果提示ANP可引起末端回肠组织TLR2的表达的上调, TLR2的过度表达可能参与了ANP的病理生理过程。ANP时末端回肠组织TLR2表达上调的机制尚不清楚, 内毒素和LPS可能是重要的刺激因素之一。急性胰腺炎时, 肠道屏障的损坏, 可使肠道内大量内毒素和LPS吸收入血, 从而诱导TLR2的表达。有文献报道, 大量LPS存在时TLR2起着加速炎症反应的作用, 进一步诱导TNF- α 产生, 而这些致炎因子也能增强TLR2 mRNA表达^[12], 如此而形成恶性循环, 加重器官损害。因此, ANP时, 对TLR2基因表达进行适当的调节, 可能为减轻肠屏障的损害、防治肠源性感染提供新的思路。

4 参考文献

- 1 石欣, 高乃荣, 杨永久, 霍明东, 胡浩霖, 郭庆明. 急性坏死性胰腺炎肠粘膜损害与NK-1R的过度表达相关. *中国病理生理杂志* 2003; 19: 1049-1053
- 2 Takahashi Y, Fukushima J, Fukusato T, Shiga J, Tanaka F, Imamura T, Fukayama M, Inoue T, Shimizu S, Mori S. Prevalence of ischemic enterocolitis in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005; 40: 827-832
- 3 Penalva JC, Martínez J, Lameda R, Esteban A, Muñoz C, Sáez J, Such J, Navarro S, Feu F, Sánchez-Payá J, Pérez-Mateo M. A study of intestinal permeability in relation to the inflammatory response and plasma endocan IgM levels in patients with acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 512-517
- 4 Ammori BJ, Fitzgerald P, Hawkey P, McMahon MJ. The early increase in intestinal permeability and systemic endotoxin exposure in patients with severe acute pancreatitis is not associated with systemic bacterial translocation: molecular investigation of microbial DNA in the blood. *Pancreas* 2003; 26: 18-22
- 5 Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 2007; 40: 97-112
- 6 Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990; 107: 574-580
- 7 Carnovale A, Rabitti PG, Manes G, Esposito P, Pacelli L, Uomo G. Mortality in acute pancreatitis: is it an early or a late event? *JOP* 2005; 6: 438-444
- 8 Foitzik T. Pancreatitis and nutrition. Significance of the gastrointestinal tract and nutrition for septic complications. *Zentralbl Chir* 2001; 126: 4-9
- 9 Mole DJ, Taylor MA, McFerran NV, Diamond T. The isolated perfused liver response to a 'second hit' of portal endotoxin during severe acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5: 475-485
- 10 Furuya T, Soeno T, Komatsu M. Strategy for bacterial translocation in acute pancreatitis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2004; 101: 502-509
- 11 Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganter D, Haller H, Dietz R, Luft FC. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2002; 2: 3
- 12 Wang Z, Castresana MR, Detmer K, Newman WH. An IkappaB-alpha mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Surg Res* 2002; 102: 198-206
- 13 Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 5197-5203
- 14 Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000; 164: 966-972
- 15 Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998; 395: 284-288

名词解释

病原相关分子模式(PAMP): 是病原体的小分子序列。他们被Toll样受体和其他模式识别受体(PRR)来识别。细菌内毒素脂多糖(LPS)被认为是原型的病原相关分子模式。其他的病原相关分子模式包括细菌鞭毛, 革兰氏阳性菌脂磷壁酸(LTA), 肽聚糖和病毒的核酸如双链RNA或非甲基化的CpG特征序列。

同行评价

本文设计较合理, 具有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

小肠CT造影对比剂的优选

宋富珍, 程英升, 朱悦琦, 赵培荣, 赵俊功, 赵炳辉

背景资料

小肠是胃肠道最长的器官, 其走行弯曲, 肠管常互相重叠, 且生理情况下存在舒张和收缩状态。为避免肠管收缩, 常服对比剂以充盈胃肠道, 形成良好的对比, 获得高质量的图像。而肠道清洁良好、肠腔充分扩张, 才能更好的观察肠腔内外及肠壁的情况。

宋富珍, 程英升, 朱悦琦, 赵培荣, 赵俊功, 赵炳辉, 上海市第六人民医院放射科 上海市 200233

宋富珍, 2005级苏州大学硕士研究生在读, 主要研究方向为胃肠道CT诊断。

作者贡献分布: 此课题由宋富珍, 程英升, 朱悦琦, 赵培荣, 赵俊功及赵炳辉设计; 研究过程由宋富珍, 程英升, 朱悦琦及赵培荣操作完成; 图像分析由宋富珍, 程英升, 赵培荣及赵俊功完成; 本论文写作由宋富珍及程英升完成。

通讯作者: 程英升, 200233, 上海市第六人民医院放射科。

chengys@sh163.net

电话: 021-64823392

收稿日期: 2007-12-07 修回日期: 2008-01-15

scanning.

RESULTS: All the Beagles finished small-intestine CT enteroclysis. The enteric cavity widths were compared between pure milk, pure water and angiografin groups ($F = 28.115$, $P < 0.01$). There was no statistical significance in enteric cavity width between the pure water and angiografin groups, as well as in the thickness of intestinal wall between the three groups. The difference in CT value was 69.25 ± 6.28 HU when the contrast coefficient for the enteric cavity and intestinal wall was the best in pure milk and pure water group.

CONCLUSION: Pure milk is an ideal contrast agent for small-intestine CT enteroclysis, which can fully distend the intestinal canal and demonstrate the enteric cavity and intestinal wall.

Key Words: Contrast agent; Small-intestine computed tomography enteroclysis; Beagle

Song FZ, Cheng YS, Zhu YQ, Zhao PR, Zhao JG, Zhao BH. Optimization of contrast agents for small intestine computed tomography enteroclysis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 366-371

Optimization of contrast agents for small intestine computed tomography enteroclysis

Fu-Zhen Song, Ying-Sheng Cheng, Yue-Qi Zhu, Pei-Rong Zhao, Jun-Gong Zhao, Bing-Hui Zhao

Fu-Zhen Song, Ying-Sheng Cheng, Yue-Qi Zhu, Pei-Rong Zhao, Jun-Gong Zhao, Bing-Hui Zhao, Department of Radiology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Ying-Sheng Cheng, Department of Radiology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China. chengys@sh163.net

Received: 2007-12-07 Revised: 2008-01-15

Abstract

AIM: To evaluate which contrast agents can fully distend the intestinal canal and demonstrate the enteric cavity and intestinal wall in computed tomography (CT) enteroclysis.

METHODS: After 8 healthy grown-up Beagles were anesthetized, a catheter was inserted to the Treitz ligament of duodenum, 654-2 was injected through the veins, and different contrast agents including pure water and milk and 10 mL/L angiografin were infused through the catheter. After MSCT plain scanning, enhancement scanning was performed. Width of the enteric cavity and thickness of the intestinal wall measured through the transverse section and multi-planar reconstruction were statistically analyzed. Plain scanning of intestinal wall was performed. CT values, contrast coefficient of enteric cavity and intestinal wall density, and difference in enteric cavity and intestinal wall density were measured 20 s, 30 s, 40 s, and 50 s after enhancement

摘要

目的: 评价何种对比剂在小肠CT造影时能充分充盈扩张肠管、不易形成伪影, 在显示小肠肠腔、肠壁方面最佳。

方法: 8条健康成年毕格犬麻醉后, 插管至十二指肠屈氏韧带以下, 静脉注射654-2, 经导管注入不同的对比剂: 纯水、纯牛奶、10 mL/L泛影葡胺后行MSCT扫描, 平扫结束后行增强扫描。通过横断面及多平面重建, 测量肠腔宽度、肠壁厚度, 对各组测量及评价结果进行统计学分析。同时测量平扫、增强后20 s、30 s、40 s、50 s时肠壁的CT值, 测量计算肠腔与肠壁对比程度最好时, 肠腔与肠壁密度的CT值差值范围。

结果: 在肠腔宽度的比较上, 纯牛奶组与纯水组、泛影葡胺组的差异有统计学意义($F = 28.115$, $P < 0.01$), 纯水组与泛影葡胺组无明显

统计学差异; 在肠壁厚度的比较上, 纯牛奶组、纯水组、泛影葡胺组的差异均无明显统计学差异。纯水与纯牛奶组肠腔、肠壁显示最好, 此时肠壁与肠腔密度的差值为 69.25 ± 6.28 HU。

结论: 纯牛奶是较理想的小肠CT造影对比剂, 能够充分充盈扩张肠腔, 同时能够较好的显示肠腔、肠壁的情况。

关键词: 对比剂; 小肠CT造影; 毕格犬

宋富珍, 程英升, 朱悦琦, 赵培荣, 赵俊功, 赵炳辉. 小肠CT造影对比剂的优选. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 366-371
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/366.asp>

0 引言

小肠是胃肠道最长的器官, 因其走行弯曲, 肠管常互相重叠, 且小肠为空腔脏器, 生理情况下存在舒张和收缩状态^[1-3]。为避免肠管收缩, 常服对比剂以充盈胃肠道, 形成良好的对比, 获得高质量的图像。小肠检查时的肠道准备非常重要, 如果小肠内有食物残渣, 就会影响肠腔的充盈与扩张。因此, 检查前尽量保证肠道的清洁度, 国外学者大多运用插管法小肠灌肠进行肠道准备^[4]。肠道清洁良好、肠腔充分扩张, 才能更好的观察肠腔内外及肠壁的情况。影像新技术小肠CT造影(CT enteroclysis, CTE)就是使用大剂量对比剂充盈小肠肠腔, 进行CT平扫及增强扫描, 将图像进行后处理, 使小肠肠腔、肠壁、壁外系膜、血管、后腹膜及腹内实质脏器全景式多方位显示出来^[5]。小肠CT造影技术在临床上的应用已不少见^[6-9], 逐渐成为诊断小肠疾病的重要手段^[10]。使用合适的对比剂将小肠充分充盈扩张是小肠CT造影检查的关键所在。本研究旨在初步探讨纯牛奶作为一种对比剂能够充分充盈扩张肠腔, 更易于观察肠腔和肠壁的情况。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年毕格犬8条, 体质量12-16 kg, 雌雄不限, 由上海市第六人民医院实验动物中心提供。纯水(温白开水), 纯牛奶(脂肪含量3.5%, 上海光明乳业股份有限公司), 10 mL/L泛影葡胺(上海旭东海普药业有限公司生产), 碘帕醇(Bracco, Italy生产, 上海博莱科信谊药业有限责任公司包装), 654-2(山莨菪碱, 上海第一生化药业有限公司), 16排螺旋CT机器(SOMATOM Sensation 16, 德国西门子公司)及同级工作站(Volume Wizard),

DSA机器及同级工作站, 导管(6F Cordis)及配套导丝。

1.2 方法

1.2.1 实验步骤: 毕格犬适应性喂养1 wk后, 于实验前禁食、禁水2 d, 分别于实验前24 h、10 h灌200 mL/L甘露醇500 mL, 以清洁肠道。麻醉后, 在DSA透视下自犬口腔, 在导丝引导下, 将导管插至十二指肠屈氏韧带以下, iv 654-2 1.5 mL, 2 min后经导管注入对比剂纯水480 mL, 注射速率1.5 mL/s, 5 min后进行螺旋CT平扫, 然后静脉注射碘帕醇行CT增强扫描。间隔1 wk后, 每条犬用同样的方法注入对比剂纯牛奶(脂肪含量3.5%), 进行螺旋CT扫描成像。再间隔1 wk后, 向每条犬同法注入对比剂泛影葡胺(浓度为10 mL/L), 进行螺旋CT扫描成像。

1.2.2 扫描方法: 犬取仰卧位, 应用Siemens SOMATOM Sensation 16螺旋CT检查, 扫描时应用CARE DOSE 4D智能剂量软件, 扫描范围从膈顶至盆腔, 平扫后行CT增强扫描。参数为120 kV, 150 mAs, 层厚、层距均为2 mm, 球管旋转时间0.5 s, 螺距为1.0, 每周进床12 mm, Kernel系数B31f smooth, FOV 220-300 mm。对比剂为370 gI/L碘帕醇20 mL, 注射速率1 mL/s, 分别于20 s、30 s、40 s、50 s进行扫描, 将数据传至工作站后观察、分析图像, 并用多平面重建法(MPR)进行重建。

1.2.3 观察方法: 为便于测量计算, 本实验中将解剖学上全部小肠分组进行合并后分为3组: 第1组为十二指肠(中上腹)和上部空肠(左上腹), 第2组为下部空肠(左下腹)和上部回肠(中腹), 第3组为中部回肠(右中腹)和下部回肠(中下腹), 分别简称为第1、2、3组小肠。

1.2.4 观察指标: 分别测量注入不同对比剂的每组小肠的肠腔宽度、肠壁厚度(以mean±SD表示), 分别进行组内、组间比较, 利用统计学分析方法判断有无显著性差异。分别测量平扫、增强扫描后20 s、30 s、40 s、50 s时肠壁的CT值, 计算肠腔与肠壁对比程度最好时, 肠腔与肠壁密度CT值差值范围。最后由2名经验丰富的放射科专科医师采用盲法阅片, 对小肠肠腔的充盈扩张程度、肠壁结构的显示、肠壁密度及强化程度的影像质量进行评估, 按照整段小肠的显示情况分别进行评分。把整段小肠肠腔扩张的程度<30%、30%-50%、50%-80%、>80%分别记作0、1、2和3分; 肠壁结构的显示不满意为0分、满意为1分; 增强扫描后肠壁与肠腔的对比

研发前沿
小肠CTE把MSCT及插管法结合起来, 能够较好地观察肠腔内、黏膜、肠壁、邻近器官及周围组织结构, 更易于发现病变。因此选择能充分扩张肠管、不形成伪影而且对人体无害、与肠壁对比度良好的对比剂非常重要。

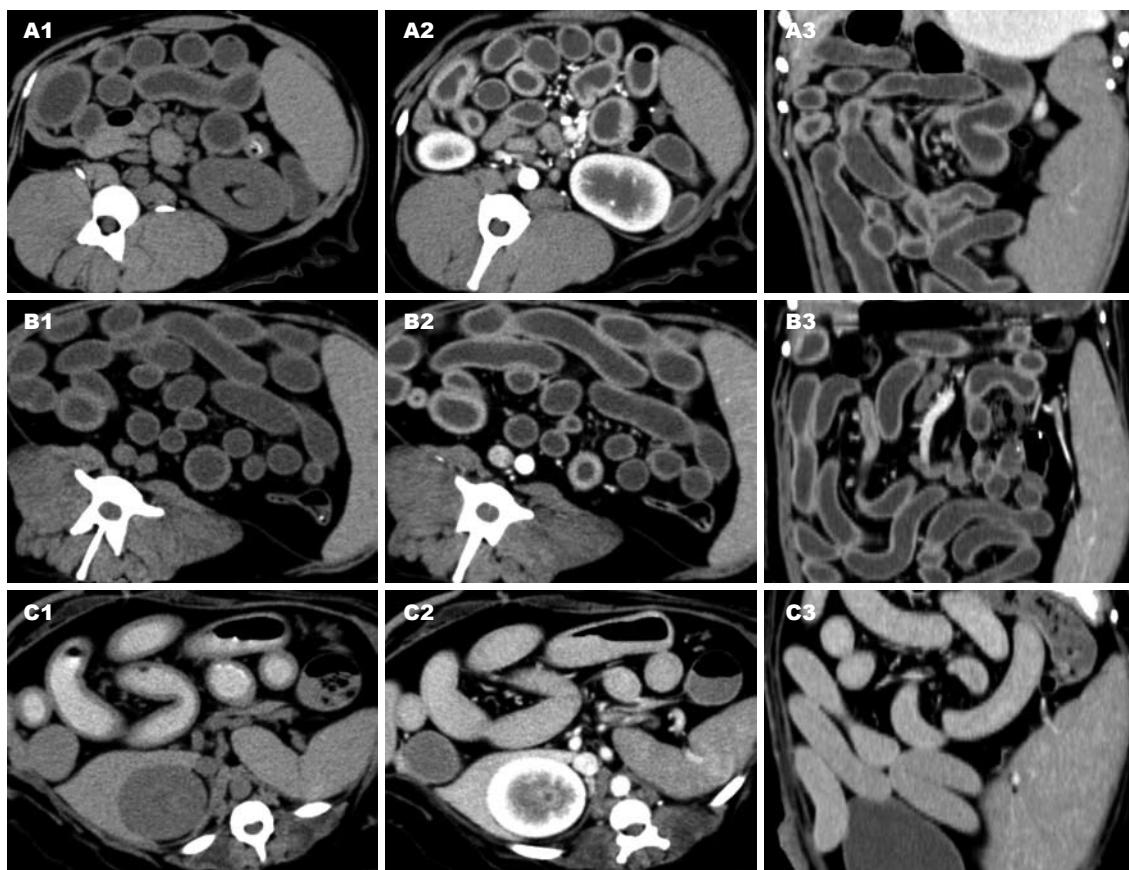


图 1 注入不同对比剂小肠CT造影图像. A: 纯水; B: 纯牛奶; C: 泛影葡胺; 1: 平扫; 2: 增强; 3: MPR重建.

周围组织结构才能显示良好, 才更易发现病变。小肠CTE检查技术的关键是用合适的对比剂将小肠充分充盈扩张^[20]。因此, 选择能充分扩张肠管、不形成伪影而且对人体无害, 与肠壁的对比度良好的对比剂非常重要。

目前常用的阳性对比剂主要是泛影葡胺、硫酸钡的混悬液, 以泛影葡胺应用最多, 但伪影较重, 由于容积效应, 肠壁结构常常显示不清楚^[21-22], 而且增强扫描时, 肠腔内与肠壁CT值相仿, 对比程度较差, 不易发现病变。

中性对比剂水的应用较为广泛, 他可以增加肠腔与肠壁间的对比, 使腔内及黏膜显影, 而且经济、便捷, 易被患者接受, 但其常常快速通过肠道, 导致肠腔扩张较差, 充盈不均。张联合 *et al* 报道, 用等渗甘露醇作为口服对比剂行小肠CT检查^[23], 肠腔充盈尚可, 但会引起腹泻。

植物油乳剂属于阴性对比剂, 但其脂肪含量太高(12.5%), 患者常常难以耐受, 且价格较高, 临幊上几乎没有应用。国外Hebert *et al*^[24]将聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)作为口服对比剂应用于腹盆部的CT检查, 与水、纤维素溶液及碘水溶液对比, 在肠壁的显示、肠腔的

扩张以及肠道的充盈方面, 均取得了良好的效果。Doerfler *et al*^[25]应用新型口服阴性对比剂 Mucofalk来诊断小肠Crohn病, 效果尚可。国内报道^[26-28]把脂肪对比剂应用于胃肠道, 提高了胃肠道疾病的检出率。

Thompson *et al*^[29]已经报道用牛奶作为胃肠道对比剂, 他们的研究证明牛奶优于水、钡剂悬浮液等。由于脂肪含量的差异, 纯牛奶 (whole milk, 脂肪含量4%) 优于脱脂或低/减脂牛奶。纯牛奶脂肪含量不高, 患者耐受性好, 一般无不良反应出现, 此外牛奶中含有的脂肪能够减慢胃肠蠕动, 使肠腔充分充盈, 是较理想的肠道对比剂。2006-12在芝加哥召开的RSNA年会上, 纽约St Luke's-Roosevelt Hospital的研究员们提出^[30], 在肠腔扩张及肠壁强化方面, 牛奶和VoLumen(不含甘露醇, 是一种硫酸钡的混悬液)有相似的作用, 而在患者耐受性、口感、来源、价格等方面, 牛奶明显优于VoLumen, 他们的实验证明牛奶是较优的对比剂。刘智明 *et al*^[31]报道把纯牛奶作为口服低密度对比剂用于腹部螺旋CT增强扫描中, 明显提高了对腹部淋巴结的检出率。

应用要点
小肠CT造影技术可以同时观察肠腔内外的病变, 牛奶作为对比剂能使肠腔充分充盈扩张, 肠腔内、黏膜、肠壁及邻近器官结构显示良好, 为临幊医生及患者提供一种观察小肠病变的技术方法。

名词解释

小肠CT造影(CTE):是使用大量对比剂充盈小肠肠腔,进行CT平扫及增强扫描,将图像进行处理后,使小肠肠腔、肠壁、壁外系膜、血管、后腹膜及腹内实质脏器全景式多方位显示出来。

通过本实验可知,纯水与纯牛奶对肠壁结构的显示及对周围图像的影响无明显差异,但在肠腔充盈扩张方面,纯牛奶明显优于纯水,而扫描后进行的MPR重建,能更立体直观地观察肠腔充盈扩张情况。泛影葡胺对肠腔的充盈扩张尚可,但其密度较高,由于容积效应,常常掩盖肠壁结构,显示不清楚;尤其增强扫描后,肠腔内与肠壁CT值相仿,不能形成良好的对比,肠壁显示效果极差;纯牛奶组肠壁结构显示效果好,对周围结构无影响,且增强扫描后,肠腔内与肠壁形成明显的对比,易于观察肠腔内外、肠壁及周围结构。不同密度的肠腔对比剂对肠壁显示的效果不同,本实验通过测量CT值可知,增强扫描40 s时,毕格犬肠壁强化最明显;观察分析图像可知,腔内对比剂为纯水及牛奶时,肠腔与肠壁对比程度最好,此时肠腔与肠壁密度的差值约为 69.25 ± 6.28 HU。

本实验选用的纯牛奶(脂肪含量3.5%),与植物油乳剂相比,既可增加患者的耐受性,又可有效的减慢肠道蠕动,从而使对比剂缓慢通过消化道,产生良好的肠腔内外、邻近器官及与周围结构的对比,而在患者耐受性、口感、来源、价格等方面,纯牛奶亦明显优于其他对比剂,因此是一种比较合适的小肠CTE对比剂。

本实验对插管技术要求较高,导管到达合适的位置,才能够使小肠充分充盈扩张,但插管属于侵入性的有创检查,同时CT扫描时患者会受到辐射^[32],而且部分患者可能对牛奶过敏。另外,毕格犬为标准实验动物,价格较昂贵。

4 参考文献

- 1 Rogalla P. CT of the small intestine. *Eur Radiol* 2005; 15 Suppl 4: D142-D148
- 2 Laghi A, Paolantonio P, Passariello R. Small bowel. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2005; 13: 331-348
- 3 Kerr JM. Small bowel imaging: CT enteroclysis or barium enteroclysis? Critically appraised topic. *Abdom Imaging* 2008; 33: 31-33
- 4 Boudiaf M, Jaff A, Soyer P, Bouchnik Y, Hamzi L, Rymer R. Small-bowel diseases: prospective evaluation of multi-detector row helical CT enteroclysis in 107 consecutive patients. *Radiology* 2004; 233: 338-344
- 5 章士正. 小肠影像诊断学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2006: 7
- 6 Maglinte DD, Sandrasegaran K, Lappas JC. CT enteroclysis: techniques and applications. *Radiol Clin North Am* 2007; 45: 289-301
- 7 Rajesh A, Maglinte DD. Multislice CT enteroclysis: technique and clinical applications. *Clin Radiol* 2006; 61: 31-39
- 8 Kermarrec E, Barbary C, Corby S, Béot S, Laurent V, Regent D. CT enteroclysis: a pictorial essay. *J Radiol* 2007; 88: 235-250
- 9 Schmidt S, Felley C, Meuwly JY, Schnyder P, Denys A. CT enteroclysis: technique and clinical applications. *Eur Radiol* 2006; 16: 648-660
- 10 Schmidt S, Felley C, Vuilleumier H, Schnyder P, Denys A. CT-enteroclysis. *Rev Med Suisse* 2006; 2: 1736-1740
- 11 Patak MA, Mortele KJ, Ros PR. Multidetector row CT of the small bowel. *Radiol Clin North Am* 2005; 43: 1063-1077, viii
- 12 Burkitt G, Bell J, Healy J. Small bowel obstruction: the role of computed tomography in its diagnosis and management with reference to other imaging modalities. *Eur Radiol* 2001; 11: 1405-1422
- 13 Leschka S, Alkadhi H, Wildermuth S, Marincek B. Multi-detector computed tomography of acute abdomen. *Eur Radiol* 2005; 15: 2435-2447
- 14 Cahir JG, Freeman AH, Courtney HM. Multislice CT of the abdomen. *Br J Radiol* 2004; 77 Spec No 1: S64-S73
- 15 Horton KM, Fishman EK. The current status of multidetector row CT and three-dimensional imaging of the small bowel. *Radiol Clin North Am* 2003; 41: 199-212
- 16 Maglinte DD, Bender GN, Heitkamp DE, Lappas JC, Kelvin FM. Multidetector-row helical CT enteroclysis. *Radiol Clin North Am* 2003; 41: 249-262
- 17 La Seta F, Buccellato A, Tesse L, Biscaldi E, Rollandi GA, Barbiera F, Cappabianca S, Di Mizio R, Grassi R. Multidetector-row CT enteroclysis: indications and clinical applications. *Radiol Med (Torino)* 2006; 111: 141-158
- 18 Parrish FJ. Small bowel CT-enteroclysis: technique, pitfalls and pictorial review. *Australas Radiol* 2006; 50: 289-297
- 19 Di Mizio R, Rollandi GA, Bellomi M, Meloni GB, Cappabianca S, Grassi R. Multidetector-row helical CT enteroclysis. *Radiol Med (Torino)* 2006; 111: 1-10
- 20 Reittner P, Goritschnig T, Petritsch W, Doerfler O, Preidler KW, Hinterleitner T, Szolar DH. Multiplanar spiral CT enterography in patients with Crohn's disease using a negative oral contrast material: initial results of a noninvasive imaging approach. *Eur Radiol* 2002; 12: 2253-2257
- 21 Ramsay DW, Markham DH, Morgan B, Rodgers PM, Liddicoat AJ. The use of dilute Calogen as a fat density oral contrast medium in upper abdominal computed tomography, compared with the use of water and positive oral contrast media. *Clin Radiol* 2001; 56: 670-673
- 22 许建荣, 朱炯, 龚红霞, 冯琦. 胃肠道疾病的MDCT应用. 中国医学计算机成像杂志 2005; 11: 335-341
- 23 Zhang LH, Zhang SZ, Hu HJ, Gao M, Zhang M, Cao Q, Zhang QW. Multi-detector CT enterography with iso-osmotic mannitol as oral contrast for detecting small bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2324-2329
- 24 Hebert JJ, Taylor A.J, Winter T.C, 赵双. 口服低衰减胃肠道造影剂在腹部CT中的应用. 世界核心医学期刊文摘(胃肠病学分册) 2006; 4: 7
- 25 Doerfler OC, Ruppert-Kohlmayr AJ, Reittner P, Hinterleitner T, Petritsch W, Szolar DH. Helical CT of the small bowel with an alternative oral contrast material in patients with Crohn disease. *Abdom Imaging* 2003; 28: 313-318
- 26 张帅, 吴斌, 彭卫军, 师英强, 钟国民. 超低密度脂肪对比剂螺旋CT结肠成像初探. 临床放射学杂志 2005; 24: 229-233
- 27 彭卫军, 吴东, 周康荣, 陈惠明, 陈锦. 口服脂肪对比剂

- 胃螺旋CT仿真内镜和三维成像初探. 中国医学影像技术 2001; 17: 566-568
- 28 张帅, 彭卫军, 钟国民, 师英强. 脂肪对比剂灌肠螺旋CT在结直肠癌术前分期中的作用. 中国医学影像技术 2005; 21: 86-89
- 29 Thompson SE, Raptopoulos V, Sheiman RL, McNicholas MM, Prassopoulos P. Abdominal helical CT: milk as a low-attenuation oral contrast agent. Radiology 1999; 211: 870-875
- 30 Mitka M. Milk shows potential as CT contrast agent. JAMA 2007; 297: 353
- 31 刘智明, 卑贵光, 吴春江, 张小颖, 唐堂. 纯牛奶作为口服低密度对比剂在腹部螺旋CT增强扫描中的应用. 中国医学影像学杂志 2003; 11: 308-309
- 32 Hong SS, Kim AY, Byun JH, Won HJ, Kim PN, Lee MG, Ha HK. MDCT of small-bowel disease: value of 3D imaging. AJR Am J Roentgenol 2006; 187: 1212-1221

同行评价
本文提供了一种简单易行的小肠病变的检查方法, 实用性及科学性均较强, 值得临床推广.

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

欢迎订阅 2008 年《世界华人消化杂志》

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

《世界华人消化杂志》报道消化疾病的评论及临床和基础研究, 包括消化肿瘤学、消化感染病学、消化内科学、消化外科学、消化内镜学、消化影像学、消化介入治疗学、消化中医药、中西医结合学、消化基础研究、消化病理学、消化循证医学等内容.

《世界华人消化杂志》2008年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅. 联系地址: 100023, 北京市2345信箱. 联系电话: 010-85381901-638; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com.



PAF对肠上皮细胞紧密连接的影响及ITF的保护作用

许玲芬, 董亚珞, 孙梅, 马力, 毛志芹

背景资料
早在20世纪80年代就有学者提出“胃肠道是MSOF的始动器官”，目前认为肠黏膜受损最早的表现是通透性增加，而通透性增加与紧密连接的破坏密切相关。肠三叶因子在肠道的自我保护和修复中具有重要作用，但其机制是否与紧密连接相关尚未报道。

许玲芬, 孙梅, 毛志芹, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)儿科 辽宁省沈阳市 110004
董亚珞, 中国医科大学附属第一医院临床流行病教研室 辽宁省沈阳市 110001
马力, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)感染科实验室 辽宁省沈阳市 110004
许玲芬, 中国医科大学博士在读, 讲师, 主要从事小儿消化系统疾病的研究。
辽宁省教育厅科研基金资助项目, No. 20122166
通讯作者: 孙梅, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)儿科. sunm@cum2h.com
电话: 024-83955572
收稿日期: 2007-10-17 修回日期: 2008-01-04

Effect of platelet-activating factor on tight junction in intestinal epithelial cells and protective effect of intestinal trefoil factor

Ling-Fen Xu, Ya-Luo Dong, Mei Sun, Li Ma, Zhi-Qin Mao

Ling-Fen Xu, Mei Sun, Zhi-Qin Mao, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Ya-Luo Dong, Department of Clinical Epidemiology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Li Ma, Department of Infectious Diseases Laboratory, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Applied Basic Research Program of the Education Commission Foundation of Liaoning Province, No. 20122166

Correspondence to: Mei Sun, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sunm@cum2h.com

Received: 2007-10-17 Revised: 2008-01-04

Abstract

AIM: To explore whether platelet-activating factor (PAF) can disrupt the intestinal epithelial barrier and is associated with tight junction, and to observe the protective effect of intestinal trefoil factor (ITF).

METHODS: Caco-2 cells were cultured with RPMI 1640 containing 15% fetal bovine serum for 7 days. Cells were then treated with differ-

ent concentrations of PAF (0, 50, 100 and 200 ng/L) for 24 hours until they became fused. The protective effect of ITF was observed. rITF (0.3 g/L) was treated 30 minutes before (prevention group) and after PAF (treatment group) was given and cells were incubated for 24 hours. MTT was used to detect cell vigor. Epithelial monolayer permeability was measured by trans-epithelial electrical resistance (TER) and mucosal to serosal flux of paracellular marker luminal yellow. RT-PCR was used to detect mRNA expression of ZO-1 and Occludin. Indirect immunofluorescence was used to localize ZO-1 and Occludin.

RESULTS: PAF had no effect on the Caco-2's vigor and proliferation. Different concentrations of PAF increased the intestinal epithelial paracellular permeability. TER decreased and luminal yellow flux increased. Treatment and prevention group of rITF partially recovered the increased permeability (122.2 ± 14.7 , 100.3 ± 10.9 vs 210.3 ± 26.4 , $P < 0.05$; 10226.1 ± 556.2 , 9711.2 ± 364.9 vs 11601.2 ± 693.5 , $P < 0.05$). RT-PCR demonstrated that the mRNA expression of ZO-1 and Occludin in PAF groups treated with different concentrations (especially 100 ng/L) for 24 hours was significantly different from that in the prevention group (1.07 ± 0.05 vs 1.28 ± 0.06 , 0.81 ± 0.06 vs 1.13 ± 0.07 , $P < 0.05$). However, treatment of rITF did not change the expression of mRNA. In the control Caco-2 monolayers, ZO-1 and Occludin proteins were localized at the apical cellular junctions and appeared as continuous belt-like structures encircling the cells at the cellular borders. PAF caused a progressive disturbance in the continuity of ZO-1 and Occludin localization at the cellular borders characterized by zig-zagging appearance at points of multiple cellular contact. rITF could partially recover the disrupted distribution of ZO-1 and Occludin proteins.

CONCLUSION: PAF disrupts the intestinal epithelial barrier. Its mechanism may be correlated to the decreased expression of ZO-1 and Occludin proteins, which can be partially recovered after treatment of rITF.

同行评议者
秦环龙, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院外科

Key Words: Tight junction; Platelet-activating factor; Intestinal trefoil factor; Trans-epithelial electrical resistance; ZO-1; Occludin; MTT; Trans-epithelial electrical resistance; RT-PCR

Xu LF, Dong YL, Sun M, Ma L, Mao ZQ. Effect of platelet-activating factor on tight junction in intestinal epithelial cells and protective effect of intestinal trefoil factor. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 372-378

摘要

目的: 探讨血小板活化因子(PAF)是否会引起肠黏膜屏障的破坏以及这种破坏机制是否与紧密连接相关, 并观察肠三叶因子(ITF)的保护作用。

方法: 培养人结肠腺癌细胞株Caco-2, 分别设正常对照组: 不加刺激物及干预因素; 实验组: 加入PAF, 终浓度分别为50 ng/L、100 ng/L和200 ng/L; ITF预防组: 先加入ITF0.3 g/L, 30 min后加入PAF 100 ng/L; ITF治疗组: 先加入PAF 100 ng/L, 30 min后加入ITF0.3 g/L, 24 h后进行实验。MTT比色法检测细胞活力; 测定跨上皮电阻TER和荧光黄的透过量反映肠上皮细胞单层通透性; RT-PCR法检测紧密连接蛋白ZO-1和Occludin mRNA表达的变化; 免疫荧光染色观察紧密连接蛋白ZO-1和Occludin的形态学。

结果: PAF未影响到细胞的增殖和细胞活力。各浓度PAF作用24 h后, 细胞单层通透性增加, 跨上皮电阻(TER)下降, 荧光黄透过增加。ITF治疗组及预防组TER下降值较模型组明显降低(122.2 ± 14.7 , 100.3 ± 10.9 vs 210.3 ± 26.4 , $P < 0.05$), 荧光黄透过量减少(10226.1 ± 556.2 , 9711.2 ± 364.9 vs 11601.2 ± 693.5 , $P < 0.05$), 预防组作用更明显。PAF作用后, ZO-1和Occludin mRNA表达均有下降, 以100 ng/L组改变最为明显, ITF预防组较之表达增加(1.28 ± 0.06 vs 1.07 ± 0.05 , 1.13 ± 0.07 vs 0.81 ± 0.06 , $P < 0.05$), ITF治疗组改变不明显。免疫荧光染色发现ZO-1和Occludin主要分布在细胞内近胞膜处。PAF作用后, ZO-1及Occludin形态学改变, 预防性给予ITF后, 可明显减轻这种改变。

结论: PAF可引起肠黏膜屏障破坏, 其机制可能和紧密连接蛋白的破坏相关; ITF可以通过改变紧密连接蛋白的表达而部分恢复肠黏膜正常通透性, 起到保护作用。

关键词: 紧密连接; 血小板活化因子; 肠三叶因子; 跨上皮电阻; ZO-1; Occludin; MTT法; 跨上皮电阻; 逆转录聚合酶链式反应

许玲芬, 董亚珞, 孙梅, 马力, 毛志芹. PAF对肠上皮细胞紧密连接的影响及ITF的保护作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 372-378
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/372.asp>

研发前沿
PAF是一种脂质类炎性介质, 很可能是内毒素作用的主要效应因子。研究认为PAF在诸多参与胃肠黏膜损害的炎症介质中可能起到“中心放大”的介导作用。PAF引起的肠黏膜屏障通透性升高的作用机制及寻求有效的预防和治疗手段是目前研究的热点。

0 引言

肠黏膜屏障的破坏在儿科急慢性疾病的发生发展中具有显著的意义^[1-4]: 急性期, 细菌移位可引起败血症及多器官功能衰竭, 而婴儿时期的肠黏膜屏障破坏将会成为随后产生的部分变应性疾病始发因素, 如: 湿疹, 食物过敏, 腹部肠病, 1型糖尿病, 哮喘, 炎症性肠病及孤独症等。而肠黏膜通透性的升高是早期和主要的病理生理基础。紧密连接作为细胞间通路最主要的屏障直接影响肠黏膜屏障的通透性^[5-6]。

血小板活化因子(PAF)是一种内源性脂性介质, 目前被认为是一种独特的细胞因子, 具有广泛的生物学特性, 研究认为^[7]PAF在诸多参与胃肠黏膜损害的炎症介质中可能起到“中心放大”的介导作用。动物实验也注意到PAF可引起肠黏膜通透性的增高^[8]。已有实验证实^[9], 用PAF和LPS引起的坏死性小肠结肠炎的改变相似, 用PAF受体拮抗剂可明显减轻LPS所致的肠坏死^[10]。但其机制是否与紧密连接的破坏相关尚无报道。

肠三叶因子(ITF)属三叶肽家族, 因其对胃肠道黏膜屏障有重要保护和修复作用而受到越来越多的关注。大量的动物实验证明^[11-13]ITF在维持肠上皮细胞的完整性, 恢复肠黏膜的正常通透性方面起到重要作用。本研究试图在细胞水平观察ITF对紧密连接的保护作用从而为临床应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠腺癌细胞株(Caco-2)购于中国科学院上海细胞所; RPMI 1640培养基、胰酶和胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)购自Gibco公司; PAF、荧光黄购自Sigma公司; ZO-1、Occludin单抗、异硫氰酸荧光素(fluorescin isothiocyanate, FITC)标记羊抗兔IgG购自Zymed公司; rITF(基因重组肠三叶因子)由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室提供; MTT和DMSO为AMRECO产品; transwell购自美国Corning公司; 电阻仪购自美国Millipore公司; RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司; 引物也由该公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养条件及方法: Caco-2细胞常规培

应用要点

本文为大家进一步深入研究PAF损伤肠黏膜屏障的机制提供了基础，同时为ITF生物制剂的开发和应用提供了理论基础。

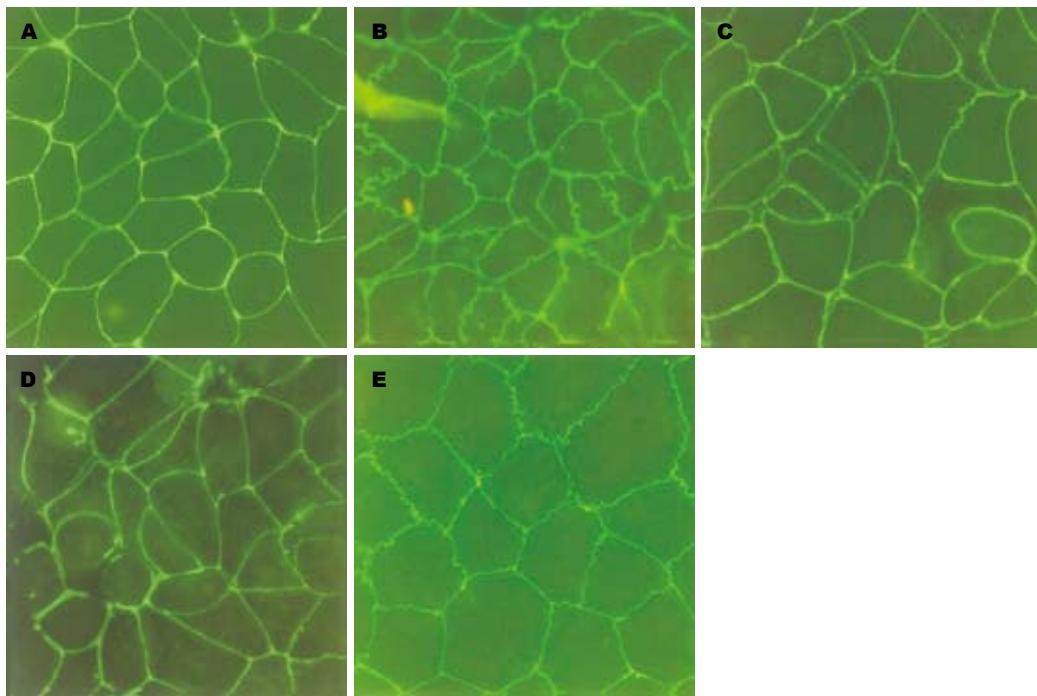


图2 药物作用24 h后ZO-1表达情况. A: 正常组; B: PAF 50 ng/L组; C: PAF 100 ng/L组; D: PAF 200 ng/L组; E: PAF 100 ng/L加ITF 0.3 g/L预防给药组.

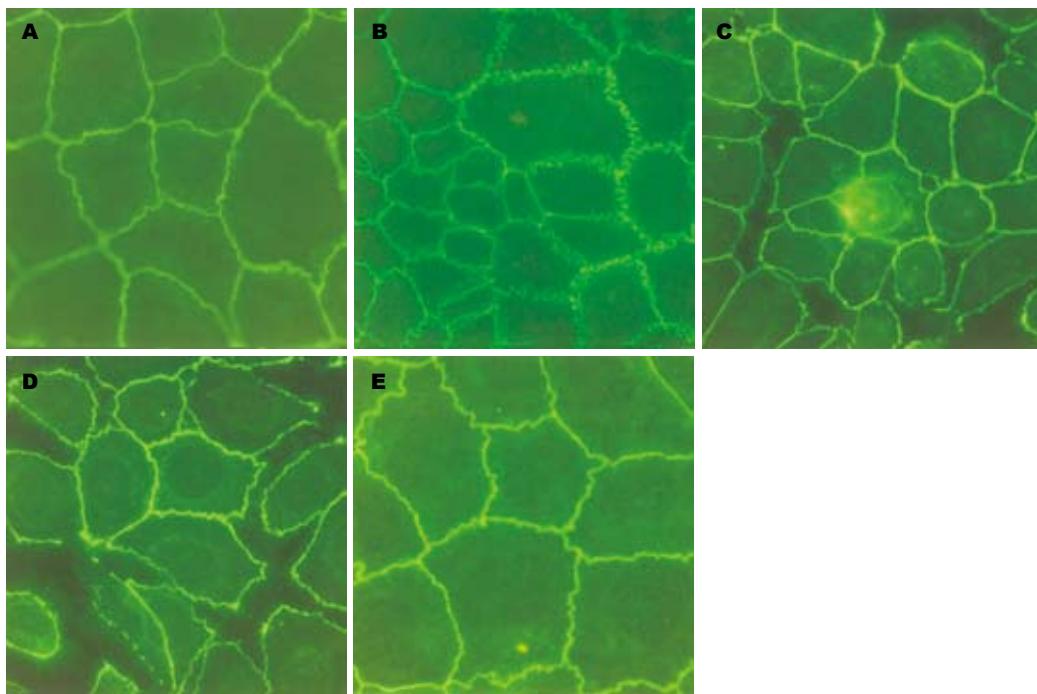


图3 药物作用24 h后Occludin表达情况. A: 正常组; B: PAF 50 ng/L组; C: PAF 100 ng/L组; D: PAF 200 ng/L组; E: PAF 100 ng/L加ITF 0.3 g/L预防给药组.

粒细胞，促进其黏附到血管内皮细胞，释放氧自由基和蛋白水解酶，破坏内皮细胞的形态和功能。在血栓形成、休克、过敏性哮喘、内毒素血症和肠道坏死中均起重要作用^[26]，但PAF是否可以直接破坏紧密连接而引起肠上皮屏障破坏、肠通透性增高尚不清楚。

Caco-2细胞来源于人的直肠癌，在细胞培养条件下，可融合并分化为肠上皮细胞，形成连续的单层，细胞亚显微结构研究表明，Caco-2细胞与人小肠上皮细胞在形态学上相似，具有相同的细胞极性和紧密连接，是国际上公认的研究紧密连接和药物小肠吸收的体外模型^[27]。

同行评价

本文研究具有较强的科学性和说服力.

- 26 polarity protein PAR-3. *J Cell Biol* 1998; 143: 95-106
 Rabinovici R, Yue TL, Farhat M, Smith EF 3rd, Esser KM, Slivjak M, Feuerstein G. Platelet activating factor (PAF) and tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) interactions in endotoxemic shock: study with BN 50739, a novel PAF antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 256-263
- 27 Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 27-43
- 28 Meyer zum Büschenfelde D, Tauber R, Huber O. TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression. *Peptides* 2006; 27: 3383-3390

编辑 杜群 电编 何基才

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

• 编读往来 •

尊敬的马连生教授:

今天我收到贵刊《生物医学核心指南》,恰好有时间,就拜读了其中的几篇文章,令人感触很深.

在如今改革开放的时代里,虽然已革命了三十年,但固守的、陈腐的、甚至是落后的东西还很多,在现象上,似乎人人都在崇尚革新与新的事物,但一旦落到自己头上,或者触碰到自己的利益,往往是激烈的反对者.作为医学事业的创新喉舌—医学期刊,是反映当代医学科研创新成果主要途径,本来就是纯自然的东西,但因为大多数受我国国有单位的掌控,也许与个人的爱好、职称的晋升、领导或权威的面子等有关,使这些自然的东西就变得不太客观,不甚自由了.

《世界华人消化杂志》是一只绚丽的奇葩,从他的孵化、出生到成长,都是在自由的成长,如今如此受到关注,首先应该感谢他的母亲,马连生教授,这样一个向往自由、崇尚真实,追求新意,海纳百川,又耐酸、耐碱、耐腐蚀的科学志士;其次,要感谢无数的学者,是他们把自己最新成果,信守在这样的平台上展示,使得这个幼苗充满了向上的活力,迅速成长壮大;还要感谢祖广安、李镇西这样一批的好领导,是他们给与了鼓励、鞭策和有力的支持.然而,直到今天我相信,还有不少的领导、学者、同行,还对该杂志处于观望、犹豫、甚至否定的态度.但我更坚信,他那种顺其自然的秉性,快捷准确的性格,以及其拥有的实力专家群,让这棵由自由人种下的大树,更广泛为世人所瞩目、发扬光大.

作为贵刊的编委,我一直密切地注意和关心贵刊的发展,也把自己及学生们的最新研究成果投寄贵刊发表,以示对贵刊实力支持.

看到祖广安、李镇西的文章,看到他们对马教授的评价,我看到一个非常谦虚好学的人,知弱图强的人,这在当今对于有点成绩的人是难能可贵的,我也希望马先生能够长期保持这种品格.

很希望静下来写一点文字献给尊敬的马先生,但作为一个临床学科的主任,患者、同事不时的打扰,其实很难,就把自己断断续续写出来的一点感言寄予你们,也算是对我热爱贵刊的表示.

最后再次向全体编辑及相关的工作人员问好!祝大家在新的一年里身体健康,万事如意!

党双锁 编委

西安交大二院感染科

2008-01-11

肝门部胆管癌神经浸润特征的临床病理学分析

李成刚, 黄志强, 韦立新, 董家鸿, 刘军桂, 王燕生

李成刚, 黄志强, 董家鸿, 刘军桂, 王燕生, 中国人民解放军总医院肝胆外科 北京市 100853

韦立新, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853

李成刚, 2005年中国人民解放军总医院普通外科学博士研究生, 主治医师, 主要从事肝胆系统肿瘤的基础与临床研究。

作者贡献分布: 此课题由李成刚, 黄志强, 韦立新, 董家鸿设计; 研究过程由李成刚, 刘军桂, 王燕生操作完成; 研究所用病理切片及分析工具由黄志强, 韦立新提供; 数据分析由李成刚, 韦立新完成; 本文论文写作由李成刚, 黄志强完成。

通讯作者: 李成刚, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院全军肝胆外科研究所。lcgang301@126.com

电话: 010-66936602 传真: 010-66936602

收稿日期: 2007-12-13 修回日期: 2008-01-14

Clinical pathology of perineural invasion in hilar cholangiocarcinoma

Cheng-Gang Li, Zhi-Qiang Huang, Li-Xin Wei, Jia-Hong Dong, Jun-Gui Liu, Yan-Sheng Wang

Cheng-Gang Li, Zhi-Qiang Huang, Jia-Hong Dong, Jun-Gui Liu, Yan-Sheng Wang, Institute of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Li-Xin Wei, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Cheng-Gang Li, Institute of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. lcgang301@126.com

Received: 2007-12-13 Revised: 2008-01-14

Abstract

AIM: To elucidate the characteristics and mechanism of perineural invasion in hilar cholangiocarcinoma.

METHODS: A clinicopathologic study was conducted on tissue sections from 73 patients with hilar cholangiocarcinoma to observe the incidence and modes of perineural invasion. Clinicopathologic factors, such as tumor differentiation and pathologic stage, were analyzed when perineural invasion was observed in the sections. Immunohistochemical staining for CD34 and D2-40 in cancer tissue samples was performed to clarify the association of perineural invasion with vessels.

RESULTS: The overall incidence of perineural invasion was 91.78% (67 of 73 patients). Howev-

er, the incidence of perineural invasion did not show any remarkable difference in various differentiated adenocarcinomas. Logistic regression analysis identified that penetration of bile duct was significantly correlated with perineural invasion ($P < 0.01$). The microvessel density (MVD) was significantly lower in well-differentiated adenocarcinomas than in moderately- and poorly-differentiated adenocarcinomas ($P < 0.05$). Five patterns were observed as the tumor cells invaded nerve fibers. Although tumor cells were found to invade microvessels and microlymphatics, immunohistochemical staining for CD34 and D2-40 respectively showed no association between perineural invasion and lymphatic or vascular invasion.

CONCLUSION: Perineural invasion is common in hilar cholangiocarcinoma and does not develop via the lymphatic or vascular network, but is a continuous extension from the primary tumor. Nerve plexus around the membrana adventitia should be completely divested during radical excision of hilar cholangiocarcinoma.

Key Words: Hilar cholangiocarcinoma; Perineural invasion; Immunohistochemical staining

Li CG, Huang ZQ, Wei LX, Dong JH, Liu JG, Wang YS. Clinical pathology of perineural invasion in hilar cholangiocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 379-384

摘要

目的: 总结肝门部胆管癌神经浸润的方式和规律, 探讨肿瘤浸润神经的途径和机制。

方法: 光镜观察73例肝门部胆管癌患者1082张组织病理切片, 总结归纳肿瘤浸润神经的方式和规律; 分析肿瘤浸润神经与肿瘤分化程度、肿瘤浸润范围、肿瘤标志物水平等临床病理学因素的关系; 通过免疫组织化学CD34、D2-40染色分别显示肿瘤浸润神经与微血管和微淋巴管的关系。

结果: 肝门部胆管癌神经浸润率为91.78%,

背景资料

肝门部胆管癌术后复发率超过50%, 当前对此类疾病进行的各类治疗, 包括手术方式的改进和切除范围的扩大, 总体上并不能提高患者的治疗效果, 如何降低术后复发率、延长患者生存时间是长期以来困扰外科医生的难题。

同行评议者
周伟平, 教授, 上海东方肝胆外科医院肝外三科

研发前沿
肿瘤浸润神经对患者预后有不良影响, 肿瘤浸润神经是肿瘤术后复发的重要因素, 但其发生的机制和途径尚知之甚少, 对应的治疗策略尚停留在分子和动物实验水平, 距离临床应用尚有距离.

高、中、低分化腺癌组肿瘤神经浸润发生率之间的差异无统计学意义($P>0.05$). Logistic回归分析显示肿瘤浸润胆管壁全层与神经浸润间的关系具有统计学意义($P<0.01$). 高分化腺癌与中、低分化组微血管密度之间的差异有统计学意义($P<0.05$). 肿瘤浸润神经有五种方式, 肿瘤可以发生微血管和微淋巴管的侵犯, 未发现肿瘤通过血管、淋巴管途径浸润神经.

结论: 肝门部胆管癌神经浸润率高; 肿瘤侵犯胆管壁全层后直接浸润神经, 而不是经过血管和淋巴管途径; 行根治性切除时应紧贴血管外膜仔细剥除其周围神经纤维组织.

关键词: 肝门部胆管癌; 神经浸润; 免疫组织化学染色

李成刚, 黄志强, 韦立新, 董家鸿, 刘军桂, 王燕生. 肝门部胆管癌神经浸润特征的临床病理学分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 379-384
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/379.asp>

0 引言

肝门部胆管癌在诊断和手术切除率上都取得了很大的进展, 但大多数患者在得到确诊时已是疾病的晚期, 总体预后仍然不佳^[1-5]. 只有根治性切除才能使患者获得最佳疗效, 但术后肿瘤的复发率非常高^[2-3]. 在人体多种实体瘤中, 肿瘤常常围绕神经组织发生扩散, 因此很多学者都强调, 在切除肿瘤组织的同时, 应该注意对瘤组织周围神经组织的清除. 尽管有研究表明, 肝门部胆管癌神经浸润对患者预后有不良影响^[4], 但各组报道间的肿瘤神经浸润发生率差异很大, 肿瘤浸润神经的途径和确切机制尚不清楚. 本研究旨在阐明肝门部胆管癌神经浸润发生率及肿瘤浸润神经的方式及其与血管和淋巴管的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 本组73例患者均为2003-08/2007-01在北京解放军总医院肝胆外科治疗的肝门部胆管癌病例, 男41例, 女32例, 男女比例1.28:1, 年龄32-82(平均57.4±11.9)岁. 共获得患者1082张组织病理切片.

1.2 方法

1.2.1 肿瘤浸润神经的判断标准: 光镜下观察发现肿瘤包绕神经外膜、侵入神经周围间隙和神经纤维内部生长者, 即确认为肿瘤浸润神经. 图像采集应用奥林帕斯BX51型显微镜及Image pro plus 5.0图像处理软件.

1.2.2 免疫组织化学方法: 鼠抗人CD34 mAb(1:50)、鼠抗人D2-40 mAb(1:50)、免疫组化SP试剂盒, 均购于北京中杉生物公司. 石蜡切片, 片厚3-4 μm, 梯度酒精水化, 30 mL/L H₂O₂室温孵育30 min, 微波炉抗原修复10 min, 分别滴加CD34、D2-40一抗(1:100)工作液4℃孵育过夜; 加入即用型兔抗鼠二抗工作液, 37℃孵育30 min, 3, 3'二氨基联苯胺(DAB)显色剂显色; 复染, 脱水, 中性树胶封片. 用TBS替代一抗、二抗作阴性对照, 已知阳性切片作阳性对照.

1.2.3 微血管密度(microvessel density, MVD)测定方法: 两名病理医师双盲法统计结果. MVD计数方法用Weidner^[5]方法计数: 任何被CD34抗体染色的单个内皮细胞或细胞团, 不管有没有形成管腔, 只要与周围的微血管、肿瘤细胞和其他连接组织有一个清楚的分离, 都认为是一个可计数的微血管. 每一标本先低倍镜(×10)下选5个微血管数最多的区域即“热点”, 在每一个区域中计数一个高倍镜(×20)下的微血管数取其均值计为MVD值.

统计学处理 结果以mean±SD表示, 经SPSS 11.0统计软件处理, 依据资料类型的不同分别采用χ²检验、Logistic回归分析和单因素方差分析.

2 结果

2.1 临床病理学结果 本研究中73例患者, 病理学诊断全部为腺癌(表1); 神经与淋巴结浸润发生率分别为91.78%(67/73)和27.40%(20/73); 高、中、低分化腺癌组肿瘤神经浸润发生率之间的差异无统计学意义($P>0.05$).

2.2 肿瘤浸润神经的相关因素分析 73例中仅2例肿瘤未侵犯胆管壁全层(高分化腺癌1例, 中分化腺癌1例), 均未发生神经浸润; 其余71例侵犯胆管壁全层, 其中67例(94.37%)发生神经浸润. 将淋巴结浸润、血清CA19-9水平、Bismuth-Corlett分型和胆管壁侵犯程度与神经浸润作Logistic单变量回归分析, 结果显示肿瘤侵犯胆管壁全层与神经浸润间的关系具有统计学意义($P<0.01$).

2.3 肿瘤浸润神经方式的观察 胆管癌细胞浸润神经主要方式可归纳为5种类型: I型, 包绕神经束膜生长; II型, 神经周围间隙内生长; III型, 神经纤维内弥漫性生长; IV型, 神经内膜间隙内生长; V型, 直接浸润无被膜包绕的神经末梢. 同一患者病灶内肿瘤浸润神经的方式相似, 但可有多种浸润方式并存, 肿瘤浸润神经方式的发生频率由高至低依次是: II型>III型>V型> I

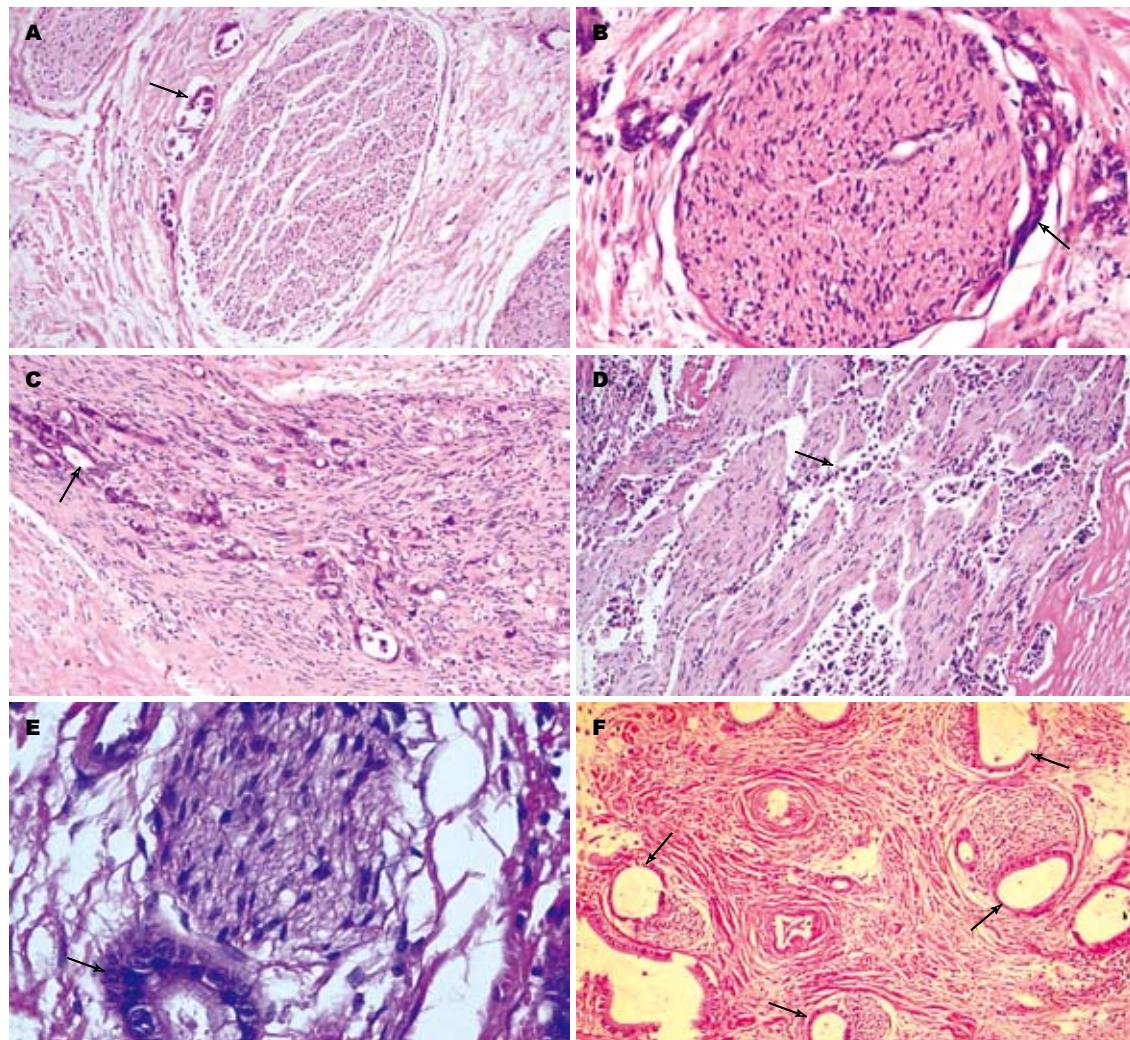


图 1 肿瘤浸润神经的方式(A–C, F; HE $\times 100$; D; HE $\times 200$; E; HE $\times 400$). A: 肿瘤细胞(箭头)包绕神经束膜生长; B: 肿瘤细胞(箭头)于神经周围间隙内生长; C: 肿瘤细胞(箭头)于神经内弥漫性生长; D: 肿瘤细胞(箭头)于神经内膜间隙内生长; E: 肿瘤细胞(箭头)直接浸润无被膜包绕的神经末梢; F: 肿瘤细胞(箭头)浸润神经的方式相似.

表 1 73例肝门部胆管癌患者临床病理学资料

病理类型	n	神经浸润	淋巴结浸润
高分化腺癌	9	8	1
中分化腺癌	34	32	9
低分化腺癌	28	25	9
黏液腺癌	2	2	1
合计	73	67	20

型>IV型(图1A-F).

2.4 肿瘤浸润神经与微血管的关系 CD34特异性染色于血管内皮细胞胞膜, 棕褐色着色. 高分化腺癌与中、低分化组微血管密度之间的差异有统计学意义($P<0.05$), 而中、低分化腺癌组之间差异无统计学意义($P>0.05$)(图2). 肿瘤可以发生微血管浸润(图3A-B), 肿瘤浸润神经时伴有微血管增生(图3C), 但未发现肿瘤细胞通过血管途径

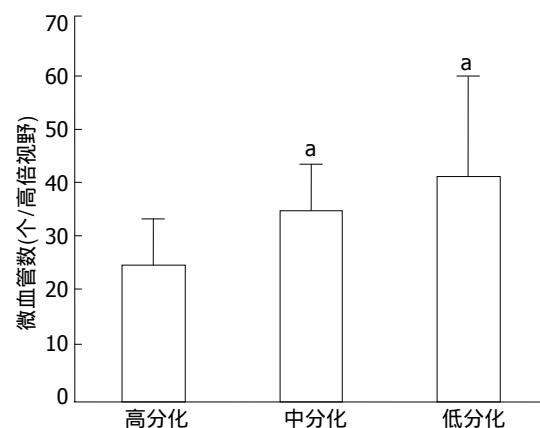


图 2 肝门部胆管癌微血管密度的比较. $^aP<0.05$ vs 高分化组.

浸润神经(图3C-D).

2.5 肿瘤浸润神经与微淋巴管的关系 D2-40染色于淋巴管内皮细胞膜, 棕褐色着色; 神经细胞胞

创新盘点
本研究对大样本病例进行了系统研究, 明确了肝门部胆管癌神经浸润的真实发生率, 总结了肿瘤浸润神经的方式和一般规律, 有助于学术交流时相关概念的明确. 对肿瘤浸润神经的机制和途径进行了探讨, 为临床外科治疗此类疾病提供了实验依据.

应用要点

本文有助于临床外科治疗肝门部胆管癌时手术范围的确定,制定相应的治疗策略,有望减少肿瘤术后复发率,延长患者生存时间改善生存质量。

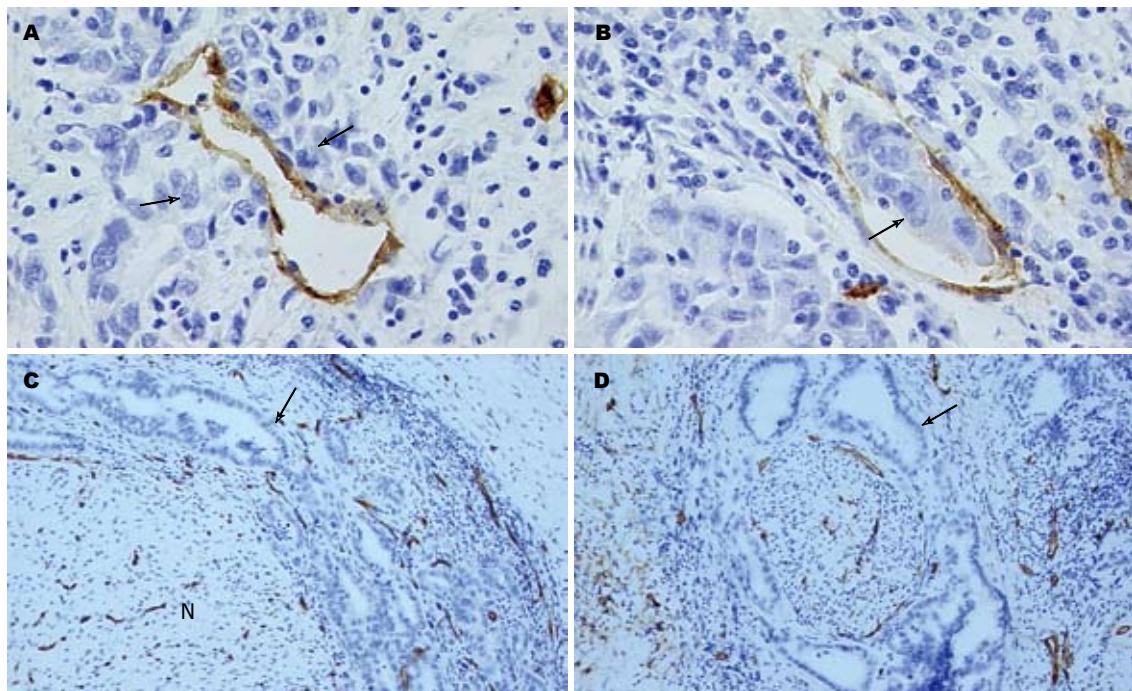


图3 肿瘤浸润神经与微血管的关系(A-B: CD34 × 400; C-D: CD34 × 100). A: 肿瘤(箭头)侵犯微血管; B: 微血管内的肿瘤(箭头)细胞团; C: 肿瘤(箭头)浸润神经伴有微血管增生; D: 肿瘤(箭头)直接浸润神经.

质着色,为棕褐色颗粒状;血管不染色(图4A-B).肿瘤区域内观察到丰富的淋巴管存在,虽然有些患者未发现局部淋巴结侵犯,但肿瘤已浸润局部微淋巴管(4C-D);肿瘤浸润神经时无淋巴管增生,未发现肿瘤通过淋巴管途径浸润神经(图4E-F).

3 讨论

肝门部胆管癌无法根治性手术的原因多为肝十二指肠韧带、淋巴结和门静脉的侵犯,而行根治性手术后患者5年生存率仅能达到30%-50%,并且术后复发率很高^[1-3]. 肝门部胆管癌即使发现体积很小或患者无症状时,已发生了胆管系统、神经纤维及局部淋巴结的转移^[6-7]. 有研究表明,肿瘤发生神经浸润后,患者生存时间显著缩短,而第一站淋巴结转移对预后无显著影响^[4]. 然而,近15年来国内外关于肝门部胆管癌神经浸润发生率的报道为28.6%-100%^[2,8-14],结果极不一致. 我们分析原因主要来自两方面:一方面是研究样本量太少,另一方面是病理医生未报告. 我们的研究表明,肝门部胆管癌神经浸润率高达91.78%. 观察中发现,肿瘤主病灶区域内无神经纤维分布,进展期肿瘤呈辐射状由胆管壁向周围组织浸润性生长,肿瘤浸润神经常发生在肿瘤侵犯胆管壁全层之后. 虽然观察到肝门部胆管癌可以发生微血管和微淋巴管侵

犯,但其发生的频率远低于神经浸润. 我们以前的研究也发现,肿瘤细胞可以在神经纤维内部以“跳跃”性方式生长并发生远处转移^[15]. 因此,我们认为神经浸润可能是肿瘤切除后局部复发的重要原因,而肿瘤的局部残留,微血管、微淋巴管的浸润也可能是潜在的复发因素. 肿瘤的神经浸润应该引起临床医生的重视,并研究相应的治疗对策,对提高患者预后并预防术后肿瘤复发可能具有重要意义.

以往认为肿瘤是沿着“最小阻力”方向侵犯神经的,或是沿着血管和淋巴管途径转运的^[16-17]. Hassan *et al*^[18]应用电镜观察发现,神经周围间隙与血管、淋巴管并不是连续的;肿瘤浸润神经的三维重建也显示肿瘤浸润神经是肿瘤的直接延续^[15,19]. 在我们的研究中,通过微淋巴管和微血管特异性染色,未观察到肿瘤细胞通过血管、淋巴管浸润神经. 我们的结果进一步证实了,肿瘤浸润神经是一相对“独立的事件”,不是经过血管、淋巴管途径,而是肿瘤侵犯胆管壁全层后直接蔓延的结果,这与Yamaguchi *et al*^[6]的研究结果相似. 但肿瘤浸润神经时伴有血管增生,增生的血管可能进一步促进了肿瘤对神经的侵犯和远处转移. 另外,我们还观察到,肿瘤在神经纤维内部生长时也不是沿着“最小阻力”方向生长的,肿瘤在神经纤维内部的生

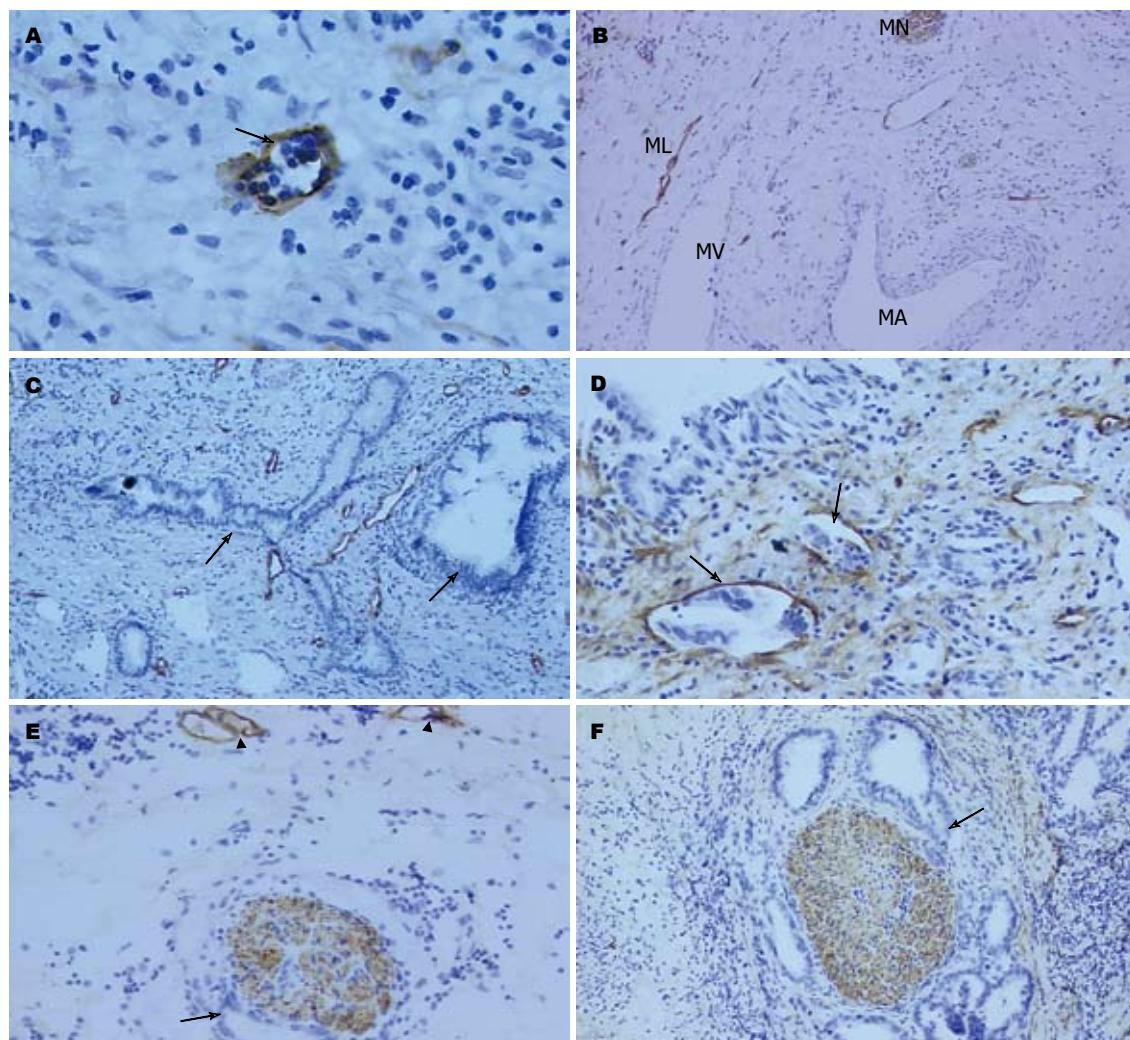


图 4 肿瘤浸润神经与微淋巴管的关系(A, D: D2-40×400; B-C, E-F: D2-40×100). A: 淋巴管(箭头)染色; B: 淋巴管及神经纤维染色而微血管不染色, ML: 微淋巴管, MV: 微静脉, MA: 微动脉, N: 神经纤维; C: 肿瘤区域(箭头)内含有丰富的淋巴管; D: 肿瘤细胞(箭头)浸润微淋巴管; E-F: 肿瘤(箭头)浸润神经与淋巴管(三角形)显色.

长方式也是多样的, 可以在神经纤维内部弥漫性生长, 最终破坏整条神经纤维。有研究表明肿瘤浸润神经与神经营养因子(neurotrophin, NT)及其受体(如Trk)有关^[20-23]。基于他们针对肿瘤神经浸润的特异性实验治疗已有研究报道^[24-25], 但目前的研究尚处于动物试验阶段, 离临床实际应用尚有距离。

由于肝门部胆管癌具有高的神经浸润发生率, 肝门部胆管癌行根治性切除术时, 对肝十二指肠韧带及一、二级胆管所在的Glisson鞘“骨骼化”时, 应仔细剥除胆管与肝动脉和门静脉间的神经纤维组织, 以防肿瘤细胞通过浸润的神经组织而发生局部残留和术后的局部复发。然而, 剥离血管外膜是否可以满足神经纤维清除的需要, “去神经支配”的肝脏功能是否受到影晌, 尚需要更多的研究工作证实。基于以上研究结果, 我们认为, 肝门部胆管癌神经浸润发

生率高, 术后应给予局部抗神经浸润治疗; 亟待研制新型、高效亲神经的肿瘤化疗药物; 研究活体组织中神经纤维染色剂, 指导术中对肿瘤周围神经组织的清除, 确定肿瘤切除的范围; 从而预防肿瘤通过神经浸润而发生的远处转移和局部复发。

4 参考文献

- 黄志强. 肝门部胆管癌外科治疗 - 效果有待提高. 临床外科杂志 2006; 14: 65-66
- 周宁新, 黄志强, 张文智, 黄晓强, 王敬, 刘荣, 纪文斌, 肖梅, 孟翔飞. 402例肝门部胆管癌临床分型、手术方式与远期疗效的综合分析. 中华外科杂志 2006; 44: 1599-1603
- 黄志强, 周宁新, 黄晓强. 肝门部胆管癌的外科治疗. 消化外科 2003; 2: 229-238
- Silva MA, Tekin K, Aytekin F, Bramhall SR, Buckels JA, Mirza DF. Surgery for hilar cholangiocarcinoma; a 10 year experience of a tertiary referral centre in the UK. Eur J Surg Oncol 2005; 31: 533-539
- Weidner N. Current pathologic methods for

名词解释
肝门部胆管癌: 曾经有Klatskin瘤、肝管分叉部癌、肝内大胆管癌、上段胆管癌等称谓, 在肝胆管癌的分类上, 现在能大致达成的共识是: 凡侵犯肝门部肝管分叉者, 不论其开始时在肝外还是肝内胆管, 都归于肝门部胆管癌。

同行评价

本文选题先进,且贴近临床,有较强的指导意义,是一篇较好的论文.

- measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 169-180
- 6 Yamaguchi R, Nagino M, Oda K, Kamiya J, Uesaka K, Nimura Y. Perineural invasion has a negative impact on survival of patients with gallbladder carcinoma. *Br J Surg* 2002; 89: 1130-1136
- 7 Chijiwa K, Ohsato T, Shinohara M, Tanaka M. Clinico-pathological findings of asymptomatic intrahepatic cholangiocellular carcinoma: report of two cases and review of the literature. *Eur J Surg Oncol* 1996; 22: 186-188
- 8 Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Nagino M, Uesaka K, Oda K, Sano T, Yamamoto H, Hayakawa N. Aggressive preoperative management and extended surgery for hilar cholangiocarcinoma: Nagoya experience. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 155-162
- 9 Nakagohri T, Asano T, Kinoshita H, Kenmochi T, Urashima T, Miura F, Ochiai T. Aggressive surgical resection for hilar-invasive and peripheral intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Surg* 2003; 27: 289-293
- 10 Aishima S, Kuroda Y, Nishihara Y, Iguchi T, Taguchi K, Taketomi A, Maebara Y, Tsuneyoshi M. Proposal of progression model for intrahepatic cholangiocarcinoma: clinicopathologic differences between hilar type and peripheral type. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 1059-1067
- 11 Robles R, Figueras J, Turrión VS, Margarit C, Moya A, Varo E, Calleja J, Valdivieso A, Valdecasas JC, Lopez P, Gomez M, de Vicente E, Loinaz C, Santoyo J, Fleitas M, Bernardos A, Llado L, Ramirez P, Bueno FS, Jaurrieta E, Parrilla P. Spanish experience in liver transplantation for hilar and peripheral cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2004; 239: 265-271
- 12 Seyama Y, Kubota K, Sano K, Noie T, Takayama T, Kosuge T, Makuuchi M. Long-term outcome of extended hemihepatectomy for hilar bile duct cancer with no mortality and high survival rate. *Ann Surg* 2003; 238: 73-83
- 13 Su CH, Tsay SH, Wu CC, Shyr YM, King KL, Lee CH, Lui WY, Liu TJ, Peng FK. Factors influencing postoperative morbidity, mortality, and survival after resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 1996; 223: 384-394
- 14 Kurosaki I, Tsukada K, Watanabe H, Hatakeyama K. Prognostic determinants in extrahepatic bile duct cancer. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 905-909
- 15 王大东, 黄志强, 周宁新, 陈乐真, 戴朴. 胆管癌神经浸润转移模式的三维重建. 中华外科杂志 2000; 38: 207, 9
- 16 Gebhardt C, Meyer W, Reichel M, Wunsch PH. Prognostic factors in the operative treatment of ductal pancreatic carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 14-20
- 17 Takahashi S, Hasebe T, Oda T, Sasaki S, Kinoshita T, Konishi M, Ueda T, Ochiai T, Ochiai A. Extratumor perineural invasion predicts postoperative development of peritoneal dissemination in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2001; 21: 1407-1412
- 18 Hassan MO, Maksem J. The prostatic perineural space and its relation to tumor spread: an ultrastructural study. *Am J Surg Pathol* 1980; 4: 143-148
- 19 Maxwell P, Hamilton PW, Sloan JM. Three-dimensional reconstruction of perineural invasion in carcinoma of the extrahepatic bile ducts. *J Pathol* 1996; 180: 142-145
- 20 Sakamoto Y, Kitajima Y, Edakuni G, Sasatomi E, Mori M, Kitahara K, Miyazaki K. Expression of Trk tyrosine kinase receptor is a biologic marker for cell proliferation and perineural invasion of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2001; 8: 477-484
- 21 Zhu Z, Kleeff J, Kayed H, Wang L, Korc M, Buchler MW, Friess H. Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog* 2002; 35: 138-147
- 22 Zhang Y, Dang C, Ma Q, Shimahara Y. Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2005; 14: 161-171
- 23 Iwahashi N, Nagasaka T, Tezel G, Iwashita T, Asai N, Murakumo Y, Kiuchi K, Sakata K, Nimura Y, Takahashi M. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor correlates with perineural invasion of bile duct carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 167-174
- 24 Miknyoczki SJ, Wan W, Chang H, Dobrzanski P, Ruggeri BA, Dionne CA, Buchkovich K. The neurotrophin-trk receptor axes are critical for the growth and progression of human prostatic carcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1924-1931
- 25 Tanaka J, Sato E, Saito Y, Kusano T, Koyama K. Preparation of a conjugate of mitomycin C and anti-neuronal cell adhesion molecule monoclonal antibody for specific chemotherapy against biliary tract carcinoma. *Surg Today* 1998; 28: 1217-1220

编辑 程剑侠 电编 郭海丽



急性胰腺炎肝损伤的发病机制和治疗

于洪海, 冯志杰

于洪海, 冯志杰, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000
作者贡献分布: 于洪海与冯志杰对本文贡献均等; 本综述写作由
于洪海完成, 文章的修改由冯志杰完成。
通讯作者: 冯志杰, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第
二医院消化内科. zhijiefeng2005@163.com
电话: 0311-66002951
收稿日期: 2007-04-16 修回日期: 2008-01-15

Pathogenesis and treatment of acute pancreatitis with liver injury

Hong-Hai Yu, Zhi-Jie Feng

Hong-Hai Yu, Zhi-Jie Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Correspondence to: Zhi-Jie Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhijiefeng2005@163.com
Received: 2007-04-16 Revised: 2008-01-15

Abstract

Acute pancreatitis is a frequent acute abdomen in clinic, causes damages not only to pancreas, but also to distant organs. Liver is one of the mainly involved organs. The development of liver injury may aggravate pancreatitis. The pathogenesis of acute pancreatitis with liver injury is mainly related to cytokines, pancreatic enzyme, oxidative stress, microcirculation disturbance, apoptosis and pancreatitis-associated ascitic fluid, etc. Its treatment is also to eradicate these factors. However, more methods are still under animal studies. Their clinical application requires further study.

Key Words: Acute pancreatitis; Liver injury

Yu HH, Feng ZJ. Pathogenesis and treatment of acute pancreatitis with liver injury. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 385-391

摘要

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急腹症, 常常引起胰外器官损伤, 肝脏是主要受损器官之一, 其损害的不断加重可导致胰

腺炎病情恶化, 目前认为肝脏损伤的机制主要有细胞因子、胰酶、氧化应激、微循环障碍、细胞凋亡和胰腺炎相关性腹水等。目前AP肝损伤的治疗也主要从上述各方面着手, 但更多的方法仍仅仅局限于动物实验, 临床应用还需进一步研究。

关键词: 急性胰腺炎; 肝脏损伤

于洪海, 冯志杰. 急性胰腺炎肝损伤的发病机制和治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 385-391

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/385.asp>

背景资料
急性胰腺炎是临床常见的急腹症, 肝脏是主要受损的胰外器官之一, 其损害的不断加重可导致胰腺炎病情恶化。肝脏损伤的机制目前认为主要有细胞因子、胰酶、氧化应激、微循环障碍、细胞凋亡和胰腺炎相关性腹水等方面, 而治疗方法大多局限于动物实验, 临床应用还需进一步研究。

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急腹症, 其发病机制尚未完全阐明。而急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)常常并发肝、肾、肠道等胰外器官损伤, 进而发生多器官功能障碍(MODS), 死亡率较高。在一项对178名SAP相关MODS患者的回顾性研究中, 具有最高死亡率的是肝衰竭患者(83%); 而联合器官衰竭中, 又以肝肾衰竭死亡率最高(91%)^[1]。围绕急性胰腺炎相关肝损伤的机制和治疗有着众多的研究, 现将目前研究进展作一综述。

1 急性胰腺炎肝损伤的发病机制

1.1 细胞因子的作用 目前研究表明, AP时中性粒细胞分泌大量细胞因子, 在AP的病理生理变化中起着重要的作用。常见的致炎因子主要有TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8等, 他们参与了局部炎症和全身炎症级联反应, 不仅引起胰腺水肿、出血坏死等, 还导致了胰外器官的损伤^[2-3]。Pastor *et al*^[4]发现, 在雨蛙肽诱导的大鼠AP中, 给予抗中性粒细胞血清后胰腺等器官损伤减轻, 肝脏中IL-6、IL-10水平明显降低, 认为中性粒细胞的激活是AP时器官损伤的原因之一。Zhang *et al*^[5]在牛磺胆酸钠诱导的大鼠AP中发现, AP时TNF-α、IL-6、IL-10等炎症因子水平明显升高, 且与胰腺炎严重程度和器官损伤程度密切相关, 给予生长抑素后TNF-α mRNA的表达降低,

同行评议者
何振平, 教授, 第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所

创新盘点

本文总结了近7年来国内外对于急性胰腺炎肝脏损伤的研究情况,探讨了急性胰腺引起肝脏损伤的诸多原因以及针对不同原因采取的治疗方法。

细胞因子水平也下降,推测TNF- α 在疾病的进展中可能起很重要的作用。另外,有人在胆碱缺乏和乙硫氨酸补充饮食(choline-deficient/ethionine-supplemented diet, CDE)诱导的C57BL/6大鼠SAP中,在实验36 h监测到肝脏中NF-kappa B的激活并且随之出现IL-6、MIP-2和转氨酶的显著升高,认为NF-kappa B依赖的细胞因子参与了AP时的肝损伤^[6-7]。

1.2 胰酶的作用 AP时在致病因素作用下大量胰酶在胰腺内激活,胰蛋白酶原激活成胰蛋白酶,继而激活糜蛋白酶、弹性蛋白酶、磷脂酶A2等,造成胰腺局部损伤,刺激中性粒细胞产生大量炎性介质。这些介质入血后进一步引起机体炎性介质释放形成瀑布似的连锁反应,形成全身的炎症反应造成多器官的损伤^[8]。Zhang *et al*^[9]从人体和大鼠的胰液中分离出一种甘露糖结合蛋白,他曾从血清、肝脏、肺等器官分离出来,证实在急性宿主防御反应第一线发挥重要作用。而该蛋白属于一种胰弹性蛋白酶,可以引起巨噬细胞激活、增强TNF- α 的表达,推测其可能在急性胰腺炎和全身炎症反应中起中介作用。Jaffray *et al*^[10]的实验证实了AP胰弹性蛋白酶造成了肝脏的炎症反应和损伤。而胰腺炎时胰酶的多少影响着胰腺炎的严重程度,这已得到Coelho *et al*^[11]实验证实:在牛磺胆酸钠诱导的AP中,造模前通过给予生理剂量的雨蛙肽[0.133 mg/(kg·h)]以降低胰酶和胰蛋白酶原的含量,从而减少了AP时致炎细胞因子的生成以及肝细胞线粒体功能障碍的发生。胰腺炎相关蛋白(pancreatitis-associated protein, PAP)是一种胰弹性蛋白,AP时过度表达。Folch-Puy *et al*^[12]在牛磺胆酸钠诱导的大鼠AP中,经腔静脉外源注入PAP(400 mg/kg),发现3 h后肝脏中NF-kappaB激活、肝细胞中TNF- α mRNA过度表达、TNF- α 含量异常增加,胰腺组织中的中性粒细胞浸润、氧化应激程度均较对照组明显升高,说明AP时PAP由胰腺释放后引起肝细胞TNF- α 过度表达, TNF- α 生成增加引起炎症造成组织损伤。

1.3 氧自由基的作用 在AP的发展中,被损坏的腺泡细胞与激活的白细胞、巨噬细胞产生大量的氧自由基及其衍生物,氧自由基的失衡导致了细胞的损伤,这些自由基不仅仅局限在胰腺内,也影响到身体的其他器官,特别是在肝、肺等器官中^[13]。Esrefoglu *et al*^[14]在雨蛙肽诱导的大鼠AP中发现,肝脏细胞出现变性、空泡化、血管充血、血窦膨大、炎症性浸润等病变同时伴有

显著的丙二醛(malondialdehyde, MDA)升高、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)的活动降低。给予抗氧化剂褪黑素或N-乙酰半胱氨酸+维生素C后可以明显改善肝脏的损伤。认为氧化损伤在AP肝损伤中起重要作用。Szabolcs *et al*^[15]采用L-精氨酸(3.2 g/kg, 2次ip)诱导大鼠坏死性胰腺炎模型,发现精氨酸引起肝脏脂质过氧化物反应水平升高,髓过氧化物酶激活,造模24 h后Cu/Zn过氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)以及CAT和GPx显著增加。Czako *et al*^[16]在L-精氨酸诱导的大鼠AP模型中也发现了胰腺、肝脏等器官中MDA浓度升高,而肝脏中Mn过氧化物歧化酶(Mn-SOD)和GPx的活动在发病初降低,胰腺泡细胞、肝细胞出现坏死等病变,认为在精氨酸诱导的AP早期,胰腺、肝脏等器官产生的氧自由基造成了器官的损害。但也有研究显示,小剂量L-精氨酸对AP具有治疗作用, Dobosz *et al*^[17]在雨蛙肽诱导的AP大鼠中,以L-精氨酸作为NO底物(100 mg/kg)给予大鼠后,发现可以改善胰腺、肝脏等脏器的微循环灌注。

1.4 微循环障碍 微循环的改变是AP早期重要的病理生理过程,他不仅仅发生于胰腺,而是涉及到众多器官诸如肝脏、肺脏和肠道等。肝脏中微循环的变化参与了肝组织损伤和肝功能障碍的发生发展过程^[18]。Foitzik *et al*^[19]通过活体显微镜检查法(intravital microscopy)和计算机图像分析发现,肝脏、胰腺等的微循环障碍在大鼠SAP模型早期发生,持续存在48 h以上,不仅影响毛细血管血流量,还影响毛细血管渗透性和白细胞内皮细胞的相互作用,认为微循环障碍可能与胰腺炎相关的MODS发生有关。Forgacs *et al*^[20]在雨蛙肽诱导的AP大鼠中,也观察到造模6 h后,与对照组相比,AP大鼠肝脏毛细血管流量显著降低,给予雨蛙肽拮抗剂可以明显改善肝血流灌注。Dobosz *et al*^[17]的实验也证实了AP造成了肝脏微循环灌注的显著下降,而给予L-精氨酸后,能够改善肝脏微循环,减轻器官损伤。

1.5 肝细胞凋亡 各种原因造成的肝损伤都可以出现肝细胞凋亡。肝细胞的凋亡是AP肝脏受损的表现之一,大量的肝细胞凋亡可造成肝功能障碍,严重时可进展至肝衰竭。Takeyama *et al*^[21]在大鼠SAP模型中发现肝细胞凋亡的存在,同时用SAP时产生的胰腺炎相关性腹水培养体外大鼠肝细胞时发现细胞的死亡是通过凋亡实现的,给予转化生长因子 β 1的(TGF β 1)中和

抗体可以部分阻止凋亡的诱导, 推测凋亡产生可能部分与胰腺炎相关性腹水(pancreatitis-associated ascitic fluid, PAAF)中的TGF β 1有关。Hori *et al*^[22]和Nakamura *et al*^[23]也发现, 大鼠AP时TGF β 1在血浆、PAAF、肝组织和腹膜巨噬细胞中的水平都升高, 其中和抗体可以减少肝细胞的凋亡、降低血清谷丙转氨酶, 而巨噬细胞的清除明显降低了血浆和PAAF中TGF β 1蛋白的水平, 且明显抑制了肝组织中TGF β 1的激活, 因此认为AP肝损伤与巨噬细胞引起的凋亡有关, 而其衍生的TGF β 1是诱导肝细胞凋亡的重要因子。研究发现AP时Kupffer细胞衍生的Fas配体(FasL)、p38-促分裂原活化蛋白激酶(p38-mitogen-activated protein kinase, p38-MAPK)、细胞凋亡蛋白酶-3(caspase-3)表达增加并且诱导了肝细胞的凋亡损伤^[24-25]。Gallagher *et al*^[26]又进一步发现, 在Fas/FasL基因敲除大鼠中, AP诱导的p38-MAPK表达显著降低, 肝细胞的凋亡也明显减少, 推测Fas/FasL在AP肝细胞的凋亡中起关键作用。Peng *et al*^[27]通过CDE诱导大鼠AP模型, 并用弹性蛋白酶在p65 siRNA转染的大鼠离体Kupffer细胞株中模拟AP损伤模型。实验发现, CDE胰腺炎引起p65 NF-kappa B/RelA核转位、Fas/FasL和caspase-3表达增加以及大鼠肝细胞核内DNA断裂。而在体外实验中, p65 siRNA的转染减弱了弹性蛋白酶诱导的p65 NF-kappa B/RelA核转位和Kupffer细胞的凋亡, 证明AP通过NF-kappa B途径诱导Kupffer细胞凋亡, 并推测Kupffer细胞衍生的Fas/FasL诱导的肝细胞凋亡和NF-kappa B途径诱导的Kupffer细胞凋亡之间的平衡失调决定了AP时肝脏损伤的程度。

1.6 胰腺炎相关性腹水(PAAF)

AP时形成腹水不仅作为一种损伤体征出现, 而且具有很强的致病性, 可以促使AP病情进一步加剧, 并造成胰外器官的损害。Murr *et al*^[28]用PAAF灌注健康大鼠肝脏60 min后, 发现血清中AST、ALT、LDH水平升高15倍以上, 且不能被蛋白抑制因子所抑制。而将人肝细胞株(CCL-13)暴露于PAAF后, 死亡细胞达到了15%而且PAAF的这一作用不受蛋白酶抑制因子或热灭活所影响。推测PAAF对AP时肝脏的影响并不是通过其含有的胰酶或者局部Kupffer细胞诱导的细胞因子, 而是通过一种热稳定因子实现的。Yang *et al*^[29]又进一步发现, 向大鼠ip灭菌的PAAF, 同时将离体人肝细胞株(CCL-13)暴露于PAFF, 24 h后, 大鼠血清ALT、AST、LDH水平和肝细胞凋亡的数量都明显增

加。在CCL-13中检测到p38-MAPK的激活, 细胞凋亡出现了时间和剂量的依赖性, 而caspase-3抑制剂II可以减少凋亡, 故而认为PAAF通过p38-MAPK的激活和caspase-3依赖的途径引起肝细胞凋亡从而造成了肝损伤。Ueda *et al*^[30]认为PAAF通过其含有的细胞毒性物质造成了肝细胞凋亡, 并发现PAAF还可引起肝细胞酸中毒、细胞内钠潴留、线粒体内ATP衰竭等, 认为PAAF中含有的血色素可能是造成肝脏损伤的细胞毒性物质之一。而此前Ueda *et al*^[31]认为PAAF可造成肝细胞内钙超载, 这也可能是AP时肝脏受损以及AP造成多器官功能损伤的原因之一。

1.7 其他 AP发病初期, 病损的胰腺组织作为抗原或炎症刺激物激活巨噬细胞等炎症细胞释放各种细胞因子等, 他们对肝脏的损伤被认为是重要的引发效应和第一次打击, 继之而来的瀑布级联反应引发的全身炎症反应以及细菌移位、内毒素血症等具有感染性的打击构成了对肝脏的第二次打击。Okabe *et al*^[32]用雨蛙肽诱导大鼠AP模型形成第一次打击, 之后造成内毒素血症以形成第二次打击。实验发现雨蛙肽+内毒素血症组的大鼠, 其肝脏对吲哚花青绿的血浆清除率较其他组显著降低, 提示肝脏功能受损严重, 而单纯的内毒素血症组该指标变化较轻微, 认为AP时的第一和第二次打击对造成肝脏损伤都具有重要作用。Gray *et al*^[33]用雨蛙肽诱导大鼠AP模型后注射内毒素, 24 h后发现肝脏NF-kappa B激活, 推测内毒素通过肝脏NF-kappa B引起器官损伤。

2 急性胰腺炎肝损伤的治疗

AP相关肝损伤的治疗与AP的治疗密切相关, 因为胰外器官的损伤程度取决于胰腺炎的严重程度。根据AP肝损伤的机制, 进行抗炎、抗氧化、改善微循环、抑制凋亡、促进肝细胞再生以及支持疗法等。

2.1 抗炎治疗 一些细胞因子参与了肝脏炎症反应并造成损害, 故抑制这些细胞因子发挥作用或者阻断其激活和表达都可以起到保护作用^[34]。抑制细菌移位以阻止其诱发炎症反应, 有人应用血小板活化因子抑制剂以及血小板活化因子受体抑制剂-BN52021, 降低了大鼠AP时细菌移位的发生并减轻了器官损伤^[35-36]。Cevikel *et al*^[37]发现, NO对AP时细菌移位可能具有调节作用, 通过每日给予NO合酶作用底物-L-精氨酸(100 mg/kg)2 d后, 细菌易位的发生明显低于对照组, 器官损害亦较轻。Chen *et al*^[38]经静脉给予AP大鼠表皮生长因子(epidermal growth factor,

应用要点
对于急性胰腺肝损伤的机制, 国内外研究涉及到诸多方面。肝脏损伤的治疗也有不同方法, 但大多集中于动物实验的研究。本文可以为今后急性胰腺炎肝损伤机制和治疗的研究提供一个借鉴和参考。

名词解释

胰腺炎相关性腹水(PAAF):是指胰腺炎时含有胰酶的胰液渗漏进入腹腔,引起慢性炎症,导致大量液体在腹腔内聚集.

EGF)后,可以改善肠道的渗透性从而阻止细菌移位发生,保护胰腺、肝脏等器官. IL-10作为一种内源性抗炎细胞因子,可以抑制单核巨噬细胞合成和表达TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8等,减轻AP严重程度,改善预后. Zou *et al*^[39]进行了针对人IL-10(hIL-10)基因治疗的研究,给AP大鼠ip一种“阳性脂质体/质粒-hIL-10(pcDNA3-hIL-10)复合物”后,胰腺、肝脏、肺脏hIL-10水平升高,TNF- α 水平降低和组织学改善,hIL-10基因治疗组的死亡率较对照组明显降低,7 d存活率分别为70%和10%,认为该疗法可能具有积极的临床意义. Wang *et al*^[40]在大鼠SAP实验中,用阳性脂质体介导的pcDNA3-IL-10基因疗法治也证明能够有效降低SAP严重程度和死亡率.Ueno *et al*^[41]给AP大鼠造模前注射重组大鼠IL-18(rmIL-18)蛋白,降低了AP时血清淀粉酶、脂肪酶、腺泡细胞空泡化水平,rmIL-18还增加了胰腺、肝脏等器官NO水平和iNOS基因表达,认为rmIL-1在AP早期的保护作用可能是通过引起iNOS来源的NO释放形成的,可能对AP具有治疗作用.早期给予抗生素治疗也可以减少肝脏的损伤,Miyahara *et al*^[42]在狗胆汁反流性AP实验中,造模6 h后,经肠系膜上动脉持续给予抗生素亚胺培南治疗,发现治疗组存活率较对照组明显升高,血清转氨酶和门静脉内毒素水平显著降低,发病24 h后,对照组肝细胞和Kupffer细胞损伤加剧,TNF- α 表达急剧增加,而治疗组的损伤则轻微.认为抗生素可以控制内毒素易位,从而减少肝损伤. Onek *et al*^[43]实验也证实抗生素具有治疗效果,并发现喹喏酮类的药物效果要优于 β -内酰胺类抗生素.

2.2 抗氧化治疗 应用氧自由基清除剂可以降低AP时肝脏的氧化损伤.褪黑素(melatonin)具有很强的抗氧化作用,Szabolcs *et al*^[45]发现褪黑素可以降低AP大鼠血清淀粉酶、过氧化氢酶的水平,降低脂质过氧化反应程度,减少器官损害.褪黑素还具有抑制中性粒细胞浸润作用,Barlas *et al*^[44]发现其在胰管梗阻性胰腺炎中可以保护肝脏等胰外器官,认为通过其清除氧自由基和抗氧化剂活性抑制了嗜中性白细胞对组织的浸润.白藜芦醇(resveratrol)是葡萄属植物产生的一种植物抗毒素,为多酚类物质,具有很强的抗氧化和抗炎作用.Szabolcs *et al*^[45]发现,在胆囊收缩素诱导的大鼠AP中,白藜芦醇可以增加肝脏还原性谷胱甘肽含量并减少肝过氧化氢酶的激活.此外还有维生素C,N-乙酰半胱氨酸等也具有抗

氧化的作用^[46-47]. Esrefoglu *et al*^[44]在其实验中发现,维生素C联合N-乙酰半胱氨酸可以增加大鼠肝脏中GPx和CAT的活性,减少了胰腺和肝脏的损伤.

2.3 改善微循环 Dobosz *et al*^[48]通过激光多普勒血流仪发现,大鼠AP时各个器官微循环灌注都显著降低,而肝素钠增加了微循环灌注,具有一定的治疗作用.Machado *et al*^[49]发现AP时平均动脉压显著降低,而高渗盐水(7.5% NaCl)治疗可以升高动脉压,改善血液循环并且降低IL-6、IL-10等细胞因子水平和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性,减轻肝脏等器官损伤,死亡率降低.Chen *et al*^[50]发现,给予大鼠ip褪黑素(2或10 mg/kg)后,可以减轻全身动脉压降低的程度,维持器官灌注水平,大剂量组对于AP的治疗效果要优于小剂量组,能够降低促炎介质-前列腺素的水平,使之趋于正常.

2.4 生长抑素 生长抑素对AP的治疗疗效较为确切,能够进一步减轻肝脏的损伤^[51].研究发现,生长抑素能够抑制AP大鼠血清TNF- α mRNA的过度表达,减轻胰腺和肝脏组织的损伤^[5,52-53]. Tang *et al*^[54]对39名SAP患者,于发病早期给予生长抑素(250 μ g/h)治疗持续72 h,发现可以减少炎症应答,恢复细胞免疫功能,改善患者一般状况,但对于死亡率的疗效还需进一步研究.Xia *et al*^[55]对60名SAP患者应用生长抑素治疗后,血清C-反应蛋白水平降低,APACHE II评分明显有改善,器官功能障碍的发生率较常规药物治疗组降低.

2.5 糖皮质激素 糖皮质激素的使用存在有争议,研究显示,给予地塞米松或者氢化可的松后,大鼠肝脏中ATP水平明显升高,MPO、细胞间黏附因子-1(ICAM-1)水平降低,认为糖皮质激素在AP早期炎症反应中发挥重要作用^[56-59]. Cosen-Binker *et al*^[60]则发现糖皮质激素对AP大鼠具有预防损伤作用且与给药时间和剂量相关,在诱导AP前30 min给予氢化可的松4 mg/kg效果最佳,过高或过低则效果欠佳.Zhang *et al*^[61]观察到地塞米松可以明显降低AP大鼠血清中淀粉酶、内毒素、TNF- α 的水平,但并没有改变大鼠的死亡率.

2.6 血液滤过 血液滤过作为一种净化血液的方法,在AP以及相关器官损伤的治疗中可能具有重要意义.Yang *et al*^[62],对猪SAP模型使用高容量零差额(high-volume and zero-balance)的血液滤过疗法,与对照组相比,治疗组的平均

动脉压、动脉血氧分压显著增加, 而尿蛋白含量、血清ALT水平则显著下降, 造模6 h后, 血清TNF- α 、IL-1 β 水平降低, IL-10/TNF- α 比率更高, 认为早期血滤可以有效清除猪血液中TNF- α 、IL-1 β , 升高IL-10/TNF- α 比率, 改善血流动力学, 减轻肝、肾等器官损伤。Yang *et al*^[63]对37名SAP患者的随机分组实验, 采用连续性静脉-静脉血液滤过(continuous veno-venous hemofiltration, CVVH)组的治疗效果明显优于常规治疗组, 死亡率低(18.2% vs 33.3%)、住院天数少(18.3±5.7 d vs 27.5±8.6 d), 认为该法对SAP造成的组织和器官损伤具有显著的保护效果。

2.7 其他 研究证实, 肠内营养的方法可以有效减少细菌移位的发生, 降低了血清淀粉酶、转氨酶^[64-65]。但Alhan *et al*^[66]却发现肠道内营养和静脉营养联合疗法对AP大鼠并没有显著效果。Yol *et al*^[67]对大鼠采用胰胆管结扎法诱导AP, 并于造模开始给予大量聚乙二醇持续灌肠6 h, 结果显示72 h后, 灌肠组血清淀粉酶、ALT、LDH、乳酸水平和肝损伤的发生率均显著低于对照组。Alhan *et al*^[68]在大鼠AP实验中发现, 给予Omega-3(ω -3)脂肪酸可以减少胰腺、肝脏等器官的细菌感染, 降低血清TNF- α 、IL-6含量, 减少氧自由基的破坏, 降低死亡率。Ueda *et al*^[69]发现肝细胞生长因子在AP损伤器官中表达增加, 肝细胞生长因子具有一定营养作用, 并且可以抑制PAAF引起的肝细胞凋亡。

3 结论

AP肝损伤机制仍未完全阐明, 目前研究认为与炎性细胞因子、胰酶活性、氧化应激、微循环障碍、肝细胞凋亡、胰腺炎相关性腹水等损伤因素有关, 这些方面相互影响, 构成了一个复杂的病理生理过程。治疗上包括抗炎、抗氧化、改善微循环、应用生长抑素、糖皮质激素和血液滤过等方法, 目前AP肝损伤治疗的研究主要为动物实验, 其临床疗效有待进一步证实。

4 参考文献

- 1 Halonen KI, Pettila V, Leppaniemi AK, Kemppainen EA, Puolakkainen PA, Haapiainen RK. Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med* 2002; 30: 1274-1279
- 2 Martín Alonso MA, Santamaría A, Saracíbar E, Arranz E, Garrote JA, Almaraz A, Caro-Patón A. Cytokines and other immunological parameters as markers of distant organ involvement in acute pancreatitis. *Med Clin (Barc)* 2007; 128: 401-406
- 3 Folch-Puy E. Importance of the liver in systemic complications associated with acute pancreatitis: the role of Kupffer cells. *J Pathol* 2007; 211: 383-388
- 4 Pastor CM, Vonlaufen A, Georgi F, Hadengue A, Morel P, Frossard JL. Neutrophil depletion--but not prevention of Kupffer cell activation--decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1219-1224
- 5 Zhang Q, Ni Q, Cai D, Zhang Y, Zhang N, Hou L. Mechanisms of multiple organ damages in acute necrotizing pancreatitis. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 738-742
- 6 Gray KD, Simovic MO, Blackwell TS, Christman JW, May AK, Parman KS, Chapman WC, Stain SC. Activation of nuclear factor kappa B and severe hepatic necrosis may mediate systemic inflammation in choline-deficient/ethionine-supplemented diet-induced pancreatitis. *Pancreas* 2006; 33: 260-267
- 7 Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Takacs T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* 2008; 57: 259-267
- 8 Elfar M, Gaber LW, Sabek O, Fischer CP, Gaber AO. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: relevance to clinical disease. *Surg Clin North Am* 2007; 87: 1325-1340, vii
- 9 Zhang H, Patel SA, Kandil E, Mueller CM, Lin YY, Zenilman ME. Pancreatic elastase is proven to be a mannose-binding protein--implications for the systemic response to pancreatitis. *Surgery* 2003; 133: 678-688
- 10 Jaffray C, Yang J, Norman J. Elastase mimics pancreatitis-induced hepatic injury via inflammatory mediators. *J Surg Res* 2000; 90: 95-101
- 11 Coelho AM, Machado MC, Cunha JE, Sampietre SN, Abdo EE. Influence of pancreatic enzyme content on experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26: 230-234
- 12 Folch-Puy E, Garcia-Movret A, Iovanna JL, Dagorn JC, Prats N, Vaccaro MI, Closa D. The pancreatitis-associated protein induces lung inflammation in the rat through activation of TNFalpha expression in hepatocytes. *J Pathol* 2003; 199: 398-408
- 13 Tadao M, Yuji O. Role of free radicals in the development of severe acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2015-2020
- 14 Eşrefoglu M, Güllü M, Ates B, Batçioğlu K, Selimoğlu MA. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 259-264
- 15 Szabolcs A, Reiter RJ, Letoha T, Hegyi P, Papai G, Varga I, Jarmay K, Kaszaki J, Sari R, Rakonczay Z Jr, Lonovics J, Takacs T. Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 251-258
- 16 Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, Lonovics J. Oxidative stress in distant organs and the effects of allopurinol during experimental acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 2000; 27: 209-216
- 17 Dobosz M, Hac S, Mionskowska L, Dymecki D, Dobrowolski S, Wajda Z. Organ microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. A role of nitric oxide. *Physiol Res* 2005; 54: 363-368
- 18 Panek J, Zasada J, Poźniczek M. Microcirculatory disturbance in the course of acute pancreatitis.

同行评价

本文之前虽有报道, 但该文的参考文献较新, 且信息量大, 有一定的参考性。

- 19 Przegl Lek 2007; 64: 435-437
Foitzik T, Eibl G, Hotz B, Hotz H, Kahrau S, Kasten C, Schneider P, Buhr HJ. Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: experimental findings and clinical implications. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 130-138
- 20 Forgacs B, Eibl G, Wudel E, Franke J, Faulhaber J, Kahrau S, Buhr HJ, Foitzik T. RES function and liver microcirculation in the early stage of acute experimental pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 861-866
- 21 Takeyama Y, Hori Y, Takase K, Ueda T, Yamamoto M, Kuroda Y. Apoptotic cell death of hepatocytes in rat experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000; 127: 55-64
- 22 Hori Y, Takeyama Y, Ueda T, Shinkai M, Takase K, Kuroda Y. Macrophage-derived transforming growth factor-beta1 induces hepatocellular injury via apoptosis in rat severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000; 127: 641-649
- 23 Nakamura H, Tashiro M, Yamaguchi T, Asaumi H, Nomiya Y, Watanabe S, Nagashio Y, Miyamoto T, Otsuki M. Preferential increase of extracellular matrix expression relative to transforming growth factor beta1 in the pancreas during the early stage of acute hemorrhagic pancreatitis in rats. *Pancreas* 2007; 35: e23-e29
- 24 Gallagher SF, Yang J, Baksh K, Haines K, Carpenter H, Epling-Burnette PK, Peng Y, Norman J, Murr MM. Acute pancreatitis induces FasL gene expression and apoptosis in the liver. *J Surg Res* 2004; 122: 201-209
- 25 Yang J, Gallagher SF, Haines K, Epling-Burnette PK, Bai F, Gower WR Jr, Mastorides S, Norman JG, Murr MM. Kupffer cell-derived Fas ligand plays a role in liver injury and hepatocyte death. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 166-174
- 26 Gallagher SF, Peng Y, Haines K, Baksh K, Epling-Burnette PK, Yang J, Murr MM. Fas/FasL play a central role in pancreatitis-induced hepatocyte apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 467-474; discussion 474-475
- 27 Peng Y, Gallagher SF, Landmann R, Haines K, Murr MM. The role of p65 NF-kappaB/RelA in pancreatitis-induced Kupffer cell apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 837-847
- 28 Murr MM, Yang J, Fier A, Foulis PR, Loughorn TP Jr, Epling-Burnette PK, Norman JG. Pancreatitis-associated ascitic fluid induces hepatocyte death independent of local cytokines. *J Surg Res* 2002; 106: 308-313
- 29 Yang J, Fier A, Carter Y, Liu G, Epling-Burnette PK, Bai F, Loughran TP Jr, Mastorides S, Norman JG, Murr MM. Liver injury during acute pancreatitis: the role of pancreatitis-associated ascitic fluid (PAAF), p38-MAPK, and caspase-3 in inducing hepatocyte apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 200-207; discussion 208
- 30 Ueda T, Takeyama Y, Takase K, Hori Y, Kuroda Y, Ho HS. Hematin is one of the cytotoxic factors in pancreatitis-associated ascitic fluid that causes hepatocellular injury. *Surgery* 2002; 131: 66-74
- 31 Ueda T, Takeyama Y, Hori Y, Takase K, Goshima M, Kuroda Y. Pancreatitis-associated ascitic fluid increases intracellular Ca(2+) concentration on hepatocytes. *J Surg Res* 2000; 93: 171-176
- 32 Okabe A, Hirota M, Kimura Y, Maeda K, Ogawa M. Functional disturbance of biliary indocyanine green excretion in rat cerulein pancreatitis followed by endotoxemia: role of the prime and the second attack. *JOP* 2003; 4: 178-183
- 33 Gray KD, Simovic MO, Chapman WC, Blackwell TS, Christman JW, May AK, Parman KS, Stain SC. Endotoxin potentiates lung injury in cerulein-induced pancreatitis. *Am J Surg* 2003; 186: 526-530
- 34 Malleo G, Mazzon E, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. TNF-alpha as a therapeutic target in acute pancreatitis--lessons from experimental models. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 431-448
- 35 Bedirli A, Gokahmetoglu S, Sakrak O, Soyuer I, Ince O, Sozuer E. Beneficial effects of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase and BN 52021 on bacterial translocation in cerulein-induced pancreatitis. *Eur Surg Res* 2004; 36: 136-141
- 36 Souza LJ, Shio MT, Molan NA, Machado MC, Jancar S. Acute pancreatitis affects non-parenchymal liver cells by a mechanism dependent on platelet-activating factor. *Pancreatology* 2007; 7: 67-73
- 37 Cevikel MH, Ozgun H, Boylu S, Demirkiran AE, Sakarya S, Culhaci N. Nitric oxide regulates bacterial translocation in experimental acute edematous pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 329-335
- 38 Chen D, Wang W, Wang J. Epidermal growth factor prevents increased permeability and bacterial translocation in rats with acute pancreatitis. *Chin Med Sci J* 2001; 16: 46-48
- 39 Zou WG, Wang DS, Lang MF, Jin DY, Xu DH, Zheng ZC, Wu ZH, Liu XY. Human interleukin 10 gene therapy decreases the severity and mortality of lethal pancreatitis in rats. *J Surg Res* 2002; 103: 121-126
- 40 Wang D, Jin D, Wu Z, Zou W, Xu D, Zheng Z, Liu X. Therapeutic effects of human interleukin 10 gene transfer on severe acute pancreatitis in rats, an experimental study. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82: 844-847
- 41 Ueno N, Kashiwamura S, Ueda H, Okamura H, Tsuji NM, Hosohara K, Kotani J, Marukawa S. Role of interleukin 18 in nitric oxide production and pancreatic damage during acute pancreatitis. *Shock* 2005; 24: 564-570
- 42 Miyahara S, Isaji S. Liver injury in acute pancreatitis and mitigation by continuous arterial infusion of an antibiotic via the superior mesenteric artery. *Pancreas* 2001; 23: 204-211
- 43 Onek T, Erkan N, Zeytunlu M, Sagol O, Coker C, Coker A. Effects of selected antibiotics on pancreatitis induced liver and pulmonary injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2005; 11: 3-10
- 44 Barlas A, Cevik H, Arbak S, Bangir D, Sener G, Yegen C, Yegen BC. Melatonin protects against pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats: role of neutrophils. *J Pineal Res* 2004; 37: 267-275
- 45 Szabolcs A, Varga IS, Varga C, Berko A, Kaszaki J, Letoha T, Tiszlavicz L, Sari R, Lonovics J, Takacs T. Beneficial effect of resveratrol on cholecystokinin-induced experimental pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2006; 532: 187-193
- 46 Eşrefoglu M, Güll M, Turan F. Comparative Effects of Several Therapeutic Agents on Hepatic Damage Induced by Acute Experimental Pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2007
- 47 Manso MA, Ramudo L, De Dios I. Extrapancreatic organ impairment during acute pancreatitis

- induced by bile-pancreatic duct obstruction. Effect of N-acetylcysteine. *Int J Exp Pathol* 2007; 88: 343-349
- 48 Dobosz M, Mionskowska L, Hac S, Dobrowolski S, Dymecki D, Wajda Z. Heparin improves organ microcirculatory disturbances in caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2553-2556
- 49 Machado MC, Coelho AM, Pontieri V, Sampietre SN, Molan NA, Soriano F, Matheus AS, Patzina RA, Cunha JE, Velasco IT. Local and systemic effects of hypertonic solution (NaCl 7.5%) in experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2006; 32: 80-86
- 50 Chen HM, Chen JC, Ng CJ, Chiu DF, Chen MF. Melatonin reduces pancreatic prostaglandins production and protects against caerulein-induced pancreatitis in rats. *J Pineal Res* 2006; 40: 34-39
- 51 Wenger FA, Kilian M, Heukamp I, Foitzik T, Jacobi CA, Guski H, Schimke I, Muller JM. Effects of octreotide in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1872-1876
- 52 Zhang XP, Zhang L, Yang P, Zhang RP, Cheng QH. Protective Effects of Baicalin and Octreotide on Multiple Organ Injury in Severe Acute Pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 581-591
- 53 Suzuki M, Shimizu T, Kudo T, Shoji H, Ohtsuka Y, Yamashiro Y. Octreotide prevents l-asparaginase-induced pancreatic injury in rats. *Exp Hematol* 2008; 36: 172-180
- 54 Tang WF, Wan MH, Zhu L, Chen GY, Xia Q, Huang X. Immuno-modulatory effect of somatostatin combined with traditional Chinese medicine on severe acute pancreatitis at early stage: a randomized control trial. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2005; 3: 103-107
- 55 Xia Q, Yuan L, Yang XN, Tang WF, Jiang JM. Comparison of integrated Chinese and Western medicine with and without somatostatin supplement in the treatment of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1073-1076
- 56 Paszt A, Takács T, Rakonczay Z, Kaszaki J, Wolfard A, Tiszlavicz L, Lázár G, Duda E, Szentpáli K, Czakó L, Boros M, Balogh A, Lázár G Jr. The role of the glucocorticoid-dependent mechanism in the progression of sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 2004; 29: 75-82
- 57 Paszt A, Rakonczay Z, Kaszaki J, Szentpáli K, Wolfard A, Tiszlavicz L, Lazar G. The role of glucocorticoid-dependent mechanisms in the progression of experimentally induced acute pancreatitis. *Magy Seb* 2003; 56: 185-192
- 58 Zhang XP, Zhang L, Wang Y, Cheng QH, Wang JM, Cai W, Shen HP, Cai J. Study of the protective effects of dexamethasone on multiple organ injury in rats with severe acute pancreatitis. *JOP* 2007; 8: 400-412
- 59 Sun W, Watanabe Y, Toki A, Wang ZQ. Beneficial effects of hydrocortisone in induced acute pancreatitis of rats. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 1757-1761
- 60 Cosen-Binker LI, Binker MG, Negri G, Tiscornia O. Experimental model of acute pancreatitis in Wistar rat: glucocorticoid treatment profile. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1453-1464
- 61 Zhang XP, Zhang L, Chen LJ, Cheng QH, Wang JM, Cai W, Shen HP, Cai J. Influence of dexamethasone on inflammatory mediators and NF- κ B expression in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 548-556
- 62 Yang Z, Wang C, Tao J, Xiong J, Wan C, Zhou F. Effect of early hemofiltration on pro- and anti-inflammatory responses and multiple organ failure in severe acute pancreatitis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004; 24: 456-459
- 63 Yang ZH, Yang J, Wang YJ. Protective effect of continuous veno-venous hemofiltration on tissue and organ damage in patients with severe acute pancreatitis. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2004; 16: 232-234
- 64 Xu GF, Lu Z, Gao J, Li ZS, Gong YF. Effect of ecoimmunonutrition supports on maintenance of integrity of intestinal mucosal barrier in severe acute pancreatitis in dogs. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 656-661
- 65 Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Shinzeki M, Matsumura N, Nakajima T, Matsumoto I, Fujita T, Ajiki T, Fujino Y, Kuroda Y. Treatment outcome of selective digestive decontamination and enteral nutrition in patients with severe acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14: 503-508
- 66 Alhan E, Kaklikkaya N, Deger O, Ercin C. Effects of combined nutritional therapy on acute necrotizing pancreatitis in rats in the early phase of the disease. *Eur Surg Res* 2004; 36: 33-38
- 67 Yol S, Ozer S, Aksoy F, Vatansev C. Whole gut washout ameliorates the progression of acute experimental pancreatitis. *Am J Surg* 2000; 180: 121-125
- 68 Alhan E, Turkyilmaz S, Ercin C, Kaklikkaya N, Kural BV. Effects of omega-3 fatty acids on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Eur Surg Res* 2006; 38: 314-321
- 69 Ueda T, Takeyama Y, Hori Y, Shinkai M, Takase K, Goshima M, Yamamoto M, Kuroda Y. Hepatocyte growth factor increases in injured organs and functions as an organotrophic factor in rats with experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2000; 20: 84-93

编辑 师忠芳 电编 何基才

IL-23及其受体IL-23R与克罗恩病的关系

李媚, 高翔, 胡品津

背景资料

炎症性肠病(包括克罗恩病和溃疡性结肠炎)是一种非特异性肠道炎症性疾病, IBD病因学研究一直是该领域的研究重点, 免疫调节紊乱是其发病的关键因素。克罗恩病是Th₁介导的肠道免疫反应。近几年来, 越来越多的研究显示, IL-23在Th₁介导的免疫反应中起重要作用。

李媚, 高翔, 胡品津, 中山大学附属第一医院消化内科 广东省广州市 510089

作者贡献分布: 本文由李媚负责撰写以及参考文献的搜寻; 高翔提供部分参考文献; 胡品津确定本文的研究方向。
通讯作者: 李媚, 510700, 广东省广州市, 中山大学附属第一医院黄埔院区消化内科. digoxin@126.com
电话: 020-39745535

收稿日期: 2007-08-30 修回日期: 2007-12-25

disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 392-398

摘要

炎症性肠病(IBD, 包括克罗恩病和溃疡性结肠炎)是一种非特异性肠道炎症性疾病, 发病率近年有所上升。IBD病因学研究一直是该领域的研究重点, 其发病与遗传、免疫、环境因素密切相关, 免疫调节紊乱是其发病的关键因素。克罗恩病是Th₁介导的肠道免疫反应。近几年来, 越来越多的研究显示, IL-23在Th₁介导的免疫反应中起重要作用。因此, 研究IL-23及其受体IL-23受体(IL-23R)与克罗恩病之间的关系有重要意义。

关键词: IL-23; IL-23受体; 克罗恩病; 炎症性肠病

李媚, 高翔, 胡品津. IL-23及其受体IL-23R与克罗恩病的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 392-398
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/392.asp>

IL-23 and IL-23 receptor in Crohn's disease

Mei Li, Xiang Gao, Pin-Jin Hu

Mei Li, Xiang Gao, Pin-jin Hu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510089, Guangdong Province, China
Correspondence to: Mei Li, Department of Gastroenterology, Huangpu Department, the First Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510700, Guangdong Province, China. digoxin@126.com

Received: 2007-08-30 Revised: 2007-12-25

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic inflammatory condition of the gastrointestinal tract and clinically presents either as Crohn's disease (CD) or as ulcerative colitis (UC). The incidence of IBD has increased in recent years and there is an increased risk for developing IBD in cohorts with a higher socioeconomic class. The underlying cause for the disease remains unknown. Studies have shown that IBD is associated with environmental, genetic and immunological factors. Immunoregulation disorder plays a key role in the development of IBD. IBD is a bacteria and cytokine-driven pathologic immune response and CD is mainly involved in the immune reaction mediated by type 1 helper T-cells (Th1). IL-23 plays an important role in the immune reaction mediated by Th1 cells. In this paper, we review the molecular immunologic pathogenesis of IL-23 and IL-23R in CD for a better understanding of the etiology of and the therapy for IBD.

Key Words: IL-23; IL-23 receptor; Crohn's disease; Inflammatory bowel disease

Li M, Gao X, Hu PJ. IL-23 and IL-23 receptor in Crohn's

0 引言

克罗恩病(crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(UC)合称炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), 是一种非特异性肠道炎症性疾病。IBD的发病率近年有所上升, 尤其是城市里社会经济地位较高的群体^[1]。IBD病因学研究一直是该领域的研究重点。大多数研究者认为该病主要由免疫反应介导, 并与遗传因素、环境因素密切相关, 属于自身免疫性疾病的一种, 免疫调节紊乱是发病的关键因素^[2]。克罗恩病是Th₁介导的肠道免疫反应, 而溃疡性结肠炎是以Th₂介导的肠道免疫反应^[3-4]。目前研究表明IL-23在Th₁介导的免疫反应中起重要作用。因此研究IL-23及其受体IL-23受体(IL-23R)与克罗恩病之间的关系有重要意义, 本文就这一方面的研究进展作一综述。

1 IL-23及IL-23R的结构

2000年, 在异源二聚体细胞因子白细胞介素IL-12(p40p35)被确定后的第10年, 人们发现了一个新的异源二聚体细胞因子IL-23(p40p19)^[5-6]。因

同行评议者
张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

为两者有共同的p40亚基, 所以早期人们用p40的拮抗剂作为IL-12的特异性抗体得到夸大的IL-12的功能。IL-23的受体是由IL-12R β 1以及IL-23R两部分组成, 而IL-12R是由IL-12R β 1及IL-12R β 2组成。人类IL-23R定位在染色体1p31上, 与IL-12R β 2基因的编码区处于同一区域内。IL-23R的ORF(开放读码框)由分布在长92 kb的人类基因组DNA上的12个外显子组成, 由不同的剪接构成已知6种亚型, 最常见的亚型为缺失外显子7或外显子10。IL-23R由胞外区、跨膜区和胞内区3部分组成^[7]。IL-23生物学作用的发挥是其两种亚单位(p40和p19)分别和IL-23受体复合物的两个亚单位(IL-12 β 1和IL-23R)相互作用的结果。

2 IL-23对免疫的调控作用

人们发现细菌产物与Toll-like受体结合后可诱导细胞表达IL-23^[8]。既往研究表明, LPS(脂多糖)和SAC(金黄色葡萄球菌)是IL-12的最强诱生剂^[5], 马小彤 *et al*^[9]发现LPS和SAC也是IL-23的强诱生剂; 用LPS和SAC处理外周血单个核细胞(PBMC), 发现他们均可上调p19和p35 mRNA的表达, LPS和SAC可分别诱导p19 mRNA表达增加最高达2.9和4.7倍, p35 mRNA达2.5和3倍。IL-23是由p40和p19组成的异源二聚体, 其中p19 mRNA可见于各种组织和细胞, 包括内皮细胞、极化的Th₁型细胞和活化的Mφ和DC等, 而p40却表达受限, 由于有生物活性的异二聚体的形成需要两种亚单位共同表达在同一细胞内, 因而IL-23主要来源于活化的中性粒细胞Mφ和DC等具有吞噬功能的细胞^[6]。研究发现DC细胞的Toll-like受体被激活后, p19基因成为转录因子NF-κB的一个重要的靶基因^[8]。T细胞、NK细胞、Mφ和DC的细胞膜上都有IL-23受体的表达^[6]。因此, Mφ和DC能通过自分泌作用产生大量的IL-23, 使炎症反应级联放大。

IL-23与靶细胞膜上的IL-23受体结合后可激活信号分子JAK2、Tyk2、STAT1、STAT3、STAT4和STAT5^[10]。IL-23最主要是经STAT3途径转导信号, 而IL-12则是通过STAT4。STAT4被激活后转移至细胞核, 结合到基因组的启动子区, 同时也包括INF的管辖区, 由此诱导Th₀细胞转化为Th₁细胞, 并产生大量的INF。而STAT3被激活后则是诱导记忆性T淋巴细胞分化为IL-17的分泌细胞, 也称之为ThIL-17细胞^[11]。

IL-23细胞因子对宿主的先天和过继性免疫均有重要的作用。IL-23有前炎症反应活性, 通过

STAT3信号通路激活记忆性CD4 $^{+}$ T细胞并刺激CD4 $^{+}$ T细胞增殖。记忆性T细胞被IL-23因子激活后分泌大量前炎症介质IL-17、IL-6和IFN-γ, 这正是慢性肠炎和其他自身免疫炎症性疾病发生的主要机制^[12]。IL-23可趋化炎症细胞聚集与迁移, 在多种炎症病灶中都有P40和P19 mRNA的高表达。IL-23能与DC结合, 并激发DC和巨噬细胞产生IL-1和肿瘤坏死因子(TNF), 并能刺激DC自分泌产生IL-12。而IL-12只激活Th₀细胞(幼稚T细胞)^[46]以及NK细胞产生以IFN-γ为主的细胞因子^[13-15]。

起初对IL-23和自身免疫病关系的研究主要集中在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的研究方面, 他作为人类炎性脱髓鞘性疾病-多发性硬化(MS)的实验模型, 是一种由CD4 $^{+}$ Th₁细胞介导的中枢神经系统的自身免疫性疾病。Cua *et al*^[16]发现p40KO小鼠(特异性的缺乏IL-12和IL-23)和p19KO小鼠(特异性的缺乏IL-23)对EAE的敏感性较之野生型的参照小鼠(wild type mice, WT mice)明显降低, 而p35KO小鼠(特异性的缺乏IL-12)的敏感性明显升高。对p40KO小鼠分别使用IL-12和IL-23重组蛋白, 只有后者才能重新形成EAE。使人们重新认识到IL-23才是这种自身免疫病发病的关键因子。体内研究证实: 以前认为的由IL-12发挥作用的实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)主要由两种细胞因子发挥作用, 即IL-12促进了幼稚T细胞(Th₀细胞)的分化, 而IL-23促进中晚期Th₁细胞的进一步分化^[16], 参与后期免疫反应。IL-23在中枢神经系统中由小胶质细胞和激活的吞噬细胞产生, 而IL-23R只表达于激活的吞噬细胞表面, 提示他在自身免疫性炎症反应中有组织特异性^[17]。IL-23可以诱导巨噬细胞产生IL-1和肿瘤坏死因子(TNF)从而参与先天性免疫反应, 也能诱导激活的CD4 $^{+}$ 记忆T细胞产生IFN-γ, 但是IL-23刺激记忆T细胞产生IFN-γ的能力明显小于IL-12^[18]。IL-23同时亦参与获得性免疫反应, 体外培养髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP)特异性CD4 $^{+}$ T细胞发现, IL-23能诱导并扩增分泌IL-17的T细胞(ThIL-17细胞), 而IL-12则诱导扩增分泌IFN-γ的T细胞。过继转移这两种细胞, 发现接受了IL-23激活的ThIL-17细胞的小鼠发生了严重的EAE, 而接受了IL-12激活的Th₁细胞的小鼠并没有发病。利用抗体阻断IL-17对于主动诱导的EAE具有部分的保护作用, 说明IL-23-IL-17通路在EAE病理过程中发挥重要作用^[19]。其他由IL-23诱导的

相关报道
本文为综述性报
导, 所引用文献主
要从2000年发现
IL-23后, 人们先
是用各种方法研
究IL-23对免疫的
调控, 特别是同
IL-12对比, 区分
两者的作用。接
着各种研究纷纷揭
示IL-23在抗细菌
感染、抗肿瘤以
及在自身免疫性
疾病发病过程
中起的重要作用;
本文重点描述IL-23
及其受体IL-23R
与克罗恩病的关
系。

创新盘点

本文是目前国内首篇关于IL-23及其受体IL-23R与克罗恩病的关系的综述报道。IL-23被发现了7年, 大量的研究证明了其在Th₁介导的免疫反应中起了重要作用, 既往众多综述都描述了IL-23在免疫反应中与IL-12的相同和不同之处以及IL-23对免疫的调控, 在抗菌抗肿瘤方面的作用; 近年发现IL-23与几种以Th₁介导为主的慢性炎症性疾病有密切关系, 特别是发病机制还不明确的克罗恩病, 因此本文就这方面内容作一综述。

因子如IL-6、TNF也在EAE发病中起了一定作用^[19]。高水平的IL-17与几种以Th₁介导为主的慢性炎症性疾病如类风湿性关节炎^[20]、牛皮癣^[21-22]、多发性硬化症^[23]和克罗恩病等有关, IL-23可促进IL-17的产生, 因此IL-23可能促进这些慢性炎症性疾病的发展^[24]。

实验证明IL-23在抵抗病原微生物中起重要的作用。仙台病毒(sendai virus)感染的Mφ分泌的IL-23、IFN- $\alpha\beta$ 、IL-12和IL-18协同作用于NK细胞和T细胞, 诱导IFN- γ 的产生, 能促进病毒的清除。丙肝病毒感染过程中, IL-23能引起针对丙肝病毒包膜蛋白(envelope protein 2, E2)较之IL-12更为强烈、更为长久的CTL和Th₁型免疫反应^[25]。虽然淋巴细胞活化的最为理想的调控因子是IL-12, 但是在其缺失的情况下其作用可以被IL-23所替代, 并且后者可能在免疫反应的晚期阶段或者感染的慢性期发挥更为主导的作用, 例如在肺结核分枝杆菌感染的小鼠模型中, 感染后肺部的IL-23来源于形成中的肉芽组织的Mφ和DC^[26]。

IL-23具有和IL-12相当的抗肿瘤和抗肿瘤转移的活性。但是二者的作用明显不同: IL-12能迅速引起肿瘤的消退, 而IL-23是在治疗2-3 wk后才能起效。早期抗肿瘤作用是由IL-12激活CD4 $^{+}$ T细胞或NK细胞产生高水平的IFN- γ 的结果, 而IL-23诱导产生的IFN- γ 水平较低, 发挥作用的效应细胞是CD8 $^{+}$ T细胞。另外经IL-23治疗的小鼠模型在原有肿瘤消退后可以产生强烈的抗肿瘤免疫记忆。IL-23抗肿瘤的作用机制可能包括: IFN- γ 诱导骨髓来源的Mφ表达IL-23R, IL-23活化Mφ分泌促炎性因子; IL-23直接作用于DC促进肿瘤肽的呈递; IL-23对记忆性T细胞的作用导致T细胞反应的扩增等^[27]。IL-12和IL-23都具有较强的抗肿瘤作用, 但IL-12诱导的高水平的IFN- γ 出现严重的毒副作用而使其在临床上的应用受到限制, 而IL-23因其所诱导的IFN- γ 的产生较少将有望成为肿瘤治疗中一种新的、更为安全的选择。

3 IL-23及其受体在CD中的作用

大量的遗传流行病学的统计结果和分子生物学的实验室数据证实IBD的发病与遗传因素有关。2001年两个研究小组各自独立地报道CD易感人群的第一个相关基因-NOD2(CARD15)^[28-29]。NOD2位于16q12, 大约30%的高加索人群的CD发病与该基因的突变有关^[30]。Richard *et al*

利用以第三代遗传标志系统(SNPs)为基础的基因分型芯片技术进行全基因组扫描, 发现除NOD2基因外, 既往用STR(微卫星扫描)未发现的IL-23R基因上有10个SNP与IBD有显著相关。10个位点中, 4个OR值(相对危险度)小于1, 是保护性的SNP, 其余6个位点OR值均大于1, 表明是易感SNP, 其中统计学差异最明显的是位点rs11209026(R381Q), 位于外显子, 是一个非同义的SNP, 碱基G由A代替, 使其编码的蛋白质中的一个谷氨酸变成精氨酸(c.1142G>A, p.Arg381Gln), 从而影响蛋白质功能^[31]。Marla *et al*也证实IL-23R基因上的R381Q变异与非犹太人儿童的CD显著相关^[32]。IL-23R基因上SNP与IBD的密切联系提示IL-23在IBD的发病过程中有举足轻重的地位。

IBD亦属于自身免疫性疾病的范畴, 多个实验证明CD是以Th₁介导的肠道免疫反应, Th₁介导的细胞因子和IFN- γ 、TNF- α 升高; 而溃疡性结肠炎是以Th₂介导的肠道免疫反应, Th₂介导的细胞因子(如IL-5 和IL-13)升高^[33-34]。既往用p40作为IL-12的特异性抗体所做的研究证明IL-12是介导Th₁型免疫反应的重要因子^[35]。IL-23的发现, 使人们进行一系列实验区分IL-12和IL-23的作用并且证明IL-23是介导肠道慢性炎症的重要因子, 并且IL-23介导的免疫反应只局限于受累器官, 而IL-12则引起全身性免疫反应。

Hue *et al*^[36]先用*H. hepaticus*(一种细菌)激发的不依赖T细胞的肠道炎症模型小鼠。这些小鼠出现的慢性盲肠结肠炎是通过先天性的免疫细胞包括粒细胞和单核细胞介导的免疫反应, 代表先天性免疫反应; 再用幼稚CD4 $^{+}$ T细胞过继转移免疫缺陷的小鼠诱发严重的结肠炎模型, 这种小鼠的肠炎是由肠道固有层活化的T细胞和树突状细胞介导的免疫反应, 代表继发性免疫反应。这两种模型均证明是IL-23而非IL-12在这种口服细菌引起结肠炎中起重要的作用, 同时亦发现IL-23的升高只出现在盲肠和结肠, 与全身性的炎症反应无关。

Holm *et al*^[37]给T和B细胞缺陷老鼠注射抗CD40的mAb引发老鼠的局部和全身的炎症性疾病, 包括消瘦、脾大、血清中炎症性因子升高及结肠炎, 经研究发现全身性的炎症反应是由IL-12升高引起, 与IL-23无关, 而结肠的局部炎症需要IL-23的存在, IL-12可以不升高, 从而认为抗IL-23是治疗IBD更特异性的靶点^[37]。

Christoph *et al*用能表达萤火虫荧光素酶的IL-12 p40增强子转基因小鼠研究p40基因在体内的转录调控机制, 只有在小肠中能检测到转基因的表达, 而全身的其他组织器官中并未检测到。p40增强子的活性只局限末端回肠, 末端回肠的CD11c⁺的固有层树突状细胞(LPDCs)(小肠固有层的主要细胞群)表达高水平的p40 mRNA和p40以及p19蛋白。同时发现p40增强子的NF- κ B结合靶点有变异的转基因小鼠不能表达p40, IL-12 p40增强子转基因小鼠在无菌的环境中培养时却亦未检测到p40的表达。通过上述实验表明细菌是引起IL-23升高最强的免疫原。肠道固有层树突状细胞(LPDCs)吞噬病原体或LPS等抗原后激活核因子NF- κ B引起p40和p19的表达增强, 从而使LPDCs分泌IL-23升高^[38]。LPDCs主要分布在小肠, 而在结肠仅仅是在淋巴结和上皮下区可见极少量。多个研究已经证明小肠和身体其他部位的树突状细胞(DCs)在平衡自身的免疫耐受和慢性炎症以及自身免疫性疾病中有重要的作用, 此功能的发挥很可能是通过吞噬凋亡的上皮细胞以及细菌并把抗原呈给T细胞^[39-40]。末端回肠的IL-23高表达也可能由于细菌较近端小肠相比更容易在此处定植有关^[38]。

David *et al*^[12]建立了两种小鼠模型(a)IL-10基因敲除小鼠(能自发出现肠炎症状)和(b)用CD4⁺ T细胞转染Rag基因敲除小鼠(T和B淋巴细胞缺陷小鼠)发生了结肠炎的小鼠模型, 用于研究IL-23在结肠炎发病中的作用以及其触发的下游炎症因子。他们观察IL-12 p35和IL-10双基因敲除小鼠发现其与IL-10基因敲除小鼠相似出生第7周就出现肠炎的表现并很快加重; 相反的是IL-12 p19和IL-10双基因敲除小鼠在出生后第12个月仍未发病, 从而证实了是IL-23并非是IL-12在IL-10基因敲除小鼠肠炎的发病中起重要的作用。他们给CD4⁺ T细胞转染Rag基因敲除小鼠注入IL-23, 发现IL-23能明显缩短这种小鼠出现结肠炎的时间; 并检测到多种炎症因子及基因的表达升高, 最引人注目的是IL-17基因的升高, IL-6基因亦伴随升高; 同时发现记忆性淋巴细胞占了发生炎症部位结肠区淋巴细胞的60%~80%。已有研究表明IL-23能特异性诱导记忆性T淋巴细胞, 而IL-12只能诱导幼稚T淋巴细胞^[13-15]。记忆性T淋巴细胞介导的免疫反应具有组织器官的靶向性^[41]。IL-17主要由记忆性T淋巴细胞产生, IL-17已经被证明了能刺激成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、巨噬细胞分泌多种炎症因

子, 例如IL-1、IL-6、TNF、NOS-2、金属蛋白酶^[42]。某一部位的IL-17升高能诱导相应部位的炎症反应, 具有部位的专一性^[43]。他们还发现联合抗IL-17和IL-6的治疗能明显减轻IL-23诱发的肠炎。

以上实验都限于小鼠模型, 在人类身上所做的研究发现, IL-23 p19 mRNA在CD患者的转录水平明显升高, 在UC患者轻度升高, 在特异性肠炎和正常人中没有升高^[44]。Fuss *et al*也发现CD患者中IL-23水平升高, 并且用IL-12 p40 mAb治疗后IL-23的水平下降^[45]。

可见IL-23主要介导肠道的免疫反应而并非全身性。针对IL-23或其受体的方案使IBD的治疗更加有靶向性。

4 以IL-23为靶向治疗CD

常用的治疗炎症性肠病的药物(如5-ASA、糖皮质类固醇激素和各种免疫抑制剂)对免疫系统均表现出强大而广泛的抑制作用, 但均容易出现严重感染等并发症, 且停药后容易复发。因此, 寻找一种新的特异的针对炎症连锁反应的关键步骤的治疗措施十分必要。

目前已经开展大量针对细胞因子的治疗策略, 出现了抗TNF mAb英利昔(Infliximab)、人类抗IL-6受体mAb^[46]和抗炎因子IL-10^[47]等称之为生物制剂的新一类药物。其中英利昔2003年获食品与药品管理局(FDA)批准用于治疗IBD, 他是一种人-鼠嵌合抗TNF- α mAb, 其不仅与可溶性TNF结合并可与膜结合TNF结合, 并通过激活补体和抗体介导的细胞毒性反应(ADCC)诱导炎症细胞溶解, 使表达TNF的T细胞克隆消除, 并通过增加凋亡蛋白BAX/Bcl22的活化来促进T细胞凋亡, 抑制炎症反应的发生。临床试验已经证实英利昔对难治性结肠CD及CD瘘管(肛周或腹部瘘管)患者都有较好疗效^[48]。Schmidt *et al*^[49]用抗p40的mAb(同时拮抗IL-12和IL-23)对79名CD患者进行随机双盲试验显示治疗组有效率75%, 安慰剂组只有25%, 同时观察到治疗组的IL-12和IL-23治疗前升高, 经过治疗后达正常水平, IFN- γ 、TNF- α 及由IL-23诱生的IL-17和IL-6亦明显下降, 治疗后观察18 wk, 治疗组及安慰剂组副作用相当, 治疗组可见部分患者出现注射部位疼痛反应。有人发现STA-5326, 一种三嗪类的衍生物(triazine derivative)能阻断p35和p40的转录, 从而选择性的抑制Th₁型的炎症反应。口服的STA-5326已经用于治疗克罗恩病和类风湿性

应用要点
本文介绍了IL-23在免疫调控方面的作用以及在炎症性肠病方面的研究情况以期方便有此研究兴趣的同行了解近期的研究成果, 以及能对炎症性肠病的发病机制以及开发新药的研究者提供帮助。

- C, Garrone P, Lebecque S. Interleukin-17. *Int Rev Immunol* 1998; 16: 541-551
- 44 Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Marth T, Zeuzem S, Meuer SC, Stallmach A. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 16-23
- 45 Fuss IJ, Becker C, Yang Z, Groden C, Hornung RL, Heller F, Neurath MF, Strober W, Mannon PJ. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 9-15
- 46 Ito H. Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody. *J Gastroenterol* 2005; 40 Suppl 16: 32-34
- 47 Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, Rutgeerts P, Schreiber S, Wild G, Hanauer SB, Kilian A, Cohard M, LeBeaut A, Feagan B. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000; 119: 1473-1482
- 48 Probert CS, Hearing SD, Schreiber S, Kuhbacher T, Ghosh S, Arnott ID, Forbes A. Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. *Gut* 2003; 52: 998-1002
- 49 Schmidt C, Marth T, Wittig BM, Hombach A, Abken H, Stallmach A. Interleukin-12 antagonists as new therapeutic agents in inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 2002; 70: 177-183
- 50 Wada Y, Lu R, Zhou D, Chu J, Przewloka T, Zhang S, Li L, Wu Y, Qin J, Balasubramanyam V, Barsoum J, Ono M. Selective abrogation of Th1 response by STA-5326, a potent IL-12/IL-23 inhibitor. *Blood* 2007; 109: 1156-1164
- 51 Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, Thompson C, Joyce-Shaikh B, Stepankova R, Robinson N, Buonocore S, Tlaskalova-Hogenova H, Cua DJ, Powrie F. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 2006; 25: 309-318
- 52 Kusugami K, Ina K, Ando T, Hibi K, Nishio Y, Goto H. Immunomodulatory therapy for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2004; 39: 1129-1137
- 53 During MJ, Xu R, Young D, Kaplitt MG, Sherwin RS, Leone P. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat Med* 1998; 4: 1131-1135
- 54 Man AL, Prieto-Garcia ME, Nicoletti C. Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys? *Immunology* 2004; 113: 15-22

编辑 李军亮 电编 郭海丽

中国学术期刊综合引证报告(2007)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2006年从6500种统计刊源析出的290余万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2006-01/12全文下载记录(2.1亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床科学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2611,影响因子为0.460,5年影响因子为0.482,即年指标为0.148,他引总引比为0.80,被引期刊数为585,被引半衰期为4.6,2006载文量为696,基金论文比为0.44,Web即年下载率为17.7.[中国学术期刊(光盘版)电子杂志社;中国科学文献计量评价研究中心].

炎症性肠病与免疫学关系研究进展

施华秀, 任建林, 董卫国

施华秀, 任建林, 厦门大学附属中山医院消化内科 福建省厦门市 361004
董卫国, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
作者贡献分布: 该综述由施华秀撰写, 董卫国、任建林审校。
通讯作者: 董卫国, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. dongwg@public.wh.hb.cn
电话: 027-88041911-6448
收稿日期: 2007-11-09 修回日期: 2008-01-15

Advances in studies on relation between inflammatory bowel disease and immunity

Hua-Xiu Shi, Jian-Lin Ren, Wei-Guo Dong

Hua-Xiu Shi, Jian-Lin Ren, Department of Gastroenterology, Affiliated Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Wei-Guo Dong, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Wei-Guo Dong, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. dongwg@public.wh.hb.cn

Received: 2007-11-09 Revised: 2008-01-15

Abstract

Inflammatory bowel disease is a chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract. Its main clinical manifestations are abdominal pain and diarrhea. Its etiology is complicated. Immune system is very important. Following factors, such as intestinal environment, immune cells, human leukocyte antigens, antibodies, anti-laminaribioside antibody, anti-chitobioside antibody IgA, cytokines, cell adhesion molecules, NO and NF- κ B, play a key factor in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Inflammatory bowel disease is related to all these factors. This paper reviews the possible role of these immune factors in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.

Key Words: Immune factors; Inflammatory bowel disease

Shi HX, Ren JL, Dong WG. Advances in studies on relation between inflammatory bowel disease and immunity. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 399-405

摘要

炎症性肠病是一组病因未明的慢性肠道炎症性疾病, 其临床症状以腹痛和腹泻为主, 病因和发病机制错综复杂, 包括多种因素, 其中与机体免疫系统关系密切, 目前研究发现免疫异常是炎症性肠病发病的重要因素, 包括肠道内环境、免疫细胞、人类白细胞抗原、自身抗体、抗Laminaribioside糖抗体(ALCA)和抗Chitobioside IgA糖抗体(ACCA)、细胞因子、黏附分子、一氧化氮和核因子NF- κ B等, 他们在炎症的起始和持续发展中起重要的作用, 本文就免疫因素在炎症性肠病中的作用作一综述。

关键词: 免疫因素; 炎症性肠病

施华秀, 任建林, 董卫国. 炎症性肠病与免疫学关系研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 399-405

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/399.asp>

背景资料

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎和克罗恩病, 其发病机制和病因涉及多方面的因素, 目前研究发现免疫异常是IBD发病的重要因素, 在炎症的起始和持续发展中起重要的作用。

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD), 其病因和发病机制仍不清楚。目前认为IBD发生与多因素有关, 即在遗传物质基础上, 由于抗原刺激和体内免疫系统的激活, 各种环境因素相互作用而引起的慢性肠道炎症^[1-5]。本文就IBD与免疫学关系的研究进展作一综述。

1 IBD与肠道内环境

目前研究表明, 肠内细菌的存在是IBD发病的必要条件, 同一种小鼠在普通环境和无特定病原体环境中可以建立结肠炎模型, 而在无菌环境中无法形成炎症模型, 黏膜炎症经抗生素治疗后改善, 表明肠道内定居的微生物与本病的启动有关^[6-8]。Van *et al*^[9]证实微生物的代谢产物丁酸盐、异戊酸盐和铵能影响肠上皮细胞代谢的完整性, 从而诱发黏膜免疫反应。胃肠道内有大量的抗原物质存在, 如致病菌、正常菌群、细菌毒素及病毒等, 肠免疫系统具有两个方面的

同行评议者
秦成勇, 教授, 山东省立医院消化内科

研发前沿

IBD病因和发病机制仍不清楚, 目前认为IBD发生与多因素有关, 即在遗传物质基础上, 由于抗原刺激和体内免疫系统的激活, 各种环境因素相互作用而引起的慢性肠道炎症。但究竟哪一种免疫因素起主要作用, 各免疫因素之间有哪些相互联系及针对哪一免疫因素治疗更有效, 都有待于进一步研究。

功能, 既要保护肠黏膜, 抵御致病因子的入侵, 又要吸取营养物质, 耐受正常的肠道菌群, 所有这些肠内容物均可能是潜在的免疫原, 上皮细胞黏膜屏障的破坏为大量摄取肠抗原创造条件, 无节制的免疫反应及免疫调节失衡是IBD的免疫学特性^[10]。

2 IBD与免疫细胞

引起炎症反应的T细胞与调节性T细胞平衡是机体调节免疫反应的主要模式, 其紊乱可诱发IBD等免疫性疾病。肠道共生的微生物抗原刺激肠黏膜T细胞, CD4⁺ T细胞在IL-12的作用下分化为Th1细胞, 分泌干扰素-γ(IFN-γ)介导肠黏膜炎症, IFN-γ活化单核巨噬细胞, 使之释放前炎性细胞因子肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IL-6和IL-1参与炎症过程, 形成IFN-γ、TNF-α升高的Th1型黏膜炎症, 表现与CD相似^[11-14]。CD4⁺ T细胞分泌IL-4、IL-5和IL-13, 形成Th2型黏膜炎症, 表现与UC相似, 因此推测UC可能是Th2细胞介导的疾病, 目前支持该观点的证据有: (1)UC患者比CD患者体内存在更多自身抗体, Th2细胞有助于B细胞活化产生抗体; (2)UC中增加的自身抗体主要为Th2相关的抗体类型; (3)EB病毒诱导的产物现在被鉴定为Th2型细胞因子, 这种细胞因子增加见于UC^[15-17]。

调节性T细胞被认为是一类能产生免疫抑制作用的相对独立的T细胞亚群。调节性T细胞Tr1可分泌高水平的IL-10, 肠道内环境的稳定需要Tr1, 当肠道病原体被清除后, Tr1可通过IL-10下调炎症反应^[18]。在研究口服诱导耐受过程中发现的Th3细胞可通过分泌转化生长因子-β(TGF-β)在黏膜免疫中承担调节作用, TGF-β具有广泛的抗炎症作用, 能抑制Th1和Th2细胞的活化, 是自身免疫调节的重要因素。CD4⁺ CD25⁺ T调节细胞是目前研究的热点, 在正常个体体内, 生理性CD4⁺ CD25⁺ T细胞约占CD4⁺ T细胞的5%-10%, 其数量及活性足以抑制自身免疫性疾病的发生。CD4⁺ CD25⁺ T细胞的免疫抑制作用主要是抑制自身反应性T细胞, 以维持自身免疫平衡, 研究表明CD4⁺ CD25⁺ T调节细胞功能失调与IBD发病有关^[19-21]。

3 IBD与人类白细胞抗原(human leucocyte antigens, HLA)

IBD的发病具有遗传倾向, 研究表明UC的发病与HLA-DR2呈正相关, CD患者HLA-DR₁和

HLA-DQ_{W5}明显升高。国外研究表明, CD患者的HLA-DR₁出现率增加, UC患者的HLA-DR₂出现率增加, 而HLA-DR₄与HLA-DR_{W6}出现率均减少。无论细胞免疫还是体液免疫, HLA在免疫反应中起了关键作用^[22-26]。

4 IBD与自身抗体

抗中性粒细胞胞质抗体(antineutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA)是一类作用于中性粒细胞胞质成分的自身抗体, 最先发现于肾小球肾炎和系统性脉管炎等患者的血清中。ANCA可通过毛细血管中的中性粒细胞、单核细胞或肠上皮细胞引起溶酶释放, 导致大面积血管或肠组织损害; ANCA亦可引发T细胞介导的细胞免疫协同作用造成组织损伤^[27-29]。近几年ANCA与IBD的关系是研究热点之一, Preda *et al*^[30]测定UC患者和CD患者血清, 发现36.4%的UC患者血清ANCA阳性, 而仅15% CD患者阳性, 且均限于结肠受累的情况。ANCA可分为胞质型(cANCA)和核旁型(pANCA), 后者与IBD相关。研究发现普遍人群中pANCA阳性率为2.9%, CD患者阳性率为10%-20%, 而UC患者的阳性率达50%-85%, 反映了病变过程中机体存在免疫功能紊乱。由于ANCA在UC患者中呈家族聚集现象, 有望成为UC较特异的血清标记物^[31-32]。

近年来研究报道抗酿酒酵母抗体(anti-saccharomyces cerevisiae antibody, ASCA), 是大多数CD患者的血清学标志物。进一步研究表明, ASCA在CD的特异性表达, 不仅是肠道受侵犯时的一种简单副现象(epiphénoménon), 而且是CD患者的一种家族免疫性的表达。文献报道, ASCA在CD患者阳性率为48%-69%, 在UC患者中的阳性率达6%-15%。ASCA研究的意义在于: (1)CD患者亲属中罹患CD易感性增高, ASCA水平可作为有价值的CD标志物; (2)CD患者ASCA阳性与阴性亚群, 可能在预后、治疗反应以及明确的遗传学标志物上均不同^[33-36]。

5 IBD与抗Laminaribioside糖抗体(ALCA)和抗Chitobioside IgA糖抗体(ACCA)

以色列Dotan *et al*^[37]报道, ALCA和ACCA是两种与CD密切相关的新的血清学标志物, 他们首次应用多聚糖间接免疫荧光芯片技术检测了72例CD患者、56例UC患者和41例健康对照者血清中的抗多聚糖抗体谱, 再用ELISA技术对124例CD患者、106例UC患者和101例健康对照者的

血清学进行筛查, 发现ALCA和ACCA是鉴别CD和UC最有诊断价值的两种新抗体, 其在CD患者中的阳性率显著高于UC患者, 且在44% ASCA阴性的CD患者中, ALCA或ACCA检测呈阳性。如IBD患者对ALCA和ACCA中至少一种呈阳性结果, 其诊断CD敏感性为77.4%, 特异性为90.6%, 在CD患者中, 高水平的ALCA与小肠病变密切相关。

6 IBD与细胞因子

细胞因子(cytokines, CK)是由多种细胞产生的多肽或低分子糖蛋白。IBD活动期患者肠黏膜固有层与肠系膜淋巴结中淋巴细胞产生的IL-1、IL-6和TNF- α 水平增加, 增加程度与病变的活动性有关。这些炎性前细胞因子可能通过下列机制介导肠道炎症反应: (1)对中性粒细胞和巨噬细胞有趋化作用; (2)通过黏附分子的作用来增加白细胞对血管壁的黏附性; (3)激活巨噬细胞; (4)激活T、B淋巴细胞, 具有上调免疫反应的作用; (5)促使巨噬细胞、内皮细胞和成纤维细胞合成前列腺素E2(PGE2)、前列腺素12(PG12)增加; (6)使内皮细胞血小板激活因子(PAF)增多。由活化的T细胞产生、与IBD发病有关的CK包括IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-11、IFN- γ 和TNF- α 等。CK既可以使大量的T细胞, 尤其是CD4 $^{+}$ T细胞迅速分裂、增殖, 形成致敏淋巴细胞, 又可以活化粒细胞, 增强NK细胞和LAK细胞的杀伤力, 并诱导黏附分子表达及肥大细胞脱颗粒, 以增进炎症反应^[38-43]。

Fantini *et al*研究认为IL-1、IL-2参与IBD发生, T细胞活化产生的IL-2可通过激活T细胞、B细胞和巨噬细胞产生多种CK, 从而参与IBD的炎症过程^[44]。TNF- α 也是CD黏膜损伤的重要介质。用抗TNF抗体治疗CD患者, 可以使肠道炎症很快消退^[45]。T细胞分泌的IL-22作用于结肠上皮下肌纤维母细胞(subepithelial myofibroblasts, SEMFs), 可以促进前炎性细胞因子表达^[46-47]。Yen *et al*对IL-23缺失模型和IL-12缺失模型的研究表明IL-23是慢性肠道炎症出现临床表现的必需因子^[48]。IL-23的一个重要靶细胞群是记忆性T细胞亚群, 他们可以被IL-23特异性激活, 产生促炎性细胞介质IL-17和IL-6, 这一途径可能与慢性肠道炎症和其他慢性自身免疫性炎症性疾病密切相关^[49]。

IL-25由肠道T细胞分泌, 也可由嗜酸性粒细胞产生, 近年来研究表明, 他能促进Th2细胞活

化增殖、分泌IL-4、IL-5和IL-13, 抑制Th1细胞分化增殖进而抑制Th1型细胞因子的产生, 说明IL-25在调节胃肠道炎症中起重要作用^[50]。Whittall *et al*^[51]研究发现在CD患者中分离出的树突状细胞被热休克蛋白70(HSP70)刺激后分泌的TNF- α 浓度明显增高, 这与细胞外信号转导途径有关。IFN- γ 诱导的蛋白-10(interferon-gamma-inducible protein-10, IP-10)是一个T细胞和单核细胞的趋化因子, Inatomi *et al*^[52]研究发现IFN- γ 能强烈诱导IP-10 mRNA表达, IP-10能介导IBD慢性炎症。此外, 肾素血管紧张素系统(RAS)也与结肠的免疫系统相关, RAS可通过调节结肠内的前炎症性和抗炎症性细胞因子而参与三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的结肠炎的发病过程^[53]。

相关报道
以色列Dotan *et al*报道, ALCA和ACCA是两种新的与CD密切相关的血清学标志物, 他们首次应用多聚糖间接免疫荧光芯片技术检测了CD患者和UC患者血清中的抗多聚糖抗体谱, 发现ALCA和ACCA是鉴别CD和UC最有诊断价值的两种新抗体, 其诊断CD敏感性为77.4%, 特异性为90.6%。此项研究表明该抗体检查有望成为最有诊断价值的血清学诊断指标。

7 IBD与细胞黏附分子

细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAMs)是一类介导免疫与内皮细胞相互作用的糖蛋白分子。淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)与细胞间黏附分子-1(ICAM-1)结合能使吞噬细胞移出血管进入肠道病变组织, 在IBD初期, 内皮细胞表达ICAM-1明显增加, 同时伴有单核巨噬细胞表达LFA-1增加, 提示黏附分子在炎性细胞进入病变组织过程中起重要作用^[54-57]。Bachmann *et al*^[58]报道黏膜地址素细胞黏附分子-1(MAdCAM-1)在UC、CD和肠易激综合征的表达是不同的, MAdCAM-1丰富地表达于UC、CD的炎症黏膜, 且CD在溃疡基底部表达比UC丰富, 提示MAdCAM-1可能与CD透壁性炎症相关。Rijcken *et al*^[59]研究应用UC、CD及对照的肠标本检测多种黏附分子在肠道的表达, 结果提示活动性UC患者黏膜中静脉及血管周围的单核细胞上血小板内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1)表达明显增强, PECAM-1在炎症时淋巴细胞跨越移行中起重要作用, 与IBD炎症细胞的渗出机制有关。

选择素及他们的配体、ICAM-1、VCAM-1、VLA-4和整合素 β 等CAMs在UC和CD患者肠病变中有重要作用, 用于治疗IBD的经典药物糖皮质激素和5-氨基水杨酸的作用机制即部分与CAMs的合成与功能有关, 说明CAMs与IBD发病有关^[60-61]。

8 IBD与NO

一氧化氮(NO)是一种多效性的自由基信号分子, 他可促进和抑制氧自由基介导的组织损伤。大量资料证实, NO参与了UC发生过程中的炎症

创新盘点

IBD的发病机制和病因涉及多方面的因素,其中免疫因素起重要作用,本文通过引用国内外最新的研究资料,对免疫因素与IBD的关系进行综述,系统地阐明了各种免疫因素在IBD发病过程中的作用。

和组织损伤。检测UC活动期患者结肠黏膜的还原型辅酶Ⅱ(NADPH)发现:黏膜隐窝中NADPH依赖性酶(NADPH-diaphorase, Nd)染色增多,表明在UC中有一氧化氮合酶(NOS)诱导存在。NOS分为原生酶(cNOS)和诱发酶(iNOS)两种,在UC结肠黏膜层主要以iNOS为主。NO在UC炎症过程中充当了双重角色,既有保护作用,又有杀伤毒性和促炎作用。在炎症初期,可抑制激活的巨噬细胞和T细胞的功能,并能抑制血小板聚集,防止血栓形成,同时抑制髓过氧化物酶的活性,保护上皮屏障及促进上皮修复。随着炎症的发展,大剂量NO由iNOS催化产生,从而一方面可通过伴随产生的自由基损伤组织,另一方面启动机体免疫防御系统,如巨噬细胞、中性粒细胞,抑制靶细胞内DNA复制,降低靶细胞内cAMP/cGMP比例,激活NK、LAK细胞,直接增强其细胞毒性,若作用过强,即可造成正常组织的损伤。在体外实验或体内急性炎症研究中表明NO有较强的抗黏附作用,NO在IBD的抗黏附作用,参与调节体内内皮细胞黏附分子(ECAM)表达的分子机制,抑制所谓的趋集瀑布机制中各步骤的反应剂,有望成为新药来控制和逆转IBD的炎症反应^[62-68]。

9 IBD与核因子NF-κB

血液循环和肠道细胞因子表达异常是IBD发病的重要机制,核因子NF-κB是一种调节各种细胞因子、趋化因子、黏附分子的转录因子,在IBD复杂的细胞因子网络失调中,NF-κB活化是一个中心环节。IBD中NF-κB活性增高的同时伴有IL-1、IL-6、TNF-α等升高,IL-1和TNF-α可促进NF-κB进一步活化,后者通过正反馈使IL-1和TNF-α分泌进一步增加,同时使其他细胞因子IL-6、IL-8等表达增加,产生级联反应,使炎症过程得以持续和放大。研究表明,在IBD患者肠浆膜组织纤维母细胞中NF-κB和ICAM-1表达明显增强^[69-70]。Guidi *et al*^[71]研究发现活动期IBD患者的黏膜固有层单核细胞中可检测到增加的NF-κB,说明NF-κB在IBD中调节炎症性细胞因子的分泌。

总之,IBD病因和发病机制复杂,涉及免疫学、遗传学以及环境因素等多方面问题,免疫因素在IBD发病过程中起重要作用,但究竟哪一种免疫因素起主要作用,各免疫因素之间有哪些相互联系及针对哪一免疫因素治疗更有效,都有待于进一步研究。

10 参考文献

- 1 Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640
- 2 Young Y, Abreu MT. Advances in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2006; 8: 470-477
- 3 Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5577-5780
- 4 Schmidt C, Stallmach A. Etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005; 51: 127-145
- 5 Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4807-4812
- 6 Gueimonde M, Ouwehand A, Huhtinen H, Salminen E, Salminen S. Qualitative and quantitative analyses of the bifidobacterial microbiota in the colonic mucosa of patients with colorectal cancer, diverticulitis and inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3985-3989
- 7 Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5571-5576
- 8 Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Gal I, Papp J. Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-cross talk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll"? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1829-1841
- 9 van Nuenen MH, de Ligt RA, Doornbos RP, van der Woude JC, Kuipers EJ, Venema K. The influence of microbial metabolites on human intestinal epithelial cells and macrophages in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45: 183-189
- 10 Ohkusa T, Nomura T, Sato N. The role of bacterial infection in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intern Med* 2004; 43: 534-539
- 11 Dubinsky MC, Taylor K, Targan SR, Rotter JI. Immunogenetic phenotypes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3645-3650
- 12 Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafillidis JK, Dedousis GV, Andrikopoulos NK. Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6031-6036
- 13 Yamamoto-Furusho JK, Korzenik JR. Crohn's disease: innate immunodeficiency? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6751-6755
- 14 Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, Caruso R, Tersigni R, Alessandrini L, Biancone L, Naccari GC, MacDonald TT, Pallone F. Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 687-694
- 15 Alkim C, Balci M, Alkim H, Dagli U, Parlak E, Tezel A, Ulker A. The importance of peripheral immune cells in inflammatory bowel disease. *Turk J Gastroenterol* 2007; 18: 2-88
- 16 Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 620-625
- 17 Shiobara N, Suzuki Y, Aoki H, Gotoh A, Fujii

- Y, Hamada Y, Suzuki S, Fukui N, Kurane I, Itoh T, Suzuki R. Bacterial superantigens and T cell receptor beta-chain-bearing T cells in the immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2007; 150: 13-21
- 18 Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 191-199
- 19 Ikeda M, Takeshima F, Ohba K, Ohnita K, Isomoto H, Yamakawa M, Omagari K, Mizuta Y, Kohno S. Flow cytometric analysis of expression of transforming growth factor-beta and glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor on CD4(+) CD25(+) T cells of patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 178-184
- 20 Liu H, Leung BP. CD4+CD25+ regulatory T cells in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 519-524
- 21 Thompson C, Powrie F. Regulatory T cells. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 408-414
- 22 Rodriguez-Borres L, Fonseca GC, Villeda MA, Yamamoto-Furusho JK. Novel genetic markers in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5560-5570
- 23 Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, Lin LJ, Gu GG. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1646-1656
- 24 Pena AS. Contribution of genetics to a new vision in the understanding of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4784-4787
- 25 Turkcapar N, Toruner M, Soykan I, Aydintug OT, Cetinkaya H, Duzgun N, Ozden A, Duman M. The prevalence of extraintestinal manifestations and HLA association in patients with inflammatory bowel disease. *Rheumatol Int* 2006; 26: 663-668
- 26 Ahmad T, Marshall SE, Jewell D. Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3628-3635
- 27 Barta Z, Csipo I, Szabo GG, Szegedi G. Seroreactivity against *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and celiac disease. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2308-2312
- 28 Papp M, Norman GL, Altorjay I, Lakatos PL. Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: gadget or magic? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2028-2036
- 29 Vergara T, Cofre P, Cifuentes S, Pulgar U, Puebla C, Velasco S. Presence of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and anti *Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) among patients with ulcerative colitis. *Rev Med Chil* 2006; 134: 960-964
- 30 Preda CM, Vermeire S, Rutgeerts P, Joosens S, Diculescu M, Marica C, Ciocarlan M, Mirea V, Oproiu A. Prevalence and significance of perinuclear anti-neutrophil antibodies (pANCA) in Romanian patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Rom J Gastroenterol* 2005; 14: 357-360
- 31 Panani AD, Grigoriadou M, Magira E, Roussos C, Raptis SA. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody myeloperoxidase-positive vasculitis in association with ulcerative colitis. *Clin Rheumatol* 2006; 25: 35-37
- 32 Yamamoto-Furusho JK, Uscanga-Dominguez L, Lopez-Martinez A, Granados J. Association of the HLA-DRB1*0701 allele with perinuclear anti-neutrophil cytoplasmatic antibodies in Mexican patients with severe ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1617-1620
- 33 Hadrich I, Vandewalle P, Cheikhrouhou F, Makni F, Krichen MS, Sendid B, Standaert-Vitse A, Ayadi A, Poulaïn D. Ethnic and socio-cultural specificities in Tunisia have no impact on the prevalence of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in Crohn's disease patients, their relatives or associated clinical factors. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 717-725
- 34 Kim BC, Park S, Han J, Kim JH, Kim TI, Kim WH. Clinical significance of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody (ASCA) in Korean patients with Crohn's disease and its relationship to the disease clinical course. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 610-616
- 35 Odes S, Friger M, Vardi H, Claessens G, Bossuyt X, Riis L, Munkholm P, Wolters F, Yona H, Hoie O, Beltrami M, Tsianos E, Katsanos K, Mouzas I, Clofent J, Monteiro E, Messori A, Politis P, O'Morain C, Limonard C, Russel M, Vatn M, Moum B, Stockbrugger R, Vermeire S. Role of ASCA and the NOD2/CARD15 mutation Gly908Arg in predicting increased surgical costs in Crohn's disease patients: a project of the European Collaborative Study Group on Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 874-881
- 36 Reese GE, Constantinides VA, Simillis C, Darzi AW, Orchard TR, Fazio VW, Tekkis PP. Diagnostic precision of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2410-2422
- 37 Dotan I, Fishman S, Dgani Y, Schwartz M, Karban A, Lerner A, Weishauss O, Spector L, Shtevi A, Altstock RT, Dotan N, Halpern Z. Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006; 131: 366-378
- 38 Asakura H, Suzuki K, Honma T. Recent advances in basic and clinical aspects of inflammatory bowel disease: which steps in the mucosal inflammation should we block for the treatment of inflammatory bowel disease? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2145-2149
- 39 Helwig U, Lammers KM, Rizzello F, Brigidi P, Rohleder V, Caramelli E, Gionchetti P, Schrezenmeir J, Foelsch UR, Schreiber S, Campieri M. Lactobacilli, bifidobacteria and *E. coli* nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5978-5986
- 40 Peluso I, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: pathogenetic relevance and therapeutic implication. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5606-5610
- 41 Moriconi F, Raddatz D, Ho NA, Yeruva S, Dudas J, Ramadori G. Quantitative gene expression of cytokines in peripheral blood leukocytes stimulated in vitro: modulation by the anti-tumor necrosis factor-alpha antibody infliximab and comparison with the mucosal cytokine expression in patients with ulcerative colitis. *Transl Res* 2007; 150: 223-232
- 42 Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Hogezand RA, Lamers CB, Hommes DW, Verspaget HW.

应用要点
本文就免疫因素在IBD形成过程中的作用作一综述,但这些因素尚未完全阐明,进一步阐明这些问题,将为临床治疗提供新的方法和依据,有利于对这类疾病进行合理有效的治疗。

名词解释

抗中性粒细胞胞质抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, ANCA):是一类作用于中性粒细胞胞质成分的自身抗体,最先发现于肾小球肾炎和系统性脉管炎等患者的血清中。ANCA可通过毛细血管中的中性粒细胞、单核细胞或肠上皮细胞引起溶酶体释放,导致大面积血管或肠组织损害;ANCA亦可引发T细胞介导的细胞免疫协同作用造成组织损伤。

- Role of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2960-2966
- 43 Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2058-2069
- 44 Fantini MC, Monteleone G, Macdonald TT. New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1419-1423
- 45 Liu Z, Jiu J, Liu S, Fa X, Li F, Du Y. Blockage of tumor necrosis factor prevents intestinal mucosal inflammation through down-regulation of interleukin-23 secretion. *J Autoimmun* 2007; 29: 187-194
- 46 Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005; 129: 969-984
- 47 Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, Blumberg RS, Xavier RJ, Mizoguchi A. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008
- 48 Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006; 116: 1310-1316
- 49 Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, Kastelein RA. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 2007; 132: 2359-2370
- 50 Owyang AM, Zaph C, Wilson EH, Guild KJ, McClanahan T, Miller HR, Cua DJ, Goldschmidt M, Hunter CA, Kastelein RA, Artis D. Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2006; 203: 843-849
- 51 Whittall T, Wang Y, Kelly CG, Thompson R, Sanderson J, Lomer M, Soon SY, Bergmeier LA, Singh M, Lehner T. Tumour necrosis factor-alpha production stimulated by heat shock protein 70 and its inhibition in circulating dendritic cells and cells eluted from mucosal tissues in Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 550-559
- 52 Inatomi O, Andoh A, Kitamura K, Yasui H, Zhang Z, Fujiyama Y. Butyrate blocks interferon-gamma-inducible protein-10 release in human intestinal subepithelial myofibroblasts. *J Gastroenterol* 2005; 40: 483-489
- 53 Inokuchi Y, Morohashi T, Kawana I, Nagashima Y, Kihara M, Umemura S. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in angiotensinogen gene knockout mice. *Gut* 2005; 54: 349-356
- 54 Zurawski J, Wozniak A, Salwa-Zurawska W, Kaczmarek E, Majewski P. Vascular changes in ulcerative colitis and Lesniowski-Crohn's disease. *Pol J Pathol* 2007; 58: 13-21
- 55 Nakamura K, Honda K, Mizutani T, Akiho H, Harada N. Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: Selective inhibition of cytokines and adhesion molecules. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4628-4635
- 56 Vainer B. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ulcerative colitis: presence, visualization, and significance. *Inflamm Res* 2005; 54: 313-327
- 57 Vainer B, Horn T, Nielsen OH. Colonic epithelial cell expression of ICAM-1 relates to loss of surface continuity: a comparative study of inflammatory bowel disease and colonic neoplasms. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 318-325
- 58 Bachmann C, Klipanov AL, Olson TS, Sonnenschein JR, Rivera-Nieves J, Cominelli F, Ley KF, Lindner JR, Pizarro TT. Targeting mucosal addressin cellular adhesion molecule (MAdCAM)-1 to noninvasively image experimental Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006; 130: 8-16
- 59 Rijken E, Mennigen RB, Schaefer SD, Laukoetter MG, Anthoni C, Spiegel HU, Bruewer M, Senninger N, Kriegstein CF. PECAM-1 (CD 31) mediates transendothelial leukocyte migration in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G446-G452
- 60 Danese S, Semeraro S, Marini M, Roberto I, Armuzzi A, Papa A, Gasbarrini A. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 811-818
- 61 Gulubova MV, Manolova IM, Vlachkova TI, Prodanova M, Jovchev JP. Adhesion molecules in chronic ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 581-589
- 62 Cavavaugh J. NOD2: ethnic and geographic differences. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3673-3677
- 63 Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonomopoulos J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 681-685
- 64 Grisham MB, Pavlick KP, Laroux FS, Hoffman J, Bharwani S, Wolf RE. Nitric oxide and chronic gut inflammation: controversies in inflammatory bowel disease. *J Investig Med* 2002; 50: 272-283
- 65 Oliver J, Gomez-Garcia M, Vilchez JR, Lopez-Nevot MA, Pinerio A, Correro F, Nieto A, Martin J. Inducible and endothelial nitric oxide synthase genes polymorphism in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 2006; 67: 326-330
- 66 Videla S, Vilaseca J, Medina C, Mourelle M, Guarner F, Salas A, Malagelada JR. Modulatory effect of nitric oxide on mast cells during induction of dextran sulfate sodium colitis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 45-51
- 67 Palatka K, Serfozo Z, Vereb Z, Batori R, Lontay B, Hargitay Z, Nemes Z, Udvardy M, Erdodi F, Altorjay I. Effect of IBD sera on expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1730-1738
- 68 Linehan JD, Kolios G, Valatas V, Robertson DA, Westwick J. Immunomodulatory cytokines suppress epithelial nitric oxide production in inflammatory

- bowel disease by acting on mononuclear cells. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1560-1569
- 69 Berndt U, Bartsch S, Philipsen L, Danese S, Wiedermann B, Dignass AU, Hammerle M, Sturm A. Proteomic analysis of the inflamed intestinal mucosa reveals distinctive immune response profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Immunol* 2007; 179: 295-304
- 70 Visekrana A, Joeris T, Seidel D, Kroesen A, Loddenkemper C, Zeitz M, Kaufmann SH, Schmidt-Ullrich R, Steinhoff U. Proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2006; 116: 3195-3203
- 71 Guidi L, Costanzo M, Ciarniello M, De Vitis I, Pioli C, Gatta L, Pace L, Tricerri A, Bartoloni C, Coppola L, Balistreri P, Doria G, Fedeli G, Gasbarrini GB. Increased levels of NF-kappaB inhibitors (IkappaBalpha and IkappaBgamma) in the intestinal mucosa of Crohn's disease patients during infliximab treatment. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005; 18: 155-164

同行评价
本文重点突出, 参考文献新, 全面, 较好反应了当前进展, 综述水平符合发表要求。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的大型综合性消化病学类学术期刊。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号。《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展。从1993-2007《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文。《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能。



肝素酶: 肿瘤治疗的新靶标

田曙光, 高红伟, 常宏宇, 李素波, 王璇琳, 章扬培, 宫锋

背景资料

硫酸肝素是细胞外基质和基底膜的重要组成部分。肝素酶是一种 β -葡萄糖醛酸酯酶, 能够识别硫酸肝素链上的特异位点, 并将其降解为较短的寡糖链, 从而破坏细胞外基质和基底膜, 促使肿瘤细胞越过“天然屏障”浸润周围组织或转移到机体其他部位。同时肝素酶还通过释放各种细胞因子、促进新生血管的生成、启动信号转导通路等途径在肿瘤生成、发展和转移过程中发挥积极作用。

田曙光, 高红伟, 常宏宇, 李素波, 王璇琳, 章扬培, 宫锋, 军事医学科学院野战输血研究所 北京市 100850
作者贡献分布: 宫锋, 田曙光对本文所作贡献均等; 此课题由宫锋, 田曙光设计; 文献收集、归纳、分析由田曙光, 宫锋完成; 本论文由田曙光及宫锋完成, 章扬培, 常宏宇, 高红伟, 李素波, 王璇琳对本文的撰写及修改提供了宝贵意见。
通讯作者: 宫锋, 100850, 北京市, 军事医学科学院野战输血研究所. gongfeng@nic.bmi.ac.cn
电话: 010-66931992
收稿日期: 2007-11-05 修回日期: 2008-01-15

Heparanase: a novel target of tumor metastasis therapy

Shu-Guang Tian, Hong-Wei Gao, Hong-Yu Chang, Su-Bo Li, Xuan-Lin Wang, Yang-Pei Zhang, Feng Gong

Shu-Guang Tian, Hong-Wei Gao, Hong-Yu Chang, Su-Bo Li, Xuan-Lin Wang, Yang-Pei Zhang, Feng Gong, Institute of Blood Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China
Correspondence to: Feng Gong, Institute of Blood Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China. gongfeng@nic.bmi.ac.cn
Received: 2007-11-05 Revised: 2008-01-15

Abstract

Heparanase plays a key role in promoting tumor angiogenesis, invasiveness and metastasis. This predominant enzyme is primarily responsible for cleaving heparin sulphate, the main polysaccharide constituent of extracellular matrix and basement membrane, thus having become a novel target of tumor therapy. It can prevent tumor growth and metastasis by inhibiting its expression and reducing its activity. This paper reviews the biological characteristics of heparanase as a target of tumor therapy, its significance in cancer progression and certain tumor therapies as well as its prospect in clinical applications.

Key Words: Heparanase; Tumor metastasis; Inhibitor; Antibody; Vaccine

Tian SG, Gao HW, Chang HY, Li SB, Wang XL, Zhang YP, Gong F. Heparanase: a novel target of tumor metastasis therapy. Shijie Huaren Zazhi 2008; 16(4): 406-412

同行评议者
谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院
感染病科

摘要

肝素酶是肿瘤发生、浸润和转移过程中的关

键酶, 主要通过降解硫酸肝素, 破坏细胞外基质和基底膜完整性而发挥作用。肝素酶与肿瘤发生和转移的密切相关性, 使得肝素酶成为肿瘤治疗的新靶标。本文主要阐述肝素酶的生物学特性、促肿瘤转移的作用机制和在肿瘤发生发展中的重要作用, 并且对目前以肝素酶为靶标的肿瘤治疗方法和临床前景进行综述。

关键词: 肝素酶; 肿瘤转移; 抑制剂; 抗体; 疫苗

田曙光, 高红伟, 常宏宇, 李素波, 王璇琳, 章扬培, 宫锋. 肝素酶: 肿瘤治疗的新靶标. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 406-412
<http://www.wjnet.com/1009-3079/16/406.asp>

0 引言

肿瘤已经成为人类生存和健康的重要威胁, 全世界每年有600多万人死于各种肿瘤, 而且死亡人数呈递增趋势。癌症的预防和治疗已经成为全世界生命科学研究共同瞩目的课题。肿瘤治疗药物一直是药物研究领域的热点。传统的细胞毒类抗癌药物特异性差、毒副作用高, 在捕杀肿瘤细胞的同时对患者正常细胞造成严重损伤, 影响组织或器官功能恢复。新型肿瘤药物的研究突破传统的抑制核酸合成、有丝分裂的理念, 向针对肿瘤发展过程中某一重要分子设计药物的方向发展具有良好选择性、高特异性、无(或低)毒副作用的新型抗肿瘤药物将成为研究和开发的新目标。近20年来, 肿瘤分子生物学、肿瘤细胞生物学、肿瘤免疫学等学科取得长足的发展, 肿瘤的发生机制日渐明朗, 越来越多的肿瘤相关蛋白被发现, 为肿瘤的治疗提供了新靶点。肝素酶(heparanase, HPA)是一种 β -葡萄糖醛酸酯酶, 为迄今发现唯一作用于细胞外基质多聚糖的内切酶^[1]。能够特异性识别硫酸肝素(heparan sulfate, HS)结构, 并能将其降解为10-20糖单位的寡糖链^[2-3]。其基因定位于4q21.3, 全长约为40 kb, 编码一个由543个氨基酸残基组成、相对分子质量为61 192 kDa的蛋白前体。HPA前体经蛋白酶切除N端157个氨基酸残基, 形成由386个氨基酸组成、相对分子质量约为 50×10^3 kDa的成熟高活性蛋白。在

肿瘤发生时HPA特异性高表达, 通过降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及血管基底膜(basement membrane, BM)上乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)的HS侧链, 破坏细胞间质的屏障功能, 同时释放结合于HS的各种生长因子, 促进肿瘤组织新生小血管生成, 对肿瘤细胞的侵袭、转移和定居发挥关键作用^[4-9]。

1 肝素酶与肿瘤发生、发展的相关性

HPA主要表达于细胞内, 分布于高尔基体和溶酶体, 细胞间质和细胞膜上也有少量存在^[10]。HPA的表达和分泌受严格控制, 以避免过量降解ECM和BM上的HSPG, 造成细胞迁徙和组织损伤, 引起机体病变^[11-12]。HPA在胚胎的形成、机体的发育、免疫应答、炎症反应、血管生成、创伤愈合、组织修复和肿瘤转移等方面发挥重要作用^[13-17]。生理条件下, 胚胎、脾脏、淋巴、胸腺、骨髓等组织以及白细胞、血小板中HPA含量较高, 其他组织中含量则很低。机体处于病理状态时HPA被激活而过量表达, 活化后发挥高效的酶活力^[18-19]。例如炎症发生时, HPA通过降解HSPG使血管通透性增高, 帮助炎性因子(如IL-2)和白细胞突破分子屏障到达炎症部位。同时HPA能够促进HS上的细胞因子释放, 如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factors, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血小板源性生长因子(PDGF)等, 他们通常以非活性形式结合于HS, 释放到组织后, 有利于新生血管形成和组织修复^[20-21]。特别是HPA与肿瘤的发生、发展以及转移的密切相关性, 引起了生命科学领域的广泛关注^[22-24]。

大量的研究结果证明, 恶性肿瘤及转移性肿瘤组织中HPA明显高于良性肿瘤和正常组织, 即HPA与肿瘤转移密切相关^[25-33]。目前的研究提示HPA促进肿瘤转移机制主要包括以下几个方面: (1)破坏ECM和BM屏障。肿瘤细胞的浸润和转移需要首先突破细胞外间质形成的包裹和穿透毛细血管内皮细胞。基质金属蛋白(matrix metalloproteinases, MMP)、胶原酶IV(collagenase IV)、血纤溶酶原激活物(plasminogen activator)、组织蛋白酶B(cathepsin B)和HPA等参与了ECM和BM中蛋白和蛋白多糖的降解, 其中HPA通过作用于HS链的特异性位点, 破坏ECM和BM结构完整性, 使肿瘤细胞得以突破屏障, 侵袭邻近器官和组织, 或通过血管转移到机体的其他部

位。(2)促进新血管生成。HPA不仅仅通过降解ECM和BM屏障而发挥促肿瘤转移的作用, 而且能以间接方式诱导新血管的生成。bFGF和其他细胞生长因子通常以无活性的方式固定或局限于HS链上, 在HPA降解HSPG过程中得到释放和活化, 共同诱导肿瘤血管生成, 为肿瘤的生长、浸润和转移提供营养和通道^[34-35]。COX-2(cyclooxygenase-2)能够促进微血管的生成, 而HPA与COX-2的表达有密切的联系, 他对COX-2的表达具有正调控作用^[36]。(3)通过促进释放尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type-plasminogen activator, uPA)和组织型纤溶酶原激活物(tissue type-plasminogen activator, tPA), 激活纤溶酶原, 活化MMP, 酶解ECM和BM中的结构蛋白^[37], 降低屏障功能。(4)通过破坏ECM和BM屏障, 释放多种细胞因子, 诱导T细胞介导的迟发性超敏反应, 促进以渗出、黏附和趋化作用为主的炎症反应, 从而加剧ECM和BM的损伤, 引起肿瘤细胞与ECM和BM的黏附, 提高肿瘤细胞的渗透和迁徙能力。(5)随着研究的深入, 有人提出HPA促进肿瘤的转移和生长的作用不仅仅依赖他的HPA活力(降解HS), 而且与他启动了信号转导通路密切相关。Goldshmidt *et al*^[38]认为细胞表面或分泌型的HPA具有介导细胞与细胞间质的黏附作用。Zetser *et al*^[39]实验证明HPA超表达时, VEGF mRNA水平明显增加, 并伴有细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)的磷酸化水平增加, 说明VEGF等细胞因子增加不仅仅由于HPA降解HS导致细胞因子的释放, 而是启动了信号通路^[40]。

2 肝素酶与肿瘤的治疗

随着基因组学、蛋白组学、细胞生物学、药理学研究的飞速发展以及在肿瘤学上的深入研究, 细胞周期的调控、细胞凋亡的诱导、血管生成以及细胞与胞外基质的相互作用过程得到了进一步认识, 肿瘤形成的分子机制、肿瘤细胞的信号转导过程也被逐步阐明, 一些与肿瘤细胞分化增殖以及转移相关的关键酶逐步被发现。以这些关键酶作为药物筛选新靶点, 研究和开发靶向抗肿瘤药物将是肿瘤预防和治疗有力武器。通过不断深入的研究, HPA的生物学特性及作用机制逐步得到揭示, 他与肿瘤转移的高度相关性也不断得到证明。这一特定靶点受到越来越多研究者的关注, 以HPA为靶点而进行的抗肿瘤药物的研发将可能在肿瘤治疗上获得突破

研发前沿
肝素酶是肿瘤转移过程中的关键酶, 他与肿瘤转移的高度相关性逐渐得到认识和重视, 以其为靶标的抗肿瘤药物的研发将可能在肿瘤治疗上获得突破性进展, 具有十分光明的前景。目前, 有几种药物已经被批准进入临床试验。特别是PI-88(肝素酶抑制剂), 已经顺利进入一期临床试验。更多的相关抗肿瘤药物将会陆续开发出来。

相关报道

自从Vlodavsky *et al*^[1]成功克隆人的肝素酶基因后,有关肝素酶的研究取得了重大突破,其促进肿瘤转移的机制逐步被揭示,而且他与肿瘤之间的密切联系也不断得到证实。1991年Nakajima *et al*^[2]报道苏拉明(surnamin)能够抑制肝素酶活性,发挥抗肿瘤转移的作用,从此以肝素酶为靶标的抗肿瘤药物的开发受到了广泛关注。

性进展,具有十分光明的前景^[41-42]。

对于HPA抑制剂的研究已有20年,早期的研究已经部分揭示了HPA抑制剂具有抗炎和抗肿瘤的作用,但是HPA用于肿瘤治疗的概念始于1991年。当时Nakajima *et al*^[43]报道了苏拉明(surnamin),一种杀寄生虫药物,具有抗肿瘤转移的作用,进一步的研究证实他是通过抑制HPA活性发挥作用的。此后一些硫酸化多糖或寡糖作为HPA抑制剂的研究受到关注,但是由于当时HPA生物特性及其促肿瘤转移的机制尚不清晰,以HPA作为肿瘤治疗靶标的研究所进展缓慢。1999年HPA基因克隆的研究结果报道后^[44],有关HPA生物特性以及在促肿瘤转移机制上的研究获得突破,许多科学家从抑制HPA过量表达和降低其酶活性以及机体免疫清除为出发点展开了一系列的研究,并且取得了很好的成绩^[45]。目前以HPA为靶标的肿瘤治疗方案主要有三种:HPA抑制剂、HPA抗体、HPA疫苗,其中有许多药物和方案已获得专利,另外有几种药物已经被批准进入临床试验。

2.1 肝素酶抑制剂的研究 HPA的异常高表达是造成肿瘤转移的关键因素,有效抑制HPA的表达及降低其活性可以保护ECM和BM免遭破坏,抑制新生血管生成,防止肿瘤细胞突破屏障迁徙到正常组织和器官^[46]。实验发现硫酸海带多糖(laminarin sulfate)能够显著的降低(>90%)B16恶性黑素瘤、Lewis肺癌、乳腺癌细胞在肺内转移范围,说明抑制HPA活性能够有效阻止肿瘤的侵袭和转移^[47-49]。同时实验还发现,通过抑制HPA活性可以治疗或减缓炎症反应和一些自身免疫疾病,如实验性自身免疫脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)、佐剂性关节炎(adjuvant arthritis)和移植排斥反应(graft rejection)。最近人们还发现可以通过抑制HPA的活性能够治疗心血管疾病和动脉粥样硬化等,所以HPA抑制剂的开发具有更加重要的临床意义。

HPA抑制剂的研究现已获得突破性进展,在1999年后的几年内就有多项专利和大量论文发表。这些抑制剂按照化合物结构可分为以下几类:(1)模拟硫酸肝素的多阴离子化合物;(2)硫酸化单糖、多糖或寡糖;(3)卡巴唑衍生物;(4)二苯基醚衍生物;(5)吲哚类衍生物;(6)多肽类化合物;(7)制唾酸酶B的衍生物等^[50]。其中模拟硫酸肝素的多阴离子化合物活性最为明显,他

能够竞争性的与HPA结合,从而降低HPA对底物HS的酶解,发挥抗肿瘤转移的作用^[51-55]。PI-88,一种五糖成分的硫酸化低聚甘露醇糖磷酸酯(phosphomannopenlaoose sulfate),具有良好的抑制血管生成和抑制HPA活性的作用,是目前最受关注的肿瘤抑制药物之一。动物试验发现他对高侵润性鼠乳腺癌1376MAT细胞抑制率达50%,同时发现肿瘤周围的血管生成减少了30%。采用PI-88抑制了HPA活性后,白血病动物模型中恶性程度高的细胞明显减少。通过第I期、第II期临床实验,PI-88对转移性肿瘤良好的抑制作用也得到了证实^[56]。最近,一种新型的来源于海洋的硫酸化低聚糖JG3被报道^[57],他在体内外都能够抑制肿瘤的发生和转移。JG3通过与HPA分子的KKDC和QPLK肽段结合形成JG3-HPA复合物,竞争性地抑制其与小分子质量的肝素结合,从而抑制HPA的活性。同时,JG3抑制细胞外基质HS所锚定的bFGF释放。而且,JG3作为一个拟HS物和竞争性抑制剂,能阻止bFGF与其受体的结合。但是这类化合物抑制剂存在着不同的缺陷:抗凝血、毒性以及影响组织修复等,例如PI-88可引起免疫介导的剂量限制性的血小板减少症,这些副作用很大程度上阻碍了抑制剂的开发,所以人们需要找到一些更加有效、无(或低)毒副作用的HPA抑制剂用于肿瘤的治疗。

随着基因技术高速发展,人们将基因技术也应用于抑制HPA的表达,特别是通过反义核酸技术和RNA干扰技术实现了对HPA表达的抑制^[58-60]。2001年Uno *et al*^[61]成功构建了HPA反义腺病毒载体(adenoviral-delivered antisense heparanase, AD-AS/hep),经AD-AS/hep转染的食道癌细胞和A549肺癌细胞HPA表达明显受到抑制,而且被AD-AS/hep转染A549肺癌细胞BALB/c小鼠体内肿瘤数量和体积显著降低。Edovitsky *et al*^[62]曾尝试使用siRNA技术降低HPA的表达,结果显示实验模型中肿瘤细胞的转移活性明显的削弱,研究的肿瘤细胞包括:黑色素瘤、乳腺癌、淋巴瘤、神经胶质瘤细胞。他们的实验不仅进一步证实了HPA在肿瘤转移中所起到的关键作用,而且为抗肿瘤治疗提供了一个全新的方案。

2.2 肝素酶抗体的研究 随着人源化技术的日益成熟,治疗性抗体的应用越来越广泛,目前全世界在临床试验中的治疗性抗体产品有100多个,占所有基因工程蛋白质药物的70%以上,治疗肿

瘤的抗体药物也不断的被开发出来。抗体作为肿瘤治疗性药物具有十分突出的优点: 他能与相关抗原特异性结合、对肿瘤细胞选择性的杀伤作用、在机体内靶向分布、对肿瘤治疗中作用显著等, 与小分子药物、毒素或放射性有效载荷有关的结合性抗体相比在理论上显示出了强大的潜力, 部分治疗性抗体药物在临床使用中也已取得十分优越的疗效。同时人们广泛关注的还有其较低甚至几乎可以忽略的毒副作用, 所以治疗性抗体药物有望成为传统肿瘤治疗手段的替代方法。近年来由于抗体药物的兴起, 特别是一些治疗肿瘤的抗体药物的相继上市, 抗体治疗已经成为继外科手术、放疗、化疗、激素治疗之后的恶性肿瘤临床治疗的常规手段之一。

肿瘤组织中细胞表面HPA表达量增高, 使得针对HPA的抗体药物更具特异性。针对HPA分子靶标的抗体, 主要通过三种途径发挥作用: 一是抗原与抗体特异性结合, 使HPA分子结构发生改变而失去酶活性; 二是使效应细胞将其吞噬破坏; 三是使抗原表面弱化被补体破坏, 从而减弱HPA在肿瘤侵袭和转移中发挥的作用, 达到治疗肿瘤的目的^[63]。基于以上原理一些研究单位和公司已经研究和开发出治疗性的HPA mAb, 他们能够与HPA活性中心的部分氨基酸序列结合的抗体, 引起HPA活性丧失。Myler *et al*^[64]获得了治疗性HPA抗体, 他与HPA有很强的结合力, 可以抑制HPA活性, 降低细胞的活动性, 阻碍肿瘤细胞的迁徙和转移。

2.3 肝素酶疫苗的研究 治疗性疫苗已经出现200多年。利用致病因子增强机体的特异免疫应答, 尤其是细胞免疫应答, 是治疗性疫苗的发展方向, 其目标是使特异性抗原具有免疫原性及免疫反应性, 产生保护性细胞免疫应答。

针对HPA的疫苗已经出现, 主要分为两类: 一类是多肽型疫苗, 另一类为核酸型疫苗。他们分别由HPA来源的多肽和核酸构成, 能够作为肿瘤患者的疫苗发挥作用, 从而达到抑制其促肿瘤生长和转移的目的。Schirmacher *et al*^[65]获得了人HPA来源的九肽, 既可以作为治疗性疫苗, 也可以促进机体产生特异性免疫细胞发挥细胞免疫作用, 还能够提高机体对肿瘤转移关键酶HPA的免疫反应。也有些学者开始了核酸型HPA疫苗的研究。Cai *et al*^[66-67]试验证实通过HPA基因刺激细胞毒性T细胞(CTL)能够有效的诱导机体的

免疫应答, 而对自身同源的淋巴细胞没有杀伤作用, 所以HPA将可以作为肿瘤基因治疗的新靶标。随着研究的不断深入, HPA治疗性疫苗将会逐步进入临床应用, 在肿瘤治疗中发挥越来越重要的作用。

3 结论

HPA的研究经历了一个较长的时期, 他在肿瘤转移中的关键作用得到研究者的广泛认可, 特别是1999年HPA基因克隆的研究结果报道后^[44,68], 有关HPA的研究发展迅速, 对其促肿瘤转移的机制的认识也不断深入, 并为肿瘤的临床治疗提供了新方向。但是目前还存在一些尚待解决的问题: (1)HPA促肿瘤转移的机制尚有许多未知因素, 特别是HPA在调控信号通路方面的作用和途径存在分歧。(2)HPA能否像常规肿瘤标志物一样作为肿瘤检测、恶性程度分析、疗效的监测等的指标有待探讨。而且目前HPA的检测操作繁琐、成本昂贵, 应用于临床需要在方法上进行探索和改进^[69]。(3)HPA在除肿瘤之外的组织和细胞中也有表达, 如胎盘、白细胞等, HPA在机体内发挥复杂而又重要的作用^[70], 是否还有尚未触及的领域需要进一步考证。相信, 随着对HPA研究的不断深入, 上述问题将会凸现答案, 以HPA为靶标的肿瘤治疗也将随之获得重要突破。

4 参考文献

- 1 Watanabe M, Aoki Y, Kase H, Tanaka K. Heparanase expression and angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2003; 56: 77-82
- 2 Patel VN, Knox SM, Likar KM, Lathrop CA, Hossain R, Eftekhar S, Whitelock JM, Elkin M, Vlodavsky I, Hoffman MP. Heparanase cleavage of perlecan heparan sulfate modulates FGF10 activity during ex vivo submandibular gland branching morphogenesis. *Development* 2007; 134: 4177-4186
- 3 Bisio A, Mantegazza A, Urso E, Naggi A, Torri G, Viskov C, Casu B. High-performance liquid chromatographic/mass spectrometric studies on the susceptibility of heparin species to cleavage by heparanase. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 488-495
- 4 Ma P, Beck SL, Raab RW, McKown RL, Coffman GL, Utani A, Chirico WJ, Rapraeger AC, Laurie GW. Heparanase deglycanation of syndecan-1 is required for binding of the epithelial-restricted prosecretory mitogen lacritin. *J Cell Biol* 2006; 174: 1097-1106
- 5 Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 2018-2039
- 6 Zhou J, Cheng Y, Ding J. The basement membrane and metastasis. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 2006; 37:

创新盘点
本文重点阐述了以肝素酶为靶标的三种类型的抗肿瘤药物: 肝素酶抑制剂、肝素酶治疗性抗体、肝素酶治疗性疫苗, 详细介绍了其治疗肿瘤的机制, 最新进展以及应用前景, 并对肝素酶研究中存在的的一些尚待解决的问题进行了归纳和总结。

应用要点

本文详细介绍了肝素酶的生物学特性、促肿瘤转移的作用机制，以及肝素酶在肿瘤发生发展中的重要作用，对于系统了解肝素酶具有一定的帮助。特别是有关以肝素酶为靶标的肿瘤治疗方法和临床应用前景的综述，对该方面研究将起到一定的指导作用。

- 307-312
7 Wijnhoven TJ, van den Hoven MJ, Ding H, van Kuppevelt TH, van der Vlag J, Berden JH, Prinz RA, Lewis EJ, Schwartz M, Xu X. Heparanase induces a differential loss of heparan sulphate domains in overt diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2008; 51: 372-382
- 8 Ben-Zaken O, Gingis-Velitski S, Vlodavsky I, Ilan N. Heparanase induces Akt phosphorylation via a lipid raft receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 829-834
- 9 Nasser NJ, Avivi A, Shushy M, Vlodavsky I, Nevo E. Cloning, expression, and characterization of an alternatively spliced variant of human heparanase. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 33-38
- 10 Vreys V, David G. Mammalian heparanase: what is the message? *J Cell Mol Med* 2007; 11: 427-452
- 11 Wu WJ, Pan CE, Liu QG, Meng KW, Yu HB, Wang YL, Zhao L. Expression of heparanase and nuclear factor kappa B in pancreatic adenocarcinoma. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007; 27: 1267-1270
- 12 Han J, Woytowich AE, Mandal AK, Hiebert LM. Heparanase upregulation in high glucose-treated endothelial cells is prevented by insulin and heparin. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232: 927-934
- 13 Levy-Adam F, Miao HQ, Heinrikson RL, Vlodavsky I, Ilan N. Heterodimer formation is essential for heparanase enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 885-891
- 14 Escobar Galvis ML, Jia J, Zhang X, Jastrebova N, Spillmann D, Gottfridsson E, van Kuppevelt TH, Zcharia E, Vlodavsky I, Lindahl U, Li JP. Transgenic or tumor-induced expression of heparanase upregulates sulfation of heparan sulfate. *Nat Chem Biol* 2007; 3: 773-778
- 15 Bashenko Y, Ilan N, Krausz MM, Vlodavsky I, Hirsh MI. Heparanase pretreatment attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Shock* 2007; 28: 207-212
- 16 D'Souza SS, Daikoku T, Farach-Carson MC, Carson DD. Heparanase expression and function during early pregnancy in mice. *Biol Reprod* 2007; 77: 433-441
- 17 Nobuhisa T, Naomoto Y, Okawa T, Takaoka M, Gunduz M, Motoki T, Nagatsuka H, Tsujigawa H, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Haisa M, Matsuoka J, Kurebayashi J, Nakajima M, Taniguchi S, Sagara J, Dong J, Tanaka N. Translocation of heparanase into nucleus results in cell differentiation. *Cancer Sci* 2007; 98: 535-540
- 18 van den Hoven MJ, Rops AL, Vlodavsky I, Levidiotis V, Berden JH, van der Vlag J. Heparanase in glomerular diseases. *Kidney Int* 2007; 72: 543-548
- 19 Xu X, Ding J, Ding H, Shen J, Gattuso P, Prinz RA, Rana N, Dmowski WP. Immunohistochemical detection of heparanase-1 expression in eutopic and ectopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2007; 88: 1304-1310
- 20 Ihrcke NS, Parker W, Reissner KJ, Platt JL. Regulation of platelet heparanase during inflammation: role of pH and proteinases. *J Cell Physiol* 1998; 175: 255-267
- 21 Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 729-777
- 22 Shafat I, Barak AB, Postovsky S, Elhasid R, Ilan N, Vlodavsky I, Arush MW. Heparanase levels are elevated in the plasma of pediatric cancer patients and correlate with response to anticancer treatment. *Neoplasia* 2007; 9: 909-916
- 23 Vlodavsky I, Ilan N, Nadir Y, Brenner B, Katz BZ, Naggi A, Torri G, Casu B, Sasisekharan R. Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression. *Thromb Res* 2007; 120 Suppl 2: S112-S120
- 24 Vlodavsky I, Ilan N, Naggi A, Casu B. Heparanase: structure, biological functions, and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 2057-2073
- 25 Simizu S, Suzuki T, Muroi M, Lai NS, Takagi S, Dohmae N, Osada H. Involvement of disulfide bond formation in the activation of heparanase. *Cancer Res* 2007; 67: 7841-7849
- 26 Cohen I, Maly B, Simon I, Meirovitz A, Pikarsky E, Zcharia E, Peretz T, Vlodavsky I, Elkin M. Tamoxifen induces heparanase expression in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4069-4077
- 27 Theodoro TR, de Matos LL, Sant Anna AV, Fonseca FL, Semedo P, Martins LC, Nader HB, Del Giglio A, da Silva Pinhal MA. Heparanase expression in circulating lymphocytes of breast cancer patients depends on the presence of the primary tumor and/or systemic metastasis. *Neoplasia* 2007; 9: 504-510
- 28 Doviner V, Maly B, Reinhartz T, Vlodavsky I, Sherman Y. Heparanase expression: a potential ancillary diagnostic tool for distinguishing between malignant cells and reactive mesothelium in body cavity effusions. *Cytopathology* 2007; 18: 13-19
- 29 Dowek J, Kaplan-Cohen V, Naroditsky I, Sabo E, Ilan N, Vlodavsky I. Heparanase localization and expression by head and neck cancer: correlation with tumor progression and patient survival. *Neoplasia* 2006; 8: 1055-1061
- 30 Ru GQ, Zhao ZS, Tang QL, Xu WJ. mRNA expression of syndecan-1 and heparanase in relation to tumor progression and prognosis of gastric carcinoma. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2006; 44: 1062-1064
- 31 van den Hoven MJ, Rops AL, Bakker MA, Aten J, Rutjes N, Roestenberg P, Goldschmeding R, Zcharia E, Vlodavsky I, van der Vlag J, Berden JH. Increased expression of heparanase in overt diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2006; 70: 2100-2108
- 32 Ben-Izhak O, Kaplan-Cohen V, Ilan N, Gan S, Vlodavsky I, Nagler R. Heparanase expression in malignant salivary gland tumors inversely correlates with long-term survival. *Neoplasia* 2006; 8: 879-884
- 33 Vlodavsky I, Eldor A, Haimovitz-Friedman A, Matzner Y, Ishai-Michaeli R, Lider O, Naparstek Y, Cohen IR, Fuks Z. Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: possible involvement in diapedesis and extravasation. *Invasion Metastasis* 1992; 12: 112-127
- 34 Xu X, Rao G, Quiros RM, Kim AW, Miao HQ, Brunn GJ, Platt JL, Gattuso P, Prinz RA. In vivo and in vitro degradation of heparan sulfate (HS) proteoglycans by HPR1 in pancreatic adenocarcinomas. Loss of cell surface HS suppresses fibroblast growth factor 2-mediated cell signaling and proliferation. *J Biol Chem* 2007; 282: 2363-2373
- 35 Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, Aviv

- A, Peretz T, Pecker I, Pappo O. Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1167-1175
- 36 Ohtawa Y, Naomoto Y, Shirakawa Y, Takaoka M, Murata T, Sonoda R, Sakurama K, Yamatsuji T, Gunduz M, Tsujigawa H, Nagatsuka H, Terada N, Itano S, Horiki S, Yanagihara K, Nakajima M, Tanaka N. The close relationship between heparanase and cyclooxygenase-2 expressions in signet-ring cell carcinoma of the stomach. *Hum Pathol* 2006; 37: 1145-1152
- 37 Gohji K, Katsuoka Y, Okamoto M, Kamidono S, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Nakajima M. Human heparanase: roles in invasion and metastasis of cancer. *Hinyokika Kiyo* 2000; 46: 757-762
- 38 Goldshmidt O, Zcharia E, Cohen M, Aingorn H, Cohen I, Nadav L, Katz BZ, Geiger B, Vlodavsky I. Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity. *FASEB J* 2003; 17: 1015-1025
- 39 Zetser A, Bashenko Y, Edovitsky E, Levy-Adam F, Vlodavsky I, Ilan N. Heparanase induces vascular endothelial growth factor expression: correlation with p38 phosphorylation levels and Src activation. *Cancer Res* 2006; 66: 1455-1463
- 40 Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med* 1999; 5: 803-809
- 41 Zhang Y, Wang Y, Fu Z, Shen F. Heparanase, a key target for gene therapy against human malignancies. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 1965-1967
- 42 McKenzie EA. Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 1-14
- 43 Nakajima M, DeChavigny A, Johnson CE, Hamada J, Stein CA, Nicolson GL. Suramin. A potent inhibitor of melanoma heparanase and invasion. *J Biol Chem* 1991; 266: 9661-9666
- 44 Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med* 1999; 5: 793-802
- 45 Zhang Y, Li L, Wang Y, Zhang J, Wei G, Sun Y, Shen F. Downregulating the expression of heparanase inhibits the invasion, angiogenesis and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 124-129
- 46 Jingting C, Yangde Z, Yi Z, Huining L, Rong Y, Yu Z. Heparanase expression correlates with metastatic capability in human choriocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2007; 107: 22-29
- 47 Zammit SC, Ferro V, Hammond E, Rizzacasa MA. Enantiospecific synthesis of the heparanase inhibitor (+)-trachyspic acid and stereoisomers from a common precursor. *Org Biomol Chem* 2007; 5: 2826-2834
- 48 Yang Y, MacLeod V, Dai Y, Khotskaya-Sample Y, Shriver Z, Venkataraman G, Sasisekharan R, Naggi A, Torri G, Casu B, Vlodavsky I, Suva LJ, Epstein J, Yaccoby S, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Sanderson RD. The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. *Blood* 2007; 110: 2041-2048
- 49 Miao HQ, Liu H, Navarro E, Kussie P, Zhu Z. Development of heparanase inhibitors for anti-cancer therapy. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2101-2111
- 50 Miao HQ, Elkin M, Aingorn E, Ishai-Michaeli R, Stein CA, Vlodavsky I. Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Int J Cancer* 1999; 83: 424-431
- 51 Ferro V, Dredge K, Liu L, Hammond E, Bytheway I, Li C, Johnstone K, Karoli T, Davis K, Copeman E, Gautam A. PI-88 and novel heparan sulfate mimetics inhibit angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 557-568
- 52 Hostettler N, Naggi A, Torri G, Ishai-Michaeli R, Casu B, Vlodavsky I, Borsig L. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J* 2007; 21: 3562-3572
- 53 Wu XZ, Chen D. Effects of sulfated polysaccharides on tumour biology. *West Indian Med J* 2006; 55: 270-273
- 54 Parish CR, Freeman C, Brown KJ, Francis DJ, Cowden WB. Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity. *Cancer Res* 1999; 59: 3433-3441
- 55 Xu X, Ding J, Rao G, Shen J, Prinz RA, Rana N, Dmowski WP. Estradiol induces heparanase-1 expression and heparan sulphate proteoglycan degradation in human endometrium. *Hum Reprod* 2007; 22: 927-937
- 56 Basche M, Gustafson DL, Holden SN, O'Bryant CL, Gore L, Witt S, Schultz MK, Morrow M, Levin A, Creese BR, Kangas M, Roberts K, Nguyen T, Davis K, Addison RS, Moore JC, Eckhardt SG. A phase I biological and pharmacologic study of the heparanase inhibitor PI-88 in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5471-5480
- 57 Zhao H, Liu H, Chen Y, Xin X, Li J, Hou Y, Zhang Z, Zhang X, Xie C, Geng M, Ding J. Oligomannururate sulfate, a novel heparanase inhibitor simultaneously targeting basic fibroblast growth factor, combats tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66: 8779-8787
- 58 Liu XY, Fang H, Yang ZG. Construction of heparanase gene-targeted small interfering RNA and its gene silencing effect. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007; 36: 581-587
- 59 Zhang Y, Wang ZN, Zhang X, Xu HM, Jiang L, Luo Y, Xing LL, Xu MD, Li J. Inhibitory effect of siRNA on heparanase expression and invasion ability of gastric cancer cells: an in vitro experiment. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 87: 1717-1720
- 60 Zhang ZH, Chen Y, Zhao HJ, Xie CY, Ding J, Hou YT. Silencing of heparanase by siRNA inhibits tumor metastasis and angiogenesis of human breast cancer in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 587-595
- 61 Uno F, Fujiwara T, Takata Y, Ohtani S, Katsuda K, Takaoka M, Ohkawa T, Naomoto Y, Nakajima M, Tanaka N. Antisense-mediated suppression of human heparanase gene expression inhibits pleural dissemination of human cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 7855-7860
- 62 Edovitsky E, Elkin M, Zcharia E, Peretz T,

名词解释
硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPG):是一种蛋白聚糖类碳水化合物,是脊椎动物和无脊椎动物组织细胞外基质(ECM)和基底膜(BM)的主要成分之一,能与细胞表面及ECM中的活性分子结合,黏附于细胞表面,是ECM聚集和稳定的基础,在组织构成、血管形成和细胞黏附等诸多方面发挥重要的生理作用。

同行评价

本文有一定的新意, 对科学的研究和临床工作有指导意义, 具有一定的学术价值.

- Vlodavsky I. Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1219-1230
- 63 Gingis-Velitski S, Ishai-Michaeli R, Vlodavsky I, Ilan N. Anti-heparanase monoclonal antibody enhances heparanase enzymatic activity and facilitates wound healing. *FASEB J* 2007; 21: 3986-3993
- 64 Myler HA, Lipke EA, Rice EE, West JL. Novel heparanase-inhibiting antibody reduces neointima formation. *J Biochem* 2006; 139: 339-345
- 65 Schirmacher V, Förg P, Dalemans W, Chlichlia K, Zeng Y, Fournier P, von Hoegen P. Intra-pinna anti-tumor vaccination with self-replicating infectious RNA or with DNA encoding a model tumor antigen and a cytokine. *Gene Ther* 2000; 7: 1137-1147
- 66 Cai YG, Fang DC, Chen L, Wang DX, Luo YH, Tang XD, Chen T, Yang SM. Immune response of heparanase gene modified dendritic cell-based vaccine on gastric cancer cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 86: 3122-3127
- 67 Cai YG, Fang DC, Chen L, Tang XD, Chen T, Yu ST, Luo YH, Xiong Z, Wang DX, Yang SM. Dendritic cells reconstituted with a human heparanase gene induce potent cytotoxic T-cell responses against gastric tumor cells in vitro. *Tumour Biol* 2007; 28: 238-246
- 68 Kussie PH, Hulmes JD, Ludwig DL, Patel S, Navarro EC, Seddon AP, Giorgio NA, Bohlen P. Cloning and functional expression of a human heparanase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 183-187
- 69 Shafat I, Zcharia E, Nisman B, Nadir Y, Nakhol F, Vlodavsky I, Ilan N. An ELISA method for the detection and quantification of human heparanase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 958-963
- 70 Pang RW, Poon RT. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now. *Oncology* 2007; 72 Suppl 1: 30-44

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

WCJD 和 WJG 2008 年对同行评议 将开始实行公开策略

本刊讯 世界华人消化杂志(WCJD)和World Journal of Gastroenterology (WJG)为了确保刊出文章的质量, 即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版。如: 同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科。(总编辑: 马连生
2007-11-15)



抗胃癌抗体重链可变区序列分析及空间结构模拟

杨丽娟, 侯颖春, 药立波, 苏成芝

杨丽娟, 中国人民解放军总医院内分泌科 北京市 100853
侯颖春, 陕西师范大学生命科学学院 陕西省西安市 710062
药立波, 苏成芝, 中国人民解放军第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 陕西省西安市 710032
作者贡献分布: 此课题由杨丽娟、侯颖春、药立波、苏成芝设计; 研究过程由杨丽娟、侯颖春操作完成; 数据分析由杨丽娟、侯颖春完成; 本论文写作由杨丽娟完成。
通讯作者: 杨丽娟, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院内分泌科. llyang2828@163.com
电话: 010-66936234 传真: 010-68168917
收稿日期: 2007-10-25 修回日期: 2008-01-17

Analysis of primary structure and modeling of spatial structure of heavy chain variable region of antibody against human gastric cancer

Li-Juan Yang, Ying-Chun Hou, Li-Bo Yao,
Cheng-Zhi Su

Li-Juan Yang, Department of Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China
Ying-Chun Hou, School of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi Province, China
Li-Bo Yao, Cheng-Zhi Su, Department of Biochemistry and Molecular Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Dr. Li-Juan Yang, Department of Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. llyang2828@163.com
Received: 2007-10-25 Revised: 2008-01-17

Abstract

AIM: To confirm the primary structure of heavy chain variable regions (V_H) of antibody against human gastric cancer based on the sequence analysis method and to model its three-dimensional structure using homology modeling method.

METHODS: The V_H gene selected from the phage display library of antibodies against human gastric cancer was sequenced and analyzed. Its three-dimensional structure was modeled with computer homology modeling techniques and optimized using molecular mechanism method.

RESULTS: The sequence of V_H was in agreement with the characteristics of the mouse antibody variable region. The FR and CDR were

determined by Kabat analysis. The spatial structure of the V_H was constructed and optimized with molecular mechanism method to obtain the stable 3-D structure.

CONCLUSION: The primary and three-dimensional structures of V_H are reasonable and reliable and lay the theoretical foundation for further biological experiments.

Key Words: Gastric cancer; Computer homology modeling techniques; Variable region

Yang LJ, Hou YC, Yao LB, Su CZ. Analysis of primary structure and modeling of spatial structure of heavy chain variable region of antibody against human gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 413-416

背景资料
在肿瘤的诊断治疗中, 抗体占有很重要的作用。本研究利用噬菌体抗体库技术, 绕过杂交瘤技术, 获得了鼠抗人胃癌重链可变区片段, 为今后胃癌的显像和导向治疗奠定了一定的基础。

摘要

目的: 通过序列分析确定抗胃癌抗体重链可变区(V_H)的一级结构, 并借助同源模建方法模拟其三级结构。

方法: 从抗人胃癌噬菌体抗体库中筛选出 V_H 基因, 并进行序列测定、翻译和分析。利用计算机辅助蛋白质空间模拟技术, 采用同源模建、力学优化合理模建 V_H 的三维空间结构。

结果: 序列比对分析表明获得的 V_H 序列符合鼠抗体可变区特征, 通过Kabat分析确定了FR、CDR; 合理搭建了抗体重链可变区的空间构象, 并通过分子力学优化获得了稳定的三维结构。

结论: 所测得的 V_H 一级结构和构建的三维空间结构均有较高的可靠性, 为进一步的生物学实验奠定了基础。

关键词: 胃癌; 计算机辅助分子模拟; 抗体可变区

杨丽娟, 侯颖春, 药立波, 苏成芝. 抗胃癌抗体重链可变区序列分析及空间结构模拟. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 413-416
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/413.asp>

同行评议者
李奇林, 教授, 南方医科大学珠江医院消化内科

0 引言

自人源化抗体Herceptin被美国FDA批准上市后,

研发前沿

目前所获得的抗体大部分为鼠源性, 在应用过程中会引发HAMA反应而限制了其应用, 必须先进行人源化改造, 才能更好地应用于临床, 如何进行人源化改造是亟待研究的问题.

更多的实践表明, 抗体可能成为较理想的肿瘤诊断和治疗的新型药物^[1]. 本研究利用噬菌体抗体库技术, 绕过杂交瘤技术, 获得了鼠抗人胃癌重链可变区片段, 为今后胃癌的显像和导向治疗奠定了一定的基础. 然而, 由于其为鼠源性, 在应用过程中会引发HAMA反应而限制了其应用. 必须先进行人源化改造, 才能更好地应用于临床. 而进行人源化设计必须了解其三维结构. 因此本研究利用同源蛋白结构模建及分子力学优化技术, 采用Biosym公司开发的计算机辅助分子设计系统搭建了V_H的三维结构.

1 材料和方法

1.1 材料 细菌菌株*E.coli* TG1, 克隆及表达载体pCANTAB5E, 扩增V_H可变区基因引物RS Primer Mix, S3和S6引物均为Pharmacia公司产品. 其他有关分子生物学试剂系华美公司和Promega公司产品. Insight II (2005)软件包为MSI公司产品.

1.2 方法 抗人胃癌单链抗体基因文库及噬菌体表面呈现文库的构建和筛选见文献[2].

1.2.1 V_H基因序列的测定及分析: 从4℃贮存的阳性克隆菌种取100 μL接种于25 mL含氨苄青霉素(100 mg/L)的SOC培养液中, 30℃振荡培养过夜, 碱裂解法大量制备噬菌粒DNA, 经FPLC HiTrap Q柱纯化, 经*Eco*R I、*Hind*III双酶切鉴定后, 作为测序模板, 用S3 和S6引物从基因两端测序. 将所测得的DNA序列通过www.expasy.ch进行氨基酸序列的翻译, 并通过www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST对其序列进行相似性比较.

1.2.2 V_H三维结构模建及结构优化: 通过www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTP, 利用BLASTP^[3]软件搜索蛋白质晶体结构数据库(PDB), 获得V_H的同源蛋白, 利用Insight II (2000)软件, 选择HOMOLOGY^[4]程序包, 经过同源蛋白结构叠加以确定结构保守区(structural conserved region, SCR)和Loop区, 以该同源蛋白为模板对V_H的主链、侧链进行结构模建. 模建获得的V_H初始结构利用DISCOVERY-3^[5]程序包, 应用CVFF/Gromos96力场通过最陡下降、共轭梯度、牛顿力学对初始模型进行分子力学优化及常温分子动力学动态模拟, 获得V_H的三维结构的能量最低构象. 所有工作均在SGI Indigo 2工作站上完成.

2 结果

2.1 抗人胃癌V_H基因序列的测定及同源性分析 用S3和S6引物从基因两端测序, 测出相应的核

苷酸序列并进行同源性分析(图1). 将V_H基因序列输入计算机与Internet网中的所有基因数据库中的已知基因进行同源性比较, 其同源序列均为鼠Ig重链可变区基因, 与之同源性最高的为MM2F2A(Score 1464).

2.2 抗人胃癌V_H氨基酸序列的推导分析 V_H基因长度为354 bp, 系一开放读框, 利用www.expasy.ch对其进行序列分析, 对应的翻译模式见图2. 根据推导的氨基酸序列进行Kabat分类分析, 确定4个FR区和3个CDR区(图2). 通过确定的FR、CDR区以及抗体结构所必须的两个恒定半胱氨酸残基, 表明其结构符合鼠Ig重链可变区的氨基酸序列特征.

2.3 抗人胃癌V_H三维结构的同源模建 以V_H序列为探针, 用BLASTP程序在PDB库中搜索V_H的同源蛋白. 选择模板蛋白免疫球蛋白重链(PDB号: 1E4X)和目标蛋白V_H两者具有85%的序列相似性. 将1E4X和V_H进行序列比对, 考虑残基的理化性质, 确定6个SCR区, 5个Loop区. 利用模板蛋白1E4X重链可变区晶体结构的Cα原子坐标确定了V_H主链构象并完成了侧链安装, 组装出完整的V_H三维结构. 对模建的V_H三维结构在CVFF力场下, 经过最陡下降, 牛顿力学等方法进行能量的分子力学优化, 获得能量最低构象. 该稳定构象为全-β模式, N端5个反平行β片层, C端6个反平行β片层, N端2个高度保守的半胱氨酸残基形成1对二硫键结构(图3). 模建获得的V_H空间构象与1FVB晶体结构进行主链C原子的Cα迭合, 迭合后的均方根位移RMS = 0.15 nm, 表明理论模建的V_H空间结构是可靠的. 应用Profile-3D对优化后的V_H三维结构进行理论评估. 结果显示, 模建结构中无不兼容的残基, 说明结构较合理, 而且优化后结构更合理.

3 讨论

在肿瘤的诊断和治疗方面, 小分子抗体具有极高的理论和应用价值. 因为其具有分子小, 免疫原性弱, 穿透力强易于进入实体瘤周围的微循环, 血清和全身廓清快, 无肾脏蓄积作用, 肿瘤显像时清晰度高, 可作载体与药物、同位素、毒素等结合之优点^[6]. 本研究从已构建的抗人胃癌单链抗体基因文库及噬菌体表面呈现文库中筛选出了抗人胃癌V_H基因, 经序列测定及同源性分析表明其结构符合鼠Ig重链可变区的氨基酸序列特征, 为今后的基因工程改造提供了条件.

为了能更好地应用于临床, 必须将鼠源性

```

Query: 1 CAGGTCCAAC TGCAGCAGTCTAGGGCTGAAC TGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAACTG 60
        ||||| ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1 CAGGTCCAAC TGCAGCAGCCTGGACTGAAC TGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAAGCTG 60

Query: 61 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCCAGCTATTGGATGCAC TGGTGAAGCAGAGG 120
        ||||| ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 61 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCCAGCTACTGGATGCAC TGGTGAAGCGGAGG 120

Query: 121 CCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCAACGGTCGTACTAACTAC 180
        ||||| ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 121 CCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAA TATAATCCTAGCAATGGTGTACTGACTAC 180

Query: 181 AATGAGAAC TCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTTGACAAATCCTCCAGCCTAC 240
        ||||| ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 181 AATGAGAAC TCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTTGACAAATCCTCCAGCAGCCTAC 240

Query: 241 ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGTCTATTACTGTGCAAGATATGAG 300
        ||||| ||||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 241 ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGTCTATTACTGTGCAAGAGAGGAC 300

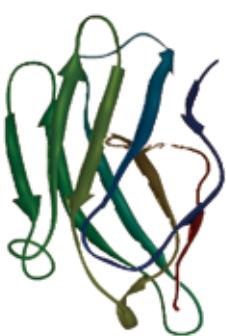
Query: 301 GACTACGATCTCCATGACTACTGGGCCAAGGGACCTCGGTACCGTCCCTCA 354
        ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 301 TACGGTAGTGACTTTGACTACTGGGCCAAGGCACACTTCACAGTCCCTCA 354

```

相关报道
人们通过对类似蛋白质空间结构的对比发现, 蛋白质的三维结构较其一级序列更为保守。氨基酸残基序列有50%相同的蛋白质, 约有90%的 $\text{C}\alpha$ 原子偏差不超过0.3 nm, 均方根偏差约0.1 nm, 氨基酸的残基替换通常发生在蛋白质表面回折区域。蛋白质主链结构, 特别是疏水中心的结构受序列变异的影响很小。因此, 用类似蛋白来预测目标蛋白的空间构象是比较可靠的。

图 1 V_{H} 基因序列及同源性分析结果。

Q	V	Q	L	Q	Q	S	R	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	
												CAGGTCCAAC TGCAGCAGTCTAGGGCTGAAC TGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAACTGTCCTGCAAGGCT												
12						24				36			48			60			72					
												CDR1												
S	G	Y	T	F	T	S	Y	W	M	H	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L	E	W	I	
												TCTGGCTACACCTTACCCAGCTATTGGATGCAC TGGTGAAGCAGAGGCCCTGGACAAGGCCCTTGAGTGGATT												
84						96				108			120			132			144					
												CDR2												
G	E	I	N	P	S	N	G	R	T	N	Y	N	E	N	F	K	S	K	A	T	L	T	V	
												GGAGAGATTAATCCTAGCAACGGTCGTACTAACTACAATGAGAAC TCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTT												
156						168				180			192			204			216					
D	K	S	S	S	S	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	
												GACAAATCCTCCAGCTCAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGTCTATTACTGT												
228						240				252			264			276			288					
												CDR3												
A	R	Y	E	D	Y	D	L	H	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S			
												GCAAGATATGAGGACTACGATCTCCATGACTACTGGGCCAAGGGACCTCGGTACCGTCTCCTCA												
300						312				324			336			348								

图 2 V_{H} CDR区、FR区的确定。图 3 以1EXB晶体结构为模板同源模建获得的目标蛋白 V_{H} 的三维空间结构。

的抗体先进行人源化改造, 而进行人源化设计必须了解其三维结构。人们通过对类似蛋白质空间结构的对比发现, 蛋白质的三维结构较其一级序列更为保守。氨基酸残基序列有50%相

同的蛋白质, 约有90%的 $\text{C}\alpha$ 原子偏差不超过0.3 nm, 均方根偏差约0.1 nm, 氨基酸的残基替换通常发生在蛋白质表面回折区域。蛋白质主链结构, 特别是疏水中心的结构受序列变异的影响很小^[7]。因此, 用类似蛋白来预测目标蛋白的空间构象是比较可靠的。根据此原理, 人们已成功预测了许多目标蛋白, 在抗体的结构预测中尤为突出^[8-14]。本研究利用Biosym公司的Homology软件包, 同源模建了用噬菌体抗体库技术获得的抗人胃癌抗体 V_{H} 结构域的三维空间结构。经过分子力学和分子动力学优化, Profile-3D的合理性评价, 提示所获得的 V_{H} 结构域的三维结构有较高的可靠性, 为今后制备人源化单链抗体

创新盘点

本文先从噬菌体抗体库着手, 得到抗体后, 利用三维重建得到空间结构, 为人源化改造奠定基础。

奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Bradbury AR, Marks JD. Antibodies from phage antibody libraries. *J Immunol Methods* 2004; 290: 29-49
- 2 杨丽娟, 苏成芝. 抗人胃癌全套单链抗体基因噬菌体表面呈现文库的构建、初步筛选及鉴定. 第四军医大学学报 1998; 19: 22-24
- 3 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3389-3402
- 4 Molecular Simulation Inc. Homology 2000.0 User Guide, Version 2000[EB] San Diego, 2000
- 5 Molecular Simulation Inc. Discover-3 User Guide, Version 2000[EB] San Diego, 2000
- 6 Colcher D, Bird R, Roselli M, Hardman KD, Johnson S, Pope S, Dodd SW, Pantoliano MW, Milenic DE, Schlom J. In vivo tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1191-1197
- 7 Blundell TL, Sibanda BL, Sternberg MJ, Thornton JM. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature* 1987; 326: 347-352
- 8 Fontayne A, Vanhoorelbeke K, Pareyn I, Van Rompaey I, Meiring M, Lamprecht S, Roodt J, Desmet J, Deckmyn H. Rational humanization of the powerful antithrombotic anti-GPIbalphabeta antibody: 6B4. *Thromb Haemost* 2006; 96: 671-684
- 9 Paula S, Monson N, Ball WJ Jr. Molecular modeling of cardiac glycoside binding by the human sequence monoclonal antibody 1B3. *Proteins* 2005; 60: 382-391
- 10 Thompson AJ, Price KL, Reeves DC, Chan SL, Chau PL, Lummis SC. Locating an antagonist in the 5-HT3 receptor binding site using modeling and radioligand binding. *J Biol Chem* 2005; 280: 20476-20482
- 11 Mendez R, Leplae R, Lensink MF, Wodak SJ. Assessment of CAPRI predictions in rounds 3-5 shows progress in docking procedures. *Proteins* 2005; 60: 150-169
- 12 Gee GV, Tsomaia N, Mierke DF, Atwood WJ. Modeling a sialic acid binding pocket in the external loops of JC virus VP1. *J Biol Chem* 2004; 279: 49172-49176
- 13 Arndt MA, Krauss J, Schwarzenbacher R, Vu BK, Greene S, Rybak SM. Generation of a highly stable, internalizing anti-CD22 single-chain Fv fragment for targeting non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2003; 107: 822-829
- 14 Mohan S, Sinha N, Smith-Gill SJ. Modeling the binding sites of anti-hen egg white lysozyme antibodies HyHEL-8 and HyHEL-26: an insight into the molecular basis of antibody cross-reactivity and specificity. *Biophys J* 2003; 85: 3221-3236

编辑 程剑侠 电编 何基才

同行评价

本研究具有新颖性, 有一定的意义。

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

• 消息 •

WCJD 和 WJG 2008 年对作者贡献分布 将开始实行公开策略

本刊讯 WCJD 和 WJG 即将开始实行在每篇文章的脚注内注明每个作者对文章的贡献率, 如: 作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李峰及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及 庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成。(总编辑: 马连生 2007-11-15)



注射用血栓通对肝星状细胞基因表达的影响

李国力, 魏红山, 邱爽, 曾辉

李国力, 魏红山, 曾辉, 北京大学北京地坛医院传染病防治研究所 北京市 100011
邱爽, 北京积水潭医院检验科 北京市 100035
国家自然科学基金资助项目 No. 30671875
作者贡献分布: 李国力与邱爽对此文所作贡献均等; 此课题由魏红山、曾辉设计; 研究过程由李国力、邱爽完成; 研究所用新试剂及分析工具由魏红山、曾辉提供; 数据分析由李国力、邱爽完成; 本论文写作由李国力、邱爽完成
通讯作者: 魏红山, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. gary_lgl@163.com
电话: 010-64211031-2358
收稿日期: 2007-10-12 修回日期: 2007-12-26

Effect of panax notoginseng saponins on gene expression of cultured human hepatic stellate cells

Guo-Li Li, Hong-Shan Wei, Shuang Qiu, Hui Zeng

Guo-Li Li, Hong-Shan Wei, Hui Zeng, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Peking University, Beijing 100011, China
Shuang Qiu, Clinical Laboratory, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30671875
Correspondence to: Guo-Li Li, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Peking University, 13 Ditan Park, Anwei Street, Beijing 100011, China. gary_lgl@163.com
Received: 2007-10-12 Revised: 2007-12-26

Abstract

AIM: To explore the effects of panax notoginseng saponins (PNS) on gene expression of cultured human hepatic stellate cells (HSCs) and its mechanism.

METHODS: PNS (10^{-3} mg/L) and HSCs (LX02 cells) were cultured for 48 h. Total RNA was isolated from HSCs, reverse transcribed into cDNA and hybridized with GeneChip. The expression of mRNA was examined with the human GeneChip analysis system.

RESULTS: Differential expression was found in 41 genes of HSCs, of which, 20 were down-regulated and 21 up-regulated. Some differentially expressed genes were associated with metabolism, cell adherence, DNA binding phosphorylation and methylation. The function

of some genes was unknown.

CONCLUSION: Panax notoginseng saponins can change the gene expression in HSCs by regulating their expression and inhibiting the function of HSCs.

Key Words: Panax notoginseng saponins; Total notoginseng saponins; Hepatic stellate cell; Liver fibrosis; Genechip

Li GL, Wei HS, Qiu S, Zeng H. Effect of panax notoginseng saponins on gene expression of cultured human hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(4): 417-421

摘要

目的: 探讨注射用血栓通对肝星状细胞LX02基因表达的影响及其机制。

方法: 将 10^{-3} mg/L的注射用血栓通与人肝星状细胞LX02共同孵育48 h, 提取mRNA, 并逆转录成cDNA. 与芯片杂交, 根据杂交信号强弱筛选相关基因。

结果: 41条肝星状细胞基因差异表达, 其中表达上调的基因21条, 下调基因20条, 这些基因主要与能量代谢、细胞黏附、DNA结合、磷酸化、甲基化等相关, 还有部分基因功能不详。

结论: 经注射用血栓通作用后, 肝星状细胞基因表达发生变化, 其可能通过调控这些基因的表达实现了对肝星状细胞功能的抑制作用。

关键词: 注射用血栓通; 三七总皂甙; 肝星状细胞; 肝纤维化; 基因芯片

李国力, 魏红山, 邱爽, 曾辉. 注射用血栓通对肝星状细胞基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 417-421
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/417.asp>

0 引言

三七总皂甙中的人参皂甙Rg1、Rb1和三七皂甙R1三种组分的含量达80%以上, 其具有较好的

背景资料

自从发现肝星状细胞表达血管受体 及血管紧张素促肝纤维化发生的现象以来, 越来越多的研究表明肝纤维化和其他系统硬化性疾病有相似的发病机制, 由此本文研究了对缓解动脉硬化有良好效果的中成药注射用血栓通对肝纤维化也有一定疗效, 本实验旨在进一步研究注射用血栓通抗肝纤维化的分子机制。

相关报道

2005年以来,王文兵*et al*对三七总皂甙在肝纤维、肝损伤、诱导肝星状细胞凋亡等方面的研究作了相关的报道。

扩血管和改善微循环的作用。近年来研究表明,三七总皂甙对肝星状细胞生物功能具有抑制作用^[1],提示其对肝纤维化可能具有一定疗效。注射用血栓通是用特殊工艺从三七主根中提取出三七总皂甙制成,其特点是纯度高、生物活性高、水溶性好和毒性低。我们以基因芯片技术对注射用血栓通作用的肝星状细胞LX02基因表达进行分析,初步探讨注射用血栓通对肝星状细胞功能抑制的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 肝星状细胞株LX02为徐列明教授惠赠,细胞培养相关试剂及总RNA提取试剂TRIzol均购自Invitrogen公司,注射用血栓通为广西梧桐制药有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 在25 cm²培养瓶中常规培养LX02细胞,细胞生长至对数期时分别将三七总皂甙及溶剂DMEM加入细胞培养液中,使终浓度达到10⁻³ mg/L(根据MTT实验提示三七总皂甙在此浓度时对肝星状细胞增殖抑制最明显),72 h后收获细胞约1×10⁷,按每5×10⁶个细胞加入1 mL TRIzol试剂,立即于液氮中保存。

1.2.2 总RNA提取和mRNA纯化: 使用TRIzol试剂一步法提取三七总皂甙和DMEM处理的LX02细胞总RNA(分别标记为实验组和对照组),样品经分光光度计检测吸光度A值,并行热稳定实验,于-20℃和70℃保温1 h后,经琼脂糖凝胶电泳检测28 S、18 S条带变化。

1.2.3 探针标记: 总RNA逆转录标记cDNA探针并纯化,Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μg),Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μg)。乙醇沉淀后溶解在20 μL 5×SSC+0.2% SDS杂交液中。

1.2.4 芯片制备: 芯片包含的4096个cDNA由上海博星基因芯片有限公司提供,包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等。以通用引物进行PCR扩增,PCR产物长度为1000-3000 bp。靶基因以0.5 g/L溶解于3×SSC溶液中,用Cartesian公司的Cartesian 7500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样。玻片经水合(2 h)、室温干燥(0.5 h),UV交联,再分别用0.2% SDS、水及0.2%的硼氢化钠溶液处理10 min,晾干备用。

1.2.5 杂交及洗涤: 将基因芯片和杂交探针在

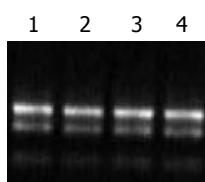


图1 肝星状细胞总RNA电泳。
1-2: 为实验对照, 3-4: 为三七总皂甙10⁻³ mg/L。

95℃水浴变性5 min,将混合探针加在基因芯片上,置于60℃杂交15-17 h。依次以2×SSC+0.2% SDS、0.1%×SSC+0.2% SDS、0.1% SSC洗涤10 min,室温晾干。

1.2.6 检测与分析: 用General Scanning公司的ScanArray3000扫描芯片。为了监控芯片杂交技术体系的整个过程,用预先选定的内参照基因(24条管家基因,每个基因点2个点,共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正。用ImaGene3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度,计算Cy5/Cy3比值。阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱; 黄色代表表达水平无差异。

2 结果

2.1 肝星状细胞总RNA和mRNA的定性、定量分析 总RNA的吸光度 $A_{260}/A_{280}>1.80$,热稳定实验70℃保温1 h与-20℃1 h电泳条带比较,显示28 S条带无明显降解,电泳结果证实已抽提纯度的总RNA(图1)。mRNA主要集中于900-4000 bp的连续条带。

2.2 芯片杂交体系验证及分析 实验组探针标记Cy5(红色),对照组探针标记Cy3(绿色),红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异,黄色代表表达水平无差异(图2-3)。

2.3 差异表达基因分析 本研究共筛选出41条差异表达的基因,其中20条基因表达下调,21条基因表达上调,差异表达的基因中有6条基因功能未知(表1)。

3 讨论

活化的肝星状细胞能大量增殖,分泌大量胶原成分^[2],是肝纤维化、肝硬化时细胞外基质的主要来源和细胞学基础^[4]。魏红山*et al*在国内首次发现肝纤维化大鼠肝星状中血管紧张素I的表达,提示肾素-血管紧张素系统在主导循环系统疾病之外,对肝纤维化的发病也有一定影响,动物实验证明依那普利等循环系统疾病的治疗药对肝纤维化也具有较好的治疗作用^[5]。

创新盘点
本文主要应用基因芯片技术初步筛选了中药成分三七总皂甙对肝星状细胞的基因表达。

表 1 三七总皂甙上调和下调LX02细胞的表达基因

序号	编码基因	Cy5/Cy3
1	FOLH1: folate hydrolase (prostate - specific membrane antigen) 1	0.148
2	Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 4331862	0.274
3	Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 5767167	0.311
4	COASY: Coenzyme A synthase	0.327
5	SLC1A6: solute carrier family 1 (high affinity aspartate/glutamate transporter), member 6	0.332
6	SUPT3H: suppressor of Ty 3 homolog	0.342
7	APEH: N - acylaminoacyl - peptide hydrolase	0.350
8	PECAM1: platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	0.351
9	INSIG1: insulin induced gene 1	0.352
10	SHROOM2: shroom family member 2	0.360
11	RUSC2: RUN and SH3 domain containing 2	0.362
12	Homo sapiens cDNA clone UI - 1 - BC1p - asi - c - 08 - 0 - UI 3'	0.364
13	RBM14: RNA binding motif protein 14	0.365
14	RAB5C: member RAS oncogene family	0.368
15	ZNF508: zinc finger protein 508	0.370
16	TEX264: testis expressed 264	0.379
17	Homo sapiens, clone IMAGE: 3914313	0.381
18	ILK: integrin - linked kinase	0.382
19	HCN1: hyperpolarization activated cyclic nucleotide - gated potassium channel 1	0.385
20	SNTA1: syntrophin, alpha 1 (dystrophin - associated protein A1, 59kDa, acidic component)	0.387
21	GLMN: glomulin, FKBP associated protein	2.441
22	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58 kDa, V1 subunit B2	2.447
23	MAN2B2: mannosidase, alpha, class 2B, member 2	2.453
24	CFTS3: cleavage and polyadenylation factor subunit	2.458
25	TTC35: tetrastricopeptide repeat domain 35	2.470
26	PLCB4: phospholipase C, beta 4	2.480
27	FOXN2: forkhead box N2	2.491
28	MTR: 5 - methyltetrahydrofolate - homocysteine methyltransferase	2.529
29	ICAM1: intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	2.561
30	Homo sapiens cDNA clone UI - E - CK1 - afi - a - 04 - 0 - UI	2.599
31	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2	2.606
32	SEPT4: septin 4	2.622
33	KCNJ10: potassium inwardly - rectifying channel, subfamily J, member 10	2.622
34	CD302 molecule	2.643
35	ABHD2: abhydrolase domain containing 2	2.657
36	phosphorylase, glycogen	2.680
37	MEGF9: multiple EGF - like - domains 9	2.700
38	Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 5755160	2.750
39	ID1: inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix - loop - helix protein	2.889
40	CYP2J: cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	2.932
41	OPCML: opioid binding protein/cell adhesion molecule - like	3.540

近年来研究表明, 常用于循环系统疾病的中药提取物三七总皂甙在实验性肝损伤和肝纤维化中也具有一定的防治作用^[6-7], 提示三七总皂甙在肝脏疾病方面具有一定的应用前景。

注射用血栓通是用特殊工艺从三七主根中提取出三七总皂甙制成, 其特点是纯度高、生物活性高、水溶性好。注射用血栓通作用的

LX02细胞共有41条基因表达发生差异变化, 其中21条基因表达上调, 20条基因表达下调。表达下调的基因包括与合成代谢、细胞增殖、抑制凋亡等信号传导相关的基因: FOLH1为叶酸吸收所必需^[8]; COASY是辅酶A合成酶, 参与细胞的能量代谢和多种生物合成过程^[9]; SLC1A6是谷氨酸和天冬氨酸的转运载体^[10];

名词解释

三七总皂甙：是从药用植物三七提取的化学混合物，其成分中的活性成分人参皂甙Rg1、Rb1和三七皂甙R1三种组分的含量达80%以上，其具有较好的扩血管和改善微循环的作用。

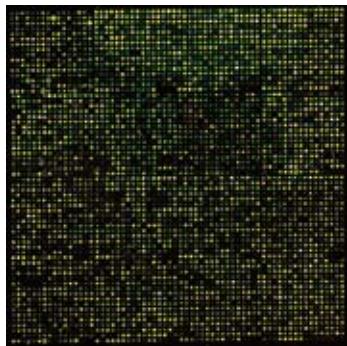


图 2 双色荧光
标记叠加图.

SUPT3H是STAGA乙酰基转移酶复合体的重要成分，STAGA与DNA复制纠错、损伤修复相关^[11]，Myc蛋白在与靶基因启动子结合时需要STAGA的辅助^[12]；APEH能够从肽段中水解末端酰基化的氨基酸，该反应对水解活细胞中氧化损伤的蛋白十分重要，与机体抗氧化损伤密切相关，在多种肿瘤中都能够监测到此基因位点的缺失^[13]，PECAM1即CD31，研究显示CD31在某些肿瘤表面表达升高，以往研究显示其可以抑制线粒体依赖的凋亡和Bax介导的凋亡^[14]。封闭肿瘤细胞表面的CD31能够诱导细胞凋亡，从而抑制细胞增殖^[15]；RAB5C属于RAS癌基因家族，与细胞增殖及肿瘤形成密切相关^[16]；ILK位于细胞增殖等信号传递的上游，在TGF-β1介导的肝星状细胞增殖过程中非常重要^[17]；HCN1能够介导肌细胞等细胞的兴奋性动作电位，注射用血栓通作用后肝星状细胞表达该基因下调，提示肝星状细胞活化表型减少^[18]。表达上调的基因中：OPCML：最近研究发现其表达能抑制肿瘤生长、抑制细胞增殖^[19]；CYP2J：属于细胞色素P450家族，参与药物和甾体类激素的代谢，其表达升高有助于维持细胞稳定状态，降低对激素的反应^[20]；ID1具有抑制细胞表型转化的作用，能拮抗TGF-β1促分化、增殖的作用^[21]；SEPT4能够促进多种途径诱导的凋亡过程^[22]。

总之，通过基因芯片筛选，经注射用血栓通作用后肝星状细胞基因表达发生变化，提示注射用血栓通可能通过调控这些基因的表达实现了其对肝星状细胞功能的抑制作用。目前实验结果的验证工作正在进行，这些基因在肝星状细胞中的具体生物功能还需进一步研究。

4 参考文献

- 王文兵, 戴立里, 郑元义. 三七总皂甙诱导大鼠肝星状细胞凋亡的研究. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 156-157
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 王宝恩. 肝星状细胞与肝纤维化. 中华肝脏病杂志

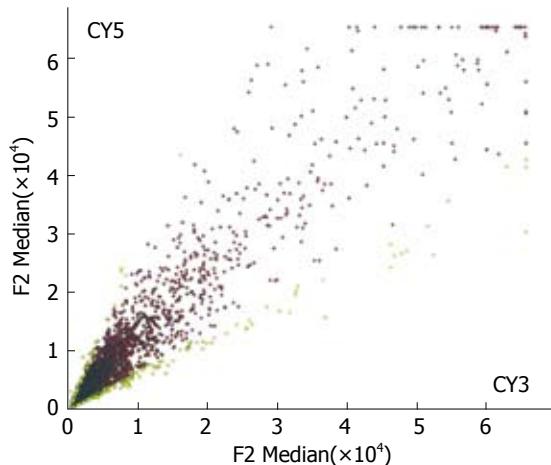


图 3 杂交信号强度散点图.

- 2000; 8: 197-199
- Wei H, Lu H, Li D, Zhan Y, Wang Z, Huang X. The expression of AT1 receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl4. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 583-587
- 元文勇, 叶启发, 姜文泉, 姜惟龙, 申培硕. 三七总皂甙对大鼠肝脏缺血再灌注损伤肝细胞线粒体的自由基的清除作用. 中国现代医学杂志 2005; 15: 3706-3708
- 石小枫, 徐曼, 刘杞. 三七总皂甙对肝纤维化大鼠、型胶原及TGF-β1的影响. 中药药理与临床 2001; 17: 7-8
- Shafizadeh TB, Halsted CH. gamma-Glutamyl hydrolase, not glutamate carboxypeptidase II, hydrolyzes dietary folate in rat small intestine. *J Nutr* 2007; 137: 1149-1153
- Zhyvoloup A, Nemazanyy I, Babich A, Panasyuk G, Pobigailo N, Vudmaska M, Naidenov V, Kukharenko O, Palchevskii S, Savinska L, Ovcharenko G, Verdier F, Valovka T, Fenton T, Rehbolz H, Wang ML, Shepherd P, Matsuka G, Filonenko V, Gout IT. Molecular cloning of CoA Synthase. The missing link in CoA biosynthesis. *J Biol Chem* 2002; 277: 22107-22110
- Poulsen MV, Vandenberg RJ. Niflumic acid modulates uncoupled substrate-gated conductances in the human glutamate transporter EAAT4. *J Physiol* 2001; 534: 159-167
- Martinez E, Palhan VB, Tjernberg A, Lymar ES, Gamper AM, Kundu TK, Chait BT, Roeder RG. Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6782-6795
- Liu X, Tesfai J, Evrard YA, Dent SY, Martinez E. c-Myc transformation domain recruits the human STAGA complex and requires TRRAP and GCN5 acetylase activity for transcription activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 20405-20412
- Perrier J, Giardina T, Durand A, Puigserver A. Specific enhancement of acylase I and acylpeptide hydrolase activities by the corresponding N-acetylated substrates in primary rat hepatocyte cultures. *Biol Cell* 2002; 94: 45-54
- Bergom C, Goel R, Paddock C, Gao C, Newman DK, Matsuyama S, Newman PJ. The cell-adhesion and signaling molecule PECAM-1 is a molecular mediator of resistance to genotoxic chemotherapy.

- 14 *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 1699-1707
 Lutzky VP, Carnevale RP, Alvarez MJ, Maffia PC, Zittermann SI, Podhajcer OL, Issekutz AC, Chuluyan HE. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1334-1350
- 15 Amaar YG, Minera MG, Hatran LK, Strong DD, Mohan S, Reeves ME. Ras association domain family 1C protein stimulates human lung cancer cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291: L1185-L1190
- 16 Lin SW, Ke FC, Hsiao PW, Lee PP, Lee MT, Hwang JJ. Critical involvement of ILK in TGF β 1-stimulated invasion/migration of human ovarian cancer cells is associated with urokinase plasminogen activator system. *Exp Cell Res* 2007; 313: 602-613
- 17 Herrmann S, Stieber J, Ludwig A. Pathophysiology of HCN channels. *Pflugers Arch* 2007; 454: 517-522
- 18 Mei FC, Young TW, Liu J, Cheng X. RAS-mediated epigenetic inactivation of OPCML in oncogenic transformation of human ovarian surface epithelial cells. *FASEB J* 2006; 20: 497-499
- 19 Yamazaki H, Okayama A, Imai N, Guengerich FP, Shimizu M. Inter-individual variation of cytochrome P4502J2 expression and catalytic activities in liver microsomes from Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica* 2006; 36: 1201-1209
- 20 Damdinseren B, Nagano H, Kondo M, Natsag J, Hanada H, Nakamura M, Wada H, Kato H, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Umehita K, Dono K, Monden M. TGF- β 1-induced cell growth arrest and partial differentiation is related to the suppression of Id1 in human hepatoma cells. *Oncol Rep* 2006; 15: 401-408
- 21 Elhasid R, Sahar D, Merling A, Zivony Y, Rotem A, Ben-Arush M, Israeli S, Bercovich D, Larisch S. Mitochondrial pro-apoptotic ARTS protein is lost in the majority of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene* 2004; 23: 5468-5475

同行评价
 本文内容和撰写基本符合要求, 具有一定的科学价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

WCJD 和 WJC 即将开始实行网络版文章与该文章发表前纪录的链接

本刊讯 WCJD 和 WJC 即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程. (总编辑: 马连生 2007-11-15)



血红素氧合酶2在吗啡诱导的结肠慢传输型便秘小鼠结肠中的表达及意义

姜柳琴, 林琳, 张红杰, 胡晔东, 林征, 王美峰

背景资料

慢性便秘是消化系统常见疾病之一, 影响了相当多患者的工作生活; 慢性便秘分类较多, 结肠慢传输型便秘是其中之一; 目前临床越来越关注患者的生活质量, 对功能性疾病的治疗不断深入。

姜柳琴, 林琳, 张红杰, 胡晔东, 林征, 王美峰, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029

江苏省“135工程”医学重点人才基金资助项目, No. RC2003087

作者贡献分布: 林琳与姜柳琴对本文所作贡献均等; 此课题由林琳、姜柳琴、张红杰、胡晔东及林征、王美峰设计; 研究过程由姜柳琴、胡晔东及王美峰合作完成; 研究所用试剂和分析工具由姜柳琴提供; 数据分析由姜柳琴和胡晔东完成; 本论文写作由姜柳琴完成。

通讯作者: 林琳, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化内科. lin9100@yahoo.com.cn

电话: 025-83718836-6920

收稿日期: 2007-01-21 修回日期: 2007-02-08

Expression of heme oxygenase-2 in mouse model of colon slow transit motility constipation induced by morphine and its significance

Liu-Qin Jiang, Lin Lin, Hong-Jie Zhang, Ye-Dong Hu, Zheng Lin, Mei-Feng Wang

Liu-Qin Jiang, Lin Lin, Hong-Jie Zhang, Ye-Dong Hu, Zheng Lin, Mei-Feng Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Supported by: “135 Program” for Medical Key Person Foundation of Jiangsu Province, No. RC2003087

Correspondence to: Dr. Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lin9100@yahoo.com.cn

Received: 2007-01-21 Revised: 2007-02-08

Abstract

AIM: To study the expression and changes of heme oxygenase-2 (HO-2) in a mouse model of morphine induced colon slow transit motility and the role of HO-2 in the development of slow transit motility constipation.

METHODS: Forty-eight mice were randomly divided into test A group ($n = 16$), test B group ($n = 16$) and control 1 group. A mouse model was established by subcutaneous injection of morphine (2.5 mg/(kg·d) in test A1) and 3.5 mg/(kg·d) in test B1) for 45 days, and the control group 1 was established by normal saline injection at the same dosage. On the 45 day, 8 mice from

each group were killed. The remaining as test A2, test B2 and control group 2 mice received no treatment and were observed for 15 days, and then killed. The intestinal transit rate for mice in each group was detected by activated charcoal suspension pushing test, and the expression of HO-2⁺ cells in proximal colon tissue was determined by immunohistochemistry.

RESULTS: The intestinal transit rate was decreased obviously in all test groups than in the control group, which was lower in test B than in test A. The intestinal transit rate for all test groups was significantly lower 15 days after colon slow transit motility constipation induced by morphine than 45 days before colon slow transit motility constipation induced by morphine.

CONCLUSION: The c-kit⁺ cells are more obviously decreased in mouse proximal colon tissue with slow-transit motility constipation induced by morphine, and correlated with the dose and time of morphine used, suggesting that changes in nerve transmitter CO are one of the factors for colon slow-transit motility constipation.

Key Words: Colon slow transit; Morphine; Heme oxygenase-2; Immunohistochemistry

Jiang LQ, Lin L, Zhang HJ, Hu YD, Lin Z, Wang MF. Expression of heme oxygenase-2 in mouse model of colon slow transit motility constipation induced by morphine and its significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 422-425

摘要

目的: 探讨血红素氧合酶2(HO-2)在吗啡诱导的结肠慢传输运动小鼠近端结肠组织中的表达, 和其在慢传输型便秘发生发展中的作用。

方法: 将48只小鼠随机分为实验组A, 实验组B和对照组, 每组16只。实验组小鼠sc不同剂量吗啡, 实验组A: 2.5 mg/(kg·d)和实验组B: 3.5 mg/(kg·d), 共45 d, 建立肠道慢传输运动小鼠模型, 对照组以等量生理盐水处理; 45 d后各组小鼠随机处死一半。剩余小鼠分别对

应作为实验组A2, 实验组B2和对照组2, 不作处理观察15 d, 再全部处死。用免疫组化技术比较各组小鼠近端结肠组织中HO-2阳性细胞的表达情况。

结果: 在实验组和对照组小鼠结肠组织中HO-2均有表达; 实验组较正常组表达显著减少; 实验组B较实验组A的表达明显减少; 停用吗啡观察15 d后各实验组较45 d时各实验组表达明显减少。

结论: 吗啡诱导的肠道慢传输运动小鼠结肠组织中HO-2表达显著减少, 并与吗啡剂量和时间有关, 提示抑制性神经递质CO异常减少可能是肠道慢传输运动的病因之一。

关键词: 结肠慢传输; 吗啡; 血红素氧合酶2; 免疫组化

姜柳琴, 林琳, 张红杰, 胡晔东, 林征, 王美峰, 血红素氧合酶2在吗啡诱导的结肠慢传输型便秘小鼠结肠中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 422 - 425

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/422.asp>

0 引言

内源性一氧化碳(CO)是肠道非肾上腺素非胆碱能神经(NANC)分泌的抑制性神经递质, 对调节胃肠运动有重要作用^[1]。血红素氧合酶(HO)是CO合成的关键酶, 有三种同工酶^[2], 即诱导型HO(HO-1), 原生型HO(HO-2)和HO-3^[3](不产生CO, 功能尚不清楚)。CO和NO在人体某些功能中的作用较相似, 是重要的化学信号物质, 调节神经递质传导、平滑肌的紧张性及其对细胞损伤的反应^[4], 并在细胞功能和信息联络发挥重要的信号转导作用。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级ICR小鼠48只, 雌雄各半, 每只体质量25-30 g, 购于江苏省实验动物中心(南京医科大学实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 造模和分组^[5]: 将48只小鼠随机分为实验组A, 实验组B和对照组($n = 16$)。实验组A和B分别sc吗啡2.5 mg/(kg•d)和3.5 mg/(kg•d), 对照组以等量生理盐水, 处理45 d。各组随机处死小鼠一半(为实验组A1、B1及对照组1)。其余小鼠继续饲养并停药观察15 d(实验组A2、B2及对照组2)。第60天处死全部小鼠, 处死后予炭末推进法评价结肠传输运动功能符合结肠慢传输运动小鼠模

型^[5], 取各组小鼠近端及远端结肠组织各0.5 cm。小鼠粪便性状采用Bristol分级^[5]。

1.2.2 免疫组织化学检测HO-2表达: HO-2一抗及免疫组化试剂盒均购自Promega公司, 二抗(羊抗兔抗体, 工作液浓度)购自北京中山生物科技公司, 按说明书进行常规免疫组化检测, PBS代替一抗作为阴性对照。阳性结果判断: 胞质染色呈棕色者判定为阳性细胞。

统计学处理 实验数据采用mean±SD表示, 录入SPSS软件包, 采用两均数t检验, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 小鼠粪便性状 第45天各实验组小鼠粪便性状1-2级较对照组4-5级明显干硬。第60天各实验组小鼠粪便性状较第45天时无明显改变, 但较对照组明显干硬。

2.2 肠道碳墨推进率 第45天各实验组小鼠的肠道碳墨推进率较对照组明显减慢($P<0.01$)。第60天各实验组小鼠的肠道碳墨推进率较对照组明显减慢($P<0.01$), 且比45 d时相应实验组的肠道碳墨推进率也减慢($P<0.05$, 表1)。

2.3 免疫组化结果分析 结肠黏膜下神经丛与肌间神经丛可见丰富的深棕色颗粒, 即HO-2阳性神经纤维, 环肌和纵肌内HO-2阳性细胞较黏膜下、肌间层明显减少。各实验组阳性细胞较对照组明显减少; 大剂量吗啡处理的实验组比小剂量组阳性细胞明显少; 第60天时各实验组较第45天时各实验组HO-2阳性细胞的表达减少(图1)。

3 讨论

内源性CO和NO都是气体分子, 两者在理化性质、分子结构和生物学作用上有许多相似之处^[1]。NO作为抑制性神经递质, 其在体内的生理病理作用已得到广泛的肯定^[1]。而内源性的CO与NO一样起着抑制性神经递质的作用, 在消化系统影响胃肠运动^[1,6]; 其含量异常增多时, 胃肠道有效的推进性收缩幅度、频率减少; 其含量异常减少时, 兴奋性和抑制性神经活动失平衡, 导致胃肠道持续性剧烈地非推进性收缩幅度、频率增加, 使胃肠平滑肌不协调运动。

HO-1和HO-2都位于细胞内质网中^[7]; HO-1主要分布于单核-巨噬细胞系统(脾、肝和骨髓)及网状内皮细胞内, HO-2则主要分布于脑和胃肠道平滑肌^[8], 胃肠道的HO-2主要分布于肠黏膜下神经丛与肌间神经丛^[9], 应激能提高HO-2活性^[10-11]。

研发前沿
目前已经开始在分子水平对慢性便秘疾病进行研究, 临幊上已获得一部分成果; 小分子神经递质的研究取得了相当的成绩, 而内源性CO也为其中之一。

创新盘点
通过本实验室以吗啡构建结肠慢传输型便秘小鼠模型, 在此基础上观察内源性CO及HO的变化; 此类模型为本实验室首次应用在便秘研究上。

应用要点

本文拟说明内源性CO可能在慢传输型便秘中起的重要作用;对将来治疗慢性便秘带来新的启发和思路。

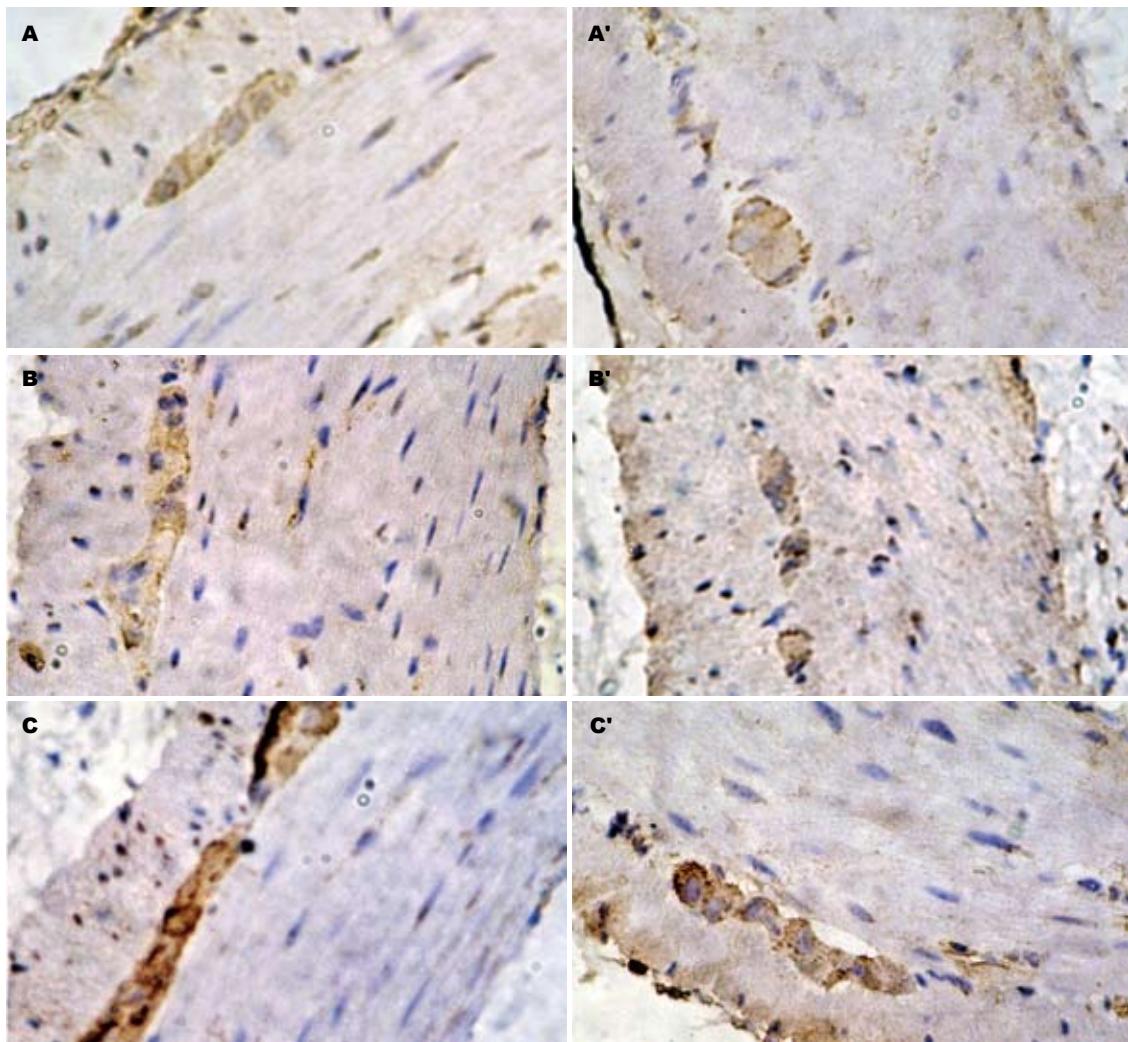


图1 小鼠近端结肠组织HO-2的表达($\times 400$). A: 实验组A1; A': 实验组A2; B: 实验组B1; B': 实验组B2; C: 对照组1; C': 对照组2.

表1 各组小鼠的肠道碳墨推进率

分组	小鼠肠道碳墨推进率(%)
对照组1	83.301 \pm 4.131
实验组A1	71.360 \pm 9.233 ^d
实验组B1	68.657 \pm 5.233 ^d
对照组2	80.260 \pm 5.510
实验组A2	64.460 \pm 5.870 ^{ad}
实验组B2	62.510 \pm 7.310 ^{ad}

^aP<0.05 vs 实验组A1, 实验组B1; ^dP<0.01 vs 对照组1, 对照组2.

本实验用吗啡诱导的小鼠结肠慢传输运动模型,根据大便性状改变及肠道推进率基本符合慢传输型便秘的临床特征^[5]。在本实验中,各实验组小鼠近端结肠组织内HO-2⁺细胞面积的表达均较对照组的明显减少,并且随着吗啡剂量的增加减少更明显,推测吗啡诱导的结肠慢传输运动小鼠其内源性CO生成减少可能导致结

肠运动异常,胃肠道内源性CO可能参与了结肠慢传输运动的发生,与NO的作用机制可能相似。而停药观察15 d后,各实验组较45 d组进一步减少,说明短期停药不能逆转吗啡诱导的结肠传输运动障碍,可能其停药时间过短发生的病理改变尚未恢复,也可能其改变为不可逆性的。

胃肠道平滑肌细胞HO-2免疫活性阴性,而其临近的ICC为阳性^[12]。肠道某些非神经细胞也表达HO-2,包括黏膜上皮细胞、血管平滑肌细胞、血管内皮细胞和ICC^[13-14]。CO在ICC与平滑肌间作为第二信使而调节胃肠运动^[15]。本实验中吗啡诱导的结肠慢传输运动小鼠近端结肠组织内HO-2的表达减少,是否与ICC自身产生减少或与ICC调节CO对胃肠平滑肌的作用减弱有关尚待进一步研究。

4 参考文献

- Xue L, Farrugia G, Miller SM, Ferris CD, Snyder SH, Szurszewski JH. Carbon monoxide and

- nitric oxide as coeurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1851-1855
- 2 McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997; 247: 725-732
- 3 Farrugia G, Miller SM, Rich A, Liu X, Maines MD, Rae JL, Szurszewski JH. Distribution of heme oxygenase and effects of exogenous carbon monoxide in canine jejunum. *Am J Physiol* 1998; 274: G350-G358
- 4 Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2004; 556: 325-336
- 5 林琳, 姜柳琴, 张红杰, 胡晔东, 林征, 王美峰, 黄峻. 结肠慢传输运动小鼠模型建立的初步探讨. 诊断学理论与实践 2006; 5: 31-34
- 6 Farrugia G, Lei S, Lin X, Miller SM, Nath KA, Ferris CD, Levitt M, Szurszewski JH. A major role for carbon monoxide as an endogenous hyperpolarizing factor in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8567-8570
- 7 Chakder S, Cao GY, Lynn RB, Rattan S. Heme oxygenase activity in the internal anal sphincter: effects of nonadrenergic, noncholinergic nerve stimulation. *Gastroenterology* 2000; 118: 477-486
- 8 Doré S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R, Hester LD, Guastella D, Snyder SH. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2445-2450
- 9 Piotrowska AP, Solari V, de Caluwé D, Puri P. Immunocalocalization of the heme oxygenase-2 and interstitial cells of Cajal in normal and aganglionic colon. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 73-77
- 10 Porcher C, Orsoni P, Berdah S, Monges G, Mazet B. Distribution of heme oxygenase 2 in nerves and c-kit(+) interstitial cells in human stomach. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 317-322
- 11 Miller SM, Reed D, Sarr MG, Farrugia G, Szurszewski JH. Haem oxygenase in enteric nervous system of human stomach and jejunum and co-localization with nitric oxide synthase. *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 121-131
- 12 Battish R, Cao GY, Lynn RB, Chakder S, Rattan S. Heme oxygenase-2 distribution in anorectum: colocalization with neuronal nitric oxide synthase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G148-G155
- 13 van Ginneken C, van Meir F, Sys S, Weyns A. Stereologic description of the changing expression of constitutive nitric oxide synthase and heme oxygenase in the enteric plexuses of the pig small intestine during development. *J Comp Neurol* 2001; 437: 118-128
- 14 Farrugia G, Miller SM, Rich A, Liu X, Maines MD, Rae JL, Szurszewski JH. Distribution of heme oxygenase and effects of exogenous carbon monoxide in canine jejunum. *Am J Physiol* 1998; 274: G350-G358
- 15 Farrugia G, Szurszewski JH. Heme oxygenase, carbon monoxide, and interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 321-324

同行评价
本课科学性明确, 层次分明, 证据充足, 结论可靠, 具有一定的学术价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

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



Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b和HMT在不同结肠癌细胞系的表达及其意义

翟荣林, 蔡开琳, 王国斌, 许飞, 田元, 张景辉

背景资料
表遗传学研究是目前国内外研究的热点之一, 回顾性的研究资料表明, 肿瘤细胞中存在异常的DNA甲基化模式, 甲基化等表遗传学修饰与癌症的发生密切相关。

翟荣林, 蔡开琳, 王国斌, 许飞, 田元, 张景辉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022
国家自然科学基金资助课题, No. 30500488
作者贡献分布: 此课题由翟荣林, 蔡开琳, 王国斌设计; 研究过程由翟荣林, 许飞, 田元及张景辉操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由田元, 张景辉提供; 数据分析由翟荣林, 蔡开琳完成; 本论文写作由翟荣林, 蔡开琳, 王国斌完成。
通讯作者: 蔡开琳, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 caikailin@yahoo.com.cn.
电话: 027-85351619
收稿日期: 2007-09-18 修回日期: 2008-01-08

Expression of Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b and HMT in different colonic cancer cell lines and its significance

Rong-Lin Zhai, Kai-Lin Cai, Guo-Bin Wang, Fei Xu, Yuan Tian, Jing-Hui Zhang

Rong-Lin Zhai, Kai-Lin Cai, Guo-Bin Wang, Fei Xu, Yuan Tian, Jing-Hui Zhang, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500488

Correspondence to: Kai-Lin Cai, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. caikailin@yahoo.com.cn

Received: 2007-09-18 Revised: 2008-01-08

Abstract

AIM: To determine the expression of DNA methyltransferase and histone methyltransferase (HMT) mRNA in different colonic cancer cell lines.

METHODS: Expression of Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b and HMT mRNA was detected in HT-29, Lovo and Caco-2 cells by RT-PCR.

RESULTS: Dnmt3b mRNA was over-expressed in HT-29 and Lovo cells, while Dnmt1 and HMT were moderately expressed and Dnmt3a was poorly expressed in colon cancer cell lines. A significant dif-

ference was found in the expression of Dnmt3b and Dnmt3a in HT-29, Lovo and Caco-2 cells.

CONCLUSION: Differentiated colon cancer cell lines may have a different epigenetic mechanism. Dnmt3b may play a vital role in the process of establishing and maintaining the DNA methylation pattern.

Key Words: DNA methyltransferases; Histone methyltransferase; Methylation; Epigenetics; Colon cancer; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Zhai RL, Cai KL, Wang GB, Xu F, Tian Y, Zhang JH. Expression of Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b and HMT in different colonic cancer cell lines and its significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 426-430

摘要

目的: 探讨不同结肠癌细胞系中表观遗传学酶谱的表达水平。

方法: RT-PCR 分别检测结肠癌细胞系 HT-29、Lovo 和 Caco-2 中 Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b 和 HMT mRNA 表达水平。

结果: Dnmt3b mRNA 在结肠癌细胞系 HT-29、Lovo 中高度表达, Dnmt1 与 HMT 次之, Dnmt3a 表达水平最低; Dnmt3b、Dnmt3a 在不同结肠癌细胞系之间的表达水平存在显著的差异。

结论: 不同分化程度的结肠癌细胞系可能存在不同的表观遗传学发生机制; Dnmt3b 在建立和维持结肠癌细胞系 DNA 甲基化模式中可能起更为重要的角色。

关键词: DNA 甲基化酶; 组蛋白甲基化酶; 甲基化; 表观遗传学; 结肠癌; 逆转录聚合酶链式反应

同行评议者
曹杰, 主任医师,
广州市第一人民医院普通外科

翟荣林, 蔡开琳, 王国斌, 许飞, 田元, 张景辉. Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b 和 HMT 在不同结肠癌细胞系的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 426-430
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/426.asp>

0 引言

基因的表遗传学修饰是一种不依赖DNA序列改变的可逆的基因表达调控过程。主要包括DNA甲基化与去甲基化、组蛋白乙酰化与脱乙酰化和组蛋白甲基化去甲基化等改变。这些可逆的表遗传学修饰可以方便地关闭和开放某些特定基因，有选择性表达基因组的信息，在维持染色体结构的稳定、基因组的完整、组织特异性基因的表达调节、胚胎发育、基因组印记、女性X染色体失活、细胞分化和个体成长等过程中发挥着至关重要的作用^[1-3]。回顾性的研究资料也表明，肿瘤细胞中存在异常的DNA甲基化模式：基因组整体甲基化水平降低，导致遗传不稳定性增加；组织特异性基因的启动子区域出现从头甲基化；原癌基因多为低甲基化或不充分甲基化，低甲基化使原癌基因活化，导致重新开放或异常表达，形成突变热点，增加染色体的不稳定性；某些调控细胞生长分化的基因和抑癌基因启动子因异常甲基化而失活关闭^[4-6]。这些都提示我们，甲基化等表遗传学修饰与癌症的发生密切相关^[7]。甲基化必然离不开甲基化酶的催化作用^[8]，Dnmt1, Dnmt3a和Dnmt3b的过度表达在很多恶性肿瘤中都有报道^[9-10]，本文分析比较了不同结肠癌细胞系中表遗传学酶谱的表达水平，为进一步研究结肠癌表观遗传学发生机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM(Hyclone), 胎牛血清(Gibco), TRIzol(武汉晶美), 逆转录酶Superscript II (Invitrogen), RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit(MBI Fermentas), PCR仪(Rotor Gene 3000), PCR引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 结肠癌细胞株体外培养：结肠癌细胞株HT-29、Lovo、Caco-2培养于高糖型DMEM+100 mL/L胎牛血清。在pH7.4、37℃、50 mL/L CO₂培养箱中孵育。每天观察细胞生长状况,每2 d换液,每3-4 d传代。

1.2.2 RT-PCR检测Dnmnts、HMT基因mRNA表达情况：收集HT-29、Lovo、Caco-2细胞，采用TRIzol分别抽提各种细胞的总RNA，以人18 S rRNA为内参照，行逆转录PCR扩增。15 g/L琼脂糖凝胶电泳分别检测各自扩增产物，凝胶成像分析系统进行半定量分析，以目的基因与内参的灰度比代表mRNA表达丰度。反应条件：94℃

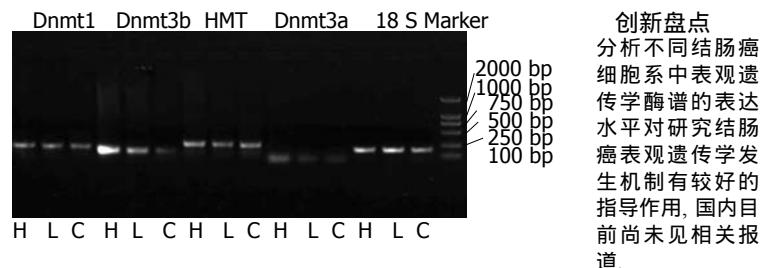


图 1 RT-PCR检测不同结肠癌细胞系中Dnmnts与HMT mRNA表达水平. H: HT-29; L: Lovo; C: Caco-2; 18 S: 18 S rRNA内参; Marker: DNA分子量标准.

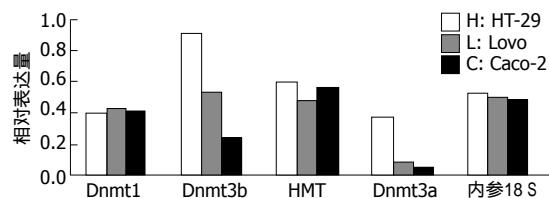


图 2 Dnmnts与HMT mRNA在不同结肠癌细胞系中的相对表达量.

预变性5 min, 94℃变性30 s, Tm退火45 s, 72℃延伸30 s, 72℃终末延伸7 min, 共进行45个循环。引物序列及Tm值见表1。

统计学处理 各组实验数据之间的比较采用方差分析t检验。 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 不同酶在结肠癌细胞系中的表达情况 不同酶之间，从头甲基化酶Dnmt3b mRNA在结肠癌细胞系HT-29中呈现高度表达，维持甲基化酶Dnmt1与组蛋白甲基化酶HMT次之，从头甲基化酶Dnmt3a mRNA在结肠癌细胞系中的表达水平最低($P<0.05$, 图1, 图2)。这表明不同的DNA甲基化酶在建立和维持DNA甲基化过程中的作用和份量不同，Dnmt3b在结肠癌形成中可能扮演更为重要的角色。

2.2 不同结肠癌细胞系中酶的表达情况 不同细胞之间，维持甲基化酶Dnmt1与组蛋白甲基化酶HMT的mRNA表达水平没有显著差异，从头甲基化酶Dnmt3b、Dnmt3a mRNA表达水平存在明显的差异($P<0.05$)。HT-29细胞中Dnmt3b呈现为高度表达，Lovo和Caco-2细胞中Dnmt3b则为中低度表达；Dnmt3a也是如此，在HT-29中表现为中度表达水平，在Lovo和Caco-2中则几乎不表达($P<0.05$, 图1, 图2)。HT-29为高分化的结肠癌细胞株，呈上皮细胞样，Caco-2为中分化结肠癌细胞，Lovo则为未分化，Dnmt3b和Dnmt3a在HT-29、Lovo和Caco-2细胞中不同表达水平提示，不同类型与分化程度的结肠癌细胞系可

创新盘点
分析不同结肠癌细胞系中表观遗传学酶谱的表达水平对研究结肠癌表观遗传学发生机制有较好的指导作用，国内目前尚未见相关报道。

应用要点
表遗传学酶谱作为甲基化等表遗传学修饰的决定因素, 对其的研究和调控在结直肠肿瘤的靶向化疗方面具有潜在的临床应用价值.

表 1 RT-PCR检测引物序列表

Gene	accession no.	Primer sequence	Position	Tm(°C)	Products
Dnmt1	NM_001379	5'-TCCACAGTGTCACAGAGG-3'	3787-4013	54.0	227 bp
		5'-CGGTAGTAGTCGCAGTAGC-3'			
Dnmt3a	NM_175629	5'-GAAGCGGGCAAAGAACAG-3'	780-1024	52.7	245 bp
		5'-TCTTCCACAGCATTCATTCAATTCC-3'			
Dnmt3b	NM_006892	5'-GCTCTTACCTTACCATCG-3'	809-937	48.2	165 bp
		5'-GATACTCTGAACCTGTCTCC-3'			
HMT	NM_024757	5'-TCATCAGTCGCTACCTCAGAAC-3'	749-1023	57.3	275 bp
		5'-AGTCCATCTCCAGGCTCTCC-3'			
18S	M10098	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	551-750	60.0	200 bp
		5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'			

能存在着迥然不同的表观遗传学发生机制, Dnmt3b、Dnmt3a尤其在分化程度良好的结肠癌细胞株中表现为高表达状态(与在正常结肠上皮中的表达水平类似), 而在分化不良或未分化的癌细胞中表现为中低表达水平.

3 讨论

Dnmt1的正确表达和阶段特异性的翻译后调节, 是维持胚胎正常DNA甲基化模式和顺利发育所不可或缺的^[1]. Dnmt1、Dnmt3a、3b这三个基因在几乎所有的正常组织中均呈现广泛的共同表达, 在肿瘤组织中则为过度表达^[9]. Dnmt1高表达是甲基化的重要因素之一, 与CpG岛甲基化紊乱有关, Dnmt1高表达总是伴有总基因组DNA低甲基化和癌基因低甲基化或抑癌基因高甲基化^[11-12]; RNA干扰抑制Dnmt1表达后RASSF1A和p16等肿瘤相关基因启动子发生去甲基化而重新表达^[13], Dnmt1基因敲除则与染色质不稳定性密切相关^[14]. 与结肠黏膜和良性病变相比, 结肠癌组织Dnmt1和Dnmt3a表达显著增高, 结直肠癌的表遗传学调节是通过甲基化活性增强而不是去甲基化活性减弱来实现的^[9]. 有研究表明, Dnmt1蛋白在胃癌和结直肠癌患者中的表达与年龄、性别不相关, 与肿瘤分化程度显著相关^[15-16]. Girault *et al*^[17]检测130例乳腺癌中Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b的mRNA表达情况, 结果显示Dnmt3b的表达量最高, 而Dnmt1、Dnmt3a表达丰度较低. 我们的研究也发现, 结肠癌细胞株HT-29中Dnmt3b mRNA表现为高表达, Dnmt1和Dnmt3a则分别为中低度表达. 不过也有报道认为, 结肠癌组织中DNA甲基化酶与CpG岛的甲基化并不相关^[18-19], 说明基因启动子的甲基化过

程有多种蛋白和机制参与.

尽管在哺乳动物中, Dnmt1的主要功能被认为是维持甲基化, 而Dnmt3a和Dnmt3b的功能主要是从头甲基化, 有研究却表明这三个酶很可能共同参与、协同作用于维持和建立DNA甲基化模式的过程^[20-22]. Dnmt1和Dnmt3a同时起作用时, 表现出近5倍的相比于各自单独作用的甲基化酶活性, Dnmt3a始发启动从头甲基化后, 半甲基化DNA底物激活Dnmt1完成后续的从头甲基化修饰, 两者在从头甲基化过程中发挥协同作用^[20]. Hsieh^[21]分析比较了Dnmt1和Dnmt3a的作用发现, Dnmt1可以催化基因组上瞬时出现的单链DNA(如复制起始区)的局部位点发生从头甲基化并向周围扩布, 也可以被甲基化的CpG岛底物所激活. 而Dnmt3a则不能催化单链DNA底物发生甲基化, 也不被甲基化的CpG岛所激活. 这表明尽管两者都具有从头甲基化活性, 但是作用机制却是完全不同的. 在从头甲基化过程中Dnmt3a扮演启动始发的作用, 他启动双链DNA中的其中一条链发生从头甲基化, 形成的半甲基化位点激活Dnmt1完成后续的从头甲基化和维持甲基化修饰. 深入研究发现, Dnmt1可以催化未修饰的DNA发生甲基化, 他的从头甲基化活性是通过甲基化的DNA结合到Dnmt1酶位于N端的变构位点上而被激活的^[23-24].

Rhee *et al*^[25]通过同源重组将Dnmt1基因敲除后发现, 结肠癌细胞DNA甲基转移酶活性明显下降, 然而基因组甲基化程度却只下降了20%左右, p16等很多基因仍处于甲基化致转录失活的状态. Dnmt1与Dnmt3b的共同灭活则几乎消除了甲基化转移酶的活性, 基因组DNA甲基化程度减少了95%以上, p16基因重新表达, 肿瘤

细胞生长受到抑制^[26]. Leu *et al*^[27]应用RNAi下调Dnmt1和Dnmt3b在卵巢癌细胞CP70中的表达水平后发现, 单独抑制Dnmt1能部分消除目的基因(TWIST, RASSF1A, HIN-1)的高甲基化状态并诱导表达, 单独下调Dnmt3b的去甲基化和转录激活效应非常小, 但同时下调这两个酶却能明显增加去甲基化效应, 目的基因的表达增加7-15倍. Ting *et al*^[28]的研究也表明, 即使采用RNA干扰技术下调人结肠癌细胞中Dnmt1基因的表达, 细胞基因组CpG岛甲基化模式仍然能够得以维持. 正反两方面的资料告诉我们, Dnmt不同成员在细胞中并不单独发挥作用, 他们在维持DNA甲基化和基因甲基化致沉默过程中协同作用, 共同发挥生物学效应. 此外, DNA甲基化酶(Dnmt)与组蛋白甲基化酶(HMT)之间也可能存在着协同作用^[29-30], DNA CpG岛甲基化与组蛋白H3-K9甲基化在异染色质形成与基因沉默过程中共同发挥作用, 新发现的组蛋白甲基化酶(HMT)SETDB1/ESET与DNA甲基化酶尤其是从头甲基化酶Dnmt3a和Dnmt3b之间在功能上有密切的关联, 而与维持甲基化酶Dnmt1之间没有关系^[31]. 然而Espada *et al*^[32]的研究却发现, Dnmt1在维持组蛋白H3位点正常甲基化和乙酰化模式方面发挥重要的作用. 对此有待进一步的研究.

总之, 我们的研究发现, Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b和HMT在结肠癌细胞系中呈现不等的表达水平, Dnmt3a、Dnmt3b在分化良好的结肠癌细胞系中呈现过度表达状况, 而在分化不良或未分化的癌细胞则被抑制表达. 这提示表遗传学酶谱之间在建立和维持DNA甲基化过程中的作用和份量可能并不相同, 不同分期与分化程度的结肠癌细胞系可能存在着不同的表观遗传学发生机制. 此外, 既然癌基因低甲基化与抑癌基因高甲基化在恶性肿瘤组织中是个普遍事件, 那么对在甲基化过程中发挥枢纽作用的甲基化酶的研究必然为结肠癌等肿瘤的防治提供了一个重要的靶点和方向. 下一步我们将在此实验资料基础上通过对特定基因的调控来进一步研究结肠癌表观遗传学发生机制.

4 参考文献

- 1 Chung YG, Ratnam S, Chaillet JR, Latham KE. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos. *Biol Reprod* 2003; 69: 146-153
- 2 Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69: 915-926
- 3 Turek-Plewa J, Jagodziński PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10: 631-647
- 4 Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042-2054
- 5 Cui H, Cruz-Correia M, Giardiello FM, Hutzcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, Wu Y, He X, Powe NR, Feinberg AP. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003; 299: 1753-1755
- 6 Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293: 1068-1070
- 7 Luczak MW, Jagodzinski PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytophisiol* 2006; 44: 143-154
- 8 Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2395-2402
- 9 Schmidt WM, Sedivy R, Forstner B, Steger GG, Zöchbauer-Müller S, Mader RM. Progressive up-regulation of genes encoding DNA methyltransferases in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Mol Carcinog* 2007; 46: 766-772
- 10 Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 2291-2298
- 11 Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2571-2587
- 12 Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 2003; 33: 61-65
- 13 Suzuki M, Sunaga N, Shames DS, Toyooka S, Gazdar AF, Minna JD. RNA interference-mediated knockdown of DNA methyltransferase 1 leads to promoter demethylation and gene re-expression in human lung and breast cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3137-3143
- 14 Karpf AR, Matsui S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 8635-8639
- 15 Zhu YM, Huang Q, Lin J, Hu Y, Chen J, Lai MD. Expression of human DNA methyltransferase 1 in colorectal cancer tissues and their corresponding distant normal tissues. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 661-666
- 16 Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol* 2004; 164: 689-699
- 17 Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bièche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4415-4422
- 18 Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg PV, Laird PW. CpG island

同行评价
本文选题新颖, 资料合适, 数据可靠, 结论客观, 文章的科学性、创新性和可读性较好的反映了我国结肠癌表现遗传学基础研究的先进水平.

- hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res* 1999; 59: 2302-2306
- 19 Oue N, Kuraoka K, Kuniyasu H, Yokozaki H, Wakikawa A, Matsusaki K, Yasui W. DNA methylation status of hMLH1, p16(INK4a), and CDH1 is not associated with mRNA expression levels of DNA methyltransferase and DNA demethylase in gastric carcinomas. *Oncol Rep* 2001; 8: 1085-1089
- 20 Fatemi M, Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *Eur J Biochem* 2002; 269: 4981-4984
- 21 Hsieh CL. The de novo methylation activity of Dnmt3a is distinctly different than that of Dnmt1. *BMC Biochem* 2005; 6: 6
- 22 Gowher H, Stockdale CJ, Goyal R, Ferreira H, Owen-Hughes T, Jeltsch A. De novo methylation of nucleosomal DNA by the mammalian Dnmt1 and Dnmt3A DNA methyltransferases. *Biochemistry* 2005; 44: 9899-9904
- 23 Araujo FD, Croteau S, Slack AD, Milutinovic S, Bigey P, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M, Szyl M. The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus. *J Biol Chem* 2001; 276: 6930-6936
- 24 Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, Jeltsch A. The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol* 2001; 309: 1189-1199
- 25 Rhee I, Jair KW, Yen RW, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, Vogelstein B, Baylin SB, Schuebel KE. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 2000; 404: 1003-1007
- 26 Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416: 552-556
- 27 Leu YW, Rahmatpanah F, Shi H, Wei SH, Liu JC, Yan PS, Huang TH. Double RNA interference of DNMT3b and DNMT1 enhances DNA demethylation and gene reactivation. *Cancer Res* 2003; 63: 6110-6115
- 28 Ting AH, Jair KW, Suzuki H, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE. CpG island hypermethylation is maintained in human colorectal cancer cells after RNAi-mediated depletion of DNMT1. *Nat Genet* 2004; 36: 582-584
- 29 Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Chen Y, Mazumdar M, Heale JT, Schmiesing JA, Kim W, Yokomori K, Zhao Y, Robertson KD. Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 2716-2729
- 30 Kang MY, Lee BB, Kim YH, Chang DK, Kyu Park S, Chun HK, Song SY, Park J, Kim DH. Association of the SUV39H1 histone methyltransferase with the DNA methyltransferase 1 at mRNA expression level in primary colorectal cancer. *Int J Cancer* 2007; 121: 2192-2197
- 31 Li H, Rauch T, Chen ZX, Szabó PE, Riggs AD, Pfeifer GP. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 19489-19500
- 32 Espada J, Ballestar E, Fraga MF, Villar-Garea A, Juarranz A, Stockert JC, Robertson KD, Fuks F, Esteller M. Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *J Biol Chem*. 2004; 279: 37175-37184

编辑 师忠芳 电编 何基才

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与，包括：(1)酝酿和设计实验，(2)采集数据，(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写，包括：(1)起草文章，(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持，包括：(1)统计分析，(2)获取研究经费，(3)行政、技术或材料支持，(4)指导，(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条，才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。



血管内皮生长因子C与其受体在食管鳞癌中的表达及临床意义

刘鹏飞, 刘兵团, 沈卫东, 施瑞华, 朱宏

刘鹏飞, 刘兵团, 沈卫东, 东南大学医学院附属江阴医院消化内科 江苏省江阴市 214400
施瑞华, 朱宏, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029
作者贡献分布: 刘鹏飞与施瑞华对本文所作贡献均等; 此课题由刘鹏飞、施瑞华、沈卫东、刘兵团及朱宏设计; 研究过程由刘兵团、沈卫东、朱宏完成; 研究所用新试剂及分析工具由刘兵团提供; 数据分析由刘鹏飞、刘兵团、沈卫东完成; 本论文写作由刘鹏飞、刘兵团、沈卫东及朱宏完成。
通讯作者: 刘鹏飞, 214400, 江苏省江阴市寿山路163号, 东南大学医学院附属江阴医院消化内科。jylpf@163.com
电话: 0510-86879102 传真: 0510-86871307
收稿日期: 2007-11-12 修回日期: 2008-01-14

Expression of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in esophageal squamous carcinoma tissues and its clinical significance

Peng-Fei Liu, Bing-Tuan Liu, Wei-Dong Shen,
Rui-Hua Shi, Hong Zhu

Peng-Fei Liu, Bing-Tuan Liu, Wei-Dong Shen, Department of Gastroenterology, Affiliated Jiangyin Hospital of Southeast University, Jiangyin 214400, Jiangsu Province, China
Rui-Hua Shi, Hong Zhu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Peng-Fei Liu, Department of Gastroenterology, Affiliated Jiangyin Hospital of Southeast University, 163 Shoushan Road, Jiangyin 214400, Jiangsu Province, China. jylpf@163.com

Received: 2007-11-12 Revised: 2008-01-14

Abstract

AIM: To investigate the expression of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and its receptor VEGFR-3 in esophageal squamous carcinoma and para-tumorous tissue samples and the relationship between VEGF-C and VEGFR-3.

METHODS: Expression of VEGF-C and VEGFR-3 was tested by immunohistochemistry in 37 esophageal squamous carcinoma and 12 para-tumorous tissue samples. The number of stained lymphatic vessels in VEGFR-3 positive tissue samples was recorded.

RESULTS: The positive expression rate of VEGF-C was 43.24% in esophageal carcinoma tissue samples (16/37), which was much higher than that in para-tumorous tissue samples (7.69%, $P < 0.05$) and correlated to lymph node metastasis and depth of tumor invasion ($P = 0.000$, $P = 0.026$), but not to the patient age, tumor size or differentiation. Immunohistochemistry showed that the mean number of VEGFR-3 in stained lymphatic vessels of the VEGF-C positive group was higher than that in the VEGF-C negative group ($5.50 \pm 1.37/\text{HPF}$ vs $2.81 \pm 1.12/\text{HPF}$, $P < 0.05$). The mean number of VEGFR-3 in stained lymphatic vessels in patients with lymph node metastasis was higher than that in those without metastasis ($5.60 \pm 1.45/\text{HPF}$ vs $2.86 \pm 1.04/\text{HPF}$, $P < 0.001$).

背景资料
VEGF-C在多种肿瘤组织和细胞株中都有表达, VEGF-C及其受体VEGFR-3的结合可以参与胃癌等多种肿瘤的淋巴管的形成, 但是二者在食管癌湿润、转移过程中所起的作用有待进一步研究。

CONCLUSION: The positive expression rate of VEGF-C is higher in carcinoma tissue samples than in para-tumorous tissue samples. Expression of VEGF-C is closely related with lymph node metastasis and depth of tumor invasion. VEGF-C and VEGFR-3 may promote the growth of canalis haemalis and metastasis of esophageal squamous carcinoma.

Key Words: Vascular endothelial growth factor-C; Vascular endothelial growth factor-receptor; Esophageal squamous carcinoma; Immunohistochemistry

Liu PF, Liu BT, Shen WD, Shi RH, Zhu H. Expression of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in esophageal squamous carcinoma tissues and its clinical significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 431-435

摘要

目的: 研究血管内皮生长因子C(VEGF-C)及其受体VEGFR-3在食管鳞癌组织和癌旁组织中的表达, 并分析他们与肿瘤病理分级、淋巴结转移等临床病理特征之间的关系。

方法: 运用免疫组织化学法检测37例食管鳞癌组织和12例癌旁组织中VEGF-C和VEGFR-3的表达情况, 并对阳性表达

同行评议者
王健生, 副教授,
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

研发前沿
近年来人们对VEGF-C和VEGFR-3与肿瘤的研究文献较多，并且发现他们是胃癌等多种肿瘤淋巴结转移的重要指标，但在食管鳞癌中的报道较少，且其具体机制尚不完全清楚，今后研究的重点是进一步探究二者介导肿瘤转移的确切机制。

VEGFR-3的组织进行染色管腔计数。

结果：37例食管鳞癌组织和12例癌旁组织中VEGF-C的阳性表达率分别为43.24%(16/37)和7.69%(1/12)，二者有显著性差异($P<0.05$)。在肿瘤组织中VEGF-C的表达与淋巴结转移和肿瘤浸润深度显著相关($P=0.000, P=0.026$)，而与患者年龄、肿瘤大小和肿瘤分级无明显相关性；VEGF-C阳性组的VEGFR-3染色脉管计数较VEGF-C阴性组高，二者有明显相关性($5.50\pm1.37/\text{HPF}$ vs $2.81\pm1.12/\text{HPF}, P<0.05$)；淋巴结转移组VEGFR-3阳性染色脉管计数较无转移组的计数高($5.60\pm1.45/\text{HPF}$ vs $2.86\pm1.04/\text{HPF}, P<0.001$)。

结论：VEGF-C在食管鳞癌组织中的表达明显高于癌旁组织，且与淋巴结转移和肿瘤浸润深度有相关性。VEGF-C和VEGFR-3可能介导食管鳞癌中脉管的生成，并参与肿瘤的淋巴结转移。

关键词：血管内皮生长因子C；血管内皮生长因子受体3；食管鳞癌；免疫组织化学

刘鹏飞，刘兵团，沈卫东，施瑞华，朱宏. 血管内皮生长因子C与其受体在食管鳞癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 431-435
<http://www.wjnet.com/1009-3079/16/431.asp>

0 引言

食管癌是我国常见恶性肿瘤之一，发病率高，预后较差，鳞癌为其主要病理类型，发生淋巴结转移是造成预后不佳的主要原因之一。研究认为，血管内皮生长因子C(VEGF-C)及其受体VEGFR-3的结合可以参与胃癌等多种肿瘤的淋巴管的形成^[1-4]，参与淋巴结转移^[5-7]，但对于二者在食管癌组织中表达的研究较少。本研究即应用免疫组化法检测了37例食管鳞癌组织中VEGF-C和VEGFR-3的表达，旨在探讨二者在食管癌发生、发展和淋巴管生成中的作用及其与食管癌临床病理特征之间的关系，从而为食管癌的临床诊断以及判断预后提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 37例食管鳞癌、12例癌旁组织标本取自2005-09/2007-06经江苏省人民医院和江阴市人民医院病理科组织病理学证实，患者年龄36-80(平均年龄58)岁，男27例，女10例，其中发生淋巴结转移的有15例。山羊抗人VEGF-C抗体购自R&D公司，兔抗人VEGFR-3抗体购自

CHEMICON公司，S-P免疫组化试剂盒及DAB染色试剂盒购自福州迈新生物技术公司。

1.2 方法 免疫组织化学法按朱宏 *et al*^[8] 报道方法操作，本实验以PBS液代替一抗作为阴性对照。VEGF-C免疫组化染色结果的判断：在放大200倍视野下，每张切片观察5个视野，根据染色程度和染色细胞百分比进行评分。染色程度：基本不着色为0级；着色呈淡黄色为1级；着色呈黄色为2级；着色呈棕褐色为3级。染色阳性细胞百分比：着色阳性细胞占计数细胞<5%为0级；6%-25%为1级；26%-50%为2级；超过51%为3级。将染色程度分级与着色细胞百分比分级相乘，乘积大于4者为阳性表达，0-3者为阴性表达^[9]。VEGFR-3免疫组化染色结果判断：首先低倍镜下确定脉管着色最密集区(热区)，然后在高倍视野(high power field, HPF)下计数5个高倍视野中阳性脉管密度，取均数作为淋巴管数。

统计学处理 应用SPSS10.0统计软件包进行统计分析，运用 χ^2 检验、*t*检验及Fisher确切概率法统计。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

VEGF-C主要定位于肿瘤细胞质内(图1A-B)，37例食管癌组织中VEGF-C的阳性表达率为43.24%(16/37)，12例癌旁组织的阳性表达率为7.69%(1/12)，二者有显著性差异($P<0.05$)。肿瘤组织中VEGF-C的表达与淋巴结转移和肿瘤浸润深度显著相关($P<0.05$)，与年龄、肿瘤大小、肿瘤分级和肿瘤位置等无明显相关性(表1)；根据S-P法免疫组化的结果我们还发现，在VEGF-C表达阳性的16例肿瘤组织中VEGFR-3阳性脉管的平均计数为($5.50\pm1.37/\text{HPF}$)，显著高于VEGF-C阴性组织($2.81\pm1.12/\text{HPF}$)，二者有明显相关性($P<0.05$ ，图1C)。淋巴结转移组VEGFR-3阳性染色脉管计数($5.60\pm1.45/\text{HPF}$)与无转移组的计数($2.86\pm1.04/\text{HPF}$)有显著性差异($P<0.001$)。

3 讨论

食管癌是严重危害人民生命安全的疾病，在我国发生率高，手术为主要治疗手段，但手术切除率较低，术后复发率高，预后较差。目前认为，食管癌发生淋巴结转移是造成预后不佳的主要原因之一，因此研究肿瘤细胞淋巴管转移有重要的临床意义。

人类VEGF基因位于染色体6p21.3上，全长24 kb，编码VEGF的基因长约14 kb，有

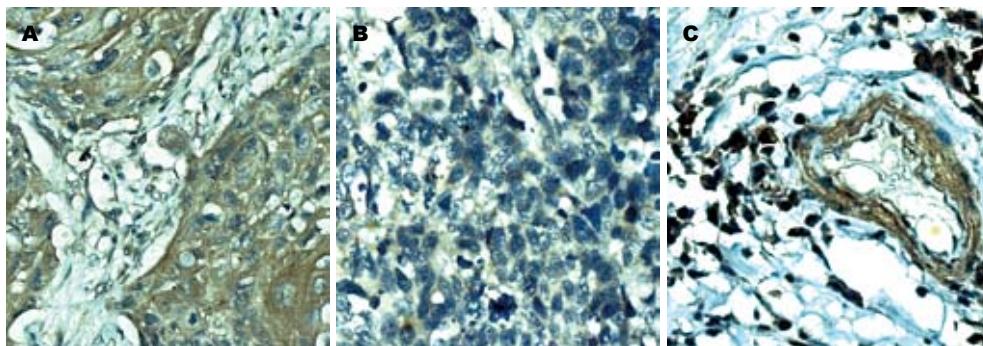


图 1 食管鳞癌组织及癌旁组织VEGF-C的表达(DAB染色×400). A: 食管鳞癌组织VEGF-C的表达; B: 癌旁组织VEGF-C的表达; C: 食管鳞癌组织脉管内皮细胞中VEGFR-3的表达.

表 1 VEGF-C的表达与临床病理特征之间的关系

临床特征	n	VEGF-C		χ^2	P值
		+	-		
年龄					
50	29	12	17		
< 50	8	4	4	-	0.705
性别					
男	27	10	17		
女	10	6	4	-	0.274
肿瘤大小					
5 cm	10	5	5		
< 5 cm	27	11	16	-	0.716
浸润深度					
有浆膜浸润	20	12	8		
无浆膜浸润	17	4	13	4.98	0.026
淋巴结转移情况					
有转移	15	12	3		
无转移	22	4	18	13.89	0.000
分化程度					
-	24	10	14		
	13	6	7	0.069	0.793
肿瘤位置					
上段	6	2	4		
中段	19	8	11	0.473	0.793
下段	12	6	6		

VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和PIGF等五种亚型, 目前认为VEGF与肿瘤的血管和淋巴管等生成有密切的关系^[10]. VEGF-C是Joukov *et al*^[11]最先在前列腺PC-3细胞系中提纯出来, 目前被认为是淋巴管生长因子之一, 在促进淋巴管内皮细胞的增殖过程中发挥重要作用^[12], 其受体主要是位于内皮细胞膜上的VEGFR-2(KDR)和VEGFR-3(Flt4), 其中VEGF-C对VEGFR-3的亲和能力较VEGFR-2高得多, 主要参与淋巴管生成. 近年研究发现VEGF-C在多种恶性肿瘤如乳腺癌、甲状腺癌等都高表达,

且与淋巴结转移有一定相关性^[3,13-17], 并影响患者的预后^[18]. Wang *et al*^[19]发现胃癌患者的血浆VEGF-C水平和淋巴管密度与肿瘤的淋巴管转移及其患者的预后有关. 有人发现在肿瘤边缘生长旺盛的部分VEGF的表达强度高于中心位置^[20], 原因尚不清楚. Kitadai *et al*^[21]用RT-PCR法检测食管鳞癌中VEGF-C mRNA的表达, 发现66.7%的食管癌表达而正常食管黏膜无表达, 并发现在5种食管癌细胞株中有4种表达. 有人研究了食管鳞癌中VEGF-C和P53的表达, 发现二者与肿瘤的淋巴结转移有相关性^[22].

VEGFR-3即血管内皮生长因子受体3, 在胚胎时期, 它主要表达于淋巴管从胚胎静脉发芽处, 在胚胎后期以及出生以后则主要表达在淋巴管内皮细胞. 他是目前发现的淋巴管生成的主要受体, 也是淋巴管较为特异的标志物^[23], Valtola *et al*^[24]发现在正常乳腺组织和乳腺癌组织内的淋巴管内皮细胞皆有VEGFR-3的高表达. Roberts *et al*^[25]的动物实验研究显示VEGFR-3可以介导乳腺癌的淋巴转移和肺转移, 而通过对其抑制可以降低转移风险. 有研究发现, VEGF-C可以和VEGFR-3结合并使受体自身磷酸化, 引起淋巴内皮细胞的增殖, 促进淋巴管生成^[26]. VEGF-C和VEGFR-3对肿瘤转移的诱导作用已经在多种肿瘤中发现^[27-29].

实验结果显示, 37例食管鳞癌组织中16例VEGF-C表达阳性, 阳性率为43.24%, 明显高于癌旁组织表达(7.69%, P<0.05). 提示VEGF-C可能与肿瘤的发生有一定相关性. 同时我们也研究了VEGF-C与食管鳞癌临床病理特征之间的关系, 发现VEGF-C的表达与淋巴结转移和浸润深度相关, 已发生淋巴结转移或浸润已达到浆膜层的组织VEGF-C表达高(P<0.05), 表明其表达可能与食管癌的浸润、转移有一定相关性, 这与Kitadai的研究结果基本一致^[21]. 本研究未发

相关报道
Skobe *et al*^[2]发现VEGF-C能够介导乳腺癌的转移, Sergio Dias *et al*^[3]研究发现VEGF-C通过与其受体FLT-4(即VEGFR-3)的结合能够促进和增强白血病细胞的增殖、存活和对化疗的抵抗力.

应用要点

本文对食管鳞癌组织中VEGF-C和VEGFR-3联合检测,发现二者具有相关性,并且是食管鳞癌浸润、转移的一项重要指标,可为以后的临床应用提供参考。

现VEGF-C与患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤分化程度和肿瘤位置等临床病理特征之间有明显相关性。我们对肿瘤组织中VEGFR-3染色阳性的淋巴管进行计数,并将其进行统计分析,发现VEGF-C阳性组染色淋巴管计数较VEGF-C阴性组高,二者有统计学差异($P<0.05$),提示VEGF-C与VEGFR-3之间有相关性,且发生淋巴结转移组的VEGFR-3计数较未发生转移组的计数要高,提示VEGF-C可能通过激活食管癌淋巴管内皮细胞膜上的受体VEGFR-3引起淋巴管增生,从而促进肿瘤的转移。

我们通过对食管鳞癌组织中VEGF-C和VEGFR-3的联合检测,发现他们是浸润、转移情况的一项重要指标,具有一定的临床应用前景。但目前对VEGF-C和VEGFR-3作用于肿瘤的确切机制尚不完全清楚,需要进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192-198
- 2 Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 211-220
- 3 Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 2002; 99: 2179-2184
- 4 Liu XE, Sun XD, Wu JM. Expression and significance of VEGF-C and FLT-4 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 352-355
- 5 Li L, Liu Q, Dong P. The expression and role of VEGF-C and its receptor FLT-4 in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma metastasis. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2005; 19: 845-849
- 6 Tanigaki Y, Nagashima Y, Kitamura Y, Matsuda H, Mikami Y, Tsukuda M. The expression of vascular endothelial growth factor-A and -C, and receptors 1 and 3: correlation with lymph node metastasis and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2004; 14: 389-395
- 7 Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G, Matsumura T. Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003; 39: 391-396
- 8 朱宏, 施瑞华, 张国新, 凌亭生, 郝波, 张智弘, 张伟明. 食管鳞癌发生过程中缺氧诱导因子1 α 和血管内皮生长因子的表达变化. 中华消化杂志 2004; 24: 755-756
- 9 杨杨, 张国新, 施瑞华, 林艳, 郝波, 王晓勇, 王宏娣, 黄祖瑚. 人宫颈癌基因蛋白在人肝细胞癌中的表达及其临床意义. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 223-224
- 10 段伦喜, 钟德午, 胡辅珍, 赵华, 易文君, 华颂文. 胃癌中VEGF, F1t1和P53的表达意义. 中国现代医学杂志 2004; 14: 38-41
- 11 Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; 15: 290-298
- 12 Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1997; 188: 96-109
- 13 Krzystek-Korpaczka M, Matusiewicz M, Diakowska D, Grabowski K, Blachut K, Kustrzeba-Wojcicka I, Banas T. Serum midkine depends on lymph node involvement and correlates with circulating VEGF-C in oesophageal squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2007; 12: 403-413
- 14 Siironen P, Ristimaki A, Narko K, Nordling S, Louhimo J, Andersson S, Haapiainen R, Haglund C. VEGF-C and COX-2 expression in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 465-473
- 15 Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, Chen HY, Hung MC, Kuo ML. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* 2007; 96: 541-545
- 16 Yu XM, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Leung P, Luk JM. Increased expression of vascular endothelial growth factor C in papillary thyroid carcinoma correlates with cervical lymph node metastases. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8063-8069
- 17 Kondo K, Kaneko T, Baba M, Konno H. VEGF-C and VEGF-A synergistically enhance lymph node metastasis of gastric cancer. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 633-637
- 18 Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Tsukiyama A, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up. *Mod Pathol* 2003; 16: 309-314
- 19 Wang TB, Deng MH, Qiu WS, Dong WG. Association of serum vascular endothelial growth factor-C and lymphatic vessel density with lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1794-1797; discussion 1797-1798
- 20 傅玉峰, 丁炯. VEGF的表达与胃癌生物学特性的实验研究. 南京医科大学学报(自然科学版) 2006; 26: 749-752
- 21 Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, Matsutani N, Yasui W, Chayama K. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93: 662-666
- 22 Han U, Can OI, Han S, Kayhan B, Onal BU. Expressions of p53, VEGF C, p21: could they be used in preoperative evaluation of lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma? *Dis Esophagus* 2007; 20: 379-385
- 23 Damasio H. A computed tomographic guide to the identification of cerebral vascular territories. *Arch Neurol* 1983; 40: 138-142
- 24 Valtola R, Salven P, Heikkila P, Taipale J, Joensuu H, Rehn M, Pihlajaniemi T, Weich H, deWaal R, Alitalo K. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J*

- Pathol 1999; 154: 1381-1390
- 25 Roberts N, Kloos B, Cassella M, Podgrabska S, Persaud K, Wu Y, Pytowski B, Skobe M. Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res* 2006; 66: 2650-2657
- 26 Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 5598-5605
- 27 Da MX, Wu XT, Wang J, Guo TK, Zhao ZG, Luo T, Zhang MM, Qian K. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-C correlates with lymphangiogenesis and lymphatic invasion in human gastric cancer. *Arch Med Res* 2008; 39: 92-99
- 28 Takizawa H, Kondo K, Fujino H, Kenzaki K, Miyoshi T, Sakiyama S, Tangoku A. The balance of VEGF-C and VEGFR-3 mRNA is a predictor of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2006; 95: 75-79
- 29 Clarijs R, Schalkwijk L, Ruiter DJ, de Waal RM. Lack of lymphangiogenesis despite coexpression of VEGF-C and its receptor Flt-4 in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1422-1428
- 30 胡绍毅, 马惠文, 边志衡, 何建明, 梁后杰. 食管鳞癌 VEGF-C的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2005; 13: 94-96

同行评价
本文的科学性、创新性和可读性能较好地反映我国食管鳞癌转移研究的水平.

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

世界华人消化杂志个性化服务订购活动

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

1 精彩专家述评专辑印刷版杂志

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

2 WCJD电子杂志

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

3 WCJD网络版杂志

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

4 WCJD印刷版杂志

WCJD印刷版1-36期. 定价: 864元/年.

5 订购信息

邮政编码, 姓名, 地址, 部门, 机构名称, E-mail, 手机号.

6 汇款的方式

邮局汇款: 世界胃肠病学杂志社收, 100023, 北京市2345信箱. 附言注明订购的内容.

银行汇款: 户名: 北京百世登生物医学科技有限公司; 开户银行: 中国工商银行北京商务中心区支行国贸大厦分理处; 账号: 0200041609020180741. 附言注明: 订购的内容和发票的抬头.

总之, WCJD将尽自己的最大努力, 满足广大读者的需求, 同时欢迎更多个性化服务的意见和建议E-mail发至: h.n.zhang@wjnet.com. 谢谢! (世界胃肠病学杂志社 2008-01-08).

进展期胃癌化疗疗效的中国文献分析

曹妮达, 赵爱光, 朱莹杰, 杨金坤

背景资料

胃癌是全球最常 见的恶性肿瘤之 一, 居恶性肿瘤死 因的第2位。目前 手术切除仍是治 疗胃癌的首选方 法, 但胃癌有“三 高三低”的特点, 晚期胃癌患者中 位生存期仅为6-9 mo, 总体5年生存 率20%-30%。为提 高晚期胃癌患者 的中位生存期, 辅 助化疗得到日益 重视, 全身化疗对 晚期胃癌有主要 作用。

曹妮达, 赵爱光, 朱莹杰, 杨金坤, 上海中医药大学附属龙华 医院肿瘤一科 上海市 200032

作者贡献分布: 赵爱光, 朱莹杰和杨金坤对本文所作贡献均 等; 数据分析及本论文写作由曹妮达完成。

通讯作者: 杨金坤, 200032, 上海宛平南路725号, 上海中医药大 学附属龙华医院肿瘤一科. amandatsao_tsao@yahoo.com.cn

电话: 021-64385700-3722

收稿日期: 2007-09-05 修回日期: 2007-12-26

Chinese Reports on the effect and safety of systemic chemotherapy for advanced gastric cancer

Ni-Da Cao, Ai-Guang Zhao, Ying-Jie Zhu, Jin-Kun Yang

Ni-Da Cao, Ai-Guang Zhao, Ying-Jie Zhu, Jin-Kun Yang, the First Department of Oncology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Jin-Kun Yang, the First Department of Oncology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 Wanping Southern Road, Shanghai 200032, China. amandatsao_tsao@yahoo.com.cn

Received: 2007-09-05 Revised: 2007-12-26

Abstract

AIM: To study the effect and safety of systemic chemotherapy for gastric cancer.

METHODS: Articles on systemic chemotherapy for gastric cancer published in 2002 to 2006 were retrieved using the key word "Gastric Cancer" with the secondary retrieval key word "Treatment" or "Chemotherapy" from "Vip Chinese Science and Technology Periodicals database", then the whole text was read to get all-related information. The data were descriptively analyzed.

RESULTS: There were 274 articles on systemic chemotherapy for gastric cancer, 156 of which were on oxaliplatin, paclitaxel, docetaxel, capecitabine and irinotecan. Among the 134 articles statistically studied, randomized controlled test was reported in 31, median survival time in 53, and median time of tumor progress in 30, respectively. The response rate of FOLFOX4, FOLFOX6, and other oxaliplatin-related regimens was 21.21%-56.00%, 38.78%-61.29%, and 34.09%-66.67%, respectively. The response rate of paclitaxel-, docetaxel- and capecitabine-relat-

ed regimens was 23.53%-75.00%, 20.00%-66.67%, and 29.17%-71.88%, respectively.

CONCLUSION: Drugs and regimens used for gastric cancer are in agreement with those reported abroad. However, there are certain shortcomings in the design of domestic clinical studies, thus affecting the results of studies.

Key Words: Gastric cancer; Chemotherapy; Document study

Cao ND, Zhao AG, Zhu YJ, Yang JK. Chinese Reports on the effect and safety of systemic chemotherapy for advanced gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 436-442

摘要

目的: 研究胃癌全身化疗的疗效及安全性。

方法: 以“胃癌”为关键字, “治疗”或“化 疗”为二次检索关键字, 搜索“维普中文科技 期刊数据库”2002-2006年国内有关胃癌全 身化疗的文献, 并搜集所有文献信息, 进行描 述性分析。

结果: 搜得胃癌全身化疗方案文献274篇, 草 酸铂类、紫杉醇类、卡培他滨及拓扑异构酶 抑制剂相关文献156篇, 可进行统计者134 篇, 其中31篇提及为随机对照试验, 53篇提 及中位生存时间, 30篇提及中位疾病进展时 间。FOLFOX4方案有效率在21.21%-56.00%, FOLFOX6方案有效率在38.78%-61.29%, 其他 OXA+CF/5-FU方案有效率在34.09%-66.67%, 紫杉醇相关方案有效率在23.53%-75.00%, 多 西紫杉醇相关方案有效率在20.00%-66.67%, 卡培他滨相关方案有效率在29.17%-71.88%。

结论: 国内胃癌全身化疗用药趋势与国际相 符, 但在临床试验设计上尚存在不足, 影响试 验的结果。

关键词: 胃癌; 化疗; 文献研究

曹妮达, 赵爱光, 朱莹杰, 杨金坤. 进展期胃癌化疗疗效的中国文 献分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 436-442
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/436.asp>

同行评议者
刘宝瑞, 教授, 南 京大学医学院附 属鼓楼医院肿瘤 中心

0 引言

胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 居恶性肿瘤死因的第2位^[1]. 外科手术彻底扫除癌灶仍是胃癌治疗的首选方法. 但除日本外大多数国家由于没有实施筛查, 早期诊断率较低, 超过50%的病例早期症状不明显或不典型, 一经诊断, 常常已达到局部晚期或发生侵犯腹膜, 包围大血管或远处转移而无法手术. 30%-50%的胃癌患者可以进行手术切除, 但60%的根治切除术后患者出现复发或远处转移. 晚期胃癌患者的中位生存期仅为6-9 mo, 总体5年生存率20%-30%. 为提高胃癌术后的疗效, 辅助化疗已受到日益重视, 针对局部与全身的抗癌药物治疗有重要的地位与作用, 围手术药物起辅助治疗作用, 对于局部进展转移期(晚期)胃癌, 药物治疗发挥主要作用^[2-5]. 2002年Panzini *et al* Meta分析统计17篇文献共3118例患者, 分析辅助化疗对于胃癌患者生存期的影响, 结果为接受辅助化疗的患者在生存期上有明显优势. Janunger *et al* Meta分析也得出类似结果^[6-7].

近10年来, 随着化疗新药物的不断出现, 胃癌的化学治疗已得到长足的进步, 虽然目前尚缺乏一致公认的“金标准”方案, 但新化学药物治疗晚期胃癌研究已出现高潮, 其客观缓解率(RR)多已超过40%. 目前, 晚期胃癌全身化疗新药研究主要有4大类6种新药, 口服5-FU前药: 卡培他滨(capecitabine, CAPE, xeloda)和替吉奥(S-1). 紫杉类: 紫杉醇(paclitaxel, taxol, TAX, PCT)和多西紫杉醇(docetaxel, taxotere, TXT, DTX). 第三代铂: 奥沙利铂(oxaliplatin, LOHP, OXA, eloxatin). 拓扑异构酶I抑制剂: 伊立替康(irinotecan, camptosar, IRI, CPT-11)^[3,5]. 本文对国内已发表的中文文献进行研究, 尤其关注含有上述新药的化疗方案之疗效, 以对胃癌术后全身化疗的疗效及安全性进行评价.

1 材料和方法

1.1 材料 搜索“维普中文科技期刊数据库”2002-2006年国内已发表的文献, 以“胃癌”为关键字, “治疗”或“化疗”为二次检索关键字, 分别搜索胃癌全身化疗(静脉及口服给药)的临床试验观察类文献.

1.2 方法 纳入标准: (1)全身化疗(包括静脉及口服给药)的临床疗效观察类试验; (2)提及病例的纳入条件(如病理证实为胃癌; 有客观可测量的指标; 不能手术或术后转移复发; 复治病例末次

表 1 各类药物相关文献一般情况描述

	总数	比例(%)	随机对照	排除篇数	纳入统计篇数
OXA+CF/ 5-FU	84	30.7	23	12	72
PCT	37	13.5	3	5	32
DCT	21	7.7	2	2	19
CAPE	13	4.7	2	3	10
CPT-11	1	0.4	1	-	1

研发前沿
目前胃癌全身化疗虽缺乏公认的“金标准”方案, 但近年来较集中于卡培他滨、紫杉类、草酸铂及伊立替康等药物组成的方案.

接受化疗结束时间; 体力评分; 预计生存期等); (3)有明确纳入试验病例数及可评价疗效病例数; (4)有疗效评估标准和化疗副反应评估标准; (5)有疗效评价情况; (6)包括随机对照试验与不设对照试验. 排除标准: (1)不符合以上纳入标准者; (2)全身化疗同时接受局部化疗(包括腹腔灌注化疗、介入治疗、免疫生物治疗及放疗等其他抗肿瘤治疗). 观察指标: 化疗组所用的化疗药物、剂量和用法等以及疗效评价情况.

2 结果

2.1 研究描述 共搜索到胃癌全身化疗文献274篇, 其中术后化疗265篇, 新辅助化疗9篇. 此外, 另有4篇为全身静脉化疗为主并同时辅以腹腔灌注化疗.

经过阅读摘要、查阅全文等过程后, 统计胃癌术后全身化疗文献的化疗方案中, 治疗对象均为晚期胃癌或进展期胃癌患者. 化疗方案中, 含草酸铂的化疗方案文献共有125篇, 含卡培他滨的16篇, 含CPT-11的1篇, 含羟基喜树碱的47篇, 含蒽环类的30篇, 含多西紫杉醇的23篇, 含紫杉醇的38篇, 其他还用到的化疗药物包括5-氟脲嘧啶(包括口服制剂如优福定, FT-207和方克等)、顺铂、卡铂、庚铂、VP-16、VM-26、丝裂霉素、长春花碱、氨甲喋呤及吉西他滨等, 所用到的化疗方案多达64种之多.

2.2 纳入研究的文献一般情况描述 本次研究主要统计以草酸铂、紫杉类药物、卡培他滨及伊立替康为主化疗方案文献的情况. 各类药物相关文献搜索所得篇数、所占比例、是否随机对照等情况见表1.

以草酸铂、亚叶酸钙/5-氟脲嘧啶联合化疗方案的文献中, 另有1篇记录1, 3年的生存率及疾病进展率, 2篇提及总生存率, 1篇提及总无疾病进展期(PFS). 84篇文献中, 未提及疗效及副反应评价标准的1篇, 文中所述病例数与实际参加

相关报道
 金懋林及秦叔逵教授 *et al*近年对胃癌化疗药物、方案以及疗效等有较多报道,包括综述概括类及临床试验等,对于国内此方面的研究有较大指导意义.

表 2 以草酸铂为主化疗方案疗效比较

化疗方案	文献篇数	n	可评价数(n)	疗效					
				CR(n)	PR(n)	RR(%)	MS(mo)(篇)	PFS(mo)(篇)	TPP(mo)(篇)
FOLFOX4	11	403	389	19	160	21.21-56.00	6.0-10.5(5)	3.0-6.3(5)	4.2-6.8(4)
FOLFOX6	9	282	282	22	118	38.78-61.29	9.0-11.8(4)	5.0(1)	5.5-5.8(3)
非标准	53	1631	1623	104	720	34.09-66.67	8.0-14.0(16)	3.5-9.5(13)	3.0-7.8(5)

表 3 以紫杉醇为主化疗方案疗效比较

化疗方案	文献篇数	n	可评价数(n)	疗效					
				CR(n)	PR(n)	RR(%)	MS(mo)(篇)	PFS(mo)(篇)	TPP(mo)(篇)
PCT+5-FU	1	30	28	3	14	60.71	11.5(1)	6.4(1)	-
PCT+CF/5-FU	8	231	229	13	111	46.15-68.00	7.9-13.1(2)	4.0(1)	4.3-8.0(3)
PCT+DDP+5-FU	3	88	88	9	39	52.00-57.14	13.0(1)	-	6.5-9.0(2)
PCT+DDP+CF/5-FU	5	155	155	11	69	41.67-65.00	-	-	-
PCT+DDP	1	22	22	3	7	45.45	-	5.5(1)	-
PCT+OXA	4	106	106	11	59	57.69-75.00	11.8(1)	8.7(1)	-
其他PCT为主 ¹	10	313	303	17	123	23.53-61.90	9.3-11.2(6)	2.9-5.0(2)	5.6-6.7(3)
合计	32	945	931	67	422	23.53-75.00	7.9-13.1(11)	2.9-8.7(6)	4.3-9.0(8)

¹10篇其他PCT为主文献中,4篇在同一试验里同时应用上述方案中的两种治疗晚期胃癌患者,联合表阿霉素的方案1篇,联合卡培他滨、VP-16的文献各2篇,紫杉醇单药应用方案1篇.

表 4 以多西紫杉醇为主化疗方案疗效比较

化疗方案	文献篇数	n	可评价数(n)	疗效					
				CR(n)	PR(n)	RR(%)	MS(mo)(篇)	PFS(mo)(篇)	TPP(mo)(篇)
DTX+CF/5-FU	3	93	93	6	41	42.11-66.67	-	-	7.6(1)
DTX+DDP+5-FU	7	206	204	10	93	41.18-56.52	8.9-11.0(4)	-	5.5(1)
DTX+DDP+CF/5-FU	2	63	63	5	30	47.62-59.52	10.0-11.1(2)	8.0(1)	5.6(1)
DTX+DDP	2	60	60	0	22	33.33-40.00	9.7(1)	-	5.6(1)
其他DCT为主 ¹	5	102	98	8	41	20.00-63.16	11.0(1)	9.5(1)	5.3-7.0(2)
合计	19	524	518	29	227	20.00-66.67	8.9-11.1(8)	8.9-9.5(2)	5.3-7.6(6)

¹5篇其他DCT为主文献中,多西紫杉醇联合草酸铂联合为主化疗的文献2篇,联合卡培他滨的方案1篇,多西紫杉醇单药应用者1篇,及混合使用上述方案中的两种方案同时治疗晚期胃癌的1篇.

疗效评价例数不符者7篇,观察化疗后总生存率的文献2篇,胃癌与其他病种肿瘤混合统计疗效无法分开者2篇,上述4种情况均不纳入统计范围.余下72篇进行化疗方案及疗效的统计.以紫杉醇为主的化疗方案的文献中,有2篇作者、单位、病例数、病例情况、用药、疗效评价标准完全一致,但疗效评价结果不同,均予以排除在统计范围之外;另外无疗效及副反应评价标准的1篇,胃癌与其他病种肿瘤混合统计疗效无法分开者1篇,观察化疗后血清免疫学指标者1篇,均不纳入统计范围内.剩余32篇进行化疗方案及疗效的统计.以多西紫杉醇为主的化疗方案

的文献中,有用药剂量明显错误者2篇,不纳入统计范围内.其余19篇进行化疗方案及疗效的统计.以卡培他滨为主的化疗方案的文献中,文中所述病例数与实际参加疗效评价例数不符者1篇,胃癌与其他病种肿瘤混合统计疗效无法分开者2篇,上述两种情况不纳入统计范围,余下10篇进行化疗方案及疗效的统计.

2.3 疗效结果 在所有提及疗效评价标准的文献中,评价标准基本有两种:一为WHO实体瘤近期客观疗效评价标准(1981年);另一种为1998年欧洲癌症研究与治疗协会(EORTC)、美国国立癌症研究所(NCI)、加拿大国立癌症研究所(NCIC)

创新盘点
本文对国内已发表的中文文献进行研究, 尤其关注含有卡培他滨、紫杉类、草酸铂及伊立替康等药物的化疗方案之疗效, 以对胃癌术后全身化疗的疗效及安全性进行评价.

表 5 以卡培他滨为主化疔方案疗效比较

化疗方案	文献篇数	n	可评价数(n)	疗效				
				CR(n)	PR(n)	RR(%)	MS(mo)(篇)	PFS(mo)(篇)
Xelox	8	204	196	17	89	29.17-71.88	8.3-12.0(4)	7.5-8.0(3)
其他CAPE为主 ¹	2	46	46	2	18	37.50-46.67	-	-
合计	10	250	242	19	107	29.17-71.88	8.3-12.0(4)	7.5-8.0(3)
								4.5-7.2(4)

¹2篇其他CAPE为主文献分别为卡培他滨单药应用, 及卡培他滨联合表阿霉素及顺铂方案.

表 6 随机对照文献情况表

化疗方案	随机对照文献数	n	可评价数(n)	疗效		
				CR(n)	PR(n)	RR(%)
FOLFOX4	1	40	36	1	17	50.00
FOLFOX6	4	121	121	11	53	45.00-58.53
5-FU单独静滴	10	312	312	18	154	43.75-66.67
5-FU bolus+CIV	1	41	41	4	16	48.78
5-FU CIV22H	2	56	56	3	28	54.55-56.52
PCT+DDP+CF/5-FU	1	31	31	1	15	51.61
PCT+DDP	1	22	22	3	7	45.45
PCT+CF/5-Fu+VP-16	1	32	32	6	13	59.83
DTX+DDP+5-FU	1	23	23	2	10	52.17
DTX	1	15	15	1	2	20.00
CAPE+OXA	1	28	28	1	16	60.71
CPT-11+DDP+5-FU	1	25	25	0	13	52.00

提出的《抗肿瘤药对实体肿瘤客观疗效评定标准》(RECIST).

2.3.1 化疗方案 以草酸铂的化疗方案: 需要提出的是, 以标准FOLFOX6方案为基础化裁的全身化疗文献共9篇, 但化疗药物剂量严格符合FOLFOX6方案的文献仅为2篇, 其余文献中L-OHP用量在85-135 mg/m²之间, CF的用量有200 mg/m²与400 mg/m²不同, 快速静滴5-FU的剂量也有400 mg/m²与500 mg/m²不同, 但因5-FU静脉维持静滴的剂量与时间均符合FOLFOX6标准, 故本研究将上述文献均归于FOLFOX6为基础的化疗方案中. 其余53篇均为草酸铂、亚叶酸钙/5-氟脲嘧啶联合组成的化疗方案, 但药物剂量与用法都不符合FOLFOX系列方案用法. 以紫杉醇、多西紫杉醇和卡培他滨为主的化疗方案见表2-5.

2.3.2 其他: 关于使用拓扑异构酶 I 抑制剂单药或联合其他药物治疗胃癌的文献在本次国内文献的搜索中较少, 仅为1篇, 并且提及为随机对照试验, 使用药物为CPT-11、顺铂及5-氟脲嘧啶, 病例数25例, 可评价疗效病例25例, 完全缓

解(CR)0例, 部分缓解(PR)13例, 有效率(RR)为52%. 关于含S-1的文献在此次搜索中没有所获.

2.3.3 随机对照文献结果: 将纳入统计的文献中提及为随机对照的文献单独分析(表6). OXA、CF/5-FU联用方案中, 因各试验药物剂量、用法均不相同, 主要体现在5-FU的用量和用法上, 故严格意义上无法将其全部进行合并统计有效率, 只能按用药方法的基本类似将其分成3类: 一是5-FU单独静脉点滴, 但用药剂量各有不同, 500 mg/m²的4篇, 300 mg/m²的4篇, 375 mg/m²和750 mg/m²的各1篇; 二是先用5-FU 400 mg/m²快速静脉推注, 再用600 mg/m²静脉维持22 h; 三是单用5-FU静脉维持22 h的方法.

2.4 副反应 在提及毒副反应评价标准的文献中, 所使用的标准有以下几种: (1)WHO抗癌药物急性与亚急性毒性表现和分度标准观察和判断, 分为0-IV度; (2)按照美国国立癌症研究所(national cancer institute, NCI)通用不良反应分级标准(common terminology criteria for adverse events, CTCAE)3.0进行评价. (3)在使用草酸铂类药物的方案中, 神经毒性按照奥沙利铂专用

应用要点

本文对国内现行化疗药物、方案、疗效及安全性等进行分析，并发现国内临床试验中存在设计不足等缺陷，在今后的工作中有一定参考意义。

分级法评价，包括肢端感觉异常或感觉迟钝、麻木，咽喉部感觉异常，面部感觉异常和喉部痉挛综合征或Caussanel *et al*描述的感觉神经毒性标准评分：1级为感觉异常和/或感觉迟钝，持续不超过7 d；2级为感觉异常和/或感觉迟钝持续8-14 d；3级为感觉异常和/或感觉迟钝，在化疗间歇期持续存在；4级为感觉异常和/或感觉迟钝引起功能障碍。

因为并非全部进入统计的文献都分别列出各项不良反应的具体人数，大多文献将不良反应按种类统计，也有仅在文中列出几个3/4度不良反应的项目，个别文献统计总周期数中发生不良反应的例数，因此无法作详尽的统计及讨论，故在此仅列举各化疔方案常见的不良反应。

文献中提及的各化疔方案的血液学毒性主要为白细胞减少、贫血及血小板减少，以白细胞和血小板减少为主，可出现3/4度毒性。非血液学毒性中，主要有恶心呕吐、腹泻等消化道反应，口腔黏膜炎，轻中重度各有分布，肝肾功能的损害以轻度为主，少见3/4度毒性，脱发以含紫杉醇类药物为多见，多在轻中度，少数为重度。含有草酸铂类药物的，观察外周神经毒性；含有卡培他滨的化疔方案，加观察手足综合征的发生率；含紫杉醇类药物的方案，亦有少数文献记录过敏反应的情况；其他有个别文献记录化疔的心脏毒性等毒副反应。

3 讨论

在本次搜索到的全部文献中，出现的化疔方案达64种之多，一方面表现出目前胃癌术后化疔尚无统一的标准方案，应用的药物种类较多，而应用以草酸铂、紫杉类、卡培他滨、伊立替康为主的化疔方案占到总数的57%，另一方面也表现目前国内胃癌术后化疔用药与国际上的趋势相符。同时，国内的临床研究尚存在诸多问题。

草酸铂为主化疔方案的有效率较高，FOLFOX4有效率为21.21%-56.00%，其中1篇为随机对照，有效率50%；FOLFOX6有效率为38.78%-61.29%，其中有4篇为随机对照试验，有效率为45.00%-58.53%，略高于FOLFOX4，不排除与两者总病例数相差较多有关，但这一情况与国外类似报道结果相仿。意大利De Vita *et al*^[8]用FOLFOX4方案治疗晚期胃癌患者61例，全部参加评价疗效及毒副反应评价，CR 4例、PR 19例，有效率38%。Louvet *et al*^[9]用FOLFOX6方案治疗53例晚期胃癌患者，有效率为45%。其他

用草酸铂、亚叶酸钙及5-氟脲嘧啶联合化疔方案的有效率在34.09%-66.67%，与FOLFOX6接近，此间提及为随机对照的文献有效率在43.75%-66.67%之间，但因此类文献中，3种药物剂量、用药途径均各有出入，其有效率难以与单纯FOLFOX4或FOLFOX6方案相比。

以紫杉类为主的化疔方案在本次研究中方案比较多，但大多与顺铂、亚叶酸钙及5-氟脲嘧啶多药联用，因此存在每种方案文献篇数较少、病例数也较少的问题，相应的，提及随机对照的文献更少，不同方案的仅各有1篇。紫杉醇与多西紫杉醇为主的化疔方案有效率分别为23.53%-75.00%与20.00%-66.67%，均高于国外的随机对照试验结果。目前唯一完成的紫杉类药物治疗晚期胃癌III期多国多中心试验V325，其II期试验TCF和DC的有效率分别为43%和26%，中位疾病进展时间(TTP)为5.9 mo和5.0 mo，中位生存期的比较结果是9.6 mo和10.5 mo^[10]；III期试验中TCF的有效率为38.7%^[11]。而本研究中DCF方案的有效率高达41.18%-56.52%，DC方案也有33.33%-40.00%，故考虑两者出现较大差异仍与样本量过小及是否随机化而产生偏差有关。

以卡培他滨为主的化疔方案中，卡培他滨联合草酸铂方案占到大多数，10篇文献中有8篇使用此方案，有效率在29.17%-71.88%，悬殊较大。国外文献中此方案的报道较少。韩国的II期试验用卡培他滨单药1250 mg/m² po 2次/d，每3周一次，治疗45例晚期或转移性胃癌患者，44例可评价疗效病例，CR 0例，PR 15例，有效率34%，中位TTP 3.2 mo，中位生存期(MS)9.5 mo^[12]。一项包括中国在内的多国多中心随机III期临床研究比较了XP方案与5-FU/DDP(FP)方案一线治疗晚期胃癌的疗效及安全性。结果显示两组的疾病无进展时间分别为5.6 mo和5 mo，总体生存时间分别为10.5 mo和9.3 mo，XP组均优于FP组^[13]。尚在继续进行中的REAL-2 II期试验，ECF、EOX、ECX以及EOF 4组有效率分别为31%、48%、35%和39%，EOX组明显高于其他3组^[14]。

含伊立替康的化疔方案在本次研究中仅一篇文献，有效率为52%。这一结果与日本Hiroshi *et al*的实验结果相仿，具体用伊立替康60 mg/m²，第1、15天静脉维持输注，联合顺铂10 mg/m²，第1、2、3、15、16、17天使用，治疗31例晚期胃癌患者，CR 0例，PR 16例，有效率为52%，中位生存时间为378 d^[15]。而随机II期试验V306的第一阶段，比较了CPT-11+DDP(欧洲方案)与CPT-11

联合静脉滴注5-FU和LV治疗晚期胃癌的疗效, 前者的有效率为40%^[16].

从本次研究中, 看到国内临床试验中存在的不少问题, 或多或少影响到试验的结果。首先, 国内的临床研究缺乏多中心的随机对照实验, 所收集病例多为作者本医院的门诊或住院患者。金懋林教授 *et al*用奥沙利铂联合亚叶酸钙及5-氟脲嘧啶先静脉快速静滴, 后大剂量静脉维持的试验在目前国内较为权威和标准的临床试验结果。病例来自7个研究中心, 最终可评价疗效例数40例, CR 4例, PR 13例, 有效率达42.5%^[17]。国内其他使用该三药联合化疗的临床试验亦与此结果作比较。

其次, 随机对照试验的文献为数相当少, 各方案的随机对照试验篇数在10%左右, 不超过25%。且对于随机的分配方法也缺乏具体交待, 对随机组患者与对照组患者的同质性没有分析, 不能排除其对试验结果的偏倚影响。

再次, 临床实验的纳入样本量也相对较少, 大多为门诊或病房收集的病例, 没有样本量需求的计算, 在本次收索的文献中, 治疗组病例数最多不超过60例, 最少的仅16例, 故试验结果可能因样本量过小而产生的误差。此次统计虽然尽量将使用药物、剂量、方法相同的方案一并统计, 但因胃癌本身尚无国际统一的所谓“金标准”方案, 各临床试验使用的药物组合各不相同, 相同药物联合应用时, 剂量及用药途径、时间亦各不相同, 从严格意义上而言, 难以合并病例总数以进行综合的疗效评价, 或与国外类似文献进行比较。

此外, 国内文献对生存期的关注度尚不足, 进行统计的134篇文献中, 仅48篇提到了中位生存时间, 占35.82%(48/134), 提及中位疾病进展时间的文献也仅为29篇, 占21.65%(29/134)。与此同时, 国外同类文献中对生存期、疾病进展期等及有效率均给予相当的重视。这提示我们, 国内临床试验需要对病例进行更长时间的随访并进行生存期、疾病进展时间等资料的收集。值得注意的是, 如各化疗药物或方案之间有效率相近, 则生存期、生存质量等对患者有更重要的意义, 在今后的研究中应予更多的重视。

另外, 在我国, 有越来越多的文献报道中医药治疗晚期胃癌在延长生存期、延迟术后复发转移时间或降低复发转移率、改善生活质量、减轻化疗副反应等有一定的作用, 中医药治疗胃癌日益受到关注, 开展大样本多中心的临床

研究客观评价中医药治疗胃癌的疗效是我国胃癌研究的重要课题之一。

总之, 晚期胃癌术后化疗目前在国内外尚无明确的“标准方案”, 所用方案众多, 但在药物应用上已基本趋向于草酸铂、紫杉类、卡培他滨等药物为主的联合用药方案, 有待在药物联合、剂量及给药途径上做进一步的研究, 加之靶向药物联合化疗的研究也逐渐成为热点, 以期提高有效率和延长生存期、提高生存质量。而国内的临床试验在试验设计上存在不足, 如缺少多中心的随机对照试验、随机的设计缺乏严密性、样本量较少、对生存期的关注度不够等, 需要我们在今后的研究和工作中加以重视和改进。

4 参考文献

- 1 Van Cutsem E. The treatment of advanced gastric cancer: new findings on the activity of the taxanes. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 2: 9-15
- 2 Hejna M, Wohrer S, Schmidinger M, Raderer M. Postoperative chemotherapy for gastric cancer. *Oncologist* 2006; 11: 136-145
- 3 秦叔達. 晚期胃癌化疗的现状和新进展. 临床肿瘤学杂志 2006; 11: 641-652
- 4 Varadhachary G, Ajani JA. Gastric cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2005; 3: 118-124
- 5 金懋林. 胃癌药物治疗研究进展. 临床药物治疗杂志 2006; 4: 13-16
- 6 Panzini I, Gianni L, Fattori PP, Tassinari D, Imola M, Fabbri P, Arcangeli V, Drudi G, Canuti D, Fochessati F, Ravaioli A. Adjuvant chemotherapy in gastric cancer: a meta-analysis of randomized trials and a comparison with previous meta-analyses. *Tumori* 2002; 88: 21-27
- 7 Janunger KG, Hafstrom L, Glimelius B. Chemotherapy in gastric cancer: a review and updated meta-analysis. *Eur J Surg* 2002; 168: 597-608
- 8 De Vita F, Orditura M, Matano E, Bianco R, Carlomagno C, Infusino S, Damiano V, Simeone E, Diadema MR, Lieto E, Castellano P, Pepe S, De Placido S, Galizia G, Di Martino N, Ciardiello F, Catalano G, Bianco AR. A phase II study of biweekly oxaliplatin plus infusional 5-fluorouracil and folinic acid (FOLFOX-4) as first-line treatment of advanced gastric cancer patients. *Br J Cancer* 2005; 92: 1644-1649
- 9 Louvet C, Andre T, Tigaud JM, Gamelin E, Douillard JY, Brunet R, Francois E, Jacob JH, Levoir D, Taamma A, Rougier P, Cvitkovic E, de Gramont A. Phase II study of oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in locally advanced or metastatic gastric cancer patients. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4543-4548
- 10 Ajani JA, Fodor MB, Tjulandin SA, Moiseyenko VM, Chao Y, Cabral Filho S, Majlis A, Assadourian S, Van Cutsem E. Phase II multi-institutional randomized trial of docetaxel plus cisplatin with or without fluorouracil in patients with untreated, advanced gastric, or gastroesophageal adenocarcinoma. *J Clin Oncol*

同行评价
本文内容新颖, 文笔流畅, 分析可观, 有较大的参考价值.

- 2005; 23: 5660-5667
- 11 Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, Rodrigues A, Fodor M, Chao Y, Voznyi E, Risso ML, Ajani JA. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4991-4997
- 12 Hong YS, Song SY, Lee SI, Chung HC, Choi SH, Noh SH, Park JN, Han JY, Kang JH, Lee KS, Cho JY. A phase II trial of capecitabine in previously untreated patients with advanced and/or metastatic gastric cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 1344-1347
- 13 Kang Y, Kang WK, Shin DB, Chen J, Xiong J, Wang M, Lichinitser M, Philco M, Suarez T, Santamaria J. Randomized phase III trial of capecitabine/cisplatin (XP) vs. continuous infusion of 5-FU/cisplatin (FP) as first-line therapy in patients (pts) with advanced gastric cancer(AGC): efficacy and safety results. *J Clin Onc* 2006; 24: 5660-5667
- 14 Sumpter K, Harper-Wynne C, Cunningham D, Rao S, Tebbutt N, Norman AR, Ward C, Iveson T, Nicolson M, Hickish T, Hill M, Oates J. Report of two protocol planned interim analyses in a randomised multicentre phase III study comparing capecitabine with fluorouracil and oxaliplatin with cisplatin in patients with advanced oesophagogastric cancer receiving ECF. *Br J Cancer* 2005; 92: 1976-1983
- 15 Imamura H, Ikeda M, Furukawa H, Tsujinaka T, Fujitani K, Kobayashi K, Narahara H, Kato M, Imamoto H, Takabayashi A, Tsukuma H. Phase II study of protracted irinotecan infusion and a low-dose cisplatin for metastatic gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6522-6526
- 16 Ajani J. 肿瘤病例新挑战. <http://www.csco.org.cn/zt/003/01.htm>
- 17 金懋林, 陈强, 程凤歧, 陈伟, 陈黎, 潘良熹, 杨宇飞. 奥沙利铂联合亚叶酸钙和5-氟尿嘧啶治疗晚期胃癌的研究. 中华肿瘤杂志 2003; 25: 172-174

编辑 李军亮 电编 郭海丽

世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价,采用匿名方式.通常每篇文章邀请2-3位专家审阅,至少2人通过方可录用,否则退稿.每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿).文章等级评定: A级、B级、C级、D级、E级、不清楚.其中A和B属于很好,C和D不算太好,E是很差,还有一部分是不清楚.



含左氧氟沙星、雷贝拉唑的三联方案治疗幽门螺杆菌94例

张喜梅, 张振玉

张喜梅, 张振玉, 南京医科大学附属南京第一医院消化科 江苏省南京市 210006

作者贡献分布: 此课题为张喜梅主要贡献; 张振玉, 张喜梅共同设计; 研究过程在张振玉指导下由张喜梅操作完成; 数据分析由张喜梅完成; 本论文写作由张喜梅完成。

通讯作者: 张喜梅, 210006, 江苏省南京市, 南京医科大学附属南京第一医院消化科. zcc518@vip.sina.com

电话: 025 - 52271260 传真: 025 - 52271260

收稿日期: 2007-08-18 修回日期: 2008-01-10

Key Words: Levofloxacin; Rebeprazole; *Helicobacter pylori*

Zhang XM, Zhang ZY. Levofloxacin and rebeprazole-based triple regimen therapy for 94 cases of *Helicobacter pylori* infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 443-445

背景资料
据统计幽门螺杆菌感染有少数患者初次根除失败, 抗生素耐药被认为是根除失败的主要原因, 因此更换敏感抗生素进行根除治疗是解决根除失败的要点.

摘要

目的: 评价含左氧氟沙星的三联方案治疗幽门螺杆菌的有效性和安全性

方法: 将94例幽门螺杆菌(*Helicobacter, H pylori*)阳性的消化性溃疡及慢性胃炎患者随机分为克拉霉素治疗组和阿莫西林治疗组, 两组联合的抗菌药均含左氧氟沙星, 抑酸剂选用雷贝拉唑, 疗程6 d. 各组在治疗前1 wk内和治疗后4-8 wk分别检测*H pylori*感染情况.

结果: 含左氧氟沙星的三联方案*H pylori*根除率为81.9%, 克拉霉素治疗组*H pylori*根除率与阿莫西林治疗组比较无显著性差异(85.4% vs 78.3%, $P = 0.368$).

结论: 含左氧氟沙星的雷贝拉唑联合克拉霉素或阿莫西林是安全有效的幽门螺杆菌根除方案.

关键词: 左氧氟沙星; 雷贝拉唑; 幽门螺杆菌

张喜梅, 张振玉. 含左氧氟沙星、雷贝拉唑的三联方案治疗幽门螺杆菌94例. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 443-445
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/443.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter, H pylori*)是慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃癌和黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的重要病因^[1]. 目前临幊上*H pylori*推荐根除方案包括抑酸剂或铋剂联合两种抗生素(如阿莫西林、克拉霉素、甲硝唑和四环素等). 据统计有近20%的患者初次根除失败^[2], 抗生素耐药被认为是根除失败的主要原因. 我们应用含左氧氟沙星的三联方案治疗幽门螺杆菌, 观察其疗效和安全性.

同行评议者
郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and tolerability of levofloxacin-based triple regimen therapy for *Helicobacter pylori* infection.

METHODS: Ninety-four patients with *H pylori* infection accompanied with peptic ulcer or chronic gastritis were randomly divided into clarithromycin treatment group and amoxicillin treatment group combined with levofloxacin and rebeprazole. The course of treatment was six days. The eradication rate of *H pylori* was evaluated 1 week before and 4-8 weeks after treatment.

RESULTS: The eradication rate of *H pylori* for levofloxacin-based tripel regimen therapy was 81.9%. The eradication rate of *H pylori* (85.4%) in clarithromycin treatment group was not significantly higher than that (78.3%) in amoxicillin treatment group ($P = 0.368$).

CONCLUSION: Levofloxacin and rebeprazole-based triple regimen therapy is effective and safe for *H pylori* infection.

研发前沿

国内外大多数研究人员正努力通过联合用药提高幽门螺杆菌初次根除率,减少耐药的发生。各种抗生素及抑酸药的组合被应用于临床及科研中,其中将左氧氟沙星作为抗*H pylori*治疗初次及补救方案已经得到临床医生的广泛关注。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2006-05/2006-07消化科门诊经胃镜确诊的胃、十二指肠溃疡及慢性萎缩性胃炎患者94例,年龄18-65岁,其中*H pylori*阳性作为入选对象,排除严重肝、肾及肺等器官功能障碍,有关药物过敏史、孕妇和哺乳期妇女以及近4 wk内已接受抗菌素或PPI治疗的患者。随机分为克拉霉素治疗组和阿莫西林治疗组。治疗前1 wk内和治疗结束后4-8 wk进行胃镜和*H pylori*检测。

1.2 方法

1.2.1 *H pylori*检测:采用快速尿素酶试验、胃黏膜组织学检查和¹⁴C-尿素呼气试验(¹⁴C-UBT)。胃镜检查时,于胃窦和胃体各取2块进行快速尿素酶试验或胃黏膜组织学检查,试验阳性者即诊断*H pylori*感染。治疗结束后至少4 wk后进行¹⁴C-UBT检测,结果为阴性,确定为*H pylori*已根除。

1.2.2 治疗方法: 克拉霉素治疗组:雷贝拉唑10 mg,克拉霉素0.5 g,左氧氟沙星0.2 g,2次/d。阿莫西林治疗组:雷贝拉唑10 mg,阿莫西林1.0 g,左氧氟沙星0.2 g,2次/d,各组疗程均为6 d。

统计学处理 采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为结果有显著性差异。

2 结果

含左氧氟沙星的三联方案*H pylori*根除率为81.9%,克拉霉素治疗组*H pylori*根除率(85.4%)与阿莫西林治疗组(78.3%)间无显著性差异($P>0.05$,表1)。本研究过程中克拉霉素治疗组6例(12.5%)(男2例,女4例),阿莫西林治疗组3例(6.52%)(男1例,女2例)。在治疗结束后,第1次随访时诉口苦、纳差、腹胀,在第2次随访时上述症状消失。本研究中9例(9.57%)不良反应轻微,停药后消失,总体安全性良好。

3 讨论

*H pylori*是慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因,是人类胃癌的I类致癌源,因此,临幊上根除*H pylori*极其重要。根据Maastricht 2-2000共识^[3]中初次根除方案治疗后仍有近20%的患者根除失败^[2]。随着根除治疗的普遍开展,*H pylori*耐药率呈上升趋势。Ling et al^[4]报道,1991-1995*H pylori*对甲硝唑、克拉霉素的耐药率也在逐渐上升。因此更换敏感抗生素进行根除治疗是解决根除失败的要点。

表 1 克拉霉素组和阿莫西林组*H pylori*根除率

分组	n	根除率(%)	P值
克拉霉素组	48	85.4(41/48)	$P = 0.368$
阿莫西林组	46	78.3(36/46)	
总计	94	81.9(77/94)	

左氧氟沙星是氧氟沙星的左旋体,抗菌活性两倍于后者,且抗菌谱广泛。现已有多项研究表明左氧氟沙星可安全、有效地初次和补救治疗*H pylori*。其中左氧氟沙星联合质子泵抑制剂、阿莫西林或替硝唑初次根除率逾90%^[5-6],联合质子泵抑制剂、阿莫西林补救根除率分别为63%、69.7%^[7-8]。阿莫西林尽管应用广泛,但*H pylori*对该药的耐药仍少见,克拉霉素的耐药率虽在逐渐上升,但仍是目前根除*H pylori*的一线用药。故选择左氧氟沙星联合克拉霉素或阿莫西林可作为治疗方案中抗生素之选。雷贝拉唑是新一代PPI,具有较高的解离常数,起效快,作用持久稳定,同时,由于其独特非酶代谢形式,药物之间的影响较小,在人体中的清除不因同工酶代谢的强弱而明显不同^[9],个体差异小,均为强效抑酸,有利于提高整体*H pylori*根除率,对本方案取得较好的效果具有重要意义。

国内舒建昌 et al^[10]和唐丽安 et al^[11]报道雷贝拉唑联合克拉霉素、阿莫西林对*H pylori*的根除率分别为78.79%、70.97%;不良反应发生率分别为10.62%、3.23%。本试验含左氧氟沙星的三联方案对*H pylori*的根除率同上述报道基本一致,且不良反应发生率亦较低。

由此本试验提示含雷贝拉唑、左氧氟沙星、克拉霉素或阿莫西林的新三联6 d疗法,是一种短程、高效、依从性好、安全的根除*H pylori*的治疗方案,值得在临幊上进一步推广应用。

4 参考文献

- 1 Current European concepts in the management of Helicobacter pylori infection. The Maastricht Consensus Report. European Helicobacter Pylori Study Group. Gut 1997; 41: 8-13
- 2 Graham DY. Antibiotic resistance in Helicobacter pylori: implications for therapy. Gastroenterology 1998; 115: 1272-1277
- 3 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 167-180
- 4 Ling TK, Cheng AF, Sung JJ, Yiu PY, Chung SS. An

应用要点
本试验提示含雷贝拉唑、左氧氟沙星、克拉霉素或阿莫西林的新三联6 d疗法,是一种短程、高效、依从性好、安全的根除*H pylori*的治疗方案,值得在临幊上进一步推广应用。

- increase in *Helicobacter pylori* strains resistant to metronidazole: a five-year study. *Helicobacter* 1996; 1: 57-61
- 5 Cammarota G, Cianci R, Cannizzaro O, Cuoco L, Pirozzi G, Gasbarrini A, Armuzzi A, Zocco MA, Santarelli L, Arancio F, Gasbarrini G. Efficacy of two one-week rabeprazole/levofloxacin-based triple therapies for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1339-1343
- 6 Di Caro S, Zocco MA, Cremonini F, Candelli M, Nista EC, Bartolozzi F, Armuzzi A, Cammarota G, Santarelli L, Gasbarrini A. Levofloxacin based regimens for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 1309-1312
- 7 Perri F, Festa V, Merla A, Barberani F, Pilotto A, Andriulli A. Randomized study of different 'second-line' therapies for *Helicobacter pylori* infection after failure of the standard 'Maastricht triple therapy'. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 815-820
- 8 Watanabe Y, Aoyama N, Shirasaka D, Maekawa S, Kuroda K, Miki I, Kachi M, Fukuda M, Wambura C, Tamura T, Kasuga M. Levofloxacin based triple therapy as a second-line treatment after failure of *helicobacter pylori* eradication with standard triple therapy. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 711-715
- 9 Kawakami Y, Akahane T, Yamaguchi M, Oana K, Takahashi Y, Okimura Y, Okabe T, Gotoh A, Katsuyama T. In vitro activities of rabeprazole, a novel proton pump inhibitor, and its thioether derivative alone and in combination with other antimicrobials against recent clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 458-461
- 10 舒建昌, 杨冬华, 张晓燕, 宋慧东, 庞春梅, 杨绮红, 黎铭恩, 罗国彪, 张文茹, 汤绍辉. 雷贝拉唑、克拉霉素、阿莫西林4日疗法根除幽门螺杆菌感染疗效观察. 中国实用内科杂志 2003; 23: 305-306
- 11 唐丽安, 李点玲, 张桂英. 雷贝拉唑三联5日疗法根除幽门螺杆菌的疗效观察. 中国现代医学杂志 2005; 24: 3789-3791

同行评价
本文实用性较强,
写作规范, 具有一
定的临床意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志 2007 年 1 - 12 月份 收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 世界华人消化杂志2007年1-12月份收稿及发稿数字统计结果: 自2007-01-01/2007-12-31, 世界华人消化杂志共收到稿件1525篇, 退稿627篇, 退稿率41.11%. 发表文章773篇, 其中述评47篇(6.1%), 基础研究198篇(25.61%), 临床研究94篇(12.16%), 文献综述109篇(14.10%), 研究快报91篇(11.77%), 临床经验201篇(26.00%), 病例报告10篇(1.29%), 焦点论坛19篇(2.46%). 会议纪要4篇(0.5%), 英文摘要740篇(95.98%). 其中受国家级基金资助的177篇(22.96%), 省部级基金资助的247篇(32.04%). 作者分布遍及全国各地, 绝大多数来自高等院校及附属医院. (常务副总编辑: 张海宁 2008-01-01)



肠胆反流与Oddi括约肌压力之间的关系

孙韶龙, 崔东旭, 戴显伟, 吴硕东, 许永庆

背景资料
Oddi括约肌在维持胆道压力, 调节胆汁排泄及防止十二指肠胆道反流方面起重要作用。而T管引流术后的患者十二指肠胆道反流的发生情况如何, 以及其发生与Oddi括约肌压力之间关系还不是很清楚。

孙韶龙, 崔东旭, 戴显伟, 吴硕东, 许永庆, 中国医科大学盛京医院普外科 辽宁省沈阳市 110004
作者贡献分布: 孙韶龙与崔东旭对本文所作贡献均等; 此课题由孙韶龙、崔东旭、戴显伟、吴硕东及许永庆设计; 研究过程由孙韶龙、崔东旭、戴显伟、吴硕东及许永庆操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由孙韶龙提供; 数据分析由吴硕东完成; 本文写作由孙韶龙完成。
通讯作者: 孙韶龙, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛京医院普外科. doubledragons@yahoo.com.cn
电话: 024-83956512
收稿日期: 2007-04-03 修回日期: 2008-01-15

Relationship between duodenobiliary reflux and pressure of Oddi sphincter

Shao-Long Sun, Dong-Xu Cui, Xian-Wei Dai, Shuo-Dong Wu, Yong-Qing Xu

Shao-Long Sun, Dong-Xu Cui, Xian-Wei Dai, Shuo-Dong Wu, Yong-Qing Xu, Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Shao-Long Sun, Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. doubledragons@yahoo.com.cn
Received: 2007-04-03 Revised: 2008-01-15

Abstract

AIM: To observe the relationship between duodenobiliary reflux in patients who underwent choledocholithotomy plus T-tube drainage and pressure of Oddi sphincter.

METHODS: A total of 51 patients who underwent choledocholithotomy plus T-tube drainage were studied. After duodenobiliary reflux due to oral 185 MBq (5 mCi) of technetium-99m diethylenetriaminepentaacetic acid (^{99m}Tc-DTPA) was observed, the patients were divided into reflux group positive for duodenobiliary reflux and control group negative for duodenobiliary reflux. Thirty-three of them were selected randomly and the pressure of Oddi sphincter was assessed by choledochoscope manometry to find if there is a certain relationship between them.

RESULTS: Duodenobiliary reflux was detected in 31% (16/51) of the patients who underwent choledocholithotomy plus T-tube drainage

and in 10 of the 33 randomly selected patients, while no duodenobiliary reflux was detected in the remaining 23 patients of the control group. The basal pressure and contraction amplitude of Oddi sphincter and the pressure of common bile duct were significantly lower in the reflux group than in the control group (7.2 ± 3.9 mmHg vs 14.7 ± 11.0 mmHg, 53.5 ± 24.5 mmHg vs 117.2 ± 65.6 mmHg, 5.1 ± 1.6 mmHg vs 11.5 ± 7.4 mmHg, $P < 0.05$). No significant difference was found in the frequency of contractions, duration of contractions or pressure of common bile duct between the two groups.

CONCLUSION: The occurrence of duodenobiliary reflux is related with the contraction amplitude and basal pressure of Oddi sphincter and the common bile duct pressure, but not with the contraction frequency and duration of Oddi sphincter and the pressure of common bile duct. Duodenobiliary reflux may play a role in the pathogenesis of choledocholithiasis.

Key Words: Cholelithiasis; Duodenobiliary reflux; Manometry; Biliary kinematics

Sun SL, Cui DX, Dai XW, Wu SD, Xu YQ. Relationship between duodenobiliary reflux and pressure of Oddi sphincter. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 446-449

摘要

目的: 探讨胆石症患者十二指肠胆道反流的发生与Oddi括约肌压力之间的关系。

方法: 采用口服核素观察十二指肠胆道反流的方法, 将51例胆道残石患者分为反流组和对照组, 并从中随机双盲选择33例患者进行Oddi括约肌测压研究, 比较十二指肠胆道反流的发生与Oddi括约肌压力之间是否存在一定的关系。

结果: 51例行胆道取石T型管引流术后的患者中有16例检测到十二指肠胆道反流(31%); 所选择的33例患者中有10例检测到十二指肠胆道反流(反流组), 余23例未检测到反流的作为对照组, 反流组Oddi括约肌基础压、

收缩波幅、胆总管压显著低于对照组($7.2 \pm 3.9 \text{ mmHg}$ vs $14.7 \pm 11.0 \text{ mmHg}$, $53.5 \pm 24.5 \text{ mmHg}$ vs $117.2 \pm 65.6 \text{ mmHg}$, $5.1 \pm 1.6 \text{ mmHg}$ vs $11.5 \pm 7.4 \text{ mmHg}$, $P < 0.05$). 两组十二指肠压(DP)、Oddi括约肌收缩频率(SOF)及收缩间期(SOD)无显著性差异($P > 0.05$).

结论: 肠胆反流的发生与Oddi括约肌收缩波幅、基础压及胆肠压力差显著性下降有关, 而与Oddi括约肌的收缩频率、间期及十二指肠压无关.

关键词: 胆石症; 肠胆反流; 压力测量法; 胆道动力学

孙韶龙, 崔东旭, 戴显伟, 吴硕东, 许永庆. 肠胆反流与Oddi括约肌压力之间的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 446-449
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/446.asp>

0 引言

胆道探查取石加T管引流术后的患者有较高的胆石复发率, 为6.4%-18%^[1], 其复发率因结石的部位、类型及手术的不同而不同. 一些因素, 如Oddi括约肌狭窄、残余结石、慢性胆管炎、胆道细菌感染、胆管狭窄、不健康的饮食习惯、不适当的治疗或不正规的操作等, 可能与胆管结石的高复发率有关. 关于胆道中的细菌, 目前公认是来源于肠道, 或者经过十二指肠大乳头逆行感染, 或者穿透肠黏膜进入胆道, 但是这方面的证据并不多见; 而且, 关于胆石症患者肠胆反流的发生率如何, 以及肠胆反流的发生与Oddi括约肌压力之间的关系怎样, 国内外鲜见报道. 由于Oddi括约肌在维持胆道压力, 调节胆汁排泄及防止十二指肠胆道反流方面起重要作用, 因此, 我们采用放射性核素标记大分子物质锝-99m二乙三胺五乙酸(technetium-99m diethylenetriaminepentaacetic acid, 简称^{99m}Tc-DTPA)来观察T管引流术后的患者十二指肠胆道反流的发生情况, 并且经胆道镜测量这些患者Oddi括约肌压力; 对于有无发生肠胆反流的患者之间, 比较其Oddi括约肌的压力差异.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-04/2005-02因胆道残石在中国医科大学附属二院住院治疗的患者51例, 男15例, 女36例, 年龄27-90(平均59.2)岁, 全部患者均已行胆囊切除、胆总管探察取石及T型管引流术, 平均手术后时间2 mo. 观察所有患者肠胆反流的发生情况, 将发生十二指肠胆道反流的患者作为反

流组, 其余作为对照组; 并从中随机双盲的选择33名患者, 男10例, 女18例, 年龄27-73(平均56.6)岁, 进行Oddi括约肌测压研究. 测压器械为PC polygram HR高分辨、多通道胃肠功能测定仪及相应测压软件、三通道测压导管、低顺应性水灌注系统、氮气泵及PENTEX LX-750p纤维胆道镜. 三通道测压导管长2 m, 直径1.7 mm, 末端有3个侧孔, 相隔2 mm, 每孔开口于不同方向.

1.2 方法 患者于检查前禁食1夜, po 1 mL含有185 MBq(5 mCi)的^{99m}Tc-DTPA水, 接着240 mL水漱服, 患者立即平卧位. 经T型引流管收集接下来的2 h胆汁, 取其中的20 mL, 采用放射活度检测仪计数放射性活度. 如果胆汁中可以检测到放射性活度, 则该患者存在十二指肠胆道反流. 所有的^{99m}Tc-DTPA均在服用前配制, 并且经放射色谱检测其放射化学纯度(radiochemical purity). 所有选用的药品, ^{99m}Tc-DTPA的放射化学纯度大于99%, 即游离^{99m}Tc小于1%^[2-3]. 受试者检查前2 d不使用对胆道压力有影响的药物, 禁食1夜. 设置电脑测压系统参数, 氮气压力为40 kPa, 水流速度为0.5 mL/min, 连接测压导管, 经T型管窦道导入胆道镜, 观察乳头部是否蠕动良好、有无狭窄及纤维化或结石, 取净结石后, 由胆道镜侧孔插入测压导管, 直视下经乳头达十二指肠, 稳定30 s后测压, 后拽导管至Oddi括约肌部, 直视结合电脑出现时相波可明确导管处于Oddi括约肌内, 测压后导管拽至胆总管内进行测压^[4].

统计学处理 数据结果以mean±SD表示, 组间差异采用Student's t检验, $P < 0.05$ 认为有显著性差异.

2 结果

51例行胆道取石T型管引流术后的患者中有16例检测到十二指肠胆道反流(31%), 此16例反流阳性患者的2 h胆汁中锝计数为 $209.5 \pm 264.0 \text{ kBq}$, 占摄入剂量的1.1%左右, 其余35例胆汁样品中未检测到放射性活度. 从所有患者中按照随机双盲原则选择了33例进行Oddi括约肌测压, 经po ^{99m}Tc-DTPA证实, 10例存在十二指肠胆道反流(反流组), 其余23例无反流(对照组). 两组Oddi括约肌测压结果见表1. 两组患者在年龄及性别组成方面无显著性差异. 反流组Oddi括约肌基础压(SOBP)、收缩波幅(SOCA)、胆总管压(CBDP)显著低于对照组($P < 0.05$), 特别是SOCA, 其平均值在反流组尚不及对照组的1/2($53.5 \pm 24.5 \text{ mmHg}$ vs $117.2 \pm 65.6 \text{ mmHg}$). 两

创新盘点
 本研究采用新的方法检测十二指肠胆道反流, 率先发现肠胆反流的发生与Oddi括约肌基础压、收缩波幅及胆总管压力的显著性下降有关.

应用要点

本文建立了简洁有效的检测十二指肠胆道反流的方法，并且探讨该反流的发生因素，有利于指导临床预防因反流导致的诸如胆道感染等并发症。

表1 T型管引流术后患者Oddi括约肌测压结果(mean ± SD, mmHg)

分组	n	男/女	年龄(岁)	DP	SOBP	SOCA	SOD	SOF	CBDP
反流	10	3/7	62.6 ± 9.3	4.6 ± 4.5	7.2 ± 3.9	53.5 ± 24.5	5.1 ± 1.5	6.4 ± 2.0	5.1 ± 1.6
对照	23	5/18	54.0 ± 12.5	5.6 ± 3.2	14.7 ± 11.0 ^a	117.2 ± 65.6 ^a	5.8 ± 1.3	6.3 ± 1.9	11.5 ± 7.4 ^a

^aP<0.05 vs 反流。

组十二指肠压(DP)、Oddi括约肌收缩频率(SOF)及收缩间期(SOD)无显著性差异。

3 讨论

消化道反流是一种不正常现象，临幊上多见的有十二指肠胃反流和胃食管反流，分别形成反流性胃炎和反流性食管炎；除此之外，还有十二指肠胆道反流和胰液胆道反流，分别与胆管炎和胆总管囊肿的发病有关。十二指肠胆道反流发生后，由于会有十二指肠液、肠道细菌及内毒素、食物等进入胆道，这些物质都有可能引起胆结石的发病，因此肠胆反流有可能与胆石形成有关。

目前用于检测十二指肠胆道反流的方法主要有：*po*泛影葡胺后放射线检查^[5]，*po*苏打后超声波检测^[6]，以及服用核素标记的大分子物质，如^{99m}Tc-DTPA等，闪烁扫描检测^[7-8]。这些方法有一个共同特点，就是都需要使用复杂且昂贵的医疗检测设备（如X线发射仪，超声仪，SPECT等），其中的一些结果只有依靠影像专家才能识别，个体判定变化大，灵敏度不高，难定量评价。我们首次对胆道取石T管引流术后的患者采用^{99m}Tc-DTPA检测十二指肠胆道反流，此方法唯一用到的设备就是RM905型放射活度检测仪。其原理是高分子质量的^{99m}Tc-DTPA(M_r 549 000)难以穿透肠道黏膜^[9]，并且经过肾脏而非肝脏排泄。因此如果我们在患者的胆汁中检测到放射性活度，就可以判断其存在十二指肠胆道反流。因为^{99m}Tc-DTPA再没有其他的途径进入胆汁了，这就是可以用*po* ^{99m}Tc-DTPA检测十二指肠胆道反流的原理。此方法简单易行，廉价、安全，由于锝半衰期短（仅6 h），可以在短时间内重复研究。其检测结果可以很容易的被那些不是很精通影像诊断学的研究者所理解。此方法有很高的特异性（可达100%），但敏感性尚不清楚，因为十二指肠胆道反流的发生可以被一些因素影响，如Oddi括约肌的功能状态、十二指肠的蠕动及胆道运动情况等。这意味着在胆道取石术后的

患者中实际反流发生率比我们的研究结果可能要高。

本研究首次对T管引流术后的患者采用^{99m}Tc-DTPA检测十二指肠胆道反流，发现这些患者中肠胆反流的发病率为31%，反流的核素剂量占摄入量的1.1%左右，尽管此方法无法用于健康志愿者，缺乏对照，但是我们认为正常人是不应该存在肠胆反流的。这是因为正常的Oddi括约肌具有单向阀门作用，可以维持胆道压力，调节胆汁排泄，防止十二指肠胆道反流的发生。那么是否说明在T管引流术后的患者中，其较高的肠胆反流发病率与Oddi括约肌功能异常有关呢？由于目前Oddi括约肌测压是公认的研究Oddi括约肌功能的金标准，在胆道动力学及Oddi括约肌功能判断上有重要意义，于是我们从所有受试对象中随机双盲的选择了33例（经*po* ^{99m}Tc-DTPA证实，10例存在肠胆反流，反流发病率30.3%，卡方检验证实与总体发病率无显著性差异）进行Oddi括约肌测压，结果发现，反流组Oddi括约肌收缩波幅显著低于对照组，而且该组Oddi括约肌基础压和胆总管压亦低于对照组，而两组在十二指肠压、Oddi括约肌收缩间期及频率方面无显著性差异。进一步的分析发现，由于反流组胆总管压低于对照组，两组间十二指肠压无显著性差异，二者的差值即胆肠压力差（CBDP-SOBP），反流组低于对照组，经统计学分析，此差异具有显著性。

Oddi括约肌的存在，维持了胆道的压力，使胆总管压力高于十二指肠压，即胆肠压力差为正值。本项研究中，反流组胆肠压力差（1.0 ± 0.8 mmHg）与对照组（5.2 ± 1.3 mmHg）比较，差异具有显著性（P<0.05）。可见，胆肠压力差减小是发生十二指肠胆道反流的直接原因。然而，如果Oddi括约肌的功能正常，即使胆肠压力差下降至负值，即胆总管压力小于十二指肠压，也可以不发生肠胆反流。这个负值是有一定限度的，Calabuig *et al*^[10]研究发现，以100 cm水柱的压力灌注负鼠十二指肠，未观察到有十二肠液

反流进入胆道。如果Oddi括约肌的功能正常, 那么胆肠压力差是不可能减小的, 更不可能为负值。也就是说, 反流组胆肠压力差的下降, 归根于Oddi括约肌的功能异常。本研究发现, 反流组Oddi括约肌的基础压和收缩波幅显著低于对照组, 尤其以SOCA的降低明显, 不及对照组的1/2。SOCA和SOBP的下降, 说明Oddi括约肌的“泵”的功能减弱, 其后果是胆肠压力差下降, 肠胆反流发生。

胆道取石T管引流术后的患者存在十二指肠胆道反流, 可能与胆总管结石术后较高的结石复发率有关, 因为在存在十二指肠胆道反流的患者中, 肠道细菌和内毒素更容易进入肝胆系统, 而该实验则为此细菌易位提供了间接的证据。这些细菌进入肝胆系统后, 其中的一些可以产生 β -葡萄糖苷酸酶和磷脂酶A, 分别水解胆汁中的结合胆红素和卵磷脂, 其产物非结合胆红素和软脂酸可以与钙离子结合成沉淀, 作为色素结石的主要成分。而且, 内毒素可以通过细胞毒效应或其他机制激活肝脏细胞、胆道上皮细胞或胆汁中的白细胞, 释放内源性 β -葡萄糖苷酸酶^[11], Ho *et al*^[12-13]发现内源性 β -葡萄糖苷酸酶在色素结石的发病中可能也起重要作用。

除了细菌和内毒素以外, 十二指肠液和食物也有可能通过反流进入胆道。在离体实验中, 成石性胆汁中加入十二指肠液可以促进结石的形成, 说明十二指肠胆道反流在结石的形成中起一定的作用。而且, 反流入胆道的食物, 如鱼骨、樱桃柄^[14]等, 可以作为胆道异物起到结石的成核作用, 胆汁中的黏蛋白、胆红素钙、细菌及其他物质会围绕此核心聚集, 形成结石^[15]。所有这些证明十二指肠胆道反流在结石的发病中起到一定的作用。

总之, 根据以上研究, 我们推测, 由于某种原因造成Oddi括约肌功能障碍(sphincter of oddi dysfunction), 表现在SOCA、SOBP及胆肠压力差显著性下降, 导致肠胆反流的发生, 反流物(包括十二指肠液、食物等异物、肠道细菌及毒素等)通过不同的途径参与胆总管色素结石的发病。但是, 由于本研究所选择的对象均为那些因胆总管结石已经行手术治疗的患者, 故究竟是先有胆石症的发病, 还是先有Oddi括约肌功能障碍的发生, 尚有待于进一步的研究。

T管引流术后的患者中存在肠胆反流, 其发

病率在31%左右; 肠胆反流的发生与Oddi括约肌收缩波幅、基础压及胆肠压力差显著性下降有关, 而与Oddi括约肌的收缩频率、间期及十二指肠压无关。肠胆反流有可能参与胆总管结石的发病。

4 参考文献

- Uchiyama K, Onishi H, Tani M, Kinoshita H, Kawai M, Ueno M, Yamaue H. Long-term prognosis after treatment of patients with choledocholithiasis. *Ann Surg* 2003; 238: 97-102
- Sun SL, Wu SD, Zhang XB. Oral (99m)Tc-DTPA simultaneous determination of duodenobiliary reflux and intestinal permeability in patients after choledocholithotomy plus T-tube drainage. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 593-596
- 孙韶龙, 吴硕东, 隋东明, 戴显伟, 崔东旭. 口服锝-^{99m}Tc-DTPA检测胆石症患者肠黏膜通透性. 中华医学杂志 2007; 87: 464-467
- Wu SD, Zhang ZH, Jin JZ, Kong J, Wang W, Zhang Q, Li DY, Wang MF. Effects of narcotic analgesic drugs on human Oddi's sphincter motility. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2901-2904
- 魏义, 张寅, 王凯, 吴硕东. 胆管空肠Roux-en-Y吻合与内镜下乳头肌切开术后肠胆返流与胆汁排泄的对比研究. 肝胆外科杂志 2003; 11: 119-120
- Wu CH, Chiu HM, Liu KL, Lin JT, Wang HP. Sonographic demonstration of duodenobiliary reflux with soda enhancement. *J Clin Ultrasound* 2004; 32: 249-252
- 冯变喜, 李德伟, 刘桂荣, 冯贵生. 胆囊结石病人存在肠胆返流. 山西医药杂志 1996; 25: 250-251
- Germain A, Proux C, Oury F. Significance of radiocinematography in the diagnosis of duodenobiliary reflux and biliodigestive fistulas. *Mem Acad Chir (Paris)* 1961; 87: 854-858
- 李幼生, 李宁, 康健, 朱虹, 李福建, 黎介寿. ^{99m}Tc-DTPA测定肠道通透性的方法及应用. 肠外与肠内营养 1998; 5: 227-229
- Calabuig R, Weems WA, Moody FG. Choledocho-duodenal flow: effect of the sphincter of Oddi in opossums and cats. *Gastroenterology* 1990; 99: 1641-1646
- Osnes T, Sandstad O, Skar V, Osnes M. Lipopolysaccharides and beta-glucuronidase activity in choledochal bile in relation to choledocholithiasis. *Digestion* 1997; 58: 437-443
- Ho KJ, Lin XZ, Yu SC, Chen JS, Wu CZ. Cholelithiasis in Taiwan. Gallstone characteristics, surgical incidence, bile lipid composition, and role of beta-glucuronidase. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1963-1973
- Ho KJ, Hsu SC, Chen JS, Ho LH. Human biliary beta-glucuronidase: correlation of its activity with deconjugation of bilirubin in the bile. *Eur J Clin Invest* 1986; 16: 361-367
- Kelly MD, Hugh TB. Cherry stalk in the common bile duct. *Aust N Z J Surg* 1993; 63: 571-574
- Chen HH, Zhang WH, Wang SS, Caruana JA. Twenty-two year experience with the diagnosis and treatment of intrahepatic calculi. *Surg Gynecol Obstet* 1984; 159: 519-524

名词解释
十二指肠胆道反流: 是指肠液的物质经过十二指肠逆流到胆管的反常现象, 即经常文献中出现的胆肠反流, 但笔者认为“从胆到肠”不是反流, 故十二指肠胆道反流更贴切。

同行评价
本文设计合理, 结论可靠, 具有一定科学价值。

编辑 李军亮 电编 何基才



实时荧光定量PCR检测IL-8 mRNA在大肠癌的表达

周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林, 吴金民

背景资料

近年来研究表明,趋化因子与肿瘤生长和转移有密切关系,因此,本文应用实时荧光定量PCR法检测大肠癌患者癌组织IL-8 mRNA表达,并分析其与临床病理因素之间的关系。

周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林, 郑州大学医学院第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052

吴金民, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院肿瘤中心 浙江省杭州市 310016

作者贡献分布: 周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林, 吴金民对本文所作贡献均等; 此课题由吴金民, 周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林计; 研究过程由周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林完成; 研究所用新试剂及分析工具由吴金民提供; 数据分析由樊青霞, 范魁生, 王瑞林完成; 本论文写作由周文鹏, 吴金民及樊青霞完成。

通讯作者: 王瑞林, 450052, 河南省郑州建设东路1号, 郑州大学医学院第一附属医院。zhwpeng@sohu.com

电话: 0371-68011778

收稿日期: 2007-07-19 修回日期: 2007-12-28

logical type, liver metastasis and clinicopathological stage (Dukes) ($P < 0.05$). However, tumor site was not significantly related to the age and sex of the patients.

CONCLUSION: IL-8 mRNA expression is significantly correlated with the biological behavior of colorectal carcinoma. The high expression of IL-8 may be related with the occurrence and progress of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal carcinoma; Interleukin-8; Fluorescent quantitative PCR

Zhou WP, Fan QX, Fan KS, Wang RL, Wu JM. Expression of interleukin-8 mRNA in patients with colorectal carcinoma detected by real-time quantitative PCR. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(4): 450-453

摘要

目的: 探讨大肠癌组织IL-8 mRNA表达及其临床意义。

方法: 用实时荧光定量PCR检测56例大肠癌组织及癌旁正常组织IL-8 mRNA表达, 分析IL-8 mRNA表达与大肠癌临床病理因素之间的关系。

结果: 癌组织和癌旁正常组织IL-8 mRNA表达有显著差异(1.106 ± 0.420 vs 0.792 ± 0.374 , $P < 0.05$)。癌组织IL-8 mRNA表达与淋巴结转移、组织学类型、血管侵犯、肝转移及肿瘤病理分期密切相关, 与肿瘤部位、肿瘤大小、及患者的性别和年龄等无关。

结论: IL-8高表达同大肠癌生物学行为密切相关, 可能与大肠癌的发生、发展及预后有关。

关键词: 大肠肿瘤; 白细胞介素8; 实时荧光定量聚合酶链式反应

周文鹏, 樊青霞, 范魁生, 王瑞林, 吴金民. 实时荧光定量PCR检测IL-8 mRNA在大肠癌的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(4): 450-453
<http://www.wjnet.com/1009-3079/16/450.asp>

0 引言

趋化因子是一组对白细胞有趋化作用和激活功

同行评议者
高泽立, 副教授,
上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科

能的细胞因子。近年来研究表明, 趋化因子与肿瘤生长和转移有密切关系, 其中研究较为深入的是白介素-8(IL-8)。在许多肿瘤组织中均可检测到IL-8蛋白质分泌及其mRNA表达, 而在其相应正常组织IL-8不表达或呈低表达状态, 说明IL-8与肿瘤发生、发展有关。因此, 我们应用实时荧光定量PCR法检测大肠癌患者癌组织IL-8 mRNA表达, 并分析其与临床病理因素之间关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-07/2004-07浙江大学附属邵逸夫医院肿瘤外科的住院大肠癌患者56例, 男33例, 女23例, 年龄31-85(中位年龄55)岁。所有标本均经过病理证实。其中, 结肠癌22例, 直肠癌34例。组织学类型: 乳头状腺癌7例, 管状腺癌44例, 黏液腺癌5例。我们将乳头状腺癌和高、中分化腺癌定为分化好型, 将低分化及黏液腺癌定为分化差型。临床病理分期按Dukes分期。全部病例术前均未接受化疗及放疗。FQD-33A荧光定量PCR仪由杭州大和热磁电力有限公司提供。总RNA抽提试剂盒和M-MuLV逆转录酶购自Promega公司。逆转录实时荧光定量PCR试剂购自Roche公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成: 引物和探针在GenBank查到基因序列, 使用软件Primer-Express 2.0进行设计。IL-8上游引物: 5'-AGAGTGGACCACACTGCGC-3', 下游引物: 3'-ACATCCCAACGGTCTACGTTA-5', 扩增片段为251 bp; GAPDH上游引物为5'-GAAGATGG TGATGGGATT-3', 下游引物为5'-CAAGCTTC CCGTTCTCAGCC-3', 扩增产物长226 bp。上述引物均由上海博亚生物技术服务公司合成。

1.2.2 标本制备、RNA提取和cDNA合成: 标本采集后迅速放至液氮中冷冻, -80℃保存。使用TRIzol RNA提取液, 按照其说明书对大肠癌组织和癌旁正常组织提取总RNA, 通过甲醛变性凝胶电泳定性和紫外分光光度仪定量。取总RNA 1 μg, 进行逆转录, 按照说明书进行cDNA合成, 所得cDNA置于-20℃保存。GAPDH和IL-8 mRNA的PCR反应: 反应体系为25 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 21.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 10 nmol/L Primer 1 μL/L, 1 nmol/L probe 2.5 μL, 5 μL/L Taq 0.25 μL, cDNA 2.5 μL, 无菌双蒸水15 μL, 反应条件: 94℃变性5 min, 94℃ 30 s, 58℃ 45 s, 72℃ 30 s, 共40个循环,

循环结束后72℃延伸10 min, 每个标准品和标本均作复管PCR反应。

1.2.3 PCR产物定量的校正和判定分析: 采用GAPDH作为内参照, IL-8 mRNA和GAPDH mRNA根据标准曲线得出mRNA的分子拷贝数。用GAPDH的拷贝数作为校正基数, 即目的基因mRNA精确含量 = 目的基因CT值/内参照GAPDH CT值, 以此比值作统计处理。根据FQ-PCR原理, 被激发的荧光信号达到一定阈值后被荧光探头采集, 最后将其转换成CT值, 该数值与扩增片段的实际拷贝数呈反比, 即CT值越低, 实际拷贝数含量越高。

统计学处理 各数据均以mena±SD表示, 进行配对t检验, 应用SPSS11.0统计软件对所得数据进行统计学处理, 以P<0.05为有显著性差异。

2 结果

2.1 IL-8在大肠癌组织和癌旁正常组织中的表达 大肠癌癌旁正常组织和大肠癌组织均表达IL-8 mRNA, 其表达水平分别为1.306±0.448和1.028±0.456, 大肠癌组织IL-8 mRNA表达明显高于癌旁正常组织(P<0.05)。

2.2 癌组织IL-8表达与大肠癌临床病理指标的关系 IL-8 mRNA在乳头状腺癌和管状腺癌组织中的表达明显高于黏液腺癌组织(1.106±0.420 vs 0.792±0.374, P<0.05)。在有淋巴结转移者中的表达明显低于无淋巴结转移者(P<0.05)。肝脏转移者IL-8 mRNA表达低于无肝脏转移者(0.756±0.328 vs 1.103±0.424, P<0.05)。按大肠癌Dukes分期标准, 本组A期和B期20例, C期和D期36例。C、D期IL-8 mRNA表达平均指数为0.891±0.349, A、B期为1.223±0.449, 前者IL-8 mRNA表达明显低于后者(P<0.05, 表1)。

3 讨论

浸润、转移及复发是肿瘤生物学主要特性, 具有重要的临床意义, 因而备受关注。而血管形成在肿瘤浸润、复发及转移过程中有非常重要的作用。肿瘤的持续生长必须依赖新生血管的形成, 如果肿瘤不能血管化, 生长至2-3 mm便发生退化。血管化不仅能通过“灌注”效应促进肿瘤生长, 并为肿瘤细胞进入血液循环和转移提供可能, 在肿瘤形成中起着重要的作用^[1]。目前的研究显示, IL-8参与肿瘤血管形成, IL-8与肿瘤的侵润、转移密切相关^[2-5]。Lee et al^[6]检测35例胃癌患者癌组织和癌旁正常组织中的IL-8表达, 癌组织中IL-8表达显著高于癌旁正常组织, 随

研发前沿
血管化不仅能通过“灌注”效应促进肿瘤生长, 而且能为肿瘤细胞进入血液循环和转移提供可能, 在肿瘤形成中起重要的作用。目前的研究显示, IL-8参与肿瘤血管形成, IL-8与肿瘤的侵润、转移密切相关。

创新盘点

本文对IL-8 mRNA与大肠癌的研究提供了一定的理论基础。

表1 IL-8 mRNA与大肠癌临床病理指标

	<i>n</i>	IL-8 mRNA
性别		
男	33	0.997 ± 0.390
女	23	1.072 ± 0.441
年龄		
>55	39	1.073 ± 0.426
<55	17	0.926 ± 0.360
肿瘤大小(cm)		
>5	27	0.921 ± 0.353
<5	29	1.143 ± 0.436
肿瘤部位		
结肠	22	0.945 ± 0.385
直肠	34	1.081 ± 0.385
组织类型		
高分化	42	1.106 ± 0.420
低分化	14	0.792 ± 0.374 ^a
血管侵犯		
有	27	0.866 ± 0.379
无	29	1.179 ± 0.439 ^a
淋巴结转移		
有	31	0.889 ± 0.347
无	25	1.202 ± 0.467 ^a
肝转移		
有	12	0.756 ± 0.328
无	44	1.103 ± 0.424 ^a
Dukes分期		
A/B	20	1.223 ± 0.449
C/D	36	0.891 ± 0.349 ^a

^aP<0.05.

着病理分期的升高, IL-8的表达也逐步升高, 二者有显著相关性。同时IL-8的表达与病理分型也有显著的相关性, 而IL-8的高表达与胃癌患者的生存时间有显著负相关性, 这表明IL-8的表达在预测胃癌演变过程中是非常重要的有效的指标。研究者在肺癌^[7-9]和卵巢癌^[10]、乳腺癌^[11]、肝癌^[12]等也得出了类似的结果, 提示IL-8参与肿瘤的发生和发展。本研究显示, 大肠癌患者癌组织IL-8 mRNA表达强度明显高于正常组织, 而且随着大肠癌临床病理分期的升高而明显上升, 呈显著正相关, 癌组织IL-8 mRNA的高表达与血管侵犯、淋巴结转移和肝脏转移呈显著正相关, 提示IL-8参与大肠癌的浸润和转移。

研究表明IL-8除参与肿瘤血管形成外, 还通过阻滞细胞凋亡^[13]、促进细胞和细胞及细胞和基质间黏附^[14]、自分泌^[15-16]、上调基质金属蛋白酶^[17]及通过调节EGFR^[18]等作用而参与肿瘤的发生发展。由于IL-8与血管形成及肿瘤生长

密切相关, Inoue *et al*^[19]用IL-8反义cDNA全序列抑制肿瘤组织血管形成和肿瘤转移, 而Hjortoe *et al*^[20]用乳腺癌细胞系MDA-MB-231接种动物, 对产生肿瘤的动物分别用抗IL-8抗体和对照抗体处理, 结果表明, 与对照组相比, 抗IL-8抗体处理的肿瘤生长明显延缓, 出现转移时间明显延长。Zhang *et al*^[21]研究前列腺癌细胞PC-3MM2时也有类似发现。提示IL-8可成为抗肿瘤治疗的一个新的靶点。

4 参考文献

- 1 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364
- 2 Murphy C, McGurk M, Pettigrew J, Santinelli A, Mazzucchelli R, Johnston PG, Montironi R, Waugh DJ. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4117-4127
- 3 Luppi F, Longo AM, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer* 2007; 56: 25-33
- 4 Takehara H, Iwamoto J, Mizokami Y, Takahashi K, Ootubo T, Miura S, Narasaki T, Takeyama H, Omata T, Shimokobe K, Ito M, Matsuoka T. Involvement of cyclooxygenase-2--prostaglandin E2 pathway in interleukin-8 production in gastric cancer cells. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2188-2197
- 5 Trevino JG, Gray MJ, Nawrocki ST, Summy JM, Lesslie DP, Evans DB, Sawyer TK, Shakespeare WC, Watowich SS, Chiao PJ, McConkey DJ, Gallick GE. Src activation of Stat3 is an independent requirement from NF-κappaB activation for constitutive IL-8 expression in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Angiogenesis* 2006; 9: 101-110
- 6 Lee KH, Bae SH, Lee JL, Hyun MS, Kim SH, Song SK, Kim HS. Relationship between urokinase-type plasminogen receptor, interleukin-8 gene expression and clinicopathological features in gastric cancer. *Oncology* 2004; 66: 210-217
- 7 Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8) levels in small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2006; 24: 492-496
- 8 Henriet C, Gouat C, Combes A, Lazennec G, Mathieu M. Differential regulation of RANTES and IL-8 expression in lung adenocarcinoma cells. *Lung Cancer* 2007; 56: 167-174
- 9 Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8) levels in small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2006; 24: 492-496
- 10 Lokshin AE, Winans M, Landsittel D, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Modugno F, Nolen BM, Gorelik E. Circulating IL-8 and anti-IL-8 autoantibody in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006; 102: 244-251
- 11 Derin D, Soydinc HO, Guney N, Tas F, Camlica H, Duranyildiz D, Yasasever V, Topuz E. Serum IL-8

- and IL-12 levels in breast cancer. *Med Oncol* 2007; 24: 163-168
- 12 Lin Q, Huang MS, Hu B, Dong M, Wen JY, Wu XY. Serum levels of macrophage migration inhibitory factor and interleukin-8 in hepatocellular carcinoma patients: their correlations with tumor progression and prognosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2007; 15: 463-464
- 13 Abdollahi T, Robertson NM, Abdollahi A, Litwack G. Identification of interleukin 8 as an inhibitor of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in the ovarian carcinoma cell line OVCAR3. *Cancer Res* 2003; 63: 4521-4526
- 14 Barshishat M, Ariel A, Cahalon L, Chowers Y, Lider O, Schwartz B. TNFalpha and IL-8 regulate the expression and function of CD44 variant proteins in human colon carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 327-337
- 15 Huang J, Yao JL, Zhang L, Bourne PA, Quinn AM, di Sant'Agnese PA, Reeder JE. Differential expression of interleukin-8 and its receptors in the neuroendocrine and non-neuroendocrine compartments of prostate cancer. *Am J Pathol* 2005; 166: 1807-1815
- 16 Kamohara H, Takahashi M, Ishiko T, Ogawa M, Baba H. Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor-alpha and leukemia
- inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor. *Int J Oncol* 2007; 31: 627-632
- 17 Watanabe H, Iwase M, Ohashi M, Nagumo M. Role of interleukin-8 secreted from human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 2002; 38: 670-679
- 18 Luppi F, Longo AM, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer* 2007; 56: 25-33
- 19 Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, Perrotte P, Eve BY, Bar-Eli M, Radinsky R, Dinney CP. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2290-2299
- 20 Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LV. Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood* 2004; 103: 3029-3037
- 21 Zhang F, Lee J, Lu S, Pettaway CA, Dong Z. Blockade of transforming growth factor-beta signaling suppresses progression of androgen-independent human prostate cancer in nude mice. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4512-4520

同行评价
本文所用方法先进, 数据可靠, 引用参考文献得当。

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版

本刊讯 《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式, 自1995年起, 发表的文章可以在线免费阅读全文 (<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>). 自2003-04-15至2007-12-31, 电子版的点击次数为21762951, 平均每天点击12743次. 总下载次数280505, 平均每天下载164次. (世界胃肠病学杂志社 2008-01-08)

会议纪要 MEETING MINUTES

《世界胃肠病学杂志》西安地区编委及作者读者座谈会 纪要

李宗芳, 张澍

李宗芳, 张澍, 西安交通大学医学院第二附属医院陕西省西安市 710004
通讯作者: 李宗芳, 710004, 陕西省西安市西五路157号, 西安交通大学医学院第二附属医院. lzsf2568@mail.xjtu.edu.cn
电话: 0592-2292017
收稿日期: 2007-12-20 修回日期: 2008-01-20

《世界胃肠病学杂志》西安地区编委及作者读者座谈会于2007-12-18在西安交通大学医学院第二附属医院召开(图1). 杂志社社长兼总编辑马连生教授、名誉总编辑潘伯荣教授、副总编辑王苑本教授、副总编辑杨思凤教授及西安地区编委、作者读者共40余人出席会议. 会议由西安交通大学医学院第二附属医院副院长李宗芳教授主持(图2).

马连生社(图3)长首先介绍了本刊的工作流程及发展现状, 包括编辑、组稿、出版、发行、被引频次和影响因子等, 并提出了不断提升本刊质量和学术水平, 更好地服务于广大读者、作者和编委的工作方针. 大家就本刊的发展方向、读者群定位、期刊的审稿形式、以及如何将杂志办得更好等问题进行了热烈的座谈与会专家仁者见仁, 智者见智, 集思广益, 共谋发展. 一致认为, 本刊发表的文章学术水平近年来不断提高, 并且受国家基金资助的文章及国外作者的文章也逐年增多, 为促进国际学术交流、推动学科进展发挥了重要的作用. 参会专家还建议, 本刊的中、英文两个杂志在刊登文章的选择上应该有不同的侧重, 中文版《世界华人消化杂志》应更加重视对临床有指导作用的、优秀的临床实用性论文的刊出, 既要确实显示出国家级的水平, 又要照顾对广大临床医师的可读性及实用性, 而英文版《World Journal of Gastroenterology》则应该更多的增加原创性和基础研究类文章, 以提高期刊的国际学术影响力, 同时也要适当刊登一些有争议性的文章, 以便更好地促进学术发展, 今后应该更加发挥本刊的自身优势, 加快特色化建设的进程, 打造“精品”, 提高知名度, 吸引更多的高水平



图 1 《世界胃肠病学杂志》西安地区编委及作者读者座谈会会场.



图 2 西安交通大学医学院第二附属医院副院长李宗芳教授主持会议.



图 3 本刊社长兼总编辑马连生教授在会上.

文章投稿, 为国内外学者更好地提供展示自己的平台.



图 4 本刊名誉总编辑潘伯荣教授在会上.



图 5 与会人员合影.

名誉总编潘伯荣教授(图4)指出：“今后的工作要更加脚踏实地，文章发表要注重创新性、可读性及临床实用性，SCI的影响因子是办好杂志的结果，而不是目的”。他对杂志今后的发展寄予了深切期望。

最后总编马连生教授对本次会议作总结，本次

座谈会的圆满召开给予高度评价，并充分肯定西安地区编委及其作者、读者多年来对杂志的积极支持给与(图5)。同时，还表明今后将增加稿件评审意见的内部评价系统、并在在欧美、日本等地设立办事处、邀请国际学术权威为本刊撰写述评等，使本刊的学术水平更上一层楼，发表更多的精品文章。

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2008-11在上海市召开第二十次全国中西医结合消化系统疾病学术会议，并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为肝病、内镜与胃癌)新技术新理论继续教育学习班。学习班招收对象：中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等。参加学习班者授予国家级1类继续教育学分；大会论文报告者另授继续教育学分6分。

1 征稿内容

消化内镜技术及其中西医结合临床应用；脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究；消化道肿瘤中西医结合诊疗；脾胃学说及其临床应用；其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等。

2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编。稿件请附800字论文摘要，尽可能以电子邮件的形式将稿件传送，截稿日期：2008-09-30。

3 联系方式

刘成海，201203，上海市浦东新区张衡路528号上海中医药大学附属曙光医院肝病所，传真：021-51324445或51328500，shxhy2008@yahoo.cn或czs.xiaohua@163.com

• 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!

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

陈立波 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

陈其奎 教授

中山大学附属第二医院消化内科

程英升 副教授

上海交通大学附属第六人民医院放射科,上海交通大学影像医学研究所

曹蕾 教授

西安交通大学第二附属医院消化内科

杜群 副研究员

广州中医药大学脾胃研究所药理室

范志宁 主任医师

南京医科大学第二附属医院内镜中心

房静远 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院,上海市消化疾病研究所

巩鹏 副教授

大连医科大学附属第一医院普外二科

郭晓钟 教授

沈阳军区总医院消化内科

何超 教授

浙江大学医学院附属邵逸夫医院肛肠外科

黄志勇 副教授

华中科技大学同济医院普外科

纪小龙 教授

武警总医院纳米医学研究所

江学良 主任医师

济南军区总医院消化科

李旭 副教授

广东省广州市南方医院急诊科

李延青 教授

山东大学齐鲁医院消化科

林勇 讲师

上海长征医院消化内科

刘宝瑞 教授

南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

陆云飞 教授

广西医科大学第一附属医院胃肠外科

欧希龙 副教授

东南大学中大医院消化科

潘秀珍 教授

福建省立医院消化研究室

秦环龙 教授

上海交通大学附属第六人民医院外科

王春友 教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

魏经国 教授

中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科

闻勤生 教授

中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科

郁宝铭 教授

上海市第八人民医院结直肠中心

周丁华 主任医师

中国人民解放军二炮总医院普外科

朱春兰 主任医师

黑龙江省医院附属消化病医院消化二科

邹小明 教授

哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科