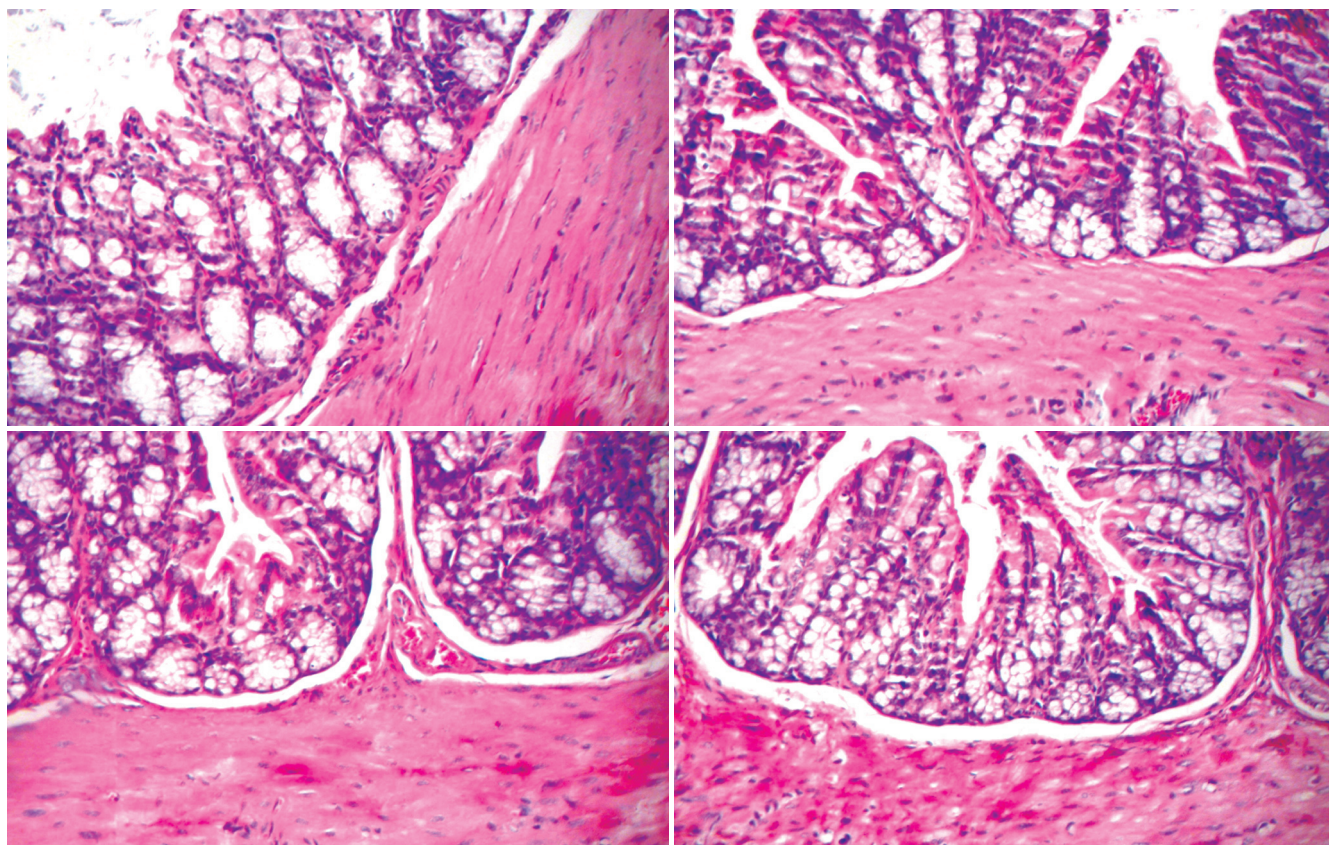


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 1 月 28 日 第 16 卷 第 3 期 (Volume 16 Number 3)



3 / 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

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
白文元教授
苒新明教授
陈洪副教授
陈尼维主任医师
陈其奎教授

陈卫昌教授
陈贻胜教授
陈玉林教授
程斌副教授
迟宝荣教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯红主任医师
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关晓辉主任医师
关玉盘教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
金懋林教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李继强教授
李淑德教授
李晓宇主任医师
李延青教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李兆申教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授

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

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

消化外科学

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

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

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

消化感染病学

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

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

消化中医药学

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

消化肿瘤学

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

消化影像学

程红岩教授
韩新巍教授
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
杨建勇教授

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
范志宁主任医师
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
沈俊教授
孙明军教授
万军教授

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授
刘鲁明教授
唐文富主治医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员

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

消化病理学

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2008 年 1 月 28 日

第 16 卷

第 3 期

(总第227期)

述 评

- 229 肝癌的冷冻治疗
徐克成, 牛立志
- 236 慢性胰腺炎内镜治疗现状
王洛伟, 李兆申

基础 研究

- 240 反义c-myc寡核苷酸对转染FHIT基因胃癌细胞MKN28的影响
刘晓宇, 郭淦华, 段晓明, 陈建, 曹建国, 贺修胜
- 246 PAI-1在大鼠胆汁淤积性肝纤维化形成中的动态变化
安德明, 季光, 郑培永
- 253 甲珠对肝纤维化大鼠 α -SMA和TGF- β 1表达的影响
付德才, 杨世忠, 孙钰玮, 于春艳, 毛丽珍, 姜相莲, 关瑞锋
- 259 经门静脉骨髓基质细胞移植治疗肝纤维化
郑进方, 吴昌雄, 陈劲松, 张震生, 肖占祥, 邢贻雷, 周开伦, 梁力建
- 265 克隆与健脾益气法有关的大鼠肝癌新基因
管冬元, 方肇勤, 朱希, 吴中华, 张辉
- 272 芪榔合剂对慢性传输型便秘小鼠结肠SP、VIP的影响
李勇, 王健, 李毅平, 胡晔, 汤健, 余莉芳

临床 研究

- 277 应用蛋白指纹图谱技术筛选原发性胆汁性肝硬化患者血清特异性标志物
胡朝军, 李永哲, 赵冠飞, 李宁, 许洋, 佟大伟, 张蜀澜

文 献 综 述

- 284 肝纤维化的基因治疗
刘娜, 张晓岚
- 289 抗肝纤维化中医治则的临床研究进展
陈俊荣, 陈俊红, 侯振江
- 292 重症急性胰腺炎的循证临床进展
唐文富, 万美华
- 299 重症急性胰腺炎并发肺损伤的研究进展
张喜平, 吴承钧, 李志军

研究 快报

- 307 血管内皮生长因子165基因对人胃癌细胞凋亡的影响及机制
欧希龙, 关云艳, 颜芳, 孙为豪, 杨柳, 陈国胜
- 311 微米大黄炭对大鼠血小板功能及纤溶活性的影响
时昭红, 张书, 郝建军, 王日权

临 床 经 验

- 314 胃癌手术治疗前后血清蛋白质谱变异性研究
任宏, 杜宁, 张靖, 姚佳, 石景森
- 319 非酒精性脂肪肝病糖代谢异常与超敏C反应蛋白的关系
张炜, 范钰, 朱丽群, 程兆明
- 322 I型自身免疫性肝炎分析102例
弓艳霞, 王邦茂
- 326 布地奈德和传统糖皮质激素直肠用药治疗远端溃疡性结直肠炎
黄美兰, 冉志华, 童锦禄, 陆丽华, 萧树东
- 332 Peutz-Jeghers综合征合并肿瘤分析26例
吴绍新, 林军

	<p>335 肿瘤患者血清IAP、T细胞亚群和NK与抑郁之间的关系 李荣, 王杰军, 钱建新, 顾小强</p> <p>338 中国腹茧症14年流行病学特征 邱法波, 张圣林, 张顺, 张斌, 卢云, 崔鹏</p>
致 谢	342 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>239 <i>WCJD</i>和<i>WJG</i>即将开始实行网络版文章与该文章发表前纪录的链接</p> <p>252 <i>WCJD</i>和<i>WJG</i> 2008年对作者贡献分布将开始实行公开策略</p> <p>264 欢迎订阅2008年《世界华人消化杂志》</p> <p>271 中国科技期刊引证报告(核心版)发布<i>WJG</i> 2006年影响因子0.834</p> <p>276 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志2006年影响因子0.373</p> <p>283 世界华人消化杂志关于作者署名的声明</p> <p>298 世界华人消化杂志的同行评价</p> <p>306 世界华人消化杂志个性化服务订购活动</p> <p>318 世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版</p> <p>321 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</p> <p>334 <i>WJG</i> 2007年1-12月份收稿及发稿数字统计结果</p> <p>337 世界华人消化杂志在线办公系统</p>
封面故事	<p>李勇, 王健, 李毅平, 胡晔, 汤健, 余莉芳. 芪榔合剂对慢性传输型便秘小鼠结肠SP、VIP的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 272-276 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/272.asp</p>
本期责任人	<p>编务 江艳; 送审编辑 程剑侠; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 王先林; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

<div>世界华人消化杂志</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</div> <div>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-01-28 原刊名 新消化病学杂志</div> <div>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</div>	<div>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</div> <div>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</div> <div>印刷 北京科信印刷厂</div> <div>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)</div> <div>订购 全国各地邮电局</div> <div>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</div>	<div>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.</div> <div>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.</div> <div>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.</div> <div>2008年版权归世界华人消化杂志所有</div>		
中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号 82-262	国外代号 M 4481	国内定价 每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

January 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 3

EDITORIAL	<p>229 Cryosurgery for hepatocellular carcinoma <i>Xu KC, Niu LZ</i></p> <p>236 Status quo of endoscopic management in chronic pancreatitis <i>Wang LW, Li ZS</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>240 Effect of anti-sense c-myc oligodeoxynucleotide on MKN28 gastric cancer cells transfected with FHIT gene <i>Liu XY, Guo GH, Duan XM, Chen J, Cao JG, He XS</i></p> <p>246 Dynamic changes of plasminogen activator inhibitor-1 in the process of cholestatic liver fibrosis in rats <i>An DM, Ji G, Zheng PY</i></p> <p>253 Effect of Jiazhu on α-SMA and TGF-β1 expression in rats with hepatic fibrosis <i>Fu DC, Yang SZ, Sun YW, Yu CY, Mao LZ, Jiang XL, Guan RF</i></p> <p>259 Intra-portal transplantation of bone marrow stromal cells ameliorates liver fibrosis in mice <i>Zheng JF, Wu CX, Chen JS, Zhang ZS, Xiao ZX, Xing YL, Zhou KL, Liang LJ</i></p> <p>265 Cloning of novel hepatoma gene in rats by invigorating the spleen to supplement Qi <i>Guan DY, Fang ZQ, Zhu X, Wu ZH, Zhang H</i></p> <p>272 Effect of Qilang Decoction on substance P and vasoactive intestine polypeptide in the mucous enteric nervous system <i>Li Y, Wang J, Li YP, Hu Y, Tang J, Yu LF</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>277 Screening for specific biomarkers in serum for diagnosis of primary biliary cirrhosis using proteomic fingerprint technology <i>Hu CJ, Li YZ, Zhao GF, Li N, Xu Y, Tong DW, Zhang SL</i></p>
REVIEW	<p>284 Gene therapy for hepatic fibrosis <i>Liu N, Zhang XL</i></p> <p>289 Progress in treatment of liver fibrosis with traditional Chinese medicine <i>Chen JR, Chen JH, Hou ZJ</i></p> <p>292 Progress in evidence-based medicine for treatment of severe acute pancreatitis <i>Tang WF, Wan MH</i></p> <p>299 Advances in research of severe acute pancreatitis complicated by lung injury <i>Zhang XP, Wu CJ, Li ZJ</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>307 Effect of vascular endothelial growth factor 165 on apoptosis of human gastric carcinoma cells <i>in vitro</i> and its mechanism <i>Ou XL, Guan YY, Yan F, Sun WH, Yang L, Chen GS</i></p> <p>311 Effects of micron rhubarb charcoal on the platelet function and fibrinolytic activity in rats <i>Shi ZH, Zhang S, Hao JJ, Wang RQ</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>314 Variabilities of serum proteomic spectra in patients with gastric cancer before and after operation <i>Ren H, Du N, Zhang J, Yao J, Shi JS</i></p>

	<p>319 Relationship between abnormal glycometabolism and ultra-sensitive C-reactive protein in non-alcoholic fatty liver <i>Zhang W, Fan Y, Zhu LQ, Cheng ZM</i></p> <p>322 Type I autoimmune hepatitis: an analysis of 102 cases <i>Gong YX, Wang BM</i></p> <p>326 Effects of topical administration of budesonide and traditional glucocorticosteroids on active distal ulcerative colitis or proctitis <i>Huang ML, Ran ZH, Tong JL, Lu LH, Xiao SD</i></p> <p>332 Peutz-Jeghers syndrome with tumors: an analysis of 26 cases <i>Wu SX, Lin J</i></p> <p>335 Relationship between depression and serum immunosuppressive acidic protein, subpopulation of T lymphocytes and natural killer cells in cancer patients <i>Li R, Wang JJ, Qian JX, Gu XQ</i></p> <p>338 Epidemiology of abdominal cocoon in China during the past 14 years <i>Qiu FB, Zhang SL, Zhang S, Zhang B, Lu Y, Cui P</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	342 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Li Y, Wang J, Li YP, Hu Y, Tang J, Yu LF.</i> Effect of Qilang Decoction on substance P and vasoactive intestine polypeptide in the mucous enteric nervous system. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2008; 16(3): 272-276</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/272.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jian-Xia Cheng</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i></p> <p>Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Xian-Lin Wang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i></p> <p>Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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 January 28, 2008

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

肝癌的冷冻治疗

徐克成, 牛立志

徐克成, 牛立志, 广州复大肿瘤医院肿瘤冷冻治疗中心 广东省广州市 510300

徐克成, 1963年南通医学院本科毕业, 主要从事消化病(肝病)临床研究。

作者贡献分布: 徐克成和牛立志对此文贡献均等, 两人共同设计, 牛立志负责肝癌临床冷冻治疗的实施, 徐克成负责临床指导和文章写作。

通讯作者: 徐克成, 510300, 广州市新港西路167号, 广州复大肿瘤医院. xukc@vip.163.com

电话: 020-84196175 传真: 020-84195515

收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-11-30

Cryosurgery for hepatocellular carcinoma

Ke-Cheng Xu, Li-Zhi Niu

Ke-Cheng Xu, Li-Zhi Niu, Cryosurgery Center for Cancer, Guangzhou Fuda Cancer Hospital, Guangzhou 510300, Guangdong Province, China

Correspondence to: Ke-Cheng Xu, Guangzhou Fuda Cancer Hospital, 167 Xingang Western Road, Guangzhou 510300, Guangdong Province, China. xukc@vip.163.com

Received: 2007-05-18 Revised: 2007-11-30

Abstract

Cryosurgery is an important treatment modality for unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). There are different forms of cryosurgery for HCC including intraoperative cryoablation with or without excision, laparoscopic liver cryosurgery, percutaneous liver cryoablation under the guidance of ultrasonography, CT or MRI. Cryoablation, as a local therapy for HCC, has certain advantages over other forms of treatment. It is able to destroy only tumor tissue in the liver while sparing more noninvolved tissues. Tumors close to the vessel systems can safely undergo cryoablation due to the warming effect of circulating blood in large blood vessels. Liver cryoablation is more effective than surgical resection for multiple liver tumors. Cryosurgery in combination with transarterial chemoembolization (TACE), alcohol injection or ¹²⁵Iodine seed implantation has a complementary efficacy. Clinically, cryosurgery for HCC is performed according to the following principles. Intraoperative or percutaneous cryosurgery may be performed for liver tumors < 5 cm or ≤ 3 cm, TACE for liver tumors > 5 cm followed by percutaneous cryosurgery. Liver tumors > 5

cm with an irregular margin, may also undergo intraoperative or percutaneous cryosurgery followed by alcohol injection or ¹²⁵Iodine seed implantation in the margins of tumors.

Key Words: Cryosurgery; Hepatocellular carcinoma

Xu KC, Niu LZ. Cryosurgery for hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 229-235

摘要

冷冻疗法已成为治疗不能手术切除肝癌的重要手段。冷冻方法可选择手术中冷冻, 切除或不切除肿瘤、腹腔镜下冷冻, 或在超声、CT或MRI监测下, 经皮冷冻。作为一局部治疗, 冷冻具有超越其他治疗方法的若干优点: 仅消融肝内肿瘤组织, 而少伤及正常组织; 由于大血管流动血流的温热作用, 冷冻可安全地治疗临近大血管的肝肿瘤; 冷冻比之手术更适宜治疗肝多发性肿瘤。冷冻联合肝动脉化学栓塞(TACE)、酒精注射或¹²⁵碘粒子植入, 有相辅相成的作用。对于冷冻在肝癌治疗中应用, 可归结如下: (1)小于5 cm, 尤其小于3 cm的肝癌, 数目不超过3个, 可以手术中冷冻或经皮冷冻。(2)大于5 cm的肝癌, 先作TACE, 再给予经皮冷冻。(3)大于5 cm, 边缘不整, 预计冷冻不完全的肝癌, 可予手术中或经皮冷冻, 同时在冷冻区周边部注射酒精或植入¹²⁵碘粒子。

关键词: 冷冻疗法; 肝肿瘤

徐克成, 牛立志. 肝癌的冷冻治疗. *世界华人消化杂志* 2008; 16(3): 229-235

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/229.asp>

0 引言

原发性肝癌的首选治疗是手术切除, 术后5年生存率30%-40%, 但只有10%左右的肝癌能得以手术切除。肝移植在选择性病例中可取得良好效果, 但也只适用于小肝癌, 肿瘤超过3 cm或有3个以上瘤结节者, 移植后效果不佳。近年来微创消融技术应用用于肝癌治疗, 这些方法包括化学消融(酒精和醋酸)、热消融(射频, 微波和超声)和

■背景资料

原发性肝癌的首选治疗是手术切除, 但只有一少部分肝癌能得以手术切除。肝移植在选择病例中可取得良好效果, 但也只适用于小肝癌, 肿瘤超过3 cm或有3个以上瘤结节者, 移植效果不佳。目前冷冻疗法已成为治疗不能手术切除的肝癌的重要手段。

■同行评议者

秦华东, 教授, 黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

■研究前沿

冷冻疗法是一种原位肿瘤消融手段,与手术切除相比较,冷冻治疗更具有优点。

冷消融^[1]

1970年德国Stucke和Hirte^[2]首先介绍冷冻治疗肝恶性肿瘤。1976年Ikeda^[3]在实验研究中发现冷冻肝肿瘤后出现对远隔病变的免疫反应。随后,包括我国在内许多国家相继应用冷冻治疗肝肿瘤^[4-6]。目前,冷冻疗法已成为治疗不能手术切除的肝癌的重要手段。据Siefert *et al*^[4]在1988年统计,全世界有72个单位应用冷冻技术,共治疗肝癌2173例。我们对2001-03/2006-10共1030例肝癌患者作了冷冻治疗,其中原发性肝癌710例,继发性肝癌320例,多数采用经皮途径完成^[6]。本文主要介绍原发性肝细胞癌冷冻治疗。

1 病例选择

冷冻疗法主要适用于不能手术切除的肝癌患者。选择病例时应考虑以下几点^[6-7]:(1)肝内肿瘤因为瘤块过大,邻近大血管、胆管或重要脏器,或呈多发性分布难以手术切除者和由于肝储备功能不良难以耐受手术者,可考虑作手术中或经皮冷冻治疗。(2)与手术切除联合应用,以求完全清除癌组织。(3)肝内肿瘤十分邻近肝内胆管汇合部患者,不适合冷冻治疗,但对邻近大血管(如肝动脉和门静脉)的肿瘤,由于血液的温热作用,冷冻一般不会伤及血管壁,因此可谨慎地进行冷冻治疗。(4)肝内肿瘤范围超过全肝50%者,不适宜作冷冻治疗。(5)有腹水存在者,应先消除腹水,再考虑冷冻治疗。对肝储备功能较差者,应主要考虑作经皮或经腹腔镜冷冻,而不宜作剖腹冷冻。(6)有肝外转移患者,一般不宜作冷冻治疗。但如转移灶数目不多或仅于一处(如肺),可同时作转移灶冷冻治疗。

2 冷冻方法

取决于肝癌的部位和大小,患者肝功能和全身状态,以及术者的技术和设备条件。冷冻方法可选择^[4]:(1)手术中冷冻:对肿瘤先冷冻,再切除,或仅冷冻而不予切除^[7-8]。(2)经皮冷冻:在超声、CT或MRI引导下,经皮穿刺插入冷冻探针,将肝内肿瘤消融^[9-10]。对于位于肝上部,邻近下腔静脉、肝静脉和膈肌的肝癌,经腹途径常不易显露病变,可取经胸途径^[11]。(3)腹腔镜下肝冷冻治疗:在腹腔镜直视下将肝内肿瘤部分或全部予以冷冻^[12-14]。

冷冻过程中必须密切监测温度和冰球的演变。氩氦冷冻系统冷冻探针头部设有温差电偶,开机后即显示温度,可进行动态监测整个冷、

热循环治疗的过程,同时配备有4支外接温差电偶,长约12 cm,可插入肿瘤周边区,实时监控温度变化。要求靶区温度应低于-40℃。

冷冻治疗开始后,在超声上出现以探针为中心的向外逐渐扩大的强回声团;随着冰球快速的增大,出现一结石样强回声半月形光环,其后有大片的无回声区声影。组织学显示,上缘强回声半月形光环反映为靶组织完全结冰,发生冷冻坏死^[15-16]。

停止冷冻,自然复温或氦气复温时,随着整个冰球全部溶解,结石样回声由内向外逐渐消失,形成一个低密度的回声区,其周围与正常组织之间有明显的暗环。经过2个轮回冷冻-复温治疗后,肿瘤区外围与正常组织交界处的暗环更为明显。

应用彩色多普勒血流显像(CDFI)可监视肝肿瘤局部血流的变化。原发或转移性肝癌的血供90%-95%来自肝动脉,CDFI不仅可以观察正常肝脏血管的走向、分布,而且可以检测出异常的血管,特别是肿瘤血管。原发性肝癌的CDFI特点是:彩色血流可呈提蓝状,包绕癌瘤,伸向瘤内或呈散状彩点分布,动脉和门静脉血流流速加快。冷冻治疗时随着冰球扩展到整个癌瘤,可见瘤体外围的彩色血流逐渐减慢以至全部消失。治疗后局部CDFI示血流消失为肿瘤灭活的重要指标之一。

近年来,随着介入MRI技术的发展,临床上应用MRI引导作肝癌经皮冷冻治疗。与超声仅显示冰球前部,后部因声影不能显示不同,MRI能显示冰球的全部轮廓^[17]。但由于费用昂贵,且操作较复杂,目前尚未能推广应用。

3 冷冻后处理

定期检查肿瘤标记(如AFP、CEA)和超声、CT,以了解有无肿瘤复发。必须指出的是,肝癌冷冻后的CT表现可类似于肝脓肿或梗塞,需仔细鉴别,以避免将治疗后正常的表现误认为并发症。在平扫CT或MRI上,冷冻区显示出较原肿瘤区稍大(覆盖肿瘤区)的低密度或低信号区域,增强扫描后局部无强化,提示肿瘤坏死。按Kuszyk *et al*^[18]统计,经冷冻治疗的病变,CT上主要表现为低密度,54%呈楔形,29%呈圆形,21%呈泪滴形,36%含有气体,93%内有出血,静脉造影后54%的病灶显示外周性增强影。

4 临床报道

4.1 单纯冷冻治疗 剖腹冷冻治疗肝细胞癌的资料较多^[19-23]。Shafir *et al*^[19]于1996年报告39例肝

癌接受冷冻治疗, 其中结直肠癌肝转移25例, 肝细胞癌4例, 在平均随访期14 mo内, 所有接受完全性冷冻治疗的病例均生存, 其中51%的病例无病生存。Crews *et al*^[8]报告40例肝恶性肿瘤经开放性冷冻治疗后, 存活率18 mo的肝细胞癌患者占60%, 结直肠癌肝转移患者占30%。Adam *et al*^[24]评价了34例不能切除性肝细胞癌和结直肠癌肝转移患者冷冻治疗的结果。无术中死亡。在平均随访期16 mo内, 局部复发率在肝细胞癌为0%, 在结直肠癌肝转移为44%, 2年累积生存率分别为63%和52%, 分别有67%和20%的病例无疾病证据。Lam *et al*^[9]应用冷冻疗法治疗根治性肝切除后复发的肝细胞癌患者4例, 在12-23 mo的随访期内均生存。Sheen *et al*^[25]报告57例恶性肝肿瘤患者接受冷冻治疗, 其中一组41例结直肠癌肝转移, 另一组16例非结直肠癌转移性肝肿瘤(内5例肝细胞癌)。2组治疗后中位存活期分别为22和37 mo。Wren *et al*^[26]认为冷冻疗法主要作为肝癌的姑息治疗, 但在选择性病例中可达到治愈目的。12例伴肝硬化的肝细胞癌患者(II期2例, III期1例, IV-A期7例, IV-B期2例)接受冷冻治疗, 在冷冻治疗后平均存活期为19 mo, 在作出诊断后为29 mo。3例在冷冻后平均17 mo死于复发, 4例在冷冻后19 mo、诊断后38 mo复发, 但仍生存, 2例II期患者分别在冷冻治疗后10和32 mo仍无复发。Rehrig *et al*^[27]报告24例肝细胞癌接受冷冻治疗, 其中6例为原发性, 18例为继发性, 在中位随访期33.7±6.8 mo, 总存活率为46%。Bilchik *et al*^[28]报告40例肝恶性肿瘤接受手术中冷冻治疗, 其中结直肠癌肝转移27例, 肝细胞癌8例。这些患者接受冷冻治疗的原因是肿瘤位于两叶或中心区、肝功能储备差、有其他疾病或肝楔形切除后切缘有癌肿残余。术后18 mo存活率在肝细胞癌患者为60%, 结直肠癌肝转移患者为30%。9例在平均17.7 mo的随访期内无疾病证据。Kosowski *et al*^[29]对8例肝细胞癌和25例转移性肝癌作冷冻治疗。13例的肿瘤为单个, 其余为多发性。术后冷冻相关性并发症不超过9%, 总死亡率3%。Jungraithmayr *et al*^[30]对19例不能手术切除的肝癌患者进行冷冻治疗和冷冻加手术切除。术后1年内27.3%的患者仍无复发生存, 中位生存期21 mo, 1和3年生存率分别为62.5%和15.8%。Kerkar *et al*^[31]回顾性分析98例肝癌(其中包括肝细胞癌14例)接受冷冻治疗的转规, 1、2、3和5年总生存率分别为81%、62%、48%和28%, 中位生存期33 mo, 无肝复发生存率分别为76%、

肿瘤大小	n	存活率(%)			
		1年	2年	3年	4年
< 5 cm	8	100.0	100.0	62.5	62.5
5-10 cm	104	89.4	69.2	54.8	46.2
>10 cm	40	70.0	49.5	37.5	27.5
总数	152	86.4	72.9	51.6	45.4

42%、24%和16%, 中位无肝复发生存期为20 mo; 冷冻病变的复发率5%。

Zhou *et al*^[32]1998年报告接受手术中冷冻治疗的235例肝细胞癌患者, 1、3、5年生存率分别为78.4%、54.1%和39.8%, 其5年生存率与一般报告的肝切除后5年生存率(41.3%)几乎无差别。2005年周信达 *et al*^[33]又报告对84例接受冷冻切除的肝癌患者随访结果。无手术死亡和严重并发症发生, 1、3和5年生存率分别为98.7%、83.9%和64.0%, 复发率分别为15.1%、30.1%和39.0%。Cha *et al*^[34]发现单纯冷冻和冷冻加手术切除的效果无差异。他们在38例不能切除的肝癌患者比较了两种治疗方式。结果显示: 1、2和4年总生存率分别为82%、65%和54%, 4年生存率在单纯冷冻组为64%, 冷冻加切除组为42%, 45 mo无病生存率分别为25%和36%, 局部复发率分别为12%和11%, 两组均无明显差异。

近年来, 经皮冷冻治疗肝癌已积累了较丰富经验。Nakazaki *et al*^[35]报告10例肝细胞癌和5例结直肠癌肝转移患者接受经皮冷冻治疗, 所有病例的肿瘤均小于3 cm。结果显示病变呈完全反应者(CR)6例, 部份反应者(PR)5例, 无变化者(NC)2例, 进展者(PD)2例。

2001-03/2005-03徐克成 *et al*^[6]对550例肝细胞癌作了经皮冷冻治疗, 其中152例单独接受冷冻治疗, 并随访4年。经临床评价, 这些病例的肿瘤均为不可手术切除性。1、2、3和4年生存率分别为86.4%、72.9%、51.6%和45.4%, 肿瘤小于5 cm的患者存活率高于大于5 cm的患者(表1)。这一结果与Zhou *et al*^[32-33]报告的开放性冷冻治疗的结果相似。

4.2 冷冻和肝动脉化学栓塞联合治疗 肝动脉化学栓塞(TACE)可使肝癌瘤块缩小。先予TACE, 待肿瘤缩小后再予冷冻, 可扩大冷冻有效范围, 提高冷冻效率, 减少复发。

Clavien *et al*^[36]报道15例不能切除性肝癌患者接受TACE和冷冻联合治疗, 所有病例均伴有肝硬化。除1例外, 全部病例在冷冻治疗前均接

■ 相关报道

报道称, 射频消融与手术切除或冷冻治疗联合应用, 与单用射频治疗相比, 可减少出血和血小板减少等并发症发生, 缩短住院时间。

■应用要点

对于不能切除的肝癌,无论是原发性或继发性,微创治疗是一可替代手术的重要选择,其中以冷冻疗法最受关注,因为他不仅能治疗小肝癌,而且对大肝癌和邻近大血管的肝癌也适用。

受一次或几次TACE,未作TACE的1例患者在冷冻治疗后发生出血被迫再次接受手术。在平均随访期2.5年内,3例出现肝癌复发,13例均生存,最长者已生存5年,实际5年存活率为79%。

Qian *et al*^[37]报道34例原发性和转移性肝癌接受TACE-经皮冷冻治疗,在3-15 mo随访期内,41.1%的患者被认为获得临床治愈,表现为肿瘤标志物降至正常,CT/MRI显示肿瘤完全坏死。

2001-03/2004-06,我们对360例肝细胞癌患者作了TACE-冷冻序贯治疗^[38]。肝内肿瘤均大于5 cm,220例的肿瘤为单发,其余为多发,但数目不超过5个。所有病例经过详细评价被认为是肿瘤不可切除。TACE后2 wk检查CT,观察有无肿瘤缩小,如无缩小,再作1-2次TACE。冷冻治疗系在超声或CT引导下经皮完成。随访期6-36(中位21) mo。在随访期,超声和/或CT显示肿瘤CR者30例(8.3%),PR者228例(63.3%),NC者66例(18.3%),PD者36例(10.0%)。治疗前AFP升高者229例,治疗后86.9%的病例AFP明显降低或降至正常范围。在取得CR和PR的病例中,26.7%有肝内复发,但仅15.9%复发出现在冷冻部位。

4.3 冷冻与酒精注射联合治疗 经皮酒精注射是治疗小肝癌的方法,冷冻治疗肝癌的主要问题是冷冻区周边部难以彻底消融。在冷冻区边缘注射酒精,可弥补此缺陷。

Wong *et al*^[39]对12例肝癌患者先作超声引导下冷冻治疗,术后检查如有肿瘤复发或残存肿瘤,则给予酒精注射。全组病例1年存活率为50%,2年存活率30%。有1例患者治疗前肝癌大小达8 cm,治疗后无瘤生存已3年,另一例治疗前肿瘤大小13 cm,治疗后无瘤生存已2.5年。该2例肝癌均处于IV-A期(按TNM分期系统)。

2001/03-2003/01,我们对65例肝癌作了经皮冷冻治疗^[10,40]。其中,36例肿瘤大小超过6 cm。对这些患者,在给予经皮冷冻治疗后1-2 wk,于肿瘤边缘部注射无水酒精。在5-21(平均14) mo的随访期内,33例(50.8%)无瘤生存,22例(33.8%)生存,但出现复发,其中2例发生骨转移,3例肺转移,余17例肝内复发,但仅3例复发发生于原冷冻部位。此种低原位复发率,显然与酒精注射联合治疗有关。

4.4 冷冻联合¹²⁵碘粒子植入治疗 ¹²⁵碘粒子放射短程射线,较持久照射局部瘤组织。在冷冻区边缘和因特殊解剖位置无法有效冷冻的部位,植入¹²⁵碘粒子,也可弥补冷冻的不足,提高疗效。徐克成 *et al*^[6]对61例肝癌患者(男46例,女15例,年

龄28-78(中位41)岁,原发性43例,转移性18例),在冷冻的同时或稍后于冷冻区周边部埋置¹²⁵碘粒子,平均每例植入粒子29粒。41例接受随访18-42 mo,1、2和3年存活率分别为78%、65%和54%。

4.5 不良反应 肝冷冻治疗的不良反应总发生率为15%-20%,低于肝切除后的20%-30%。冷冻相关死亡率为1.5%^[41-42],与肝切除后相当,但接受肝冷冻者常为不适宜作肝切除者,这些患者在冷冻前即已处于较严重的基础状态。

1999年Seifert *et al*^[41]对应用冷冻疗法的299家中心发出询问,有134家作了回答。其中108家来自美国和加拿大,18家来自欧洲,5家来自亚洲和澳洲。72家中心共作肝冷冻治疗2173例,其中21例并发冷休克。该21例中,15例伴急性肾衰竭,12例伴急性呼吸窘迫综合征,8例伴弥漫性血管内凝血,13例伴血小板减少,6例伴肝衰竭,10例伴低血压休克,死亡6例。在22家中心中,每家至少有一例肝冷冻后死亡。在2173例接受肝冷冻患者中,死亡33例(1.5%)。死亡病例中20%以上是由于急性心肌梗死,在冷冻时可发生严重心律不齐,此可能与冷冻邻近下腔静脉的肿瘤时回心血流被降温,或细胞溶解后暂时性高血钾有关,坏死组织也可能释放能促发心肌梗死的某种物质。

肝冷冻治疗后常出现血小板降低。Pistorius *et al*^[43]观察了6例肝癌冷冻治疗后血小板变化,发现术后即开始下降,2 d后降至术前一半水平,第5天后逐渐上升,第10天恢复正常。血小板减少可导致血凝固异常、出血等并发症。处理在于密切观察,对症治疗,必要时输注血小板。

血小板减少的机制尚不完全清楚。已知血小板降低程度与冷冻损伤范围有明显相关性,因此目前认为冷冻本身是导致血小板减少的主要原因。Pistorius *et al*^[43]给患者冷冻前静脉注射核素铟(indium)标记的血小板,发现全身血小板放射性半减期为 1.4 ± 0.2 d,明显短于未作冷冻治疗的病例(2.4 d),血小板平均寿命为 3.0 ± 0.3 d,也短于对照组(5.2 d)。应用伽玛照相机全身扫描,显示肝及冷冻区域内血小板过量积聚,表现为肝(包括冷冻区)/脾放射性比率明显高于未冷冻的对照组。将MRI扫描图和伽玛照相图结合起来分析,发现冷冻区域容量占全肝的 $8.3\% \pm 1.3\%$,而冷冻区域放射性相当于非冷冻区域全部放射性,如按每单位容量计算,则冷冻区域血小板积聚量是肝内非冷冻区域的10

倍. 上述研究结果提示, 肝冷冻治疗后血小板减少是由于肝内冷冻区域大量摄取及破坏血小板所致.

徐克成 *et al*^[6]曾分析1500例接受经皮冷冻治疗者发生的不良反应, 其中320例接受了肝冷冻治疗. 5例死亡, 治疗相关死亡率1.5%, 如除外寒战发热、肝区疼痛、血清酶升高和血小板减少等不良反应, 严重或较严重不良反应发生率为11.3%(表2).

5 讨论

5.1 冷冻疗法治疗肝癌的优点 冷冻疗法是一原位肿瘤消融手段, 与手术切除相比较, 冷冻治疗肝癌具有若干优点^[19,28,44]: (1)仅破坏肿瘤组织, 而不伤及或较少伤及非肿瘤组织, 这对肝细胞癌患者极为重要, 因为这些患者多数伴有肝硬化, 肝储备功能受损. (2)由于流动血流的温热效应, 如下腔静脉和门静脉等大血管能耐受冷冻, 因此, 邻近这些血管的肿瘤可安全地被冷冻治疗, 而手术切除这些部位的肿瘤常常甚为困难. (3)肝细胞癌常发生在肝硬化基础上, 由于肝硬化常累及全肝, 因此癌肿常为多发性, 对此种肝癌, 冷冻治疗比之手术切除更为可行.

5.2 不同冷冻途径的比较 肝癌冷冻途径有术中、腹腔镜下和经皮穿刺几种, 各有优缺点^[45]. 早先多采用开腹手术冷冻, 其优点是可准确进行冷冻, 同时可切除肿瘤, 且能探查腹腔内其他脏器. 在手术切除肿瘤后对切缘进行冷冻可显著减少局部复发率^[46]. 但需全身麻醉, 对患者侵袭性大, 不适用于全身和肝功能状况较差的患者; 腹腔镜下冷冻侵袭性相对较小, 也可探查腹腔其他脏器, 但仅适用于治疗肝表面尤其肝下表面的肿瘤, 难以同时应用多根探针冷冻; 经皮冷冻对患者侵袭小, 无需全身麻醉, 如能充分应用超声、CT或MRI监测, 也能准确地对靶组织进行冷冻, 可根据肿瘤大小, 同时应用多根探针冷冻, 且可反复冷冻, 适合肿瘤复发后再次治疗. 按国内经验, 经皮冷冻的患者存活期基本与手术冷冻的患者相似, 但不能探查腹腔内其他病变, 对肝下表面的肿瘤, 经皮冷冻不易达到完全消融目的, 且易并发癌结节破裂和出血, 对此种肿瘤, 以手术冷冻为宜.

对于肝上部, 邻近下腹静脉、肝静脉和横膈的肝肿瘤, 尤其对以前作过肝切除的残肝内肿瘤, 可经胸腔途径进行手术中冷冻. Stella *et al*^[11]用此法治疗复发性不能切除性结直肠肝转移13

表 2 320例患者经皮肝冷冻治疗的不良反应

不良反应	n	%	转归
寒战发热	81	25.3	对症处理后改善
肝区疼痛	24	7.50	对症处理后消失
血清酶升高	286	89.38	2-3 wk后降低
腹腔出血	11	3.44	9例经保守治疗的停止, 2例手术止血
肝破裂	3	0.94	2例死亡
肝衰竭 ¹	4	1.25	3例死亡
胸腔渗液	15	4.69	经穿刺放液后, 全部吸收
胆漏	1	0.31	引流后治愈
肝脓肿	2	0.63	抗感染和引流后治愈
血小板减少	32	10	5例输血小板, 其余对症处理, 均恢复

¹指血清胆红素升高超过正常1倍、凝血酶原时间延长3 s以上、肝性脑病.

例, 共治疗17个肿瘤, 无一例手术死亡, 3例出现微小并发症, 中位住院日10 d, 冷冻治疗后, 3年存活率60%, 5年存活率58%.

5.3 肝冷冻和肿瘤播散 曾有人顾虑肝冷冻会促发肝癌播散. 但进一步研究证明这种顾虑是不必要的, 这是因为冷冻速度极快, 可迅速将癌细胞固定和附近微血管内血液冻凝, 从而阻止癌细胞脱落和扩散, 是为冷固定(cryosolidification). El-Shakhs *et al*^[47]作了以下实验: 将鼠结肠癌细胞直接注入鼠肝内, 制造实验性肝癌. 对照鼠在4-6 wk后被处死. 治疗组在诱发肿瘤后2 wk接受冷冻治疗, 再2-4 wk后被处死. 对照组中75%(9/12)发生肺转移, 而治疗组中仅38%(6/16)发生肺转移; 腹腔种植发生率在两组分别为42%和50%. 这一结果说明肝冷冻不会促发癌转移. Allen *et al*^[48]的实验也显示冷冻不会促进肝内残余肿瘤生长. 给鼠左肝植入肿瘤块, 14 d后给予肝切除或冷冻处理, 然后从门静脉注入肿瘤细胞, 观察肿瘤在肝内种植情况. 结果显示: 冷冻组肝内肿瘤结节(115±38)明显少于切除组(278±74, $P=0.04$).

有人根据一些实验结果, 对肝癌治疗采用手术切除或冷冻孰优孰劣提出质疑. Jacob *et al*^[49]报告实质性肝肿瘤鼠, 冷冻治疗后存活率高于接受肝切除鼠. 有认为肝切除可损害Kupffer细胞功能, 抑制全身免疫^[50], 而冷冻治疗后留在原位的瘤组织坏死后, 释放抗原, 可激发机体抗肿瘤免疫. 部分肝切除后肝产生生长因子, 血中纤维生长因子(FGF)水平升高, 而冷冻后无此现象. 由此设想, 也许冷冻比手术切除更适合肝癌的

■同行评价

本文临床资料较多, 数据丰富, 是一篇难得的好文章.

治疗,至少在手术中包含冷冻,可能对提高患者存活率有益。

5.4 射频消融与冷冻治疗的比较 某些学者评价了射频消融对不能切除性肝癌的治疗价值,认为比冷冻治疗更为安全。Pearson *et al*^[51]报告并发症发生率在冷冻治疗后为40.7%,而射频治疗后仅3.3%,早期局部复发也较多见于冷冻治疗后。但多数学者认为冷冻与射频消融两者均是安全的,易为患者耐受的治疗手段。局部肿瘤清除的有效性取决于许多因素,包括肿瘤大小、数目、部位和类型,到底选择哪一种治疗往往取决于使用者的经验和习惯。事实上,两者各有优缺点。射频消融治疗肝癌有肯定效果,也较安全,但仅限于治疗小肿瘤(<3 cm),而冷冻则可用于治疗较大的不能切除性肝癌。Bilchik *et al*^[52]在308例不能手术切除的肝肿瘤比较了两种治疗手段。对大于3 cm的肿瘤中位消融时间如用射频为60 min,如用冷冻则为15 min;局部复发率也以射频治疗的病例为多(38% *vs* 17%)。有报告射频消融与手术切除或冷冻治疗联合应用,与单用射频治疗相比,可减少出血和血小板减少等并发症发生,缩短住院时间。

6 结论

对于不能切除的肝癌,无论是原发性或继发性,微创治疗是一可替代手术的重要选择,其中以冷冻疗法最受关注,因为他不仅能治疗小肝癌,对大肝癌和邻近大血管的肝癌均适用。冷冻疗法可在手术中应用,也可经腹腔镜或经皮穿刺完成治疗过程。在超声或CT引导下,经皮冷冻消融治疗不能切除性肝癌,可获得类似于手术中冷消融所取得的存活率。冷冻与其他疗法如TACE、酒精注射和¹²⁵碘粒子植入联合应用可提高疗效。冷冻治疗的不良反应主要有出血和肝破裂,但如能仔细掌握适应证,在超声或CT监视下精细操作,多能避免严重并发症发生。

对于冷冻疗法在肝癌治疗中应用,可归结为以下: (1)小于5 cm,尤其小于3 cm的肝癌,数目不超过3个,可以手术中冷冻或经皮冷冻。(2)大于5 cm的肝癌,先作TACE 1-2次,再给予经皮冷冻。(3)大于5 cm,边缘不整,预计冷冻不完全的肝癌,可予手术中冷冻,切除或不切除肿瘤,或给予经皮冷冻,同时在冷冻区周边部注射酒精或植入¹²⁵碘粒子。(4)伴门静脉癌栓的肝癌,给予经皮冷冻,门静脉内植入¹²⁵碘粒子。

参考文献

- 徐克成, 江石湖. 消化病现代治疗. 第1版. 上海: 上海科技教育出版社, 2001: 345-359
- Stucke K, Hirte D. Cryosurgery of malignant liver tumors. *Acta Hepatosplenol* 1970; 17: 416-422
- Ikeda K. Immune response of distant lesions following cryosurgery in the experimental tumor system. *Fukushima J Med Sci* 1976; 23: 45-67
- Seifert JK, Junginger T, Morris DL. A collective review of the world literature on hepatic cryotherapy. *J R Coll Surg Edinb* 1998; 43: 141-154
- Zhou XD, Tang ZY, Yu YQ, Ma ZC. Clinical evaluation of cryosurgery in the treatment of primary liver cancer. Report of 60 cases. *Cancer* 1988; 61: 1889-1892
- 徐克成, 牛立志. 肿瘤冷冻治疗学. 第1版. 上海: 上海科技教育出版社, 2007: 169-191
- Korpan NN. Liver cryosurgery for primary and secondary liver tumors. in: Korpan NN (ed). *Basics of Cryosurgery*. Wein New York: Springer-Verlag, 2001: 117-120
- Crews KA, Kuhn JA, McCarty TM, Fisher TL, Goldstein RM, Preskitt JT. Cryosurgical ablation of hepatic tumors. *Am J Surg* 1997; 174: 614-617; discussion 617-618
- Lam CM, Yuen WK, Fan ST. Hepatic cryosurgery for recurrent hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a preliminary report. *J Surg Oncol* 1998; 68: 104-106
- Xu KC, Niu LZ, He WB, Guo ZQ, Hu YZ, Zuo JS. Percutaneous cryoablation in combination with ethanol injection for unresectable hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2686-2689
- Stella M, De Cian F, Mariani F, Quaglia F, Baldo S, Mithieux F, Meeus P, Kaemmerlen P, Rivoire M. Cryosurgery with transpleurodiaphragmatic approach in the treatment of non-resectable and recurrent hepatic metastasis from the colorectum. *Suppl Tumori* 2005; 4: S44
- Lezoche E, Paganini AM, Felicetti F, Guerrieri M, Lugnani F, Tamburini A. Ultrasound-guided laparoscopic cryoablation of hepatic tumors: preliminary report. *World J Surg* 1998; 22: 829-835; discussion 835-836
- Pistorius G, Menger MD, Feifel G. Minilaparotomy vs the percutaneous approach for minimally invasive hepatic cryosurgery. *Surg Endosc* 2000; 14: 207-209
- Tait IS, Yong SM, Cuschieri SA. Laparoscopic in situ ablation of liver cancer with cryotherapy and radiofrequency ablation. *Br J Surg* 2002; 89: 1613-1619
- Ross WB, Horton M, Bertolino P, Morris DL. Cryotherapy of liver tumours--a practical guide. *HPB Surg* 1995; 8: 167-173
- Onik G, Gilbert J, Hoddick W, Filly R, Callen P, Rubinsky B, Farrel L. Sonographic monitoring of hepatic cryosurgery in an experimental animal model. *AJR Am J Roentgenol* 1985; 144: 1043-1047
- Silverman SG, Sun MR, Tuncali K, Morrison PR, vanSonnenberg E, Shankar S, Zou KH, Warfield SK. Three-dimensional assessment of MRI-guided percutaneous cryotherapy of liver metastases. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 183: 707-712
- Kuszyk BS, Choti MA, Urban BA, Chambers TP, Bluemke DA, Sitzmann JV, Fishman EK. Hepatic tumors treated by cryosurgery: normal CT appearance. *AJR Am J Roentgenol* 1996; 166:

- 363-368
- 19 Shafir M, Shapiro R, Sung M, Warner R, Sicular A, Klipfel A. Cryoablation of unresectable malignant liver tumors. *Am J Surg* 1996; 171: 27-31
- 20 Hobbs KE. Cryosurgery: its role in liver tumours. *HPB Surg* 1993; 7: 89-91
- 21 Ravikumar TS, Buenaventura S, Salem RR, D'Andrea B. Intraoperative ultrasonography of liver: detection of occult liver tumors and treatment by cryosurgery. *Cancer Detect Prev* 1994; 18: 131-138
- 22 Lau WY, Leung TW, Leung KL, Ho S, Leung N, Chan M, Lin J, Li AK. Cyto-reductive surgery for hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol* 1994; 3: 161-166
- 23 Wong LL, Limm WM, Cheung AH, Fan FL, Wong LM. Hepatic cryosurgery: early experience in Hawaii. *Hawaii Med J* 1995; 54: 811-813
- 24 Adam R, Akpınar E, Johann M, Kunstlinger F, Majno P, Bismuth H. Place of cryosurgery in the treatment of malignant liver tumors. *Ann Surg* 1997; 225: 39-38; discussion 48-50
- 25 Sheen AJ, Poston GJ, Sherlock DJ. Cryotherapeutic ablation of liver tumours. *Br J Surg* 2002; 89: 1396-1401
- 26 Wren SM, Coburn MM, Tan M, Daniels JR, Yassa N, Carpenter CL, Stain SC. Is cryosurgical ablation appropriate for treating hepatocellular cancer? *Arch Surg* 1997; 132: 599-603; discussion 603-604
- 27 Rehrig ST, Marshall S, Meghoo C, Peoples GE, Shriver CD. 5-year qualitative results of isolated cryosurgical ablation for hepatic malignancy at Walter Reed Army Medical Center(1). *Curr Surg* 2001; 58: 81-85
- 28 Bilchik AJ, Sarantou T, Wardlaw JC, Ramming KP. Cryosurgery causes a profound reduction in tumor markers in hepatoma and noncolorectal hepatic metastases. *Am Surg* 1997; 63: 796-800
- 29 Kosowski K, Nowak W, Danciewicz W, Milanowski W, Skucinski J. Cryotherapy of liver tumors. *Przegl Lek* 2005; 62: 1436-1439
- 30 Jungraithmayr W, Burger D, Olschewski M, Eggstein S. Cryoablation of malignant liver tumors: results of a single center study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 554-560
- 31 Kerkar S, Carlin AM, Sohn RL, Steffes C, Tyburski J, Littrup P, Weaver D. Long-term follow up and prognostic factors for cryotherapy of malignant liver tumors. *Surgery* 2004; 136: 770-779
- 32 Zhou XD, Tang ZY. Cryotherapy for primary liver cancer. *Semin Surg Oncol* 1998; 14: 171-174
- 33 周信达, 汤钊猷, 余耀, 马曾辰, 吴志全, 张博恒. 冷冻肝切除对降低肝癌术后复发的初步评价. *中华外科杂志* 2005; 43: 439-441
- 34 Cha C, Lee FT Jr, Rikkers LF, Niederhuber JE, Nguyen BT, Mahvi DM. Rationale for the combination of cryoablation with surgical resection of hepatic tumors. *J Gastrointest Surg* 2001; 5: 206-213
- 35 Nakazaki H, Watanabe M, Hasebe Y, Takita W, Ooshiro M, Seo A, Kurihara A, Kobayashi K, Teramoto T, Hirano K. Percutaneous cryosurgery for liver tumors. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001; 28: 1599-1602
- 36 Clavien PA, Kang KJ, Selzner N, Morse MA, Suhocki PV. Cryosurgery after chemoembolization for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 95-101
- 37 Qian GJ, Chen H, Wu MC. Percutaneous cryoablation after chemoembolization of liver carcinoma: report of 34 cases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 520-524
- 38 徐克成, 牛立志, 何卫兵, 郭子倩, 左建生, 胡以则. 化学栓塞-经皮冷消融序贯治疗不能切除的原发性肝癌. *现代消化及介入诊疗* 2004; 9: 134-137
- 39 Wong WS, Patel SC, Cruz FS, Gala KV, Turner AF. Cryosurgery as a treatment for advanced stage hepatocellular carcinoma: results, complications, and alcohol ablation. *Cancer* 1998; 82: 1268-1278
- 40 徐克成, 牛立志, 胡以则, 何卫兵, 郭子倩, 左建生. 经皮冷消融联合酒精注射治疗不能切除的肝细胞癌. *中华消化杂志* 2003; 23: 544-547
- 41 Seifert JK, Morris DL. World survey on the complications of hepatic and prostate cryotherapy. *World J Surg* 1999; 23: 109-113; discussion 113-114
- 42 Sarantou T, Bilchik A, Ramming KP. Complications of hepatic cryosurgery. *Semin Surg Oncol* 1998; 14: 156-162
- 43 Pistorius GA, Alexander C, Krisch CM, Feifel G, Schilling MK, Menger MD. Local platelet trapping as the cause of thrombocytopenia after hepatic cryotherapy. *World J Surg* 2005; 29: 657-660; discussion 661
- 44 Mala T. Cryoablation of liver tumours -- a review of mechanisms, techniques and clinical outcome. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2006; 15: 9-17
- 45 Calvin HL. Minimally invasive hepatic cryosurgery. In: Korpan NN. Basics of Cryosurgery. WeinNewYork: Springer-Verlag, 2001: 133-135
- 46 Shen P, Hoffman A, Howerton R, Loggie BW. Cryosurgery of close or positive margins after hepatic resection for primary and metastatic hepatobiliary malignancies. *Am Surg* 2002; 68: 695-703; discussion 703
- 47 El-Shakhs SA, Shimi SA, Cuschieri A. Effective hepatic cryoablation: does it enhance tumor dissemination? *World J Surg* 1999; 23: 306-310
- 48 Allen PJ, D'Angelica M, Hodyl C, Lee J, You YJ, Fong Y. The effects of hepatic cryosurgery on tumor growth in the liver. *J Surg Res* 1998; 77: 132-136
- 49 Jacob G, Li AK, Hobbs KE. A comparison of cryodestruction with excision or infarction of an implanted tumor in rat liver. *Cryobiology* 1984; 21: 148-156
- 50 Panis Y, Nordlinger B. Experimental models for hepatic metastases from colorectal tumors. *Ann Chir* 1991; 45: 222-228
- 51 Pearson AS, Izzo F, Fleming RY, Ellis LM, Delrio P, Roh MS, Granchi J, Curley SA. Intraoperative radiofrequency ablation or cryoablation for hepatic malignancies. *Am J Surg* 1999; 178: 592-599
- 52 Bilchik AJ, Wood TF, Allegra D, Tsioulis GJ, Chung M, Rose DM, Ramming KP, Morton DL. Cryosurgical ablation and radiofrequency ablation for unresectable hepatic malignant neoplasms: a proposed algorithm. *Arch Surg* 2000; 135: 657-662; discussion 662-664

编辑 李军亮 电编 郭海丽

慢性胰腺炎内镜治疗现状

王洛伟, 李兆申

■背景资料

慢性胰腺炎(CP)发病率近年呈不断上升趋势, 但有大规模的临床流行病学资料并不多. 20世纪内镜介入技术的飞速发展, 为CP的治疗提供了新的技术和方法.

王洛伟, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433

李兆申, 医学博士, 主任医师、教授, 主要从事消化系疾病基础与临床研究及消化内镜新技术研究.

作者贡献分布: 王洛伟与李兆申对此文所作贡献均等; 课题由李兆申负责、设计; 本论文由王洛伟、李兆申共同完成.

通讯作者: 李兆申, 200433, 上海市长海路174号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科.

zhaoshen.li@gmail.com

电话: 021-25070552 传真: 021-55621735

收稿日期: 2007-05-14 修回日期: 2008-01-05

Status quo of endoscopic management in chronic pancreatitis

Luo-Wei Wang, Zhao-Shen Li

Luo-Wei Wang, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China
Correspondence to: Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 174 Changhai Road, Shanghai 200433, China. zhaoshen.li@gmail.com
Received: 2007-05-14 Revised: 2008-01-05

Abstract

The incidence of chronic pancreatitis (CP) is increasing all over the world. However, it is rather difficult to treat it because its etiological factor and pathogenesis are still unclear. In recent years, the rapid advances in endoscopy techniques have provided new treatment modalities for CP. We, in this paper, describe the present status and advances in endoscopy for CP as well as the problems and difficulties, thus contributing to the treatment for CP.

Key Words: Chronic pancreatitis; Endoscopy; Endoscopic pancreatic sphincterotomy; Treatment

Wang LW, Li ZS. Status quo of endoscopic management in chronic pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 236-239

摘要

慢性胰腺炎发病率不断攀高, 但由于其确切的病因和发病机制尚不清楚, 给治疗带来较大困难. 近年来, 内镜治疗技术的飞速发展,

为慢性胰腺炎的治疗提供了新的方向. 本文详述慢性胰腺炎内镜治疗的现状和进展, 指出存在的问题和困难, 对慢性胰腺炎内镜治疗的进一步发展具有指导意义.

关键词: 慢性胰腺炎; 内镜; 胰管括约肌切开术; 治疗

王洛伟, 李兆申. 慢性胰腺炎内镜治疗现状. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 236-239

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/236.asp>

0 引言

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)发病率虽然尚无大规模的临床流行病学资料, 但近年来呈不断上升趋势^[1]. CP常见的病理改变为胰腺实质的钙化、纤维化、胰管结石、狭窄和梗阻, 可并发胰腺假性囊肿. 20世纪内镜介入技术的飞速发展, CP的诊治发生了划时代的变革. 内镜逆行胰胆管造影(ERCP)及内镜下括约肌切开术的广泛开展, 为CP的诊断和治疗提供了新的技术和方法. 内镜治疗CP的主要目的是胰管减压. 虽然最近有随机对照研究^[2-3]表明对于有胰管扩张的CP患者行外科胰管减压手术治疗在缓解疼痛上明显优于内镜介入, 但由于内镜介入治疗的相对简单性及微创性、恢复时间短、疗效确切, 因此, 目前仍是治疗CP的有效手段^[4-7].

1 胰管括约肌切开术(endoscopic pancreatic sphincterotomy, EPS)

内镜下胰管括约肌切开能降低胰管压力, 一般在胆管括约肌切开后进行, 否则胆管炎发生率较高, 也为胰管支架置入、胰管刷检和组织活检、胰管狭窄扩张和取石术创造条件. 但该操作并发胰腺炎的风险要比胆管括约肌切开术高2-4倍, 而预防性植入胰管支架则能将此风险降低约50%. 其他可能的并发症包括出血、穿孔、感染甚至死亡, 其发生率在2%-30%之间^[8-9]. Ahmed *et al*^[10]建议植入单根长4-6 cm直径3F的单猪尾支架即可有效预防胰腺炎的发

■同行评价者

范志宁, 主任医师, 南京医科大学第二附属医院内镜中心

生, 并且这种细的单猪尾支架在4-7 d内可自行脱落经肠道排出体外而不需要再次行内镜下拔除。

2 胰管扩张和胰管支架置入术

胰管扩张和胰管支架置入的目的也是降低胰管压力。CP由于胰腺实质及胰管壁的纤维化导致的胰管狭窄往往比较僵硬, 使用扩张导管和气囊导管进行扩张, 通常较为困难。Ziebert *et al*^[11]提出当无法通过常规扩张导管时可采用7-Fr Soehendra支架取回器扩张坚硬的胰管。Brand *et al*^[12]对21例主胰管难以扩张的患者行该疗法, 18例患者成功扩张并放置胰管支架, 患者术后1 wk症状缓解, 未见因使用支架置换器引起的并发症。此外, 本方法在扩张胰管的同时可获得组织标本行进一步检测。胰管扩张后一般均需置入胰管支架, 其疗效比较肯定^[4]。支架的选择包括单根、多根塑料支架和可回收金属支架。在我国, 以单根塑料支架最常用。本中心已累计治疗CP患者800余例, 长期效果还在随访之中。支架治疗的方案我们推荐“7-8.5-10”原则, 即从7F支架开始, 每3月更换一次, 逐渐更换成8.5F和10F支架, 疗程9 mo, 拔除10F支架后随访。若仍有胰管明显狭窄, 可考虑多根塑料支架或金属支架治疗^[13]。Costamagna *et al*^[14]对顽固性胰管狭窄的CP患者采用多根塑料支架治疗, 平均随访38 mo, 84%的患者症状消失, 无严重并发症发生。同时提出多根支架治疗胰管狭窄的指征为: (1)胰头部胰管有明显狭窄, 括约肌切开后需要行塑料支架治疗; (2)胰管括约肌功能紊乱导致的上腹部复发性疼痛; (3)支架(8.5-11.5F)植入的时间至少3 mo; (4)支架移除后胰管的狭窄仍然存在; (5)胰管上段扩张>6 mm。Eisendrath *et al*^[15]曾报道用自膨式金属胰管支架治疗CP, 效果与胰十二指肠吻合术相似。但多数研究者认为这种永久植入性的支架不适于良性胰腺疾病的治疗。Parviainen *et al*^[16]报道使用聚交酯可降解支架患者2例, 该支架内芯为聚交酯纤维, 外覆钽涂层, 聚交酯纤维可在胰酶和碱性环境下, 24-52 wk出现降解, 钽涂层使支架在X线下可见, 不影响降解速度, 目前该支架安全性尚待进一步研究。目前有非随机对照的研究表明大约2/3伴有主胰管狭窄的CP患者在内镜下置入胰管支架后一年内腹痛症状能得到明显改善^[2-4]。相比胆管支架, 胰管支架更容易且更快发生堵塞, 通畅时间大多数不超过8-10 wk, 而且有16%-34%的患者主胰

管可发生类似于慢性胰腺炎的形态学改变, 居于上述考虑, 对CP患者选择置入胰管支架时应慎重。

3 内镜下肉毒杆菌毒素括约肌注射

肉毒杆菌毒素可舒张Oddi括约肌, 近年来已被应用于CP的内镜注射治疗。Wehrmann *et al*^[17]施行15例肉毒杆菌毒素Oddi括约肌注射术, 12例3 mo未出现腹痛症状, 其中11例在注射后腹痛立即缓解, 平均症状缓解持续 6 ± 2 mo, 未发生明显并发症。随访发现只有肉毒杆菌毒素括约肌注射治疗有效的患者, 后续行括约肌切开才有效。因此, 肉毒杆菌毒素注射可作为Oddi括约肌功能失调的治疗方法, 该方法短期有效率约80%, 亦可作为进一步行括约肌切开的疗效预测。

4 内镜下胰管取石术

胰管结石导致胰管、胰实质的压力增高, 引起胰腺缺血、纤维化, 加速病情的进展。以往采用内镜下取石篮、气囊导管取石, 但胰石常紧密地嵌顿在二级胰管中, 内镜下无法移动, 器械也无法通过, 取石难度极大。近来ERCP技术的飞速发展, 为胰管结石的治疗带来了新的技术和方法, 但其操作难度要远高于胆管结石的内镜治疗。对于不能用常规方法顺利取石的患者可选用体外震波碎石(extracorporeal shock wave lithotripsy, ESWL), 碎石后的结石碎片, 通常只有数毫米大小, 一般可用网篮取出。国外研究表明ESWL是一项痛苦较小、并发症较少、成功率较高的治疗手段, 但目前在国内开展很少, 主要是仪器和技术的限制。对伴胰头部胰管结石的慢性钙化性胰腺炎或伴有胆道结石的CP患者, 可采用胰管内子母镜下液电碎石(electrohydraulic lithotripsy, EHL)治疗。一般采用3F的EHL探头, 直视下施行, 直到所有结石粉碎并排出。多数患者的结石可以完全清除, 术后很少发生胰腺炎和胆管炎。Howell *et al*^[18]对6例患者行9次EHL治疗, 仅1例胰管结石未能完全清除, 未见液电碎石相关的并发症, 结石完全清除的5例患者6 mo内未再出现腹痛。总体来说, EHL技术对于伴胰头部胰管结石的慢性钙化性胰腺炎或伴有胆道结石的CP患者是有效的辅助手段, 但仍需要进一步研究确定其在胰管内操作的安全性。最近也有报道利用激光作为治疗胰管结石的手段, 少量临床应用未见明显并发症发生, 但目前对本方法的研究较少, 尚须进一步确定其疗效和安全性。

■创新盘点

本文对慢性胰腺炎内镜治疗现状进行了深刻阐述, 并指出存在的问题, 为今后发展指明方向。

■应用要点

本文详述了慢性胰腺炎内镜治疗的现状和进展,指出存在的问题和困难,对慢性胰腺炎内镜治疗的进一步发展具有指导意义。

5 胰腺假性囊肿引流术

CP患者胰腺假性囊肿的发生率为20%-40%,多在炎症坏死区域逐渐形成的液体积聚。假性囊肿可位于胰腺内部或边缘,单个或多个,按囊肿是否与主胰管相通可分为交通性和非交通性假性囊肿,可有腹痛、肠梗阻等相关症状,也可以没有任何症状。一般来说,有症状的胰腺假性囊肿才是内镜介入治疗的适应症。如囊肿向消化道膨出,B超、CT证实囊肿与胃或十二指肠肠壁间的距离 $<10\text{ mm}$,即为经胃或十二指肠壁引流的指征^[19-20]。通常应选择薄壁($<1\text{ cm}$)囊肿和胃肠道内有可见突起的胰腺囊肿患者,约有40%的患者符合条件,小囊肿和胰头部的假性囊肿操作较容易,效果也比较好。因胰腺假性囊肿的诊断错误率约为20%,内镜引流术前必须排除囊性结构并非血管瘤或其他肿瘤。此外,一旦内镜引流术失败,必须立即行手术治疗。如囊腔与主胰管相通,可经十二指肠乳头置入双猪尾式引流支架,有时支架末端不必置入囊腔,只要放在狭窄的上游即可^[21-22]。

6 内镜治疗继发性胆道狭窄

CP患者如出现黄疸则表明胰腺头部及钩突部的进行性纤维化压迫了胆总管胰内段。但事实上很多CP患者其影像学资料提示有胆总管的狭窄而无临床症状,也不伴有肝功能的异常,所以这部分患者是不需要内镜处理的。对于黄疸的CP患者行内镜下支架置入的疗效从目前的资料来看仍让人失望,Cahen *et al*^[23]对58例因CP引起的胆道狭窄患者内镜单根支架治疗后平均随访45 mo,结果发现1/4的患者治愈,据此他们建议如经过1年的支架治疗仍有胆道狭窄者应考虑外科手术。Baron^[24]的研究认为多根塑料支架胆管内置入效果显著。Van Berkel *et al*^[25]选择不适宜外科手术的患者给予自膨式金属支架置入,结果令人鼓舞,但上述研究仍需要更多大样本、更长时间随访以进一步证实。

7 结论

关于CP内镜介入治疗目前尚有许多问题亟待解决,如:具有相似影像学改变的患者却对内镜介入治疗的反应不一的原因不清楚;胰管的形态学改变与疼痛程度是否有关;内镜或外科减压治疗是否会改变疾病的自然过程,能否使丧失的胰腺分泌功能得到恢复等。而目前我们所看到的一些研究结果迥异,难以得出令人信服

的结论。因此,需要制定CP分级的统一标准,规范CP患者腹痛的治疗,选择基础特征相似的患者进行研究以获得可靠的结果,也许一些大样本、多中心、单盲的随机对照研究能提供我们所需要的答案。

8 参考文献

- 1 Díte P, Starý K, Novotný I, Precechtelová M, Dolina J, Lata J, Zboril V. Incidence of chronic pancreatitis in the Czech Republic. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 749-750
- 2 Díte P, Ruzicka M, Zboril V, Novotný I. A prospective, randomized trial comparing endoscopic and surgical therapy for chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2003; 35: 553-558
- 3 Cahen DL, Gouma DJ, Nio Y, Rauws EA, Boermeester MA, Busch OR, Stoker J, Laméris JS, Dijkgraaf MG, Huibregtse K, Bruno MJ. Endoscopic versus surgical drainage of the pancreatic duct in chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 2007; 356: 676-684
- 4 Rösch T, Daniel S, Scholz M, Huibregtse K, Smits M, Schneider T, Ell C, Haber G, Riemann JF, Jakobs R, Hintze R, Adler A, Neuhaus H, Zavoral M, Zavada F, Schusdziarra V, Soehendra N; European Society of Gastrointestinal Endoscopy Research Group. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: a multicenter study of 1000 patients with long-term follow-up. *Endoscopy* 2002; 34: 765-771
- 5 Morgan DE, Smith JK, Hawkins K, Wilcox CM. Endoscopic stent therapy in advanced chronic pancreatitis: relationships between ductal changes, clinical response, and stent patency. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 821-826
- 6 Gabbrielli A, Pandolfi M, Mutignani M, Spada C, Perri V, Petruzzello L, Costamagna G. Efficacy of main pancreatic-duct endoscopic drainage in patients with chronic pancreatitis, continuous pain, and dilated duct. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 576-581
- 7 Elta GH. Is there a role for the endoscopic treatment of pain from chronic pancreatitis? *N Engl J Med* 2007; 356: 727-729
- 8 Kozarek RA. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis. *Indian J Gastroenterol* 2002; 21: 67-73
- 9 Jakobs R, Benz C, Leonhardt A, Schilling D, Pereira-Lima JC, Riemann JF. Pancreatic endoscopic sphincterotomy in patients with chronic pancreatitis: a single-center experience in 171 consecutive patients. *Endoscopy* 2002; 34: 551-554
- 10 Ahmed SA, Wray C, Rilo HL, Choe KA, Gelrud A, Howington JA, Lowy AM, Matthews JB. Chronic pancreatitis: recent advances and ongoing challenges. *Curr Probl Surg* 2006; 43: 127-238
- 11 Ziebert JJ, DiSario JA. Dilation of refractory pancreatic duct strictures: the turn of the screw. *Gastrointest Endosc* 1999; 49: 632-635
- 12 Brand B, Thonke F, Obytz S, Binmoeller KF, Rathod V, Seitz U, Bohnacker S, Jäckle S, Soehendra N. Stent retriever for dilation of pancreatic and bile duct strictures. *Endoscopy* 1999; 31: 142-145
- 13 李兆申, 许国铭, 孙振兴, 王辉, 湛先保. 胰管内支架治疗慢性胰腺炎. *中华消化内镜杂志* 2000; 17: 263-265
- 14 Costamagna G, Bulajic M, Tringali A, Pandolfi M, Gabbrielli A, Spada C, Petruzzello L, Familiari

- P, Mutignani M. Multiple stenting of refractory pancreatic duct strictures in severe chronic pancreatitis: long-term results. *Endoscopy* 2006; 38: 254-259
- 15 Eisendrath P, Devière J. Expandable metal stents for benign pancreatic duct obstruction. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1999; 9: 547-554
- 16 Parviainen M, Sand J, Harmoinen A, Kainulainen H, Välimä T, Törmälä P, Nordback I. A new biodegradable stent for the pancreaticojejunal anastomosis after pancreaticoduodenal resection: in vitro examination and pilot experiences in humans. *Pancreas* 2000; 21: 14-21
- 17 Wehrmann T, Schmitt TH, Arndt A, Lembcke B, Caspary WF, Seifert H. Endoscopic injection of botulinum toxin in patients with recurrent acute pancreatitis due to pancreatic sphincter of Oddi dysfunction. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1469-1477
- 18 Howell DA, Dy RM, Hanson BL, Nezhad SF, Broaddus SB. Endoscopic treatment of pancreatic duct stones using a 10F pancreatoscope and electrohydraulic lithotripsy. *Gastrointest Endosc* 1999; 50: 829-833
- 19 Boerma D, Obertop H, Gouma DJ. Pancreatic pseudocysts in chronic pancreatitis. Surgical or interventional drainage? *Ann Ital Chir* 2000; 71: 43-50
- 20 Delhaye M, Matos C, Devière J. Endoscopic management of chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2003; 13: 717-742
- 21 Monkemüller KE, Kahl S, Malfertheiner P. Endoscopic therapy of chronic pancreatitis. *Dig Dis* 2004; 22: 280-291
- 22 Rosso E, Alexakis N, Ghaneh P, Lombard M, Smart HL, Evans J, Neoptolemos JP. Pancreatic pseudocyst in chronic pancreatitis: endoscopic and surgical treatment. *Dig Surg* 2003; 20: 397-406
- 23 Cahen DL, van Berkel AM, Oskam D, Rauws EA, Weverling GJ, Huibregtse K, Bruno MJ. Long-term results of endoscopic drainage of common bile duct strictures in chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 103-108
- 24 Baron TH. Endoscopic therapy with multiple plastic stents for benign biliary strictures due to chronic calcific pancreatitis: the good, the bad, and the ugly. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 96-98
- 25 van Berkel AM, Cahen DL, van Westerlo DJ, Rauws EA, Huibregtse K, Bruno MJ. Self-expanding metal stents in benign biliary strictures due to chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2004; 36: 381-384

■同行评价

本文为慢性胰腺炎的治疗提供了新的技术和方法, 值得临床医师学习和借鉴。

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 WJG 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WJG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)

反义c-myc寡核苷酸对转染FHIT基因胃癌细胞MKN28的影响

刘晓宇, 郭淦华, 段晓明, 陈建, 曹建国, 贺修胜

■背景资料

肿瘤的基因治疗已成为肿瘤治疗的研究热点, 随着分子生物学的发展, 许多癌基因和抑癌基因被发现。目前认为癌症的发生是一个多基因参与的多步骤的复杂过程, 抑癌基因的表达抑制和癌基因的过度表达在肿瘤发生发展中起着十分重要的作用。

刘晓宇, 郭淦华, 南华大学2005级内科学研究生 湖南省衡阳市 421001

段晓明, 长沙市中心医院 湖南省长沙市 411001

陈建, 南通市第三人民医院消化内科 江苏省南通市 226006

曹建国, 贺修胜, 南华大学肿瘤研究所 湖南省衡阳市 421001

刘晓宇, 南华大学2005级内科学消化专业硕士研究生。

作者贡献分布: 刘晓宇及段晓明对此文所作贡献均等, 此课题由段晓明, 刘晓宇及陈建设计; 研究过程由刘晓宇, 郭淦华及陈建操作完成; 研究所用试剂及分析工具由段晓明, 曹建国及贺修胜提供; 数据分析由刘晓宇及陈建完成; 本文文写作由刘晓宇完成。

通讯作者: 段晓明, 411001, 湖南省长沙市中心医院院长办公室。
xiaomingduan@21cn.com

电话: 0731-5667797

收稿日期: 2007-09-08 修回日期: 2008-01-10

Effect of anti-sense c-myc oligodeoxynucleotide on MKN28 gastric cancer cells transfected with FHIT gene

Xiao-Yu Liu, Gan-Hua Guo, Xiao-Ming Duan,
Jian Chen, Jian-Guo Cao, Xiu-Sheng He

Xiao-Yu Liu, Gan-Hua Guo, Nanhua University, Hengyang
421001, Hunan Province, China

Xiao-Ming Duan, Changsha Central Hospital, Changsha
411001, Hunan Province, China

Jian Chen, Department of Gastroenterology, Nantong the
Third People's Hospital, Nantong 226006, Jiangsu Province,
China

Jian-Guo Cao, Xiu-Sheng He, Cancer Research Institute
of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province,
China

Correspondence to: Xiao-Ming Duan, Changsha Central
Hospital, Changsha 411001, Hunan Province,
China. xiaomingduan@21cn.com

Received: 2007-09-08 Revised: 2008-01-10

Abstract

AIM: To explore the effect of anti-sense c-myc oligodeoxynucleotide on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells transfected with the fragile histidine triad (FHIT) gene.

METHODS: The FHIT gene was transfected into human gastric cancer MKN28 cells through liposomes. The anti-sense c-myc oligodeoxynucleotide was transfected into the FHIT gene. FHIT gene transfection was detected by RT-PCR and Western blot. Expression of c-myc

was detected by Western blot. Proliferation of gastric cancer cells was determined by MTT. Cell apoptosis was detected by AO/EB staining and FCM.

RESULTS: The expression of MKN28 cells transfected with the FHIT gene was observed. However, no FHIT gene segment and FHIT protein were found in the cells transfected with void vector. C-myc transfected with the FHIT gene exhibited significant inhibitory effects on the expression of c-myc protein in MKN28 cells and induced cell apoptosis in a time-dependent manner. However, the inhibition rate ($F = 177.480$, $P < 0.05$) ($F = 41.500$, $P < 0.05$), apoptosis rate, and apoptosis portion of anti-sense c-myc oligodeoxynucleotide for C-myc were higher than those for FHIT⁺ MKN28 cells.

CONCLUSION: The expression of c-myc and FHIT oncogenes plays an important role in suppressing the growth of tumor cells and may provide the theoretical basis for tumor gene therapy.

Key Words: Fragile histidine triad; Antisense c-myc oligodeoxynucleotide; Transfection; Apoptosis; RT-PCR

Liu XY, Guo GH, Duan XM, Chen J, Cao JG, He XS. Effect of anti-sense c-myc oligodeoxynucleotide on MKN28 gastric cancer cells transfected with FHIT gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 240-245

摘要

目的: 探讨脂质体介导的c-myc反义寡核苷酸对导入脆性组氨酸三联体(FHIT)基因的胃癌细胞增殖及凋亡的影响。

方法: 通过脂质体将重组FHIT基因PRC/CMV质粒和空载体转染到人类胃癌细胞系MKN28, 并分别转染c-myc反义寡核苷酸, RT-PCR和Western blot法检测FHIT基因的转染, Western blot法检测细胞c-myc的表达, MTT法分析细胞增殖, AO/EB染色法和流式细胞分析技术检测细胞凋亡。

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科; 田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院普外科

结果: 转染FHIT基因后, MKN28细胞检测到FHIT基因片段和FHIT蛋白, 而未转染的细胞及转染空载体的细胞未检测到FHIT基因片段及FHIT蛋白. 转染c-myc反义寡核苷酸后, 对MKN28细胞c-myc的表达有明显的抑制作用, 并呈明显的时间依赖性; c-myc asODN对FHIT⁺ MKN28细胞抑制率($F = 177.480$, $P < 0.05$), 凋亡率($F = 41.500$, $P < 0.05$)和凋亡比例明显高于FHIT MKN28细胞。

结论: 癌基因c-myc的表达抑制联合FHIT基因的表达可以发挥较强的抗肿瘤细胞作用, 为多基因治疗肿瘤提供了理论基础。

关键词: 脆性组氨酸三联体; 反义c-myc寡核苷酸; 转染; 凋亡; 逆转录聚合酶链式反应

刘晓宇, 郭金华, 段晓明, 陈建, 曹建国, 贺修胜. 反义c-myc寡核苷酸对转染FHIT基因胃癌细胞MKN28的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 240-245

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/240.asp>

0 引言

肿瘤的基因治疗已成为肿瘤治疗的研究热点, 随着分子生物学的发展, 许多癌基因和抑癌基因被发现. 目前认为癌症的发生是一个多基因参与的多步骤的复杂过程, 抑癌基因的表达抑制和癌基因的过度表达在肿瘤发生发展中起着十分重要的作用. 脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad, FHIT)基因被认为是候选抑癌基因, c-myc为已被公认的癌基因. 本实验通过基因转染及反义寡核苷酸技术(antisense oligodeoxynucleotide, asODN), 同时干扰肿瘤细胞中二者的异常表达, 观察其对肿瘤细胞生长和凋亡的影响, 评价基因联合治疗肿瘤的效果。

1 材料和方法

1.1 材料 人类胃高分化管状腺癌细胞系MKN28来自南华大学肿瘤研究所, 存在FHIT基因的表达缺失^[1-2]和c-myc基因高表达. 用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基, 在37℃、50 mL/L CO₂的细胞培养箱内进行培养. FHIT基因的重组载体(含FHIT基因第5-8个外显子)及其空载体PRC/CMV均由美国俄亥俄州立大学K.Huebner教授惠赠. 针对c-myc mRNA第二外显子起始码AUG后4个密码子合成c-myc反义寡核苷酸链5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3', 对所合成的寡核苷酸链进行全硫代硫酸化修饰(上海生工生物工程公司). 细胞培养所用DMEM培养基购于

美国GIBCO公司; 脂质体Lipofectamine 2000购于Invitrogen公司; 总RNA/DNA提取试剂盒、RT试剂盒、PCR试剂盒购于Sigma公司; 兔抗人FHIT单克隆抗体购于美国Zymed公司; 兔抗人c-myc抗体购于武汉博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 FHIT基因转染与单克隆细胞株筛选: 于24孔板内接种MKN28细胞 2×10^5 , 37℃培养24-48 h, 待细胞融合度达90%-95%时, 用无血清DMEM培养基洗两遍, 按照Lipofectamine2000的使用说明操作, 将适量脂质体和重组质粒、空载体的混合加入24孔板内, 轻轻混匀, 标记为FHIT基因转染组、空载体组, 设未加入脂质体孔为空白对照组. 加入适量无血清的DMEM的培养基, 继续培养24 h, 传代, 换用完全培养基继续培养24 h后, 开始用含G418浓度300 g/L的培养基进行筛选, 待空白组细胞全部死亡时, 降低G418的浓度为150 g/L, 继续筛选14 d后, 形成细胞克隆, 将细胞克隆接种入96孔板, 用有限稀释法稀释, 挑选单克隆继续培养、传代。

1.2.2 RT-PCR: 按照试剂盒说明提取细胞总RNA及合成cDNA. 由上海生工合成PCR引物, 5'端: 5'-GTGGATAGCGGTTTGACT-3', 3'端: 5'-TACAGAGGGCTTGATGAGA-3', 产物长度297 bp. PCR反应体系25 μL, 反应程序如下: 94预变性3 min, 再94℃变性30 s, 52℃退火30 s, 72℃合成1 min, 循环30次; 72℃合成5 min, 4℃保存. 取4 μL反应产物, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外分光光度仪观察, 凝胶成像分析系统分析摄像。

1.2.3 Western blot: 加入细胞裂解液, 裂解细胞, 离心提取蛋白. 定量, 上样, 电泳分离蛋白, 转膜, 封闭1.5 h, 孵免抗人FHIT抗体, 4℃过夜, 洗膜后孵二抗, 室温1.5 h, 洗膜, 加发光剂, 压膜, 显影, 定影。

1.2.4 反义c-myc寡核苷酸转染: 将FHIT基因稳定表达的细胞(FHIT⁺ MKN28) 1×10^7 和转染空载体的对照组(FHIT⁻ MKN28)分别接种于250 mL培养瓶, 待细胞融合度达50%, 用无血清DMEM培养基洗两遍. 配制溶液A: 用无血清的DMEM培养基配制浓度为100 mmol/L的c-myc asDON溶液400 μL, 溶液B: 将20 μL的Lipofectin 2000加入无血清DMEM培养基配成200 μL的溶液. 按Lipofectamine 2000的使用说明配置混合液加入细胞, 再加入适量无血清DMEM培养基使c-myc asODN终浓度为10 mmol/L。

1.2.5 转染后c-myc蛋白表达测定: 将上述转染c-myc asDON后细胞分成4组, 分别培养24、

■ 研发前沿

FHIT基因诱导细胞凋亡的作用受多种因素影响, 可能在部分肿瘤细胞中存在FHIT基因启动凋亡所必需的相关因子, 这必然与细胞中癌基因及抑癌基因的表达情况有密切的联系. 目前FHIT基因促凋亡的机制尚不明确, FHIT基因如何启动caspase凋亡途径及在这一过程中受哪些因素影响等问题有待于进一步研究。

■相关报道

国外已有报道FHIT基因过表达能增加胰腺癌细胞系对外源性凋亡诱导剂的敏感性。体内实验结果显示FHIT基因的转导能阻止肿瘤的生长,延长模型小鼠的生存时间,抑制暴露致癌环境下小鼠体内肿瘤的产生。

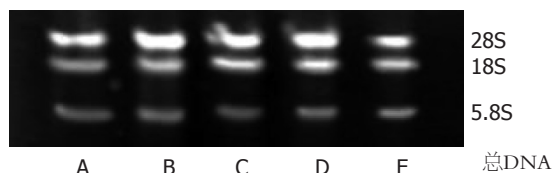


图1 不同MKN28细胞总RNA提取结果。A-C: 转染FHIT基因的3个MKN28细胞克隆; D: 转染空载体的细胞; E: 野生型MKN28细胞。

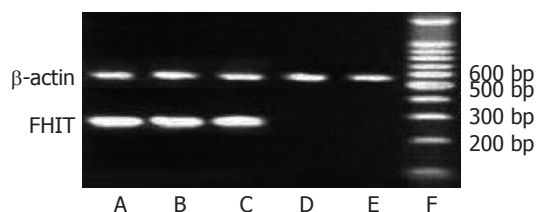


图2 不同MKN28细胞FHIT基因片段RT-PCR检测结果。A-C: 转染FHIT基因的3个MKN28细胞克隆; D: 转染空载体的细胞; E: 野生型MKN28细胞; F: DNA ladder。

48、72、96 h后收集细胞。提取蛋白, Western blot检测c-myc蛋白表达的变化。

1.2.6 MTT法分析细胞增殖: 取对数生长期FHIT⁺ MKN28和FHIT⁻ MKN28细胞分别接种于96孔板, 细胞同步化后, 对照组加入无血清培养基, 实验组加入终浓度为10 mmol/L c-myc asODN和10 mL/L Lipofectin 2000的无血清培养基。24、48、72、96 h后收集细胞, 每孔加入5 g/L MTT(四甲基偶氮唑盐)20 μ L继续培养4 h后, 吸去原培养液, 每孔加入100 μ L二甲基亚砜, 避光振荡20 min后, 于酶联免疫检测仪测定 A_{570} 值, 计算出生长抑制率, 生长抑制率的公式为: 抑制率(%) = (对照孔 A 值-实验孔 A 值)/对照孔 A 值 \times 100%。

1.2.7 AO/EB染色: 分别收集转染c-myc asODN后24、48、72、96 h FHIT⁺ MKN28细胞, 制成细胞悬液, 取细胞悬液95 μ L, 加入AO/EB 5 μ L, 混匀后吸1滴于洁净玻片上, 立即于490 nm激发波长的荧光显微镜下观察、摄影。在荧光显微镜下观察活细胞核染色质着绿色和凋亡细胞核染色质为橘红色。

1.2.8 流式细胞分析: 分别收集转染c-myc asODN后24、48、72、96 h FHIT⁺ MKN28细胞, 750 mL/L乙醇固定, 流式细胞仪检测, 得出各组细胞的凋亡率。

统计学处理 据用SPSS统计软件处理, 采用方差分析差异显著性。P<0.05为有显著性差异。

2 结果

2.1 转染PRC/CMV-FHIT后, MKN28细胞FHIT基

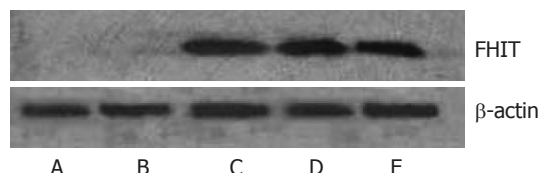


图3 不同MKN28细胞FHIT蛋白表达的Western blot检测结果。A: 野生型MKN28细胞; B: 转染空载体的细胞; C-E: 转染FHIT基因的3个MKN28细胞克隆。

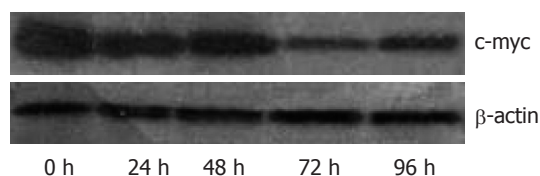


图4 转染c-myc asODN的MKN28细胞的Western blot法检测c-myc水平变化。

因片段RT-PCR检测 转染FHIT基因的MKN28细胞中检测到FHIT基因片段, 转染空载体及野生型细胞中则未检测到FHIT基因片段(图1-2)。

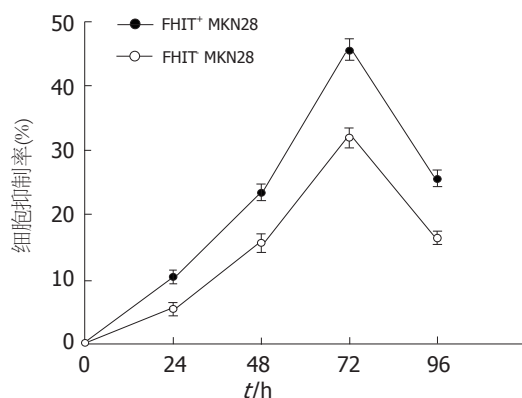
2.2 转染FHIT-PRC/CMV后, MKN28细胞FHIT蛋白的表达 转染FHIT基因的MKN28细胞可检测到FHIT蛋白表达, 而转染空载体及其野生型细胞则均未检测到FHIT蛋白的表达(图3)。

2.3 转染c-myc asODN后MKN28细胞的c-myc表达 转染c-myc asODN 0、24、48、72、96 h后, MKN28细胞经Western blot检测结果显示, 转染c-myc asODN可明显降低细胞内c-myc的表达, 在72 h后达高峰。以未转染细胞(转染0 h的细胞)c-myc蛋白表达水平为100%, 转染24、48、72、96 h的c-myc蛋白表达水平分别为72.1%、56.3%、18.1%、30.6%(图4)。

2.4 转染c-myc asODN后对FHIT⁺ MKN28细胞的增殖反应的影响 MTT法检测结果显示终浓度10 mmol/L的c-myc asODN对FHIT⁺ MKN28细胞均有一定的生长抑制作用($F = 100.123$, $P < 0.05$), 转染c-myc asODN后72 h抑制作用达高峰, c-myc asODN对FHIT⁺ MKN28细胞抑制率明显高于FHIT⁻ MKN28细胞($F = 177.480$, $P < 0.05$)(图5)。

2.5 细胞凋亡率分析 流式细胞仪检测结果显示, FHIT⁺ MKN28较FHIT⁻ MKN28细胞的凋亡率明显升高($F = 130.606$, $P < 0.05$)。转染c-myc asODN后细胞的凋亡率逐渐升高于72 h达到高峰, 且FHIT⁺ MKN28细胞凋亡率在每个时间段均高于FHIT⁻ MKN28细胞($F = 41.500$, $P < 0.05$)(图6)。

2.6 细胞凋亡的形态学观察 AO/EB染色结果显

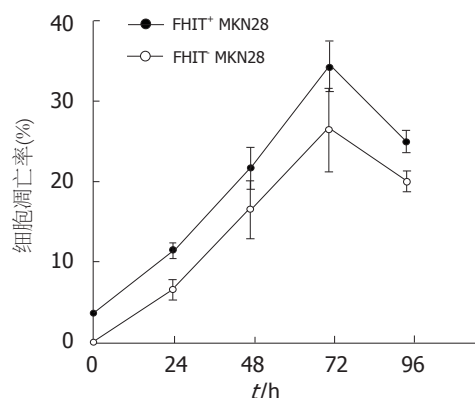

 图 5 c-myc asODN对FHIT^{+/+} MKN28细胞的生长抑制率.

示c-myc asODN对FHIT^{+/+} MKN28细胞凋亡均有一定的促进作用($P<0.05$), 随着时间的延长, 凋亡现象越明显, 在转染c-myc asODN 72 h最明显. 转染c-myc asODN后的不同时间, FHIT⁺ MKN28凋亡比例均明显大于FHIT⁻ MKN28细胞($P<0.05$)(图7).

3 讨论

FHIT基因是1996年Ohta *et al*^[3]用外显子捕获法(exon trapping)确定并克隆出来的人类基因, 被视为候选抑癌基因, 该基因的异常改变见于多种肿瘤如肺癌^[4]、食管癌^[5]、胃癌^[6-7]、结肠癌^[8]、胰腺癌^[9]、肺癌^[10]等. 近年的研究表明FHIT具有抑制细胞生长、诱导细胞凋亡、抑制肿瘤生长以及提高肿瘤细胞对部分凋亡作用敏感性等特点, 因此, FHIT基因已成为肿瘤基因治疗的新靶点^[4-6,8-9,11-12]. 本实验将FHIT导入MKN28细胞, 证实FHIT蛋白可重新表达, 转染后FHIT⁺ MKN28凋亡率较抑制率和凋亡率均明显升高, 说明FHIT可促进MKN28细胞凋亡抑制其生长. 同时转导FHIT基因后, 未出现促凋亡和生长抑制的情况也有报道. Ishii *et al*^[5]将FHIT基因转染入食道癌7个细胞系, 其中3个细胞系凋亡及生长没有明显改变, 这说明FHIT基因诱导细胞凋亡的作用受多种因素影响. 可能在部分肿瘤细胞中存在FHIT基因启动凋亡所必需的相关因子^[13-16], 这可能与细胞中癌基因及抑癌基因的表达情况有密切的联系. 目前, FHIT基因促凋亡的机制尚不明确. 已有研究表明, FHIT是通过启动caspase 8途径诱导细胞凋亡^[5,9,12], 而FHIT基因如何启动了凋亡途径及在这一过程中受哪些因素影响等问题有待于进一步研究.

c-myc原癌基因是一种控制细胞增殖和分


 图 6 c-myc asODN对FHIT^{+/+} MKN28细胞凋亡率的流式细胞仪分析结果.

化的原癌基因, 其编码产物是参与细胞周期调控最重要的反式作用因子(又称转录因子). 对细胞的生长和增殖进行调控, 具有诱导增殖和凋亡的双重作用. 当致癌因素存在, 使c-myc出现过度表达, 可导致细胞的无限增殖和凋亡抑制, 从而引发肿瘤^[17-18], 如在人的肺癌、胃癌、结肠癌、肝癌等肿瘤中均可发现c-myc的异常表达和扩增^[17,19-20].

asODN技术即人工合成一段能与相应癌基因互补的核苷酸, 使癌基因表达受抑制, 因而改变肿瘤发生、发展^[21-23]. 目前, 已有近10种抗肿瘤asODN完成了实验研究, 正在进行临床实验, 显示了抗肿瘤反义药物的广阔发展前景^[24-25]. 研究发现, asODN在适当的条件下, c-myc asODN可以通过和c-myc mRNA结合抑制c-myc基因的表达, 抑制细胞的生长, 甚至促进细胞的凋亡^[26-27]. 本实验结果显示脂质体介导转染c-myc asODN后可抑制FHIT⁺ MKN28及FHIT⁻ MKN28细胞的增殖并诱导其凋亡, 证实了c-myc asODN对胃癌细胞系MKN28的抗肿瘤作用, c-myc的表达下调, 可明显抑制肿瘤细胞的无限增殖, 从而可发挥抑制肿瘤生长的作用. 实验对c-myc asODN作用后不同时间的c-myc蛋白表达以及相应的细胞生长抑制率及凋亡率情况. 实验数据显示, 蛋白表达与细胞生长呈明显正相关, c-myc asODN作用以转染后第72小时作用最强, 为c-myc反义药物的研究提供了药代动力学等实验依据.

以上结果也反映了FHIT与c-myc asODN的抗肿瘤作用没有依赖性, c-myc基因不直接参与FHIT基因的抗肿瘤作用, 二者是通过不同的途径发挥抑制细胞生长及促凋亡作用. Sard *et al*发现FHIT诱导的凋亡是p53非依赖性的^[28], FHIT诱

■应用要点

FHIT基因可提高MKN28细胞对其他促凋亡作用的敏感性, 利用FHIT基因这一特性, 可进一步研究FHIT基因转染联合抗癌药物治疗肿瘤的作用效果, 这为临床肿瘤治疗提供了新的思路.

■名词解释

反义寡核苷酸技术: 是根据核酸间结合碱基互补原理, 用人工合成或生物合成的特定互补的反义核酸或他们的化学修饰物与细胞内的核酸相互作用以抑制或封闭其表达。

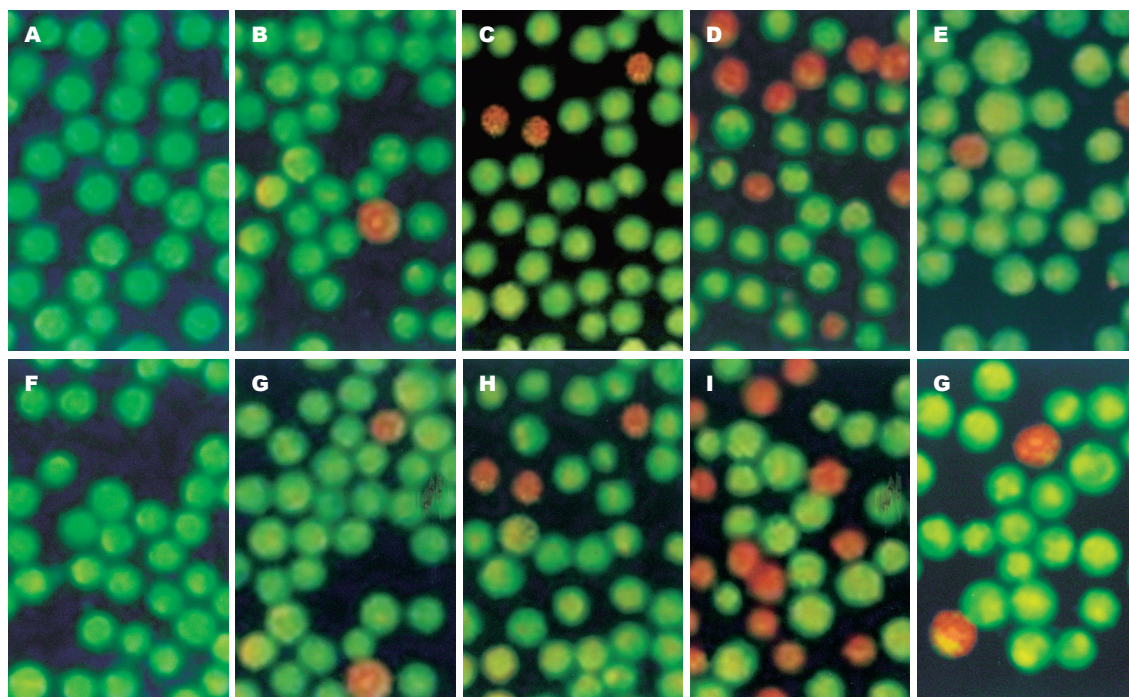


图7 转染c-myc asODN不同时间AO/EB染色的 20×20 倍镜下结果. A-E: FHIT⁺ MKN28细胞在0、24、48、72、96 h; F-J: FHIT⁻ MKN28细胞0、24、48、72、96 h.

导的凋亡经过caspase通路实现; 而与c-myc相关的凋亡为p53依赖性^[29-30], 可能是通过Fas/APO-1促凋亡途径实现^[31]. 结果还显示c-myc asODN对FHIT⁺ MKN28的生长抑制和凋亡促进作用较强, 为二者联合治疗提供了理论依据. 说明FHIT基因可提高MKN28细胞对其他促凋亡作用的敏感性, 利用FHIT基因这一特性, 可进一步研究FHIT基因转染联合抗癌药物治疗肿瘤的作用效果, 这为临床肿瘤治疗提供了新的思路.

本实验结果证实了FHIT基因及c-myc asODN对胃癌细胞MKN28的抗肿瘤作用, 同时反映二者联合应用可促进这一作用. 说明FHIT基因及c-myc均可以作为一个基因治疗的靶点, 二者联合应用更为癌基因与抑癌基因联合治疗肿瘤提供了实验依据.

4 参考文献

- 1 Baffa R, Veronese ML, Santoro R, Mandes B, Palazzo JP, Rugge M, Santoro E, Croce CM, Huebner K. Loss of FHIT expression in gastric carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 4708-4714
- 2 Lee SH, Kim HS. Sequence analyses of aberrant FHIT transcripts in gastric cancer cell lines. *Korean J Gastroenterol* 2003; 42: 476-483
- 3 Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 1996; 84: 587-597
- 4 Rohr UP, Rehfeld N, Gedert H, Pflugfelder L,

Bruns I, Neukirch J, Rohrbeck A, Grote HJ, Steidl U, Fenk R, Opalka B, Gabbert HE, Kronenwett R, Haas R. Prognostic relevance of fragile histidine triad protein expression in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 180-185

- 5 Ishii H, Dumon KR, Vecchione A, Trapasso F, Mimori K, Alder H, Mori M, Sozzi G, Baffa R, Huebner K, Croce CM. Effect of adenoviral transduction of the fragile histidine triad gene into esophageal cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1578-1584
- 6 Stec-Michalska K, Antoszczyk S, Klupinska G, Nawrot B. Loss of FHIT expression in gastric mucosa of patients with family histories of gastric cancer and Helicobacter pylori infection. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 17-21
- 7 Lee SH, Kim WH, Kim HK, Woo KM, Nam HS, Kim HS, Kim JG, Cho MH. Altered expression of the fragile histidine triad gene in primary gastric adenocarcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 850-855
- 8 Sarli L, Bottarelli L, Azzoni C, Campanini N, Di Cola G, Bader G, Iusco D, Salvemini C, Caruso G, Donadei E, Pizzi S, D'Adda T, Renato C, Roncoroni L, Bordini C. Abnormal Fhit protein expression and high frequency of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1581-1588
- 9 Dumon KR, Ishii H, Vecchione A, Trapasso F, Baldassarre G, Chakrani F, Druck T, Rosato EF, Williams NN, Baffa R, During MJ, Huebner K, Croce CM. Fragile histidine triad expression delays tumor development and induces apoptosis in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 4827-4836
- 10 Arun B, Kilic G, Yen C, Foster B, Yardley DA, Gaynor R, Ashfaq R. Loss of FHIT expression in breast cancer is correlated with poor prognostic markers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:

- 1681-1685
- 11 Pichiorri F, Trapasso F, Palumbo T, Aqeilan RI, Drusco A, Blaser BW, Iliopoulos D, Caligiuri MA, Huebner K, Croce CM. Preclinical assessment of FHIT gene replacement therapy in human leukemia using a chimeric adenovirus, Ad5/F35. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3494-3501
- 12 Dumon KR, Ishii H, Fong LY, Zanesi N, Fidanza V, Mancini R, Vecchione A, Baffa R, Trapasso F, During MJ, Huebner K, Croce CM. FHIT gene therapy prevents tumor development in Fhit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 3346-3351
- 13 Huiping C, Kristjansdottir S, Bergthorsson JT, Jonasson JG, Magnusson J, Egilsson V, Ingvarsson S. High frequency of LOH, MSI and abnormal expression of FHIT in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 728-735
- 14 D'Agostini F, Izzotti A, Balansky R, Zanesi N, Croce CM, De Flora S. Early loss of Fhit in the respiratory tract of rodents exposed to environmental cigarette smoke. *Cancer Res* 2006; 66: 3936-3941
- 15 Toledo G, Sola JJ, Lozano MD, Soria E, Pardo J. Loss of FHIT protein expression is related to high proliferation, low apoptosis and worse prognosis in non-small-cell lung cancer. *Mod Pathol* 2004; 17: 440-448
- 16 Ishii H, Dumon KR, Vecchione A, Fong LY, Baffa R, Huebner K, Croce CM. Potential cancer therapy with the fragile histidine triad gene: review of the preclinical studies. *JAMA* 2001; 286: 2441-2449
- 17 Cole MD. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet* 1986; 20: 361-384
- 18 Ryan KM, Birnie GD. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J* 1996; 314 (Pt 3): 713-721
- 19 Augenlicht LH, Wadler S, Corner G, Richards C, Ryan L, Multani AS, Pathak S, Benson A, Haller D, Heerdt BG. Low-level c-myc amplification in human colonic carcinoma cell lines and tumors: a frequent, p53-independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi-institutional trial. *Cancer Res* 1997; 57: 1769-1775
- 20 Smith-Sorensen B, Hijmans EM, Beijersbergen RL, Bernards R. Functional analysis of Burkitt's lymphoma mutant c-Myc proteins. *J Biol Chem* 1996; 271: 5513-5518
- 21 Pirolo KF, Rait A, Sleer LS, Chang EH. Antisense therapeutics: from theory to clinical practice. *Pharmacol Ther* 2003; 99: 55-77
- 22 Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 6658-6663
- 23 Lee CM, Reddy EP. The v-myc oncogene. *Oncogene* 1999; 18: 2997-3003
- 24 Crooke ST. Potential roles of antisense technology in cancer chemotherapy. *Oncogene* 2000; 19: 6651-6659
- 25 Tamm I, Dorken B, Hartmann G. Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* 2001; 358: 489-497
- 26 Wickstrom E. Antisense c-myc inhibition of lymphoma growth. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997; 7: 225-228
- 27 Kimura S, Maekawa T, Hirakawa K, Murakami A, Abe T. Alterations of c-myc expression by antisense oligodeoxynucleotides enhance the induction of apoptosis in HL-60 cells. *Cancer Res* 1995; 55: 1379-1384
- 28 Sard L, Accornero P, Tornielli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, Colombo MP, Gramegna M, Croce CM, Pierotti MA, Sozzi G. The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8489-8492
- 29 Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 1998; 12: 2424-2433
- 30 Rupnow BA, Alarcon RM, Giaccia AJ, Knox SJ. p53 mediates apoptosis induced by c-Myc activation in hypoxic or gamma irradiated fibroblasts. *Cell Death Differ* 1998; 5: 141-147
- 31 Hueber AO, Zornig M, Lyon D, Suda T, Nagata S, Evan GI. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* 1997; 278: 1305-1309

■同行评价

本文立题明确, 实验设计合理可靠, 论证充分, 有一定指导意义。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

PAI-1在大鼠胆汁淤积性肝纤维化形成中的动态变化

安德明, 季光, 郑培永

■背景资料

肝纤维化是大多数慢性肝病所共有的病理过程,也是各种慢性肝病向肝硬化过度的中间环节,肝纤维化确切的发病机制尚未完全阐明,胆管阻塞性肝纤维化动物模型与CCl₄、二甲基亚硝胺以及异源血清诱导的肝纤维化模型相比,具有炎症反应轻、肝细胞坏死少、纤维组织增生明显等特点,在肝纤维化的发病机制、筛选非创伤性肝纤维血清学诊断指标、新药开发等研究方面具有独特的应用价值,已广泛应用于肝纤维化研究。

安德明, 季光, 郑培永, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科、上海中医药大学脾胃病研究所 上海市 200032
安德明, 医学硕士, 主治医师, 主要从事中医药防治肝病研究。教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目, No. NCET-07-0563
上海市教委重点学科资助项目, No. J50305
作者贡献分布: 安德明, 季光对此文所作贡献均等, 此课题由季光, 安德明及郑培永设计; 研究过程由安德明, 郑培永操作完成; 研究所用试剂及分析工具由季光提供; 数据分析由安德明, 郑培永及季光完成; 本论文写作由安德明, 郑培永及季光完成。
通讯作者: 季光, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科、上海中医药大学脾胃病研究所。jiliver@vip.sina.com
电话: 021-64286261 传真: 021-64286261
收稿日期: 2007-07-09 修回日期: 2007-11-21

Dynamic changes of plasminogen activator inhibitor-1 in the process of cholestatic liver fibrosis in rats

De-Ming An, Guang Ji, Pei-Yong Zheng

De-Ming An, Guang Ji, Pei-Yong Zheng, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; Institute of Spleno-gastric Diseases of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Supported by: the Foundation of Ministry of Education of China for talented persons in the New Century, No. NCET-070585 and Leading Academic Discipline Project of Shanghai Municipal Education Commission Leading Academic Discipline Project, No. J50305
Correspondence to: Dr. Guang Ji, Institute of Gastroenterology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 Wanping South Road, Shanghai 200032, China. jiliver@vip.sina.com
Received: 2007-07-09 Revised: 2007-11-21

Abstract

AIM: To study the dynamic changes of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) mRNA in the process of cholestatic liver fibrosis in rats.

METHODS: Rat models of cholestatic liver fibrosis were induced by bile duct ligation. Rats were divided into control group, 1 wk, 2 wk, 3 wk and 4 wk groups. Liver pathology and fibrosis degree were observed. Expression of PAI-1 mRNA, MMP-2 and MMP-9 was detected weekly by ELISA.

RESULTS: Histological examination showed

that the degree of rat liver fibrosis and the expression of PAI-1 mRNA were gradually increased with the prolongation of biliary obstruction. The expression of PAI-1/ β -actin mRNA in 1 wk, 2 wk, 3 wk and 4 wk model groups was significantly higher than that in the control group (1.53 ± 0.01 , 1.84 ± 0.03 , 2.06 ± 0.04 , 3.62 ± 0.04 vs 0.72 ± 0.02 , $P < 0.01$) and the expression of MMP-2 and MMP-9 was elevated in the first stage and then declined.

CONCLUSION: Dynamic changes of PAI-1 mRNA expression are closely correlated with the formation and development of cholestatic liver fibrosis.

Key Words: Plasminogen activator inhibitor 1; Cholestatic liver fibrosis; MMPs; RT-PCR

An DM, Ji G, Zheng PY. Dynamic changes of plasminogen activator inhibitor-1 in the process of cholestatic liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 246-252

摘要

目的: 探讨纤溶酶原激活物抑制剂1(PAI-1)mRNA在胆汁淤积性肝纤维形成中的动态变化及其作用。

方法: 应用胆管结扎法复制胆汁淤积性肝纤维化动物模型, 分为假手术组, 模型组1 wk、2 wk、3 wk、4 wk, 观察模型大鼠肝组织病理、纤维化程度、RT-PCR检测PAI-1 mRNA的水平、ELISA法检测MMP-2和MMP-9含量的动态变化。

结果: 随胆管阻塞时间延长, 胆管阻塞性肝纤维化大鼠纤维化程度逐渐增加, 模型组1 wk、2 wk、3 wk、4 wk组PAI-1 mRNA表达与假手术组相比, 逐渐增强, 有显著性差异(1.53 ± 0.01 , 1.84 ± 0.03 , 2.06 ± 0.04 , 3.62 ± 0.04 vs 0.72 ± 0.02 , $P < 0.01$), 而MMP-2和MMP-9表达先升高后下降。

结论: PAI-1 mRNA表达存在动态变化, 其表达升高与胆汁淤积性肝纤维化形成和发展有关。

■同行评议者

范建高, 主任医师, 上海市第一人民医院消化科

关键词: I型纤溶酶原激活物抑制剂; 胆汁淤积性肝纤维化; 基质金属蛋白酶; 逆转录聚合酶链式反应

安德明, 季光, 郑培永. PAI-1在大鼠胆汁淤积性肝纤维化形成中的动态变化. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 246-252
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/246.asp>

0 引言

肝纤维化是肝脏对各种因素所致的慢性损伤的一种修复反应, 是大多数慢性肝病所共有的病理过程, 也是各种慢性肝病向肝硬化过度的中间环节, 其特征是细胞外基质(ECM)在肝内过度沉积^[1-10]. 纤溶系统是调节基质金属蛋白酶(matrix metalloprotease, MMPs)活性和ECM降解的关键因素, 在肝脏ECM调控和肝细胞再生等过程中起着重要作用, 与肝纤维化的发生和发展密切相关^[11-15]. I型纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)是纤溶系统的主要抑制物, 是尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, uPA)和组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)专一生理抑制剂, 可以迅速、有效地抑制uPA和tPA的活性^[16-21]. 观察PAI-1 mRNA在胆汁淤积性肝纤维形成中的动态变化, 有助于阐明其在胆汁淤积性肝纤维化形成中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级SD δ 大鼠63只(体质量 260 ± 20 g), 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 上海中医药大学附属龙华医院实验动物中心饲养. 盐酸氯胺酮注射液(上海第一生化药业公司); 注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司); HE染液和Masson染液(上海虹桥乐翔医用试剂有限公司); MMP-2和MMP-9 ELISA试剂盒(上海森雄科技实业有限公司); TRizol Reagent, AMV RT/PCRKit 和DNA Marker(上海申能博彩生物科技有限公司); DEPC和琼脂糖(Sigma); 氯仿、异丙醇(上海试剂一厂); 引物由上海申能博彩生物科技有限公司合成, 大鼠PAI-1上游引物: GTGGTTCGGCACAATCCAACAGAG, 下游引物: GCAATGGAGGACGATACAAGAGGT, β -actin上游: TGTGATGGTGGGTATGGGTCAGAAG; β -actin下游: TCACGGTTGGCCTTAGGGTTCAGAG; DY89-1型电动玻璃匀浆机为宁波新芝科器研究所产品; 低温离心机为Eppendorf公司; PCR仪(BIO-RAD); RNA/DNA calculator(Pharmacia); 凝

胶成像系统(上海四星生物技术有限公司); 电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司); UV-2102C型紫外可见分光光度计(尤尼克公司).

1.2 方法

1.2.1 造模及给药: 参照文献[22]采用胆管结扎复制胆汁淤积性肝纤维化模型. 术前禁食不禁水12 h, im盐酸氯胺酮100 mg/kg麻醉, 常规腹部皮肤消毒, 沿腹正中线切开皮肤, 暴露胆总管, 于远近端结扎胆总管, 中间离断, 关腹; 假手术组仅开腹暴露并游离胆总管不结扎, 关腹. 于造模1 wk后, 模型组随机分为1 wk、2 wk、3 wk(各6只), 4 wk(12只); 假手术组分为1 wk、2 wk、3 wk(各6只), 4 wk(10只). 以盐酸氯胺酮ip麻醉(2 mL/kg), 腹主动脉采血, 离心分离血清, -80°C 保存备用. 摘取肝脏称重后, 于肝右叶切取 $1.0\text{ cm} \times 1.0\text{ cm}$ 大小肝组织2块, 40 g/L中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋备组织病理检查, 常规HE, Masson染色; 余下肝组织于液氮中速冻, -80°C 保存备用. 参考文献[23]制定纤维化程度分级标准: 汇管区纤维组织无增生为“-”; 增生后面积占肝小叶1/3以下为“+”; 占肝小叶1/3-2/3为“++”; 占肝小叶2/3以上为“+++”. 每个“+”记1分, 每个标本记总分.

1.2.2 RT-PCR: 标本经 -80°C 保存的大鼠肝组织, 匀浆后用TRIzol试剂抽提总RNA, 采用分光光度法测定其含量及纯度, 吸光度在1.8-2.0之间. PCR扩增, 49 μL 体系: 1^{st} strand cDNA 5 μL , $10 \times$ PCR Buffer 5 μL , dNTP 1 μL , 目的基因正负链各2 μL , β -actin正负链各2 μL , H_2O 29 μL , Taq酶 1 μL ; PCR循环条件: 95°C 预变性5 min, 95°C 30 s, 60°C 40 s, 72°C 1 min, 30次循环, 72°C 10 min. PCR产物加样于20个/L琼脂糖凝胶, 电泳, 紫外灯下观察, 凝胶分析系统拍照, 计算机图像扫描和吸光度值分析, 从而得到PAI-1/ β -actin mRNA的相对表达量.

1.2.3 ELISA: 取一部分肝组织迅速置于液氮, 之后转入 -80°C 保存, 再用生理盐水制备100 g/L肝匀浆. 匀浆液置于试管中, 4°C , 2000 r/min, 离心10 min, 仔细收集上清, -20°C 保存, 备用. 然后严格按照试剂盒说明书操作.

统计学处理 各组计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 计量资料采用 F 检验, 等级资料采用秩和检验, 应用SPSS12.0软件进行分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠体征 假手术组大鼠毛发有光泽, 体质量

■ 研发前沿

PAI-1与肝纤维化关系研究的热点主要集中在PAI-1通过调控纤溶系统对细胞外基质调控系统的影响, 尤其是对基质金属蛋白酶系统的调控、与肝纤维化相关细胞因子之间的关系以及在肝星状细胞增殖、迁移中的作用等方面.

■ 相关报道

最近研究表明, PAI-1在肝纤维化发病过程中起着重要作用, 而且与转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)等细胞因子相关. Bergheim *et al*通过对PAI-1基因敲除小鼠胆管阻塞性肝纤维化模型研究发现与野生小鼠比较PAI-1基因缺失在延缓肝纤维化进程中起着关键作用.

■创新盘点

本文动态观察胆汁淤积性肝纤维化形成过程中肝组织病理学、PAI-1、MMP-2、MMP-9变化规律,发现PAI-1 mRNA表达存在动态变化,其表达升高与胆汁淤积性肝纤维化形成和发展有关。

增加,体态活泼,食量及二便正常,模型组大鼠体重增长缓慢,2-3 d后大鼠出现小便发黄,术后7 d,出现尾部黄染、耳黄、毛发黄染等黄疸表现,胆总管明显扩张,梗阻时间越长,扩张越明显,肝脏肿大,呈黄绿色,随时间延长黄染加重,第3-4周肝脏质地逐渐变硬,4 wk表面呈桔皮样。造模过程中,大鼠死亡3只,大鼠在1 wk内死亡2只,死亡较少,为结扎线脱落形成胆汁性腹水致死,2-3 wk无死亡,第4周始大鼠死亡增加,共死亡4只,尸体解剖观察可见消化道出血和腹水等。

2.2 肝组织病理的动态变化 HE染色显示,假手术组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,呈放射状,肝窦正常,胞核结构清晰。造模第1周可见胆管上皮细胞增生,可见少量的肝细胞坏死灶;第2周胆管上皮细胞进一步增殖,范围较第1周增加,汇管区面积扩大,逐渐向小叶内延伸,增生的胆管上皮细胞周围有纤维组织增生,炎细胞浸润和肝细胞坏死较少;第3周增生的胆管上皮细胞分化为小胆管,与纤维母细胞、纤维组织形成间隔,改建原有肝小叶;第4周肝组织结构破坏严重,细胞呈花环状,多数有管腔,大量胶原组织沉积,纤维增生更加明显,肝细胞坏死和炎细胞浸润较少,肝细胞与增生的胆小管相比较明显减少,肝细胞形态和结构正常(图1A-E)。Masson染色、肝纤维化分级表明,随着胆管阻塞时间的延长,纤维化程度逐渐加重(图1A'-E',表1)。

2.3 肝组织PAI-1 mRNA表达动态变化 RT-PCR检测结果显示,假手术组PAI-1 mRNA表达较低(PAI-1/ β -actin mRNA为 0.72 ± 0.02),而各时间点模型对照组PAI-1 mRNA表达随胆管阻塞时间延长逐渐增强(PAI-1/ β -actin mRNA依次为 1.53 ± 0.01 , 1.84 ± 0.03 , 2.06 ± 0.04 , 3.62 ± 0.04),与假手术组比较,各时间点模型对照组PAI-1/ β -actin mRNA显著增加($P < 0.01$),各时间点模型对照组之间PAI-1/ β -actin mRNA有显著差异($P < 0.01$,图2)。

2.4 肝组织MMP-2和MMP-9蛋白含量动态变化 ELISA法检测显示,MMP-2蛋白含量在胆管阻塞1 wk时显著增加,且随着胆管阻塞时间的延长逐渐增加,3 wk时达到峰值,4 wk时有所下降;与假手术组比较,各时间点模型对照组均有显著差异($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),而各时间点模型对照组之间比较无显著差异($P > 0.05$)。MMP-9蛋白含量在胆管阻塞1 wk时显著增加,2 wk达到峰值,而后有所下降;与假手术组比较,各时间点模型对照

组有均显著差异($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),而各时间点模型对照组之间无显著差异(表2)。

3 讨论

纤溶系统是纤溶酶原经特异性激活物作用转化为纤溶酶,导致体内纤维蛋白不断溶解的反应体系,主要包括纤溶酶原、纤溶酶、纤溶酶原激活物及其抑制剂^[24]。纤溶酶原激活物(PA)通过PA-纤溶酶-MMPs级联反应途径,最终可产生活化的纤溶酶和MMPs,后两者是降解ECM各组分的重要物质。PAI-1和PA是调节纤溶系统的重要成分。两者的平衡维持着纤溶系统功能的正常,可防止血栓形成和保证血管内血流通畅。而在肝脏纤维化的过程中,这种平衡的失调会促进胶原、糖蛋白、蛋白多糖等ECM的合成增加^[25],并在肝组织内沉积形成纤维组织,从而促进肝脏纤维化和肝硬化的出现。PAI-1基因缺失可以延缓纤维化进程^[26-27],而小鼠uPA基因敲除可自发性出现肝脏、肺脏及其他脏器ECM沉积,诱发纤维化形成^[28-29]。高脂饮食诱导的家兔脂肪肝肝脏中PAI-1基因的表达亦明显增强^[30]。对大鼠酒精性肝病研究发现,在肝损伤早期尚未出现明显组织病理学改变时,即可诱导PAI-1基因在转录水平的过度表达^[31]。而近年临床研究也证实慢性乙肝患者PAI-1蛋白表达着色积分随肝纤维化加重而显著升高^[32]。

肝纤维化的调控是多水平调节,其中最主要的是肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化,进而合成大量ECM,因此,HSC的激活是肝纤维化发生发展的中心环节,他是调控肝脏ECM的最主要的细胞^[33-43]。研究发现,新分离的大鼠HSC可以表达uPA, uPAR和PAI-1,在HSC活化的早期阶段(7 d)时,uPA mRNA合成和活性达到高峰,HSC完全活化的后期阶段(14-21 d)时,uPA活性逐渐下降,而PAI-1活性则逐渐增高^[44]。对CCL₄诱导的大鼠肝纤维化的研究表明,在肝纤维化形成的早期,uPA, uPAR mRNA的表达分别增加2.8和1.8倍,而tPA、PAI-1 mRNA的水平不变;随着肝纤维化的发展,uPA、uPAR、tPA、PAI-1的mRNA表达都增加,但PAI-1的表达更加明显,Western blot分析与之一致^[45]。基于上述研究,有学者认为,uPA及其抑制剂在纤维化的不同阶段起着不同作用。在早期,uPA可能随HSC活化表达上调,活性增加,激活窦周间隙纤溶酶及MMPs,后两者降解肝脏组织中正常的ECM,由于缺乏正常的纤维组织的支撑和营养作用,肝细胞功能受到损害。此后,HSC不断TGF- β 1,

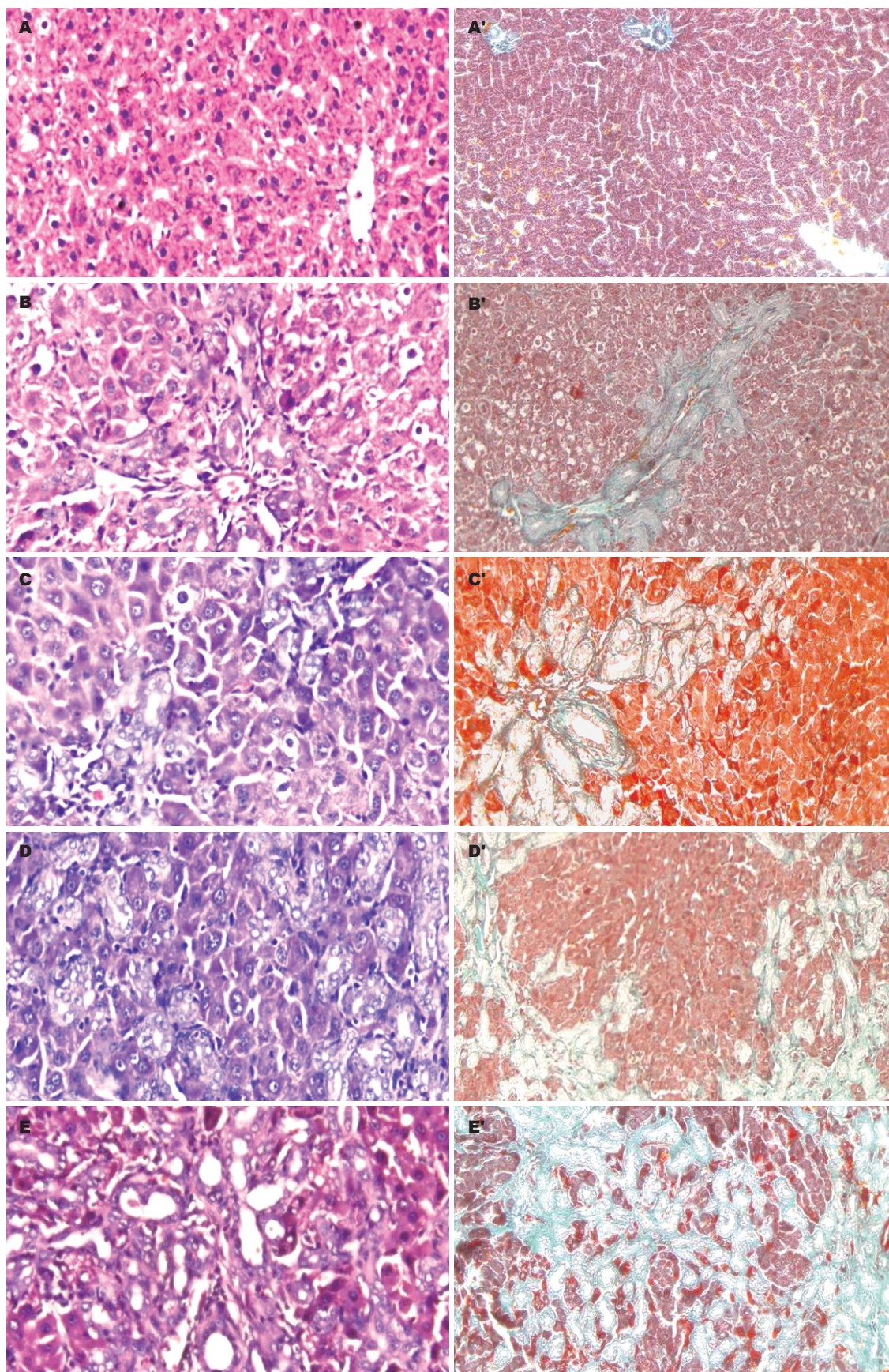


图 1 大鼠肝组织病理动态变化, A-E(HE $\times 400$), A'-E'(Masson $\times 200$). A: 假手术组; B: 模型1 wk; C: 模型2 wk; D: 模型3 wk; E: 模型4 wk.

■应用要点

本文研究表明,在胆汁淤积性肝纤维化形成过程中,PAI-1 mRNA 过度表达可能导致PA/PAI-1平衡失衡,通过PA-纤溶酶-MMPs级联途径影响ECM的合成与降解,下调ECM降解,使得ECM合成增加,沉积增加,加速肝纤维化的发展和肝硬化的发生,提示PAI-1有可能作为胆汁淤积性肝纤维化治疗的靶点之一.

引起PAI-1表达增加,通过与uPA结合抑制其纤溶激活作用,导致纤溶酶和MMPs系统活性下

■同行评价

本文设计比较合理, 结果有一定的意义。

表 1 各时间点模型肝组织纤维化程度的动态变化

分组	n	肝纤维化程度分级				纤维化积分
		-	+	++	+++	
假手术组	6	10	0	0	0	0 ^b
模型1 wk	6	0	5	1	0	3.50 ± 1.22
模型2 wk	6	0	4	2	0	4.00 ± 1.55
模型3 wk	6	0	0	4	2	7.00 ± 1.55 ^d
模型4 wk	8	0	0	1	7	8.63 ± 1.06 ^c

^bP<0.01 vs 各时间点模型对照组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 上一时间点模型对照组。

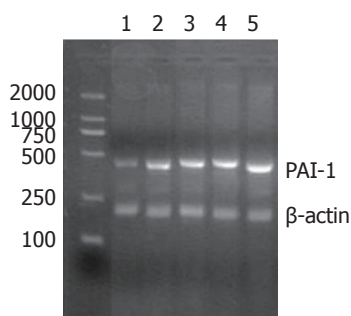


图 2 大鼠肝组织PAI-1 mRNA表达动态变化。1: 假手术组; 2: 模型1 wk; 3: 模型2 wk; 4: 模型3 wk; 5: 模型4 wk。

调, 细胞外基质沉积明显增加, 肝纤维化程度不断加重。在肺纤维化的研究中也发现, uPA可激活TGF- β 1, 促进肺纤维化, 同时TGF- β 1能诱导PAI-1表达, 而PAI-1在肺损伤和胸膜损伤的修复中同样起关键作用^[46]。然而, 也有学者认为, MMP-2和MMP-9活性升高持续整个肝纤维形成期, 可能是机体对纤维间隔和窦周胶原过多沉积的自身调节反应^[47]。国外有学者对胆汁淤积性肝纤维化的研究中发现, 野生鼠胆管阻塞3 d PAI-1 mRNA即显著增加, 而野生和PAI-1基因敲除鼠uPA、MMP-2和MMP-9活性均并未上调, 而 α -SMA、I 胶原mRNA表达均升高; 2 wk野生鼠三者活性都增加, 而且与野生鼠比较, PAI-1基因敲除鼠三者活性增加更加明显, 肝纤维化明显减轻; 同时发现基因敲除鼠早期肝损伤明显减轻, 只是这种保肝作用短暂。进一步研究表明PAI-1基因缺失延缓肝纤维化进程是由于促进了细胞外基质降解^[48]。

本研究表明, 在胆管阻塞1 wk, PAI-1 mRNA表达显著升高, PAI-1基因在转录水平的过度表达随着胆管结扎时间延长, 逐渐显著增强; MMP-2和MMP-9蛋白含量在第1周即显著增加, 分别于第3周和第2周达到峰值, 此后有所下降, 但在各时间点之间无统计学差异。而病理观察

表 2 模型大鼠肝组织MMP-2和 MMP-9表达的动态变化

组别	n	MMP-2(μ g/L)	MMP-9(μ g/L)
假手术组	6	177.28 ± 40.70 ^{ab}	81.01 ± 19.77 ^{ab}
模型1 wk	6	241.22 ± 64.37	114.97 ± 24.74
模型2 wk	6	272.90 ± 56.95	144.76 ± 32.35
模型3 wk	6	277.45 ± 48.40	131.25 ± 34.37
模型4 wk	6	264.87 ± 38.55	129.99 ± 21.33

^aP<0.05 vs 模型1 wk, ^bP<0.01 vs 模型2 wk、3 wk、4 wk。

表明, 在1-3 wk为胆管细胞增生期, 3 wk后主要为胶原纤维增生期, 随着胆管结扎时间的延长, 纤维化程度逐渐加重, 由此我们推测, 在胆汁淤积性肝纤维化形成早期, uPA或者tPA纤溶活性可能显著增强, 导致MMP-2和MMP-9活性增加。此后, 可能PAI-1 mRNA的增加的强度要高于PA蛋白的增加, 过多表达的PAI-1通过结合PA抑制其纤溶激活作用, 抑制纤溶酶原的活化进一步抑制MMP-2和MMP-9的活化, 细胞外基质合成继续增加、降解相对不足, 肝纤维程度不断加重。有研究证实, 将uPA基因导入体外培养的大鼠HSC可以提高上清液中MMP-2的浓度, 胞质内的I, III型胶原含量明显减少^[49]。外源性uPA基因治疗CCl₄诱导的肝纤维化发现, uPA可以提高MMP-2的活性, 促进ECM降解, 延缓肝纤维化进程, 但是并未改善肝功能^[50]。

总之, 在大鼠胆汁淤积性肝纤维形成过程中, PAI-1 mRNA过度表达可能导致PA/PAI-1平衡失衡, 通过PA-纤溶酶-MMPs级联途径影响ECM的合成与降解, 下调ECM降解, 使得ECM合成增加, 沉积增加, 加速肝纤维化的发展和肝硬化的发生。关于PA在胆汁淤积性肝纤维化形成中的动态变化以及作用机制有待进一步研究。

4 参考文献

- Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515
- 王宝恩. 肝星状细胞与肝纤维化. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 197-198
- Valková M. Pathophysiology of hepatic fibrosis. *Vnitř Lek* 2002; 48: 27-33
- Valková M. Hepatic fibrogenesis. *Bratisl Lek Listy* 2002; 103: 76-85
- Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1728-1734
- Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 413-426
- Huwart L, Sempoux C, Salameh N, Jamart J, Annet L, Sinkus R, Peeters F, ter Beek LC, Horsmans

- Y, Van Beers BE. Liver fibrosis: noninvasive assessment with MR elastography versus aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index. *Radiology* 2007; 245: 458-466
- 9 Lamireau T, Desmoulière A, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Arch Pediatr* 2002; 9: 392-405
- 10 Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 1399-1410
- 11 Bai K, Guo CJ. The plasma levels of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 and the protein expressions of alpha-SMA and MMP-1 and TIMP-1 in patients with different grades of liver fibrosis. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2006; 14: 459-461
- 12 Nagaoka MR, Kouyoumdjian M, Borges DR. Hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator and plasma kallikrein in experimental liver fibrosis. *Liver Int* 2003; 23: 476-483
- 13 Gangadharan B, Antrobus R, Dwek RA, Zitzmann N. Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clin Chem* 2007; 53: 1792-1799
- 14 Wu XR, Lv MH, Wang Q, Shi SS, Guo WD. The plasma levels of transforming growth factor beta1 and the protein expressions of alpha-SMA, urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in liver of patients with different grades of hepatic fibrosis. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2004; 12: 400-402
- 15 Inuzuka S, Ueno T, Torimura T, Tamaki S, Sugawara H, Sakata R, Kusaba N, Sata M, Tanikawa K. The significance of colocalization of plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin in hepatic fibrosis. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 1052-1060
- 16 Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Grøndahl-Hansen J, Eriksen J, Blasi F, Danø K. Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am J Pathol* 1991; 138: 1059-1067
- 17 Idell S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003; 31: S213-S220
- 18 Schwartz BS, España F. Two distinct urokinase-serpin interactions regulate the initiation of cell surface-associated plasminogen activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 15278-15283
- 19 Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW. Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol Sci* 2002; 17: 56-61
- 20 Benahmed M. Plasminogen activator inhibitor-1 is expressed in cultured rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 1998; 59: 591-598
- 21 Pinsky DJ, Liao H, Lawson CA, Yan SF, Chen J, Carmeliet P, Loskutoff DJ, Stern DM. Coordinated induction of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibition of plasminogen activator gene expression by hypoxia promotes pulmonary vascular fibrin deposition. *J Clin Invest* 1998; 102: 919-928
- 22 孙杨忠, 耿小平. 阻塞性黄疸大鼠胆总管直径、压力及血清胆红素代谢变化的观察. *肝胆外科杂志* 2003; 11: 141-142
- 23 沈宏亮, 徐冠南, 陈克明, 王元和, 张璞, 付志仁. IFN γ 防治大鼠胆总管结扎所致肝纤维化的实验研究. *第二军医大学学报* 1999; 20: 48-50
- 24 Nicholl SM, Roztocil E, Davies MG. Plasminogen activator system and vascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2006; 4: 101-116
- 25 Stoop AA, Lupu F, Pannekoek H. Colocalization of thrombin, PAI-1, and vitronectin in the atherosclerotic vessel wall: A potential regulatory mechanism of thrombin activity by PAI-1/vitronectin complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1143-1149
- 26 Nicholas SB, Aguiniga E, Ren Y, Kim J, Wong J, Govindarajan N, Noda M, Wang W, Kawano Y, Collins A, Hsueh WA. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency retards diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67: 1297-1307
- 27 Chuang-Tsai S, Sisson TH, Hattori N, Tsai CG, Subbotina NM, Hanson KE, Simon RH. Reduction in fibrotic tissue formation in mice genetically deficient in plasminogen activator inhibitor-1. *Am J Pathol* 2003; 163: 445-452
- 28 Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994; 368: 419-424
- 29 Swaisgood CM, French EL, Noga C, Simon RH, Ploplis VA. The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice deficient for components of the fibrinolytic system. *Am J Pathol* 2000; 157: 177-187
- 30 范建高, 陈良华, 曾明德, 徐正婕, 王国良, 巫协宁. 普伐他丁对兔脂肪肝肝脏 I 型纤溶酶原激活物抑制物 mRNA 表达的影响. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 70-72
- 31 周俊, 拓西平, 苗振春, 孙波, 韩易. 大鼠酒精性肝病早期 I 型纤溶酶原激活物抑制物 mRNA 表达及药物的影响. *中华消化杂志* 2002; 22: 573-574
- 32 李清华, 秦成勇, 劳萍. 纤溶酶原激活物抑制物在纤维化肝组织中的表达及其血浆活性检测. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 209-211
- 33 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105
- 34 Uemura M, Swenson ES, Gaça MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4214-4224
- 35 Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, Mukherjee P, Friedman SL, Eng FJ. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005; 54: 142-151
- 36 Gäbele E, Reif S, Tsukada S, Bataller R, Yata Y, Morris T, Schrum LW, Brenner DA, Rippe RA. The role of p70S6K in hepatic stellate cell collagen gene expression and cell proliferation. *J Biol Chem* 2005; 280: 13374-13382
- 37 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-384
- 38 Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* 1996; 54: S39-S45
- 39 Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects

- for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 618-633
- 40 Pohl JF, Melin-Aldana H, Sabla G, Degen JL, Bezerra JA. Plasminogen deficiency leads to impaired lobular reorganization and matrix accumulation after chronic liver injury. *Am J Pathol* 2001; 159: 2179-2186
- 41 Vergnes L, Phan J, Strauss M, Tafuri S, Reue K. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 42774-42784
- 42 Du SL, Pan H, Lu WY, Wang J, Wu J, Wang JY. Cyclic Arg-Gly-Asp peptide-labeled liposomes for targeting drug therapy of hepatic fibrosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322: 560-568
- 43 Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S73-S78
- 44 Leyland H, Gentry J, Arthur MJ, Benyon RC. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996; 24: 1172-1178
- 45 Zhang LP, Takahara T, Yata Y, Furui K, Jin B, Kawada N, Watanabe A. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. *J Hepatol* 1999; 31: 703-711
- 46 Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Kotliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 2001; 194: 809-821
- 47 王宪波, 刘平, 唐志鹏, 陆雄, 刘成海, 胡义扬, 徐列明, 顾宏图, 刘成. 大鼠肝纤维化形成中基质金属蛋白酶 2、9活性变化的病理意义. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 267-268
- 48 Bergheim I, Guo L, Davis MA, Duveau I, Arteel GE. Critical role of plasminogen activator inhibitor-1 in cholestatic liver injury and fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 592-600
- 49 林勇, 陈伟忠, 谢渭芬, 曾欣, 张新, 陈岳祥, 张忠兵, 杨秀疆. 导入外源人尿激酶型纤溶酶原激活剂基因对肝星状细胞胶原沉积的影响. *中华消化杂志* 2004; 24: 387-389
- 50 Lin Y, Xie WF, Chen YX, Zhang X, Zeng X, Qiang H, Chen WZ, Yang XJ, Han ZG, Zhang ZB. Treatment of experimental hepatic fibrosis by combinational delivery of urokinase-type plasminogen activator and hepatocyte growth factor genes. *Liver Int* 2005; 25: 796-807

编辑 李军亮 电编 李军亮

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, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成. (总编辑: 马连生 2007-12-28)

甲珠对肝纤维化大鼠 α -SMA和TGF- β 1表达的影响

付德才, 杨世忠, 孙钰玮, 于春艳, 毛丽珍, 姜相莲, 关瑞锋

付德才, 杨世忠, 吉林大学第一医院消化科 吉林省长春市 130021

孙钰玮, 于春艳, 毛丽珍, 姜相莲, 关瑞锋, 牡丹江医学院附属第一医院感染科 黑龙江省牡丹江市 157011

付德才, 吉林大学第一医院消化科博士在读, 主任医师, 主要从事慢性肝病及肝纤维化、肝硬化方面的研究。

黑龙江省卫生厅基金资助项目, No. 2006-408

作者贡献分布: 此课题由付德才, 杨世忠设计; 研究过程由付德才, 孙钰玮, 于春艳, 毛丽珍, 姜相莲, 关瑞锋操作完成; 研究所用试剂及分析工具由付德才提供; 数据分析由付德才, 于春艳, 孙钰玮完成; 本论文写作由付德才完成。

通讯作者: 杨世忠, 13002, 吉林省长春市, 吉林大学第一医院消化科. 303302385@qq.com

电话: 0453-6583274

收稿日期: 2007-09-03 修回日期: 2007-11-17

Effect of Jiazhu on α -SMA and TGF- β 1 expression in rats with hepatic fibrosis

De-Cai Fu, Shi-Zhong Yang, Yu-Wei Sun, Chun-Yan Yu, Li-Zhen Mao, Xiang-Lian Jiang, Rui-Feng Guan

De-Cai Fu, Shi-Zhong Yang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jiling Province, China

Yu-Wei Sun, Chun-Yan Yu, Li-Zheng Mao, Xiang-Lian Jiang, Rui-Feng Guan, Department of Infection, the First Hospital of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Heilongjiang Health Department Research Fund, No. 2006-408

Correspondence to: Shi-Zhong Yang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Jilin University, Changchun, 130021, China. 303302385@qq.com

Received: 2007-09-03 Revised: 2007-11-17

Abstract

AIM: To investigate the effect of Jiazhu on α -SMA and TGF- β 1 expression in the liver of rats with hepatic fibrosis and its anti-fibrosis mechanism.

METHODS: A model of rat hepatic fibrosis was induced by injecting 40% CCL₄, which was interfered with high [2.0 g/(kg·d)], medium [1.0 g/(kg·d)] and low doses [0.5 g/(kg·d)] of Jiazhu. Hepatic function and serum TGF- β 1 were examined. Expression of α -SMA and TGF- β 1 was detected by immunohistochemistry and RT-PCR.

RESULTS: Compared with the model group,

the levels of aspartate transaminase and alanine transaminase were significantly decreased in the high, medium and low Jiazhu dose groups. Total protein and albumin increased while serum bilirubin and TGF- β 1 were significantly reduced. The expression of α -SMA and TGF- β 1 in liver tissue was decreased. The mRNA expression, stained area and gray scale of α -SMA and TGF- β 1 in the high, medium and low Jiazhu dose groups were significantly different compared with the model group (α -SMA: 9.21 ± 1.12 , 12.63 ± 2.42 , 14.23 ± 1.57 vs 16.32 ± 2.14 , $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$; TGF- β 1 mRNA: 5.58 ± 0.80 , 8.62 ± 1.16 , 11.92 ± 1.35 vs 14.57 ± 1.59 , $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), (dyeing area of α -SMA: $9.21\% \pm 1.29\%$, $12.63\% \pm 1.44\%$, $14.23\% \pm 1.41\%$ vs $16.32\% \pm 1.75\%$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$; dyeing area of TGF- β 1: $5.31\% \pm 0.70\%$, $8.37\% \pm 1.09\%$, $11.92\% \pm 1.42\%$ vs $14.47\% \pm 1.48\%$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), (gray scale of α -SMA: 91.29 ± 9.53 , 99.55 ± 11.83 , 107.18 ± 12.06 vs 116.44 ± 12.97 , $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$; gray scale of TGF- β 1: 89.96 ± 9.64 , 106.92 ± 13.90 , 110.50 ± 12.91 vs 127.13 ± 14.88 , $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Jiazhu can inhibit rat hepatic fibrosis induced by CCL₄.

Key Words: Jiazhu; Hepatic fibrosis; α -SMA; TGF- β 1; RT-PCR

Fu DC, Yang SZ, Sun YW, Yu CY, Mao LZ, Jiang XL, Guan RF. Effect of Jiazhu on α -SMA and TGF- β 1 expression in rats with hepatic fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(3): 253-258

摘要

目的: 研究甲珠对肝纤维化大鼠 α -肌动蛋白(α -SMA)和转化生长因子- β 1(TGF- β 1)表达影响, 并探讨其抗纤维化机制。

方法: 采用400 mL/L CCL₄ sc, 制备肝纤维化模型并以高[2.0 g/(kg·d)], 中[1.0 g/(kg·d)], 低剂量[0.5 g/(kg·d)]甲珠干预, 测定各组肝功能、血清TGF- β 1, 免疫组织化学法检测肝组织 α -SMA、TGF- β 1表达, RT-PCR检测 α -SMA、TGF- β 1 mRNA的表达。

■背景资料

肝纤维化的病理改变是细胞外基质(ECM)的增生和降解失衡所致, 而病理情况下细胞外基质的主要细胞来源是肝星状细胞(HSC), 他的激活和增生在肝纤维化过程中起主要作用。TGF- β 1是HSC活化的强有力刺激因子和肝纤维化形成的始动细胞因子, α -SMA是HSC活化的标志。研究TGF- β 1、 α -SMA的表达变化可反映肝纤维化的变化情况。

■同行评议者

高春芳, 研究员, 第二军医大学附属长征医院实验诊断科

■研发前沿

肝纤维化的可逆性是防治肝硬化的研究热点,其中星状细胞的激活及细胞外基质的分泌与代谢机制是该领域的研究重点,找到安全、高效、来源充足的抗肝纤维化药物是当务之急。

结果: 甲珠各组较模型组肝功能明显改善,丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶显著降低,总蛋白及白蛋白显著升高,胆红素降低;血清TGF- β 1显著降低;高、中、低甲珠剂量组肝组织 α -SMA及TGF- α 1 mRNA表达,染色面积比,灰度值与模型组相比均有显著性意义(α -SMA: 9.21 ± 1.12 、 12.63 ± 2.42 、 14.23 ± 1.57 vs 16.32 ± 2.14 , $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$; TGF- β 1 mRNA: 5.58 ± 0.80 、 8.62 ± 1.16 、 11.92 ± 1.35 vs 14.57 ± 1.59 , $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$), (α -SMA染色面积比: $9.21\% \pm 1.29\%$ 、 $12.63\% \pm 1.44\%$ 、 $14.23\% \pm 1.41\%$ vs $16.32\% \pm 1.75\%$, $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$; TGF- β 1染色面积比: $5.31\% \pm 0.70\%$ 、 $8.37\% \pm 1.09\%$ 、 $11.92\% \pm 1.42\%$ vs $14.47\% \pm 1.48\%$, $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$), (α -SMA灰度值: 91.29 ± 9.53 、 99.55 ± 11.83 、 107.18 ± 12.06 vs 116.44 ± 12.97 , $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$; TGF- β 1灰度值: 89.96 ± 9.64 、 106.92 ± 13.90 、 110.50 ± 12.91 vs 127.13 ± 14.88 , $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$).

结论: 甲珠对CCl₄诱导的实验鼠肝纤维化有良好的抑制作用。

关键词: 甲珠; 肝纤维化; α -肌动蛋白; 转化生长因子- β 1; 逆转录聚合酶链式反应

付德才, 杨世忠, 孙钰玮, 于春艳, 毛丽珍, 姜相莲, 关瑞锋. 甲珠对肝纤维化大鼠 α -SMA和TGF- β 1表达的影响. 世界华人消化杂志 2008;16(3):253-258
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/253.asp>

0 引言

肝纤维化作为肝硬化的前期阶段,其可逆性为延缓或阻止各种慢性肝病发展为肝硬化提供了可能,对肝纤维化的防治已成为该领域的研究热点.近年来研究显示许多中医方药对肝纤维化有很好的治疗效果,并已展示良好的应用前景^[1-5].甲珠为穿山甲的鳞片,主归肝经,具有软坚、通络、散结的功效,是历代医家治疗癥、瘕、集、聚的常用药,近年来被广泛用于治疗肝硬化,取得了较好的临床效果.但目前国内外尚无甲珠抗肝纤维化的基础及临床研究.

本实验采用四氯化碳(CCl₄)大鼠肝纤维化模型,观察甲珠的抗肝纤维化作用,并探讨其对 α -肌动蛋白(α -SMA)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)影响,及甲珠抗肝纤维化的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠108只,体质量 180 ± 30 g,

由吉林大学实验动物中心提供.甲珠(由牡丹江中医院提供)研细末.CCL₄购自北京北化精细化学品有限责任公司;秋水仙碱(colchicine)购自昆明股份有限公司;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)试剂盒购自上海科欣生物技术研究;血清总胆红素(TBIL)试剂盒购自上海科华东菱诊断用品有限公司;TGF- β 1酶联免疫吸附试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,单克隆即用型鼠抗人 α -SMA试剂盒购自北京中杉生物公司,兔抗大鼠TGF- β 1多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,即用型SP免疫组化试剂盒购自福州迈新试剂公司,DAB购自北京中山生物公司.RT-PCR两步法试剂盒购自TaKaRa公司,TRIzol购自Sangon公司.

1.2 方法

1.2.1 模型制作: 模型制作参照文献[6]方法,实验第1天除正常空白对照组(简称对照组)外,其余动物sc CCL₄分析纯5 mL/kg体质量,以后每隔3 d注射400 mL/L CCL₄橄榄油剂3 mL/kg体质量,连续8 wk.实验前2 wk饲喂高脂玉米粉饲料(795 g/kg玉米粉+200 g/kg猪油+5 g/kg胆固醇),第3-6周饲喂1000 g/kg玉米粉和300 mL/L乙醇饮料.

1.2.2 分组及给药方法: 采用成组设计,将108只大鼠随机分为6组,每组18只,第1组对照组,饲喂正常饮食;第2组模型组,按上述造模方法给予饮食;第3组秋水仙碱组,于造模第3周开始给予秋水仙碱0.1 mg/(kg·d),第4组甲珠高剂量治疗组,于造模第3周开始,ig甲珠混悬液,2.0 g/(kg·d)(体质量);第5组甲珠中剂量治疗组,于造模第3周开始,ig甲珠混悬液,1.0 g/(kg·d)(体质量);第6组甲珠高剂量治疗组,于造模第3周开始,给予甲珠混悬液ig,0.5 g/(kg·d)(体质量),共8 wk.造模结束时模型组死亡3只,中剂量组死亡3只,低剂量组死亡2只,秋水仙碱组死亡2只,高剂量组死亡1只,为增加可比性,每组均采用15只.

1.2.3 标本制作: 上述造模及处理过程结束后,禁食12 h后称质量,心包取血,分离血清置-20℃保存;并立刻完整摘取肝脏及脾脏,肝右叶置于40 g/L中性甲醛液中常规固定后,石蜡包埋,用于制作组织芯片.

1.2.4 血清及组织纤维化指标检测: 测定血清肝功能包括TBIL、ALT、AST、ALB、TGF- β 1,严格按说明书操作.

1.2.5 免疫组织化学检查: α -SMA、TGF- β 1: 采用石蜡包埋常规切片,SP法,兔抗鼠TGF- β 1,多克隆抗体及鼠抗鼠 α -SMA单克隆抗体均以1:100稀释,DAB显色,苏木素复染.PBS代替一抗作为阴

表 1 大鼠血清肝功能及TGF- β 1($n=15$)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALB(g/L)	TBIL(μ mol/L)	TGF- β 1(μ g/L)
正常对照组	53.42 \pm 6.54	47.26 \pm 7.33	39.32 \pm 3.45	13.47 \pm 2.42	0.79 \pm 0.13
模型组	216.29 \pm 18.90 ^b	197.63 \pm 19.36 ^b	29.35 \pm 2.68 ^b	76.10 \pm 7.82 ^b	8.56 \pm 1.37 ^b
秋水仙碱组	172.88 \pm 17.16	165.89 \pm 16.80	33.64 \pm 2.94	58.97 \pm 6.64	4.03 \pm 0.66
甲珠高剂量组	163.74 \pm 17.28	157.34 \pm 14.87	33.49 \pm 2.86	57.51 \pm 7.43	5.64 \pm 0.62
甲珠中剂量组	194.07 \pm 18.02 ^a	170.34 \pm 18.38 ^a	31.87 \pm 3.13 ^a	64.21 \pm 8.08 ^a	6.39 \pm 0.76
甲珠低剂量组	197.53 \pm 19.50 ^a	175.43 \pm 17.05 ^a	32.61 \pm 2.72 ^a	68.86 \pm 7.19 ^a	6.93 \pm 0.81

^a $P<0.05$ vs 模型组, ^b $P<0.01$ vs 正常组.

性对照. 阳性组织呈棕色, 阴性组织呈蓝色. 在全自动图像分析系统上, 采用HPIAS-2000型图像分析软件进行定量分析, 随机选取每张切片10个视野($\times 200$)倍测定阳性细胞的灰度值与所占视野面积, 灰度值在0-249之间, 灰度值越高, 染色越浅, 表达产物越少; 灰度值越低, 染色越深, 表达产物越多.

1.2.6 RT-PCR: 大鼠GAPDH上游引物: 5'-CATGACCACAGTCCATGCCATC-3', 下游引物: 5'-CACCTGTGCTGTAGCCATATTC-3', 全长756 bp; TGF- β 1上游引物: 5'-ACTACTGCTTCA GCTCCACA-3', 下游引物: 5'-ATCATGTTGGA CAACTGCTC-3', 全长301 bp; α -SMA上游引物: 5'-TGTGCTGGACTCTGGAGATG-3', 下游引物: 5'-CTTCTGCATCCTGTCAGCAA-3', 全长493 bp. 称取50-100 mg肝组织用TRIzol提取总RNA, 采用分光光度法测定其含量及纯度, 测定 A_{260}/A_{280} 值. 取2 μ g总RNA, 42 $^{\circ}$ C逆转录90 min. 参数设置94 $^{\circ}$ C变性, 3 min \times 1 循环. 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 53 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸45 s, 共35个循环. 最后72 $^{\circ}$ C彻底延伸7 min \times 1 循环. 同法扩增GAPDH作为内参照. 取5 μ L PCR产物150 mL/L琼脂糖凝胶电泳. 凝胶图像分析系统检测灰度, TGF- β 1/GAPDH比值表示TGF- β 1 mRNA相对水平. α -SMA/GAPDH比值表示 α -SMA mRNA相对水平.

统计学处理 实验结果数据以mean \pm SD表示, 采用SPSS11.5软件进行统计分析, 各组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用基于方差分析两两比较LSD法.

2 结果

2.1 各组大鼠肝组织病理学改变 (1)HE染色: 光镜下正常对照组大鼠未见肝细胞变性坏死, 门脉区不增宽, 肝组织及肝小叶结构清晰, 未见胶原纤维增生. 模型组大鼠可见大量肝细胞变

性、坏死, 汇管区周围大量炎症细胞浸润, 大量胶原纤维增生, 伸入到肝实质中, 可见含铁血黄素, 肝小叶结构破坏; (2)Masson染色见蓝色胶原纤维明显增多. 汇管-中央静脉区纤维间隔明显增宽, 包绕、分隔肝小叶, 部分形成假小叶. 甲珠各组及秋水仙碱组较模型组肝细胞变性、坏死明显减轻, 纤维增生及炎细胞浸润程度较模型组明显减轻.

2.2 各组大鼠肝功能改变及血清TGF- β 1检查结果 模型组ALT、AST显著升高, ALB显著降低; 不同剂量甲珠(2.0、1.0、0.5 g/kg)与秋水仙碱(0.1 mg/kg) ig, 可不同程度降低ALT、AST、TBIL水平($P<0.01$, $P<0.05$), 可不同程度升高ALB($P<0.01$, $P<0.05$). 与正常组相比, 模型组大鼠TGF- β 1明显升高($P<0.01$), 甲珠各组及秋水仙碱干预组与模型组比较, TGF- β 1明显降低($P<0.01$), 但未达到正常对照组的水平(表1).

2.3 免疫组化结果 正常组肝组织中几乎不表达TGF- β 1, 模型组TGF- β 1阳性细胞主要位于中央小叶和门静脉周围纤维带及肝纤维间隔中, 主要见于Kuffer细胞、类间质细胞质及其周围, 不同剂量甲珠(2.0、1.0、0.5 g/kg)与秋水仙碱(0.1 mg/kg)灌胃较模型组灰度值升高, 表达产物减少, 阳性染色程度不同程度减轻($P<0.01$, $P<0.05$)(图1). 模型组TGF- β 1免疫组织化学染色阳性面积明显升高, 显著高于正常组($P<0.01$). 甲珠治疗各组及秋水仙碱干预组明显低于模型组($P<0.01$). α -SMA在胞质表达, 正常对照组只表达于小动脉及小静脉, 在胆管无表达. 模型组 α -SMA主要表达于汇管区及纤维间隔, 且呈长椭圆形或梭形. 实验表明不同剂量甲珠与秋水仙碱灌胃较模型组 α -SMA灰度值升高, 表达产物减少, 阳性染色程度不同程度减轻($P<0.01$, $P<0.05$). 模型组 α -SMA免疫组织化学染色阳性面积明显升高, 显著高于正常组($P<0.01$). 甲珠治疗各组及秋水仙碱

■ 相关报道

Sakata *et al*报道肝星状细胞(HSC), 其激活和增生在肝纤维化过程中起主要作用, 是肝纤维化发生、发展的核心环节. Ballardini *et al*报道激活的肝星状细胞的特点之一是表达 α -SMA, α -SMA是HSC活化的标志. Border *et al*报道TGF- β 1是HSC活化的强有力刺激因子和肝纤维化形成的始动细胞因子. Pan *et al*报道研究显示许多中医药对肝纤维化有很好的治疗效果, 并已展示出良好的应用前景.

■创新盘点

甲珠可改善肝功能,可降低实验鼠血清及肝组织 α -SMA及 α -SMA mRNA、TGF- β 1 mRNA的表达, TGF- β 1具有逆转肝纤维化的作用.

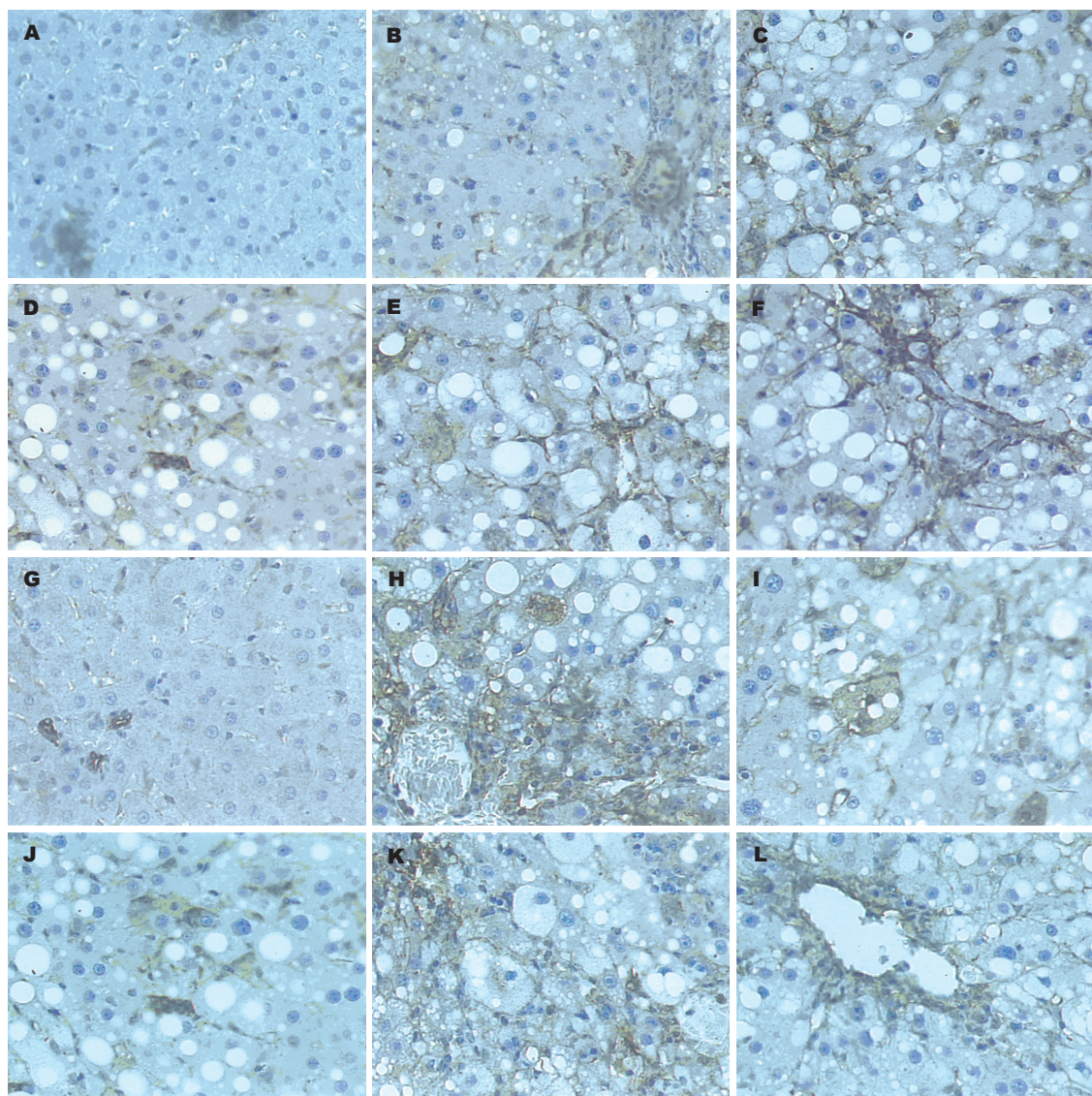


图1 各组 α -SMA、TGF- β 1肝组织免疫组化表达图. A: α -SMA正常组; B: α -SMA模型组; C: α -SMA秋水仙碱组; D: α -SMA高剂量组; E: α -SMA中剂量组; F: α -SMA低剂量组; G: TGF- β 1正常组; H: TGF- β 1模型组; I: TGF- β 1秋水仙碱组; J: TGF- β 1高剂量组; K: TGF- β 1中剂量组; L: TGF- β 1低剂量组.

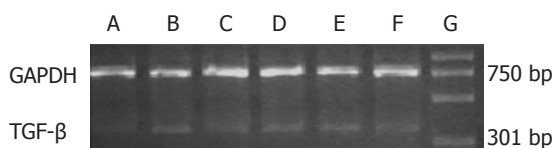


图2 TGF- β 1 mRNA RT-PCR凝胶电泳图. A: 正常组; B: 模型组; C: 秋水仙碱组; D: 甲珠低剂量组; E: 甲珠中剂量组; F: 甲珠高剂量组; G: Marker.

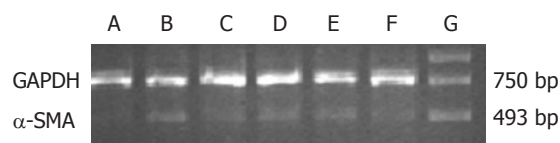


图3 α -SMA mRNA RT-PCR凝胶电泳图. A: 正常组; B: 模型组; C: 秋水仙碱组; D: 甲珠低剂量组; E: 甲珠中剂量组; F: 甲珠高剂量组; G: Marker.

干预组明显低于模型组($P<0.01$, $P<0.05$)(表2).

2.4 RT-PCR 正常肝组织几乎不表达TGF- β 1 mRNA, 而模型组为强表达, 不同剂量甲珠(2.0、1.0、0.5 g/kg)与秋水仙碱(0.1 mg/kg)灌胃组TGF- β 1 mRNA表达明显减少(图2), 各组TGF- β 1 mRNA/GAPDH比值见表3, 与模型组比较($P<0.01$); α -SMA mRNA模型组表达较正常组

明显增强, 不同剂量甲珠(2.0、1.0、0.5 g/kg)与秋水仙碱(0.1 mg/kg)灌胃组 α -SMA mRNA表达明显减少(图3), 各组 α -SMA mRNA/GAPDH比值见表3, 与模型组比较($P<0.01$, $P<0.05$).

3 讨论

目前的研究认为, 肝纤维化的病理改变是细胞

表 2 各组大鼠肝组织TGF- β 1和 α -SMA的染色灰度值及阳性面积比($n = 15$, mean \pm SD)

分组	染色灰度值		染色阳性面积比	
	TGF- β 1	α -SMA	TGF- β 1(%)	α -SMA(%)
正常对照组	127.13 \pm 14.30	116.44 \pm 12.60	1.29 \pm 0.22	1.48 \pm 0.24
模型组	84.29 \pm 10.14 ^b	79.48 \pm 9.13 ^b	14.47 \pm 1.48 ^b	16.32 \pm 1.75 ^b
秋水仙碱组	106.92 \pm 13.95	99.55 \pm 11.78	7.16 \pm 1.04	9.45 \pm 1.27
甲珠高剂量组	110.50 \pm 12.46	107.18 \pm 12.02	5.31 \pm 0.70	9.21 \pm 1.29
甲珠中剂量组	99.56 \pm 11.12	94.24 \pm 10.05	8.37 \pm 1.09	12.63 \pm 1.44
甲珠低剂量组	89.96 \pm 9.60 ^a	91.29 \pm 9.79 ^a	11.92 \pm 1.42	14.23 \pm 1.41 ^a

^a $P < 0.05$ vs 模型组, ^b $P < 0.01$ vs 正常组.表 3 各组大鼠肝组织TGF- β 1及 α -SMA mRNA/GAPDH 比值($n = 15$, mean \pm SD)(%)

分组	TGF- β 1	α -SMA
正常对照组	1.29 \pm 0.22	1.48 \pm 0.24
模型组	14.57 \pm 1.59 ^b	16.32 \pm 2.14 ^b
秋水仙碱组	7.16 \pm 1.17	9.46 \pm 1.20
甲珠高剂量组	5.58 \pm 0.80	9.21 \pm 1.12
甲珠中剂量组	8.62 \pm 1.16	12.63 \pm 2.42
甲珠低剂量组	11.92 \pm 1.35	14.23 \pm 1.57 ^a

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

外基质(ECM)的增生和降解失衡所致, 而病理情况下细胞外基质的主要细胞来源是肝星状细胞(HSC), 其激活和增生在肝纤维化过程中起主要作用^[7-8]. 是肝纤维化发生、发展的核心环节. 激活的肝星状细胞的特点之一是表达 α -SMA, α -SMA是HSC活化的标志^[9]. 常作为肝星状细胞激活的标志物^[10-25]. TGF- β 1是HSC活化的强有力刺激因子和肝纤维化形成的始动细胞因子^[24-25], TGF- β 1在肝纤维化发生、发展中的作用: (1)促进HSC转化为FSC, 并刺激FSC合成ECM^[26-27], (2)抑制胶原酶及基质降解, 刺激TIMP产生, 抑制MMP的活性^[28-29]. (3)对FSC单核细胞等有^[30-31]趋化作用. 此外, 研究还显示, TGF- β 1可抑制谷氨酰半胱氨酸连接酶的表达, 促进肝细胞损害^[32], TGF- β 1还能抑制肝细胞DNA合成, 阻止肝细胞再生^[33-34]. 从祖国医学辩证, 认为肝纤维化是由于气滞、血瘀、络阻所致, 肝纤维化初期主要为气滞, 进而血瘀, 最后络阻, 气机不畅, 肝纤维化、肝硬化形成. 甲珠为穿山甲的鳞片, 主归肝经, 具有软坚、通络、散结的功效, 是历代医家治疗癥、瘕、集、聚的常用药. 本实验证实了甲珠具有保护

■应用要点

本实验甲珠治疗各组TGF- β 1、 α -SMA在肝组织中表达明显减少, 可能与甲珠抑制肝星状细胞活化有关, 从而阻止了细胞外基质产生, 延缓或逆转肝纤维化的发生, 为临床应用甲珠抗肝纤维化提供了理论依据.

实验鼠肝功能的作用, 甲珠高剂量组、中剂量组、低剂量组ALT、AST较模型组均明显降低, ALB较模型组明显升高, 甲珠各组与模型组比较差别显著($P < 0.01$, $P < 0.05$); 血清中TGF- β 1含量甲珠高剂量组、中剂量组、低剂量组较模型组均显著降低($P < 0.01$); 甲珠能够减少或阻抑实验鼠TGF- β 1及 α -SMA的表达, 免疫组化结果甲珠高剂量组、中剂量组、低剂量组肝组织 α -SMA及TGF- β 1表达面积较模型组均明显减少($P < 0.01$, $P < 0.05$); 灰度值明显升高($P < 0.01$, $P < 0.05$); RT-PCR证实TGF- β 1及 α -SMA的表达量较模型组明显降低, 两者比较差别显著($P < 0.01$, $P < 0.05$). 实验结果证实甲珠具有降低实验鼠血清及肝组织中肝纤维化指标的作用, 可以防治或阻抑肝纤维化.

4 参考文献

- Pan NS, Li ST, Wang Y, Li MF, Han Z. Therapeutic effect of "anti-hepatic-fibrosis 268" on hepatic fibrosis in rats. *Sichuan Daxue Xuebao Yixueban* 2004; 35: 528-531
- Yao L, Yao ZM, Weng H, Zhao GP, Zhou YJ, Yu T. Effect of rat serum containing Biejiajian oral liquid on proliferation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1911-1913
- Dang SS, Jia XL, Cheng YA, Chen YR, Liu EQ, Li ZF. Inhibitory effect of Huangqi Zhechong decoction on liver fibrosis in rat. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2295-2298
- Guo SG, Zhang W, Jiang T, Dai M, Zhang LF, Meng YC, Zhao LY, Niu JZ. Influence of serum collected from rat perfused with compound Biejiajuangan drug on hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1487-1494
- He YT, Liu DW, Ding LY, Li Q, Xiao YH. Therapeutic effects and molecular mechanisms of anti-fibrosis herbs and selenium on rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 703-706
- 于世瀛, 贾长恩, 杨美娟, 白锦雯, 赵丽云. 免疫性和化学性损伤肝纤维化动物模型的比较. *实验动物科学与管理* 1995; 12: 5-6
- Sakata R, Ueno T, Nakamura T, Sakamoto M,

■同行评价

本文设计合理, 方法先进, 结论可靠, 有较深的理论价值和实用价值, 值得推广。

- Torimura T, Sata M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cell line LI90. *J Hepatol* 2004; 40: 52-59
- 8 Isono M, Soda M, Inoue A, Akiyoshi H, Sato K. Reverse transformation of hepatic myofibroblast-like cells by TGFbeta1/LAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 959-965
- 9 Ballardini G, Groff P, Badiali de Giorgi L, Schuppan D, Bianchi FB. Ito cell heterogeneity: desmin-negative Ito cells in normal rat liver. *Hepatology* 1994; 19: 440-446
- 10 Reynaert H, Rombouts K, Jia Y, Urbain D, Chatterjee N, Uyama N, Geerts A. Somatostatin at nanomolar concentration reduces collagen I and III synthesis by, but not proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 77-88
- 11 Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005; 166: 1655-1669
- 12 Chen YW, Wu JX, Chen YW, Li DG, Lu HM. Tetrandrine inhibits activation of rat hepatic stellate cells in vitro via transforming growth factor-beta signaling. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2922-2926
- 13 Miyazaki T, Karube M, Matsuzaki Y, Ikegami T, Doy M, Tanaka N, Bouscarel B. Taurine inhibits oxidative damage and prevents fibrosis in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2005; 43: 117-125
- 14 Hsu YC, Lin YL, Chiu YT, Shiao MS, Lee CY, Huang YT. Antifibrotic effects of Salvia miltiorrhiza on dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2005; 12: 185-195
- 15 Chang XM, Chang Y, Jia A. Effects of interferon-alpha on expression of hepatic stellate cell and transforming growth factor-beta1 and alpha-smooth muscle actin in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2634-2636
- 16 Yao XX, Jiang SL, Tang YW, Yao DM, Yao X. Efficacy of Chinese medicine Yi-gan-kang granule in prophylaxis and treatment of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2583-2590
- 17 Li T, Leng XS, Qin ZZ, Song SH, Zhao L, Xiong LF, Peng JR. Regulation of hepatic stellate cell activation by interleukin-10/platelet derived growth factor/mitogen-activated protein kinase pathway. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 35-37
- 18 Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Ikenaka Y, Yoshii J, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Masaki T, Fukui H. Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G907-G913
- 19 Fiorucci S, Antonelli E, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pellicciari R, Morelli A. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 127: 1497-1512
- 20 Wang X, Tang X, Gong X, Albanis E, Friedman SL, Mao Z. Regulation of hepatic stellate cell activation and growth by transcription factor myocyte enhancer factor 2. *Gastroenterology* 2004; 127: 1174-1188
- 21 Parsons CJ, Bradford BU, Pan CQ, Cheung E, Schauer M, Knorr A, Krebs B, Kraft S, Zahn S, Brocks B, Feirt N, Mei B, Cho MS, Ramamoorthi R, Roldan G, Ng P, Lum P, Hirth-Dietrich C, Tomkinson A, Brenner DA. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. *Hepatology* 2004; 40: 1106-1115
- 22 Jiang HQ, Zhang XL, Liu L, Yang CC. Relationship between focal adhesion kinase and hepatic stellate cell proliferation during rat hepatic fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3001-3005
- 23 Liu QH, Li DG, Huang X, Zong CH, Xu QF, Lu HM. Suppressive effects of 17beta-estradiol on hepatic fibrosis in CCl₄-induced rat model. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1315-1320
- 24 Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292
- 25 Pinzani M. Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmacol Ther* 1995; 66: 387-412
- 26 Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-5774
- 27 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- 28 Senties-Gómez MD, Gálvez-Gastélum FJ, Meza-García E, Armendáriz-Borunda J. Hepatic fibrosis: role of matrix metalloproteases and TGFbeta. *Gac Med Mex* 2005; 141: 315-322
- 29 Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol* 1999; 30: 48-60
- 30 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- 31 Breitkopf K, Godoy P, Ciuculan L, Singer MV, Dooley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 57-66
- 32 Franklin CC, Rosenfeld-Franklin ME, White C, Kavanagh TJ, Fausto N. TGFbeta1-induced suppression of glutathione antioxidant defenses in hepatocytes: caspase-dependent post-translational and caspase-independent transcriptional regulatory mechanisms. *FASEB J* 2003; 17: 1535-1537
- 33 Zimmermann A. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 Suppl 4: iv6-iv10
- 34 Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000; 32: 247-255

编辑 李军亮 电编 李军亮

经门静脉骨髓基质细胞移植治疗肝纤维化

郑进方, 吴昌雄, 陈劲松, 张震生, 肖占祥, 邢贻雷, 周开伦, 梁力建

郑进方, 吴昌雄, 陈劲松, 张震生, 肖占祥, 邢贻雷, 周开伦,
海南省人民医院肝胆外科 海南省海口市 570311
梁力建, 中山大学附属第一医院肝胆外科 广东省广州市
510080

郑进方, 2007年中山大学博士, 副主任医师, 主要从事肝胆疾病
的研究。

海南省自然科学基金资助项目, No. 805107

海南省卫生厅医学研究基金资助项目, No. 琼卫2005-77

作者贡献分布: 郑进方与梁力建对此文所作贡献均等; 此课题
由郑进方, 吴昌雄, 陈劲松, 张震生, 肖占祥, 邢贻雷, 周开伦, 梁
力建设计; 研究过程由郑进方, 吴昌雄, 陈劲松, 张震生, 肖占
祥, 邢贻雷, 周开伦操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由郑
进方提供; 数据分析由郑进方完成; 本论文写作由郑进方, 梁力
建完成。

通讯作者: 郑进方, 570311, 海南省海口市秀华路19号, 海南省
人民医院肝胆外科, zhengjif2000@hotmail.com

电话: 0898-68642216 传真: 0898-68661664

收稿日期: 2007-10-20 修回日期: 2008-01-01

Intra-portal transplantation of bone marrow stromal cells ameliorates liver fibrosis in mice

Jin-Fang Zheng, Chang-Xiong Wu, Jin-Song Chen,
Zhen-Sheng Zhang, Zhan-Xiang Xiao, Yi-Lei Xing,
Kai-Lun Zhou, Li-Jian Liang

Jin-Fang Zheng, Chang-Xiong Wu, Jin-Song Chen,
Zhen-Sheng Zhang, Zhan-Xiang Xiao, Yi-Lei Xing, Kai-
Lun Zhou, Department of Hepatobiliary Surgery, the Peo-
ple's Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, Hainan
Province, China

Li-Jian Liang, Department of Hepatobiliary Surgery, the
First Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guang-
zhou 510080, Guangdong Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Hainan
Province, No. 805107; the Medical Research Foundation
of Medical Department of Hainan Province, No. Qiongwei
2005-77

Correspondence to: Dr. Jin-Fang Zheng, Department of
Hepatobiliary Surgery, the People's Hospital of Hainan
Province, 19 Xiuhua Road, Haikou 570311, Hainan Pro-
vince, China. zhengjif2000@hotmail.com

Received: 2007-10-20 Revised: 2008-01-01

Abstract

AIM: To investigate the effect of transplanted
bone marrow stromal cells (BMSCs) on liver
fibrosis in mice.

METHODS: BMSCs harvested from male
BALB/c mice were cultured and transplanted
into female syngenic BALB/c mice via portal
vein. After partial hepatectomy, liver fibrosis

was induced by diethylnitrosamine (DEN).
Controls received BMSCs and non-supple-
mented drinking water, model group received DEN-
spiked water, and experimental group received
BMSCs and DEN. The mice were killed after
three months. Alanine aminotransferase (ALT),
aspartate aminotransferase (AST), hyaluronic
acid (HA) and laminin (LN) in serum, hydroxy-
proline (Hyp) content in liver were assessed.
Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) in liver
was tested by immunohistochemistry. Bone
marrow-derived hepatocytes in liver sections
were identified by fluorescent in situ hybridiza-
tion (FISH).

RESULTS: BMSCs differentiated into hepato-
cyte-like phenotypes after hepatocyte growth
factor (HGF) treatment in vitro. Serum ALT,
AST, HA and LN were markedly reduced by
transplanted BMSCs (208 ± 44 U/L vs 341 ± 66
U/L, 372 ± 84 U/L vs 506 ± 81 U/L, 289 ± 74
 $\mu\text{g/L}$ vs 362 ± 83 $\mu\text{g/L}$, 178 ± 48 $\mu\text{g/L}$ vs 232 ± 63
 $\mu\text{g/L}$). Liver Hyp level (900 ± 141 mg/g vs 1255
 ± 205 mg/g) and α -SMA staining in mice receiv-
ing BMSCs was lower than that in the model
group, consistent with the altered liver pathol-
ogy. FISH analysis revealed the presence of do-
nor-derived hepatocytes in the injured liver after
cross-gender mouse BMSCs transplantation.
About 10% of cells were bone marrow-derived
cells in the injured liver after three months.

CONCLUSION: BMSCs transplanted via portal
vein can convert into hepatocytes with replace-
ment of the DEN-induced liver injury, restore
liver function and reduce liver fibrosis.

Key Words: Bone marrow stromal cell; Hepatocyte;
Differentiation; Cell therapy; Liver fibrosis

Zheng JF, Wu CX, Chen JS, Zhang ZS, Xiao ZX, Xing YL,
Zhou KL Liang LJ. Intra-portal transplantation of bone
marrow stromal cells ameliorates liver fibrosis in mice.
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(3): 259-264

摘要

目的: 探讨移植骨髓基质细胞(BMSCs)减轻小
鼠肝纤维化的作用。

■背景资料

肝细胞移植是器
官移植的替代方
法之一。但肝细胞
难以培养和保存
及数量少, 难以达
到临床治疗效果。
研究报道, 骨髓细
胞能分化为肝细
胞, 其移植可以减
轻肝纤维化。

■同行评议者

党双锁, 副教授,
西安交通大学医
学院第二附属医
院感染科; 刘海
林, 主任医师, 上
海交通大学医学
院附属第九人民
医院消化科

■相关报道

研究报道骨髓细胞在合适的条件下能分化为肝细胞。骨髓细胞向肝细胞的转化是通过横向分化还是骨髓细胞与肝细胞的融合目前不清楚。

方法: δ BALB/c小鼠BMSCs分离培养及经门静脉移植到 γ BALB/c小鼠肝脏,二乙基亚硝胺诱导肝纤维化。60只 γ 小鼠随机分为对照组,模型组及治疗组。3 mo后测定ALT、AST、透明质酸酶(HA)和层黏连蛋白(LN)浓度,及肝脏羟基脯氨酸(Hyp)含量。免疫组化检测肝脏 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达,及荧光原位杂交鉴定移植的BMSCs向肝细胞的分化。

结果: BMSCs在添加肝细胞生长因子(HGF)的培养基中体外培养能分化为肝细胞样细胞。与模型组相比,移植BMSCs能显著降低血清ALT、AST、HA和LN的水平以及肝脏Hyp含量和 α -SMA的表达(208 ± 44 U/L vs 341 ± 66 U/L, 372 ± 84 U/L vs 506 ± 81 U/L, 289 ± 74 μ g/L vs 362 ± 83 μ g/L, 178 ± 48 μ g/L vs 232 ± 63 μ g/L, 900 ± 141 mg/g liver vs 1255 ± 205 mg/g liver, 均 $P < 0.01$)。荧光原位杂交显示DEN诱导的损伤肝脏中有骨髓来源的肝细胞,3 mo后10%的肝细胞来源于BMSCs。

结论: 在肝纤维化模型中,经门静脉移植的BMSCs能分化为肝细胞,有效地恢复肝功能和减轻肝纤维化。

关键词: 骨髓基质细胞;肝细胞;分化;细胞治疗;肝纤维化

郑进方, 吴昌雄, 陈劲松, 张震生, 肖占祥, 邢胎雷, 周开伦, 梁力建. 经门静脉骨髓基质细胞移植治疗肝纤维化. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 259-264

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/259.asp>

0 引言

肝纤维化及肝硬化是一个棘手的肝脏疾病。虽然肝移植是治疗晚期肝硬化的有效方法,但存在供体缺乏、手术损伤、免疫排斥及费用昂贵等问题。肝细胞移植被认为是器官移植的替代方法之一,但肝细胞是一种静止细胞,移植的肝细胞增殖数量少,难以达到临床治疗效果,而且肝细胞难以培养和保存^[1]。研究报道骨髓细胞在合适的条件下能分化为肝细胞^[2-3]。骨髓细胞向肝细胞的转化是通过横向分化还是骨髓细胞与肝细胞的融合目前不清楚^[4-5]。另外,骨髓中哪类细胞能分化为肝细胞也不清楚,但骨髓细胞移植能减轻CCl₄引起的肝纤维化^[6]。研究显示骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)在添加肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的培养基中体外培养能分化为肝细胞样

细胞^[7]。自身骨髓细胞容易获得,因此骨髓细胞移植可能是一种治疗慢性肝损害及肝纤维化的有希望的策略。本研究旨在探讨移植BMSCs向肝细胞的分化,及对肝损害和肝纤维化的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c小鼠,周龄6-8 wk,体质量20-25 g,购于中山大学医学动物中心。二乙基亚硝胺(DEN, Sigma-Aldrich, MO)。DMEM培养基(Roche Pharma, Switzerland)。肝细胞生长因子(HGF, Sigma-Aldrich, MO),抗体包括鼠抗AFP多克隆抗体(Santa Cruz, CA),兔抗白蛋白多克隆抗体(Dako, Denmark),兔抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)多克隆抗体(NeoMarkers, CA),小鼠Y染色体荧光原位杂交(FISH)探针(Cambio, UK)。SABC免疫组化检测试剂盒为武汉博士德生物公司产品。

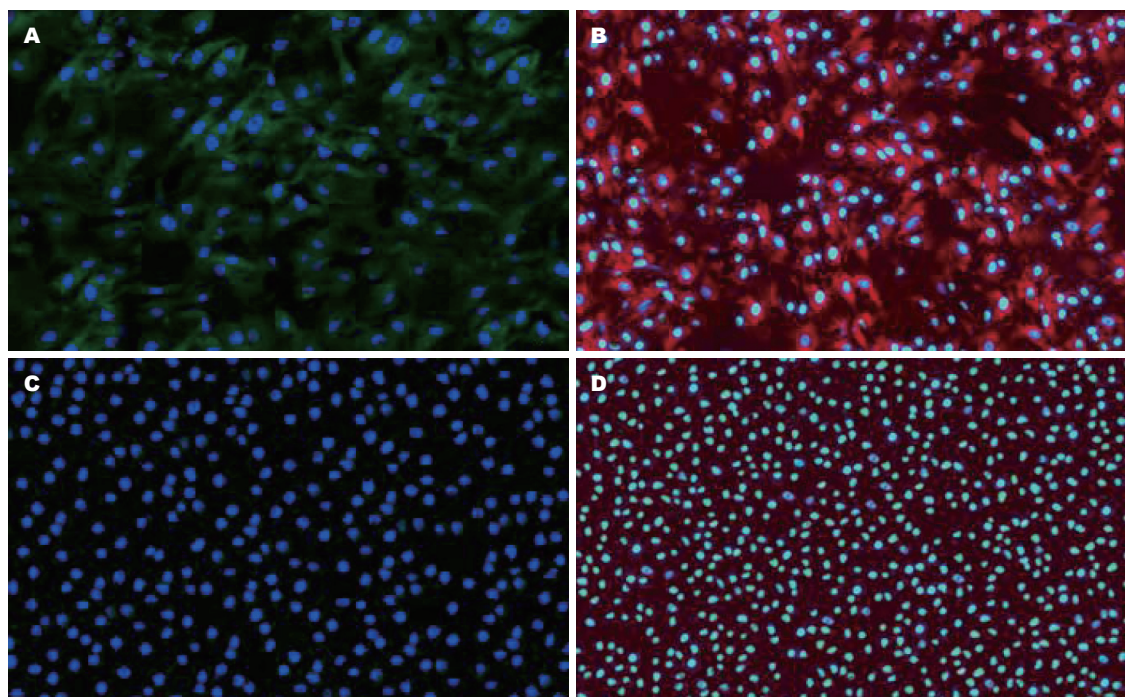
1.2 方法

1.2.1 BMSCs的分离与培养: 取 δ 小鼠的股骨和胫骨,注射器针头插入骨髓腔内用DMEM培养液冲出骨髓细胞制备成悬液。细胞悬液用Ficoll(density 1.077 kg/L)梯度离心(1500 r/min)10 min。收集中间界面的BMSCs,在DMEM培养基内培养。培养基另外加入100 mL/L胎牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺、100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素。细胞在37℃、50 mL/L CO₂培养箱中进行培养,每3 d换液一次。除去悬浮的细胞,细胞长至90%汇合时进行传代培养,取培养3-4代的BMSCs做细胞移植实验。培养基中添加50 μ g/L的HGF诱导分化BMSCs,每3 d换液一次,21 d后收集做免疫荧光检查。

用免疫荧光鉴定诱导分化细胞表达AFP和白蛋白的情况。诱导分化的细胞包埋及多聚甲醛固定。甲醇及Triton X-100分别处理标本,滴加50 mg/L BSA封闭液,再滴加一抗小鼠抗AFP多克隆抗体或兔抗白蛋白多克隆抗体,4℃孵育过夜。滴加FITC或PE结合的二抗(Sigma-Aldrich, 1:100)孵育30 min。细胞核用DAPI(Sigma-Aldrich, MO)显示蓝色荧光。

1.2.2 BMSCs的分离和移植: 取分离及培养3-4代的 δ BMSCs制备成细胞悬液,酚酞兰染色计数活细胞>95%。 γ 小鼠麻醉后行2/3肝切除,分离的BMSCs用胰岛素注射器经肠系膜静脉注射到肝脏,每只小鼠移植 1×10^6 个细胞。

1.2.3 肝纤维化诱导及分组: BMSCs移植后小鼠



■应用要点
骨髓基质细胞移植可能成为一种治疗慢性肝损害及肝纤维化的方法。

图1 免疫荧光显示BMSCs体外培养21 d后细胞表达AFP和白蛋白的情况($\times 400$)。A: AFP阳性表达(细胞质呈绿色荧光); B: 白蛋白阳性表达(细胞质呈红色荧光); C: 无AFP表达; D: 无白蛋白表达。

恢复1 wk, DEN加入饮用水中, 浓度为100 $\mu\text{g/L}$, 连续饮用12 wk诱导纤维化^[8]。60只♀小鼠随机分为3组($n = 20$): A: 对照组, BMSCs移植及饮正常水; B: 模型组, 饮水中加DEN诱导肝纤维化; C: 治疗组, BMSCs移植及饮含DEN的水。细胞移植1, 2, 3 mo麻醉小鼠取肝脏标本。每个时间点取约5-8只小鼠。细胞移植3 mo后取血肝功能指标和肝纤维化指标。取肝脏标本测定羟基脯氨酸(Hyp)含量及病理学检查。

1.2.4 肝功能、肝纤维化指标及肝脏Hyp含量测定: 血清ALT、AST、总胆红素用常规实验室方法测定, 血清透明质酸酶(HA)和层黏连蛋白(LN)用放免试剂盒测定。Hyp含量用试剂盒测定, 其含量用mg/g表示。

1.2.5 肝脏病理学检查: HE染色和 α -SMA的免疫组化染色确定肝脏炎症及肝纤维化程度。一抗用兔抗 α -SMA多克隆抗体。

Y染色体荧光原位杂交(Fluorescent in situ hybridization, FISH)显示肝脏内移植的雄性细胞, 按FISH试剂盒的实验步骤操作(<http://www.cambio.co.uk/>), 用FITC放大试剂盒(Cambio, Cambridge, UK)放大荧光信号, 细胞核用DAPI显示为蓝色荧光。切片用LSM 510 META共聚焦显微镜观察。

统计学处理 数据用mean \pm SD表示, 用SPSS10.0软件分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 体外培养BMSCs的向肝细胞分化 本实验在培养基中添加HGF培养BMSCs, 免疫荧光检测AFP和白蛋白的表达。发现加HGF培养的BMSCs培养21 d后细胞表达AFP(图1A)和白蛋白(图1B), 而未加HGF培养的BMSCs培养21 d后的细胞无AFP和白蛋白表达(图1C-D)。结果提示HGF能诱导BMSCs向肝细胞分化。

2.2 BMSCs对肝功能及肝纤维化指标的影响 BMSCs移植组DEN诱导小鼠的死亡率为80%, 模型组DEN诱导小鼠的死亡率为85%, 两组间无显著性差异($P > 0.05$)。与正常对照组相比, 模型组DEN导致血清ALT和AST显著升高($P < 0.01$)。BMSCs移植实验组明显降低转氨酶水平($P < 0.01$), 但仍高于正常对照组($P < 0.01$)。

本研究测定了肝纤维化的指标, 包括血清HA、LN水平和肝脏Hyp含量。细胞移植治疗组血清HA、LN水平明显低于模型组($P < 0.05$), 但仍高于正常对照组($P < 0.01$)。细胞移植治疗组肝脏Hyp含量明显低于模型组($P < 0.01$), 但高于正常对照组($P < 0.01$)(表1)。

2.3 骨髓基质细胞移植对肝脏炎症及纤维化的影响 HE染色和免疫组化显示BMSCs移植对肝脏病理学的影响。HE染色显示正常对照组肝脏结构完整, 无炎症及纤维化改变(图2A)。模型组中DEN诱导肝脏炎症细胞浸润和肝纤维化形成,

■同行评价

本文立意较新,方法得当,结果有一定的参考价值,是一篇好的学术文章.

表 1 肝功能和肝纤维化指标的变化($n=8$, mean \pm SD)

分组	ALT(U/L)	AST (U/L)	TBIL(mg/L)	HA(μ g/L)	LN(μ g/L)	Hyp(mg/g liver)
对照组	42 \pm 12	105 \pm 35	8.8 \pm 4.2	54 \pm 19	58 \pm 16	313 \pm 118
模型组	341 \pm 66 ^b	506 \pm 81 ^b	12.9 \pm 6.1	362 \pm 83 ^b	232 \pm 63 ^b	1255 \pm 205 ^b
治疗组	208 \pm 44 ^{bd}	372 \pm 84 ^{bd}	13.5 \pm 4.2	289 \pm 74 ^{bc}	178 \pm 48 ^{bc}	900 \pm 141 ^{bd}

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

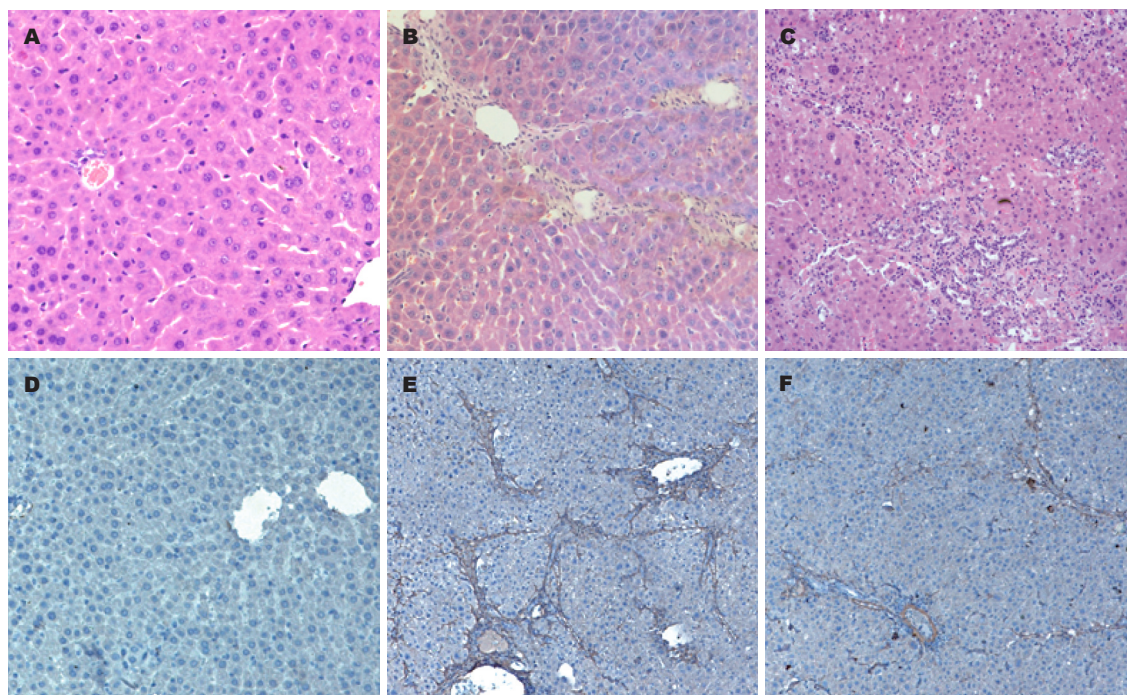


图 2 移植的BMSCs对肝纤维化的抑制(HE染色, 免疫组化 $\times 200$). A: 对照组; B: 模型组; C: BMSCs移植组; D: 对照组; E: 模型组; F: BMSCs移植组.

伴肝脏失去完整结构(图2B). 而BMSCs移植治疗组肝脏炎症和肝纤维化明显减轻(图2C).

通过 α -SMA免疫组化显示肝星状细胞活性来证实肝纤维化发展. 正常对照组 α -SMA只表达于肝脏血管平滑肌细胞(图2D). 模型组活化的肝星状细胞表达 α -SMA增加, 呈网状结构(图2E). 而BMSCs移植治疗组的肝星状细胞活性明显受抑制(图2F).

2.4 BMSCs在正常小鼠及DEN诱导小鼠肝脏的分化与增殖 本研究用 δ BMSCs移植到 η 小鼠肝脏, 研究BMSCs在正常小鼠肝脏及DEN诱导小鼠肝脏内分化增殖的情况. 用Y染色体FISH的方法显示骨髓来源的肝细胞. δ 小鼠肝脏作为阳性对照, 肝细胞核内绿色荧光显示Y染色体(图3A). 骨髓基质细胞移植及DEN诱导2 mo后小鼠肝脏内有约4%的Y染色体阳性肝细胞(图3B), 移植3 mo后肝脏内有10%的肝细胞Y染色体阳性(图3C). 结果提示经门静脉移植的BMSCs经

DEN诱导向肝细胞分化及增殖. 而无DEN诱导的小鼠, BMSCs移植3 mo后肝脏内未发现Y染色体阳性的细胞(图3D).

3 讨论

虽然骨髓中的细胞被证实有向肝细胞转化的能力, 但骨髓中何种类型的细胞能分化为肝细胞目前仍不清楚. BMSCs包含多向分化潜能的干细胞, 如分化为神经干细胞和造血干细胞^[9]. 本研究证实BMSCs在添加肝细胞生长因子的培养基中培养21 d能分化为表达AFP和白蛋白的肝细胞样细胞.

越来越多的证据显示骨髓细胞能分化为特定的细胞类型. 在一定的条件下移植的骨髓细胞在肝脏内分化为肝细胞^[10]. 有报道在FAH小鼠模型中肝脏内有30%-50%的肝细胞来源于移植的骨髓细胞的分化与增殖^[2]. 转化为肝细胞的骨髓细胞可能是间充质细胞^[11]. 但有部分研究报

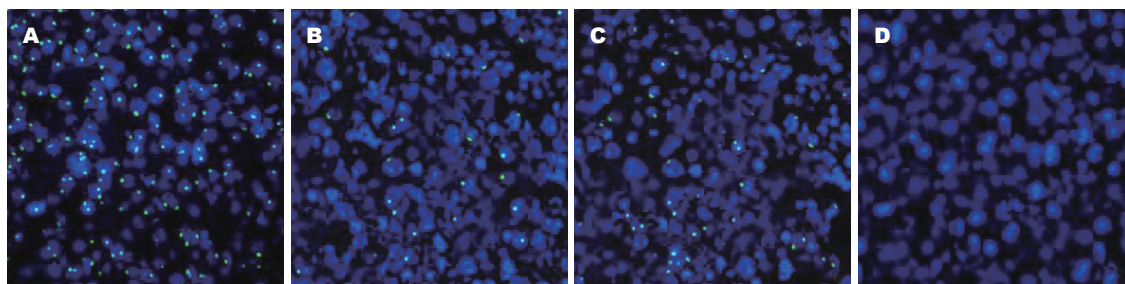


图 3 FISH显示BMSCs来源的肝细胞在DEN诱导小鼠肝脏的分化与增殖($\times 400$)。A: 正常♂小鼠阳性对照组; B: BMSCs移植的♀小鼠DEN诱导2 mo; C: BMSCs移植的♀小鼠DEN诱导3 mo; D: BMSCs移植的♀小鼠无DEN诱导。

道即使存在很强转化的压力下, 骨髓细胞转变为肝细胞仅仅是一种可能性很小的事件^[12]。另外有研究报道骨髓细胞与肝细胞的细胞融合是骨髓转化为肝细胞的主要来源^[4]。主要由髓系单核细胞与肝细胞融合产生功能性的肝细胞增殖^[6]。

本实验用DEN诱导肝纤维化模型来研究BMSCs移植治疗纤维化的效果。DEN是一种肝毒性的诱癌剂, 能诱导肝纤维化, 与人类的肝纤维化相似。我们的结果显示BMSCs移植能明显降低DEN诱导的血清转氨酶水平和改善肝纤维化指标。BMSCs移植组肝脏 α -SMA表达较模型组明显减少。肝脏 α -SMA表达代表肝星状细胞的活性, 也是肝纤维化形成的关键因素^[13]。BMSCs移植能有效的抑制肝脏炎症和肝纤维化形成。

我们进一步探讨BMSCs移植恢复肝脏损伤的潜在机制。BMSCs移植及DEN持续诱导肝损伤后, 我们用荧光原位杂交的方法研究BMSCs在肝脏内向肝细胞分化的能力。研究结果显示在持续性肝损伤情况下, BMSCs能向肝细胞分化, 随时间延长而逐渐增加。3 mo肝脏内约10%的细胞为骨髓来源的肝细胞。

本研究中肝脏内有较多骨髓来源的肝细胞, 其结果与某些报道不一致^[12], 原因可能包括以下几方面。首先, 注射途径可能是影响骨髓细胞转化为肝细胞的重要因素之一。本研究中经门静脉向肝脏内直接注射骨髓细胞可能比经尾静脉周围血管注射更有利于骨髓细胞向肝细胞分化。在心脏和血管疾病中, 病变部位直接注射自身骨髓细胞更容易在缺血的局部补充内皮祖细胞及新生血管形成^[14]。其次, 骨髓细胞转化为肝细胞的压力决定骨髓来源的肝细胞增殖的数量^[15]。本研究发现BMSCs移植到小鼠肝脏后DEN诱导肝损伤, 肝脏内发现有骨髓来源的肝细胞增殖, 而无DEN诱导的肝脏内未发现骨髓来源的肝细胞。DEN诱导的持续肝损伤是BMSCs向肝细胞

分化和增殖的重要因素, 移植BMSCs向肝细胞的分化增殖与改善肝功能和抑制肝纤维化有关。该结果提示骨髓来源的肝细胞通过替代受损的肝细胞来减轻肝损害。

总之, 在持续损伤性肝脏中, 向肝内直接移植的BMSCs能有效地增殖分化为肝细胞。移植的BMSCs通过替代受损的肝细胞来有效地恢复肝损害和减轻肝纤维化。本研究提示自身的骨髓细胞移植是一种有前途的治疗慢性肝脏疾病的方法。

4 参考文献

- 1 Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G, Burlina AB. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002; 359: 317-318
- 2 Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539
- 3 Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005; 106: 756-763
- 4 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901
- 5 Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise ND, Segovia JC. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology* 2006; 43: 108-116
- 6 Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1304-1311
- 7 Wang PP, Wang JH, Yan ZP, Hu MY, Lau GK, Fan ST, Luk JM. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 712-716
- 8 Kofman AV, Morgan G, Kirschenbaum A, Osbeck J,

- Hussain M, Swenson S, Theise ND. Dose- and time-dependent oval cell reaction in acetaminophen-induced murine liver injury. *Hepatology* 2005; 41: 1252-1261
- 9 Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003; 9: 1195-1201
- 10 Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
- 11 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49
- 12 Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 Suppl 1: 11850-11853
- 13 Lau DT, Luxon BA, Xiao SY, Beard MR, Lemon SM. Intrahepatic gene expression profiles and alpha-smooth muscle actin patterns in hepatitis C virus induced fibrosis. *Hepatology* 2005; 42: 273-281
- 14 Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-435
- 15 Körbling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 346: 738-746

编辑 程英升 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 •

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>。

克隆与健脾益气法有关的大鼠肝癌新基因

管冬元, 方肇勤, 朱希, 吴中华, 张辉

管冬元, 方肇勤, 朱希, 吴中华, 张辉, 上海中医药大学基础医学院 上海市 201203

管冬元, 博士, 副教授, 主要从事中医药防治肿瘤的分子机制研究。国家自然科学基金资助项目, No. 30400582; No. 30271576

上海市教委资助项目, No. 04CB04

作者贡献分布: 此文主要由管冬元设计、实验、分析及撰写; 课题由管冬元、方肇勤设计并提供研究经费; 朱希、吴中华参与了部分实验及辅助研究工作; 实验试剂由吴中华订购; 张辉参与基因序列的比对及登录工作; 论文写作由管冬元及方肇勤完成。

通讯作者: 管冬元, 201203, 上海市蔡伦路1200号, 上海中医药大学基础医学院实验中医教研室. guandongyuan@hotmail.com
电话: 021-51322116

收稿日期: 2007-09-27 修回日期: 2008-01-08

Cloning of novel hepatoma gene in rats by invigorating the spleen to supplement Qi

Dong-Yuan Guan, Zhao-Qin Fang, Xi Zhu, Zhong-Hua Wu, Hui Zhang

Dong-Yuan Guan, Zhao-Qin Fang, Xi Zhu, Zhong-Hua Wu, Hui Zhang, Preclinical Medicine Institute in Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203
Supported by: National Natural Foundation of China, No. 30400582 and No. 30271576; the Research Program of Shanghai Education Committee, No. 04CB04

Correspondence to: Dong-Yuan Guan, Experimental Chinese Medicine Office of Preclinical Medical Institute in Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Cailun Road, Shanghai 201203, China. guandongyuan@hotmail.com

Received: 2007-09-27 Revised: 2008-01-08

Abstract

AIM: To clone the integrated cDNA expression sequence of EST segments in down-regulated genes by invigorating the spleen to supplement Qi.

METHODS: Integrated cDNA expression sequences of EST gene segments were cloned for the 689 down-regulated genes by invigorating the spleen to supplement Qi, with electron cloning in combination with PCR.

RESULTS: cDNA expression sequences were detected in 11 EST segments (G2, G4, G5, G6, G11, G14, G15, G16, G17, G18, G20). BLAST analysis showed that G14, G15 and G20 were novel genes which were submitted to GenBank (their accession number is DQ480745, DQ480746 and DQ480747, respectively).

CONCLUSION: Invigorating the spleen to supplement Qi can clone the cDNA expression sequences of EST segments in the down-regulated genes. Further study is needed to observe the functions of these novel genes and the mechanism of action of different TCM therapies.

Key Words: Invigorating the spleen to supplement Qi; Hepatoma; Gene cloning; Bioinformatics

Guan DY, Fang ZQ, Zhu X, Wu ZH, Zhang H. Cloning of novel hepatoma gene in rats by invigorating the spleen to supplement Qi. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 265-271

摘要

目的: 克隆健脾益气法明显下调基因中EST片段cDNA的完整表达序列。

方法: 从689个健脾益气法明显下调的基因中, 采用电子克隆与PCR相结合的方法, 克隆出有关EST片段的cDNA完整表达序列。

结果: 成功筛选出11个EST片段的cDNA序列(G2、G4、G5、G6、G11、G14、G15、G16、G17、G18、G20), 经进一步BLAST对比分析, 证明G14、G15、G20 3个基因为新基因, 并进行GenBank登录, 登录号分别为DQ480745、DQ480746、DQ480747。

结论: 本研究成功克隆出3个中医健脾益气法能明显调控的新基因cDNA序列。这为今后进一步深入观察这些基因的功能以及探讨不同中医治法的作用机制提供了良好的研究基础。

关键词: 健脾益气; 肝癌; 基因克隆; 生物信息学

管冬元, 方肇勤, 朱希, 吴中华, 张辉. 克隆与健脾益气法有关的大鼠肝癌新基因. *世界华人消化杂志* 2008; 16(3): 265-271
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/265.asp>

0 引言

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是我国高发的恶性肿瘤之一, 据统计, 每年约有13万人死于肝癌, 占全世界肝癌年死亡人数的43.7%。中

■背景资料

近年来, 中医药的研究正逐步深入到生物医学的前沿, 在生物医学信息不断膨胀的21世纪, 如何将中医药的研究与现代最新科技有机的结合, 并充分地利用各种现有的科技资源, 是新时代中医药研究工作者的基本要求和迫切需要。

■同行评议者

邵升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科; 陈洪, 副教授, 东南大学附属中大医院消化科

■研究前沿

本文重点克隆部分健脾益气法方药能明显下调肝癌高表达的新基因的cDNA表达序列,这既是中医治则治法机制研究的重要部分,也是生命科学研究领域中探讨肿瘤发生发展因素的重要方面。

医药辨证论治在防治肝癌方面疗效肯定,并积累了丰富的临床经验,其治则治法主要集中在健脾益气、清热解毒、活血化瘀等治法。大量的研究表明,脾虚是肝癌的重要病理基础,脾虚证是肝癌发生发展中的常见证型,健脾益气法是防治肝癌的常用有效治法^[1-2]。

我们观察并报道了健脾益气、清热解毒、活血化瘀等治法方药对肝癌大鼠的治疗作用,发现与模型组和西药对照组相比,这些治法均能不同程度地延长二乙基亚硝胺诱发肝癌大鼠生存期。同时,不同中医治法在肝癌中的作用、生存期延长等方面作用不尽相同,其中健脾益气法对肝癌大鼠肝功能的改善最明显^[3]。进一步采用美国Affymetrix公司Rat 230A GeneChip检测,研究表明:(1)西药组表达明显小于模型组,以及各中药治疗组的基因计476个;(2)全方组表达明显小于模型组,以及各中西药治疗组的基因计342个;(3)清热组表达明显小于模型组,以及各中西药治疗组的基因计140个;(4)活血组表达明显小于模型组,以及各中西药的基因计186个;(5)健脾组表达明显小于模型组,以及各中西药治疗组的基因计689个^[4]。

为了进一步揭示健脾益气法防治原发性肝癌的分子机制,本课题在基因芯片检测的基础上,应用表达序列标签(expressed sequence tag, EST)电子克隆与PCR技术相结合的办法,从689个健脾益气法明显下调的基因中克隆出部分(20个待筛选基因)EST序列的cDNA全长序列,为进一步研究这些新基因的功能打下坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠1只,体质量305 g, TRIzol试剂盒(Invitrogen公司), Mu-MLV反转录酶(Gibco BRC公司), Ex Taq酶(宝生物工程有限公司), 待克隆的新基因共20个,编号为G1-20的EST片段的gi登录号及芯片检测中健脾益气法对该EST片段的调整作用(表1)。

1.2 方法

1.2.1 EST的cDNA全序列电子克隆的方法:(1)将EST序列进行BLAST比对,检索有无相同已知基因的序列登录。(2)在NCBI网站的UniGene数据库中查找与EST序列有关的序列片段,并下载到PC机上,以文本文件保存。(3)在下载文本文件中各序列单独用一系列的文本文件保存(均为FASTA格式)。(4)应用DNAMAN6.0.40生物软件,拼接上述保存的一系列文本文件中的序列。(5)

表 1 健脾益气法对待筛选EST片段的调整情况

编号	GenBank 的gi号	EST长度 (bp)	正常组	模型组	健脾组
G1	5000060	458	3210	5045	2983
G2	14886250	472	3	3069	1222
G3	14931989	746	696	2000	931
G4	13303048	697	969	1991	1001
G5	8513155	496	987	1705	972
G6	11381923	483	447	1688	959
G7	14979816	553	650	1577	624
G8	14962954	404	638	1425	606
G9	14926442	681	783	1311	767
G10	18183378	669	648	1198	631
G11	13305474	476	789	1197	699
G12	8508677	590	391	1132	630
G13	8510803	561	563	1127	568
G14	8499623	639	601	1093	643
G15	14930616	646	218	1068	574
G16	14939126	641	174	1058	559
G17	14976479	548	158	1035	616
G18	3709796	623	958	8348	4687
G19	13893620	768	2980	6422	3539
G20	4132294	410	515	2589	1525

用拼接后的序列与原EST序列进行相似性比较,如果拼接后的序列包含原EST序列,并得到一定程度的延伸,则说明该EST片段的cDNA全长序列已能初步完成,并能进行下面的校对工作。(6)再将拼接后的序列与大鼠的基因组进行BLAST比对。(7)下载比对后的基因组序列,并按次序连接好,从而生成EST的电子延伸序列。(8)最后,通过Primer5生物软件,将上述生成EST的电子延伸序列反向互补,得到该EST片段的cDNA全长序列。

1.2.2 PCR扩增的引物设计:通过EST的电子克隆方法得到各EST片段的cDNA全长序列后,用Primer3在线生物软件进行PCR引物设计。

1.2.3 大鼠肝组织总RNA的提取:大鼠处死后取新鲜肝组织50 mg,再按照Invitrogen公司的TRIzol试剂盒说明进行肝组织总RNA提取。

1.2.4 反转录:RT反应体系中含:DEPC处理水7 μ L, dNTP(each 10 mmol/L)2 μ L, 5 \times Buffer 4 μ L, DTT(100 mmol/L)1 μ L, RNAsin(40 000 kU/L)1 μ L, Olig(dT15)(100 mg/L)1 μ L总RNA(1 g/L)2 μ L。混匀,65 $^{\circ}$ C 5 min;冰上加入RNAsin、M-MuLV各1 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C 60 min后,再加M-MuLV 1 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C 60 min;最后94 $^{\circ}$ C 5 min灭活逆转录酶;-20 $^{\circ}$ C保存。

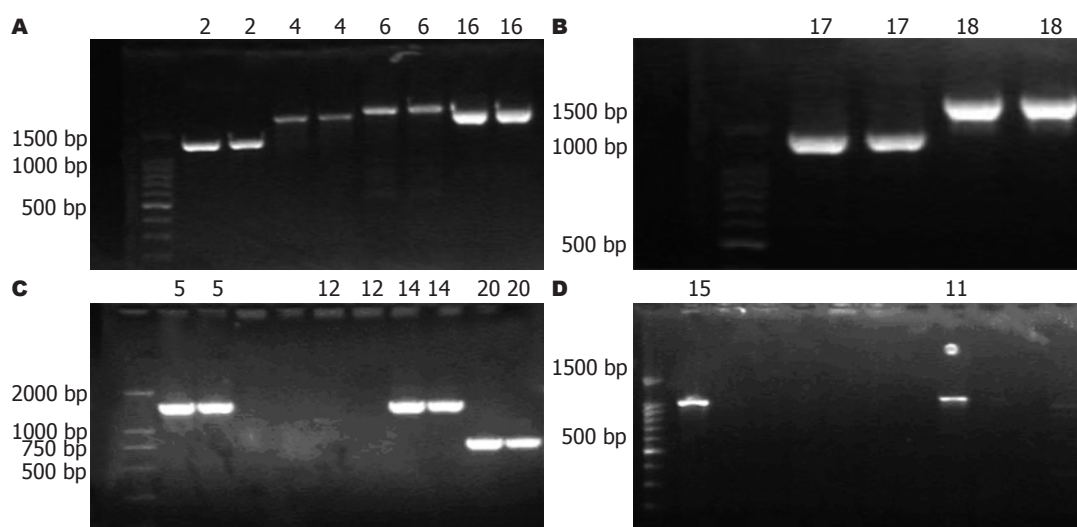


图1 基因扩增电泳图. A: G2、G4、G6和G16; B: G17和G18; C: G5、G12、G14和G20; D: G11和G15.

■ 相关报道

大量的研究表明, 中医药防治肿瘤是多途径、多基因共同作用的结果. 在已有文献报道中, 大多数报道健脾益气方药对已知基因的作用, 如对信号转导通路的研究.

1.2.5 扩增PCR: PCR反应体系中含: 水22 μ L, dNTP(each 2.5 mmol/L)2 μ L, 10 \times Buffer 4 μ L, 上游引物(5 μ mol/L)4 μ L, 下游引物(5 μ mol/L)4 μ L, RT产物4 μ L, Ex Taq酶0.4 μ L. 混匀后, 进行扩增. PCR反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 4 min, 35个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C保存.

1.2.6 电泳、回收与测序: PCR产物经琼脂糖电泳后, 对相应大小的产物进行回收并送公司测序.

1.2.7 测序后基因全长cDNA序列的蛋白阅读框架分析(ORF): 将测序后基因全长cDNA序列复制到NCBI的ORF系统中进行自动蛋白阅读框架分析, 以+1的氨基酸序列作为该基因的蛋白表达序列.

1.2.8 测序后基因全长cDNA序列的比对与登录: 测序后的基因全长cDNA序列与NCBI的BLAST系统进行核酸的非冗余数据库(nr)比对, 如果为新基因, 则进行基因库登录.

2 结果

2.1 EST的cDNA全序列电子克隆的结果: 在候选的20个EST中, G1、G3、G9、G13、G19等5个EST未得到有效的电子延伸序列.

2.2 PCR扩增结果: 在延伸序列的15个未知基因中, G2、G4、G5、G6、G11、G12、G14、G15、G16、G17、G18、G20等12个基因得到了相应的扩增产物(图1), 并测序验证了序列的准确性, 但其中G12反复测序均未测出相应的序列, 测序公司认为可能是引物不适宜测序或PCR回收产物浓度不够或不纯.

2.3 基因的比对与登录: 经PCR及测序验证的

G2、G4、G5、G6、G11、G14、G15、G16、G17、G18、G20等11个基因序列, 与NCBI的BLAST系统进行核酸的非冗余数据库(nr)比对, 结果表明, G2、G4、G5、G11、G18等5个基因已于2005年底至2006年初被其他的研究机构登录, 而G6、G16、G17等3个基因的序列还有相当一部分未得到扩增与测序的验证. 于是, 将G14、G15、G20等3个新基因进行GenBank登录, 录号分别为DQ480745、DQ480746、DQ480747. 3个新基因的核酸序列如下(各基因的序列中, 斜体的部分为相应原EST序列颠倒反相后的序列, 其余为新延伸的部分). G14(1537 bp): GTCTCCCTA-AGTGCTGGGGTCACAGACATGTGCCACT-GCCCCAGCATCCATGAATCTTCTTGAA-GATCCATTTCTCCCTTTATCTTCCCTA-ACCTTTTCATTTTTCTACTTTGTGTGT-GTGTGGTGATGGGGATCAGACGTCG-GCCCTCACATGCTGGGCGAGTGTTCTAC-CACTGAACCACACCCTCCAGCCCCCTTCCTTGTCTTTCTCTTCCCCCTTTCTTATTG-CATTTCTACTATAGAATGATCTCCCT-GATACATCCTGGGCCATAAGGAAAT-GTAGGACTCTGGGGTTTACTAAACATGGTGGGCAGTCCAAAGCTGT-GCCCTATTTCCCCATTGTGAAAATATG-GCAGTTCCTTTGATTACCTGGCTTAG-GCCAGAGTACCATTGCAGGAGAG-GCCTCAGGGCCTGCACTCGGGAT-GAGGAAGGTGGGGTATATTCAGCATT-GGGTTTCTGAGAGGAGAGCTGATCT-

■创新盘点

本研究成功克隆出3个健脾益气方药下调的与肝癌有关的新基因,并实现登录。这3个新基因既是中医健脾益气法的作用靶点之一,也可能与肝癌的发生发展有关。

GAGCAGTTACCATGAACCCTGAGGCA
GGGTTCCCAGAGTTGTCTCTCTGCTCC-
GGTGAGGCAGCAACTGAGGGTCTCAT-
GTCTCCAGTCTTGTTACCTCAAGCCATC-
TACATTCTCTCTTTCTGCCATACTGTCATT-
GCTGCTAATGGTCAGAGTCAAGCATGTG-
GCATTACAGAATGAGCAGGTGGTCTT-
GGGCTGCTATCCGGACATCACTTTTTA-
AATGTGGAAACATGCAGATGACTTCTC-
CAAGAGGCTTAGGCTAATGTGTCAGC-
CAGAAACAGTAGGCTAAGAGAAGCTT-
GAACTCCAGAAGAAAGCTGTTGACATT
CTGTGTGACAGCTGGAAAATGTATA-
AGCACCCGCCCTTGAGACAACTCAGT-
GAAGCCGAACCTGTGCTATCCGCCATTT-
GATAGAAATGTTCTCACCTTGGGCTGACT-
GTGATGTACAATGTGTTATGAAAATT-
GTCGAGCTGAAGCTTTAGTCAAATAC-
GAGTCACTTGCTTTGATCCCGTGTATTT-
TATGATTCCTCTGTCAGTGACTTTCCCTC-
GCCTTACCCTGAGTGTGAATTGTAGCAT-
GATTGTATAAACCTCTATGTAGAAAATG-
GAGATTTTCATGTTCTACAAAATGTTAAG
CTCTAACTGATCCATTTCTGTGTTCTC-
TATAGCCTCATGTGTATGACCTCACTTTCT-
TATCTATTTAAACTTTCCCTTCTGTTCTA-
AAGCTTTCTGTAGCACCCCTGTTCAAGGTG-
GAGAGGAAAGCTGTCTCTTTGCAGAACC-
GTACTGTAAACCAATTTCTCCTTTATAAATAT-
TATTTTCACAGGGCTGATTGTATACAGGGC
TTGTAATAAAATTTTAACACTGTGTTGT-
GAATGAGCTGCGGTTTCTCCGCTGGAG-
GTGACTTCAAAAGCACCTGAGGGGTG-
GAGCGTTCTTTCTGTGACCTTACTTCCTAG-
TACGTGAAGTCTAATCTCACAGTCTT-
GTTCTGTTTCAGTCTCCTGTATAAGAAG-
TACCATAATTTCTGCCCATCATACTTT-
GTAATAAAACTTGAACATGTATAGATT-
GAAAAAATAAAAAAAAAA. G15(2171 bp):
GGCCTGGAAAAGGTGTTCCCAGGGATA
ATACACTGTAAACCCCAACAAGCCTTCT-
GGATGGGTGACAGCTGCAAGCTC-
GTCTCTGTGGTCCTTAGGGCTCTCCTT-
GGCTTTTACTCTACAAACCACCC
AGGCAAACCTCATCTGTTTCATGAAATA-
ACTCCAGAGAAAGAAACCAA-

CAAAGAAAAGGCAGAAAGGATCTATA-
AACAGCGCTGCCAGCTTCTGTTTCCA
CTGGCATCCATTGTAATTTAATCAGGC-
TAGTTTCAGCCCTCATGGACAAAACAA-
CAGTTAGCACACAGATGAAACAAGCTT-
TAAAAACTTCTCAAATTCTGTCTAGC-
CAAACCATGCCGCCTCTCCTCTTAGACTG-
GCTCCAGTTCCCTAGAAATGCCAACTTGC-
CATTGGTACCTCTACCACCAGGCTAGCA-
CAGAGCTCTCCCTGCTTGCCTAACATCTTA-
ATCAGCCCTTGCTCCCTGGGGCTGCTGTG-
GAAGTGGAGACTAAACCTCCACTTCCCTA-
ACTACCTTTTATGTACACACAACCTCTCT-
TACCTTCTCAAACCAGGAGCATGACT-
GAGTCAAATCAGTCTGTCCCCCTAATGC-
CAACAGGATGAAGGTTCCCTACGTCCTG-
GCCTCTCATCTCTGTGCCTCTGCTCAGC-
CAAGGTCTTCCCTGCCCTGATGTTTCAT-
GTCCCTCACATTAGGCTTGGGTAGGGT-
GGTTCACCAGGATGCCATGCCCACAC-
TATGCCGGGACAGGCCACACTA-
AAGCCCTGATATGTCCACCTGTACG-
GAGAGTGATTATGTAAAGCTTCACAG-
CACTGAGGCACAAAGCGCTGCCTCACA
GTGAATGAAGCAAGTACAGGGGGT-
GCTCGAAGCCTCCCTCCTAGTGGTGTCT-
GGACCAAGATCTGATTTCTCTGACTG-
GACTCCCCACCATCCCTCTGAGGGTCATG-
GAGTAGAAGAGTCATTTGACACTCACCT-
CAAATGATCCAGGTACTAACTTCTA-
CAGAAGTTGCTGGCGCTGGTGCCTCTT-
GCTGGCACGTGGAGTGGCAGCCGAACCTC-
GCGGGGCGGGAAGCCGCGAGATGGA-
CACCCCTCCGCTCTCAGACTCGGACTCC-
GGGTCCGATGAGTGCCTGGCCTCAGAT-
CAAGAGTTGCAGGATGCGTTTTTCCCGCG-
GACTCCTAAAGCCAGGCCTCAATGTC-
GTGCTAGAGAAGCCGAAGAAGGCG-
GTGAATGACGAGAATGGCCTGAAGCA
GTGCTTGGCTGAATTCAAACGGGATCTG-
GAGTGGGTTGAAAGGCTCGATGTGACCCT-
GGGTCCTGTGCCTGAAGCCAGTGAACT-
CAGTCAACACCCCAAGAACAAAGGAC-
CAGAAGAAAGGTGTTAATCCAGAAGAC-
GACTTCCAGAGGGGAATGAGTTTC-
TACCGCCAGGCCAGGCTGCTGTGCTT-

GCAGTATTACCCCGACTCCACCAGCTC-
CAAGTCCCTACGAAGAGGCCCACTGAT-
TATTTTGCAGAAATGGCCAAGTCTGATCAA-
CAGATGCAAAAGATTGACAGAAAGCTGCA
GACTAAACAGGCTGCCATGGAGAAATCT-
GAAAAGGCCAAGCAACTTTCGAGC-
GCTTAGGAAATACGGAAAGAAAGGT-
GCAAACTGAGGTCTTTCAGAAAGAGG
CAGCAGGAGAAAGCGCATATGATGAATGC-
CATCAAGAAGTACCAGAAAGGCTTCTCT-
GATAAGCTGGATTTCTTGAAGGGC-
GATCAGAAAGCCTGTGGAAACGAGGT-
GCAAAAGGCAGGAGGAGCTAAAGGC-
CAGCAGATAAGTAAAGGGGCCCAATGC-
CAAACGAAGATACAAAATCAGAAGTTT-
GGTTTTGGCGGAAAGAAAGAAAGGCTC-
CAATGGAACACACGGGAGAGCTACGAC-
GATGTCTCCAGCTTCCGGGGCAAGGTG-
GCTCATGGCAAGGGGCCCAAGAGGCTT-
GGGAAGAAAGGGGCAAAACAAGAGA-
CCCGGAAAACGTACCAGACAGAAACT-
GAAAAGCAAAACCCGCTGAACAGCACT-
GTCCTGTGTAAAGAACCAGGAGAAAGGAT-
GCACAGCACACTCAGTGTTCTGTCTT-
GATTTTTGTAGGAAATTATTTTAAATAAT-
TAAACCTATGGAAGAAAGATACTCTT-
GGGTCAAAACCAGATACTTTTTAAAGAT-
GGAGAAGTTTGCACATTAATAAAATATT-
GCTGCTCCTCA. G20(866 bp): CCCACGC-
GTCCGCATGTGTGTCCAC CCCAAATG-
TACAGTGTCCACCTAGTTACCTGAGAGA-
ACGCCCCAGTCAAGTGTTACTAGTCTTT-
TAGATTTACAGCAGGGAAGCCTCCACCTA-
ATGTGGACCAACTCTGAACTATTCCT-
GTCCCTAAGGTCAGAGAGGCCATAAAT-
GAACATTTACCTTATATTTTTATTTTCATA-
ATGAAATCTTTTAGGCCAAACAACA
ATGTCTCGCTTCTTAAAGCCACAAAGAGC-
CAACCCCCCTCCTAGATCCGCTGTGC-
CAGGACGGATAGTGGGAGGCTGATTCT-
CAACCTTTACCAGAACAGCAAAATGTCTA-
AGACACATGTAACGGGCAAAAACAGAAT-
GCTCAGACCAAATGCGTTGTAAAGTGATAT-
GCACTGTTAATTACAGATCTTTGAAAGTCTC
TGTGCACATATGTAAAGTTTTATTCAAC-
CATAAAATTTATTATCAGTCTTAGGTAAAT

GAACAGTATTTTATACCACATAAACCCCT-
GCTTTCCAAAACCTCATTTCCCTCTAACT-
TACCAGGCACATTATACACACAGCTTA-
AAAAAGATCATATTTTTTTATTCTTGAC-
CATCCACTTATTTTGAAATTTCCAAAGTTTC
TTAGAAAGCGAATTAAATAGAAACT-
CATGGGGAGTGCTTATGGAGACGT-
CAGAAAATGTCACACCAGAGATCATCCAT-
GCTGTAGCCAAATGCATCTTCTAAGTCT-
GTCAGTGGTGGGGGTACCCACCTTCCCT-
GTGTCTAAAGTATACTTTGCCCACTGA-
CAGTGGGCTCTGGCACCTTGGGATTGCT-
GTGAACCCAAATCAAAAATAAAATCTGAGA-
AGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.

2.4 蛋白阅读框架分析(ORF)结果 3个新基因
中,以电子克隆序列为有意义链(mRNA序列),
进行在线ORF分析.结果其蛋白阅读框架如下:
G14: 65aa; 1137-1334 bp, MCMTSLSYLFKLS-
FCSKAFVAPLFRWRGSCSLFAEPYCNHFSFI-
NIIFTGLIVYRACNKILTLCCE. G15: 354aa;
1064-2128 bp, MDTPPLSDSDSGSDECLAS-
DQELQDAFSRGLLKPLNVVLEKPKKA-
VNDENGLKQCLAEFKRDLEWVERLD-
VTLGPVPEASETQSTPQNKDQKKGVNPE-
DFQREMSFYRQAQAAVLAVLPRLHQLQVPT-
KRPTDYFAEMAKSDQMQKIRQKLQT-
KQAAMEKSEKAKQLRALRKYGKKVQTEV-
LQKRQKEKAHMMNAIKKYQKGFSDKLD-
FLEGDQKPVERGAKAGGAKGQQISKGAQC-
QTKIQKSEVWFWRKEERLQMEHTGELR-
RCLQLPGQGGSWQGPQKAWEEERKQETRK-
TYQTETEKQNPLNSTVLCKEPGEGETAHS-
VFVLIFVGNFYFNKLNWKKDTLGSKPDTE.
G20: 34aa; 377-481 bp, MRCKVICTVNYRSLK
VSVHICKFYSTIKFIISLR.

3 讨论

EST的概念于1991年被首次提出.为了从海量
基因组数据中得到可靠的蛋白质编码序列信
息,需要构建一个cDNA文库,即从mRNA反
转录生成cDNA链, cDNA的互补链呈现mRNA
的序列信息,因此某一组织或某一状态所有mRNA
来源的cDNA文库即可反应该状态下完整的转
录信息.但是由于克隆技术的局限性,最终得到
的cDNA序列往往偏向3'端,再加上测序反应能
力所限,所以cDNA测序所得到的信息通常只是

■应用要点

本文对进一步揭
示健脾益气法防
治肝癌的分子机
制做了探索,对指
导中医临床实践
提供了理论依据.
同时,在未来的新
基因功能检测基
础上,将有可能进
一步补充肝癌发
生的分子机制.

■同行评价

本文立意新颖,将中医诊治与现代分子生物学结合,值得推广。

mRNA的一部分。这样一段测序结果虽然没有包含完整的mRNA序列信息,但是足以代表一条mRNA。因此,这样一段序列被称为表达序列标签。

目前研究认为,人基因组中只有2%-3%的序列是蛋白质编码序列,因此代表蛋白质编码序列的EST数据可以帮助我们方便地进行新基因识别和注释,mRNA成熟过程中的可变剪接分析,编码序列的多态性位点识别,EST序列中物种特异的重复序列的发现,以及不同物种之间基于表达序列的比较基因组研究等。此外,EST序列为Microarray提供了大量的数据源,以更精细地研究不同组织、不同发育阶段以及不同条件下的转录谱。

生物信息学是一门实践性很强的新兴科学,早期的生物信息学知识主要来自对核酸序列和蛋白质序列的分析过程,并将分析结果与实验研究结果进行对比分析,从中总结出关于序列数据的规律,后者进一步成为生物信息学的理论基础。在此基础上,逐步形成了生物信息学的算法,体现在核酸和蛋白质序列基本性质的分析、核酸和蛋白质二级结构分析等方面。作为生物医学研究工作者,重要的是利用生物信息学的基本原理,充分利用各种信息资源,尤其是各种在线的生物医学数据库及相关软件。近年来,中医药的研究正逐步深入到生物医学的前沿,在生物医学信息不断膨胀的21世纪,如何将中医药的研究与现代最新科技有机的结合,并充分地利用各种现有的科技资源,是我们新时代中医药研究工作者的基本要求和迫切需要。我们课题组在充分利用不同中医治法方药调控大鼠肝癌转录水平的基因芯片信息资源的基础上,选择其具有明显调控作用的EST为研究目标,筛选出其全长cDNA序列,并在可能的条件下进行其功能探讨。这样的研究,目前国内中医药研究领域还是很少报道,而国外的研究正在蓬勃发展,各研究机构或研究工作者正在抓紧时间,以最快的速度抢占各种资源。本课题筛选到的G2、G4、G5、G11、G18等5个基因已于2005年底至2006年初已被其他的研究机构抢先登录。

在通过mRNA差异显示、代表性差异分析、基因芯片检测等实验技术获得某些基因的部分序列后,广大研究工作者都迫切地希望得到其全长的cDNA序列,以便进行其功能分析,在筛选EST片段全长cDNA序列方面,目前国内

外常用的筛选方法有传统经典的cDNA文库杂交筛选、RACE-PCR扩增及电子克隆等方法。其中传统经典的cDNA文库杂交筛选方法在基因的cDNA克隆方面作出过重要的贡献,其方法稳定可靠,但其缺点也很明显,即受cDNA文库本身的质量、目的基因在文库中的拷贝数量、操作需要同位素的使用条件等影响与限制。由于大鼠基因组序列的测序工作已完成^[5],同时,世界各地的生物医学工作者在研究大鼠的功能基因组方面产生大量的基因片段的数据信息,以及生物信息学及相关生物软件的深入与开发,为大多数EST的有效延伸提供可能。大量的研究证明,EST的电子克隆是克隆其全长cDNA序列的有效途径,常常起到事半功倍的作用^[6-7]。我们研究的20个EST片段中,有15个得到了有效的电子延伸,其中有11个基因的大部分或全部序列通过PCR扩增得到了充分的验证。也充分说明生物信息学的有关技术与方法在中医药研究中的应用前景是非常广阔的。

当然,得到这些EST片段的cDNA序列,只是我们课题组在深入研究不同治法防治肝癌分子机制方面的一部分。重要的是后续工作,即这些基因的功能预测及实验室检测,因为,基因的功能检测才是我们的最终目标。这样的研究工作,既拓宽了不同中医治法防治肝癌的作用分子机制研究,也必将丰富生命科学的有关内容。

4 参考文献

- 1 Guan D, Fang Z. Advances in TCM treatment of primary hepatocarcinoma. *J Tradit Chin Med* 2000; 20: 223-226
- 2 董秀丽,李长华,李炜.原发性肝癌从脾虚论治探讨. *山东中医杂志* 2001; 20: 459-461
- 3 方肇勤,管冬元,梁尚华,秦红友,李海燕.不同中医治法对DEN诱发大鼠肝癌作用的比较研究. *中医杂志* 2002; 43: 542-544
- 4 盛学仕,方肇勤,管冬元,赵晓珍,吴中华,阚卫兵,高必峰. DEN诱发大鼠肝癌过程中肝组织基因表达谱的演变. *中国中医基础医学杂志* 2005; 11: 737-746
- 5 Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, Scott G, Steffen D, Worley KC, Burch PE, Okwuonu G, Hines S, Lewis L, DeRamo C, Delgado O, Dugan-Rocha S, Miner G, Morgan M, Hawes A, Gill R, Celera, Holt RA, Adams MD, Amanatides PG, Baden-Tillson H, Barnstead M, Chin S, Evans CA, Ferriera S, Fosler C, Glodek A, Gu Z, Jennings D, Kraft CL, Nguyen T, Pfannkoch CM, Sitter C, Sutton GG, Venter JC, Woodage T, Smith D, Lee HM, Gustafson E, Cahill P, Kana A, Doucette-Stamm L, Weinstock K, Fechtel K, Weiss RB, Dunn DM, Green ED, Blakesley RW, Bouffard GG, De Jong PJ, Osoegawa K, Zhu B, Marra M, Schein J, Bosdet I, Fjell C, Jones S, Krzywinski M, Mathewson C, Siddiqui A, Wye N, McPherson J, Zhao S, Fraser CM, Shetty J,

Shatsman S, Geer K, Chen Y, Abramzon S, Nierman WC, Havlak PH, Chen R, Durbin KJ, Egan A, Ren Y, Song XZ, Li B, Liu Y, Qin X, Cawley S, Worley KC, Cooney AJ, D'Souza LM, Martin K, Wu JQ, Gonzalez-Garay ML, Jackson AR, Kalafus KJ, McLeod MP, Milosavljevic A, Virk D, Volkov A, Wheeler DA, Zhang Z, Bailey JA, Eichler EE, Tuzun E, Birney E, Mongin E, Ureta-Vidal A, Woodward C, Zdobnov E, Bork P, Suyama M, Torrents D, Alexandersson M, Trask BJ, Young JM, Huang H, Wang H, Xing H, Daniels S, Gietzen D, Schmidt J, Stevens K, Vitt U, Wingrove J, Camara F, Mar Albà M, Abril JF, Guigo R, Smit A, Dubchak I, Rubin EM, Couronne O, Poliakov A, Hübner N, Ganten D, Goesle C, Hummel O, Kreitler T, Lee YA, Monti J, Schulz H, Zimdahl H, Himmelbauer H, Lehrach H, Jacob HJ, Bromberg S, Gullings-Handley J, Jensen-Seaman MI, Kwitek AE, Lazar J, Pasko D, Tonellato PJ, Twigger S, Ponting CP, Duarte JM, Rice S, Goodstadt L, Beatson SA, Emes RD, Winter EE, Webber C, Brandt P, Nyakatura G, Adetobi M, Chiaromonte F, Elnitski L, Eswara P, Hardison RC, Hou M, Kolbe D, Makova K, Miller W, Nekrutenko A, Riemer C, Schwartz S, Taylor J, Yang S, Zhang Y,

Lindpaintner K, Andrews TD, Caccamo M, Clamp M, Clarke L, Curwen V, Durbin R, Eyraas E, Searle SM, Cooper GM, Batzoglou S, Brudno M, Sidow A, Stone EA, Venter JC, Payseur BA, Bourque G, López-Otín C, Puente XS, Chakrabarti K, Chatterji S, Dewey C, Pachter L, Bray N, Yap VB, Caspi A, Tesler G, Pevzner PA, Haussler D, Roskin KM, Baertsch R, Clawson H, Furey TS, Hinrichs AS, Karolchik D, Kent WJ, Rosenbloom KR, Trumbower H, Weirauch M, Cooper DN, Stenson PD, Ma B, Brent M, Arumugam M, Shteynberg D, Copley RR, Taylor MS, Riethman H, Mudunuri U, Peterson J, Guyer M, Felsenfeld A, Old S, Mockrin S, Collins F; Rat Genome Sequencing Project Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004; 428: 493-521

6 Hogenesch JB, Ching KA, Batalov S, Su AI, Walker JR, Zhou Y, Kay SA, Schultz PG, Cooke MP. A comparison of the Celera and Ensembl predicted gene sets reveals little overlap in novel genes. *Cell* 2001; 106: 413-415

7 Dworkin J, Losick R. Differential gene expression governed by chromosomal spatial asymmetry. *Cell* 2001; 107: 339-346

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 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布 WJG 2006 年影响因子 0.834

本刊讯 2006年*World Journal of Gastroenterology (WJG)*的总被引频次为3576, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第19位, 内科医学类28种期刊的第1位。2006年WJG的影响因子为0.834, 内科医学类28种期刊的第7位。即年指标0.134, 他引率0.77, 地区数26, 基金论文比0.40, 海外论文比0.78, 学科影响指标0.75。(总编辑: 马连生 2007-11-15)

芪榔合剂对慢性传输型便秘小鼠结肠SP、VIP的影响

李勇, 王健, 李毅平, 胡晔, 汤健, 余莉芳

■背景资料

中医治疗CFC疗效明确,但多数限于临床疗效观察方面,对其作用机制的研究探讨较少,本文从胃肠激素方面讨论芪榔合剂对小鼠结肠SP、VIP的影响,探讨其通便的作用机制。

李勇, 王健, 李毅平, 胡晔, 汤健, 余莉芳, 上海中医药大学附属市中医院消化科 上海市 200071

李勇, 2004年上海中医药大学博士, 副教授, 主要从事中西医结合治疗消化系统疾病的临床和实验研究。

作者贡献分布: 李勇与王健对此文所作贡献均等; 本课题由李勇, 王健及余莉芳共同设计; 研究过程由王健, 李毅平, 胡晔及汤健共同操作完成; 数据分析由李勇, 王健及余莉芳完成; 论文写作由李勇和王健完成。

通讯作者: 李勇, 200071, 上海市芷江中路274号, 上海中医药大学附属市中医院消化科(上海市中医医院)。

liyong8256@sohu.com

电话: 021-56639828-2302/2303

收稿日期: 2007-08-02 修回日期: 2007-12-11

Effect of Qilang Decoction on substance P and vasoactive intestine polypeptide in the mucous enteric nervous system

Yong Li, Jian Wang, Yi-Ping Li, Ye Hu, Jian Tang, Li-Fang Yu

Yong Li, Jian Wang, Yi-Ping Li, Ye Hu, Jian Tang, Li-Fang Yu, Department of Gastroenterology, Shanghai Traditional Chinese Medicine Hospital, Shanghai 200071, China
Correspondence to: Dr. Yong Li, Department of Gastroenterology, Shanghai Traditional Chinese Medicine Hospital, 274 Zhijiang Middle Road, Shanghai 200071, China. liyong8256@sohu.com

Received: 2007-08-02 Revised: 2007-12-11

Abstract

AIM: To investigate the effect of Qilang Decoction on substance P (SP) and vasoactive intestine polypeptide (VIP) in mucous and muscular layers of colon and its possible mechanism.

METHODS: Fifty Kunming mice were divided into normal group (A), model group of constipated mice (B) and three different treatment groups (C, D, E). Positively stained SP and VIP were compared among the 5 groups using immunohistochemistry and pathology analysis system.

RESULTS: Strongly positive SP $[(9.35 \pm 2.44) \times 10^5, (7.69 \pm 4.16) \times 10^5]$ and VIP $[(9.48 \pm 4.54) \times 10^5, (6.65 \pm 3.30) \times 10^5]$ were found in the mucous membrane and muscular layers of the normal colon group compared with the negative group

($P < 0.05$). The SP and VIP level was higher in the mucous membrane layer than in the muscular layer. The SP level $[(5.25 \pm 0.72) \times 10^5, (5.61 \pm 1.59) \times 10^5, (5.61 \pm 2.03) \times 10^5]$ and the VIP level $[(4.19 \pm 1.13) \times 10^5, (7.27 \pm 2.27) \times 10^5, (3.40 \pm 1.51) \times 10^5]$ decreased considerably in the mucous membrane and muscular layers of the Qilang Decoction groups compared with the normal group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Qilang Decoction may regulate the distribution of SP and VIP in the colon by directly stimulating the peristalsis of the colon, decreasing the response of SP to the nerve cluster of the colon mucous membrane, and releasing SP, thus leading to increased excretion of intestinal juice, which lubricates the intestines for easy bowel movements.

Key Words: Qilang Decoction; Diphenoxylate; Constipated mice; Substance P; Vasoactive intestine polypeptide

Li Y, Wang J, Li YP, Hu Y, Tang J, Yu LF. Effect of Qilang Decoction on substance P and vasoactive intestine polypeptide in the mucous enteric nervous system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 272-276

摘要

目的: 观察芪榔合剂对便秘小鼠结肠黏膜层和肌层P物质(substance P, SP)、血管活性肠肽(vasoactive intestine polypeptide, VIP)的影响,初步探讨其通便作用机制。

方法: 50只昆明种小鼠随机分为5组: 阴性对照组(A组)、便秘模型组(B组)和大(C组), 中(D组), 小(E组)剂量芪榔合剂组。应用免疫组织化学技术和病理显微镜分析图像系统, 观察各组SP、VIP阳性染色区域的免疫组化指数, 并进行比较。

结果: 便秘模型组结肠黏膜层及肌层内SP、VIP呈强阳性表达, 与阴性组比较明显升高, 其中黏膜层SP、VIP含量高于肌层; C, D, E组黏膜层和肌层SP[黏膜层: $(5.25 \pm 0.72) \times$

■同行评议者

王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室

10^5 、 $(5.61 \pm 1.59) \times 10^5$ 、 $(5.61 \pm 2.03) \times 10^5$ vs $(9.35 \pm 2.44) \times 10^5$; 肌层: $(2.28 \pm 0.82) \times 10^5$ 、 $(3.23 \pm 0.80) \times 10^5$ 、 $(3.45 \pm 0.88) \times 10^5$ vs $(7.69 \pm 4.16) \times 10^5$], VIP黏膜层: $[(4.19 \pm 1.13) \times 10^5$ 、 $(7.27 \pm 2.27) \times 10^5$ 、 $(3.40 \pm 1.51) \times 10^5$ vs $(9.48 \pm 4.54) \times 10^5$; 肌层: $(1.54 \pm 0.39) \times 10^5$ 、 $(1.40 \pm 1.30) \times 10^5$ 、 $(1.47 \pm 0.57) \times 10^5$ vs $(6.65 \pm 3.30) \times 10^5]$ 含量较模型组比较显著降低($P < 0.05$).

结论: 芪榔合剂能够调节结肠内SP、VIP含量, 其通便作用机制可能是直接刺激结肠蠕动, 使结肠黏膜神经丛中SP能神经反应性降低, SP释放减少, 导致肠液分泌增加达到润下通便作用.

关键词: 芪榔合剂; 复方地芬诺酯; 小鼠便秘模型; P物质; 血管活性肠肽

李勇, 王健, 李毅平, 胡晖, 汤健, 余莉芳. 芪榔合剂对慢性传输型便秘小鼠结肠SP、VIP的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 272-276
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/272.asp>

0 引言

慢性功能性便秘(CFC)主要是以大便排出困难、排便不适感及排便时间延长为主要症状的征候群, 其发病率男性可达9%-26%, 女性可达21%-34%^[1-4]. 其病因不明、无特征性病例改变, 治疗较困难, 我们在运用芪榔合剂治疗CFC取得较好临床疗效的基础上, 对芪榔合剂的通便作用进行进一步的动物实验研究, 证明其具有较好的促进肠蠕动、润下通便的作用, 同时我们应用免疫组织化学的方法, 对复方地芬诺酯诱导的慢性传输型便秘小鼠结肠P物质(substance P, SP)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)2种主要的肽能神经递质进行了研究, 以探讨其通便作用的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 选用体质量 20 ± 2 g健康昆明小鼠50只, 雌雄各半, 中国科学院上海实验动物中心提供, 合格证号: 22148, 二级动物房饲养. 实验动物按照体质量、性别随机分为5组, 即阴性对照组、便秘模型组、大中小3个剂量中药组(每毫升分别含原生药2.9 g、1.45 g、0.72 g), 每组10只. 芪榔合剂由黄芪15 g, 槟榔20 g, 知母15 g, 玉竹15 g, 全瓜蒌30 g, 望江南30 g, 枳壳15 g组成, 煎煮、浓缩至每毫升含生药2.9 g, 置于冰箱内4℃保存, 实

验前配制成合适浓度. Leica RM2145型轮转切片; 中文IMS细胞图像分析系统、医学图像分析软件; 摄像机PANASONIC MV-CP410; Olympus BH2显微镜; 数码相机; 兔抗鼠SP、VIP多克隆抗体; EnVision试剂(即用型)等.

1.2 方法 复方地芬诺酯100片, 用研钵研碎后加入100 mL蒸馏水中, 配制成复方地芬诺酯混悬液(2.5 g/L), 用前摇匀. 炭末汁配制^[5]: 准确称取阿拉伯树胶50 g, 加水400 mL, 煮沸至溶液透明, 称取活性炭末25 g加至上述溶液中煮沸3次, 待溶液凉后加水定容到500 mL, 于冰箱4℃保存, 用前摇匀. 模型制备与评价^[6]: 阴性对照组(A组)给蒸馏水, 其余4组给复方地芬诺酯混悬液30 min后给予每只动物0.4 mL炭末汁, 从给炭末汁完即开始记录时间, 于当日记录各组小鼠首次排出黑色粪便时间; 8 h排便总粒数; 8 h不排便动物数; 20 h排便总粒数. (1)便秘模型组(B组)和3个剂量中药组(按大中小剂量分别为C、D、E组)均以灌胃方法给予50 mg/kg复方地芬诺酯, 灌胃量为0.02 mL/g, 30 min后便秘模型组给予同等剂量蒸馏水ig, 3个剂量中药组分别给予相应剂量中药ig, 灌胃量为0.025 mL/g, 连续ig 4 wk, 末次ig 70 min后脱臼处死小鼠, 剪取小鼠近端结肠2 cm, 纵行剖开, NaCl(含Na 9 g/L)漂洗后, 固定于40 g/L中性甲醛溶液中, 常规脱水、石蜡包埋, 常规切片机切片, 厚约4 μm. 分别进行HE染色和免疫组化染色. 采用EnVision免疫组化染色法(两步法), 光学显微镜下, 采用中文IMS细胞图像分析系统, 每张片随机取3个视野, 对SP、VIP含量进行定量分析, 并对免疫组化指数进行统计.

统计学处理 计量资料以mean±SD表示, 组间比较采用方差分析, 两组间比较采用LSD-*t*检验, 用SPSS12.0软件包进行数据统计, $P < 0.05$ 表示统计学上差异有显著性.

2 结果

2.1 小鼠慢性传输型便秘模型评价 B、C、D、E组与A组比较, 首次排出黑便时间明显延长($P < 0.05$); 小鼠8 h、20 h排便总粒数明显减少; 不排便动物数明显增多. B、C、D和E组间比较小鼠首次排出黑色粪便时间, 8 h、20 h排便粒数无明显差异($P > 0.05$), 说明造模成功(表1).

2.2 小鼠结肠形态学改变 各组动物, 结肠黏膜结构完好, 上皮无剥脱, 固有腺体无异常, 间质无充血、水肿、炎细胞浸润, 肌间神经丛、肌细

■ 研发前沿

慢性传输型便秘的发生机制目前尚不明确, 近年来研究表明肠神经系统与慢性传输型便秘有关, 神经肽在便秘的发生过程中具有重要作用, 尤其与SP、VIP数量的变化关系密切.

■相关报道

《慢性传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛内VIP能神经、SP能神经的免疫组化研究》一文以复方苯乙哌啶(地芬诺酯)制备大鼠慢传输型便秘模型并探讨大鼠结肠SP、VIP含量变化。

表 1 各组动物排便粒数(mean \pm SD, $n = 10$)

分组	首次排黑便时间(min)	8 h排便粒数	不排便动物数	20 h排便粒数
A	156 \pm 22.24	44.3 \pm 7.82	0	97.5 \pm 13.38
B	419.4 \pm 88.24 ^a	7.6 \pm 7.29 ^a	4	56.1 \pm 17.40 ^a
C	419.4 \pm 62.26 ^a	9.1 \pm 9.08 ^a	4	57.5 \pm 11.74 ^a
D	434.2 \pm 61.35 ^a	7.0 \pm 7.41 ^a	4	59.2 \pm 15.38 ^a
E	435.5 \pm 61.89 ^a	8.5 \pm 6.85 ^a	3	54.1 \pm 17.21 ^a

^a $P < 0.05$ vs A组.

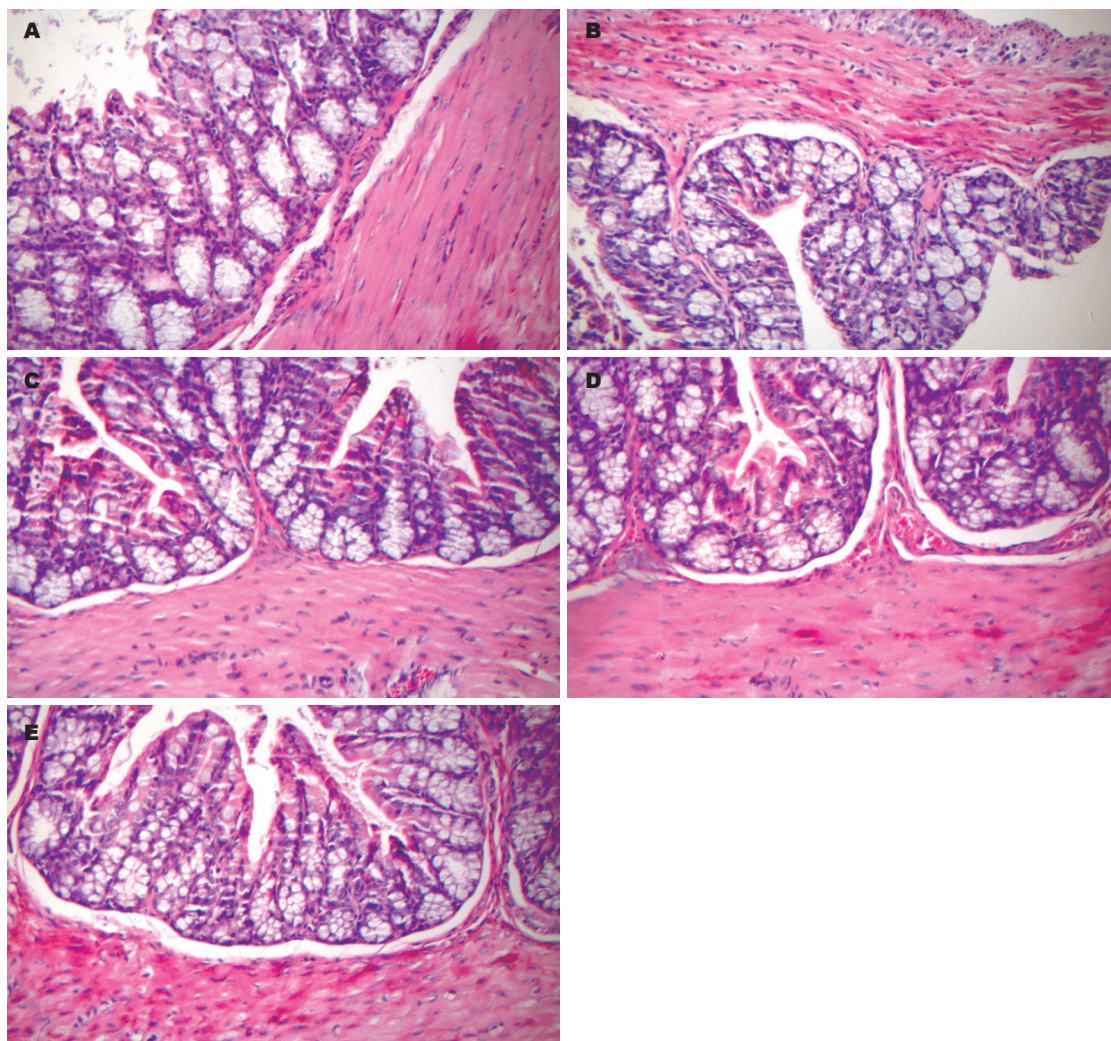


图 1 芪榔合剂对小鼠结肠形态学的影响(H&E \times 200). A: 阴性对照组; B: 便秘模型组; C: 大剂量中药组; D: 中剂量中药组; E: 小剂量中药组.

胞未见明显异常改变(图1).

2.3 小鼠结肠黏膜层及肌层SP、VIP含量的变化 B组结肠黏膜层及肌层SP、VIP阳性表达明显升高,与A组比较均有显著性差异($P < 0.05$);而中药治疗C、D、E组结肠黏膜层和肌层SP、VIP阳性表达明显降低,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$),组间比较无显著性差异

($P > 0.05$, 表2).

3 讨论

慢性传输型便秘的发生机制目前尚不明确,近年来研究表明肠神经系统与慢传输型便秘有关^[7-9],神经肽在便秘的发生过程中具有重要作用^[10-12].胃肠肽由胃肠神经分泌释放,而肠神经

表 2 不同组间SP和VIP免疫组化指数变化(mean \pm SD, $\times 10^5$, $n = 10$)

	A	B	C	D	E
SP 黏膜层	2.46 \pm 1.36	9.35 \pm 2.44 ^a	5.25 \pm 0.72 ^c	5.61 \pm 1.59 ^c	5.61 \pm 2.03 ^c
肌层	2.53 \pm 1.19	7.69 \pm 4.16 ^a	2.28 \pm 0.82 ^c	3.23 \pm 0.80 ^c	3.45 \pm 0.88 ^c
VIP 黏膜层	4.40 \pm 1.12	9.48 \pm 4.54 ^a	4.19 \pm 1.13 ^c	7.27 \pm 2.27 ^c	3.40 \pm 1.51 ^c
肌层	1.26 \pm 0.22	6.65 \pm 3.30 ^a	1.54 \pm 0.39 ^c	1.40 \pm 1.30 ^c	1.47 \pm 0.57 ^c

^a $P < 0.05$ vs A组; ^c $P < 0.05$ vs B组.

广泛存在于肠道黏膜层、黏膜下层、肌层. 神经肽是主要起传递信息作用的生物活性多肽, 扮演着神经激素、神经递质、神经调质和细胞因子等多种角色, 是调节胃肠功能的重要因素. 一般来讲, 黏膜下神经丛主要参与肠道分泌和吸收功能, 而肌间神经丛主要参与肠道运动功能的调节^[13]. 目前已确认的肠神经递质或调质多达数十种, 其中兴奋性递质主要包括SP、乙酰胆碱等; 抑制性递质包括VIP、NO、三磷酸腺苷(ATP)等.

SP是由胃肠道固有神经或外来神经释放, 存在于胃肠道黏膜神经丛、肌间神经丛, 是调节肠道作用最强的兴奋性肽能神经递质, 能抑制肠道黏膜分泌, 刺激肠道运动, 可直接作用大肠纵行肌环行肌引起收缩, 增加结肠收缩和运动^[13]. 国内外学者对慢性传输型便秘患者结肠进行研究后认为慢性传输型便秘的产生可能与结肠肌间神经丛内SP含量减少有关^[14-18], 可能是导致结肠传输功能减弱的原因之一. 实验结果显示, 模型小鼠黏膜层及肌间神经丛内SP含量较阴性对照组明显增多, 以黏膜层SP含量增多最明显.

我们认为慢性功能性便秘以气虚推动乏力、津亏肠道失润为本, 兼以肠道气滞为标. 芪榔合剂是我科治疗便秘的经验方, 全方由黄芪、槟榔、知母、玉竹、全瓜蒌、望江南、枳壳6味中药组成, 具有益气润下、理气导滞之功效, 我们长期临床实践应用证明本方具有良好的通便效果, 并且无腹痛、腹泻、停药后便秘反复加重等副作用. 本研究结果表明, 便秘小鼠结肠神经丛内SP含量释放增加, 而芪榔合剂各剂量组均可降低SP含量. 我们认为, SP含量增加可能是由于复方地芬诺酯抑制结肠蠕动, 为维持肠道正常生理, 黏膜层SP含量增加从而使肠液分泌减少, 继发性引起肠道内容物通过延迟; 而芪榔合剂可能直接作用于小鼠结肠刺激肠蠕动, SP能神经反应性降低, SP含量减少, 同时由于黏膜层SP含量的减少, 导致结肠黏膜分泌肠

液增加, 有利通便作用.

VIP能神经按神经元功能不同分为运动神经元和分泌神经元. 前者其传出主要使胃肠括约肌舒张, 后者则主要刺激肠液分泌^[19], VIP可以使结肠运动减弱. 尽管VIP能神经是胃肠道运动的抑制性神经, 但国内外大量学者通过对慢性便秘患者及慢性传输型便秘大鼠结肠VIP能神经进行免疫组化研究认为, 其结肠肌层内VIP能神经呈减少趋势^[20], 并认为VIP是产生下行性抑制的重要因素, 其含量降低可能导致肠神经系统传输障碍, 产生传输减慢^[21], 同时由于VIP浓度降低可能引起结肠出现过度的阶段性蠕动, 使有效推动减弱^[22-25]. 结果显示, 模型小鼠黏膜层及肌间神经丛内VIP含量较阴性对照组明显增多, 以黏膜层VIP含量增多更明显; 而芪榔合剂各剂量组与模型组比较显著性下降, 说明芪榔合剂各剂量组均可降低VIP含量. 由于复方地芬诺酯作用于肠道平滑肌, 抑制结肠蠕动, 为恢复结肠正常的动力, 肠神经系统大量释放VIP, 使黏膜层分泌肠液增多, 并能抑制结肠阶段性蠕动, 使有效推动增强. 而芪榔合剂可能通过直接作用于结肠, 促进结肠的运动, 从而促进排便, VIP释放减少. 因此我们认为, 结肠内VIP含量升高可能是便秘早期肠神经系统的一种代偿性反应.

我们研究表明便秘小鼠结肠黏膜层及肌层SP、VIP含量明显升高, 可能与便秘病程较短及未使用接触性泻剂有关, 可能是便秘早期肠神经系统的一种代偿性反应; 芪榔合剂刺激小鼠肠蠕动, SP能神经反应性降低, SP含量减少, 由于黏膜层SP含量的减少, 导致结肠黏膜分泌肠液增加, 使粪便软化, 最终达到通便作用.

4 参考文献

- 1 于普林, 李增金, 郑宏, 朱汉民, 李玺, 何钦成, 王静思, 袁凯瑜, 姜中央, 段春波, 高芳堃. 老年人便秘流行病学特点的初步分析. 中华老年学杂志 2001; 20: 132-134
- 2 Pare P, Ferrazzi S, Thompson WG, Irvine EJ, Rance

■应用要点

本文为中药治疗慢传输型便秘机制研究奠定了基础, 为中药临床治疗慢传输型便秘提供理论基础.

■名词解释

1 P物质(SP): 是由胃肠道固有神经或外来神经释放, 存在于胃肠道黏膜神经丛、肌间神经丛, 是调节肠道作用最强的兴奋性肽能神经递质.

2 血管活性肠肽(VIP): 是由运动神经元和分泌神经元分泌的能够刺激肠液分泌、可以使结肠运动减弱的一种肠道肽类激素.

■同行评价

本文设计合理,文字表达流畅,但总体评价一般。

- L. An epidemiological survey of constipation in canada: definitions, rates, demographics, and predictors of health care seeking. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3130-3137
- 3 郭晓峰,柯美云,潘国宗,韩少梅,方秀才,鲁素彩,郭慧平. 北京地区成人慢性便秘整群、分层、随机流行病学调查及其相关因素分析. *中华消化杂志* 2002; 22: 637
- 4 尉秀清,陈旻湖. 广州市居民功能性便秘流行病学调查. *胃肠病学和肝病学杂志* 2001; 10: 150
- 5 李业鹏,崔生辉,江涛,李燕俊,李玉伟,韩春卉,刘红蕾,张靖. 小鼠便秘模型的建立. *中国食品卫生杂志* 2000; 12: 1-4
- 6 李仪奎,王钦茂,周金黄. 中药药理实验方法学. 第1版. 上海: 上海科技出版社, 1991: 416
- 7 Voderholzer WA, Wiebecke B, Gerum M, Müller-Lissner SA. Dysplasia of the submucous nerve plexus in slow-transit constipation of adults. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 755-759
- 8 Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S, Ikeda T, Fukuzawa M. Regulation of the enteric nervous system in the colon of patients with slow transit constipation. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1540-1544
- 9 莫平,刘武红. Mu阿片受体在大鼠“泻剂结肠”肠道低反应中的应用. *消化外科* 2002; 1: 436-440
- 10 Sjölund K, Fasth S, Ekman R, Hultén L, Jiborn H, Nordgren S, Sundler F. Neuropeptides in idiopathic chronic constipation (slow transit constipation). *Neurogastroenterol Motil* 1997; 9: 143-150
- 11 刘诗,高再荣,钱伟,易粹琼. 慢性便秘患者直肠P物质和血管活性肠肽含量的变化. *中华内科杂志* 2001; 40: 608
- 12 潘仁智,王业皇,张苏闽. 便秘患者血清NO检测及其临床意义的初步探讨. *右江民族医学院学报* 2004; 26: 368
- 13 王志均. 胃肠激素. 北京: 科学出版社, 1985: 210-307
- 14 童卫东,张胜本,张连阳,高峰,杜文华,牟江洪. 慢性传输型便秘肠神经系统一氧化氮合酶和P物质的分布意义. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 380-382
- 15 丁义江,哈楠林,丁曙晴,徐文华,耿建祥. 结肠慢传输型便秘与突触素和P物质及血管活性肠肽的临床研究. *中华胃肠外科杂志* 2004; 7: 485-487
- 16 高峰,张胜本,张连阳,陈俐. 慢传输型便秘乙状结肠VIP、SP免疫组化研究. *中华消化杂志* 1998; 18: 34-36
- 17 Wedel T, Roblick UJ, Ott V, Eggers R, Schiedeck TH, Krammer HJ, Bruch HP. Oligoneuronal hypoganglionosis in patients with idiopathic slow-transit constipation. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 54-62
- 18 童卫东. 慢传输型便秘肠神经系统的研究进展. *国外医学外科学分册* 1999; 26: 212-214
- 19 张经济,连至诚,许冠荪. 结肠运动的发生与调节, 消化道病理生理学. 广州: 科技出版社, 1997: 1084-1090
- 20 何俊堂,刘海峰,房殿春,龙庆林,王国安. 慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛内VIP能神经、SP能神经的免疫组化研究. *消化外科* 2004; 3: 122-124
- 21 Wheatley JM, Hutson JM, Chow CW, Oliver M, Hurley MR. Slow-transit constipation in childhood. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 829-832; discussion 832-833
- 22 Cortesini C, Cianchi F, Infantino A, Lise M. Nitric oxide synthase and VIP distribution in enteric nervous system in idiopathic chronic constipation. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2450-2455
- 23 Milner P, Crowe R, Kamm MA, Lennard-Jones JE, Burnstock G. Vasoactive intestinal polypeptide levels in sigmoid colon in idiopathic constipation and diverticular disease. *Gastroenterology* 1990; 99: 666-675
- 24 El-Salhy M. Gastrointestinal transit in an animal model of human diabetes type 2: relationship to gut neuroendocrine peptide contents. *Ups J Med Sci* 2002; 107: 101-110
- 25 Forrest A, Parsons M. The enhanced spontaneous activity of the diabetic colon is not the consequence of impaired inhibitory control mechanisms. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003; 23: 149-158

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 ●

中国科技期刊引证报告(核心版)发布 世界华人消化杂志 2006 年影响因子 0.373

本刊讯 2006年世界华人消化杂志的总被引频次为1855, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第104位, 内科医学类28种期刊的第7位. 2006年世界华人消化杂志的影响因子为0.373, 内科医学类28种期刊的第21位. 即年指标0.134, 他引率0.71, 地区数27, 基金论文比0.42, 海外论文比0.02, 学科影响指标 0.50. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

应用蛋白指纹图谱技术筛选原发性胆汁性肝硬化患者血清特异性标志物

胡朝军, 李永哲, 赵冠飞, 李 宁, 许 洋, 佟大伟, 张蜀澜

胡朝军, 李永哲, 赵冠飞, 佟大伟, 张蜀澜, 中国医学科学院, 中国协和医科大学, 北京协和医院 北京市 100730

李宁, 许洋, 吴阶平医学基金会 北京市 100062

胡朝军, 研究实习生, 主要从事自身免疫性疾病实验室诊断研究及蛋白指纹图谱技术临床应用研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30640084, No. 30471617

作者贡献分布: 胡朝军与李永哲对此文所作贡献均等; 此课题由胡朝军, 李永哲, 李宁及许洋设计; 研究过程由赵冠飞, 佟大伟及张蜀澜操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由许洋提供; 数据分析由胡朝军, 李永哲及李宁完成; 本论文写作由胡朝军, 李永哲及李宁完成。

通讯作者: 李永哲, 100730, 中国医学科学院, 中国协和医科大学, 北京协和医院. yongzhelipumch@yahoo.com.cn

电话: 010-65295416 传真: 010-65295416

收稿日期: 2007-10-09 修回日期: 2007-12-23

Screening for specific biomarkers in serum for diagnosis of primary biliary cirrhosis using proteomic fingerprint technology

Chao-Jun Hu, Yong-Zhe Li, Guan-Fei Zhao, Ning Li, Yang Xu, Da-Wei Tong, Shu-Lan Zhang

Chao-Jun Hu, Yong-Zhe Li, Guan-Fei Zhao, Da-Wei Tong, Shu-Lan Zhang, Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Ning Li, Yang Xu, Wu Jie-Ping Medical Foundation, Beijing 100062, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30640084, No. 30471617

Correspondence to: Yong-Zhe Li, Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China. yongzhelipumch@yahoo.com.cn

Received: 2007-10-09 Revised: 2007-12-23

Abstract

AIM: To screen for the potential protein biomarkers in serum for the diagnosis of primary biliary cirrhosis (PBC) using proteomic fingerprint technology.

METHODS: Proteomic fingerprint technology combining magnetic beads with MALDI-TOF-MS was used to profile and compare the serum proteins from 44 patients with PBC, 32 patients

with other hepatic diseases and 43 healthy blood donors. Proteomic patterns associated with PBC were identified by Biomarker Patterns Software. Model of biomarkers was constructed and evaluated using the Biomarker Patterns Software.

RESULTS: A total of 69 discriminating m/z peaks were identified that were related to PBC ($P < 0.05$). The model of biomarkers constructed by the Biomarker Patterns Software based on the four biomarkers (3445, 4260, 8133 and 16 290) generated excellent separation between the PBC and control groups. The sensitivity was 93.3% and the specificity was 95.1%. Blind test data indicated a sensitivity of 92.9% and a specificity of 82.4%.

CONCLUSION: Biomarkers for PBC can be discovered in serum by MALDI-TOF-MS combining the use of magnetic beads. The pattern of combined markers provides a powerful and reliable diagnostic method for PBC with a high sensitivity and specificity.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; Autoimmune liver disease; Biomarker; Magnetic beads; Proteomic fingerprint

Hu CJ, Li YZ, Zhao GF, Li N, Xu Y, Tong DW, Zhang SL. Screening for specific biomarkers in serum for diagnosis of primary biliary cirrhosis using proteomic fingerprint technology. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 277-283

摘要

目的: 探讨蛋白指纹图谱技术筛选原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者血清中可用于诊断的特异性标志物。

方法: 采用弱阳离子纳米磁性微球捕获血清中的蛋白, ProteinChip PBSII-C型蛋白质芯片阅读仪检测绘制成蛋白指纹图谱。所有蛋白指纹图谱采用Biomarker Wizard 3.1分析之后用Biomarker Patterns Software 5.0识别最终可能用于PBC诊断的蛋白标志物并优化组合建立诊断模型。

■背景资料

近年的调查研究表明原发性胆汁性肝硬化(PBC)在世界范围内已经不再是罕见疾病, 但发病机制不清楚且预后差。目前采用的肝脏组织病理活检和血清抗线粒体抗体检测并不能完全满足临床诊治的要求。蛋白指纹图谱技术是近年来的热点技术, 已经在临床疾病的研究中得到广泛的应用并展示出较好的应用前景。

■同行评议者

张吉翔, 教授, 南昌大学第二附属医院

■研发前沿

蛋白指纹图谱技术出现的同时也提出一种全新的多标志物谱或个性化标志物的诊断模式。采用该技术筛选PBC患者血清中的特异性标志物,可以发现一些传统方法不能发现的小分子物质,对这些小分子物质的鉴定有助于PBC的诊断和对发病机制的探讨。但目前鉴定采用蛋白指纹图谱技术筛选低丰度小分子难度较大。

结果:在PBC患者和对照组之间找到69个差异蛋白峰($P<0.05$)。其中质荷比(m/z)为3445, 4260, 8133和16 290的蛋白峰建立PBC诊断模型。该诊断模型能很好地把PBC患者从其他肝脏疾病患者和正常人群中区分出来,其敏感性为93.3%,特异性为95.1%。经双盲实验验证,该模型对PBC诊断的敏感性为92.9%,特异性为82.4%。

结论:采用纳米磁性微球与蛋白质芯片阅读仪联用的蛋白指纹图谱技术可以检测PBC患者血清中的特异性蛋白标志物,并建立敏感性和特异性均较高的PBC诊断模型。

关键词:原发性胆汁性肝硬化;自身免疫性肝炎;生物标志物;磁性微球;蛋白指纹图谱技术

胡朝军, 李永哲, 赵冠飞, 李宁, 许洋, 佟大伟, 张蜀澜. 应用蛋白指纹图谱技术筛选原发性胆汁性肝硬化患者血清特异性标志物. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 277-283

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/277.asp>

0 引言

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种慢性自身免疫性肝脏疾病,该病以肝内细小胆管非化脓性进行性破坏并伴门脉炎症性改变,长期持续性肝内胆汁淤积、最终导致肝纤维化和肝硬化的慢性进展性自身免疫性疾病为主要特征^[1-2]。近年的调查研究表明,PBC在世界范围内已经不再是罕见疾病^[3],特别是在东方人群中,无症状的PBC患者可能远远超过我们现在估计的数量,而且PBC在中国人群中的发病率和死亡率可能都高于其他地方^[4]。目前,对于PBC诊断最可靠的方法仍然是肝脏组织病理活检^[5]。然而,很多PBC患者不愿意接受这种具有创伤性的侵入检查^[6],很多接受检查的PBC患者肝脏组织病理活检并不能找到特征性的病理改变。除此之外,血清中高滴度的抗线粒体抗体(AMA)目前也作为诊断PBC的一个重要指标^[7-8],但是该抗体对于PBC的诊断并不特异,在其他疾病状态,如感染性肝病等也经常出现^[9-10],这对于像我们这样的肝炎大国来说显得非常不利。还有研究发现,10%左右的PBC患者血清中检测不到AMA^[11-12]。由于现有的检测技术限制导致很多PBC患者到了疾病终末期才被诊断,这一现状已经不能满足临床对于疾病早期诊断、早期治疗的要求,在临床医疗中仍然迫切需要诊断PBC的新方法。现有的研究表明蛋白指纹图谱技术可用于很多疾病的早期诊断,如肿瘤、神经性疾病、结核艾滋病毒等感染性疾病和自

身免疫性疾病^[13-19]。因此,我们采用纳米磁性微球和蛋白芯片阅读仪联用的蛋白指纹图谱技术筛选PBC患者血清中的特异性标志物。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-06/2007-02北京协和医院体检、门诊和住院患者119例血清样品,其中包括PBC患者44例(所有病例符合PBC的诊断标准)^[5],其他肝脏疾病患者32例(包括:自身免疫性肝炎10例、乙型肝炎10例、肝硬化9例、酒精性肝炎1例、药物性肝炎1例和原发性硬化性胆管炎1例),健康体检者43例,详细临床资料及分组信息见表1。所有标本用4 mL无抗凝剂的BD真空采血管空腹采血后于4℃静置1 h,4000 g离心5 min。血清分装5管,于-80℃冻存储备用。弱阳离子(WCX)纳米磁性微球,购自北京赛尔迪生物技术有限公司。乙腈、三氟乙酸、尿素、Hepes、水(HPLC级)、Tris碱、CHAPS、DTT、SPA(Sinapinic acid)购自Sigma公司。PBSII-C型蛋白质芯片阅读仪为美国赛弗吉公司产品。

1.2 方法

1.2.1 标本准备:血清从-80℃冰箱内取出,冰浴融化后4℃ 20 000 g离心10 min。取10 μL血清,加20 μL U9缓冲液(9 mol/L尿素,20 g/L CHAPS,10 g/L DTT,50 mmol/L Tris-HCl, pH9.0),充分混匀,4℃振摇30 min后加入100 mmol/L NaAc 370 μL(pH4.0),立即混匀。

1.2.2 弱阳离子纳米磁性微球的活化:每个PCR管中加入50 g/L WCX磁性微球50 μL,置于磁性分离板上分离2 min,弃上清液,加入100 mmol/L NaAc 100 μL活化2次,5 min/次。

1.2.3 活化的纳米磁性微球捕获血清蛋白:每份弃上清液活化的磁性微球中加入100 μL处理好的血清样品,振荡孵育1 h。置于磁性分离板上分离2 min,弃上清液,加入100 mmol/L NaAc 100 μL洗涤2次,5 min/次。用5 mL/L的TFA 10 μL将结合在磁性微球上的蛋白洗脱5 min,取5 μL蛋白洗脱液加入5 μL饱和SPA(50% CAN+5 mL/L TFA),充分混匀后吸取2 μL蛋白结晶混合物点样于金芯片(此芯片仅起载体作用, Au-chip, Ciphergen),自然晾干,采用PBSII-C型蛋白质芯片阅读仪检测蛋白指纹图谱。

1.2.4 芯片检测:芯片阅读仪参数设定为最高检范围为50 000,优化范围2000-10 000,激光强度205,检测灵敏度8。检测前用All-in-one多肽标准芯片校正仪器,系统质量偏差≤0.1%。原始数据

表 1 119例患者临床资料和分组信息

分组	<i>n</i>	男/女	年龄范围	平均年龄	建模组	盲法验证组
健康对照组	43	27/16	25–78	38.6 ± 10.9	23	20
PBC组	44	3/41	16–74	54.1 ± 11.3	30	14
其他肝病组	32	17/15	18–75	50.6 ± 13.1	18	14

表 2 PBC组、其他肝脏疾病组和健康对照组之间存在的69个差异蛋白峰

质荷比 <i>m/z</i>	<i>P</i> 值	质荷比 <i>m/z</i>	<i>P</i> 值	质荷比 <i>m/z</i>	<i>P</i> 值
3088	2.70E–09	16489	0.000942	3681	0.012169
2543	1.31E–08	3375	0.001028	28790	0.012373
8133 ¹	2.20E–07	9280	0.001045	7761	0.012457
7628	2.71E–07	2869	0.001280	3445 ¹	0.013500
8600	2.95E–07	16077	0.001831	25099	0.015117
5477	1.55E–05	5855	0.002259	4528	0.018915
31842	2.06E–05	3774	0.002416	43219	0.019396
3935	4.21E–05	8290	0.002421	24015	0.023501
2759	4.67E–05	4382	0.002668	4676	0.023565
4281	7.05E–05	28026	0.002679	7049	0.027295
4300	7.93E–05	4645	0.002708	3397	0.029999
7967	0.000137	9487	0.002722	3887	0.030014
3955	0.000150	23386	0.003273	9606	0.033309
22798	0.000151	5246	0.003700	32550	0.035143
15874	0.000196	14016	0.004198	5214	0.038265
11485	0.000212	5634	0.005086	5384	0.041371
4068	0.000224	9794	0.005553	7554	0.041867
8071	0.000280	14103	0.005622	4260 ¹	0.043380
15608	0.000325	7405	0.006566	47633	0.044072
5803	0.000379	5315	0.007519	1498	0.045245
11697	0.000571	43917	0.010108	9399	0.046333
6846	0.000664	46614	0.011099	9116	0.047415
16290 ¹	0.000780	8554	0.011442	5525	0.048693

¹被选为建立PBC诊断模型的蛋白峰.

先以Proteinchip 3.1软件标化处理, 并采用*m/z*为4091的蛋白峰(每个人都具有的血清蛋白峰)作为内标校正.

统计学处理 采用Ciphergen ProteinChip软件和BioMarker Wizard软件对芯片检测得到的蛋白指纹图谱进行统计学处理. PBC组与对照组(由其他肝病组与正常对照组组成)之间蛋白质峰的比较采用*t*检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义. 在此基础上采用Biomarker Patterns Software Version 5.0 (BPS)识别诊断PBC的最佳标志物, 并建立PBC诊断模型.

2 结果

2.1 PBC组与对照组之间蛋白指纹图谱比较 对

建模组的71例样本检测得到的蛋白指纹图谱进行分析发现69个蛋白质峰存在显著性差异($P < 0.05$, 表2).

2.2 PBC患者血清蛋白标志物的筛选及诊断模型的建立 将BioMarker Wizard软件统计分析得到的69个差异蛋白峰导入Biomarker Patterns Software分析软件筛选诊断PBC的最佳标志物. 结果显示*m/z*为3445、4260、8133和16 290的4个蛋白峰为诊断PBC的最佳标志物(图1). 这4个蛋白标志物组成的诊断模型能很好的将PBC患者区分出来, 其诊断模型如图2. 该诊断模型的敏感性为93.3%, 特异性为95.1%(表3), 其诊断ROC曲线如图3.

2.3 诊断模型的盲法验证 采用48例样本检测得

■创新盘点

血清蛋白指纹的检测一般采用SELDI技术, 本文采用纳米磁性微球技术捕获血清蛋白, 再采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪进行蛋白指纹检测.

■应用要点

本研究采用纳米磁性微球和蛋白芯片阅读仪联用的蛋白指纹图谱技术诊断PBC患者,为读者提供了实验依据。

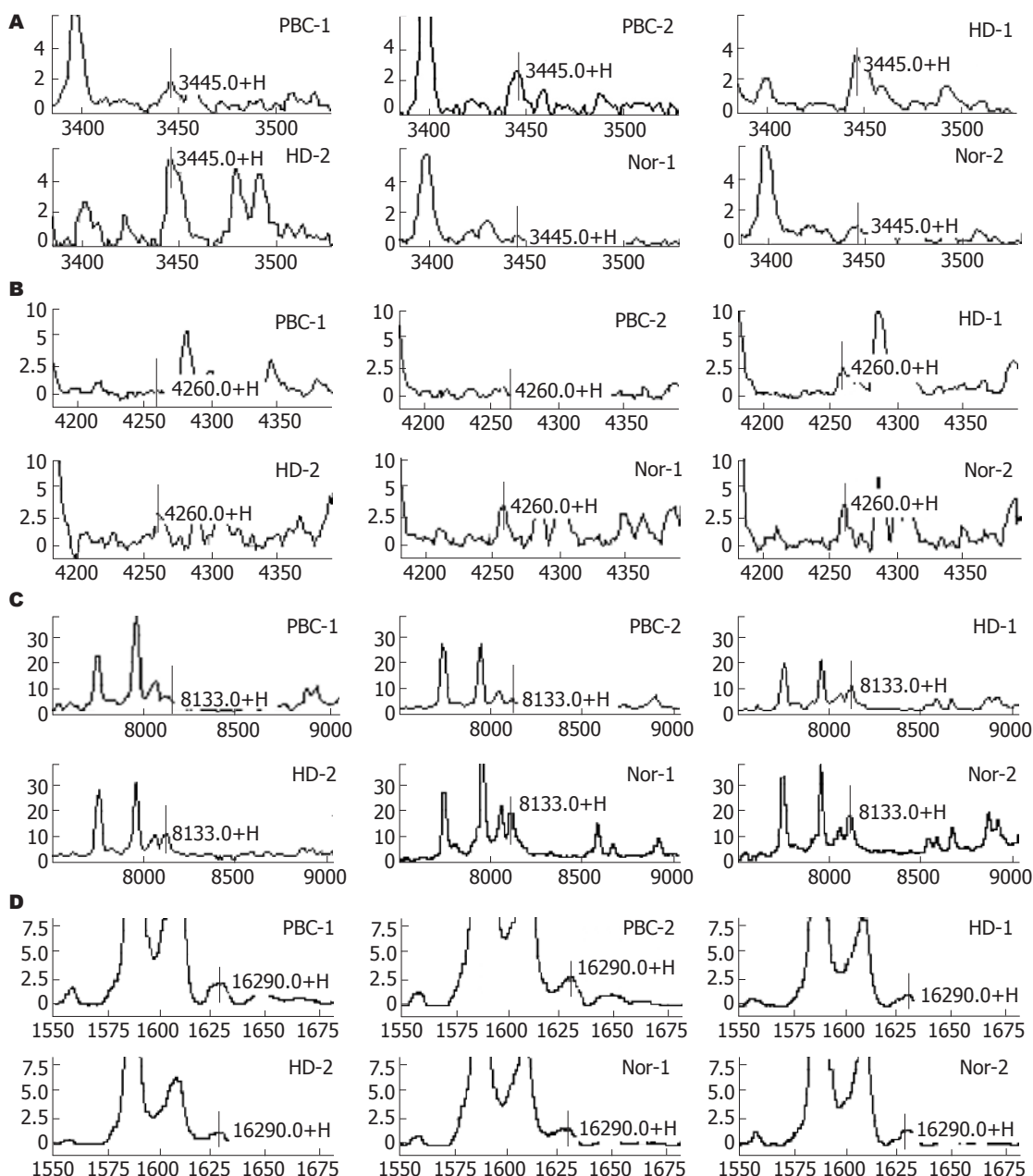


图1 建立PBC诊断模型的4个蛋白峰在PBC、其他肝脏疾病组(HD)和健康对照组(Nor)之间的典型图谱。A: $3445 \leq 1.67$; B: $4260 \leq 2.19$; C: $8133 \leq 9.2$; D: $16290 \geq 0.23$ 。

表3 PBC诊断模型的诊断特性及盲法验证结果

实验分组	临床分组	n	诊断正确例数	诊断正确率
建模组	PBC	30	28	93.33%
	对照	41	39	95.12%
盲法验证组	PBC	14	13	92.86%
	对照	34	28	82.35%

到的蛋白指纹图谱对已建立的PBC诊断模型进行盲法验证。验证结果表明该模型对PBC的诊断敏感性为92.9%, 特异性为82.4%(表3)。

2.4 AMA-M2阳性与AMA-M2阴性PBC患者蛋白指纹图谱比较 采用Biomarker Patterns Software

软件对AMA-M2阳性与AMA-M2阴性PBC患者蛋白指纹图谱进行比较,发现m/z为3682、3935、4068、4472和8133的5个蛋白质峰在两组患者之间存在显著性差异($P < 0.05$, 图4)。

3 讨论

胆汁淤积性疾病在人群中的发生率非常高,因此把PBC患者从这类人群中区分出来在临床诊疗中显得非常重要^[20]。目前依靠组织病理活检、生化检查以及血清自身抗体检查仅能发现并诊断50%-60%的PBC患者,这一现状无法很好的满足临床诊疗需求,因此, PBC的诊断仍旧显得并不十分完善^[21]。

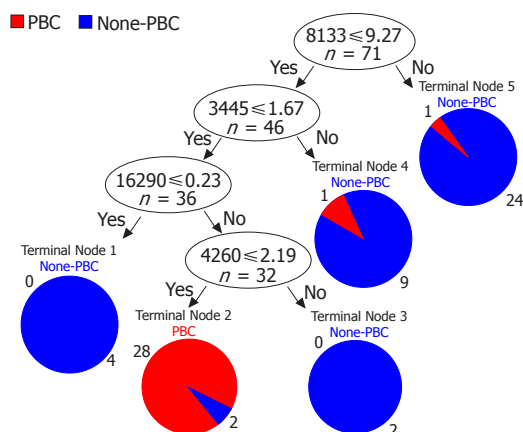


图 2 PBC诊断模型图.

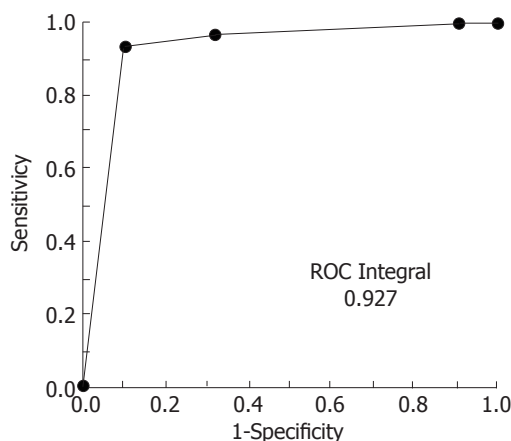


图 3 PBC诊断模型的ROC曲线.

■ 名词解释

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS): 是利用激光脉冲辐射使芯池中的分析物解析形成荷电离子, 根据不同质荷比, 这些离子在仪器场中飞行的时间长短不一, 由此绘制出一张质谱图案.

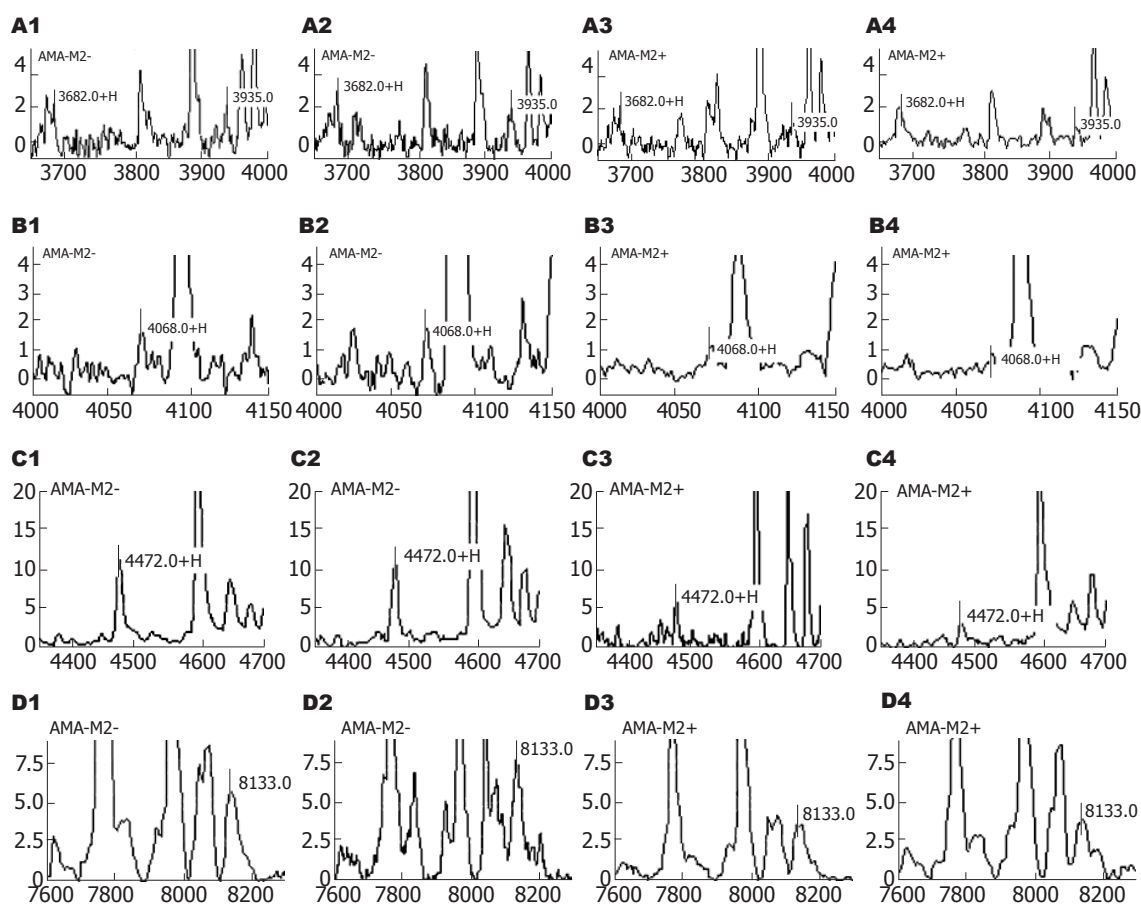


图 4 AMA-M2阳性与AMA-M2阴性PBC患者5个差异蛋白峰的典型图谱.

近年来, 蛋白质组学的研究得到了空前的发展, 出现了大量的蛋白质组学研究方法并应用于临床研究^[22-23]. 蛋白质组学研究领域出现的这些高通量方法使得寻找复杂疾病的生物标志物越来越成功^[24-25]. 疾病的生物标志物或者多标志物联合诊断模式在疾病的诊断、鉴别诊断以及治疗方案的制定方面逐渐显示出强大的优越性^[26-27]. 通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术分析血清中的

蛋白指纹已经筛选出很多用于疾病诊断的标志物. 与传统蛋白芯片相比, 由于纳米磁性微球具有强大的表面积, 因此他能更好的捕获血清中的小分子多肽或蛋白^[28-29]. 结合纳米磁性微球和MALDI-TOF-MS的优势, 采用这两种技术连用的方法能检测到血清中更多的低丰度蛋白. 我们采用WCX纳米磁性微球和MALDI-TOF-MS检测44例PBC患者、32例其他肝病患者和43例健康体检者血清中的蛋白指纹图谱, 研究结果

同行评价

本文研究方法先进, 结果与统计分析可信, 有所创新, 研究结论具有潜在应用价值。

显示 m/z 为3445、4260、8133 和16290的蛋白峰是诊断PBC的最佳标志物, 4个蛋白组合建立的诊断模型能很好的区分PBC患者, 该诊断模型对PBC的诊断敏感性为93.3%, 特异性为95.1%。48例标本盲法验证结果显示其敏感性为92.9%, 特异性为82.4%。对AMA-M2阳性和AMA-M2阴性PBC患者血清蛋白指纹图谱分析比较, 仅发现 m/z 为3682、3935、4068、4472和8133的5个蛋白质峰在两组患者之间存在显著性差异($P<0.05$), 究其原因可能是AMA-M2阳性和AMA-M2阴性PBC患者主要的差异蛋白是大分子蛋白(因AMA为抗体, 分子量较大), 而蛋白指纹图谱技术主要检测的是小分子蛋白, 因此在这两者之间发现的差异蛋白并不多。

由于PBC是一个多因素的复杂疾病, 发现和鉴定PBC相关的标志物不仅可以促进我们在分子层面上对PBC发病机制、疾病过程的理解, 而且多标志物联合诊断模式的建立对于诊断PBC这种复杂疾病也可能更可靠。目前这些多标志物联合诊断模式的建立都是基于一些神经网络软件实现^[30], 因此, 应用于临床之前还需要大量的临床验证来证实其可靠性。由于PBC患者的标本收集较为困难, 本研究中我们建立PBC诊断模型时包括了30例PBC患者, 在48例盲法验证标本中只有14例PBC患者标本。因此, 本研究中发现的4个PBC诊断标志物更需要扩大样本量来做进一步验证, 以确定其临床实用价值。

总之, 虽然本次研究只包括44例PBC患者, 但是本研究结果的确为采用纳米磁性微球和蛋白芯片阅读仪联用的蛋白指纹图谱技术诊断PBC患者提供了实验依据, 特别是发现联合4个蛋白峰建立的诊断模型对PBC的诊断具有较高的敏感性和特异性, 且在盲法验证结果中也得到了体现。

参考文献

- 1 Locke GR 3rd, Therneau TM, Ludwig J, Dickson ER, Lindor KD. Time course of histological progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1996; 23: 52-56
- 2 Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 1261-1273
- 3 Metcalf J, James O. The geoepidemiology of primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 13-22
- 4 Wong GL, Hui AY, Wong VW, Chan FK, Sung JJ, Chan HL. A retrospective study on clinical features and prognostic factors of biopsy-proven primary biliary cirrhosis in Chinese patients. *Am J*

- Gastroenterol* 2005; 100: 2205-2211
- 5 Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000; 31: 1005-1013
- 6 Zeniya M, Watanabe F, Morizane T, Shibata M, Maeyama S, Kage M, Nakanuma Y, Toda G. Diagnosing clinical subsets of autoimmune liver diseases based on a multivariable model. *J Gastroenterol* 2005; 40: 1148-1154
- 7 Leung PS, Coppel RL, Ansari A, Munoz S, Gershwin ME. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 61-69
- 8 Neuberger J. Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 1997; 350: 875-879
- 9 Toda G, Zeniya M, Watanabe F, Imawari M, Kiyosawa K, Nishioka M, Tsuji T, Omata M. Present status of autoimmune hepatitis in Japan--correlating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. Japanese National Study Group of Autoimmune Hepatitis. *J Hepatol* 1997; 26: 1207-1212
- 10 Miyakawa H, Tanaka A, Selmi C, Hosoya N, Mataka N, Kikuchi K, Kato T, Arai J, Goto T, Gershwin ME. Serum reactivity against bacterial pyruvate dehydrogenase: increasing the specificity of anti-mitochondrial antibodies for the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Clin Dev Immunol* 2006; 13: 289-294
- 11 Kaplan MM. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 335: 1570-1580
- 12 Sakauchi F, Mori M, Zeniya M, Toda G. Antimitochondrial antibody negative primary biliary cirrhosis in Japan: utilization of clinical data when patients applied to receive public financial aid. *J Epidemiol* 2006; 16: 30-34
- 13 Dotzlaw H, Schulz M, Eggert M, Neeck G. A pattern of protein expression in peripheral blood mononuclear cells distinguishes rheumatoid arthritis patients from healthy individuals. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1696: 121-129
- 14 Mei J, Kolbin D, Kao HT, Porton B. Protein expression profiling of postmortem brain in schizophrenia. *Schizophr Res* 2006; 84: 204-213
- 15 Shiwa M, Nishimura Y, Wakatabe R, Fukawa A, Arikuni H, Ota H, Kato Y, Yamori T. Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 18-25
- 16 Agranoff D, Fernandez-Reyes D, Papadopoulos MC, Rojas SA, Herbster M, Loosemore A, Tarelli E, Sheldon J, Schwenk A, Pollok R, Rayner CF, Krishna S. Identification of diagnostic markers for tuberculosis by proteomic fingerprinting of serum. *Lancet* 2006; 368: 1012-1021
- 17 Kang X, Xu Y, Wu X, Liang Y, Wang C, Guo J, Wang Y, Chen M, Wu D, Wang Y, Bi S, Qiu Y, Lu P, Cheng J, Xiao B, Hu L, Gao X, Liu J, Wang Y, Song Y, Zhang L, Suo F, Chen T, Huang Z, Zhao Y, Lu H, Pan C, Tang H. Proteomic fingerprints for potential application to early diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem* 2005; 51: 56-64
- 18 Sun B, Rempel HC, Pulliam L. Loss of macrophage-secreted lysozyme in HIV-1-associated dementia detected by SELDI-TOF mass spectrometry. *AIDS* 2004; 18: 1009-1012
- 19 de Seny D, Fillet M, Meuwis MA, Geurts P, Lutteri L,

- Ribbens C, Bours V, Wehenkel L, Piette J, Malaise M, Merville MP. Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3801-3812
- 20 Kim WR, Ludwig J, Lindor KD. Variant forms of cholestatic diseases involving small bile ducts in adults. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1130-1138
- 21 He XS, Ansari AA, Ridgway WM, Coppel RL, Gershwin ME. New insights to the immunopathology and autoimmune responses in primary biliary cirrhosis. *Cell Immunol* 2006; 239: 1-13
- 22 Baumeister W. From proteomic inventory to architecture. *FEBS Lett* 2005; 579: 933-937
- 23 Chung CH, Levy S, Chaurand P, Carbone DP. Genomics and proteomics: emerging technologies in clinical cancer research. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 61: 1-25
- 24 Choi J, Malakowsky CA, Talent JM, Conrad CC, Gracy RW. Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 1566-1570
- 25 Hayman MW, Przyborski SA. Proteomic identification of biomarkers expressed by human pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 918-923
- 26 Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, Lee CC, Leung TW, Ho SK, Johnson PJ. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem* 2003; 49: 752-760
- 27 Hellstrom M, Lexander H, Franzen B, Egevad L. Proteomics in prostate cancer research. *Anal Quant Cytol Histol* 2007; 29: 32-40
- 28 Villanueva J, Philip J, Entenberg D, Chaparro CA, Tanwar MK, Holland EC, Tempst P. Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 2004; 76: 1560-1570
- 29 Whiteaker JR, Zhao L, Zhang HY, Feng LC, Piening BD, Anderson L, Paulovich AG. Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers. *Anal Biochem* 2007; 362: 44-54
- 30 Wiesner A. Detection of tumor markers with ProteinChip technology. *Curr Pharm Biotechnol* 2004; 5: 45-67

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.

肝纤维化的基因治疗

刘娜, 张晓岚

■背景资料

肝纤维化的发生机制是机体对炎症的修复反应, 是多种慢性肝病共同的病理学基础, 是慢性肝病发展为肝硬化的中间环节。如果能阻滞或逆转肝纤维化进展, 将会提高患者的生存质量, 在很大程度上改善肝病患者的预后。

刘娜, 张晓岚, 河北医科大学第二医院消化科 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 文献检索、资料分析和论文撰写由刘娜完成, 选题和审校由张晓岚完成。

通讯作者: 张晓岚, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化科。xiaolanzh@126.com

电话: 0311-66002951

收稿日期: 2007-08-10 修回日期: 2008-01-11

Gene therapy for hepatic fibrosis

Na Liu, Xiao-Lan Zhang

Na Liu, Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Professor Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. xiaolanzh@126.com

Received: 2007-08-10 Revised: 2008-01-11

Abstract

Hepatic fibrosis is a common pathological process of chronic liver diseases, characterized by increased synthesis and relatively low degradation of extracellular matrix (ECM) resulting from their dynamic imbalance. Recent progress in molecular biology techniques has made it possible to treat hepatic fibrosis with gene therapy. At present, the commonly used method is to induce the expression of exogenous genes by transducing enough therapeutic genes into injured liver to delay or cure liver fibrosis.

Key Words: Hepatic fibrosis; Gene; Therapy

Liu N, Zhang XL. Gene therapy for hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 284-288

摘要

肝纤维化是慢性肝病共有的病理改变, 其本质是以胶原为主的细胞外间质(extracellular matrix, ECM)合成增多, 而降解相对减少, 两者失去动态平衡, 致使过多ECM沉积于肝内。近年来随着分子生物学技术的发展, 肝纤维化的基因治疗成为可能。目前, 常用的一般方法

是将足够的治疗性基因导入受损的肝脏, 使外源基因得到表达调控, 达到延缓和治愈肝纤维化的目的。

关键词: 肝纤维化; 基因; 治疗

刘娜, 张晓岚. 肝纤维化的基因治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 284-288

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/284.asp>

0 引言

肝纤维化是慢性肝病晚期的组织学变化, 是一种在损害因子持续作用下渐进的病理过程。以细胞外间质(extracellular matrix, ECM)增加为特征, 同时伴有肝实质的广泛破坏和再生, 导致肝小叶和肝血管结构的紊乱, 最终可引起肝功能失代偿、腹水、上消化道出血等一系列并发症^[1-2]。近年来随着肝纤维化的分子机制逐渐阐明, 从而使肝纤维化的基因治疗成为可能^[3-6]。肝纤维化的形成是多种因素参与并长期相互作用的过程, 因此, 肝纤维化的基因治疗也应采取综合措施^[7-12]。本文针对目前肝纤维化的基因治疗进展作一综述。

1 细胞因子的作用

1.1 转化生长因子 β (transforming growth factor, TGF β) 是肝纤维化形成过程中的关键细胞因子之一。可以促进肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)分泌大量ECM, 抑制肝细胞增生, 诱导肝细胞凋亡, 抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)合成, 使ECM降解减少^[13-14]。因此, 阻断TGF β 信号转导通路就可以阻断肝纤维化进展^[15-16]。有人构建了表达TGF β II受体细胞外区域的复制缺陷型腺病毒载体AdCAT- β TR, 通过门静脉注射实现其在肝脏的局部表达, 以阻断内源性TGF β 信号通路。结果表明, 注射后大鼠肝脏纤维黏连蛋白(fibronectin, FN)、TGF β 1等与对照组比较显著减少, HSC及Kupffer细胞的活化被抑制, 显示出良好的抑制肝纤维化的作用。更重要的是给予AdCAT- β TR后, 大鼠肝功能

■同行评议者

刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化内科

逐渐恢复,血清ALT、AST水平显著下降,表明以腺病毒为载体将TGF β 基因转入体内是治疗肝纤维化非常有效的方法. Ueno *et al*构建了表达TGF β II型受体完整细胞外位点与人免疫球蛋白Fc片段融合蛋白的重组腺病毒载体,可以表达一种可溶性的受体分子片段,与TGF β 竞争性结合,阻断TGF β 的生物学活性.在接受腺病毒后的5-7 d达到高峰,注射重组腺病毒的大鼠可以显著减轻二甲基亚硝胺诱导的肝纤维化的发生.这些研究结果均证明阻断TGF β 信号传导通路,可以有效阻断肝纤维化的形成和发展^[17-19].

1.2 肝细胞生长因子的作用 在肝纤维化形成过程中,肝细胞的相对体积和绝对数量都显著减少.因此,刺激、促进肝细胞的再生也是防治肝纤维化的重要策略和措施.肝细胞生长因子(hepatic growing factor, HGF)是一种多功能细胞因子,能刺激多种类型细胞分化、增殖及迁移,对肝再生具有强大的促进作用^[20-21]. Xia *et al*^[22]将裸露HGF表达质粒静脉注射到经胆总管结扎引起肝硬化的大鼠中,发现肝脏I、III型胶原沉积明显减少, TGF β 1的表达受到抑制,肝纤维化程度明显减轻.随后,人们利用一些缺陷病毒如逆转录病毒、腺病毒等作为基因的载体,也取得了一定的效果^[23].还有学者通过腺病毒介导将HGF和截短型TGF β II型受体联合转入肝硬化大鼠体内,发现肝纤维化明显好转,肝脏功能恢复,肝细胞再生旺盛^[24].提示HGF在体内可刺激肝细胞有丝分裂,促进肝细胞增殖,可以作为肝纤维化基因治疗的有效靶点^[25].

1.3 肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR) 比HGF具有更强的促肝细胞分裂活性,对CCl₄诱发的肝损伤有明显的保护作用.研究表明,ALR通过上调 γ 干扰素的表达,抑制自然杀伤细胞的活性,去除抑制肝再生的因素,达到促进肝再生和逆转肝纤维化的目的.有人构建了ALR真核表达质粒,以基因治疗的方式观察对急性肝损伤的保护作用,发现急性肝衰竭大鼠的存活率显著高于对照组,并显著降低外周血ALT和AST水平^[26].

1.4 白介素-10(interleukin-10, IL-10) 是肝纤维化间质炎症的重要炎症介质因子^[27-28],并对肝纤维化发生起调节作用,因而是阻断肝纤维化过程基因治疗的重要靶点^[29-32].研究证实,肝星状细胞表达IL-10水平的下降可能是肝纤维化形成的重要原因^[33-35].用含有大鼠IL-10基因的腺病毒载体通过尾静脉转染CCl₄肝损伤大鼠,RT-PCR

检测HSC的I、IV型胶原mRNA表达和分泌明显低于空载体组和空白对照组,证实IL-10可以抑制HSC表达和分泌I、IV型胶原,对肝纤维化起负调节作用.利用电穿孔技术将外源IL-10基因导入CCl₄肝损伤大鼠,结果证实胶原I α 、TGF β 1、FN均明显下降,肝纤维化程度减轻^[36].将外源IL-10基因导入硫代乙酰胺肝损伤大鼠,结果同样证实胶原I α 、TGF β 1、TNF α 明显下降^[35].IL-10的基因治疗为肝纤维化提供了良好的应用前景.如能把IL-10基因导入肝脏,使之在肝脏局部高效长时间表达,则有望抑制肝纤维化发展^[37-39].

1.5 其他细胞生长因子 多种细胞生长因子,如血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)^[40],角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF),胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)^[41-43]等也可以促进HSC增殖,加速肝脏纤维化.研究证实KGF可以显著促进HSC增殖,促进细胞由G₀/G₁期进入S期, KGF刺激后, cyclin D1蛋白表达明显升高, P21waf1蛋白表达下降,表明KGF对HSC有显著促增殖作用,在肝纤维化的发生中有重要意义.而重组新型人KGF异构体(K102)可以抑制肝纤维化大鼠成纤维细胞增殖、分化,显著降低ALT、AST水平,肝组织胶原蛋白染色可见胶原纤维明显减少^[44].IGF与肝纤维化的关系也非常密切,应用低剂量重组IGF于肝硬化大鼠,发现肝细胞功能、门静脉高压、肝纤维化均显著改善,肝硬化相关的肝外表现也得到改善^[45].随机临床对照实验表明,IGF1替代疗法可以提高肝硬化患者血清白蛋白水平,改善能量代谢状态,但仍需要进一步的临床实验证实^[46].

2 抑制HSC活化和促进HSC的凋亡

HSC活化、增殖是肝纤维化发生发展的中心环节^[47-49].因此,最为有效的抗肝纤维化基因治疗还是针对HSC的基因治疗途径^[50-52].用携带外源Smad7基因的重组复制缺陷型腺病毒AdSmad7感染大鼠原代HSC,结果显示AdSmad7可在HSC中高效表达, TGF β 1对HSC的活化作用被有效阻断^[53].

在HSC凋亡的调节中,可溶性Fas配体(sFasL)与Fas系统是细胞凋亡调节过程中的重要因素.对sFasL诱导的HSC细胞凋亡研究发现, sFasL诱导的HSC凋亡是一种蛋白和RNA合成依赖性的过程.如果以环磷酸胺阻断蛋白的合成或者以放线菌素D阻断RNA的合成, sFasL诱导

■ 研发前沿

肝纤维化的基因治疗是慢性肝病研究的重点和热点,近年的研究报道主要集中于TGF β 、HGF、ALR等细胞因子和HSC细胞活化、凋亡相关基因的表达调控.

■应用要点

肝纤维化的基因治疗是国内外研究的热点,近年来取得飞速发展,逐渐成为最有希望逆转肝脏纤维化的治疗方法,具有广阔的应用前景。

的HSC细胞凋亡即受到抑制。对HSC表达的细胞凋亡抑制基因**bcl-2**和**bcl-xl**的水平进行半定量测定,发现早期的HSC表达水平显著高于晚期培养的HSC活化而成的成纤维细胞。因此,从HSC的细胞凋亡入手,也是探索肝纤维化基因治疗的重要途径^[54-59]。

3 端粒酶在肝纤维化中的作用

端粒是真核细胞染色体末端特殊的帽状结构,端粒本身维持一定的长度对于细胞的染色体末端的稳定性、正常的有丝分裂过程都是必须的。端粒长度的维持主要依赖端粒酶的活性。大量的证据表明,在纤维化的肝脏中,端粒酶的活性变得不稳定或显著降低。以表达端粒酶蛋白亚单位的重组表达载体转染人的成纤维细胞系,可以使端粒酶阴性的细胞系继续维持细胞的正常状态。Rudolph *et al*^[60]将端粒酶的mRNA转入端粒功能不良的肝细胞中,结果显示可以减轻肝纤维化的病理损害,恢复肝功能。当用表达端粒酶基因的腺病毒载体感染小鼠肝细胞时,小鼠出现腹水消失、体质量增加、血清ALT水平下降和肝细胞增殖活性升高。研究还发现,端粒酶RNA基因能部分抑制TGF β 的功能,提高其抗纤维化效果。提示通过表达端粒酶的基因治疗措施是慢性肝脏疾病包括肝纤维化基因治疗的重要途径^[61]。

4 RNA干扰技术在治疗肝纤维化中的应用

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是新近发展起来的一种快速、简洁、经济的新技术,可同时阻断多个基因表达,不仅可用于研究基因功能,而且可高效、靶向性阻断目的基因的复制和表达,而不干扰其他基因的转录,达到治疗目的^[62-64]。由于其针对性强,且无严重的不良反应,在肝病治疗方面无疑将具有非常广阔的应用前景, RNAi将有望为抗肝纤维化治疗带来新希望。靶位选择是RNAi研究的关键环节。抑制介导HSC活化的关键细胞因子结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)及TGF β 也是针对肝纤维化基因治疗较理想的靶位。经门静脉注射肝纤维化大鼠CTGF siRNA发现,治疗组大鼠肝组织CTGF mRNA及蛋白表达显著下调,肝组织炎症、坏死及纤维化显著减轻^[65-66]。将TGF β 1 siRNA用于CCl₄肝损伤大鼠模型同样发现,肝脏表达TGF β 1、 α -SMA、I型胶原含量均明显下降^[67]。随着对RNAi认识的不

断深化, RNAi技术必将对肝纤维化的治疗起到不可估量的作用^[68-69]。

5 结论

肝纤维化的基因治疗在短短几年中的飞速发展,给人们展现了治疗慢性肝病的美好前景^[70]。我们相信,随着基因治疗技术的日趋成熟,基因治疗将更加有效、安全、经济。肝纤维化基因治疗也将由单基因治疗向着多基因治疗的方向发展,治疗的最终目标是逆转纤维化、重建正常肝小叶,恢复正常肝功能。

6 参考文献

- 1 Rockey DC. Antifibrotic therapy in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 95-107
- 2 Prieto J, Qian C, Hernandez-Alcoceba R, Gonzalez-Aseguinolaza G, Mazzolini G, Sangro B, Kramer MG. Gene therapy of liver diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 1073-1091
- 3 Abe H, Uto H, Takami Y, Takahama Y, Hasuike S, Kodama M, Nagata K, Moriuchi A, Numata M, Ido A, Tsubouchi H. Transgenic expression of osteoactivin in the liver attenuates hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 610-615
- 4 胡庆伟, 刘耕陶. 抗肝纤维化药物研究的进展. *药理学报* 2006; 41: 7-11
- 5 Roderfeld M, Weiskirchen R, Wagner S, Berres ML, Henkel C, Grotzinger J, Gressner AM, Matern S, Roeb E. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. *FASEB J* 2006; 20: 444-454
- 6 Chen M, Wang GJ, Diao Y, Xu RA, Xie HT, Li XY, Sun JG. Adeno-associated virus mediated interferon-gamma inhibits the progression of hepatic fibrosis in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4045-4051
- 7 Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515
- 8 Jiang Y, Kang YJ. Metallothionein gene therapy for chemical-induced liver fibrosis in mice. *Mol Ther* 2004; 10: 1130-1139
- 9 Iimuro Y, Fujimoto J. Strategy of gene therapy for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 45-47
- 10 Suzuki K, Aoki K, Ohnami S, Yoshida K, Kazui T, Kato N, Inoue K, Kohara M, Yoshida T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon alpha improves dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis in rat model. *Gene Ther* 2003; 10: 765-773
- 11 Rosenbaum J. Gene therapy for liver fibrosis using genes that code for protease matrices. *Gastroenterol Clin Biol* 2003; 27: 671-672
- 12 Promrat K, Wu GY, Wu CH. Gene therapy for metabolic diseases of the liver. *BioDrugs* 2000; 13: 177-188
- 13 Dai WJ, Jiang HC. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: a review. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 1-8
- 14 Cheng K, Mahato RI. Gene modulation for treating liver fibrosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2007;

- 24: 93-146
- 15 Yang KL, Chang WT, Chuang CC, Hung KC, Li EI. Antagonizing TGF-beta induced liver fibrosis by a retinoic acid derivative through regulation of ROS and calcium influx. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365: 484-489
- 16 Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007; 56: 284-292
- 17 Xu XB, Leng XS, He ZP, Liang ZQ, Lin K, Wei YH, Yu X, Peng JR. Inhibitory effect of retroviral vector containing anti-sense Smad4 gene on Ito cell line, LI90. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1170-1177
- 18 Arias M, Sauer-Lehnen S, Treptau J, Janoschek N, Theuerkauf I, Buettner R, Gressner AM, Weiskirchen R. Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 29
- 19 Jiang W, Yang CQ, Liu WB, Wang YQ, He BM, Wang JY. Blockage of transforming growth factor beta receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1634-1638
- 20 Xue F, Takahara T, Yata Y, Kuwabara Y, Shinno E, Nonome K, Minemura M, Takahara S, Li X, Yamato E, Watanabe A. Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. *Gut* 2003; 52: 694-700
- 21 Matsuno Y, Iwata H, Umeda Y, Takagi H, Mori Y, Kosugi A, Matsumoto K, Nakamura T, Hirose H. Hepatocyte growth factor gene transfer into the liver via the portal vein using electroporation attenuates rat liver cirrhosis. *Gene Ther* 2003; 10: 1559-1566
- 22 Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 2006; 168: 1500-1512
- 23 Lin Y, Xie WF, Chen YX, Zhang X, Zeng X, Qiang H, Chen WZ, Yang XJ, Han ZG, Zhang ZB. Treatment of experimental hepatic fibrosis by combinational delivery of urokinase-type plasminogen activator and hepatocyte growth factor genes. *Liver Int* 2005; 25: 796-807
- 24 Ozawa S, Uchiyama K, Nakamori M, Ueda K, Iwahashi M, Ueno H, Muragaki Y, Ooshima A, Yamaue H. Combination gene therapy of HGF and truncated type II TGF-beta receptor for rat liver cirrhosis after partial hepatectomy. *Surgery* 2006; 139: 563-573
- 25 Peron JM. Gene therapy, hepatocyte growth factor (HGF) and anti-fibrotic effect. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28: 98-99
- 26 Li Q, Liu DW, Zhang LM, Zhu B, He YT, Xiao YH. Effects of augmentation of liver regeneration recombinant plasmid on rat hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2438-2443
- 27 Schuppan D, Hahn EG. Interleukin 10: the magic bullet for liver fibrosis? *Gastroenterology* 2000; 119: 1412-1414
- 28 Louis H, Le Moine O, Goldman M, Deviere J. Modulation of liver injury by interleukin-10. *Acta Gastroenterol Belg* 2003; 66: 7-14
- 29 Zhang LJ, Yu JP, Li D, Huang YH, Chen ZX, Wang XZ. Effects of cytokines on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 77-81
- 30 Zhang LJ, Chen YX, Chen ZX, Huang YH, Yu JP, Wang XZ. Effect of interleukin-10 and platelet-derived growth factor on expressions of matrix metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rat fibrotic liver and cultured hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2574-2579
- 31 Zhang LJ, Zheng WD, Shi MN, Wang XZ. Effects of interleukin-10 on activation and apoptosis of hepatic stellate cells in fibrotic rat liver. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1918-1923
- 32 Zhang LJ, Wang XZ. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1681-1685
- 33 Huang YH, Shi MN, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl4-induced hepatic fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1386-1391
- 34 Zhang L, Wang X, Zheng W, Shi M. The effects of interleukin-10 on the expression of Fas and FasL in rat hepatic stellate cells. *Med Chem* 2006; 2: 611-616
- 35 Hung KS, Lee TH, Chou WY, Wu CL, Cho CL, Lu CN, Jawan B, Wang CH. Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 324-331
- 36 Chou WY, Lu CN, Lee TH, Wu CL, Hung KS, Concejero AM, Jawan B, Wang CH. Electroporative interleukin-10 gene transfer ameliorates carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis by MMP and TIMP modulation. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 469-476
- 37 Shi MN, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Effect of IL-10 on the expression of HSC growth factors in hepatic fibrosis rat. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4788-4793
- 38 Wang XZ, Zhang LJ, Li D, Huang YH, Chen ZX, Li B. Effects of transmitters and interleukin-10 on rat hepatic fibrosis induced by CCl4. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 539-543
- 39 Zheng WD, Zhang LJ, Shi MN, Chen ZX, Chen YX, Huang YH, Wang XZ. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1753-1758
- 40 Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J Hepatol* 2007; 46: 1064-1074
- 41 Zaratiegui M, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Prieto J, Novo FJ. IGF1 gene transfer into skeletal muscle using recombinant adeno-associated virus in a rat model of liver cirrhosis. *J Physiol Biochem* 2002; 58: 169-176
- 42 Vera M, Sobrevals L, Zaratiegui M, Martinez L, Palencia B, Rodriguez CM, Prieto J, Fortes P. Liver transduction with a simian virus 40 vector encoding insulin-like growth factor I reduces hepatic damage and the development of liver cirrhosis. *Gene Ther* 2007; 14: 203-210
- 43 Wang XZ, Chen ZX, Zhang LJ, Chen YX, Li D, Chen FL, Huang YH. Expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor and its intervention by interleukin-10 in experimental hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1287-1291
- 44 Finch PW, Rubin JS. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with

■名词解释

RNA干扰(RNAi): 是指在进化过程中高度保守的、由双链RNA(dsRNA)诱发的、同源mRNA高效特异性降解的现象。

同行评价

本文内容详实,层次分明,具有一定的理论意义和学术价值.

- therapeutic potential for epithelial protection and repair. *Adv Cancer Res* 2004; 91: 69-136
- 45 Conchillo M, Prieto J, Quiroga J. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and liver cirrhosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 156-164
- 46 Conchillo M, de Knecht RJ, Payeras M, Quiroga J, Sangro B, Herrero JL, Castilla-Cortazar I, Frystyk J, Flyvbjerg A, Yoshizawa C, Jansen PL, Scharschmidt B, Prieto J. Insulin-like growth factor I (IGF-I) replacement therapy increases albumin concentration in liver cirrhosis: results of a pilot randomized controlled clinical trial. *J Hepatol* 2005; 43: 630-636
- 47 Gutierrez-Ruiz MC, Gomez-Quiroz LE. Liver fibrosis: searching for cell model answers. *Liver Int* 2007; 27: 434-439
- 48 Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1728-1734
- 49 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 363-369
- 50 Adrian JE, Poelstra K, Kamps JA. Addressing liver fibrosis with liposomes targeted to hepatic stellate cells. *J Liposome Res* 2007; 17: 205-218
- 51 Beljaars L, Meijer DK, Poelstra K. Targeting hepatic stellate cells for cell-specific treatment of liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: e214-e222
- 52 Parola M, Marra F, Pinzani M. Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol Aspects Med* 2007
- 53 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-191
- 54 徐新保, 冷希圣, 何振平, 梁志清, 林凯, 于鑫, 魏玉华. 反义Smad₄基因对脂肪细胞系CFSC生物学特性的影响. *中华医学杂志* 2004; 84: 587-591
- 55 Kinoshita K, Iimuro Y, Fujimoto J, Inagaki Y, Namikawa K, Kiyama H, Nakajima Y, Otagawa K, Kawada N, Friedman SL, Ikeda K. Targeted and regulable expression of transgenes in hepatic stellate cells and myofibroblasts in culture and in vivo using an adenoviral Cre/loxP system to antagonise hepatic fibrosis. *Gut* 2007; 56: 396-404
- 56 Shen H, Fan J, Minuk G, Gong Y. Apoptotic and survival signals in hepatic stellate cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007; 32: 726-734
- 57 Urtasun R, Nieto N. Hepatic stellate cells and oxidative stress. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 223-230
- 58 Watanabe A, Hashmi A, Gomes DA, Town T, Badou A, Flavell RA, Mehal WZ. Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9. *Hepatology* 2007; 46: 1509-1518
- 59 Yin MF, Lian LH, Piao DM, Nan JX. Tetrandrine stimulates the apoptosis of hepatic stellate cells and ameliorates development of fibrosis in a thioacetamide rat model. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1214-1220
- 60 Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 2000; 287: 1253-1258
- 61 Sato R, Maesawa C, Fujisawa K, Wada K, Oikawa K, Takikawa Y, Suzuki K, Oikawa H, Ishikawa K, Masuda T. Prevention of critical telomere shortening by oestradiol in human normal hepatic cultured cells and carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis. *Gut* 2004; 53: 1001-1009
- 62 Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. In vivo siRNA delivery to tumor cells and its application to cancer gene therapy. *Yakugaku Zasshi* 2007; 127: 1525-1531
- 63 Volarevic M, Smolic R, Wu CH, Wu GY. Potential role of RNAi in the treatment of HCV infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5: 823-831
- 64 John M, Constien R, Akinc A, Goldberg M, Moon YA, Spranger M, Hadwiger P, Soutschek J, Vornlocher HP, Manoharan M, Stoffel M, Langer R, Anderson DG, Horton JD, Kotliansky V, Bumcrot D. Effective RNAi-mediated gene silencing without interruption of the endogenous microRNA pathway. *Nature* 2007; 449: 745-747
- 65 陆翠华, 陆静贤, 华国平, 朱净, 王华, 黄介飞, 顾美珍, 周倩, 倪润洲. 反义抑制结缔组织生长因子对实验性肝纤维化的影响. *中华肝病杂志* 2007; 15: 118-121
- 66 George J, Tsutsumi M. siRNA-mediated knockdown of connective tissue growth factor prevents N-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Gene Ther* 2007; 14: 790-803
- 67 Kim KH, Kim HC, Hwang MY, Oh HK, Lee TS, Chang YC, Song HJ, Won NH, Park KK. The antifibrotic effect of TGF-beta1 siRNAs in murine model of liver cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 1072-1078
- 68 Hu YB, Li DG, Lu HM. Modified synthetic siRNA targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits hepatic fibrogenesis in rats. *J Gene Med* 2007; 9: 217-229
- 69 Martin SE, Caplen NJ. Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007; 8: 81-108
- 70 Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S79-S84

编辑 李军亮 电编 何基才

抗肝纤维化中医治则的临床研究进展

陈俊荣, 陈俊红, 侯振江

陈俊荣, 沧州医学高等专科学校药理教研室 河北省沧州市 061001

陈俊红, 中国石油天然气集团公司中心医院医务处 河北省廊坊市 065000

侯振江, 沧州医学高等专科学校医学检验教研室 河北省沧州市 061001

作者贡献分布: 此课题由陈俊荣与陈俊红设计; 文献检索和分析由陈俊荣与陈俊红完成; 本论文写作由陈俊荣与陈俊红共同完成, 侯振江对论文写作给予审核和指导。

通讯作者: 陈俊荣, 061001, 河北省沧州市, 迎宾南大道高教区 沧州医学高等专科学校. czyzkkk@yahoo.com.cn

电话: 0317-5507813

收稿日期: 2007-10-25 修回日期: 2008-01-02

Progress in treatment of liver fibrosis with traditional Chinese medicine

Jun-Rong Chen, Jun-Hong Chen, Zhen-Jiang Hou

Jun-Rong Chen, Department of Pharmacology, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China
Jun-Hong Chen, Division of Medical Affairs, China National Petroleum Corporation Central Hospital, Langfang 065000, Hebei Province, China

Zhen-Jiang Hou, Department of Laboratory Medicine, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, Hebei Province, China

Correspondence to: Jun-Rong Chen, Cangzhou Medical College, Yingbin Southern Avenue, Gaojiao District, Cangzhou 061001, Hebei Province, China. czyzkkk@yahoo.com.cn

Received: 2007-10-25 Revised: 2008-01-02

Abstract

Research on therapeutic principles of traditional Chinese medicine for liver fibrosis has become increasingly active. The therapy for liver fibrosis has been transformed from merely promoting blood circulation to dispel stasis to different treatment modalities such as softening hardness to resolve harden mass, soothing liver and reinforcing spleen, eliminating heat and removing dampness, detoxification, nourishing kidney and smoothing liver. The core of treatment of liver fibrosis is based on an overall analysis of its symptoms and signs according to the basic theories of traditional Chinese medicine. Related studies on the treatment of liver fibrosis are proposed.

Key Words: Chinese medicine; Liver fibrosis; Therapeutic principle

peutic principle

Chen JR, Chen JH, Hou ZJ. Progress in treatment of liver fibrosis with traditional Chinese medicine. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(3): 289-291

摘要

抗肝纤维化中医治则研究日趋活跃, 其治疗已从过去单纯的活血化瘀发展到软坚散结、舒肝健脾、清热利湿解毒、滋肾柔肝等多样化治则, 认为辨证论治仍是中医治疗肝纤维化的核心, 同时对肝纤维化治疗研究提出相关思路。

关键词: 中医药; 肝纤维化; 治则

陈俊荣, 陈俊红, 侯振江. 抗肝纤维化中医治则的临床研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 289-291

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/289.asp>

0 引言

肝纤维化可见于中医的胁痛、症瘕、积聚、鼓胀等多种病证, 多数医学家认为其病因病机为湿、热、毒、瘀、痰、郁、虚作用于肝经, 使络脉瘀阻, 病变常涉及肝脾肾三脏。近年来, 中医中药在治疗此病方面体现出巨大优势, 肝纤维化中医治则研究取得了可喜的成就, 现就其近年来临床治疗研究进展情况综述如下。

1 活血化瘀、软坚散结

《临证指南医案》云: “初病在气, 久病必入血”。《医学发明》云: “血者, 皆肝之所主, 恶血必归于肝, 不问何经之伤, 必留胁下”。现代医学家^[1-4]认为, 瘀血在肝纤维化发病中起决定性的作用, 并贯穿其发生发展的整个过程, 谨守病机, 从瘀论治是从根本上延缓或逆转肝纤维化的治疗措施。研究表明, 主治瘀血诸证之基本方血府逐瘀汤^[5]可改善慢性乙型肝炎纤维化患者的血清学指标。

肝纤维化迁延日久, 正气日衰, 寒热痰湿之邪与气血相搏, 聚而成形, 结于胁下, 痞块已成。依据“坚者削之”、“结者散之”的原则, 治宜

■背景资料

抗肝纤维化研究已成为肝病研究的热点课题, 其中尤以中医药抗肝纤维化治疗所显示出的多靶点作用引人注目。中医对肝纤维化的治疗是根据患者的具体情况而采用不同的治则治法, 其治疗已从过去单纯的活血化瘀发展到软坚散结、舒肝健脾、清热利湿解毒、滋肾柔肝等多样化治则, 辨证论治是中医治疗肝纤维化的核心。

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科; 刘杞, 教授, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所

■研发前沿

中医治疗肝纤维化由单一的治肝发展到从肝脾肾论治,注重整体调理,联合用药应是其发展的方向。对中药复方、中药量效关系的研究是目前研究重点。借助现代科学技术,寻求适合临床操作的肝纤维化中医分型量化指标,确立规范统一的分型标准,是亟待解决的问题。

■相关报道

胡义扬认为,活血化瘀结合扶正固本为中医药抗肝纤维化的基本治法,中药复方的抗肝纤维化作用多通过多途径药理作用实现,并认为今后研究更要重视:(1)把抗病毒治疗与抗肝纤维化治疗结合以提高疗效;(2)中药抗肝纤维化对远期预后的影响;(3)临床观察中无效病例的规律性分析研究。

渐消缓散^[6-7]、软肝消癥胶囊^[8](田三七、血竭、炙鳖甲等组成)经临床观察可改善肝纤维化四项指标,对肝纤维化的治疗有较好的临床疗效。朱建明^[9]采用活血软坚合剂(丹参、鳖甲、川芎、桃仁、山楂、海藻、牡蛎等组成)治疗慢性乙型肝炎40例,临床观察发现该方对肝纤维化血清学指标有明显改善作用,可改善肝功能和微循环,从而在很大程度上改善肝病患者的预后。

2 舒肝解郁、益气健脾

《临证指南医案》云“治肝之法,无非治用治本”。即治疗肝病当以恢复肝的生理特性为要,治宜舒肝解郁,理气通络,以尊“木郁达之”之旨。肝郁脾虚是慢性肝炎肝硬化的常见类型,常与血瘀一起存在于整个慢性肝病过程中,因而舒肝健脾活血法是肝纤维化基本治则之一^[10]。马列清^[11]临床观察发现逍遥散加减在舒肝解郁的逍遥散基础上加用健脾、活血的药物,在改善症状的同时,改善肝功和纤维化指标。薛霁^{et al}^[12]发现健脾软肝煎对乙型肝炎肝纤维化(肝郁脾虚证)有较好的治疗效果。

《金匱要略》云:“见肝之病,知肝传脾,当先实脾”。乙型肝炎在其肝纤维化过程中常累及于脾,出现脾运失调的病理状态^[13]。晏军^{et al}^[6]治疗肝纤维化强调实脾,一则益气健脾,扶助正气,以治病本;二则俾脾气实,防“土虚木贼”,培土开源,充养先天,顾护后天,有固本驱邪,防病传变之妙。姜学连^{et al}^[14]应用慢肝合剂(黄芪、太子参、当归等组成)治疗慢性乙型肝炎肝纤维化患者,治疗组总有效率为93.3%,结果表明,慢肝合剂可保护肝细胞,减轻炎症坏死,增强肝细胞能量代谢和蛋白质合成,提高机体免疫功能,从而起到抗肝纤维化作用。

3 清热利湿、清化瘀毒

肝木横逆犯脾,脾胃运化失职,痰湿内生,蕴久化热,所以,在肝纤维化发展过程中,往往也表现湿热的病理变化。肝胆湿热与肝内淤胆、肝细胞变性坏死及炎症细胞浸润有关,由于湿热久蕴,湿从热化,继则先伤肝阴,久则耗伤肾阴。故治疗应重视清热利湿的应用^[15]。黄敏华^[16]自拟蛇虎丹七汤(白花蛇舌草、虎杖、茵陈、大黄、丹参、三七等组成)治疗慢性乙型肝炎肝纤维化69例,具有清热利湿、化瘀、解毒退黄的作用。临床观察发现本方能显著改善患者肝功能和临床症状及肝纤维化血清学指标。虎杖清肝汤^[17](由虎杖、苦参、郁金、茯苓等组成),

具有清利肝胆湿热、活血解毒的功效,临床发现该方对慢性乙型肝炎有较好的临床疗效和抗肝纤维化作用。

肝纤维化的病因主要是肝炎病毒感染,而肝炎病毒作为病因与中医的湿热疫毒有相似之处。叶放^{et al}认为肝纤维化的病因病机主要是湿热疫毒入侵,而热毒瘀结是肝纤维化的中心证型,治疗应高度重视清化瘀毒法的运用^[18-19]。临床上许多慢性肝炎肝纤维化的患者,尤其是炎症活动阶段,即可归属于湿热瘀毒证。薛博瑜^[19]曾经运用以清化瘀毒法组方的“肝复净”、“紫七软肝片”、“丙肝宁冲剂”治疗慢性乙型肝炎、丙型肝炎,结果表明上述方药有显著的抗肝纤维化作用。正如柳宝诒曰:“瘀热所为者,必须导去瘀热,俾热邪随瘀而下,庶己病势可转危为安”。

4 滋养肾阴、柔润肝体

五脏所伤,穷必及肾,肝肾不足是慢性肝病发展的必然趋势,中医学认为,“肝肾同源”“肝肾互补”,可以补肾而达养肝的作用。早在《内经》中就有“肾生髓,髓生肝”的论述,明代医家李中梓根据《内经》理论并结合自己的临床实践提出著名的“乙癸同源”、“肝肾同治”的理论观点。许多临床观察表明^[20-24]补肾冲剂(由巴戟天、肉苁蓉、仙灵脾、菟丝子、枸杞子、生地、丹参、青皮、虎杖组成)对慢性肝炎患者具有改善症状、体征,改善肝功能,抑制HBV复制,调控免疫,以及抗肝纤维化等多种效果。

《类政治裁》说“肝为刚脏,职司疏泄,用药不宜刚而宜柔,不宜伐而宜和”。中医学认为,肝主藏血,“体阴而用阳”。李新华^[25]认为,本病的病机实质为各种原因引起的津液亏损,导致水不涵木,肝阴不足,络脉失养,肝脉枯萎。其经验方滋阴养肝汤(熟地黄、山萸肉、枸杞子、麦冬、黄芪、太子参、五味子、当归、白芍药等)治疗慢性乙型肝炎后肝纤维化有较好的临床疗效,总有效率为85%,该方具有较好的改善患者肝功能和抗肝纤维化的作用。中医抗纤维化其他治法还有扶正化瘀^[26]、痰瘀并治^[27-28]活血渗湿^[29]、温阳行水、血水同治^[30]、滋阴潜阳^[31]等。

总之,在整体观念指导下,中医治疗肝纤维化由单一的治肝,发展到从肝脾肾论治,注重整体调理。同时,在肝纤维化的不同阶段,病机重点有所侧重,遵循中医辨证论治原则,其治疗已

从过去单纯的活血发展到益气、软坚、舒肝、健脾、清热、利湿、滋肾、养阴等多样化治则, 且获良效, 体现了辨证论治仍是中医治疗肝纤维化的核心。肝纤维化的机制是复杂的, 与之相应的治则治法也不能有所偏废, 应不拘一格, 积极广泛的探索不同角度的治则治法。

目前, 专门用于肝纤维化的中医分型不多, 混于各种慢性肝病的又分型各异, 分型的混乱使得抗肝纤维化的中医治则总体上有些杂乱, 不利于从中寻找规律, 对于提高临床施治水平带来一定影响。有必要借助现代科学技术, 寻求适合临床操作的肝纤维化中医分型量化指标, 确立规范统一的分型标准, 使治疗用药针对性更强。

4 参考文献

- 1 彭渤. 从瘀论治肝纤维化体会. 江苏中医药 2007; 39: 4
- 2 杨倩, 冯玉彦, 蒋树林. 姚希贤瘀血论治慢性肝纤维化经验. 中华中医药杂志 2007; 22: 168-171
- 3 杜明瑞. 冀爱英教授治疗慢性肝病临床经验. 中医研究 2006; 19: 45-46
- 4 王宝珍, 刘成. 慢性乙型肝炎肝纤维化肝血瘀阻与病理关系的探讨. 中国中医药科技 2003; 10: 65-66
- 5 Ru QJ, Tang ZM, Zhang ZE, Zhu Q. Clinical observation on effect of xuefu zhuyu decoction in treating patients with liver fibrosis caused by chronic hepatitis B. Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi 2004; 24: 983-985
- 6 晏军, 王煦. 王绵之教授治疗肝纤维化经验撷菁. 中医药学刊 2001; 19: 410-411
- 7 贺松其, 张绪富, 蔡红兵. 吕志平教授辨治慢性肝炎肝纤维化经验介绍. 新中医 2005; 37: 16-17
- 8 杨福泰, 周晓燕, 黄巧云, 周莺, 李向东. 软肝消癥胶囊治疗肝炎肝纤维化的临床观察. 中国中医药信息杂志 2003; 10: 10-11
- 9 朱建明. “活血软坚合剂”对肝纤维化血清指标的影响. 江苏中医药 2006; 27: 27-28
- 10 叶放. 肝纤维化病因病机证治指要. 中医药学刊 2002; 20: 339-340
- 11 马列清. 逍遥散加减对乙型病毒性肝炎肝纤维化指标的影响. 北京中医 2002; 21: 285-286
- 12 薛霁, 郑万平, 徐丹. 健脾软肝煎治疗乙肝肝纤维化(肝

- 郁脾虚证)30例疗效观察. 新中医 2005; 37: 44-46
- 13 刘绍能. 乙型肝炎肝纤维化的中医病机研究概况. 中医药信息 2001; 18: 10-12
- 14 姜学连, 靳艳华, 崔银枝, 贾长恩. 慢肝合剂抗肝纤维化的临床研究. 北京中医药大学学报 2003; 26: 65-68
- 15 卢良威. 肝纤维化的治疗研究. 浙江中医学院学报 2001; 25: 3-5
- 16 黄敏华. 蛇虎丹七汤治疗慢性乙型肝炎肝纤维化69例. 浙江中医杂志 2006; 41: 704
- 17 张斌, 王灵台, 陈建杰, 王中华, 赵莹. 虎杖清肝汤治疗慢性乙型肝炎及对肝纤维化形成的影响. 上海中医药大学学报 2007; 21: 37-39
- 18 叶放, 薛博瑜, 周琨, 周仲瑛. 论湿热瘀毒与肝纤维化. 南京中医药大学学报(自然科学版) 2005; 21: 346-349
- 19 薛博瑜. 清化瘀毒法治疗肝纤维化的体会. 江苏中医药 2007; 39: 5
- 20 Ren JY, Wang LT, Lei CD. Comparative study on efficacy of qinggan granule and bushen granule in treating chronic hepatitis C. Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi 2001; 21: 645-648
- 21 张友祥, 王灵台, 陈建杰. 中药补肾冲剂联合拉米夫定治疗慢性乙型肝炎88例. 中西医结合肝病杂志 2003; 13: 112-113
- 22 张盛杰, 陈建杰, 奚骏, 顾正明, 朱丽华. 补肾冲剂治疗慢性乙型肝炎32例. 中西医结合肝病杂志 2005; 15: 366-367
- 23 Chen JJ, Tang BX, Wang LT. Clinical study on effect of bushen granule combined with marine injection in treating chronic hepatitis B of Gan-shen deficiency with damp-heat syndrome type. Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi 2006; 26: 23-27
- 24 高月求, 王灵台, 陈建杰. 补肾冲剂治疗慢性乙型肝炎的临床研究. 上海中医药大学学报 2001; 15: 34-36
- 25 李新华. 滋阴养肝汤治疗慢性乙型肝炎后肝纤维化的临床观察. 上海中医药杂志 2006; 40: 14-15
- 26 Wang ZH. Clinical observation on Chinese herbal medicine treatment of liver cirrhosis caused by chronic severe hepatitis. Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi 2004; 24: 647-648
- 27 刘为民, 姚乃礼. 从痰论治肝纤维化渊藪. 中国医药学报 2003; 18: 21-23
- 28 齐洪军, 胡曼菁. 从“痰瘀”角度浅析肝纤维化的病因病机及治疗. 四川中医 2004; 22: 26-28
- 29 侯宝峰, 寇小妮. 柔肝活血渗湿法治疗慢性乙型肝炎肝纤维化45例. 陕西中医 2007; 28: 9-11
- 30 顾惠芳, 周志武, 周胜生, 白敬羽, 倪才珍, 于忠兴, 陈春华. 软肝胶囊治疗慢性肝炎及抗肝纤维化34例. 江苏中医 2001; 22: 15-16
- 31 杨玉梅. 大定风珠治疗肝纤维化临床观察. 牡丹江医学院学报 2005; 26: 45-46

■同行评价

本文内容丰富, 条理清楚, 结构严谨。

编辑 程剑侠 电编 何基才

重症急性胰腺炎的循证临床进展

唐文富, 万美华

■背景资料

重症急性胰腺炎的传统治疗是在诊治指南指导下进行的经验治疗, 而循证医学的兴起和发展推动了急性胰腺炎循证临床实践的发展, 为重症急性胰腺炎的循证临床实践提供了科学依据。

唐文富, 万美华, 四川大学华西医院中西医结合科 四川省成都市 610041

国家自然科学基金资助课题, No. 30400576

作者贡献分布: 本文由唐文富设计写作, 万美华进行文献检索整理。

通讯作者: 唐文富, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院中西医结合科, wftang900@126.com

电话: 029-33777595

收稿日期: 2007-11-15 修回日期: 2008-01-09

Progress in evidence-based medicine for treatment of severe acute pancreatitis

Wen-Fu Tang, Mei-Hua Wan

Wen-Fu Tang, Mei-Hua Wan, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30400576

Correspondence to: Wen-Fu Tang, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. wftang900@126.com

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

Abstract

Severe acute pancreatitis (SAP) is an abdominal catastrophe with a high morbidity and mortality. Up to now, no special drugs or therapeutic methods are available for SAP. Since evidence-based medicine came into being, much more clinical evidence has provided better choice of treatment for SAP. However, such evidence does not fit for all ASP patients based on its critical inclusion and exclusion criteria. It is, therefore, important to treat ASP patients by combining such evidence with clinical experiences.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Evidence-based medicine; Epidemiology; Antibiotics; Chinese medicine

Tang WF, Wan MH. Progress in evidence-based medicine for treatment of severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 292-298

摘要

重症急性胰腺炎是常见的腹部急症之一, 并

发症多、病死率高而治疗棘手, 尚无特别有效药物和治疗手段。随着循证医学的发展, 越来越多的循证医学证据推动了重症急性胰腺炎的循证临床实践, 为临床治疗提供了更佳选择, 但这些证据所用病例均有严格纳入和排除标准, 不一定适合所有人群, 因此需要将这些循证证据与临床实践经验相结合进行个体化治疗。

关键词: 急性胰腺炎; 循证医学; 流行病学; 抗生素; 中药

唐文富, 万美华, 重症急性胰腺炎的循证临床进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 292-298

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/292.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎病情危重, 进展快而变化多端, 并发症多、病死率高而严重威胁患者生命, 并带来沉重的社会和经济负担^[1-3]。其临床治疗棘手, 多种治疗方法和药物在临床上广泛运用^[4-8], 但尚无特别有效药物和治疗手段^[9-11]。随着循证医学的发展, 急性胰腺炎的循证临床实践受到重视, 越来越多的循证医学证据推动了重症急性胰腺炎的治疗。本文运用已有的循证医学系统评价证据结果进行重症急性胰腺炎的循证临床实践。

1 流行病学

急性胰腺炎的发病率在不同国家和地区明显不同^[12-14]。2005年英国指南报道英国的发病率是百万分之150到420^[15]。而最近的系统评价分析8个来自英国和10个来自其他欧洲国家的研究, 多个研究结果发现很多国家的急性胰腺炎发病率逐渐升高; 但发病率和病因在不同国家之间和同一国家内部有显著差别, 反映了发病危险因素的差异。初发病例的发病率和病死率随年龄而增加, 其疾病病死率随时间而逐渐降低; 胆囊结石性急性胰腺炎在女性中更常见, 酒精性因素在中年男性中更多, 而特发性急性胰腺炎对两性的影响类似。复发性急性胰腺炎病情较

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

轻, 实际病死率也低^[16]。

2 胆石性急性胰腺炎的鉴别诊断

重症急性胰腺炎的常规诊断比较容易^[17-19], 但胆石性与非胆石性急性胰腺炎的鉴别诊断决定不同的临床处理方式, 而胆囊小结石或胆汁淤积在急性胰腺炎早期难以明确分辨。除常规影像学方法外, 临床常用生化指标在鉴别胆结石中的作用也倍受关注。对胆红素、碱性磷酸酶、丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶在评价胆囊结石性胰腺炎的作用进行Meta分析, 结果丙氨酸转氨酶是最有临床意义的参数, 其血清水平值越高, 在诊断胆囊结石性胰腺炎中的特异性和阳性预测价值越大; 当其大于或等于150 IU/L时, 胆囊结石性胰腺炎的可能性是95%。天冬氨酸转氨酶与丙氨酸转氨酶具有类似预测效力, 而胆红素和碱性磷酸酶没有预测价值^[20]。

3 重症急性胰腺炎的治疗

重症急性胰腺炎的临床表现复杂, 病情变化多端, 其治疗药物和方法很多, 临床疗效不一, 而循证医学为这些治疗方法和药物的临床应用提供了科学评价标准。

3.1 抗生素 20世纪70年代在急性胰腺炎患者中进行的前瞻性临床试验结果显示预防性使用抗生素没能改善病死率, 因为该研究选择了本来就不会发生感染和死亡的轻症胰腺炎, 选用的氨苄西林也不能有效地穿透并进入胰腺组织内^[21]。随着动物实验和临床试验的进展而加深了对重症急性胰腺炎病理生理机制的认识, 将其病情发展演变分为全身炎症反应期和感染期^[22-24]。早期的全身炎症反应阶段产生大量的细胞因子和炎症介质, 导致SIRS的发生而引起呼吸、肾脏、肝脏和心血管系统的功能衰竭或者死亡, 而抗生素在这一早期阶段的作用可能不大^[25-27]。严重炎症反应过程中出现胰腺和胰周组织缺血坏死, 肠道内细菌移位导致坏死组织继发感染, 诱发脓毒血症和晚期器官功能衰竭, 增加死亡的风险, 所以抗生素应该在这一阶段使用。

基于上述病理生理基础的前瞻性随机对照临床试验很快见诸报道^[28-30], 认为预防性使用抗生素能降低SAP胰腺感染的发生率, 或降低感染率和病死率, 或者减少胰腺感染、降低手术率和晚期病死率。随后对8个研究报道的系统评价分析认为, 选择能在胰腺组织内达到治疗浓度水平的广谱抗生素能降低病死率, 因此建议重症急性胰腺炎患者应选用此类药物^[31]。由于这些早

期研究的病例数小、纳入标准不一、选用药物和给药方案不一、终点指标不同, 也缺乏正确的安慰剂对照, 因而其结论备受争议^[32]。2001年更新的系统评价对纳入分析的研究进行严格限制, 即只纳入预防性使用抗生素与未使用进行急性坏死性胰腺炎比较的随机对照试验, 且所选用的抗生素在坏死胰腺组织内能达到最低抑菌浓度。与不预防性使用抗生素比较, 结果预防性使用抗生素能降低脓毒血症21.1%(NNT = 5)和病死率12.3%(NNT = 8); 对降低胰腺局部感染有一个没有显著差异的趋势(ARR = 12%; NNT = 8), 因此仍然建议在急性坏死性胰腺炎患者预防性使用那些已经证明对坏死胰腺组织有效的抗生素^[33]。2006年更新后的系统评价纳入6个以重症急性胰腺炎为对象的研究, 均选择那些预防性使用能在胰腺组织内达到有效治疗浓度水平的广谱抗生素, 结果预防性使用不能降低胰腺感染发生率($RR = 0.77$, 95% CI: 0.48-1.24, $P = 0.28$)、手术率($RR = 0.84$, 95% CI: 0.40-1.74, $P = 0.64$)和病死率($RR = 0.54$, 95% CI: 0.28-1.04, $P = 0.07$), 认为预防性使用抗生素不是适用于所有重症患者的治疗策略, 而应该限于CT检查证实有胰腺坏死者^[34]。

但这些试验纳入标准严格, 且没有进行双盲研究。2006年的系统评价从328个研究中纳入了6个实验共187例患者进行分析, 其中3个是多中心试验, 一个是随机、双盲对照试验, 结果发现预防性使用抗生素并不能显著降低感染性坏死发生率、病死率、胰外感染率和手术率, 但却能显著缩短住院时间($P = 0.040$)。认为预防性使用抗生素防止急性坏死性胰腺炎的感染性坏死或死亡^[35]。几乎同时发表的Cochrane系统评价分析抗生素与安慰剂比较在并发胰腺坏死的急性胰腺炎中有效性和安全性, 研究纳入标准是经CT证实有胰腺坏死的急性胰腺炎。其初级终点指标是病死率和胰腺感染率, 次级终点指标是胰外感染率和手术率, 不良反应包括抗生素耐药和真菌感染, 并根据药物不同进行亚组分析。5个试验共294例患者纳入研究, 治疗组的病死率明显降低, 而感染性胰腺坏死、手术率和真菌感染发生率没有明显差别, 可供分析的抗生素耐药相关资料不足。亚组分析发现192例预防性使用 β 内酰胺类能显著降低病死率和感染性胰腺坏死, 但对手术率和胰外感染发生率没影响; 而预防性使用喹诺酮和咪唑类药物对各项指标均没有影响。结果认为预防性使用抗

■ 研发前沿

中西医结合综合治疗治疗急性胰腺炎疗效显著, 但没有符合循证医学要求的证据。因此, 进行随机双盲多中心临床研究获得高质量的循证医学证据成为当务之急。

■相关报道

最近研究报道8个来自英国和10个来自其他欧洲国家的系统评价分析结果显示,很多国家的急性胰腺炎发病率逐渐升高,但发病率和病因在不同国家之间和同一国家内有显著差别,这反映了发病危险因素的差异。

生素似乎能降低病死率,但对感染性胰腺坏死没影响;而 β 内酰胺类能降低病死率和和感染性胰腺坏死发生率,而喹诺酮和咪唑类药物没影响^[36]。

最近发表的系统评价筛选1990-2006年的英文文献,共692篇文章有关抗生素治疗急性胰腺炎的文章中有97篇涉及临床研究,其中10个随机对照临床试验研究了预防性肠道外使用抗生素治疗急性坏死性胰腺炎。使用随机效应模型评价预防性使用抗生素对感染性胰腺坏死和脓毒血症、手术率以及总体病死率的影响,认为坏死性急性胰腺炎应该预防性静脉使用碳青霉烯类抗生素以降低感染性坏死发生率和手术率^[37]。由此分析,虽然经过不同时期、纳入不同等级的试验研究结果进行了多次系统评价,仍然不能得出比较一致的结论。

3.2 生长抑素 是在寻找生长激素释放因子(GRF)的时候意外在羊下丘脑提取液中发现的。1977年诺贝尔生理或医学奖得主Roger Guilemin要求他的博士后研究生Paul Brazeau提取TRF(促甲状腺素释放因子)和LRF(黄体生成素释放因子)以后剩余的的下丘脑提取液中检测有无GRF,结果在1971年意外发现14肽的生长抑素,而没有发现想要的生长激素释放因子;后来发现他也存在于下丘脑以外的脑内其他部位和胃肠胰岛的D细胞中。临床用于治疗包括肢端肥大症^[38],神经内分泌肿瘤^[39]等多种疾病,但不是任何一个疾病的特效药。目前已经进行了大量生长抑素治疗急性胰腺炎的研究,1998年的系统评价同时分析生长抑素、善宁和加贝酯对急性胰腺炎早期和总体病死率、并发症发生率和手术率的影响,结果所有药物对轻症患者没影响;生长抑素和善宁能改善总体病死率;加贝酯对早期和总体病死率没影响,却能减少并发症的发生率^[40]。

1999年发表了全世界范围内唯一的随机双盲多中心实验,设安慰剂组、OCT 100 mg tid组、200 mg tid组,三组的病死率(16%, 15%, 12%)、并发症的新发生率、疼痛持续时间、外科手术干预和住院时间都没有差异^[41]。此后世界范围内的有关临床研究逐年减少,也没有更新的系统评价出现,因而2002年世界胃肠病大会的急性胰腺炎治疗指南和2005年英国指南均不推荐使用生长抑素^[15,42]。到目前为止,生长抑素治疗急性胰腺炎的疗效不确切,国际上人不推荐使用,我们也不鼓励使用。

除此之外,生长抑素治疗可能明显增

加胆囊结石的发生^[43],2006年的文章报道somatostatin能增加Oddi's括约肌的运动力,损伤复发性胰腺炎患者静止期胰液的外流^[44],从而增加复发的可能性;并可能诱发致命的坏死性胰腺炎^[45]。因此建议在条件具备的时候对生长抑素的作用进行全面再评价^[46]。

3.3 酶抑制剂 与生长抑素类似,蛋白酶抑制剂的临床疗效一直受到广泛争议^[47],在临床研究不断更新过程中先后有数个系统评价出现,分析其临床应用价值。1995最早的系统评价纳入5个随机对照试验,选择病死率、并发症发生率和并发症的手术率等终点指标,结果显示加贝酯对急性胰腺炎90 d的病死率没有影响,但能显著降低并发症发生率和并发症的手术率。由于常规使用于所有患者的成本太高,因此建议选择有很高风险发生并发症的患者^[48]。随后一个随机对照多中心试验的结果结合系统评价的结论联合分析,认为加贝酯不能显著改善急性胰腺炎的生存率^[49]。2004年最新的系统评价纳入10个研究,结果发现蛋白酶抑制剂不能降低急性胰腺炎的总体病死率,但能降低中到重度患者的病死率^[50]。

对国产的乌司他丁治疗急性胰腺炎的有效性和安全性进行系统评价时共纳入17个RCT试验1199例患者,虽然显示乌司他丁在改善急性胰腺炎近期临床疗效指标方面优于常规治疗,但因所纳入试验的方法学质量均较低,也无评价远期疗效的试验,还难以对其疗效得出可靠的结论^[51]。

3.4 营养支持 重症急性胰腺炎患者胃肠功能障碍会加重炎症反应和病情,需要进行完全胃肠外和/或肠内营养支持,但营养支持的优选方案、临床疗效和安全方面的观点难以统一。2004年有人比较肠内和肠外营养支持的安全性和对临床结局的影响,6个比较肠内肠外营养的随机对照试验共263例患者纳入分析,结果肠内营养的感染发生率明显降低,也减少了并发症的手术率和住院时间;但对病死率和非感染性并发症的影响不明显。因此建议将肠内营养作为优先的急性胰腺炎常规营养支持方法^[52]。2006年在此基础上纳入前瞻性随及对照试验27个,对其中7个试验的结果分析发现,与肠外营养比较肠内营养能显著降低感染的发生率,缩短住院时间,并有减少器官功能衰竭的趋势;而对病死率没影响。其机制可能是肠内营养降低氧化应激反应,加快病程的缓解过程而费用更

低, 但没有足够数据以证明肠内比不进行营养支持能更改善疾病的最终结局. 对于需要手术治疗并发的急性胰腺炎患者, 肠内营养能降低术后病死率. 在入院24 h内进行肠外营养会加重病情, 而在充分液体复苏后提供肠外营养能改善疾病终点指标. 个别研究发现肠内营养添加精氨酸、谷氨酰胺和 ω -3多不饱和脂肪酸等可能有助于改善预后. 建议肠内营养应该优先使用, 而肠外营养应该在5 d后开始, 且两者都能很好耐受^[53]. 而肠内营养比肠外营养能更好的控制急性胰腺炎患者的血糖水平^[54].

3.5 制酸剂 经常使用制酸剂以保护胃肠黏膜, 抑制胰腺分泌并减少胰液量, 常用的是H2受体拮抗剂, 但很多研究表明这些药物没有明显效果, 虽然也没明显毒副作用. 对285例使用西米替丁的5个急性胰腺炎临床试验纳入分析, 发现他与安慰剂比较没有显著差别, 未能减少胰腺炎相关的并发症和疼痛持续时间; 相反, 西米替丁可能使并发症发生率增加、疼痛加重^[55]. 目前还没有足够证据说明急性胰腺炎的发病与抑酸药之间有确切联系^[56], 虽然有奥美拉唑诱发急性胰腺炎的个案报道^[57], 且体外研究证实他不能直接抑制胰腺腺泡细胞淀粉酶的释放^[58], 但没有系统的临床研究评价其疗效和毒副作用, 因此更需要对临床广泛使用的质子泵抑制剂进行科学评价, 以为临床提供科学的循证依据.

3.6 血小板活化因子拮抗剂 重症急性胰腺炎时有多种细胞因子和炎性介质参与其病理生理过程, 因此针对各种炎症介质的拮抗治疗成为潜在的治疗新靶点, 其中血小板活化因子拮抗剂来昔帕泛的研究较早, 但最后的结果不理想. 截止2001年的系统评价纳入3个研究424例患者, 结果来昔帕泛有降低早期病死率、减少器官衰竭发生率和促进器官衰竭恢复的趋势, 但没有显著差异. 认为仅仅借助当时的研究数据还不能对来昔帕泛治疗急性胰腺炎的疗效做出客观的评价^[59]. 由于临床效果的原因, 他不能降低病死率, 各试验之间由于研究设计和剂量的不同而难以相互比较, 很多研究资料没有公开^[60], 此后没有更大规模的随机对照临床试验发表. 因此, 仅仅通过某一炎症反应环节以调节整个疾病的炎症反应网络、甚至调控全身炎症反应的方法还不可行.

3.7 血液滤过与腹腔灌洗 针对单一环节的方法疗效不理想, 而不分炎性介质种类的清除疾病早期过多细胞因子的血液滤过方法受到重视,

他可能通过对流作用清除炎症因子并调节内环境. 对16个试验共891例患者的系统评价分析后发现, 早期血液滤过能提高总体治愈率, 降低总体病死率、中转手术率和并发症发生率; 持续血液滤过并不能改善预后. 而反复或间歇短时血液滤过无论是否联合腹膜透析治疗, 都能明显改善预后并无不良反应报道. 但由于纳入研究的方法学质量低, 还不能得出合适的结论^[61]. 而与此类似的腹腔灌洗也曾经受到重视, 但对8个试验333例患者的系统评价结果发现, 腹腔灌洗不能显著改善急性胰腺炎的病死率和并发症发生率^[62]. 各种针对已经产生的炎性细胞因子的治疗方法均没有预期的理想结果.

3.8 ERCP治疗胆源性胰腺炎 内窥镜逆行胆管造影和内窥镜括约肌切开术已经广泛用于处理急性胆源性胰腺炎, 但有各种危险并发症. 通过系统评价分析该方法的有效性和安全性, 共7个研究834例患者纳入研究, 结果显示他能显著降低急性胰腺炎的并发症发生率和病死率, 其NNT分别是7.6和25.6, 即治疗26个患者可能挽救一个人的生命^[63]. 但不同熟练程度的操作者面对不同严重程度的患者, 不能完全避免其严重并发症, 或者加重病情的可能, 因此应该慎重选择合适的患者. 而中医药的通里攻下法也有助于胆结石和胆源性胰腺炎的处理.

3.9 中药 上述各种方法都没有理想的效果, 因此国内已经广泛使用我们的传统医学治疗重症急性胰腺炎, 并取得满意临床疗效. 按照循证医学的要求评价中药治疗急性胰腺炎的有效性和安全性, 11个试验658例患者纳入分析, 中药似乎能改善病死率、住院时间和手术率, 但所有试验没有描述随机分配方法, 方法学质量低, 所有结果都没有显著的统计学差异, 也没有足够证据足以推荐单一中药的临床使用. 而需要进行设计良好的随机双盲、安慰剂对照研究以进一步评价中医药治疗急性胰腺炎的疗效和安全性, 促进中医药的临床运用和推广^[64].

4 重症急性胰腺炎病情评价与预后

各种评分系统和预后指标较多, 在重症急性胰腺炎中的作用评价不一. 有关肥胖与急性胰腺炎患者的病情和预后的关系一直不清楚, 相关研究报道也不多. 截止2002文献的系统评价纳入4个研究共607例患者, 终点指标是疾病严重程度、全身并发症、局部并发症和病死率. 结果肥胖患者的病情更重, 全身和局部并发症更多,

■应用要点

本文所提供的循证医学证据为临床治疗提供了更佳选择, 有助于抗生素、生长抑素等药物治疗的选择; 但系统评价所有病例均有严格纳入和排除标准, 不一定适合所有人群. 因此, 要将这些循证证据与临床实践经验相结合进行个体化治疗.

■同行评价

本文对急性胰腺炎的相关问题提供了循证医学的临床进展,有一定的临床指导意义和可读性。

但病死率仅轻度升高,因此认为肥胖应该常规作为急性胰腺炎早期病情严重度的评价之一^[65]。而更新后的系统评价新增一个研究,对5个研究共739例患者的分析结果仍然显示肥胖患者病情更严重,全身和局部并发症发生率高,而病死率也明显高于非肥胖者。说明肥胖不仅是发生并发症的危险因素,也增加疾病的病死率^[66]。

急性胰腺炎早期难以准确评价疾病的严重程度,包括各种细胞因子和炎症介质,如原降钙素在评价急性胰腺炎严重度时,对4个研究的荟萃分析提示他不能作为疾病严重程度的评价指标^[67]。RANSON指标在重症急性胰腺炎病情严重程度的预测、预后分析与临床判断等方面的作用进行分析后发现,在低假阳性率时对临床判断的敏感性比较高;而只有在高假阳性率情况下才显示出有实际意义的敏感性。结果显示RANSON指标的预测效力很差,也无助于不同临床病情的区分判断^[68]。

5 结论

循证医学所得出的证据为临床治疗提供了更佳选择,但系统评价所用病例均有严格纳入和排除标准,不一定适合所有人群^[69],因此要将这些循证证据与临床实践经验相结合进行个体化治疗^[70]。我们根据中医温热病理论,创新性地进行“益气救阴,活血化瘀,清热解毒,通里攻下”的中西医结合综合疗法治疗急性胰腺炎,疗效显著,重症胰腺炎病死率为10.77%,且病例数大(1386例),治疗经验丰富;超过国际同期报道,成为中西医结合治疗重症急性胰腺炎的成功典范,但仍然没有符合循证医学要求的证据,是急需我们进行随机双盲多中心临床研究以获得高质量的循证医学证据,促进临床治疗水平的提高。

6 参考文献

- Haney JC, Pappas TN. Necrotizing pancreatitis: diagnosis and management. *Surg Clin North Am* 2007; 87: 1431-1446
- Bai Y, Liu Y, Jia L, Jiang H, Ji M, Lv N, Huang K, Zou X, Li Y, Tang C, Guo X, Peng X, Fang D, Wang B, Yang B, Wang L, Li Z. Severe acute pancreatitis in China: etiology and mortality in 1976 patients. *Pancreas* 2007; 35: 232-237
- Reber HA. Food, fat, and the inflamed pancreas. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 915-916
- Curtis CS, Kudsk KA. Nutrition support in pancreatitis. *Surg Clin North Am* 2007; 87: 1403-1415, viii
- Testoni PA. Endoscopic pancreatic duct stent placement for inflammatory pancreatic diseases. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5971-5978
- Bai Y, Gao J, Zou DW, Li ZS. Prophylactic antibiotics cannot reduce infected pancreatic necrosis and mortality in acute necrotizing pancreatitis: evidence from a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 104-110
- Canlas KR, Branch MS. Role of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6314-6320
- Besselink MG, Verwer TJ, Schoenmaeckers EJ, Buskens E, Ridwan BU, Visser MR, Nieuwenhuijs VB, Gooszen HG. Timing of surgical intervention in necrotizing pancreatitis. *Arch Surg* 2007; 142: 1194-1201
- Sargen K, Kingsnorth AN. Acute pancreatitis: an overview of emerging pharmacotherapy. *BioDrugs* 1998; 10: 359-371
- Navicharern P, Wesarachawit W, Sriussadaporn S, Pak-art R, Udomsawaengsup S, Nonthasoot B, Chulakadabba A, Tharavej C, Pungpapong SU, Wongsaisuwan M. Management and outcome of severe acute pancreatitis. *J Med Assoc Thai* 2006; 89 Suppl 3: S25-S32
- Pezzilli R, Uomo G, Gabbriellini A, Zerbi A, Frulloni L, De Rai P, Castoldi L, Cavallini G, Di Carlo V. A prospective multicentre survey on the treatment of acute pancreatitis in Italy. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 838-846
- Abu-Eshy SA, Mahfouz AA, Badr A, El Gamal MN, Al-Shehri MY, Salati MI, Rabie ME. Prevalence and risk factors of gallstone disease in a high altitude Saudi population. *East Mediterr Health J* 2007; 13: 794-802
- Hamano H, Arakura N, Muraki T, Ozaki Y, Kiyosawa K, Kawa S. Prevalence and distribution of extrapancreatic lesions complicating autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol* 2006; 41: 1197-1205
- Nydegger A, Heine RG, Ranuh R, Gegati-Levy R, Cramer J, Oliver MR. Changing incidence of acute pancreatitis: 10-year experience at the Royal Children's Hospital, Melbourne. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1313-1316
- UK Working Party on Acute Pancreatitis. UK guidelines for the management of acute pancreatitis. *Gut* 2005; 54 Suppl 3: iii1-9
- Yadav D, Lowenfels AB. Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas* 2006; 33: 323-330
- Bollen TL, van Santvoort HC, Besselink MG, van Es WH, Gooszen HG, van Leeuwen MS. Update on acute pancreatitis: ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging features. *Semin Ultrasound CT MR* 2007; 28: 371-383
- Tanaka S, Mitsui K, Tatsuguchi A, Kobayashi T, Ehara A, Gudis K, Sakamoto C. Current status of double balloon endoscopy--indications, insertion route, sedation, complications, technical matters. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: S30-S33
- Reszetow J, Hać S, Dobrowolski S, Stefaniak T, Wajda Z, Gruca Z, Sledziński Z, Studniarek M. Biliary versus alcohol-related infected pancreatic necrosis: similarities and differences in the follow-up. *Pancreas* 2007; 35: 267-272
- Tenner S, Dubner H, Steinberg W. Predicting gallstone pancreatitis with laboratory parameters: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1863-1866
- Bradley EL 3rd. Antibiotics in acute pancreatitis. Current status and future directions. *Am J Surg* 1989; 158: 472-477; discussion 477-478
- Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory

- mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; 202: 145-156
- 23 Hirota M, Sugita H, Maeda K, Ichibara A, Ogawa M. Concept of SIRS and severe acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2128-2136
 - 24 Shi C, Zhao X, Lagergren A, Sigvardsson M, Wang X, Andersson R. Immune status and inflammatory response differ locally and systemically in severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 472-480
 - 25 Miniello S, Testini M, Amoroso M. Acute pancreatic necrosis complicated by infection and gastrointestinal translocation: pathogenesis correlation and therapeutic implication. *Ann Ital Chir* 2002; 73: 611-617; discussion 617-618
 - 26 Hirata K. Essential therapeutic strategies for acute pancreatitis--guidelines for initial treatment and their significance. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2049-2056
 - 27 Oláh A, Belágyi T, Pótó L, Romics L Jr, Bengmark S. Synbiotic control of inflammation and infection in severe acute pancreatitis: a prospective, randomized, double blind study. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 590-594
 - 28 Pederzoli P, Bassi C, Vesentini S, Campedelli A. A randomized multicenter clinical trial of antibiotic prophylaxis of septic complications in acute necrotizing pancreatitis with imipenem. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176: 480-483
 - 29 Sainio V, Kempainen E, Puolakkainen P, Taavitsainen M, Kivisaari L, Valtonen V, Haapiainen R, Schröder T, Kivilaakso E. Early antibiotic treatment in acute necrotising pancreatitis. *Lancet* 1995; 346: 663-667
 - 30 Luiten EJ, Hop WC, Lange JF, Bruining HA. Controlled clinical trial of selective decontamination for the treatment of severe acute pancreatitis. *Ann Surg* 1995; 222: 57-65
 - 31 Golub R, Siddiqi F, Pohl D. Role of antibiotics in acute pancreatitis: A meta-analysis. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 496-503
 - 32 Howard TJ. As good as it gets: the study of prophylactic antibiotics in severe acute pancreatitis. *Ann Surg* 2007; 245: 684-685
 - 33 Sharma VK, Howden CW. Prophylactic antibiotic administration reduces sepsis and mortality in acute necrotizing pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreas* 2001; 22: 28-31
 - 34 Xiong GS, Wu SM, Wang ZH. Role of prophylactic antibiotic administration in severe acute pancreatitis: a meta-analysis. *Med Princ Pract* 2006; 15: 106-110
 - 35 Mazaki T, Ishii Y, Takayama T. Meta-analysis of prophylactic antibiotic use in acute necrotizing pancreatitis. *Br J Surg* 2006; 93: 674-684
 - 36 Villatoro E, Bassi C, Larvin M. Antibiotic therapy for prophylaxis against infection of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; CD002941
 - 37 Dambrauskas Z, Gulbinas A, Pundzius J, Barauskas G. Meta-analysis of prophylactic parenteral antibiotic use in acute necrotizing pancreatitis. *Medicina (Kaunas)* 2007; 43: 291-300
 - 38 Janson ET. Somatostatin analogs in the treatment of neuroendocrine gastroenteropancreatic and intrathoracic tumors. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 137-140
 - 39 Colao A, Pivonello R, Auriemma RS, Briganti F, Galdiero M, Tortora F, Caranci F, Cirillo S, Lombardi G. Predictors of tumor shrinkage after primary therapy with somatostatin analogs in acromegaly: a prospective study in 99 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 2112-2118
 - 40 Andriulli A, Leandro G, Clemente R, Festa V, Caruso N, Annese V, Lezzi G, Lichino E, Bruno F, Perri F. Meta-analysis of somatostatin, octreotide and gabexate mesilate in the therapy of acute pancreatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 237-245
 - 41 Uhl W, Bährle MW, Malfertheiner P, Beger HG, Adler G, Gaus W. A randomised, double blind, multicentre trial of octreotide in moderate to severe acute pancreatitis. *Gut* 1999; 45: 97-104
 - 42 Tooouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S15-S39
 - 43 Venneman NG, van Erpecum KJ. Gallstone disease: Primary and secondary prevention. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 1063-1073
 - 44 Di Francesco V, Angelini G, Zoico E, Zamboni M, Frulloni L, Cavallini G. Effect of native somatostatin on Sphincter of Oddi motility in patients with acute recurrent pancreatitis. A pilot study with Ultrasound-Secretin test. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 268-271
 - 45 Battaglia M, Ditonno P, Palazzo S, Bettocchi C, Garofalo L, Selvaggi FP. Lethal somatostatin analog-induced acute necrotizing pancreatitis in a patient with hormone-refractory prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol* 2006; 40: 423-425
 - 46 Fantini L, Tomassetti P, Pezzilli R. Management of acute pancreatitis: current knowledge and future perspectives. *World J Emerg Surg* 2006; 1: 16
 - 47 Kitagawa M, Hayakawa T. Antiproteases in the treatment of acute pancreatitis. *JOP* 2007; 8: 518-525
 - 48 Messori A, Rampazzo R, Scroccaro G, Olivato R, Bassi C, Falconi M, Pederzoli P, Martini N. Effectiveness of gabexate mesilate in acute pancreatitis. A metaanalysis. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 734-738
 - 49 Pelagotti F, Cecchi M, Messori A. Use of gabexate mesylate in Italian hospitals: a multicentre observational study. *J Clin Pharm Ther* 2003; 28: 191-196
 - 50 Seta T, Noguchi Y, Shimada T, Shikata S, Fukui T. Treatment of acute pancreatitis with protease inhibitors: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1287-1293
 - 51 杨锦林, 郭震, 吴宗英, 王一平, 曾超. 乌司他丁治疗急性胰腺炎疗效的系统评价. *中国循证医学杂志* 2005; 5: 323-330
 - 52 Marik PE, Zaloga GP. Meta-analysis of parenteral nutrition versus enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *BMJ* 2004; 328: 1407
 - 53 McClave SA, Chang WK, Dhaliwal R, Heyland DK. Nutrition support in acute pancreatitis: a systematic review of the literature. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 143-156
 - 54 Petrov MS, Zagainov VE. Influence of enteral versus parenteral nutrition on blood glucose control in acute pancreatitis: a systematic review. *Clin Nutr* 2007; 26: 514-523
 - 55 Morimoto T, Noguchi Y, Sakai T, Shimbo T, Fukui T. Acute pancreatitis and the role of histamine-2 receptor antagonists: a meta-analysis of randomized controlled trials of cimetidine. *Eur J Gastroenterol*

- Hepatology 2002; 14: 679-686
- 56 Eland IA, Alvarez CH, Stricker BH, Rodríguez LA. The risk of acute pancreatitis associated with acid-suppressing drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 49: 473-478
- 57 Youssef SS, Iskandar SB, Scruggs J, Roy TM. Acute pancreatitis associated with omeprazole. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2005; 43: 558-561
- 58 Cai J, Zhou W, Luo HS, Peng LV. Effect of proton pump inhibitor on amylase release from isolated pancreatic acini. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2007; 43: 25-27
- 59 刘宁, 应明英, 李静. 来昔帕泛治疗急性胰腺炎随机对照试验的系统评价. *中国循证医学杂志* 2003; 3: 108-113
- 60 Abu-Zidan FM, Windsor JA. Lexipafant and acute pancreatitis: a critical appraisal of the clinical trials. *Eur J Surg* 2002; 168: 215-219
- 61 姜坤, 陈心足, 夏庆, 唐文富, 王蕾. 早期血液滤过治疗重症急性胰腺炎的系统评价. *中国循证医学杂志* 2007; 7: 121-134
- 62 Platell C, Cooper D, Hall JC. A meta-analysis of peritoneal lavage for acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 689-693
- 63 Sharma VK, Howden CW. Metaanalysis of randomized controlled trials of endoscopic retrograde cholangiography and endoscopic sphincterotomy for the treatment of acute biliary pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3211-3214
- 64 Qiong W, Yiping W, Jinlin Y, Tao G, Zhen G, Pengcheng Z. Chinese medicinal herbs for acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2005: CD003631
- 65 Martínez J, Sánchez-Pay  J, Palaz n JM, Suazo-Barahona J, Robles-Díaz G, Pérez-Mateo M. Is obesity a risk factor in acute pancreatitis? A meta-analysis. *Pancreatology* 2004; 4: 42-48
- 66 Martínez J, Johnson CD, Sánchez-Pay  J, de Madaria E, Robles-Díaz G, Pérez-Mateo M. Obesity is a definitive risk factor of severity and mortality in acute pancreatitis: an updated meta-analysis. *Pancreatology* 2006; 6: 206-209
- 67 Shafiq N, Malhotra S, Bhasin DK, Rana S, Siddhu S, Pandhi P. Estimating the diagnostic accuracy of procalcitonin as a marker of the severity of acute pancreatitis: a meta-analytic approach. *JOP* 2005; 6: 231-237
- 68 De Bernardinis M, Violi V, Roncoroni L, Boselli AS, Giunta A, Peracchia A. Discriminant power and information content of Ranson's prognostic signs in acute pancreatitis: a meta-analytic study. *Crit Care Med* 1999; 27: 2272-2283
- 69 Heinrich S, Schäfer M, Rousson V, Clavien PA. Evidence-based treatment of acute pancreatitis: a look at established paradigms. *Ann Surg* 2006; 243: 154-168
- 70 De Waele JJ, Hoste E. Current pharmacotherapeutic recommendations for acute pancreatitis. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7: 1017-1025

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.

重症急性胰腺炎并发肺损伤的研究进展

张喜平, 吴承钧, 李志军

张喜平, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006
吴承钧, 李志军, 浙江中医药大学 浙江省杭州市 310053
浙江省中医药卫生科技计划资助项目, No. 2003C130, No. 2004C142
杭州市重大科技发展计划资助项目, No. 2003123B19
杭州市医药卫生重点资助项目, No. 2004Z006
浙江省医药卫生科技计划资助项目, No. 2003B134
杭州市科技计划资助项目, No. 2005224
杭州市医药卫生科技资助项目, No. 2003A004
作者贡献分布: 本文写作由张喜平及吴承钧完成, 张喜平、吴承钧及李志军进行文献整理。
通讯作者: 张喜平, 310006, 浙江省杭州市第一人民医院普外科.
zxp99688@vip.163.com
电话: 0571-87065701
收稿日期: 2007-09-05 修回日期: 2007-12-25

Advances in research of severe acute pancreatitis complicated by lung injury

Xi-Ping Zhang, Cheng-Jun Wu, Zhi-Jun Li

Xi-Ping Zhang, Department of General Surgery, Hangzhou the First People's Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Cheng-Jun Wu, Zhi-Jun Li, Zhejiang Chinese Traditional Medicine University, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China

Supported by: the Technological Foundation Project of Traditional Chinese Medicine Science of Zhejiang province, No. 2003C130 and No. 2004C142; the Grave Foundation Project for Technological and Development of Hangzhou, No. 2003123B19; the Intensive Foundation Project for Technology of Hangzhou, No. 2004Z006; the Foundation Project for Medical Science and Technology of Zhejiang Province, No. 2003B134; the Foundation Project for Technology of Hangzhou, No. 2005224; the Foundation Project for Medical Science and Technology of Hangzhou, No. 2003A004

Correspondence to: Xi-Ping Zhang, MD, Department of General Surgery, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. zxp99688@vip.163.com

Received: 2007-09-05 Revised: 2007-12-25

Abstract

Lung injury is one of the most common complications of severe acute pancreatitis (SAP). At present, the pathogenesis of SAP complicated by lung injury still remains unclear. However, great attention has been paid to it at home and abroad. Many factors such as pancreatic enzyme, polymorphonuclear neutrophil, oxygen free radical, cytokine, microcirculatory disturbance, complement, kinin, NO and ET

play an important role in the pathogenesis of SAP by interacting with each other. This paper reviews the advances in the pathogenesis of SAP complicated by lung injury and related studies in order to provide the theoretical basis for its effective prevention and treatment.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Lung injury; Acute pancreatitis-related lung injury; PLA₂

Zhang XP, Wu CJ, Li ZJ. Advances in research of severe acute pancreatitis complicated by lung injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 299-306

摘要

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)最常见的并发症之一是肺损伤。目前, SAP合并肺损伤的相关机制尚未明确, 国内外学者对其机制的研究非常重视。胰酶、中性粒细胞、氧自由基、细胞因子、微循环障碍、补体系统、激肽、一氧化氮以及内皮素等因素, 通过彼此的相互作用和影响, 在SAP发病机制中起着十分重要的作用。本文阐述SAP并发肺损伤可能的发病机制和有关研究进展, 为制定有效的防治措施提供可靠的理论依据。

关键词: 重症急性胰腺炎; 肺损伤; 急性胰腺炎相关性肺损伤; 磷脂酶A₂

张喜平, 吴承钧, 李志军. 重症急性胰腺炎并发肺损伤的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(3): 299-306

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/299.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)^[1]是以胰腺自身消化为基础和胰腺自身坏死为主要特征的一种全身性疾病, 可以引发局部和全身性过度炎症反应, 造成血管渗出、低血容量、休克和多脏器功能障碍等系统性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)^[2], 甚至导致多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction, MODS)^[3]. 具有病情凶险、病程进展快、并发症多和病死率高等特点^[4-6]. 近几年来, SAP发病率呈上升趋势。相

■背景资料

近年来的研究表明, 重症急性胰腺炎(SAP)具有病情凶险、病程进展快、并发症多和病死率高等特点, 相关研究显示SAP时肺是最早且最易受侵害的脏器。由于其发病机制至今尚未完全明确, 所以缺乏针对性的治疗措施。因此, 详细阐明APALI的可能机制具有重要理论意义和临床价值。

■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

目前有关SAP并发肺损伤的研究主要集中在其发病机制等方面,其中有许多问题有待进一步探讨,如:胰酶的激活、炎症介质激活及其调控在APALI的发生发展中究竟涉及哪些方面;如何改善微循环障碍,降低病情的严重程度;如何运用基因研究、凋亡学说等深入探求相关因子及其产物在发病机制中的作用,将是未来研究的热点。

关研究显示SAP时肺是最早且最易受侵害的脏器,急性胰腺炎相关性肺损伤(acute pancreatitis-associated lung injury, APALI)^[7]和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[8]是最常见的一种早期并发症,但SAP合并肺损伤的发病机制至今仍未完全清楚。本文针对有关研究进展进行综述如下。

1 胰酶、补体系统和激肽

SAP最基本的发病机制是激活的胰酶大量释放逸入胰腺,造成胰腺和胰周器官的损伤,胰蛋白酶、磷脂酶A₂(phospholipases A₂, PLA₂)、弹力蛋白酶、糜蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶等胰酶的释放在SAP时发病时起着非常重要的作用。一般认为PLA₂以无活性的酶原形式从胰腺分泌至胰管,然后经胰蛋白酶和胆盐激活而成为活化的PLA₂。PLA₂一方面可以直接破坏肺血管、肺泡膜,或者介导肺泡巨噬细胞产生NO而致肺损伤;另一方面PLA₂是花生四烯酸降解过程中的关键酶,能够促使血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)、血栓素A₂(thromboxane A₂, TXA₂)和白三烯(leukotriens, LTs)等炎症介质大量释放,提高中性粒细胞表面PAF受体表达,使中性粒细胞活化而致内皮细胞损伤。Leme *et al*^[9]发现应用PLA₂的阻滞剂可改善大鼠APALI,但胰腺本身的炎症程度未能改善。某些实验研究^[7,10]通过向实验动物注射胰蛋白酶及(或)PLA₂可成功复制出APALI模型,可见胰蛋白酶和PLA₂在APALI中的作用较为明显。还有研究也证明胰蛋白酶在APALI中发挥其作用^[11],Hartwig *et al*^[12]通过胆管注射甘氨酸胆酸诱发大鼠SAP模型,研究发现外周血胰蛋白酶原和胰蛋白酶浓度与肺损伤和SAP的严重程度有关。有实验表明将含胰蛋白酶的腹水注射到大鼠体内,可以测得实验组大鼠血浆肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)显著增高,认为胰蛋白酶对相应靶器官的损伤作用是通过刺激巨噬细胞产生细胞因子发挥作用。再次,胰弹力蛋白酶(pancreatitis elastase, PE)在胰液中的浓度较血中高出很多,也是与APALI相关的重要的胰酶之一。Jaffray *et al*^[13]通过腹腔分别注射胰弹力蛋白酶、淀粉酶或脂肪酶等模拟小鼠胰腺炎继发肺损伤的过程,结果显示,胰弹力蛋白酶可以在制模后30-60 min内引起肺内核转录因子- κ B(nuclearfactor- κ B, NF- κ B)的活化、I κ B(inhibitory κ B)的降解,继而出现TNF- α 表达升高和肺微循环通透性增加,而淀粉酶和脂肪酶等无此作用。最后,其他多种酶类与APALI

也有密不可分的联系,包括粒细胞弹性酶和羟基水解酶等均可能参与APALI的病理过程。Cohen *et al*^[14]的研究提示结扎胆胰管阻止胰酶进入肠道可以减轻缺血休克引起的肺损伤和回肠损伤,他们认为胰酶可以和肠道淋巴系统内的毒性物质发生作用,损伤肠道屏障,导致肠道和肺组织损伤加重。以上研究表明在APALI中发挥主要作用的胰酶是胰蛋白酶、弹力蛋白酶和PLA₂,推测APALI时期体内环境中某种因素或几种因素共同发挥作用,从而导致多种胰酶的激活失控或者是某些抑制因子的缺乏或消失。

胰蛋白酶可激活补体经典途径,或直接水解C3和C5而产生C3a和C5a。补体的终末产物被认为是SAP发病的重要调节介质。C3a和C5a可诱导肥大细胞释放组织胺,中性粒细胞通过趋化作用向肺内聚集,促进肺血栓形成。胰蛋白酶可使血管舒缓素原转化为血管舒缓素,后者可使激肽原转化为HMW-激肽原,并进一步生成赖氨酸缓激肽和缓激肽。缓激肽可抑制凝血机制,活化纤溶和补体系统,扩张血管,增加血管通透性,诱导中性粒细胞活化并具有致血压下降的效应。

2 中性粒细胞(PMN)与氧自由基(OFR)

APALI的典型特征包括:微血管通透性的增加,富含蛋白质的渗出液渗入肺泡,肺泡表面张力降低,在这一时期临床上表现为进行性的低氧血症和呼吸困难。越来越多的研究已经表明肺内过度的炎症反应是APALI发生的重要原因之一。中性粒细胞的过度激活在炎症反应和APALI中具有重要的介导作用^[15],具体过程包括:PMN的聚集、黏附和炎症介质的释放。

2.1 PMN的聚集 生理状态下当机体遇到外界病菌入侵时,机体自身的免疫系统就会发挥其作用,大量PMN被激活并通过趋化作用到病菌入侵的部位。不过在免疫系统功能异常时,大量PMN聚集的作用可能适得其反,即损伤自身组织。SAP时可见肺内大量PMN聚集,积聚的PMN可以激活补体系统和巨噬细胞,导致巨噬细胞分泌大量炎症介质,与此同时,这些物质反过来引起肺微血管中PMN的激活,共同引起APALI。活化的巨噬细胞通过释放NO、TNF- α 和单核细胞化学黏附蛋白1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)等因子而发挥生物效应。其中信号分子TNF- α 起关键作用,一定程度地放大了机体炎症系统的反应。

2.2 PMN的黏附 活化的PMN表面的整合素CD11b/CD8 β 复合体与血管内皮细胞表面的细胞

间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)以受体、配体的形式相结合是炎症反应的关键步骤. ICAM-1促进PMN黏附于内皮细胞, 导致其游走. 中性粒细胞-内皮细胞的互相影响、互相作用表现为一种多步级联反应: 最初表现不牢固的黏附, 然后在牢固结合的过程中开始是中性粒细胞的滚动, 在包括L选择素和P选择素等连续活化调节下, 外周血中的PMN通过间隔到达肺间质组织^[16]. CD11/CD18-ICAM-1途径是介导外周血PMN与内皮细胞黏附的主要途径^[17]. ICAM-1是内皮细胞表面诱导蛋白, 正常时肺组织很少表达, 研究发现在SAP动物模型中肺中ICAM-1表达升高, 并且存在严重的肺损伤, 而在ICAM-1缺省的小鼠模型, 肺损伤程度低^[18-19], 说明ICAM-1过高表达是APALI发生的重要因素. 一些研究还发现, ICAM-1等黏附分子的异常表达较细胞因子晚, PMN的浸润和组织、器官的损伤往往发生在ICAM-1上调之后, 所以阻断细胞黏附步骤是治疗中可取的方法, 应该可以有效的缓解APALI的相关临床症状.

2.3 PMN释放炎症介质, 产生病理效应 PMN可分泌多种细胞因子, 从而形成炎症介质网络, 产生放大效应和级联效应, 造成多器官损伤. SAP发生的早期血清中的TNF- α 和IL-6显著升高, 其中IL-6升高水平与胰腺炎严重程度和并发症的发生呈正相关^[20]. PMN经脱颗粒作用, 释放基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)等多种蛋白酶, 在肺组织中进行蛋白分解作用, 引起APALI. MMP可以增加肺微循环的通透性, 易于PMN游走到肺实质^[21], 应用MMP抑制剂可以减轻SAP损伤的程度^[22]. MPO一般存在于PMN的胞质中, 约占细胞干重的5%, MPO的含量可以间接反映中性粒细胞浸润的程度.

2.4 氧自由基 在APALI期间OFR及其产物对于胰腺损伤有着极其重要的作用. 在APALI期间损伤的胰腺细胞, 被激活的PMN以及巨噬细胞产生大量的OFR、过氧化氢、超氧化物、羟基分子和活性氧(reactive oxygen species, ROS)是APALI细胞损伤的重要损伤机制^[23]. OFR可与细胞膜发生氧化反应, 导致大分子变性, 损伤细胞DNA, 抑制PGI₂, 增加TXA₂, 促进EDRF分解, 抑制抗凝血酶的活性. 实验及临床研究已经证实ROS可以导致APALI的胰腺及肺部病灶的细胞代谢紊乱^[24]. 他们不受限于胰腺组织, 可以表现为系统性的疾病症状, 特别是肺、肝和血液

中. ROS直接危及细胞的损伤并且在APALI中控制细胞间的信号转导. ROS还涉及PMN的激活, 细胞因子的产物, 内皮屏障的紊乱以及微循环在APALI的障碍. 除在细胞间的信号转导作用外, ROS还能够影响细胞内的情况并且通过激活NF- κ B来调控活性因子的表达. OFR在SAP时期的产生对于胆固醇、磷脂以及甘油三酯的代谢有影响作用. 这些代谢产物大所不溶于体液而形成脂质蛋白复合物, 我们称之为脂蛋白. 在大多数SAP中高密度脂蛋白的减少和低密度脂蛋白的增加需要留心观察, 脂蛋白的代谢紊乱可能是SAP的一个重要原因^[25]. OFR在实验室诱导的AP中能够促进ICAM-1的表达, ICAM-1的高表达是肺损伤发生的重要步骤, 早期阻止ICAM-1的过度表达可能减轻SAP的损伤程度^[26]. OFR引起的肺部损害几乎涉及肺内所有的细胞和组织, OFR损伤后, I型上皮细胞内有不连续的空泡形成, 而II型上皮细胞尚能保持完整. 肺血管内皮细胞是OFR的主要来源和活性氧的重要作用目标. 减少氧自由基释放, 对于减轻肺损伤可能具有重要意义, 而给予抗氧化剂来作为治疗APALI的方法, 仍然需要进一步的研究.

3 细胞因子

细胞因子在SAP中主要是通过炎症介质网络发挥作用. 致炎细胞因子间的相互作用、抗炎细胞因子间的相互作用以及致炎细胞因子和抗炎细胞因子间的相互消长影响着炎症过程的进展, 细胞因子亦可与信号传导系统相互作用影响着APALI的进程. 细胞因子的特点是一旦某种细胞因子产生并被激活, 就不断激活、扩增自己及其他细胞因子, 出现不断放大的瀑布效应^[27]. 正如Browne *et al*^[28]所提到的那样, 我们希望在不久的将来能够直接找到造成AP的有害因子从而更好地控制APALI.

3.1 TNF- α 是最重要的炎症和免疫反应调节物, 包括发热、恶液质、低血压、弥漫性血管内凝血、组织损伤和休克等局部或全身的表现与他密切相关^[29]. 他是由激活的巨噬细胞或淋巴细胞分泌的, 与其相应受体结合后发挥作用. TNF- α 是SAP发病后较早产生的细胞因子, 有动物实验证实SAP被诱发1 h后, 胰腺组织及血清TNF- α 即可被检测到, 并在其后的6 h内迅速上升, 其升高的程度是与胰腺损伤及炎症程度直接相关联的^[30]. 因此, TNF- α 被作为SAP发病后反映其严重程度的重要的早期指标. 他可激活PMN, 促进多种炎症介质的释放, 在SAP发病及其全身并发症发生过程中

■相关报道

不少临床观察报道以及SAP动物模型的实验性研究, 分析了SAP时肺损伤的一些机制. 马振华 *et al*介绍了APALI时各种因素对肺损伤的影响和可能机制.

■创新盘点

本文在以往SAP并发肺损伤的研究基础上,整理了近几年国内外对APALI发病机制的最新研究成果,阐述了胰酶、PMN的过度激活、微循环障碍以及细胞因子等一系列可能的发病机制,强调了TNF- α 、NF- κ B等对APALI发生发展有重要作用,希望能为更深入的研究APALI发病机制和对APALI的治疗提供参考依据。

起着重要作用。TNF- α 可以增加肺微循环的通透性、促进PMN在肺内的黏附和聚集、诱导中性粒细胞释放NE等。早期检测TNF- α 不仅反映SAP的严重程度,同时有助于预测肺损伤发生及其严重程度。TNF- α 作为重要的始发因子在细胞和亚细胞水平上发生一系列的级联反应,诱导IL-1、IL-6及其自身的产生^[31]。SAP患者的腹水中发现有很高的TNF- α 浓度^[32]。在该类患者的发病早期,肺组织中TNF- α 的表达就达到了显著的水平^[33]。在APALI时对TNF- α 的动态监测可能对于疾病的治疗及预后的判断有一定的帮助。

3.2 IL-1 正常的胰腺组织中并没有发现IL-1, 现代相关研究表明, IL-1中的IL-1 β 亚类与AP关系密切, 在胰腺炎患者中, 实验室检查可以发现IL-1 β 升高, 而且升高幅度与病情的严重程度密切相关。IL-1 β 在生物学活性上, 可以使嗜碱性及中性粒细胞脱颗粒, 并作用于肝脏促进急性期反应蛋白(acute reactive protein, ARP)的合成, 引起发热。IL-1 β 低浓度时主要上调免疫, 产生过多, 则导致多种炎症病损。在有关动物实验中, 应用IL-1拮抗剂及抗体可以延缓病情的发展, 并能降低死亡率30%^[34], IL-1 β 在血清不易检测, 其受体内源性IL-1r可以反应其水平。

3.3 IL-6 由单核细胞、内皮细胞和成纤维细胞等多种细胞产生, 急性胰腺炎发病早期IL-1 β 和TNF- α 可刺激单核细胞和内皮细胞产生IL-6^[35]。特点是调节急性期蛋白的产生, 有研究^[36]提示IL-6是SAP患者合并肺衰竭的重要指标。因此, IL-6对SAP的早期诊断、病情判断和预后评估具有重要的应用价值。

3.4 IL-8 大多数有核细胞均可分泌, 属白细胞的趋化因子超家族。炎症反应时可被LPS、TNF- α 和IL-1 β 激活, 相关实验表明, IL-8可与中性粒细胞表面的特异性受体结合, 导致白细胞发生变形反应、脱颗粒、呼吸爆发、释放蛋白溶解酶和活性氧, 从而引起组织损伤的发生^[37]。Osman *et al*^[38]用单克隆IL-8抗体中和IL-8作用, 结果发现应用IL-8抗体后不能改变胰腺的坏死, 但可通过阻止循环IL-8、TNF- α 和肺组织的黏附分子CD11b和CD18减轻急性肺损伤。

3.5 IL-10 随着胰腺损伤程度和肺损伤程度的加重IL-10水平升高, 两者成正相关^[39]。IL-10是一种有效的抗炎介质, 在AP发生后不久, 免疫抑制性细胞因子IL-10即相应增加, IL-10通过抑制细胞因子mRNA的产生而抑制巨噬细胞产生的TNF- α 、IL-1及氧自由基减轻炎症反应, 尤其在SAP的后

期, 抗炎反应成为主要趋势, 此时期大量的免疫抑制因子如IL-10及TGF-B的释放, 在临床上主要表现为全身和胰腺感染。

4 核因子- κ B(NF- κ B)

他是Rel转录调节蛋白家族成员之一, 是由包括p50、p52、p65、c-Rel和RelB五种亚单位组成的同源或异源二聚体。核因子- κ B是一种多极性细胞转录核因子, 是真核细胞中普遍存在的转录因子, 也是目前发现的细胞内最重要的转录因子之一, 他与机体免疫、炎症和细胞再生、凋亡等过程密切相关。活化的NF- κ B能够调控如TNF- α 、IL-6、IL-8和IL-1 β 等细胞因子以及黏附分子、消化酶等的生成表达, 使这些炎症介质和消化酶一起参与炎症反应和组织损伤, 他的这种作用不仅表现在胰腺的腺泡细胞和单核/巨噬细胞, 同时也表现在肺等远处器官^[40-43]。有实验研究NF- κ B在SAP时的表达在地塞米松的治疗下和模型对照之间有明显的区别, 在SAP初期地塞米松治疗组NF- κ B的表达较模型组明显增高^[44]; 还有研究表明在SAP时期选择性地切断胰腺外分泌细胞中的NF- κ B/RelA基因可以造成APALI, 说明了NF- κ B的调控作用^[45]; Xia *et al*^[46]发现NF- κ B/p65的表达在SAP时有显著改变, 并且这种改变在SAP发病机制中发挥着重要的作用。作者认为NF- κ B与SAP的关系已经受到了人们的关注, 其增加的程度可作为疾病严重程度的指征, 临床上可以早期应用针对NF- κ B的抑制措施来减少细胞因子和炎症介质的释放, 抑制级联效应, 达到改善SAP预后的目的, 从而有效的缓解APALI的严重程度。

5 NO、内皮素(ET)和微循环障碍

左旋精氨酸(L-arg)和分子氧在NO合酶(NOS)的催化下生成。NO可对急性胰腺炎发病的许多相关因素产生影响, 但目前的研究报道结果不一致, NO在AP中的作用可能十分复杂, 甚至具有两面性。现代研究表明NO对于APALI作用的机制可能是高水平NO发挥其自由基性质的细胞毒作用, 加重胰腺损伤; 而合适水平的NO可维持胰腺微循环, 并减轻白细胞-内皮的相互作用等, 对胰腺有保护作用。深入研究NO/NOS在SAP时的相关分子机制及探寻特异性的NOS抑制剂, 以期合理干预L-arg/NO通路, 可能将为SAP的防治提供新的途径。实验研究表明, 在SAP的患者中, 胰腺的血流量和微循环灌注明显减少, 此种

因素的持续存在,也是AP进展为SAP的主要机制之一。

有研究表明^[47-50],MAP、SAP患者血浆ET增高,而SAP患者显著高于MAP患者,提示ET在SAP可能起重要作用,ET是由日本学者Yanagisawa在1988年发现,是迄今为止作用最强的血管活性收缩肽,主要来源于血管内皮细胞,参与机体缺血、缺氧等损伤的病理过程。有人使用外源性ET导致大鼠胰腺微循环损害和胰腺细胞损伤^[51],使大鼠胰腺血流量显著降低^[52],提示ET可引起和加重SAP血循环紊乱,给大鼠一定剂量的外源性内皮素,可使水肿型胰腺炎向出血坏死型转化,胰腺组织损害程度与血浆ET水平呈正相关。相关研究结果显示,ET还可能是一种内源性损伤因子,参与机体诸多器官的损伤和功能衰竭的病理过程。人体内有ET1、ET2、ET3三种异构体,且由不同的染色体的独立基因编码,内皮素的3种异构体ET1、ET2、ET3均与微循环障碍、组织损伤、炎症有关,但其作用的侧重性各有不同。ET3作用不显著,ET2主要介导白细胞依赖性炎症,ET1则主要参与了SAP微循环障碍的发生发展。ET对早期损伤因素非常敏感,是胰腺早期微循环损伤并导致低血流灌注的重要因素之一,也是介导SAP严重程度重要介质。ET对于APALI时期病理损害机制可以归纳为:(1)通过胰腺腺泡内受体,促进钙超载,致组织细胞损伤;(2)激活钙通道促使钙内流,引起胰腺小动脉痉挛;(3)同样机制导致冠脉痉挛,心功能障碍,心脏射血锐减,最终使胰腺供血减少,其中ET对胰腺血流的影响较之对其他脏器更明显。因此,研究ET的拮抗剂可能成为APALI的有效治疗药物。

目前的研究发现,可能是以下几种因素参与了SAP时微循环障碍:一是应激反应,在SAP时由于大量炎症介质的释放及胰腺坏死,机体处于应激状态,此时血液中的去甲肾上腺素、肾上腺素和皮质醇含量明显增高,引起外周血液循环量减少,用以保证重要生命器官的供血,由此导致胰腺的血液供应不足,引起微循环障碍。二是炎症介质的影响,如前所述,SAP时大量炎症介质的释放,其中对微循环产生重要影响的有NO/ET, TXA₂/PGI₂,他们在正常情况下含量保持相对平衡,维持血管张力,SAP时,二者的平衡关系被打破,从而引起胰腺微血管张力的改变,导致微循环障碍。三是血液流变学改变,SAP发生后可见明显的血液流变学改变,表现为红细

胞压积上升,血液黏度上升,红细胞趋向于强烈聚集,变形能力下降,携氧能力明显下降,一次导致胰腺微循环的阻力增大,血液积滞,血栓形成,加重毛细血管内皮及组织细胞坏死,使胰腺炎的病情进一步发生恶化。因此,改善AP时胰腺微循环的障碍,维持血液动力学的稳定,可以有效胰腺坏死的进展,降低病情的严重程度。

6 基因研究、凋亡学说以及其他因素在APALI中的作用

随着科技的不断进步,医学领域对疾病机制的探究也更加深入,基因领域的研究和细胞凋亡学说成为时下研究的热点。目前发现,胰腺炎相关的基因有胰腺炎相关蛋白(PAP)基因、谷氨酰胺合成(GS)基因、胰腺内白细胞介素1 β (IL-1 β)基因和TNF基因、阳离子胰蛋白酶原基因等。此外研究认为抗氧化基因的多态性如谷胱甘肽S转移酶T1基因亚型异常与SAP密切相关^[53]。还有研究表明^[54]IL-1 β 与其受体IL-1RA的比例失调与重症急性胰腺炎密切相关。凋亡(apoptosis)或称细胞程序性死亡,细胞凋亡是机体清除受创后不能恢复细胞的一种自我保护方式。SAP时胰腺细胞凋亡的机制还不清楚。细胞凋亡是由基因控制的,参与凋亡调控的基因由很多种,Bax基因就是一种凋亡调控基因。Fas/FasL系统被认为是一条最主要的介导细胞凋亡的信号传导通路。细胞凋亡可能是对胰腺损伤的有利反应^[55],诱导胰腺细胞凋亡可以减少腺泡内成分为外逸,从而减轻胰腺炎症。通过这种前沿学科的研究来探索困扰我们已久的APALI机制可能找到其关键所在。

脂类递质如LTs、PAF、TXA₂和前列腺素I₂(prostaglandinI₂, PGI₂)等在SAP继发APALI的发生中具有重要作用。LTs和PAF可以引起中性粒细胞的聚集和血管内皮的破坏。应用LTs或PAF抑制剂可以减轻ALI和肺水肿的程度。TXA₂和PGI₂是由细胞膜磷脂在PLA₂催化下产生的。TXA₂具有强烈的血小板聚集作用和血管收缩作用,并能趋化白细胞,使其黏附于血管内皮,释放弹力纤维酶,增加微血管的通透性。PGI₂是一种强烈的血小板聚集抑制剂和血管松弛剂。TXA₂和PGI₂的作用相反,正常情况下两者处于平衡状态。一些学者强调TXA₂、PGI₂的平衡在AP病理改变中的作用。

Gray *et al*^[56]认为革兰氏阴性菌的感染是APALI加重的一个重要因素。约40%的患者合并

■应用要点

掌握SAP并发肺损伤的相关机制,就可采取有效的治疗措施。这是SAP取得突破性进展的关键。从抑制PMN的过度激活、拮抗炎症介质和利用抗炎细胞因子等方面着手治疗都是可能的治疗路径。

■同行评价

本文叙述的各种发病机制应进一步归纳和总结,综述的条理性,可读性有待加强。

细菌感染。神经肽P物质是一种神经递质,也是一种促炎症介质,在炎症过程中通过作用于神经激肽1受体而在APALI发挥效应。游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)的作用,活化的PLA₂、脂肪酶可分解血脂、细胞膜脂质以及胰周肠系膜脂肪组织而产生FFA,通过门静脉、淋巴系统进入人体循环。FFA可损伤内皮细胞和肺泡膜,诱导血栓形成。AP时肝功能受损,血管通透性升高,导致血清白蛋白降低,中和FFA能力不足,使FFA增加。补充新鲜血浆、白蛋白以降低FFA,可能有助于减轻FFA介导的肺损伤。大量输液、手术等也是SAP促成因素。此外,腹水、腹腔巨噬细胞及腹腔淋巴系统亦可能在SAP的炎症扩散过程中发挥作用。还有研究表明^[57], SAP时产生的炎性介质等物质对肝枯夫细胞的刺激,使其激活,合成并释放大量的炎症介质,可能形成“瀑布效应”,是造成炎症反应放大的原因之一。

总之,通过对SAP并发肺损伤发病机制的研究,针对发病的不同环节对相关炎症因子进行的干预应该成为最有取得突破性医学研究成果的途径。随着人们对于APALI的发病机制的不断认识,在控制炎症反应、改善微循环等APALI病因机制研究的基础上,从多角度、多层次、多学科领域进行针对APALI的探索,必定能够帮助我们找到治疗APALI的最佳方法。

7 参考文献

- Zhang XP, Liu DR, Shi Y. Study progress in therapeutic effects of traditional Chinese medicine monomer in severe acute pancreatitis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007; 8: 147-152
- Chan YC, Leung PS. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. *Pancreas* 2007; 34: 1-14
- DiMaggio MJ, DiMaggio EP. New advances in acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 494-501
- Yousaf M, McCallion K, Diamond T. Management of severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2003; 90: 407-420
- Hartwig W, Werner J, Muller CA, Uhl W, Buchler MW. Surgical management of severe pancreatitis including sterile necrosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 429-435
- Abu-Zidan FM, Windsor JA. Lexipafant and acute pancreatitis: a critical appraisal of the clinical trials. *Eur J Surg* 2002; 168: 215-219
- Surbatović M, Jovanović K, Radaković S, Filipović N. Pathophysiological aspects of severe acute pancreatitis-associated lung injury. *Srp Arh Celok Lek* 2005; 133: 76-81
- Luh SP, Chiang CH. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007;

- 8: 60-69
- Leme AS, Lichtenstein A, Arantes-Costa FM, Landucci EC, Martins MA. Acute lung injury in experimental pancreatitis in rats: pulmonary protective effects of crotopotol and N-acetylcysteine. *Shock* 2002; 18: 428-433
- Kiyonari Y, Nishina K, Mikawa K, Maekawa N, Obara H. Lidocaine attenuates acute lung injury induced by a combination of phospholipase A2 and trypsin. *Crit Care Med* 2000; 28: 484-489
- Keck T, Friebe V, Warshaw AL, Antoniu BA, Waneck G, Benz S, Hopt UT, Fernández-del-Castillo C. Pancreatic proteases in serum induce leukocyte-endothelial adhesion and pancreatic microcirculatory failure. *Pancreatolgy* 2005; 5: 241-250
- Hartwig W, Werner J, Jimenez RE, Z'graggen K, Weimann J, Lewandowski KB, Warshaw AL, Fernández-del Castillo C. Trypsin and activation of circulating trypsinogen contribute to pancreatitis-associated lung injury. *Am J Physiol* 1999; 277: G1008-G1016
- Jaffray C, Yang J, Carter G, Mendez C, Norman J. Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery* 2000; 128: 225-231
- Cohen DB, Magnotti LJ, Lu Q, Xu DZ, Berezina TL, Zaets SB, Alvarez C, Machiedo G, Deitch EA. Pancreatic duct ligation reduces lung injury following trauma and hemorrhagic shock. *Ann Surg* 2004; 240: 885-891
- Hać S, Dobosz M, Kaczor JJ, Rzepko R, Aleksandrowicz-Wrona E, Wajda Z, Sledziński Z, Krajewski J. Neutrophil engagement and septic challenge in acute experimental pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6459-6465
- Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998; 114: 1066-1090
- Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101
- Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 1999; 116: 694-701
- Lundberg AH, Granger N, Russell J, Callicutt S, Gaber LW, Kotb M, Sabek O, Gaber AO. Temporal correlation of tumor necrosis factor-alpha release, upregulation of pulmonary ICAM-1 and VCAM-1, neutrophil sequestration, and lung injury in diet-induced pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 248-257
- 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
- Keck T, Balcom JH 4th, Fernández-del Castillo C, Antoniu BA, Warshaw AL. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 188-201
- Muhs BE, Patel S, Yee H, Marcus S, Shamamian P. Inhibition of matrix metalloproteinases

- reduces local and distant organ injury following experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2003; 109: 110-117
- 23 Tadao M, Yuji O. Role of free radicals in the development of severe acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2015-2020
 - 24 Shi C, Andersson R, Zhao X, Wang X. Potential role of reactive oxygen species in pancreatitis-associated multiple organ dysfunction. *Pancreatology* 2005; 5: 492-500
 - 25 Modzelewski B, Janiak A, Hołłyński J. Hyperlipoproteinemia in necrotizing pancreatitis. *Pol Merkur Lekarski* 2005; 18: 415-417
 - 26 Keck T, Werner J, Banafsche R, Stalman A, Schneider L, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Oxygen radicals promote ICAM-1 expression and microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3: 156-163
 - 27 Denham W, Norman J. The potential role of therapeutic cytokine manipulation in acute pancreatitis. *Surg Clin North Am* 1999; 79: 767-781
 - 28 Browne GW, Pitchumoni CS. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7087-7096
 - 29 Alsasser G, Antoniu B, Thayer SP, Warshaw AL, Fernández-del Castillo C. Degradation and inactivation of plasma tumor necrosis factor- α by pancreatic proteases in experimental acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5: 37-43; discussion 43
 - 30 Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000; 190: 117-125
 - 31 Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175: 76-83
 - 32 Denham W, Yang J, Fink G, Denham D, Carter G, Ward K, Norman J. Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. *Gastroenterology* 1997; 113: 1741-1746
 - 33 Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton C, Falkner J, Gower WR, Franz MG. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1783-1788
 - 34 Norman JG, Franz MG, Fink GS, Messina J, Fabri PJ, Gower WR, Carey LC. Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine blockade. *Ann Surg* 1995; 221: 625-631; discussion 631-634
 - 35 Bentrem DJ, Joehl RJ. Pancreas: healing response in critical illness. *Crit Care Med* 2003; 31: S582-S589
 - 36 Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut* 2000; 47: 546-552
 - 37 Seely AJ, Naud JF, Campisi G, Giannias B, Liu S, DiCarlo A, Ferri LE, Pascual JL, Tchervenkov J, Christou NV. Alteration of chemoattractant receptor expression regulates human neutrophil chemotaxis in vivo. *Ann Surg* 2002; 235: 550-559
 - 38 Osman MO, Kristensen JU, Jacobsen NO, Lausten SB, Deleuran B, Deleuran M, Gesser B, Matsushima K, Larsen CG, Jensen SL. A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotizing pancreatitis in rabbits. *Gut* 1998; 43: 232-239
 - 39 林栋栋, 孙家邦, 李非, 张淑文, 崔叶青, 刘大川, 朱斌, 孙海晨, 刘爽. IL-8、IL-10在大鼠急性胰腺炎并发肺损伤中的作用. *首都医科大学学报* 2005; 26: 193-196
 - 40 Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Takács T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* 2008; 57: 259-267
 - 41 Xu P, Zhou XJ, Chen LQ, Chen J, Xie Y, Lv LH, Hou XH. Pioglitazone attenuates the severity of sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1983-1988
 - 42 Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Viña J, López-Rodas G, Sastre J. Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2775-2787
 - 43 Letoha T, Somlai C, Takacs T, Szabolcs A, Jarmay K, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Varga I, Kaszaki J, Krizbai I, Boros I, Duda E, Kusz E, Penke B. A nuclear import inhibitory peptide ameliorates the severity of cholecystokinin-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 990-999
 - 44 Zhang XP, Zhang L, Xu HM, Xu YP, Cheng QH, Wang JM, Shen HP. Application of Tissue Microarrays to Study the Influence of Dexamethasone on NF-kappaB Expression of Pancreas in Rat with Severe Acute Pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2007
 - 45 Algul H, Treiber M, Lesina M, Nakhai H, Saur D, Geisler F, Pfeifer A, Paxian S, Schmid RM. Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *J Clin Invest* 2007; 117: 1490-1501
 - 46 Xia SH, Fang DC, Hu CX, Bi HY, Yang YZ, Di Y. Effect of BN52021 on NFkappa-Bp65 expression in pancreatic tissues of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 882-888
 - 47 穆德广, 李焕章. 扎鲁司特对急性肺损伤防治作用的实验观察. *第四军医大学学报* 2002; 23: 497-500
 - 48 黄宏, 周萍, 刘友生, 陈意生, 蒋建新. PAF拮抗剂 BN50739对大鼠急性肺损伤的作用研究. *第三军医大学学报* 2002; 24: 919-920
 - 49 姜虹, 刘丽娜, 谷玲. 急性胰腺炎患者血浆内皮素与一氧化氮变化及意义. *医师进修杂志(内科版)* 2004; 03: 2
 - 50 Paulino EC, de Souza LJ, Molan NA, Machado MC, Jancar S. Neutrophils from acute pancreatitis patients cause more severe in vitro endothelial damage compared with neutrophils from healthy donors and are differently regulated by endothelins. *Pancreas* 2007; 35: 37-41
 - 51 Plusczyk T, Bersal B, Westermann S, Menger M, Feifel G. ET-1 induces pancreatitis-like microvascular deterioration and acinar cell injury. *J Surg Res* 1999; 85: 301-310
 - 52 袁晟光, 张肇达, 刘续宝, 谭建山. 内皮素在大鼠急性胰腺炎发病中的作用. *中国普外基础与临床杂志* 2000; 7: 150-151
 - 53 Rahman SH, Ibrahim K, Larvin M, Kingsnorth A, McMahon MJ. Association of antioxidant enzyme gene polymorphisms and glutathione status with severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2004; 126: 1312-1322
 - 54 Powell JJ, Fearon KC, Siriwardena AK, Ross JA. Evidence against a role for polymorphisms at tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist gene loci in the regulation of disease severity in acute pancreatitis. *Surgery* 2001;

- 129: 633-640
- 55 张桂信, 陈海龙, 宫爱霞, 张利. 胰腺腺泡细胞凋亡与急性胰腺炎及其治疗策略. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1115-1120
- 56 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
- 57 黎冬暄, 田伏洲, 李红, 李旭, 向珂, 罗皓. 枯否细胞在大鼠重症急性胰腺炎肺损伤中的作用. 中华外科杂志 2005; 43: 159-160

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@wjgnet.com. 谢谢! (世界胃肠病学杂志社 2007-09-30).

血管内皮生长因子165基因对人胃癌细胞凋亡的影响及机制

欧希龙, 关云艳, 颜芳, 孙为豪, 杨柳, 陈国胜

欧希龙, 关云艳, 颜芳, 杨柳, 东南大学附属中大医院消化内科 江苏省南京市 210009

孙为豪, 陈国胜, 南京医科大学第一附属医院老年消化科 江苏省南京市 210029

作者贡献分布: 此课题由欧希龙, 关云艳, 孙为豪及陈宝安设计; 研究过程由欧希龙, 关云艳, 颜芳, 杨柳及陈国胜操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由关云艳及颜芳提供; 数据分析由关云艳完成; 本论文写作由欧希龙, 关云艳及杨柳完成。

通讯作者: 欧希龙, 210009, 江苏省南京市丁家桥87号, 东南大学附属中大医院消化内科, ouxilong@126.com

收稿日期: 2007-09-25 修回日期: 2008-01-10

Effect of vascular endothelial growth factor 165 on apoptosis of human gastric carcinoma cells *in vitro* and its mechanism

Xi-Long Ou, Yun-Yan Guan, Fang Yan, Wei-Hao Sun, Liu Yang, Guo-Sheng Chen

Xi-Long Ou, Yun-Yan Guan, Fang Yan, Liu Yang, Department of Gastroenterology, Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University Clinical Medical College, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Wei-Hao Sun, Guo-Sheng Chen, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xi-Long Ou, Department of Gastroenterology, Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University Clinical Medical College, 87 Dingjia Bridge, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. ouxilong@126.com

Received: 2007-09-25 Revised: 2008-01-10

Abstract

AIM: To investigate the effect of vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165) on apoptosis of human gastric adenocarcinoma cell line (BGC-823) *in vitro* and its underlying mechanism

METHODS: BGC-823 cells were divided into control group, Ad-GFP group and Ad-VEGF165 group and cultured with GFP (MOI = 20) and Ad-VEGF165. Apoptotic cells were detected by FCM assay. Expression of Bcl-2 mRNA and Bcl-2 protein was determined by RT-PCR and immunocytochemistry, respectively.

RESULTS: FCM showed that the apoptosis rate of BGC-823 cells was significantly lower in the

Ad-VEGF165 group than in the Ad-GFP and control groups ($4.6\% \pm 0.31\%$ vs $8.37\% \pm 1.06\%$, $7.73\% \pm 0.86\%$, $P < 0.01$). PCR and immunocytochemistry displayed that VEGF165-transfected BGC-823 increased the expression of Bcl-2 mRNA and Bcl-2 protein, which was higher in the Ad-VEGF165 group than in the control and Ad-GFP groups (Bcl-2 mRNA: 0.761 ± 0.05 vs 0.363 ± 0.12 , 0.356 ± 0.08 ; Bcl-2 protein: 1.010 ± 0.08 vs 0.865 ± 0.07 , 0.901 ± 0.05 ; $P < 0.01$).

CONCLUSION: VEGF165 can inhibit cell apoptosis induced by serum starvation by up-regulating the expression of Bcl-2.

Key Words: Adenovirus; Vascular endothelial growth factor 165; Gastric carcinoma; Apoptosis; Bcl-2; RT-PCR

Ou XL, Guan YY, Yan F, Sun WH, Yang L, Chen GS. Effect of vascular endothelial growth factor 165 on apoptosis of human gastric carcinoma cells *in vitro* and its mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 307-310

摘要

目的: 本实验探讨血管内皮生长因子165(VEGF165)对体外培养的胃癌细胞株BGC-823凋亡的影响和机制。

方法: 将BGC-823细胞分为对照组、感染复数(MOI = 20)病毒Ad-GFP的Ad-GFP组, 重组腺病毒Ad-VEGF165转染的Ad-VEGF165组, 应用流式细胞仪检测细胞凋亡的百分率, RT-PCR方法检测凋亡抑制基因Bcl-2 mRNA的表达, 免疫细胞化学方法检测Bcl-2蛋白的表达情况。

结果: 流式细胞仪测定显示Ad-VEGF165组的细胞凋亡率明显低于Ad-GFP组和对照组 ($4.6\% \pm 0.31\%$ vs $8.37\% \pm 1.06\%$, $7.73\% \pm 0.86\%$, $P < 0.01$); RT-PCR和细胞免疫化学结果显示VEGF165转染BGC-823细胞后促进了细胞Bcl-2 mRNA和蛋白的表达, Ad-VEGF165组Bcl-2 mRNA和蛋白均高于对照组和Ad-GFP组(Bcl-2 mRNA: 0.761 ± 0.05 vs 0.363 ± 0.12 , 0.356 ± 0.08 ; Bcl-2蛋白: 1.010 ± 0.08 vs 0.865 ± 0.07 , 0.901 ± 0.05 ; $P < 0.01$)。

结论: VEGF165通过上调凋亡抑制基因Bcl-2

■背景资料

血管内皮细胞生长因子(VEGF)在肿瘤的发生、发展中扮演着重要的角色, 以往的研究主要是集中在其对肿瘤血管生成上, 随着研究的深入, 人们发现在多种肿瘤细胞上都有VEGF受体的表达, 推测VEGF在促进肿瘤血管生成的同时, 还可能直接作用于肿瘤细胞, 从而促进肿瘤的生长和抑制凋亡。

■同行评议者

冯志杰, 教授, 河北医科大学第二医院; 胡和平, 教授, 第二军医大学附属东方肝胆医院消化科

■创新盘点

本文以复制缺陷性腺病毒作为载体构建Ad-VEGF, 体外转染人胃癌细胞株BGC-823, 研究其对BGC-823凋亡的影响以及可能的机制, 这对于未来肿瘤的治疗可能是一个新的研究方向。

及其蛋白的表达, 来抑制血浆饥饿诱导的胃癌细胞的凋亡。

关键词: 腺病毒; 血管内皮生长因子165; 胃癌; 凋亡; Bcl-2; 逆转录聚合酶链式反应

欧希龙, 关云艳, 颜芳, 孙为豪, 杨柳, 陈国胜. 血管内皮生长因子165基因对人胃癌细胞凋亡的影响及机制. 世界华人消化杂志. 2008; 16(3): 307-310

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/307.asp>

0 引言

尽管血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的发现距今已有很多年, 但人们对他的功能并未了解透彻. 最初人们仅仅把他看作是促血管形成因子, 认为具有促血管生成和增加血管通透性的功能. 后来逐渐认识到他还有其他功能, 如在多种肿瘤细胞上发现了他的受体, 该受体可介导VEGF对这些细胞产生促生存及增加其耐药性的作用等^[1]. 为了进一步明确其体外作用, 我们将腺病毒重组体Ad-VEGF165转染至体外培养的胃癌细胞株BGC-823, 观察其对凋亡的影响, 并探讨可能存在的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃腺癌细胞株BGC-823购自中科院, 复制缺陷型腺病毒重组体及对照病毒由南京医科大学第一附属医院构建^[2]并赠送, RPMI 1640低糖培养基、胎牛血清均购自美国Gibco公司, Annexin V-FITC/PI试剂盒为澳大利亚Bender Medsystems公司产品, RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司, 焦碳酸二乙酯(DEPC)水、溴化乙锭(EB)、TRIzol试剂均购自Sigma公司, DNA小分子量marker为北京天为时代公司生产, 引物由南京英俊生物工程技术服务有限公司合成, Bcl-2鼠抗人单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术公司, 免疫组化S-P试剂盒(SP-9000)为福州迈新公司产品, DAB显色试剂盒购自美国Vector Laboratories公司。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞仪检测细胞凋亡: 取对数生长期的BGC-823细胞, 消化后计数并调整培养液用量, 使细胞悬液终浓度为 $2.0 \times 10^5/L$, 分别取3 mL接种于四个培养瓶(50 mL)中, 待生长至70%融合后, 阴性对照组和对照组均用无血清培养基培养, 实验组分别用Ad-GFP、Ad-VEGF165转染(感染复数与前期实验相同取MOI = 20), 8 h后继续用无血清培养基培养, 36 h后收集 1.0×10^6 个细胞, 离心后用PBS冲洗两次. 然后先后加

入Annexin V-FITC和PI, 1 h内上机检测细胞的凋亡率, 实验重复3次。

1.2.2 RT-PCR方法检测Bcl-2 mRNA的表达: 实验分为对照组、Ad-GFP组和Ad-VEGF165组, 按前述方法培养及感染细胞后加入1 mL TRIzol reagent提取总RNA, 然后进行逆转录(体系为20 μL), 反应混合物于42℃温育30 min后, 升温至99℃加热5 min使逆转录酶灭活, 并使DNA、RNA杂合分子变性解离, 立即降至5℃冷却5 min. 再行半定量PCR, 引物已在GenBank中核实. Bcl-2上游引物: 5'-GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA-3', 下游引物: 5'-AGGCACCCAGGGTGATGCAA-3', 扩增片段长度304 bp; β -actin内参的扩增长度为661 bp, 其上游引物: 5'-TGACGGGGTACCCCACTGTGCCCATCTA-3', 下游引物: 5'-CTAGAA GCATTGCGGTGGACGATGCAGGG-3'. 反应体系如下: cDNA 3 μL , $5 \times$ PCR Buffer 5 μL , $MgCl_2$ 1 μL , Bcl-2、 β -actin上下游引物各0.5 μL , Taq(DNA聚合酶)0.25 μL , 灭菌蒸馏水13.75 μL . 反应条件: 98℃预变性30 s, 98℃变性10 s, 54℃复性10 s, 72℃延伸30 s, 30个循环后再于72℃延伸8 min. PCR产物立即进行电泳, 用ImageMaster VDS扫描分析仪扫描凝胶图谱, 采用Total Lab2.0分析系统(Nonlinear Dynamics Ltd.)对PCR产物进行半定量分析, 测量区带密度, 计算样品的目的区带与内参区带的密度比, 实验重复3次。

1.2.3 免疫细胞化学检测细胞Bcl-2蛋白的表达: 用底部有小玻片的6孔板接种细胞, 使细胞悬液终浓度为 $1.0 \times 10^5/L$, 每孔2 mL细胞悬液, 置孵育箱中培养. 感染复数和感染时间同前. 取出小玻片后固定, 然后以3% H_2O_2 消除内源性过氧化物酶的活性, 以微波进行抗原修复, 滴加正常山羊血清工作液后加入一抗(1:100), 4℃过夜后分别滴生物素标记的二抗工作液和辣根酶标记链酶卵白素工作液, 最后以DAB显色、苏木素复染. PBS替代一抗作阴性对照。

1.2.4 判断标准: 胞质和/或胞膜见黄色或棕黄色颗粒为阳性. 然后采用计算机图像分析软件Image-Proplus 4.5对阳性表达进行原位定量检测, 每张玻片随机选取5个视野, 自动选取阳性部位并计算平均吸光度值(A), 计算5个视野的平均值作为该片的代表值。

统计学处理 实验结果中计量资料以mean \pm SD表示, 均数间比较采用t检验. 所有数据均采用SAS 8.2统计软件进行分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

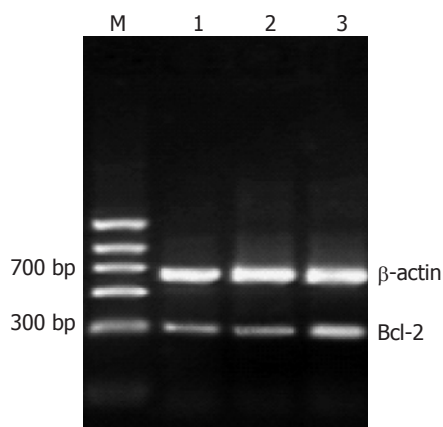


图 1 不同处理组中BGC-823细胞Bcl-2 mRNA的表达. M: DNA marker; 1: 对照组; 2: Ad-GFP组; 3: Ad-VEGF165组.

2 结果

2.1 流式细胞仪检测细胞凋亡率 血浆饥饿诱导的细胞凋亡率(%)在Ad-VEGF165组和对照组的比较(4.60 ± 0.31 vs 7.73 ± 0.86)以及在Ad-VEGF165组和Ad-GFP组的比较(4.60 ± 0.31 vs 8.37 ± 1.06)均有显著性差异($P < 0.01$), 而对照组与Ad-GFP组相比, 两组细胞凋亡率的差异无统计学意义, 提示VEGF165具有抑制血浆饥饿所诱导BGC-823细胞凋亡的作用, 而GFP对BGC-823细胞的凋亡没有影响.

2.2 BGC-823细胞Bcl-2 mRNA的表达 对照组与Ad-GFP组相比(0.363 ± 0.12 vs 0.356 ± 0.08), 两组细胞中Bcl-2 mRNA表达的差异无统计学意义, 而对照组与Ad-VEGF165组相比(0.363 ± 0.12 vs 0.761 ± 0.05)以及Ad-GFP组与Ad-VEGF165组相比(0.356 ± 0.08 vs 0.761 ± 0.05), 有显著性差异($P < 0.01$), 提示VEGF165转染入体外培养的BGC-823细胞后促进了该细胞Bcl-2 mRNA的表达, 而GFP对BGC-823细胞Bcl-2 mRNA的表达没有影响(图1).

2.3 Bcl-2蛋白在BGC-823细胞中的表达 阴性对照无阳性染色. 细胞质和细胞膜染成棕黄色的细胞为Bcl-2阳性细胞(图2). 在对照组和Ad-GFP组中, 可见大部分细胞的胞质、胞膜上有阳性着色, 但染色强度中等, 此两组间A值比较(0.865 ± 0.07 vs 0.901 ± 0.05), 差异无统计学意义. Ad-VEGF165组中阳性细胞接近100%, 染色强度高, 其A值为 1.010 ± 0.08 , 与前两组比较有统计学意义($P < 0.05$), 说明Ad-VEGF165转染BGC-823细胞后上调了该细胞的Bcl-2蛋白的表达.

3 讨论

VEGF促进肿瘤生长和转移的作用已得到公认,

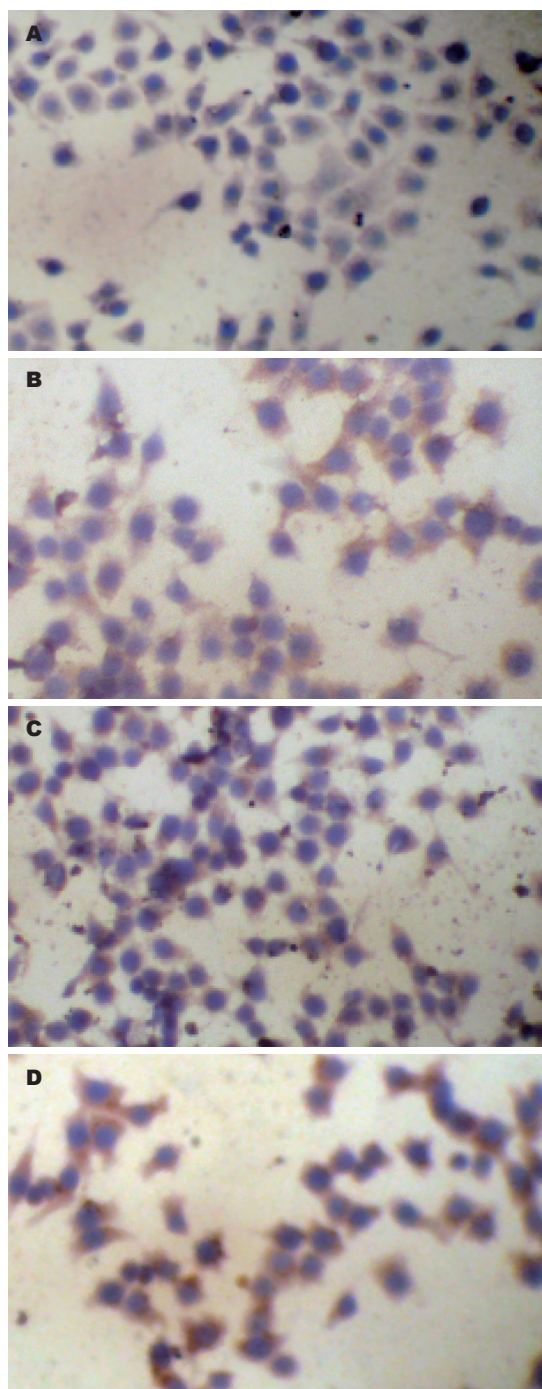


图 2 Bcl-2蛋白在BGC-823细胞的表达($\times 200$). A: 阴性对照; B: 对照组; C: Ad-GFP组; D: Ad-VEGF165组.

但以往认为这一作用是通过VEGF与血管内皮细胞上的受体结合, 促进血管的增殖、增加其通透性以及抑制内皮细胞凋亡而实现的^[3]. 有实验显示内皮细胞中高表达的VEGF可诱导和促进Bcl-2和survivin等凋亡抑制基因的高表达, 从而抑制了内皮细胞的凋亡^[4-6]. 而近年来在有些肿瘤细胞如肺癌^[7]、前列腺癌^[8]、膀胱癌^[9]、乳腺癌^[10]及结肠癌^[11]等细胞上发现有其受体的表达, 并证实VEGF可通过这些受体发挥生物学效应.

■应用要点

VEGF165通过上调凋亡抑制基因Bcl-2及其蛋白的表达, 来抑制血浆饥饿诱导的胃癌细胞的凋亡, 为未来肿瘤治疗提供了一个新的研究方向.

■同行评价

本研究设计合理,方法先进,具有一定的科学性。

Krause *et al*^[12]将VEGF反义寡核苷酸VEGF857转染至体外培养的移行细胞癌的癌细胞中,结果降低了细胞增殖活性,促进了凋亡,这一功能是抑制了VEGF的表达所致,也说明VEGF对肿瘤细胞有直接的作用。但也有实验显示将反义VEGF-RNA转染体外培养的肝癌细胞对细胞的增殖和凋亡没有影响,而在裸鼠体内则抑制了肿瘤的生长及促进了细胞的凋亡^[13]。我们在前期实验中已将腺病毒重组体Ad-VEGF165进行扩增、纯化后转染胃癌细胞株BGC-823,并证实其对胃癌细胞的促增殖作用。而目前已知,肿瘤的发生除与细胞无限增殖有关外,还与细胞凋亡减少有关,细胞凋亡能力的下降是肿瘤具有无限生长能力的另一重要原因。我们以适当的感染复数转染BGC-823细胞,并利用血浆饥饿方法诱导细胞凋亡,然后应用流式细胞仪检测凋亡细胞百分率的变化情况。结果显示Ad-VEGF165组细胞的凋亡率明显低于Ad-GFP组及对照组,而后两组之间比较无统计学意义,说明VEGF165能够抑制血浆饥饿所诱导的BGC-823细胞的凋亡。

为了进一步研究VEGF165抑制凋亡的机制,我们也检测了基因转染后Bcl-2表达的变化情况。Bcl-2基因家族是对细胞凋亡起调控作用的主要因子,Bcl-2是家族中最主要的成员,一直被认为是细胞凋亡重要的抑制基因^[14]。在凋亡信号转导的过程中,通常认为Bcl-2的作用在Caspase-3的上游,通过抑制Caspase-3的激活而发挥作用^[15]。Xu *et al*^[16]检测了慢性活动性胃炎、胃溃疡、中度不典型增生、重度不典型增生、早期胃癌及进展期胃癌患者的细胞凋亡指数及Bcl-2蛋白的表达情况,结果显示当胃黏膜发生不典型增生时Bcl-2的表达就明显增加,在胃癌早期阶段达到高峰,而在进展期该蛋白表达又有下降,因而认为Bcl-2在胃癌的发生及早期的发展过程中发挥了重要作用。我们的研究证实,Ad-VEGF165转染BGC-823细胞后可上调Bcl-2 mRNA和Bcl-2蛋白的表达,因而认为VEGF165可通过上调Bcl-2的表达而抑制胃癌细胞的凋亡。

4 参考文献

- 1 Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005; 9: 777-794
- 2 周磊, 张馥敏, 杨志健, 陆丽, 丁兆丰, 丁必森, 哈团柱, 李传富, 高翔, 马文珠. 人血管生成素-1和血管内皮生长因子₁₆₅基因克隆及复制缺陷型腺病毒载体构建. *中华心血管病杂志* 2003; 31: 699
- 3 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and

other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257

- 4 Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer* 2001; 85: 273-278
- 5 Katoh O, Takahashi T, Oguri T, Kuramoto K, Mihara K, Kobayashi M, Hirata S, Watanabe H. Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor. *Cancer Res* 1998; 58: 5565-5569
- 6 盛世乐, 黄钢. VEGF上调survivin和bcl-2表达及抑制乳腺癌细胞凋亡的机制探讨. *肿瘤* 2005; 25: 525-529
- 7 Zhang G, Zhao M, Xu M, Yang Y, Wang M, Yang C. Correlation of angiogenesis with expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in lung carcinoma. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2002; 25: 89-93
- 8 Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, Ricciardelli C, Stahl J, Choong C, Horsfall DJ, Tilley WD. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 854-859
- 9 Wu W, Shu X, Hovsepian H, Mosteller RD, Broek D. VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors. *Oncogene* 2003; 22: 3361-3370
- 10 Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D, Poli A. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res Vet Sci* 2006; 81: 350-357
- 11 Stewart M, Turley H, Cook N, Pezzella F, Pillai G, Ogilvie D, Cartlidge S, Paterson D, Copley C, Kendrew J, Barnes C, Harris AL, Gatter KC. The angiogenic receptor KDR is widely distributed in human tissues and tumours and relocates intracellularly on phosphorylation. An immunohistochemical study. *Histopathology* 2003; 43: 33-39
- 12 Krause S, Forster Y, Kraemer K, Fuessel S, Kotzsch M, Schmidt U, Wirth MP, Meye A, Schwenzer B. Vascular endothelial growth factor antisense pretreatment of bladder cancer cells significantly enhances the cytotoxicity of mitomycin C, gemcitabine and Cisplatin. *J Urol* 2005; 174: 328-331
- 13 Hao JH, Yu M, Li HK, Shi YR, Li Q, Hao XS. Inhibitory effect of antisense vascular endothelial growth factor RNA on the profile of hepatocellular carcinoma cell line in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1140-1143
- 14 Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998; 391: 496-499
- 15 Shi LG, Zhang GP, Jin HM. Inhibition of microvascular endothelial cell apoptosis by angiopoietin-1 and the involvement of cytochrome C. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 725-730
- 16 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 403-406

编辑 李军亮 电编 何基才

www.wjgnet.com

微米大黄炭对大鼠血小板功能和纤溶活性的影响

时昭红, 张书, 郝建军, 王日权

时昭红, 张书, 郝建军, 武汉市第一医院消化内科 湖北省武汉市 430022

王日权, 湖北中医学院中医系 湖北省武汉市 430061

作者贡献分布: 时昭红与张书对此文所作贡献均等; 此课题由时昭红, 张书, 郝建军及王日权设计; 研究过程由时昭红, 张书及王日权操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张书, 王日权提供; 数据分析由张书, 王日权完成; 本论文写作由时昭红, 张书, 郝建军及王日权完成。

通讯作者: 时昭红, 430022, 湖北省武汉市中山大道215号, 武汉市第一医院消化内科. zhaohshi@sohu.com

电话: 027-85855908-428

收稿日期: 2007-08-20 修回日期: 2007-11-23

Effects of micron rhubarb charcoal on the platelet function and fibrinolytic activity in rats

Zhao-Hong Shi, Shu Zhang, Jian-Jun Hao, Ri-Quan Wang

Zhao-Hong Shi, Shu Zhang, Jian-Jun Hao, Department of Gastroenterology, Wuhan the First Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Ri-Quan Wang, Hubei Provincial Traditional Chinese Medicine College, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Correspondence to: Zhao-Hong Shi, Department of Gastroenterology, Wuhan the First Hospital, 215 Zhongshan Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. zhaohshi@sohu.com

Received: 2007-08-20 Revised: 2007-11-23

Abstract

AIM: To study the effects of micron rhubarb charcoal on platelet function and fibrinolytic activity in rats.

METHODS: SD rats were divided into control group, Yunan Baiyao group [0.9 g/(100 g·d)] and high [0.8 g/(100 g·d)], normal [0.4 g/(100 g·d)] and low [0.2 g/(100 g·d)] micron rhubarb charcoal dosage groups (ig for six days). The effects of micron rhubarb charcoal on platelet aggregation, TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} and the activity of tissue fibrinolytic activating factor (t-PA) and its inhibitors (PAI-1) in SD rats were studied.

RESULTS: Compared with normal rats treated with Yunan Baiyao, the platelet aggregation and TXB₂ level were increased while the 6-keto-PGF_{1α} level was decreased in rats treated with

micron rhubarb charcoal ($P<0.05$), suggesting that high micron rhubarb charcoal dosage had a better effect than Yunan Baiyao on platelet function and fibrinolytic activity in rats ($64.19\% \pm 8.79\%$ vs $56.82\% \pm 4.78\%$, 273.35 ± 24.86 ng/L vs 238.35 ± 47.30 ng/L, 15.21 ± 2.71 μg/L vs 13.12 ± 3.09 μg/L, $P<0.05$). However, micron rhubarb charcoal had no effect on the activity of t-PA and its inhibitor PAI.

CONCLUSION: Micron rhubarb charcoal regulates platelet aggregation by decreasing the level of TXB₂ and 6-Keto-PGF_{1α} and its effects on hemostasis are better than Yunan Baiyao.

Key Words: Micron rhubarb charcoal; Platelet aggregation; TXB₂; 6-keto-PGF_{1α}; Fibrinolytic activity; ELISA

Shi ZH, Zhang S, Hao JJ, Wang RQ. Effects of micron rhubarb charcoal on the platelet function and fibrinolytic activity in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 311-313

摘要

目的: 研究微米大黄炭对大鼠血小板功能和纤溶活性的影响。

方法: 以SD大鼠为研究对象, 将其分为微米大黄炭大[0.8 g/(100 g·d)]、中[0.4 g/(100 g·d)]、小剂量组[0.2 g/(100 g·d)], 阳性对照组云南白药[0.9 g/(100 g·d)]和空白对照组5组, 给药6 d, 测定大鼠血小板聚集性, 血栓素B₂(TXB₂)和6-酮前列腺素F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})的含量, 并测定大鼠组织型纤溶酶原激活物(t-PA)及其抑制剂(PAI-1)活性。

结果: 微米大黄炭能够明显提高血小板聚集性和TXB₂水平, 而下调6-keto-PGF_{1α}水平, 较空白对照组有统计学意义, 而微米大黄炭大剂量组作用优于云南白药($64.19\% \pm 8.79\%$ vs $56.82\% \pm 4.78\%$, 273.35 ± 24.86 ng/L vs 238.35 ± 47.30 ng/L, 15.21 ± 2.71 μg/L vs 13.12 ± 3.09 μg/L, $P<0.05$); 微米大黄炭各剂量组对t-PA和PAI-1活性无明显影响。

■背景资料

上消化道出血是临床常见病和多发病, 同时也是内科急重症之一。发病率成年人中大约为1/1000, 占内科住院患者数的2.43%, 其死亡率约为8%-14%, 而由消化性溃疡引起的出血占40%-50%, 因此研究一种行之有效的止血方法、止血药物是治疗消化性溃疡出血患者的迫切需要。

■研发前沿

戴冬秋, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

■研发前沿

目前西药治疗消化性溃疡出血已经发展到一个新的水平,各种新的药物和方法不断出现,传统的内科静脉给药疗效差、止血慢、费用高。近年来,临床和实验研究表明,中医药对消化性溃疡出血等疾病的治疗具有很大潜力。

结论:微米大黄炭可能通过影响TXB₂和6-keto-PGF_{1α}的含量来实现对血小板活化作用的调节。

关键词:微米大黄炭;血小板聚集率;血栓素B₂;6-酮前列腺素F_{1α};纤溶活性;酶联免疫吸附双抗体夹心法

时昭红, 张书, 郝建军, 王曰权, 微米大黄炭对大鼠血小板功能和纤溶活性的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 311-313
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/311.asp>

0 引言

微米大黄炭是采用现代微米技术与中医炒炭止血理论相结合研制而成的新型中药制剂,我院临床运用于治疗消化性溃疡出血,疗效显著. 本文着重探讨其止血作用机制,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD大鼠50只,雌雄各半,体质量200-250 g,由同济医科大学动物中心提供,微米大黄炭由武汉市中西医结合医院制剂室制备,云南白药由云南白药集团股份有限公司生产,碘^[125I]-6-酮前列腺素F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})放射免疫分析药盒和碘^[125I]-血栓素B₂(TXB₂)放射免疫分析药盒为北京科美东雅生物技术有限公司产品, LBY-NJ2血液凝聚仪为北京普利生公司生产, MK3型Thermo酶标仪为上海热电仪器有限公司生产, DFM-96型多管放射免疫计数器为合肥众成机电技术公司生产,大鼠组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1) ELISA试剂盒为大连泛邦化工有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药: 50只大鼠随机分为微米大黄炭小、中、大剂量组,阳性对照组和空白对照组5组,每组10只. ig给药, 1次/d. 微米大黄炭组剂量分别为0.2 g/(100 g·d)、0.4 g/(100 g·d)、0.8 g/(100 g·d)的剂量灌服,阳性对照组给予云南白药,剂量为0.9 g/(100 g·d) (以生药量计,为临床剂量的20倍),空白对照组给予等量生理盐水. 连续给药6 d, 1次/d。

1.2.2 血小板聚集功能测定: 末次给药30 min后, ip 30 g/L戊巴比妥钠0.01 mL/g麻醉,背位固定,心脏穿刺取血1.8 mL. 按说明书要求^[1],分离富血小板血浆(PRP)和乏血小板血浆(PPP),分别置于比色杯中,调整好透光度后,将诱导剂ADP 2 μmol(1 nmol/L)加入PRP中,记录浊度改变曲线,

记录其最大聚集率(%)。

1.2.3 TXB₂和6-keto-PGF_{1α}的测定: 末次给药30 min后,按0.02 mL/kg体质量腹腔内注射20 g/L戊巴比妥钠麻醉,心脏穿刺取血2 mL,用消炎痛EDTANA2抗凝备检,以3000 r/min离心10 min,分离血浆,严格按试剂盒说明书步骤操作,用放射免疫法测TXB₂和6-keto-PGF_{1α}的含量。

1.2.4 t-PA及PAI-1活性测定: 末次给药后1 h, ip 30 g/L戊巴比妥钠0.01 mL/g麻醉,背位固定,心脏穿刺取血2 mL,用EDTANA2抗凝备检,3500 r/min离心15 min,分离血浆,用酶联免疫吸附双抗体夹心法(ELISA法)测定t-PA和PAI-1水平。

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件对数据进行方差分析(*F*检验;*q*检验),实验数据以mean ± SD表示。

2 结果

2.1 各组大鼠血小板聚集率 与空白对照组比较,用药各组均明显提高血小板聚集性(*P*<0.05),其中微米大黄炭大、中剂量组作用有显著统计学差异(*P*<0.01);与云南白药组相比,微米大黄炭大剂量组提高血小板聚集性有统计学意义(*P*<0.05)(表1)。

2.2 各组大鼠TXB₂和6-keto-PGF_{1α}水平 微米大黄炭大、中、小剂量组均能明显提高大鼠TXB₂的含量,与空白对照组比较有统计学差异(*P*<0.05),其中微米大黄炭大剂量组有显著统计学差异(*P*<0.01);与云南白药组比较,微米大黄炭大剂量组作用更强(*P*<0.05). 实验各用药组均能降低大鼠6-keto-PGF_{1α}的含量,与空白对照组比较有统计学差异(*P*<0.05),其中微米大黄炭大、中剂量组有显著统计学差异(*P*<0.01);与云南白药组比较,微米大黄炭大剂量组有显著性差异(*P*>0.05)(表1)。

2.3 各组大鼠t-PA和PAI-1的活性(μg/L) 云南白药组能降低大鼠组织纤溶酶原激活物(t-PA)的活性(*P*<0.05),提高PAI-1的活性(*P*<0.05);而微米大黄炭各组对t-PA及PAI-1含量变化无影响(表1)。

3 讨论

大黄止血最早记载于汉代张仲景《伤寒论》,其中“血自下,下者愈”的精辟见解,为大黄止血创立了理论基础. 大黄的药理学研究发现^[2-4],大黄能促进血小板生成、黏附和聚集,缩短凝血时间,降低毛细血管通透性等. 生大黄^[5]苦寒泻下,久服易伤脾胃. 根据中药“烧炭存性”

■创新盘点

微米大黄炭是采用现代微米技术与中医炒炭止血理论相结合研制而成的新型中药制剂,该药将大黄炭制成微米大小的颗粒制剂,使其在保存原有药性的同时,最大限度的提高了药物的生物利用度,而将大黄制成大黄炭,使其泻下作用减弱,而止血作用增强。

表 1 各组大鼠血小板聚集率, TXB₂和6-keto-PGF_{1α}(pg/mL) 水平以及t-PA和PAI-1的活性(mean ± SD, n = 10)

	最大聚集率(%)	TXB ₂ (ng/L)	6-keto-PGF _{1α} (ng/L)	t-PA (μg/L)	PAI-1 (μg/L)
空白对照组	49.68 ± 4.75	199.87 ± 13.17	334.91 ± 37.36	15.43 ± 1.24	5.61 ± 0.94
云南白药组	56.82 ± 4.78 ^a	238.35 ± 47.30 ^a	300.03 ± 32.54 ^a	13.12 ± 3.09 ^a	6.94 ± 1.60 ^a
微米大黄炭(小)	58.96 ± 5.76 ^a	238.90 ± 30.92 ^a	291.06 ± 35.97 ^a	15.55 ± 2.72	5.41 ± 1.73
微米大黄炭(中)	62.13 ± 7.36 ^b	243.20 ± 37.36 ^a	279.75 ± 47.69 ^b	15.54 ± 2.08	5.49 ± 1.44
微米大黄炭(大)	64.19 ± 8.79 ^{bc}	273.35 ± 24.86 ^{bc}	262.52 ± 37.21 ^{bc}	15.21 ± 2.71	5.80 ± 1.82

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 空白对照组; ^cP<0.05 vs 云南白药组.

的原理”^[6-8], 将大黄制成大黄炭, 使其泻下作用减弱, 而止血作用增强. 我们采用现代中药制备技术制成微米大黄炭颗粒, 是在保持原有药物特性的基础上, 又最大限度的提高药物的吸收和生物利用度, 同时又缩短了药物的起效时间.

正常止血与凝血机制包括血管壁、血小板和凝血因子等多方面的作用, 而血小板的黏附、聚集作用在止血初期具有重要意义^[9]. TXA₂是目前已发现的最强的缩血管物质与血小板聚集剂之一^[10]. PGI₂则是较强的血小板功能的抑制剂, 具有抑制血小板的黏附、聚集和释放反应, 抑制血小板的促凝活性等作用^[11]. PGI₂和TXA₂之间的动态平衡是维持正常止血功能的基础, 血小板与血管壁接触时被激活, 合成和释放TXA₂并促进血小板聚集, 而血管壁利用自身或外源性的花生四稀酸合成PGI₂. 由于TXA₂和PGI₂的半衰期很短, 一般将TXA₂和PGI₂稳定的代谢产物TXB₂和6-keto-PGF_{1α}作为判断其浓度的指标^[12].

在纤溶系统中, 产生于血管内皮细胞的t-PA及其PAI-1发挥重要作用^[13]. t-PA能选择性地激活纤溶酶原形成纤溶酶, 继而催化纤维蛋白水解. PAI-1是t-PA活性主要的生理性抑制剂, PAI-1能快速与t-PA结合, 形成1:1复合物而使t-PA失活. t-PA与PAI-1在纤溶系统激活过程中起着相互拮抗的作用^[14].

实验研究表明, 微米大黄炭能明显提高ADP诱导的大鼠血小板聚集性, 且大剂量组作用最为明显, 效果优于云南白药. 通过对TXB₂和6-keto-PGF_{1α}含量的检测证实, 微米大黄炭大剂量组能明显提高大鼠TXB₂的含量同时下调6-keto-PGF_{1α}的含量, 且调节作用优于云南白药, 说明微米大黄炭活化血小板的作用优于云南白

药. 在对t-PA及PAI-1活性的检测中发现, 微米大黄炭组对大鼠t-PA及PAI-1活性无影响, 提示微米大黄炭的止血作用机制与纤溶活性无关. 因此, 我们认为微米大黄炭可能是通过对TXB₂、6-keto-PGF_{1α}含量的影响来实现对血小板活化作用的调节, 血小板活化后增强血小板的聚集功能, 起到止血作用.

4 参考文献

- Meduri G, Bausero P, Perrot-Applanat M. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 2000; 62: 439-447
- 段景文, 彭建国. 大黄止血合剂治疗急性上消化道出血64例. *中国中医急症* 2005; 9: 895-896
- 焦东海, 苏雪生, 沈学敏, 王翹楚. 单味大黄治疗急性胰腺炎临床与基础研究报告. *新消化病杂志* 1995; 3: 5-7
- 柳崇典, 薛芳芳, 王福玲, 张春香, 朱高华. 单味大黄汤治疗上消化道出血86例. *新消化病杂志* 1995; 3: 59-60
- 雷载权, 陈松育, 高学敏. 中药学. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 98
- 马规划. 中药制炭止血理论的现代认识. *中医研究* 2004; 17: 15-18
- 钟凌云, 龚千锋, 张的风. 中药炒炭的炮制机理. *时珍国医国药* 2002; 13: 19
- 王永泉, 于冰露. 中药制炭品作用原理浅析. *实用中医药杂志* 2001; 17: 46
- 王振义. 止血与血栓基础理论与临床. 第2版. 上海科学技术出版社, 1996: 104
- 庞爱明, 阮长耿. 绿茶的主要成分表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对血小板功能影响的研究. *中国血液流变学杂志* 2004; 14: 37-39
- 刘耀武, 马腾飞, 蒋新颖, 谷淑玲. 盐酸戊乙奎醚对高黏血症大鼠微循环和血液流变性的影响. *中国微循环* 2006; 10: 415-419
- 杨月艳. 老年上消化道出血患者PGI₂及TXA₂检测及其临床意义. *现代中西医结合杂志* 2003; 12: 1483-1484
- 张晓平, 柳春. TNF-α、t-PA/PAI-1在2型糖尿病血管并发症中的意义. *辽宁医学杂志* 2006; 20: 13-14
- 韩纪举, 魏然, 陈彬, 任道凌, 杨明峰, 夏作理. 血液t-PA和PAI-1水平及活性与血液流变学指标的相关性分析. *中国血液流变学杂志* 2004; 14: 160-164

■应用要点

大黄在我国分布广泛, 且炒炭工艺成熟, 将其制成微米大小的颗粒制剂, 使其在保存原有药性的同时, 最大限度的提高药物的生物利用度. 如能有效开发利用, 不仅可以改善目前消化性溃疡出血患者的生存质量, 更减轻患者的家庭负担, 具有较高的实用价值.

■同行评价

本文选题较好, 研究方法与技术可行, 结果可信, 为药物的临床应用提供了理论依据.

编辑 李军亮 电编 李军亮

胃癌手术治疗前后血清蛋白质谱变异性研究

任宏, 杜宁, 张靖, 姚佳, 石景森

■背景资料

胃癌是一种恶性程度高、发展迅速的临床常见恶性肿瘤。迄今为止尚未发现特异性标志物, 胃癌的诊断和治疗是目前肿瘤研究领域的一个焦点。

任宏, 杜宁, 张靖, 姚佳, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科 陕西省西安市 710061

石景森, 西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科研究室 陕西省西安市 710061

作者贡献分布: 任宏与杜宁对此文所作贡献均等, 此课题由任宏, 杜宁, 张靖, 姚佳, 石景森设计, 研究过程由张靖, 姚佳操作完成, 数据分析由任宏, 杜宁完成, 本论文写作由任宏, 杜宁, 石景森完成。

通讯作者: 石景森, 710061, 西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科研究室. lightingboy532@163.com

电话: 029-85323527

收稿日期: 2007-09-28 修回日期: 2007-12-21

Variabilities of serum proteomic spectra in patients with gastric cancer before and after operation

Hong Ren, Ning Du, Jing Zhang, Jia Yao, Jing-Sen Shi

Hong Ren, Ning Du, Jing Zhang, Jia Yao, Department of Oncosurgery, the First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Jing-Sen Shi, Liver and Gall Surgery Laboratory, the First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Dr Jing-Sen Shi, Liver and Gall Surgery Laboratory, the First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. lightingboy532@163.com

Received: 2007-09-28 Revised: 2007-12-21

Abstract

AIM: To study the variabilities of serum proteomic spectra in patients with gastric cancer before and after operation in order to detect specific protein markers that can be used in the rapid diagnosis of gastric cancer.

METHODS: Proteomic spectra of 46 serum samples from patients with gastric cancer before and after operation and 40 from normal individuals were generated by IMAC-Cu protein chip and surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS).

RESULTS: Fourteen differentially expressed proteins in serum were screened by analysis of proteomic spectra in preoperative patients and normal individuals. We obtained 4 proteins (heat

shock protein 27, glucose-regulated protein, prohibitin, protein disulfide isomerase A3) as markers able to classify gastric cancer patients and normal individuals. The sensitivity and specificity of these markers were 95.7% and 92.5%, respectively. The proteins over-expressed in serum of preoperative patients were obviously down-regulated.

CONCLUSION: Specific proteinic markers of gastric cancer can be detected in serum and used both in the rapid diagnosis of gastric cancer and in the judgment of prognosis. SELDI-TOF-MS is a useful tool for the detection and identification of new protein markers in serum.

Key Words: Gastric cancer; Proteome; Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein chip technology; Specific marker

Ren H, Du N, Zhang J, Yao J, Shi JS. Variabilities of serum proteomic spectra in patients with gastric cancer before and after operation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 314-318

摘要

目的: 观察胃癌手术前后血清蛋白质谱的变化, 从而筛选能够快速诊断胃癌的特异性蛋白标志物。

方法: 选用IMAC-Cu蛋白质芯片和表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)蛋白质芯片技术, 对46例胃癌患者和40名正常人的血清蛋白质谱进行分析。

结果: 通过对胃癌术前血清与正常人血清蛋白质谱分析发现共有14个蛋白质表达量有明显差异。并获得以热休克蛋白27、葡萄糖调节蛋白、抑制素、蛋白质二硫化物异构酶A3这4个蛋白质所组成的模板, 可将胃癌与正常人正确分组, 利用该模板建立胃癌诊断的分类树模型, 此分类树具有两层三个叶结点, 诊断胃癌的灵敏度可达95.7%, 特异性可达92.5%, 术后血清蛋白质谱中, 原表达上调的蛋白质明显下调。

■同行评价者

曹志成, 院士, 香港九龙尖沙咀伊利沙伯医院临床肿瘤科; 熊斌, 教授, 武汉大学中南医院肿瘤科

结论:血清中可以筛选到快速诊断胃癌的特异性蛋白标志物,并可用以预后的判断。SELDI-TOF-MS蛋白质芯片技术为建立蛋白质模板用以诊断胃癌提供了可靠的技术平台。

关键词:胃癌;蛋白质组;表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱蛋白质芯片技术;特异性标志物

任宏,杜宁,张靖,姚佳,石景森.胃癌手术治疗前后血清蛋白质谱变异性研究.世界华人消化杂志 2008;16(3):314-318
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/314.asp>

0 引言

胃癌是一种恶性程度高、发展迅速的临床常见恶性肿瘤。我国每年约16万人死于胃癌^[1],其已严重威胁我国人民生命健康。目前临床胃癌的诊断方法多是物理诊断和组织细胞学诊断,这些方法往往只能发现中期病例,并且操作复杂,确诊所需时间太长,而只能靠生物化学方法检测胃癌发生过程中表达的特异性蛋白标志物达到快速诊断的目的。但是至今没有一种标志物对胃癌是完全特异性的,仅靠单一指标诊断,灵敏度不高,特异性不强。因此,探索和建立一种简单、快速、敏感性高和特异性强的胃癌快速诊断技术已经成为临床医学上的迫切需要。

我们利用表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)蛋白质芯片技术对胃癌患者手术前后血清蛋白质谱的变化进行分析对比,旨在筛选可用于临床胃癌快速诊断和预后判断的特异性标志物。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2003-2004年在我院肿瘤外科住院治疗的胃癌患者46例,其中早期胃癌患者5例,占10.9%,中晚期胃癌患者41例,占89.1%。男女比例为2.2:1.0,平均年龄为51岁;正常健康人(对照组)40例为正常体检者,男女比例为2.1:1.0,平均年龄为49岁。所有患者术前及术后15 d清晨空腹无菌采静脉血5 mL,留制血清标本于-80℃冷冻保存。以上血清标本均由本院肿瘤外科和门诊提供。患者组与对照组在性别比例和年龄上无统计学差异,两组均无引起血清中蛋白质含量发生变化的其他相关疾病。尿素(urea)、乙腈(acetonitrile)、cibacron blue, 3-环乙胺-1-丙磺酸(CHAPS)、三氟乙酸(TFA), SPA(sinapinic acid)均购自Sigma公司。实验所应用SELDI-TOF质谱仪、K30型选择性沉降柱(K30 size selection spin

column)和IMAC3(固定金属亲和)蛋白质芯片由美国Ciphergen公司生产。

1.2 方法 将保存于-80℃的样品取出常温下融解,用cibacron blue及K30型选择性的沉降柱去除血清中的白蛋白,后将20 μL该样品用IMAC缓冲液(100 mmol/L磷酸钠+250 mmol/L氯化钠, pH7.0)稀释7倍备用。将IMAC3芯片安装于Bioprocessor上,于各孔芯池中加入100 mmol/L硫酸铜50 μL, 4℃下200 r/min振荡5 min,使铜离子与芯池活性表面整合,待与蛋白质上的磷酸化氨基酸相结合。吸去剩余的硫酸铜,用去离子水冲洗甩干。每孔芯池中加入100 mmol/L醋酸钠(pH4.0)50 μL振荡,以洗脱未结合的铜离子。弃掉液体,各孔芯池用150 μL结合/洗脱缓冲液(50 mmol/L HEPES pH7.0)进行平衡。将稀释后的样品取50 μL加入芯池中,4℃孵育60 min后弃去多余液体,再用150 μL HEPES缓冲液冲洗3次,洗脱未与芯池表面结合的蛋白质或肽段。取出芯片,用PAP疏水笔在芯池周围圈画样品孔并自然风干。将各孔芯池中加2次SPA, 0.5 μL/次。将处理好的芯片置入蛋白质芯片阅读仪进行蛋白质谱分析。通过Ciphergen Proteinchip软件辅助,程序性完成数据读取过程。在读取数据前,用标准多肽-血管紧张素原(angiotensin peptide)进行仪器校正,使得系统的质量偏差调整为0.1%。本研究芯片阅读的主要参数设定为:激光强度175,检测灵敏度8,优化分子量范围1500-100 000 Da,最佳聚焦中心6000,数据采集参数范围20-80。应用Biomarker Wizard软件对读取的数据进行处理,计算两组或多组具有相同质荷比蛋白质峰波强度,并用P值表明其差异程度。

统计学处理 联合应用Biomarker Wizard软件和Biomarker Patten软件对数据进行分组及相关性分析, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌术前组与正常对照组血清样品蛋白质谱的分布结果

2.1.1 峰波检测(peak detection): 设定46例患者术前血清样品与对照组40份血清样品检测的蛋白质分子量区间在1500-100 000 Da, 低于1500 Da的蛋白质或肽段将被自动从波谱中清除,因为在0-1500 Da这一区间可存在加合物、试剂成分、SPA以及其他的化学成分干扰,而影响后续的数据分析。利用PBS II型蛋白质芯片阅读仪对IMAC3芯片进行检测,所得到的蛋白质以

■ 相关报道

目前许多报道提示关于临床肿瘤病例的蛋白质组学研究对于寻找肿瘤的特异性标志物,发展新的恶性肿瘤早期诊断技术很有帮助,其中利用表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS)蛋白质芯片技术是近几年新兴的差异蛋白质组学技术,其最大优点是快速、简便、易行、样本用量少和高通量分析,利用这一技术在不同的肿瘤中筛选出的灵敏度高、特异性强的肿瘤特异蛋白标志物的数量在逐渐增加。

■创新盘点

本文首次利用 SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片技术在46例胃癌病例中筛选胃癌的特异性标志物,得到比较有意义的结果。

表 1 胃癌血清表达上调和下调的蛋白质

蛋白质编号	上调		下调	
	平均分子量(kDa)	蛋白质鉴定	平均分子量(kDa)	蛋白质鉴定
1	22.33	热休克蛋白27	17.16	p20
2	22.59	transgelin	22.02	核苷二磷酸异构酶A
3	28.42	葡萄糖调节蛋白	30.77	载脂蛋白A-1
4	29.90	抑制素	46.73	α_1 -抗胰蛋白酶
5	35.72	非结构蛋白3(NSP3)	53.40	结蛋白
6	42.46	未命名蛋白质	70.07	血清转铁蛋白
7	56.77	蛋白质二硫化物异构酶A3	80.02	血清白蛋白

表 2 胃癌手术治疗前后血清表达上调蛋白质的变异

蛋白质名称	平均分子量(kDa)	术前表达	术后表达
热休克蛋白27	22.33	上调 ^a	恢复正常 ^c
transgelin	22.59	上调 ^a	上调 ^a
葡萄糖调节蛋白	28.42	上调 ^a	恢复正常 ^c
抑制素	29.90	上调 ^a	恢复正常 ^c
非结构蛋白3(NSP3)	35.72	上调 ^a	上调 ^a
未命名	42.46	上调 ^a	恢复正常 ^c
蛋白质二硫化物异构酶A3	56.77	上调 ^a	恢复正常 ^c

^a $P<0.05$ vs 正常对照组, ^c $P<0.05$ vs 术前组。

波谱的形式表示,共得到54 126个波峰。

2.1.2 波峰整合(peak alignment)与蛋白质谱分析:采用Biomarker Wizard软件对所得波谱进行分析,术前组与正常对照组血清样品中大多数蛋白质峰的表达量都是基本相同的,但两组之间仍有33个蛋白质表达量具有一定判断差别,其中有14个蛋白质峰在术前组与正常组比较时有显著性差异($P<0.05$)。在这14个表达具有显著性差异的蛋白质中,术前患者组血清中表达量上调的蛋白质占7个,他们的平均分子量分别为22.33, 22.59, 28.42, 29.90, 35.72, 42.46和56.77 kDa(分别编号为胃癌血清表达上调蛋白质1, 2, 3, 4, 5, 6, 7);与正常对照组比较,蛋白质表达量下调的有7个,他们的平均分子量分别为17.16, 22.02, 30.77, 46.73, 53.40, 77.07和80.02 kDa(分别编号为胃癌血清表达下调蛋白质1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)。经过进一步鉴定,表达上调的7个蛋白质分别为(按编号排列):热休克蛋白27、transgelin、葡萄糖调节蛋白、抑制素、非结构蛋白3(NSP3)、未命名蛋白质和蛋白质二硫化物异构酶A3。表达下调的7个蛋白质(按编号排列)分别是: p20、核苷二磷酸异构酶A、载脂蛋

白A-1、 α_1 -抗胰蛋白酶、结蛋白、血清转铁蛋白、血清白蛋白。

2.1.3 胃癌血清蛋白标志物的筛选及其模板的建立和分析:将Biomarker Wizard软件分析所得到的有差异的蛋白质峰建立数据库,导入Biomarker Patten智能统计分析软件,选择相应条件,对术前组与正常对照组进行分组统计,从而得到能够正确分组的特异性蛋白标志物。结果显示利用热休克蛋白27、葡萄糖调节蛋白、抑制素、蛋白质二硫化物异构酶A3这4个蛋白质所组成的模板,可以正确地将胃癌患者与正常人分组。利用这些标志物为模板,建立胃癌诊断的分类树模型,此分类树具有两层三个叶结点,胃癌患者与正常人共86例,可将95.7%的胃癌患者和92.5%的正常人正确划分出来。研究结果表明,该模板诊断胃癌的灵敏度达95.7%,特异性达92.5%(表1)。

2.1.4 胃癌患者术前与术后血清蛋白质谱的变化:在相同条件及参数下,应用IMAC3蛋白质芯片和Biomarker Wizard软件对胃癌患者术后血清进行分析,并与术前组和正常对照组的蛋白质谱进行对比研究。结果显示术后组中热休克蛋白27、葡萄糖调节蛋白、抑制素、未命名的蛋白质、蛋白质二硫化物异构酶A3这5个蛋白质(即胃癌血清表达上调蛋白质1, 3, 4, 6, 7)表达量都有所下降,与正常对照组蛋白质峰强度相当,差异无显著性($P>0.05$),但与术前组比较差异具有显著性($P<0.05$, 表2),而NSP3和transgelin这两个蛋白质(即胃癌血清表达上调蛋白质2, 5)在术后表达量未见明显下降,表达量仍然上调,与术前组比较无显著性差异($P>0.05$),与正常对照组相比差异性仍然显著($P<0.05$, 表2)。但是术后组与术前组和正常对照组比较,其蛋白质谱也发生了一些变化,出现了一些分子量相对较大的蛋白质表达上的差异。

■应用要点

胃癌患者的血清中可能存在可以用于快速诊断的特异性标志物。

3 讨论

胃癌是恶性程度高,发展迅速的临床常见的恶性肿瘤,并且对许多化疗药物具有天然耐药性.目前我国胃癌防治现状一高三低,即病死率高,早期诊断率、手术切除率、5年生存率低,并且临床上诊断胃癌的方法较复杂.多年研究表明,胃癌的发生和发展过程是长期的、多因素、多基因共同作用的结果.涉及到细菌感染,多种癌基因与抑癌基因的异常改变,包括癌基因激活、抑癌基因失活或缺如、基因的突变等,具有一定的遗传倾向.有学者提出^[2],*H pylori*的感染可导致胃上皮细胞的增殖和凋亡,增加了细胞恶变的危险性,有文献报道,叶酸水平降低致使一些癌基因在内的DNA片段甲基化的水平下降,细胞遗传稳定性降低,易发生癌变^[3],有关总基因甲基化水平越低,癌细胞的分化程度越差^[4],*nm23*基因缺失可能参与胃癌细胞转移过程.因此,寻求一种新的、有效的、快速可靠的诊断技术,对临床医疗及公众健康至关重要.

任何疾病在出现病理改变之前,细胞内的蛋白质在成分和数量上都会出现相应的改变.所以,理论上,通过对蛋白质的动态观察,我们可以筛选出疾病的特异指标和征兆,从而能够在疾病的早期对其进行快速诊断,但是这种筛选工作量很大,用以往常规的方法难以做到.蛋白质组学技术的开展和研究使得这种大规模的筛选成为可能,同时也给临床疾病诊断,尤其是肿瘤诊断开辟了一个全新的分子诊断技术时期^[5].蛋白质组学可以对肿瘤发生,演进和细胞转导过程中相关的细胞活动的分子特征进行研究^[6-7],这些关于临床肿瘤病例的蛋白质组学研究对于确定肿瘤特异蛋白标记物,发展新的早期诊断技术很有帮助,并且可以促进癌症演进过程中的分子特征的研究^[7-10].基因通过蛋白质的表达来表现其遗传性状,蛋白质组学研究结果可以阐明内在的遗传性状和外界环境对细胞恶变的影响,所以蛋白质组研究技术对寻找肿瘤的特异性标志物有很高的价值.

以往研究蛋白质的方法主要有二维电泳、高效液相色谱、质谱等,这些技术都不同程度地促进了蛋白质组学的发展,但因其操作繁琐,信息量少,仪器昂贵等原因限制了其继续发展^[11-12].SELDI-TOF-MS蛋白质芯片技术是近几年新兴的差异蛋白质组学技术,这一技术的最大优点是快速、简便、易行、样本用量少和高通量分析.2001年底以来,基于这一技术的蛋白质芯片系统

在肿瘤特异标志物筛选中有了大量的应用,采用此技术并获得有意义成果的数量已经日益增多.von Eggeling *et al*^[13]采用此技术获得了肾癌组织,癌旁组织和正常组织的差异蛋白质谱变化.Paweletz *et al*^[14]应用此技术检测乳腺癌患者和正常人的乳头吸出液蛋白质谱变化,结果表明,乳腺癌患者和正常人蛋白质谱存在着显著的差异.Vlahou *et al*^[15]采用该技术从膀胱癌患者的尿液中筛选出5个膀胱癌的特异性标志物.上述报道可以看出,SELDI-TOF-MS蛋白质芯片技术已经成为蛋白质组学的主要技术之一,将其应用于筛选肿瘤的特异性标志物方面尤为合适.

本研究结果显示,胃癌患者与正常人血清中有33个蛋白质峰具有判断性差别,其中有14个蛋白质峰差异有显著性($P<0.05$),7个蛋白质表达量上调,7个蛋白质表达量下调.经过进一步鉴定,表达上调的7个蛋白质中除了分子质量为42.46 KDa的蛋白质(胃癌血清表达上调蛋白6)未曾命名,其他蛋白质分别为(按编号排列):热休克蛋白27、transgelin、葡萄糖调节蛋白、抑制素、NSP3和蛋白质二硫化物异构酶A3.表达下调的7个蛋白质(按编号排列)分别是:p20、核苷二磷酸异构酶A、载脂蛋白A-1、 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、结蛋白、血清转铁蛋白、血清白蛋白.将两组血清蛋白质谱建立数据库,利用Biomarker Pattern统计软件对数据库进行分析,确立了以热休克蛋白27、葡萄糖调节蛋白、抑制素、蛋白质二硫化物异构酶A3这4个蛋白质所组成的诊断模板,能正确地将胃癌患者和正常人分组.利用这4个蛋白标志物组成的模板诊断胃癌的灵敏度达95.7%,特异性达92.5%.

术后患者血清蛋白质谱亦发生了变化,原来高表达的5个蛋白质:热休克蛋白27、葡萄糖调节蛋白、抑制素、未命名的蛋白质、蛋白质二硫化物异构酶A3,术后都有明显下降,其蛋白质峰强度与正常对照组相当.而transgelin、和NSP3这两个蛋白质在术后表达量未见明显下降,与正常对照组相比表达量仍然上调.实验结果进一步提示,利用上述的4种蛋白质标志物组成的模板有很高的特异性和灵敏度,对临床快速诊断胃癌有较高的利用价值,并且在术后可以用术前表达上调的5个蛋白质的表达量是否恢复正常来判断手术治疗是否彻底,判断患者的预后情况.但是由于本实验所收集的样本资料中,早期胃癌所占的比例较小,所以此结果仅适用于胃癌的快速诊断,是否能够适用于早期胃癌的筛查,有待

■名词解释

表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS):蛋白质芯片技术,是在基质辅助激光解吸离子化质谱技术基础上,利用经过特殊处理的固相支持物或芯片的基质表面制成蛋白质芯片.根据蛋白质物理、化学性质的不同,选择性地对待测生物样品中捕获配体,将其结合在芯片的固相基质表面上,经原位清洗和浓缩后,利用能量吸收分子将激光束的能量转换,激发蛋白质解吸及离子化,形成气态离子.在统一电场条件下,这些离子加速飞出,经过离子飞行管,最终由离子接受检测器接受.由于每种蛋白质的质荷比(m/z)不同,飞行时间不同,从而到达接受检测器的先后顺序不同.可对结合的多肽或蛋白质进行质谱检测,并结合生物信息学进行分析;结合四极杆/飞行时间质谱/质谱仪可对未知蛋白质进行测序等研究.

■同行评价

本文具有一定的科学性,创新性和可读性,若能对所发现的蛋白质及其机制作更深入的讨论,将对读者更有益。

于下一步收集更多的早期胃癌病例资料,扩大样本含量,以作进一步的研究分析。

总之,将经过筛选所得到的蛋白质作为快速诊断胃癌的特异性标志物其代表性好,灵敏度高、特异性强,适用于胃癌的快速诊断,而且对胃癌患者预后判断分析具有临床意义。SELDI-TOF-MS蛋白质芯片技术的应用加快了肿瘤标记物的筛选和研究。采用该技术建立的多蛋白标志物组成的模板对胃癌进行检测及筛选工作具有重要意义。随着实验样本量的不断增加,该技术有望成为临床早期诊断胃癌的快速、灵敏的手段。

4 参考文献

- 1 邢守正,梁小波. 胃癌. 山西医药杂志 1999; 28: 5-8
- 2 Liu WZ, Xiao SD, Jiang SJ, Li RR, Pang ZJ. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in medical staff in Shanghai. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 749-752
- 3 Fang JY, Xiao SD, Zhu SS, Yuan JM, Qiu DK, Jiang SJ. Relationship of plasma folic acid and status of DNA methylation in human gastric cancer. *J Gastroenterol* 1997; 32: 171-175
- 4 Fang JY, Zhu SS, Xiao SD, Jiang SJ, Shi Y, Chen XY, Zhou XM, Qian LF. Studies on the hypomethylation of c-myc, c-Ha-ras oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 1079-1082
- 5 Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol* 2001; 2: 698-704
- 6 Nooter K, Stoter G. Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Pathol Res Pract* 1996; 192: 768-780
- 7 Moscow JA, Cowan KH. Multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 14-20
- 8 Rau B, Gaestel M, Wust P, Stahl J, Mansmann U, Schlag PM, Benndorf R. Preoperative treatment of rectal cancer with radiation, chemotherapy and hyperthermia: analysis of treatment efficacy and heat-shock response. *Radiat Res* 1999; 151: 479-488
- 9 Laszlo A, Li GC. Heat-resistant variants of Chinese hamster fibroblasts altered in expression of heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 8029-8033
- 10 Laszlo A, Venetianer A. Heat resistance in mammalian cells: lessons and challenges. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 851: 169-178
- 11 Bichsel VE, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal pathway profiling. *Cancer J* 2001; 7: 69-78
- 12 von Eggeling F, Junker K, Fiedler W, Wollscheid V, Durst M, Claussen U, Ernst G. Mass spectrometry meets chip technology: a new proteomic tool in cancer research? *Electrophoresis* 2001; 22: 2898-2902
- 13 von Eggeling F, Davies H, Lomas L, Fiedler W, Junker K, Claussen U, Ernst G. Tissue-specific microdissection coupled with ProteinChip array technologies: applications in cancer research. *Biotechniques* 2000; 29: 1066-1070
- 14 Paweletz CP, Trock B, Pennanen M, Tsangaris T, Magnant C, Liotta LA, Petricoin EF 3rd. Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer. *Dis Markers* 2001; 17: 301-307
- 15 Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinis S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, Nasim S, Wright Jr GL Jr. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol* 2001; 158: 1491-1502

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

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)

非酒精性脂肪肝糖代谢异常与超敏C反应蛋白的关系

张炜, 范钰, 朱丽群, 程兆明

张炜, 范钰, 朱丽群, 程兆明, 江苏大学附属医院消化科 江苏省镇江市 212001

作者贡献分布: 张炜、程兆明对此文所作贡献均等; 此课题由张炜、范钰及程兆明设计; 由张炜、程兆明提供临床病例; 朱丽群采集血清标本, 完成实验室检查并收集记录临床资料; 数据分析由张炜、范钰完成; 本论文写作由张炜、范钰及朱丽群完成; 程兆明负责组织协调。

通讯作者: 程兆明, 江苏大学附属医院消化科, 江苏省镇江市 212001. zw8839200@163.com

电话: 0511-2059016

收稿日期: 2007-07-10 修回日期: 2007-12-25

Relationship between abnormal glycometabolism and ultra-sensitive C-reactive protein in non-alcoholic fatty liver

Wei Zhang, Yu Fan, Li-Qun Zhu, Zhao-Ming Cheng

Wei Zhang, Yu Fan, Li-Qun Zhu, Zhao-Ming Cheng, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhao-Ming Cheng, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. zw8839200@163.com

Received: 2007-07-10 Revised: 2007-12-25

Abstract

AIM: To study the relationship between abnormal glycometabolism and ultra-sensitive C-reactive protein (hsCRP) in non-alcoholic fatty liver (NAFLD).

METHODS: One hundred and ninety-one NAFLD patients were divided into normal glucose metabolism group and abnormal glucose metabolism group according to the oral glucose tolerance test (OGTT). Their serum hsCRP levels were measured.

RESULTS: The serum hsCRP levels in the abnormal glucose metabolism group were higher than those in the normal glucose metabolism group (4.01 ± 1.45 vs 0.96 ± 0.41 , $P < 0.01$), which were positively correlated with the glucose tolerance ($r = 0.74$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Serum hsCRP levels are related

with abnormal glycometabolism in NAFLD patients.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver; Ultra-sensitive C-reactive protein; Abnormal glycometabolism; Oral glucose tolerance test

Zhang W, Fan Y, Zhu LQ, Cheng ZM. Relationship between abnormal glycometabolism and ultra-sensitive C-reactive protein in non-alcoholic fatty liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 319-321

摘要

目的: 探讨非酒精性脂肪肝(NAFLD)患者糖代谢异常与血清超敏C反应蛋白(hsCRP)的相关性。

方法: 将191例NAFLD患者按口服葡萄糖耐量试验(OGTT)分为糖代谢正常组和异常组, 检测患者血清hsCRP。

结果: NAFLD患者糖代谢异常组血清hsCRP浓度较糖代谢正常组明显增高(4.01 ± 1.45 vs 0.96 ± 0.41 , $P < 0.01$), 血清hsCRP浓度与2 h血糖呈正相关($r = 0.74$, $P < 0.01$)。

结论: NAFLD患者糖代谢异常与血清hsCRP密切相关。

关键词: 非酒精性脂肪肝; 超敏C反应蛋白; 糖代谢异常; 口服葡萄糖耐量试验

张炜, 范钰, 朱丽群, 程兆明. 非酒精性脂肪肝糖代谢异常与超敏C反应蛋白的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16(3): 319-321
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/319.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝(NAFLD)指病变主要在肝小叶, 以肝细胞脂肪变性和脂肪沉积为病理特征, 但无过量饮酒史的临床病症, 成年人发病率17%-33%^[1]. 胰岛素抵抗是发生发展的基础, 随着肝脏疾病的慢性进展, 肝细胞反复受损伤, 肝纤维化程度加重, 同时, 糖代谢异常及胰岛素抵抗的发生率逐渐增高^[2]. 超敏C反应蛋白(hsCRP)是一种敏感、非特异性的炎症标志物, 近年来

■背景资料

hsCRP是一种敏感的炎症标志物, 近年来已被公认为是糖代谢异常的独立危险因素. NAFLD患者随着疾病的进展, 糖代谢异常的发生率逐渐增高, 常伴有高血糖和高胰岛素血症。

■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

■应用要点

通过检测血清hsCRP可以判断NAFLD患者肝脏炎症与合并糖代谢异常,hsCRP可能成为判断患者病情的新指标。

已被公认为是糖代谢异常的独立危险因素^[3-4]。本文通过不同糖耐量水平的NAFLD患者hsCRP比较,探讨hsCRP与NAFLD患者糖耐量水平的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-06/2007-06在我院就诊的NAFLD患者191例,均符合2006年中华医学会肝脏病学分会提出的诊断标准^[5],男138例,女53例。所有患者否认就诊前有糖尿病史及糖尿病家族史,并除去有明确冠心病和心衰者。

1.2 方法 所有患者,进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT,75 g葡萄糖粉),按OGTT结果,将NAFLD患者分为糖代谢正常组和异常组,hsCRP采用免疫散射比浊法,用岛津7200全自动生化分析仪检测肝功能,以AST≤40 U/L为正常,40 U/L<AST≤80 U/L为轻度异常,AST>80 U/L为明显异常。

统计学处理 所有数据用SPSS13.0软件处理。hsCRP水平为计量资料用mean±SD表示,两样本均数的比较用 t 检验,肝功能分级为定性资料,两组的比较用 χ^2 检验, $P<0.01$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 NAFLD患者临床资料和血清hsCRP NAFLD患者中糖代谢正常89例,占46.6%;糖代谢异常102例,占53.4%。两组NAFLD患者年龄、性别、体质量指数(BMI)和血压水平无明显差异。糖代谢异常组血清hsCRP浓度较糖代谢正常组明显增高, $t=19.20$, $P<0.01$ (表1)。

2.2 NAFLD患者血清hsCRP与OGTT 2 h血糖相关性 NAFLD患者血清hsCRP与OGTT 2 h血糖呈明显的正相关, $r=0.74$, $P<0.01$ (图1)。

2.3 患者肝功能 糖代谢正常组AST正常的比例明显高于糖代谢异常组($\chi^2=71.3$, $P<0.01$),AST轻度异常的比例明显低于糖代谢异常组($\chi^2=9.8$, $P<0.01$),AST明显异常的比例明显低于糖代谢异常组($\chi^2=37.5$, $P<0.01$),可见NAFLD患者发生糖代谢异常者肝功能明显减退(表2)。

3 讨论

NAFLD是一种临床病理综合征,他的范畴从单纯的脂肪变性到非酒精性脂肪性肝炎、纤维化和终末期肝病^[6]。由于目前尚无特异的治疗方案,其机制的研究对于阻止NAFLD的进展有重要意义^[7]。最近的研究结果表明,胰岛素抵抗可能参与了其病理生理过程^[8]。随着肝脏疾病的慢性化

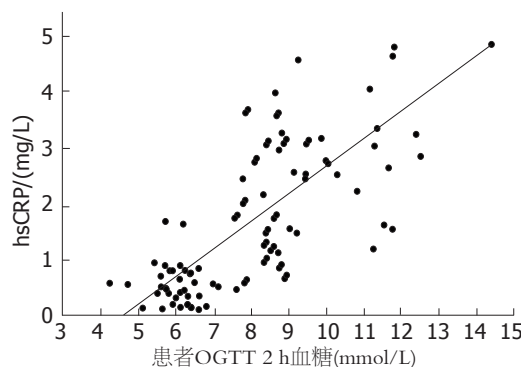


图1 患者OGTT 2 h血糖与血清hsCRP水平间的相关性。

表1 两组NAFLD患者血清hsCRP浓度

分组	<i>n</i>	血清hsCRP(mg/L)
糖代谢正常组	89	0.96 ± 0.41
糖代谢异常组	102	4.01 ± 1.45
正常参考值		0.65 ± 0.35

表2 两组患者在不同肝功能分级时的比例(*n*)

分组	<i>n</i>	AST		
		正常	轻度异常	明显异常
糖代谢正常组	89	59	16	4
糖代谢异常组	102	8	39	55

进展,糖代谢异常的发生率逐渐增高,常伴有高血糖和高胰岛素血症。这种现象与肝脏对血糖摄取、糖原合成及分解功能障碍及高血糖刺激胰岛素分泌,肝脏摄取、降解胰岛素的作用减弱等因素有关,也存在有明显的胰岛素抵抗^[9]。本研究结果显示NAFLD患者糖代谢异常的发生率高达53.4%。

在NAFLD发生发展过程中炎症是重要的环节^[10]。本研究结果显示可见NAFLD患者随着糖代谢异常的发生肝功能损伤更加明显。说明炎症与糖代谢异常密切相关。hsCRP是一项灵敏度较高的炎症反应性指标,已经被作为公认的心血管疾病预示因子用于预测心血管事件的发生和死亡率^[11-12]。同时hsCRP水平也与糖代谢异常密切相关^[13]。Temelkova-Kurktschiev *et al*^[14]和Festa *et al*^[15]研究结果已经证实,CRP与血糖相关的原因与高血糖及胰岛素水平异常等状态导致血管内皮细胞损伤,引起炎症反应有关。而脂肪肝为肝脏内过多的脂肪沉积,且常伴有内脏脂肪增多及胰岛素抵抗,从发病因素看与此类似^[16]。因此NAFLD患者hsCRP水平可能增高。本研究结果显示NAFLD患者随着糖代谢异常的发生

hsCRP 水平升高. 而且hsCRP水平与OGTT 2 h血糖有明显的正相关.

总之, NAFLD患者血清hsCRP水平反应炎症, 炎症与胰岛素抵抗密切相关, 互为因果. 通过检测血清hsCRP可以判断NAFLD患者肝脏炎症与合并糖代谢异常的情况, 监测病情变化.

4 参考文献

- 1 曾民德. 葡萄糖毒性、脂肪毒性与非酒精性脂肪性肝病. 中华肝病杂志 2005; 13: 81-82
- 2 Petrides AS, Schulze-Berge D, Vogt C, Matthews DE, Strohmeier G. Glucose resistance contributes to diabetes mellitus in cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18: 284-291
- 3 Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hulten LM, Hiukka A, Taskinen MR. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2003; 166: 387-394
- 4 Xu Y, Whitmer K. C-reactive protein and cardiovascular disease in people with diabetes: high-sensitivity CRP testing can help assess risk for future cardiovascular disease events in this population. *Am J Nurs* 2006; 106: 66-72
- 5 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝病杂志 2006; 14: 161-163
- 6 Grant LM, Lisker-Melman M. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2004; 3: 93-99
- 7 Tilg H, Kaser A. Treatment strategies in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 148-155
- 8 Cortez-Pinto H, Camilo ME. Non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH): diagnosis and clinical course. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 1089-1104
- 9 Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 421-427
- 10 Panasiuk A, Dzieciol J, Panasiuk B, Prokopowicz D. Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6198-6202
- 11 Kovacs A, Green F, Hansson LO, Lundman P, Samnegard A, Boquist S, Ericsson CG, Watkins H, Hamsten A, Tornvall P. A novel common single nucleotide polymorphism in the promoter region of the C-reactive protein gene associated with the plasma concentration of C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2005; 178: 193-198
- 12 Haffner SM. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006; 97: 3A-11A
- 13 Pietri P, Vyssoulis G, Vlachopoulos C, Zervoudaki A, Gialernios T, Aznaouridis K, Stefanadis C. Relationship between low-grade inflammation and arterial stiffness in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2006; 24: 2231-2238
- 14 Temelkova-Kurktschiev T, Siegert G, Bergmann S, Henkel E, Koehler C, Jaross W, Hanefeld M. Subclinical inflammation is strongly related to insulin resistance but not to impaired insulin secretion in a high risk population for diabetes. *Metabolism* 2002; 51: 743-749
- 15 Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002; 51: 1131-1137
- 16 Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Ponichik J. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Mol Med* 2006; 12: 555-558

■同行评价

本文实验设计合理, 论据充分, 具有一定的临床价值.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

●消息●

世界华人消化杂志 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 2007-12-14)

I 型自身免疫性肝炎分析102例

弓艳霞, 王邦茂

■背景资料

自身免疫性肝炎是一种病因不明,以高球蛋白血症、多种自身抗体、汇管区界板炎症等为特征的疾病,是临床上肝硬化的形成原因之一。随着诊疗技术的不断进步以及越来越多的人关注,认识此疾病的临床特点,使之得到早期诊断及有效的预防和治疗,显得尤为重要。

弓艳霞, 王邦茂, 天津医科大学总医院消化内科 天津市 300052

作者贡献分布: 弓艳霞与王邦茂对此文所作贡献均等; 此课题由王邦茂设计; 研究过程由王邦茂与弓艳霞操作完成; 研究所用分析工具由弓艳霞提供; 数据分析由弓艳霞完成; 本论文写作由弓艳霞与王邦茂完成。

通讯作者: 弓艳霞, 300052, 天津市, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化内科。gong_yanxia@yahoo.com.cn
收稿日期: 2007-10-12 修回日期: 2007-12-27

Type I autoimmune hepatitis: an analysis of 102 cases

Yan-Xia Gong, Bang-Mao Wang

Yan-Xia Gong, Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University Hospital, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Yan-Xia Gong, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University Hospital, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. gong_yanxia@yahoo.com.cn

Received: 2007-10-12 Revised: 2007-12-27

Abstract

AIM: To describe the clinical features of type I autoimmune hepatitis.

METHODS: One hundred and two cases of autoimmune hepatitis admitted to Tianjin Medical University Hospital from January 2000 to May 2007 were retrospectively analyzed.

RESULTS: There were 85 females and 17 males, with a mean age of 59.73 ± 13.46 years. Clinical manifestations of chronic liver disease were found in 41.18% patients, acute hepatitis manifestations in 18.63% patients, and no symptom in 5.89% patients. Laboratory tests showed that the percentage of abnormal liver function, gamma globulin or immunoglobulin G was 84.33% and 80%, respectively. Negative viral serology was found in 85.29% patients, hyperglycemia occurred in 50.67% patients. The positive rate of antinuclear antibody (ANA), antismooth muscle antibody (SMA) and antimitochondrial antibody (AMA) was 74.51%, 4.90% and 7.84%, respectively. Abdominal ultrasound was abnormal in 97.06% patients. Ultrasonography revealed liver texture asymmetry or decreased density, hepato-

cirrhosis, hepatoma, bilestone, enlarged abdominal lymph nodes, ascites, etc. Of the 31 patients who received treatment, 18 had improvement in their symptoms, 7 incomplete response, 5 relapse and 7 treatment failure

CONCLUSION: Autoimmune hepatitis has different manifestations. However, it has certain unique features in immunology, imageology, liver histology, which can be useful for its clinical diagnosis and treatment.

Key Words: Autoimmune hepatitis; Cirrhosis; Immune; Clinical feature

Gong YX, Wang BM. Type I autoimmune hepatitis: an analysis of 102 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 322-325

摘要

目的: 描述 I 型自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)的临床特点。

方法: 回顾性分析2000-01/2007-05天津医科大学总医院确诊的102例AIH患者的临床资料。

结果: AIH患者102例, 女性85例, 男性17例, 平均年龄 59.73 ± 13.46 岁; 症状: 41.18%为慢性肝病表现, 18.63%为急性肝炎表现, 5.89%患者无症状; 实验室检查: 84.33%肝功能异常, 80.00% γ -球蛋白或IgG异常, 85.29%肝炎病毒标记物为阴性, 50.67%血糖增高, 74.51% ANA阳性, 4.90% SMA阳性, 7.84% AMA阳性; 影像学: 97.06%腹部超声异常, 表现为肝脏质地不均或密度减低、肝硬化、肝癌、胆石、腹腔淋巴结肿大、腹腔积液等。37例患者予以治疗, 其中缓解18例, 不完全应答7例, 复发5例, 失败7例。

结论: AIH临床表现复杂多样, 但在免疫学、影像学和病理学等方面又具有特征性, 这对临床诊治具有指导作用。

关键词: 自身免疫性肝炎; 肝硬化; 免疫; 临床特点

弓艳霞, 王邦茂。I 型自身免疫性肝炎分析102例。世界华人消

■同行评议者

唐晓鹏, 教授, 中南大学肝病研究所/中南大学湘雅二医院; 张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心

化杂志 2008; 16(3): 322-325

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/322.asp>

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)的发病率约为0.17%, 女性多见, 常出现严重的肝炎表现, 并可进展为肝硬化^[1]. 基于自身抗体谱特点, 可将其分为三种亚型, 即 I 型、II 型和III型. 其中 I 型最为常见, 70%是小于40岁的女性^[2]. 我院7年收治AIH患者102例, 对其分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2000-01/2007-05收治 I 型AIH患者102例, 女性85例(83.33%). 男性17例(16.67%), 年龄15-103(平均59.73±13.46)岁, 60-70岁为高发年龄. 病程1 d到30年不等, 平均病程12.55±40.95 mo.

1.2 方法 诊断标准依据“国际自身免疫性肝炎组织制定的AIH评分标准”, 结果判定: 治疗前评分>15明确诊断, 10-15可能诊断; 治疗后评分>17明确诊断, 12-17可能诊断. 研究指标包括一般资料、临床表现、实验室指标、影像学检查、合并症、肝穿刺活检、治疗和预后等方面.

统计学处理 计量资料采用mean±SD表示, 计数资料采用例数百分比表示, 治疗前后相关指标的比较采用t检验.

2 结果

2.1 临床表现 症状有乏力、发热、食欲不振和体质量下降等, 体征有黄疸、肝脾大和腹水等. 其中6例患者(5.89%)无症状, 42例患者(41.18%)为乏力、发热、食欲减退、体质量下降和腹部不适等慢性肝病的表现, 19例患者(18.63%)为恶心、黄疸等急性肝炎表现, 出现消化道出血26例(25.49%), 肝性脑病1例(0.98%), 肝肾综合征3例(2.94%), 暴发性肝炎1例(0.98%), 有关节痛、肌痛等肝外表现4例(3.92%).

2.2 实验室检查 84.33%患者有不同程度的肝功能异常, 主要为AST、ALT、TBIL、ALP、GGT等升高(表1). 76例(74.51%)ANA阳性, 滴度均在1:100以上, 其中: 胞质颗粒型39例, 着丝点型16例, 均质型11例, 斑点型10例, 同时合并核仁型8例, 核模型6例. SMA阳性5例(4.90%). 伴AMA阳性8例(7.84%). 余患者未检测到抗LKM-1及抗SLA/LP阳性(所有患者未进行pANCA和抗ASGPR检测). 80.00% γ-球蛋白、IgG异常(表1).

表 1 实验室检查情况

化验指标	mean ± SD
WBC(×10 ⁹)	5.0475 ± 2.7669
HGB(g/L)	99.5474 ± 27.5796
PLT(×10 ⁹)	133.2632 ± 111.0222
TP (g/L)	68.3535 ± 10.8040
ALB(g/L)	34.9225 ± 10.5690
GLO(g/L)	35.5235 ± 9.7766
ALT(U/L)	157.8510 ± 139.0524
AST(U/L)	152.0820 ± 142.2243
ALP(U/L)	229.3854 ± 269.0245
GGT(U/L)	265.0883 ± 351.5267
IgA(g/L)	346.5000 ± 141.8752
IgG(g/L)	1706.9667 ± 802.5732
FPG(g/L)	6.0758 ± 3.4410

表 2 75例AIH合并高血糖情况

	阳性数	阴性数	合计	阳性率(%)
无肝硬化	4	8	12	33.3333
肝硬化-A	22	21	43	51.1628
肝硬化-B	11	6	17	64.7059
肝硬化-C	1	2	3	33.3333
合计	38	37	75	50.6667

85.29%肝炎标志物阴性, 11.76% HBcAb阳性, 2.94% HCV阳性. 102例患者中75例检测血糖, 高血糖38例, 占50.67%(表2).

2.3 影像学检查 3例正常(2.94%), 余异常: 肝硬化52例(50.98%), 弥漫性肝脏病变3例, 肝脏颗粒增粗4例, 肝脏回声不均2例, 肝癌2例(1.96%), 肝囊肿4例(3.92%), 肝大5例, 肝脏血管瘤4例, 肝内小钙化点6例, 门静脉血栓形成3例, 脂肪肝5例(4.90%). 胆囊壁增厚、胆囊息肉、胆囊结石等62例(60.78%). 脾大45例, 副脾1例. 腹腔淋巴结增大者11例(10.78%), 其中肝门区、胰头周围及肠系膜根部多发淋巴结肿大1例, 腹腔淋巴结肿大2例, 心包旁、腹腔及腹膜后多发淋巴结肿大2例, 心包旁及肺门淋巴结增大伴钙化1例, 脾门区淋巴结增大1例, 肝门区、肝胃韧带及腹主动脉旁多发淋巴结肿大, 门腔静脉间及腹主动脉旁淋巴结增大1例. 腹腔积液37例, 双肾弥漫性病变1例, 肾囊肿1例, 肾结石1例, 肾大1例, 肾积水1例, 盆腔积液1例, 结肠壁增厚3例, 胰腺异常5例.

2.4 合并症 60.78%合并胆囊炎、胆囊结石等胆道疾患; 50.67%合并糖尿病; 8.82%为重叠综合

■ 相关报道

近年来国内外的相关文献均从不同方面报道了自身免疫性肝炎的特点. 目前观点认为对此病的诊断需从临床症状、实验室检查、病理学等方面全面考虑, 应用自身免疫性肝炎诊断积分系统, 同时需要排除病毒性、药物性、酒精性等肝病.

■创新盘点

本文对102例 I 型自身免疫性肝炎患者的临床表现、实验室检查、影像学、病理学、诊断及治疗等方面进行系统的统计学分析及总结。病例数量多, 归纳方面全, 尤其指出其在影像学方面可合并淋巴结肿大的特点, 在实验室检查方面易出现高血糖情况, 均有助于此病的诊疗。

表 3 37例AIH患者治疗及疗效

	n	缓解	不完全应答	复发	失败
UDCA	6	2	1	0	3
H+UDCA	6	3	1	1	1
H	20	10	5	3	2
H+6-MP	2	1	0	1	0
H+6-MP +UDCA	2	1	0	0	1
环磷酰胺	1	1	0	0	0
合计	37	18	7	5	7

H: 强的松; 6-MP: 6-巯基嘌呤; UDCA: 熊去氧胆酸。

征; 11.76%及2.94%分别合并乙肝和丙肝; 2.94%合并系统性红斑狼疮; 1.96%合并类风湿关节炎; 0.98%合并甲状腺机能亢进; 0.98%合并干燥综合征。

2.5 病理 7例行肝穿刺活检, 病理提示确诊4例。界板炎症2例、汇管区及汇管周围区淋巴细胞及浆细胞的浸润6例, 肝脏纤维化和肝硬化4例。

2.6 治疗 37例接受治疗, 其中治疗前评分>15者15例, 评分10-15者22例, 具体治疗方案如下。治疗后评分>17者27例, 评分12-17者10例(表3-4)。出现类肾上腺皮质功能亢进综合征者20例, 胃肠道反应6例, 皮疹5例, 睡眠障碍4例, 未见骨质疏松、骨无菌性坏死、白内障等副作用发生。除1例因严重副作用(骨髓抑制)而停药, 其余患者均完成治疗。61.76%合并肝硬化, 其中30例(29.41%)并发消化道出血、肝性脑病、肝肾综合征。

3 讨论

本研究83.33%患者为女性, 提示AIH发病与性别相关, 女性多发, 可能原因为^[1-3]。(1)女性HLA DR4阳性更常见, 且其多样性较为复杂; (2)对免疫应答存在差异, 可能单独与性激素或与下丘脑-垂体-肾上腺轴的分泌物一起对易感基因的调节有关, 女性患者暴露于感染因子和抗原后更易产生Th1型细胞因子应答而致病。AIH多有免疫遗传背景即人类白细胞抗原(HLA), 其决定AIH的临床表现^[4]。与HLA DR3相关者发病年龄较轻, 而且病情较重, 常在免疫抑制剂治疗停药后复发, 多需肝移植; 而HLA DR4阳性者常于40岁以后发病, 病情较轻, 对免疫抑制剂治疗反应良好, 较少需要肝移植, 但是肝外自身免疫性综合征多见^[5]。本研究应加入此项检测。

AIH无特征临床表现, 可有发热、食欲不振

等, 出现黄疸、腹水等体征。部分患者就诊时已进展为失代偿期肝硬化, 并可出现食管静脉曲张。患者可伴发溃疡性结肠炎、原发性硬化性胆管炎、系统性红斑狼疮等疾病^[6], 本研究均观察到。

实验室检查具有特异性。多数患者出现不同程度肝功能异常: AST、ALT升高为主, ALP和GGT正常或轻度升高。本研究中AST、ALT、TBIL、ALP和GGT均可升高, 不除外重叠综合征可能。几乎所有AIH患者都存在一种或多种高滴度的自身抗体, I型AIH的特征性抗体为ANA和SMA阳性, 少数患者可有pANCA和抗ASGPR阳性。本研究结果与文献报道一致。

此外, 本研究特别指出AIH患者50.67%合并高血糖, 目前国内外尚无此项报道。探讨其机制可能如下: (1)形成肝硬化后, 肝源性糖尿病可能性存在。几乎所有的肝硬化患者都存在胰岛素抵抗^[7]。本研究中, 63例AIH合并肝硬化患者, 其中高血糖34例(53.9682%)。 (2)观察到5例患者影像学有胰腺改变, 如: 胰腺肿大、胰石、胆总管扩张等, 有9例患者肝功能淤胆表现, 进一步说明有自身免疫性胰腺炎的可能。43%-68%自身免疫性胰腺炎患者可伴有糖尿病, 以II型糖尿病为多。Taniguchi *et al*^[8]首次报道了伴有I型糖尿病的自身免疫性胰腺炎病例。如果伴自身免疫性胰腺炎, 则会引起胰腺组织水肿、缺血、坏死等, 从而影响胰岛素的分泌与释放, 促使血糖升高。当然, 有待血清碳酸酐酶抗体检测及胰腺组织活检论证。 (3)部分患者予以长期激素治疗, 药物性因素不除外。

另有创新之处在于对AIH超声表现进行详细描述, 特别指出AIH可伴发腹腔淋巴结肿大(10.78%)。肝脏是一个免疫器官, 称为淋巴样肝脏。其有参与天然免疫的吞噬细胞(肝巨噬细胞即库普弗细胞、树突状细胞)、NK细胞、NK T细胞和参与适应性免疫的迁移性T、B细胞。可能原因为人体免疫系统所引起的特异性免疫反应的结果。部分患者晚期可发展到肝癌, 肝癌引起腹腔淋巴结转移的因素存在。

治疗主要应用免疫抑制剂。据病情活动性及疾病发展阶段, 可分为绝对需要治疗、相对需要治疗和不需要治疗^[9]。绝对需要治疗指征: 有乏力、肌痛、关节痛、持续性黄疸且反应严重肝脏炎症的实验室指标异常者^[10]; AST≥10×ULN; AST≥5×ULN同时γ-球蛋白大于等于正常值的2倍; 肝组织桥接坏死或多小叶坏死; 活

表 4 37例AIH患者治疗前后肝功能变化(治疗2 wk后, mean \pm SD)

肝功能	治疗前	治疗后	<i>t</i>	<i>P</i>
GLO(g/L)	37.6154 \pm 8.0998	34.7000 \pm 9.9742	1.1570	>0.05
ALT(U/L)	195.2917 \pm 180.6541	118.1250 \pm 87.7349	1.9592	>0.05
AST(U/L)	191.5417 \pm 180.1297	87.0000 \pm 51.3936	2.8458	<0.05
ALP(U/L)	385.7917 \pm 383.1620	302.6190 \pm 227.5123	0.9517	>0.05
GGT(U/L)	409.0000 \pm 349.2505	506.7500 \pm 516.4529	0.7995	>0.05
TBIL(mg/L)	80.3077 \pm 58.8173	70.9000 \pm 85.7077	0.4803	>0.05

■同行评价

本研究立题新颖, 设计合理, 符合医学伦理学要求, 对临床具有较强的指导意义。

动性肝硬化; 暴发性发作者. 相对需要治疗指征: AST $>5\times$ ULN且 $<10\times$ ULN; AST $<5\times$ ULN同时 γ -球蛋白小正常值的2倍且均异常升高者. 是否治疗取决于症状严重程度. 不需要激素及免疫抑制治疗者: 非活动性肝硬化; 轻度界板或汇管区炎症; 严重门脉高压; 肝酶轻度增高的无症状患者^[11]. 治疗以传统治疗为主, 即强的松单独或联合硫唑嘌呤治疗. 其他药物有大环酯类免疫抑制剂如FK506、环孢霉素A等, 第二代糖皮质激素布地缩松等, 酶酚酸吗啉乙酯, 熊去氧胆酸, 抗CD4 mAb, 青霉胺等^[12]. 治疗2 wk后90%的患者转氨酶和 γ -球蛋白水平可有所改善, 病理指标的变化比临床及生化指标晚3-6 mo, 短期内很难达到病情缓解的指征^[9]. 本研究中, 治疗2 wk后AST变化具统计学意义, ALT虽较治疗前有所下降, 但尚无统计学意义.

影响预后因素有合并肝硬化与否、发病年龄、对免疫抑制剂的反应、复发、有无肝移植等. 一般, 发病年龄越小, 病情越重, 进展越快^[13-14]. 有研究表明, I型无症状AIH较常见, 其结局较好. 多数于随访中未出现症状, 且只要保持无症状, 可不予免疫抑制治疗^[11], 本研究中也证实了此点. 肝硬化的出现提示预后差, 本研究中61.76%患者合并有肝硬化, 其中30例出现消化道出血、肝性脑病等并发症. 一项以色列的研究指出无症状者预后好, 虽多数最终出现症状, 但这些患者对治疗反应好只需低剂量皮质类固醇激素即可控制^[11], 本研究未观察到此点, 有待进一步研究.

4 参考文献

1 邱德凯, 马雄. 自身免疫性肝病基础与临床. 第1版. 上

- 海: 上海科学技术出版社, 2006: 20-84
- Al-Khalidi JA, Czaja AJ. Current concepts in the diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 1237-1252
 - Li DY, Schwarz KB. Autoimmune hepatitis. *Adolesc Med Clin* 2004; 15: 131-143, x
 - Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Genetic predispositions for immunological features in chronic liver diseases other than autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1996; 24: 52-59
 - Ma X, Qiu DK. Relationship between autoimmune hepatitis and HLA-DR4 and DRbeta allelic sequences in the third hypervariable region in Chinese. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 718-721
 - Tojo J, Ohira H, Abe K, Yokokawa J, Takiguchi J, Rai T, Shishido S, Sato Y, Kasukawa R. Autoimmune hepatitis accompanied by systemic lupus erythematosus. *Intern Med* 2004; 43: 258-262
 - Yagmur E, Weiskirchen R, Gressner AM, Trautwein C, Tacke F. Insulin resistance in liver cirrhosis is not associated with circulating retinol-binding protein 4. *Diabetes Care* 2007; 30: 1168-1172
 - Taniguchi T, Seko S, Okamoto M, Hamasaki A, Ueno H, Inoue F, Nishida O, Miyake N, Mizumoto T. Association of autoimmune pancreatitis and type 1 diabetes: autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas. *Diabetes Care* 2000; 23: 1592-1594
 - Manns MP, Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: clinical challenges. *Gastroenterology* 2001; 120: 1502-1517
 - Czaja AJ. Treatment of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 365-378
 - Feld JJ, Dinh H, Arenovich T, Marcus VA, Wanless IR, Heathcote EJ. Autoimmune hepatitis: effect of symptoms and cirrhosis on natural history and outcome. *Hepatology* 2005; 42: 53-62
 - Heneghan MA, McFarlane IG. Current and novel immunosuppressive therapy for autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002; 35: 7-13
 - 赵鸿. 自身免疫性肝炎的诊断. *中国综合临床* 2001; 17: 730-731
 - Baranov AA, Kaganov BS, Gundobina OS, Zainudinov ZM. Autoimmune hepatitis in children. *International Pediatrics* 2003; 18: 23-29

编辑 李军亮 电编 何基才

布地奈德和传统糖皮质激素直肠用药治疗远端溃疡性结直肠炎

黄美兰, 冉志华, 童锦禄, 陆丽华, 萧树东

■背景资料

布地奈德是近年新发展的难吸收性、肝脏首过清除率高的直肠局部用药制剂, 其局部药物浓度高于全身, 首次通过肝脏时即有90%被代谢, 对远端溃疡性结直肠炎患者的治疗比传统GCS制剂有更多优点。

黄美兰, 冉志华, 童锦禄, 陆丽华, 萧树东, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科 上海市消化疾病研究所 上海市200001

作者贡献分布: 黄美兰与冉志华对此文所作贡献均等; 此课题由黄美兰, 冉志华设计; 研究过程由黄美兰, 冉志华, 童锦禄及陆丽华操作完成; 数据分析由黄美兰, 冉志华及童锦禄完成; 本论文写作由黄美兰完成。

通讯作者: 冉志华, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科, 上海市消化疾病研究所. z-ran@online.sh.cn
电话: 021-68383112

收稿日期: 2007-09-27 修回日期: 2008-01-01

Effects of topical administration of budesonide and traditional glucocorticosteroids on active distal ulcerative colitis or proctitis

Mei-Lan Huang, Zhi-Hua Ran, Jin-Lu Tong, Li-Hua Lu, Shu-Dong Xiao

Mei-Lan Huang, Zhi-Hua Ran, Jin-Lu Tong, Li-Hua Lu, Shu-Dong Xiao, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China

Correspondence to: Zhi-Hua Ran, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China. z-ran@online.sh.cn

Received: 2007-09-27 Revised: 2008-01-01

Abstract

AIM: To evaluate the effects of topical administration of budesonide and traditional glucocorticosteroids on distal ulcerative colitis or proctitis and to analyze their efficacy and side effects.

METHODS: Medline, Embase and China Biological Medicine Disc were searched for randomized controlled trials and related articles comparing the effects of topical administration of budesonide and traditional glucocorticosteroids on distal ulcerative colitis or proctitis. Meta-analysis was performed with Review Manager 4.2.8.

RESULTS: Six studies met the inclusion criteria.

No significant difference was found in the endoscopic, histological and clinical remission rates for the effects of topical administration of budesonide and traditional glucocorticosteroids on active distal ulcerative colitis or proctitis ($OR = 1.21$, 95% $CI: 0.84-1.74$, $P > 0.05$; $OR = 1.08$, 95% $CI: 0.75-1.57$, $P > 0.05$, $OR = 1.09$, 95% $CI: 0.75-1.58$, $P > 0.05$). However, the effect of topical administration of budesonide on plasma cortisol level was lower than that of conventional glucocorticosteroids. There was a significant difference between them ($OR = 0.17$, 95% $CI: 0.06-0.53$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The effects of budesonide and traditional glucocorticosteroids on active distal ulcerative colitis or proctitis are similar. However, budesonide may be preferable to traditional glucocorticosteroids since its inhibitory effect on plasma cortisol level is lower than glucocorticosteroids.

Key Words: Budesonide; Glucocorticosteroids; Enema; Ulcerative colitis; Ulcerative proctitis; Meta-analysis

Huang ML, Ran ZH, Tong JL, Lu LH, Xiao SD. Effects of topical administration of budesonide and traditional glucocorticosteroids on active distal ulcerative colitis or proctitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 326-331

摘要

目的: 系统分析布地奈德和传统糖皮质激素直肠局部用药治疗远端溃疡性结直肠炎的疗效, 客观评价两者疗效及副作用。

方法: 通过Medline、Embase及中国生物医学文献数据库检索有关布地奈德和传统糖皮质激素直肠局部用药治疗远端溃疡性结直肠炎疗效的随机对照试验及相关文献, 采用RevMan4.2.8进行荟萃分析。

结果: 按照入选标准, 共有6项研究被纳入本荟萃分析。结果显示, 布地奈德直肠局部用药

■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所; 王晓艳, 副教授, 中南大学湘雅三医院消化内科

治疗远端溃疡性结直肠炎与传统糖皮质激素相比在内镜下、病理组织学及临床疗效方面都无显著差异($OR = 1.21$, 95% CI: 0.84-1.74, $P > 0.05$; $OR = 1.08$, 95% CI: 0.75-1.57, $P > 0.05$; $OR = 1.09$, 95% CI: 0.75-1.58, $P > 0.05$); 但对机体内源性皮质醇产生的抑制影响比传统糖皮质激素要小, 差异有显著性($OR = 0.17$, 95% CI: 0.06-0.53, $P < 0.05$).

结论: 布地奈德与传统糖皮质激素直肠局部用药治疗远端溃疡性结直肠炎的疗效相似, 但由于其对机体内源性皮质醇的抑制程度比传统糖皮质激素较轻, 故可能在应用上更优于后者.

关键词: 布地奈德; 糖皮质激素; 灌肠; 溃疡性结肠炎; 溃疡性直肠炎; Meta分析

黄美兰, 冉志华, 童锦禄, 陆丽华, 萧树东. 布地奈德和传统糖皮质激素直肠用药治疗远端溃疡性结直肠炎. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 326-331

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/326.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)至今仍是一种病因不明的结肠慢性炎症性疾病, 发病率有逐年上升趋势. 患者结肠黏膜病变累及结肠的范围不同, 但大多数都会累及到直肠. 对结肠病变范围广泛的患者(超过结肠脾曲)一般推荐 po 5-ASA制剂, 而对于病变仅累及远端结直肠的患者, 更推荐直肠用药.

肾上腺糖皮质类固醇(GCS)是治疗UC的药物之一, 是急性期诱导缓解可迅速奏效的制剂. 近年来新发展了几种难吸收性或肝脏首过清除率增加的直肠局部用药制剂, 布地奈德(budesonide)是其中之一, 这类药物对远端溃疡性结直肠炎患者的治疗比传统GCS制剂有更多优点. 布地奈德直肠局部用药制剂, 其局部药物浓度高于全身, 首次通过肝脏时即有90%被代谢. 本文就布地奈德直肠用药与传统GCS直肠用药对远端溃疡性结直肠炎患者的疗效及副作用进行荟萃分析, 旨在了解两者间在疗效及副作用方面是否存在差异, 以利于临床更恰当及有依据地运用这些药物.

1 材料和方法

1.1 材料 采集比较布地奈德与传统糖皮质激素直肠局部治疗剂治疗远端溃疡性结直肠炎疗效的随机对照试验及相关文献. 以“溃疡性

结肠炎”, “治疗”, “直肠用药”, “布地奈德”, “糖皮质激素”, “随机对照试验”和“人”为关键词检索Medline(1966-01/2006-11), Embase(1980-01/2006-11)和中国生物医学数据库(1980-01/2006-11), 由2名作者单独检索并交叉核对, 查阅所获得资料的参考文献索引, 手工检索相应文献.

1.2 方法

1.2.1 入选标准: (1)有关两种疗法的前瞻性、随机、对照临床实验; (2)研究对象年龄不小于18周岁; (3)所有的病例都确诊为溃疡性结直肠炎2 wk以上; (4)入选研究前1 mo内未使用糖皮质激素或前3 mo内未使用过免疫抑制剂; (5)药物疗效判断包括有临床症状、内镜下分析及病理组织学判断; (6)药物副作用判断标准都有血清皮质醇浓度测定.

1.2.2 排除标准: (1)非随机研究, 观察性研究, 综述; (2)研究对象不符合纳入标准; (3)实验研究中有加用其他直肠局部用药; (4)对失访对象无具体描述; (5)对同一组研究的重复报道.

1.2.3 资料质量评价: 对收集到的文献, 分别由2位研究者独立阅读文献标题、摘要和全文等以确定符合纳入标准的文献, 并对每一篇符合纳入标准的文献进行评价, 不同意通过讨论解决. 质量评分标准用Jadad方法^[1], 包括: 随机分配方法, 是否采用盲法, 随访等情况(表1).

统计学处理 系统分析软件为Cochrane协作网提供的RevMan4.2.8. 采用 χ^2 检验进行各研究间的异质性检验, 假设齐性检验的 α 值为0.05, 齐性检验的 $P > 0.05$ 则 RR 是齐性的, 否则为非齐性, 如果 RR 齐性, 采用固定效应模型进行统计, 非齐性采用随机效应模型进行统计.

2 结果

2.1 纳入文献状况 通过计算机、手工和参考索引检索, 结果共检出12篇相关文献. 阅读全文或摘要后发现2篇随机对照实验使用相同数据和资料^[2], 2篇实验数据无法纳入统计^[3-4], 1篇实验对象为出血性直肠炎患者^[5], 2篇为布地奈德灌肠剂与5-ASA制剂进行疗效比较^[6-7], 予删除. 最后共有6项前瞻性、随机、对照实验符合入选要求而被采用(表2).

2.2 布地奈德和传统糖皮质激素直肠局部用药法的评价 (1)采用固定效应模型, 布地奈德与传统糖皮质激素直肠局部用剂治疗远端溃疡性结直肠炎相比, 内镜下病变改善程度相似, 两者

■相关报道

国内由于药物供应问题, 没有相关临床大规模前瞻性、随机、对照实验结果的报道.

■创新盘点

本文通过荟萃分析对两药疗效和不良反应所做的多个独立研究结果进行系统的定性或定量的综合, 能将以往的研究结果更为客观地综合反映出来, 提供真实的科学结论.

■应用要点

本文就布地奈德直肠用药与传统GCS直肠用药对远端溃疡性结直肠炎患者的疗效及副作用进行荟萃分析,以利于临床更恰当且有依据地运用这些药物。

表 1 Jadad评分标准

指标	符合要求	不符合要求
分组方案	根据随机数字表或计算机随机产生的数字(2分)	未有描述(1分)半随机或假随机(0分)
分组隐藏	随机数字置于封好的信封中或类似方法(2分)	未有描述(1分)随机数字打开或轻易可见(0分)
双盲	对照组严格采用安慰剂或类似的盲法方案(2分)	未采用安慰剂方案(1分)两组用药途径完全不同(0分)无盲法(0分)
随访	描述任何失访或退出的人数及理由(1分)	未描述失访或退出的人数及理由(0分)

总分 ≤ 2 分者为低质量文章, ≥ 3 分者为高质量文章。

表 2 入选各随机对照实验特点

第一作者	发表年	药物(剂量)	剂型	用法	治疗时间(wk)	Jadad评分(分)
Hammond A ^[9]	2004	布地奈德(40 mg/L)/ 倍他米松(50 mg/L)	泡沫剂/ 灌肠剂	前2 wk 2次/d, 后2 wk 晚间睡前1次/d	4	3
Danielsson A ^[10]	1987	布地奈德(20 mg/L)/ 泼尼松龙(250 mg/L)	灌肠剂/ 灌肠剂	晚间睡前1次	4	4
Lofberg R ^[11]	1994	布地奈德(20 mg/L)/ 泼尼松龙(250 mg/L)	灌肠剂/ 灌肠剂	晚间睡前1次	8	5
Matzen P ^[12]	1991	布地奈德(20 mg/L)/ 泼尼松龙(250 mg/L)	灌肠剂/ 灌肠剂	晚间睡前1次	2	4
Bar-Meir S ^[13]	2003	布地奈德(100 mg/L)/ 氢化考地松(6666 mg/L)	泡沫剂/ 泡沫剂	晚间睡前1次	8	4
Bianchi Porro G ^[14]	1994	布地奈德(20 mg/L)/ 甲基强地松龙(250 mg/L)	灌肠剂/ 灌肠剂	晚间睡前1次	4	4

的改善率分别是59.4%(95% CI: 35.7%-83.1%)
和52.2%(95% CI: 38.9%-65.5%), 无统计学差异
($OR = 1.21$, 95% CI: 0.84-1.74, $P > 0.05$)(表3)。 (2) 采用固定效应模型, 布地奈德与传统糖皮质激素
直肠局部用剂治疗远端溃疡性结直肠炎相比, 病理组织学改善程度相似, 改善率分别是
46.6%(95% CI: 17%-76.2%)和43.8%(95% CI:
30.1%-57.5%), 无统计学差异($OR = 1.08$, 95%
CI: 0.75-1.57, $P > 0.05$)(表4)。 (3)采用固定效应
模型, 布地奈德与传统糖皮质激素直肠局部用
剂治疗远端溃疡性结直肠炎相比, 两种治疗法
的临床症状缓解率亦相似, 两者的缓解率分别
是57.6%(95% CI: 36%-79.2%)和54.3%(95% CI:
39.3%-69.3%), 也无统计学差异($OR = 1.09$, 95%
CI: 0.75-1.58, $P > 0.05$)(表5)。 (4)采用随机效应模
型, 布地奈德对血清皮质醇浓度的抑制程度明
显的低于传统糖皮质激素, 其副作用更小, 两者
对血清皮质醇的抑制率分别是9%和27.1%, (OR
 $= 0.17$, 95% CI: 0.06-0.53, $P < 0.05$)(表6)。 Danielsson *et al*^[10]对血清皮质醇浓度抑制程度的计算
方式与其他5组实验不同, 无法纳入荟萃。 但该作

者的结论与其余5组一致, 故不会影响荟萃结果。

3 讨论

本系统评价纳入的研究质量较齐, 所有研究按
明确的纳入和排除标准, 均为随机、对照研究
方法, 对失访者均有描述, 但未提及具体的随机
方法, 分组隐藏未有描述, 也未提及评价者是否
应用盲法。 根据Jadad评分标准, 均为高质量文
章, 因此由此产生的偏倚较少。

布地奈德是一种结构上与16 α 羟基泼尼松
龙相关的非卤化糖皮质激素, 与糖皮质激素受
体的高度亲和力使其具备很强的局部抗炎效
果^[6]。 布地奈德首次通过肝脏约90%被代谢, 代
谢产物没有明显的糖皮质激素活性, 故全身副
作用很小^[15]。 目前布地奈德已经被用于哮喘、过
敏性关节炎、炎症性肠病(包括溃疡性结直肠炎
和克罗恩病)及回肠囊袋炎^[16]的治疗中, 局部用
于远端溃疡性结直肠炎治疗的制剂分别有灌肠
剂和泡沫剂两种。 有一项大型临床研究已经证
实, 布地奈德泡沫制剂与其灌肠剂在治疗活动
性溃疡性直肠炎或直肠乙状结肠炎的疗效方面

表 3 内镜下改善率Peto比值(固定效应模式)

Study or sub-category	Treatment n/N	Control n/N	OR(fixed) 95% CI	Weight %	OR(fixed) 95% CI
Danielsson A 1987	26/28	21/28		2.84	4.33 [0.81, 23.10]
Bianchi Porro G 1994	20/24	20/44		20.65	1.00 [0.43, 2.31]
Lofberg R 1994	18/45	28/55		28.63	0.64 [0.29, 1.43]
Bar-Meir S 2003	71/120	64/128		47.88	1.45 [0.88, 2.40]
Total (95% CI)	237	255		100.00	1.21 [0.84, 1.74]
Total events: 135 (Treatment), 133 (Control)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 5.34$, $df = 3$ ($P = 0.15$), $I^2 = 43.8\%$					
Test for overall effect: $Z = 1.01$ ($P = 0.31$)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10		
			Favours treatment Favours control		

■同行评价

本文写作规范, 分析严谨, 结论可靠, 具有较强的临床应用价值。

表 4 病理组织学改善率Peto比值(固定效应模式)

Study or sub-category	Treatment n/N	Control n/N	OR(fixed) 95% CI	Weight %	OR(fixed) 95% CI
Danielsson A 1987	21/23	12/22		2.00	8.75 [1.64, 46.75]
Bianchi Porro G 1994	20/44	20/44		20.45	1.00 [0.43, 2.31]
Lofberg R 1994	9/45	13/55		17.55	0.81 [0.31, 2.11]
Bar-Meir S 2003	58/120	64/128		60.00	0.94 [0.57, 1.54]
Total (95% CI)	232	249		100.00	1.08 [0.75, 1.57]
Total events: 108 (Treatment), 109 (Control)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 6.70$, $df = 3$ ($P = 0.08$), $I^2 = 55.2\%$					
Test for overall effect: $Z = 0.42$ ($P = 0.68$)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10		
			Favours treatment Favours control		

无显著差异, 两种制剂对患者都是安全的^[17], 本次分析将以布地奈德泡沫剂作为治疗制剂的实验也归于其中一并分析。

目前的临床实验中布地奈德灌肠剂剂量有10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L和80 mg/L四种不等, 泡沫剂为80 mg/L。根据几位学者的临床实验结果显示20 mg/L是其最低起效剂量, 也是对下丘脑-垂体-肾上腺轴影响最小剂量^[18]。而20 mg/L和40 mg/L的布地奈德灌肠剂剂量, 其对远端溃疡性结肠炎的治疗效果无显著性差异^[12]。根据该结果, 大部分的临床试验都是以20 mg/L的布地奈德灌肠剂剂量与传统糖皮质激素比较治疗远端溃疡性结直肠炎患者, 而各传统糖皮质激素在不同实验中的剂量较统一, 相同的激素剂量多一致, 为各自在临床应用中的最佳剂量。

本荟萃分析共收集6项前瞻性、随机、对照临床试验, 各项试验患者的基础资料间无显著差异, 因此具有远端溃疡性结直肠炎患者的代表性。结果发现布地奈德直肠用药与传统的

糖皮质激素(包括氢化可的松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙和倍他米松)在治疗的疗效方面无显著性差异, 改善和缓解率都相似, 该疗效的评判包括临床症状、内镜下评分和病理组织学标准。但在副作用方面, 布地奈德直肠局部用药对下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响远小于传统的糖皮质激素, 故其对内源性皮质醇产生的抑制作用明显低于传统糖皮质激素。虽然在一般情况下这种影响不一定表现出来, 但是一旦患者处于某种应激状态时, 肾上腺皮质醇的分泌及其作用将至关重要。在用药时间方面各实验显示布地奈德直肠用药对远端溃疡性结直肠炎2 wk治疗可能不足以使该治疗手段达到最佳疗效, 其效果不及4 wk和8 wk的治疗; 且即使用药至8 wk, 布地奈德对下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响也不是很明显, 这点对临床用药时间的掌控有指导意义。另一方面, 相同剂量的布地奈德灌肠剂与泡沫剂在各组疗效方面没有显著差异^[17]。药物制剂的用药方便性及耐受性也是影响药物最

表 5 临床缓解率Peto比值(固定效应模式)

Study or sub-category	Treatment n/N	Control n/N	OR(fixed) 95% CI	Weight %	OR(fixed) 95% CI
Bianchi Porro G 1994	36/44	26/44		8.84	3.12 [1.18, 8.25]
Lofberg R 1994	16/45	26/55		28.19	0.62 [0.27, 1.38]
Bar-Meir S 2003	64/120	67/128		56.57	1.04 [0.63, 1.71]
Hammond A 2004	17/22	13/16		6.40	0.78 [0.16, 3.90]
Total (95% CI)	231	243		100.00	1.09 [0.75, 1.58]
Total events: 133 (Treatment), 132 (Control)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 6.59$, $df = 3$ ($P = 0.09$), $I^2 = 54.4\%$					
Test for overall effect: $Z = 0.44$ ($P = 0.66$)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10		
			Favours treatment Favours control		

表 6 血清皮质醇抑制率Peto比值(随机效应模式)

Study or sub-category	Treatment n/N	Control n/N	OR(random) 95% CI	Weight %	OR(random) 95% CI
Matzen P 1991	4/28	9/20		22.14	0.20 [0.05, 0.81]
Bianchi Porro G 1994	11/44	25/44		27.33	0.25 [0.10, 0.63]
Lofberg R 1994	0/45	24/55		10.61	0.01 [0.00, 0.24]
Bar-Meir S 2003	4/120	5/128		22.55	0.85 [0.22, 3.24]
Hammond A 2004	4/18	13/15		17.37	0.40 [0.01, 0.53]
Total (95% CI)	255	262		100.00	0.17 [0.06, 0.53]
Total events: 23 (Treatment), 76 (Control)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 11.21$, $df = 4$ ($P = 0.02$), $I^2 = 64.3\%$					
Test for overall effect: $Z = 3.08$ ($P = 0.002$)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10		
			Favours treatment Favours control		

终治疗疗效的一个重要方面,而对布地奈德直肠局部用药制剂的优越性及患者的依从性进行比较后发现,泡沫剂由于其用药方式的方便性,患者更易接受并执行,从而提高其用药依从性,这对溃疡性疾病的治疗也起着重要作用^[17]。由这些结果提示,在临床上布地奈德直肠局部治疗剂可能比传统糖皮质激素直肠局部治疗剂在治疗远端溃疡性结肠炎方面更有应用前景。本分析结果对今后临床上这类药物的使用有一定的指导意义。

另外,有学者亦将20 mg/L布地奈德灌肠剂与1 g和4 g的5-ASA灌肠剂作实验比较,两两间的疗效及副作用相似^[7-8]。另有实验结果得出,对po或直肠用5-ASA制剂治疗失败的远端溃疡性结肠炎的患者,再用布地奈德直肠局部用药(泡沫剂和液体灌肠剂)其有效率分别是49%, 41%及50%, 62%。所以在用5-ASA制剂治疗失败的患者中,布地奈德的局部用药是一种较好的治

疗手段^[17]。Bar-Meir *et al*^[13]的研究亦表明,对美沙拉嗪灌肠治疗效果不佳的患者改用布地奈德直肠局部用药,仍可以达到可观的临床治疗疗效。

此荟萃分析仍存在一些不足,大部分入选的临床实验对布地奈德直肠局部用药副作用的检测仅局限于其对下丘脑-垂体-肾上腺轴的抑制影响患者自身血清皮质醇水平这一点,而对激素常易引起的其他副作用如Cushing's面容、骨质缺乏等未作描述。另外,国内由于药物供应的问题还没有相关临床大规模前瞻性、随机、对照实验的结果。如果加入亚洲人群实验数据,可能最终的结果涵盖面更广泛,适用性更强。

4 参考文献

- Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17:

- 1-12
- 2 Thomsen O, Andersen T, Langholz E, Lofberg R, Malchow-Moller A, Matzen P, Nordstorm H, Persson T. Lack of adrenal gland suppression with budesonide enema in active distal ulcerative colitis: a prednisolone-controlled 8-week study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6: 507-511
- 3 Bayless T, Sninsky C for the US Budesonide Enema Study Group. Budesonide enema is an effective alternative to hydrocortisone enema in active distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1995; 108: A778
- 4 Schlottmann K, Bregenzer N, Caesar I. Open randomized, multicenter trial comparing safety and efficacy of budesonide foam with betamethasone enema in patients with active distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1998; 114: A1078
- 5 Tarpila S, Turunen U, Seppälä K, Aukee S, Pikkarainen P, Elomaa I, Karvonen AL, Kääriäinen I, Sipponen P, Toivanen E. Budesonide enema in active haemorrhagic proctitis—a controlled trial against hydrocortisone foam enema. *Aliment Pharmacol Ther* 1994; 8: 591-595
- 6 Brunner M, Vogelsang H, Greinwald R, Kletter K, Kvaternik H, Schrolnberger C, Eichler HG, Brunner H, Dudczak R, Maller M. Colonic spread and serum pharmacokinetics of budesonide foam in patients with mildly to moderately active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 463-470
- 7 Lambers C, Meijer JL, Engels L, Bos R, van Hogezaand W, Driessen S, van der Werf P, van Hees J, Nadorp N, van Bentem C, Seidegard T, Persson L. Comparative study of the topically acting glucocorticosteroid budesonide and 5-aminosalicylic acid enema therapy of proctitis and proctosigmoiditis. *Gastroenterology* 1991; 100: A223
- 8 Lemann M, Galian A, Rutgeerts P, Van Heuverszwijn R, Cortot A, Viteau JM, Elewaut A, Belaiche J, Froguel E, Modigliani R. Comparison of budesonide and 5-aminosalicylic acid enemas in active distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9: 557-562
- 9 Hammond A, Andus T, Gierend M, Ecker KW, Scholmerich J, Herfarth H. Controlled, open, randomized multicenter trial comparing the effects of treatment on quality of life, safety and efficacy of budesonide foam and betamethasone enemas in patients with active distal ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1345-1349
- 10 Danielsson A, Hellers G, Lyrenas E, Lofberg R, Nilsson A, Olsson O, Olsson SA, Persson T, Salde L, Naesdal J. A controlled randomized trial of budesonide versus prednisolone retention enemas in active distal ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 987-992
- 11 Lofberg R, Ostergaard Thomsen O, Langholz E, Schioler R, Danielsson A, Suhr O, Graffner H, Pahlman L, Matzen P, Moller-Petersen JF. Budesonide versus prednisolone retention enemas in active distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1994; 8: 623-629
- 12 Budesonide enema in distal ulcerative colitis. A randomized dose-response trial with prednisolone enema as positive control. The Danish Budesonide Study Group. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 1225-1230
- 13 Bar-Meir S, Fidler HH, Faszczuk M, Bianchi Porro G, Sturniolo GC, Mickisch O, Muller R, Greinwald R, Chowers Y, Grobeta V. Budesonide foam vs. hydrocortisone acetate foam in the treatment of active ulcerative proctosigmoiditis. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 929-936
- 14 Bianchi Porro G, Prantera C, Campieri M, Petrillo M, Cristina Campanini M, Gionchetti P, Grandinetti G, Mangiarotti R, Brunetti G, Ranzi T. Comparative trial of methylprednisolone and budesonide enemas in active distal ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6: 125-113
- 15 Greenberg GR, Feagan BG, Martin F, Sutherland LR, Thomson AB, Williams CN, Nilsson LG, Persson T. Oral budesonide as maintenance treatment for Crohn's disease: a placebo-controlled, dose-ranging study. Canadian Inflammatory Bowel Disease Study Group. *Gastroenterology* 1996; 110: 45-51
- 16 Sambuelli A, Boerr L, Negreira S, Gil A, Camartino G, Huernos S, Kogan Z, Cabanne A, Graziano A, Peredo H, Doldan I, Gonzalez O, Sugai E, Lumi M, Bai JC. Budesonide enema in pouchitis—a double-blind, double-dummy, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 27-34
- 17 Gross V, Bar-Meir S, Lavy A, Mickisch O, Tulassay Z, Pronai L, Kupcinkas L, Kiudelis G, Pokrotnieks J, Kovacs A, Faszczuk M, Razbadauskas A, Margus B, Stolte M, Muller R, Greinwald R. Budesonide foam versus budesonide enema in active ulcerative proctitis and proctosigmoiditis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 303-312
- 18 Hanauer SB, Robinson M, Pruitt R, Lazenby AJ, Persson T, Nilsson LG, Walton-Bowen K, Haskell LP, Levine JG. Budesonide enema for the treatment of active, distal ulcerative colitis and proctitis: a dose-ranging study. U.S. Budesonide enema study group. *Gastroenterology* 1998; 115: 525-532

编辑 李军亮 电编 何基才

Peutz-Jeghers综合征合并肿瘤分析26例

吴绍新, 林 军

■背景资料

黑斑息肉病是一种较罕见的常染色体显性遗传病, 其发病机制、恶变情况及治疗方案等方面存在诸多争议。

吴绍新, 林军, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

作者贡献分布: 吴绍新、林军对此文所作贡献均等。此课题由林军指导, 吴绍新设计, 研究过程, 数据分析、论文写作由吴绍新完成。

通讯作者: 林军, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院消化内科, linjun64@yahoo.com.cn

电话: 027-67813072

收稿日期: 2007-07-30 修回日期: 2007-12-12

Peutz-Jeghers syndrome with tumors: an analysis of 26 cases

Shao-Xin Wu, Jun Lin

Shao-Xin Wu, Jun Lin, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Jun Lin, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China. linjun64@yahoo.com.cn

Received: 2007-07-30 Revised: 2007-12-12

Abstract

AIM: To analyze Peutz-Jeghers syndrome with tumors and its treatment modalities and follow-up program.

METHODS: Retrospective clinical data on 26 cases admitted to the First and Second Affiliated Hospitals of Jingchu University of Technology from September 1986 to August 2006 were analyzed.

RESULTS: Ten patients (38.46%) had a clear family history of Peutz-Jeghers syndrome. The main manifestations were skin and mucosa pigmentation, abdominal pain and hematochezia. Bowel obstruction was found in 14 patients (53.85%), alimentary tract hemorrhage in 10 patients (38.46%), and malignant diseases in 6 patients (23.08%) (colonic cancer in three patients and gastric cancer in the other 3 patients). The average age of the patients at the diagnosis was 31 years. The pathohistology showed poorly-differentiated mucinous adenocarcinomas in all the patients. The main treatment modalities used were high frequency electric polypectomy under endoscope, polyposis intestinalis polypectomy and partial excision of the bowel.

■同行评议者

孙延平, 副教授, 上海第二军医大学附属长征医院普外科

CONCLUSION: Peutz-Jeghers syndrome patients have a high morbidity of cancer. Peutz-Jeghers syndrome occurs at a young age. Repeated endoscopy, high frequency electric polypectomy and regular screening for cancer can improve its long term curative effect.

Key Words: Peutz-Jeghers syndrome; Gastroenteric tumor

Wu SX, Lin J. Peutz-Jeghers syndrome with tumors: an analysis of 26 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 332-334

摘要

目的: 分析Peutz-Jeghers综合征及合并癌变的临床特征, 总结其治疗和随访方案。

方法: 回顾性分析荆楚理工学院附属第一、二临床医院1986-09/2006-08间收治的26例Peutz-Jeghers综合征患者的临床资料。

结果: 10例患者(38.46%)家族史明确, 临床以皮肤黏膜色素沉着、腹痛及便血为主要表现。并发肠梗阻14例(53.85%), 消化道出血10例(38.46%); 发生恶变6例(23.08%), 其中结肠癌3例, 胃癌3例, 平均确诊年龄31岁, 恶变者的病理组织学分型均为低分化黏液腺癌。内镜下高频电凝息肉切除术、开腹肠道息肉切除及肠部分切除术为主要治疗手段。

结论: Peutz-Jeghers综合征患者是恶性肿瘤的高发人群, 肿瘤患者发病年龄轻, 分化较差。定期复查内镜, 以内镜高频电凝积极处理肠息肉, 以及筛查肿瘤是提高Peutz-Jeghers综合征远期疗效的有效方法。

关键词: Peutz-Jeghers综合征; 胃肠道肿瘤

吴绍新, 林军. Peutz-Jeghers综合征合并肿瘤分析26例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(3): 332-334

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/332.asp>

0 引言

Peutz-Jeghers综合征亦称黑斑息肉病, 是一种

较罕见的常染色体显性遗传病。其临床特点为消化道错构瘤性息肉和黏膜、肢端色素沉着。消化道息肉常可以导致腹痛、消化道出血和肠套叠、肠梗阻等急症。由于Peutz-Jeghers综合征相对罕见, 并以前认为其胃肠道息肉属错构瘤性质, 不是癌前病变^[1], 所以有时候对其容易发展为恶性肿瘤的特点重视不够, 对息肉的处理和患者的随访上还存在不足。我们回顾性分析荆楚理工学院附属第一、二临床医院1986-09/2006-08收治26例Peutz-Jeghers综合征患者的临床特点和恶变所发生的特点, 总结其治疗和随访策略。

1 材料和方法

1.1 材料 1986-09/2006-08荆楚理工学院附属第一、二临床医院收治Peutz-Jeghers综合征患者的26例, 男14例, 女12例, 年龄4-53(平均26)岁, 12岁以下3例, 13-20岁15例, 20岁以上8例, 发生恶变患者确诊时的平均年龄为32岁, 住院次数最多达7次, 平均2.1次, 10例患者(38.46%)家族史明确, 20例(76.92%)患者以腹痛, 14例患者(53.85%)以便血为主要症状, 同时有腹痛及便血者10例(38.46%)。所有患者均有口腔、口唇黏膜色素沉着, 其中11例患者有手掌、足底色素沉着, 8例患者有颜面部色素沉着。所有患者经内镜、消化道造影及手术证实诊断, 均有小肠多发性息肉, 其中15例患者还有胃十二指肠多发性息肉, 12例患者还有结肠多发性息肉, 10例患者则全消化道均有多发性息肉。并发肠梗阻14例(53.85%), 消化道出血10例(38.46%), 发生恶变6例(23.08%), 其中结肠癌3例, 胃癌3例, 病理学分型均为黏液腺癌, 无肝和肺的转移。

1.2 方法 回顾性分析26例Peutz-Jeghers综合征患者的临床资料, 总结其治疗和随访策略。具有以下特点的患者, 临床诊断为黑斑息肉病: (1)具有典型的消化道错构瘤性息肉伴特征性部位黑斑色素沉着, 无论其有无家族史; (2)有明确的家族史, 仅具有以上两种特点之一的患者。

2 结果

22例患者在内镜下行高频电凝息肉切除术, 最少1次, 其中1例患者达6次, 平均2.5次, 其中有18例患者因出现严重并发症(如肠道出血、肠套叠和肠梗阻)而行急诊剖腹探查手术, 9例患者在术中行多处肠道切开息肉摘除术, 4例患者在结肠镜下切开小肠一次切除多个息肉。内镜下及手

术探查中所见胃肠道息肉, 大部分均为有蒂状, 多发, 直径大小不一, 最小0.2 cm, 最大4.2 cm。术后病理诊断, 其中24例的组织学结构为错构瘤或腺瘤性息肉, 6例发生恶变者病理组织学分型均为低分化黏液腺癌, 无淋巴结及肝、肺等远处转移, 其中错构瘤性息肉发生癌变者5例, 腺瘤性息肉发生癌变者1例。发生恶变的息肉直径均大于2 cm, 最大者超过4.2 cm。术中及术后患者一般情况平稳, 均顺利出院。对所有患者进行随访(1986-09/2006-08), 失访3例, 期间2-3年定期复查纤维结肠镜、胃镜或消化道造影等检查, 如发现有较大息肉(直径大于2.0 cm), 则积极手术或内镜下行高频电凝切除, 9例患者经2-6次内镜下行高频电凝息肉切除术或开腹手术治疗, 至随访结束患者均健在。

3 讨论

1921年, Peutz首先描述此病。1949年Jeghers *et al*^[1]对本病进行系统总结, 以后本病即被称为Peutz-Jeghers综合征。该综合征具有三大特征: (1)特定部位皮肤及黏膜的色素沉着, 口腔及口唇黏膜最多见, 其次为手掌、足底; (2)多发性胃肠道息肉, 息肉可以发生在胃至直肠的任何部位, 以空肠和回肠最为多见, 其次为十二指肠, 有约1/3的患者累及结肠和直肠, 约1/4的患者累及胃; (3)遗传性, Peutz-Jeghers综合征是一种常染色体显性遗传病, 有很高的外显率, 男性和女性均可携带遗传基因, 家族中数人发病者并不少见, 约有30%-50%的患者有阳性家族史^[2], 而息肉分布的广泛性与遗传不一定有直接的关系。本组10例患者(38.46%)家族史明确, 与文献报道相符。该病由单基因突变即可致病, Smith *et al*^[3]发现LKB1为其致病基因, 定位于19p13.3, 编码丝苏氨酸激酶, LKB1为一丝氨酸/苏氨酸激酶, 属未知的信息传导系统, 可能影响黏膜上皮细胞的分化。本组病例13-20岁者13例(50%), 与文献报道相符。本病多发于青春期^[4]。

关于本病能否癌变尚有争议。有研究^[1]表明: Peutz-Jeghers综合征息肉主要是错构瘤性息肉, 是由过度增生的正常黏膜腺体组成, 故不是癌前病变。Dong *et al*^[4]提出本病发生结肠癌的机会增加。本组临床资料表明, 26例中有6例发生恶变, 发生率为23.08%, 恶性肿瘤确诊时的平均年龄为32岁, 病理组织学分型均为低分化黏液腺癌。关于Peutz-Jeghers综合征息肉发生癌变的机制, Wang *et al*^[2]提出, 一方面确实存在错构瘤-

■应用要点

本文通过对26例Peutz-Jeghers综合征患者的临床特征分析, 提出对本病患者的息肉应积极治疗, 尤其是孤立的大于2 cm的息肉应尽早切除, 对患者还应积极随访, 达到早期发现、早期治疗肿瘤, 减少恶性肿瘤发生的目的。

■同行评价

本文选题新颖, 分析透彻, 具有较好的参考价值和临床指导意义。

腺瘤-癌的发生途径, 但只占Peutz-Jeghers综合征息肉恶性肿瘤发生率的很小部分; 另一方面多数肿瘤的发生是通过导致本病的LKB1(STK11)基因的杂合性缺失而发生, 遵循Knudson^[5]二次打击途径, 符合经典的遗传性肿瘤发生理论. 约60%的Peutz-Jeghers综合征患者有LKB1(STK11)基因的先天性缺陷^[6], 该基因属于抑癌基因, 其先天性功能缺陷导致相关信息传导通路的功能缺陷.

由于该病患者息肉为多发, 并散布于胃肠道的各个部位, 很难将息肉全部切除. 本组病例资料显示出Peutz-Jeghers综合征患者的恶性肿瘤发生早, 分化差.

本组临床资料还显示, 发生恶变的息肉直径均大于2 cm, 表明息肉越大, 发生恶变的几率也越高. 我们认为, 此病虽然少见, 但更应注意其临床特点, 详细询问家族史. 一旦本病诊断成立, 对于Peutz-Jeghers综合征患者息肉应积极治疗, 尤对孤立的大于2 cm的息肉, 或息肉密集于一段肠管并有剧烈腹痛者, 应尽早切除, 2-3年内定期复查结肠镜、胃镜, 如发现有较大息肉, 应积极手术或内镜下高频电凝切除, 以减少恶性肿瘤的发生. 无论患者是否有家族史, 建议对所有患

者均积极随访, 以达到早期诊断、减少急性并发症、早期发现和治疗肿瘤, 减少恶性肿瘤的发生.

4 参考文献

- 1 Jeghers H, Mckusick VA, Katz KH. Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits; a syndrome of diagnostic significance. *N Engl J Med* 1949; 241: 993, illust; passim
- 2 Wang ZJ, Ellis I, Zauber P, Iwama T, Marchese C, Talbot I, Xue WH, Yan ZY, Tomlinson I. Allelic imbalance at the LKB1 (STK11) locus in tumours from patients with Peutz-Jeghers' syndrome provides evidence for a hamartoma-(adenoma)-carcinoma sequence. *J Pathol* 1999; 188: 9-13
- 3 Smith DP, Rayter SI, Niederlander C, Spicer J, Jones CM, Ashworth A. LIP1, a cytoplasmic protein functionally linked to the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2869-2877
- 4 Dong K, Li B. Peutz-Jeghers syndrome: case reports and update on diagnosis and treatment. *Chin J Dig Dis* 2004; 5: 160-164
- 5 Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 820-823
- 6 Wang ZJ, Churchman M, Avizienyte E, McKeown C, Davies S, Evans DG, Ferguson A, Ellis I, Xu WH, Yan ZY, Aaltonen LA, Tomlinson IP. Germline mutations of the LKB1 (STK11) gene in Peutz-Jeghers patients. *J Med Genet* 1999; 36: 365-368

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 •

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 2008-01-08)

肿瘤患者血清IAP、T细胞亚群和NK与抑郁之间的关系

李荣, 王杰军, 钱建新, 顾小强

李荣, 王杰军, 钱建新, 顾小强, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院肿瘤科 上海市 200070

作者贡献分布: 此课题由李荣、王杰军设计, 研究过程由李荣、钱建新、顾小强操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王杰军提供, 数据分析由李荣、顾小强完成, 本论文写作由李荣、顾小强、钱建新完成。

通讯作者: 王杰军, 200070, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院肿瘤科, jiejunw@cscs.org.cn

电话: 021-66540109-7045

收稿日期: 2007-08-07 修回日期: 2007-12-25

Relationship between depression and serum immunosuppressive acidic protein, subpopulation of T lymphocytes and natural killer cells in cancer patients

Rong Li, Jie-Jun Wang, Jian-Xin Qian, Xiao-Qiang Gu

Rong Li, Jie-Jun Wang, Jian-Xin Qian, Xiao-Qiang Gu, Department of Oncology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200070, China

Correspondence to: Jie-Jun Wang, Department of Oncology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200070, China. jiejunw@cscs.org.cn

Received: 2007-08-07 Revised: 2007-12-25

Abstract

AIM: To analyze the relationship between depression and immunity indexes such as immunosuppressive acid protein (IAP) and T lymphocytes in cancer patients.

METHODS: Depression, IAP, subpopulation of T lymphocytes and natural killer cells were studied in 65 patients with advanced tumors. The relationship between depression and immune function in patients with or without depression was analyzed.

RESULTS: Compared to the control group, there was no difference in the location of cancer, involvement of illness and sex in immunity function, while there was a difference in depression between other groups. The serum levels of IAP and CD8 were significantly higher in the depression group than in the control group (IAP: 696.76 ± 331.78 vs 499.03 ± 233.74 , $P < 0.01$; CD8: 36.65 ± 14.20 vs 30.02 ± 9.78 , $P < 0.05$). The serum levels of CD4 and NK were lower in the depression group than in the control group (NK: 17.03 ± 11.36 vs 23.63 ± 13.24 , $P < 0.05$; CD4: 35.59 ± 13.10 vs 41.41 ± 8.14). There was no difference in the serum levels of CD3, CD4/CD8. IAP was negatively related with CD4 and CD4/CD8, and positively related with CD8. CD3 was not related with NK cells.

± 331.78 vs 499.03 ± 233.74 , $P < 0.01$; CD8: 36.65 ± 14.20 vs 30.02 ± 9.78 , $P < 0.05$). The serum levels of CD4 and NK were lower in the depression group than in the control group (NK: 17.03 ± 11.36 vs 23.63 ± 13.24 , $P < 0.05$; CD4: 35.59 ± 13.10 vs 41.41 ± 8.14). There was no difference in the serum levels of CD3, CD4/CD8. IAP was negatively related with CD4 and CD4/CD8, and positively related with CD8. CD3 was not related with NK cells.

CONCLUSION: Depression is correlated with the immunity function in cancer patients.

Key Words: Cancer; Depression; Immunosuppressive acid protein; Immunity

Li R, Wang JJ, Qian JX, Gu XQ. Relationship between depression and serum immunosuppressive acidic protein, subpopulation of T lymphocytes and natural killer cells in cancer patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 335-337

摘要

目的: 研究肿瘤患者血清IAP和T淋巴细胞等免疫指标与抑郁之间的关系。

方法: 对65例晚期肿瘤患者采用ZUNG量表进行抑郁调查, 同时检测血清IAP、T淋巴细胞亚群和NK细胞数量, 分析肿瘤患者抑郁与免疫功能之间的关系。

结果: 免疫功能与肿瘤部位、病情进展情况、性别之间无显著相关性, 而抑郁与免疫功能检测指标之间呈显著相关; 抑郁组肿瘤患者血清IAP和CD8高于非抑郁组(IAP: 696.76 ± 331.78 vs 499.03 ± 233.74 , $P < 0.01$; CD8: 36.65 ± 14.20 vs 30.02 ± 9.78 , $P < 0.05$), 而NK和CD4低于非抑郁组(NK: 17.03 ± 11.36 vs 23.63 ± 13.24 , $P < 0.05$; CD4: 35.59 ± 13.10 vs 41.41 ± 8.14), CD3、CD4/CD8两组间比较无统计学差异; IAP与CD4和CD4/CD8呈负相关, 与CD8呈正相关, 与NK和CD3间无显著相关性。

结论: 肿瘤患者免疫功能抑制与抑郁状态相关。

关键词: 肿瘤; 抑郁; 免疫抑制酸性蛋白; 免疫

李荣, 王杰军, 钱建新, 顾小强. 肿瘤患者血清IAP、T细胞亚

■背景资料

恶性肿瘤患者常伴随情绪上的变化, 抑郁是常见的情绪障碍之一。而关于抑郁与免疫功能之间关系的研究中, 引入与肿瘤免疫功能和肿瘤预后密切相关的指标IAP, 尚不多见。

■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院普通外科

■应用要点

IAP在决定肿瘤治疗及判断预后方面有着重要的参考价值,同时,大量研究证明动态观察IAP的变化可用来评价肿瘤的治疗效果及预后。

表 1 混杂因素与肿瘤患者免疫功能之间的分析

	性别		疾病部位		进展与否		抑郁与否	
	F	P	F	P	F	P	F	P
IAP	1.647	0.204	2.810	0.068	0.434	0.513	7.577	0.008
NK	0.545	0.463	0.382	0.684	0.104	0.749	4.674	0.034
CD3	0.339	0.562	1.244	0.295	0.488	0.487	2.333	0.132
CD4	2.347	0.131	1.293	0.282	0.799	0.375	4.525	0.037
CD8	0.438	0.510	0.073	0.929	0.128	0.721	4.715	0.034
CD4/CD8	2.120	0.150	0.062	0.940	0.035	0.852	2.790	0.100

表 2 抑郁组与非抑郁组免疫功能分析结果

	n	IAP	NK	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
抑郁	34	696.76 ± 331.78	17.03 ± 11.36	65.82 ± 16.90	35.59 ± 13.10	36.65 ± 14.20	1.16 ± 0.64
非抑郁	31	499.03 ± 233.74	23.63 ± 13.24	71.17 ± 10.00	41.41 ± 8.14	30.02 ± 9.78	1.40 ± 0.48
T		-2.75258	2.161993	1.527512	2.127195	-2.17147	1.670253
P		0.007714	0.034424	0.13172	0.037325	0.033669	0.099831

群和NK与抑郁之间的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(3): 335-337

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/335.asp>

0 引言

恶性肿瘤患者常伴随情绪上的变化,抑郁是常见的情绪障碍之一^[1]. 国内外研究伴有抑郁的肿瘤患者的免疫功能中,选择的免疫检测指标集中在NK细胞计数和T细胞亚群数量的测定,尚未有免疫抑制酸性蛋白(immunosuppressive acidic protein, IAP)与抑郁相关性的研究. 我们对65例病理确诊的恶性肿瘤患者采用Zung抑郁自评量表进行测评,同时联合检测IAP、NK、T细胞亚群等指标研究肿瘤患者免疫功能与抑郁之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-11/2004-06我院肿瘤科收治的经病理检查确诊的恶性肿瘤患者65例,除外免疫系统疾病及精神疾患,肝、肾功能基本正常. 其中男41例,女24例;年龄22-74(平均55 ± 10)岁,其中消化道肿瘤26例,肺癌20例,其他系统实体肿瘤19例;既往治疗病情稳定者(SD)52例,病情进展者(PD)13例。

1.2 方法 实验组管理人员对入选癌症患者按入院顺序进行编号,由患者本人填写《Zung抑郁自评量表》评定抑郁状况,按《Zung抑郁自评量表》分为抑郁(SDS ≥ 42分)组和非抑郁(SDS < 42分)组. 采取患者空腹静脉血,应用中科院上海细胞生物研究所IAP检测试剂盒采用单

表 3 IAP与其他免疫检测指标之间的关系

		NK	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
IAP	r	0.065	-0.239	-0.356	0.301	-0.371
	P	0.606	0.055	0.004	0.015	0.002

向免疫琼脂扩散法检测血清中IAP水平. NK细胞、T淋巴细胞亚群检测由上海市长征医院细胞学实验室应用流式细胞仪测定。

统计学处理 原始数据采用SPSS11.5统计软件包进行两独立样本的t检验(independent samplest test)和单变量一般线性模型(Univariate General Linear Model)分析。

2 结果

用单变量一般线性模型分析数据得出的结果显示免疫功能与肿瘤部位、病情进展情况、性别之间的差别无统计学意义($P > 0.05$),而抑郁与否与免疫功能监测指标比较结果有意义($P < 0.05$)(表1). 用两独立样本的t检验分析抑郁组和非抑郁组IAP, NK, CD3, CD4, CD8, CD4/CD8的测量值,抑郁组IAP值显著高于非抑郁组($P < 0.01$),NK、CD4低于非抑郁组($P < 0.05$),CD8高于非抑郁组($P < 0.05$),CD3、CD4/CD8两组间之间比较无统计学差异($P > 0.05$)(表2). 采用独立样本t检验研究IAP与其他免疫检测指标之间的关系,检测结果提示IAP与CD4和CD4/CD8呈密切的负相关,与CD8呈正相关,与NK和CD3间无显著相关性(表3).

3 讨论

抑郁是一种负性情绪障碍,主要表现为体质量下降、难以入睡、情绪低落、悲伤失望、思维迟缓、生活及工作能力减退等。抑郁的病因学研究中,应激是重要的病因之一。恶性肿瘤是一个应激源,可引起机体应激的情绪和生理反应,包括一系列神经、内分泌和免疫功能的变化。关于抑郁与肿瘤患者免疫功能之间的关系,国内外主要以T细胞亚群和NK细胞为检测指标^[2],未见有以IAP作为肿瘤免疫功能的检测指标的报道。IAP是国内外研究较成熟的一种免疫抑制因子,Tamura *et al*^[1]首先于1981年从晚期胃癌患者的腹水中分离出的一种糖蛋白。肝细胞、巨噬细胞、粒细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞和肿瘤细胞都可以分泌少量的IAP。体外实验证实IAP可抑制植物血凝素诱导的淋巴细胞的增殖^[3],Nakashima *et al*^[4]也发现IAP对NK细胞活性有抑制作用。Shibata *et al*^[5]通过动物实验证实IAP可延缓变态反应的发生,还可以抑制抗体产生。IAP既可以抑制细胞免疫,又可以抑制体液免疫,既可以抑制特异性免疫,又可以抑制非特异性免疫,与患者的免疫功能呈负相关,可较客观的反应肿瘤患者的免疫功能。

我们发现抑郁组肿瘤患者IAP和CD8高于非抑郁组($P<0.01$),NK,CD4低于非抑郁组,提示肿瘤伴有抑郁患者免疫功能低下。同时发现,抑郁组血清IAP水平明显高于非抑郁组,且IAP与CD4,CD4/CD8的关系密切,IAP升高的同时CD4下降。Yamaguchi *et al*^[6]研究IAP与淋巴细胞表面抗原之间关系的结果与此一致,他们发现IAP可下调淋巴细胞表面CD4抗原的表达,对CD8抗原的表达没有影响,因而认为IAP可能通过下调淋巴细胞表面CD4抗原的表达发挥免疫抑制作用。在决定

肿瘤治疗及判断预后方面,IAP也有重要的参考价值,大量研究证明动态的观察IAP的变化可以用来评价肿瘤的治疗效果及判断肿瘤的预后^[7-9]。因此,把IAP作为研究抑郁与肿瘤患者精神情绪变化之间的一个切入点,值得进一步研究。

4 参考文献

- 1 Valentine AD. Cancer pain and depression: management of the dual-diagnosed patient. *Curr Pain Headache Rep* 2003; 7: 262-269
- 2 Reiche EM, Morimoto HK, Nunes SM. Stress and depression-induced immune dysfunction: implications for the development and progression of cancer. *Int Rev Psychiatry* 2005; 17: 515-527
- 3 Tamura K, Shibata Y, Matsuda Y, Ishida N. Isolation and characterization of an immunosuppressive acidic protein from ascitic fluids of cancer patients. *Cancer Res* 1981; 41: 3244-3252
- 4 Nakashima T, Tanaka M, Okamura S. Survey of immunosuppressive acidic protein and other immunological parameters in head and neck cancer patients. *J Laryngol Otol* 1991; 105: 939-945
- 5 Shibata Y, Tamura K, Ishida N. In vivo analysis of the suppressive effects of immunosuppressive acidic protein, a type of alpha 1-acid glycoprotein, in connection with its high level in tumor-bearing mice. *Cancer Res* 1983; 43: 2889-2896
- 6 Yamaguchi Y, Miyahara E, Funakoshi M, Takashima I, Kawami H, Sato Y, Toge T. Modulation of CD4 antigen expression on the lymphocyte surface by immunosuppressive acidic protein in cancer patients. *Oncology* 1995; 52: 1-6
- 7 Kawata N, Yamaguchi K, Hirakata H, Hachiya T, Yoshida T, Takimoto Y. Immunosuppressive acidic protein detects high nuclear grade localized renal cell carcinoma. *Urology* 2005; 66: 736-740
- 8 Ikuta S, Miki C, Tanaka K, Konishi N, Mohri Y, Tonouchi H, Kusunoki M. Serum immunosuppressive acidic protein as an interleukin-6 related index of deteriorating condition in gastric cancer patients. *Dig Surg* 2003; 20: 532-538
- 9 Nakaigawa N, Yao M, Kondo K, Kishida T, Noguchi K, Kubota Y, Nagashima Y, Kawano N, Inayama Y, Nozawa A. Chromophobe renal cell carcinoma: a clinicopathological study of 16 cases. *Hinyokika Kyo* 2006; 52: 1-6

编辑 李军亮 电编 郭海丽

■同行评价

本课题设计尚合理,立题明确,层次结构分明,但全文设计和结论相对简单。

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。

中国腹茧症14年流行病学特征

邱法波, 张圣林, 张顺, 张斌, 卢云, 崔鹏

■背景资料

腹茧症是一种罕见的腹部疾患, 病因不明, 术前诊断困难, 尚存在不少争议。

邱法波, 张顺, 张斌, 卢云, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科 山东省青岛市 266003

张圣林, 崔鹏, 青岛海慈医院普外科 山东省青岛市 266033
作者贡献分布: 邱法波与张圣林对此文所作贡献均等; 此课题由张圣林, 邱法波, 张顺, 张斌, 卢云及崔鹏设计; 研究过程由邱法波, 张圣林, 张顺, 张斌, 卢云及崔鹏操作完成; 数据分析由张圣林和崔鹏完成; 本文文写作由邱法波和张圣林完成。

通讯作者: 邱法波, 266003, 山东省青岛市市南区江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院肝胆外科. qiu fabo@sina.com.cn

电话: 0532-82911323 传真: 0532-82911840

收稿日期: 2007-09-18 修回日期: 2007-12-27

Epidemiology of abdominal cocoon in China during the past 14 years

Fa-Bo Qiu, Sheng-Lin Zhang, Shun Zhang, Bin Zhang, Yun Lu, Peng Cui

Fa-Bo Qiu, Shun Zhang, Bin Zhang, Yun Lu, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Sheng-Lin Zhang, Peng Cui, Department of General Surgery, Qingdao Haici Hospital, Qingdao 266033, Shandong Province, China

Correspondence to: Fa-Bo Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Shinan District, Qingdao 266003, Shandong Province, China. qiu fabo@sina.com.cn

Received: 2007-09-18 Revised: 2007-12-27

Abstract

AIM: To study the epidemiological features of abdominal cocoon and its diagnosis and treatment in China during the past 14 years.

METHODS: Reports on abdominal cocoon published from January 1994 to June 2007 were retrieved from various databases, such as Chinese Medical Current Content (CBM) and National Knowledge Infrastructure (CNKI). The epidemiological features of abdominal cocoon and its diagnosis and treatment were analyzed.

RESULTS: A total of 776 patients with abdominal cocoon were reported in China during the past 14 years. The male to female ratio was approximately 1 : 1.37. The mean age of patients at the time of their diagnosis was 29.3 years. Fifty-seven percent of the patients were distributed in East China. Intestinal obstruction of different

types was the main clinical manifestation in 91.5% of the patients, diffuse abdominal cocoon was found in 68.3% of the patients, and greater omentum was absent in 40.5% of the patients. Capsule resection was the main procedure for the treatment of abdominal cocoon.

CONCLUSION: Abdominal cocoon is more common in East China and is difficult to diagnose before operation. Capsule removal and adhesion release are effective against the disease.

Key Words: Abdominal cocoon; Epidemiological feature; Diagnosis; Treatment

Qiu FB, Zhang SL, Zhang S, Zhang B, Lu Y, Cui P. Epidemiology of abdominal cocoon in China during the past 14 years. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(3): 338-341

摘要

目的: 探讨中国近14年腹茧症的流行病学特征和诊疗经验。

方法: 联合检索中国生物医学文献数据库和中国知识资源总库等多家中文数据库1994-01/2007-06有关腹茧症的文章, 总结分析腹茧症的流行病学特征和诊治经验。

结果: 中国近14年共报道776例腹茧症, 男女比例为1 : 1.37, 平均年龄29.3岁, 57%分布在华东地区, 91.5%以不同表现形式的肠梗阻为主要症状, 68.3%属于弥漫型腹茧症, 40.5%患者无大网膜, 手术以包膜切除为主。

结论: 腹茧症主要分布在华东地区, 术前诊断困难, 切除包膜和松解粘连是治疗此病有效方法。

关键词: 腹茧症; 流行病学特征; 诊断; 治疗

邱法波, 张圣林, 张顺, 张斌, 卢云, 崔鹏. 中国腹茧症14年流行病学特征. *世界华人消化杂志* 2008; 16(3): 338-341
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/338.asp>

0 引言

腹茧症(abdominal cocoon)是一种罕见的腹部疾

■同行评议者

秦环龙, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院普外科

患, 1978年Foo *et al*^[1]首先命名. 腹茧症的病因不明, 术前诊断困难, 是一种存在不少争议的腹部疾病^[2], 以小肠被茧状包裹在一层异常的纤维膜内为其特征, 治疗以手术为主, 近年有很多个案报道, 但对其流行病学特点及诊治方案尚无统一认识. 本文复习中国近14年的文献资料, 探讨腹茧症的流行病学特征和诊治经验.

1 材料和方法

1.1 材料 联合检索中国生物医学文献数据库和中国知识资源总库等多家中文数据库1994-01/2007-06的文章266篇, 共报道776例腹茧症.

1.2 方法 以腹茧症、小肠禁锢症、小肠茧状包裹症、原发性硬化性腹膜炎和小肠节段性纤维包裹症为检索关键词, 分别检索到216篇(652例, 占84.0%)、44篇(118例, 15.2%)、3篇(3例, 0.4%)、1篇(1例, 0.1%)和2篇(2例, 0.3%). 检出的文章5篇综述和5篇重复报道不计入统计, 共有776例腹茧症, 年度报道情况见图1, 可见近几年腹茧症的发病有增加的趋势.

2 结果

2.1 地区分布 统计涵盖我国30个省、自治区和直辖市的腹茧症发病情况, 按照7个地区划分: 东北地区27例(3%)(黑龙江5例, 吉林6例, 辽宁16例); 华北地区100例(13%)(河北36例, 山西8例, 北京36例, 天津19例, 内蒙古1例); 西北地区30例(4%)(陕西7例, 甘肃3例, 青海13例, 新疆1例, 宁夏6例); 华东地区437例(57%)(山东160例, 安徽24例, 浙江118例, 福建39例, 江苏39例, 江西28例, 上海29例); 华南地区48例(6%)(广东27例, 广西21例, 海南0例); 华中地区85例(11%)(河南46例, 湖南27例, 湖北12例); 西南地区49例(6%)(云南5例, 四川44例, 贵州0例, 西藏0例). 中国的腹茧症主要(57%)分布在沿海的华东地区, 处于亚热带季风气候, 推断其发病与气候可能有一定的关系.

2.2 性别和年龄 776例患者中, 男328例, 女448例, 男女比例为1:1.37, 女性发病略多于男性, 这与文献所报道此病多发于女性有一定差别. 本组病例中, 年龄最小2岁, 最大79岁, 平均29.3岁.

2.3 症状 776例患者腹痛、恶心、腹胀440例(56.7%), 痛吐胀闭(腹痛、恶心呕吐、腹胀和停止排便排气)270例(34.8%), 腹部包块208例(26.8%)无症状(无腹茧症相关症状, 因其他疾病手术中发现腹茧症)66例(8.5%). 91.5%的患者

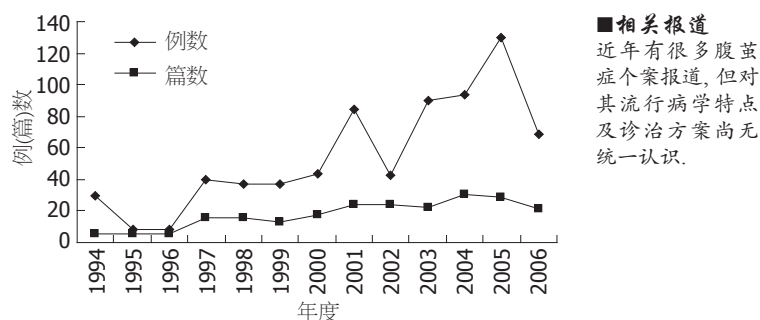


图1 中国腹茧症年度报道情况.

是以不同表现形式的肠梗阻为主要表现, 34.8%的患者有肠梗阻的典型表现, 即腹痛、恶心呕吐、腹胀和肛门停止排便排气, 有学者称腹茧症为一种特殊类型的肠梗阻.

2.4 入院诊断 776例患者中372例(47.9%)入院诊断为肠梗阻, 说明患者多以不同类型的肠梗阻为主要表现, 入院诊断为腹茧症仅36例(4.6%). 入院诊断为阑尾炎114例(14.7%)、腹部肿块48例(6.2%)、卵巢囊肿38例(4.9%)、不孕症55例(7.1%)、腹膜炎28例(3.6%)、消化性溃疡和肠结核各6例(0.8%)、腹内嵌顿疝和消化道穿孔各2例(0.3%)、肠系膜肿瘤和急性胆囊炎各1例(0.2%), 有18例(2.3%)诊断不明, 另有49例(6.3%)在进行其他手术中发现合并腹茧症.

2.5 腹部手术史 本组776例患者中36例(4.6%)既往有腹部手术史, 其中阑尾切除术8例, 肠部分切除术7例, 腹腔化疗5例, 剖腹探查术4例, 卵巢手术、胆囊切除术和胃癌根治术各3例, 肝癌切除术、门腔分流术和疝修补术各1例.

2.6 合并症 本组病例中有72例(9.3%)合并有其他疾病, 合并原发性不孕症25例、卵巢囊肿18例、阴睾和小肠肿瘤各3例、肠系膜血管畸形、胆石病、肠结核、上消化道穿孔、肠扭转和消化道出血各2例, 合并子宫肌瘤、异位妊娠破裂、输卵管积水、短小肠畸形、贲门癌、直肠癌、盆腔脓肿、结核性腹膜炎、切口疝、脾蒂扭转和腹股沟斜疝各1例.

2.7 手术方式及术中所见 所有腹茧症患者均行手术治疗, 手术方式以包膜切除(430例, 55.4%)、阑尾切除(174例, 22.4%)和单纯包膜切开(119例, 15.3%)最为常见. 其他手术方式有肠排列(101例, 13.0%)、肠段切除(89例, 11.5%)和肠侧侧吻合(13例, 1.7%). 术中发现: 530例(68.3%)患者纤维膜包裹全部小肠, 其中有37例(4.8%)患者的纤维膜连同盆腔内脏器, 如子宫、卵巢等一起包裹, 纤维膜的厚度(530例)在1-12

■相关报道

近年有很多腹茧症个案报道, 但对其流行病学特点及诊治方案尚无统一认识.

■应用要点

本文复习中国近14年的文献资料,探讨中国腹茧症的流行病学特征和诊治经验,以指导腹茧症的诊断和治疗,提高诊治水平。

mm之间;8例(1.0%)患者无子宫附件等;314例(40.5%)患者无大网膜。

2.8 预后 776例患者中,仅378例有预后情况报道,其中79例(20.9%)术后再次发生肠梗阻,27例(7.1%)再手术治疗,14例(3.7%)发生肠痿,6例(1.6%)出现短肠综合征;手术后总共死亡13例,死亡率3.4%,主要死因为肠痿、腹腔感染、短肠综合征及多器官功能衰竭。

3 讨论

腹茧症为腹腔部分或全部脏器被一层纤维膜包裹,包裹内容物以小肠最为常见。其诊断名称较多,但由于纤维膜把腹腔脏器作为一个整体包裹固定于后腹壁,故称之为腹茧症更为恰当,大多数学者以“腹茧症”命名此病。

腹茧症的病因还不清楚,可能与下列因素有关:(1)性别和地域因素:以往认为本病多发生于年轻女性且伴有反复发作的妇科疾病,引起亚临床性腹膜炎,致纤维蛋白渗出机化后形成包膜^[1]。本组病例统计男女比例是1:1.37,男女发病情况相差不大;并且男性病例报道也逐渐增多^[3],说明性别可能不是该病的发生因素。有资料提示,本病存在地区性发病情况,以热带及亚热带地区多见^[4]。中国的腹茧症主要(57%)分布在华东地区,处于亚热带季风气候,其发病与地域可能有一定的关系。(2)药物影响:β-受体阻滞剂能降低环磷酸腺苷酸(cAMP)和环磷酸鸟苷酸(cGMP)比例,导致胶原过度生成和腹腔内纤维蛋白渗出机化,腹腔内纤维化形成致密的白色纤维膜包裹压迫小肠,引起腹茧症^[5]。(3)亚临床型腹膜炎:由于腹腔内刺激,引起纤维蛋白渗出,机化形成纤维性包膜。腹腔化疗^[6]、腹膜透析^[7]和腹腔结核^[8]等,可刺激腹膜发生化学性腹膜炎,纤维素样物沉积形成纤维膜,引起腹茧症。本组病例中4.6%的患者既往有腹部手术史,说明腹茧症的发病与腹腔损伤刺激引起的急慢性炎症有一定关系,可能是腹茧症的发病因素之一。(4)发育异常:因为有儿童病例的报道^[9],并且许多腹茧症患者手术中发现大网膜和(或)子宫附件缺如和合并先天性畸形等,有学者认为腹茧症是一种先天性腹膜畸形,为胚胎发育过程中腹膜发生变异所致的先天性疾病^[10]。本组病例中40.5%的患者无大网膜,1.0%的患者无子宫附件,还有患者合并先天性畸形,说明该因素可以作为腹茧症的主要病因之一。

腹茧症可分为局限型和弥漫型两种,局限

型是指仅部分小肠等脏器被纤维膜包裹,弥漫型是指全部小肠合并或不合并其他脏器(尤其是盆腔脏器)被纤维膜包裹。本组资料中68.3%的患者纤维膜包裹全部小肠(其中4.8%的患者连同盆腔脏器包裹),属于弥漫型腹茧症,其发生率高于局限型腹茧症。

腹腔内纤维膜呈茧状,乳白色或淡黄色,表面光滑,起自屈氏韧带、肠系膜根部或小网膜,止于回肠中下段或盆腔脏器,与前腹壁部分粘连,膈下间隙消失。纤维膜厚度在1-12 mm之间,质地坚韧,易于松解,松解后纤维膜肠面可见多个肠管压迹。肠间疏松粘连分离后小肠浆膜光滑,肠壁柔韧如常。纤维膜部分硬化呈玻璃样病变,间质小血管充血扩张,伴淋巴细胞浸润^[11-12]。

腹茧症一般没有症状,某些因素(如腹腔脏器炎症、饱餐后体位变化等)可使肠管炎性水肿增粗,肠袢折叠过度而包膜又限制肠管活动,诱发急性肠梗阻等外科急腹症,其临床表现为:(1)青年患者多发(本组平均年龄29.3岁),女性发病比例略高于男性(男:女=1:1.37);(2)不明原因的肠梗阻或便秘^[13];(3)反复发作的腹痛、恶心和腹胀病史(56.7%),仅约1/3(34.8%)的患者同时有停止排便排气;缺乏典型肠梗阻的四大特征^[14],非手术治疗有效,有时可自行缓解;(4)部分患者(26.8%)表现为无症状的腹部包块,包块能被压缩,表面可闻及肠鸣音。腹茧症属外科少见病,无特殊临床表现,可终生无症状,常因肠梗阻、腹部包块或合并其他疾病时被发现。

近年来国内外虽屡有报道,但因缺乏规范的诊断标准,本病诊断困难,尤其术前确诊者甚少^[15],中国腹茧症近14年术前正确诊断率仅为4.6%。以下辅助检查有助于诊断:(1)X线检查主要表现为部分肠梗阻征象^[11];(2)消化道钡餐检查可发现包块内为活动受限的小肠,加压后肠管不易分离,推动包块,该段小肠随之移动,即Navani所说的“菜花征”^[16];(3)CT表现为圆形包块有肠管入出的部位,包块的后上方有纠集的肠系膜血管断面像,其内可见呈“串珠”样改变的小肠,合并肠梗阻时对比剂沿肠管只能到达包块的外缘^[17-18];(4)MRI的多参数、多方位成像可以直接显示肥厚迂曲的肠管,肠腔内气体、液体以及与大网膜粘连的情况^[19]。

腹茧症的确诊依靠腹腔镜或剖腹探查,术中发现全部或部分小肠被纤维膜包裹^[20]。病理检查显示包膜为致密的纤维素样膜状组织,部分呈玻璃样变性,无上皮细胞,纤维呈非特异性炎症,

有少量白细胞和淋巴细胞浸润^[11]。

腹茧症的治疗以手术为主, 原则上彻底切除包膜, 松解粘连和切除囊带^[12], 也有学者主张无须刻意追求包膜完全切除和广泛分离, 只要充分松解粘连就能够达到治疗效果^[21]。虽然有学者主张腹茧症应尽量行非手术治疗, 但此病常无明显症状, 多合并其他疾病呈急性起病, 入院时不能明确诊断, 多行手术处理。本组776例患者全部手术治疗, 手术方式主要是包膜切除(55.4%)或切开(15.3%)。肠管如无病变则不作肠切除术, 切忌将包裹内小肠当作肿瘤全部切除, 以免引起短肠综合征^[22], 本组病例有11.5%行肠管切除。小肠松解后是否作小肠排列术仍有争议, 本组有13.0%病例行小肠排列; 王飞海 *et al*^[23]认为小肠排列术可能会造成小肠粘连成团, 包裹重新生成。本组病例有22.4%行阑尾切除; 有学者认为即使无阑尾病变, 在不增加手术难度的情况下可同时将阑尾切除, 以免患者再发生阑尾病变以及由此引起的肠梗阻, 而增加手术机会^[23]。

4 参考文献

- 1 Foo KT, Ng KC, Rauff A, Foong WC, Sinniah R. Unusual small intestinal obstruction in adolescent girls: the abdominal cocoon. *Br J Surg* 1978; 65: 427-430
- 2 Suh WN, Lee SK, Chang H, Hwang HJ, Hyung WJ, Park YN, Kim TI. Sclerosing encapsulating peritonitis (abdominal cocoon) after abdominal hysterectomy. *Korean J Intern Med* 2007; 22: 125-129
- 3 Deeb LS, Mourad FH, El-Zein YR, Uthman SM. Abdominal cocoon in a man: preoperative diagnosis and literature review. *J Clin Gastroenterol* 1998; 26: 148-150
- 4 Yip FW, Lee SH. The abdominal cocoon. *Aust N Z J Surg* 1992; 62: 638-642
- 5 Eltringham WK, Espiner HJ, Windsor CW, Griffiths DA, Davies JD, Baddeley H, Read AE, Blunt RJ. Sclerosing peritonitis due to proctocol: a report on 9 cases and their surgical management. *Br J Surg* 1977; 64: 229-235
- 6 李军成. 腹腔镜化疗后腹茧症2例. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 50
- 7 Bujalance Cabrera FM, Herrera Merino N, Salvador Fernández M, Escudero Escudero J, Sierra Ortega MA, Oliva Díaz C, Martínez Veiga JL. Surgical treatment of sclerosing encapsulating peritonitis. *Cir Esp* 2007; 81: 139-143
- 8 Kaushik R, Punia RP, Mohan H, Attri AK. Tuberculous abdominal cocoon—a report of 6 cases and review of the Literature. *World J Emerg Surg* 2006; 1: 18
- 9 Sahoo SP, Gangopadhyay AN, Gupta DK, Gopal SC, Sharma SP, Dash RN. Abdominal cocoon in children: a report of four cases. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 987-988
- 10 Stanley MM, Reyes CV, Greenlee HB, Nemchausky B, Reinhardt GF. Peritoneal fibrosis in cirrhotics treated with peritoneovenous shunting for ascites. An autopsy study with clinical correlations. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 571-577
- 11 Hur J, Kim KW, Park MS, Yu JS. Abdominal cocoon: preoperative diagnostic clues from radiologic imaging with pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 182: 639-641
- 12 Xu P, Chen LH, Li YM. Idiopathic sclerosing encapsulating peritonitis (or abdominal cocoon): a report of 5 cases. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3649-3651
- 13 Raju GS. Abdominal cocoon due to primary peritonitis: barium meal is valuable in diagnosis. *Trop Gastroenterol* 2004; 25: 80-81
- 14 石美鑫. 实用外科学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 846-847
- 15 Dutranoy JC, Molle G. Sclerosing peritonitis. *J Chir (Paris)* 2005; 142: 78-84
- 16 Navani S, Shah P, Pandya S, Doctor N. Abdominal cocoon—the cauliflower sign on barium small bowel series. *Indian J Gastroenterol* 1995; 14: 19
- 17 刘中林, 王振常, 李惠章. 腹茧症影像学诊断一例. *临床放射学杂志* 2004; 23: 535-537
- 18 Wig JD, Gupta SK. Computed tomography in abdominal cocoon. *J Clin Gastroenterol* 1998; 27: 259-260
- 19 郭兴华, 王建文, 王耀普, 郑国芳, 张崇杰. 腹茧症MRI诊断一例. *中华放射学杂志* 2002; 36: 612
- 20 Nakamoto H. Encapsulating peritoneal sclerosis—a clinician's approach to diagnosis and medical treatment. *Perit Dial Int* 2005; 25 Suppl 4: S30-S38
- 21 Samarasinghe I, Mathew G, Sitaram V, Perakath B, Rao A, Nair A. The abdominal cocoon and an effective technique of surgical management. *Trop Gastroenterol* 2005; 26: 51-53
- 22 Al-Abassi AA, Emad M. Abdominal cocoon. An unusual cause of intestinal obstruction. *Saudi Med J* 2004; 25: 1482-1485
- 23 王飞海, 郑敏, 郑志强, 何尔斯泰. 腹茧症七例临床分析. *中华胃肠外科杂志* 2001; 4: 80

■同行评价

本文书写流畅, 层次分明, 逻辑性强, 具有很强的说服力和指导意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹志成 院士
香港伊利沙伯医院临床肿瘤科

陈洪 副教授
江苏省东南大学附属中大医院消化科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

陈耀凯 副教授
第三军医大学西南医院全军感染病研究所

戴冬秋 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

党双锁 副教授
西安交通大学医学院第二附属医院感染科

杜群 副研究员
广州中医药大学脾胃研究所

范建高 主任医师
上海市第一人民医院消化科

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

冯志杰 教授
河北医科大学第二医院消化内科

高春芳 研究员
第二军医大学附属长征医院实验诊断科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

胡和平 教授
第二军医大学附属东方肝胆医院消化科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

刘海林 主任医师
上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

刘杞 教授
重庆医科大学病毒性肝炎研究所

秦华东 教授
黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二医院普外四科

秦环龙 教授
上海交通大学附属第六人民医院普外科

孙延平 副教授
上海第二军医大学附属长征医院普外科

邵升 副教授
哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

唐晓鹏 教授
中南大学肝病研究所/中南大学湘雅二医院内科

田晓峰 教授
大连医科大学附属第二医院普通外科

王晓艳 副教授
中南大学湘雅三医院消化内科

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

熊斌 教授
武汉大学中南医院肿瘤科

张吉翔 教授
南昌大学第二附属医院消化科

张占卿 主任医师
上海市(复旦大学)公共卫生中心