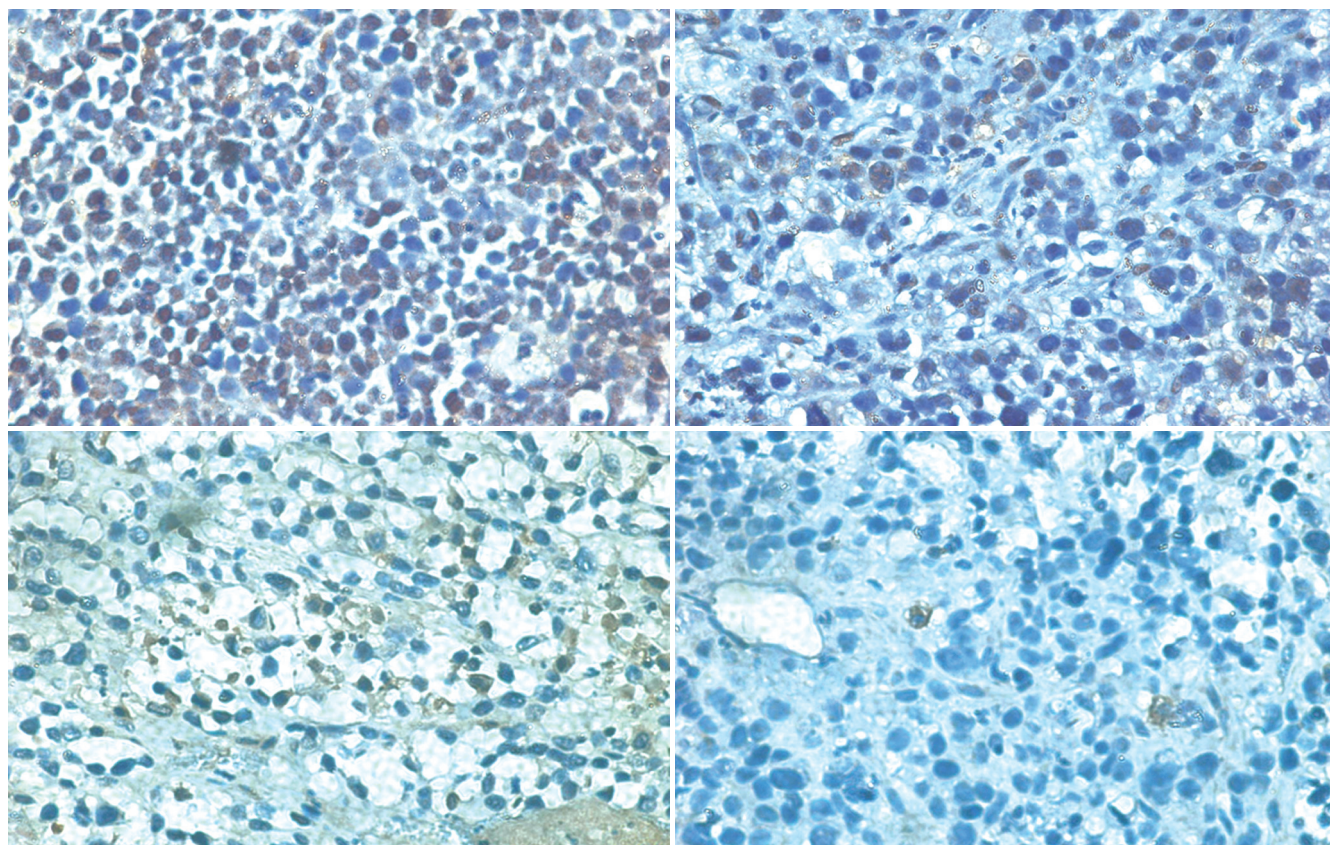


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 2 月 18 日 第 16 卷 第 5 期 (Volume 16 Number 5)



5 / 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
汤恢焕教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王振宁教授
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 2 月 18 日

第 16 卷

第 5 期

(总第229期)

述 评

- 457 光动力治疗消化系肿瘤的进展与展望
葛海燕
- 463 局部切除术在Vater壶腹肿瘤治疗中的地位
乔岐禄, 刘斯

基础 研究

- 468 黄芩甙对肝癌细胞BEL-7402线粒体膜电位、细胞内Ca²⁺和Cyt C的影响
郭霞, 郭昱
- 473 不同诱导条件对大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导类肝细胞的影响
何文艳, 刘树贤, 姜慧卿
- 479 重叠延伸PCR法克隆重组复合干扰素
刘顺爱, 浅野龙太郎, 郭晶晶, 刘志英, 余康康, 徐道振
- 484 BxPC-3条件培养液对PC12细胞株DA和NE代谢的影响
李荣, 王杰军, 吴欣, 郭静, 王妙苗, 王喜, 解静, 何晓静

临 床 研 究

- 488 PUMA蛋白在胰腺癌中的表达及临床意义
张克君, 李德春, 朱东明

文 献 综 述


- 493 黏膜下层胃癌的淋巴结转移规律与缩小手术
王世贺, 王振宁, 徐惠绵
- 498 斑蝥素及其衍生物治疗乙型肝炎及消化系肿瘤的研究进展
崔东来, 陈卫, 姚希贤
- 503 p38MAPK在肝细胞癌中的研究进展
邱建武, 郭薇, 申丽娟
- 510 幽门螺杆菌耐药基因检测的研究现状
何恒, 王洪明, 迟晶

研 究 快 报

- 517 胆道梗阻再通术后肾脏AQP3的变化及其意义
李云飞, 刘金钢
- 522 溃疡灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜TLR4蛋白水平的作用
杜群, 李红, 王汝俊, 王文君, 李燕舞, 巫燕莉

临 床 经 验

- 526 自身抗体与食管癌相关性的检测与分析92例
陈志刚, 李宏, 周迪, 杨军, 周婷, 秦江梅
- 530 埃索美拉唑对胃食管反流病患者症状和生活质量的影响
朱风尚, 陈锡美, 王志荣, 张东伟, 张霞
- 535 慢性丙型肝炎患者幽门螺杆菌感染及其相关因素分析
季尚玮, 张永贵, 王江滨
- 540 胰腺癌中FXD6蛋白的表达及临床意义
刘军桂, 周宁新, 夏洪天, 李成刚, 李亚卓, 李崇辉
- 544 胰腺囊性肿瘤的诊断和治疗34例
郭春光, 田艳涛, 刘霄, 王成峰, 赵平
- 548 妊娠中晚期伴急性胰腺炎治疗23例
徐进, 卜献民, 戴显伟
- 551 内源性生物素在结肠组织中的表达及其对免疫组化的影响
高春, 王爱英, 韩亚京

	556 心理社会因素在溃疡性结肠炎中的作用 罗秋华, 邹天然, 陈掌珠, 孙学礼				
	559 Skp2 mRNA及蛋白在大肠腺瘤组织中的表达 刘晓珺, 杜雅菊, 沈滨				
	563 罗马Ⅲ标准研究肠易激综合征临床特点及亚型 姚欣, 杨云生, 赵卡冰, 孙刚, 刘英圣, 王巍峰				
	567 经皮超声引导下腹膜穿刺活检诊断结核性腹膜炎的临床实用性分析 刘东屏, 贺庆娟, 王学梅, 孙明军				
致 谢	570 致谢世界华人消化杂志编委				
消 息	472 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知 492 世界华人消化杂志的同行评价 497 世界华人消化杂志个性化服务订购活动 509 世界华人消化杂志2007年编委审稿费总计36 225元 521 《世界华人消化杂志》简介 529 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 534 世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版 539 中国学术期刊综合引证报告(2007) 543 欢迎订阅2008年《世界华人消化杂志》 547 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0.373 555 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 558 中国科技期刊引证报告(核心版)发布WJG 2006年影响因子0.834 562 世界华人消化杂志在线办公系统				
封面故事	Ai-Guang Zhao, Ting Li, Sheng-Fu You, Hai-Lei Zhao, Ying Gu, Lai-Di Tang, Jin-Kun Yang. Effects of Wei Chang An on expression of multiple genes in human gastric cancer grafted onto nude mice. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 14(5): 693-700 http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/693.asp				
本期责任人	编务 江艳; 送审编辑 程剑侠; 组版编辑 郭海丽; 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				
<div><div><div><div><div></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 2008-02-18 原刊名 新消化病学杂志</div></div><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</div><div>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></div><div><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><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><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></div></div></div></div></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 每册24.00元 全年864.00元	广告经营许可证 1401004000050
www.wjgnet.com					

World Chinese Journal of Digestology

February 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 5

EDITORIAL	<p>457 Advances in photodynamic therapy for gastrointestinal tumors and its prospect <i>Ge HY</i></p> <p>463 Local resection of ampullary tumors <i>Qiao QL, Liu S</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>468 Effect of baicalin on mitochondrial membrane potential, Ca²⁺ and cytochrome C in HCC cell line BEL-7402 <i>Guo X, Guo Y</i></p> <p>473 Effect of different induction conditions on hepatocyte-like cells induced <i>in vitro</i> by rat bone marrow mesenchymal stem cells <i>He WY, Liu SX, Jiang HQ</i></p> <p>479 Cloning recombinant consensus interferon with overlap extension polymerase chain reaction <i>Liu SA, Asano R, Guo JJ, Liu ZY, Yu KK, Xu DZ</i></p> <p>484 Effect of BxPC-3-conditioned medium on the metabolism of DA and NE in PC12 cell line and its mechanism of action <i>Li R, Wang JJ, Wu X, Guo J, Wang MM, Wang X, Xie J, He XJ</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>488 PUMA expression in pancreatic cancer and its clinical significance <i>Zhang KJ, Li DC, Zhu DM</i></p>
REVIEW	<p>493 Lymph node metastasis in submucosal gastric cancer and reduction surgery <i>Wang SH, Wang ZN, Xu HM</i></p> <p>498 Progress in the treatment of hepatitis B and digestive tumors with cantharidin and its analogues <i>Cui DL, Chen W, Yao XX</i></p> <p>503 Advances in research on p38MAPK-related hepatocellular carcinoma <i>Qiu JW, Guo W, Shen LJ</i></p> <p>510 Detection of the drug-resistant gene of <i>Helicobacter pylori</i> <i>He H, Wang HM, Chi J</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>517 Change of renal aquaporin 3 expression in rats after release of obstructive jaundice and its significance <i>Li YF, Liu JG</i></p> <p>522 Effect of Kuijieling Decoction on protein level of Toll-like receptor 4 in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis <i>Du Q, Li H, Wang RJ, Wang WJ, Li YW, Wu YL</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>526 Correlation between auto-antibodies and esophageal cancer: an analysis of 92 cases <i>Chen ZG, Li H, Zhou D, Yang J, Zhou T, Qin JM</i></p> <p>530 Effect of esomeprazole on symptom relief and improvement of quality of life in gastroesophageal reflux disease patients <i>Zhu FS, Chen XM, Wang ZR, Zhang DW, Zhang X</i></p> <p>535 <i>Helicobacter pylori</i> infection in patients with chronic hepatitis C and its related factors <i>Ji SW, Zhang YG, Wang JB</i></p>

	<p>540 Expression of FXVD6 in pancreatic adenocarcinoma and its clinical significance <i>Liu JG, Zhou NX, Xia HT, Li CG, Li YZ, Li CH</i></p> <p>544 Diagnosis and treatment of pancreatic cystic tumors: an analysis of 34 cases <i>Guo CG, Tian YT, Liu Q, Wang CF, Zhao P</i></p> <p>548 Clinical characteristics of acute pancreatitis in middle and late pregnancy stage and its treatment: an analysis of 23 cases <i>Xu J, Bu XM, Dai XW</i></p> <p>551 Expression of endogenous biotin in colonic tissues and its influence on the results of immunohistochemistry <i>Gao C, Wang AY, Han YJ</i></p> <p>556 Psychosocial factors for ulcerative colitis <i>Luo QH, Zou TR, Chen ZZ, Sun XL</i></p> <p>559 Expression of S-phase kinase-associated protein 2 mRNA in large intestine adenoma tissue <i>Liu XJ, Du YJ, Shen B</i></p> <p>563 Clinical features and subtypes of irritable bowel syndrome based on Rome III diagnostic criteria <i>Yao X, Yang YS, Zhao KB, Sun G, Liu YS, Wang WF</i></p> <p>567 Clinical outcome analysis of epiploon biopsy in the diagnosis of patients with tuberculous peritonitis <i>Liu DP, He QJ, Wang XM, Sun MJ</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	570 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Zhao AG, Li T, You SF, Zhao HL, Gu Y, Tang LD, Yang JK.</i> Effects of We Chang An on expression of multiple genes in human gastric cancer grafted onto nude mice.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 14(5): 693-700</p> <p>http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/693.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>Hai-Li Guo</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 February 18, 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 Newspa-
 pers 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 re-
 served; 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, re-
 cording, or otherwise without the prior per-
 mission of *WCJD*. Authors are required to
 grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal repre-
 sent the viewpoints of the authors except
 where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

光动力治疗消化系肿瘤的进展与展望

葛海燕

葛海燕, 同济大学附属第十人民医院普通外科 上海市 200072

葛海燕, 主任医师, 教授, 主要从事胃肠道肿瘤外科综合治疗的研究。

通讯作者: 葛海燕, 200072, 上海市延长中路301号, 同济大学附属第十人民医院普通外科. gesurgery@163.com

电话: 021-66302659

收稿日期: 2007-07-26 修回日期: 2008-01-23

Advances in photodynamic therapy for gastrointestinal tumors and its prospect

Hai-Yan Ge

Hai-Yan Ge, Department of General Surgery, the Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Correspondence to: Hai-Yan Ge, Department of General Surgery, the Tenth People's Hospital, Tongji University, 301 Yanchang Middle Road, Shanghai 200072, China. gesurgery@163.com

Received: 2007-07-26 Revised: 2008-01-23

Abstract

This paper reviews the photodynamic therapy for gastrointestinal tumors and its mechanisms, and describes the authors' experience with it. It is feasible and reasonable to use photodynamic therapy for gastrointestinal tumors. It is not in contradiction with PDT and traditional surgical treatment, chemotherapy, radiation and immune therapy, etc. The main mechanisms of photodynamic therapy for gastrointestinal tumors are to damage tumor microvasculature, induce cancer cell apoptosis, injure cancer cell membrane, and trigger immune reactions.

Key Words: Photodynamic therapy; Tumor; Gastrointestinal system

Ge HY. Advances in photodynamic therapy for gastrointestinal tumors and its prospect. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(5): 457-462

摘要

本文结合作者自己的研究成果, 对国内外近年来在应用光动力技术治疗消化系肿瘤方面的文献报道进行较全面的复习和综述, 介绍光动力治疗消化系肿瘤的技术方法及其机制. 应用光动力治疗消化系实体肿瘤具有较好的效果,

其与传统的手术、化疗、放疗、免疫治疗等方法并不矛盾, 他的主要机制是破坏肿瘤微血管、诱导肿瘤细胞凋亡、膜的损伤和引起免疫反应等。

关键词: 光动力疗法; 肿瘤; 消化系统

葛海燕. 光动力治疗消化系肿瘤的进展与展望. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 457-462

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/457.asp>

0 引言

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)是利用光敏剂对激光照射后产生的光化学反应来诊断或治疗肿瘤的新技术, 经过20多年来的发展, 其技术已经日趋成熟^[1-2]. 国内外大量的实验研究和临床观察证明, PDT对血管瘤、息肉、不典型增生、良性肿瘤以及恶性肿瘤都有一定的作用^[3-4]. 本文就近年来应用PDT治疗消化系肿瘤、PDT治疗肿瘤的机制研究所取得的成果、存在的问题以及解决这些问题的可能途径作简要介绍。

1 光动力学对肿瘤细胞的杀伤机制

1.1 对微血管的破坏作用 光动力治疗后可造成微血管内皮完整性的破坏, 内皮细胞损伤后胶原裸露促使血小板黏附于胶原纤维, 形成血小板黏集堆和微血栓; 血管内皮损伤后导致炎性因子释放, 引起血管收缩, 导致血细胞滞留凝集、血流停滞, 血管内的静水压增高, 富含蛋白质的液体从血管内到血管外, 水分流入组织间隙造成组织水肿、血容量降低; 血管血栓形成及血容量降低均能造成肿瘤组织缺血、缺氧、从而杀伤肿瘤组织^[5-8].

1.2 诱导肿瘤细胞凋亡和坏死 光动力治疗引发的细胞凋亡, 一些研究表明, 光敏剂酞菁(phtalocyanine)光动力治疗引起线粒体的损伤, 细胞色素C从线粒体快速释放到细胞溶胶中诱导细胞凋亡, PDT引发凋亡反应的典型特征是细胞色素C的迅速释放, 半胱天冬酶(caspases)活化和凋

■背景资料

近年来, 国内外许多研究者利用光动力疗法(PDT)治疗消化系息肉、癌前病变和癌症等, 为肿瘤治疗增添了新的技术手段。

■同行评议者

施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化内科

■ 研发前沿

本文围绕如何将激光有效地导入到机体深部组织, PDT是否能够杀灭肿瘤细胞, PDT对实体性肿瘤的效果究竟如何评价以及其是通过什么机制导致肿瘤细胞凋亡和坏死等基础和临床研究中的热点、重点, 以及亟待研究的问题, 进行文献复习和述评。

亡小体形成^[7,9-12]。禹丽娜 *et al*^[13]在利用人淋巴瘤细胞系(Jurkat cell)进行的PDT实验中观察到, 照射30-60 min后细胞色素C释放, caspase23活化和多聚(ADP2核糖)聚合酶裂解。Mikes *et al*^[14]运用caspase抑制剂发现, caspase23就足以发动PDT引起的凋亡发生。

1.3 免疫反应 PDT可引起照射组织内TNF、IL-1B、IL-2增加, 其原理可能是巨噬细胞发生吞噬反应^[7,15]在结肠癌细胞系HT29的体外和体内模型中, PDT均能引起线粒体中HSP60的转录和翻译^[16]。Abdel-Hady *et al*^[17]报道PDT治疗肿瘤时可以激活补体系统。Korbelik *et al*长期致力于研究补体在PDT诱发抗肿瘤免疫反应中的作用, 认为补体激活是PDT诱发抗肿瘤免疫反应的一个重要过程, 光动力学疗法诱导的补体级联反应的活化和受照射肿瘤局部补体蛋白的沉积过程, 对PDT的抗肿瘤效果有很大影响, 而且补体激活剂和PDT的联合应用能够扩大PDT诱导的补体激活效应, 提高PDT的抗肿瘤效果^[18-21]。

1.4 对细胞膜功能的影响 近年来, 部分研究者深入研究了PDT对细胞膜性结构的影响, 光敏剂最初接触的部位是细胞膜或细胞内膜^[22-24]。膜敏化后细胞膜电位下降, 通过细胞膜的分子转运受到抑制, 细胞膜相关的酶被激活^[17]。光敏剂在激光作用下发生光化学反应^[25], 使线粒体膜的通透性增加, 膜电位($\Delta\Psi m$)消失, 许多与诱导细胞凋亡相关的蛋白质因子释放于胞质中, 这些因子包括细胞色素C、凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)、SMAC(second mitochondria 2 derived activator of caspases)等。细胞色素C进入胞质, 与胞质中的dATP、凋亡活化因子21(APAF21)及原caspase29结合成复合物, 启动了caspase的级联活化, 最终使许多蛋白质因子活化, 如DNA裂解因子(DNA fragmentation factor, DFF)、多聚腺苷聚合酶[Poly(ADP2ribose) polymerase, PARP], DNA依赖蛋白激酶(DNA2PKcs)、caspase激活的脱氧核糖核酸酶抑制剂(inhibitor of caspase activated DNase, ICAD)等, 引起细胞凋亡特征的产生, 如细胞收缩、染色质凝聚并边缘化、DNA断裂、凋亡小体形成等^[26]。PDT导致线粒体功能受损, 产生ATP减少, 进而引起线粒体内膜跨膜电位下降, 活性氧产生, 胞内pH值和Ca离子等改变^[27], 从而启动细胞凋亡程序^[17]。内质网也是PDT作用的重要靶点。光敏剂Foscan孵育MCF-7肿瘤细胞时, 内质网和高尔基复合体是光敏剂优先集中的位置, 并

且通过激光照射, 他们也是被破坏的位置^[26,28]。许多光敏剂定位于溶酶体^[29], 光照射后经过两种不同的途径引起细胞的死亡, 一种是通过溶酶体的酶释放到细胞质引起细胞的死亡, 另一种经过光照射后光敏剂重新定位于其他非溶酶体的靶点, 引起细胞的死亡^[26]。

2 光动力治疗消化系统肿瘤

2.1 对消化系统癌前病变的治疗 癌前病变在胃肠道恶性肿瘤的发生、发展中具有重要地位^[30], 结、直肠的腺瘤、息肉(尤其是家族性息肉病患者)、血吸虫病肉芽肿等癌前病变都与结、直肠癌的发生有密切关系^[31-33]。对于胃肠道癌前病变的处理, 以往都采用手术切除的方法进行治疗, 病灶虽小, 但是手术和手术引起的创伤往往很大。随着微创医学理念的发展, 采用微创技术来治疗癌前病变, 引起研究者的兴趣。从不同研究者的研究结果看, 光动力治疗的效果不尽一致, 同时对利用光动力治疗的患者必须密切随访, 以便及时发现和处理光动力治疗失败者。Smolka *et al*^[34]报道应用氨基酮戊酸作为光敏剂^[35-36], 并通过内镜系统将光导纤维引导到病灶部位, 对食道、胃和肠道的癌前病变进行PDT治疗, 发现每个患者对治疗都产生反应, 其中2例患者的病灶完全消退, 其他5例患者的病变缩小面积也达到60%以上, 表明ALA-PDT对胃肠道癌前病变可能是一种有效的治疗方法^[37-38]。Weiss *et al*^[39]对17例患者Barrett's食道并且高度间变或早期食道癌的患者进行光动力治疗, 并在治疗后的第3、6、9、12月进行随访, 满一年后则每6 mo一次。其结果9例(占60%)患者高度间变或早期食道癌得到完全消除, 2例早期癌患者无反应, 1例高度间变患者的间变程度下降, 另1例无变化, 有4例患者则病情继续发展。研究者认为光动力治疗食道癌前病变的有效率为60%, 不能奏效者40%, 因此, 在PDT治疗后需要密切随访。

2.2 对消化系统恶性肿瘤的治疗

2.2.1 食道癌: Eickhoff *et al*^[40]应用5-氨基酮戊酸对长达10 cm的上段食道癌进行光动力治疗(5-ALA-PDT), 在3个疗程后, 利用内镜直视和超声内镜检查, 发现肿瘤已经完全消退, 并且组织活检也证实肿瘤已经完全消除。该例患者经过23 mo的随访, 仍然没有复发征象, 因此认为早期表浅的食道鳞癌可以通过5-ALA-PDT完全治愈, 但是仍需对这些患者进行远期随访。其他许多研究者的大量临床研究表明, PDT对食道癌确实具有治疗作用^[41-48]。

2.2.2 胃癌: 根治性切除是胃癌的首选治疗措施, 而且疗效十分肯定. 近几年来, 一些研究者对部分早期胃癌患者尝试应用PDT治疗, 目的是在治愈胃癌的同时, 使患者免除巨大的手术创伤^[49-51]. Nakamura *et al*^[52]用PDT治疗7例早期胃癌, 均获得成功, 术后病理活检未发现癌组织残留. Gahlen *et al*^[53]认为, PDT对胃肠道早期小癌变、癌前病变是可行的, 对于拒绝手术治疗的胃肠道肿瘤患者, PDT可以用作替代治疗措施之一.

2.2.3 胆管癌: 胆管癌的发病率近年来一直呈增高趋势, 尤其是高位胆管癌的切除率仍然偏低, 远期生存时间并没有显著提高. 最近, Mayo Clinic Rochester的Prasad *et al*^[54]采用光动力治疗25例已经无法手术切除的胆管癌患者, 其中Bismuth I型3例, III型13例, IV型9例. 在注射光敏剂后48 h, 光纤经逆行插管(20例)或经皮肤穿刺(5例)引导到胆管癌部位, 进行激光照射. 所有患者每3 mo进行一次PDT治疗, 在PDT治疗后, 放置10-11.5 F胆管支架进行胆道减压. 患者总的平均生存期为344 d, 其中PDT治疗后的生存期为214 d, 1年生存率为30%. 多因素分析表明, 如果在影像学上存在明显肿块、确诊胆管癌和开始PDT治疗的时间间隔越长, 愈后就越差; 血清白蛋白水平越高, 预示PDT治疗后的死亡率就越低.

2.2.4 胰腺癌: Bown *et al*^[55]对16例无法切除的胰腺癌患者进行光动力疗法的观察. 所有患者都有梗阻性黄疸, 事先通过放置胆道支架进行减黄处理. 注射光敏剂后3 d, 在CT引导下经皮肤胰腺穿刺将光线导引到肿瘤部位, 然后实施PDT. 其结果, 所有患者都有肿瘤坏死的征象, 14例在10 d内就出院, 2例由于肿瘤侵犯胃十二指肠动脉而发生大出血, 未经手术治疗就将出血控制. 在随访过程中, 3例出现十二指肠梗阻, 没有发生与PDT相关的死亡. 光动力治疗后的平均生存期是9.5 mo, 7例患者(44%)1年后健在.

2.2.5 转移癌: 对于胃肠道恶性肿瘤的腹腔内转移癌或肝转移癌, 目前仍然是临床治疗中的难点问题. 大多数患者已经无法根治性切除, 甚至已经失去手术时机, 而且化疗、放疗、免疫治疗等综合治疗措施也大多难以取得满意的疗效. 由于光动力治疗不会影响其他治疗方法的效果, 并且即使别的方法失败后, 光动力疗法仍然能够发挥效能, 近年来许多研究者积极探索利用光动力来治疗腹腔内广泛转移癌或肝转移癌, 取得了一些令人满意的初步疗效^[56-58].

3 光动力治疗存在的不足和解决的可能途径

Hahn *et al*^[59]对腹腔内转移性肿瘤和肉瘤的光动力治疗效果进行了二期临床试验, 他们分别对33例卵巢癌、37例胃肠道癌和30例肉瘤患者进行了观察, 其结果对腹腔内肿瘤进行光动力治疗是可行的, 但是并没有取得显著的完全缓解或长期控制的效果. 光敏剂摄取和肿瘤内氧化(tumor oxygenation)的不均一性(heterogeneity)、肿瘤对光敏剂摄取缺乏特异性以及组织内光学特性的不均一性是导致治疗效果不佳的主要原因^[60-62].

Van Duijnhoven *et al*^[63]对24例结直肠癌伴肝转移的31例无法手术切除的转移癌灶进行光动力治疗, 采用的光敏剂为5、10、15、20-羟苯菌绿素(mTHPBC), 分别在静脉注射光敏剂后12、48 h经皮穿刺插入光纤进行激光照射(60 J/cm²). 在PDT治疗后1 mo时检查发现, 所有患者的转移癌组织均发生坏死. 在副作用方面, 8例有轻微疼痛, 21例出现短暂的亚临床肝损害, 各有1例发生皮肤或胰腺损伤. 研究者认为对手术无法切除的肝转移癌灶, 采用间质性mTHPBC光动力治疗, 是一种安全有效的方法^[64].

进入21世纪以来, 随着PDT在国内的广泛应用, PDT的不足和局限性逐渐被人们认识, 加上最初时人们对PDT的期望值过高, 而在实际应用过程中, 一些患者PDT的疗效不尽满意. 除了PDT产生的皮肤光敏反应外, 光动力治疗中面临的问题还有: 由于可见光在组织中穿透性的限制, PDT对位于体内深部肿瘤的作用很微弱; 根据国家药事管理的法规, 当前国内还没有合格的光敏剂可供临床使用.

为了解决光线在实质性组织内的穿透问题, 目前主要采用在超声或CT引导下组织内穿刺的方法, 直接将光纤插入到深部肿瘤内和肿瘤组织周围. 在应用PDT治疗肝癌、胰腺癌等实质性肿瘤的过程中, 文献报道中普遍采用在超声或CT引导下经皮穿刺的PDT技术. 超声动力学治疗(sonodynamic therapy)是近年来新兴的一种技术, 他通过超声来激发声敏药物(sonosensitizer), 从而产生单线态氧等自由基, 启动脂质膜的过氧化反应, 进而杀伤肿瘤细胞. 超声动力学治疗的最大优点是可以穿透到深部组织.

由于光敏剂在体内循环需时较长, 在循环过程中受到吞噬细胞的破坏, 目前许多研究人员利用光敏剂激活剂缩短光敏剂到达靶器官或靶组织的途径及时间. Svensson *et al*的研究表明,

■创新盘点

对于脏器表面的息肉、癌前病变和早期癌, PDT具有比较确切的疗效, 而对腹腔内的中晚期癌症, 通过B超、CT引导下的经皮穿刺技术, 也可将光导纤维插入到肿瘤部位, 从而产生光动力效应.

应用要点

本文通过探讨 PDT 治疗过程中存在的问题和解决途径,对进一步研究克服 PDT 的缺陷,提高 PDT 疗效的技术方法有一定意义。

氢氧化氯苯是一种最潜在性的光敏素激活剂,能够促使光敏素迅速进入肿瘤细胞内,并且能迅速达到生物分布并从血液中清除^[65]。

光敏剂也可以用于光化学基因转染(photochemical gene transfection, PCGT)。PCGT 是一种新的基因转染技术,他通过光化学反应,导致内吞泡膜损伤,释放泡内转染基因。肖卫东 *et al*^[66]报道,以阳离子聚合物距乙烯基亚胺(polyetheneimine, PET)为 DNA 载体,增强绿光反应蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)质粒为目的 DNA,通过流式细胞计数对比观察光化学作用对阳离子聚合物介导 EGFP 质粒转染结肠癌细胞的影响。结果显示,光敏剂中介四-(对苯基磺酸)-卟吩钠(meso-tetraphenylporphine with two sulfonate groups on adjacent phenyl rings, TPPS2a)的胞内分布与内吞密切相关;基于 TPPS2a 的光化学细胞毒性作用呈剂量依赖性;与单纯质粒转染组和阳离子聚合物转染组相比,光化学可明显提高阳离子聚合物介导转染目的 DNA 的阳性细胞率。

参考文献

- Snyder JW, Greco WR, Bellnier DA, Vaughan L, Henderson BW. Photodynamic therapy: a means to enhanced drug delivery to tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 8126-8131
- Hamdan KA, Tait IS, Nadeau V, Padgett M, Carey F, Steele RJ. Treatment of grade III anal intraepithelial neoplasia with photodynamic therapy: report of a case. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1555-1559
- Hahn SM, Fraker DL, Mick R, Metz J, Busch TM, Smith D, Zhu T, Rodriguez C, Dimofte A, Spitz F, Putt M, Rubin SC, Menon C, Wang HW, Shin D, Yodh A, Glatstein A. A Phase II Trial of Intraperitoneal Photodynamic Therapy for Patients with Peritoneal Carcinomatosis and Sarcomatosis. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2517-2525
- Qiang YG, Zhang XP, Li J, Huang Z. Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 845-857
- Hjelde A, Gederaas OA, Krokan HE, Brubakk AO. Lack of effect of hyperoxia on photodynamic therapy and lipid peroxidation in three different cancer cell lines. *Med Sci Monit* 2005; 11: BR351-BR356
- Henderson BW, Gollnick SO, Snyder JW, Busch TM, Kousis PC, Cheney RT, Morgan J. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 2120-2126
- 雷姗姗, 李铁刚. 光动力治疗胃肠道肿瘤. 中国现代手术学杂志 2005; 9: 76-79
- Webber J, Herman M, Kessel D, Fromm D. Photodynamic treatment of neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. Recent advances in techniques and results. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 299-304
- Usuda J, Chiu SM, Azizuddin K, Xue LY, Lam M, Nieminen AL, Oleinick NL. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO: dependence on Bax. *Photochem Photobiol* 2002; 76: 217-223
- Takahira K, Sano M, Arai H, Hanai H. Apoptosis of gastric cancer cell line MKN45 by photodynamic treatment with photofrin. *Lasers Med Sci* 2004; 19: 89-94
- Varnes ME, Chiu SM, Xue LY, Oleinick NL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 673-679
- Mitsunaga M, Tsubota A, Nariai K, Namiki Y, Sumi M, Yoshikawa T, Fujise K. Early apoptosis and cell death induced by ATX-S10Na (II)-mediated photodynamic therapy are Bax- and p53-dependent in human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 692-698
- 禹丽娜, 杨观端. 凋亡相关基因与肿瘤光动力学疗法的疗效. 中国激光医学杂志 2006; 15: 389-394
- Mikes J, Kleban J, Sacková V, Horváth V, Jamborová E, Vaculová A, Kozubík A, Hofmanová J, Fedorocko P. Necrosis predominates in the cell death of human colon adenocarcinoma HT-29 cells treated under variable conditions of photodynamic therapy with hypericin. *Photochem Photobiol Sci* 2007; 6: 758-766
- van Duijnhoven FH, Aalbers RI, Rovers JP, Terpstra OT, Kuppen PJ. Immunological aspects of photodynamic therapy of liver tumors in a rat model for colorectal cancer. *Photochem Photobiol* 2003; 78: 235-240
- Hanlon JG, Adams K, Rainbow AJ, Gupta RS, Singh G. Induction of Hsp60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2001; 64: 55-61
- Abdel-Hady ES, Martin-Hirsch P, Duggan-Keen M, Stern PL, Moore JV, Corbitt G, Kitchener HC, Hampson IN. Immunological and viral factors associated with the response of vulval intraepithelial neoplasia to photodynamic therapy. *Cancer Res* 2001; 61: 192-196
- Marchal S, Fadloun A, Maugain E, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 1167-1176
- Shen XY, Zagal N, Singh G, Rainbow AJ. Alterations in mitochondrial and apoptosis-regulating gene expression in photodynamic therapy-resistant variants of HT29 colon carcinoma cells. *Photochem Photobiol* 2005; 81: 306-313
- 黄正, 强永刚, 陈伟. 光动力学疗法诱导抗肿瘤免疫反应研究的进展. 中国激光医学杂志 2006; 15: 121-124
- Gupta N, Martin PM, Miyauchi S, Ananth S, Herdman AV, Martindale RG, Podolsky R, Ganapathy V. Down-regulation of BCRP/ABCG2 in colorectal and cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 571-577
- Bronshteint I, Aulova S, Juzeniene A, Iani V, Ma LW, Smith KM, Malik Z, Moan J, Ehrenberg B. In vitro and in vivo photosensitization by

- protoporphyrins possessing different lipophilicities and vertical localization in the membrane. *Photochem Photobiol* 2006; 82: 1319-1325
- 23 Ji Z, Yang G, Vasovic V, Cunderlikova B, Suo Z, Nesland JM, Peng Q. Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for its photodynamic efficiency of human carcinoma and normal cell lines. *J Photochem Photobiol B* 2006; 84: 213-220
 - 24 Krieg RC, Messmann H, Schlottmann K, Endlicher E, Seeger S, Schölmerich J, Knuechel R. Intracellular localization is a cofactor for the phototoxicity of protoporphyrin IX in the gastrointestinal tract: in vitro study. *Photochem Photobiol* 2003; 78: 393-399
 - 25 Mordon S, Maunoury V. Using white light during photodynamic therapy: visualization only or treatment? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 765-771
 - 26 苗丽霞, 张宝琴, 肖谧, 张镇西. 光动力作用与生物膜. *中国激光医学杂志* 2005; 14: 190-193
 - 27 Sharma M, Sahu K, Dube A, Gupta PK. Extracellular pH influences the mode of cell death in human colon adenocarcinoma cells subjected to photodynamic treatment with chlorin p6. *J Photochem Photobiol B* 2005; 81: 107-113
 - 28 Teiten MH, Bezdetnaya L, Morliere P, Santus R, Guillemin F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer* 2003; 88: 146-152
 - 29 Saczko J, Kulbacka J, Chwilkowska A, Pola A, Lugowski M, Marcinkowska A, Malarska A, Banas T. Cytosolic superoxide dismutase activity after photodynamic therapy, intracellular distribution of Photofrin II and hypericin, and P-glycoprotein localization in human colon adenocarcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45: 93-98
 - 30 Webber J, Fromm D. Photodynamic Therapy for Carcinoma In Situ of the Anus *Arch Surg*. *Arch Surg* 2004; 139: 259-261
 - 31 Wang JB, Liu LX. Use of photodynamic therapy in malignant lesions of stomach, bile duct, pancreas, colon and rectum. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 718-724
 - 32 Ross HM, Smelstoys JA, Davis GJ, Kapatkin AS, Del Piero F, Reineke E, Wang H, Zhu TC, Busch TM, Yodh AG, Hahn SM. Photodynamic therapy with motexafin lutetium for rectal cancer: a preclinical model in the dog. *J Surg Res* 2006; 135: 323-330
 - 33 Shahzidi S, Stokke T, Soltani H, Nesland JM, Peng Q. Induction of apoptosis by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human colon carcinoma cell line 320DM. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006; 25: 159-171
 - 34 Smolka J, Mateasik A, Cunderlikova B, Sanislo L, Mlkvy P. In vivo fluorescence diagnostics and photodynamic therapy of gastrointestinal superficial polyps with aminolevulinic acid. A clinical and spectroscopic study. *Neoplasma* 2006; 53: 418-423
 - 35 Wild PJ, Krieg RC, Seid J, Stoehr R, Reher K, Hofmann C, Louhelainen J, Rosenthal A, Hartmann A, Pilarsky C, Bosserhoff AK, Knuechel R. RNA expression profiling of normal and tumor cells following photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in vitro. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 516-528
 - 36 Juzeniene A, Juzenas P, Ma LW, Iani V, Moan J. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2004; 19: 139-149
 - 37 Marchal S, Bezdetnaya L, Guillemin F. Modality of cell death induced by Foscan-based photodynamic treatment in human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Biochemistry (Mosc)* 2004; 69: 45-49
 - 38 Lovat LB, Jamieson NF, Novelli MR, Mosse CA, Selvasekar C, Mackenzie GD, Thorpe SM, Bown SG. Photodynamic therapy with m-tetrahydroxyphenyl chlorin for high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's columnar lined esophagus. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 617-623
 - 39 Weiss AA, Wiesinger HA, Owen D. Photodynamic therapy in Barrett's esophagus: results of treatment of 17 patients. *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 261-264
 - 40 Eickhoff A, Jakobs R, Weickert U, Hartmann D, Schilling D, Alsenbesy M, Eickhoff JC, Riemann JF. Long-Segment early squamous cell carcinoma of the proximal esophagus: curative treatment and long-term follow-up after 5-aminolevulinic acid (5-ALA)-photodynamic therapy. *Endoscopy* 2006; 38: 641-643
 - 41 Ma L, Steindal AE, Juzeniene A, Iani V, Moan J. The effect of folic acid on porphyrin synthesis in tumors and normal skin of mice treated with 5-aminolevulinic acid or methyl 5-aminolevulinate. *Photochem Photobiol Sci* 2006; 5: 755-759
 - 42 Keeley SB, Pennathur A, Gooding W, Landreneau RJ, Christie NA, Luketich J. Photodynamic therapy with curative intent for Barrett's esophagus with high grade dysplasia and superficial esophageal cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 2406-2410
 - 43 Shah AK, Wolfson HC, Hemminger LL, Shah AA, DeVault KR. Changes in esophageal motility after porfimer sodium photodynamic therapy for Barrett's dysplasia and mucosal carcinoma. *Dis Esophagus* 2006; 19: 335-339
 - 44 Foroulis CN, Thorpe JA. Photodynamic therapy (PDT) in Barrett's esophagus with dysplasia or early cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 29: 30-34
 - 45 Overholt BF, Wang KK, Burdick JS, Lightdale CJ, Kimmey M, Nava HR, Sivak MV Jr, Nishioka N, Barr H, Marcon N, Pedrosa M, Bronner MP, Grace M, Depot M. Five-year efficacy and safety of photodynamic therapy with Photofrin in Barrett's high-grade dysplasia. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 460-468
 - 46 Yano T, Muto M, Minashi K, Ohtsu A, Yoshida S. Photodynamic therapy as salvage treatment for local failures after definitive chemoradiotherapy for esophageal cancer. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 31-36
 - 47 Little VR, Luketich JD, Christie NA, Buenaventura PO, Alvelo-Rivera M, McCaughan JS, Nguyen NT, Fernando HC. Photodynamic therapy as palliation for esophageal cancer: experience in 215 patients. *Ann Thorac Surg* 2003; 76: 1687-1692; discussion 1692-1693
 - 48 Moghissi K, Dixon K. Photodynamic therapy (PDT) in esophageal cancer: a surgical view of its indications based on 14 years experience. *Technol Cancer Res Treat* 2003; 2: 319-326
 - 49 Namiki Y, Namiki T, Date M, Yanagihara K, Yashiro M, Takahashi H. Enhanced photodynamic antitumor effect on gastric cancer by a novel photosensitive stealth liposome. *Pharmacol Res* 2004;

■名词解释

光动力疗法 (PDT): 是指光敏剂在有氧环境中, 并且在激光照射下产生单线态氧等超氧离子, 进而导致受照射的肿瘤细胞凋亡、坏死的治疗方法。

■同行评价

本文写作规范, 层次清楚, 论据充分, 有一定的临床指导价值.

- 50: 65-76
- 50 Wiedmann MW, Caca K. General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications. *Curr Pharm Biotechnol* 2004; 5: 397-408
- 51 Kikuchi T, Asakura T, Aihara H, Shiraki M, Takagi S, Kinouchi Y, Aizawa K, Shimosegawa T. Photodynamic therapy of intestinal tumors with mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a basic study. *Anticancer Res* 2003; 23: 4897-4900
- 52 Nakamura H, Yanai H, Nishikawa J, Okamoto T, Hirano A, Higaki M, Omori K, Yoshida T, Okita K. Experience with photodynamic therapy (endoscopic laser therapy) for the treatment of early gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1599-1603
- 53 Gahlen J, Probst RL, Stern J. Photodynamic therapy in the gastrointestinal tract. Possibilities and limits. *Chirurg* 2002; 73: 122-131
- 54 Prasad GA, Wang KK, Baron TH, Buttar NS, Wongkeesong LM, Roberts LR, LeRoy AJ, Lutzke LS, Borkenhagen LS. Factors associated with increased survival after photodynamic therapy for cholangiocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 743-748
- 55 Bown SG, Rogowska AZ, Whitelaw DE, Lees WR, Lovat LB, Ripley P, Jones L, Wyld P, Gillams A, Hatfield AW. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut* 2002; 50: 549-557
- 56 Woodhams JH, MacRobert AJ, Novelli M, Bown SG. Photodynamic therapy with WST09 (Tookad): quantitative studies in normal colon and transplanted tumours. *Int J Cancer* 2006; 118: 477-482
- 57 Busch TM, Hahn SM, Wileyto EP, Koch CJ, Fraker DL, Zhang P, Putt M, Gleason K, Shin DB, Emanuele MJ, Jenkins K, Glatstein E, Evans SM. Hypoxia and Photofrin uptake in the intraperitoneal carcinomatosis and sarcomatosis of photodynamic therapy patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4630-4638
- 58 Jalili A, Makowski M, Switaj T, Nowis D, Wilczynski GM, Wilczek E, Chorazy-Massalska M, Radzikowska A, Maslinski W, Biały L, Sienko J, Sieron A, Adamek M, Basak G, Mróz P, Krasnodebski IW, Jakóbiak M, Gołab J. Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4498-4508
- 59 Hahn SM, Fraker DL, Mick R, Metz J, Busch TM, Smith D, Zhu T, Rodriguez C, Dimofte A, Spitz F, Putt M, Rubin SC, Menon C, Wang HW, Shin D, Yodh A, Glatstein E. A phase II trial of intraperitoneal photodynamic therapy for patients with peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2517-2525
- 60 Banfi S, Caruso E, Caprioli S, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, Gariboldi M, Monti E. Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 4853-4860
- 61 Hahn SM, Putt ME, Metz J, Shin DB, Rickter E, Menon C, Smith D, Glatstein E, Fraker DL, Busch TM. Photofrin uptake in the tumor and normal tissues of patients receiving intraperitoneal photodynamic therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5464-5470
- 62 陈祖林, 葛海燕, 肖卫东. 激光光动力治疗胃肠肿瘤. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1918-1921
- 63 van Duijnhoven FH, Rovers JP, Engelmann K, Krajina Z, Purkiss SF, Zoetmulder FA, Vogl TJ, Terpstra OT. Photodynamic therapy with 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin for colorectal liver metastases is safe and feasible: results from a phase I study. *Ann Surg Oncol* 2005; 12: 808-816
- 64 Spinelli P, Calarco G, Mancini A, Ni XG. Operative colonoscopy in cancer patients. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2006; 15: 339-347
- 65 Svensson J, Johansson A, Gräfe S, Gitter B, Trebst T, Bendsoe N, Andersson-Engels S, Svanberg K. Tumor selectivity at short times following systemic administration of a liposomal temoporfin formulation in a murine tumor model. *Photochem Photobiol* 2007; 83: 1211-1219
- 66 肖卫东, 陈炜, 陈祖林, 刘嘉, 葛海燕. 光化学作用增强阳离子聚合物介导EGFP转染结肠癌. *第三军医大学学报* 2006; 28: 922-925

编辑 程剑侠 电编 何基才

局部切除术在Vater壶腹肿瘤治疗中的地位

乔岐禄, 刘 斯

乔岐禄, 刘斯, 北京大学第一医院普通外科 北京市 100034
乔岐禄, 医学博士, 主任医师, 主要从事肝、胆、胰肿瘤的临床治疗及实验研究。

作者贡献分布: 乔岐禄负责文章立题, 设计, 论文指导; 刘斯负责查阅文献, 论文书写。

通讯作者: 刘斯, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院普通外科, docleo@vip.sina.com
电话: 010-66551122-2410

收稿日期: 2007-07-13 修回日期: 2008-01-12

Local resection of ampullary tumors

Qi-Lu Qiao, Si Liu

Qi-Lu Qiao, Si Liu, Department of General Surgery, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China
Correspondence to: Si Liu, Department of General Surgery, the First Hospital of Peking University, 8 Xishiku Street, Beijing 100034, China. docleo@vip.sina.com
Received: 2007-07-13 Revised: 2008-01-12

Abstract

Ampullary tumors are rare. Their appropriate treatment is still controversial. Local resection of ampullary tumors is a relatively simple procedure with a lower operative morbidity and mortality rate than pancreatoduodenectomy. However, the mortality of Whipple procedure has significantly decreased in the past two decades, as reported in many medical centers. Since accurate preoperative histological diagnosis and staging of the tumors are often difficult and inconclusive, local resection should be limited in those with a poor health status, or in those refusing major operations, although it is considered an alternative in patients with a high co-morbidity.

Key Words: Tumors of ampulla of Vater; Local resection; Pancreatoduodenectomy

Qiao QL, Liu S. Local resection of ampullary tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 463-467

摘要

Vater壶腹肿瘤比较少见, 手术方式的选择目前仍存争议。局部切除术与胰十二指肠切除术相比, 手术操作相对简单, 手术死亡率和并发

症率相对较低, 安全性较高, 但复发率也较高。近年来, 在大多数有经验的医学中心Whipple术的手术死亡率已明显下降, 且壶腹肿瘤术前、术中准确的组织学诊断及分期常有困难, 结果常不可靠。因此, 局部切除的指征应严格掌握, 仅限于高危人群或拒绝大手术的患者。

关键词: 壶腹肿瘤; 局部切除术; 胰十二指肠切除术

乔岐禄, 刘斯. 局部切除术在Vater壶腹肿瘤治疗中的地位. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 463-467

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/463.asp>

0 引言

壶腹肿瘤是发生在Vater壶腹或Vater乳头(十二指肠乳头)的肿瘤^[1]。Abrahamus Vater在1720年首次描述了Vater壶腹这一解剖结构。该部位解剖极为复杂, 范围包括被Oddi括约肌包绕的胆总管末端、主胰管末端、胆胰管壶腹及壶腹隆起部(十二指肠乳头)的十二指肠黏膜。该部位有3种不同的上皮来源, 即胆管上皮、胰管上皮和十二指肠黏膜。1898年Halsted完成第1例壶腹癌局部切除术, 术后7 mo患者死于肿瘤复发。1935年Whipple成功对壶腹癌进行了两阶段的胰头及十二指肠整块切除术, 使肿瘤的根治程度得到提高, 术后患者生存25 mo, 死于肝转移。虽然胰十二指肠切除术(pancreatoduodenectomy, PD)相对于局部切除术提高了肿瘤根治程度, 但早年手术死亡率和并发症率很高, 效果也不尽满意。1976年1篇多中心的报道^[2]显示壶腹癌Whipple手术死亡率17%, 5年生存率仅为6%。而局部切除术创伤小、操作简单, 被认为是一种相对比较安全的术式。如能完整切除肿瘤, 切缘无瘤组织残留, 患者可望得到与胰十二指肠切除术相近的效果^[3]。因此外科医生曾又一度热衷于壶腹癌局部切除这一术式。

然而, 近20年来随着手术技术的提高、麻醉和重症监护技术的改进及影像学检查的进步, 大多数中心的Whipple术围手术期死亡率已降低至5%以下, 且5年生存率得到了大幅提高, 胰

■背景资料

壶腹肿瘤发生率较低, 手术切除是其主要的治疗手段。根治术式有局部切除和胰十二指肠切除两种。由于Vater壶腹肿瘤少见, 目前对该肿瘤手术切除的方式选择仍存在较多争议。

■同行评议者

秦环龙, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院外科

■相关报道

文献报道壶腹癌根治性切除术后5年及10年存活率稳步提高,但肿瘤局部切除术后有较高的复发率。由于本病发生率低,目前尚没有信服的前瞻性随机对照的临床试验结果。

表 1 局部切除文献报道

作者	年份	n	肿瘤性质(M恶、B良)	手术死亡率(%)	并发症率(%)	5年生存率(%)	复发率(%)
Knox <i>et al</i> ^[3]	1986	25	M	0		51	40
Tarazi <i>et al</i> ^[4]	1986	11	M	9.1		40.9	27.3
Asbun <i>et al</i> ^[5]	1993	8	B	0	30.8 ¹		0
		4	M				
Sperti <i>et al</i> ^[6]	1994	5	M			60	
Branum <i>et al</i> ^[7]	1996	18	B	0	19.2		27.8
		8	M				62.5
Rattner <i>et al</i> ^[8]	1996	8	B	0	14.3 ¹		0
		2	M				0
Treitschke <i>et al</i> ^[9]	1999	36	B	0	2.8		0
Meneghetti <i>et al</i> ^[10]	2005	24	B	0	23		12.5
		6	M			50	33
Demetriades <i>et al</i> ^[11]	2006	8	B	0	0		0
		12	M			33.3	25(2例pT2)

¹全部局部切除病例。

十二指肠切除治疗壶腹癌的优势得以显现。但目前对该肿瘤的术式选择尤其是局部切除的适应症仍存在争议。本文复习近年相关文献,就局部切除术在壶腹肿瘤治疗中的地位进行讨论。

1 壶腹肿瘤的局部切除

大多数壶腹肿瘤局部切除的文献报道无手术死亡(表1),手术并发症低于20%,且并发症都比较轻,与Whipple手术相比手术安全性较高。对壶腹良性肿瘤,多数报道复发率为0^[5,8-9,11],但也有复发的报道^[7,10]。在无复发的文献^[5,8-9,11]中,局部切除的切缘距肿瘤边缘距离常大于1 cm。而在报道有复发的文献里, Meneghetti *et al*^[10]报道其在局部切除过程中切缘距肿瘤边缘仅5 mm; Branum *et al*^[7]在文献中未描述切缘距肿瘤的距离,且5例复发中2例为Gardner综合征患者。因此,可以认为只要保证一定的切除范围,局部切除对于壶腹良性肿瘤可以达到比较满意的治疗效果。

对壶腹恶性肿瘤,虽然有报道局部切除的5年生存率为33.3%-51%^[3-4,10-11],也能达到Whipple术相似的5年生存率,但是局部切除术与胰十二指肠切除术进行比较存在以下几个问题:(1)局部切除的例数较少;(2)局部切除的随访时间相对较短,除Meneghetti *et al*^[10]、Demetriades *et al*^[11]的随访时间超过5年, Rattner *et al*^[8]的2例分别为46 mo和75 mo, Branum *et al*^[7]的8例平均随访时间仅为27(21-36) mo;(3)病例缺乏可比性,能进行局部切除的病例通常为早期肿瘤,而

Whipple术则应用于分期高达T3N1的壶腹癌。作者报道^[20]的127例壶腹癌,有3例进行了首次局部切除,尽管都获得了阴性切缘,其中2例在2年内死于肿瘤复发,另1例在术后38 mo局部复发而行Whipple切除术,与Meneghetti *et al*^[10]的经验相同。因此,与PD术相比,局部切除术的根治效果存在疑问,但目前尚缺乏大样本的前瞻性随机对照研究资料以得到确定性结论。此外,局部切除术通常不附加淋巴结清扫,其应用不利于对壶腹癌的全面分期。

2 胰十二指肠切除术的远期效果

近20年来,Whipple手术的围手术期死亡率在多数医学中心已降到5%以下,个别甚至报道无手术死亡^[13,16]。但手术并发症率仍较高,大多数报道的并发症率超过30%,最高达到59%^[19]。从远期存活情况来看,总体的5年生存率平均42.5%^[20],有报道高达66.7%^[16]。我院胰十二指肠切除术124例的10年生存率35.7%^[20],即有超过1/3的Whipple术患者可以达到临床治愈(表2)。

与局部切除术相比,早期壶腹癌行胰十二指肠切除术的根治效果明显优于前者。对无淋巴结转移的病例,Whipple术的5年生存率为63%^[15],我院为58%^[20]。对肿瘤分化好的壶腹癌,Whipple术的5年生存率为54.6%^[19]。Duff报道没有神经侵犯的5年生存率为78.8%^[16]、Yoon报道为62%^[17]。对I期壶腹癌,Beger报道5年生存率为84%^[15]、Hsu为77.7%^[19]。就肿瘤侵犯深度,Yoon *et al*^[17]报道pTis、pT1壶腹癌总5年生

表 2 1990年后大宗Whipple术文献报道

作者	年份	n	死亡率(%)	并发症率(%)	生存率(%)		
					3年	5年	10年
Monson <i>et al</i> ^[12]	1991	104	5.7	9 ¹		34	25
Talamini <i>et al</i> ^[13]	1997	103	3.8	47		38	
			0 ²	38 ²			
Howe <i>et al</i> ^[14]	1998	99	5			46	
Beger <i>et al</i> ^[15]	1999	98	3.2	25	72(PPPD)		
					52(PD)		
Duffy <i>et al</i> ^[16]	2003	55	0	49.1		67.7	
						25.5 ³	9.1 ³
Yoon <i>et al</i> ^[17]	2005	201	1	33.8		39.7 ³	15.6 ³
Balachandran <i>et al</i> ^[18]	2006	113	8	48		33 ⁴	
Hsu <i>et al</i> ^[19]	2007	135	3	59		45.7	
Qiao <i>et al</i> ^[20]	2006	124	9.7	40.2	46.8	43.3	35.7

¹较严重并发症; ²1992年后; ³实际生存率; ⁴去除手术死亡。

存率为83.7%, pTis病例为100%; Beger *et al*^[15]的pT1和pT2壶腹癌5年生存率79%; Hsu *et al*^[19]报道pT1的5年生存率83.9%, pT2的59.2%。我院20 pTis至pT2病例的5年生存率49.5%。故对早期无淋巴结转移壶腹癌, 胰十二指肠切除术几乎可以达到治愈的效果, 而局部切除后仍有较高的复发风险。目前世界范围的绝大多数医疗中心都将Whipple术作为治疗壶腹癌的首选术式, 局部切除在壶腹癌治疗中的地位极其有限, 仅限于高龄、一般情况差, 不能耐受大手术的患者^[8,15,17]。

也有学者提出了局部切除的指征标准, 认为良性肿瘤和早期恶性肿瘤的患者可以应用局部切除^[8-9,11,15], 但临床上外科医生进行具体掌握时存在一定的困难。这主要与壶腹肿瘤术前甚至术中对良、恶性及肿瘤分期难以准确判断有关。

3 各种辅助检查的评价

虽然有二次行Whipple手术的并发症与直接行Whipple术相近的报道^[21], 但临床上还是应当在可能的情况下争取首次手术达到合适且必要的切除范围, 毕竟首次手术最安全、最可能完全切除肿瘤, 一旦局部切除失败, 将延误最佳治疗时机, 影响患者预后。由于局部切除对壶腹恶性肿瘤的治疗效果不理想, 且因为技术的原因, 其切除范围受到限制, 因此术前、术中肿瘤性质的可靠诊断和分期对局部切除病例的准确选择显得非常重要。

3.1 术前十二指肠镜活检的准确率 Cattell *et al*于

1950年首次报道了壶腹腺瘤发展至壶腹癌的现象^[22]。随后, 很多作者提出了壶腹肿瘤“腺瘤-非典型增生-腺癌”的演变过程。Beger *et al*^[15]报道腺瘤癌变率16.6%。所以, 由于活检取材的原因, 术前、术中活检提示为良性腺瘤并不能除外合并恶性的可能。

Rattner *et al*^[8]和Beger *et al*^[15]分别报道十二指肠镜活检对恶性肿瘤的敏感率为42%和40%, 特异率为79%和78%。Jordan *et al*^[23]发现65%的绒毛状腺瘤石蜡病理提示有癌变, 如果包括原位癌, 则癌变率达87%。Komorowski *et al*^[24]报道首次内镜活检有25%的漏诊率。Heidecke *et al*^[25]回顾32例壶腹肿瘤病理资料, 尽管活检平均7.6处/患者, 漏诊率仍达28.1%。我院76例患者进行了ERCP检查, 其中36个患者进行了活检, 活检阳性率仅为53%^[20]。可见, 术前活检对恶性肿瘤的漏诊率较高, 对选择手术方式的帮助价值有限。尽管Branum *et al*^[7]报道术前活检结合术中冰冻的诊断准确率为100%。但大多数学者认为术中冰冻并不完全可靠。Asbun *et al*^[5]的术中冰冻准确率85.7%, Schoenberg *et al*^[26]的准确率97%。由于使用胆道支架、电刀烧灼等原因, 冰冻病理对切缘残癌的判断也不完全准确。因此, 虽然冰冻病理较内镜活检的取材更完整、准确率更高, 但仍存在一定的偏差。

3.2 内镜超声(EUS)的效果评价 Jordan *et al*^[23]发现, 术后证实pT1的病例30%在术前、术中被认为是原位癌。Ito *et al*^[27]分析23例早期壶腹癌(pTis、pT1)的病理结果, 肿瘤侵犯胆管下段占39%, 侵犯胰管占8%, 有胰管侵犯或下段胆管侵

■应用要点

局部切除有较高的复发率, 肿瘤局部切除适应症应严格掌握, 仅适用于pTisN0M0、pT1N0M0、肿瘤分化好的高危人群或拒绝大手术的患者。

■同行评价

本文整体书写流畅, 简明扼要, 有层次。

犯的占43%。Yoon *et al*^[17]报道早期壶腹癌(pTis、pT1)中存在淋巴结转移的占9%, 肿瘤小于1 cm的淋巴结转移率11.6%, 高分化的淋巴结转移率23.5%, 无溃疡样外观的淋巴结转移率29.9%, 其中胆管侵犯长度平均7.7 mm, 最长25 mm, 胰管侵犯长度平均6.3 mm, 最长18 mm, 存在胆管或胰管侵犯的占22.4%。因此, 对术前、术中检查已明确恶性诊断的病例, 进行手术方式的选择时, 还必须了解肿瘤的分期, 尤其是淋巴结转移的情况, 以准确选择能够达到完全切除的手术方式。

近年来有报道内镜超声可以在术前为肿瘤分期提供有价值的信息, 但准确程度有限。其对侵犯深度判断的准确率75%-83%, 对淋巴结转移判断的准确率54%-68%^[28-32]。有报道EUS不能准确区别pT1壶腹癌和腺瘤^[8]。内镜超声作为新兴的影像学方法, 其应用尚处于经验积累阶段, 随经验的进一步丰富, 其对壶腹肿瘤诊断的可靠程度有望进一步提高。

总之, 术前、术中各种检查均不能准确明确肿瘤性质和肿瘤分期。因此, 在临床实践中, 准确选择局部切除术的合适病例仍存在困难。

4 局部切除的地位

对于术前、术中检查明确为恶性肿瘤的病例, 有作者^[8,15,17]建议对无明确禁忌的均行胰十二指肠切除术, 仅对早期、Whipple手术风险高的患者使用局部切除术, 并建议局部切除的同时附加淋巴结清扫。

对于术前、术中检查提示良性肿瘤的病例, 手术方式的选择应谨慎。Treitschke *et al*^[9]认为只要手术操作准确, 局部切除术能够可靠治愈良性肿瘤。但是Heidecke *et al*^[25]报道腺瘤伴重度不典型增生行局部切除术后58%复发, 且7例复发病例中5例有癌变; 术前活检提示腺瘤伴重度不典型增生的病例83%术后病理为恶性。Meneghetti *et al*^[10]发现术前活检诊断为腺瘤伴重度不典型增生的术后病理均证实为恶性。因此, 有作者^[9,33]建议对术前、术中诊断为腺瘤伴重度不典型增生的病例行Whipple术或保留幽门的胰十二指肠切除术(PPPD)。

另外, Rattner *et al*^[8]通过分析认为: 对于类癌, 虽然肿瘤较局限, 但有一半以上存在淋巴结转移, 建议行Whipple术; 无功能神经内分泌肿瘤常常体积较大, 不适合局部切除; 家族性息肉病因其复发率较高, 建议行PD切除。

总之, 对于壶腹肿瘤, 术前、术中准确的组织学诊断及分期常有困难, 结果常不可靠, 治疗

方式的选择存在争议。

在这里, 我们建议在壶腹肿瘤治疗中对于壶腹良性肿瘤, 可考虑行局部切除, 应注意术前及术中检查证实良性诊断, 并且要获得阴性切缘, 否则有复发甚至恶变的可能。对大体形态可疑恶性、组织学异型性明显的病例应附加淋巴结清扫。术后要定期复查十二指肠镜。对于壶腹恶性肿瘤, 只要条件允许, 应首先考虑Whipple术。局部切除的指征应严格掌握, 仅对pTis N0M0、pT1N0M0、肿瘤分化好的高危人群或拒绝大手术的患者作为姑息治疗手段, 并附加淋巴结清扫。

5 参考文献

- 1 Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. American Joint Committee on Cancer Staging Manual. 6th edition. New York, Springer-Verlag 2002; 151-156
- 2 Nakase A, Matsumoto Y, Uchida K, Honjo I. Surgical treatment of cancer of the pancreas and the periampullary region: cumulative results in 57 institutions in Japan. *Ann Surg* 1977; 185: 52-57
- 3 Knox RA, Kingston RD. Carcinoma of the ampulla of Vater. *Br J Surg* 1986; 73: 72-73
- 4 Tarazi RY, Hermann RE, Vogt DP, Hoerr SO, Esselstyn CB Jr, Cooperman AM, Steiger E, Grundfest S. Results of surgical treatment of periampullary tumors: a thirty-five-year experience. *Surgery* 1986; 100: 716-723
- 5 Asbun HJ, Rossi RL, Munson JL. Local resection for ampullary tumors. Is there a place for it? *Arch Surg* 1993; 128: 515-520
- 6 Sperti C, Pasquali C, Piccoli A, Sernagiotto C, Pedrazzoli S. Radical resection for ampullary carcinoma: long-term results. *Br J Surg* 1994; 81: 668-671
- 7 Branum GD, Pappas TN, Meyers WC. The management of tumors of the ampulla of Vater by local resection. *Ann Surg* 1996; 224: 621-627
- 8 Rattner DW, Fernandez-del Castillo C, Brugge WR, Warshaw AL. Defining the criteria for local resection of ampullary neoplasms. *Arch Surg* 1996; 131: 366-371
- 9 Treitschke F, Beger HG. Local resection of benign periampullary tumors. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 4: 212-214
- 10 Meneghetti AT, Safadi B, Stewart L, Way LW. Local resection of ampullary tumors. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1300-1306
- 11 Demetriades H, Zacharakis E, Kirou I, Pramateftakis MG, Sapidis N, Kanellos I, Betsis D. Local excision as a treatment for tumors of ampulla of Vater. *World J Surg Oncol* 2006; 4: 14
- 12 Monson JR, Donohue JH, McEntee GP, McIlrath DC, van Heerden JA, Shorter RG, Nagorney DM, Ilstrup DM. Radical resection for carcinoma of the ampulla of Vater. *Arch Surg* 1991; 126: 353-357
- 13 Talamini MA, Moesinger RC, Pitt HA, Sohn TA, Hruban RH, Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Adenocarcinoma of the ampulla of Vater. A 28-year experience. *Ann Surg* 1997; 225: 590-599; discussion

- 599-600
- 14 Howe JR, Klimstra DS, Moccia RD, Conlon KC, Brennan MF. Factors predictive of survival in ampullary carcinoma. *Ann Surg* 1998; 228: 87-94
 - 15 Beger HG, Treitschke F, Gansauge F, Harada N, Hiki N, Mattfeldt T. Tumor of the ampulla of Vater: experience with local or radical resection in 171 consecutively treated patients. *Arch Surg* 1999; 134: 526-532
 - 16 Duffy JP, Hines OJ, Liu JH, Ko CY, Cortina G, Isacoff WH, Nguyen H, Leonardi M, Tompkins RK, Reber HA. Improved survival for adenocarcinoma of the ampulla of Vater: fifty-five consecutive resections. *Arch Surg* 2003; 138: 941-948; discussion 948-950
 - 17 Yoon YS, Kim SW, Park SJ, Lee HS, Jang JY, Choi MG, Kim WH, Lee KU, Park YH. Clinicopathologic analysis of early ampullary cancers with a focus on the feasibility of ampullectomy. *Ann Surg* 2005; 242: 92-100
 - 18 Balachandran P, Sikora SS, Kapoor S, Krishnani N, Kumar A, Saxena R, Kapoor VK. Long-term survival and recurrence patterns in ampullary cancer. *Pancreas* 2006; 32: 390-395
 - 19 Hsu HP, Yang TM, Hsieh YH, Shan YS, Lin PW. Predictors for patterns of failure after pancreaticoduodenectomy in ampullary cancer. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 50-60
 - 20 Qiao QL, Zhao YG, Ye ML, Yang YM, Zhao JX, Huang YT, Wan YL. Carcinoma of the ampulla of Vater: factors influencing long-term survival of 127 patients with resection. *World J Surg* 2007; 31: 137-143; discussion 144-146
 - 21 Sohn TA, Lillemoe KD, Cameron JL, Pitt HA, Huang JJ, Hruban RH, Yeo CJ. Reexploration for periampullary carcinoma: resectability, perioperative results, pathology, and long-term outcome. *Ann Surg* 1999; 229: 393-400
 - 22 Cattell RB, Pyrtek LJ. Premalignant lesions of the ampulla of Vater. *Surg Gynecol Obstet* 1950; 90: 21-30
 - 23 Jordan PH Jr, Ayala G, Rosenberg WR, Kinner BM. Treatment of ampullary villous adenomas that may harbor carcinoma. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 770-775
 - 24 Komorowski RA, Beggs BK, Geenan JE, Venu RP. Assessment of ampulla of Vater pathology. An endoscopic approach. *Am J Surg Pathol* 1991; 15: 1188-1196
 - 25 Heidecke CD, Rosenberg R, Bauer M, Werner M, Weigert N, Ulm K, Roder JD, Siewert JR. Impact of grade of dysplasia in villous adenomas of Vater's papilla. *World J Surg* 2002; 26: 709-714
 - 26 Schoenberg MH, Treitschke F, Harada N, Beger HG. Benign tumour of the ampulla of Vater: surgical treatment and prognosis. *Eur J Surg* 1998; 164: 765-770
 - 27 Ito K, Fujita N, Noda Y, Kobayashi G, Kimura K, Horaguchi J, Sugawara T, Takasawa O. Modes of spread in early ampullary cancer in terms of establishing proper indications for endoscopic papillectomy. *Digestive Endoscopy* 2004; 16: 224-228
 - 28 Yamaguchi K, Enjoji M. Carcinoma of the ampulla of vater. A clinicopathologic study and pathologic staging of 109 cases of carcinoma and 5 cases of adenoma. *Cancer* 1987; 59: 506-515
 - 29 Tio TL, Tytgat GN, Cikot RJ, Houthoff HJ, Sars PR. Ampullopapillary carcinoma: preoperative TNM classification with endosonography. *Radiology* 1990; 175: 455-461
 - 30 Cannon ME, Carpenter SL, Elta GH, Nostrant TT, Kochman ML, Ginsberg GG, Stotland B, Rosato EF, Morris JB, Eckhauser F, Scheiman JM. EUS compared with CT, magnetic resonance imaging, and angiography and the influence of biliary stenting on staging accuracy of ampullary neoplasms. *Gastrointest Endosc* 1999; 50: 27-33
 - 31 Shoup M, Hodul P, Aranha GV, Choe D, Olson M, Leya J, Losurdo J. Defining a role for endoscopic ultrasound in staging periampullary tumors. *Am J Surg* 2000; 179: 453-456
 - 32 Chen CH, Tseng LJ, Yang CC, Yeh YH, Mo LR. The accuracy of endoscopic ultrasound, endoscopic retrograde cholangiopancreatography, computed tomography, and transabdominal ultrasound in the detection and staging of primary ampullary tumors. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1750-1753
 - 33 Clary BM, Tyler DS, Dematos P, Gottfried M, Pappas TN. Local ampullary resection with careful intraoperative frozen section evaluation for presumed benign ampullary neoplasms. *Surgery* 2000; 127: 628-633

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

黄芩甙对肝癌细胞BEL-7402线粒体膜电位、细胞内Ca²⁺和Cyt C的影响

郭霞, 郭昱

■背景资料

近年来发现黄芩甙诱导肿瘤细胞凋亡,但既往对凋亡的形态观察重点在细胞核的变化上,线粒体作为能量器官其形态又会有什么变化研究甚少。本研究拟观察黄芩甙作用后线粒体超微结构以及细胞内Ca²⁺的含量、线粒体膜电位和细胞色素C的变化,探讨线粒体损伤在黄芩甙诱导肝癌细胞凋亡中的机制。

郭霞,河北医科大学第四医院 河北省石家庄市 050011

郭昱,河北医科大学第二医院 河北省石家庄市 050000

郭霞,副主任医师,主要从事肝癌的中医药研究。

作者贡献分布: 郭霞与郭昱对此文所作贡献均等;此课题由郭霞和郭昱设计;研究过程由郭霞、郭昱共同操作完成;研究所用新试剂及分析工具由郭昱提供;数据分析由郭昱完成;本论文写作由郭霞、郭昱完成。

通讯作者: 郭昱, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院. guoyu123123@sina.com

电话: 0311-66002951

收稿日期: 2007-10-09 修回日期: 2008-01-23

Effect of baicalin on mitochondrial membrane potential, Ca²⁺ and cytochrome C in HCC cell line BEL-7402

Xia Guo, Yu Guo

Xia Guo, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Yu Guo, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Yu Guo, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. guoyu123123@sina.com

Received: 2007-10-09 Revised: 2008-01-23

Abstract

AIM: To study the effect of mitochondria membrane injury on baicalin-induced liver cancer cell apoptosis and its possible mechanism.

METHODS: Hepatocellular carcinoma (HCC) BEL-7402 cells were cultured. Changes in mitochondria ultra-structure were observed under transmission electron microscope. Changes in mitochondria membrane potential, intracellular Ca²⁺ and apoptosis rate were detected by flow cytometry. Cytochrome C level was detected using fluorescence method. Expression of protein bcl-2 and activity of caspases-3 were assessed by flow cytometry.

RESULTS: Baicalin induced BEL-7402 cell apoptosis in a dose-dependent manner and significantly changed the ultra-structure of mitochondria. The level of mitochondria membrane

potential was significantly decreased (85.49 ± 2.17 , 82.59 ± 2.18 , 28.45 ± 2.39 , respectively, at 6, 24 and 48 h). The release of intracellular Ca²⁺ and cytochrome C was increased, while the expression of Bcl-2 was decreased and the activity of caspase-3 was increased. The values for mitochondria membrane potential, intracellular Ca²⁺ and cytochrome C were 19.56 ± 2.09 , 14.76 ± 1.03 and 88.79 ± 4.32 at 6 h; 82.59 ± 2.1 , 14.76 ± 1.03 and 44.57 ± 5.56 at 24 h; 28.45 ± 2.39 , 88.79 ± 4.32 and 78.63 ± 7.65 at 48 h.

CONCLUSION: Baicalin induces apoptosis of HCC BEL-7402 cells in a dose-dependent manner and mitochondria play an important role in apoptosis by inhibiting Bcl-2 protein expression in liver cancer cells, increasing the activity of caspase-3 and the level of intracellular Ca²⁺, promoting mitochondrial membrane permeability and cytochrome C release, decreasing mitochondrial transmembrane potential.

Key Words: Baicalin; Hepatocellular carcinoma; Apoptosis; Mitochondria membrane potential; Cytochrome C; Ca²⁺

Guo X, Guo Y. Effect of baicalin on mitochondrial membrane potential, Ca²⁺ and cytochrome C in HCC cell line BEL-7402. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 468-472

摘要

目的: 探讨线粒体损伤在黄芩甙诱导肝癌细胞凋亡中的作用及可能的机制。

方法: 应用细胞培养技术培养肝癌细胞BEL-7402,透射电镜观察线粒体的变化;应用流式细胞仪检测细胞凋亡百分率及线粒体膜电位、细胞内Ca²⁺的改变,荧光发光法检测细胞色素(cytochrome C, Cyt C)含量, Bcl-2蛋白表达和流式细胞仪测定caspase-3活性。

结果: 黄芩甙诱导肝癌细胞BEL-7402凋亡呈剂量依赖关系,线粒体结构出现明显改变;肝癌细胞线粒体膜电位降低,6 h、24 h、48 h分

■同行评议者

党双锁,副教授,
西安交通大学第
二医院感染科

别为85.49±2.17、82.59±2.18、28.45±2.39;细胞内Ca²⁺和Cyt C的释放增加,Bcl-2蛋白表达下降和caspase-3活性增加.在6 h、24 h、48 h时细胞线粒体膜电位,细胞内Ca²⁺和Cyt C的释放分别为(6 h: 85.49±2.17、19.56±2.09、35.36±3.21; 24 h: 82.59±2.18、14.76±1.03、44.57±5.56; 48 h: 28.45±2.39、88.79±4.32、78.63±7.65).

结论: 线粒体损伤在黄芩甙诱导肝癌细胞凋亡中起重要作用,其机制可能为抑制肝癌细胞Bcl-2蛋白表达,促进caspase-3活性增加,使细胞内Ca²⁺增加,激发线粒体膜通透性转运孔开放,降低线粒体跨膜电位,促进Cyt C的释放.

关键词: 黄芩甙; 肝癌细胞; 凋亡; 线粒体膜电位; 细胞色素C; Ca²⁺

郭霞, 郭昱. 黄芩甙对肝癌细胞BEL-7402线粒体膜电位、细胞内Ca²⁺和Cyt C的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 468-472

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/468.asp>

0 引言

黄芩甙是从唇形科植物黄芩中提取、分离出来的一种黄酮类化合物,是黄芩的主要有效成分之一,除传统意义上的解热、利胆、保肝、抗菌等药理作用外,近年来发现黄芩甙具有抗肿瘤作用^[1-2].诱导肿瘤细胞凋亡是重要的抗肿瘤策略之一.既往对凋亡的形态观察重点在细胞核的变化上,线粒体作为能量器官其形态又会有什么变化?因此,本研究拟观察黄芩甙作用后线粒体超微结构以及细胞内Ca²⁺的含量、线粒体膜电位和细胞色素C(Cytochrome C, Cyt C)的变化,探讨线粒体损伤在黄芩甙诱导肝癌细胞凋亡中的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株BEL-7402由本室冻存;黄芩甙由四川汉坤植化有限公司提供(纯度≥95% 分子质量446.35 kDa);RPMI-1640培养液,Bcl-2、Cyt C mAb为北京中山试剂公司产品;JEM2000EX透射电镜,流式细胞仪Epics XL II型为美国Beckman Coulter公司产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人肝癌细胞株BEL-7402培养于RPMI-1640培养液,内含100 g/L小牛血清、100 000 U/L青霉素、100 mg/L链霉素,置37℃,50 mL/L CO₂,恒温密闭式孵箱内培养传代.

1.2.2 黄芩甙对肝癌细胞凋亡的影响: 空白对照组、1.25 mg/L、2.5 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L黄芩甙处理组分别作用48 h后,制备各细胞悬液,PI染色流式细胞计数测定凋亡率.

1.2.3 透射电镜: 取对数生长期细胞接种于培养瓶内,分别加入10 mg/L黄芩甙及等量培养液作用48 h,收集细胞,常规透射电镜样品制备,透射电镜下观察亚细胞结构.

1.2.4 流式细胞仪检测线粒体膜电位、细胞内Ca²⁺: 空白对照组、10 mg/L黄芩甙处理组分别作用6 h、24 h、48 h后制备各细胞悬液,PBS洗涤、弃上清,分别加入下列染液:1 mmol/L rhodamine 123,1 mmol/L Fluo-3,37℃孵育20 min,37℃孵育20 min,PBS洗涤、重悬、流式检测.

1.2.5 免疫荧光检测Cyt C: 40 g/L多聚甲醛固定细胞20 min,PBS洗涤后用山羊血清封闭30 min,加入抗大鼠Cyt C单克隆抗体,4℃过夜,PBS洗涤后加入FITC荧光标记二抗,37℃孵育40 min,90%碱性甘油封固,用Novo start全自动荧光发光检测仪对荧光强度进行定量分析.

1.2.6 Bcl-2蛋白表达检测: 作用48 h后,消化细胞10⁵左右,PBS洗涤2次后,20 g/L中性甲醛固定30 min,0.3%皂素渗透5 min,弃上清,加1:50稀释的鼠抗人Bcl-2蛋白单克隆抗体,冰上孵育45 min,PBS洗涤后,流式细胞检测Bcl-2表达.

1.2.7 caspase-3活性检测: 作用48 h后,按300 μL细胞悬液加1 μL FITC-DEVD-FMK,37℃ 50 mL/L CO₂孵育30 min,用Wash buffer重悬细胞2次后加300 μL Wash buffer混匀,置于冰上,流式细胞检测.

统计学处理 计量资料数据以mean±SD表示,用SPSS10.0软件进行统计分析.多组间的均数差异性比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及LSD检验.*P*<0.05为有统计学意义.

2 结果

2.1 黄芩甙对肝癌细胞凋亡的影响 1.25 mg/L、2.5 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L黄芩甙分别作用肝癌细胞48 h后,凋亡百分率分别为2.32%±0.72%、2.42%±0.68%、9.86%±1.98%、17.59%±3.26%、22.27%±3.89%、24.34%±3.79%,与对照组(2.18%±0.66%)比较,后四者有统计学意义(*P*<0.01),呈量效关系.

■研究前沿

目前诱导肿瘤细胞凋亡,已成为抗肿瘤的重要策略之一,许多学者已逐渐认识到线粒体是细胞凋亡的“中心执行者”,线粒体膜通透性转运改变是线粒体调节凋亡的重要机制.

■创新盘点

本研究深入探讨了线粒体损伤在黄芩甙诱导肝癌细胞凋亡中的机制。

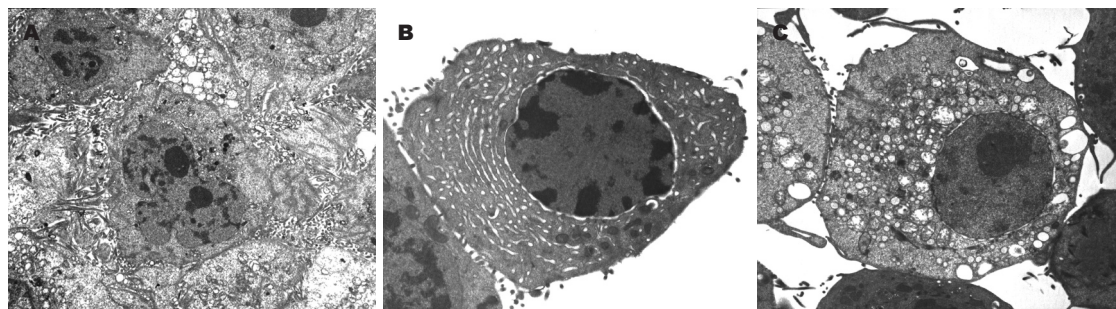


图1 透射电镜观察. A: 对照组($\times 13\ 500$); B-C: 黄芩甙处理组($\times 15\ 000$).

表1 黄芩甙对肝癌细胞线粒体膜电位的影响(mean \pm SD)

分组	6 h	24 h	48 h
对照组	88.76 \pm 2.54	98.56 \pm 3.79	86.38 \pm 2.63
处理组	85.49 \pm 2.17	82.59 \pm 2.18	28.45 \pm 2.39 ^b

^b $P < 0.01$ vs 处理组.

表2 黄芩甙对肝癌细胞细胞内Ca²⁺的影响 (mean \pm SD)

分组	6 h	24 h	48 h
对照组	16.27 \pm 2.15	15.18 \pm 2.19	14.58 \pm 2.89
处理组	19.56 \pm 2.09	14.76 \pm 1.03	88.79 \pm 4.32 ^b

^b $P < 0.01$ vs 处理组.

表3 黄芩甙对肝癌细胞Cyt C的影响(mean \pm SD)

分组	6 h	24 h	48 h
对照组	30.29 \pm 3.36	28.91 \pm 2.87	29.43 \pm 2.47
处理组	35.36 \pm 3.21	44.57 \pm 5.56 ^b	78.63 \pm 7.65 ^b

^b $P < 0.01$ vs 处理组.

表4 Bcl-2蛋白表达和caspase-3活性(mean \pm SD)

分组	Bcl-2	caspase-3
对照组	78.55 \pm 7.28	19.72 \pm 2.11
处理组	35.96 \pm 4.26 ^b	74.76 \pm 8.23 ^b

^b $P < 0.01$ vs 处理组.

2.2 透射电镜下观察 发现对照组肝癌细胞具有肿瘤细胞典型特点:核大而圆,染色质疏松,核仁明显,有多个大核仁,形态不规则,常见核仁边集现象,细胞质较少,细胞器都比较简单,细胞表面微绒毛细长且密集.黄芩甙处理组,细胞核变小,皱缩,异染色质增多,核仁减少、浓缩甚至消失,核质比减少.部分细胞呈现典型的凋亡改变:染色质凝集、固缩,聚集于核膜下呈境界分明的团块状、花瓣状或新月体形.线粒体数量增多,有的为基质密度增高,内外膜间隙增宽,内嵴发育较好,但体积变化不明显;有的线粒体体积增大,肿胀呈空泡状(图1).

2.3 黄芩甙对肝癌细胞线粒体膜电位的影响 对照组在不同时间的线粒体膜电位较稳定,保持在较高水平,6 h、24 h处理组与对照组比差别不大,48 h处理组显著降低,两组差异显著($P < 0.01$,表1).

2.4 黄芩甙对肝癌细胞内Ca²⁺和Cyt C的影响 细胞内Ca²⁺和Cyt C在对照组的在不同时间较稳定,6 h、24 h处理组与对照组比差别不大,48 h处理组升高显著,两组差别显著(均 $P < 0.01$,表2,表3).

2.5 Bcl-2蛋白表达和caspase-3活性测定 处理组

Bcl-2蛋白表达显著下降, caspase-3活性显著升高($P < 0.01$,表4).

3 讨论

目前已逐渐认识到线粒体是细胞凋亡的“中心执行者”^[3-4],某些与凋亡相关的基因产物(蛋白质和酶)均可定位于线粒体.在细胞凋亡的诱导期,线粒体的结构和功能就开始发生一些特征性的变化^[5-7].Reed *et al*^[5]认为在细胞凋亡时线粒体超微结构的改变主要为:线粒体嵴失去紧密排列和有序折叠的外表,同时在膜间隙中充满了浓缩的基质,而线粒体本身的大小改变不明显.我们在观察肝癌细胞发生凋亡时,除了见到典型的凋亡核型,同时还发现线粒体的变化有两种表现:一种基质密度增高,内外膜间隙增宽,但体积变化不明显;一种线粒体体积增大,肿胀呈空泡状.前者与Reed *et al*所描述的在凋亡中线粒体的改变相似.沈忠英 *et al*^[6]在研究三氧化二砷作用于食管癌细胞系时,认为凋亡的早期改变为线粒体增多,中后期是线粒体肿胀.所以,线粒体的这种基质密度增高的改变可能是凋亡发生的早期改变.

已证实线粒体膜通透性转运改变是凋亡过程中的重要环节,在致凋亡因子的刺激下,线粒体膜通透性转运孔(permeability transition pore, MPTP)开放,线粒体跨膜电位降低或丧失,线粒体基质中释放出凋亡蛋白,使细胞凋亡^[7-8]。近年来陆续有报道线粒体跨膜电位的耗散是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,而一旦线粒体跨膜电位耗散,细胞就会进入不可逆的凋亡过程^[9-10]。MPTP是跨膜多蛋白孔,定位于线粒体内外膜接触点,可能由电压依赖的阴离子通道(VDAC)-腺苷酸移位酶-亲环蛋白D三联复合物构成,有开放与关闭二种构象。MPTP孔道作为许多生理效应的感受器(二价阳离子、ATP、ADP、NAD、 $\Delta\Psi_m$ 、pH、巯基与多肽)整合了电生理、氧化还原与细胞代谢状态的信息。在正常情况下,MPTP只允许相对分子质量小于1500的分子通过,质子可自由通过线粒体膜形成稳定的线粒体膜电位,如果MPTP开放,导致线粒体膜电位下降或缺失,且MPTP作用有自放大的效应。如果能稳定线粒体膜电位就能防止细胞凋亡或可阻止凋亡的进展。我们的研究结果发现对照组肝癌细胞在不同时间的线粒体膜电位较稳定,保持在较高水平,黄芩甙作用6 h、24 h时与对照组比差别不大,48 h时显著降低肝癌细胞线粒体跨膜电位。认为黄芩甙通过某种途径使MPTP开放,导致线粒体膜电位下降,而阻止凋亡的进展。

Ca²⁺是细胞代谢活动重要的第二信使^[11]。他可能是使MPTP开放的刺激信号。Carboni *et al*^[12]提出钙依赖性的MPTP孔调节模式,认为MPTP孔有低导性和高导性两种不同的开放方式,前者是一种可逆的正常调节过程,后者为不可逆的细胞死亡信号。两种开放方式均受线粒体Ca²⁺浓度的升高直接或间接调控。线粒体Ca²⁺超载,启动高导性MPTP孔开放,线粒体膜电位下降,线粒体膨胀,外膜破裂,诱导细胞凋亡。季宇彬 *et al*将羊栖菜多糖作用于人胃癌SGC-7901细胞,观测到细胞内Ca²⁺浓度升高,且细胞凋亡指数增加,提示可能是通过Ca²⁺启动凋亡机制。Takei *et al*研究表明,抑制细胞Ca²⁺升高,可防止凋亡的发生^[13]。我们观察到黄芩甙作用后肝癌细胞凋亡增加、细胞内Ca²⁺含量的增加、线粒体膜电位的下降,三者时间上的变化趋于一致,并伴有线粒体的肿胀。认为线粒体途径在黄芩甙诱导细胞凋亡中起重要作用,其机制为增加细胞内Ca²⁺含量,激发MPTP开放,降低线粒体跨膜电

位。但是影响细胞外钙的内流,还是调整细胞内钙库的释放,尚需进一步研究。此外,细胞内Ca²⁺信号的改变与凋亡发生的阶段密切相关^[14-15],有研究表明一旦凋亡发生,细胞内依赖Ca²⁺-Mg²⁺核酸酶被大量激活后,细胞内游离Ca²⁺可能被结合而浓度下降。我们只观察到黄芩甙增加细胞内Ca²⁺含量,这可能与细胞所处的凋亡阶段有关,处于本阶段的细胞尚未发生不可逆的凋亡。

Cyt C作为一种信号物质,也在细胞凋亡中发挥着重要的作用。正常情况下,他存在于线粒体内膜和外膜之间的腔中,凋亡信号刺激使其从线粒体释放至细胞质。Cyt C一旦释放可引起两种后果,一是与Apaf-1(apoptotic protease activating factor-1)结合,在ATP/dATP的介导下,使caspase-9前体裂解为活化的caspase-9,活化的caspase-9再激活caspase-3,引起细胞凋亡。二是由于Cyt C释放入胞质,细胞内Cyt C减少或缺失,可直接导致呼吸链电子传递中断,最后导致细胞坏死^[16]。Cyt C的释放是线粒体外膜通透性增高的结果。Bcl-2蛋白主要聚集在线粒体外膜,阻止Cyt C的释放,使胞质内caspase不能激活,细胞凋亡受阻。caspase-3是最重要的凋亡执行者之一,在激活的caspase-3能降解Bcl-2蛋白,阻止其抗凋亡作用。caspase-3一旦被激活,细胞凋亡的发生将不可逆转。我们的研究结果发现黄芩甙能抑制肝癌细胞Bcl-2蛋白表达,增加caspase-3活性,促进Cyt C的释放。

黄芩甙诱导肝癌细胞凋亡的可能途径为增加细胞内Ca²⁺含量,降低线粒体跨膜电位,促进Cyt C的释放。Bcl-2蛋白表达的下降和caspase-3活性增加调控上述过程。透射电镜下线粒体的改变进一步支持线粒体损伤在黄芩甙诱导肝癌细胞凋亡中的作用。

4 参考文献

- 1 Chao JI, Su WC, Liu HF. Baicalein induces cancer cell death and proliferation retardation by the inhibition of CDC2 kinase and survivin associated with opposite role of p38 mitogen-activated protein kinase and AKT. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 3039-3048
- 2 Lu HF, Hsueh SC, Ho YT, Kao MC, Yang JS, Chiu TH, Huang SY, Lin CC, Chung JG. ROS mediates baicalin-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells through the expression of the Gadd153 and mitochondrial-dependent pathway. *Anticancer Res* 2007; 27: 117-125
- 3 Lin HH, Hsu HL, Yeh NH. Apoptotic cleavage of NuMA at the C-terminal end is related to nuclear disruption and death amplification. *J Biomed Sci* 2007; 14: 681-694
- 4 Brenner C, Kroemer G. Apoptosis. Mitochondria-

■应用要点

本研究为揭示黄芩甙抗肿瘤作用机制提供了有用的资料,为其进一步开发应用奠定了基础。

■名词解释

线粒体膜通透性转运孔:是跨膜多蛋白孔,定位于线粒体内外膜接触点,可能由电压依赖的阴离子通道(VDAC)-腺苷酸移位酶-亲环蛋白D三联复合物构成,有开放与关闭两种构象。

■同行评价

本文研究方法可行, 目的明确, 但讨论应结合自己的研究成果展开, 突出主题.

- the death signal integrators. *Science* 2000; 289: 1150-1151
- 5 Reed JC, Green DR. Remodeling for demolition: changes in mitochondrial ultrastructure during apoptosis. *Mol Cell* 2002; 9: 1-3
- 6 沈忠英, 沈健, 陈铭华, 李乔山, 洪超群. 氧化砷诱导食管癌细胞凋亡线粒体形态改变. *中华病理学杂志* 2000; 29: 200-203
- 7 林洪生, 周彩虹, 黄启福, 娄金丽, 裴迎霞, 祁鑫. 金安粉针剂对肺癌细胞系超微结构的影响. *中国病理生理杂志* 2004; 20: 1390-1395
- 8 Danial NN. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7254-7263
- 9 Liu J, He H, Zhang Z, Jiang S, Akahoshi T, Yang J, Li J, He T. Mitochondria play a role in the development of non-apoptotic programmed cell death of neutrophils induced by ONO-AE-248. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 447-453
- 10 黄伟, 张瑶珍. 线粒体膜与肿瘤进展. *国外医学·生理、病理科学与临床分册* 2002; 22: 9-11
- 11 Chang WH, Chen CH, Lu FJ. Different effects of baicalein, baicalin and wogonin on mitochondrial function, glutathione content and cell cycle progression in human hepatoma cell lines. *Planta Med* 2002; 68: 128-132
- 12 Carboni GL, Gao B, Nishizaki M, Xu K, Minna JD, Roth JA, Ji L. CACNA2D2-mediated apoptosis in NSCLC cells is associated with alterations of the intracellular calcium signaling and disruption of mitochondria membrane integrity. *Oncogene* 2003; 22: 615-626
- 13 Takei N, Endo Y. Ca²⁺ ionophore-induced apoptosis on cultured embryonic rat cortical neurons. *Brain Res* 1994; 652: 65-70
- 14 Ichas F, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low-to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 33-50
- 15 Adams JM, Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 715-720
- 16 Haraguchi M, Torii S, Matsuzawa S, Xie Z, Kitada S, Krajewski S, Yoshida H, Mak TW, Reed JC. Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1)-independent cell death suppression by Bcl-2. *J Exp Med* 2000; 191: 1709-1720

编辑 周晓武 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 •

第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2008-11在上海市召开第二十次全国中西医结合消化系统疾病学术会议, 并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为肝病、内镜与胃癌)新技术新理论继续教育学习班. 学习班招收对象: 中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等. 参加学习班者授予国家级1类继续教育学分; 大会论文报告者另授继续教育学分6分.

1 征稿内容

消化内镜技术及其中西医结合临床应用; 脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究; 消化道肿瘤中西医结合诊疗; 脾胃学说及其临床应用; 其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等.

2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编. 稿件请附800字论文摘要, 尽可能以电子信件的形式将稿件传送, 截稿日期: 2008-09-30.

3 联系方式

刘成海, 201203, 上海市浦东新区张衡路528号上海中医药大学附属曙光医院肝病所, 传真: 021-51324445或51328500, shxhy2008@yahoo.cn或czs.xiaohua@163.com

不同诱导条件对大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导类肝细胞的影响

何文艳, 刘树贤, 姜慧卿

何文艳, 姜慧卿, 河北医科大学第二医院消化科 河北省石家庄市 050000
何文艳, 中国石油中心医院感染科 河北省廊坊市 065000
姜慧卿, 河北医科大学第二医院消化科 河北省石家庄市 050000
何文艳, 硕士, 主治医师, 主要从事肝病及传染病研究。
河北省卫生厅科研课题, No. 062761355
作者贡献分布: 本论文由姜慧卿指导; 刘树贤设计; 何文艳操作完成并撰写论文; 姜慧卿、刘树贤审阅。
通讯作者: 姜慧卿, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化科. huiqingjiang@yahoo.com.cn
电话: 0311-66002955
收稿日期: 2007-10-17 修回日期: 2008-01-15

Effect of different induction conditions on hepatocyte-like cells induced *in vitro* by rat bone marrow mesenchymal stem cells

Wen-Yan He, Shu-Xian Liu, Hui-Qing Jiang

Wen-Yan He, Hui-Qing Jiang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Shu-Xian Liu, Center of Liver Diseases, the First Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei Province, China
Supported by: the Science Research Programs of Healthy Department of Henan Province, No. 062761355
Correspondence to: Dr. Hui-Qing Jiang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping Western Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. huiqingjiang@yahoo.com.cn
Received: 2007-10-17 Revised: 2008-01-15

Abstract

AIM: To study the optimal conditions for *in vitro* induction and culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in order to provide the theoretical basis for the treatment of severe liver disease patients with MSCs.

METHODS: MSCs were isolated by gradient density centrifugation and plastic adherence and purified. MSCs were induced by different concentrations of FBS and cytokines. Levels of AFP and albumin in the supernatant were measured by radioimmunoassay on days 15, 21 and 27. On day 27, cells were collected.

Glycogen store of hepatocytes was determined by periodic acid-Schiff staining and the expression of CK-18 and CK-19 in MSCs were detected by immunocytochemical analysis.

RESULTS: The level of AFP was higher in induced MSCs than in non-induced MSCs on days 15, 21, 27, and reached its highest on day 21. There was no significant difference in albumin levels on day 15, between induced and non-induced MSCs. However, on days 21 and 27, the albumin level was higher in induced MSCs than in non-induced MSCs. Glycogen storage in induced MSCs was observed on day 27 but not in non-induced MSCs. The induced MSCs expressed CK-18 and CK-19 while the non-induced MSCs did not. Multiple factor analysis by ANOVA showed that MSCs should be cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 200 mL/L FBS, 20 µg/L hepatocyte growth factor (HGF) and 20 µg/L fibroblast growth factor 4 (FGF-4), which might be the best induction conditions for MSCs.

CONCLUSION: Rat MSCs can differentiate into hepatocyte-like cells with hepatic phenotypes and functions in the presence HGF and/or FGF-4 *in vitro*. The concentrations of fetal bovine serum, HGF and FGF-4 affect the differentiation of rat MSCs into hepatocyte-like cells. MSCs can be used in the treatment of severe hepatic diseases.

Key Words: Bone marrow; Mesenchymal stem cells; Hepatocyte-like cells; Hepatocyte growth factor; Fibroblast growth factor 4

He WY, Liu SX, Jiang HQ. Effect of different induction conditions on hepatocyte-like cells induced *in vitro* by rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 473-478

摘要

目的: 探讨实验性大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)体外培养、诱导的最优条件, 为MSCs治疗临床重症肝病患者提供参考依据。

■背景资料

肝细胞移植越来越受到重视, 寻找合适的肝细胞来源成为重要的研究课题。MSCs可以分化为肝细胞, 可以自体取材, 植入体内无免疫排斥反应, 体内外均有极强分化潜能。MSCs有望成为治疗重症肝病的种子细胞。

■同行评议者

秦波, 教授, 重庆医科大学附属第二医院感染病科

■研究前沿

MSCs在不同理化环境和细胞因子的诱导下可以分化为多种组织细胞,研究MSCs定向分化为类肝细胞的最佳诱导条件是目前的一个热点问题。

方法:采用密度梯度离心法和贴壁法分离大鼠MSCs,经培养传代获得纯化的MSCs。采用析因实验,设不同诱导时间、不同浓度的FBS、不同浓度的细胞因子为3个因素,每个因素设不同水平,对纯化的MSCs进行分组诱导培养。留取15、21、27 d细胞培养液进行白蛋白(Alb)、甲胎蛋白(AFP)检测;于27 d时收集细胞爬片,采用过碘酸希夫(PAS)实验进行糖原染色和免疫细胞化学染色检测MSCs中CK-18和CK-19。

结果:诱导15、21、27 d,各MSCs诱导组AFP水平均高于MSCs非诱导组($P<0.01$),21 d诱导组AFP水平最高;15 d各MSCs诱导组与MSCs非诱导组白蛋白水平无统计学意义,21、27 d各MSCs诱导组白蛋白水平均高于MSCs非诱导组($P<0.01$),27 d诱导组白蛋白水平最高。27 d各MSCs诱导组糖原染色阳性,免疫细胞化学染色CK-18、CK-19均阳性,而MSCs非诱导组糖原染色、CK-18、CK-19均阴性。多因素方差分析表明,MSCs体外最佳诱导条件为含200 mL/L FBS的DMEM+肝细胞生长因子(HGF)20 $\mu\text{g/L}$ +成纤维细胞生长因子-4(FGF-4)20 $\mu\text{g/L}$ 。

结论:HGF和FGF-4可在体外诱导实验性大鼠MSCs分化为具有肝细胞样细胞表型和功能的类肝细胞;不同浓度的FBS、HGF和FGF-4影响MSCs的体外分化;MSCs可作为治疗临床重症肝病的一种细胞来源。

关键词:骨髓;间充质干细胞;类肝细胞;肝细胞生长因子;成纤维细胞生长因子-4

何文艳,刘树贤,姜慧卿.不同诱导条件对大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导类肝细胞的影响.世界华人消化杂志 2008; 16(5): 473-478

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/473.asp>

0 引言

骨髓间充质干细胞(MSCs)是骨髓干细胞的重要组成部分。目前研究表明,该细胞能在不同理化环境和细胞因子的诱导下分化为成骨细胞^[1-2]、脂肪细胞^[3-4]、神经元样细胞^[5-7]、心肌细胞^[8-9]和肝实质细胞^[10-11]等组织细胞。

当前重症肝病患者的肝移植已取得重大成就,但供移植的肝脏数量有限,而且直到目前机体组织的排异性仍未被攻克。因此,MSCs向肝细胞分化的研究越来越受到人们的关注^[12-13],MSCs有希望成为治疗重症肝病的理想方法。

本实验研究旨在发现含不同浓度FBS及细胞诱导因子的培养基对细胞诱导的影响,以探讨MSCs体外培养、诱导的最优条件,为MSCs

治疗临床重症肝病提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar大鼠6只(来自河北医科大学动物中心,合格证编号:DK0512051),体质量180-200 g,雌雄各半。DMEM低糖培养基购于美国HyClone;FBS购于中美合资兰州民海生物工程有限公司;细胞因子购于美国Pepro Tech;淋巴细胞分离液购于上海恒信化学试剂有限公司;AFP放射免疫分析药盒购于北京北方生物技术研究所;大鼠Alb放射免疫分析药盒购于北京市福瑞生物工程公司;CK-18、CK-19单克隆抗体购于北京中杉金桥生物公司。

1.2 方法

1.2.1 MSCs分离培养:无菌条件下取大鼠胫骨、股骨,除去骨表面附着的组织。用肝素(200 kU/L)-PBS混合液冲出骨髓腔中的骨髓,制成单细胞悬液至无菌离心管中,将6只大鼠的细胞悬液混合;室温1500 r/min离心10 min,收集沉淀物用含200 mL/L FBS DMEM重悬后加在等体积的淋巴细胞分离液(比重1.077 kg/L)上,室温1500 r/min离心10 min;取白膜层到无菌离心管中,用含200 mL/L FBS低糖DMEM重悬细胞,1500 r/min离心10 min,洗涤细胞1次,最后弃上清。取10 μL 上述细胞悬液与100 μL 20 mg/L醋酸混匀,进行细胞计数。调整单个核细胞数为 $1\times 10^5/\text{cm}^2$,接种到25 cm^2 细胞培养瓶内。加入5 mL低糖DMEM完全培养基(含200 mL/L FBS、青霉素100 mg/L、链霉素100 mg/L),置37℃、50 mg/L CO_2 、饱和湿度的 CO_2 细胞培养箱中培养。

1.2.2 MSCs纯化:原代骨髓细胞培养48 h后进行首次换液弃掉悬浮细胞,以后每3 d更换新鲜的低糖DMEM完全培养基。在细胞接近90%汇合时,进行消化传代,在传至第3代时,已完全去除非贴壁的球形骨髓造血细胞,得到纯化的MSCs。

1.2.3 体外诱导:采用析因设计,取诱导时间、FBS浓度、细胞因子浓度作为3个因素,其中诱导时间取15、21、27 d三个水平;FBS浓度取100 mg/L、200 mg/L两个水平;细胞因子浓度取10 $\mu\text{g/L}$ 肝细胞生长因子(HGF)+10 $\mu\text{g/L}$ 成纤维细胞生长因子-4(FGF-4)、20 $\mu\text{g/L}$ HGF+20 $\mu\text{g/L}$ FGF-4、20 $\mu\text{g/L}$ HGF、0 $\mu\text{g/L}$ HGF+0 $\mu\text{g/L}$ FGF-4四个水平。将纯化的MSCs分为8个处理组,重复实验2次,按 10^4 /孔接种于24孔培养板。每3 d换液一次。

第1组加用含100 mg/L FBS的低糖

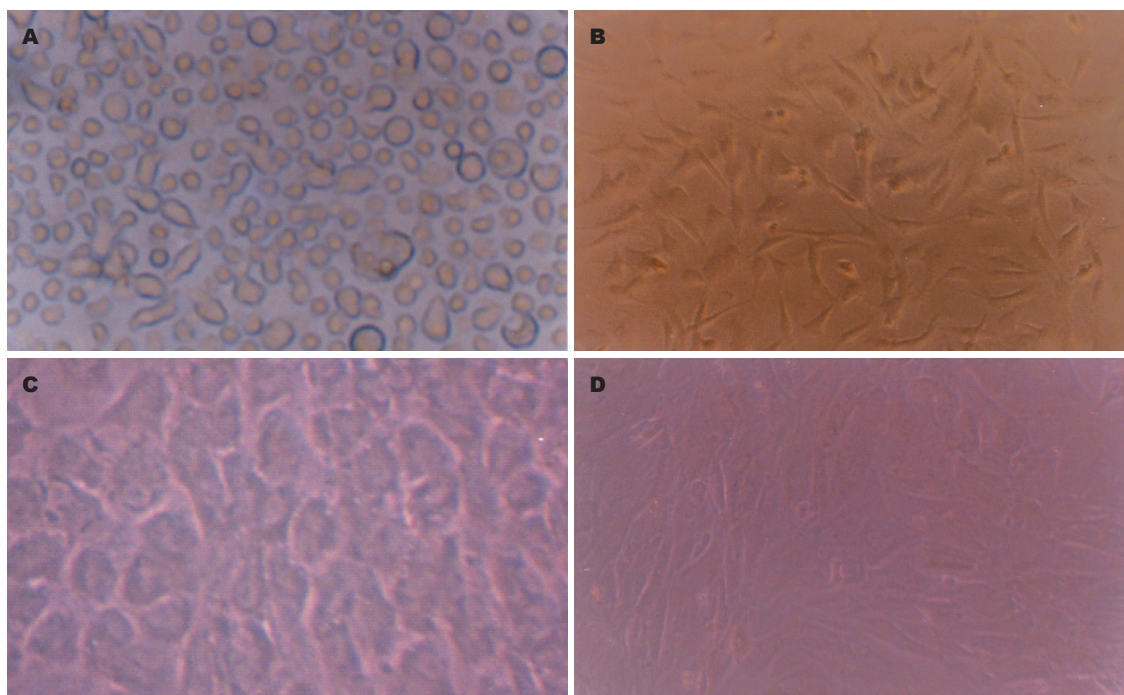


图1 MSCs的显微镜观察(×100). A: 原代培养48 h; B: 原代培养7 d; C: 诱导培养21 d; D: 非诱导培养21 d.

■相关报道

近年的研究报道表明, HGF、FGF-4、OSM和EGF等多种细胞因子及血清浓度均在MSCs诱导分化为类肝细胞中起作用, 但最佳诱导条件仍需进一步探讨.

DMEM+10 $\mu\text{g/L}$ HGF+10 $\mu\text{g/L}$ FGF-4; 第2组加用含100 mg/L FBS的低糖DMEM+20 $\mu\text{g/L}$ HGF+20 $\mu\text{g/L}$ FGF-4; 第3组加用含100 mL/L FBS的低糖DMEM+20 $\mu\text{g/L}$ HGF; 第4组加用含100 mL/L FBS的低糖DMEM, 不加细胞因子; 第5组加用含200 mL/L FBS的低糖DMEM+10 $\mu\text{g/L}$ HGF+10 $\mu\text{g/L}$ FGF-4; 第6组加用含200 mL/L FBS的低糖DMEM+20 $\mu\text{g/L}$ HGF+20 $\mu\text{g/L}$ FGF-4; 第7组加用含20 mL/L FBS的低糖DMEM+20 $\mu\text{g/L}$ HGF; 第8组加用含200 mL/L FBS的DMEM, 不加细胞因子.

1.2.4 白蛋白与AFP检测: 采用放射免疫分析法, 分别于细胞诱导分化的15、21、27 d收集细胞培养液进行白蛋白与AFP检测. 以未诱导的MSCs细胞培养液为阴性对照.

1.2.5 糖原染色: 采用过碘酸希夫(PAS)实验. 于诱导27 d收集诱导细胞爬片, 甲醇固定, 以未诱导培养27 d的MSCs作阴性对照. 载玻片用1%过碘酸氧化5 min, 蒸馏水漂洗3次. 然后用Schiff试剂处理15 min, 蒸馏水漂洗5-10 min, 苏木精染色1 min, 蒸馏水漂洗. 常规脱水、透明, 中性树胶封片. 红紫色染色的积聚物看作糖原储存, 显微摄像.

1.2.6 免疫细胞化学染色检测MSCs中CK-18、CK-19: 于诱导27 d收集诱导细胞爬片, 丙酮固定10 min, 进行免疫细胞化学染色检测. 按说明操作, 胞质内呈现棕黄色颗粒为阳性染色.

统计学处理 计量资料组间比较采用 t 检验、方差分析; 所有统计数据均采用SPSS13.0软件处理; $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 MSCs的显微镜观察 倒置显微镜下观察新鲜分离的骨髓干细胞大小均匀, 透光度好. 接种24-48 h后, 几乎所有的细胞都沉积于瓶底, 少部分细胞贴壁, 呈圆形(图1A). 72 h后, 贴壁细胞数增加, 呈小梭形, 并开始分裂增殖. 7 d后, 贴壁分裂细胞形成不同大小、分散的细胞集落, 细胞多呈梭形(图1B). 14 d后, 集落中细胞数量增多, 呈放射状向周围扩张, 集落间渐汇合成单层. 21 d左右细胞达90%汇合, 可以传代; 传代后细胞3-4 h开始贴壁, 24 h内完全贴壁, 展成梭形, 开始迅速增殖, 7 d左右可达90%汇合, 可继续传代; 经细胞因子诱导处理的细胞与非诱导细胞在最初1 wk细胞形态变化不大, 随诱导时间延长, 诱导细胞自梭形逐渐变成多角形, 且细胞数量逐渐增多(图1C). 单用HGF组的细胞增长速度慢于HGF、FGF-4合用组. 而非诱导细胞仍为成纤维细胞样, 细胞密度增加, 局部有重叠交错(图1D).

2.2 放射免疫检测结果

2.2.1 细胞培养上清液AFP检测结果: 15、21、27 d的诱导细胞的培养上清液AFP水平均高于非诱导细胞($P<0.01$), 且21 d各诱导细胞培养

■创新盘点

HGF单独或联合FGF-4使用是比较常见的诱导MSCs分化为类肝细胞的方法,但两种细胞因子浓度的相关性以及与血清浓度的相关性报道较少。

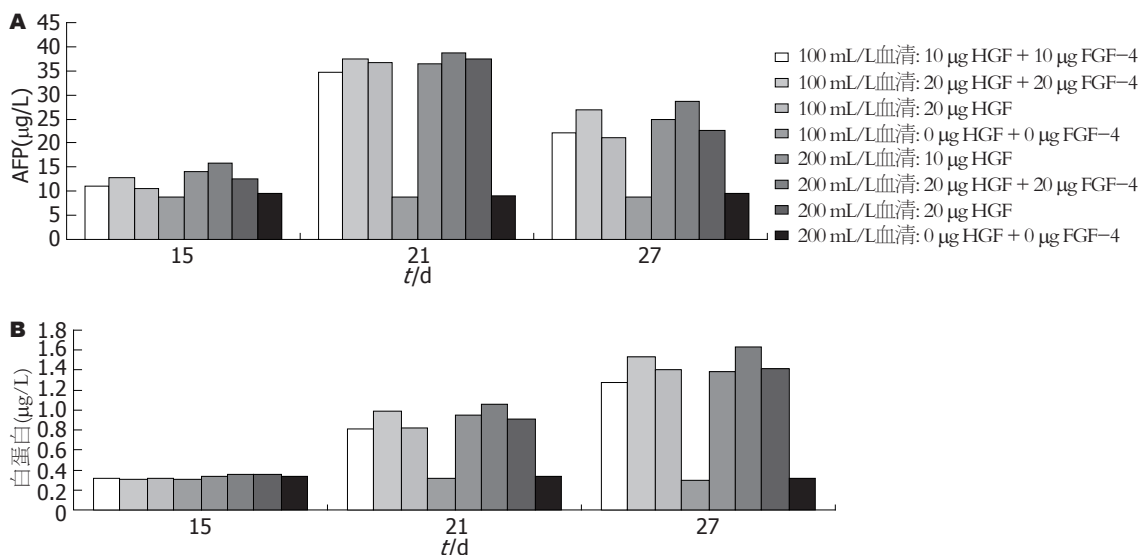


图2 各处理组AFP和白蛋白水平. A: AFP; B: 白蛋白.

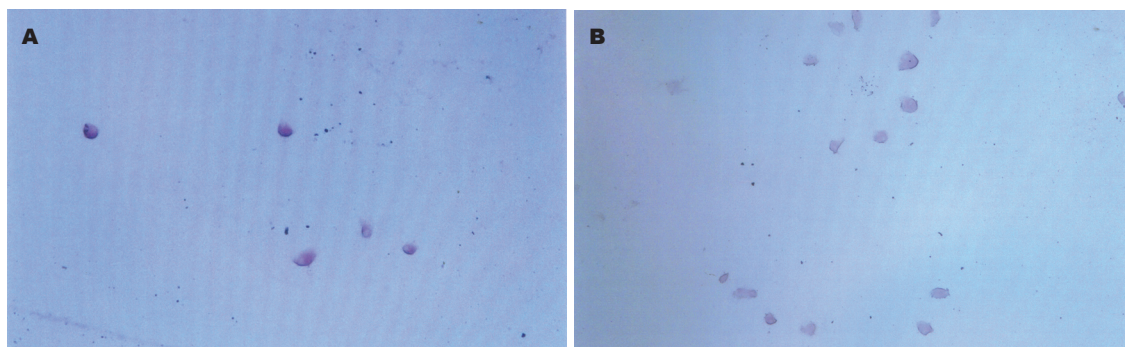


图3 糖原染色($\times 100$). A: 诱导组; B: 非诱导组.

表1 AFP和白蛋白水平方差分析表

分组	AFP		白蛋白	
	F	P	F	P
FBS \times 细胞因子	10.76	<0.01	4.13	<0.05
FBS \times 细胞因子 \times 时间	0.54	>0.05	2.39	>0.05

上清液AFP水平最高(图2A). 通过多因素方差分析(表1), 15、21、27 d最佳诱导条件均为含200 mL/L FBS的DMEM+20 μg/L HGF+20 μg/L FGF-4.

2.2.2 细胞培养上清液白蛋白检测结果: 15 d各诱导组细胞与非诱导组细胞培养上清液白蛋白水平比较无统计学意义($P>0.05$), 而21、27 d诱导组细胞培养上清液白蛋白水平平均高于非诱导组细胞, 而且呈时间依赖性($P<0.01$), 即27 d诱导组细胞培养上清液白蛋白水平最高(图2B). 通过多因素方差分析(表1)可以看出, 15、21、27 d最佳诱导方案均为含200 mL/L FBS的DMEM+20

μg/L HGF+20 μg/L(图1D).

2.3 过碘酸希夫(PAS)实验糖原染色结果 27 d各诱导组MSCs糖原染色强阳性, 而非诱导组MSCs糖原染色阴性(图3).

2.4 免疫细胞化学染色检测CK-18、CK-19的结果 27 d各诱导组MSCs CK-18、CK-19均阳性. 非诱导组MSCs CK-18、CK-19均阴性(图4).

3 讨论

肝移植是肝脏功能衰竭后的理想治疗方案, 但由于供体肝源不足、移植后的排斥反应及治疗费用昂贵, 限制了肝衰竭患者接受肝移植. 而肝细胞移植越来越受到重视, 已显示潜在的应用前景, 寻找合适的肝细胞来源成为重要的研究课题. MSCs来源充足, 可以分化为肝细胞, 可以自体取材, 植入体内无免疫排斥反应, 遗传背景稳定, 增殖能力强, 体内外均有极强分化潜能, 易于临床应用.

从骨髓中分离得到MSCs, 有贴壁法^[14]、密

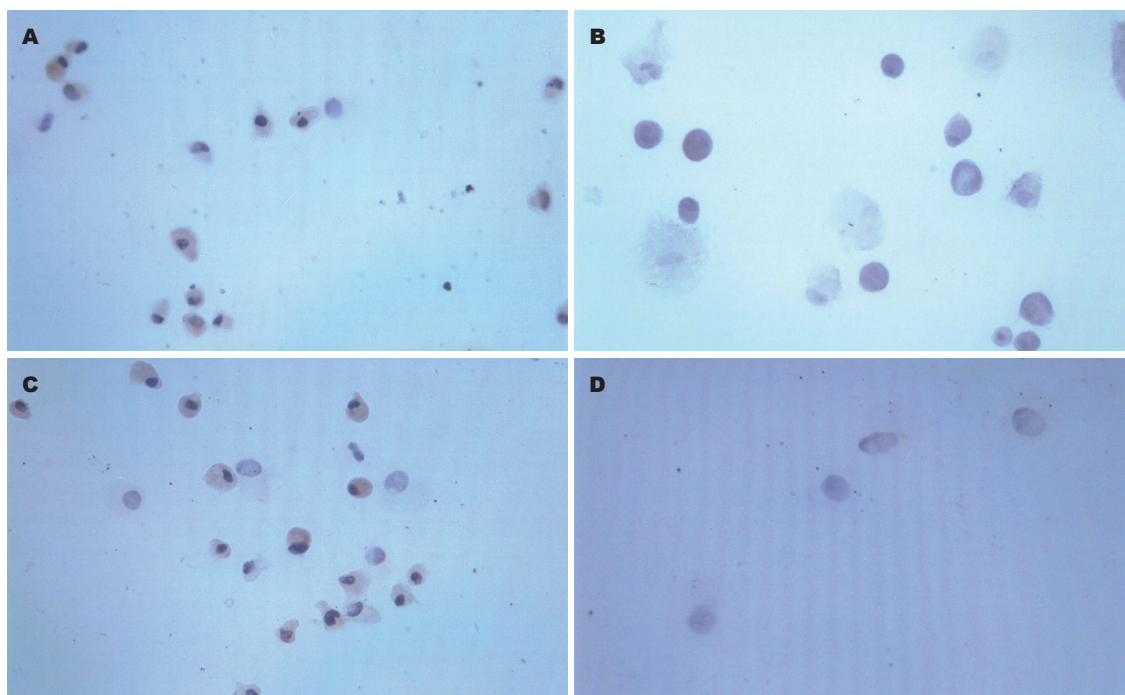


图 4 CK-18和CK-19免疫细胞染色($\times 100$). A: 诱导组CK-18阳性; B: 非诱导组CK-18阴性; C: 诱导组CK-19阳性; D: 非诱导组CK-19阴性.

■应用要点

HGF、FGF-4可在体外诱导MSCs分化为类肝细胞,可能成为肝细胞移植和生物人工肝的种子细胞,以期治疗临床重症肝病.

度梯度离心法^[15]、免疫磁珠法^[16]、流式细胞仪法^[17]. 各种方法各有利弊, 近年研究^[18-19]多先采用密度梯度离心法, 得到含MSCs的骨髓单个核细胞, 再利用MSCs贴壁生长的特性加以纯化, 与此同时, 大量不贴壁的造血系细胞随着更换培养液得以除去. 再通过传代使其更加纯化. 此种方法操作简单, 很易得到纯化的MSCs. 故我们采用此种分离方法作为实验手段.

我们采用了不同浓度的FBS和HGF、FGF-4在体外诱导MSCs的分化. HGF是肝细胞生长因子, 他是一种普遍存在并具有多能性的细胞因子, 通过与受体C-met相互作用而对多种细胞产生促有丝分裂作用及促形态形成作用, 在肝脏的发育成熟和再生过程中发挥重要作用^[20-22]. FGF-4在体内是一种重要的来源于中胚层和内胚层的信号分子, 可促进胚胎肝脏的形成和发育^[23]. 鼠胚胎干细胞在含有FGF-4的培养液中进行诱导培养, 也可分化为表达肝细胞特征基因和抗原的细胞^[24]. HGF、FGF-4在肝细胞的发育和再生中起着不可替代的作用^[25]. 培养液中FBS成分复杂, 含有多种生长因子和促分化因子. 我们发现在诱导过程中单用HGF组的细胞增长速度慢于HGF、FGF-4合用组, 这可能与FGF-4不仅诱导细胞分化, 而且可以促进细胞增殖以及HGF的促分化作用强于促增生作用有关.

本实验从功能和表型对诱导分化后的

MSCs进行了检测, AFP、白蛋白、CK-18、CK-19和糖原均为肝系细胞较为特异的标志. AFP是幼稚肝细胞分泌的, 是肝细胞分化早期的标志; CK-19也是肝细胞分化早期的标志物; 白蛋白是肝细胞成熟的标志; CK-18是肝细胞相对特异性的标志物, 在幼稚的肝前体细胞不表达, 当肝细胞趋于成熟后表达量增高; 糖原合成和储存是肝细胞的特征性功能. 本实验诱导组MSCs能够分泌AFP、白蛋白, 储存糖原, 表达CK-18、CK-19肝细胞标记. 诱导组MSCs培养上清液中AFP的水平, 均为21 d最高, 27 d反而下降; 白蛋白水平呈时间依赖性, 27 d达最高. 这也说明诱导所得类肝细胞功能逐渐完善. 27 d诱导组MSCs CK-18、CK-19均阳性, 而非诱导组MSCs CK-18、CK-19均阴性. 这表明诱导的MSCs已分化为类肝细胞且并未完全成熟, 仍有继续分化的潜能. 最终诱导结果显示, 6种诱导条件均使MSCs诱导分化为类肝细胞, 但通过析因分析得出: 最佳诱导条件为含200 mL/L FBS的低糖DMEM合用20 μ g/L的HGF和20 μ g/L FGF-4. 说明由于200 mL/L的FBS含有更多的生长因子和促分化因子, 加之两种细胞因子同时应用, 促进了细胞的增殖和分化. HGF、FGF-4和FBS为MSCs体外分化提供了微环境, 是MSCs分化的关键因素, 尤其是HGF、FGF-4的浓度更为重要.

同行评价

本研究具有一定的意义,可以为人类肝衰竭的肝细胞移植和生物人工肝的治疗提供一定的指导。

总之, MSCs可以在体外通过诱导分化为具有肝细胞功能和表型的类肝细胞;可以作为人工肝和肝细胞移植的一种细胞来源,为临床治疗重症肝病提供新的途径。

参考文献

- Atmani H, Chappard D, Basle MF. Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. *J Cell Biochem* 2003; 89: 364-372
- Chen TL, Shen WJ, Kraemer FB. Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Biochem* 2001; 82: 187-199
- Allan EH, Ho PW, Umezawa A, Hata J, Makishima F, Gillespie MT, Martin TJ. Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem* 2003; 90: 158-169
- Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 2003; 90: 13-22
- Wislet-Gendebien S, Leprince P, Moonen G, Rogister B. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2003; 116: 3295-3302
- Rismanchi N, Floyd CL, Berman RF, Lyeth BG. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols. *Brain Res* 2003; 991: 46-55
- Song S, Kamath S, Mosquera D, Zigova T, Sanberg P, Vesely DL, Sanchez-Ramos J. Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells. *Exp Neurol* 2004; 185: 191-197
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 2003; 7 Suppl 3: 86-88
- Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 152-157
- Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002; 161: 565-574
- Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, Fabre M, Guidotti JE, Renia L, Coulombel L, Kahn A, Gilgenkrantz H. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 2002; 35: 799-804
- 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
- Zhang Y, Fan Y, Zhao L, Tang H. Differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte in vivo. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2005; 22: 521-524
- Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003; 123: 702-711
- 盛小刚, 冯建章, 吴书林, 靳立军, 余细勇, 张斌. 骨髓间充质干细胞的肌源性诱导分化及转染VEGF基因的表达. *第一军医大学学报* 2004; 24: 290-294
- Locatelli F, Corti S, Donadoni C, Guglieri M, Capra F, Strazzer S, Salani S, Del Bo R, Fortunato F, Bordini A, Comi GP. Neuronal differentiation of murine bone marrow Thy-1- and Sca-1-positive cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12: 727-734
- 王运涛. 骨髓间充质干细胞分离培养的研究进展. *国外医学生物医学工程分册* 2002; 25: 184-188
- Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3479-3484
- 王利霞, 法宪恩, 侯剑峰. 人骨髓间充质干细胞体外培养特性的初步观察. *实用神经疾病杂志* 2005; 8: 8-9
- Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 500-504
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
- Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21: 98-104
- Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999; 284: 1998-2003
- Ruhnke M, Ungefroren H, Zehle G, Bader M, Kremer B, Fandrich F. Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages. *Stem Cells* 2003; 21: 428-436
- Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 258-264

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

重叠延伸PCR法克隆重组复合干扰素

刘顺爱, 浅野龙太郎, 郭晶晶, 刘志英, 余康康, 徐道振

刘顺爱, 郭晶晶, 刘志英, 余康康, 徐道振, 北京地坛医院 北京市 100011

刘顺爱, 北京大学人类疾病基因研究中心 北京市 100083
浅野龙太郎, 日本东北大学大学院生物学蛋白质研究室
仙台市 983-0833 日本

刘顺爱, 硕士, 副研究员, 主要从事感染免疫学研究。

北京市优秀人才培养专项基金资助项目

北京市卫生局科研基金资助项目

北京市自然科学基金资助项目, No. 7042028

作者贡献分布: 刘顺爱和浅野龙太郎对此文所作贡献均等; 此课题由刘顺爱, 浅野龙太郎, 徐道振设计; 研究过程由刘顺爱, 浅野龙太郎, 郭晶晶, 刘志英, 余康康操作完成; 数据分析由刘顺爱, 浅野龙太郎, 徐道振完成; 本论文写作由刘顺爱完成。

通讯作者: 刘顺爱, 100011, 北京东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. liusa1031@sina.com
电话: 010-64211031-2358

收稿日期: 2007-09-14 修回日期: 2008-01-15

Cloning recombinant consensus interferon with overlap extension polymerase chain reaction

Shun-Ai Liu, Ryutaro Asano, Jing-Jing Guo,
Zhi-Ying Liu, Kang-Kang Yu, Dao-Zhen Xu

Shun-Ai Liu, Jing-Jing Guo, Zhi-Ying Liu, Kang-Kang Yu,
Dao-Zhen Xu, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011,
China

Shun-Ai Liu, Center for Human Disease Genomics, Peking
University, Beijing 100083, China

Ryutaro Asano, Department of Biomolecular Engineering,
Graduate School of Engineering, Tohoku University, Sendai
983-0833, Japan

Supported by: the Grant from the Beijing Special Fund
of Outstanding Personnel Training; the Scientific Research
Fund of Beijing Municipal Health Bureau and the Natural
Science Foundation of Beijing, No. 7042028

Correspondence to: Shun-Ai Liu, Institute of Infectious
Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011,
China. liusa1031@sina.com

Received: 2007-09-14 Revised: 2008-01-15

Abstract

AIM: To obtain the recombinant consensus interferon (cIFN) gene by overlap extension PCR and to express it using a prokaryotic expression system to identify its activities.

METHODS: Overlap extension PCR was performed to obtain the cIFN gene and to construct the high expression vector for the production of cIFN protein according the preferred codon of *E.coli*. The expression vector pRA-cIFN was transformed with BL21 (DE3) *E.coli* straining.

The expression of cIFN was identified by SDS-PAGE and Western blotting and purified by metal-chelating chromatography, and refolded by stepwise dialysis method. Then, the immune and biological activities of cIFN were detected by ELISA, MTS chromometry and hemagglutination inhibition test.

RESULTS: The cIFN gene was obtained by overlap extension PCR. Its DNA length was 534 bp which is consistent with its theoretical length. SDS-PAGE and Western blotting showed that the pressed cIFN protein in *E.coli* BL21 (DE3) was in the form of inclusion bodies and its molecular weight was 23.3 kDa. We achieved the refolding of *E.coli*-expressed cIFN with a stepwise dialysis method. The biological activity of the refolded cIFN was detected by ELISA, MTS chromometry and hemagglutination inhibition test, showing that cIFN had obvious immunological activities, dose-dependent suppressive activity of PLC/PRF/5 cell proliferation and HBsAg secretion inhibitory activity.

CONCLUSION: Overlap extension PCR is a simple method to obtain the recombinant genes. cIFN protein produced in this study has significant anti-virus and anti-tumor cell proliferation activities.

Key Words: Recombinant consensus interferon; Overlap extension polymerase chain reaction; Prokaryotic expression; Activity identification

Liu SA, Asano R, Guo JJ, Liu ZY, Yu KK, Xu DZ. Cloning recombinant consensus interferon with overlap extension polymerase chain reaction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 479-483

摘要

目的: 用重叠延伸PCR(overlap extension PCR)法获得人工优化的干扰素-重组复合干扰素 (consensus interferon, cIFN)基因, 用原核表达系统对其进行表达, 鉴定表达的cIFN活性。

方法: 根据大肠杆菌的偏爱密码子, 人工设计cIFN的高表达基因, 用overlap PCR法合成

■背景资料

干扰素是目前治疗病毒性肝炎的首选一线药物之一, 临床使用已多年, 但尚存在临床疗效不够理想、副反应较大等缺陷, 其原因可能与宿主和病毒因素有关以外, 还与IFN产品本身的性质、剂型及给药方式等有关。

■同行评议者

朱传武, 副主任医师, 苏州市第五人民医院传染科

■创新盘点

本研究根据大肠杆菌的偏爱密码子,人工设计了cIFN的高表达基因,并用重叠延伸PCR方法成功合成cIFN的全基因,实现了大肠杆菌表达系统中的高效表达。

cIFN全基因,用基因重组技术构建其原核表达载体pRA-cIFN,在大肠杆菌BL21中进行高效表达,用SDS-PAGE和Western blotting鉴定cIFN表达,用GuHCl阶段透析法进行蛋白变性、复性,用TALON(His)₆亲和层析柱进行纯化,用ELISA、MTS比色定量法及血凝抑制试验检测cIFN的免疫活性和生物活性。

结果:成功合成了cIFN全基因,其DNA长度与理论长度534 bp相符;用基因重组技术成功构建了cIFN原核表达载体pRA-cIFN,并用大肠杆菌BL21进行了高效表达,SDS-PAGE和Western blotting鉴定结果显示,表达蛋白主要以包涵体形式存在,其分子质量符合理论值23.3 kDa;用GuHCl阶段透析法成功进行包涵体蛋白的复性,亲和层析法纯化后cIFN的ELISA、MTS比色定量法及血凝抑制试验结果显示,表达蛋白具有明显的cIFN免疫学活性、剂量依赖性PLC/PRF/5细胞增殖抑制作用和HBsAg分泌抑制作用。

结论:重叠延伸PCR法是获得重组复合基因的有效简便的方法,我们通过重叠延伸PCR法获得并表达的cIFN具有明显的抗病毒、抗细胞增殖活性。

关键词:重组复合干扰素;重叠延伸PCR;原核表达;活性鉴定

刘顺爱, 浅野龙太郎, 郭晶晶, 刘志英, 余康康, 徐道振. 重叠延伸PCR法克隆重组复合干扰素. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 479-483

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/479.asp>

0 引言

干扰素(IFN)是一类具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等多种生物学活性的重要细胞因子,目前广泛应用于病毒感染性疾病的临床治疗,但当前的IFN产品存在临床疗效尚不够理想、难以清除病毒、复发率较高、副作用多等缺陷,有必要寻找更有效的药物来治疗难治性感染和复发感染.重组复合干扰素(consensus interferon, cIFN)是非天然存在的I型IFN,是通过对已知IFN α 各亚型序列筛选,采用每个位点上最常出现的氨基酸决定簇,用基因重组技术复合而成^[1].cIFN对I型受体的亲和力比IFN α 高数倍,生物活性高出5-10倍,临床试验也显示比IFN α 具有更好的效果.美国Amgen公司已生产cIFN,活性比原IFN α 强10倍,在临床应用上很受欢迎,已进入我国市场,我国也有多家单位正在研制复合干扰

素,还没有一家获准生产.重叠延伸PCR(overlap extension PCR)方法是用重叠延伸连接两个或多个目的序列的基因复合和基因重构的简便有效方法^[2-4].基于以上cIFN的优点和重叠延伸PCR方法的有效简便性,我们用重叠延伸PCR方法合成cIFN全基因,再用大肠杆菌表达系统实现了高效表达,拟使用于病毒性肝炎的靶向治疗等应用研究。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌高效表达载体pRA获赠于日本东北大学大学院生物工学蛋白质研究室,表达HBsAg的肝癌细胞系-PLC/PRF/5细胞获赠于日本东北大学加龄医学研究所医用细胞资源中心,相关的分子生物学、免疫学及生化学试剂在相应的生物试剂公司购买。

1.2 方法

1.2.1 重叠延伸PCR法进行cIFN全基因合成:参考文献[1]的序列,又根据大肠杆菌的偏爱密码子,人工设计重组复合干扰素的高表达基因.人为地把cIFN全基因分成8个片段并合成其长片段寡核苷酸,相邻的每两个片段之间均有一部分重叠序列,并在N-末端和C-末端各导入限制性内切酶Nco I、Sac II的酶切位点.混合此8个长片段寡核苷酸后进行第一次PCR;把第一次PCR产物作为模板,使用两末端引物继续进行第二次PCR.图1A为重叠延伸PCR的模式图。

1.2.2 构建cIFN表达载体pRA-cIFN:用限制性内切酶Nco I和Sac II进行cIFN基因和pRA载体的双酶切,用T4连接酶连接后经JM109工程菌的克隆筛选,得到cIFN的表达载体pRA-cIFN,表达载体pRA被设计为重组基因的N-末端有目的蛋白纯化用的(His)₆ tag和活性测定用的c-myc基因.用ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer测序以鉴定表达载体的序列准确性。

1.2.3 cIFN的表达、纯化及变性复性:把构建好的表达载体pRA-cIFN转化到BL21大肠杆菌中,使用2YT培养基进行大量培养.收集的细菌沉淀用超声破碎后经47℃, 11 000 g离心20 min,其沉淀中富含cIFN表达蛋白的包涵体.参照文献[5-7],用6 mol/L GuHCl变性cIFN包涵体蛋白,用TALON(His)₆ tag亲和层析柱纯化蛋白,纯化后的目的蛋白依次用6、3、2、1、0.5、0 mol/L GuHCl阶段透析法进行复性.用SDS-PAGE和Western blotting进行蛋白的表达鉴定。

1.2.4 cIFN的免疫活性测定:用IFN α 双抗体夹心

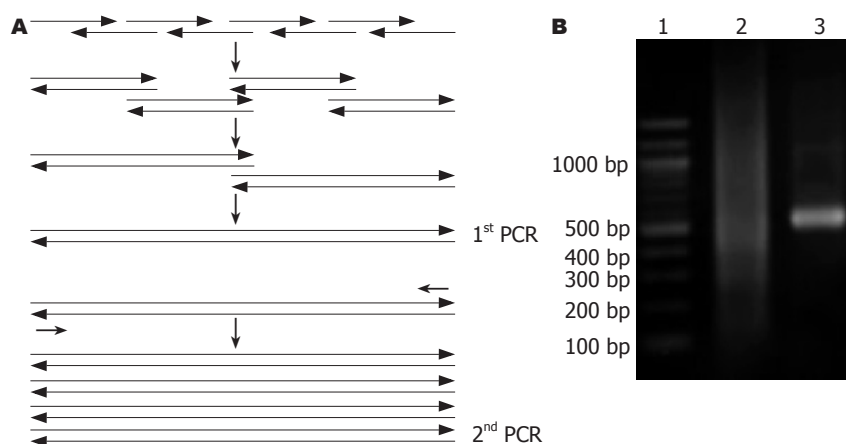


图1 重叠延伸PCR法扩增cIFN. A: 重叠延伸PCR法原理示意图; B: cIFN的PCR产物. 1: Marker; 2: cIFN第一次PCR产物; 3: cIFN第二次PCR产物.

应用要点

cIFN作为一种高效的新型干扰素, 不仅可以单独使用, 也可以用于抗体导向干扰素、长效干扰素等新型干扰素. 抗体导向干扰素可以把干扰素特异性地集中在病毒感染细胞周围, 是非常有应用前景的新型干扰素剂型.

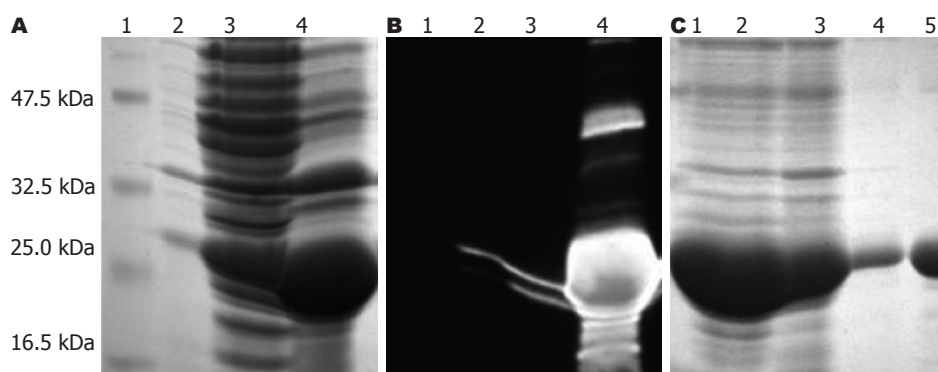


图2 cIFN的表达及纯化. A: cIFN的SDS-PAGE; B: cIFN的Western blotting. 1: Marker; 2: 培养菌液上清; 3: 超声破碎后上清; 4: 包涵体成份. 检测抗体为抗(His)₆IgG-HRP. C: 亲和层析法纯化后cIFN的SDS-PAGE. 1: Marker; 2: 包涵体总成份; 3: 柱通过; 4: 柱洗涤; 5: 柱洗脱.

ELISA试剂盒检测cIFN的抗原活性, 加入的cIFN浓度依次为0.058、0.58、5.8、58 nmol/L, 按说明书进行操作, 最后测 A_{450} .

1.2.5 MTS比色定量法测定cIFN的细胞增殖抑制活性: PLC/PRF/5细胞铺至96孔板后CO₂孵箱培养过夜, 加入cIFN继续培养48 h, cIFN浓度依次为20、10、5、2.5 mg/L. 弃培养上清后加入MTS, 测 A_{492} , 按公式计算cIFN对PLC/PRF/5细胞的增殖抑制率. 增殖抑制率(%) = $[1 - (A_{\text{experiment well}} - A_{\text{background well}}) / (A_{\text{control well}} - A_{\text{background well}})] \times 100\%$.

1.2.6 血凝抑制试验检测cIFN的抗HBV活性: PLC/PRF/5细胞铺至96孔板后CO₂孵箱培养过夜, 加入cIFN继续培养, cIFN浓度依次为0、1.56、3.125、6.25、12.5、25、50 mg/L, 干预培养48 h后收集培养上清. 用HBsAg血凝抑制检测试剂盒检测培养上清中HBsAg含量, 观察cIFN的HBsAg分泌抑制作用, 拟说明cIFN的抗HBV活性.

2 结果

2.1 cIFN的重叠延伸PCR及其表达载体的构建 通过重叠延伸PCR方法成功获得了cIFN的全基

因(图1B), 加上酶切位点其全长符合理论长度534 bp. 用此cIFN基因成功构建了原核表达载体pRA-cIFN, 基因测序结果显示表达载体的基因序列完全正确.

2.2 cIFN的表达鉴定及纯化 用BL21大肠杆菌实现了cIFN的高效表达(图2A-B), 分别显示cIFN表达蛋白的SDS-PAGE和Western blotting结果, 其分子质量符合理论大小23.3 kDa. 结果显示目的蛋白主要以包涵体形式表达, 培养上清中和超声破碎上清中的可溶性表达蛋白量较低. cIFN表达蛋白的纯化前和纯化后SDS-PAGE结果图2C为, 经(His)₆ tag亲和层析柱纯化后包涵体形式的表达蛋白能达到比较高的纯度.

2.3 cIFN的免疫活性鉴定 把纯化后的cIFN经GuHCl阶段透析法变性复性后进行ELISA干扰素活性测定, 结果显示cIFN具有很强的IFN α 抗原活性(图3A).

2.4 cIFN的细胞增殖抑制活性测定 MTS比色定量法测定cIFN对肝癌细胞系PLC/PRF/5的细胞增殖抑制实验结果显示, 所表达的cIFN在干预浓度10 mg/L时其细胞增殖抑制率能达到35%, 说明cIFN具有明显的细胞增殖抑制作用(图3B).

■名词解释

重组复合干扰素(cIFN): 是通过筛选已知IFN α 各亚型氨基酸序列每个位点上最常出现的氨基酸, 再用基因重组技术复合而成的新型非天然干扰素。cIFN和普通IFN α 相比, 受体的亲和力和生物活性均明显提高。

2.5 cIFN的抗病毒活性测定 用HBsAg血凝抑制检测试剂检测cIFN干预培养后的PLC/PRF/5细胞培养上清中HBsAg含量, 结果显示cIFN在1.56 mg/L时明显抑制PLC/PRF/5细胞分泌HBsAg, 说明表达的cIFN具有明显的抗HBV作用(图3C)。

3 讨论

IFN是一类具有多种生物学活性的重要细胞因子, 是迄今为止研究得最为详尽, 同时也是第一个利用基因工程技术开发生产并用于临床治疗的细胞因子, 目前广泛应用于病毒感染性疾病的抗病毒治疗。IFN的抗病毒机制是其与细胞膜特异性受体结合, 在细胞内产生抗病毒蛋白, 通过激活核苷酸内切酶, 使病毒单链RNA和mRNA降解, 抑制病毒合成, 是目前治疗病毒性肝炎首选一线药物之一^[8-9], 临床使用已多年。但当前的IFN产品尚存在临床疗效不够理想、副反应较大等缺陷, 其原因可能与宿主和病毒因素有关以外, 还与IFN产品本身的性质、剂型及给药方式等也有关系, 很多研究小组和制药行业正致力于寻找更适合于临床应用的疗效更强、毒副作用更低的新型IFN^[10-12]。

目前临床上用于病毒性肝炎治疗的IFN包括普通IFN α 、cIFN和聚乙二醇化干扰素 α (PEG-IFN α), 后者均为改变IFN的性质或剂型而制成的新型IFN。cIFN是通过筛选已知IFN α 各亚型序列后用基因重组技术复合而成的非天然IFN, 和普通IFN相比, 其体外抗病毒、抗增殖、激活自然杀伤细胞和基因诱导活性都有明显增高。PEG-IFN α 是在IFN α 分子上交联无活性、无毒性的PEG分子, 延缓IFN α 注射后的吸收和体内清除过程, 其半衰期较长, 每周1次给药即可维持有效血药浓度。除此之外, 正在研究的IFN剂型还有融合IFN和特异性抗体而制成的抗体导向IFN、融合IFN和白蛋白而制成的长效IFN等^[13]。抗体导向IFN是把单克隆抗体作为载体的导向药物, 从理论上讲, 这种剂型IFN因其导向载体-单克隆抗体特异性高, 可以特异性地把IFN集中在HBV感染细胞周围, 不仅提高疗效和降低毒副作用, 而且还可以延长IFN的半衰期, 是非常有应用前景的新型IFN剂型。我院正在进行实验室阶段或临床试验阶段的新型IFN研究。

在进行不同剂型IFN研究时, 其核心主体-IFN本身的性质至管重要。cIFN是一种新型IFN, 因其和I型IFN受体的亲和力较强, 其生物学活性优于普通IFN。cIFN已分别被美国FDA和我国卫生部批准用于治疗慢性乙型肝炎和慢性丙型

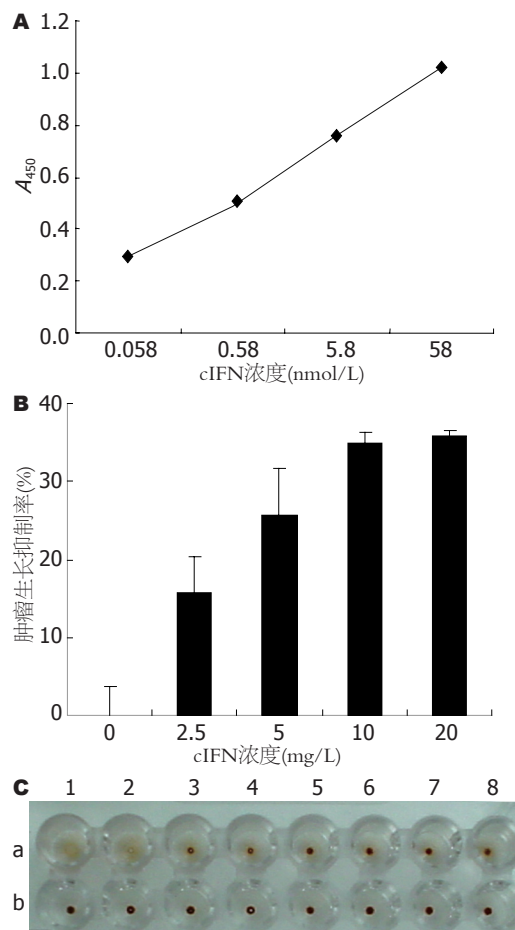


图3 cIFN的活性鉴定。A: cIFN的ELISA法免疫活性结果; B: cIFN的MTS法细胞增殖抑制活性结果; C: cIFN的血凝抑制法HBsAg分泌抑制活性结果。a: 实验组, 1: 阳性对照; 2: 0 mg/L; 3: 1.56 mg/L; 4: 3.125 mg/L; 5: 6.25 mg/L; 6: 12.5 mg/L; 7: 25 mg/L; 8: 50 mg/L; b: 阴性对照组。

肝炎, 国内外已有很多关于cIFN治疗慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎的成功报道^[14-21]。cIFN治疗慢性乙型肝炎在抗病毒应答率、持续抗病毒应答率及诱导HBeAg/抗HBe血清转换方面均优于普通IFN。cIFN治疗慢性丙型肝炎的研究报道多于慢性乙型肝炎, 尤其对复发和其他IFN无效的丙型肝炎患者, cIFN可获得较高的疗效。因其良好的应用前景, 国内有实验室进行cIFN的表达及相关制备工艺研究^[22-23]。

根据以上理论基础及临床需要, 我们正在开展cIFN及其导向药物研究, 本文报道有关cIFN蛋白的表达及其活性测定结果。cIFN是人工优化的非天然IFN, 不能用传统的PCR方法扩增其基因。重叠延伸PCR方法是现有基因的重要改造手段, 也可作为已知序列的基因全合成的有效手段。我们参考已报道的cIFN序列, 又根据大肠杆菌的偏爱密码子, 人工设计了cIFN的高表达基因, 之后用重叠延伸PCR方法成功合成了

cIFN的全基因, 其基因长度为534 bp. 我们用此基因构建了原核表达载体, 在大肠杆菌表达系统实现了高效表达, 其分子质量为23.3 kDa. 活性测定结果显示, 在本研究获得的cIFN蛋白具有明显的剂量依赖性PLC/PRF/5细胞增殖抑制活性和抗HBV活性, 我们将用此cIFN进行病毒性肝炎的靶向治疗等应用研究.

4 参考文献

- Blatt LM, Davis JM, Klein SB, Taylor MW. The biologic activity and molecular characterization of a novel synthetic interferon-alpha species, consensus interferon. *J Interferon Cytokine Res* 1996; 16: 489-499
- Warrens AN, Jones MD, Lechler RI. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* 1997; 186: 29-35
- Zhao QT, Ma LY, Xue GZ, Zhao AZ, Dou KF. Expression, purification and activity analysis of human single-chain antibody against hepatocellular cancer. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2007; 23: 649-651
- Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* 2007; 2: 924-932
- Asano R, Takemura S, Tsumoto K, Sakurai N, Teramae A, Ebara S, Katayose Y, Shinoda M, Suzuki M, Imai K, Matsuno S, Kudo T, Kumagai I. Functional construction of the anti-mucin core protein (MUC1) antibody MUSE11 variable regions in a bacterial expression system. *J Biochem* 2000; 127: 673-679
- Takemura S, Asano R, Tsumoto K, Ebara S, Sakurai N, Katayose Y, Kodama H, Yoshida H, Suzuki M, Imai K, Matsuno S, Kudo T, Kumagai I. Construction of a diabody (small recombinant bispecific antibody) using a refolding system. *Protein Eng* 2000; 13: 583-588
- Makabe K, Asano R, Ito T, Tsumoto K, Kudo T, Kumagai I. Tumor-directed lymphocyte-activating cytokines: refolding-based preparation of recombinant human interleukin-12 and an antibody variable domain-fused protein by additive-introduced stepwise dialysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 98-105
- 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华传染病杂志* 2005; 23: 421-431
- 中华医学会肝病学会, 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. *中华医学杂志* 2004; 84: 775-780
- 张辉, 段招军, 朱建高, 彭夫望, 李武平, 高寒春, 谢志萍, 王玉娥, 侯云德. 人新型干扰素 κ 的基因克隆、表达、纯化及其抗病毒活性的初步研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2005; 19: 223-226
- 彭夫望, 高寒春, 谢志萍, 张辉, 李启明, 段招军, 侯云德. 重组人干扰素Epsilon的表达纯化及生物学性质研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2005; 19: 227-231
- 王刚, 李武平, 张成海, 衣作安, 郑丽舒, 张辉, 段招军, 侯云德. 新型重组人IFN- λ 2的高效表达、纯化与抗病毒活性研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2005; 19: 232-235
- 唱韶红, 巩新, 杨志愉, 王同映, 马国昌, 马清钧, 吴军. 人血清白蛋白和人干扰素 α 2b的融合蛋白在毕赤酵母中的表达. *生物工程学报* 2006; 22: 173-179
- Kemmer N, Neff GW. Managing chronic hepatitis C in the difficult-to-treat patient. *Liver Int* 2007; 27: 1297-1310
- Witthoeft T, Fuchs M, Ludwig D. Recent i.v.-drug users with chronic hepatitis C can be efficiently treated with daily high dose induction therapy using consensus interferon: an open-label pilot study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 579-584
- Cornberg M, Hadem J, Herrmann E, Schuppert F, Schmidt HH, Reiser M, Marschal O, Steffen M, Manns MP, Wedemeyer H. Treatment with daily consensus interferon (CIFN) plus ribavirin in non-responder patients with chronic hepatitis C: a randomized open-label pilot study. *J Hepatol* 2006; 44: 291-301
- Bocher WO, Schuchmann M, Link R, Hillenbrand H, Rahman F, Sprinzl M, Mudter J, Lohr HF, Galle PR. Consensus interferon and ribavirin for patients with chronic hepatitis C and failure of previous interferon-alpha therapy. *Liver Int* 2006; 26: 319-325
- Yao GB, Fu XX, Tian GS, Xu DZ, Hao LJ, Huangfu YS, Su CX. A multicenter, randomized, controlled trial of interferon alfacon-1 compared with alpha-2a-interferon in Chinese patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 1165-1170
- 罗光汉, 廖柏明, 黄绍标. 重组复合干扰素联合利巴韦林治疗丙型肝炎的临床观察. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 363
- 李晓娟, 于岩岩, 斯崇文, 高健, 田德英, 许家璋, 盛吉芳, 胡大荣, 徐道振, 王耀宗, 朴明淑, 牛俊奇, 谭德明, 任万华. 复合干扰素治疗复发及无应答慢性丙型肝炎效果观察. *中华传染病杂志* 2004; 22: 327-330
- 闫涛, 王慧芬, 李克, 张爱民. 复合干扰素 α 治疗慢性乙型肝炎. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 314-315
- Hao Y, Chu J, Wang Y, Zhang S, Zhuang Y. Expression and aggregation of recombinant human consensus interferon-alpha mutant by *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 2006; 28: 905-909
- Hao Y, Chu J, Wang Y, Zhuang Y, Zhang S. The inhibition of aggregation of recombinant human consensus interferon-alpha mutant during *Pichia pastoris* fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 74: 578-584

■同行评价

本文研究具有新颖性, 实验方法具备一定的难度, 研究结果有待进一步开发利用, 具有应用价值.

编辑 程剑侠 电编 何基才

BxPC-3条件培养液对PC12细胞株DA和NE代谢的影响

李荣, 王杰军, 吴欣, 郭静, 王妙苗, 王喜, 解静, 何晓静

■背景资料

胰腺癌合并抑郁的研究属于肿瘤精神学的交叉领域。当前, 这一研究领域主要集中在流行病学调查研究上。DA和NE是与情绪和行为密切相关的神经递质。以兴趣丧失、失眠、体质量减轻等情绪和行为改变为主要临床表现的抑郁症, 常伴有中枢神经系统内DA和NE的减少。

李荣, 王杰军, 吴欣, 郭静, 王妙苗, 王喜, 解静, 何晓静, 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

李荣, 在读博士, 主要从事肿瘤患者生活质量方面的研究。

通讯作者: 王杰军, 200070, 上海市和田路64号, 中国人民解放军第三军医大学附属长征医院肿瘤科。lirong785@hotmail.com
电话: 021-66540109-7045

收稿日期: 2007-08-17 修回日期: 2008-01-10

Effect of BxPC-3-conditioned medium on the metabolism of DA and NE in PC12 cell line and its mechanism of action

Rong Li, Jie-Jun Wang, Xin Wu, Jing Guo, Miao-Miao Wang, Xi Wang, Jing Xie, Xiao-Jing He

Rong Li, Jie-Jun Wang, Xin Wu, Jing Guo, Miao-Miao Wang, Xi Wang, Jing Xie, Xiao-Jing He, 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, 64 Hetian Road, Shanghai 200070, China. lirong785@hotmail.com
Received: 2007-08-17 Revised: 2008-01-10

Abstract

AIM: To study the effect of BxPC-3-conditioned medium on the metabolism of DA and NE in PC12 cells and its mechanism of action.

METHODS: PC12 cells were treated with BxPC-3-conditioned medium without IL-6. The rate of apoptosis of PC12 cells was detected by flow cytometry. DA, 5-HT and NE in the medium were measured by HPLC. IL-6 (0.01 mg/L, 0.1 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2 mg/L) was added into the medium deprived of serum, then the DA, 5-HT and NE in the medium were measured.

RESULTS: There was no significant difference in the rate of apoptosis of PC12 cells in each group. After anti-IL-6 was added into the conditioned medium, the quantity of DA and NE in the medium was increased. The concentration of IL-6 was increased. DA and NE were metabolized in a dose-dependent manner. Addition of

1mg/L IL-6 significantly decreased DA and NE.

CONCLUSION: BxPC-3-conditioned medium has certain effects on the metabolism of DA and NE of PC12 cells by adding IL-6.

Key Words: Conditioned medium; Interleukine-6; PC12 cell; Dopamine; Noradrenalin; Metabolism; Mechanism

Li R, Wang JJ, Wu X, Guo J, Wang MM, Wang X, Xie J, He XJ. Effect of BxPC-3-conditioned medium on the metabolism of DA and NE in PC12 cell line and its mechanism of action. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 484-487

摘要

目的: 探讨BxPC-3条件培养液影响分化的PC12细胞神经递质代谢的机制。

方法: 用去除IL-6的BxPC-3条件培养液处理分化的PC12细胞, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率、HPLC检测上清和细胞裂解液中DA、5-HT和NE的含量。在不含血清的条件培养液中加入IL-6(0.01 mg/L, 0.1 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2 mg/L), 分别收集上清和细胞裂解液, 采用HPLC检测DA和NE的含量。

结果: 各组细胞凋亡率之间差别无统计学意义, 条件培养液中加入IL-6抗体后, 上清中DA和NE的含量明显增加, 而细胞内DA和NE代谢差异无统计学意义, 在加入不同剂量IL-6后, 随着浓度的增加, DA和NE的代谢近似呈现剂量依赖性降低, 当IL-6浓度为1 mg/L时DA和NE的变化有统计学意义。

结论: BxPC-3条件培养液主要通过IL-6影响分化的PC12神经递质代谢。

关键词: 条件培养液; 白介素6; PC12细胞; 多巴胺; 去甲肾上腺素; 代谢; 机制

李荣, 王杰军, 吴欣, 郭静, 王妙苗, 王喜, 解静, 何晓静. BxPC-3条件培养液对PC12细胞株DA和NE代谢的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(5): 484-487

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/484.asp>

■同行评议者

吴泰璜, 教授, 山东省立医院肝胆外科

0 引言

肿瘤患者普遍伴有抑郁障碍, 其严重影响患者的治疗与康复, 降低患者的生活质量^[1]. 研究显示, 胰腺癌患者的抑郁发病率高于其他肿瘤患者^[2], 且抑郁与胰腺癌之间存在特殊的密切联系^[3], 但相关机制不详. 我们在前期实验中发现胰腺癌细胞微环境可以影响类中枢神经元神经递质的代谢, 并发现其中含有大量的IL-6. 本研究继续探讨细胞因子在胰腺癌条件培养液影响神经递质代谢中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 PC12细胞由第二军医大学神经生物教研室惠赠(购自ATCC), BxPC-3细胞由第二军医大学长海医院消化内科实验室惠赠(购自ATCC), NGF购自Sigma公司, 胎牛血清、马血清和多聚赖氨酸均购自Gibco公司, IL-6抗体, IL-6及IL-6的同型对照兔IgG均购自PEPROTECH公司, 应用于细胞HPLC检测的溶剂和物质中, 除乙腈外均购自Merck公司, 乙腈购于上海中科院药物研究所.

1.2 方法

1.2.1 PC12细胞的培养及分组: 按照参考文献[4]的方法选用第13-15代的PC12细胞, 以 6×10^5 个/孔接种在铺有多聚赖氨酸的六孔板中, 培养液选用含100 mL/L马血清, 50 mL/L胎牛血清的DMEM, 在含有50 mL/L CO₂, 37℃的孵箱中培育. 接种后第1天, 用50 ng/L的NGF诱导分化, 然后在含有NGF的DMEM中培养7-10 d, 隔天换液, 然后用于实验研究. 根据检测项目的不同, 细胞分组不同, 总体将细胞分为对照组, 去除IL-6的条件培养液处理组, IL-6抗体同型对照处理组, IL-6处理组(0.01 mg/L, 0.1 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2 mg/L).

1.2.2 条件培养液的制备: 参照参考文献[5]在BxPC-3处于对数生长期时, 换用不含血清的DMEM培养24 h, 收集上清, 500 r/min离心5 min, 存于-80℃低温冰箱备用. 按照参考文献[6]的方法制备除IL-6的条件培养液, 略有改进, 用终浓度为0.1 mg/L的IL-6多抗来阻断1 mL BxPC-3条件培养液中IL-6的活性, 加入后共培养15 min, 收集, 500 r/min离心5 min, 将去除IL-6的条件培养液用于处理分化的PC12细胞, 对照为1 μg非特异性兔IgG.

1.2.3 高效液相检测神经递质的合成和分泌: 按照参考文献[7]的方法, 分别收集培养液和细胞,

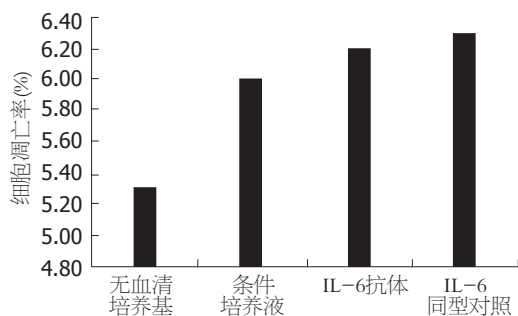


图1 不同培养液处理PC12后细胞凋亡率.

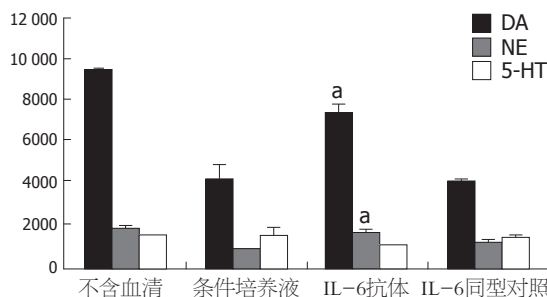


图2 条件培养液中加入IL-6抗体后DA, NE, 5-HT的变化.
^a $P < 0.05$ vs 条件培养液组.

培养液4℃ 17 500 g离心10 min, 去掉蛋白及可能存在的细胞碎屑, 立即取5 μL用做HPLC检测. 收集的细胞用0.2N高氯酸处理后4℃ 17 500 g离心10 min, 然后参照参考文献[8]将细胞裂解液和上清应用高效液相电化学检测器检测.

统计学处理 实验数据采用 t 检验进行分析, 定量资料以mean±SD表示, $P < 0.05$ 为统计学有显著差异.

2 结果

2.1 加入IL-6抗体和同型对照后细胞活性 在各处理组间, 细胞凋亡率无显著差异. 应用IL-6抗体处理过的条件培养液处理分化的PC12细胞, 结果显示DA、NE代谢障碍被纠正, 与条件培养液相比较结果有统计学意义(图1-2).

2.2 IL-6与DA和NE的关系 将不同剂量IL-6加入培养液中, 随IL-6剂量的增加, 细胞外液中DA和NE的含量逐渐下降, IL-6浓度为1 mg/L时处理组与对照组的差别具有显著统计学意义(图3).

3 讨论

胰腺癌合并抑郁的研究属于肿瘤精神学的交叉领域, 当前, 这一研究领域主要集中在流行病学调查研究. 在以往的实验中, 我们采用胰腺癌细胞株BxPC-3条件培养液处理类中枢神经元-分化的PC12细胞, 发现其合成分泌的DA和NE明

■ 相关报道

Carney *et al*通过前瞻性研究认为胰腺癌与抑郁之间存在因果联系, 并认为抑郁可以导致胰腺癌的产生和发展, 而Brown *et al*认为胰腺癌导致抑郁, 并认为可能是胰腺癌细胞合成和分泌的单胺类神经递质受体抗体所导致.

■ 创新盘点

本文中首次以体外研究的模式,采用胰腺癌细胞条件培养液和类神经元细胞-分化的PC12细胞,探讨了胰腺癌合并抑郁的可能的机制。

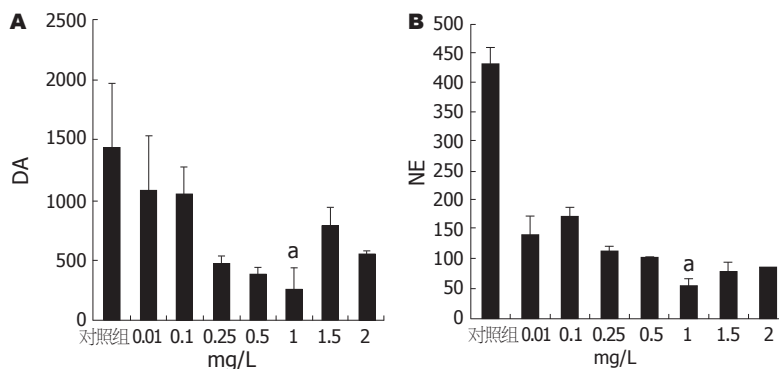


图3 不同浓度IL-6加入不含血清的培养基中培养24 h后,神经递质代谢变化. A: DA; B: NE, ^a $P < 0.05$ vs 对照组.

显下降. DA和NE是与情绪和行为密切相关的神递质. 以兴趣丧失、失眠、体质量减轻等情绪和行为改变为主要临床表现的抑郁症,常伴有中枢神经系统内DA和NE的减少.

我们在前面的实验中还发现BxPC-3条件培养液中含有较多量的IL-6. Yang *et al*^[9]和Kim *et al*^[10]都发现抑郁患者外周血中IL-6水平明显高于非抑郁患者, Capuron *et al*发现给动物注射IL-6会使动物产生症状类似抑郁症的病态综合征^[11], 这些研究显示IL-6水平与抑郁密切相关. Ebrahimi *et al*研究发现胰腺癌患者外周血IL-6水平明显高于其他消化系统肿瘤患者和健康人^[12], 基础研究也显示胰腺癌细胞株可以合成和分泌相对较高质量的IL-6^[13], 提示IL-6水平与胰腺癌也关系密切. 基于IL-6水平与肿瘤及抑郁都存在密切关系, 我们在本实验中进一步了解IL-6与BxPC-3条件培养液影响PC12细胞神经递质代谢的关系.

首先应用IL-6抗体处理过的条件培养液处理分化的PC12细胞, 结果显示, DA、NE代谢障碍被纠正, 与条件培养液相比较结果有统计学意义, 但神经递质的量并未完全恢复到对照组的水平. Kunioku *et al*^[14]发现IL-6可使分化的PC12细胞免于无血清导致的凋亡, 为排除细胞数量可能对神经递质检测的影响, 我们检测各处理组中细胞凋亡率的影响. 结果在处理时间段内, 各组细胞凋亡率没有明显区别. 进一步将不同剂量IL-6加入培养液中提示, 随IL-6剂量的增加, 细胞外液中DA和NE的含量逐渐下降, 当IL-6浓度为1 mg/L时处理组与对照组的差别具有显著统计学意义. 这些实验结果提示, 胰腺癌细胞合成和分泌的IL-6影响PC12细胞神经递质代谢.

关于胰腺癌与抑郁之间的关系, 临床流行病学和基础研究的结果都提示两者之间存在甚为密切的联系. Carney *et al*通过前瞻性研究认为胰腺癌与抑郁之间存在因果联系^[15], 并认为抑

郁可以导致胰腺癌的产生和发展, 而Brown *et al*认为胰腺癌导致抑郁, 并认为可能是胰腺癌细胞合成和分泌的单胺类神经递质受体抗体所导致^[16]. 我们以体外研究的模式发现, 胰腺癌合成和分泌的IL-6可以降低PC12细胞内DA和NE的合成代谢, 也就是说, 抑郁患者胰腺癌细胞株合成和分泌的细胞因子导致抑郁的产生, 这一结论支持Brown *et al*的观点, 但是与Brown *et al*的研究结果还有差异, 究其原因, 除与研究方法不同外, 也与不同时期实验研究的背景有关. 在抑郁症的研究方面, 经历不同的过程, 在19世纪90年代以前, 多数学者的实验结果提示抑郁症患者处于免疫抑制状态, 而近代, 许多学者发现抑郁症患者呈现以炎症细胞因子、急性期反应蛋白增多为主要表现的免疫激活状态, 甚至有学者认为抑郁症的发病机制与免疫细胞活化后分泌的细胞因子有关, 进而提出“抑郁症的细胞因子学说”^[17]. 另外, 在肿瘤合并抑郁免疫状态的结果也显示, 免疫功能处于激活状态^[18].

IL-6是一种炎症细胞因子, 不仅在胰腺癌患者、抑郁症患者血清内明显升高, 而且在肿瘤合并抑郁患者外周血清内也明显升高^[18]. 现代神经生理研究证实, 外周血内的IL-6可以通过缺乏血脑屏障的区域、特殊的转运机制等方式而最终通过血脑屏障影响神经系统内的功能^[19]. 虽然在正常情况下, 中枢神经系统内有少量的IL-6, 在神经细胞的生长发育中发挥重要作用^[20-21], 但在病理情况下, 中枢神经系统内IL-6的浓度升高, 发挥破坏学习能力以及记忆能力的作用^[22], 动物实验也证实过高浓度的IL-6会影响神经递质的代谢^[23]. 由此我们认为, 胰腺癌细胞合成和分泌过多的IL-6, 通过不同的途径进入中枢神经系统, 影响神经递质的代谢, 可能是胰腺癌合并高抑郁发病率的原因.

4 参考文献

- 1 Rodin G, Lloyd N, Katz M, Green E, Mackay JA,

- Wong RK. The treatment of depression in cancer patients: a systematic review. *Support Care Cancer* 2007; 15: 123-136
- 2 Massie MJ. Prevalence of depression in patients with cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2004; : 57-71
- 3 Boyd AD, Riba M. Depression and pancreatic cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2007; 5: 113-116
- 4 Ireland LM, Yan CH, Nelson LM, Atchison WD. Differential effects of 2,4-dithiobiuret on the synthesis and release of acetylcholine and dopamine from rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 1453-1462
- 5 Jandu N, Ceponis PJ, Kato S, Riff JD, McKay DM, Sherman PM. Conditioned medium from enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected T84 cells inhibits signal transducer and activator of transcription 1 activation by gamma interferon. *Infect Immun* 2006; 74: 1809-1818
- 6 Suwa T, Hogg JC, Vincent R, Mukae H, Fujii T, van Eeden SF. Ambient air particulates stimulate alveolar macrophages of smokers to promote differentiation of myeloid precursor cells. *Exp Lung Res* 2002; 28: 1-18
- 7 Liu HQ, Zhu XZ, Weng EQ. Intracellular dopamine oxidation mediates rotenone-induced apoptosis in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 17-26
- 8 Liang YQ, Tang XC. Comparative studies of huperzine A, donepezil, and rivastigmine on brain acetylcholine, dopamine, norepinephrine, and 5-hydroxytryptamine levels in freely-moving rats. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 1127-1136
- 9 Yang K, Xie G, Zhang Z, Wang C, Li W, Zhou W, Tang Y. Levels of serum interleukin (IL)-6, IL-1beta, tumour necrosis factor-alpha and leptin and their correlation in depression. *Aust N Z J Psychiatry* 2007; 41: 266-273
- 10 Kim YK, Na KS, Shin KH, Jung HY, Choi SH, Kim JB. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; 31: 1044-1053
- 11 Capuron L, Miller AH. Cytokines and psychopathology: lessons from interferon-alpha. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 819-824
- 12 Bartsch R, Woehrer S, Raderer M, Hejna M. Serum interleukin-6 levels in patients with gastric MALT lymphoma compared to gastric and pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2006; 26: 3187-3190
- 13 Bellone G, Smirne C, Mauri FA, Tonel E, Carbone A, Buffolino A, Dughera L, Robecchi A, Pirisi M, Emanuelli G. Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 684-698
- 14 Kunioku H, Inoue K, Tomida M. Interleukin-6 protects rat PC12 cells from serum deprivation or chemotherapeutic agents through the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT3 pathways. *Neurosci Lett* 2001; 309: 13-16
- 15 Carney CP, Jones L, Woolson RF, Noyes R Jr, Doebbeling BN. Relationship between depression and pancreatic cancer in the general population. *Psychosom Med* 2003; 65: 884-888
- 16 Brown JH, Paraskevas F. Cancer and depression: cancer presenting with depressive illness: an autoimmune disease? *Br J Psychiatry* 1982; 141: 227-232
- 17 Smith RS. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses* 1991; 35: 298-306
- 18 Musselman DL, Miller AH, Porter MR, Manatunga A, Gao F, Penna S, Pearce BD, Landry J, Glover S, McDaniel JS, Nemeroff CB. Higher than normal plasma interleukin-6 concentrations in cancer patients with depression: preliminary findings. *Am J Psychiatry* 2001; 158: 1252-1257
- 19 Simmons DA, Broderick PA. Cytokines, stressors, and clinical depression: augmented adaptation responses underlie depression pathogenesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 793-807
- 20 Fernandes A, Falcao AS, Silva RF, Brito MA, Brites D. MAPKs are key players in mediating cytokine release and cell death induced by unconjugated bilirubin in cultured rat cortical astrocytes. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 1058-1068
- 21 Ghorbel MT, Sharman G, Leroux M, Barrett T, Donovan DM, Becker KG, Murphy D. Microarray analysis reveals interleukin-6 as a novel secretory product of the hypothalamo-neurohypophyseal system. *J Biol Chem* 2003; 278: 19280-19285
- 22 Elwan O, Madkour O, Elwan F, Mostafa M, Abbas Helmy A, Abdel-Naseer M, Abdel Shafy S, El Faiuomy N. Brain aging in normal Egyptians: cognition, education, personality, genetic and immunological study. *J Neurol Sci* 2003; 211: 15-22
- 23 Zaheer A, Sahu SK, Wu Y, Zaheer A, Haas J, Lee K, Yang B. Diminished cytokine and chemokine expression in the central nervous system of GMF-deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2007; 1144: 239-247

同行评价

本文研究设计合理, 技术路线可行, 论述较全面, 具有较强的学术价值。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

PUMA蛋白在胰腺癌中的表达及临床意义

张克君, 李德春, 朱东明

■背景资料

PUMA是近年发现的位于P53下游的基因, 具有强大的促凋亡作用和细胞生长抑制作用。许多肿瘤组织存在PUMA低表达, 其低表达水平与肿瘤的发生、发展有关, 而增加肿瘤细胞PUMA表达可明显地抑制肿瘤生长, 并能增强肿瘤细胞对放疗和化疗的敏感性。

张克君, 李德春, 朱东明, 苏州大学附属第一医院普外科 江苏省苏州市 215006

张克君, 在读博士, 主要从事肝胆胰疾病的基础与临床研究。

卫生部科学研究基金资助项目, No. WKJ2004-2-001

作者贡献分布: 此课题由李德春、张克君设计; 研究过程由朱东明、张克君操作完成; 数据分析由朱东明、张克君完成; 本论文写作由张克君完成。

通讯作者: 李德春, 215006, 江苏省苏州市, 苏州大学附属第一医院普外科。love5028@126.com

电话: 0532-86175890

收稿日期: 2007-10-17 修回日期: 2008-01-22

PUMA expression in pancreatic cancer and its clinical significance

Ke-Jun Zhang, De-Chun Li, Dong-Ming Zhu

Ke-Jun Zhang, De-Chun Li, Dong-Ming Zhu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China
Supported by: the Foundation of Ministry of Public Health for Scientific Research, No. WKJ2004-2-001

Correspondence to: Professor De-Chun Li, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Suzhou University Jiangsu Province, China. love5028@126.com
Received: 2007-10-17 Revised: 2008-01-22

Abstract

AIM: To investigate the role of PUMA in development of pancreatic cancer (PC) and its mechanism as well as its correlation with P53 up-regulate dmodulator of apoptosis (PUMA) expression and clinicopathologic parameters.

METHODS: Expression of PUMA, P53 and Bcl-2 in 60 PC tissue samples and 19 normal pancreatic tissue samples was assessed with immunohistochemical Envision method. Apoptosis index (AI) was detected with TUNEL method. Correlations between expressions of P53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA), P53, Bcl-2, AI and clinicopathologic parameters were analyzed.

RESULTS: The positive rate of PUMA expression was significantly lower in PC tissue samples than in normal pancreatic tissue samples (30% vs 52.6%, $P < 0.05$). The PUMA expression was correlated with tumor size, lymph node and distant metastasis ($P < 0.05$), but not with any other

clinical or pathological parameters. The AI of positive and negative PUMA expression in PC tissue samples was $20.63\% \pm 6.27\%$ and $17.44\% \pm 5.86\%$, respectively ($P < 0.05$). The positive rate of P53 and Bcl-2 expression in PC tissue samples was 46.7% (28/60) and 41.7% (25/60), respectively. Expression of PUMA was closely related with that of Bcl-2 and P53 in PC tissue samples ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Absent PUMA expression in PC tissue is related with the development of PC and lymph node and distant metastasis. PUMA may be a new target for the treatment of PC.

Key Words: Pancreatic carcinoma; P53 up-regulated modulator of apoptosis; P53; Bcl-2; Metastasis

Zhang KJ, Li DC, Zhu DM. PUMA expression in pancreatic cancer and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 488-492

摘要

目的: 初步探讨PUMA(P53 up-regulated modulator of apoptosis)蛋白在胰腺癌发生发展中的作用及其可能机制, 并研究PUMA蛋白表达与临床病理学指标的关系。

方法: 应用免疫组化Envision方法检测60例导管腺癌组织石蜡标本中PUMA, Bcl-2和P53蛋白表达以及19例正常胰腺组织石蜡标本中PUMA蛋白表达; TUNEL检测细胞凋亡(AI); 分析PUMA表达与临床病理学指标的关系以及其与AI和P53、Bcl-2表达的相关性。

结果: PUMA在胰腺癌组织中的阳性率低于正常胰腺组织, 有统计学差异(30% vs 52.6%, $P < 0.05$); PUMA表达与肿瘤大小, 淋巴结转移和远处转移有关($P < 0.05$), 而与肿瘤分化程度和TNM分期无关; AI在PUMA阳性和阴性表达的肿瘤组织中, 有统计学差异($20.63\% \pm 6.27\%$ vs $17.44\% \pm 5.86\%$, $P < 0.05$); P53和Bcl-2在胰腺癌中的表达率分别为46.7%(28/60)和41.7%(25/60); PUMA与P53和Bcl-2表达分别有显著的相关性($P = 0.013$, $P = 0.046$)。

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

结论: 胰腺癌的生长、淋巴结和远处转移与PUMA蛋白表达缺失有关, PUMA可能是胰腺癌基因治疗的新靶点。

关键词: 胰腺癌; P53上调细胞凋亡调控因子; P53; Bcl-2; 转移

张克君, 李德春, 朱东明. PUMA蛋白在胰腺癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 488-492
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/488.asp>

0 引言

细胞凋亡受阻是胰腺癌发生的重要原因, 而高侵袭性和高转移性是大部分患者无法获得根治性治疗的主要因素^[1-4]. 深入阐明胰腺癌浸润转移和生长的分子机制, 对于寻找胰腺癌诊治的新靶点, 提高其疗效具有重要的临床意义. PUMA(P53 up-regulated modulator of apoptosis)是新近发现的Bcl-2家族BH-3亚家族中的成员, 是P53介导的下游促凋亡基因^[5-7]. 体外实验表明^[6-8], 转染外源性PUMA基因可以诱导肿瘤细胞的快速凋亡和抑制集落形成, 而PUMA基因沉默后, 肿瘤细胞的凋亡能力明显减弱, 说明PUMA能促进细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞生长, 而PUMA表达缺失可促进肿瘤细胞的生长. 临床研究发现^[9-11], 许多恶性肿瘤中存在PUMA表达缺失, 而PUMA表达缺失与肿瘤的远处和淋巴结转移有相关性, 在某些肿瘤, PUMA表达缺失与肿瘤大小和5年生存率明显相关. 本文采用免疫组化技术研究PUMA蛋白表达与胰腺癌临床病理因素的相关性及意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集苏州大学第一附属医院、青岛大学第一附属医院、四川大学华西医院普外科2001-05/2006-05病理诊断均为导管腺癌的60例胰腺癌石蜡标本(临床资料完整), 男39例, 女21例, 年龄35-71(中位数56)岁; 肿瘤直径小于4 cm者22例, 大于或等于4 cm者38例; 高分化30例, 中分化13例, 低分化17例; 根据TNM分期(1997恶性肿瘤国际临床病期分类)标准: I 13例、II 12例、III 15例、IV 20例; 伴有淋巴结转移32例, 无淋巴结转移28例; 远处转移者20例(肝转移、腹膜和网膜种植等); 19例正常胰腺组织标本, 取自壶腹癌、胰腺内分泌肿瘤和外伤的患者. 所有患者均为第一次手术, 术前未经任何放化疗. 兔抗人PUMA多克隆抗体为美国Cell Signaling

表 1 PUMA在胰腺癌和良性胰腺组织中的表达

分组	-	+	++	+++	%
胰腺癌组织	42	8	5	5	30
正常胰腺组织	8	8	3	0	57.9

公司产品, Bcl-2和P53抗体购自北京中山, 二抗: Envision试剂为即用型试剂, 购自Dako公司, TUNEL检测试剂盒购自罗氏公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 采用Envision二步法检测操作流程, 具体操作步骤按照说明书进行. 判定结果: PUMA和Bcl-2阳性判断标准以胞质内出现棕黄染色为阳性, P53阳性判断标准以胞核内出现棕黄染色为阳性. 用专业图像分析系统分析阳性程度: 阳性反应的强度分为-($\leq 10\%$), 弱阳性+(10%-20%), 中度阳性++(20%-51%), 强阳性+++(>51%).

1.2.2 凋亡细胞原位缺口末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡: 具体操作按照说明书进行. 结果判断以细胞核中有棕黄色颗粒为阳性细胞, 即凋亡细胞. 随机计数5个以上高倍视野, 不少于1000个细胞, 将凋亡细胞与总细胞比值定义为凋亡指数(AI).

统计学处理 应用SAS6.0统计软件, 采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 PUMA在胰腺癌和正常胰腺组织中的表达 PUMA阳性表达主要在细胞质内, 部分质核内同时表达. 60例胰腺癌组织中18例表达阳性, 阳性率30%; 在19例正常胰腺组织中11例表达阳性, 阳性率57.9%. PUMA在肿瘤组织中的阳性率明显低于正常胰腺组织, 差异有显著性($P = 0.028$)(图1, 表1).

2.2 PUMA表达与胰腺癌临床病理指标的关系 在胰腺癌组织中, PUMA蛋白表达与肿瘤分化程度、TNM分期无关($P > 0.05$); PUMA在远处转移组和淋巴结转移组的阳性表达率低于非远处转移组和非淋巴结转移组($P < 0.05$), 在肿瘤大于4 cm组的阳性表达率低于肿瘤小于4 cm组($P < 0.05$, 表2).

2.3 TUNEL法检测细胞凋亡 在PUMA阳性和阴性表达的胰腺癌组织中, AI分别 $20.63\% \pm 6.27\%$ 和 $17.44\% \pm 5.86\%$, 差异有显著性($P < 0.05$, 图2).

2.4 PUMA和P53和Bcl-2表达的相关性分析 18

■ 相关报道

PUMA在实体肿瘤表达的文献报道只见于肝癌、胃癌、结直肠癌、鼻咽癌、头颈癌、恶性黑色素瘤等, 在胰腺癌中未见报道.

■创新盘点

本文以免疫组化的方法研究PUMA在胰腺癌组织的表达情况以及与临床病理因素的关系,并探讨PUMA在胰腺癌中的作用及其可能机制。

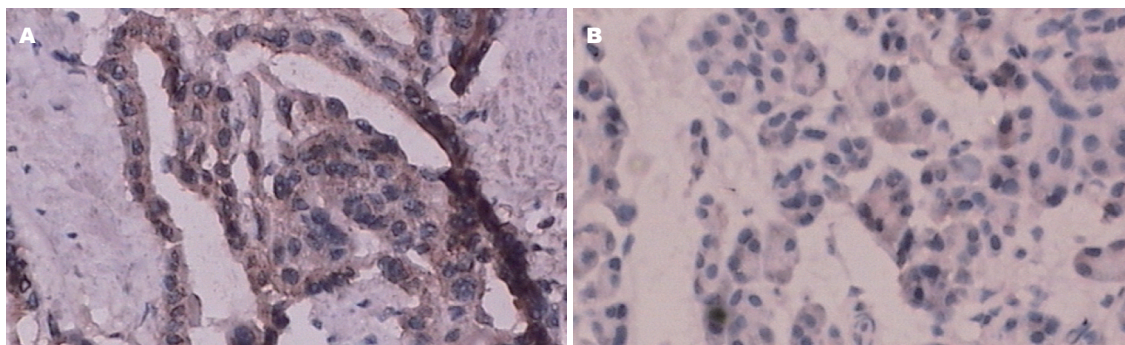


图1 PUMA蛋白的免疫组织化学检测结果. A: PUMA在胰腺癌组织表达($\times 400$, +++); B: PUMA在正常胰腺组织中表达($\times 400$, ++).

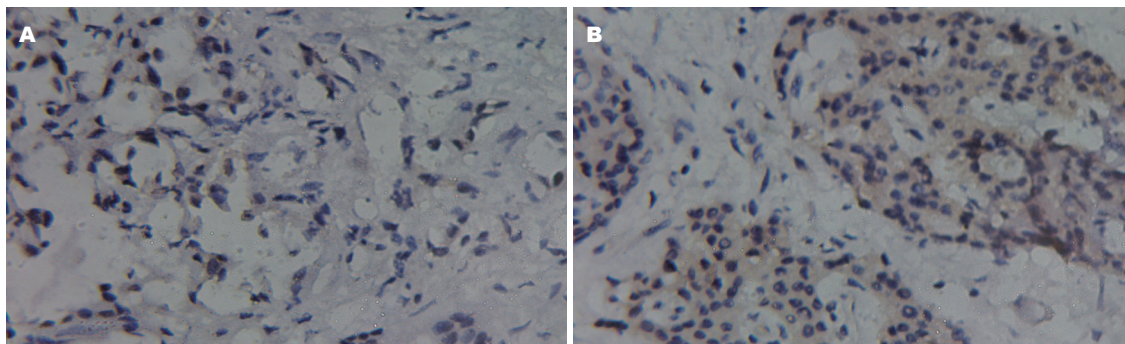


图2 TUNEL检测胰腺癌组织细胞凋亡($\times 200$). A: PUMA阳性表达; B: PUMA阴性表达.

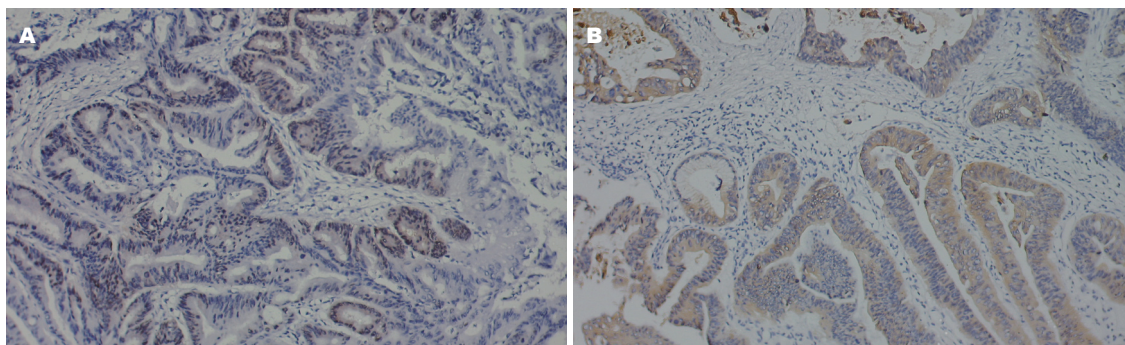


图3 P53和Bcl-2的免疫组织化学检测结果($\times 200$, +++). A: P53在胰腺癌组织表达; B: Bcl-2在胰腺癌组织表达.

例PUMA阳性表达胰腺癌组织中, Bcl-2阳性4例, P53阳性4例, 42例PUMA阴性表达的胰腺癌组织中, Bcl-2阳性21例, P53阳性24例, PUMA与Bcl-2明显相关($\chi^2 = 4.0$, $P = 0.046$), PUMA与P53表达有明显相关性($\chi^2 = 6.173$, $P = 0.013$)(图3, 表3)。

3 讨论

PUMA是P53下游的关键性促凋亡基因, 许多恶性肿瘤存在PUMA表达缺失, 而且PUMA表达缺失在不同肿瘤组织中的意义不尽相同。如PUMA表达缺失与结肠癌远处转移有相关性, 而与其他病理因素无相关性^[9]; 在恶性黑色素瘤

中^[10-11], PUMA表达缺失与淋巴结转移和5年生存率明显相关, 除此之外, PUMA表达缺失还与黑色素瘤大小和分期相关。

本研究显示, PUMA在胰腺癌组织中的阳性表达率明显低于正常胰腺组织, 提示胰腺癌组织中存在PUMA表达缺失。分析PUMA表达与临床病理学指标的关系中发现, PUMA蛋白表达水平与胰腺癌肿块的大小有关: 在 <4 cm的肿瘤组织中, PUMA表达率较高(10/22), 在 ≥ 4 cm的肿瘤组织, PUMA表达较低(8/38)。凋亡检测证实PUMA缺失的肿瘤组织中AI较低, 而PUMA阳性表达的肿瘤组织中AI较高。由于PUMA具有凋亡促进作用, PUMA表达高者加快细胞凋

表 2 PUMA表达与胰腺癌临床病理特征的关系

分期	分类	n	阳性率 (n/n)	P
肿瘤直径	< 4cm	22	10/22	0.047
	≥4cm	38	8/38	
分化程度	高	30	9/30	0.720
	中	13	5/13	
	低	17	4/17	
分期	I	13	4/13	0.373
	II	12	6/12	
	III + IV	35	8/35	
淋巴结转移	有	32	3/32	0.045
	无	28	15/28	
远处转移	有	20	2/20	0.017
	无	40	16/40	

表 3 PUMA和P53和Bcl-2表达的相关性分析

PUMA	n	P53		Bcl-2	
		≤10%	>10%	≤10%	>10%
≤10%	42	18	24	21	21
>10%	18	14	4	14	4

亡, PUMA表达缺失者细胞凋亡减慢^[8-9], 因此, PUMA表达缺失所导致的细胞凋亡能力的下降可能是胰腺癌肿瘤生长和肿块大小不同的原因之一。

PUMA可以通过P53依赖性途径以及P53非依赖性两条途径促进细胞凋亡^[14-17]。在本实验中, PUMA表达缺失肿瘤组织存在高频率P53突变, 而在PUMA表达阳性肿瘤组织存在低频率P53突变, PUMA和P53表达明显负相关, 说明PUMA在胰腺癌内是依赖内源性P53途径发挥作用。P53变异后丧失了对PUMA的正向调节作用, 致使PUMA表达缺失。Bcl-2是PUMA下游的凋亡抑制基因, 当PUMA基因诱导表达后, PUMA可以与Bcl-2/bcl-xL结合, 中和Bcl-2/bcl-xL的凋亡抑制活动^[18-19]。本研究发现, 胰腺癌中PUMA和Bcl-2表达有明显负相关关系, 所以胰腺癌中PUMA表达缺失后, 对Bcl-2/与Bcl-XL的中和作用减弱或消失, 从而使Bcl-2抑凋亡效用加强。本实验表明, 胰腺癌组织中PUMA的凋亡调节作用可能是P53-PUMA-Bcl-2途径。

分析PUMA表达与临床病理学指标的关系中发现: PUMA表达水平与淋巴结转移和远处转移有明显相关性, 在淋巴结和远处转移组织中存在PUMA表达缺失, 在非转移组织存在高水平

的PUMA表达。Gansauge *et al*^[20]和Tomaszewska *et al*^[21]报道, P53突变和Bcl-2高表达与胰腺癌的淋巴结转移和远处转移明显相关, 在高转移性胰腺癌中存在高频率P53突变和Bcl-2表达。本实验证实了P53和Bcl-2与PUMA表达有明显的负相关, 而PUMA既受P53调节又调节下游的Bcl-2, 因而, PUMA是否直接参与胰腺癌的转移过程有待于进一步研究。

我们的研究还发现, PUMA在不同分期和不同分化肿瘤组织的阳性表达率差异分别无统计学意义($P>0.05$), 说明PUMA与肿瘤分化程度和分期无明显相关。我们收集的资料由于失访及其他原因亦未进行生存分析。

Ad-P53是胰腺癌治疗的有效基因, 但P53对于来不同源甚至同种来源的肿瘤细胞对P53的易感性不一致, 使得P53进入细胞受到阻碍, 因此P53并不是对所有肿瘤有效, 对来源相同的肿瘤细胞的治疗效果也不相同^[22-25]。

本研究发现, PUMA表达缺失与肿瘤生长和转移有关, 因此转染外源性PUMA基因对促进细胞凋亡及抑制肿瘤转移可能有重要作用, 也为外源导入P53诱导凋亡效果不好的肿瘤提供了新的可能治疗靶点。但要使其成为可能, 一方面需要明确PUMA的作用通路, 阐明他与其他相关基因相互作用的机制; 另一方面需要寻找到能导致PUMA激活的DNA元件、转录因子及其他无毒性的小分子物质, 这样就可以利用这些物质激活PUMA在肿瘤细胞内强表达, 达到治疗的目的。

4 参考文献

- Welsch T, Kleeff J, Friess H. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer: advances and challenges. *Curr Mol Med* 2007; 7: 504-521
- Adrian TE. Inhibition of pancreatic cancer cell growth. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2512-2521
- Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 981-1011
- Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003; 2: 6
- Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 2001; 7: 673-682
- Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7: 683-694
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 2005; 309: 1732-1735
- Hemann MT, Zilfou JT, Zhao Z, Burgess

■应用要点

本研究为胰腺癌基因治疗提供了新的靶点, 同时为外源导入P53诱导凋亡效果不好的肿瘤提供了新的可能治疗靶点。

■同行评价

本文选题较新颖, 学术价值较好, 研究方法科学, 数据客观, 结论明确, 有较好的学术价值.

- DJ, Hannon GJ, Lowe SW. Suppression of tumorigenesis by the p53 target PUMA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9333-9338
- 9 Jansson A, Arbmán G, Sun XF. mRNA and protein expression of PUMA in sporadic colorectal cancer. *Oncol Rep* 2004; 12: 1245-1249
- 10 Karst AM, Dai DL, Martinka M, Li G. PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene* 2005; 24: 1111-1116
- 11 Karst AM, Dai DL, Cheng JQ, Li G. Role of p53 up-regulated modulator of apoptosis and phosphorylated Akt in melanoma cell growth, apoptosis, and patient survival. *Cancer Res* 2006; 66: 9221-9226
- 12 Gu J, Zhang L, Swisher SG, Liu J, Roth JA, Fang B. Induction of p53-regulated genes in lung cancer cells: implications of the mechanism for adenoviral p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2004; 23: 1300-1307
- 13 Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKinnon PJ, Cleveland JL, Zambetti GP. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 2003; 4: 321-328
- 14 Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins PUMA and noxa. *Science* 2003; 302: 1036-1038
- 15 Callus BA, Ekert PG, Heraud JE, Jabbour AM, Kotevski A, Vince JE, Silke J, Vaux DL. Cytoplasmic p53 is not required for PUMA-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2008; 15: 213-215; author reply 215-216
- 16 You X, Boyle DL, Hammaker D, Firestein GS. PUMA-mediated apoptosis in fibroblast-like synoviocytes does not require p53. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R157
- 17 Ito H, Kanzawa T, Miyoshi T, Hirohata S, Kyo S, Iwamaru A, Aoki H, Kondo Y, Kondo S. Therapeutic efficacy of PUMA for malignant glioma cells regardless of p53 status. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 685-698
- 18 Luo X, He Q, Huang Y, Sheikh MS. Transcriptional upregulation of PUMA modulates endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis via Bax activation. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1310-1318
- 19 Liu FT, Newland AC, Jia L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 956-962
- 20 Gansauge F, Gansauge S, Schmidt E, Müller J, Beger HG. Prognostic significance of molecular alterations in human pancreatic carcinoma--an immunohistological study. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383: 152-155
- 21 Tomaszewska R, Karcz D, Stachura J. An immunohistochemical study of the expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 1999; 26: 163-171
- 22 Liu Q, El-Deiry WS, Gazitt Y. Additive effect of Apo2L/TRAIL and Adeno-p53 in the induction of apoptosis in myeloma cell lines. *Exp Hematol* 2001; 29: 962-970
- 23 Schuler M, Herrmann R, De Greve JL, Stewart AK, Gatzemeier U, Stewart DJ, Laufman L, Gralla R, Kuball J, Buhl R, Heussel CP, Kommos F, Perruchoud AP, Shepherd FA, Fritz MA, Horowitz JA, Huber C, Rochlitz C. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: results of a multicenter phase II study. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1750-1758
- 24 Jenks S. Gene therapy death--"everyone has to share in the guilt". *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 98-100
- 25 Zeimet AG, Marth C. Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer? *Lancet Oncol* 2003; 4: 415-422

编辑 师忠芳 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.

黏膜下层胃癌的淋巴结转移规律与缩小手术

王世贺, 王振宁, 徐惠绵

王世贺, 王振宁, 徐惠绵, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室胃肠肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001

王世贺, 硕士, 主要从事胃肠肿瘤的临床研究。

教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目, No. NCET-06-0296

辽宁省高等学校优秀人才支持计划资助项目, No. RC-05-02

作者贡献分布: 王世贺与王振宁对此文所作贡献均等; 王世贺综述; 王振宁与徐惠绵立题; 王振宁审校。

通讯作者: 王振宁, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室胃肠肿瘤外科。josieon826@yahoo.com.cn
电话: 024-83283555

收稿日期: 2007-05-16 修回日期: 2008-01-23

Lymph node metastasis in submucosal gastric cancer and reduction surgery

Shi-He Wang, Zhen-Ning Wang, Hui-Mian Xu

Shi-He Wang, Zhen-Ning Wang, Hui-Mian Xu, Department of Surgical Oncology and Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the Program for New Century Excellent Talents in University, No. NCET-06-0296; the Program for Liaoning Excellent Talents in University, No. RC-05-02

Correspondence to: Dr. Zhen-Ning Wang, Department of Surgical Oncology and Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, 92 Beierna Road, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. josieon826@yahoo.com.cn

Received: 2007-05-16 Revised: 2008-01-23

Abstract

Although the concept of early gastric cancer (EGC) has been accepted, lymph node metastasis is the most important prognostic factor for EGC. Submucosal gastric cancer is greatly concerned because of its high lymph node metastasis incidence accounting for about 20% of all lymph node metastases. Many researchers suggest that reduction surgery should be performed for submucosal gastric cancer patients at a lower risk of developing lymph node metastasis. Submucosal gastric cancer can be divided into 3 levels (Sm1, Sm2, Sm3) based on its depth of invasion, which has been proven useful for predicting lymph node metastasis, directing treatment and evaluating prognosis. Recently, with the advances in clinical pathology and molecular biology, the risk factor for lymph

node metastasis of submucosal gastric cancer can be accurately evaluated and its treatment has become rather rational. This paper reviews the relative factors for lymph node metastasis of submucosal gastric cancer and advances in its rational surgical treatment.

Key Words: Early gastric cancer; Submucosal gastric cancer; Lymph node metastasis; Reduction surgery

Wang SH, Wang ZN, Xu HM. Lymph node metastasis in submucosal gastric cancer and reduction surgery. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 493-497

摘要

虽然早期胃癌(early gastric cancer, EGC)的概念已经得到认同, 但有无淋巴结转移仍是影响预后的首要因素。其中黏膜下癌(Sm)具有相对较高的淋巴结转移率而备受关注。Sm癌中淋巴结转移的病例约占20%, 很多学者希望可以选出淋巴结转移风险小的Sm癌病例予以缩小手术治疗。Sm癌依浸润深度可分为Sm1、Sm2、Sm3, 研究证明这种分型法对评估有无淋巴结转移, 指导治疗, 评估预后颇有价值。近年来, 随着对EGC淋巴结转移相关规律的认识和进展, 结合临床病理学和分子生物学淋巴结转移相关因素, 更加准确地评估淋巴结转移风险, Sm癌的治疗也趋向合理化。本文综述了目前Sm癌的淋巴结转移相关因素及外科合理化治疗的研究进展。

关键词: 早期胃癌; 黏膜下癌; 淋巴结转移; 缩小手术

王世贺, 王振宁, 徐惠绵. 黏膜下层胃癌的淋巴结转移规律与缩小手术. *世界华人消化杂志* 2008; 16(5): 493-497

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/493.asp>

0 引言

早期胃癌(early gastric cancer, EGC)是指癌细胞局限于黏膜层及黏膜下层, 无论肿瘤大小及有无淋巴结转移。EGC术后5年、10年生存率分别达到95%和85%左右, 其中淋巴结转移

■背景资料

虽然早期胃癌(EGC)的概念已经得到认同, 但有无淋巴结转移仍是影响预后的首要因素, 其中黏膜下癌(Sm)具有相对较高的淋巴结转移率而备受关注。

■同行评议者

孙学英, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

■ 研发前沿

确定Sm癌的淋巴结高转移风险人群,制定个体化治疗方案是Sm癌治疗中亟待解决的问题。

阴性者5年生存率显著优于淋巴结转移阳性病例^[1-2]。因此,尽管目前EGC的概念已得到认同,但有无淋巴结转移仍是影响EGC预后的首要因素^[1-3]。癌细胞浸润最深处局限于黏膜下层,未突破基底膜的早期胃癌称为黏膜下癌(Sm)^[3]。Sm癌据浸润深度被进一步细分为Sm1(上1/3), Sm2(中1/3), Sm3(下1/3)^[4]。文献报道黏膜内癌的淋巴结转移率为0%-3%,而Sm癌达到17.6%-21.0%^[2,5-7]。因此,寻找Sm癌的淋巴结转移规律,确定高转移风险人群,制定个体化治疗方案,具有重要的临床意义。研究显示与淋巴结转移可能相关的病理学因素包括:浸润深度、癌灶的直径、血管和淋巴管的浸润等^[2-3,5]。除此以外,在早期胃癌分子水平的研究提示,某些基因的突变失活,表达异常等与EGC的生物学行为及预后亦相关,如血管内皮生长因子(VEGF), E-钙黏蛋白等。因此,从临床病理学和分子生物学两个层面来描述EGC,尤其是Sm癌,可能有助于准确地预测淋巴结转移。

1 病理学因素与Sm癌的淋巴结转移

1.1 浸润深度 肿瘤浸润黏膜下层的深度与淋巴结转移的关系目前已被较多学者接受,但仍缺少一个较为公认的临界值,多数研究提示浸润黏膜下层深度<500 μm (即Sm1)的淋巴结转移率极低^[3-4,7-9]。Kurihara *et al*^[3]在一项对Sm癌淋巴结转移规律的研究中将黏膜下层均分为三层(Sm1, Sm2, Sm3),其淋巴结转移率分别为2%, 12%, 20%,其中直径<2 cm的Sm1无淋巴结转移,提示此类患者外科治疗可考虑缩小手术。另有研究结果亦支持在无淋巴管和血管浸润时,Sm1癌无淋巴结转移^[10]。在将Sm癌浸润黏膜下层深度数字化分级的研究中发现随着癌浸润黏膜下层深度的增加,淋巴结转移程度亦随着增加。Park *et al*^[4]报道浸润黏膜下层深度为500-2000 μm 和>2000 μm 的Sm癌淋巴结率分别为19%, 33%。而Yasuda *et al*^[11]将黏膜下层分为<300 μm , 300-1000 μm 和>1000 μm 三个层次,浸润黏膜下层深度为300-1000 μm 和>1000 μm 的Sm癌的淋巴结转移率分别为19%和14%(在该项研究中Sm3癌的转移率虽然小于Sm2癌,但其中4例患者发现胃周淋巴结以外的淋巴结转移)。目前每项研究提出的浸润黏膜下层深度临界值仍有所区别, Park *et al*^[4]将临界值设定为500 μm , Yasuda *et al*^[11]为300 μm , Shimada *et al*^[12]和Kashimura *et al*^[13]为200 μm 。因此,未来大样本多中心的研究将有利于Sm

癌的合理分级。

1.2 肿瘤直径 研究表明肿瘤的直径与淋巴结转移亦有关^[2-7],直径<2 cm的Sm癌淋巴结转移明显减少^[4,14],其中隆起型病变无淋巴结转移^[15]。浅表广泛型EGC(SSC)是一种特殊类型,被定义为肿瘤浸润黏膜层或黏膜下层且直径 ≥ 5 cm^[16],多数为Sm癌,其淋巴结转移率可达30%以上^[17-18],常伴有较高的淋巴管和静脉的癌栓发生率^[16]。

1.3 联合肿瘤浸润深度和直径 联合癌灶直径与浸润深度两个病理学指标评估淋巴结转移风险是研究的热点之一。研究提示Sm癌,浸润黏膜下层深度<500 μm 且直径<15 mm者无淋巴结转移^[9], Gotoda *et al*^[7]进一步扩展发现肿瘤直径<30 mm,浸润黏膜下层深度<500 μm 的分化型腺癌,且无淋巴管和静脉受侵者无淋巴结转移。Park *et al*^[4]则称浸润深度<500 μm ,直径<4 cm的Sm癌亦无淋巴结转移;而癌直径<2 cm时,只有浸润深度超过2000 μm 的病例才有淋巴结转移。可见肿瘤直径小于2 cm或浸润黏膜下层深度小于500 μm (Sm1)时淋巴结转移明显减少,联合二者预估Sm癌的淋巴结转移状况很有意义。

1.4 淋巴管及血管浸润 淋巴管及血管浸润是独立的淋巴结转移危险因素^[3,5,10]。淋巴管及血管浸润阳性的EGC中淋巴结转移率达到36.6%-39%^[7,19],其中,伴有淋巴管浸润的Sm癌淋巴结转移率更是达到58.9%^[8],而淋巴结转移阳性的Sm癌伴淋巴管浸润的占65%^[20]。

1.5 组织学分型 研究发现分化型Sm癌淋巴结转移率约为3.2%,而未分化型达到20.9%^[6],未分化型EGC较分化型更容易发生淋巴结转移^[5-7,14]。印戒细胞癌可能是一种特殊类型的早期癌,虽然分化程度较差,但淋巴结转移率偏低^[21],在相同淋巴结转移程度时预后反而较好^[22]。

2 分子生物学标志物与Sm癌的淋巴结转移

某些基因的突变失活(金属蛋白酶家族, E-钙黏蛋白家族, 以及p53基因等),表达异常等与EGC的生物学行为及预后亦相关,但在Sm癌中与淋巴结转移关系较为明确的有以下几种。

2.1 VEGF 在VEGF家族中VEGF-C与EGC的淋巴结转移有关^[23-25]。Onogawa *et al*^[23]报道Sm癌的VEGF-C的阳性表达率为22.9%,与淋巴结转移和淋巴管受侵相关。淋巴管受侵的EGC中VEGF-C阳性表达率为36%明显高于对照组(14%)^[24]。关于VEGF-D是否与淋巴结转移有关

仍存有争议. 部分研究结果称在EGC中VEGF-D的阳性表达与淋巴结转移等病理学因素无显著相关性^[24], 另有部分研究结果提示未分化型的EGC中VEGF-D阳性表达可能与淋巴结转移相关^[25].

2.2 E-钙黏蛋白和连环蛋白 E-钙黏蛋白、连环蛋白及其相互结合形成的复合物在细胞间粘附中起着重要作用. E-钙黏蛋白是钙黏蛋白家族中的一个成员. 研究发现在EGC中E-钙黏蛋白的低表达与淋巴结微转移关系密切^[26-27]. Nakajo *et al*^[28]报道在pN0患者中1.5%的淋巴结存在微转移, 而且几乎所有微转移病例均有E-钙黏蛋白表达异常或缺失. 这些提示E-钙黏蛋白在EGC的淋巴结转移过程中可能发挥重要作用. 连环蛋白是一种细胞骨架蛋白, 包括 α 、 β 、 γ 三种亚型, 这三种亚型与淋巴结转移的关系亦有争议. Joo *et al*^[29]报道仅 α 亚型表达异常与淋巴结转移有关, 而Tanaka *et al*^[30]称 β 亚型表达缺失与淋巴结转移关系密切. 对于E-钙黏蛋白/连环蛋白复合物, 目前研究认为其表达异常多出现在弥漫型胃癌^[29], 而与淋巴结转移的关系仍有待进一步研究证实.

总之, Sm癌淋巴结转移的危险因素可概括为: (1)癌浸润黏膜下层深度 $>500\ \mu\text{m}$ (即Sm2, Sm3), 直径 $\geq 2\ \text{cm}$, 伴有淋巴管及血管的浸润, 组织学分化程度较差者; (2)VEGF表达异常、E-钙黏蛋白表达异常者, 其他转移相关分子有待进一步研究鉴定.

3 Sm癌的治疗原则

Sm癌中无淋巴结转移的病例约占80%, 所以依据肿瘤的病理生物学行为筛选无淋巴结转移的Sm癌病例群予以微创治疗, 可以防止过度治疗, 而不影响预后^[4,31]. 目前, 新技术不断地应用于胃癌的治疗中, 包括EMR, ESD和腹腔镜技术等, 可明显减少传统胃癌的手术造成的创伤, 术后的生活质量得到了显著提高. 这些治疗方法已得到广泛推广, 但在Sm癌的治疗中的应用尚存争议.

3.1 Sm1癌的缩小手术治疗 此种EGC淋巴结转移少见, 其中直径 $\leq 20\ \text{mm}$ 者几乎没有淋巴结转移, 且ESD的整块切除率较高, 可行ESD治疗. 据日本的一项多中心研究结果显示, 与EMR相比, ESD降低了局部复发率, 并提高整块切除率, 随访3年的无复发率及生存率分别为94.4%和99.2%^[32]. Onozato *et al*^[33]报道直径 $>21\ \text{mm}$ 的病

例ESD的整块切除率达93.2%, 若不合并其他淋巴结转移相关因素, Sm1癌可行ESD治疗.

3.2 Sm2、Sm3癌的治疗 Sm2、Sm3癌的淋巴结转移率达19%-33%^[4], 因此ESD治疗的根治率明显下降, 建议行腹腔镜胃癌根治术. 他与传统胃癌手术相比, 在手术时间、并发症的发生率及5年生存率等方面均无明显差别, 而手术失血量、住院时间、术后镇痛时间均有减少^[34]. 近年来应用前哨淋巴结(SN)技术引导的腹腔镜胃癌手术, Tonouchi *et al*^[35]对17名早期癌患者进行了初步研究发现, 术中所有患者都找到了SN, 术后被证明有淋巴结转移的3名患者术中亦判断SN转移阳性.

3.3 特殊类型Sm癌的治疗 以下两种Sm癌应行传统的开腹胃癌根治手术: (1)SSC型Sm癌, 常合并其他淋巴结转移相关因素, 淋巴结转移率较高, 而且胃切除范围应充分^[16], (2)多发癌累及胃的几个部位.

4 结论

近年来对早期胃癌的诊断和治疗技术及分子生物学上都有了新的进展, 内镜活检, 超声内镜, PCR, 免疫组织化学等先进的检测手段使EGC的cTNM分期更加准确. 先进的治疗技术, 如ESD和腹腔镜技术等, 使Sm癌的缩小手术治疗成为可能. 因此, 为每一位Sm癌患者选择最适宜的个体化治疗方案是我们的目标, 进一步寻找明确的Sm癌的淋巴结转移规律意义重大.

5 参考文献

- 1 Kikuchi S, Katada N, Sakuramoto S, Kobayashi N, Shima H, Watanabe M, Hiki Y. Survival after surgical treatment of early gastric cancer: surgical techniques and long-term survival. *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389: 69-74
- 2 Kitamura K, Yamaguchi T, Taniguchi H, Hagiwara A, Sawai K, Takahashi T. Analysis of lymph node metastasis in early gastric cancer: rationale of limited surgery. *J Surg Oncol* 1997; 64: 42-47
- 3 Kurihara N, Kubota T, Otani Y, Ohgami M, Kumai K, Sugiura H, Kitajima M. Lymph node metastasis of early gastric cancer with submucosal invasion. *Br J Surg* 1998; 85: 835-839
- 4 Park DJ, Lee HK, Lee HJ, Lee HS, Kim WH, Yang HK, Lee KU, Choe KJ. Lymph node metastasis in early gastric cancer with submucosal invasion: feasibility of minimally invasive surgery. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3549-3552
- 5 Hyung WJ, Cheong JH, Kim J, Chen J, Choi SH, Noh SH. Application of minimally invasive treatment for early gastric cancer. *J Surg Oncol* 2004; 85: 181-185; discussion 186
- 6 Seto Y, Shimoyama S, Kitayama J, Mafune K,

■创新盘点

本文综合分析目前对Sm癌淋巴结转移规律及缩小手术的研究成果, 总结Sm癌淋巴结转移及缩小手术的研究现状.

■应用要点

本文综述了目前Sm癌的淋巴结转移相关因素及外科合理化治疗的研究进展,为临床医生提供了诊治依据。

- 7 Gotoda T, Yanagisawa A, Sasako M, Ono H, Nakanishi Y, Shimoda T, Kato Y. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer* 2000; 3: 219-225
- 8 Abe N, Sugiyama M, Masaki T, Ueki H, Yanagida O, Mori T, Watanabe T, Atomi Y. Predictive factors for lymph node metastasis of differentiated submucosally invasive gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 242-245
- 9 Yamada H, Nihei Z, Yamashita T, Shiota Y, Ichikawa W, Sugihara K. Is lymphadenectomy needed for all submucosal gastric cancers? *Eur J Surg* 2001; 167: 199-203
- 10 Nakahara K, Tsuruta O, Tateishi H, Arima N, Takeda J, Toyonaga A, Sata M. Extended indication criteria for endoscopic mucosal resection of early gastric cancer with special reference to lymph node metastasis--examination by multivariate analysis. *Kurume Med J* 2004; 51: 9-14
- 11 Yasuda K, Shiraishi N, Suematsu T, Yamaguchi K, Adachi Y, Kitano S. Rate of detection of lymph node metastasis is correlated with the depth of submucosal invasion in early stage gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 2119-2123
- 12 Shimada S, Yagi Y, Shiomi K, Honmyo U, Hayashi N, Matsuo A, Marutsuka T, Ogawa M. Characterization of early gastric cancer and proposal of the optimal therapeutic strategy. *Surgery* 2001; 129: 714-719
- 13 Kashimura H, Ajioka Y, Watanabe H, Nishikura K, Iiri T, Asakura H. Risk factors for nodal micrometastasis of submucosal gastric carcinoma: assessment of indications for endoscopic treatment. *Gastric Cancer* 1999; 2: 33-39
- 14 Kim DY, Joo JK, Ryu SY, Kim YJ, Kim SK. Factors related to lymph node metastasis and surgical strategy used to treat early gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 737-740
- 15 Takeno S, Noguchi T, Kikuchi R, Sato T, Uchida Y, Yokoyama S. Analysis of early (pT1) gastric cancer with submucosal invasion: surgical management and possibility to schedule less invasive surgery. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 605-610
- 16 Yasuda K, Inomata M, Fujii K, Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S. Superficially spreading cancer of the stomach. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 192-196
- 17 Ichinoe M, Mitomi H, Kikuchi S, Tanabe S, Akino F, Okayasu I. Mucosal high apoptotic activity and low p21WAF1/CIP1 expression and submucosal low proliferative activity in superficially spreading early gastric cancers: comparison with the penetrating growth type. *Pathol Int* 2003; 53: 81-89
- 18 Imai M, Kondo Y, Osawa S, Nishida Y, Okada K, Ishizu H, Masuko H, Hata T, Uemura K, Kina M, Honda S, Ishiyama G, Takahashi T, Hino A. Clinicopathological characteristics of superficial spreading type early gastric cancer. *J Surg Oncol* 2003; 83: 94-98
- 19 Nasu J, Nishina T, Hirasaki S, Moriwaki T, Hyodo I, Kurita A, Nishimura R. Predictive factors of lymph node metastasis in patients with undifferentiated early gastric cancers. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 412-415
- 20 Shimoyama S, Yasuda H, Mafune K, Kaminishi M. Indications of a minimized scope of lymphadenectomy for submucosal gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 625-631
- 21 Hyung WJ, Noh SH, Lee JH, Huh JJ, Lah KH, Choi SH, Min JS. Early gastric carcinoma with signet ring cell histology. *Cancer* 2002; 94: 78-83
- 22 Kunisaki C, Shimada H, Nomura M, Matsuda G, Otsuka Y, Akiyama H. Therapeutic strategy for signet ring cell carcinoma of the stomach. *Br J Surg* 2004; 91: 1319-1324
- 23 Onogawa S, Kitadai Y, Amioka T, Kodama M, Cho S, Kuroda T, Ochiumi T, Kimura S, Kuwai T, Tanaka S, Chayama K. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in early gastric carcinoma: correlation with clinicopathological parameters. *Cancer Lett* 2005; 226: 85-90
- 24 Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Sugimachi K. Overexpression of vascular endothelial growth factor C is related to lymphogenous metastasis in early gastric carcinoma. *Oncology* 2001; 60: 146-150
- 25 Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 21-27
- 26 Pan W, Ishii H, Ebihara Y, Gobe G. Prognostic use of growth characteristics of early gastric cancer and expression patterns of apoptotic, cell proliferation, and cell adhesion proteins. *J Surg Oncol* 2003; 82: 104-110
- 27 Cai J, Ikeguchi M, Tsujitani S, Maeta M, Liu J, Kaibara N. Significant correlation between micrometastasis in the lymph nodes and reduced expression of E-cadherin in early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2001; 4: 66-74
- 28 Nakajo A, Natsugoe S, Ishigami S, Matsumoto M, Nakashima S, Hokita S, Baba M, Takao S, Aikou T. Detection and prediction of micrometastasis in the lymph nodes of patients with pN0 gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 158-162
- 29 Joo YE, Rew JS, Choi SK, Bom HS, Park CS, Kim SJ. Expression of e-cadherin and catenins in early gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 35-42
- 30 Tanaka M, Kitajima Y, Edakuni G, Sato S, Miyazaki K. Abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin may be a molecular marker of submucosal invasion and lymph node metastasis in early gastric cancer. *Br J Surg* 2002; 89: 236-244
- 31 Yuasa N, Nimura Y. Survival after surgical treatment of early gastric cancer, surgical techniques, and long-term survival. *Langenbecks Arch Surg* 2005; 390: 286-293
- 32 Oda I, Saito D, Tada M, Iishi H, Tanabe S, Oyama T, Doi T, Otani Y, Fujisaki J, Ajioka Y, Hamada T, Inoue H, Gotoda T, Yoshida S. A multicenter retrospective study of endoscopic resection for early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006; 9:

- 262-270
- 33 Onozato Y, Ishihara H, Iizuka H, Sohara N, Kakizaki S, Okamura S, Mori M. Endoscopic submucosal dissection for early gastric cancers and large flat adenomas. *Endoscopy* 2006; 38: 980-986
- 34 Mochiki E, Kamiyama Y, Aihara R, Nakabayashi T, Asao T, Kuwano H. Laparoscopic assisted distal gastrectomy for early gastric cancer: Five years' experience. *Surgery* 2005; 137: 317-322
- 35 Tonouchi H, Mohri Y, Tanaka K, Konishi N, Ohmori Y, Kobayashi M, Watanabe Y, Matsumura K, Takeda K, Kusunoki M. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy during laparoscopic gastrectomy for early cancer. *Dig Surg* 2003; 20: 421-427

■同行评价

本文选题新颖, 但文献量略显不足, 治疗原则缺乏深度了解。

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)。

斑蝥素及其衍生物治疗乙型肝炎及消化系统肿瘤的研究进展

崔东来, 陈卫, 姚希贤

■背景资料

斑蝥为芫青科昆虫, 味辛、热, 有大毒, 在我国已经应用两千多年, 斑蝥的有效成分为斑蝥素。斑蝥素类药物有刺激骨髓的作用, 促进骨髓干细胞向粒-单系祖细胞分化。去甲基斑蝥素是国内第一个有升高白细胞作用的抗癌药物, 其独特的抗癌和升高白细胞作用备受推崇, 其抗癌机制可能与抑制癌因蛋白的表达、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制NF- κ B活性和干扰肿瘤细胞分裂有关。

■同行评议者

向德兵, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心

崔东来, 姚希贤, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄 050000

陈卫, 河北体育学院医院 河北省石家庄 050041

作者贡献分布: 崔东来、陈卫对此文所作贡献均等; 此课题由崔东来、陈卫设计; 研究过程由崔东来、陈卫操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由崔东来、姚希贤提供; 数据分析由崔东来、陈卫完成; 本论文写作由崔东来、陈卫及姚希贤完成。

通讯作者: 崔东来, 050000, 河北省石家庄, 河北医科大学第二医院消化内科。liver369@126.com

电话: 0311-6220127

收稿日期: 2007-09-30 修回日期: 2008-01-15

Progress in the treatment of hepatitis B and digestive tumors with cantharidin and its analogues

Dong-Lai Cui, Wei Chen, Xi-Xian Yao

Dong-Lai Cui, Xi-Xian Yao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Wei Chen, Hospital of Hebei Institute of Physical Education, Shijiazhuang 050041, Hebei Province, China

Correspondence to: Dong-Lai Cui, Department of Gastroenterology, the Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. liver369@126.com

Received: 2007-09-30 Revised: 2008-01-15

Abstract

Blister beetle or mylabris, pungent in flavor and toxic in nature, has been used for more than 2000 years as traditional Chinese medicine in China. Cantharidin, an active ingredient of the blister beetle, is an effective therapeutic agent against cancers of the liver, breast, esophagus, lung and intestine, etc. However, it is very toxic. Nocantharidin (NCTD), a derivative of cantharidin first synthesized in China, is a new anti-tumor drug with strong anti-tumor activities and increases the number of white blood cells. Cantharidin can be used in the treatment of hepatitis B and pointed condyloma. This paper reviews the progress in its clinical applications at home and abroad.

Key Words: Cantharidin; Treatment; Hepatitis B; Tumor

Cui DL, Chen W, Yao XX. Progress in the treatment of hepatitis B and digestive tumors with cantharidin and its analogues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 498-502

摘要

斑蝥为芫青科昆虫, 南方大斑蝥或黄黑小斑蝥的干燥虫体, 味辛、热, 有大毒, 在我国已经应用两千多年。斑蝥的有效成分为斑蝥素 (cantharidin), 对肝癌、乳腺癌、食道癌、肺癌、贲门癌和肠癌治疗有效, 但毒性较大。去甲基斑蝥素 (nocantharidin, NCTD) 为斑蝥素的衍生物, 是我国首先合成的具有较强抗肿瘤活性和独特升高白细胞作用的新型抗肿瘤药物。斑蝥有较强的抗病毒作用, 治疗慢性乙型肝炎、尖锐湿疣取得一定疗效, 现将其在国内外的临床应用进展作一综述。

关键词: 斑蝥素; 治疗; 乙型肝炎; 肿瘤

崔东来, 陈卫, 姚希贤。斑蝥素及其衍生物治疗乙型肝炎及消化系统肿瘤的研究进展。世界华人消化杂志 2008; 16(5): 498-502

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/498.asp>

0 引言

斑蝥素及其衍生物具有较强抗肿瘤活性和独特的升高白细胞作用, 广泛用于消化系统肿瘤的治疗。此外, 其还具有较强的抗病毒作用, 是治疗慢性乙型肝炎较有潜力的药物, 值得深入研究。

1 抗病毒作用

斑蝥素具有较强的抗RNA、DNA病毒作用, 内服治疗乙型肝炎, 外涂治疗尖锐湿疣, 均取得较好疗效。抗病毒治疗是治疗慢性乙型肝炎的最关键、最重要的手段^[1]。常用抗病毒药物贺普丁虽能有效抑制乙肝病毒复制, 实现转氨酶的正常化, DNA保持阴性, 但必须长期用药, 而长期用药带来病毒YMDD变异, 产生耐药性^[2-4]。研究表明斑蝥制剂有良好的抗病毒作用, 甲基斑蝥素对2.2.15细胞株分泌的HBsAg和HBeAg具有抑制作用, 并有一定抗HBV病毒作用, 为临床应用甲基斑蝥胺抗乙型肝炎抗病毒治疗提供理论依据^[4-6]。临床研究表明斑蝥及其制剂对慢性肝炎具有良好作用^[7]。采用去甲基斑蝥素 (nocantharidin, NCTD) 对44例肝炎及肝硬化患者 (其中慢性活动性肝炎39例) 进行第一期疗效观察。2 mo可见80%患者临床症状改善, ALT和

球蛋白等肝功能检查明显好转. 7例黄疸患者治疗1-3 mo完全消退. 对13例患者测定淋巴细胞转化百分率, 治疗后有11例不同程度的升高. 对10例患者治疗前后作PHA皮内试验, 显示NCTD有提高机体免疫功能的作用. 以随机双盲法, 用NCTD治疗HBsAg携带者80例(治疗及对照各40例), 治疗前半年内两次检查乙型肝炎表面抗原持续阳性, 治疗3 mo HBsAg及HBeAg转阴率依次为12.5%(5/40)及11.7%(2/17); 继续服药6 mo者, 转阴率依次为35%(7/20)及18.2%(2/11), 服药3, 6 mo合计HBsAg转阴率为30%(12/40), HBeAg的转阴率为23.5%(4/17). 周志武应用去甲斑蝥胺治疗慢性乙型肝炎53例, 结果HBsAg转阴13例, HBeAg转阴33例, HBV DNA转阴10例, 表明斑蝥制剂对HBsAg转阴、乙型肝炎病毒抑制有良好作用.

尖锐湿疣(pointed condyloma)是由人乳头病毒感染引起的性传播疾病之一, 潜伏期为1-3 mo, 好发于外阴部、大小阴唇、阴蒂、肛门周围. 初期为微小散在乳头状疣, 逐渐增大或互相融合形成鸡冠状或菜花样团块, 质地柔软, 表面湿润, 多为粉红、暗红色或污灰色, 也有部分患者发生感染而溃烂. 约30%患者可同时见于阴道壁和宫颈上. 该病治疗方法较多, 多为外治法, 如氟脲嘧啶、争光霉素、竹叶草脂, 亦有用冷冻、电灼及激光破坏疣组织等治疗方法, 但均适宜较小疣体的治疗, 对较大疣体治疗疗效则不显著, 且易复发, 达不到彻底治疗的目的. 斑蝥素是中药斑蝥的提取物, 有抗病毒作用, 具有较强的抗RNA、DNA病毒作用, 外涂治疗尖锐湿疣, 由于乳膏吸收后杀死疣体中病毒, 而使疣体变色、萎缩、脱落, 取得非常理想的效果^[8-12]. 杨柳 *et al*采用斑蝥素溶于脂肪制成的乳膏治疗本病共63例, 全部为下生殖道尖锐湿疣患者, 年龄18-37(平均25.5)岁; 病程7 wk-6 mo; 均为非妊娠期妇女; 性伴侣患同样病症者15例(占23.6%). 63例患者中57例疣体主要分布于小阴唇、会阴体及肛门周围, 占90.48%, 6例分布于大阴唇外侧、阴蒂, 占9.52%, 少数合并阴道下段湿疣. 临床治疗效果: 63例病例中, 疣体较小患者, 多数病例局部涂抹乳膏5次, 疣体就已萎缩、脱落, 继涂2次则可治愈; 较大疣体钳除后, 根部涂抹药物疗效亦很显著, 约5次根部完全萎缩消失, 遗留黏膜充血于停药后2 d即可恢复. 王新华^[8]治疗尖锐湿疣30例, 1疗程治愈率达90%, 有效率达100%, 而且治疗后未见复发. 儿童传染性软疣

是由一种双链DNA痘类病毒引起的皮肤疾病, 主要是经过皮肤-皮肤或接触传染, 临床表现为在四肢、躯干、腋窝、腹股沟部位斑蝥疹半透明、珍珠状的丘疹, 直径约2-8 mm, 中央有凹陷, 传染性强, 治疗困难. 国外文献报道应用斑蝥治疗取得了较好疗效, 约98%患者治疗后传染性软疣消失或好转, 说明斑蝥素具有较强的抗病毒作用^[13-17].

2 抗癌作用

NCTD对肝癌、宫颈癌、食管癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、胆囊癌细胞, 乳腺癌以及胶质瘤等多种肿瘤细胞株的生长有抑制作用^[18-22]. 近来文献报道NCTD体外对白血病细胞株尤其是耐药的K562细胞株抑制作用明显^[23-26]; 动物实验证明, NCTD对S-180、艾氏腹水癌、肝癌(实体癌)及腹水H22肝癌(实体癌)有轻至中度抑制作用, 或可延长荷瘤小鼠的生存期, 说明NCTD具有良好的抗癌作用^[27-29].

2.1 抗癌作用机制 斑蝥素是磷酸化酶1(PP1)和2A(PP2A)的抑制剂^[19-20,30-34]. PP1和PP2A通过磷酸化过程调控多种细胞内信号传导、糖原合成、T细胞活化和细胞增殖过程, 并已经成为抗肿瘤治疗的新靶位^[35-36].

2.1.1 抑制癌基因的表达和诱导凋亡基因表达: 肿瘤的发生、发展与细胞增殖和凋亡的不平衡有关. NCTD既对肿瘤细胞的增殖有抑制作用, 又可诱导肿瘤细胞凋亡, 从而发挥抗癌作用^[21,23,37-45]. Zhang *et al*应用基因芯片技术研究了斑蝥对HL60细胞基因表达图谱影响, 结果发现斑蝥素可促进与DNA复制、修复相关基因和与能量相关基因的表达, 减少癌基因蛋白的表达, 减少癌基因和多耐药基因的表达, 从而具有抑制肿瘤生长及增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性. 研究还表明斑蝥素可促进编码细胞因子及炎症反应因子的基因表达, 部分解释了斑蝥素的升高白细胞的作用机制^[46]. 研究发现斑蝥酸钠体外可诱导肝癌细胞的凋亡, 细胞生长阻断在G₂+M期. NCTD可以诱导人肝癌细胞发生凋亡, 该凋亡过程与癌基因蛋白Bcl-2表达下调相关. 戎煜 *et al*^[43]研究也证实NCTD对人乳腺癌细胞系的凋亡诱导作用与Bcl-2基因的表达有关. 安巍巍 *et al*研究表明, NCTD通过诱导小鼠肺纤维瘤细胞L929细胞凋亡而抑制其生长, 这种作用可能与丝裂原激活的蛋白激酶介导细胞信号转导中JNK、ERK通路激活有关, NCTD诱导人

■ 相关报道

文献报道, 去甲基斑蝥素为斑蝥素的衍生物, 是我国首先合成的具有较强抗肿瘤活性和独特的升高白细胞作用的新型抗肿瘤药物.

■应用要点

斑蝥有较强的抗病毒作用,对2.2.15细胞株分泌的HBsAg和HBeAg具有抑制作用,治疗慢性乙型肝炎对HBsAg转阴、抑制乙型肝炎的病毒复制有一定作用,值得深入研究。

宫颈癌HeLa细胞、白血病细胞凋亡与caspase、MAPK和线粒体途径相关^[39,44,46-49]。

2.1.2 抑制核因子 κ B(NF- κ B): NF- κ B是一组具有启动基因转录功能的重要蛋白质,通过和某些基因上启动子增强子区的固定核苷酸序列结合,而启动癌基因转录。抑制NF- κ B的活性有助于提高TNF、辐射和化疗药物杀伤肿瘤细胞株的能力,其机制与NF- κ B可抑制细胞凋亡、促进癌细胞生长有关。NF- κ B在胞质中与I NF- κ B结合在一起,限制了NF- κ B向核内的移动。实验表明,NCTD在体外有良好的抗肿瘤效应,此效应与增强肿瘤细胞中I NF- κ B的表达,抑制NF- κ B的表达有一定的关系^[50-51]。

2.1.3 干扰肿瘤细胞分裂:细胞周期调控是当前肿瘤研究的热点,几乎所有癌基因/抑癌基因的生物效应最终都归结到细胞周期。癌基因/抑癌基因的变异,导致细胞周期失控,无限增殖(形成克隆群体)肿瘤。在细胞周期调控中G₂/M期是细胞增殖的主要调控点。在G₂期内主要是cyclinb1/p34cdc2复合物呈现功能并直接与细胞成熟进行有丝分裂相关。研究表明斑蝥素对人肺癌A₅₄₉细胞的增殖有抑制作用,可特异性地引起肺癌A₅₄₉细胞周期G₂/M期阻滞,其机制可能是与cyclinb1/p34cdc2活性下降有关^[35,52-53]。

2.2 斑蝥素及其衍生物的临床疗效

2.2.1 原发性肝癌:近年来研究表明,NCTD治疗原发性肝癌无论是从实验研究,还是临床治疗均取得了不错的效果^[28,38,54-58],可使患者食欲增加,腹胀、肝区疼痛减轻或消失,生存期明显延长。国内6所医疗单位用他治疗原发性肝癌244例,其中单纯型占51.6%,硬化型47.5%,治后食欲增加者占46%,腹胀减轻或消失者占24%,肝区疼痛减轻或消失者占39%,甲胎蛋白(AFP)转阴者占8%,有不同程度下降者占27.9%,且下降者的生存期明显延长,肝脏回缩者占37.1%,有效率为58.6%,治愈后的中位生存期为7 mo,平均生存期为11.1 mo,1年生存率为30%,较一般常用化疗药物明显提高。杨敏一 *et al*采用瘤体中心注射甲基斑蝥素法,治疗41例原发性肝癌患者,结果平均生存期11.6 mo,1年生存率34.1%,且2例患者治疗后生存期超过2年,证明NCTD是治疗原发性肝癌的较理想药物。

2.2.2 卵巢癌:是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤,由于患者早期无症状,大多数人就诊时已是晚期,故其预后差、死亡率高。唐龙英 *et al*^[59-61]研究发现,NCTD对卵巢癌3AO和AO细胞株均

有中等杀伤作用,且呈浓度依赖性和时间依赖性,光镜下癌细胞变圆呈悬浮状、结构模糊和立体感差;电镜下则表现为微绒毛消失、细胞脱落和线粒体受损等,提示NCTD可直接杀伤3AO、AO细胞,引起细胞形态及超微结构的改变。将卵巢癌3AO细胞接种于重度联合免疫缺陷型小鼠(SCID鼠,是由C, B-17系小鼠突变而来的,表现为T-B淋巴细胞功能联合缺陷)鼠皮下,观察NCTD对卵巢癌移植瘤的抑瘤效应。结果表明,NCTD无论是腹腔内注射还是瘤内直接注射均有抑瘤效应,且随着治疗时间的延长抑瘤效果增强,提示NCTD治疗卵巢癌可能有效。

2.2.3 胆囊癌:早期诊断困难,胆囊癌手术切除率不高,术后易转移、复发,因而非手术综合治疗显得尤为重要。范跃祖 *et al*^[62-67]研究发现NCTD对人胆囊癌(GBC-SD)细胞的生长、增殖有明显的抑制杀伤作用,随浓度升高或时间延长作用增强,呈剂量/时间效应关系,光镜下NCTD作用后见细胞固缩、胞膜突出、核碎裂和凋亡小体;电镜示细胞微绒毛卷缩、高尔基体和线粒体等细胞器衰退和典型凋亡细胞。通过流式细胞仪检测显示:NCTD作用后GBC-SD细胞的G₂/M期细胞明显增多,S期细胞明显减少,说明NCTD抑制胆囊癌GBC-SD细胞增殖的作用机制可能与干扰细胞的有丝分裂将细胞阻滞于生长周期的G₂/M期,并抑制干扰细胞DNA合成代谢有关。细胞外基质的降解和基底膜的破坏是癌细胞突破正常细胞基底膜在别处形成转移灶的关键步骤。研究发现,NCTD在低浓度下就可促进基质金属蛋白酶组织抑制因子表达,抑制基质金属蛋白酶表达,维持BM和ECM完整性,这可能与抑制人胆囊癌细胞的体外侵袭、运动能力,防止癌细胞转移有关。

3 升高白细胞作用

NCTD不仅对癌细胞有明显抑制作用,而且具有升高白细胞作用^[68],与多数抗癌药物的骨髓抑制的不良反应相比,具有一定的优势^[55,57,69-70]。斑蝥素类药物有刺激骨髓的作用,促进骨髓干细胞向粒-单系祖细胞分化。研究发现,NCTD对人早幼粒白血病HL-60细胞株DNA和蛋白质合成有抑制作用,促进细胞因子和炎症反应因子合成,对骨髓细胞有一定的促进作用^[46]。

4 结论

斑蝥的有效成分斑蝥素及其衍生物对病毒性感染性疾病乙型肝炎、尖锐湿疣有一定疗效。NCTD

是国内第一个有升高白细胞作用的抗癌药物, 其独特的抗癌和升高白细胞作用备受推崇, 其抗癌机制可能与抑制癌基因蛋白的表达、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制NF- κ B活性和干扰肿瘤细胞分裂有关。

5 参考文献

- 姚希贤, 崔东来. 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1645-1649
- Yang ZJ, Tu MZ, Liu J, Wang XL, Jin HZ. Comparison of amplicon-sequencing, pyrosequencing and real-time PCR for detection of YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7192-7196
- Lee CZ, Lee HS, Huang GT, Yang PM, Sheu JC. Detection of YMDD mutation using mutant-specific primers in chronic hepatitis B patients before and after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5301-5305
- 陆德云, 王甦, 赵连三. 影响拉米夫定相关乙肝病毒YMDD变异的因素. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2243-2245
- 周国平, 白敬羽, 于忠兴, 黄育清, 葛其童, 邓为群, 王永忠. 甲基斑蝥胺抗乙型肝炎病毒体外实验研究. 山西医药杂志 1998; 27: 118-120
- Romero MR, Serrano MA, Efferth T, Alvarez M, Marin JJ. Effect of cantharidin, cephalotaxine and homoharringtonine on "in vitro" models of hepatitis B virus (HBV) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) replication. *Planta Med* 2007; 73: 552-558
- 周志武, 钱留青, 黄育清, 殷锦才, 白敬羽. 甲基斑蝥胺治疗慢性乙型肝炎的临床研究. 中西医结合肝病杂志 1995; 5: 3-4
- 王新华. 尤斯洛(斑蝥素)治疗尖锐湿疣30例报道. 中国民康医学杂志 2004; 16: 680-681
- 周彩霞. 斑蝥素软膏治疗女性生殖道尖锐湿疣53例临床观察. 齐齐哈尔医学院学报 2003; 24: 1351
- 刘卫. 斑蝥素乳膏配合激光治疗尖锐湿疣35例临床观察. 湖南中医药导报 2003; 9: 22, 28
- 陈佐龙, 毕焕州, 刘瑛琦. 斑蝥素乳膏外用治疗尖锐湿疣50例. 中医药学报 2002; 30: 28
- 刘卫, 朱敏刚, 顾慰梅. 斑蝥素乳膏治疗尖锐湿疣临床疗效观察. 临床皮肤科杂志 2000; 29: 365
- Ross GL, Orchard DC. Combination topical treatment of molluscum contagiosum with cantharidin and imiquimod 5% in children: a case series of 16 patients. *Australas J Dermatol* 2004; 45: 100-102
- Silverberg NB, Sidbury R, Mancini AJ. Childhood molluscum contagiosum: experience with cantharidin therapy in 300 patients. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 503-507
- Langley JM, Soder CM, Schlievert PM, Murray S. Case report: Molluscum contagiosum. Toxic shock syndrome following cantharidin treatment. *Can Fam Physician* 2003; 49: 887-889
- Epstein E. Cantharidin therapy for molluscum contagiosum in children. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: 638
- Epstein E. Cantharidin treatment of molluscum contagiosum. *Acta Derm Venereol* 1989; 69: 91-92
- Chen YJ, Shieh CJ, Tsai TH, Kuo CD, Ho LT, Liu TY, Liao HF. Inhibitory effect of norcantharidin, a derivative compound from blister beetles, on tumor invasion and metastasis in CT26 colorectal adenocarcinoma cells. *Anticancer Drugs* 2005; 16: 293-299
- Hill TA, Stewart SG, Sauer B, Gilbert J, Ackland SP, Sakoff JA, McCluskey A. Heterocyclic substituted cantharidin and norcantharidin analogues-synthesis, protein phosphatase (1 and 2A) inhibition, and anti-cancer activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17: 3392-3397
- Rauh R, Kahl S, Boechzelt H, Bauer R, Kaina B, Efferth T. Molecular biology of cantharidin in cancer cells. *Chin Med* 2007; 2: 8
- Fan YZ, Fu JY, Zhao ZM, Chen CQ. Inhibitory effect of norcantharidin on the growth of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 72-80
- Cao JH, Xu B, Li M, Wu DZ, Huang W, Cui JR. Effect of norcantharidin's derivative Nd3 on proliferation of human ovarian cancer cell line SKOV3 and its possible mechanisms. *Ai Zheng* 2007; 26: 361-366
- 黄雪强, 凌昌全, 张登海, 俞超芹, 陈哲, 刘岭. 去甲斑蝥素诱导人T淋巴细胞白血病细胞株凋亡. 基础医学与临床 2002; 22: 36-39
- 黄雪强, 凌昌全, 宋田斌, 陈哲, 张登海, 俞超芹, 刘岭. 去甲斑蝥素诱导人T淋巴细胞白血病细胞株凋亡的实验研究. 浙江中医学院学报 2001; 25: 49-52
- 林桂凤, 刘银燕. 去甲斑蝥素诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究. 中国药房 2007; 18: 1266-1267
- Yi SN, Wass J, Vincent P, Iland H. Inhibitory effect of norcantharidin on K562 human myeloid leukemia cells in vitro. *Leuk Res* 1991; 15: 883-886
- 赵聚山, 陈璇. 去甲斑蝥素对体外两种肿瘤细胞生长的影响. 辽宁中医杂志 2004; 31: 157-158
- 李琦, 范忠泽, 孙珏, 李先茜, 刘晓华, 顾伟, Paul Heng, 盛霞, 高虹. 去甲斑蝥素微球介入治疗对大鼠肝癌细胞凋亡和细胞增殖相关基因表达影响的研究. 肿瘤 2006; 26: 708-712
- 朱立峰, 顾伟, 沈婕, 张亚妮, 李柏. 两种去甲斑蝥素注射剂型对小鼠移植性肝癌抑制作用比较. 山东中医药大学学报 2007; 31: 64-67
- Swingle M, Ni L, Honkanen RE. Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods Mol Biol* 2007; 365: 23-38
- Bonness K, Aragon IV, Rutland B, Ofori-Acquah S, Dean NM, Honkanen RE. Cantharidin-induced mitotic arrest is associated with the formation of aberrant mitotic spindles and lagging chromosomes resulting, in part, from the suppression of PP2A α . *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2727-2736
- To KK, Ho YP, Au-Yeung SC. Synergistic interaction between platinum-based antitumor agents and demethylcantharidin. *Cancer Lett* 2005; 223: 227-237
- van der Voort IR, Knapp J, Konturek JW, Boknik P, Domschke W, Schmitz W, Neumann J. Expression and functional role of serine/threonine phosphatases in rat esophagus. *Med Sci Monit* 2004; 10: BR123-BR129
- McCluskey A, Ackland SP, Bowyer MC, Baldwin ML, Garner J, Walkom CC, Sakoff JA. Cantharidin analogues: synthesis and evaluation of growth inhibition in a panel of selected tumour cell lines. *Bioorg Chem* 2003; 31: 68-79
- Sakoff JA, Ackland SP, Baldwin ML, Keane MA, McCluskey A. Anticancer activity and protein phosphatase 1 and 2A inhibition of a new generation of cantharidin analogues. *Invest New*

■同行评价

本文论述了斑蝥素及其衍生物在抗病毒、抗肿瘤方面的最新研究进展, 有一定的临床指导意义和可读性。

- Drugs* 2002; 20: 1-11
- 36 McCluskey A, Ackland SP, Gardiner E, Walkom CC, Sakoff JA. The inhibition of protein phosphatases 1 and 2A: a new target for rational anti-cancer drug design? *Anticancer Drug Des* 2001; 16: 291-303
- 37 曹菁华, 徐波, 李敏, 武德柱, 黄薇, 崔景荣. 去甲斑蝥素衍生物Nd3对人卵巢癌细胞SKOV3增殖的作用及机制初步探讨. *癌症* 2007; 26: 361-366
- 38 李琦, 范忠泽, 李先茜, 刘晓华, 孙珏, 顾伟, Paul HENG, 高虹. 去甲斑蝥素微球介入治疗大鼠肝癌疗效及其机制研究. *中西医结合学报* 2006; 4: 378-383
- 39 安巍巍, 薛莲, 王敏伟, 田代真一, 小野寺敏, 池岛乔. 去甲斑蝥素诱导小鼠肺纤维瘤L929细胞凋亡. *中国癌症杂志* 2005; 15: 22-25
- 40 范跃祖, 傅锦业, 赵泽明, 陈春球. 去甲斑蝥素对人胆囊癌GBC-SD细胞系MMP2、TIMP2和MMP2/TIMP2的影响. *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 495, 502
- 41 桂允胜, 曹献英, 陈筠. 斑蝥酸钠体外诱导肝癌细胞凋亡的实验研究. *武汉大学学报(医学版)* 2004; 25: 493-496
- 42 莫日根, 牛建昭, 王继峰, 戴书静, 金永三. 去甲斑蝥素对人脐静脉内皮细胞株的细胞毒作用. *北京中医药大学学报* 2001; 24: 25-28
- 43 戎煜, 梁福佑, 陈莉, 杜海军, 刘乐尧, 孙红柳, 安威. 去甲斑蝥素对人乳腺癌细胞系的凋亡诱导作用及bcl-2基因的表达. *癌症* 2000; 19: 1077-1081
- 44 安巍巍, 王敏伟, 龚昱峰, 田代真一, 小野寺敏, 池岛乔. 去甲斑蝥素通过半胱氨酸天冬氨酸酶诱导HeLa细胞凋亡. *中国病理生理杂志* 2005; 21: 417-421
- 45 Zhang WD, Zhao HR, Yan Y, Wang XH, Zong ZH, Liu Y. Apoptosis induced by cantharidin in human pulmonary carcinoma cells A549 and its molecular mechanisms. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2005; 27: 330-334
- 46 Zhang JP, Ying K, Xiao ZY, Zhou B, Huang QS, Wu HM, Yin M, Xie Y, Mao YM, Rui YC. Analysis of gene expression profiles in human HL-60 cell exposed to cantharidin using cDNA microarray. *Int J Cancer* 2004; 108: 212-218
- 47 Kok SH, Chui CH, Lam WS, Chen J, Lau FY, Wong RS, Cheng GY, Tang WK, Teo IT, Cheung F, Cheng CH, Chan AS, Tang JC. Apoptogenic activity of a synthetic cantharimide in leukaemia: implication on its structural activity relationship. *Int J Mol Med* 2006; 18: 1217-1221
- 48 Kok SH, Chui CH, Lam WS, Chen J, Lau FY, Wong RS, Cheng GY, Tang WK, Cheng CH, Tang JC, Chan AS. Mechanistic insight into a novel synthetic cantharidin analogue in a leukaemia model. *Int J Mol Med* 2006; 18: 375-379
- 49 Li JL, Cai YC, Liu XH, Xian LJ. Norcantharidin inhibits DNA replication and induces apoptosis with the cleavage of initiation protein Cdc6 in HL-60 cells. *Anticancer Drugs* 2006; 17: 307-314
- 50 何太平, 莫丽儿, 梁念慈. 斑蝥素抑制人高转移卵巢癌细胞HO-8910PM侵袭转移的体外实验研究. *癌症* 2005; 24: 443-447
- 51 何太平, 莫丽儿, 梁念慈. 斑蝥素诱导高转移卵巢癌细胞HO-8910PM凋亡的研究. *中国药科大学学报* 2005; 36: 164-167
- 52 张卫东, 赵惠儒, 于秉治, 王晓华, 宗志红, 刘莹. 斑蝥素通过MAPK途径对肺癌A549细胞周期阻滞及其分子机制的研究. *中国医科大学学报* 2006; 35: 382-384
- 53 Yu CW, Li KK, Pang SK, Au-Yeung SC, Ho YP. Anticancer activity of a series of platinum complexes integrating demethylcantharidin with isomers of 1,2-diaminocyclohexane. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 1686-1691
- 54 田秀岭, 杨朴. 斑蝥酸钠维生素B6注射液联合TACE治疗中晚期肝癌疗效观察. *中国肿瘤临床与康复* 2006; 13: 351-353
- 55 李琦, 范忠泽, 李先茜, 刘晓华, 孙珏, 顾伟, Paul HENG, 高虹. 去甲斑蝥素微球介入治疗大鼠肝癌疗效及其机制研究. *中西医结合学报* 2006; 4: 378-383
- 56 杨军, 丁敏, 张太君, 郭渝, 宋自阆, 曹永艳. 血清药理学方法观察复方斑蝥胶囊对人肝癌细胞SMMC-7721增殖的影响. *中国药房* 2005; 16: 262-264
- 57 陈武进, 廖斌, 陈禹略, 皇甫真萍. 斑蝥酸钠联合介入治疗原发性肝癌临床观察. *新疆中医药* 2004; 22: 13-15
- 58 戴书静, 王继峰, 莫日根, 郭顺根, 牛建昭. 去甲斑蝥素增强Bel7402中I κ B α 表达和抑制细胞增殖的研究. *解剖学报* 2001; 32: 155-158, 11
- 59 何太平, 莫丽儿, 梁念慈. 斑蝥素对高转移卵巢癌细胞HO-8910PM中NF- κ B(P65)、FAK表达及FAK磷酸化水平的影响. *中国药理学通报* 2005; 21: 698-701
- 60 何太平, 何振辉, 莫丽儿, 梁念慈. 斑蝥素抑制NF-JB(P65)及Smad3在高转移卵巢癌细胞株HO-8910PM中的表达. *广东医学院学报* 2005; 23: 111-114
- 61 唐龙英, 王昭梅, 宓鹤鸣, 郑钦岳, 姚明, 朱玲仙. 去甲基斑蝥素治疗卵巢癌的实验研究. *肿瘤* 2000; 20: 96-99
- 62 赵泽明, 范跃祖, 陈春球. 去甲斑蝥素对人胆囊癌侵袭转移的抑制作用及机制. *肿瘤* 2006; 26: 724-727
- 63 傅锦业, 范跃祖, 赵泽明, 陈春球. 去甲斑蝥素对人胆囊癌GBC-SD细胞系增殖相关基因蛋白PCNA、Ki-67的影响. *同济大学学报(医学版)* 2003; 24: 374-377
- 64 赵泽明, 范跃祖, 傅锦业, 陈春球. 去甲斑蝥素对人胆囊癌侵袭转移的体内外抑制实验研究. *中华肿瘤杂志* 2005; 27: 221
- 65 范跃祖, 傅锦业, 赵泽明, 陈春球. 去甲斑蝥素对人胆囊癌细胞系侵袭转移及其相关基因的抑制效应. *中国新药与临床杂志* 2004; 23: 522-525
- 66 范跃祖, 傅锦业, 赵泽明, 陈春球. 去甲斑蝥素对人胆囊癌GBC-SD细胞系生长的影响及其机制探讨. *肿瘤* 2004; 24: 358-361
- 67 范跃祖, 傅锦业, 赵泽明, 陈春球. 去甲斑蝥素对人原发性胆囊癌GBC-SD细胞系增殖及相关基因的干预效应. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 554-555, 1002
- 68 Wang GS. Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies. *J Ethnopharmacol* 1989; 26: 147-162
- 69 周阿高, 张勇, 孔德云, 王颖, 张惠珍, 王树军, 黄纲, 洪声, 葛海良, 任秋华, 毛旭明, 董佳容. 斑蝥合剂对H22肝癌小鼠的抑瘤及免疫调节作用. *中西医结合学报* 2006; 4: 504-508
- 70 梁小岩, 许德明. 复方斑蝥注射液配合化疗治疗晚期鼻咽癌的研究. *中国基层医药* 2007; 14: 451-452

编辑 李军亮 电编 郭海丽

p38MAPK在肝细胞癌中的研究进展

邱建武, 郭薇, 申丽娟

邱建武, 郭薇, 申丽娟, 昆明医学院基础医学院病理教研室
云南省昆明市 650031
云南省后备人才培养基金资助项目, No. 2004PY01-8
作者贡献分布: 文献检索、资料分析和论文撰写由邱建武和郭薇完成, 选题和审校由申丽娟完成。
通讯作者: 申丽娟, 650031, 云南省昆明市人民西路191号, 昆明医学院基础医学院病理教研室. shenljkm@yahoo.cn
电话: 0871-5338845
收稿日期: 2007-11-07 修回日期: 2008-01-16

Advances in research on p38MAPK-related hepatocellular carcinoma

Jian-Wu Qiu, Wei Guo, Li-Juan Shen

Jian-Wu Qiu, Wei Guo, Li-Juan Shen, Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Kunming Medical University, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Supported by: the Reserved Talent Training Program of Yunnan Province, No. 2004PY01-8

Correspondence to: Li-Juan Shen, Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Kunming Medical University, 191 Renmin Western Road, Kunming 650031, Yunnan Province, China. shenljkm@yahoo.cn

Received: 2007-11-07 Revised: 2008-01-16

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers in the world. Studies indicate that the development of HCC is related to signal transduction of Ras-MAPK. P38MAPK, an important member of the family of mitogen-activated protein kinases. P38MAPK participates in cell proliferation, apoptosis and differentiation and plays a key role in cell apoptosis. P38MAPK is closely related with carcinogenesis, rapid generation and infinite growth of liver cancer and plays a role in the occurrence and development of liver cancer induced by organics, HBV and HCV. Drugs exert their anti-tumor effects through p38MAPK which also takes part in the formation of drug resistance to HCC. This paper reviews the advances in studies on p38MAPK-related HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Mitogen-activated protein kinases; p38 mitogen-activated

protein kinase

Qiu JW, Guo W, Shen LJ. Advances in research on p38MAPK-related hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(5): 503-509

摘要

肝细胞癌(HCC)是最常见的恶性肿瘤之一, 研究表明肝细胞癌的发生与Ras-MAPK信号转导有关. p38分裂原激活蛋白激酶(p38MAPK)是丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)家族中重要的一员, 他参与细胞增殖、凋亡和分化, 在细胞凋亡过程中起重要作用. p38MAPK与肝癌的发生发展、快速增殖、无限生长和转移密切相关, 其还参与乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和一些有机物致肝癌的过程. 某些抗肿瘤药物通过p38MAPK发挥抗肿瘤效应. 此外, p38MAPK还参与肝癌耐药形成. 本文就近年来肝细胞癌在有关p38MAPK方面的研究进展作一综述.

关键词: 肝细胞癌; 丝裂原活化蛋白激酶; p38分裂原激活蛋白激酶

邱建武, 郭薇, 申丽娟. p38MAPK在肝细胞癌中的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 503-509

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/503.asp>

0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一, 全球50%以上肝癌发生在我国, 我国肝癌死亡率占全部恶性肿瘤死亡的18.8%, 患者主要集中在大陆^[1-3]. 研究发现, 肝癌的发生与其Ras-MAPK信号转导有关, 而有关p38分裂原激活蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)在肝癌中作用的研究目前报道不多.

与所有肿瘤的发生一样, HCC的发生是多步骤过程, 宿主因素先有肝细胞的增生, 随后恶性化. 信号分子在信号转导过程中起到不可缺少的作用, 常成为外源性蛋白的靶作用目标, 引起细胞正常生理活动的改变. 丝裂原活化蛋白

■背景资料

肝细胞癌(HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 对HCC的信号转导通路的研究显示有多条通路的参与了HCC的发生发展. p38MAPK是丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)家族中重要的一员, 他在肝细胞癌发生、发展、转移和耐药等过程中起着重要作用.

■同行评议者

党双锁, 副教授, 西安交通大学第二医院感染科

■ 研发前沿

p38MAPK是近年来肿瘤研究中的一个热点,有关肝癌细胞癌的研究报道也日益增多.抗肿瘤药物可通过p38MAPK发挥抗肿瘤效应.

激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶.研究证实, MAPKs信号转导通路存在于大多数细胞内,在将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,并引起细胞增殖、分化、转化及凋亡等细胞生物学反应, MAPKs在这过程中具有至关重要的作用.

目前所知MAPKs超家族至少包含四条平行的MAPK通路: (1)细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路; (2)JNK/SAPK通路: c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)又被称为应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK); (3)p38MAPK通路; (4)ERK5/BMK1通路: 细胞外信号调节蛋白激酶5(extracellular-signal regulated protein kinase 5, ERK5), 也叫大丝裂素活化蛋白激酶1(big mitogen-activated protein kinase 1, BMK1), 这是近年来新克隆出的一条通路, 这条通路可以被高渗刺激激活^[4]. MAPKs信号转导通路在细胞内具有生物进化的高度保守性, 以三级激酶级联的形式(MAPKKK-MAPKK-MAPK)转导信号^[5]. 他们拥有各自的底物和调节蛋白激酶, 接受不同的信号刺激引起特异的细胞效应, 这些信息流之间的“交流”构成信号转导网. 其中p38MAPK信号途径是MAPKs家族中的重要组成部分, 经外界刺激而激活, 引起细胞内蛋白激酶的连锁反应, 作用于细胞周期的各个检验点, 参与调控细胞的增殖、凋亡和分化. 细胞信号转导异常, 可导致恶性肿瘤快速增殖, 无限生长.

1 p38MAPK通路的构成

1.1 p38MAPK的发现 p38MAPK是1993年发现的一条MAPKs通路. Han *et al*^[6]用高渗和内毒素刺激小鼠肝脏细胞, 分离纯化出分子质量为38 kDa的酪氨酸磷酸化蛋白激酶-p38MAPK, 并从肝细胞cDNA文库中筛选到编码p38MAPK的克隆. 系列分析显示, p38MAPK与酿酒酵母HOG1基因编码的MAPK分子有52.3%的同源性. 功能研究表明, 哺乳动物p38MAPK与酵母HOG1系统功能十分相似. 目前发现有4个异构体, 分别为p38 α (p38)、p38 β 、p38 γ 和p38 δ ^[7]. 不同亚型其分布具有不同的组织特异性: p38 α 在各种组织细胞中广泛存在, p38 β 在脑组织中表达最高, p38 γ 仅在骨骼肌细胞中存在, 而p38 δ 主要存在于腺体组织, 肝组织中p38 α 有较高的表达. 不同亚

型氨基酸个数不同, 但同源性超过50%.

1.2 p38MAPK信号传导通路 p38信号通路也由三级激酶链组成, 一些促炎因子、应激刺激、脂多糖和革兰氏阳性细菌细胞壁成分可通过激活p38MAPK, 把细胞外信号向细胞内传递. 首先, MAPKKK磷酸化激活MAPKK, 再由MAPKK对MAPK双位点磷酸化, 从而激活p38MAPK^[8]. 其上游激活物为MKK3、MKK4及MKK6, 而MKK3、MKK6仅特异性激活p38MAPK, 以及MAPKK类的TAK, MIK和ASK也可激活p38MAPK, 其再作用于多种转录因子, 如ATF2, Elk-1, PRAK等发挥生理作用^[9-11]. p38MAPK激活导致的细胞生物学效应多种多样, 具有细胞类型依赖性和刺激类型依赖性.

2 p38MAPK的生物学功能

主要参与细胞应激反应和炎症反应, 还参与细胞增殖、凋亡和分化^[12]. 近期研究发现, p38MAPK在细胞凋亡过程中起重要作用. 研究发现不同细胞在受到不同刺激影响时, p38MAPK所扮演的角色是完全不同的^[13]. 多种细胞株内p38MAPK均可以通过G₁/S检验点阻滞细胞分裂, 抑制细胞增殖, 认为可能是下调了cyclinD1的表达^[14]. G₁/S检验点的另一个重要的调控因子是P53, 体内外都有实验证明p38MAPK可以通过P53发挥效应^[15-16]. p38MAPK也可能通过影响cdc25B和cdc25C的磷酸化而影响G₂/M检验点^[17], 但p38MAPK引导的cdc25B磷酸酯酶的磷酸化依赖的失活机制目前还不是很清楚. p38MAPK参与细胞凋亡过程, 与激活c-jun和c-fos^[18-20]; 诱导bax转位^[21]; 介导caspases的活化^[22]; 增强c-myc表达^[23]; p53磷酸化^[24]; 增强TNF- α 的表达^[25]及参与Fas/FasL介导的凋亡^[26]有关. 但也有研究表明, p38MAPK信号通路也通过抑制前凋亡信号的产生, 参与介导细胞存活信号通路而抑制细胞凋亡^[27].

3 p38MAPK在肝癌中的作用

3.1 p38MAPK在肝癌中的表达 与正常非肿瘤组织相比较, p38MAPK在许多人类肿瘤, 如结肠癌^[28], 食管癌^[29], 乳腺癌^[30]等呈普遍持续的激活表达. Iyoda *et al*^[31]研究肝癌患者标本时发现, p38MAPK和MKK6的活性, 大病灶组(>20 mm)相对于小病灶组来说显示出低水平活性, 瘤体组织(T)组p38MAPK和MKK6活性明显低于非

瘤体组织(NT)组. 说明降低p38MAPK和MKK6的活性, 从某种意义上来说可以抑制凋亡, 导致肝癌细胞的无限生长. 国内研究发现, p38MAPK在肝癌组织中表达较癌旁组织中明显增高, 而JNK的表达在癌旁组织中较肝癌组织中高, p38MAPK与JNK结果相反, 说明在肝癌组织中至少通过两种途径使得MKK3、MKK4激活不平衡, 使得JNK和p38MAPK表达不同^[32-33]. 陈茂伟 *et al*^[34]用多重逆转录聚合酶链式反应(Multi RT-PCR)的方法对22例肝癌组织检测, 结果表明在肝癌组织中ERK1、JNK1、p38mRNA阳性率分别为95.83%、100%、100%, 且在表达丰度上有明显的变化.

3.2 p38MAPK在HBX致肝癌中的作用 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)X蛋白(HBX)与肝癌的发生具有密切的关系, 两者相关率高达80%^[35]. 目前p38MAPK在HBX致肝癌中发挥的作用不是很明确. 有研究表明, HBX可能激活MAPK通路^[36], Tarn *et al*^[37]观察到HBX激活已分化肝细胞有丝分裂Ras/Raf/MAPK通路, 去分化的肝细胞则发现JNK通路被激活. MAPK通路与肝细胞的增殖、恶性转化有关, 也是肝炎病毒蛋白作用的重要靶位. 肝癌发生过程中, p16, p21(Cip-1/WAF1/MDA6)和p27的表达下降, 可增加MAPK信号系统和HBx蛋白的表达能力, 导致肝细胞增生^[38-40], MAPKs是肝细胞生存和增生中极其重要的分子, 起着整合细胞内信号诱导通路的信息, 并将胞质信号与基因表达程序偶联在一起的作用. MAPKs对肝细胞的作用有加快肝细胞进入S期, 促进肝细胞转化肝癌细胞的转移, 提高缺氧诱导因子(HIF-1 α)的转录活性^[41], 诱导一些血管生成因子的生成.

3.3 p38MAPK在HCV致肝癌中的作用 有人证明^[42-43]核心蛋白激活MAPK/ERK及血清反应元件从而增强生长因子功能, 对细胞生长有刺激作用, 同时核心蛋白通过抑制p38MAPK的活化而抑制血清饥饿诱导的细胞凋亡. 但也有人^[44]认为丙型肝炎病毒核心蛋白的表达可激活p38MAPK通路, 增强cyclin B1-Cdk1复合物的活性, 导致细胞异常增殖而形成肝细胞癌. 李波 *et al*^[45]发现HCV核心蛋白可抑制MAPK通路激酶的激活, 降低NF- κ B, AP-1等转录因子的活性, 使caspase-3蛋白表达明显降低, 是抑制细胞增殖和凋亡的重要机制.

3.4 p38MAPK与有机物致肝癌机制 二恶英(TCDD)是一种很强的多位点致癌物. 可引起人

类的肝损伤、卟啉病、氯痤疮、生殖发育和智力影响及致癌、致畸、致突变等. 因为TCDD的毒性作用机制还不完全清楚, 他产生作用不是通过直接损伤, 而主要是通过芳香烃受体诱导基因表达、诱导酶活性、改变蛋白质功能等起作用. 刘燕群 *et al*^[46]研究TCDD对人肝癌细胞株(HepG2)和肺腺癌细胞株(SPC2A1)中p53基因和p38MAPK基因表达的影响, 发现p38MAPK基因在2株细胞都有表达. 在HepG2中, p38MAPK基因表达随TCDD浓度增加表现为先抑制再升高再降低, 呈先抑后扬再修复. 多环芳烃类化合物广泛存于环境中, 能引起哺乳动物致癌. Kim *et al*^[47]研究多环芳烃类物质诱导凋亡时发现: 用苯并芘处理过的肝癌细胞Hepalclc7中p53介导的凋亡作用可以被p38MAPK的抑制剂所抑制. 说明苯并芘介导的凋亡受p53活化信号调节, 而这种活化信号又受p38MAPK的调节. 脂肪酸-辅酶A连接酶4(FACL4)是一种对花生四烯酸酯有亲和力的酶, Liang *et al*^[48]发现他在人肝癌的发生过程中起重要作用, p38在FACL4所致肝癌的过程中起着促进作用, 用p38抑制剂作用后FACL4的表达显著降低. Parekh *et al*^[49]在二乙基亚硝胺致肝癌形成模型中发现, ERK1/2, p38和JNK表达量和活性增高, p38MAPK能上调cyclin D1的表达, 干扰G₁/S调节点, 导致细胞异常增殖. 此外, p38MAPK在酒精致肝癌中也起重要作用^[50].

3.5 p38MAPK在肝癌转移中的作用 肝癌的转移率高与许多因素有关, 血管内皮细胞生长因子是其中重要因素之一. 毛华 *et al*^[51-53]研究发现血管内皮细胞生长因子(VEGF)可通过p38MAPK信号传导通路诱导的肝癌细胞转移, 阻断p38MAPK信号传导通路可以抑制VEGF诱导肝癌细胞转移, 他们还发现VEGF可使肝癌细胞穿过基底膜胶原纤维向下室浸润能力增加10倍以上, 而预先使用p38MAPK信号传导通路特异性阻断剂SB203580, 可抑制95%向下室浸润能力, 也可减少87% VEGF诱导肝癌细胞浸润膜能力. 他们还发现^[54]VEGF可通过p38MAPK信号传导通路增加肝癌细胞异质性黏附作用, 以及降低肝癌细胞同质性黏附作用, 促进肝癌细胞的侵袭与转移.

环氧化酶2(COX-2)和前列腺素E₂(PGE₂)的合成与细胞迁移、金属蛋白酶(MMPs)分泌、肝癌细胞黏附有关, 在这过程中有多条传导途径参与, 其中就有p38MAPK途径^[55].

■创新盘点

本文整理了近年来p38MAPK在肝细胞癌中的研究成果, 阐述了p38MAPK在肝细胞癌的发生发展、转移和治疗中的作用, 希望能为更深入的研究肝癌发生机制及治疗提供参考依据.

■应用要点

p38MAPK有促进肝细胞凋亡的作用,有望成为治疗肝癌的一个新靶点。

3.6 肝癌治疗中p38MAPK的作用

3.6.1 p38MAPK与肝癌的基因治疗: 宋霆婷 *et al*^[56]用脂质体转染法将MAPK反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASO)导入肝癌细胞系SMMC-7721细胞中,对细胞恶性表型起逆转作用,阻断MAPK信号转导就有可能阻止肝癌的发生。陈涛 *et al*^[57]也证明了封闭survivin表达可引起p38MAPK的活化,其介导的活化功能与其作用浓度有关,呈剂量依赖性,他们还发现^[58]转染survivin的细胞出现G₂/M期阻滞,细胞内微丝形态结构破坏。从另一方面也说明,survivin基因阻止肝癌细胞凋亡可能是通过抑制p38MAPK活性来实现的。这一结果也提示p38MAPK有可能成为治疗肝癌的新靶标,即通过调节p38MAPK的活性达到治疗肝癌的目的。

3.6.2 p38MAPK与肝癌的化学药物治疗: 许多抗肿瘤药物都是通过诱导癌细胞凋亡而发挥抗癌效应的,抗癌效应的发挥往往不是通过单一途径诱导肿瘤细胞发生凋亡,而是多条信号传导通路共同完成,p38MAPK途径就是其中的一条。不同的药物在不同的肝癌细胞中p38MAPK所起的作用可能不同。大多数文献报道p38MAPK诱导肝癌细胞凋亡,也有报道p38MAPK可抑制细胞凋亡。郑壬鸿 *et al*^[59]体外用顺铂诱导肝癌SMMC-7721细胞凋亡,发现细胞质和细胞核中MAPKs(JNK/SAPK, p38MAPK, ERK)及转录因子(JUN, CREB)均有明显表达,在实验中发现JNK/SAPK、p38MAPK和ERK三条途径均诱导促进肝癌SMMC-7721细胞的凋亡并且顺铂诱导肝癌细胞凋亡存在明显的量效和时效关系。Sutter *et al*^[60]用他汀类药抑制肝癌细胞的增殖,发现用他汀类药可诱导人肝癌细胞凋亡,并有特征性形态变化,而且还发现ERK1/2活性下调时p38MAPK仍保持活性状态,说明他汀类药物通过p38MAPK介导肝癌细胞发生凋亡。Lin *et al*^[61]发现灵芝提取物三萜类物质WEES-G6可以抑制人肝癌Huh-7细胞的生长,但对张氏肝细胞(正常人肝细胞株)无抑制作用,经WEES-G6处理后的肝癌细胞可引起细胞生长调节蛋白、PKC、JNK和p38MAPK急剧下降,这种变化导致细胞周期延长和强烈生长抑制,但对正常肝细胞似乎没影响。Tong *et al*^[62]用合欢酸(EA)在人肝癌细胞HepG2中诱导bid和bcl-2蛋白的减少,还引起线粒体膜的缺损和细胞色素C的释放,用JNK和p38MAPK特异性抑制剂可阻止bid的平截、bcl-2的减少、细胞色素C释放、capase激

活、DNA片段化等一系列细胞内反应。说明EA诱导的肝癌细胞凋亡是通过JNK和p38MAPK途径介导的线粒体方式。Yeh *et al*^[63]研究莱菔硫烷(sulforaphane)在肝癌细胞株HepG2中诱导金属硫蛋白(MT)的分子机制和抗增殖机制时发现低浓度时莱菔硫烷激活MAPKs通路,导致金属硫蛋白的表达,高浓度通过bcl-2家族和ICE/Ced-3(capase-3)级联反应引起凋亡。使用p38MAPK和ERK的抑制剂可阻断莱菔硫烷诱导的金属硫蛋白表达。

而p38MAPK抑制肝癌细胞凋亡的文献很少,Wen *et al*^[64]在人肝癌细胞HepG2细胞中蒜臭素(DADS)可影响细胞增殖和活力以及引起典型的细胞凋亡形态学改变。用DADS处理过的肝癌细胞磷酸化的p38MAPK和p42/44MAPK活性暂时性增高,存在时间和浓度依赖性,结果表明,DADS和MAPK特异性抑制剂可以诱导HepG2细胞的凋亡,说明在HepG2细胞的凋亡的过程中,至少存在内源性活化的p38MAPK和P42/44MAPK起着细胞保护作用。MAPK抑制剂可加强蒜臭素处理过的HepG2细胞的凋亡效果。

3.6.3 p38MAPK与肝癌的生物治疗: Zauberman *et al*^[65]发现在人肝癌细胞HepG2中,IL-6介导C-反应蛋白的分泌,p38MAPK起关键作用,并认为在此过程中MAPKs路径和STAT路径可能有“交谈”作用。Kim *et al*^[66]在FaO鼠肝癌细胞和人肝癌细胞Hep3B中,发现用TGF- β 1处理后可致MLK3活性增加,MLK3过表达的细胞,ERK、JNKs和p38MAPK都随着TGF- β 1活性增加进一步增加。他们还发现只有用p38MAPK抑制剂能抑制TGF- β 1诱导的细胞凋亡,可以说,在TGF- β 1诱导肝癌细胞凋亡过程中MLKs激活p38MAPK发挥效应。Bianchiet *et al*^[67]发现在人肝癌细胞HepG2中,花生四烯酸(AA)代谢产物产生活性氧(ROS),活性氧激活p38MAPK和还原氧化敏感转化因子AP-1和NF- κ B,再通过这些因子发挥生物学效应,AA通过氧化应激的方式可以抑制HepG2细胞的生长。肿瘤坏死因子(TNF)- α 是最强的信号诱导剂之一,李湘竑 *et al*^[68]发现在肝癌细胞Hepa 1-6中过表达丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(HIPK1)时,可以增加TNF- α 所诱导的JNK/p38的激活,TNF- α 所诱导肝癌细胞凋亡有p38的激活。Smad通路是TGF- β 信号转导的主要通路。Yang *et al*^[69]发现Smad3可以促进肝癌细胞凋亡,这个过程中要有TGF- β 1信号的参与和p38的激活。热休克蛋白(HSP)27

磷酸化水平和肝癌相关, 蛋白激酶C(PKC)可通过p38MAPK参与热休克蛋白(HSP)27磷酸化过程^[70]. 也有一些生物因子诱导肝癌细胞凋亡过程中没有p38MPAK的参与, 任正刚 *et al*^[71]发现一氧化氮(NO)的供体JSK可以激活MAPKs通路引起肝癌细胞凋亡, 但在这过程中并没有p38MPAK的参与.

3.7 p38MAPK与肝癌耐药性 Zhang *et al*^[72]用肝癌细胞株HepG2、Huh7和HLE转染且过表达整合素B1后, 其化疗药物诱导凋亡作用均加强, 而当采用ERK或p38MAPK抑制剂时, 癌细胞可以消除这种整合素B1的保护作用. 由此认为肝癌细胞中过表达的整合素B1通过MAPK信号传导通路起抗凋亡作用.

4 结论

p38MAPK在肝癌发生过程中是如何调控细胞增殖和凋亡的, 目前尚不完全清楚. 不同细胞因子作用于肝癌细胞, 激活p38MAPK具体机制以及p38MAPK通路与其他胞内信号通路是否存在“交谈”等问题, 还有待进一步研究的阐明. 研究p38MAPK通路在肝癌发生过程中的作用和机制, 探讨肝癌发生机制, 可为早期诊断和预防治疗肝癌提供实验依据和技术手段, 为临床治疗肝癌提供新的思路.

5 参考文献

- 1 钦伦秀, 孙惠川, 汤钊猷. 原发性肝癌研究进展-2006沪港国际肝病大会纪要. 中华外科杂志 2006; 44: 1070-1074
- 2 莫妮, 许培扬, 张玢, 王汝宽. 肝癌研究进展. 医学研究通讯 2003; 32: 47-48
- 3 Hall AJ, Wild CP. Liver cancer in low and middle income countries. *BMJ* 2003; 326: 994-995
- 4 Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* 1996; 271: 16586-16590
- 5 牟金叶, 陈晓光. 促分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号传导通路的研究进展. 生命科学 2002; 14: 208-211
- 6 Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 1994; 265: 808-811
- 7 Wang XS, Diener K, Manthey CL, Wang S, Rosenzweig B, Bray J, Delaney J, Cole CN, Chan-Hui PY, Mantlo N, Lichenstein HS, Zukowski M, Yao Z. Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997; 272: 23668-23674
- 8 Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995; 270: 7420-7426
- 9 Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard

B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1247-1255

- 10 Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995; 267: 682-685
- 11 Janknecht R, Hunter T. Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J* 1997; 16: 1620-1627
- 12 Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000; 12: 1-13
- 13 Martin-Blanco E. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *Bioessays* 2000; 22: 637-645
- 14 Ellinger-Ziegelbauer H, Kelly K, Siebenlist U. Cell cycle arrest and reversion of Ras-induced transformation by a conditionally activated form of mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 3857-3868
- 15 郑联合, 张伟, 韩涛, 马保安, 范清宇. 阿霉素可通过MAPK信号转导通路促进骨肉瘤细胞凋亡. 第四军医大学学报 2005; 26: 1119-1121
- 16 Bulavin DV, Kovalsky O, Hollander MC, Fornace AJ Jr. Loss of oncogenic H-ras-induced cell cycle arrest and p38 mitogen-activated protein kinase activation by disruption of Gadd45a. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 3859-3871
- 17 Bulavin DV, Higashimoto Y, Popoff IJ, Gaarde WA, Basrur V, Potapova O, Appella E, Fornace AJ Jr. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* 2001; 411: 102-107
- 18 Kalra N, Kumar V. c-Fos is a mediator of the c-myc-induced apoptotic signaling in serum-deprived hepatoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 25313-25319
- 19 Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 1997; 386: 296-299
- 20 Kitamura T, Watanabe S, Sato N. Liver regeneration, liver cancers and cyclins. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13 Suppl: S96-S99
- 21 Ghatan S, Larner S, Kinoshita Y, Hetman M, Patel L, Xia Z, Youle RJ, Morrison RS. p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J Cell Biol* 2000; 150: 335-347
- 22 Jiang DJ, Jia SJ, Dai Z, Li YJ. Asymmetric dimethyl-larginine induces apoptosis via p38 MAPK/caspase-3-dependent signaling pathway in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40: 529-539
- 23 Stoneley M, Chappell SA, Jopling CL, Dickens M, MacFarlane M, Willis AE. c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1162-1169
- 24 Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ Jr. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* 1999; 18: 6845-6854
- 25 秦永伟, 程纯, 王海波, 高永静, 邵晓轶, 沈爱国. P38在LPS诱导大鼠雪旺氏(Schwann)细胞TNF- α 表达中的作用. 中国生物化学与分子生物学报 2007; 23: 382-387
- 26 Kornmann M, Ishiwata T, Kleeff J, Beger HG,

■同行评价

本文较好地综述p38MAPK在肝癌的研究状况, 文献丰富, 但分析不够深入.

- Korc M. Fas and Fas-ligand expression in human pancreatic cancer. *Ann Surg* 2000; 231: 368-379
- 27 Remacle-Bonnet MM, Garrouste FL, Heller S, Andre F, Marvaldi JL, Pommier GJ. Insulin-like growth factor-I protects colon cancer cells from death factor-induced apoptosis by potentiating tumor necrosis factor alpha-induced mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB signaling pathways. *Cancer Res* 2000; 60: 2007-2017
- 28 孙泽群, 徐少勇, 邓长生, 张丽, 田林. P38蛋白在大肠癌中的表达及其临床意义. *中国肿瘤临床* 2005; 32: 635-637
- 29 张剑, 王树俊, 裘宋良, 杨观瑞, 张亚冰, 裘一兵, 张聚真, 孙豫, 杨静, 薛乐勋, 赵立群. ERK1和P38在食管鳞癌组织中的表达. *肿瘤基础与临床* 2006; 19: 177-179, 182
- 30 尹为华, 马雅, 余光银, 蔡广玲. 乳腺癌p38表达及临床病理意义. *中国煤炭工业医学杂志* 2005; 8: 698-699
- 31 Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M, Takehara T, Fujimoto J, Hori M, Wands JR, Hayashi N. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 3017-3026
- 32 栗光明, 朱继业, 刘燕南, 冷希圣, 王东, 陈雷, 高杰, 杜如昱. 有丝分裂蛋白激酶及其上游调节信号在人肝癌组织中的表达. *中华普通外科杂志* 2001; 16: 368-370
- 33 Zhu J, Leng X, Dong N, Liu Y, Li G, Du R. Expression of mitogen-activated protein kinase and its upstream regulated signal in human hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2002; 40: 1-16
- 34 陈茂伟, 曹骥, 苏建家, 焦杨. MAPK信号转导通路多基因多重RT-PCR方法的建立. *广西医科大学学报* 2006; 23: 274-276
- 35 肖开银, 彭民浩. 原发性肝癌流行病学研究进展. *中国普外基础与临床杂志* 2000; 7: 272-274
- 36 Oh JC, Jeong DL, Kim IK, Oh SH. Activation of calcium signaling by hepatitis B virus-X protein in liver cells. *Exp Mol Med* 2003; 35: 301-309
- 37 Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 34671-34680
- 38 Qiao L, Leach K, McKinstry R, Gilfor D, Yacoub A, Park JS, Grant S, Hylemon PB, Fisher PB, Dent P. Hepatitis B virus X protein increases expression of p21(Cip-1/WAF1/MDA6) and p27(Kip-1) in primary mouse hepatocytes, leading to reduced cell cycle progression. *Hepatology* 2001; 34: 906-917
- 39 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Kumar V, Sarkar DP. An internal segment (residues 58-119) of the hepatitis B virus X protein is sufficient to activate MAP kinase pathways in mouse liver. *FEBS Lett* 2001; 504: 59-64
- 40 Rothmann K, Schnolzer M, Radziwill G, Hildt E, Moelling K, Schaller H. Host cell-virus cross talk: phosphorylation of a hepatitis B virus envelope protein mediates intracellular signaling. *J Virol* 1998; 72: 10138-10147
- 41 Yoo YG, Oh SH, Park ES, Cho H, Lee N, Park H, Kim DK, Yu DY, Seong JK, Lee MO. Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1alpha through activation of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2003; 278: 39076-39084
- 42 Tsuchihara K, Hijikata M, Fukuda K, Kuroki T, Yamamoto N, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein regulates cell growth and signal transduction pathway transmitting growth stimuli. *Virology* 1999; 258: 100-107
- 43 Takamatsu M, Fujita T, Hotta H. Suppression of serum starvation-induced apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Kobe J Med Sci* 2001; 47: 97-112
- 44 Spaziani A, Alisi A, Sanna D, Balsano C. Role of p38 MAPK and RNA-dependent protein kinase (PKR) in hepatitis C virus core-dependent nuclear delocalization of cyclin B1. *J Biol Chem* 2006; 281: 10983-10989
- 45 李波, 冯德云, 程瑞雪, 何琼琼, 胡忠良, 郑晖, 文继舫. 丙型肝炎病毒核心蛋白对人源肝细胞生物学行为的影响. *中华医学杂志* 2005; 85: 1243-1248
- 46 刘燕群, 周宜开, 徐顺清, 吕斌, 郝巧玲, 李华文, 程晋鹏, 任恕. 二噁英对HepG2和SPC-A1细胞P53和P38 MAPK基因表达的影响. *环境与职业医学* 2005; 22: 8-10
- 47 Kim SJ, Ko CB, Park C, Kim BR, Sung TH, Koh DH, Kim NS, Oh KJ, Chung SY, Park R. p38 MAP kinase regulates benzo(a)pyrene-induced apoptosis through the regulation of p53 activation. *Arch Biochem Biophys* 2005; 444: 121-129
- 48 Liang YC, Wu CH, Chu JS, Wang CK, Hung LF, Wang YJ, Ho YS, Chang JG, Lin SY. Involvement of fatty acid-CoA ligase 4 in hepatocellular carcinoma growth: roles of cyclic AMP and p38 mitogen-activated protein kinase. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2557-2563
- 49 Parekh P, Rao KV. Overexpression of cyclin D1 is associated with elevated levels of MAP kinases, Akt and Pak1 during diethylnitrosamine-induced progressive liver carcinogenesis. *Cell Biol Int* 2007; 31: 35-43
- 50 Hsiang CY, Wu SL, Chen JC, Lo HY, Li CC, Chiang SY, Wu HC, Ho TY. Acetaldehyde induces matrix metalloproteinase-9 gene expression via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 signaling pathways in human hepatocellular carcinoma cells: Association with the invasive potential. *Toxicol Lett* 2007; 171: 78-86
- 51 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 赖卓胜. 血管内皮细胞生长因子诱导肝癌转移的实验研究. *中华肝胆外科杂志* 2001; 7: 34-36
- 52 毛华, 袁爱力, 赖卓胜. p38MAPK信号通路特异性阻断剂SB203580抑制VEGF诱导肝癌转移的实验研究. *现代消化及介入诊疗杂志* 1999; 4: 43-45
- 53 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 赖卓胜. 分裂原激活蛋白激酶p38信号转导通路在抑制血管内皮细胞生长因子诱导肝癌转移的实验研究. *中华消化杂志* 2000; 20: 14-16
- 54 毛华, 黄纯焱, 赵敏芳, 宋卫生. p38MAPK信号转导通路调控VEGF诱导肝癌细胞黏附作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 778-783
- 55 Mayoral R, Fernandez-Martinez A, Bosca L, Martin-Sanz P. Prostaglandin E2 promotes migration and adhesion in hepatocellular carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 753-761
- 56 宋霆婷, 姜玉华, 李妙玉, 王瑾. MAPK反义寡核苷酸对肝癌细胞恶性表型的逆转作用. *实用医学杂志* 2005; 21: 2116-2118
- 57 陈涛, 田伏洲, 蔡忠红, 尹致良. Survivin反义寡核苷酸诱导肝癌细胞凋亡的作用. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 546-549
- 58 陈涛, 田伏洲, 蔡忠红, 尹致良, 赵铁军. survivin反义寡核苷酸诱导人肝癌细胞凋亡的相关信号转导途径. *中华医学杂志* 2003; 83: 425-429
- 59 郑壬鸿, 窦科峰, 梁克明. 体外顺铂诱导肝癌SMMC-

- 7721细胞凋亡时细胞信号转导因子活性变化. 第四军医大学学报 2002; 23: 831-834
- 60 Sutter AP, Maaser K, Hopfner M, Huether A, Schuppan D, Scherubl H. Cell cycle arrest and apoptosis induction in hepatocellular carcinoma cells by HMG-CoA reductase inhibitors. Synergistic antiproliferative action with ligands of the peripheral benzodiazepine receptor. *J Hepatol* 2005; 43: 808-816
 - 61 Lin SB, Li CH, Lee SS, Kan LS. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life Sci* 2003; 72: 2381-2390
 - 62 Tong X, Lin S, Fujii M, Hou DX. Molecular mechanisms of echinocystic acid-induced apoptosis in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 539-546
 - 63 Yeh CT, Yen GC. Effect of sulforaphane on metallothionein expression and induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 2138-2148
 - 64 Wen J, Zhang Y, Chen X, Shen L, Li GC, Xu M. Enhancement of diallyl disulfide-induced apoptosis by inhibitors of MAPKs in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 323-331
 - 65 Zauberman A, Zipori D, Krupsky M, Ben-Levy R. Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene* 1999; 18: 3886-3893
 - 66 Kim KY, Kim BC, Xu Z, Kim SJ. Mixed lineage kinase 3 (MLK3)-activated p38 MAP kinase mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in hepatoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 29478-29484
 - 67 Bianchi A, Dewailly E, Gautier H, Merlin JL, Slomianny C, Dauca M, Becuwe P. Decrease of human hepatoma cell growth by arachidonic acid is associated with an accumulation of derived products from lipid peroxidation. *Biochimie* 2004; 86: 633-642
 - 68 李湘站, 汪谦, 罗燕, 王敏. 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶对肝癌细胞凋亡的促进作用. 中华实验外科杂志 2006; 23: 55-56
 - 69 Yang YA, Zhang GM, Feigenbaum L, Zhang YE. Smad3 reduces susceptibility to hepatocarcinoma by sensitizing hepatocytes to apoptosis through downregulation of Bcl-2. *Cancer Cell* 2006; 9: 445-457
 - 70 Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Yasuda E, Toyoda H, Kaneoka Y, Yamaguchi A, Kumada T, Kozawa O. Protein kinase C delta regulates the phosphorylation of heat shock protein 27 in human hepatocellular carcinoma. *Life Sci* 2007; 81: 585-591
 - 71 任正刚, 刘银坤, Ziqiu Wang, Sid Kar, Brian I Carr. 多途径丝裂原激活的蛋白激酶介导一氧化氮引起的肝癌细胞凋亡. 肿瘤 2004; 24: 459-463
 - 72 Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, Matsuhashi S, Yoshimura T, Hisatomi A, Tadano J, Sakai T, Yamamoto K. Beta 1-integrin protects hepatoma cells from chemotherapy induced apoptosis via a mitogen-activated protein kinase dependent pathway. *Cancer* 2002; 95: 896-906

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 年编委审稿费总计 36 225 元

本刊讯 世界华人消化杂志(*World Chinese Journal of Digestology*, *WCJD*)编辑委员会共计490人, 其中博士356, 硕士61人, 本科48人, 教授及主任医师351人, 副教授61人, 副主任医师及讲师30人, 研究员18人. *WCJD*编辑部编委会审稿费结算工作于每年12月5日开始. 本次统计为2007-01-01/2007-12-05编委审稿费费用, 数据以稿件审回日期为准. *WCJD*共计审稿1449篇, 其中送审专家299位, 有效审回专家269位, 有30位专家未接受编辑部送审稿件, 共计催审次数479次, 平均催审次数1.7次, 其中最多审稿编委本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科黄颖秋17篇; 复旦大学上海医学院病理学系张锦生, 南京医科大学第二附属医院内镜中心范志宁, 中南大学湘雅二医院肖恩华编委分别审稿15篇; 南昌大学第二附属医院张吉翔, 上海交通大学附属第六人民医院程英升编委分别审稿14篇.

*WCJD*编辑部感谢各位编委2007年对*WCJD*编辑部工作的支持, 同时希望各位编委更加积极主动的配合我们今后的工作. (编务 江艳 2008-01-20)

幽门螺杆菌耐药基因检测的研究现状

何恒, 王洪明, 迟晶

■背景资料

抗生素的广泛应用使 *H pylori* 对抗生素的耐药性和耐药率逐渐增加, 而对 *H pylori* 的根除率却逐渐降低, 选择快速敏感价廉的分子生物学技术对 *H pylori* 耐药基因进行检测, 成为了临床医生选择合理抗生素的关键。

何恒, 王洪明, 迟晶, 中国医科大学附属第一医院消化科 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 何恒与迟晶对此文所作贡献均等; 此课题由何恒、迟晶设计; 研究过程由何恒、王洪明、迟晶操作完成; 数据分析由何恒、迟晶、王洪明完成; 本论文写作由何恒、迟晶、王洪明完成。

通讯作者: 迟晶, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化科. cj729302@126.com

电话: 024-22734313

收稿日期: 2007-07-22 修回日期: 2008-01-17

Detection of the drug-resistant gene of *Helicobacter pylori*

Heng He, Hong-Ming Wang, Jing Chi

Heng He, Hong-Ming Wang, Jing Chi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Jing Chi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cj729302@126.com

Received: 2007-07-22 Revised: 2008-01-17

Abstract

Antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* (*H pylori*) and the resistance rate are increased due to the wide use of antibiotics. At present, the detection of antibiotic-resistant *H pylori* is focused on the clarithromycin and metronidazole resistance testing using PCR-based molecular biology techniques. However, PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time PCR in combination with melting curve analysis techniques have a broad prospect in detecting drug-resistant clarithromycin. They can detect it from tissue biopsy and stool samples, and thus can be used in detecting the resistance of a wide range of antibiotics. Western blot and PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect the resistance of metronidazole, and can therefore develop into the routine procedures for detecting drug-resistant *H pylori*.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Drug resistance mechanisms; Drug-resistant gene; Detection methods

He H, Wang HM, Chi J. Detection of the drug-resistant

gene of *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(5): 510-516

摘要

抗生素的广泛应用使幽门螺杆菌(*H pylori*)对抗生素的耐药性和耐药率逐渐增加, 目前对幽门螺杆菌耐药的检测方法重点在对克拉霉素和甲硝唑两种抗生素耐药的检测, 其检测方法主要是基于聚合酶链式反应为基础的分子生物学技术, 其对克拉霉素发展前景广阔的是聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术和实时定量聚合酶链式反应结合解链曲线分析技术, 可对活检组织和粪便两种样本进行检测, 同时可以对多种抗生素进行耐药检测; 其对甲硝唑耐药的检测主要是免疫印迹法和聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术, 有望发展成检测 *H pylori* 耐药的常规项目。

关键词: 幽门螺杆菌; 耐药机制; 耐药基因; 检测方法

何恒, 王洪明, 迟晶. 幽门螺杆菌耐药基因检测的研究现状. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 510-516

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/510.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)在人群中传播广泛, 致病性强, *H pylori* 的感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌以及胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤密切相关, *H pylori* 的清除与根治, 直接关系到这些疾病的转归及预后^[1-5]。随着抗生素的广泛应用, *H pylori* 耐药菌株的发生率逐年上升, 根除的难度逐渐增加。最近报道 *H pylori* 耐药是全球性的, 其耐药是导致根除治疗失败的主要原因^[6-7]。对 *H pylori* 根除治疗的常用抗生素有: 克拉霉素、甲硝唑、阿莫西林、四环素及喹诺酮类等, 大多数 *H pylori* 菌株对这些抗生素的耐药是由突变引起的, 包括自发突变和通过耐药信息的传递引起的突变等。 *H pylori* 对抗生素耐药的检测目前已经不再局限于传统的药物敏感性试验, 由传统的细菌培养、药物敏

■同行评议者

杨昭徐, 教授, 首都医科大学附属北京天坛医院消化科

感试验逐渐转向分子生物学检测方法, 耐药基因突变的检测若能成为*H pylori*检查的常规项目, 无论从患者的医药费开支还是药物对患者引起的不良反应方面, 均有重要意义, 本文就目前对*H pylori*耐药基因检测的最新进展作一综述。

1 *H pylori*对克拉霉素耐药的基因检测

克拉霉素的化学名称是6-甲基红霉素, 是当前应用最广泛的大环内酯类抗生素。该药具有耐酸和能溶解于酸性pH胃液中的特性及*po*后生物利用率高、副作用少等优点。因而, 近年新的抗*H pylori*三联或四联治疗方案中将其作为主要首选药物。克拉霉素的抗菌机制是药物穿透入菌体细胞内, 与核糖体紧密结合, 作用于23S rRNA V区的多肽转移环, 抑制多肽转移酶, 影响核糖体的移位过程, 阻止肽链延长, 从而抑制细菌蛋白质的合成, 达到杀菌目的。但是据报道克拉霉素对敏感菌株和耐药菌株的根除率分别为95%和40%^[8]。关于*H pylori*对克拉霉素的耐药机制, 比较一致的观点是*H pylori* 23S rRNA基因点突变引起克拉霉素与核糖体结合力下降^[9-10], 突变位点包括A2142G、A2142C、A2143G、A2143C、T2717C、T2182C、A2144T、C2245T、T2289C等^[11-15], 其中主要突变位点是: A2142G、A2142C和A2143G。新近快速发展的应用分子生物学技术检测*H pylori*耐药性的实验方法多是检测上游突变位点。用来检测的样本主要为活检胃组织、胃液, 以及近年来备受关注的可用来无创检测的粪便样本等。检测的方法主要是基于分子生物学的PCR技术, 其中近年来应用较广, 效果较好的检测方法有以下几种:

1.1 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术(PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP)

PCR-RFLP是将目的基因片段PCR扩增后, 利用多种限制性内切酶对扩增产物进行酶切, 不同的基因序列会产生不同的酶切产物, 从而产生不同的电泳图谱, 通过与标准物的对比即可检测出有无变异。Fontana *et al*^[16]先利用半巢式PCR扩增长约783 bp的23S rRNA基因, 扩增的敏感度和特异度均为100%, 然后用限制性内切酶*Bsa* I (A2143G), *Mbo* II (A2142C/G), 和*Hha* I (T2717C)切割目的片段, 可以检测23S rRNA基因点突变的位点。Rimbara *et al*^[17]用巢式PCR-RFLP技术检测粪便中的23S rRNA基因的点突变, 结果在耐药菌株(MIC>1 mg/L)中检测出A2143G位点的突变, Sevin

et al^[18]用此方法检测出A2143G和A2144G位点的突变, 与通过培养*H pylori*来检测耐药菌株的方法相比, 此方法简单、敏感、准确, 是一种非创伤性的检测方法, 临床应用前景广阔, 但是存在临床标本易被污染的缺点。

1.2 实时定量PCR(real-time PCR) 结合解链曲线(melting curve)分析技术

此方法的基本原理是寡核苷酸探针与模板结合时, 不匹配碱基将显著影响双链解链温度(*T_m*), 探针与模板完全配对时的*T_m*值比单个碱基错配时的*T_m*值要高, 通过LightCycler实时监测升温时Cy5的荧光信号强度变化以LightCycler软件生成的解链曲线, 了解不同扩增产物的*T_m*值, 便可判断耐药基因的突变。Schabereiter-Gurtner *et al*^[19]应用实时定量PCR结合解链曲线分析的方法, 分别检测92个*H pylori*感染的胃组织标本及粪便标本, 结果显示野生型*H pylori*解链温度为63℃, A2142C突变的菌株解链温度为58℃, A2142G和A2143G突变的菌株解链温度为54℃, 用E-test检测患者的标本, 耐药菌株的最小抑菌浓度(MIC)≥1.0 mg/L, 92例患者中有11例对克拉霉素耐药, 相比之下实时定量PCR检测活检组织有9例耐药, 粪便样本检测中有8例耐药, 其敏感度为64%, 特异度分别为94%和97%。此方法简单准确, 除可以用来检测克拉霉素耐药基因以外, 其检测*H pylori*感染的敏感度和特异度都达到了90%以上, 是检测*H pylori*治疗后情况的一种非创伤性的方法。

1.3 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH) PCR-FISH

是将DNA探针用特殊修饰的核苷酸分子标记(如biotin-dUTP或digoxigenin-dUTP), 然后将标记的探针直接原位杂交到染色体或DNA纤维切片上, 再用与荧光素分子偶联的单克隆抗体与探针分子特异性结合来检测DNA序列在染色体或DNA纤维上的定位。*H pylori*对克拉霉素耐药性的3个突变位点可以特异性的被ClaR1(A2143G), ClaR2(A2144G), 及ClaR3(A2143C)探针所标记, 不同的突变位点对应不同的抗生素最小抑菌浓度, ClaR1>64 mg/L, ClaR2和ClaR3抑菌浓度为8-64 mg/L^[20-22]。Morris *et al*^[20]应用琼脂扩散法确定的敏感与耐药样本, 从286例*H pylori*培养阳性的样本中, 随机选取35例克拉霉素敏感样本和33例克拉霉素耐药样本, 对PCR-FISH的检验效能进行验证, 结果表明PCR-FISH对克拉霉素耐药检测的敏感度达94%, 特异度达86%, 并且此方法可以解释用琼脂扩散法确定的敏感菌株为何治疗失败, 因其在对克拉霉素耐药和敏感的混合菌株。但

■研发前沿

目前对*H pylori*研究的重点是耐药基因及其检测, 开发快速、敏感、价廉的应用分子生物学技术对其耐药基因进行检测, 并应用于临床, 成为亟待解决的问题。

■相关报道

胡伏莲 *et al* 在 *H pylori* 耐药研究进展中, 从 *H pylori* 的流行病学、耐药机制、根除失败原因、治疗及研制和开发 *H pylori* 疫苗的重要性进行了多层次分析。

是也存在此法不能确定除克拉霉素外其他抗生素的耐药性。此方法具有快速、特异性高、准确、经济的优点, 是检测 *H pylori* 感染及其对大环内脂类抗生素敏感性的方法^[23]。

1.4 以PCR为基础的变性高效液相色谱分析技术(PCR-based denaturing high-performance liquid chromatography assay, PCR-DHPLC) PCR-DHPLC检测系统的原理是基于未解链的和部分解链的双链DNA在部分失活条件下具有不同保留的性质。杂合子个体的DNA经PCR扩增产生异源双链, 由于错配位点的氢键被破坏, 因此在异源双链上形成“鼓泡”, 导致他与纯合子个体的DNA扩增产物(完全匹配的同源双链)的解链特征不同。在部分加热变性的条件下, 异源双链DNA分子更易于解链形成Y形结构, 与固定相的结合能力降低, 将先于同源双链被洗脱出来, 带有突变序列的样品呈现出异源双链和同源双链混合物的峰形特点, 而不含突变序列的样品则只有同源双链的峰形。据此可检测出含有单个碱基的置换、插入或缺失的异源双链片段, 从而提供有无突变的信息, 然后再利用序列分析的方法来确定突变的类型和位点。Posteraro *et al*^[24]用此方法检测94例 *H pylori* 感染的样本, 结果发现有51例存在对克拉霉素的耐药, 与E-test的检验结果一样, 其敏感度和特异度都达到100%, 并且分析检测的51例耐药菌株的DNA序列, 发现有25例A2143G突变, 15例A2142G突变, 7例A2142C突变, 此外还发现了3例T2182C突变, 1例C2195T突变, 此方法是一种简单, 快速, 功能强大发现基因突变的技术, 使临床上检测耐药基因的突变成为可能, 但是只能提供样本有无突变的信息, 需要结合序列分析才能得出具体的突变类型。

1.5 优势同源形成分析技术(preferential homoduplex formation assay, PHFA) PHFA是根据同源双链较异源双链优先形成的原理, 将双标记的双链DNA探针与未标记的双链DNA样品进行混合、变性, 当标记的DNA的序列与未标记的DNA序列相同时, 同源双链之间可以进行杂交。由于未标记的DNA分子的稀释, 双标记的双链DNA的比例将会减少。当两者的DNA序列不相同甚至仅一个碱基存在差异时, 同源双链优先形成, 双标记双链DNA分子的比例不会减少。在双标记双链DNA中, 一条标有生物素的DNA链可通过生物素与亲和素之间的亲和力和连接于亲和素包被的微量滴定板上, 当加

入碱性磷酸酶标记的抗DNP抗体和硝基苯酚磷酸盐(p-NPP), 标有DNP的DNA链就可以通过与酶标DNP抗体和p-NPP结合发生的显色反应进行检测。通过制备针对 *H pylori* 23S rRNA基因特定位点突变的双标记双链DNA探针, 可以检测耐药的突变基因。Maeda *et al*^[25]应用PHFA测定412例 *H pylori* 感染的患者23S rRNA基因的突变, 发现337例是纯野生菌株感染, 38例发生单纯A2144G突变, 37例存在野生菌株和突变菌株的混合感染(30例A2144G突变, 5例A2143G突变, 2例A2144G突变和A2143G突变)。与琼脂糖稀释法作比较测定186例 *H pylori* 感染的患者, 结果显示PHFA测定的纯野生菌株感染的149例中有147例在琼脂糖稀释法中的最小抑菌浓度小于0.2 mg/L, 纯突变菌株感染的18例最小抑菌浓度都大于3.13 mg/L, 而在19例混合菌株感染的病例中, 10例最小抑菌浓度小于0.1 mg/L, 9例大于3.13 mg/L, 其敏感度达到95%以上, 并且与PCR-RFLP相比较, PHFA最大的优势是可以检测到只有10个基因拷贝的 *H pylori*, 检测出耐药菌株和野生菌株同时感染的患者。

1.6 反向杂交 反向杂交是用标记的待检测核酸与未标记的固化DNA探针杂交, 目前研究较多的是PCR线性探针分析(PCR-line probe assay[LiPA])。PCR-LiPA检测 *H pylori* 23S rDNA突变的位点, 即先用PCR的方法, 以生物素标记的引物来扩增23S rDNA的某一基因片段, 生物素化的PCR扩增产物变性后, 再与固定在硝酸纤维素膜上的特殊寡聚核苷酸探针杂交, 从而确定有无突变及突变的位点。van Doorn *et al*^[26]通过多中心实验研究, 在不同国家六个实验室的299例 *H pylori* 感染的患者中, 利用最小抑菌浓度试验区分出133例耐药菌株和169例敏感菌株, 而利用PCR-LiPA技术检测其结果在133例耐药菌株中127例存在23S rDNA点突变, 其主要突变位点A2143G占45.2%, A2142G占33.3%。而多位点突变占19.8%, 在169例敏感菌株中167例未发生基因突变。其敏感度和特异度都在95%以上, 此方法准确可靠, 并且可以检测多个耐药基因位点的突变, 其临床发展前景十分广泛。

2 *H pylori*对硝基咪唑类似物耐药的基因检测

近年 *H pylori* 对硝基咪唑的耐药也呈上升趋势, 严重影响 *H pylori* 的根除。据报道, 兰索拉唑+克拉霉素+甲硝唑的三联疗法对咪唑敏感菌株的 *H pylori* 根除率为83%, 而对耐药菌株的根除率仅为63%^[27]。硝基咪唑类药物治疗 *H pylori* 的主要

机制是在特有的低氧化还原电势和硝基还原酶的作用下, 还原产生亚硝基衍生物和羟胺衍生物引起DNA的损伤和细菌的死亡^[28]. 研究表明 *H pylori* 对硝基咪唑耐药性的产生, 主要是由于无法获得足够低的氧化还原电位^[29]. *H pylori* 有多个硝基还原酶, 包括: NADPH黄素氧化还原酶、氧不敏感的NAPH硝基还原酶、铁氧还蛋白和黄素氧还蛋白等, 其中 $rdxA$ 基因编码的氧不敏感的NADPH硝基还原酶起主要作用^[30-31]. $rdxA$ 基因的突变包括易位突变、错义突变、片段缺失、片段插入等, 可使此酶活性降低, 是导致 *H pylori* 对硝基咪唑耐药的主要机制^[32-33]. 但是 rdx 突变类型与耐药程度不相关, 而且发现耐药菌株来自敏感菌株 rdx 基因的起始突变, 并非水平基因的转移. 此外 $frxA$ 基因(编码黄素氧化还原酶)、 $frxB$ 基因(编码铁氧还蛋白类类似物)、 $rdxA$ 基因、 $rdxB$ 基因、 $porA$ 基因的突变也可能影响 *H pylori* 对硝基咪唑类药物的耐药^[34-35], Han *et al*^[36]研究发现 $frxA$ 基因突变能够增强 rdx 基因突变导致的耐药性.

虽然硝基咪唑类药物的耐药与 rdx 基因和其他编码还原酶的基因突变有关, 但是到目前为止还没有一种高效的分析方法检测硝基咪唑类药物的耐药. 公认的检测 *H pylori* 抗生素敏感性方法, 如琼脂糖稀释法、E-test、肉汤微量稀释法等检测硝基咪唑类药物耐药方面得不到满意的结果, 且这些方法费时, 费用高, 技术含量要求较高, 需胃镜下取材, 给患者带来一定的痛苦和创伤. 目前对甲硝唑的耐药的检测主要有两种分子生物学技术.

2.1 免疫印迹法 Latham *et al*^[37]用PCR扩增26695菌株中的 $rdxA$ 基因, 扩增产物经限制性内切酶 *EcoR* I and *Pst* I 酶切后的限制性片段转入到质粒表达载体PMAL-C2上, 用亲和层析法得到净化的MalE- $rdxA$ 融合蛋白(M_r 66 000), 和费氏完全佐剂一起免疫兔子, 6 wk之后分离得到抗 $rdxA$ 蛋白抗体. 再利用免疫印迹的方法, 用特异性的抗 $rdxA$ 蛋白抗体检测耐药菌株, 结果发现27株甲硝唑耐药菌中有25株存在 M_r 24 000 $rdxA$ 蛋白的免疫化合物缺失(93%), 而17株甲硝唑敏感菌株均表达此蛋白. 此方法的最大优点是能够检测出所有影响 $rdxA$ 基因表达的耐药菌株, 包括那些用核苷酸序列分析没有被发现的菌株, 有望成为新的用于临床的检测方法.

2.2 PCR-RFLP 田拥军 *et al*^[38]利用PCR-RFLP将 $rdxA$ 基因分成两个基因型: $rdxA$ 基因 I 型和

$rdxA$ 基因 II 型, 同时与甲硝唑耐药进行统计学分析, 有显著意义, 其 $rdxA$ 基因 II 型中耐药菌株占84%, 敏感菌株占16%. 可以认为 $rdxA$ 基因 II 型是 *H pylori* 耐甲硝唑的特征型别, 如果菌株为 II 型, 则耐药机率大.

3 *H pylori* 对阿莫西林耐药的基因检测

阿莫西林是用于治疗 *H pylori* 感染的唯一 β 内酰胺药物, 其对 *H pylori* 的MIC非常低, β 内酰胺类抗生素能穿越细菌细胞壁, 与细菌内膜的青霉素结合蛋白结合, 干扰细胞壁合成导致细菌死亡. 由于这些位点能与青霉素G共价结合, 故称之为青霉素结合蛋白酶(penicillin-binding protease, PBP). 尽管过去20多年中阿莫西林广泛用于抗菌治疗, 但 *H pylori* 对阿莫西林的耐药仍非常少见^[39]. 对阿莫西林耐药的 *H pylori* 菌株中没有检测到 β 内酰胺酶活性, 其基因的青霉素结合位点的突变是引起阿莫西林耐药的原因. Dore *et al*^[40]报道阿莫西林耐药株仅有3种青霉素结合蛋白酶(PBP-A、B、C), 其PBP-D缺失, 敏感菌株中PBP 4种成分都有. 表明PBP-D表达的改变在 *H pylori* 对阿莫西林的耐药中起重要作用. DeLoney *et al*^[41]报道的结果为: PBP1结合能力的下降和细胞对 β -内酰胺类抗生素的摄取能力下降为 *H pylori* 对阿莫西林耐药的主要原因. 在分子水平的研究显示PBP1的氨基酸序列发生改变导致PBP与阿莫西林的结合力下降, 并且细胞内青霉素的浓度也由于 *H pylori* 质子泵蛋白B、C的结构改变而下降^[42]. 目前研究 *H pylori* 对阿莫西林耐药基因的检测的方法很少, 其 *H pylori* 对阿莫西林的最小抑菌浓度的报道也没有统一的标准. Gerrits *et al*^[43]提出的在PBP1A基因多重突变变化是 *H pylori* 对阿莫西林耐药的主要原因, 目前这项研究的发现否定了用分子生物学技术快速检测 *H pylori* 对阿莫西林耐药的可能性.

4 *H pylori* 对喹诺酮耐药的基因检测

随着 *H pylori* 对克拉霉素和甲硝唑类的耐药率不断地上升, 喹诺酮类作为二线根除 *H pylori* 的抗生素成为关注的重点^[44], 对喹诺酮类耐药性的研究也越来越多^[45-47]. 喹诺酮类药物主要是抑制细菌复制过程中所必需的DNA回旋酶和拓扑异构酶IV的作用, 从而抑制细菌的繁殖, 产生抗菌活性. DNA回旋酶的A、B两个亚单位分别由 $gyrA$ 和 $gyrB$ 基因编码, 而拓扑异构酶IV的C亚单位和两个E亚单位分别由 $parC$ 和 $parE$ 基因编码. 其中 $gyrA$ 和 $parC$ 基因突变导致的耐药比

■创新盘点

本文根据国内外最新资料, 分析了目前 *H pylori* 对抗生素的耐药及其耐药基因位点的突变, 并对目前研究的多种分子生物学技术的原理及其检测耐药基因的优缺点做了相应的比较.

■应用要点

分子生物学技术对*H pylori*基因的耐药位点进行检测,必将提高*H pylori*的根除率。

较常见,突变位点集中的区域称为喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance-determining region, QRDR)^[48],这个区域内发生基因突变会导致大部分细菌产生高水平的耐药。研究显示,*H pylori*对喹诺酮类抗生素的耐药机制主要是由于编码回旋酶的*gyrA*基因QRDR区域内点突变造成的^[49],*gyrA*基因突变相对应的氨基酸位置主要有87位天冬酰胺突变为赖氨酸,88位丙氨酸突变为缬氨酸,91位天冬氨酸突变为谷氨酸,或者天冬酰胺,或者酪氨酸^[50],此外Cattoir *et al*^[51]发现了三个新的突变位点分别是86位天冬氨酸突变为天冬酰胺、87位苏氨酸突变为异亮氨酸、87位天冬酰胺突变为丙酮酸,并且发现后两种87位氨基酸突变与*H pylori*对喹诺酮类抗生素的获得性耐药有关。目前*H pylori*在传统的检测抗生素敏感的试验中存在易污染和生长不足的缺点,Glocker *et al*^[52]应用实时定量PCR结合荧光共振能转换技术(fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR)对*gyrA*基因进行检测,结果发现87位氨基酸基因突变菌株的解链温度为48.7℃,91位氨基酸基因突变的解链温度分别为:58.5℃、52℃、44.6℃,而野生型菌株的解链温度分别为57℃和47.4℃,从而可以检测出对喹诺酮类药物耐药的菌株,筛选出敏感的患者用喹诺酮类药物进行*H pylori*根除治疗。

5 *H pylori*对四环素耐药的基因检测

四环素是一种廉价有效的治疗*H pylori*感染的抗生素。作为二线治疗的药物,四环素通过结合核糖体的30S小亚基,阻止蛋白质的翻译过程达到抗菌的目的,主要的结合点位于16S rRNA区域^[53]。但是近几年来据报道,四环素耐药性显著的增加。Dailidienne *et al*^[54]已经从159例临床病例中分离出六种四环素耐药的菌株。研究发现16S rRNA基因的突变是导致四环素耐药的主要机制。其分离的六个耐药菌株中有五个是16S rRNA基因发生突变。Gerrits *et al*^[55]发现16S rRNA基因的三个碱基对AGA926-928突变为TTC与*H pylori*对四环素高水平的耐药(MIC 8-64 mg/L)有关,而单个碱基对或者两个碱基对的突变只会导致低水平的耐药(MIC<4 mg/L)或者*H pylori*生长速度的减慢。而Nonaka *et al*^[56]研究发现16S rRNA的965-967位点的核苷酸的替换也和四环素的耐药有关。目前研究其耐药机制并不单纯集中在16S rRNA基因突变上,还与幽门螺杆菌细胞膜的通透性等多方面的因素有关。

传统对四环素的敏感检测主要为琼脂扩散法和琼脂稀释法,但是其检测缓慢、费时,并且其培养过程中存在*H pylori*生长缓慢、易被其他细菌污染的缺点,目前对其耐药基因的检测主要集中在分子生物学技术,实时定量PCR技术发展成为其快速准确检测16S rRNA点突变的主要技术^[57-58],Lawson *et al*^[57]利用实时定量PCR技术从1006例*H pylori*感染的患者中检测出18例患者对四环素降低了敏感性,其野生型菌株的解链温度68℃,而点突变A928C的解链温度是66℃,A926C的解链温度是64℃,A926G的解链温度是63℃,A926T/A928C的解链温度是62℃,三个碱基对AGA926-928突变为TTC的解链温度是61℃,从而可以确定*H pylori*菌株的耐药性。

了解*H pylori*的耐药状况对选择正确的治疗方案有非常重要的作用^[59],上述分子生物学检测技术何时成为一种快速敏感价廉的方法,对*H pylori*耐药基因进行检测,并广泛的应用到临床,成为目前研究的重点,相信在不远的将来必会有新的研究方法应用到临床,指导临床医生选择合理有效的抗生素,提高*H pylori*的根除率。

6 参考文献

- 1 Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-2115
- 2 Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med* 1994; 120: 977-981
- 3 Asenjo LM, Gisbert JP. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in gastric MALT lymphoma: a systematic review. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 398-404
- 4 Egi Y, Ito M, Tanaka S, Imagawa S, Takata S, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Role of *Helicobacter pylori* infection and chronic inflammation in gastric cancer in the cardia. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 365-369
- 5 Araujo-Filho I, Brandao-Neto J, Pinheiro LA, Azevedo IM, Freire FH, Medeiros AC. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in advanced gastric carcinoma. *Arq Gastroenterol* 2006; 43: 288-292
- 6 McMahon BJ, Hennessy TW, Bensler JM, Bruden DL, Parkinson AJ, Morris JM, Reasonover AL, Hurlburt DA, Bruce MG, Sacco F, Butler JC. The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for *Helicobacter pylori* infections. *Ann Intern Med* 2003; 139: 463-469
- 7 Ziemniak W. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication taking into account its resistance to antibiotics. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 3: 123-141
- 8 Bazzoli F, Berretti D, De Luca L, Nicolini G, Pozzato

- P, Fossi S, Zagari M. What can be learnt from the new data about antibiotic resistance? Are there any practical clinical consequences of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11 Suppl 2: S39-S42; discussion S43-S45
- 9 Megraud F. Basis for the management of drug-resistant *Helicobacter pylori* infection. *Drugs* 2004; 64: 1893-1904
- 10 Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Griffy MV, Beyer J, Flamm RK, Tanaka SK, Graham DY, Go MF. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 477-480 2002; 8: 70-73
- 11 Fontana C, Favaro M, Minelli S, Criscuolo AA, Pietroiusti A, Galante A, Favalli C. New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3765-3769
- 12 Kim KS, Kang JO, Eun CS, Han DS, Choi TY. Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 599-603
- 13 Khan R, Nahar S, Sultana J, Ahmad MM, Rahman M. T2182C mutation in 23S rRNA is associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates obtained in Bangladesh. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3567-3569
- 14 Hao Q, Li Y, Zhang ZJ, Liu Y, Gao H. New mutation points in 23S rRNA gene associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin in northeast China. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1075-1077
- 15 Toracchio S, Aceto GM, Mariani-Costantini R, Battista P, Marzio L. Identification of a novel mutation affecting domain V of the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2004; 9: 396-399
- 16 Fontana C, Favaro M, Pietroiusti A, Pistoia ES, Galante A, Favalli C. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in stool samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3636-3640
- 17 Rimbara E, Noguchi N, Yamaguchi T, Narui K, Kawai T, Sasatsu M. Development of a highly sensitive method for detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from human feces. *Curr Microbiol* 2005; 51: 1-5
- 18 Sevin E, Lamarque D, Delchier JC, Soussy CJ, Tankovic J. Co-detection of *Helicobacter pylori* and of its resistance to clarithromycin by PCR. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 165: 369-372
- 19 Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kovach Z, Rotter M, Makristathis A. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4512-4518
- 20 Morris JM, Reasonover AL, Bruce MG, Bruden DL, McMahon BJ, Sacco FD, Berg DE, Parkinson AJ. Evaluation of seaFAST, a rapid fluorescent in situ hybridization test, for detection of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin in paraffin-embedded biopsy sections. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3494-3496
- 21 Yilmaz O, Demiray E. Clinical role and importance of fluorescence in situ hybridization method in diagnosis of *H pylori* infection and determination of clarithromycin resistance in *H pylori* eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 671-675
- 22 Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, Kist M, Heesemann J, Haas R. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut* 2000; 46: 608-614
- 23 Can F, Yilmaz Z, Demirbilek M, Bilezikci B, Kunefeci G, Atac FB, Selcuk H, Arslan H, Boyacioglu S, Sahin FI. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance by fluorescence in situ hybridization from formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens. *Can J Microbiol* 2005; 51: 569-573
- 24 Posteraro P, Branca G, Sanguinetti M, Ranno S, Cammarota G, Rahimi S, De Carlo M, Posteraro B, Fadda G. Rapid detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* using a PCR-based denaturing HPLC assay. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 71-78
- 25 Maeda S, Yoshida H, Matsunaga H, Ogura K, Kawamata O, Shiratori Y, Omata M. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains by a preferential homoduplex formation assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 210-214
- 26 van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, Queiroz DM, Nouhan N, Stet E, Quint WG. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1500-1504
- 27 Poon SK, Chang CS, Su J, Lai CH, Yang CC, Chen GH, Wang WC. Primary resistance to antibiotics and its clinical impact on the efficacy of *Helicobacter pylori* lansoprazole-based triple therapies. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 291-296
- 28 Jorgensen MA, Manos J, Mendz GL, Hazell SL. The mode of action of metronidazole in *Helicobacter pylori*: futile cycling or reduction? *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 67-75
- 29 Cederbrant G, Kahlmeter G, Ljungh A. Proposed mechanism for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 115-120
- 30 Solca NM, Bernasconi MV, Piffaretti JC. Mechanism of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*: comparison of the rdxA gene sequences in 30 strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2207-2210
- 31 Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg DE, Hoffman PS. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol* 1998; 28: 383-393
- 32 Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Dailidienė D, Wang Y, Velapattino B, Gilman RH, Parkinson AJ, Nair GB, Wong BC, Lam SK, Mistry R, Segal I, Yuan Y, Gao H, Alarcon T, Brea ML, Ito Y, Kersulyte D, Lee HK, Gong Y, Goodwin A, Hoffman PS, Berg DE. Sequential inactivation of rdxA (HP0954) and frxA (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2000; 182: 5082-5090
- 33 Jenks PJ, Edwards DI. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 1-7
- 34 Hughes NJ, Clayton CL, Chalk PA, Kelly DJ.

■名词解释

PCR为基础的变性高效液相色谱分析技术(PCR-DHPLC): 由于杂合子个体和纯合子个体的DNA扩增产物的解链特征不同, 在部分加热变性的条件下, 根据色谱峰形的不同来确定有无突变, 然后再利用序列分析的方法来确定突变的类型和位点。

■同行评价

本文立意较新颖,且参考文献较新,行文流畅,是一篇较好的文章,有一定的参考价值。

- Helicobacter pylori porCDAB and oorDABC genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP. *J Bacteriol* 1998; 180: 1119-1128
- 35 Matteo MJ, Perez CV, Domingo MR, Olmos M, Sanchez C, Catalano M. DNA sequence analysis of rdxA and frxA from paired metronidazole-sensitive and -resistant Helicobacter pylori isolates obtained from patients with heteroresistance. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 152-158
- 36 Han F, Liu S, Ho B, Yan Z, Yan X. Alterations in rdxA and frxA genes and their upstream regions in metronidazole-resistant Helicobacter pylori isolates. *Res Microbiol* 2007; 158: 38-44
- 37 Latham SR, Owen RJ, Elviss NC, Labigne A, Jenks PJ. Differentiation of metronidazole-sensitive and -resistant clinical isolates of Helicobacter pylori by immunoblotting with antisera to the RdxA protein. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3052-3055
- 38 田拥军, 胡国平, 刘战利, 熊汉华, 张正茂, 叶嗣颖. 幽门螺杆菌耐甲硝唑基因分型与耐药性关系研究. *中国微生态学杂志* 2002; 14: 252-253
- 39 Toro C, Garcia-Samaniego J, Carbo J, Iniguez A, Alarcon T, Lopez-Brea M, Baquero M. Prevalence of primary Helicobacter pylori resistance to eight antimicrobial agents in a hospital in Madrid. *Rev Esp Quimioter* 2001; 14: 172-176
- 40 Dore MP, Graham DY, Sepulveda AR. Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant Helicobacter pylori. *Helicobacter* 1999; 4: 154-161
- 41 DeLoney CR, Schiller NL. Characterization of an In vitro-selected amoxicillin-resistant strain of Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3368-3373
- 42 Co EM, Schiller NL. Resistance mechanisms in an in vitro-selected amoxicillin-resistant strain of Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4174-4146
- 43 Gerrits MM, Godoy AP, Kuipers EJ, Ribeiro ML, Stof J, Mendonca S, van Vliet AH, Pedrazzoli J Jr, Kusters JG. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to Helicobacter pylori. *Helicobacter* 2006; 11: 181-187
- 44 Vaira D, Ricci C, Lanzini A, Perna F, Romano A, Corinaldesi R. How to proceed in Helicobacter pylori-positive chronic gastritis refractory to first- and second-line eradication therapy. *Dig Dis* 2007; 25: 203-205
- 45 Nishizawa T, Suzuki H, Umezawa A, Muraoka H, Iwasaki E, Masaoka T, Kobayashi I, Hibi T. Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in gyrA of Helicobacter pylori by allele-specific PCR. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 303-305
- 46 Nishizawa T, Suzuki H, Kurabayashi K, Masaoka T, Muraoka H, Mori M, Iwasaki E, Kobayashi I, Hibi T. Gatifloxacin resistance and mutations in gyra after unsuccessful Helicobacter pylori eradication in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1538-1540
- 47 Zullo A, De Francesco V, Scaccianoce G, Manes G, Efrati C, Hassan C, Maconi G, Piglionica D, Cannaviello C, Panella C, Morini S, Ierardi E. Helicobacter pylori eradication with either quadruple regimen with lactoferrin or levofloxacin-based triple therapy: a multicentre study. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 806-810
- 48 Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1271-1272
- 49 Hughes NJ, Clayton CL, Chalk PA, Kelly DJ. Helicobacter pylori porCDAB and oorDABC genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP. *J Bacteriol* 1998; 180: 1119-1128
- 50 Moore RA, Beckthold B, Wong S, Kureishi A, Bryan LE. Nucleotide sequence of the gyrA gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 107-111
- 51 Cattoir V, Nectoux J, Lascos C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, Soussy CJ, Cambau E. Update on fluoroquinolone resistance in Helicobacter pylori: new mutations leading to resistance and first description of a gyrA polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 389-396
- 52 Glocker E, Kist M. Rapid detection of point mutations in the gyrA gene of Helicobacter pylori conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2241-2246
- 53 Trieber CA, Taylor DE. Mutations in the 16S rRNA genes of Helicobacter pylori mediate resistance to tetracycline. *J Bacteriol* 2002; 184: 2131-2140
- 54 Dailidienė D, Bertoli MT, Miculeviciene J, Mukhopadhyay AK, Dailide G, Pascasio MA, Kupcinskas L, Berg DE. Emergence of tetracycline resistance in Helicobacter pylori: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3940-3946
- 55 Gerrits MM, Berning M, Van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. Effects of 16S rRNA gene mutations on tetracycline resistance in Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 2984-2986
- 56 Nonaka L, Connell SR, Taylor DE. 16S rRNA mutations that confer tetracycline resistance in Helicobacter pylori decrease drug binding in Escherichia coli ribosomes. *J Bacteriol* 2005; 187: 3708-3012
- 57 Lawson AJ, Elviss NC, Owen RJ. Real-time PCR detection and frequency of 16S rDNA mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in Helicobacter pylori from England and Wales. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 282-286
- 58 Glocker E, Berning M, Gerrits MM, Kusters JG, Kist M. Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3166-3170
- 59 Sung H, Chung HJ, Kim MN, Lee GH. Clinical Usefulness of Antimicrobial Susceptibility Test for Helicobacter pylori. *Korean J Lab Med* 2006; 26: 179-184

胆道梗阻再通术后肾脏AQP3的变化及其意义

李云飞, 刘金钢

李云飞, 暨南大学附属第一医院急诊科 广东省广州市 510632

刘金钢, 中国医科大学盛京医院第二胆道微创外科 辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 李云飞对此文贡献为主; 此课题由刘金钢牵头主持; 研究过程以李云飞为主操作完成; 数据分析和论文写作由李云飞完成; 刘金钢进行了审核和指导。

通讯作者: 刘金钢, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛京医院第二胆道微创外科. fuqierren@sohu.com
电话: 020-38688102

收稿日期: 2007-10-22 修回日期: 2008-01-15

Change of renal aquaporin 3 expression in rats after release of obstructive jaundice and its significance

Yun-Fei Li, Jin-Gang Liu

Yun-Fei Li, Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Jin-Gang Liu, Department of the Second Minimally Invasive Surgery and Biliary Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Jin-Gang Liu, Department of the Second Minimally Invasive Surgery and Biliary Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. fuqierren@sohu.com

Received: 2007-10-22 Revised: 2008-01-15

Abstract

AIM: To study the change of renal aquaporin 3 (AQP3) expression in rats after release of obstructive jaundice in biliary tract and its significance.

METHODS: Fifty Wistar rats were divided into control group ($n = 10$) and experimental group ($n = 40$). A model of experimental obstructive jaundice was established. Seven days after release of obstructive jaundice, serum biochemical parameters were detected. Rats in the experimental group were randomly divided into five subgroups: OJ 0 h, OJ 24 h, OJ 72 h, OJ 1 wk and non-operated control (NC). Biochemical parameters in venous blood were detected and the expression level of renal AQP3 was determined by Western blot.

RESULTS: The TBIL and ALT gradually decreased after release of obstructive jaundice in biliary tract (TBIL: 93.26 ± 1.32 vs 63.31 ± 1.85 , 30.78 ± 1.40 , 5.04 ± 0.24 , $P < 0.05$; ALT: 70.95 ± 1.22 vs 69.96 ± 0.82 , 30.74 ± 1.52 , 11.84 ± 1.12 , $P < 0.05$). There was no significant difference in levels of BUN and Cr between the OJ 0 h and NC subgroups, but the expression level of AQP3 was lower in the OJ 0 h subgroup than in the NC subgroup. Both BUN and Cr were significantly decreased 24 h after operation and the expression of AQP3 was further decreased. The levels of BUN and Cr did not markedly change between the OJ 24 h and OJ 72 h subgroups. The expression level of AQP3 was slightly higher, but still lower in the OJ 24 h subgroup than in the NC subgroup ($P < 0.05$). The expression levels of BUN, Cr and AQP3 were not significantly different between the two groups 7 days after operation.

CONCLUSION: The renal function is further damaged after release of obstructive jaundice in biliary tract. The expression level of AQP3 becomes higher when renal function improves. The sensitivity and specificity of AQP3 are higher than those of BUN and Cr.

Key Words: Obstructive jaundice; Renal dysfunction; Aquaporin3; Urea Nitrogen; Serum creatinine

Li YF, Liu JG. Change of renal aquaporin 3 expression in rats after release of obstructive jaundice and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 517-521

摘要

目的: 探讨大鼠胆道梗阻再通术后肾脏水通道蛋白3(AQP3)的变化及其意义。

方法: 50只大鼠, 任选10只为对照组, 其余为实验组, 实验组先建梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)模型, 7 d后解除梗阻; 按取材时间不同随机分为5组: OJ 0 h、OJ 24 h、OJ 72 h、OJ 1 wk和NC。测定血生化指标, Western blot法检测肾脏AQP3水平。

结果: 随梗阻解除时间延长血清总胆红素

■背景资料

梗阻性黄疸围手术期可发生多种并发症, 其中以肾功能衰竭最为常见。肾脏AQP是一类功能性整合膜蛋白。研究表明, 肾功能受损时都伴有AQP的变化。但梗阻性黄疸术后肾脏AQP的变化及其意义尚少有研究。

■同行评议者

李胜, 研究员, 山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

■研究前沿

自AQP发现以来,肾脏AQP在各种条件下的变化一直是人们研究的热点。但梗阻性黄疸围手术期肾脏AQP的变化尚较少研究。本实验就胆道梗阻解除后肾脏AQP3的变化及其意义进行了探索,以期有所发现。

(TBIL)和谷丙转氨酶(ALT)逐渐下降(TBIL: 93.26 ± 1.32 vs 63.31 ± 1.85 , 30.78 ± 1.40 , 5.04 ± 0.24 , $P < 0.05$; ALT: 70.95 ± 1.22 vs 69.96 ± 0.82 , 30.74 ± 1.52 , 11.84 ± 1.12 , $P < 0.05$); OJ 0 h与NC相比尿素氮(BUN)、血肌酐(Cr)无明显变化($P > 0.05$), AQP3表达降低; OJ 24 h BUN、Cr下降, AQP3表达进一步降低。OJ 72 h与OJ 24 h相比BUN、Cr无明显变化, AQP3表达增强,但仍弱于NC($P < 0.05$); 到第7天, BUN、Cr和AQP3均与NC无明显差别。

结论: 大鼠胆道梗阻解除后短期内因肾功能受损加重, AQP3表达下降后随肾功能好转表达增强,其灵敏性和特异性均高于BUN和Cr。

关键词: 梗阻性黄疸; 肾功能衰竭; 水通道蛋白3; 尿素氮; 血肌酐

李云飞, 刘金钢. 胆道梗阻再通术后肾脏AQP3的变化及其意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 517-521

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/517.asp>

0 引言

水通道蛋白(aquaporin, AQP)是一组构成水通道并与水通透有关的细胞膜转运蛋白^[1]。迄今,在人体已发现13种^[2-3]。存在于肾脏的AQPs至少有7种,即AQP1-7,其中AQP3主要分布于集合管主细胞基底侧膜,在介导水通过集合管主细胞基底侧膜转运时起重要作用^[4]。AQP3除对水有高度通透性外,对尿素和甘油也有较高通透性,属可通透其他分子的AQP^[5-6]。研究表明,各种原因导致的肾功能衰竭都可使AQP3表达下降,但关于梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)术后肾脏AQP3的变化尚少有研究。本实验旨在探讨胆道梗阻解除后肾脏AQP3的变化及其意义。

1 材料和方法

1.1 材料 成年(鼠龄为4 wk)♂ Wistar大鼠,由中国医科大学实验动物中心提供,共50只、体重250-300 g,全部经检疫合格,实验前饲养7 d无疾病。任选10只作为对照组(NC),其余为实验组。主要实验器材和试剂包括Hitachi7600全自动生化分析仪、德国UP200H组织超声匀浆器、德国Heraus-Biofuge-PrimoR超速低温离心机、日本岛津UV-260紫外分光光度计、美国BIO-RAD-PAC300型垂直电泳槽、美国BIO-RAD MiniPROTEAN II cell型转印电泳槽、上海天能公司产GIS-2020型凝胶扫描成像系统; AQP-3一抗: SANTA CRUZ, AQP-3(C-18)SC-9885, 二抗:

SANTA CRUZ, SC-2351 BOVINE anti-goat IgG-AP; 电泳用聚丙烯酰胺凝胶、Tris及甘氨酸等均购自上海生物工程公司。

1.2 方法 所有大鼠术前12 h禁食, 4 h禁水, 以0.3 mL/100 g体质量的给药量腹腔内注射水合氯醛麻醉。术区备皮, 安尔碘消毒, 上腹正中切口长约1.5-2 cm入腹。实验组于肝门区游离胰胆总管, 7号丝线穿过胆总管下端暂不结扎, 丝线两端分别通过圆针在腹直肌外缘穿过肌层, 后用9号胰胆导管作为衬垫至于结扎处胆总管上打结, 力度适中, 以导管产生轻度形变为宜。然后逐层关腹。全程注意无菌操作。我们这里用7号丝线结扎, 可防丝线过细切断胆总管; 以胰管作衬垫, 可以利用导管的弹性确切的封闭胆总管, 又不至于使胆总管产生缺血坏死, 而且在解除梗阻时原切口入腹, 利用胰管做标记易于快速找到胆总管, 只需剪断胰管表面线结取出胰管便可做到梗阻的再通, 从而大大减轻了二次手术的打击。另外, 该模型也更符合临床病理生理, 因为梗阻性黄疸患者其胆道梗阻无外乎胆管内肿瘤或结石阻塞以及胆管外的异常压迫, 而并不是完全的胆总管离断或封闭^[7]。麻醉清醒后6 h自由进食标准大鼠饲料, 饮用自来水, 分笼饲养。每日以青霉素2万单位肌注以预防感染。假手术对照组仅打开腹腔游离胆总管, 不予结扎。

梗阻性黄疸模型建立后7 d, 动物无一死亡, 部分有轻微切口感染。两组大鼠分别称质量, 如前法麻醉、解除梗阻。实验组又按解除梗阻后的取材时间不同随机分为4组, 每组10只: OJ 0 h: 梗阻解除即刻取材组(相当于梗阻未解除时的情况); OJ 24 h: 梗阻解除24 h后取材组; OJ 72 h: 梗阻解除72 h后取材组; OJ 1 wk: 梗阻解除7 d后取材组; 按上述分组打开腹腔, 见实验各组不同程度的腹水。抽取腔静脉血5-8 mL, 保存于-20℃冰箱内待测生化指标; 取左侧肾脏称质量, 置于-80℃冰箱内待测AQP3(右侧肾脏另作他用), 肝脏也一并取出称质量。

全自动生化分析仪检测血清总胆红素(TBIL)、谷丙转氨酶(ALT)、尿素氮(BUN)、血肌酐(Cr)。

采用半定量免疫印迹(Western blot)检测肾脏AQP3。取肾脏标本(已作分组标记)用生理盐水冲净后剪碎, 加入10 mL细胞裂解液用组织超声匀浆器进行匀浆, 匀浆液4℃ 4000 g离心30 min, 去除完整的细胞、细胞核和线粒体等。然

表 1 各组动物体重(BW)、肾脏质量(LKW)、肝脏质量(LW)及生化指标($n=10$)

分组	BW(g)	LKW(g)	LW(g)	ALT(U/L)	TBIL(μ mol/L)	Cr(μ mol/L)	BUN(μ mol/L)
OJ 0 h	269.2 \pm 10.4 ^a	1.13 \pm 0.03 ^a	13.5 \pm 0.4 ^a	70.95 \pm 1.22	93.26 \pm 1.32	24.13 \pm 0.30	7.60 \pm 0.23
OJ 24 h	265.3 \pm 9.8 ^a	1.13 \pm 0.04 ^a	13.5 \pm 0.3 ^a	69.96 \pm 0.82	63.31 \pm 1.85	28.31 \pm 0.37 ^a	9.18 \pm 0.27 ^a
OJ 72 h	277.4 \pm 7.3	1.16 \pm 0.02	12.3 \pm 0.4	30.74 \pm 1.52	30.78 \pm 1.40	28.17 \pm 0.33	9.07 \pm 0.13
OJ 1 wk	278.4 \pm 9.4	1.17 \pm 0.02	12.4 \pm 0.5	11.84 \pm 1.12	5.04 \pm 0.24	24.09 \pm 0.22	7.54 \pm 0.33
NC	278.4 \pm 6.3	1.18 \pm 0.02	12.3 \pm 0.7	11.36 \pm 0.90	5.13 \pm 0.34	24.00 \pm 0.20	7.39 \pm 0.32

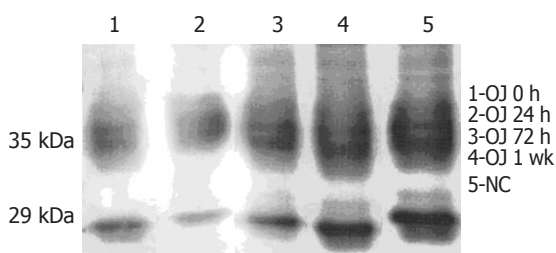
^a $P<0.05$ vs NC.

图 1 各组AQP3表达.

后取其沉淀(含膜的成分)加入裂解液进行匀浆, 4℃ 17 500 g 离心约1.5 h, 其上清富含膜蛋白, 用以进行电泳. 各取富含膜蛋白的上清样品 50 μ L, 在12%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳进行免疫印迹并转移到硝酸纤维素(NC)膜上; NC膜在1 \times TBS中浸泡10 min, 100 g/L脱脂奶粉封闭1 h, 1 \times TBS-T洗膜两次, 5 min/次; 浸入一抗溶液中4℃过夜取出NC膜, 用1 \times TBS快速洗一次, 后用1 \times TBS-T洗膜两次, 5min/次; 转到二抗溶液中浸泡2 h(室温), 1 \times TBS-T洗膜两次, 5 min/次, 1 \times TBS洗膜5 min, 染色至条带呈现, 终止染色. 用GIS-2020凝胶图象分析系统扫描分析结果.

统计学处理 数据均以mean \pm SD表示, 采用SPSS13.0统计软件包处理, 用单因素方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 各组动物体重(BW)、肾脏质量(LKW)、肝脏质量(LW)及生化测量结果 与NC组相比梗阻第7天(OJ 0 h)和梗阻解除后24 h(OJ 24 h), 体质量和肾脏质量明显减轻, 而肝脏质量则明显增加($P<0.05$); 至梗阻解除后72 h(OJ 72 h)到1 wk(OJ 1 wk), 体质量、肾脏质量和肝脏质量均恢复至与NC组无明显差异($P>0.05$); TBIL和ALT均随梗阻解除时间的延长而下降, 至术后1 wk(OJ 1 wk)恢复至与NC组无明显差异($P>0.05$); 梗阻第7 d时(OJ 0 h), Cr和BUN与对照组相比无

明显差异($P>0.05$), 在术后24 h(OJ 24 h)两者均显著升高($P<0.05$), 虽然术后72 h与24 h相比两者有下降趋势, 但没有明显差异($P>0.05$), 至术后1 wk恢复至与NC组无明显差异($P>0.05$, 表1).

2.2 Western blotting结果 胆道梗阻第7天(OJ 0 h)AQP3表达较NC组弱($P<0.05$); 梗阻解除后24 h(OJ 24 h)AQP3表达进一步减弱($P<0.05$); 至术后72 h(OJ 72 h)AQP3表达仍弱于NC组($P<0.05$), 但与OJ24 h、OJ0 h相比已有所升高($P<0.05$); 至术后1 wk(OJ 1 wk)AQP3表达与NC组相比已无明显差异($P>0.05$), 35 kDa和29 kDa分别为糖基化和未糖基化的AQP3(图1).

3 讨论

OJ是肝胆外科常见疾病. OJ围手术期可发生多种并发症如脓毒血症、胃肠道出血、急性肾功能衰竭(acute renal failure, ARF)等, 其中ARF最为常见. 在接受手术的OJ患者中约8%-9%发生ARF, 死亡率高达68%^[8-9].

导致OJ围手术期肾功能受损的因素十分复杂, 已有的研究表明, 缺血再灌注损伤、胆汁酸对肾脏的毒性作用、内毒素血症和一氧化氮(NO)及大量氧自由基等都是肾功能受损的危险因素^[10-15]. 本实验结果显示, 胆道梗阻时由于上述各种有害因素的作用使肾功能受损, AQP3合成受到抑制, 表达下降(OJ 0 h); 而解除梗阻后, 由于手术打击、麻醉等作用短期内使血内本已很高的胆红素进一步入血, 再加上其他有害因子使肾脏受损加重, AQP3表达进一步下降(OJ 24 h). 随各种损伤因子的减少, 肾功能逐渐改善, AQP3表达也逐渐增强, 直至恢复正常(OJ 72 h、OJ 1 wk、NC). 当然, 调节AQP3表达的因素众多, 如抗利尿激素(血管加压素)、盐皮质激素、血浆渗透压、糖皮质激素、胰岛素水平等均影响AQP3的表达^[16-20]. 胆道梗阻解除后这些因素的变化如何, 尚需进一步研究.

■ 相关报道

新近研究发现梗阻性黄疸时肾脏AQP2表达下调, 并发现多巴胺对其表达有调节作用.

■应用要点

检测AQP3有助于早期发现肾功能受损,从而指导临床更加及时地进行预防和治疗。

目前,监测肾功能变化的常用指标是BUN和Cr。但其只能定性不能定位,而且肾脏有强大的贮备能力,出现异常时肾脏疾病往往已进展到晚期。临床上,当肾小球滤过率(GFR)降至正常的25%-50%时,才发生氮质血症,Cr升高,但患者可仍无临床症状^[21]。肾活检虽能早期发现并判断肾脏受损的程度,但由于他的有创性,临床应用受到限制。因此,寻找一种灵敏度高、特异性强,又能从功能和结构两方面反映肾功能变化的指标十分必要。AQP3是肾小管上的功能性整合膜蛋白,分别定位于肾小管的不同部位。如本实验所示胆道梗阻第7天(OJ 0 h)时AQP3表达弱于NC组,显然说明肾脏功能受损;但此时BUN、Cr却与NC组无明显差异。另外,胆道梗阻解除后短期内(OJ 24 h)由于各种损伤因子对肾脏的损害加重,AQP3表达也进一步减弱,此时BUN、Cr才出现异常升高;术后3 d(OJ 72 h)BUN、Cr与OJ 24 h相比无明显变化,AQP3表达虽弱于NC组却较前两者(OJ 0 h、OJ 24 h)明显增强。这表明AQP3反映肾功能受损的灵敏性高于BUN、Cr,能更好地说明肾功能的变化。AQP3主要分布于集合管主细胞基底侧膜,其表达的下降和增强至少说明了这部分肾小管功能和结构的变化。到解除梗阻后第7天(OJ 1 wk)损害肾脏的各种因子逐渐下降,肾功能好转,AQP3表达恢复,BUN、Cr也降至正常。这说明通过检测肾脏AQP3可以早期发现胆道梗阻解除后肾功能不全,并能从结构和功能两方面反映肾功的变化,其灵敏度和特异性均好于BUN、Cr。最近,有研究表明,OJ大鼠肾脏AQP2的表达是进行性下降的^[22]。一个关于急性肾盂肾炎患儿尿液中AQP变化的研究发现,急性肾盂肾炎早期尿液AQP2的排泄显著高于NC组及治疗后的患儿,而AQP3则没有显著变化;该研究认为这可能是由于肾小管上皮细胞受损导致脱落入小管腔的顶质膜碎片增多所致^[23]。据此我们推测,由于AQP2是肾小管上的功能性整合膜蛋白,各种损伤因子使得肾小管上皮细胞坏死脱落,AQP2也存在其中随终尿排出,其多少与肾小管损伤程度成正比。国内许项立 *et al*^[24]研究认为可以通过检测尿液AQP2的量来预测充血性心力衰竭的程度,检测方法简单易行。我们是测量肾脏原位的AQP3,那么胆道梗阻再通术后尿液AQP3的变化如何;由于本研究所显示的AQP3对肾功能预测的灵敏性和其固有的特异性,如果可以通过检测尿液AQP3的变化来估计肾功能受损的

程度,则更有利于临床推广应用。这些都需要进一步深入研究。

大鼠胆道梗阻解除后短期内AQP3表达下降;随梗阻解除时间延长,AQP3表达增强。AQP3变化反映了肾功能的变化,且其早于BUN和Cr两者变化的出现,反映肾功能变化的灵敏性和特异度高于BUN、Cr。

致谢:感谢中国医科大学盛京医院麻醉科王勇讲师在实验过程中给予的无私帮助和指导!

4 参考文献

- 1 Kruse E, Uehlein N, Kaldenhoff R. The aquaporins. *Genome Biol* 2006; 7: 206
- 2 Petrovic MM, Vales K, Stojan G, Basta-Jovanovic G, Mitrovic DM. Regulation of selectivity and translocation of aquaporins: an update. *Folia Biol (Praha)* 2006; 52: 173-180
- 3 Morishita Y, Sakube Y, Sasaki S, Ishibashi K. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: aquaporin superfamily (superaquaporins): expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms. *J Pharmacol Sci* 2004; 96: 276-279
- 4 Nejsum LN. The renal plumbing system: aquaporin water channels. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1692-1706
- 5 Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 2002; 82: 205-244
- 6 Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 6269-6273
- 7 王勇, 陈卫民, 高林林, 刘金钢. 多巴胺调控实验性梗阻性黄疸围手术期肾髓质水通道蛋白2表达. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2714-2717
- 8 Green J, Better OS. Systemic hypotension and renal failure in obstructive jaundice-mechanistic and therapeutic aspects. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5: 1853-1871
- 9 Fogarty BJ, Parks RW, Rowlands BJ, Diamond T. Renal dysfunction in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1995; 82: 877-884
- 10 Tajiri K, Miyakawa H, Liu J, Kamiyama T, Marumo F, Sato C. Enhanced renal susceptibility to ischemia-reperfusion injury in the rat with obstructive jaundice. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 789-795
- 11 Yuksek YN, Kologlu M, Daglar G, Doganay M, Dolapci I, Bilgihan A, Dolapci M, Kama NA. Intestinal ischemia-reperfusion injury augments intestinal mucosal injury and bacterial translocation in jaundiced rats. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 171-175
- 12 Rodrigo R, Avalos N, Orellana M, Bosco C, Thielemann L. Renal effects of experimental obstructive jaundice: morphological and functional assessment. *Arch Med Res* 1999; 30: 275-285
- 13 Kaler B, Karram T, Morgan WA, Bach PH, Yousef IM, Bomzon A. Are bile acids involved in the

- renal dysfunction of obstructive jaundice? An experimental study in bile duct ligated rats. *Ren Fail* 2004; 26: 507-516
- 14 Kucuk C, Sozuer E, Ikizceli I, Avsarogullari L, Keceli M, Akgun H, Muhtaroglu S. Role of oxygen free radical scavengers in acute renal failure complicating obstructive jaundice. *Eur Surg Res* 2003; 35: 143-147
- 15 Inan M, Sayek I, Tel BC, Sahin-Erdemli I. Role of endotoxin and nitric oxide in the pathogenesis of renal failure in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1997; 84: 943-947
- 16 Terris J, Ecelbarger CA, Nielsen S, Knepper MA. Long-term regulation of four renal aquaporins in rats. *Am J Physiol* 1996; 271: F414-F422
- 17 Kwon TH, Nielsen J, Masilamani S, Hager H, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S. Regulation of collecting duct AQP3 expression: response to mineralocorticoid. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F1403-F1421
- 18 Matsuzaki T, Suzuki T, Takata K. Hypertonicity-induced expression of aquaporin 3 in MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C55-C63
- 19 Cutler CP, Phillips C, Hazon N, Cramb G. Cortisol regulates eel (*Anguilla anguilla*) aquaporin 3 (AQP3) mRNA expression levels in gill. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 152: 310-313
- 20 Higuchi S, Kubota M, Iguchi K, Usui S, Kiho T, Hirano K. Transcriptional regulation of aquaporin 3 by insulin. *J Cell Biochem* 2007; 102: 1051-1058
- 21 叶任高, 陆再英, 谢毅, 王辰. 内科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 542-551
- 22 Wang Y, Liu JG, Han JL. Downregulation of AQP2 and AQP2 mRNA expression in kidney medulla of rats with bile duct ligation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 636-640
- 23 Rodionova EA, Kuznetsova AA, Shakhmatova EI, Prutskova N, Nielsen S, Holtback U, Natochin Y, Zelenina M. Urinary aquaporin-2 in children with acute pyelonephritis. *Pediatr Nephrol* 2006; 21: 361-367
- 24 许顶立, 殷晓燕, 邓英姿, 惠海鹏. 充血性心力衰竭患者尿液水通道蛋白-2的改变. *中华内科杂志* 2000; 39: 471-472

■同行评价

本文研究内容较重要, 思路较新颖, 实验设计合理, 具有一定的创新性和科学意义。

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

●消息●

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的综合性消化病学类学术期刊. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号.

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.

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

《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展.

从1993-2007《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文.

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊.

《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能.

溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜TLR4蛋白水平的作用

杜群, 李红, 王汝俊, 王文君, 李燕舞, 巫燕莉

■背景资料

肾上腺皮质激素类药物和氨基水杨酸类药物治疗UC已有几十年历史, 目前仍是治疗UC的一线药物。虽有一些治疗UC新药问世, 但由于疗效及毒副作用问题, 只能作为二、三线药物使用。中药对UC有较好的治疗效果, 毒副作用小, 应用前景广阔, 但作用机制不明确严重限制了其推广使用。

杜群, 王汝俊, 李燕舞, 巫燕莉, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405

李红, 广州中医药大学中药学院 广东省广州市 510006
王文君, 广州中医药大学临床药理研究所 广东省广州市 510405

国家自然科学基金资助项目, No. 30400613

作者贡献分布: 杜群与李红对此文所作贡献均等; 此课题由杜群, 李红, 王汝俊及王文君设计; 研究过程由杜群, 李红, 王文君, 李燕舞及巫燕莉操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由杜群提供; 数据分析由杜群及李红完成; 本论文写作由杜群及李红完成。

通讯作者: 杜群, 510405, 广东省广州市机场路12号大院, 广州中医药大学脾胃研究所. duqun@gzhtcm.edu.cn

电话: 020-36585555

收稿日期: 2007-09-30 修回日期: 2008-01-15

Effect of Kuijieling Decoction on protein level of Toll-like receptor 4 in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis

Qun Du, Hong Li, Ru-Jun Wang, Wen-Jun Wang, Yan-Wu Li, Yan-Li Wu

Qun Du, Ru-Jun Wang, Yan-Wu Li, Yan-Li Wu, Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Hong Li, College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Wen-jun Wang, Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30400613

Correspondence to: Dr. Qun Du, Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Chinese Medicine, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. duqun@gzhtcm.edu.cn

Received: 2007-09-30 Revised: 2008-01-15

Abstract

AIM: To observe the protein level changes of Toll-like receptor 4 (TLR4) as well as the effects of Kuijieling Decoction (KD) on TLR4 in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis (UC).

METHODS: Rat UC model was induced by trinitrobenzene-sulfonic acid (TNBS). The rats were randomly divided into normal control (NC) group, model control (MC) group, Kuijieling low dose (KLD) group, Kuijieling medium dose (KMD) group, Kuijieling high dose (KHD)

group and salazossulfapridine (SASP) group. The rats were killed to get their colonic mucosa and extract the whole-cell protein after 10 days of treatment. Western blot was performed to detect the protein level of TLR4. β -actin was used as an internal index. Relative expression of target protein was calculated from the gray scale ratio of target protein and β -actin.

RESULTS: The relative protein expression of TLR4 was significantly higher in the MC group than in the NC group (0.843 ± 0.201 vs 0.472 ± 0.072 , $P < 0.01$). The relative protein expression of TLR4 was significantly lower in the KHD group than in the MC group (0.620 ± 0.178 vs 0.843 ± 0.201 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: TLR4 may be involved in the pathogenesis of UC, and KD can inhibit the relative protein expression of TLR4 in colonic mucosa of rats with UC induced by TNBS. The inhibitory effects of KD on UC might be associated with the inhibition of protein expression of TLR4.

Key Words: Kuijieling Decoction; Ulcerative colitis; Toll-like receptor 4; Trinitrobenzen-sulphonic acid; Western blot

Du Q, Li H, Wang RJ, Wang WJ, Li YW, Wu YL. Effect of Kuijieling Decoction on protein level of Toll-like receptor 4 in colonic mucosa of rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 522-525

摘要

目的: 观察溃结灵对溃疡性结肠炎(UC)大鼠结肠黏膜Toll样受体4(TLR4)的变化特点及溃结灵对TLR4的影响。

方法: 采用三硝基苯磺酸(TNBS)法制作UC大鼠模型, 大鼠随机分为6组: 正常对照组、模型对照组、溃结灵低、中、高剂量组、阳性药柳氮磺胺吡啶(SASP)组。治疗10 d后处死大鼠取新鲜结肠黏膜标本提取全细胞蛋白, 采用蛋白免疫印迹(Western blot)方法对TLR4的蛋

■同行评议者

陈治水, 主任医师, 解放军第二一医院中医科

白表达水平进行检测, 以 β -actin作为内参, 以目的蛋白与 β -actin密度的比值作为目的蛋白的相对含量并进行统计学分析。

结果: 模型组TLR4蛋白相对表达量明显高于正常组(0.843 ± 0.201 vs 0.472 ± 0.072 , $P < 0.01$); 溃结灵高剂量组TLR4相对表达量明显低于模型组(0.620 ± 0.178 vs 0.843 ± 0.201 , $P < 0.05$)。

结论: TLR4可能参与了UC大鼠的发病过程, 溃结灵使TNBS法UC大鼠模型结肠黏膜TLR4的蛋白表达水平明显降低, 这可能是其治疗UC作用的机制之一。

关键词: 溃结灵; 溃疡性结肠炎; Toll样受体4; 三硝基苯磺酸; 免疫印迹法

杜群, 李红, 王汝俊, 王文君, 李燕舞, 巫燕莉. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜TLR4蛋白水平的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 522-525

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/522.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称非特异性溃疡性结肠炎, 是一种慢性直肠和结肠炎性疾病, 病机复杂, 病因尚不明确, 与多种因素相关, 其中免疫因素是主要方面. 随着免疫学和分子生物学等学科的迅速发展, 通过抑制Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)/核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)通路的关键分子进而阻断UC过激的炎症反应已成为众多学者研究的方向。

脾胃研究所在多年临床实践的基础上, 以清热健脾活血为治则, 总结出治疗UC疗效较满意的中药复方溃结灵^[1], 前期实验研究^[2-3]采用三硝基苯磺酸(trinitrobenzen sulphonic acid, TNBS)灌肠成功复制了UC大鼠模型, 并发现溃结灵对TNBS法UC大鼠模型有明显的治疗作用; 采用免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)法观察溃结灵对UC大鼠结肠黏膜NF- κ B P65蛋白表达的作用, 发现TNBS所致大鼠UC的发生与NF- κ B的活化密切相关, 溃结灵对UC大鼠模型过度激活的NF- κ B有抑制作用. 为了进一步研究溃结灵对UC的作用机制, 本研究观察了溃结灵对TNBS法UC大鼠模型结肠黏膜TLR4蛋白表达水平的影响, 以期对溃结灵治疗UC的较深层次的作用机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD大鼠由广东省医学实验动物中心提供(合格证号: 粤监证字2005A010), 体质量180-220 g, SPF级环境饲养. 溃结灵药材购于采芝林连锁药店, 经广州中医药大学中药学院中药标本中心张秋镇老师鉴定, 所购药材均符合中华人民共和国药典标准. 按组方比例称取药材, 常规方法制备水煎液. 大鼠低、中、高剂量按成人用量的5倍、10倍、20倍计算, 即4.6 g(生药量, 下同)/kg、9.2 g/kg、18.3 g/kg, 药物用蒸馏水配成460 g/L、920 g/L、1830 g/L. 柳氮磺胺吡啶(SASP, 上海三维制药有限公司, 每片0.25 g): 用作阳性对照药物, 大鼠用量取10倍成人用量即0.5 g/kg, 药物用蒸馏水配成50 g/L. 5% TNBS(Sigma公司), 全细胞蛋白提取试剂盒(Active motif公司), BCA-100蛋白质定量测定试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司), 预先染色的蛋白分子量标准品(Marker, Fermentas life Sciece公司), 兔抗TLR4多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology公司), 兔抗 β -Actin多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司), 显色法免疫检测试剂盒(Invitrogen公司), ZFMQ050PE型超纯水器(Millipore公司), 3K-30Z型高速冷冻离心机(Sigma公司), A5002型酶联免疫检测仪(Tecan公司), Mini Protean 3 cell型凝胶电泳装置(Bio-Rad公司), Power PAC 1000型电泳仪(Bio-Rad公司), DYY-40B型电转移装置(北京市六一仪器厂), TS-1型脱色摇床(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司), GS-800型光密度扫描仪(BIO-RAD公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模: 采用TNBS灌肠法制作UC大鼠模型^[2,4]. 取3 mo SD大鼠, 造模型前禁食24 h, 留取部分动物作为正常对照组, 其余大鼠乙醚麻醉, 用大鼠灌胃针头轻轻从肛门插入, 深度为8 cm, 推入TNBS溶液(含25 mL/L TNBS和500 mL/L乙醇)4 mL/kg体质量, 捏紧肛门平放5 min即可, 术后常规饲养。

1.2.2 给药和标本留取: 造模后d 3, 模型动物分为空白对照组, 溃结灵低、中、高剂量组和阳性药SASP组, 并同时开始按上述剂量给药, 给药体积为10 mL/kg. 空白对照组及正常对照组给等体积蒸馏水, 每天1次, 连续10 d. 末次给药24 h后, 脱颈椎法处死大鼠, 取距肛门8 cm结肠, 沿纵轴剪开, 刮取结肠黏膜组织, 即置于液氮中, -70℃保存。

■研发前沿

通过活化Toll样受体, 激活NF- κ B, 进而引起持续扩大的炎症反应是近年来UC发病机制研究的新发现, 相关研究受到广泛重视, 针对TLRs/NF- κ B通路开展UC的治疗研究是当前研制抗UC新药热点, 把这一新进展引入中药研究中, 对揭示抗UC中药的深层次作用机制及开发高水平中药有积极作用。

■创新盘点

通过抑制Toll样受体表达量, 抑制NF- κ B活化, 进而治疗UC可能是中药发挥抗UC作用的部分机制. 本文从Toll样受体表达角度探讨清热健脾活血治则的中药方剂治疗UC的作用机制, 尚未见类似的文献报道。

■应用要点

TLRs/NF- κ B通路调控众多基因的转录,能在一个较高水平发挥调控细胞因子水平总环节的作用,对其进行研究会明显增加药物研究的有效性和针对性,突破以往研究模式,本文对中药抗UC作用机制研究有借鉴意义。

1.2.3 Western blot方法检测结肠黏膜TLR4蛋白水平:取结肠黏膜按试剂盒说明书提取全细胞蛋白,用BAC-100蛋白质定量测定试剂盒测定蛋白浓度,取100 μ g蛋白在100 g/L十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)恒压198 V 40 min后,取下凝胶进行4℃湿法过夜转移至尼龙膜上,参考Western blot试剂盒说明书及文献[5]进行免疫检测,室温下封闭90 min,洗膜2次,加入TLR4一抗(稀释度为1:400)4℃摇床上孵育24 h,用抗体清洗液洗膜4次,加入二抗摇床上孵育2 h,洗膜4次,用DAB显色法在1 h内完成显色并照相。同时 β -actin作为内参。用光密度扫描仪对蛋白含量进行密度分析,以目的蛋白与 β -actin的密度比值作为目的蛋白的相对含量。

统计学处理 结果以mean \pm SD表示,组间两两比较,采用 t 检验分析。

2 结果

TNBS法UC模型大鼠结肠黏膜TLR4蛋白相对含量明显高于正常组,溃结灵高剂量组和SASP组的TLR4蛋白相对含量明显低于模型组(图1,表1)。

3 讨论

UC与克隆病(crohn's disease, CD)合称为炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), UC是一种慢性直肠和结肠炎性疾病,病变主要位于结肠的黏膜层,以溃疡为主,多累及直肠和远端结肠,也可遍及整个结肠。UC病因与发病机制尚不十分明确,但与宿主遗传易感性、机体免疫应答及肠黏膜免疫识别失调密切相关^[6],可以认为UC是有遗传易感性患者肠黏膜系统免疫调节性疾病,免疫反应异常是其发病中的重要环节^[7]。

TLRs是近十多年来发现的天然免疫受体,既在抗感染免疫及先天性免疫中起关键作用,也是重要的获得性免疫的调节因子^[8-9]。他使人类重新认识并定位了机体天然免疫系统在免疫始动环节及调控中的重要作用,因而被誉为“免疫学领域的重大突破”^[10]。该受体族作为机体炎性反应链的启动蛋白,从源头为炎症性疾病的发病机制的研究提供了新的方向。至今已克隆出人的TLRs家族成员共11个^[8,11],并被证明可以识别各种病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)^[12]。其中TLR4与宿主的免疫功能有着密切的联系,可识别不同类型的病原分子。TLR4的特异性配体主

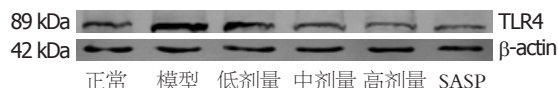


图1 Western blot法检测大鼠TLR4蛋白的表达情况。

表1 溃结灵对UC大鼠结肠黏膜TLR4蛋白表达的影响(mean \pm SD)

分组	n	剂量(g/kg)	TLR4相对含量
正常组	6	等体积水	0.472 \pm 0.072
模型组	10	等体积水	0.843 \pm 0.201 ^b
溃结灵治疗组低剂量	8	4.6	0.762 \pm 0.153
溃结灵治疗组中剂量	8	9.2	0.694 \pm 0.160
溃结灵治疗组高剂量	8	18.3	0.620 \pm 0.178 ^c
SASP组	8	0.5	0.581 \pm 0.152 ^d

^b $P<0.01$ vs 正常组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 模型组。

要为内毒素中的类脂A、热休克蛋白等,供体病原体具有特异性,如革兰氏阴性菌、厌氧菌、致密螺旋体和藤黄微球菌等。

TLRs识别病原体后,向细胞内传递活化信号,激活NF- κ B等转录因子,进而调节炎症递质的产量,导致IBD炎症黏膜的损伤。正常肠道对自身的菌群是耐受的,这些菌群不会引起正常肠道的免疫反应,肠上皮细胞持续表达TLR3和TLR5,而TLR4则几乎无法测到,这使得肠上皮细胞对正常的肠道共生细菌及其毒力成分不应答,但在IBD中TLR4的表达呈显著上调,而发生对自身菌群耐受缺失^[13]。TLRs对肠腔内PAMPs进行模式识别,经一系列信号传导分子最终促发NF- κ B的激活, NF- κ B的激活导致肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)转录增加,而体外实验发现TNF- α 、IL-1能上调肠上皮TLR4的表达^[14-15],又进一步激活NF- κ B。因此TLR4在结肠组织中高表达是UC发病过程中的关键环节,也是UC治疗研究中极受重视的靶位。如髓样分化蛋白-2(myeloid differential protein-2, MD-2)是TLR4介导NF- κ B激活必需的膜表面分子,其糖基化是关键步骤。TLR4-MD2抑制剂tunicamycin能阻止MD-2N端糖基化,明显下调NF- κ B活性^[16]。TLR4的中和性抗体MTS510能识别TLR4-MD2复合体,阻断NF- κ B的激活及TNF- α 的产生^[17]。

前期研究^[18]采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法观察溃结灵对TNBS法UC大鼠模型结肠黏膜TLR4基因表达的作用,发现UC大鼠

模型组TLR4基因相对表达量明显高于正常对照组, 溃结灵高剂量组TLR4的基因相对表达量均明显低于模型组. 本实验结果表明, UC大鼠模型组TLR4蛋白相对表达量明显高于正常对照组, 溃结灵高剂量组TLR4蛋白的相对表达量均明显低于模型对照组, 这与前期研究的结果相一致. 研究表明, TLR4的高表达与UC的发病密切相关, 这与文献报道的一致^[5,19], 同时溃结灵对TNBS法UC大鼠过量表达的TLR4有下调作用, 这可能是溃结灵抑制NF- κ B活性并治疗UC的作用机制之一.

4 参考文献

- 1 黄志新, 劳绍贤, 崔琦珍, 王汝俊, 胡旭光. 溃结灵颗粒治疗活动期溃疡性结肠炎的临床与实验研究. 中国中西医结合消化杂志 2003; 11: 141-143
- 2 杜群, 李红, 王建华, 王汝俊. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠治疗作用的病理学观察. 中药新药与临床药理 2007; 18: 173-175
- 3 杜群, 李红, 王建华, 王汝俊. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠粘膜NF- κ B p65蛋白表达及血清TNF- α 含量的影响. 广州中医药大学学报 2007; 24: 396-399
- 4 郑礼, 高振强, 王淑仙. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究. 中国药理学通报 1998; 14: 370-372
- 5 Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 2003; 170: 3977-3985
- 6 郑家驹. 我国溃疡性结肠炎发病机制研究. 中华消化杂志 2005; 25: 637-638
- 7 巫协宁. 炎症性肠病的发病机制新解. 国外医学·消化系疾病分册 2004; 24: 323-325
- 8 Kelly D, Conway S. Bacterial modulation of mucosal innate immunity. *Mol Immunol* 2005; 42: 895-901
- 9 Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 12-19
- 10 Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, Medzhitov RM, Beg AA. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 2001; 166: 7128-7135
- 11 O'Neill LA. Immunology. After the toll rush. *Science* 2004; 303: 1481-1482
- 12 Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 2005; 26: 469-476
- 13 Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; 167: 1609-1616
- 14 Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, Gonsky R, Zhou Y, Hu B, Arditi M. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 20431-20437
- 15 Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun* 2003; 71: 3503-3511
- 16 陈维雄. 应加强炎症性肠病发病机制及治疗的研究. 国外医学·消化系疾病分册 2003; 23: 259-260
- 17 Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, Miyake K. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000; 164: 3471-3475
- 18 李红, 杜群, 王文君, 王汝俊, 王建华, 刘珊珊. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠粘膜Toll样受体2、4基因表达的影响. 中药材 2007; 30: 56-59
- 19 Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Kazumori H, Yuki T, Mishima Y, Moriyama I, Kadota C, Oshima N, Amano Y, Kadowaki Y, Ishimura N, Kinoshita Y. Epithelial toll-like receptor 5 is constitutively localized in the mouse cecum and exhibits distinctive down-regulation during experimental colitis. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 132-138

■同行评价

本文研究选题新颖, 所用技术手段先进, 具有一定的学术价值.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

自身抗体与食管癌相关性的检测与分析92例

陈志刚, 李宏, 周迪, 杨军, 周婷, 秦江梅

■背景资料

20多年来国内外陆续报道了肿瘤患者体内存在抗细胞质或(和)细胞核成分的自身抗体, 这些自身抗体有望成为鉴别诊断正常人与肿瘤患者的标志物。但目前对于食管癌患者体内自身抗体的系统研究的文献还很少, 对抗体谱的研究将有助于深入认识食管癌患者的自身免疫现象。

陈志刚, 李宏, 周迪, 杨军, 周婷, 新疆石河子大学医学院一附院医学实验室 新疆维吾尔自治区石河子市 832000
秦江梅, 新疆石河子大学医学院预防医学系 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

国家自然科学基金资助项目, No. 30660161

石河子大学自然科学与技术创新资助项目, No. ZRXX2005123

作者贡献分布: 陈志刚, 秦江梅对此文所做贡献均等; 此课题由陈志刚、秦江梅设计; 研究过程由陈志刚, 李红, 周迪, 杨军, 周婷操作完成; 研究所用试剂及分析工具由陈志刚提供; 数据分析由陈志刚、李宏及秦江梅完成; 本论文写作由陈志刚完成。

通讯作者: 秦江梅, 832000, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆石河子大学医学院预防医学系. czg113126@163.com
电话: 0993-2850234

收稿日期: 2007-11-22 修回日期: 2008-01-13

Correlation between auto-antibodies and esophageal cancer: an analysis of 92 cases

Zhi-Gang Chen, Hong Li, Di Zhou, Jun Yang, Ting Zhou, Jiang-Mei Qin

Zhi-Gang Chen, Hong Li, Di Zhou, Jun Yang, Ting Zhou, Medical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jiang-Mei Qin, Department of Preclinical Medicine, Shihezi Medical University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30660161, the Natural Science and Technological Innovation Program of Shihezi University, No. ZRXX2005123

Correspondence to: Jiang-Mei Qin, Department of Preclinical Medicine, Shihezi Medical University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. czg113126@163.com

Received: 2007-11-22 Revised: 2008-01-13

Abstract

AIM: To study the positive rate of auto-antibodies, locations of their target antigens in esophageal cancer patients and correlation between auto-antibodies and esophageal cancer.

METHODS: Auto-antibodies in sera of 92 esophageal cancer patients and 135 healthy controls were detected with indirect immunofluorescence (IIF).

RESULTS: The positive rate of auto-antibodies

in esophageal cancer patients was significantly higher than that in normal controls (55.43% vs 20.00%, $P < 0.01$). A significant difference was found in the fluorescence pattern and location of target antigens between the two groups. Although the positive rate of auto-antibodies increased with increasing age ($P < 0.05$, $\chi^2 = 4.68$, $\chi^2 = 3.93$; $P < 0.05$, $\chi^2 = 5.93$, $\chi^2 = 3.86$), it was significantly higher in esophageal cancer patients than in normal controls ($P < 0.05$, $\chi^2 = 5.01$; $P < 0.01$, $\chi^2 = 9.43$, $\chi^2 = 18.1$). The positive rate of auto-antibodies was significantly higher in normal controls and in women with esophageal cancer than in males with esophageal cancer ($P < 0.01$, $\chi^2 = 8.34$, $\chi^2 = 6.90$).

CONCLUSION: The spectra of auto-antibodies in esophageal cancer patients are different from those in normal controls and patients with autoimmune disease, thus contributing to the differentiation between healthy persons and cancer patients.

Key Words: Esophageal neoplasm; Auto-antibody; Indirect immunofluorescence

Chen ZG, Li H, Zhou D, Yang J, Zhou T, Qin JM. Correlation between auto-antibodies and esophageal cancer: an analysis of 92 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 526-529

摘要

目的: 了解食管癌患者体内自身抗体阳性率、细胞内定位及荧光模式特点, 分析自身抗体与食管癌的相关性。

方法: 应用间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence, IIF)检测92例食管癌以及135例不同年龄段正常人血清中自身抗体。

结果: 92例经IIF检查的食管癌患者中, 51例自身抗体阳性, 显著高于正常对照组27例的检出率(55.43% vs 20.00%, $P < 0.01$)。两者在荧光模式、靶抗原细胞内定位上均有显著差异。两组人群的自身抗体阳性率随年龄增长而增高($P < 0.05$, $\chi^2 = 4.68$, $\chi^2 = 3.93$; $P < 0.05$, $\chi^2 = 5.93$,

■同行评议者

王健生, 副教授,
西安交通大学医学院第一附属医院
肿瘤外科

$\chi^2 = 3.86$), 在不同年龄段食管癌组皆显著高于对照组($P < 0.05$, $\chi^2 = 5.01$; $P < 0.01$, $\chi^2 = 9.43$, $\chi^2 = 18.1$). 在正常人及食管癌患者中女性自身抗体阳性率均明显高于男性($P < 0.01$, $\chi^2 = 8.34$, $\chi^2 = 6.90$).

结论: 食管癌患者中的自身抗体谱与正常人生理性自身抗体谱和自身免疫性疾病中的自身抗体谱不同, 有助于鉴别诊断健康人与癌症患者.

关键词: 食管癌; 自身抗体; 间接免疫荧光法

陈志刚, 李宏, 周迪, 杨军, 周婷, 秦江梅. 自身抗体与食管癌相关性的检测与分析92例. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 526-529
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/526.asp>

0 引言

食管癌的发病率在我国逐年增加, 且预后极差, 中晚期患者5年生存率仅10%左右^[1], 是一种恶性程度高、预后差, 严重危害人民健康的疾病. 其早期诊断异常困难, 由于早期患者缺乏特异症状, 首次就诊时约90%为中晚期^[2]. 而肿瘤患者体内查及自身抗体, 始报道于1972年, Whitehouse发现肿瘤患者体内存在抗平滑肌抗体. 20多年来国内外陆续报道了肿瘤患者体内存在抗细胞质或(和)细胞核成分的自身抗体^[3], 同时这很可能是一种肿瘤发生发展过程中的早期事件. 这些自身抗体有望成为鉴别诊断正常人与肿瘤患者的标志物^[4]. 国内外学者也曾研究食管癌, 并在食管癌患者血清检测到P53抗体^[1,5-9], 还有报道认为增殖细胞核抗原(PCNA)阳性表达与食管癌发生相关^[10-12]. 但目前对于食管癌患者体内自身抗体谱的系统研究的文献还很少, 对抗体谱及其靶抗原本质的研究将有助于深入认识食管癌患者的自身免疫现象, 为自身抗体应用于肿瘤诊断、治疗的潜在可能性提供更多信息. 我们用间接免疫荧光(indirect immunofluorescence, IIF)法分析食管癌患者及正常人血清中的自身抗体, 以探讨自身抗体与食管癌的相关性, 并为今后更深入认识食管癌中的自身免疫现象提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 经临床确诊的原发性食管癌患者92例, 男52例, 女40例, 年龄31-84(平均59.78)岁, 正常对照组源于正常体检者, 共135例, 其中男80例,

女55例, 年龄23-83(平均53.89)岁, IIF检测自身抗体试剂盒购自德国欧盟公司.

1.2 方法 IIF检测自身抗体试剂盒联合使用为已固定在载玻片上的人类上皮细胞(Hep-2)和灵长类肝脏组织切片这两种基质. 荧光二抗为FITC标记的羊抗人IgG. 实验步骤按试剂盒所附说明书进行, 滴度高于1:100者报告为阳性. 结果判定在石河子大学医学院一附院医学实验室进行, 同时, 由石河子大学医学院病理教研室及新疆医科大学病理教研室的专家对结果进行确定, 一致率达到90%以上.

统计学处理 阳性率间比较均采用性 χ^2 检验.

2 结果

2.1 IIF检验 血清由1:100稀释后, 92份经IIF检测的食管癌患者中, 51份(55.43%)自身抗体阳性, 显著高于正常对照组27(20.00%)的检出率($P < 0.01$, $\chi^2 = 30.46$). 将食管癌和对照组按年龄分为3组, 结果显示: 随着年龄增高, 两组阳性率都有增高趋势, 而各年龄段食管癌组皆显著高于对照组(表1).

2.2 荧光显微镜下观察自身抗体细胞内定位 食管癌组自身抗体阳性中以抗核质为主 52.94%(27/51), 其次为抗核仁35.29%(18/51), 胞质11.76%(6/51). 与此相比较, 对照组抗核质为77.78(21/27), 抗核仁18.52(5/27); 抗胞质3.70(1/27), 对照组抗核仁、抗胞质阳性率明显低于食管癌组. 分析银光图形, 肺癌组自身抗体显示出多种荧光图形, 包括核质细颗粒18份35.29%, 核质均质型4份(7.84%), 核质粗颗粒2份3.92%, Jo-1型3份5.88%. 抗胞质包括抗着丝点2例、抗溶酶体2例、抗高尔基体1例, 抗线粒体1份, 抗核仁阳性包括抗核仁形成区抗体14份, 抗核点型2份, 抗核少点型2份. 对照组抗体荧光类型不如食管癌组多样, 27份正常人阳性血清中, 细颗粒17份, 均质型2份, 粗颗粒2份, 抗着丝点1份, 看核仁形成区抗体5份. 另外本研究发现食管癌患者中女性阳性率72.50%(29/40), 男性40.38(22/52); 正常男性12.5(10/80), 女性30.90(17/55), 在食管癌患者及正常人中女性自身抗体阳性率均明显高于男性($\chi^2 = 8.34$, $\chi^2 = 6.90$, $P < 0.01$).

3 讨论

吕顺 *et al*^[13]报道, 肿瘤细胞能直接诱导机体产生抗核抗体(antinuclear antibody, ANA), 其没有种

■ 研发前沿

目前对食管癌的研究主要集中在相关基因及蛋白上, 对于食管癌患者体内自身抗体谱的系统研究还很少.

■相关报道

刘保池 *et al* 检测了河南食管癌高发区391例无症状居民的血清自身抗体, 得出结论: 血清肿瘤相关自身抗体检测有助于提高食管癌高发区无症状居民食管癌前和早期食管癌的检出率, 血清肿瘤相关自身抗体与食管上皮组织中相应肿瘤抗原的表达变化明显相关。

表 1 食管癌组和对照组不同年龄段自身抗体阳性率比较

年龄分组	食管癌		对照组	
	<i>n</i>	阳性率(%)	<i>n</i>	阳性率(%)
20-40	20	20.00 ^a	38	2.63
41-60	32	50.00 ^{bc}	38	15.79 ^c
≥ 61	40	75.50 ^{bce}	59	33.89 ^d

^a $P < 0.05$, $\chi^2 = 5.01$; ^b $P < 0.01$, $\chi^2 = 9.43$, $\chi^2 = 18.1$ vs 对照组;

^c $P < 0.05$, $\chi^2 = 4.68$, $\chi^2 = 3.93$ vs 20-40; ^d $P < 0.05$, $\chi^2 = 5.93$, $\chi^2 = 3.86$ vs 41-60。

属、构象和序列特异性; 癌症患者有较高的自身抗体检出率。但有关食管癌患者体内自身抗体的检出率国内外鲜见报道。为探讨自身抗体与食管癌的相关性, 为自身抗体应用于食管癌的潜在的潜在可能性提供更多的信息, 我们以人喉癌上皮细胞(Hep-2)及猴肝组织冰冻切片为基质, 采用IIF法对正常人和食管癌患者体内自身抗体进行研究。Hep-2细胞为目前国际通用的检测自身抗体的基质, 他具有以下优点: 作为人喉癌上皮细胞株, Hep-2含有人类的抗原, 其抗原谱较其他非人源性抗原更适合检测人的特异性抗体; 具有大而明显的细胞核, 镜下容易区分各种细胞核蛋白、核内细胞器抗体的银光模式; 细胞有丝分裂的比例较高, 容易检测到有丝分裂特异性蛋白及细胞器, 如着丝点、中间体等; 此外该细胞容易大规模培养, 制作基质片方便, 容易被标准化等。采用猴肝组织冰冻切片为基质的IIF, 其灵敏度虽低于前者, 但对抗可溶性肝抗原(SLA)等抗肝胆组织特异性抗体以及抗核仁成分抗体的灵敏度高, 同时其银光模式的观察, 有助于鉴别在Hep-2细胞中银光模式相似的自身抗体, 如SS-A/SS-B与RNP抗体等。

本研究结果证实, 食管癌中存在以自身抗体为表现的自身免疫现象。一定比例正常人存在着生理性自身抗体, 且随着年龄增长阳性率增加, 这与肿瘤发病率随年龄增长而增加相似, 因此, 对肿瘤患者的自身抗体是否具有肿瘤相关性, 或只是反映肿瘤的高龄发病性也存有争论。我们将正常对照组与食管癌组分为20-40, 41-60, 61岁以上3个年龄段。IIF检测结果显示, 两组在3个年龄段皆查及针对细胞不同成分的自身抗体随年龄增长阳性率皆增高, 但各年龄段食管癌组阳性率皆显著高于相应对照组。比较两组自身抗体的荧光图形和细胞内定位, 值得注意的是食管癌组荧光图形比对照组类型丰富, 特别是抗胞质、核仁阳性率高于对照组,

已知核仁、胞质内含有核糖体蛋白等, 是与细胞生长、增值过程密切相关的蛋白质, 这提示食管癌患者体内自身抗体相应的靶抗原可能是某些与细胞的生物合成或增值有关的蛋白质。国外学者曾报道肝癌中抗核仁抗体阳性率(6.56%)较正常人增高, 并鉴定出3种核仁内靶抗原: NOR-90/人类上游结合因子(Hubf)、原纤维蛋白、B23蛋白, 他们均参与核糖体RNA的处理过程, 在细胞生长和增值过程中这些蛋白质含量或活性均有明显升高^[14]。我们的研究说明食管癌组的抗体谱较正常人宽, 表明食管癌患者自身免疫反应不同于正常人生理性自身免疫反应。这些扩大的抗体谱可能是由于细胞转化或肿瘤进展过程中异常出现的某些新的胞内抗原, 诱发机体免疫系统针对这些新的抗原产生免疫反应; 也可能是由于癌基因在转化过程中伴随着某些正常蛋白质的过量表达, 刺激那些在胸腺发育过程中由于低量表达而逃开清除从而进化到外周的正常状态下无反应性T淋巴细胞, 导致非生理性的自身抗体产生。这就为用自身抗体鉴别诊断正常人与肿瘤患者, 甚至治疗肿瘤提供了理论上的可能性^[15]。另外我们发现在正常人及食管癌患者中女性自身抗体阳性率均明显高于男性($P < 0.01$), 具体原因有待于进一步探讨。刘保池 *et al*^[2]检测了河南食管癌高发区391例无症状居民的血清自身抗体, 得出结论: 血清肿瘤相关自身抗体检测有助于提高食管癌高发区无症状居民食管癌前和早期食管癌的检出率, 血清肿瘤相关自身抗体与食管上皮组织中相应肿瘤抗原的表达变化明显相关。李颖 *et al*^[16]对117例慢性丙型肝炎患者和30例健康体检者的血清中自身抗体进行检测, 阳性率分别为27.35%和3.33%。

目前, 自身免疫在不同疾病中的作用日益得到重视, 关于食管癌与自身抗体相关性的研究还不多见, 自身抗体的检测是否有助于食管癌的早期诊断和治疗, 这些自身抗体相对应靶抗原的阐明及其生物学和临床意义, 还有待今后继续探讨。

4 参考文献

- 1 杜芳, 王立东, 齐义军, 孙哲, 江亚南, 郭涛, 吕晓东, 李苹娟, 常志伟, 范宗民, 高珊珊, 何欣, 李吉林, 常扶保, 张建营. 食管和贲门癌及癌前病变患者血清中多个自身抗体的检测及其临床意义. 中华肿瘤防治杂志 2006; 13: 1289-1292
- 2 刘保池, 王立东, 杜芳, 冯常炜, 张延瑞, 刘宾, 杨孟选, 郭涛, 宋昕, 王茜, 何欣, 范宗民, 杜娟娟, 张建营, 张梅, 吴爱群. 肿瘤相关抗原与自身抗体检测对食管癌

■创新盘点

本文首次对食管癌患者血清自身抗体谱进行研究, 探讨自身抗体作为肿瘤标志物的可能性。

- 早期发现和高危人群预警的意义. 中华肿瘤防治杂志 2007; 14: 645-649
- 3 Lu F, Kalman B. Autoreactive IgG to intracellular proteins in sera of MS patients. *J Neuroimmunol* 1999; 99: 72-81
- 4 Okano HJ, Park WY, Corradi JP, Darnell RB. The cytoplasmic Purkinje onconeural antigen cdr2 down-regulates c-Myc function: implications for neuronal and tumor cell survival. *Genes Dev* 1999; 13: 2087-2097
- 5 季萍. 肿瘤患者血清中肿瘤自身抗体的产生及意义. 临床输血与检验 2005; 7: 76-78
- 6 王铭辉, 李艳萍, 王旭东, 张华, 熊利华, 黄洪铮. 血清 p53抗体与食管癌化疗敏感性的关系. 癌症 2004; 23: 467-470
- 7 Sato S, Kigawa J, Minagawa Y, Okada M, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Terakawa N. Chemosensitivity and p53-dependent apoptosis in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 1307-1313
- 8 Nasierowska-Guttmejer A, Szawlowski A, Jastrzebska M, Jeziorski K, Radziszewski J. p53 Protein accumulation as a prognostic marker of preoperative radiotherapy and/or chemotherapy in advanced squamous cell esophageal carcinoma--preliminary report. *Dis Esophagus* 1999; 12: 128-131
- 9 Zhang JY, Casiano CA, Peng XX, Koziol JA, Chan EK, Tan EM. Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 136-143
- 10 符宝敏, 谭红文, 张庆远. PCNA和C-erbB-2食管癌的表达及临床意义. 中国实用医药 2007; 2: 61-62
- 11 赵光明, 赵卫星, 和瑞芝, 苏蔚, 张丽娟. 食管癌p53和PCNA的表达与局部体液免疫. 世界华人消化杂志 2001; 9: 714-715
- 12 周连亚, 段俊峰, 石彦涛, 李永军, 刘瑞林, 李书军. 食管鳞状细胞癌中p16、PCNA表达研究. 中国肿瘤 2005; 14: 345-346
- 13 吕顺, 恽小婧, 吴瑾, 郑秀娟, 吴厚生, 熊思东. 肿瘤细胞诱导抗双链DNA自身抗体的产生及其生物学特性. 现代免疫学 2004; 24: 9-12
- 14 Imai H, Ochs RL, Kiyosawa K, Furuta S, Nakamura RM, Tan EM. Nucleolar antigens and autoantibodies in hepatocellular carcinoma and other malignancies. *Am J Pathol* 1992; 140: 859-870
- 15 Ganss R, Limmer A, Sacher T, Arnold B, Hammerling GJ. Autoaggression and tumor rejection: it takes more than self-specific T-cell activation. *Immunol Rev* 1999; 169: 263-272
- 16 李颖, 徐鑫, 刘沛, 王雪莲, 王贵新. 慢性丙型肝炎患者自身抗体检测的临床意义. 肝脏 2007; 12: 17-19

■应用要点

本研究证明食管癌患者中的自身抗体谱与正常人生理性自身抗体谱不同, 为食管癌的早期诊断和治疗提供了新的思路, 也为自身抗体相对应靶抗原的阐明及其生物学和临床意义的研究打下基础。

■同行评价

本文研究内容新颖, 设计合理, 统计方法正确, 具有一定的科学性和可读性。

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 •

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 2008-02-10)

埃索美拉唑对胃食管反流病患者症状和生活质量的影响

朱风尚, 陈锡美, 王志荣, 张东伟, 张霞

■背景资料

有关PPI治疗GERD的研究已充分证实埃索美拉唑至少不逊于其它PPI, 其中, 标准剂量埃索美拉唑(40 mg/d)较标准剂量奥美拉唑(20 mg/d)在治疗GERD上有更好的疗效, 而标准剂量的埃索美拉唑与加倍剂量奥美拉唑(40 mg/d)治疗GERD的疗效差异, 目前研究尚不充分。

朱风尚, 陈锡美, 王志荣, 张东伟, 张霞, 同济大学附属同济医院消化内科上海市 200065

作者贡献分布: 朱风尚和陈锡美对此文所作贡献均等; 此课题由朱风尚, 陈锡美设计; 研究过程由朱风尚, 陈锡美, 王志荣, 张东伟和张霞操作完成; 研究所用材料由张霞提供; 数据分析由朱风尚, 张东伟完成; 本论文写作由朱风尚, 陈锡美, 王志荣, 张东伟和张霞共同完成。

通讯作者: 朱风尚, 200065, 上海市新村路389号, 同济大学附属同济医院消化内科. zhufengshang@126.com

电话: 021-66111075 传真: 021-66111149

收稿日期: 2007-08-17 修回日期: 2008-01-23

Effect of esomeprazole on symptom relief and improvement of quality of life in gastroesophageal reflux disease patients

Feng-Shang Zhu, Xi-Mei Chen, Zhi-Rong Wang, Dong-Wei Zhang, Xia Zhang

Feng-Shang Zhu, Xi-Mei Chen, Zhi-Rong Wang, Dong-Wei Zhang, Xia Zhang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China
Correspondence to: Feng-Shang Zhu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji University, 389 Xincun Road, Shanghai 200065, China. zhufengshang@126.com

Received: 2007-08-17 Revised: 2008-01-23

Abstract

AIM: To compare the efficacy and safety of esomeprazole with omeprazole on symptom relief and improvement of quality of life in gastroesophageal reflux disease (GERD) patients.

METHODS: A prospective, randomized controlled study was designed. A total of 78 GERD patients diagnosed with endoscope and/or their 24 h esophageal pH monitored were randomized into esomeprazole treatment group and omeprazole treatment group (39 patients each group). Patients in the two groups received standard doses of esomeprazole (20 mg, twice a day, po) or double doses of omeprazole (20 mg, twice a day, po) for 8 wk. Symptom relief, efficiency, cure rate and quality of life were compared between the two groups.

RESULTS: Seven-six patients completed the

8-week therapy. One patient in each group was dropped out because of running counter to the RE testing procedure. Symptoms of the two groups at weeks 4 and 8 were significantly improved. Symptoms of patients in the esomeprazole group were much better improved than those in the omeprazole group ($P < 0.01$). There was a significant difference in remission of heartburn and chest pain between the two groups (78.3% vs 45.5%, 64.3% vs 37.5%, $P < 0.05$). However, there was no significant difference in remission of acid regurgitation and dysphagia between the two groups. There was a significant difference in the efficiency and cure rate at weeks 4 and 8 between the two groups (4 wk: 88.8% vs 59.3%, 80.0% vs 51.9%, $P < 0.05$; 8 wk: 96.0% vs 70.4%, 88.0% vs 63.1%, $P < 0.05$). The quality of life, cure rate, vitality (VT) and social function (SF) were much better improved in the esomeprazole group than in the omeprazole group (92.5 ± 5.7 vs 85.3 ± 7.1 , 85.2 ± 4.6 vs 76.8 ± 6.5 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Standard doses of esomeprazole have better effects on improving heartburn and chest pain, cure rate, VT and SF in GERD patients than double doses of omeprazole.

Key Words: Esomeprazole; Omeprazole; Gastroesophageal reflux disease; Non-erosive reflux disease; Quality of life

Zhu FS, Chen XM, Wang ZR, Zhang DW, Zhang X. Effect of esomeprazole on symptom relief and improvement of quality of life in gastroesophageal reflux disease patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 530-534

摘要

目的: 探讨埃索美拉唑对胃食管反流病(GERD)患者症状和生活质量的影响。

方法: 采用前瞻、随机、阳性对照研究, 将经内镜或24 h食管pH监测明确诊断的78例GERD患者随机分为标准剂量的埃索美拉唑(20 mg, 2次/d, po)组和加倍剂量的奥美拉唑(20 mg, 2次/d, po)组, 每组39例。2组分别治疗8 wk, 比较2组症状控制、RE内镜下有效率和

■同行评议者

沈薇, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

愈合率、生活质量等区别。

结果: 共76例患者完成试验。埃索美拉唑组和奥美拉唑组各有1例RE因违反试验方案退出。4 wk和8 wk两组症状总积分治疗后均明显下降, 但两组间差异无统计学意义。埃索美拉唑组和奥美拉唑组使NERD症状积分下降程度不如RE患者, 但埃索美拉唑组使NERD患者症状积分下降优于奥美拉唑组($P<0.01$); 两组在烧心和胸痛缓解率上差异明显(78.3% vs 45.5%, 64.3% vs 37.5%, 均 $P<0.05$), 在反酸、咽下困难上无明显差异; 4 wk和8 wk对RE内镜有效率和愈合率差异明显(4 wk: 88.8% vs 59.3%, 80.0% vs 51.9%; 8 wk: 96.0% vs 70.4%, 88.0% vs 63.1%, 均 $P<0.05$), 埃索美拉唑组患者活力和社会功能疗效明显(92.5 ± 5.7 vs 85.3 ± 7.1 , 85.2 ± 4.6 vs 76.8 ± 6.5 , 均 $P<0.05$)。

结论: 标准剂量的埃索美拉唑较加倍剂量的奥美拉唑更有效的控制GERD患者(尤其是RE患者)的临床症状, 改善活力和社会功能相关的生活质量。

关键词: 埃索美拉唑; 奥美拉唑; 胃食管反流病; 非糜烂性反流病; 生活质量

朱风尚, 陈锡美, 王志荣, 张东伟, 张霞. 埃索美拉唑对胃食管反流病患者症状和生活质量的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 530-534
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/530.asp>

0 引言

随着质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)不断升级换代和根除幽门螺杆菌(*H pylori*)方案的优化, 消化疾病谱发生了变化。消化性溃疡发病率逐年下降, 胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)逐年增加^[1-2]。GERD包括反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)和非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)。GERD严重影响患者生活质量(quality of life, QL)。目前, PPI是治疗GERD的主要药物, 埃索美拉唑作为较新的PPI制剂, 较既往上市的其他PPI有理论上的优越性。国内外较多文献报道^[3-5], 标准剂量埃索美拉唑治疗GERD的疗效至少不逊于其他标准剂量PPI制剂, 而且一项多中心的临床试验结果显示^[6], 半标准剂量(20 mg/d)埃索美拉唑和标准剂量奥美拉唑治疗糜烂性食管炎时, 在症状缓解和内镜愈合率上无明显差异。鉴于此, 本文比较标准剂量埃索美拉唑和加倍奥美拉唑治疗GERD的内镜下愈合率、症状控制和生活质量

的差异。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2004-03/2006-04符合条件的患者78例进行前瞻、随机、阳性对照临床研究。试验方案符合赫尔辛基宣言, 并得到临床药物试验(GCP)中心伦理委员会批准。所有受试对象均签署知情同意书。入选标准: 18-75岁, 性别不限; 男性或未怀孕、非哺乳期的妇女; 入选10 d内内镜或24 h食管pH明确诊断的GERD患者。RE诊断及分级参考洛杉矶(LA)标准分为A-D 4级。排除标准: 胃、食管和十二指肠手术史; 患有卓-艾综合征、原发性食管动力疾病; 内镜显示有上消化道恶性疾病; 怀疑或证实患有恶性疾病; 患严重的心、肺、肾、胰、肝等疾病影响研究评估; 血糖控制不稳定的糖尿病; 因脑血管疾病而妨碍研究进行; 最近3 mo内患有胃溃疡、十二指肠溃疡或十二指肠糜烂; 胃、食管反流性有关的并发症, 内镜证实的Barrett食管或食管狭窄; 入选前10 d内使用过PPI或H₂受体阻断剂的患者; 任何早期预警症状; 语言障碍; 有药物滥用史、酗酒史、依从性差或不能合作者; 已知或怀疑对埃索美拉唑或奥美拉唑过敏者。

1.2 方法

1.2.1 分组及用药: 入选时行症状评价(烧心、反酸、咽下困难、胸痛)、生活质量评价、体格检查、内镜检查、血清白细胞计数、丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)检测。患者随机分入埃索美拉唑组(商品名: 耐信)和奥美拉唑组(商品名: 洛赛克)。埃索美拉唑组: 每次服用埃索美拉唑20 mg, 2次/d; 奥美拉唑组: 每次服用奥美拉唑20 mg, 2次/d, 两药均饭前30 min服用。用药时间先均为4 wk。4 wk后随访, 询问不良事件、症状改变、内镜检查、复查血白细胞、ALT和AST、清点患者退还的药物数量确定依从性。若4 wk时RE患者内镜下愈合, 继续服药4 wk, 但默认wk 8时RE仍旧愈合而不行内镜复查。若尚未达到上述目标, 继续如前治疗4 wk, 在wk 8继续评价上述内容。RE总共疗程4 wk或8 wk。所有NERD患者均治疗8 wk, 评价治疗前、后的疗效变化, 在wk 8不再行24 h食管pH复查。

1.2.2 发作频率及症状程度计分标准: 治疗开始前、复诊时记录烧心、反酸、咽下困难、胸痛的发作频率和严重程度并计分^[7-8]。发作频率计分标准: 无症状为0分, 症状出现频度<1、1、2-3、4-5以及6-7 d/w分别记为1、2、3、4及5分, 最高分可达20分。症状程度计分: 症状不明显,

■相关报道

国外已报道半标准剂量埃索美拉唑和标准剂量奥美拉唑治疗GERD疗效上的差异, 结果显示在症状控制、内镜下愈合率等方面二者差异无统计学意义, 但对生活质量的改善情况不明。

■创新盘点

本文全面的比较标准剂量埃索美拉唑和加倍标准剂量奥美拉唑对GERD患者症状控制、镜下愈合率、生活质量和不良反应等方面的差异。

在提醒下发现1分;症状明显,影响日常生活,偶尔服药3分;症状非常明显,影响日常生活,需长期服药治疗5分,症状介于1分和3分之间2分,介于3分和5分之间4分,最高分可达20分。症状频率计分加程度计分总分最高可达40分。

1.2.3 评估RE愈合: 用药4 wk和/或8 wk后RE受试者均接受内镜检查,评估黏膜破损情况。RE愈合标准是食管黏膜无破损,改善 ≥ 1 个级别为有效,改善不明显为无效^[7]。

1.2.4 生活质量评价: 用浙江大学社会医学与全科医学研究所研制的汉化版SF-36健康量表行问卷调查^[9],包括生理功能、生理职能、躯体疼痛、总体健康、活力、社会功能、情感职能和精神健康等8个方面。每个方面积分为最差(0分)-最好(100分)。

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件进行。计数资料比较采用 χ^2 或Fisher确切概率法,计量资料用两样本均数差异的 t 检验、两配对样本 t 检验或Wilcoxon秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 试验完成情况及组间可比性 按PP分析78例GERD患者入选,2组各有1例A级RE因未按试验方案进行退出试验。在76例完成试验入选者中,埃索美拉唑组和奥美拉唑各38例。埃索美拉唑组38例包含RE 25例(A+B级19例、C+D级6例)和NERD 13例,奥美拉唑组包含RE 27例(A+B级19例、C+D级8例)和NERD 11例。一般资料具有可比性(表1)。

2.2 治疗前后临床症状变化 埃索美拉唑患者症状基线积分为 17.03 ± 4.99 ,奥美拉唑组为 16.66 ± 5.93 ,两组具有可比性。wk 4两组症状积分分别为 12.45 ± 4.02 和 11.13 ± 4.47 ,两组症状评分均较基线明显下降(P 均 < 0.01),但两组下降幅度无统计学意义($P = 0.66$)。wk 8两组症状积分分别为 5.11 ± 2.84 和 6.66 ± 3.60 ,两组症状评分较基线均明显下降(P 均 < 0.01),但两组下降幅度无统计学意义($P = 0.36$)。症状积分上,两组RE患者较NERD患者症状积分明显下降($P < 0.05$),且埃索美拉唑组RE患者症状积分下降较奥美拉唑组明显($P < 0.01$)。具体症状上,两组烧心、反酸、咽下困难、胸痛8 wk的缓解率相比分别为78.3%(18/23) vs 45.5%(8/22)($P = 0.02$)、65.0%(13/20) vs 35.3%(6/17)($P = 0.07$)、70.0%(7/10) vs 50.0%(4/8)($P = 0.70$)和

表 1 入选患者一般资料比较($n = 38$, PP分析)

项目	埃索美拉唑组	奥美拉唑	P
男/女	30/8	28/10	0.59
年龄(岁)	50.7 ± 13.5	52.5 ± 14.9	0.84
RE /NERD	25/13	27/11	0.62
RE A+B/C+D	19/6	19/8	0.65
烧心有/无	23/15	22/16	0.82
反酸有/无	20/18	17/21	0.65
咽下困难有/无	10/28	8/30	0.79
胸痛有/无	14/24	16/22	0.81

64.3%(9/14) vs 37.5%(6/16)($P = 0.03$)。可见两组8 wk的症状缓解率中烧心和胸痛差异明显。

2.3 内镜下RE有效率和愈合率 wk 4埃索美拉唑组RE有效率为88.8%(22/25),奥美拉唑组为59.3%(16/27),两组差异有统计学意义($P = 0.02$);两组愈合率分别为80.0%(20/25)和51.9%(14/27),两组差异有统计学意义($P = 0.03$)。wk 8埃索美拉唑组RE有效率为96.0%(24/25),奥美拉唑组为70.4%(19/27),两组差异有统计学意义($P = 0.04$);wk 8两组愈合率分别为88.0%(22/25)和63.1%(17/27),两组差异有统计学意义($P = 0.04$)。可见,埃索美拉唑组在wk 4,8均较奥美拉唑组有较好的有效率和愈合率。

2.4 生活质量改善 两组治疗后,除生理功能和生理职能无明显变化以外,其他维度,如躯体疼痛、总体健康、活力、社会功能、情感职能和精神健康均明显好转(P 均 < 0.05 ,表2)。其中,埃索美拉唑组对活力和社会功能的作用较奥美拉唑组明显(P 均 < 0.05 ,表2)。

2.5 依从性、耐受性和不良反应 所有随机入选患者在治疗期间,服用过1次以上治疗药物即被纳入安全性等分析中。大多患者(97.4%)按期完成试验,依从性良好。总体上,两组耐受性良好。埃索美拉唑组不良反应率为10.3%(4/39),患者分别表现为口腔异味、腹泻、皮肤瘙痒和荨麻疹,前3者均停药后消失,后者停药并服用氯雷他定抗过敏后症状消失。奥美拉唑组不良反应发生率为12.8%(5/39),与埃索美拉唑组比较差异无统计学差异($P = 0.72$)。分别为腹泻/大便稀松(2例)、荨麻疹(1例)、腹痛(2例),上述患者经过停药或对症治疗均症状消失。

3 讨论

GERD是抗反流机制减弱和反流物对食管黏膜攻击共同作用的结果。目前主要的内科治疗措

表 2 治疗前后SF-36量表变化($n=38$)

	埃索美拉唑组		奥美拉唑组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
生理功能	81.2±6.1	93.3±4.8	82.4±5.5	92.5±4.7
生理职能	64.1±6.4	66.1±5.2	61.0±5.3	62.4±5.5
躯体疼痛	62.3±5.8	82.1±6.3 ^a	59.6±3.2	72.4±5.4 ^a
总体健康	50.2±4.6	78.2±6.9 ^a	52.1±3.0	79.4±5.7 ^a
活力	60.2±5.6	92.5±5.7 ^{ab}	63.5±4.1	85.3±7.1 ^a
社会功能	72.5±7.1	85.2±4.6 ^{ab}	70.2±3.9	76.8±6.5 ^a
情感职能	58.4±5.6	80.5±4.1 ^a	60.2±4.2	77.4±5.2 ^a
精神健康	60.5±3.5	80.2±7.2 ^a	59.3±4.0	76.2±5.9 ^a

^a $P<0.05$ vs 治疗前; ^b $P<0.05$ vs 奥美拉唑组.

施是运用PPI制剂. 研究表明, 埃索美拉唑作为较新的PPI, 理论和实践上至少不逊色于其他PPI制剂^[10-11]. 大量随机大样本的临床试验业已证明, 标准剂量的埃索美拉唑(40 mg/d)治疗GERD较标准剂量的奥美拉唑(20 mg/d)有较好的疗效^[5]. 临床上对于疗效欠佳的GERD患者, 我们常采用加倍剂量的奥美拉唑(20 mg, 2次/d, po)进行治疗. 为了解该剂量与标准剂量的埃索美拉唑(40 mg/d)治疗的疗效, 我们比较两组治疗方法的疗效差异.

本研究结果显示: 症状控制上, 4 wk和8 wk时, 两组症状总积分治疗后明显下降, 但两组间差异无统计学意义($P>0.05$). 可见, 标准剂量的埃索美拉唑和加倍剂量的奥美拉唑治疗GERD同样有效. 亚组分析显示, 埃索美拉唑组和奥美拉唑组对RE患者症状积分下降明显, 对NERD患者疗效不如RE患者. 这从临床上证明了NERD发病机制复杂, 对PPI反应较差. 即使这样, 我们仍可发现, 埃索美拉唑组使NERD患者症状积分下降明显于奥美拉唑组($P<0.01$). 具体到常见的4种症状上, 两组在烧心和胸痛缓解率上差异明显($P<0.05$), 在反酸、咽下困难上无明显差异($P>0.05$). 提示该剂量的埃索美拉唑较加倍剂量的奥美拉唑有较好的控制烧心和反酸能力, 但也不排除由于样本量的关系, 结果出现偏倚可能.

在内镜下有效率和愈合率方面, 埃索美拉唑在4 wk和8 wk对RE的内镜有效率和愈合率明显高于奥美拉唑组($P<0.05$). 我们同时观察到, 有1例患者临床症状完全消失, 但患者内镜下RE级别并没有改善, 仍可见活动性酸反流存在. 这说明, 临床症状和内镜下病变程度不成比例. 其

原因可能与个人的食管敏感性、饮食习惯甚至心理素质有一定的关系^[12].

临床上, 慢性消化系统疾病, 如慢性乙肝、肠易激综合征、GERD对患者生活质量影响明显. 在长期治疗与反复的过程中, 很多患者出现抑郁和/或焦虑^[13-15]. 因此, 改善慢性疾病患者的生活质量亦是治疗的重点目标之一. 本研究结果显示, 埃索美拉唑组和奥美拉唑组均可明显改善患者总的生活质量, 其中活力和社会功能维度上, 埃索美拉唑组疗效明显. McDougall *et al*^[16]认为, 无论RE是否愈合, 加倍剂量的奥美拉唑均可改善总体健康和活力. 本研究显示, 标准剂量的埃索美拉唑在上述生活质量改善上更胜一筹. 这说明, 虽然两组均有效改善生活质量, 但标准剂量的埃索美拉唑较加倍剂量的奥美拉唑疗效更好.

总之, 标准剂量的埃索美拉唑和加倍剂量的奥美拉唑均可有效控制GERD患者症状, 治愈GERD, 改善患者的生活质量. 但标准剂量的埃索美拉唑在烧心、胸痛改善上疗效明显. 同时, 两组在治疗NERD患者方面疗效不如治疗RE, 但以埃索美拉唑疗效显著.

致谢: 感谢第二军医大学附属长海医院消化内科徐晓蓉博士和复旦大学附属华东医院消化内科项平教授在量表和食管pH监测方面给予本研究的帮助.

4 参考文献

- Hritz I, Herszenyi L, Molnar B, Tulassay Z, Pronai L. Long-term omeprazole and esomeprazole treatment does not significantly increase gastric epithelial cell proliferation and epithelial growth factor receptor expression and has no effect on apoptosis and p53

■应用要点

本文从标准剂量埃索美拉唑与加倍剂量奥美拉唑治疗GERD疗效等方面的差异上, 为医患应用埃索美拉唑治疗GERD提供了参考依据.

■同行评价

本研究从临床角度评价了埃索美拉唑和奥美拉唑治疗RE和GERD的内镜愈合情况及临床症状的改善情况,具有一定的临床意义,但无新意。

- 2 Dent J. Review article: from 1906 to 2006--a century of major evolution of understanding of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 1269-1281
- 3 Chen CY, Lu CL, Luo JC, Chang FY, Lee SD, Lai YL. Esomeprazole tablet vs omeprazole capsule in treating erosive esophagitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3112-3117
- 4 Labenz J, Armstrong D, Lauritsen K, Katelaris P, Schmidt S, Schutze K, Wallner G, Juergens H, Preiksaitis H, Keeling N, Naucier E, Adler J, Eklund S. Esomeprazole 20 mg vs. pantoprazole 20 mg for maintenance therapy of healed erosive oesophagitis: results from the EXPO study. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 803-811
- 5 Schmitt C, Lightdale CJ, Hwang C, Hamelin B. A multicenter, randomized, double-blind, 8-week comparative trial of standard doses of esomeprazole (40 mg) and omeprazole (20 mg) for the treatment of erosive esophagitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 844-850
- 6 Lightdale CJ, Schmitt C, Hwang C, Hamelin B. A multicenter, randomized, double-blind, 8-week comparative trial of low-dose esomeprazole (20 mg) and standard-dose omeprazole (20 mg) in patients with erosive esophagitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 852-857
- 7 刘军, 王丹, 王伟. 埃索美拉唑对老年反流性食管炎生活质量的影响. *中国老年学杂志* 2006; 26: 1193-1194
- 8 王战波, 陈玲玲, 游旭东. 联合应用埃索美拉唑、铝碳酸镁和莫沙比利治疗难治性胃食管反流病. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 901-904
- 9 许军, 胡敏燕, 杨云滨, 王斌会, 解亚宁. 健康测量量表 SF-36. *中国行为医学科学* 1999; 8: 150-152
- 10 Edwards SJ, Lind T, Lundell L. Systematic review: proton pump inhibitors (PPIs) for the healing of reflux oesophagitis - a comparison of esomeprazole with other PPIs. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 743-750
- 11 Devault KR, Johanson JF, Johnson DA, Liu S, Sostek MB. Maintenance of healed erosive esophagitis: a randomized six-month comparison of esomeprazole twenty milligrams with lansoprazole fifteen milligrams. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 852-859
- 12 DeVault KR. Review article: the role of acid suppression in patients with non-erosive reflux disease or functional heartburn. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23 Suppl 1: 33-39
- 13 Wilhelmsen I, Hatlebakk JG, Olafsson S, Berstad A. On demand therapy of reflux oesophagitis--a prospective study of symptoms, patient satisfaction and quality of life. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 1035-1040
- 14 Havelund T, Lind T, Wiklund I, Glise H, Hernqvist H, Lauritsen K, Lundell L, Pedersen SA, Carlsson R, Junghard O, Stubberod A, Anker-Hansen O. Quality of life in patients with heartburn but without esophagitis: effects of treatment with omeprazole. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1782-1789
- 15 Si JM, Wang LJ, Chen SJ, Zhao L, Dai N. Quality of life and cost-effectiveness of combined therapy for reflux esophagitis. *J Zhejiang Univ Sci* 2003; 4: 602-606
- 16 McDougall NI, Collins JS, McFarland RJ, Watson RG, Love AH. The effect of treating reflux oesophagitis with omeprazole on quality of life. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 459-464

编辑 李军亮 电编 何基才

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)

慢性丙型肝炎患者幽门螺杆菌感染及其相关因素分析

季尚玮, 张永贵, 王江滨

季尚玮, 张永贵, 王江滨, 吉林大学中日联谊医院消化内科
吉林省长春市 130033

国家自然科学基金资助项目, No. 30670300

作者贡献分布: 此课题由季尚玮、张永贵、王江滨共同设计; 研究过程由季尚玮、张永贵操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王江滨提供; 数据分析由季尚玮、张永贵完成; 本论文写作由季尚玮、王江滨完成。

通讯作者: 王江滨, 130033, 吉林省长春市仙台大街126号, 吉林大学中日联谊医院消化内科. zrlwangjb@medmail.com.cn

电话: 0431-84995303

收稿日期: 2007-08-13 修回日期: 2008-01-23

Helicobacter pylori infection in patients with chronic hepatitis C and its related factors

Shang-Wei Ji, Yong-Gui Zhang, Jiang-Bin Wang

Shang-Wei Ji, Yong-Gui Zhang, Jiang-Bin Wang, Department of Gastroenterology, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30670300

Correspondence to: Jiang-Bin Wang, Department of Gastroenterology, China-Japan Union Hospital of Jilin University, 126 Xiantai Street, Changchun 130033, Jilin Province, China. zrlwangjb@medmail.com.cn

Received: 2007-08-13 Revised: 2008-01-23

Abstract

AIM: To study the role of *H pylori* in chronic hepatitis C.

METHODS: Serum anti-*H pylori*-IgG was detected by ELISA to determine whether there is *H pylori* infection according to the diagnostic criteria of *H pylori* epidemiology. Serum HCV RNA level was detected by real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). HCV genotypes were identified by polymerase chain reaction-microplate hybridization-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-MPH-ELISA).

RESULTS: *H pylori* infection was more prevalent in patients with chronic hepatitis C, cirrhosis due to chronic hepatitis C and HCC than in healthy controls (55.5%, 76.5%, 78.6% vs 43.4%, $P < 0.05$). *H pylori* infection aggravated with the extent of hepatic lesions and the load of hepatic

C virus. *H pylori* infection was 59.5%, 66.7%, 65.0% and 59.2% in patients with genotypes 1a, 1b, 2a and 2b, respectively. However, there was no significant difference in these genotypes.

CONCLUSION: *H pylori* infection is higher in patients with chronic hepatitis C than in healthy controls. *H pylori* might play a role in the progress from chronic hepatitis C to cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Hepatitis C virus; Hepatitis C virus RNA; Real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction

Ji SW, Zhang YG, Wang JB. *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic hepatitis C and its related factors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 535-539

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*H pylori*)在慢性丙型肝炎中的作用。

方法: 采用*H pylori*流行病学诊断标准检测血清anti-*H pylori*-IgG, 来判定是否存在*H pylori*感染, 实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)方法检测血清中HCV RNA的含量, 聚合酶链反应-微板核酸杂交-酶联免疫测定法检测血清中HCV基因型。

结果: *H pylori*感染率在慢性丙型肝炎组、丙型肝炎肝硬化组和合并肝癌组明显高于健康对照组(55.5%、76.5%、78.6% vs 43.4%, $P < 0.05$), 且随着病变程度的加重, *H pylori*感染率增加。不同HCV载量的慢性丙型肝炎患者*H pylori*感染率均增加。基因1a型和1b型、2a型和2b型患者*H pylori*感染率分别为59.5%、66.7%、65.0%和59.2%, 各基因型之间比较无显著性差异。

结论: 慢性丙型肝炎患者幽门螺杆菌感染率明显增加, *H pylori*在慢性丙型肝炎向肝硬化和肝癌的发展过程中可能与HCV发挥协同作用。

关键词: 幽门螺杆菌; 丙型肝炎病毒; 丙型肝炎病毒

■背景资料

丙型肝炎病毒(HCV)感染是慢性肝炎、肝硬化和原发性肝癌的主要病因, 同样是HCV感染、且基因型相同者, 其临床表现及疾病转归却相差甚远。因此, 有些研究者认为还存在其他协同致病因素, 如细菌感染等。近年来, 国外相继有研究发现HCV相关性肝硬化、原发性肝癌的*H pylori*血清阳性率明显高于健康献血者, 且在HCV相关性慢性肝病患者的肝脏组织中发现了螺杆菌特异的16S rRNA基因的存在。

■同行评议者

党双锁, 副教授, 西安交通大学第二医院感染科; 唐晓鹏, 教授, 中南大学肝病研究所/中南大学湘雅二医院感染科

■ 研发前沿

我国作为HCV感染的高发地区,目前尚无*H pylori*与慢性丙型肝炎关系的研究。本研究通过一组病例对照研究,旨在探讨本地区人群中*H pylori*与慢性丙型肝炎的关系。

核糖核酸;实时荧光定量聚合酶链反应

季尚玮, 张永贵, 王江滨. 慢性丙型肝炎患者幽门螺杆菌感染及其相关因素分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 535-539

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/535.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染是世界上公共卫生健康的主要问题,全世界约有1.7亿人感染HCV. 在我国HCV感染者占总人口的3%,且有逐年增加的趋势, HCV感染已成为慢性肝炎、肝硬化和原发性肝癌的主要病因,严重威胁人类健康^[1]. 但是,同样是HCV感染、且基因型相同者,其临床表现及疾病转归却相差甚远. 有人可发展至慢性肝炎、肝硬化甚至原发性肝癌,而有人却不发病,疾病进展的机制尚不明确. 除遗传因素外,是否还存在其他协同致病因素的作用,如细菌感染等,越来越受到人们关注. 人们一直在寻找与HCV在慢性肝损伤及癌变发生过程中具有协同作用的其他感染因素.

1992年美国的Fox *et al*^[2]发现肝螺杆菌(*Hepaticus*)与A/J Cr小鼠肝脏疾病的发生发展关系密切. 自发现*Hepaticus*以来,全球范围内的多个研究组就螺杆菌与慢性肝病的关系作了大量研究. 虽然*Hepaticus*在超微结构和生物学特征方面与幽门螺杆菌(*H pylori*)不同,但二者为同一菌属. 而*H pylori*感染广泛分布,人类对*H pylori*普遍易感,自然人群*H pylori*感染率约为50%左右. 因此近年来人们开始关注*H pylori*与慢性肝病之间的关系,发现慢性丙型肝炎患者的*H pylori*感染率明显增高. 国外几组流行病学方面的研究表明, HCV相关性肝硬化、肝癌患者的*H pylori*血清阳性率明显高于健康献血者^[3-4]. 同时还有研究者应用PCR技术在HCV相关性慢性肝病患者的肝脏组织中相继发现了*H pylori*及其他螺杆菌属16S rRNA基因的存在^[5-7],提示螺杆菌感染可能在慢性丙型肝炎向肝硬化和原发性肝癌进展过程中发挥作用.

目前关于探讨螺杆菌在慢性丙型肝炎中的作用,欧美等许多发达国家做了大量研究,而亚洲尤其是中国等许多发展中国家作为HCV感染的高发地区,尚无相关方面的研究报道. 为了探讨我国人群中*H pylori*感染与慢性丙型肝炎之间的关系,我们进行了一组病例对照研究,调查了本地区188例慢性丙型肝炎患者的*H pylori*感染状况,以探讨*H pylori*在慢性丙型肝炎中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 病例组为吉林大学中日联谊医院2005-01/2006-12门诊及住院HCV RNA阳性和(或)anti-HCV抗体阳性的慢性丙型肝炎患者188例,男91例,女97例,年龄18-80(平均年龄49.6±15.6)岁,其中慢性丙型肝炎126例,丙型肝炎肝硬化34例,丙型肝炎合并肝癌28例. 合并其他肝病因素如HBV感染、自身免疫疾病、代谢性疾病、饮酒、药物等因素者除外. 对照组为性别、年龄相匹配的同期健康献血者136例,男67例,女69例,年龄21-65(平均年龄47.8±14.1)岁和慢性胃炎患者132例,男64例,女68例,年龄23-61(平均年龄47.1±13.3)岁. 3组病例半年内均未接受过抗生素治疗. 分别检测3组的血清anti-*H pylori*-IgG、HCV RNA定量、HCV RNA基因分型. *H pylori* IgG抗体酶联检测试剂盒由华美生物工程公司提供. 丙型肝炎病毒核酸扩增荧光定量检测试剂盒由广州中山大学达安基因股份有限公司提供. 聚合酶链反应-微板核酸杂交-酶联免疫测定试剂由中国广州第一军医大学蓝星生物科技开发有限公司提供.

1.2 方法

1.2.1 *H pylori*感染的判定: 采用*H pylori*流行病学诊断标准,即应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清anti-*H pylori*-IgG来判定是否存在*H pylori*感染.

1.2.2 HCV RNA定量及分型检测: (1)HCV RNA定量: 采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)方法检测血清中HCV RNA的含量. 最低检测下限为 1.0×10^6 copies/L. (2)HCV RNA分型: 采用聚合酶链反应-微板核酸杂交-酶联免疫测定法,即选取HCV RNA核心区的保守序列作引物,通过聚合酶链反应法扩增患者的血清标本,然后再与特异性探针夹心杂交,最后通过酶联显色对血清中HCV基因型进行检测.

统计学处理 样本均数的比较采用*t*检验,率的比较采用 χ^2 检验和Fisher精确检验, $P < 0.05$ 有统计学意义. 所有统计分析应用SPSS11.0软件完成.

2 结果

2.1 慢性丙型肝炎患者*H pylori*感染状况的调查 对188例HCV RNA阳性和(或)anti-HCV抗体阳性的慢性丙型肝炎患者*H pylori*感染状况进行调查,结果显示HCV RNA阳性和(或)anti-HCV抗体阳性的慢性丙型肝炎患者*H pylori*感染率

表 1 慢性丙型肝炎患者 *H. pylori* 感染状况的调查

分组	<i>n</i>	感染数	感染率(%)
慢性丙型肝炎患者	188	118	62.8 ^a
慢性丙型肝炎组	126	70	55.5 ^a
丙型肝炎肝硬化组	34	26	76.5 ^a
丙型肝炎合并肝癌组	28	22	78.6 ^a
慢性胃炎组	132	76	57.6 ^a
健康对照组	136	59	43.4

^a*P*<0.05 vs 健康对照组.

为62.8%, 明显高于健康对照者(43.4%), 与慢性胃炎患者(57.6%)的感染率相接近. 为进一步分析不同程度病变对 *H. pylori* 感染是否有影响, 将 HCV RNA 阳性和(或)anti-HCV 抗体阳性的慢性丙型肝炎患者根据病变程度分为慢性丙型肝炎组、丙型肝炎肝硬化组和合并肝癌组, 分别分析各组 *H. pylori* 感染状况, 结果显示慢性丙型肝炎组感染率为55.5%, 丙型肝炎肝硬化组为76.5%, 合并肝癌组为78.6%, 各组 *H. pylori* 感染率均高于健康对照组. 丙型肝炎肝硬化组以及合并肝癌组 *H. pylori* 感染率明显高于单纯肝炎组 (*P*<0.05, 表1).

2.2 慢性丙型肝炎患者血清 HCV RNA 载量与 *H. pylori* 感染的关系 将188例慢性丙型肝炎患者根据 HCV RNA 载量进行分组, 分别比较各组之间 *H. pylori* 感染状况, 结果显示不同病毒载量的慢性丙型肝炎组的 *H. pylori* 感染率均高于健康对照组 (*P*<0.05), 但不同病毒载量之间比较无统计学差异(表2).

2.3 不同基因型慢性丙型肝炎患者 *H. pylori* 感染率分析 将188例慢性丙型肝炎患者根据 HCV RNA 基因分型进行分组, 分别比较各组之间 *H. pylori* 感染状况, 结果显示基因1a型、1b型、2a型、2b型的 *H. pylori* 感染率分别为59.5%(25/42)、66.7%(38/57)、65.0%(26/40)和59.2%(29/49), 各组之间比较无统计学意义.

3 讨论

HCV 是慢性肝炎、肝硬化和原发性肝癌的主要致病因子, 且在人群中的感染率较高. 但同样是 HCV 感染者, 其临床表现及疾病转归却相差甚远. 已有大量研究证实 *H. pylori* 作为 HCV 的辅助因子参与诱导肝硬化和肝癌. 人们已相继在人类肝硬化、肝癌患者和胆囊疾病患者的肝脏和胆汁标本中发现多种螺杆菌属的存在^[8-9]. Pellicano 研究组对23例 HCV 相关性肝硬

表 2 慢性丙型肝炎患者血清 HCV-RNA 载量与 *H. pylori* 感染的关系分析

分组	<i>n</i>	<i>H. pylori</i> 阳性 <i>n</i> (%)
健康对照组	136	59(43.4)
慢性丙型肝炎组	188	118(62.8) ^a
10 ³ –10 ⁵ copies/L	102	63(61.8) ^a
> 10 ⁵ copies/L	86	55(64.0) ^a

^a*P*<0.05 vs 健康对照组.

化后肝癌患者和6例结直肠癌肝转移患者的肝脏组织应用 PCR 技术检测是否存在螺杆菌特异的 16S rRNA 基因, 结果发现23例肝癌患者中有17例(85%)发现螺杆菌特异的 16S rRNA 基因, 经 DNA 测序证实其中16例为 *H. pylori*, 另1例为 *Helicobacter pullorum*, 而6例肝转移癌中仅2例发现螺杆菌特异的 16S rRNA 基因^[10]. Rocha *et al*^[7]通过在109例伴或不伴原发性肝癌的丙型肝炎肝硬化患者的肝组织检测是否存在螺杆菌 16S rRNA 基因, 发现伴肝癌的肝硬化组、不伴肝癌的肝硬化组、慢性肝炎组、对照组分别有68.0%、61.3%、4.2%、3.5%存在螺杆菌特异的 16S rRNA 基因, 提示肝脏组织中存在螺杆菌 DNA, 并与丙肝肝硬化进展相关, 这些细菌的存在能够导致肝脏结构的改变, 螺杆菌可能是 HCV 相关性慢性肝病的协同危险因素. 此外, Ward *et al*^[11]还通过小鼠实验动物模型证实 (*H. hepaticus* 感染可引起 A/J Cr 小鼠的慢性活动性肝炎和原发性肝癌).

我们通过病例对照研究调查了本组188例慢性丙型肝炎患者的 *H. pylori* 感染状况. 结果表明慢性丙型肝炎组(55.5%)、丙型肝炎肝硬化组(76.5%)、丙型肝炎合并肝癌组(78.6%)的 *H. pylori* 感染率均明显高于健康对照组(43.4%) (*P*<0.05), 提示慢性丙型肝炎患者 *H. pylori* 感染率明显增加, 与 Pellicano *et al* 的多项研究结果一致, 但各组与慢性胃炎患者(57.6%)的感染率相接近 (*P*>0.05). 丙型肝炎肝硬化组以及合并肝癌组 *H. pylori* 感染率明显高于单纯肝炎组 (*P*<0.05), 即随着病变程度的加重 *H. pylori* 感染率增加, 提示 *H. pylori* 在慢性丙型肝炎向肝硬化和肝癌的发展过程中可能与 HCV 发挥协同作用. 同时我们还发现不同病毒载量的慢性丙型肝炎患者的 *H. pylori* 感染率均高于健康对照者 (*P*<0.05), 但不同病毒载量之间无明显差异, 提示 *H. pylori* 感染率与 HCV 病毒载量之间缺乏

■ 相关报道

Spinzi *et al* 报道了意大利丙型肝炎肝硬化患者的 *H. pylori* 感染状况. Rocha *et al* 在109例伴或不伴原发性肝癌的丙型肝炎肝硬化患者的肝组织发现了螺杆菌特异的 16S rRNA 基因的存在, 提示螺杆菌可能是 HCV 相关性慢性肝病的协同危险因素.

■创新盘点

本研究不仅对慢性丙型肝炎患者 *H pylori* 感染状况进行了研究, 还在此基础上探讨 HCV RNA 载量、HCV RNA 基因分型与 *H pylori* 感染的关系。

相关性。另外, 有研究表明, 宿主因素在慢性丙型肝炎的进展中发挥作用, 如基因1b型感染者肝脏病变进展较迅速, 且预后较差^[12]。我们按照 HCV RNA 基因分型对本地区慢性丙型肝炎患者进行分组后比较各组之间 *H pylori* 感染状况, 结果表明基因1a型、1b型、2a型、2b型的 *H pylori* 感染率分别为59.5%(25/42)、66.7%(38/57)、65.0%(26/40)和59.2%(29/49), 各组之间比较无统计学意义($P>0.05$), 即尚未发现 *H pylori* 感染与 HCV RNA 基因型之间存在相关性。目前国内外尚无相关方面的研究报道。

关于 *H pylori* 感染在慢性丙型肝炎中的作用机制尚不清楚, 可能与炎症介质和细胞免疫的参与有关。慢性肝炎是炎症性疾病, 是以促炎症因子如IL-1、IL-6、TNF- α 水平升高以及淋巴单核细胞浸润和淋巴样滤泡形成为特征的炎症过程^[13]。允许血流中的炎症细胞进入肝脏需要多对肝细胞和效应淋巴细胞表面的黏附分子。ICAM-1是最重要的因子。HCV能诱导其在肝细胞上的表达, 高水平的IL-1、IL-6和TNF- α 能增强其表达。但病毒如HCV, 仅能引起有限的炎症, 通过封闭循环中的IL-1受体, 从而限制IL-1与细胞表面受体的结合^[14]。螺杆菌是炎症反应的强烈激活因子, *H pylori*是靠近肝门束最常见的引起感染的细菌, 研究显示 *H pylori* 是IL-1、IL-6、TNF- α 和ICAM-1的强烈诱导剂^[5-6]。这些因子能促进淋巴细胞归巢和增加肝细胞毒性。因此, 螺杆菌感染能导致感染部位大量淋巴细胞和多形核细胞的聚集。IL-1基因群的多态性虽然产生IL-1 β 产物, 但对 *H pylori* 感染者来说却增加了一个危险因子^[15]。此外, Meyerter-Vehn *et al*最近研究证实CagA(+) *H pylori* 菌株能激活ERK/MAP激酶级联反应, 导致Elk-1磷酸化, 增加c-fos复制。原癌基因活化可能是 *H pylori* 诱发肿瘤发病机制中极为重要的一步。此外, 细胞培养证实一些螺杆菌还能分泌一种肝脏特异性毒素而引起肝细胞坏死, 也有可能参与体内肝脏实质的损伤机制^[16]。有实验动物模型显示 *H pylori* 感染可以通过下调病毒特异的Th1细胞因子和T细胞抑制效应而影响并发感染病毒清除^[17]。

总之, *H pylori* 在胃肠道外表现的致病机制中发挥作用的假说可能基于以下特点: (1) *H pylori* 感染是一种慢性持续性感染; (2) 局部感染可能引起系统性反应; (3) 持续感染可诱发慢性炎症和免疫反应, 导致原位和远处损伤^[6]。

H pylori 感染特别是毒力菌株感染可通过引起局部炎症、释放毒素入血、诱导炎症因子增多、增加自由基生成及形成交叉免疫反应等途径而致病。

4 参考文献

- 1 Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006; 3: 47-52
- 2 Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins MJ Jr, Gorelick PL, Ward JM. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1238-1245
- 3 Spinzi G, Pellicano R, Minoli G, Terreni N, Cutufia MA, Fagoonee S, Rizzetto M, Ponzetto A. *Helicobacter pylori* seroprevalence in hepatitis C virus positive patients with cirrhosis. The Como cross-sectional study. *Panminerva Med* 2001; 43: 85-87
- 4 Pellicano R, Leone N, Berrutti M, Cutufia MA, Fiorentino M, Rizzetto M, Ponzetto A. *Helicobacter pylori* seroprevalence in hepatitis C virus positive patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 648-650
- 5 Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Cutufia MA, Turrini F, Grigioni WF, D'Errico A, Mortimer P, Rizzetto M, Silengo L. *Helicobacter* infection and cirrhosis in hepatitis C virus carriage: is it an innocent bystander or a troublemaker? *Med Hypotheses* 2000; 54: 275-277
- 6 Dore MP, Realdi G, Mura D, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter* infection in patients with HCV-related chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1638-1643
- 7 Rocha M, Avenaud P, Menard A, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P, de Magalhaes Queiroz DM, Megraud F. Association of *Helicobacter* species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Gut* 2005; 54: 396-401
- 8 Cindoruk M, Cirak MY, Unal S, Karakan T, Erkan G, Engin D, Dumlu S, Turet S. Identification of *Helicobacter* species by 16S rDNA PCR and sequence analysis in human liver samples from patients with various etiologies of benign liver diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 33-36
- 9 Xuan SY, Li N, Qiang X, Zhou RR, Shi YX, Jiang WJ. *Helicobacter* infection in hepatocellular carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2335-2340
- 10 Pellicano R, Mazzaferro V, Grigioni WF, Cutufia MA, Fagoonee S, Silengo L, Rizzetto M, Ponzetto A. *Helicobacter* species sequences in liver samples from patients with and without hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 598-601
- 11 Ward JM, Fox JG, Anver MR, Haines DC, George CV, Collins MJ Jr, Gorelick PL, Nagashima K, Gonda MA, Gilden RV. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused

- by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1222-1227
- 12 Delic D, Nesic Z, Prostran M, Boricic I, Tomanovic N, Cutovic M, Dokic L, Simonovic J, Svrtlih N. Histopathology of chronic hepatitis C in relation to virus genotype. *Vojnosanit Pregl* 2006; 63: 819-825
- 13 Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-545
- 14 Fagoonee S, Pellicano R, Rizzetto M, Ponzetto A. The journey from hepatitis to hepatocellular carcinoma. Bridging role of *Helicobacter* species. *Panminerva Med* 2001; 43: 279-282
- 15 El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402
- 16 Baldari CT, Lanzavecchia A, Telford JL. Immune subversion by *Helicobacter pylori*. *Trends Immunol* 2005; 26: 199-207
- 17 McGee DJ, Radcliff FJ, Mendz GL, Ferrero RL, Mobley HL. *Helicobacter pylori* rocF is required for arginase activity and acid protection in vitro but is not essential for colonization of mice or for urease activity. *J Bacteriol* 1999; 181: 7314-7322

■同行评价

本文研究了大量的临床资料, 对于了解 *H. pylori* 与 HCV 感染的病情发展有一定意义。

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 •

中国学术期刊综合引证报告(2007)

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

胰腺癌中FXVD6蛋白的表达及临床意义

刘军桂, 周宁新, 夏洪天, 李成刚, 李亚卓, 李崇辉

■背景资料

胰腺癌发病率在世界范围内呈明显上升趋势,在美国和日本其病死率占全部肿瘤病死率的第4位,也是我国十大恶性肿瘤之一。胰腺癌早期缺乏敏感及特异性的诊断方法,不易被早期发现,一旦临床确诊,多属中晚期,手术切除率低。FXVD6是一种新近发现的离子通道相关的单跨膜小分子蛋白,由于其对肿瘤的作用机制尚不清楚,是否可以作为肿瘤早期诊断的分子标志物还需要进一步研究。

刘军桂, 夏洪天, 李成刚, 李崇辉, 中国人民解放军总医院肝胆外科研究所 北京市 100853

周宁新, 中国人民解放军第二炮兵总医院肝胆胃肠研究所 北京市 100088

李亚卓, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853

作者贡献分布: 本课题由刘军桂, 周宁新设计; 研究过程由刘军桂, 夏洪天, 李成刚, 李崇辉操作完成; 实验试剂及实验设备由李亚卓提供; 数据分析由刘军桂, 李成刚完成; 论文写作由刘军桂, 夏洪天, 李成刚完成。

国家自然科学基金资助项目, No. 39970724

通讯作者: 周宁新, 100088, 北京市, 中国人民解放军第二炮兵总医院肝胆胃肠研究所. zhounx301@163.com

电话: 010-66936602

收稿日期: 2007-11-05 修回日期: 2008-01-02

Expression of FXVD6 in pancreatic adenocarcinoma and its clinical significance

Jun-Gui Liu, Ning-Xin Zhou, Hong-Tian Xia, Cheng-Gang Li, Ya-Zhuo Li, Chong-Hui Li

Jun-Gui Liu, Hong-Tian Xia, Cheng-Gang Li, Chong-Hui Li, Institute of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Ning-Xin Zhou, Institute of Hepatobiliary and Gastrointestinal Surgery, the Second Artillery Forces General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100088, China

Ya-Zhuo Li, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 39970724

Correspondence to: Ning-Xin Zhou, Institute of Hepatobiliary and Gastrointestinal Surgery, the Second Artillery Forces General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100088, China. zhounx301@163.com

Received: 2007-11-05 Revised: 2008-01-02

Abstract

AIM: To investigate the expression of FXVD6 in pancreatic carcinoma and its clinical significance.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of FXVD6. The relation between the expression of FXVD6 and the clinical pathological factors was analyzed.

RESULTS: FXVD6 was expressed in 42 of 47 pancreatic carcinoma tissue samples. The positive expression rate of FXVD6 in 47 pancreatic cancer tissue samples was 89.34% (42/47). Compared to the expression of FXVD6 in normal pancreatic tissue samples, the expression of FXVD6

in pancreatic carcinoma tissue samples had a statistically significant difference ($\chi^2 = 10.8631$, $P = 0.0125$). According to the FXVD6 expression level, 47 patients were divided into high expression group and low expression group. There was no statistically significant difference in age, gender, tumor size and distant metastasis between the two groups, while there were statistical significances in tumor-differentiation degree ($\chi^2 = 11.562$, $P = 0.0031$), lymphatic metastasis ($\chi^2 = 4.1947$, $P = 0.0406$), TNM staging ($\chi^2 = 9.5995$, $P = 0.0223$). The expression level of FXVD6 protein was related to tumor size ($r = 0.2991$), differentiation degree ($r = 0.6980$), lymphatic metastasis ($r = 0.4971$) and distant metastasis ($r = 0.4967$).

CONCLUSION: FXVD6 protein plays an important role in the development and progression of pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Immunohistochemistry; FXVD6 protein

Liu JG, Zhou NX, Xia HT, Li CG, Li YZ, Li CH. Expression of FXVD6 in pancreatic adenocarcinoma and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 540-543

摘要

目的: 探讨FXVD6蛋白在胰腺癌中的表达及临床意义。

方法: 应用免疫组化法检测FXVD6蛋白在胰腺癌中的表达, 并分析其与临床病理因素的关系。

结果: 47例胰腺癌病例中, FXVD6蛋白阳性表达42例, 阳性表达率为89.34%, 而正常胰腺组织中不表达或低表达, 两组相比有显著性差异($\chi^2 = 10.8631$, $P = 0.0125$)。按FXVD6蛋白表达程度将47例胰腺癌病例分为高表达组和低表达组, 两组年龄、性别、肿瘤大小及远处转移之间的差异无统计学意义, 而肿瘤分化程度($\chi^2 = 11.562$, $P = 0.0031$)、淋巴转移($\chi^2 = 4.1947$, $P = 0.0406$)、TNM分期($\chi^2 = 9.5995$, $P = 0.0223$)之间的差异有显著统计学意义, 肿瘤分化程度低、出现淋巴转移、TNM分期为Ⅲ

■同行评议者

沈柏用, 副教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

-IV期的胰腺癌组织中FXYP6蛋白表达明显增高。Spearman等级相关分析显示, FXYP6蛋白表达程度与肿瘤大小($r = 0.2991$)、分化程度($r = 0.6980$)、淋巴转移($r = 0.4971$)、远处转移相关($r = 0.4967$)。

结论: FXYP6蛋白在胰腺癌发病机制中发挥重要作用。

关键词: 胰腺癌; 免疫组织化学; FXYP6蛋白

刘军桂, 周宁新, 夏洪天, 李成刚, 李亚卓, 李崇辉. 胰腺癌中FXYP6蛋白的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 540-543
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/540.asp

0 引言

FXYP6(FXYP domain-containing ion transport regulator 6, FXYP6)是一种新近发现的离子通道相关的单跨膜小分子蛋白。我们在前期的研究中发现FXYP6蛋白在胆管癌的演变过程中发挥重要作用^[1-2], 鉴于胰腺和肝外胆管有着共同的胚胎学起源, 发生于这些部位的胰腺导管上皮癌和胆管癌具有相似的组织学特征, 我们推测FXYP6蛋白在胰腺癌的发生和发展中也可能具有重要的作用。本研究旨在通过检测FXYP6蛋白在胰腺癌中的表达情况, 初步探讨其临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-01/2006-11中国人民解放军总医院肝胆外科因胰头导管腺癌行胰十二指肠切除手术的标本47例, 所有标本均经病理学证实, 其中男28例, 女19例, 年龄26-71(平均54.1)岁。术前未经过任何化疗和放疗。临床病理特征按年龄、性别、肿瘤大小、淋巴转移、远处转移、肿瘤分化程度和临床分期进行分组, 临床分期采用胰腺癌TNM分期。正常胰腺组织6例, 男5例, 女1例, 年龄21-56(平均43.2)岁, 由我科器官移植供体获得。FXYP6兔抗人多克隆抗体由本课题组前期研究制备, 通用型二步法免疫组化检测试剂盒由福建迈新生物技术公司提供。

1.2 方法 采用PV 6000二步法检测FXYP6蛋白的表达。标本经40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m连续切片, 常规脱蜡、枸橼酸盐抗原修复, 滴加内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育10 min, 滴加一抗FXYP6(1:100), 4℃过夜, 滴加通用型IgG抗体37℃孵育30 min, DAB显色, 苏木精复

表 1 FXYP6蛋白在正常胰腺和胰腺癌中的表达

分组	n	FXYP6(n)				P
		-	+	++	+++	
胰腺癌	47	5	13	18	11	0.0125
正常胰腺	8	3	5	0	0	

染, 中性树胶封片后镜下观察。以PBS代替一抗作为阴性对照。以胞质和(或)胞膜出现明显的深棕色或棕黄色颗粒为FXYP6染色阳性。每例标本随机取2张切片进行高倍镜观察($\times 400$), 每张切片分别随机选10个视野, 每个视野计数100个肿瘤细胞中的染色阳性细胞数, 计算阳性细胞平均百分数, 并根据肿瘤细胞中FXYP6蛋白染色的范围, 将染色分为“0-3+”4级(3+: $>50\%$; 2+: $10\%-50\%$; +: $<10\%$; 0: 无染色)。“2+”与“3+”级归为高表达组, “0”与“+”归为低表达组。

统计学处理 应用SPSS13.0统计分析软件进行数据分析, 包括 χ^2 检验或Fisher确切概率检验, 并进行Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 FXYP6蛋白在正常胰腺组织、胰腺癌中的表达 FXYP6蛋白棕黄色染色颗粒位于胞膜和(或)胞质, 以胞膜为主。胰腺癌中FXYP6呈阳性表达, 阳性表达率为89.34%(42/47), 正常胰腺组织中不表达或微弱表达, 两种组织中的表达程度差异有显著统计学意义($\chi^2 = 10.8631$, $P = 0.0125$)(表1)。

2.2 FXYP6蛋白表达与临床病理特征之间的关系 FXYP6低表达组与高表达组之间, 年龄、性别、肿瘤大小及远处转移的差异无统计学意义($\chi^2 = 0.1325$, 1.1634, 3.1006, 1.0475; $P = 0.7159$, 0.2808, 0.0783, 0.3061), 而肿瘤分化程度、淋巴转移、TNM分期的差异有统计学意义($\chi^2 = 11.562$, 4.1947, 9.5995; $P = 0.0031$, 0.0406, 0.0223)(表2)。Spearman等级相关分析显示, FXYP6蛋白表达程度与肿瘤大小、分化程度、淋巴转移、远处转移相关($r = 0.2991$, 0.6980, 0.4971, 0.4967; $P < 0.05$)。

3 讨论

目前认为胰腺癌的发生发展是一个多基因、多步骤、多阶段的复杂过程, 在不同的发展阶段有不同的基因改变和肿瘤标志物的表达。研究

■创新盘点

本文应用免疫组化法检测FXYP6蛋白在胰腺癌中的表达, 并分析其与临床病理因素的关系。

■应用要点

FXYP6蛋白可能是一个潜在的肿瘤相关蛋白,其对于肿瘤临床分期的判断、手术方式的选择及手术范围具有指导作用。

表 2 FXYP6蛋白表达与胰腺癌临床病理特征的关系

临床病理因素		FXYP6		χ^2	P
		低表达(n)	高表达(n)		
年龄	≤60岁	9	23	0.1325	0.7159
	>60岁	5	10		
性别	男	10	18	1.1634	0.2808
	女	4	15		
肿瘤大小	≤3 cm	9	12	3.1006	0.0783
	>3 cm	5	21		
淋巴转移	有	1	12	4.1947	0.0406
	无	13	21		
远处转移	有	0	5	1.0475	0.3061
	无	14	28		
分化程度	高	1	0	11.5620	0.0031
	中	13	14		
	低	1	19		
TNM分期	I	3	13	9.5995	0.0223
	II	6	8		
	III	5	7		
	IV	0	15		

发现FXYP蛋白家族的多个成员在胰腺癌的发病机制中发挥着重要作用,如FXYP3在胰腺癌中的表达不仅远远高于正常胰腺组织,而且也高于慢性胰腺炎组织。体外实验显示FXYP3的过表达可以增加胰腺癌组织的分裂增殖能力^[3-5];另外FXYP5与胰腺癌的浸润及淋巴转移密切相关,FXYP5强阳性表达被认为是两个独立危险预后因素之一,其作用机制可能是通过影响E-钙黏蛋白实现的^[6-7]。

FXYP6蛋白是FXYP家族新成员,其mRNA由Yamaguchi *et al*^[8]首先在大鼠脑和肾脏中克隆获得。染色体比较基因组杂交结果表明,11号染色体长臂是包括胆管癌、胰腺癌在内的多种肿瘤细胞最常见的异常区域^[9],主要表现为11号染色体长臂的部分或全部获得,而人fxyp6基因正是定位于11号染色体长臂(11q23.3)。初步的研究表明FXYP6只在脑中表达,并作用于成年大鼠中枢神经元的兴奋。我们前期发现,从正常胆管上皮细胞、高分化胆管癌细胞到低分化胆管癌细胞,FXYP6 mRNA含量依次递增,其表达与胆管癌分化程度呈负性相关^[10-12];hFXYP6反义核酸可以明显抑制人胆管癌细胞的体外增殖能力,推测FXYP6基因及其表达产物在胆管癌的发生和发展中可能具有重要的作用^[2]。

本实验研究显示FXYP6蛋白在胰腺癌组织中呈高表达,而在正常胰腺组织中不表达或低

表达,提示FXYP6在胰腺癌的发病机制中发挥一定作用。在对FXYP6蛋白与临床病理特征之间关系的分析中,我们发现随着胰腺癌分化程度的由高到低,FXYP6蛋白免疫反应强度逐渐增强;在出现淋巴转移的胰腺癌组织中,FXYP6蛋白表达也明显增强。上述结果表明,FXYP6蛋白高表达者,其肿瘤细胞的分化程度较差,恶性程度较高,易发生淋巴结转移,这提示我们对于临床中FXYP6蛋白高表达的胰腺癌病例,即使术中未见有明显的淋巴转移,也要扩大手术范围,进行周围淋巴清扫。另外,我们还发现不同TNM分期FXYP6蛋白的表达有明显的差异,II-IV期胰腺癌组织中的FXYP6蛋白表达要明显高于在I-II期的表达,因此术中测定FXYP6蛋白的表达程度有助于术中胰腺癌的正确分期,对于手术方式及范围具有指导意义。

FXYP6蛋白与胰腺癌的发生、发展密切相关,可能是一个潜在的肿瘤相关蛋白,但是其作用机制还不是很清楚。鉴于FXYP6是Na⁺/K⁺-ATP酶的组织特异性调节蛋白^[13-16],推测FXYP6可能通过调节Na⁺/K⁺-ATP酶的活性而影响肿瘤细胞的分化和增殖,具体机制有待于进一步探讨。

4 参考文献

- 1 万涛,倪彬,刘建伟,叶玲,周宁新.人胆管癌相关基因CCR-L2/FXYP6大片段克隆与鉴定.中华实验外科杂志 2003; 20: 393-395
- 2 窦春青,岳鑫,周宁新. hFXYP6反义核酸对胆管癌细胞体外增殖和侵袭能力的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 929-935
- 3 Kaye H, Kleeff J, Kolb A, Ketterer K, Keleg S, Felix K, Giese T, Penzel R, Zentgraf H, Buchler MW, Korc M, Friess H. FXYP3 is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and influences pancreatic cancer cell growth. *Int J Cancer* 2006; 118: 43-54
- 4 Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Olsen M, Lowe AW, van Heek NT, Rosty C, Walter K, Sato N, Parker A, Ashfaq R, Jaffee E, Ryu B, Jones J, Eshleman JR, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH, Brown PO, Goggins M. Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *Am J Pathol* 2003; 162: 1151-1162
- 5 Friess H, Ding J, Kleeff J, Fenkell L, Rosinski JA, Guweidhi A, Reidhaar-Olson JF, Korc M, Hammer J, Buchler MW. Microarray-based identification of differentially expressed growth- and metastasis-associated genes in pancreatic cancer. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1180-1199
- 6 Shimamura T, Yasuda J, Ino Y, Gotoh M, Tsuchiya A, Nakajima A, Sakamoto M, Kanai Y, Hirohashi S. Dysadherin expression facilitates cell motility and metastatic potential of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 6989-6995
- 7 Izumi T, Oda Y, Hasegawa T, Nakanishi Y, Iwasaki H, Sonobe H, Goto H, Kusakabe H, Takahira T, Kobayashi C, Kawaguchi K, Saito T, Yamamoto H,

- Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Prognostic significance of dysadherin expression in epithelioid sarcoma and its diagnostic utility in distinguishing epithelioid sarcoma from malignant rhabdoid tumor. *Mod Pathol* 2006; 19: 820-831
- 8 Yamaguchi F, Yamaguchi K, Tai Y, Sugimoto K, Tokuda M. Molecular cloning and characterization of a novel phospholemman-like protein from rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 86: 189-192
- 9 Rijken AM, Hu J, Perlman EJ, Morsberger LA, Long P, Kern SE, Hruban RH, Yeo CJ, Griffin CA. Genomic alterations in distal bile duct carcinoma by comparative genomic hybridization and karyotype analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26: 185-191
- 10 张效东, 周宁新, 卢柏松, 贾熙华, 黄培堂. 不同分化胆管癌差异表达基因的分离、克隆和功能研究. *中华外科杂志* 2002; 40: 399
- 11 张效东, 周宁新, 卢柏松, 贾熙华, 黄培堂. 不同分化胆管癌间差异表达基因的研究. *消化外科* 2002; 1: 13-15
- 12 张效东, 周宁新, 卢柏松, 黄培堂. 应用基因芯片技术比较两种不同表型的胆管癌组织中基因表达的差异. *消化外科* 2002; 1: 181-184
- 13 Delprat B, Bibert S, Geering K. FXYP proteins: novel regulators of Na,K-ATPase. *Med Sci (Paris)* 2006; 22: 633-638
- 14 Geering K. FXYP proteins: new regulators of Na,K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F241-F250
- 15 Geering K, Beguin P, Garty H, Karlsh S, Fuzesi M, Horisberger JD, Crambert G. FXYP proteins: new tissue- and isoform-specific regulators of Na,K-ATPase. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 986: 388-394
- 16 Lindzen M, Gottschalk KE, Fuzesi M, Garty H, Karlsh SJ. Structural interactions between FXYP proteins and Na⁺,K⁺-ATPase: alpha/beta/FXYP subunit stoichiometry and cross-linking. *J Biol Chem* 2006; 281: 5947-5955

■同行评价

本研究设计科学, 统计方法合理, 结论可靠, 但结果不够具体, 讨论需进一步深入。

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●

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》综合介绍以下内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用。

《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: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wjcd@wjgnet.com; <http://www.wjgnet.com>。

胰腺囊性肿瘤的诊断和治疗34例

郭春光, 田艳涛, 刘 骞, 王成锋, 赵 平

■背景资料

胰腺囊性肿瘤发病率低, 易与胰腺假性囊肿相混淆, 而其生物学特性各异, 时有误诊误治。近年随影像技术的进步, 越来越多的无症状胰腺囊性肿瘤被发现, 如何鉴别诊断, 选择合适的治疗方案成为当前关注的焦点。

郭春光, 田艳涛, 刘骞, 王成锋, 赵平, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院腹部外科 北京市 100021

作者贡献分布: 本文由郭春光及田艳涛撰写、收集数据; 刘骞及王成锋设计思路; 赵平设计思路 and 审稿。

通讯作者: 赵平, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院腹部外科。

dr.zhaoping@263.net

电话: 010-87788207 传真: 010-67730386

收稿日期: 2007-11-12 修回日期: 2008-01-02

Diagnosis and treatment of pancreatic cystic tumors: an analysis of 34 cases

Chun-Guang Guo, Yan-Tao Tian, Qian Liu,
Cheng-Feng Wang, Ping Zhao

Chun-Guang Guo, Yan-Tao Tian, Qian Liu, Cheng-Feng Wang, Ping Zhao, Department of Abdominal Surgery, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Correspondence to: Ping Zhao, Department of Abdominal Surgery, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, 17 Panjia Yuan Nanli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. dr.zhaoping@263.net

Received: 2007-11-12 Revised: 2008-01-02

Abstract

AIM: To summarize the experience with the diagnosis and treatment of pancreatic cystic tumors.

METHODS: Thirty-four patients with pancreatic cystic tumors admitted between 1980 and 2006 were analyzed retrospectively.

RESULTS: Clinical manifestations of the patients with pancreatic cystic tumors were abdominal pain, abdominal bump, abdominal distention and epigastric discomfort. The correct diagnostic rate of ultrasonography, CT and MRI for pancreatic cystic tumors was 50%, 66.7% and 80%, respectively. All the patients underwent surgery with a resection rate of 82.4%. The complications were pancreatic fistulae and hydrops of spleen fossa. Twenty-one patients with pancreatic cystadenoma were alive without relapse. Mucinous cystadenoma recurred in one patient 90 months after operation, one patient

with intraductal papillary mucinous neoplasm was alive 39 months after operation, 3 patients with mucinous cystadenocarcinoma were alive 7, 27 and 76 months after operation, mucinous cystadenocarcinoma metastasis was found in 2 patients 2 and 4 months after resection, and one patient died 27 months after operation because of tumor recurrence.

CONCLUSION: Pancreatic cystic neoplasm has no specific symptoms. CT and MRI are its main diagnostic techniques. CT in combination with MRI can improve its diagnostic rate. Surgical resection remains the main choice of its treatment. Exploratory operation should be performed for serous pancreatic cystic cystadenoma if its diameter is greater than 5 cm and its diagnosis is not unclearly established.

Key Words: Pancreatic cystic tumors; Serous cystadenoma; Mucinous cystadenoma; Cystadenocarcinoma; Surgery

Guo CG, Tian YT, Liu Q, Wang CF, Zhao P. Diagnosis and treatment of pancreatic cystic tumors: an analysis of 34 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 544-547

摘要

目的: 探讨胰腺囊性肿瘤的临床诊治特点。

方法: 回顾性分析1980-2006年我院收治的34例胰腺囊性肿瘤患者的临床资料。

结果: 胰腺囊性肿瘤常见症状为腹痛, 腹部包块, 腹胀和上腹不适。各项检查及确诊率分别为: B超50%, CT 66.7%和MRI 80%。全组病例皆行手术治疗, 手术切除率82.4%。手术并发症主要为胰瘘和脾窝积液。21例囊腺瘤生存, 未见复发。1例黏液性囊腺瘤术后90 mo复发。1例导管内乳头状囊腺癌随访39 mo生存。黏液性囊腺癌中3例分别随访7, 27和76 mo健在, 2例分别在术后2 mo和4 mo出现腹腔转移, 1例术后27 mo肿瘤复发死亡。

结论: 胰腺囊性肿瘤缺乏特异性临床表现。CT

■同行评议者

李淑德, 教授, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科

和MRI是主要诊断方法, 联合应用影像手段可以提高确诊率. 手术切除是主要治疗手段. 大于5 cm的浆液性囊性肿瘤建议手术治疗. 未明性质的胰腺囊性肿瘤应积极手术探查.

关键词: 胰腺囊性肿瘤; 浆液性囊腺瘤; 黏液性囊腺瘤; 胰腺癌; 手术

郭春光, 田艳涛, 刘霄, 王成锋, 赵平. 胰腺囊性肿瘤的诊断和治疗34例. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 544-547
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/544.asp>

0 引言

随着现代医学影像技术的进步, 越来越多的无症状胰腺囊性肿瘤被发现. 这类肿瘤发病率低, 生物学特性各异, 诊断与治疗还不够规范, 时有误诊误治. 为此, 我们总结1980-02/2006-11我院34例胰腺囊性肿瘤病例资料, 报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 全组34例胰腺囊性肿瘤, 男9例, 女25例, 年龄14-82(平均50.3)岁. 就诊时间1 wk到10年, 中位就诊时间2 mo. 常见症状为腹痛(20例), 腹部肿块(5例), 腹胀(3例)和上腹不适(2例). 10例肿瘤在行其他疾病检查或体检中发现. 体格检查中, 阳性体征主要为腹部肿块(10例)和压痛(4例).

1.2 方法

1.2.1 辅助检查: 浆液性囊腺瘤和黏液性囊腺瘤的血清肿瘤标志物Ca19-9, Ca242和CEA皆在正常范围. 3例黏液性囊腺癌行血清Ca19-9检查, 2例大于 1×10^6 U/L. CT对胰腺囊性肿瘤的确诊率为66.7%(14/21), 其中5例误诊胰腺癌, 1例误诊胰岛细胞瘤, 1例将囊腺癌诊为囊腺瘤. 5例误诊胰腺癌中有4例为浆液性囊腺瘤. 超声确诊率为50%(12/24), 5例误诊为胰岛细胞瘤, 2例囊腺癌诊为囊腺瘤. MRI为80%(4/5), 1例囊腺癌诊为囊腺瘤.

1.2.2 治疗: 全组病例皆行手术治疗并获取病理, 手术切除率82.4%(28/34). 浆液性囊腺瘤中, 1例行胰腺局部切除术, 3例行胰十二指肠切除术, 4例行胰腺中段切除术, 4例行胰体尾联合脾脏切除术. 黏液性囊腺瘤中, 2例因体积较小, 行胰腺局部切除术, 1例行胰十二指肠切除术, 7例行胰体尾联合脾脏切除术. 1例由于患者高龄, 只行囊液抽吸, 囊壁灭活术. 1例术中误诊为胰腺假性囊肿而行囊肿空肠内引流术. 其余3例由于肿瘤粘连广泛而无法切除, 1例行胃肠胆肠短路术,

2例行单纯剖腹探查术. 囊腺癌中6例行根治性手术, 其中5例由于侵犯周围脏器, 行胰体尾联合脾脏、结肠和部分胃壁的扩大切除术. 1例在外院误行囊肿外引流术, 术后反复感染发热, 4年后行胰体尾联合脏器切除. 另1例由于病期较晚, 仅行减状手术. 术后并发症主要为胰痿(6例)和脾窝积液(6例), 没有围手术期死亡.

2 结果

2.1 病理类型 浆液性囊腺瘤12例, 黏液性囊腺瘤15例, 黏液性囊腺癌6例, 导管内乳头状囊腺瘤1例. 肿瘤直径2-20 cm, 平均7.8 cm. 14例位于胰头颈部, 20例位于胰腺体尾部. 浆液性囊腺瘤、黏液性囊腺瘤和黏液性囊腺癌的平均直径分别为5.6 cm, 8.9 cm和10.7 cm. 以有无症状分组分析后, 浆液性囊腺瘤无症状组和症状组的平均直径分别为3.3 cm和7.2 cm.

2.2 预后 全组29例获得随访, 随访率85.3%. 随访时间2 mo至20年, 平均随访42 mo. 21例囊腺瘤生存, 未见复发. 1例黏液性囊腺瘤术后90 mo复发. 1例导管内乳头状囊腺瘤随访39 mo生存. 黏液性囊腺癌中3例分别随访7、27和76 mo健在. 2例分别在术后2 mo和4 mo出现腹腔转移, 1例术后27 mo肿瘤复发死亡.

3 讨论

胰腺囊性肿瘤占胰腺囊性疾病的10%-15%, 以女性多见, 主要由浆液性囊腺瘤、黏液性囊腺瘤和导管内乳头状黏液瘤组成, 其中浆液性囊腺瘤占32%-39%, 黏液性囊腺瘤10%-45%, 导管内乳头状黏液瘤21%-33%^[1]. 浆液性囊腺瘤主要位于胰头部, 由许多小囊构成0.1-2.0 cm的囊肿, 有时伴有特征性的中心星状瘢痕. 根据囊肿形态分为微囊型、少囊型和混合型, 以微囊型多见. 黏液性肿瘤包括囊腺瘤和囊腺癌, 多位于胰尾部, 单腔或多腔, 囊肿与胰管不相通, 囊壁有乳头状突起. 导管内乳头状黏液瘤发病年龄60-80岁, 男女比例相当, 以胰头部多见. 肿瘤沿扩张胰管生长, 形成乳头结构, 囊腔与胰管相通. 组织学上类似浸润性胰腺癌的表现.

胰腺囊性肿瘤多无明显症状, 常见症状为腹部不适、腹痛和腹部肿块, 有时伴有黄疸和体质量减轻. 临床表现缺乏特异性, 容易被患者忽视. 其中约1/3的病例在诊治其他疾病或体检过程中偶然发现^[2]. 胰腺囊性肿瘤的血淀粉酶、尿淀粉酶、血清Ca19-9和CEA基本都在正常范围, 对肿瘤的诊断和鉴别难以提供帮助.

■ 研发前沿

胰腺囊性肿瘤生物学行为各异, 预后不同, 约1/3患者通过体检可发现. 如何术前准确诊断, 把握适合的手术指证是当前研究的热点.

应用要点

本文为胰腺囊性肿瘤的治疗提供借鉴,体现出胰腺外科的发展方向,即以微创方式取得最佳的治疗效果。

影像检查对胰腺囊性肿瘤的诊断非常重要。超声善于区分囊实性病变,能够确定肿瘤的位置、分隔、乳头等成分,但难以对囊性肿瘤分型。浆液性囊腺瘤囊壁较薄,囊内有粗细不等的分隔光带,蜂窝样外观是其典型表现。黏液性囊腺瘤多大于2 cm,囊壁厚薄不均,囊肿中常见细分隔和钙化。CT是诊断胰腺囊性肿瘤的主要手段。浆液性囊腺瘤平扫时肿瘤分叶状,与周围界限欠清。增强后囊内分隔显示清楚,肿瘤呈典型的蜂窝样表现。个别病例可见特征性的中央星状瘢痕。约20%的浆液性囊腺瘤存在中心性钙化,细孔样,借此可与黏液性囊腺瘤的蛋壳样钙化区别。黏液性囊腺瘤的囊壁和囊内分隔血管少,增强期不强化。多表现为边缘清晰的单腔囊肿,无分叶,囊壁厚约1-2 cm。外周囊壁的蛋壳样钙化是其特征性表现^[3]。如果存在囊壁增厚、乳头状增生、蛋壳样钙化和侵犯周围结构等特征,则提示囊腺瘤可能癌变^[4]。胰胆管水成像和ERCP有助鉴别浆液性囊腺瘤和导管内乳头状黏液瘤,特别是肿瘤位于胰头或钩突时,能够清晰显示扩张的主胰管及其内的乳头结构。如果肿瘤与Wirsung管不相通,即可诊断浆液性囊腺瘤^[5]。在影像表现不典型时,准确鉴别囊性肿瘤是比较困难的。本组B超和CT的诊断效果并不理想。误诊分析表明,最易误诊的三种病变为胰岛细胞瘤,胰腺癌以及囊腺癌误诊囊腺瘤。浆液性囊腺瘤的误诊率甚至高达52.9%(9/17),肿瘤囊内分隔厚度是造成误诊的主要原因。分隔偏厚时易误诊为实性肿瘤,纤细时易误诊为单腔囊肿,常与黏液性囊腺瘤混淆。如能综合运用多种影像手段将有利提高确诊率。全组34例中共有29例行超声、CT和MRI中的1-3项,总确诊率可达82.8%(24/29)。近年,超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)被认为是诊断胰腺肿瘤的理想手段,除获取高分辨率的病变影像,还可穿刺肿瘤获取肿瘤标志物和细胞学证据。当EUS结合囊液CEA和CA199诊断囊腺癌时,敏感性可达94.4%^[6]。Brugge *et al*^[11]建议对常规影像不能确定性质的胰腺囊肿应行EUS检查,根据结果决定下一步治疗方案。

手术切除是胰腺囊性肿瘤的主要治疗手段。黏液性囊腺瘤中可能并存良性和恶性上皮细胞,需要手术切除。术中单纯切取活检并不可靠,只有详细检查标本后才能诊断为良性,否则存在漏诊囊腺癌的可能^[7]。一般认为浆液性囊腺瘤是无恶性倾向的良性病变,不需要外科干预。

但一定体积的浆液性囊腺瘤却多伴有症状。本组12例浆液性囊腺瘤中,直径小于等于5 cm者有8例,其中3例伴有症状。直径大于5 cm者皆有临床症状。无症状组和症状组的平均直径分别为3.3 cm($n=5$)和7.2 cm($n=7$),囊腺瘤呈现随肿瘤体积增大,症状增多的趋势。Tseng *et al*^[8]报道,浆液性囊腺瘤总中位生长速率为0.6 cm/年,小于4 cm的肿瘤为0.12 cm/年,大于4 cm则为1.98 cm/年。体积越大的肿瘤生长越快,也越容易出现临床症状。由于囊性肿瘤性质不易诊断, Sahani *et al*^[9]分析了肿瘤大小与恶性的关系,发现肿瘤小于3 cm时鲜有恶性。此外, Galanis *et al*^[10]对158例浆液性囊腺瘤的分析表明,病理虽为良性,但存在局部浸润表现时却预示复发和转移。我们认为,体积小的浆液性囊腺瘤可以随访观察,而伴有临床症状,肿瘤直径大于5 cm,体积进行性增大,无法与黏液性囊腺瘤区别时则应手术治疗。

由于部分良性肿瘤位于胰颈部,且多不伴临床症状,所以该部位的切除应尽量减小手术风险,保留胰腺功能。局部切除术具有创伤小,术后恢复快的优势。但当肿瘤偏大,包绕胰腺时,则有伤及胰管、术区残留的可能。如果采用胰十二指肠切除或胰体尾切除,则增加了手术风险、胰腺功能不全等并发症的发生,手术代价过大^[11]。Crippa *et al*^[12]的经验表明,胰腺中段切除与扩大的胰体尾切除相比,没有增加手术风险及并发症。由于保留了较多的胰腺实质,避免了胰腺内外分泌功能不全的发生。本组行胰腺中段切除术4例,皆为浆液性囊腺瘤,肿瘤平均直径2.1 cm,均位于胰颈部。除1例出现胰瘘和腹腔感染,余皆恢复顺利。我们认为,胰腺中段切除对于胰颈部的良性和低度恶性肿瘤是比较理想的术式。

胰腺囊性肿瘤的手术治疗还需考虑几个问题: (1)个体化的治疗方案。由于30%的病例通过体检发现,因此要谨慎把握手术指征。在确定治疗方案时要考虑患者年龄、胰腺手术风险、肿瘤的性质和部位。当前大型医疗中心的胰腺围手术死亡率已低于5%,手术安全性得到明显提高^[13]。鉴于胰腺囊性肿瘤手术切除后有较好的预后,对难以明确性质者应积极手术探查。(2)区别肿瘤和非肿瘤性疾病。依据囊壁是否存在上皮性成分与单纯囊肿和假性囊肿相鉴别。本组有2例黏液性囊腺瘤误为假性囊肿而行囊肿空肠内引流术,术后症状反复,最后病理证实黏液性囊腺瘤。因此,术中应常规冰冻病理证实囊肿的性

质^[14]. 而盲目进行内外引流则不可取. (3)术中处理. 黏液性囊腺癌有时表现为周围脏器浸润, 但少有远处转移和重要血管侵犯. 经仔细分离后一般都能得到切除, 预后较好. 本组有5例黏液性囊腺癌通过胰体尾、脾脏、结肠和部分胃壁的联合切除而得到根治, 3例获得了长期生存. 因此, 不要轻易放弃手术治疗. 一般认为导管内乳头状黏液瘤是一种前恶性病变, 存在一个从良性到恶性的渐变过程, 一旦发现即应手术切除. 由于导管内乳头状黏液瘤多沿胰管生长, 故术中应对可疑区域行冰冻病理检查, 以保证胰管切缘阴性^[15].

4 参考文献

- 1 Brugge WR, Lauwers GY, Sahani D, Fernandez-del Castillo C, Warshaw AL. Cystic neoplasms of the pancreas. *N Engl J Med* 2004; 351: 1218-1226
- 2 Fernandez-del Castillo C, Targarona J, Thayer SP, Rattner DW, Brugge WR, Warshaw AL. Incidental pancreatic cysts: clinicopathologic characteristics and comparison with symptomatic patients. *Arch Surg* 2003; 138: 427-423; discussion 433-434
- 3 Sahani DV, Kadavigere R, Saokar A, Fernandez-del Castillo C, Brugge WR, Hahn PF. Cystic pancreatic lesions: a simple imaging-based classification system for guiding management. *Radiographics* 2005; 25: 1471-1484
- 4 王单松, 靳大勇, 楼文晖, 许雪峰, 匡天涛, 倪晓凌, 吴文川, 纪元. 胰腺囊性肿瘤26例临床诊治分析. *中国实用外科杂志* 2005; 25: 681-683
- 5 Salvia R, Festa L, Butturini G, Tonsi A, Sartori N, Biasutti C, Capelli P, Pederzoli P. Pancreatic cystic tumors. *Minerva Chir* 2004; 59: 185-207
- 6 Wu H, Cheng NS, Zhang YG, Luo HZ, Yan LN, Li J. Improved early diagnosis of cystadenocarcinoma of the pancreas. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 87-91
- 7 Sarr MG, Carpenter HA, Prabhakar LP, Orchard TF, Hughes S, van Heerden JA, DiMagno EP. Clinical and pathologic correlation of 84 mucinous cystic neoplasms of the pancreas: can one reliably differentiate benign from malignant (or premalignant) neoplasms? *Ann Surg* 2000; 231: 205-212
- 8 Tseng JF, Warshaw AL, Sahani DV, Lauwers GY, Rattner DW, Fernandez-del Castillo C. Serous cystadenoma of the pancreas: tumor growth rates and recommendations for treatment. *Ann Surg* 2005; 242: 413-419; discussion 419-421
- 9 Sahani DV, Saokar A, Hahn PF, Brugge WR, Fernandez-Del Castillo C. Pancreatic cysts 3 cm or smaller: how aggressive should treatment be? *Radiology* 2006; 238: 912-919
- 10 Galanis C, Zamani A, Cameron JL, Campbell KA, Lillemoe KD, Caparrelli D, Chang D, Hruban RH, Yeo CJ. Resected serous cystic neoplasms of the pancreas: a review of 158 patients with recommendations for treatment. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 820-826
- 11 Muller MW, Friess H, Kleeff J, Hinz U, Wente MN, Paramythiotis D, Berberat PO, Ceyhan GO, Buchler MW. Middle segmental pancreatic resection: An option to treat benign pancreatic body lesions. *Ann Surg* 2006; 244: 909-918; discussion 918-920
- 12 Crippa S, Bassi C, Warshaw AL, Falconi M, Partelli S, Thayer SP, Pederzoli P, Fernandez-del Castillo C. Middle pancreatectomy: indications, short- and long-term operative outcomes. *Ann Surg* 2007; 246: 69-76
- 13 McPhee JT, Hill JS, Whalen GF, Zayaruzny M, Litwin DE, Sullivan ME, Anderson FA, Tseng JF. Perioperative mortality for pancreatectomy: a national perspective. *Ann Surg* 2007; 246: 246-253
- 14 葛春林, 郭克建, 罗晓光, 涂巍, 郭仁宣, 田雨霖. 38例胰腺囊性肿瘤的临床诊断及外科治疗. *中华普通外科杂志* 2006; 21: 235-238
- 15 Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Fukushima N, Campbell KA, Lillemoe KD. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: an updated experience. *Ann Surg* 2004; 239: 788-797; discussion 797-799

■同行评价

本文样本量较大, 且全部病例均有病理手术样本结果, 说服力较强, 具有较强的临床参考价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

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 2008-02-10)

妊娠中晚期伴急性胰腺炎治疗23例

徐进, 卜献民, 戴显伟

■背景资料

在临床工作中, 妊娠中晚期由于饮食和胆道疾病的因素可能导致急性胰腺炎的发生. 对于此方面的治疗, 一直没有深入的探讨和明确的理论指导, 常常由于治疗经验的欠缺导致母婴死亡.

徐进, 卜献民, 戴显伟, 中国医科大学盛京医院肝胆胰肿瘤移植科 辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 文章撰写和分析主要由徐进来完成. 卜献民和戴显伟贡献相同.

通讯作者: 徐进, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛京医院肝胆胰肿瘤移植科. xujinwang@163.com
电话: 024-83955400

收稿日期: 2007-10-18 修回日期: 2008-01-16

Clinical characteristics of acute pancreatitis in middle and late pregnancy stage and its treatment: an analysis of 23 cases

Jin Xu, Xian-Min Bu, Xian-Wei Dai

Jin Xu, Xian-Min Bu, Xian-Wei Dai, Department of Hepaticobiliary and Pancreatic Tumor Transplantation, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Jin Xu, Department of Hepaticobiliary and Pancreatic Tumor Transplantation, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Road, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. xujinwang@163.com

Received: 2007-10-18 Revised: 2008-01-16

Abstract

AIM: To discuss the clinical characteristics of acute pancreatitis in middle and late pregnancy stage and its treatment.

METHODS: Twenty-three patients with acute pancreatitis in middle and late pregnancy stage were conservatively treated with drugs under close observation. Operation was performed for those with their conditions worsened to eliminate the necrotic tissues and terminate their pregnancy.

RESULTS: Two mothers with their fetus died, 21 mothers were discharged from the hospital after their entire recovery and 13 fetuses were successfully saved.

CONCLUSION: Women in the middle and late pregnancy stage, especially those with a history of gallbladder and biliary tract diseases are easy to suffer from pancreatitis. Changes in endocrine

during this stage can also lead to the development of acute pancreatitis.

Key Words: Pregnancy; Pancreatitis; Surgery

Xu J, Bu XM, Dai XW. Clinical characteristics of acute pancreatitis in middle and late pregnancy stage and its treatment: an analysis of 23 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 548-550

摘要

目的: 探讨妊娠中晚期伴发急性胰腺炎的临床特点和治疗经验.

方法: 23例妊娠中晚期伴发急性胰腺炎的患者均经药物保守治疗, 密切观察, 并部分病情变化转为手术治疗. 手术以清除坏死组织和终止妊娠为主.

结果: 2例母婴死亡, 21例母亲痊愈出院, 保胎成功13例.

结论: 妊娠中晚期的患者容易发生急性胰腺炎, 特别是既往胆囊或胆道疾病病史的患者, 同时妊娠中晚期内分泌变化也容易导致胰腺炎的发生.

关键词: 妊娠; 胰腺炎; 手术

徐进, 卜献民, 戴显伟. 妊娠中晚期伴急性胰腺炎治疗23例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(5): 548-550

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/548.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(acute severe pancreatitis, ASP)是普通外科急症中最严重的一种疾病. 其发病急, 发展迅速, 并发症多, 死亡率高, 一直是普通外科处理最困难的疾病之一. 妊娠并发急性胰腺炎并不常见, 国外报道妊娠人群的发病率为1/1000-1/5000^[1,14], 但有逐年增加的趋势. 妊娠合并急性胰腺炎具有发病急, 进展快, 临床过程凶险, 对母婴危害大, 孕产妇及围生儿病死率高达20%-50%. 现在就我院2000-01/2005-12救治的23例病例总结经验如下.

■同行评议者

蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化内科

1 材料和方法

1.1 材料 2000-01/2005-12我院救治患者23例, 年龄22-34(平均27.3)岁. 初产妇16例, 经产妇7例. 其中中期妊娠14例, 晚期妊娠9例, 平均妊娠6.3 mo. 孕前有慢性胆囊炎1例, 孕期发现胆囊结石4例, 发病前摄油腻食物过多11例.

1.2 方法

1.2.1 诊断标准及分型: 根据临床表现, 生化检查, B超或手术探查明确诊断. 临床症状和体征有以下2-3项者即可考虑本病: (1)中上腹持续性疼痛, 频繁恶心呕吐, (2)血尿淀粉酶升高 >128 或 256 U/L, 或突然下降到正常但病情恶化, (3)B超或CT显示胰腺肿胀, 质地不均或胰外有浸润. 根据AP临床诊断及分级标准, 重症17例, 轻度6例.

1.2.2 治疗方法: 23例均先经禁食, 胃肠减压, 抑酶及广谱广菌素治疗. 24 h之内转为手术5例. 24 h后手术3例. 2例术中终止妊娠后行胰腺包膜切开引流及部分病灶切除. 转入ICU 2例. 肾脏透析1例.

2 结果

临床首发症状均为腹痛, 伴腹膜炎13例, 呼吸困难2例, 肾功能衰竭1例. 16例伴恶心呕吐, 发热4例, 体温平均 39.1°C , 入院后检查, 上腹部压痛18例, 腹膜刺激征13例, 入院后出现先兆早产3例, 胎心快11例. 血白细胞及中性粒细胞升高8例, 最高白细胞 $20 \times 10^9/\text{L}$, 中性89%. 血淀粉酶升高23例, 为 $984-4532$ U/L(正常值 $70-170$ U/L). 高脂血症21例, 总胆固醇升高明显, 肝酶升高15例, 其中谷丙转氨酶最高达 600 U/L, 电解质异常7例, 其中低血钾1例, 血糖升高3例, 最高 12.1 mmol/L. B超提示胰腺边缘模糊不清, 有腹腔渗出18例, 胰腺肿大6例, 探及胆囊结石4例. 2例母婴死亡, 21例母亲痊愈出院. 保胎成功13例.

3 讨论

急性胰腺炎的病因很多, 现在研究认为主要与胆道疾病及饮食因素有关. Gürsoy *et al*^[7]报道认为肥胖, 妊娠期营养增加特别是高脂饮食是妊娠合并急性胰腺炎的重要诱因.

本组患者情况, 23例中4例合并胆结石, 1例合并慢性胆囊炎, 4例合并胆囊结石, 11例有暴饮暴食病史, 胆道疾病^[15]和饮食因素仍然是妊娠期胰腺炎的主要病因. 另外妊娠期常伴有自己疾病的特殊性: 妊娠期本身导致的不利因素, (1)血液流变学发生改变. 孕妇高蛋白、脂肪的摄入增加及体内孕、雌激素含量的显著变化引起

妊娠晚期血清总胆固醇含量明显升高. Athyros *et al*^[3]报道妊娠期甘油三酯较非孕时升高2-3倍, 而脂蛋白酶活性降低, 严重的甘油三酯升高可能在妊娠晚期产生不良后果, 胰腺血管被凝集的血清脂质颗粒栓塞, 容易诱发急性胰腺炎^[12,15]. 甘油三酯的升高也使血浆黏滞性增加, 血液流动的阻力增大^[4-5]. (2)微循环抗紊乱能力减弱, 但当孕周达终末期时, 因腹腔压力增加胆胰管内阻力增加, 和血液高黏滞综合征其耐受能力下降. Hernandez *et al*^[2]指出, 胰管高压可致导管-腺泡屏障破裂, 使胆汁分布于胰间质血管周围, 可致胰腺微循环出血及血栓形成, 可致胰腺微循环障碍. (3)妊娠导致的并发症, Badja *et al*^[6]报道妊高征可引起微血管内凝血和血管炎, 诱发胰腺坏死而导致急性胰腺炎. 因此临床上认为妊娠性胰腺炎病理分型以坏死型为主而水肿型较少. (4)甘油三酯一般可升高30%左右, 并在孕后期达到高峰, 严重者血浆呈乳糜状. 事实证明妊娠高脂血症也是诱发胰腺炎的原因之一^[8]. (5)妊娠时由于盆腔脏器充血及激素的影响, 毛细血管壁通透性增加, 促使炎症发展, 同时膨大的子宫机械性压迫也不利于炎症的消退; 炎症的扩散又可刺激子宫收缩, 易引起流产, 早产等. 其他不利因素: (1)妊娠期间对抗生素治疗有明显的限制. 一般主要应用青霉素类或头孢类药物. 大多数医生参照药物说明都对抗生素应用持谨慎态度. 如果青霉素类阳性, 选择药物将更加十分困难. 加重了治疗上的困难. (2)生长抑素类药物的限制应用. 应用生长抑素类药物是胰腺炎保守治疗中非常重要的环节. 但是由于对胎儿可能有潜在的影响, 所以到现在为止国际上也没有对生长抑素类药物在孕妇中是否应用作出明确规定. (3)CT是诊断胰腺炎的国际上的金标准^[9-11], 但是由于胎儿的存在, 使一些特异性检查应用起来非常困难. 只能以无创性的B超作为必要检查手段, 但是对于腹腔深部的器官来说, 在炎症状态下, 前方的肠管常常高度积气, 影响检查效果, 可能妨碍诊断效果. 由于上述不利因素, 所以对于妊娠期胰腺炎治疗变的非常困难, 而且如果保守治疗效果不好, 常可以使可能导致母婴双亡的悲惨局面.

通过上述病例我们总结治疗妊娠期胰腺炎的常用方法: (1)补液, 纠正水电紊乱, 抑酶及抗生素治疗: 禁食, 频繁呕吐可致水电解质异常, 为满足胎儿生长营养需要及让胃肠和胰腺充分休息, 应及早给予胃肠外营养, 每日补液

■创新盘点

本文主要提出作者的观点, 根据病情变化认为积极采取外科治疗对母婴的安全性可以提高. 治疗这方面疾病不能瞻前顾后, 要当机立断, 争取治疗时间.

■应用要点

本文通过介绍妊娠伴发急性胰腺炎的治疗经验, 为此疾病的深入研究提供借鉴和参考依据.

■同行评价

本文总结妊娠中晚期急性胰腺炎的临床特点及治疗经验,对临床有一定的指导意义,但缺乏统计学处理。

3000-4000 mL, 其中1/3-1/4为胶体溶液, 提高胶体渗透压, 维持血容量, 纠正水电解质紊乱。按医嘱给予抑肽酶及广谱抗菌素治疗。(2)必要的产科护理: 据报导孕妇并发急性胰腺炎约75%发生在晚期妊娠, 早产发生率高达60%。本组发生在晚孕期占80%, 早产发生率占10%, 可见保守治疗胰腺炎的同时应进行保胎治疗, 密切观察胎心率, 腹痛及腹部体征, 宫缩等变化, 并进行胎动计数, B超, NST检查, 加强胎儿监护, 及时了解胎儿宫内情况, 尽量延长胎龄。(3)适时终止妊娠。如果胎儿超过32 wk, 在应用抗生素的情况下, 应给予地塞米松以促胎肺成熟不论是自然分娩或手术分娩, 均需做好新生儿抢救的准备。对于中晚期妊娠应常规每4 h听胎心1次, 必要时还应缩短时间。(4)行B超和血酶学的跟踪检测, 每4 h检测一次血淀粉酶和脂肪酶。B超每12 h复查1次。必要时仍然要行CT检查。(5)细心观察体征。如腹膜炎出现, 血象超过 $20 \times 10^9/L$, 紧急手术治疗。(6)观察呼吸和尿量的变化, 可以行血气检查和留置导尿, 急检肾功能。如果有器官功能不全的病妇, 应急诊手术治疗。(7)如果保守24 h治疗效果不好, 应紧急手术治疗。必要时能果断终止妊娠挽救患妇生命。

无论何种类型的胰腺炎, 对孕妇和胎儿的危害都很大^[13]。重症胰腺炎起病凶险, 胰腺发生出血坏死, 腹腔有大量血性渗出, 急性渗出物和毒素可刺激子宫, 引起持续性宫缩, 最终导致子宫胎盘血循环障碍, 使胎儿缺氧而死亡。毒素也可直接通过胎盘引起死胎。而且不利因素较非妊娠胰腺炎更多, 所以治疗起来更加困难。

治疗原则是首先以保证病妇的生命为主, 其次兼顾胎儿。保守治疗时间不易过长。严密观察病妇各项指标变化, 当机立断, 不能延误治疗时机。手术以清除胰腺坏死组织充分引流, 同时终止妊娠状态, 减少胰腺炎加重的因素。

4 参考文献

1 Coleman MT, Trianfo VA, Rund DA. Nonobstetric

- emergencies in pregnancy: trauma and surgical conditions. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 497-502
- 2 Hernandez CA, Lerch MM. Sphincter stenosis and gallstone migration through the biliary tract. *Lancet* 1993; 341: 1371-1373
- 3 Athyros VG, Giouleme OI, Nikolaidis NL, Vasiliadis TV, Bouloukos VI, Kontopoulos AG, Eugenidis NP. Long-term follow-up of patients with acute hypertriglyceridemia-induced pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 472-475
- 4 Belo L, Caslake M, Santos-Silva A, Castro EM, Pereira-Leite L, Quintanilha A, Rebelo I. LDL size, total antioxidant status and oxidised LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study. *Atherosclerosis* 2004; 177: 391-399
- 5 Okazaki M, Usui S, Tokunaga K, Nakajima Y, Takeichi S, Nakano T, Nakajima K. Hypertriglyceridemia in pregnancy does not contribute to the enhanced formation of remnant lipoprotein particles. *Clin Chim Acta* 2004; 339: 169-181
- 6 Badja N, Troche G, Zazzo JF, Benhamou D. Acute pancreatitis and preeclampsia-eclampsia: a case report. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 707-709
- 7 Gürsoy A, Kulaksizoglu M, Sahin M, Ertugrul DT, Ozer F, Tutuncu NB, Demirag NG. Severe hypertriglyceridemia-induced pancreatitis during pregnancy. *J Natl Med Assoc* 2006; 98: 655-657
- 8 Chuang SC, Lee KT, Wang SN, Kuo KK, Chen JS. Hypertriglyceridemia-associated acute pancreatitis with chylous ascites in pregnancy. *J Formos Med Assoc* 2006; 105: 583-587
- 9 Kim DH, Pickhardt PJ. Radiologic assessment of acute and chronic pancreatitis. *Surg Clin North Am* 2007; 87: 1341-1358, viii
- 10 Tsuji Y, Yamamoto H, Yazumi S, Watanabe Y, Matsueda K, Yamamoto H, Chiba T. Perfusion computerized tomography can predict pancreatic necrosis in early stages of severe acute pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1484-1492
- 11 Casas JD, Diaz R, Valderas G, Mariscal A, Cuadras P. Prognostic value of CT in the early assessment of patients with acute pancreatitis. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 182: 569-574
- 12 Perrone G, Critelli C. Severe hypertriglyceridemia in pregnancy. A clinical case report. *Minerva Ginecol* 1996; 48: 573-576
- 13 Chen CP, Wang KG, Su TH, Yang YC. Acute pancreatitis in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995; 74: 607-610
- 14 Hsia SH, Connelly PW, Hegele RA. Successful outcome in severe pregnancy-associated hyperlipemia: a case report and literature review. *Am J Med Sci* 1995; 309: 213-218
- 15 Robertson KW, Stewart IS, Imrie CW. Severe acute pancreatitis and pregnancy. *Pancreatol* 2006; 6: 309-315

编辑 李军亮 电编 何基才

内源性生物素在结肠组织中的表达及其对免疫组化的影响

高春, 王爱英, 韩亚京

高春, 王爱英, 韩亚京, 北京大学第三医院消化科 北京市 100083

国家自然科学基金资助项目, No. 30571810

作者贡献分布: 此课题由王爱英和高春设计; 研究操作过程及数据分析由高春、王爱英和韩亚京完成; 论文写作由高春和王爱英完成。

通讯作者: 王爱英, 100083, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院消化科. wangaiy@bjmu.edu.cn
电话: 010-62017691-2533

收稿日期: 2007-09-13 修回日期: 2007-12-20

Expression of endogenous biotin in colonic tissues and its influence on the results of immunohistochemistry

Chun Gao, Ai-Ying Wang, Ya-Jing Han

Chun Gao, Ai-Ying Wang, Ya-Jing Han, Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30571810

Correspondence to: Ai-Ying Wang, Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China. wangaiy@bjmu.edu.cn

Received: 2007-09-13 Revised: 2007-12-20

Abstract

AIM: To investigate the normal expression of endogenous biotin (EB) in colonic tissues and its influence on the results of immunohistochemistry (IHC).

METHODS: Fourteen specimens were tested and analyzed with different immunology methods.

RESULTS: EB was expressed on the fundic endoplasm of surface epithelial cells in 8 of the 14 colonic tissue samples, and 15% egg white blocking fluid could eliminate EB in colonic tissues from human beings. Traditional SP, SP + 15% egg white blocking fluid, two-step PV-6002 and improved two-step PV-6002 showed that Bax was positively expressed in 12 (85.71%), 10 (71.43%), 4 (28.57%) and 8 (57.14%) colonic tissue samples, respectively, whereas moderately and strongly expressed in 10, 6, 0, and 5 colonic

tissue samples, respectively.

CONCLUSION: Endogenous biotin is expressed mostly in the fundic endoplasm of surface epithelial cells in colonic tissue samples from human beings. The biotinylated detection system is the first choice of method during IHC.

Key Words: Immunohistochemistry; Endogenous biotin; Colon; Paraffin-embedded tissue; Egg white blocking fluid

Gao C, Wang AY, Han YJ. Expression of endogenous biotin in colonic tissues and its influence on the results of immunohistochemistry. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 551-555

摘要

目的: 探讨内源性生物素在结肠组织中的表达及其对免疫组化结果的影响。

方法: 14例结肠黏膜组织标本按不同的免疫学方法进行实验和分析。

结果: 8例出现内源性生物素阳性表达(57.14%), 主要位于表面上皮细胞胞质, 尤其近基底侧。15%蛋清封闭液可以封闭结肠组织中的内源性生物素。传统SP法、SP法+15%蛋清液、PV-6002两步法和改进后的两步法Bax阳性表达数分别为12例(85.71%)、10例(71.43%)、4例(28.57%)和8例(57.14%), 在这四种方法中Bax中等强度以上表达数分别为10例、6例、0例和5例。

结论: 内源性生物素在结肠组织中主要表达在表面上皮细胞胞质, 尤其是近基底侧; 免疫组化时可首选生物素标记的检测系统。

关键词: 免疫组织化学; 内源性生物素; 结肠; 石蜡包埋组织; 蛋清封闭液

高春, 王爱英, 韩亚京. 内源性生物素在结肠组织中的表达及其对免疫组化的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(5): 551-555

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/551.asp>

■背景资料

随着免疫组化技术越来越广泛的运用, 内源性生物素因其对免疫组化结果的影响而受到极大关注。目前, 国内外文献对结肠组织中内源性生物素的表达及其影响未见报道。

■同行评议者

陈建荣, 副教授, 南通大学第二附属医院急诊医学中心

■研究前沿

探讨免疫组化中各个影响因素及有效的消除方法,是免疫组化方法学研究的重点。本文探讨内源性生物素在结肠组织中对免疫组化结果的影响,并提出合适的消除方法。

0 引言

随着免疫组化技术在临床诊断和科学研究中获得越来越广泛的运用,内源性生物素因其对免疫组化结果产生较大影响而受到极大关注。常用的检测系统中,包括SP、SABC和LSAB等,均是用生物素标记的二抗,而文献报道加热抗原修复会重新暴露内源性生物素的活性^[1-2],由此导致实验结果的假阳性也引起学者们的广泛关注^[3]。因为内源性生物素较多分布在线粒体中,以往的研究过多的集中在含线粒体丰富的组织,如肝脏、肾脏和乳腺等^[4-5]。而肠道作为内源性生物素产生的重要部位之一,对其表达情况却研究甚少,国内外文献中均未见报道。

目前,免疫组化的检测系统较多,既包括上述以SP为代表的生物素标记的三步法检测系统,也包括许多非生物素标记的检测系统,例如EnVision、PicTureTM、PowerVision等,他们大都是简化的两步法检测系统。后者显示较高的特异性,而且敏感性也较高,因此有学者认为,内源性生物素含量丰富的组织应该放弃以SP为代表的生物素标记的三步法检测^[6]。本研究旨在通过不同的实验方法探讨内源性生物素在结肠组织中对免疫组化结果的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 结肠黏膜标本取自北京大学第三医院消化内镜中心, Bax一抗和SP检测系统由美国NeoMarkers公司提供, PV-6002为两步法的非生物素标记的检测系统, 购自北京中杉公司。

1.2 方法

1.2.1 标本的制备: 结肠镜黏膜活检, 标本立即用40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μ m厚连续切片, 每份标本均制作成8张免疫组化用的切片, 另有1张作HE染色。

1.2.2 蛋清封闭液的制备: 取新鲜鸡蛋蛋清, 无菌操作, 纱布过滤后4℃冰箱保存, 使用时用去离子水稀释成不同的浓度, 室温孵育均为30 min, 其后PBS冲洗3次, 每次各5 min。

1.2.3 免疫组化: (1)按照SP/PV-6002步骤进行; (2)抗原修复采用微波高火15 min, 修复液采用0.01 mol/L柠檬酸(pH 6.0); (3)对照设立包括阳性对照、阴性空白对照和阴性替代对照, 阳性对照由NeoMarkers公司提供, 空白对照由既往实验证实, 替代对照用PBS取代一抗。

1.2.4 实验方法: (1)切片脱蜡水化后常规使用过氧化氢液封闭内源性过氧化物酶活性, 使用血

清减轻非特异性背景染色, 随之直接滴加SP液, DAB显色, 普通光学显微镜下观察; (2)在上一步基础上增加微波高温抗原修复, DAB显色和镜下观察; (3)微波抗原修复后增加蛋清封闭液的处理过程, 余同上; (4)传统的免疫组化SP法操作; (5)增加蛋清封闭液的处理后, 按照常规SP法操作; (6)按照PV-6002两步法说明书操作; (7)将PV-6002两步法的二抗作用条件由室温30 min改为37℃孵育60 min, 余仍按照说明书操作; (8)PV-6002两步法的操作, 不加一抗观察二抗的单一影响; (9)HE染色进行普通病理诊断, 并辅助免疫组化结果的判断。

1.2.5 结果判定: 记分参照Rahman *et al*的标准并作适当修改。染色强度记分: 无色0分; 淡黄色1分; 黄色2分; 棕褐色3分。阳性细胞数记分: <25%, 1分; 26%-50%, 2分; 51%-75%, 3分; >75%, 4分。根据染色强度和阳性细胞数计分之之和进行判断: 0分为阴性(-), 1-2分为弱阳性(+), 3-5分为阳性(++), 6-7分为强阳性(+++)。所有结果均经3位作者在病理医师帮助下分别阅片, 若有疑义共同商议后确定。

2 结果

2.1 内源性生物素在结肠组织的表达 方法1和2操作前者反应是石蜡包埋结肠组织未经热修复的情况, 后者反应的是微波热修复后的情况。前者均未见阳性表达; 后者出现明显的内源性生物素表达, 14份标本中8份出现阳性(57.14%), 其中中等强度以上的表达有6份(42.86%)。表达部位主要是在结肠黏膜表面上皮细胞的胞质, 且绝大多数在近核的基底侧(表1, 图1)。

2.2 蛋清封闭液对结肠组织内源性生物素的效果 观察不同浓度的蛋清封闭液对结肠组织内源性生物素的封闭效果, 浓度分别为5%、15%和30%, 孵育均为室温30 min。结果显示, 15%蛋清封闭液可以得到满意的效果, 内源性生物素被成功封闭(图2); 5%的蛋清封闭液不能完全封闭, 在内源性生物素表达部位存在部分着色, 但强度明显下降; 30%蛋清封闭液的封闭效果不满意, 整个背景均有轻微的着色。15%蛋清封闭液的结果见表1。

2.3 不同免疫组化实验方法结果 方法4反应的是未经蛋清封闭液处理, 用生物素标记SP系统的检测结果; 方法5反应的是经过蛋清封闭液封闭内源性生物素后, SP系统的检测结果; 方法6反应的是按说明书操作的两步法非生物素标记系

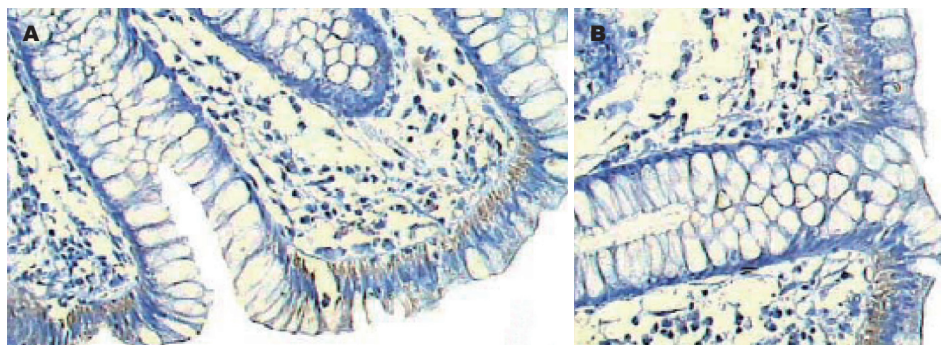


图1 内源性生物素在石蜡包埋结肠组织中的表达情况(微波处理后 $\times 400$). A: 主要在黏膜表面上皮细胞胞质表达, 以近核基底侧为主; B: 单一在上皮细胞胞质近核基底侧表达.

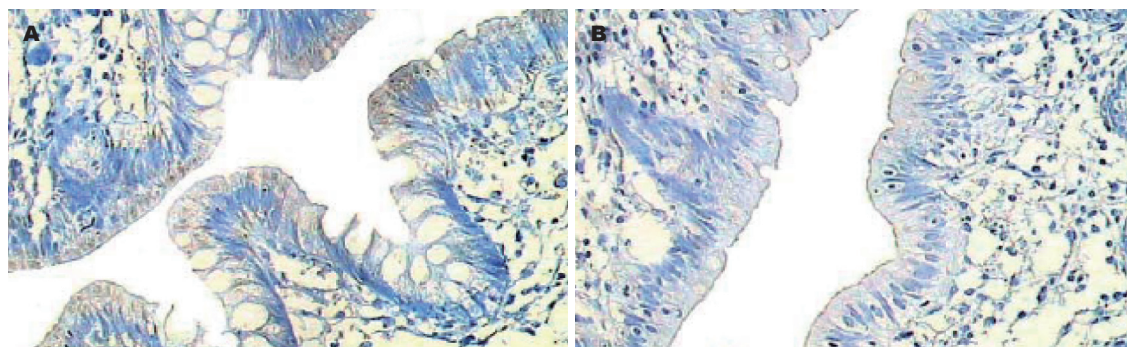


图2 蛋清封闭液对结肠组织内源性生物素的封闭效果($\times 400$). A: 蛋清液封闭前; B: 蛋清液封闭后.

统的检测结果; 方法7反应的是调整两步法检测系统二抗作用条件后的结果(图3).

4种方法的样本阳性数有明显差异, 其中方法4阳性数最多, 14例标本中有12例阳性(85.71%), 中等度以上表达的有10例; 增加蛋清液封闭内源性生物素后(方法5), 阳性表达数降至10例(71.43%), 而中等度以上表达的仅有6例(42.86%). 增加了内源性生物素的封闭后, 原有的12例阳性标本中有7例出现不同程度的强度下降(58.33%), 甚至有2例均为中等强度以上表达的阳性标本从阳性直接转为阴性(表1).

更换两步法非生物素的检测系统后, 按照步骤操作(二抗作用条件为室温30 min)实验, 阳性数仅为4例(28.57%), 且强度均较弱, 无1例达到中等度及以上表达; 提高二抗的作用温度至37℃、延长作用时间至60 min, 阳性数上升至8例(57.14%), 其中中等度以上表达的有5例(35.71%), 仅略低于SP系统. 调整后的PV-6002系统与SP系统逐一比较, 14例标本中有9例检测结果完全一致, 5例存在差异, 其中4例PV-6002系统强度弱于SP系统, 3例SP法阳性而两步法为阴性, 仅有1例两步法为弱阳性而SP法为阴性. 方法8证实了非生物素检测系统的二抗对结果没

有影响, HE染色是为了辅助免疫组化结果的判定.

3 讨论

生物素是一种含硫水溶性维生素, 广泛分布于动物及植物各组织, 是多种羧化酶辅基的成分, 在人体内主要位于线粒体和细胞质中, 参与多种生理和病理反应. 内源性生物素是指体内所含有的能够和抗生物素蛋白结合的分子或基团, 肠道是其产生的主要部位之一. Rodriguez-Soto *et al*发现在甲醛固定、石蜡包埋组织中内源性生物素活性被封闭, 而经过微波高温修复后活性重新恢复^[1-2]. 本研究证实了这一观点, 14例石蜡包埋结肠组织如果不经高温热修复, 在常规脱蜡水化后直接与外源性的抗生物素蛋白反应, DAB显色, 并未发现有阳性着色. 经过微波高温热修复, 8例出现明显着色, 且有6例表达强度在中等度及以上; 主要部位在黏膜表面上皮细胞的胞质, 尤其近核基底侧. 本研究证实了结肠是内源性生物素高表达的组织之一, 详细报道了内源性生物素在石蜡包埋结肠组织中的表达情况.

早在1981年Wood *et al*^[7]就发现内源性生物素会对免疫组化的结果产生影响, 并且初步找到解决的方法, 随后又陆续有研究报道^[8]. 目前

■相关报道

国外学者认为在内源性生物素含量丰富的组织中应该放弃以生物素标记的免疫组化检测系统.

■创新盘点

本文首次报道了内源性生物素在石蜡包埋结肠组织中的表达情况, 并且通过实验证实了尽管结肠组织中内源性生物素含量丰富, 但是处理得当依然可以获得理想的结果.

■应用要点

在结肠组织中进行免疫组化操作时,生物素标记的检测系统依然可列为首选方法之一。本研究结果对应用免疫组化技术时合理选择不同的检测系统有一定意义。

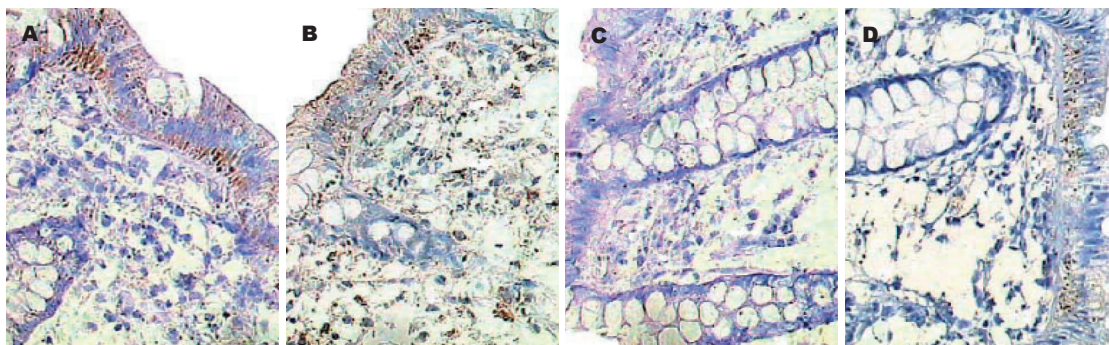


图3 不同免疫组化实验方法($\times 400$)。A: 未加蛋清液封闭的SP系统的检测结果; B: 蛋清液封闭后的SP系统的检测结果; C: PV-6002两步法原检测系统的结果(二抗为室温30 min); D: 调整二抗作用条件后PV-6002两步法系统的检测结果。

表1 各种实验方法的结果

实验方法	1	2	3	4	5	6	7	8
001	-	-	-	+++	+++	+	+++	-
002	-	++	-	+++	++	-	++	-
003	-	++	-	++	-	-	-	-
004	-	+++	-	+++	-	-	+	-
005	-	-	-	+	+	-	-	-
006	-	-	-	+++	+++	+	+++	-
007	-	-	-	-	-	-	-	-
008	-	+	-	++	++	+	++	-
009	-	++	-	++	+	-	-	-
010	-	+	-	++	+	-	-	-
011	-	+++	-	+++	++	-	+	-
012	-	+++	-	+++	++	+	++	-
013	-	-	-	-	-	-	-	-
014	-	-	-	+	+	-	+	-

1-8对应材料和方法中的方法编号; 001-014是各标本的编号。

有很多厂家提供内源性生物素的封闭液,然而,有研究表明在某些情况下,这些封闭液并不能达到满意的效果^[9]。Miller *et al*推荐了一种简单的封闭液,即蛋清封闭液^[10]。考虑到蛋清来源容易、价格便宜、操作简单、并且可以自由调整浓度,我们研究了蛋清封闭液的效果,结果发现采用合适的浓度在结肠组织中可以取得满意的效果,浓度过高或过低时效果均不满意。封闭的效果存在较高的浓度依赖性,这可能是即用型的封闭液在某些组织中不能取得满意效果的原因之一。本研究结果提示,在石蜡包埋结肠组织中,内源性生物素的活性可以被完全封闭,影响可以被消除;考虑到封闭的效果存在较高的浓度依赖性,蛋清封闭液可成为首选的内源性生物素封闭液。

因为内源性生物素会对免疫组化的结果产

生影响。有学者认为应该在生物素含量丰富的组织放弃以生物素标记的免疫组化检测系统^[6]。本研究重点是在结肠组织中免疫组化时是否应该抛弃生物素标记的检测系统。根据预实验的结果,我们选择了在同一部位表达的Bax抗体作为研究所用的一抗,Bax是Bcl-2家族促凋亡亚家族的成员之一,在正常多种组织有表达,其中包括正常的结肠组织。经过封闭后SP系统依然表现出高敏感性,每一份标本均设立了阴性对照,对照片未见着色,同时实验片背景清晰,未见非特异性着色,表现出较高的特异性。由实验结果可以看出,经过合适的封闭过程,用生物素标记的系统是可以取得理想结果。

反观两步法系统的检测结果,按照说明书步骤操作,阳性表达数很低,14例标本中仅有4例出现阳性,且表达均较弱,没有1例达到中等

度以上表达;与SP系统比较,背景更为清晰,表现出非常高的特异性,但低敏感性过低.考虑到这一情况,本研究改进实验条件,将二抗的作用条件进行改善,得到了较为理想的结果,8例出现阳性表达,但依然低于SP系统.而且有3例SP系统检测为阳性在该方法中为阴性,敏感性相对较低.敏感性和特异性很难同时获取,这也正是不同检测系统难以取舍的原因.SP为代表的生物素标记的检测系统由于采取三级放大,敏感性高于两步法的检测系统,特异性降低,非特异性的背景染色增加.本研究成功消除了内源性生物素的影响,并且获得了理想效果.根据研究结果,在结肠组织中进行免疫组化操作时,生物素标记的检测系统可作为首选方法之一.

致谢:感谢吕愈敏教授、李柯主治医师、张颖、尚惠茹在标本收集和处理上给予本课题的帮助.

4 参考文献

- 1 Barker FG, Ozua P, Van Noorden S. False positive immunoreaction in products of conception. *J Clin Pathol* 1994; 47: 1118-1119
- 2 Rodriguez-Soto J, Warnke RA, Rouse RV. Endogenous avidin-binding activity in paraffin-embedded tissue revealed after microwave treatment. *Applied immunohistochemistry* 1997; 5: 59-62
- 3 Srivastava A, Tischler AS, Delellis RA. Endogenous biotin staining as an artifact of antigen retrieval with automated immunostaining. *Endocr Pathol* 2004; 15: 175-178
- 4 Parkin RK, Boeckh MJ, Erard V, Huang ML, Myerson D. Specific delineation of BK polyomavirus in kidney tissue with a digoxigenin-labeled DNA probe. *Mol Cell Probes* 2005; 19: 87-92
- 5 Skinnider BF, Folpe AL, Hennigar RA, Lim SD, Cohen C, Tamboli P, Young A, de Peralta-Venturina M, Amin MB. Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: potential utility of a cytokeratin antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 747-754
- 6 Hasui K, Murata F. A new simplified catalyzed signal amplification system for minimizing non-specific staining in tissues with supersensitive immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol* 2005; 68: 1-17
- 7 Wood GS, Warnke R. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 1196-1204
- 8 Duhamel RC, Whitehead JS. Prevention of nonspecific binding of avidin. *Methods Enzymol* 1990; 184: 201-207
- 9 Cooper K, Haffajee Z, Taylor L. Comparative analysis of biotin intranuclear inclusions of gestational endometrium using the APAAP, ABC and the PAP immunodetection systems. *J Clin Pathol* 1997; 50: 153-156
- 10 Miller RT, Kubier P. Blockage of endogenous avidin-binding activity in immunohistochemistry: the use of egg whites. *Applied immunohistochemistry* 1997; 5: 63-65

■同行评价

本文研究有一定的先进性,但建议进行统计学处理,意义会更大.

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.

心理社会因素在溃疡性结肠炎中的作用

罗秋华, 邹天然, 陈掌珠, 孙学礼

■背景资料

心身障碍是指一类心理社会因素在疾病的发生、发展和转归中起了很重要作用的生理功能障碍或疾病, 无明显精神活动或行为障碍。根据有无已知的组织和器官的形态学改变, 分为心理生理障碍和心身疾病。随着医学模式的转换, 心身医学作为一门研究精神和躯体相互关系的医学亚科, 从某种意义上说, 已经成为一种特定的疾病观的体现, 即任何疾病的发生、发展、转归都渗透着心身医学的影响。

■同行评价者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室

罗秋华, 成都市第二人民医院神经内科 四川省成都市 610017

邹天然, 陈掌珠, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041

孙学礼, 四川大学华西医院心理卫生中心 四川省成都市 610041

作者贡献分布: 本课题设计及操作过程由罗秋华完成; 病例资料由陈掌珠和邹天然提供, 论文写作由罗秋华完成; 孙学礼指导与审校。

通讯作者: 罗秋华, 610041, 四川省成都市锦江区庆云南街10号, 成都市第二人民医院神经内科。lqhlyc@tom.com

电话: 028-86621522-5301

收稿日期: 2007-11-06 修回日期: 2008-01-16

Psychosocial factors for ulcerative colitis

Qiu-Hua Luo, Tian-Ran Zou, Zhang-Zhu Chen, Xue-Li Sun

Qiu-Hua Luo, Department of Neurology, the Second People Hospital of Chengdu, Chengdu 610017, Sichuan Province, China

Tian-Ran Zou, Zhang-Zhu Chen, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Xue-Li Sun, Mental Health Centre, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Qiu-Hua Luo, Department of Neurology, the Second People Hospital of Chengdu, 10 South Qingyun Street, Jinjiang District, Chengdu 610017, Sichuan Province, China. lqhlyc@tom.com

Received: 2007-11-06 Revised: 2008-01-16

Abstract

AIM: To explore the psychosocial factors for ulcerative colitis (UC).

METHODS: Individuals enrolled in this study were divided into UC patient group and control group (30 in each group). Minnesota multiphasic personality inventory (MMPI), Hamilton depression scale (HAMD), Hamilton anxiety scale (HAMA), life event scale (LES), Toronto alexithymia scale (TAS), social support scale (SS) were used to evaluate UC patients and normal controls.

RESULTS: UC patients had higher scores of Hs ($t = 4.39, P < 0.01$), D ($t = 4.48, P < 0.01$), Pt ($t = 2.67, P < 0.05$), Sc ($t = 2.55, P < 0.05$), HAMD ($t = 4.19, P < 0.01$), HAMA ($t = 3.48, P < 0.01$)

and TAS ($t = 3.81, P < 0.01$) than the normal controls.

CONCLUSION: The personality characteristics and style of emotional expression of UC patients are abnormal.

Key Words: Ulcerative colitis; Psychosocial factors; Minnesota multiphasic personality inventory

Luo QH, Zou TR, Chen ZZ, Sun XL. Psychosocial factors for ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 556-558

摘要

目的: 探讨心理社会因素在溃疡性结肠炎(UC)中的作用。

方法: UC患者30例, 正常对照组30例。采用明尼苏达多相人格调查表(MMPI)、汉米尔顿抑郁量表(HAMD)、汉米尔顿焦虑量表(HAMA)、生活事件量表(LES)、社会支持量表(SS)、多伦多述情障碍量表(TAS)对UC患者及正常人进行评定。

结果: UC患者在Hs($t = 4.39, P < 0.01$)、D($t = 4.48, P < 0.01$)、Pt($t = 2.67, P < 0.05$)、Sc($t = 2.55, P < 0.05$)和HAMD($t = 4.19, P < 0.01$)、HAMA($t = 3.48, P < 0.01$)、TAS($t = 3.81, P < 0.01$)量表的评分高于正常对照组。

结论: UC患者的人格因素及述情方式有明显异常。

关键词: 溃疡性结肠炎; 心理社会因素; 明尼苏达多相人格调查表

罗秋华, 邹天然, 陈掌珠, 孙学礼. 心理社会因素在溃疡性结肠炎中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(5): 556-558
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/556.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种原因不明的直肠和结肠炎性疾病。目前认为本病

的发生除与免疫异常、遗传因素和感染因素有关外, 心理因素与本病的发生和复发有密切关系^[1-4]. 本文主要研究UC患者的个性以及情绪因素等.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2000-2001年华西医院消化内科门诊和住院确诊的UC患者30例, 平均年龄 37.69 ± 8.95 岁, 男18例, 女12例. 入组条件: 有UC的典型症状并经纤维肠镜确诊; 有反复发作的病史; 无严重并发症; 无精神疾病和家族史; 无其他躯体疾病. 另设一对照组: 为华西医院研究生、精神科工作人员和成都飞机设计研究所职工, 均排除UC、其他严重躯体疾病及精神疾病. 共30例, 平均年龄 34.04 ± 7.04 岁, 男16例, 女14例. UC组与对照组间的年龄及性别构成比差异无显著性.

1.2 方法 明尼苏达多相人格调查表(MMPI)、汉米尔顿抑郁量表(HAMD)、汉米尔顿焦虑量表(HAMA)、生活事件量表(LES)、社会支持量表(SS)和多伦多述情障碍量表(TAS)^[10]对30例UC患者进行评定, 并与30例正常人进行比较.

统计学处理 所有数据均采用SPSS软件进行统计分析. 组间比较用 t 检验或方差分析.

2 结果

与正常对照组比较, UC组HAMD、HAMA和TAS量表评分较高, 差异具有显著性, 而在LES及SS评分上两组间的差异无显著性. 在MMPI的因子评分中, 患者组Hs、D、Pt和Sc评分高于对照组, 差异具有显著性(表1).

在患者组中, 有轻中度抑郁者11例, 重度抑郁者1例, 共计12例, 占40%; 肯定有焦虑者9例, 有明显焦虑者4例, 有严重焦虑者1例, 共计14例, 占46.7%; 而对照组只有1人的抑郁评分高于9分, 无1人焦虑评分超过14分.

3 讨论

个性亦称人格, 表现为个体对现实事物和环境所采取的态度及习惯化了的行为方式, 是指一个人各项比较重要的、相当稳定的心理特征的总和. 个性特征决定着个体对生活事件的认知和评价, 决定着是否对事件作出反应以及反应程度的强弱、持续时间的久暂, 决定着情绪反应的形式, 表现出情绪的强度、情绪稳定性、情绪倾向性、情绪的持久性等方面的不同, 影响个体对社会支持网络的利用^[6-9]. 而不同的情绪

表 1 UC组与对照组的各量表评分

项目	对照组	UC组	t	P
MMPI				
Hs	49.74 \pm 8.31	59.19 \pm 8.37	4.39	<0.01
D	45.48 \pm 9.28	56.45 \pm 9.67	4.48	<0.01
Hy	49.96 \pm 9.09	54.73 \pm 13.93	1.57	>0.05
Pd	51.66 \pm 9.03	52.69 \pm 8.59	0.45	>0.05
Mf	49.17 \pm 8.39	48.07 \pm 8.34	0.51	>0.05
Pa	44.13 \pm 11.62	49.72 \pm 10.56	1.95	>0.05
Pt	46.83 \pm 9.66	53.46 \pm 9.56	2.67	<0.05
Sc	44.98 \pm 8.92	50.78 \pm 8.71	2.55	<0.05
Ma	46.57 \pm 6.50	47.84 \pm 7.62	0.70	>0.05
Si	43.08 \pm 11.66	46.98 \pm 8.05	1.51	>0.05
HAMD	2.00 \pm 2.27	13.86 \pm 8.93	4.19	<0.01
HAMA	2.64 \pm 1.89	10.56 \pm 8.04	3.48	<0.01
TAS	63.48 \pm 9.20	72.66 \pm 9.47	3.81	<0.01
LES	13.84 \pm 16.00	19.31 \pm 17.14	1.28	>0.05
SS	41.08 \pm 7.46	39.20 \pm 7.81	0.91	>0.05

反应作为中介因素导致神经内分泌系统、免疫系统发生各种改变, 产生各种心身疾病. 因此, 个性特征被认为是心身疾病的内在致病因素^[11-12]. 本研究中, UC患者在客观社会支持、生活事件方面与对照组无明显区别, 而主要异常表现在人格特征及述情方式方面, 表明个性特征与UC有着密切联系.

那么, UC患者存在怎样的个性特征呢? 张成林 *et al*^[13]、顾华英 *et al*^[14]以及程文芳 *et al*^[15]采用症状自评量表、艾森克人格量表及卡特尔16项人格测评问卷对UC患者进行研究, 结果表明UC患者情绪稳定性差, 容易紧张、焦虑、抑郁. 本研究中, UC患者在Hs、D、Pt、Sc的评分明显高于正常受试者, 表明UC患者存在较多的疑病和抑郁焦虑症状. 患者在疑病量表上的高分表明UC患者有许多叙述不清的身体不适, 同时对自己的健康有过度的担忧. 抑郁症和精神衰弱的分值高, 反映了这类患者有一定程度的焦虑抑郁. UC组的轻至重度抑郁和焦虑患者分别占40%和46.7%, 进一步说明了这个问题.

本研究还发现UC患者不善于区别情绪状态和躯体感觉, 多以躯体不适感来表达情绪的不畅, 在表露内心感受和态度方面较差. 他们较少自发地倾诉抑郁、焦虑情绪, 更多的表现为躯体症状如全身软弱无力和胃肠功能障碍等.

由此可见, 由于UC患者的个性特征, 容易出现抑郁、焦虑等负性情绪, 这些负性情绪通过神经内分泌系统、免疫系统影响UC, 加重其炎

■ 相关报道

张成林 *et al* 采用症状自评量表、艾森克人格量表及卡特尔16项人格测评问卷对UC患者进行研究, 结果表明UC患者情绪稳定性差, 容易紧张、焦虑、抑郁.

■应用要点

本研究进一步阐明心理社会因素对UC的影响与作用,对UC的临床诊治提供参考依据。

■同行评价

本文选题新,信息量大,有一定的科学性和可读性。

症损伤及溃疡形成^[16]。提示我们在诊治UC患者时,要重视其个性缺陷,有针对性地指导其改变个性薄弱环节,改变不良的行为方式,有助于使病情长期处于稳定状态,改善疾病的预后。而对于伴有焦虑和抑郁的UC患者,在常规治疗的基础上,可同时给予抗焦虑药和抗抑郁药。

4 参考文献

- 1 李强,鞠应东,王倩,张宪英.抗抑郁药及心理疗法在溃疡性结肠炎治疗中的作用. *山东医药* 2005; 18: 56
- 2 Kurina LM, Goldacre MJ, Yeates D, Gill LE. Depression and anxiety in people with inflammatory bowel disease. *J Epidemiol Community Health* 2001; 55: 716-720
- 3 Mittermaier C, Dejaco C, Waldhoer T, Oefflerbauer-Ernst A, Miehsler W, Beier M, Tillinger W, Gangl A, Moser G. Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. *Psychosom Med* 2004; 66: 79-84
- 4 王再见,欧阳钦,陈怀恭,刘传新. 43例溃疡性结肠炎患者中肠易激样综合征的精神心理因素分析. *临床内科杂志* 2005; 22: 180-182

- 5 姜杰新. 溃疡性结肠炎病因及发病机制的研究进展. *医师进修杂志* 2004; 12: 51-52
- 6 陈剑群,陈玉林,刘德成. 溃疡性结肠炎的心理社会因素研究. *健康心理学杂志* 1999; 7: 254-256
- 7 刘凤芹,楚更五,李子华,李平,张瑞迁. 心理因素与溃疡性结肠炎. *健康心理学杂志* 2001; 9: 307-308
- 8 靳淑黎,王一平. 氟西汀治疗溃疡性结肠炎的疗效观察. *中国药房* 2007; 18: 854-855
- 9 崔萌,朱慧卿,孙成刚. 百忧解治疗伴有抑郁的溃疡性结肠炎疗效观察. *山东医药* 2003; 43: 32-33
- 10 汪向东,王希林,马弘. 心理卫生评定量表手册(增订版). 中国心理卫生杂志社 1999, 101-106, 127-131, 378-181
- 11 卢宁. 个性特征与心身疾病的关系. *中国行为医学科学* 1994; 3: 165-167
- 12 雷伶,周路平. 心理社会因素对个体心身疾病的影响. *武汉科技学院学报* 2006; 1: 102-104
- 13 张成林,储兴,林周,薛飞. 溃疡性结肠炎患者的心理健康状况及个性特征. *中国行为医学科学* 2001; 10: 32-33
- 14 顾华英,温盛霖,梁艳娉. 溃疡性结肠炎患者的个性特征及心理状态研究. *新医学* 2006; 37: 731-732
- 15 程文芳,施瑞华. 溃疡性结肠炎患者心理特征的研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2007; 16: 437-439
- 16 王昊,吴万春,韩真,金道友,汪萌芽. 心理应激对溃疡性结肠炎病情及疗效的影响. *中国临床药理学与治疗学* 2006; 11: 86-90

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 ●

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 2008-02-10)

Skp2 mRNA及蛋白在大肠腺瘤组织中的表达

刘晓璐, 杜雅菊, 沈 滨

刘晓璐, 哈尔滨医科大学附属第二医院急诊科 黑龙江省哈尔滨市 150086

杜雅菊, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

沈 滨, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086

作者贡献分布: 本文三作者贡献均等; 此课题由三人共同设计; 标本资料, 试剂均由杜雅菊提供; 刘晓璐完成研究过程; 数据分析及论文写作由刘晓璐和沈滨共同完成。

通讯作者: 沈 滨, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科. liuxiaojun2003@hotmail.com

收稿日期: 2007-08-27 修回日期: 2008-01-16

Expression of S-phase kinase-associated protein 2 mRNA in large intestine adenoma tissue

Xiao-Jun Liu, Ya-Ju Du, Bin Shen

Xiao-Jun Liu, Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Ya-Ju Du, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Bin Shen, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Dr. Bin Shen, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. liuxiaojun2003@hotmail.com

Received: 2007-08-27 Revised: 2008-01-16

Abstract

AIM: To study the expression of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) in large intestine adenoma tissue.

METHODS: Expression of Skp2 was detected in 20 cases of tubular adenoma, 15 cases of villous adenoma, 18 cases of mixed type adenoma and 20 cases of normal tissue using RT-PCR and immunohistochemical technique.

RESULTS: The expression level of Skp2 mRNA was significantly higher in villous adenoma and mixed type adenoma than in normal tissue (0.71 ± 0.34 , 0.63 ± 0.20 vs 0.34 ± 0.20 , $P < 0.01$). However, there was no difference in the relative amount of Skp2 mRNA between tubular adenoma and normal tissue. However, there was a

significant difference in villous adenoma, mixed type adenoma and tubular adenoma (0.71 ± 0.34 , 0.63 ± 0.20 vs 0.43 ± 0.22 , $P < 0.05$). There was no difference in villous adenoma and mixed type adenoma. The positive rate for the expression of Skp2 in tubular adenoma, villous adenoma, mixed type adenoma and normal tissue was 15% (3/20), 46.7% (7/15), 27.8% (5/18) and 5.0% (1/20), respectively ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Positive expression of Skp2 in large intestine adenoma is related with its histology type and may promote the development of large intestine adenoma.

Key Words: Large intestine adenoma; S-phase kinase-associated protein 2; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Immunohistochemical technique

Liu XJ, Du YJ, Shen B. Expression of S-phase kinase-associated protein 2 mRNA in large intestine adenoma tissue. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 559-562

摘要

目的: 研究细胞S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase-associated protein 2, Skp2)在大肠腺瘤组织中的表达。

方法: 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组化方法检测20例管状腺瘤、15例绒毛状腺瘤、18例混合性腺瘤和20例正常黏膜组织中Skp2的表达情况。

结果: 绒毛状腺瘤和混合性腺瘤Skp2 mRNA的表达水平显著高于正常对照组(0.71 ± 0.34 , 0.63 ± 0.20 vs 0.34 ± 0.20 , $P < 0.01$), 而管状腺瘤Skp2 mRNA的相对含量与正常对照组无显著差异, 绒毛状腺瘤和混合性腺瘤Skp2 mRNA的相对含量与管状腺瘤组亦有显著差异(0.71 ± 0.34 , 0.63 ± 0.20 vs 0.43 ± 0.22 , $P < 0.05$); 但是绒毛状腺瘤和混合性腺瘤间无显著差异。大肠管状腺瘤、绒毛状腺瘤、混合性腺瘤及正常组Skp2蛋白表达阳性率分别为15%(3/20)、46.7%(7/15)、27.8%(5/18)和5.0%(1/20), 各组间有显著差异($P < 0.05$)。

■背景资料

Skp2是细胞周期中重要的调节因子, 在肿瘤发生中备受关注。目前研究发现许多恶性肿瘤组织中Skp2的表达呈不同程度增高, 与细胞周期调控及肿瘤的发生、发展和预后密切相关, 有原癌基因的潜能。

■同行评议者

李华山, 副主任医师, 中国医科大学广安门医院肛肠科

■ 研究前沿

大肠腺瘤是大肠癌的癌前病变,从腺瘤到癌是一个复杂的积累过程,可能伴随着细胞周期调控机制的紊乱,这是研究的热点。

结论: 从基因及蛋白水平证明, Skp2的阳性表达与大肠腺瘤的组织学类型有关,可能对大肠腺瘤的发生发展起促进作用。

关键词: 大肠腺瘤; 激酶相关蛋白2; 逆转录聚合酶链式反应; 免疫组化技术

刘晓璐, 杜雅菊, 沈滨. Skp2 mRNA及蛋白在大肠腺瘤组织中的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 559-562
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/559.asp>

0 引言

大肠腺瘤虽然是一组良性肿瘤性病变,但多项研究显示80%的结直肠癌是由腺瘤演变而来^[1].在大肠腺瘤发生发展过程中,有多种因子参与,并分别在不同阶段起着不同的作用,对腺瘤生长的促进或抑制等产生影响.细胞S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase-associated protein 2, Skp2)是细胞周期中重要的调节因子,在肿瘤发生中备受关注.我们应用RT-PCR及免疫组织化学技术检测Skp2在大肠腺瘤中的表达。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2004-2005年哈尔滨医科大学附属二院内镜中心大肠黏膜活检诊断病例:管状腺瘤20例(男13例,女7例,平均年龄55.7岁)、绒毛状腺瘤15例(男9例,女6例,平均年龄58岁)、混合性腺瘤18例(男12例,女6例,平均年龄57.2岁)、正常黏膜20例(平均年龄35岁)患者的病变组织,一部分40 g/L甲醛固定,用于病理学及免疫组织化学检测;另一部分液氮速冻后置于-80℃冰箱保存,备于提取RNA. TRIzol[®] Reagent购于Gibco BRL公司, M-MLV Reverse Transcriptase, Tag DNA聚合酶为Primerase产品,引物由上海生工合成. Skp2鼠抗人mAb(克隆系:1G12E9), PV-9000二步法免疫组化检测试剂盒均购于北京中山生物技术有限公司.冰冻高速离心机, PTC-100热循环仪, GE-100凝胶电泳仪,全自动数码凝胶图像系统,紫外分光光度计和Olympus CX40显微镜等。

1.2 方法

1.2.1 组织总RNA提取和cDNA合成: 按试剂盒说明书进行操作. PCR扩增,引物设计为: F: 5'-AGTCTCTATGGCAGACCTTAGACC-3', R: 5'-TTTCTGGAGATTCTTTCTGTAGCC-3', 扩增片段长度500 bp, 设置β-actin为阳性参照,同时设H₂O为阴性对照. 反应体系: 10×Buffer 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L)2 μL, MgCl₂(25 mmol/L)2

μL, 上、下游引物(10 pmol/L)各1 μL, Tag DNA聚合酶 0.5 μL, cDNA 2 μL, 水补足体系至25 μL; 反应条件: 95℃预变性5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35个循环, 72℃ 10 min. 产物20 mg/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色(10 mg/L)后, 通过凝胶成像系统对目的电泳条带进行光密度扫描, 与自身β-actin形成条带比较的相对值表示Skp2 mRNA的表达水平(图1)。

1.2.2 免疫组化方法: 4 μ连续切片, 常规脱蜡和水化. 30 mg/L H₂O₂室温处理10 min, 以阻断内源性过氧化物酶. 加EDTA缓冲液用高压锅抗原热修复2 min. 滴加Skp2鼠抗人mAb 50 μL, 4℃孵育过夜. 按照PV-9000二步法免疫组化检测试剂说明, 加入试剂1, 室温静置20 min; 再滴加试剂2, 室温孵育20 min. DAB显色, 苏木精复染. 以PBS代替一抗作为阴性对照. 阳性结果判定: Skp2阳性细胞为细胞核呈棕黄色(图2). 每张病理切片随机选取10个视野, 每个视野计数100个细胞, 共1000个细胞, 计算着色细胞所占比例, <10%者为阴性, ≥10%者为阳性。

统计学处理 所有数据采用SPSS10.0软件处理, 采用χ²检验及 q 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 Skp2 mRNA的表达 大肠管状腺瘤Skp2 mRNA的相对含量与正常对照组无显著差异($q = 1.52$, $P > 0.05$); 绒毛状腺瘤和混合性腺瘤Skp2 mRNA的表达水平显著高于正常对照组($q_{\text{绒-正}} = 5.69$, $P < 0.01$; $q_{\text{混-正}} = 4.73$, $P < 0.01$); 绒毛状腺瘤和混合性腺瘤Skp2 mRNA的相对含量与管状腺瘤组亦有显著差异($q_{\text{绒-管}} = 4.28$, $P < 0.01$; $q_{\text{混-管}} = 3.26$, $P < 0.05$); 但是绒毛状腺瘤和混合性腺瘤间无显著差异($q = 1.15$, $P > 0.05$)(表1)。

2.2 Skp2蛋白的表达 细胞核着色呈棕黄色为Skp2蛋白表达阳性. 大肠管状腺瘤、绒毛状腺瘤、混合性腺瘤及正常组Skp2蛋白表达阳性率分别为15%(3/20)、46.7%(7/15)、27.8%(5/18)和5.0%(1/20), 各组间有显著差异(χ² = 11.6, $P < 0.05$)(表1)。

3 讨论

自1974年Morson^[2]提出“腺瘤-癌”顺序的大肠癌发生的理论, 越来越多的流行病学、病理学以及临床研究方面的证据表明大肠腺瘤是大肠癌的癌前病变. 研究显示, 肠镜下摘除腺瘤可降

表 1 Skp2 mRNA和Skp2蛋白的表达情况(mean ± SD)

分组	n	Skp2 mRNA 相对含量	Skp2蛋白	
			阳性例数	阳性率(%)
管状腺瘤	20	0.43 ± 0.22	3	15.0
绒毛状腺瘤	15	0.71 ± 0.34	7	46.7
混合性腺瘤	18	0.63 ± 0.20	5	27.8
正常组	20	0.34 ± 0.20	1	5.0

低76%-90%的大肠癌发病率^[3]. 因此, 积极诊治大肠腺瘤成为控制和减少大肠癌发病的重要途径.

有研究认为腺瘤的生长过程受到不同的因子影响, 有决定形态的因子, 有促进或抑制生长的因子. 因此, 只有在特定人群, 一定大小的腺瘤, 在某个阶段受到促发因素作用, 使其自身的自限性发生了变异才导致癌变. 这是一个复杂的积累过程, 可能伴随着细胞周期调控机制的紊乱. 目前, 研究发现与正常黏膜比较, 小于5 mm的大肠腺瘤处在细胞周期的S期和G₂期细胞明显增加.

Skp2是细胞从G₁期进入S期的必需因子, 是DNA复制所必需的人类F-box蛋白家族成员^[4-5], 通过泛素蛋白酶体途径(ubiquitin proteasome pathway)参与细胞周期的调控. 泛素蛋白酶体途径是真核细胞中一种蛋白降解方式, 主要降解胞内泛素化的蛋白质, 在细胞周期发展、基因转录及信号转导过程中发挥重要作用. Skp2作为泛素连接酶复合物SCF(Skp1-Cullin-F-Box)的底物识别亚基, 特异性识别磷酸化的底物并介导其泛素化降解. 目前研究发现许多恶性肿瘤组织中Skp2的表达呈不同程度增高, 通过对多种靶蛋白的泛素化降解如E₂F、cyclinD₁、cyclinE、cyclinA、cyclinB、CDC25B、p27^{kip1}、p21^{waf1}及p53, 而与细胞周期调控及肿瘤的发生、发展和预后密切相关^[6-11], 有原癌基因的潜能. 国内外大量研究显示, Skp2与肿瘤组织的许多生物学性状相关^[12-13]. Ishii *et al*^[14]在肺腺癌细胞株A549中发现, Skp2过表达不但能够降低细胞周期蛋白p27^{kip1}, cyclinE蛋白表达, 还能增加S期细胞数, 抵抗腺病毒感染引起的细胞凋亡. Hershko *et al*^[15]通过免疫印迹分析和免疫组化的方法检测的20例人结肠直肠癌标本中, p27和Skp2的表达水平呈负相关, 且Skp2在分化良好的结肠直肠癌标本中几乎缺如, 其表达随分化程度的降低而逐渐增高. Shim *et al*^[16]建立了

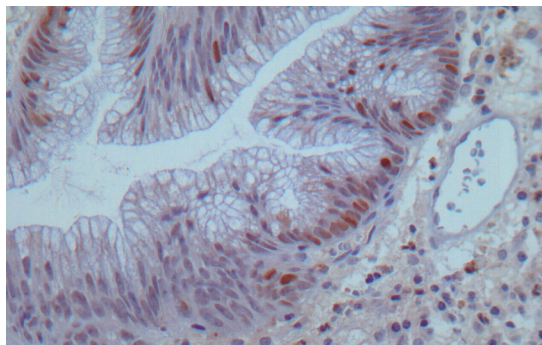


图 1 大肠腺瘤Skp2阳性表达.

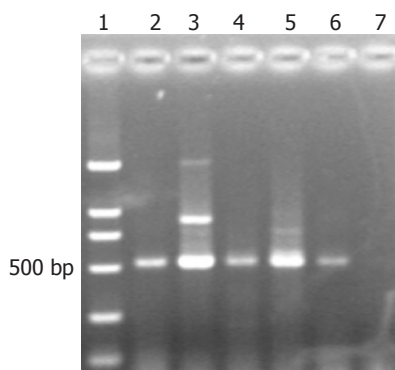


图 2 Skp2 PCR扩增条带. 1: Marker; 2-6: 阳性扩增条带; 7: 阴性对照.

前列腺特异性表达Skp2的转基因鼠模型, 结果这种鼠中Skp2表达足以导致前列腺体积增大, 促进不典型增生及低度前列腺癌的发生, Skp2过量表达可下调p27^{kip1}, 但仅局限于不典型增生区域. 我们的实验发现, Skp2 mRNA在大肠腺瘤组织中有不同程度的增高, 并且在3个组织类型中的表达水平不同. 绒毛状腺瘤和混合性腺瘤Skp2 mRNA的表达水平显著高于正常对照组 ($P < 0.01$); 而管状腺瘤Skp2 mRNA的相对含量与正常对照组无显著差异 ($P > 0.05$); 绒毛状腺瘤和混合性腺瘤Skp2 mRNA的相对含量与管状腺瘤组亦有显著差异 ($P < 0.05$); 但是绒毛状腺瘤和混合性腺瘤间无显著差异. 免疫组化结果显示, 15绒毛状腺瘤患者中有7例阳性表达Skp2, 阳性率46.7%; 混合性腺瘤的检出率是27.8%, 管状腺瘤的阳性率为15%, 正常组1例阳性, 统计学分析, 各组间有显著差异 ($P < 0.05$). 研究表明, Skp2的表达与大肠腺瘤的组织学类型有关, Skp2在绒毛状腺瘤和混合性腺瘤中呈高表达, 可能对大肠腺瘤的发生发展起促进作用.

4 参考文献

- Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid

■ 相关报道

Hershko *et al*通过免疫印迹分析和免疫组化的方法检测的20例人结肠直肠癌标本中, p27和Skp2的表达水平呈负相关, 且Skp2在分化良好的结肠直肠癌标本中几乎缺如, 其表达随分化程度的降低而逐渐增高.

■ 创新盘点

研究Skp2在不同病理类型大肠腺瘤中的表达, 并且从基因及蛋白双重水平上加以证明.

■应用要点

对Skp2的监测及干预有可能成为控制和减少大肠癌发病的重要途径。

- adenomas. *N Engl J Med* 1992; 326: 658-662
- 2 Morson BC. Evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1974; 34: suppl: 845-849
- 3 Winawer SJ, Zaubler AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; 329: 1977-1981
- 4 Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, Larsen B, Tyers M, Pagano M, Hershko A. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 321-324
- 5 Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U, Krek W. p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 207-214
- 6 Yokoi S, Yasui K, Saito-Ohara F, Koshikawa K, Iizasa T, Fujisawa T, Terasaki T, Horii A, Takahashi T, Hirohashi S, Inazawa J. A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers. *Am J Pathol* 2002; 161: 207-216
- 7 Ezoe S, Matsumura I, Nakata S, Gale K, Ishihara K, Minegishi N, Machii T, Kitamura T, Yamamoto M, Enver T, Kanakura Y. GATA-2/estrogen receptor chimera regulates cytokine-dependent growth of hematopoietic cells through accumulation of p21(WAF1) and p27(Kip1) proteins. *Blood* 2002; 100: 3512-3520
- 8 Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, Krek W. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 5043-5048
- 9 Li JQ, Wu F, Masaki T, Kubo A, Fujita J, Dixon DA, Beauchamp RD, Ishida T, Kuriyama S, Imaida K.

■同行评价

本文研究目的明确,条理清楚,具有一定的临床意义。

- Correlation of Skp2 with carcinogenesis, invasion, metastasis, and prognosis in colorectal tumors. *Int J Oncol* 2004; 25: 87-95
- 10 DeSalle LM, Pagano M. Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett* 2001; 490: 179-189
- 11 Shapira M, Ben-Izhak O, Linn S, Futerman B, Minkov I, Hershko DD. The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 1336-1346
- 12 Takanami I. The prognostic value of overexpression of Skp2 mRNA in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 727-731
- 13 Masuda TA, Inoue H, Sonoda H, Mine S, Yoshikawa Y, Nakayama K, Nakayama K, Mori M. Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Res* 2002; 62: 3819-3825
- 14 Ishii T, Matsuse T, Masuda M, Teramoto S. The effects of S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) on cell cycle status, viability, and chemoresistance in A549 lung adenocarcinoma cells. *Exp Lung Res* 2004; 30: 687-703
- 15 Hershko D, Bornstein G, Ben-Izhak O, Carrano A, Pagano M, Krausz MM, Hershko A. Inverse relation between levels of p27(Kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. *Cancer* 2001; 91: 1745-1751
- 16 Shim EH, Johnson L, Noh HL, Kim YJ, Sun H, Zeiss C, Zhang H. Expression of the F-box protein SKP2 induces hyperplasia, dysplasia, and low-grade carcinoma in the mouse prostate. *Cancer Res* 2003; 63: 1583-1588

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。

罗马Ⅲ标准研究肠易激综合征临床特点及亚型

姚欣, 杨云生, 赵卡冰, 孙刚, 刘英圣, 王巍峰

姚欣, 杨云生, 赵卡冰, 孙刚, 刘英圣, 王巍峰, 中国人民解放军总医院消化科 北京市 100853

作者贡献分布: 姚欣与杨云生对此文所作贡献均等; 此课题由杨云生, 姚欣设计; 研究过程由姚欣, 赵卡冰, 孙刚, 刘英圣及王巍峰操作完成; 研究所用分析工具由姚欣提供; 数据分析由姚欣完成; 本论文写作由姚欣, 杨云生完成。

通讯作者: 杨云生, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院消化科, sunny888@medmail.com.cn

电话: 010-66939747

收稿日期: 2007-12-03 修回日期: 2008-01-22

Clinical features and subtypes of irritable bowel syndrome based on Rome III diagnostic criteria

Xin Yao, Yun-Sheng Yang, Ka-Bing Zhao, Gang Sun, Ying-Sheng Liu, Wei-Feng Wang

Xin Yao, Yun-Sheng Yang, Ka-Bing Zhao, Gang Sun, Ying-Sheng Liu, Wei-Feng Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China.

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

Received: 2007-12-03 Revised: 2008-01-22

Abstract

AIM: To investigate the clinical features and subtypes of irritable bowel syndrome (IBS) based on Rome III diagnostic criteria.

METHODS: A total of 487 consecutive outpatients presented to the gastroenterological clinic were diagnosed with IBS based on Rome III diagnostic criteria. The forms of stool were assessed by Bristol stool form scale. Statistical analysis was performed using SPSS.

RESULTS: All the patients fulfilled the Rome III criteria for IBS. Their age was 18 to 78 years and the disease course was 6 to 720 months. The disease course was over 12 months in 420 patients (86.2%) and 6-12 months in 67 patients (13.8%). The other symptoms outside the gastrointestinal (GI) tract were acratia, backache, insomnia, dizziness, chest distress, weight loss (≥ 5 kg), headache, frequency of micturition, foreign body sensation in throat, shoulder

pain, eyeball pain and chest pain. Three hundred and sixteen patients (65%) were diagnosed as IBS with diarrhea (IBS-D), 59 (13%) as IBS with constipation (IBS-C), 24 (5%) as mixed IBS (IBS-M) and 88 (18%) as unsubtyped IBS (IBS-U). Of the 487 patients, subtype alteration occurred in 16 (3.29%) patients during the disease course. Among the four subtypes, sex difference was significant ($P < 0.05$). IBS-C and IBS-U were more prevalent in females, while IBS-D was more common in males ($P < 0.05$). However, the subtypes of IBS were similar among different ages ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Rome III diagnostic criteria can improve the early diagnostic rate of IBS. According to Rome III diagnostic criteria, IBS-D is most common, accounting for about 2/3 of IBS cases followed by IBS-U, IBS-C and IBS-M. IBS-U deserves further investigation.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Epidemiology; Rome III diagnostic criteria; Rome II diagnostic criteria

Yao X, Yang YS, Zhao KB, Sun G, Liu YS, Wang WF. Clinical features and subtypes of irritable bowel syndrome based on Rome III diagnostic criteria. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 563-566

摘要

目的: 应用功能性胃肠病罗马Ⅲ诊断标准研究肠易激综合征(IBS)的临床特点及亚型分布。

方法: 应用罗马Ⅲ诊断标准, 对消化科门诊IBS患者进行诊断和亚型分类, 大便性状按照Bristol分级, 统计学分析应用SPSS软件进行统计学处理。

结果: 罗马Ⅲ标准诊断IBS患者487例, 年龄18-78岁, 病程6-720 mo; 病程达12 mo以上者420例, 占86.2%, 6-12 mo者67例, 占13.8%。常见的消化道外的伴随症状依次为乏力、腰背痛、失眠、头晕、胸闷、体质量下降(≥ 5 kg)、头痛、尿频、咽部异物感、肩痛、眼球痛、胸痛。诊断为腹泻型IBS(IBS-D)者316例

■背景资料

肠易激综合征(IBS)是以腹痛或腹部不适, 伴有排便性状改变和排便习惯改变为特征的功能性肠道疾病, 是临床最常见的功能性胃肠病之一。2006-05颁布的功能性胃肠病罗马Ⅲ分类及诊断标准将IBS诊断时间重新进行了定义, 并提出了新的亚型分类。

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室

■研究前沿

肠易激综合征罗马Ⅲ标准将其分为便秘型、腹泻型、混合型和未定型四型,但目前各亚型分布情况尚不清楚。

(65%),便秘型IBS(IBM-C)者59例(13%),混合型IBS(IBM-M)者24例(5%),未定型IBS(IBM-U)者88例(18%)。病程中发生亚型转化者16例,占3.29%。不同的IBS亚型性别分布不同($\chi^2=30.86, P<0.05$), IBM-C和IBM-U中女性较多, IBM-D中男性较多($P<0.05$)。不同的IBS亚型年龄分布无统计学差异($\chi^2=16.67, P>0.05$)。

结论: 罗马Ⅲ诊断标准可提高IBS的早期诊断率。按照IBS罗马Ⅲ诊断标准, IBM-D最多见,约占2/3;其次为IBM-U, IBM-C及IBM-M。IBM-U在临床上不少见,这一新的亚型值得进一步研究。

关键词: 肠易激综合征; 流行病学; 罗马Ⅲ标准; 罗马Ⅱ标准

姚欣, 杨云生, 赵卡冰, 孙刚, 刘英圣, 王巍峰. 罗马Ⅲ标准研究肠易激综合征临床特点及亚型. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 563-566

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/563.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是以腹痛或腹部不适,伴有大便性状改变和排便习惯改变为特征的功能性肠道疾病,是临床最常见的功能性胃肠病之一。2006-05颁布的功能性胃肠病罗马Ⅲ分类及诊断标准将IBS诊断时间重新进行了定义,并提出了新的亚型分类。本研究旨在按照功能性胃肠病罗马Ⅲ分类及诊断标准,研究我国IBS患者的临床特点和亚型分布等,以便对应用罗马Ⅲ标准诊断IBS提供新的认识。

1 材料和方法

1.1 材料 应用功能性胃肠病罗马Ⅲ分类及诊断标准,对2006-08/2007-03中国人民解放军总医院消化科门诊就诊的IBS患者进行连续的诊断和相关研究。

1.2 方法 采用问卷调查法,由专人询问填写,主要调查患者的性别、年龄、学历和职业等一般情况,消化道症状及排便情况,患者以往的诊断及花费情况。大便性状按照Bristol分级。所有诊断为IBS的患者均进行体格检查未见异常;血液生化、HBsAg、抗-HCV、抗-HIV检查均阴性;大便常规检查未见寄生虫及红、白细胞;肠道内镜检查未见异常。同时排除其他可能影响肠道功能的器质性疾病,如胃、小肠、结肠或直肠切除史、结肠或直肠癌、炎症性肠病、糖尿病、甲状腺功能亢进症或减退症、先天性巨结

表 1 IBS患者学历和职业分布情况

学历	n	比例(%)	职业	n	比例(%)
小学及	102	20.94	工人	108	22.17
小学以下			农民	84	17.25
初中	123	25.26	技术人员	80	16.43
高中	112	23.00	公务员	73	14.99
大学	132	27.10	经商	41	8.42
大学以上	18	3.70	退休	33	6.78
			学生	26	5.34
			军人	23	4.72
			无业	19	3.90

肠、硬皮病、神经性厌食症等。

1.2.1 IBS罗马Ⅲ诊断标准: 在最近的3 mo内每月至少有3 d具有反复发作的腹痛或腹部不适,并有下列症状中的2个或以上: (1)排便后症状改善, (2)排便频率的改变, (3)粪便性状的改变。在诊断前6 mo出现症状,最近3 mo症状发作符合上述诊断标准^[1]。

1.2.2 IBS亚型分类标准: (1)便秘型IBS(IBM-C): 硬便或块状便占大便量 $\geq 25\%$,稀便(糊状便)或水样便占大便量 $<25\%$; (2)腹泻型IBS(IBM-D): 稀便(糊状便)或水样便占大便量 $\geq 25\%$,硬便或块状便占大便量 $<25\%$; (3)混合型IBS(IBM-M): 稀便(糊状便)或水样便占大便量 $\geq 25\%$,硬便或块状便占大便量 $\geq 25\%$; (4)未定型IBS(IBM-U): 粪便的性状不符合上述IBM-C、D、M之中的任一标准。硬便或块状便为Bristol分级1-2级,稀便(糊状便)或水样便为Bristol分级6-7级^[1]。

1.2.3 Bristol分级: 1级: 分散的硬块,似坚果; 2级: 腊肠状,但成块; 3级: 腊肠状,但表面有裂缝; 4级: 似腊肠或蛇,光滑柔软; 5级: 软团,边缘清楚; 6级: 绒状物,边缘不清,糊状便; 7级: 水样便,无固体成分,完全是液体^[2]。为保证分级准确可靠,提供大便Bristol分级图形^[3],供患者参考。

统计学处理 全部调查表经校对后统一录入计算机,建立数据库。正态分布的计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,非正态分布的计量资料以中位数表示,构成比以百分率(%)表示,计数资料采用 χ^2 检验。采用SPSS软件10.0作统计分析,以 $P<0.05$ 为差异显著性。

2 结果

2.1 IBS患者一般情况 罗马Ⅲ标准诊断IBS患者487例,男221例,女266例,男女比例为1:1.2;年龄18-78(平均 43.5 ± 12.9)岁。居住在农村者202例,城市者285例。学历分布及职业分布情况见表1。

表 2 IBS患者常见的伴随症状

伴随症状	n	比例(%)
乏力	285	58.52
腰背痛	123	25.26
失眠	95	19.51
头晕	93	19.14
胸闷	72	14.78
体质量下降	69	14.17
头痛	53	10.88
尿频	51	10.47
咽部异物感	37	7.60
肩痛	26	5.34
眼球痛	15	3.08
胸痛	14	2.87

2.2 临床特点 病程6-720(平均病程38) mo, 病程达12 mo以上者420例, 占86.2%, 6-12 mo者67例, 占13.8%。表现有腹痛者318例(65%), 腹部不适者169例(35%), 腹痛或腹部不适排便后可缓解者472例(97%), 无缓解者15例(3%)。

2.3 伴随症状 常见的伴随症状依次为乏力、腰背痛、失眠、头晕、胸闷、体质量下降(≥ 5 kg)、头痛、尿频、咽部异物感、肩痛、眼球痛、胸痛, 发生的比例见表2。在69例体质量明显下降的患者中, IBS-D患者48例(70%), IBS-C患者8例(12%), IBS-M患者5例(7%), IBS-U患者8例(11%)。

2.4 患者以往的诊断及花费情况 IBS患者此次就诊前诊断为慢性结肠炎者294例(60.37%), 诊断为便秘者70例(14.37%), 诊断为慢性胃炎者43例(8.83%), 诊断为消化不良者28例(5.75%), 诊断为IBS者20例(4.11%), 其他诊断者32例(6.57%)。72%的患者诊断来自中小城市和农村医院。既往诊治总费用自200-300 000元不等, 平均2500元。

2.5 患病亚型比例 IBS-D患者316例(65%), IBS-C患者59例(13%), IBS-M患者24例(5%), IBS-U患者88例(18%)。病程中发生亚型转化(即在发病过程中由一种亚型转化为另一种亚型)者16例, 占3.29%。

2.6 亚型分布与性别及年龄的关系 不同的IBS亚型性别分布不同($\chi^2 = 30.86, P < 0.05$), IBS-C和IBS-U中女性较多, IBS-D中男性较多($P < 0.05$)。不同的IBS亚型年龄分布无统计学差异($\chi^2 = 16.67, P > 0.05$)(表3, 表4)。

3 讨论

IBS的流行病学调查一般认为IBS青年、中年多

表 3 亚型分布与性别的关系

亚型	男性(%)	女性(%)	合计
IBS-C	12(20%)	47(80%) ^a	59
IBS-D	171(54%)	145(46%)	316
IBS-M	7(29%)	17(71%)	24
IBS-U	31(35%)	57(65%) ^a	88

^a $P < 0.05$ vs IBS-D。

表 4 亚型分布与各年龄段的关系(n)

亚型	年龄					
	18-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80
IBS-C	12	8	16	18	4	1
IBS-D	51	85	99	59	14	8
IBS-M	3	4	8	6	3	0
IBS-U	16	29	21	16	5	1

见, 患病率女性高于男性^[4-8]。关于罗马Ⅲ标准的流行病学资料尚未见报道。本研究为连续的门诊就诊患者, 采用罗马Ⅲ诊断标准, 发现IBS患者男女比例为1:1.2, 提示IBS在女性仍较多见。本研究中IBS患者的平均年龄 43.5 ± 12.9 岁, 与文献报道的情况基本一致。潘国宗 *et al*^[9]应用Manning诊断标准所做的IBS流行病学调查表明, IBS与职业有关, 干部和知识分子的患病率高于农民。我们发现IBS在工人、农民所占的比例高于公务员和技术人员, 低学历者(高中以下)占近3/4。二者虽然采用的调查方法不同, 但我们的资料提示工人、农民和低学历者在因IBS就诊的患者中占主要比例, 需要引起高度重视。

IBS是一种消化系统常见病, 但误诊率很高^[10-11]。本研究发现, 60.37%的IBS患者曾被诊断为慢性结肠炎, 其次是便秘、慢性胃炎、消化不良, 正确诊断为IBS者不足5%。尽管本研究所纳入的患者多数来自中小城市和农村, 结果可能不甚全面, 但可在一定程度上表明在我国IBS的诊断尚未被完全认识。本研究中IBS患者以往诊治总费用多少不等, 最高达300 000元, 平均2500元。表明IBS在我国仍是医疗花费较高的疾病之一, 如何有效地诊治IBS值得进一步的研究。

罗马Ⅲ诊断标准将罗马Ⅱ标准诊断IBS的最短病程由12 mo缩短为6 mo。本研究发现, 按照IBS罗马Ⅲ诊断标准, 有近1/7罗马Ⅱ标准不能诊断的IBS患者被早期诊断, 对于及时有效的诊治等具有积极的意义, 同时未发现因病程缩短

■ 相关报道

按照罗马Ⅱ标准, 国内流行病学调查显示腹泻型肠易激综合征最多见, 其次是便秘型, 而腹泻和便秘交替型最少见。

■ 创新盘点

本文按照新的罗马Ⅲ诊断标准, 研究我国肠易激综合征患者的临床特点和亚型分布等。

■应用要点

本研究可对应用罗马Ⅲ标准诊断和治疗肠易激综合征提供新的认识。

而将器质性疾病误诊为IBS的患者。

IBS患者常伴随多种消化道外症状^[10,12-14], 本研究发现, 其中超过半数的患者伴有乏力, 超过1/4的患者伴有腰背痛。体质量下降被认为是器质性疾病的报警症状之一^[15]。本研究中近15%的IBS患者伴有明显体质量下降, 尤其在IBS-D患者中, 可能与患者摄入减少, 营养物质排出增加等因素有关, 提示功能性疾病也可出现体质量下降。

根据罗马Ⅱ诊断标准, IBS分为三个临床亚型, 即腹泻型IBS、便秘型IBS和腹泻、便秘交替型IBS。国内的几个较大规模的IBS流行病学调查^[4,9,16-17]均显示腹泻型IBS最多见, 其次是便秘型IBS, 而腹泻、便秘交替型IBS最少见。IBS分型与患者性别相关, 女性IBS患者多以便秘型为主, 而男性患者以腹泻型居多^[18]。罗马Ⅲ诊断标准将IBS分为四个临床亚型, 即腹泻型、便秘型、混合型和未定型, 其分型标准主要依据大便性状并参照Bristol分级。重新定义的IBS分型标准由于提供了明确的分型依据, 使IBS分型更加准确, 易于在临床实践中掌握和应用。我们的研究结果显示, 按照罗马Ⅲ诊断标准, IBS-D最多见, 约占2/3; 其次为IBS-U, IBS-C及IBS-M。IBS-U在临床上不少见, 值得重视和进一步研究。在性别分布上, IBS-C和IBS-U中女性较多, IBS-D中男性较多。另外, 少部分IBS患者在病程中发生了亚型转化, 这在以往的研究中很少被提及或注意。IBS亚型转化提示部分IBS患者肠道功能紊乱随着时间而改变, 对于其诊治也应进行相应的调整, 这部分IBS的特点还有待进一步研究。

■同行评价

本文立题有据, 设计严谨, 研究方向集中, 病例收集与诊断方法规范, 内容较全面, 结果可靠, 讨论明确, 对IBS的临床工作和研究有帮助。

4 参考文献

- 1 Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1480-1491
- 2 O'Donnell LJ, Virjee J, Heaton KW. Detection of

pseudodiarrhoea by simple clinical assessment of intestinal transit rate. *BMJ* 1990; 300: 439-440

- 3 Drossman DA, Corazziari E, Delvaux M, Spiller RC, Talley NJ, Thompson WG, Whitehead WE. Rome III: The functional gastrointestinal disorders. Third Edition(KS). Allen Press, Inc., 2006: 492
- 4 熊理守, 陈旻湖, 陈惠新, 许岸高, 王伟岸, 胡品津. 广东省社区人群肠易激综合征的流行病学研究. *中华医学杂志* 2004; 84: 278-281
- 5 姒健敏, 陈淑洁, 孙蕾民. 浙江省肠易激综合征的流行病学和患者生活质量研究. *中华内科杂志* 2003; 42: 34-37
- 6 Rhee PL. Definition and epidemiology of irritable bowel syndrome. *Korean J Gastroenterol* 2006; 47: 94-100
- 7 Yilmaz S, Dursun M, Ertem M, Canoruc F, Turhanoglu A. The epidemiological aspects of irritable bowel syndrome in Southeastern Anatolia: a stratified randomised community-based study. *Int J Clin Pract* 2005; 59: 361-369
- 8 Portincasa P, Moschetta A, Baldassarre G, Altomare DF, Palasciano G. Pan-enteric dysmotility, impaired quality of life and alexithymia in a large group of patients meeting ROME II criteria for irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2293-2299
- 9 潘国宗, 鲁素彩, 柯美云, 韩少酶, 郭慧平, 方秀才. 北京地区肠易激综合征的流行病学研究: 一个整群、分层、随机的调查. *中华流行病学杂志* 2000; 21: 26-29
- 10 周建宁, 侯晓华, 刘南植, 朱尤庆, 罗和生, 许桦林. 武汉地区消化内科就诊患者肠易激综合征的发病情况. *胃肠病学* 2006; 11: 356-358
- 11 Longstreth GF. Avoiding unnecessary surgery in irritable bowel syndrome. *Gut* 2007; 56: 608-610
- 12 熊理守, 陈旻湖, 陈惠新, 许岸高, 胡品津. 社区人群中肠易激综合征的症状学特征. *胃肠病学* 2004; 9: 277-279
- 13 Si JM, Wang LJ, Chen SJ, Sun LM, Dai N. Irritable bowel syndrome consulters in Zhejiang province: the symptoms pattern, predominant bowel habit subgroups and quality of life. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1059-1064
- 14 廖常奎, 王佩秋. 精神、心理行为障碍对女性肠易激综合征与重叠功能性消化不良的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1927-1930
- 15 中华医学会消化病学分会. 肠易激综合征诊治的共识意见. *中华消化杂志* 2003; 42: 669-670
- 16 付玉军, 李莲花. 平顶山市居民肠易激综合征及功能性便秘的流行病学调查. *临床消化病杂志* 2005; 17: 132-134
- 17 刘景云. 肠易激综合征的临床分析. *中国医师进修杂志* 2006; 29: 66-67
- 18 余颖聪, 陈淑洁, 姒健敏. 性别影响肠易激综合征患者的症状和生活质量. *浙江临床医学* 2004; 6: 42-43

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

经皮超声引导下腹膜穿刺活检诊断结核性腹膜炎的临床实用性分析

刘东屏, 贺庆娟, 王学梅, 孙明军

刘东屏, 贺庆娟, 孙明军, 中国医科大学附属第一医院消化科 辽宁省沈阳市 110001

王学梅, 中国医科大学附属第一医院超声诊断科 辽宁省沈阳市 110001

沈阳市科委基金资助项目, No. 2004-36

作者贡献分布: 此课题由王学梅设计; 病例选择由孙明军完成; 研究过程由刘东屏完成, 数据分析由贺庆娟完成, 本论文由刘东屏完成。

通讯作者: 刘东屏, 110001, 沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院消化科. dpl19632003@yahoo.com.cn 电话: 024-83282199

收稿日期: 2007-08-20 修回日期: 2008-01-14

Clinical outcome analysis of epiploon biopsy in the diagnosis of patients with tuberculous peritonitis

Dong-Ping Liu, Qing-Juan He, Xue-Mei Wang, Ming-Jun Sun

Dong-Ping Liu, Qing-Juan He, Ming-Jun Sun, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Xue-Mei Wang, Ultrasound Center, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China.

Supported by: the Research Programs of Science and Technology Commission in Shenyang, No. 2004-36

Correspondence to: Dong-Ping Liu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, 155 Nanjingbei Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. dpl19632003@yahoo.com.cn

Received: 2007-08-20 Revised: 2008-01-14

Abstract

AIM: To evaluate the clinical practical value of epiploon biopsy in the diagnosis of tuberculous peritonitis.

METHODS: A total of 152 ascetic patients with uncertain diagnosis were selected to puncture the thickened peritoneum under the guidance of ultrasonic puncture probe. Biopsy tissue was sent for pathological examination. Serum PPD, ESR and CRP were and LDH in ascites were detected. Abdomen was examined by X-rays.

RESULTS: The success rate of epiploon biopsy

was 96.05%. Of the 152 patients, 64 were diagnosed as tuberculous peritonitis, accounting for 42.11% of ascetic patients with uncertain diagnosis. The positive rate of epiploon biopsy was obviously higher than that of traditional clinical examinations. Serum ESR ($\chi^2 = 1.265$, $P = 0.261$), PPD ($\chi^2 = 26.669$, $P = 0.000$), CRP ($\chi^2 = 8.125$, $P = 0.004$) and LDH in ascites ($\chi^2 = 20.403$, $P = 0.000$) and positive findings of abdominal X-ray findings ($\chi^2 = 7.169$, $P = 0.007$) were increased in tuberculous peritonitis patients with a significantly statistical difference ($P < 0.05$). Following pathologic findings of TB were observed in peritoneal tissue samples: cheese necrosis, Langhan's cells-like and epithelial cells-like multinucleated giant cells, a large number of fibers within adipose tissue.

CONCLUSION: Percutaneous biopsy can be confirmed tuberculosis peritonitis, secure, reliable, less restriction on the use, is one of the most practical clinical means of inspection.

Key Words: Epiploon biopsy; Tuberculous peritonitis; Ascites

Liu DP, He QJ, Wang XM, Sun MJ. Clinical outcome analysis of epiploon biopsy in the diagnosis of patients with tuberculous peritonitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(5): 567-569

摘要

目的: 评价腹膜活检在结核性腹膜炎诊断中的临床实用性。

方法: 152例腹水原因待查患者, 采用超声穿刺探头引导下经皮于增厚的腹膜处进行活检, 活检组织行病理学检查, 所有患者均进行PPD、血沉、血清C反应蛋白(CRP)和腹水乳酸脱氢酶(LDH)、腹部X线检查。

结果: 腹膜活检的成功率为96.05%, 结核性腹膜炎64例, 占腹膜活检者的42.11%。152例腹膜活检患者中, 诊断为结核性腹膜炎者64例, 占总不明原因腹水42.11%, 腹膜活检阳性率

■背景资料

结核性腹膜炎是临床的常见疾病, 临床上常靠试验性抗结核治疗诊断, 常和恶性腹水相混淆, 容易误诊, 近年来开展的超声引导下经腹壁穿刺腹膜活检, 可以达到确诊结核性腹膜炎的目的。

■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感染科

■应用要点

鉴于结核性腹膜炎目前缺乏临床确诊的手段,腹膜穿刺活检可以达到确诊结核性腹膜炎的目的,故经皮腹膜穿刺活检是目前最有临床实用价值的检查手段。

明显高于目前用于临床提示结核性腹膜炎的一般性辅助检查包括血沉增快($\chi^2 = 1.265$, $P = 0.261$)、PPD阳性($\chi^2 = 26.669$, $P = 0.000$)、CRP升高($\chi^2 = 8.125$, $P = 0.004$)、腹水LDH增高($\chi^2 = 20.403$, $P = 0.000$)、腹部X线检查阳性所见($\chi^2 = 7.169$, $P = 0.007$),统计处理差异显著。腹膜活检病理组织内可见结核的病理改变:干酪样坏死,朗罕氏细胞、类上皮细胞及多核巨细胞,组织内有大量纤维脂肪组织。

结论:经皮腹膜穿刺活检可以确诊结核性腹膜炎,安全可靠,使用限制少,是一种最具有临床实用价值的检查手段。

关键词:腹膜活检;结核性腹膜炎;腹水

刘东屏, 贺庆娟, 王学梅, 孙明军. 经皮超声引导下腹膜穿刺活检诊断结核性腹膜炎的临床实用性分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(5): 567-569

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/567.asp>

0 引言

结核性腹膜炎起病隐匿,临床缺乏特异性表现及特异性检查指标,极易和恶性腹水相混淆,二者的鉴别一直是临床医生面临的一大难题,尽管临床影像、腹水细胞学检测和内镜等检查可以使一些腹水的病因得到明确,但仍有相当一部分病例腹水原因不明。结核性腹膜炎的治疗、预后和恶性腹水截然不同,因此两者的鉴别极为重要。腹膜穿刺活检是近年来国内外开展的一种用于诊断原因不明的腹水的一种特殊手段^[1-3]。我们总结了近5年来我院开展的152例经皮超声引导下腹膜穿刺活检病例,分析比较了腹膜活检在结核性腹膜炎诊断中的临床实用性。

1 材料和方法

1.1 材料 152例腹水原因待查患者,男性82例,女性70例,年龄在22-68岁,平均44.5岁,为2001-01/2006-03我院住院患者,经B超检查均有不同程度不同部位的腹膜增厚,腹膜厚度在1.2-3.5 cm,平均厚度在1.68 cm。

1.2 方法 检查前所有患者均测定出凝血时间、血小板计数、凝血酶原时间,腹膜活检采用在超声穿刺探头引导下于增厚的腹膜处进行活检,穿刺针规格为14-18 G,采用半自动活检枪,嘱患者短暂屏气,触发活检枪瞬间活检,每例活检1-3次,活检组织置于950 mL/L乙醇中固定送检,术中按压伤口10 min,组织石蜡包埋,HE染色后作

表 1 64例结核性腹膜炎患者的临床辅助检查与腹膜活检阳性率比较(%)

项目	总体阳性率	结腹阳性率	χ^2	P
血沉增快	88.82(135/152)	92.19(59/64)	1.265	0.261
PPD \geq (++)	38.82(59/152)	64.06(41/64)	26.669	0.000
腹部X线阳性所见	17.76(27/152)	28.13(18/64)	8.125	0.004
腹水LDH增高	51.98(79/152)	73.44(47/64)	20.403	0.000
血CRP增高	35.53(54/152)	54.69(35/64)	7.169	0.007

χ^2 值和P值是所检查的项目和腹膜活检确诊结核性腹膜炎分别比较的结果。

病理学诊断。血沉正常范围:男性0-15/1 h末,女性0-20/1 h末。PPD判断标准:硬结平均直径如小于5 mm为阴性,大于等于5 mm小于20 mm为阳性反应,其中5-9 mm为弱阳性(+),10-19 mm为阳性(++),20 mm以上或局部有水疱、坏死、淋巴管炎均为强阳性(+++)。血清CRP浓度测定采用免疫散射速率比浊法,正常范围是0-0.8 mg/dL,用美国BECKMAN公司IMMAGE全自动免疫分析仪测定,试剂购自美国BECKMAN公司,腹水LDH检测为酶学速率法,正常值为82-268 U/L,用日立7600自动生化分析仪,试剂购于日本第一化学株式会社,腹部X线阳性所见为腹部有结核钙化灶。

统计学处理 统计学处理采用统计分析软件SPSS11.5,对资料行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 差异显著。

2 结果

152例腹膜活检病例中,有6例病理回报为平滑肌组织和无成分组织,腹膜活检的成功率为96.05%,结核性腹膜炎64例,占腹膜活检者的42.11%。152例腹膜活检的患者中,有57例在活检后24 h内,有轻微可以忍受的疼痛,未予处置自行缓解,无出血,无脏器穿孔等并发症。64例结核性腹膜炎患者的临床辅助检查与腹膜活检阳性率比较(表1)。结核性腹膜炎腹膜活检病理改变见图1。

3 讨论

结核性腹膜炎是临床一种常见病,结核性腹膜炎的腹水常规和生化学检测无诊断意义^[1-4],以往诊断上缺乏病理学的确切依据,临床上仅靠试验性抗结核治疗来证实结核性腹膜炎的诊断^[5],随着结核耐药菌的增多,试验性抗结核治疗疗效不显著,同时抗结核药物对肝肾功能的损

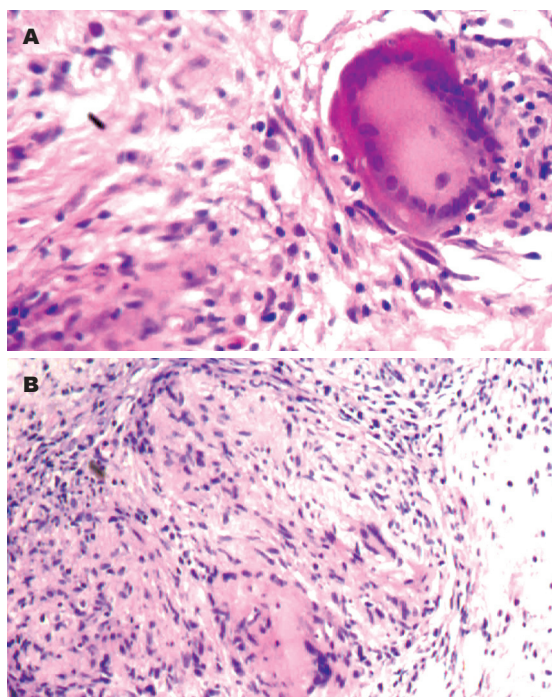


图1 结核性腹膜炎腹膜活检组织病理($\times 20$)。A: 组织内可见干酪样坏死, 周边为类上皮细胞及多核巨细胞; B: 可见大量纤维脂肪组织, 其中见较多的朗罕氏巨细胞及类上皮细胞。

伤, 使试验性抗结核治疗的实际应用受到限制。自从腹腔镜开展以来, 结核性腹膜炎可以靠此手段确诊^[6-7], 但需要全身麻醉, 费用较高。腹膜活检是近年用于诊断和鉴别结核性腹膜炎腹水和恶性腹水的一种临床检查方法^[8-11]。本研究结果显示腹膜活检的阳性率是96.05%(146/152), 结核性腹膜炎占活检总数的43.84%, 同步进行的临床常用的辅助检查, 任何单项检测血沉增快、血CRP增高、腹水LDH增高、PPD阳性、腹部X线阳性所见对临床诊断的实用价值都明显低于腹膜穿刺活检, 我们所采用的全自动组织切割腹膜活检, 使腹膜活检瞬间完成, 不易造成腹腔内器官的损伤和腹膜出血, 安全可靠, 使用限制小^[12-14]。活检病理可直接给出诊断金标准-病理诊断, 腹膜穿刺活检的病理可以见到典型的结核病理改变: 干酪样坏死、朗罕氏巨细胞、类上皮细胞和大量纤维脂肪细胞。对于原因不明的腹水当临床疑诊结核性腹膜炎时, 尽管腹膜穿刺活检为有创性检查, 但鉴于结核性腹膜炎

目前缺乏临床确诊的手段, 而腹膜穿刺活检可以达到确诊结核性腹膜炎的目的, 且无明显并发症^[15], 故在有条件的医院, 经皮腹膜穿刺活检是一种确诊结核性腹膜炎最有临床实用价值的检查手段。

4 参考文献

- 1 Chow KM, Chow VC, Szeto CC. Indication for peritoneal biopsy in tuberculous peritonitis. *Am J Surg* 2003; 185: 567-573
- 2 Barutcu O, Erel HE, Saygili E, Yildirim T, Torun D. Abdominopelvic tuberculosis simulating disseminated ovarian carcinoma with elevated CA-125 level: report of two cases. *Abdom Imaging* 2002; 27: 465-470
- 3 Hiller N, Lioubashevsky N. Tuberculous peritonitis: a diagnostic challenge. *Abdom Imaging* 2001; 26: 319-322
- 4 Li CP, Huang TS, Chao Y, Chang FY, Whang-Peng J, Lee SD. Advantages of assaying telomerase activity in ascites for diagnosis of digestive tract malignancies. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2468-2471
- 5 欧大联, 吴小平, 王学红, 霍继荣, 凌奇荷. 结核性腹膜炎109例诊断分析. *中国现代医学杂志* 2003; 13: 101-105
- 6 张安田, 杜雅菊, 高善玲. 腹腔镜检查对腹膜病变的诊断价值. *中华消化内镜杂志* 2002; 19: 92-94
- 7 Rai S, Thomas WM. Diagnosis of abdominal tuberculosis: the importance of laparoscopy. *J R Soc Med* 2003; 96: 586-588
- 8 Sun XM, Dong WG, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Detection of type IV collagenase activity in malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2592-2595
- 9 Ho LM, Thomas J, Fine SA, Paulson EK. Usefulness of sonographic guidance during percutaneous biopsy of mesenteric masses. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 1563-1566
- 10 王学梅, 李萍, 刘延君, 陶春梅, 耿晶, 欧国成, 赵文静. 超声引导下经皮大网膜穿刺活检的临床应用. *中国超声医学杂志* 2007; 23: 693-695
- 11 黄渊金, 廖锦堂, 肖滢, 黄铁汉. 超声引导下自动活检对腹膜病变的诊断价值. *湖南医科大学学报* 2001; 26: 72
- 12 孙文, 孔敏. 多功能腹膜检查针的临床应用. *实用临床诊断* 2005; 6: 45-47
- 13 范丽琳, 陈东风. 腹膜活检在腹水病因诊断中的意义. *第三军医大学学报* 2003; 25: 1791, 1794
- 14 Caspi B, Wolach V, von der Walde J, Weiss Y, Appelman Z, Hagay Z. Diagnosis of abdominal tuberculosis by transabdominal ultrasound-guided needle biopsy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 16: 569-570
- 15 Vardareli E, Kebapci M, Saricam T, Pasaoglu O, Acikalin M. Tuberculous peritonitis of the wet ascitic type: clinical features and diagnostic value of image-guided peritoneal biopsy. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 199-204

■同行评价

本文表述较清晰, 文笔较流畅, 立题有一定新颖性, 设计合理, 研究内容立足临床, 实用性较强, 有较好的学术价值。

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

曹秀峰 主任医师

南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈光 教授

吉林大学第一医院消化器官外科

陈凇 教授

中国人民解放军总医院普通外科

陈贻胜 教授

福建省立医院消化内科

陈治水 主任医师

解放军第二一一医院中医科

丁惠国 主任医师

首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

董明 教授

中国医科大学附属第一医院普通外科

戈之铮 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

巩鹏 副教授

大连医科大学附属第一医院普外二科

郭晓钟 教授

沈阳军区总医院消化内科

何裕隆 教授

中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

何振平 教授

第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所肝胆外科学

黄恒青 主任医师

福建省第二人民医院消化内科

黄志勇 副教授

华中科技大学同济医院普外科

纪小龙 教授

武警总医院纳米医学研究所

李瑗 教授

广西肿瘤研究所

刘宝瑞 教授

南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

刘铁夫 教授

哈尔滨医科大学附属四院消化病诊疗中心

陆云飞 教授

广西医科大学第一附属医院胃肠外科

牛建昭 教授

北京中医药大学细胞生物化学实验室与中加抗纤维化研究中心

朴熙绪 教授

延边大学附属医院消化内科

乔岐禄 主任医师

北京大学第一医院外科二病房

施诚仁 教授

上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科

王健生 副教授

西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王振宁 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

严以群 主任医师

第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外一科

于颖彦 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

张继明 教授

复旦大学附属华山医院肝炎研究室

张宗明 教授

清华大学第一附属医院消化医学中心