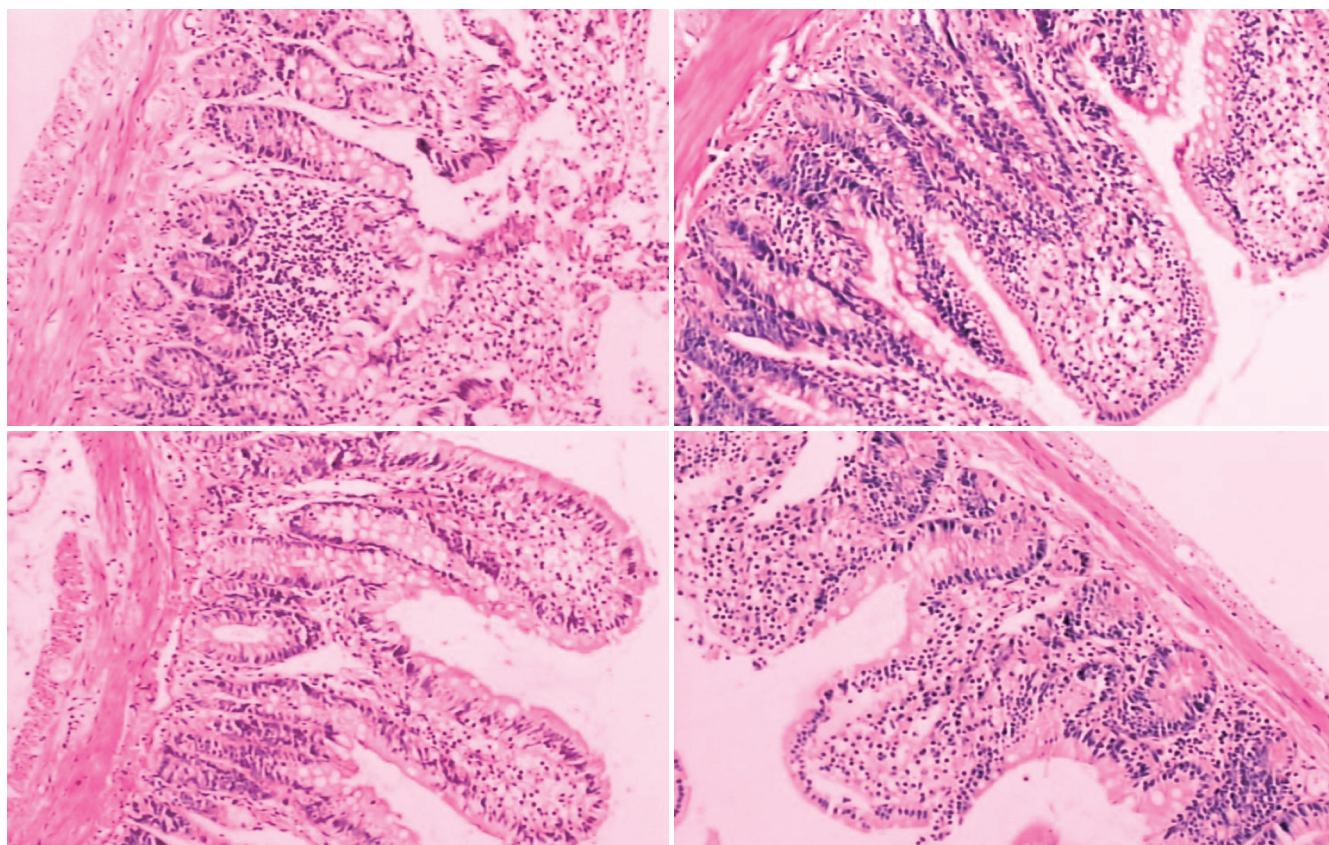


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 3 月 18 日 第 16 卷 第 8 期 (Volume 16 Number 8)



8 / 2008

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，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》和俄罗斯《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
袁正军教授
任建安教授
荣大庆教授
邵成浩讲师
邵永孚教授
沈柏用副教授
沈世强教授
沈岩主任医师
师英强博士
施诚仁教授
宋世兵主任医师
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙家邦教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭群友副教授
汤恢煥教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
卫洪波教授
吴德全教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
席启主任医师
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师

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

消化感染病学

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

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

消化中医药学

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

消化肿瘤学

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

消化影像学

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

消化内镜学

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

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授
刘鲁明教授
唐文富主治医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员

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

消化病理学

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2008 年 3 月 18 日

第 16 卷

第 8 期

(总第232期)

述 评

799 电阻抗断层成像与胃排空和胃动力检测

任超世, 王妍, 赵舒

806 幽门螺杆菌对抗生素耐药研究进展

潘秀珍, 彭孝纬, 彭如洁

基础 研究

814 Ss-A/Ro 60 ku亚单位变异体1在胃癌多药耐药中的作用

韩全利, 张龙方, 张希东, 金晓维, 杨玲, 王新, 丁杰

819 丹参对肝星状细胞一氧化氮合酶表达的影响

姚冬梅, 房澍名, 杨川杰, 姚希贤

823 家兔非酒精性脂肪肝纤维化形成中层粘连蛋白及透明质酸的变化

赵迎庆, 王炳元

829 肝癌差异表达基因EEG1的克隆和鉴定

黄春玲, 王效民, 张忠英, 邱兴峰, 刘平果, 李岗山, 彭友源

833 不同潮气量机械通气对失血性及内毒素休克复苏早期兔小肠病理的影响

刘菲, 张海英, 刘志

839 穿心莲内酯对肝硬化大鼠肠道通透性的作用及临床意义

覃慧敏, 吴春明, 李洪涛, 宋建新

临床 研究

844 胃癌高发区人群胃黏膜病变与细胞增殖、凋亡的关系

潘凯枫, 张阳, 张联, 马峻岭, 冯国双, 周彤, 李吉友, 游伟程

850 凋亡抑制因子Survivin和Livin在胃癌中的表达及意义

程平, 秦蓉, 张红, 吴继锋, 王道斌

856 胃癌组织TGF- β 1和TGF- β R1及其前体mRNA的表达意义

韩慧, 徐珞, 刘希双, 司海运, 王宝中

862 胃癌远处隐匿性腹膜转移组织学检测的意义

邵永胜, 彭开勤, 张应天, 吴文良, 赵建国

869 NAT2基因多态性与温州汉族人群炎症性肠病遗传易感性的相关性

林李森, 陈浩, 陈碧红, 张定亮, 王建璋, 郑波, 林秀清

文 献 综 述

874 HO-CO系统与肝硬化门脉高压血液动力学改变的研究进展

段志军, 刘洁, 赵钢, 杨冬, 李蕾蕾

879 吡啶胺2,3双加氧酶在病毒感染中的作用

曾道炳, 卢实春

885 维甲酸和肠道免疫稳态

郑丽坤, 张磊, 陈乃耀

研 究 快 报

892 核因子- κ B及其调控产物在实验性自身免疫性肝炎中的表达及意义

杨兰兰, 鲍启德, 崔东来, 王彦

896 乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织NF- κ B p65的影响

范恒, 段雪云, 庄雄, 吕建芳, 寿折星

900 卡巴胆碱减轻大鼠烫伤休克期肠内补液时肠组织氧自由基的损伤

车晋伟, 胡森, 耿世佳, 吴静, 王磊, 杜颖, 田易军, 盛志勇

临床 经验	904 原发性肉瘤样肝细胞癌的临床与CT特征 杨炼, 陈立波 908 溶酶体相关4次跨膜蛋白质基因多态性与肝癌易感性的关系 孙桂珍, 李卓, 郝娃, 牛京勤, 殷继明, 严艳
致 谢	912 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	805 世界华人消化杂志英文摘要要求 813 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标 818 世界华人消化杂志名词术语标准 822 世界华人消化杂志栏目设置 828 世界华人消化杂志修回稿须知 838 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知 843 世界华人消化杂志投稿方式 849 世界华人消化杂志被收录情况 855 世界华人消化杂志标点符号用法 861 世界华人消化杂志数字用法标准 868 世界华人消化杂志计量单位标准 873 世界华人消化杂志作者署名要求 878 世界华人消化杂志外文字符标准 884 世界华人消化杂志参考文献要求 891 世界华人消化杂志正文要求 899 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开策略 903 世界华人消化杂志中文摘要要求 907 世界华人消化杂志网络版的发表前链接 911 2007年度山西省期刊质量评估结果揭晓
封面 故事	覃慧敏, 吴春明, 李洪涛, 宋建新. 穿心莲内酯对肝硬化大鼠肠道通透性的作用及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 839-843 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/839.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 程剑侠; 英文编辑 王先林 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

<div data-bbox="153 1391 592 1469" data-label="Section-Header"> <h1>世界华人消化杂志</h1> </div> <div data-bbox="213 1494 526 1523" data-label="Text"> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> </div> <div data-bbox="258 1534 483 1626" data-label="Text"> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> </div> <div data-bbox="276 1630 515 1753" data-label="Text"> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-03-18 原刊名 新消化病学杂志</p> </div> <div data-bbox="122 1780 466 2042" data-label="Text"> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p> </div>	<div data-bbox="655 1386 1066 2042" data-label="Text"> <p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 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 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> </div>	<div data-bbox="1109 1386 1471 2042" data-label="Text"> <p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 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》和俄罗斯《文摘杂志》收录。 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。 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。 2008年版权归世界华人消化杂志所有</p> </div>
---	---	---

中国标准连续出版物号	ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号	82-262	国外代号	M 4481	国内定价	每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证	1401004000050
------------	--------------------------------	------	--------	------	--------	------	--------------------	---------	---------------

World Chinese Journal of Digestology

March 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 8

EDITORIAL	<p>799 Electrical impedance tomography measuring gastric emptying and gastric motility <i>Ren CS, Wang Y, Zhao S</i></p> <p>806 Antibiotic resistance of <i>Helicobacter pylori</i> <i>Pan XZ, Peng XW, Peng RJ</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>814 Role of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit variant 1 in multi-drug resistance of gastric cancer <i>Han QL, Zhang LF, Zhang XD, Jin XW, Yang L, Wang X, Ding J</i></p> <p>819 Effect of radix salviae miltiorrhizae on expression of nitric oxide synthase in hepatic stellate cells <i>Yao DM, Fang SM, Yang CJ, Yao XX</i></p> <p>823 Successive observation of laminin and hyaluronic acid on the formation of non-alcoholic fatty liver fibrosis in rabbits <i>Zhao YQ, Wang BY</i></p> <p>829 Cloning and identification of human hepatocellular carcinoma-related genes <i>Huang CL, Wang XM, Zhang ZY, Qiu XF, Liu PG, Li GS, Peng YY</i></p> <p>833 Effects of mechanical ventilation with different tidal volumes on small intestine injury of early resuscitated hemorrhagic and endotoxic shock rabbits <i>Liu F, Zhang HY, Liu Z</i></p> <p>839 Role of andrographolide in the permeability of intestinal tract of cirrhosis rats and its clinical significance <i>Qin HM, Wu CM, Li HT, Song JX</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>844 Relationship between precancerous gastric lesions and cell proliferation and apoptosis in a high-risk population <i>Pan KF, Zhang Y, Zhang L, Ma JL, Feng GS, Zhou T, Li JY, You WC</i></p> <p>850 Expression of Survivin and Livin in gastric cancer and its clinical significance <i>Cheng P, Qin R, Zhang H, Wu JF, Wang DB</i></p> <p>856 Expression of transforming growth factor β1 and its type I receptor in gastric cancer <i>Han H, Xu L, Liu XS, Si HY, Wang BZ</i></p> <p>862 Histologic detection and significance of distant occult peritoneal metastasis of gastric carcinoma <i>Shao YS, Peng KQ, Zhang YT, Wu WL, Zhao JG</i></p> <p>869 Correlation between N-acetyltransferase 2 gene polymorphisms and genetic susceptibility to inflammatory bowel disease <i>Lin LM, Chen H, Chen BH, Zhang DL, Wang JZ, Zheng B, Lin XQ</i></p>
REVIEW	<p>874 Research progress in the relationship between HO-CO pathway and haemodynamic variation of cirrhotic portal hypertension <i>Duan ZJ, Liu J, Zhao G, Yang D, Li LL</i></p> <p>879 Function of indoleamine 2, 3-dioxygenase in viral infection <i>Zeng DB, Lu SC</i></p> <p>885 Role of retinoic acid in gut immune homeostasis <i>Zheng LK, Zhang L, Chen NY</i></p>

RAPID COMMUNICATION	<p>892 Expression of NF-κB and its regulation products in experimental autoimmune hepatitis and its significance <i>Yang LL, Bao QD, Cui DL, Wang Y</i></p> <p>896 Effect of Wumeiwan on NF-κB p65 in colon tissue of rats with ulcerative colitis <i>Fan H, Duan XY, Zhuang X, Lv JF, Shou ZX</i></p> <p>900 Carbachol alleviates oxygen free radical injury in gut during enteral resuscitation of burn shock in rats <i>Che JW, Hu S, Geng SJ, Wu J, Wang L, Du Y, Tian YJ, Sheng ZY</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>904 Clinical and CT characteristics of primary sarcomatoid hepatic carcinoma <i>Yang L, Chen LB</i></p> <p>908 Relationship between lysosome-associated protein transmembrane 4β polymorphism and susceptibility to liver cancer <i>Sun GZ, Li Z, Hao W, Niu JQ, Yin JM, Yan Y</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	912 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Qin HM, Wu CM, Li HT, Song JX.</i> Role of andrographolide in the permeability of intestinal tract of cirrhosis rats and its clinical significance.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(8): 839-843</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/839.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>Jian-Xia Cheng</i> English Language Editor: <i>Xian-Lin Wang, Hai-Ning Zhang</i></p> <p>Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> 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 March 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 Newspapers and Journals (Code No. 82-261)
 China International Book Trading Corporation PO Box 399, Beijing, China (Code No. M4481)

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
 Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
 Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
 Director: Hai-Ning Zhang

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

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

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

电阻抗断层成像与胃排空和胃动力检测

任超世, 王妍, 赵舒

任超世, 王妍, 赵舒, 中国医学科学院中国协和医科大学生物医学工程研究所 天津市 300192

任超世, 1965年毕业于四川大学, 研究员, 博士生导师, 主要从事生物医学工程, 生物信息检测与处理, 医学成像等研究工作。

国家自然科学基金资助项目, No. 60471041

国家科技支撑计划资助项目, No. 2006BA103A14

天津市应用基础研究计划面上资助项目, No. 06YFJMJ10900

作者贡献分布: 任超世为本文的主要撰写者; 王妍承担EIT技术介绍和测量系统及成像方法部分的撰写; 赵舒负责相关文献的收集和整理。

通讯作者: 任超世, 300192, 天津市南开区白堤路236号, 中国医学科学院中国协和医科大学生物医学工程研究所。

bmeren@tom.com

电话: 022-87891583 传真: 022-87891583

收稿日期: 2007-10-09 修回日期: 2008-02-15

Electrical impedance tomography measuring gastric emptying and gastric motility

Chao-Shi Ren, Yan Wang, Shu Zhao

Chao-Shi Ren, Yan Wang, Shu Zhao, Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Support by: National Natural Science Foundation of China, No. 60471041; the National Science and Technology Support Program, No. 2006BA103A14; and the Basic Applied Research Projects of Tianjin, No. 06YFJMJ10900

Correspondence to: Chao-Shi Ren, Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 236 Baidi Road, Nankai District, Tianjin 300192, China. bmeren@tom.com

Received: 2007-10-09 Revised: 2008-02-15

Abstract

Electrical impedance tomography (EIT) is a novel medical imaging technology, which comes forth in recent 20 years following morphology imaging and structure imaging. EIT has the outstanding advantages of noninvasive, functional imaging and medical image monitoring. It has been mostly used in gastroenterology to assess flow of ingesta through the gastric region as an alternative to radionuclide studies. *In vitro*, EIT can accurately measure the volume of glass rods/balloons in a phantom. In humans, EIT can accurately measure gastric volume (balloons) in experimental conditions. Gastric emptying measurement of EIT has good correlations with dye dilution, gastric residuals and scintigraphy. By electrode array located on body surface,

gastric motility measurement using EIT realizes noninvasive results and directly displays shrink and motility conditions of stomach in body by images of real time. This is going to be a great progress of gastric motility measurement and evaluation method. EIT gastric motility measurement has shown seductive application prospect.

Key Words: Electrical impedance tomography; Gastric emptying; Gastric motility; Electrical bioimpedance

Ren CS, Wang Y, Zhao S. Electrical impedance tomography measuring gastric emptying and gastric motility. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 799-805

摘要

电阻抗断层成像(EIT)是继形态、结构成像之后, 于近20余年发展, 出现的新一代医学成像技术, 具有功能成像, 无损伤和医学图像监护三大突出优势。其在胃肠领域的最多应用是评价通过胃部的食物流动以替代临床仍然视为胃排空测量金标准的核素法。在离体的模型实验中EIT可精确测量玻璃棒/气囊的容积变化。在体实验条件下, EIT能精确测量胃容积(气囊)的变化。EIT胃排空测量与染料稀释法、胃存留法、核素法等有良好的相关性。EIT胃动力测量以置于体表的电极阵列实现无损检测, 以实时图像方式直接显示体内胃体的收缩和运动状况, 将是胃动力检测与评价手段的重大进步, 显示了诱人的应用前景。

关键词: 电阻抗断层成像; 胃排空; 胃动力; 生物电阻抗

任超世, 王妍, 赵舒. 电阻抗断层成像与胃排空和胃动力检测. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 799-805

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/799.asp>

0 引言

胃肠动力学是一门正在迅速发展的、多学科交叉的新兴学科。由于相关基础研究薄弱, 长期以来人们缺乏对胃肠运动功能的正确认识 and

■背景资料

近年来, 人们对功能性胃肠病以及胃肠动力障碍性疾病的认识有了长足的进步, 对胃肠生物力学的认识有了一定程度的提高, 并获得了大量宝贵信息, 但仍有诸多问题尚不够清楚。胃动力学研究和临床检查至今仍缺乏方便、有效、可完整了解胃排空和运动情况的检测方法。鉴于目前功能性消化不良的高发病率和现有检测方法与设备的局限性, 提供能全面、准确了解胃动力状态的无损检测与评价方法是促进胃动力学研究与临床应用进一步发展的需要, 也是生物医学工程学者和医生共同面临的艰巨任务。

■同行评议者

许文燮, 教授, 上海交通大学生命科学院生物医学工程系

■ 研发前沿

在胃的运动过程中,其容积、形态及内容物组成状况改变较大,相应的电特性变化十分明显,变化规律与胃动力学状况相对应,相关性较强,胃动力信息丰富。EIT液体餐胃排空测量与染料稀释法有很好的相关性。由于多数实验排除了胃酸分泌,其在正常条件下的胃排空关系还有待进一步研究。非营养液体餐EIT胃排空测量与核素法相关。在胃酸抑制条件下,EIT半固体餐和固体餐胃排空测量与核素法相关。EIT的半排空时间测量结果总比核素法的结果长。当胃酸抑制时,EIT胃排空曲线的慢变相明显短于核素法的测量结果。

解^[1-2]。在生理学领域中,胃肠动力学的发展明显滞后,这是导致胃肠神经与运动障碍性疾病成为当今临床突出问题的主要原因之一^[3-4]。近年来,人们对功能性胃肠病以及胃肠动力障碍性疾病的认识有了长足的进步,对胃肠生物力学的认识有了一定程度的提高,并获得了大量宝贵信息^[5]。但仍有诸多问题尚不够清楚,胃动力学研究和临床检查至今仍缺乏可完整了解胃运动和排空情况的方法以作为诊断常规^[1]。鉴于目前功能性消化疾病的高发病率和现有检测方法与设备的局限性,提供能全面、准确了解胃动力状态的无损伤检测与评价方法是促进胃动力学研究与临床应用进一步发展的需要^[6],也是生物医学工程学者和医生共同面临的艰巨任务^[7]。

本文对采用代表了生物阻抗技术发展方向的电阻抗断层成像技术检测胃排空与胃动力的发展、现状、问题和应用前景进行述评。

1 电阻抗断层成像

电阻抗断层成像(electrical impedance tomography,以下简称EIT)是当今生物信息学与生物医学工程学重大研究课题之一。他是继形态、结构成像之后,于近20年才发展,出现的新一代医学成像技术,具有功能成像,无损伤和医学图像监护三大突出优势。代表了生物阻抗技术的发展方向,是一种理想的、具有诱人应用前景的生物信息检测与成像手段^[8]。

EIT以人体组织、器官的电阻抗特性及其变化为依据,通过配置于人体体表的电极阵列,提取与人体生理、病理状态相关的组织或器官的电特性信息,给出反映组织、器官功能状态及其变化规律的功能性图像结果。

EIT的发展虽然只有20余年的历史,却以其无损伤、低成本和功能性图像的独特优势吸引了全世界越来越多的研究者。国外的EIT研究一直很活跃。分布在世界各国的EIT研究小组已超过20个,其中的一些小组已由实验室研究向临床应用研究过渡^[9]。

国外大多数研究者认为,目前影响EIT进入临床实际应用的主要问题是系统分辨能力较差。研究工作也多集中在改进成像模型和重建算法方面,以期改善EIT的系统的分辨能力。笔者认为,虽然现有EIT系统的分辨能力还有待继续提高,但是片面地追求EIT结构图像的高分辨力而忽视其功能成像与图像监护的优势是不可取的^[10]。EIT的真正优势在于利用生物阻抗所携带

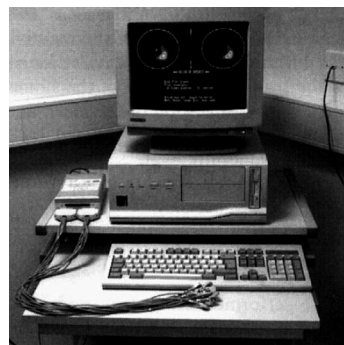


图 1 EIT 系统 Mark 1.

的丰富生理和病理信息,实现无损伤功能性成像和图像监护。如果注意深化生物阻抗检测技术,改善EIT前级检测方法的定量性和定位性,采用全信息的多频率或复阻抗检测方法,充分利用人体组织阻抗中的容抗特性,改进理论模型,就可实现从细胞水平上提取与人体生理、病理状态相联系的,丰富的阻抗全信息。那么,国内现有的EIT研究水平,对于实现人体某些器官、组织和系统(如乳腺、胃、肺)的功能成像和图像监护已经足够了^[11]。

胃是人体中比较容易提取EIT信息的组织与器官之一,在胃的活动期,特别在食物消化期,由于胃的收缩和运动,其形态、体积及内容物组成情况改变较大,相应的电特性变化非常明显,信号较强,信息丰富。采用EIT技术可无创、连续地检测胃的运动信号,提取与胃动力学状况相对应的电特性及其变化信息,反映胃的收缩、蠕动及排空过程,从而达到检测与评价胃动力功能的目的^[7,12]。

2 EIT胃排空测量

在已知的EIT胃肠领域临床应用研究中,最多的是关于通过胃部的食物流动评价和胃排空测量研究,以期替代临床视为胃排空测量金标准的核素法^[13]。

2.1 测量系统及成像方法 EIT胃排空测量的大量工作是在谢菲尔德大学Brown和Barber于1987年开发的单频率EIT系统Mark 1的基础上进行的^[14]。

Mark 1系统由数据采集单元,图像显示单元和计算机组成(图1)。采用相邻电极激励(1 mA, 50 kHz),相邻电极检测模式和基于反投影原理的图像重建算法,可给出128×128像素的腹部断层阻抗分布图。16只电极成环形阵列置于第8肋间位置的腹壁圆周上(图2)。以一定的间隔(对于胃排空测量通常是1 min)相对于参考图像进行序列成像。然后将胃区位置标注在EIT图像上,以计算相应于排空过程各序列图像中这一兴趣

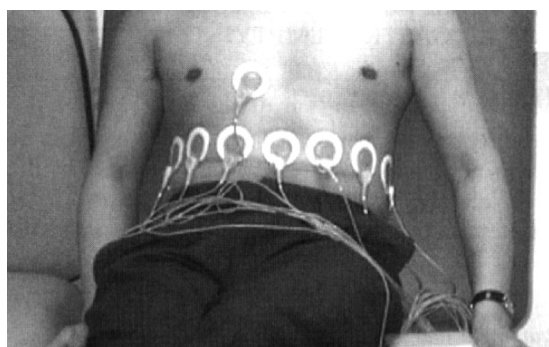


图 2 EIT环形电极阵列位置.

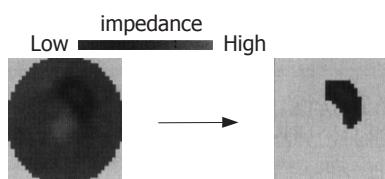


图 3 在EIT图像标注的胃区位置.

区内电阻率的变化(图3), 并将其表示为相对于餐后第一幅图像电阻率的变化百分比, 画出胃排空曲线(图4).

2.2 试验餐 因为胃排空采用反投影算法, 其假定胃区电阻率的变化是由于胃内食物的排出. 理论上, 合适的试验餐可以是高电导率的, 也可以是高绝缘的. 重要的是试验餐要有固定的电阻率, 该电阻率的变化表示胃容积的变化^[15]. 进餐时分泌的胃酸是一种高电导的氢离子源. 因此, 如果使用非导电性的试验餐, 则在研究胃排空时将由于胃酸中氢离子的加入而使试验餐变成导电性的, 并在消化和排空过程中不断变化, 对测量不利. 高电导试验餐是最合适的, 且可以测量胃内试验餐和胃酸的容量. 任何单价的正离子, 如钠, 钾和氢将增加电导率. 试验餐中加入盐以增加电导率是实际可行的并可起调味作用. Oxo(一种牛肉或蔬菜提取物)通常用作非营养性液体试验餐, 一块Oxo加水可制成200 mL试验餐(31 mmol钠, 15 kcal/块). 麦片粥加盐(37 mmol钠, 315 kcal/150 mL碗)可作为标准的固体试验餐^[13].

3 离体实验

为了评价EIT胃排空检测的可行性和有效性, 早在1987年, Avill *et al*^[16]就设计一椭圆形有机玻璃水槽以模拟人体腹部, 进行了EIT胃排空测量离体实验验证. 将不同直径的玻璃棒置于水槽中心恒定深度, 先在电极灵敏区外, 进行EIT成像. 然后将棒移动到槽心至槽边的中点处成像. 结果表明, 电阻率的变化直接与玻璃棒半径的

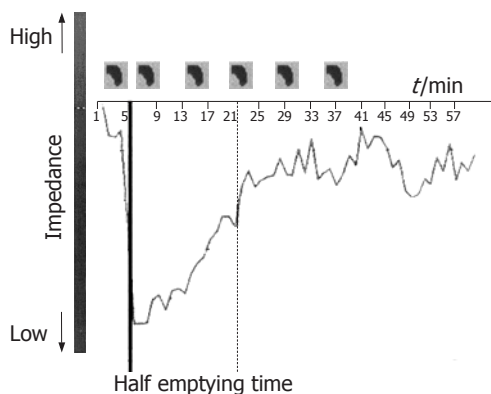


图 4 阻抗胃排空曲线.

平方成正比($r = 0.99$). 玻璃棒置于水槽中心时其EIT值为 52.8 ± 1.5 U(mean \pm SD, $n = 5$), 当棒移动到槽心至槽边的中点时, 其EIT值为 56.2 ± 1.2 U($P = 0.05$).

在另一组实验中, 将一5 mL大小的气囊垂直置于水槽中心, 并使其最大直径处位于电极平面, 每次向气囊注入1 mL水, 然后成像, 重复10次. 结果表明, 水槽中气囊的容积和EIT电阻率值有很高的线性关系($r = 0.99$).

4 测量精度评价

在EIT胃排空测量可行性和有效性离体实验验证的基础上, 一些在体实验研究进一步确认了EIT胃排空测量的精确性, 并对电极位置变化影响, EIT基线的稳定性等进行了评价.

4.1 胃内气囊容积测量 Avill *et al*^[16]采用胃内气囊方法进行了EIT测量容积变化精度的评价研究. 6名志愿者吞入一带气囊的鼻饲管^[17], 气囊位于食管与胃结合部下10 cm处. 每次向气囊充气50 mL, 至250 mL或受试者感觉不适时止. 胃内分泌物被连续抽出. 将气囊每次充气后容积的EIT图像与未充气时的空囊图像相比较. 结果表明, EIT值与胃内气囊的空气量成正比($r = 0.99$).

4.2 电极位置变化影响 Avill *et al*于1987年将电极阵置于第8肋间位置, 对19名健康志愿者进行了EIT胃电阻率测量研究^[16]. 其中的三只电极用⁵⁷Co标记, 试验餐为一杯含100 μ Ci^{99m}Tc-tin胶体的汤. 由 γ 相机进行核素法成像并与EIT法进行对比. 结果表明19名受试者的电极均位于相应于胃底处的体表位置.

Wright也于1995年通过6名男性志愿者进行了EIT电极安放位置影响评价研究^[13]. 在EIT试验的前一天, 5名志愿者饮用200 mL由1 MBq^{99m}Tc-DTPA标记的橙汁后进行核素成像, 以标明

■相关报道

生物电阻抗方法具有无创、廉价、操作简单和功能信息丰富等特点, 可高灵敏、准确地提取与胃动力学状况相对应的电特性及其变化信息. 从电活动-机械收缩复合系统的高度认识胃动力, 将生物阻抗方法与同步胃电检测相结合, 是生物电阻抗胃动力检测方法的发展方向.

■创新盘点

EIT具有功能成像,无损伤和医学图像监护的突出优势,有利于对消化间期和消化期胃动力状况及其变化进行检测和评价。胃的收缩和蠕动频率约为3次/min,对EIT系统的实时性要求不高,是阻抗信息易于提取,较好的EIT应用目标之一。EIT胃动力测量以置于体表的电极阵列实现无损检测,以实时图像方式直接显示体内胃体的收缩和运动状况,呼吸干扰易于识别和排除,将是胃动力检测与评价手段的重大进步,显示了诱人的应用前景。

胃的形状和位置。d 2根据核素成像结果将EIT电极置于设定的胃窦水平处,一个 ^{57}Co 标记置于受试者后背电极水平以测定电极与胃的相对位置。液体餐为2 MBq $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA标记的500 mL Oxo,在记录餐前基线后,同步进行连续的EIT和核素成像(EIT成像间隔1 min,核素法间隔8 min)。当核素成像至胃内标记物少于30%(胃内存留)时结束实验。结果表明6名受试者中,1名的电极位置偏高,2名偏低,电极正好在胃底水平位置的3名,且电极位置偏低者的EIT胃排空有明显的滞后,可能是由于十二指肠充盈所致。

4.3 EIT基线测量 4名健康志愿者空腹服用抑制胃酸分泌药甲氰咪胍(cimetidine)90 min后进行EIT成像以评价基线变化^[13]。EIT序列成像每分钟一幅,共进行45 min。以饮用Oxo后即刻EIT最大值的百分数表示,画出饮用Oxo后相应于胃位置的感兴趣区的空腹变化曲线。结果表明,基线变化通常不超过10%,虽然偶尔会有20%的情况出现。

5 液体餐胃排空测量

5.1 液体餐胃排空EIT测量与染料稀释法的比较 1987年Avill *et al*以10名健康志愿者进行了EIT和染料稀释法的液体餐胃排空率同步测量比较^[16]。将一双腔管插入受试者胃区,吸出胃内物后,用0.6 mg苯酚红染料水200 mL洗胃。试验餐为5%蔗糖溶液750 mL。饮用蔗糖溶液10 min后,将20 mL苯酚红染料液,每100 mL溶液含苯酚红染料6.25 mg,注入管内并使胃内容物充分混合。每间隔10 min重复注入一次直至胃排空,每次注入的染料浓度加倍。在每次注入前和后,抽出10 mL胃内容物,由分光光度计在560 nm处测定其苯酚红浓度。研究结果表明,EIT和染料稀释法半排空时间测量的相关系数为0.83($P < 0.001$)。

5.2 液体餐胃排空EIT测量与胃存留法的比较 Nour *et al*^[18] 1995年对使用鼻饲管的47名足月和早产婴儿进行了EIT胃排空测量。其中20名的液体餐为普通牛奶,其余为Dioralyte,按25 mL/kg由鼻饲管注入。测量完成后抽出胃内存留物,计算其百分比并与EIT的测量结果进行比较。20名牛奶餐婴儿中,16名的EIT法与胃存留法^[13]结果符合率很好,其余4名差别较大。27名Dioralyte餐婴儿中,24名的测量结果有很好的符合率,其余3名差别较大。

5.3 液体餐胃排空EIT测量与核素法的比较 Avill *et al* 1987年以8名健康志愿者进行了EIT法和核

素法的液体餐胃排空同步测量比较^[16]。液体试餐为300 mL肉汤,经过滤并加水(含100 μCi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tin胶体)稀释至50%。核素法成像使用单头 γ 相机(Pho/Gamma III, model 1021, Nuclear Chicago, Europa, NY)每2 min 1幅共46幅。胃排空图由定义的胃部兴趣区获得并进行归一化和辐射衰减修正。其结果与每分钟1幅的EIT胃排空图进行比较。结论是两种方法的胃半排空时间相关系数为0.801($P = 0.05$)。

Wright在1995年也以11名男性志愿者进行了EIT和核素法的液体餐胃排空测量比较^[13]。实验分2次进行,其间隔在14 d以上。志愿者分为胃酸抑制组和无胃酸抑制(对照)组。胃酸抑制组在实验前2 h服用400 mg甲氰咪胍(cimetidine)。在记录EIT餐前基线后,EIT和核素法的液体餐(500 mL Oxo,采用2 MBq $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA标记)胃排空实验同步进行。EIT图像间隔为1 min,核素法间隔为8 min,当核素法检测到胃内标记物少于30%时结束实验。结果表明,在对照组($r = 0.77$, $P = 0.006$)和酸抑制组($r = 0.87$, $P = 0.001$),两种方法的半排空时间具有很好的一致性。

6 固体餐胃排空测量

6.1 半固体餐胃排空EIT测量与核素法比较 Wright于1995年以8名志愿者进行了EIT和核素法的半固体餐胃排空评价^[13]。实验分2次进行,间隔14 d以上,分为无胃酸抑制(对照)组和实验前2 h服用甲氰咪胍(cimetidine)400 mg的胃酸抑制组。实验为500 mL盐味粥,烹制前加入3 MBq $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA标记物。在记录EIT餐前基线后,EIT和核素法的半固体餐胃排空实验同步进行。EIT图像间隔为1 min,核素法间隔为10 min,连续进行至最长200 min结束。

对10次有效实验结果的分析表明。服用甲氰咪胍使核素法组的半排空时间增加($P = 0.04$)。对照组的EIT和核素法半排空时间测量的相关性为 $r = 0.87$, $P = 0.05$,服用甲氰咪胍的酸抑制组为 $r = 0.89$, $P = 0.04$ 。即对照组的EIT与核素法胃排空测量结果有明显差别($P = 0.04$),而酸抑制组的EIT和核素法排空测量结果没有明显的差别。

6.2 固体餐胃排空EIT测量与核素法比较 Avill *et al*在1987年以8名健康志愿者进行了EIT法和核素法固体餐胃排空的同步测量比较研究^[17-21]。试验餐为85 g即食土豆泥与含100 μCi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tin胶体的300 g水混合。在进食前15 min和90 min时服用

甲氧咪胍以抑制胃酸. 核素法成像采用单头 γ 相机(Pho/Gamma III, model 1021, Nuclear Chicago, Europa, NY), 采集时间为2 h, 前40 min每2 min一幅, 随后的80 min每5 min一幅. 胃排空图由定义的胃部兴趣区获得并进行归一化和辐射衰减修正. 其结果与每分钟一幅的同步EIT图像进行比较. 结果表明两种方法的半排空时间测量结果的相关系数为($r = 0.73, P < 0.05$).

7 胃酸分泌对EIT胃排空测量的影响

进食期间胃酸分泌明显增加, 已有研究表明, 酸分泌对EIT测量结果有影响. 如Avill *et al*于1987年对3名健康志愿者以五肽促胃酸激素(pentagastrin, 6 $\mu\text{g/kg}$ 体重)诱发胃酸分泌, 对用药前后进行了EIT成像研究^[16]. 发现五肽促胃酸激素诱发胃酸分泌, 增加了所有受试者的胃电导率, 从而影响EIT测量结果.

7.1 H2型阻断剂对胃排空率的影响 Mushambi *et al*在1992年使用雷尼替定(ranitidine)和甲氧咪胍(cimetidine)抑制胃酸分泌^[20], 进行了10名正常志愿者的EIT胃排空测量比较, 发现雷尼替定组的胃排空时间比甲氧咪胍组有明显的延迟($P < 0.04$).

Wright于1995年以16名健康志愿者比较了胃酸分泌对液体餐和固体餐排空测量的影响^[13]. 液体餐是一块Oxo稀释于500 mL水中. 半固体餐是含4.5 g盐的粥500 mL. 受试者各进行6次实验, 分别在无酸抑制, 实验前2 h *po* 400 mg甲氧咪胍, 或实验前12 h *po* 40 mg奥米普拉唑(omeprazole)和实验前2 h *po* 20 mg奥米普拉唑情况下进行液体餐和固体餐EIT测量.

结果表明, 液体餐实验中, 男女性之间的胃排空时间没有整体上的差别, 但胃酸抑制组的胃排空比对照组快(甲氧咪胍组 $P = 0.06$, 奥米普拉唑组 $P = 0.09$). 半固体餐实验中, 男性比女性的胃排空更快并在对照组($P = 0.01$)和甲氧咪胍组($P = 0.02$)具有统计意义. 在液体餐和半固体餐实验中, 甲氧咪胍组的排空最快, 其次是对照组, 然后是奥米普拉唑组. 女性中服用甲氧咪胍和奥米普拉唑后的排空都快于对照组. 在半固体餐实验中, 女性的慢变相长于男性($P = 0.02$). 在对照组半固体餐和液体餐实验中, 男性($P = 0.04$)和女性($P = 0.04$)的慢变相都较长. 当胃酸分泌被抑制时, 半固体餐和液体餐实验的慢变相比比例相似.

7.2 胃酸分泌对EIT重复性的影响 Avill *et al*在

1987年采用随机盲检试验研究了8名健康志愿者服用甲氧咪胍后对液体餐EIT胃排空测量的影响^[16]. 每位受试者进行两对实验. 受试者在连续两天的同一时间服用800 mg甲氧咪胍或安慰剂, 试验餐为500 mL热水加一块Oxo. 结果表明, 当服用甲氧咪胍时, 两次实验有很强的相关性($r = 0.90$). 但当不抑制胃酸时, 没有相关性($r = -0.19$).

Mangnall *et al* 1991年以牛肉饼为试验餐进行了固体餐EIT法和核素法的同步测量研究^[21]. 试验餐为以核素($100 \mu\text{Ci}^{99\text{m}}\text{Tc}$ 牛黄胶体, 并在制餐时溶入蛋中)标记的牛肉饼160 g, 体积为137 mL, 含脂肪20 g, 蛋白23 g, 碳水化合物8 g, 盐2.5 g. 8名志愿者无胃酸分泌抑制, 进行核素成像. 另12名志愿者实验前60 min服用400 mg甲氧咪胍, 继而在实验开始时再服800 mg甲氧咪胍以抑制胃酸分泌. 核素成像采用单头 γ 相机(Pho/Gamma III, model 1021, Nuclear Chicago, Europa, NY), 每5 min一幅核素图像, 从进食前开始, 共持续4 h. EIT测量每2 min一幅, 进食前10 min时开始, 至餐后4 h止. 以上20名志愿者实验中, 共获得19人的胃排空图像. 研究结果表明, 两种方法的半排空时间($r = 0.713, P < 0.02$)和1/4半排空时间($r = 0.825, P < 0.01$)明显相关, 但是胃酸抑制组中排空慢变相的相关性不足($r = 0.585$). 没有抑制胃酸分泌的8名志愿者中, 5名的EIT排空时间慢于核素法, 且两者的半排空时间没有相关性($r = 0.058$), 慢变相($r = 0.376$). 8名志愿者中只有2名的EIT半排空时间在核素法结果的10%以内.

8 EIT胃排空测量小结

EIT胃排空测量研究已经历了约20年的发展过程^[13-22]. 在离体的模型实验中EIT可以精确测量玻璃棒/气囊的容积变化. 在体实验条件下, EIT能精确测量胃容积(气囊)的变化. 当电极置于第8肋间位置时, EIT胃排空测量具有足够的精度, 且轻微的电极位置变化不影响测量结果. 当然, 电极稍高比偏低要更好些, 可以避免来自胃窦和十二指肠区的干扰信号.

对于液体餐EIT胃排空测量, 其与染料稀释法有很好的相关性. 由于多数实验排除了胃酸分泌, 其在正常条件下的胃排空关系还有待进一步研究. 非营养液体餐时的EIT胃排空测量与核素法相关. 在胃酸抑制条件下, EIT半固体餐和固体餐胃排空测量与核素法相关. EIT的半排空时间测量结果总比核素法的结果长. 当胃酸

■应用要点

EIT是检测人体器官中黏质液容积传导的一种新的、无损伤方法. 其在胃肠领域的最多应用是评价通过胃部的食物流动以替代临床仍然视为金标准的核素法. EIT测量的是包括了胃酸分泌在内的胃容量(排空)而不是胃存留时间, 由于核素法只是测量试验餐中辐射标记物的胃排空, 因而没有必要, 也不要指望采用核素法对EIT测量结果予以修正, 除非所有进入胃肠道的生理性分泌被抑制.

■名词解释

电阻断层成像技术(EIT): 一种以人体组织电特性(阻抗、导纳、介电常数等)及其变化为目标的功能成像技术. EIT通过配置于人体体表的电极阵, 外加一微弱的交流激励电流, 测量其产生的边界电压值, 经图像重建算法给出位于电极位置平面的人体组织与器官的电特性图像. 因为人体不同组织和器官具有不同的电特性, 而且某些组织和器官的电特性随其功能状态而改变. 所以这种EIT图像不但包含了解剖学信息, 更重要的是可以给出与人体病理和生理状态相对应的功能性图像结果. EIT以人体组织、器官的阻抗分布或变化为依据, 提取与人体生理、病理状态相关的组织或器官的电特性信息, 具有功能成像、无损伤和医学图像监护三大突出优势.

抑制时, EIT胃排空曲线的慢变相明显短于核素法的测量结果. 因此, EIT法更像是测量了包括胃酸分泌的胃容量, 而核素法只是测量试验餐中辐射标记物的胃排空^[23].

EIT是检测人体器官中黏质液容积传导的一种新的、无损伤方法. 其在胃肠领域的最多应用是评价通过胃部的食物流动以替代临床仍然视为金标准的核素法. 由于他测量的是胃容量而不是胃存留时间(排空)^[13], 因而不用, 也不要指望采用 γ 核素法予以修正^[24-25], 除非所有进入胃肠道的生理性分泌被抑制.

9 EIT胃动力检测

胃动力包括空腹状态下的消化间期移行性复合运动(migrating motor complex, MMC)和消化期的相对规则运动. 在消化间期, 胃内压呈现周期性变化, 以防止胃的淤滞, 同时扫清胃内细菌、未消化残留食物、脱落细胞、黏液等, 为进餐作准备. 进餐后, 进入消化期, MMC消失, 胃的运动进入一个相对规则的运动期. 食物刺激口腔、咽、食管和胃内感受器, 通过迷走-迷走神经反射使胃近端舒张, 以容纳食物, 称为容纳性舒张; 同时近端胃在接纳食物后, 进一步舒张以顺应胃内体积的增加, 保持胃腔内压力无明显变化, 为胃顺应性舒张. 而胃远端运动则包括蠕动、终末胃窦收缩等, 以完成对胃内食物的混合、研磨, 最终将食物排空^[1,3,5].

在以上不同时段胃的运动过程中, 胃的容积、形态及内容物组成状况改变较大^[26-28], 相应的电特性变化十分明显, 变化规律与胃动力学状况相对应, 相关性强, 阻抗胃动力信息丰富. 应用生物阻抗技术, 通过体表电极连续地检测胃的运动信号, 提取与胃动力学状况相对应的电特性及其变化信息, 反映胃的收缩、蠕动及排空过程, 就可以达到检测与评价胃动力功能的目的^[29].

采用非图像方式的普通阻抗方法通过体表电极获得的阻抗信号是一种混合信号, 包含了如心电、呼吸以及受检者体位变化干扰等的多种信号成分, 特别是呼吸信号的频率约为12次/min, 与胃运动信号接近, 同属于超低频范围, 且其幅度还可能远大于胃阻抗信号, 信号分离与处理难度较大. 如何在超低频段上稳定可靠地去除呼吸干扰, 有效提取胃阻抗信号, 至今还是有待解决的重要技术问题之一^[30].

EIT代表了生物阻抗技术的发展方向, 具有

功能成像, 无损伤和医学图像监护的突出优势, 可以实现对消化间期和消化期的胃动力状况及其变化进行检测和评价^[31]. 胃的收缩和蠕动频率约为3次/min, 对EIT系统的实时性要求不高, 是阻抗信息易于提取, 较好的EIT应用目标之一^[32-33]. EIT胃动力测量以置于体表的电极阵列实现无损检测, 以实时图像方式直接显示体内胃体的收缩和运动状况, 呼吸干扰易于识别和排除, 将为胃动力学基础研究与临床应用提供一种全新的、能全面、准确了解胃动力状态的无损检测手段, 促进胃动力学研究与临床检测的进步, 显示了广阔的应用前景.

10 参考文献

- 1 周吕, 柯美云. 肠胃动力学: 基础与临床. 第1版. 北京: 科学出版社, 1999: 279-476
- 2 马文M. 舒斯特. 舒斯特胃肠动力学. 第2版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003: 130-196
- 3 周吕, 柯美云. 神经胃肠病学与动力-基础与临床. 北京: 科学出版社, 2005: 461-543
- 4 潘国宗, 曹世植. 现代胃肠病学(上册). 第1版. 北京: 科学出版社, 1994: 123, 853-859
- 5 樊艳华, 王虹. 胃肠生物力学-胃肠动力新视角. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 64-123
- 6 赵舒, 任超世. 生物电阻抗法检测胃动力功能. 国际生物医学工程杂志 2006; 29: 92-95
- 7 赵舒, 任超世. 无创检测与评价胃动力功能——生物电阻抗方法. 世界华人消化杂志 2006; 14: 465-469
- 8 任超世. 生物电阻抗测量技术. 中国医疗器械信息 2004; 10: 21-25
- 9 任超世, 安源. 医学电阻抗技术与临床. 世界医疗器械 2003; 9: 50-53
- 10 任超世, 王妍. 阻抗成像实用化应用技术研究. 中国医学装备 2007; 4: 1-5
- 11 邓娟, 王妍, 任超世. EIT图像重建算法的进展研究. 中国医学装备 2007; 4: 1-5
- 12 任超世, 王妍, 邓娟. 电阻抗断层成像应用技术研究. 中国医疗器械杂志 2007; 31: 235-238
- 13 Holder DS. Electrical impedance tomography, methods, history and applications. London, IOP Publishing Ltd., 2005: 186-202
- 14 Brown BH, Seagar AD. The Sheffield data collection system. *Clin Phys Physiol Meas* 1987; 8 Suppl A: 91-97
- 15 Piessevaux H, Tack J, Walrand S, Pauwels S, Geubel A. Intragastric distribution of a standardized meal in health and functional dyspepsia: correlation with specific symptoms. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 447-455
- 16 Avill R, Mangnall YF, Bird NC, Brown BH, Barber DC, Seagar AD, Johnson AG, Read NW. Applied potential tomography. A new noninvasive technique for measuring gastric emptying. *Gastroenterology* 1987; 92: 1019-1026
- 17 Soulsby CT, Khela M, Yazaki E, Evans DF, Hennessy E, Powell-Tuck J. Measurements of gastric emptying during continuous nasogastric infusion of liquid feed: electric impedance tomography versus gamma scintigraphy. *Clin Nutr* 2006; 25: 671-680
- 18 Nour S, Mangnall YF, Dickson JA, Johnson AG, Pearse RG. Applied potential tomography in the

- measurement of gastric emptying in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20: 65-72
- 19 Ghooos YF, Maes BD, Geypens BJ, Mys G, Hiele MI, Rutgeerts PJ, Vantrappen G. Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. *Gastroenterology* 1993; 104: 1640-1647
 - 20 Mushambi MC, Trotter TN, Barker P, Rowbotham DJ. A comparison of gastric emptying rate after cimetidine and ranitidine measured by applied potential tomography. *Br J Clin Pharmacol* 1992; 34: 278-280
 - 21 Mangnall YF, Kerrigan DD, Johnson AG, Read NW. Applied potential tomography. Noninvasive method for measuring gastric emptying of a solid test meal. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1680-1684
 - 22 Vantrappen G. Methods to study gastric emptying. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 91S-94S
 - 23 Bromer MQ, Parkman HP. Office-based testing for gastric emptying: a breath away? *J Clin Gastroenterol* 2001; 32: 374-376
 - 24 Bromer MQ, Kantor SB, Wagner DA, Knight LC, Maurer AH, Parkman HP. Simultaneous measurement of gastric emptying with a simple muffin meal using [13C]octanoate breath test and scintigraphy in normal subjects and patients with dyspeptic symptoms. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1657-1663
 - 25 Lee JS, Camilleri M, Zinsmeister AR, Burton DD, Choi MG, Nair KS, Verlinden M. Toward office-based measurement of gastric emptying in symptomatic diabetics using [13C]octanoic acid breath test. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2751-2761
 - 26 Gilja OH, Detmer PR, Jong JM, Leotta DF, Li XN, Beach KW, Martin R, Strandness DE Jr. Intragastric distribution and gastric emptying assessed by three-dimensional ultrasonography. *Gastroenterology* 1997; 113: 38-49
 - 27 Horowitz M, Dent J. Disordered gastric emptying: mechanical basis, assessment and treatment. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1991; 5: 371-407
 - 28 Horowitz M, Dent J, Fraser R, Sun W, Hebbard G. Role and integration of mechanisms controlling gastric emptying. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 7S-13S
 - 29 Li Z, Sha H, Wang Y, Zhao S, Wang W, Ren CS. A new approach of gastric motility measurement and evaluation by bioimpedance. Proceedings of 13th International Conference on Electrical Bio-Impedance & 8th Conference on Electrical Impedance Tomography, Graz, Austria 2007 August 29: 691-694
 - 30 Yan W, Hong S, Chaoshi R. Optimum design of electrode structure and parameters in electrical impedance tomography. *Physiol Meas* 2006; 27: 291-306
 - 31 Wang Y, Sha H, Zhao S, Ren CS. Influences of Compound Electrode Parameter on Measurement Sensitivity and Reconstruction Quality in Electrical Impedance Tomography. Proceedings of World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Seoul, Korea, 2006 August 27-September 1: 3433-3436
 - 32 Li ZY, Ren CS, Sha H, Wang Y, Zhao S, Wei JM, Wang W. Wavelet Transform to Extract Bio-Impedance Gastric Motility Information. Proceedings of the 2nd international conference on complex systems and applications-modeling, control and simulations, Hanlin, Jinan, China, 2007, June 8-10: 1237-1241
 - 33 Sha H, Wang Y, Zhao S, Ren CS. Integrated Data Collection in Electrical Impedance Tomography. Proceedings of 13th International Conference on Electrical Bio-Impedance & 8th Conference on Electrical Impedance Tomography, Graz, Austria, 2007, August 29: 348-351

■同行评价

本文选题新颖, 书写流畅, 信息量大, 具有很好的可读性和学术价值。

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 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1) 题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2) 作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3) 单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4) 基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5) 通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6) 收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

幽门螺杆菌对抗生素耐药研究进展

潘秀珍, 彭孝纬, 彭如洁

■背景资料

幽门螺杆菌与慢性胃炎、消化性溃疡和胃癌的关系引起了全世界医学界人们的广泛研究和证实, 目前根除 *H pylori* 的治疗在临床上应用已经十分普遍。但是根除率却不尽如人意, 导致 *H pylori* 根除治疗失败的原因是多方面的, 但 *H pylori* 对抗生素产生耐药是导致根除失败的最主要原因。

潘秀珍, 彭孝纬, 彭如洁, 福建省立医院消化内科 福建省福州市 350001

潘秀珍, 主任医师, 教授, 主要从事消化内科、消化病的临床研究。

作者贡献分布: 本论文写作由彭孝纬教授主要完成; 彭如洁研究生协助; 潘秀珍教授立题和审核。

通讯作者: 潘秀珍, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建省立医院消化病研究所, panxiuz@yahoo.com

电话: 0591-87557768-9088

收稿日期: 2007-07-17 修回日期: 2008-02-19

Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori*

Xiu-Zhen Pan, Xiao-Wei Peng, Ru-Jie Peng

Xiu-Zhen Pan, Xiao-Wei Peng, Ru-Jie Peng, Department of Gastroenterology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Xiu-Zhen Pan, Institute of Digestive Diseases, 134 Eastern Street, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. panxiuz@yahoo.com

Received: 2007-07-17 Revised: 2008-02-19

Abstract

Helicobacter pylori are spiral-shaped, Gram-negative bacteria that colonize the stomachs of more than half the world's population. *H pylori* colonization is the most common cause of chronic active gastritis and peptic ulcer disease, which directly related to gastric carcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. However, the efficacies of eradication therapies are not satisfying mainly because of bacterial resistance to antibiotics. This article makes a brief summary on the recent research related to the antibiotic resistance of *H pylori*.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Antibiotics; Bacterial resistance

Pan XZ, Peng XW, Peng RJ. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 806-813

摘要

幽门螺杆菌(*H pylori*)是一种存在于人类胃黏膜的G⁻的螺旋形细菌, 是胃十二指肠溃疡、慢性活动性胃炎的主要病因, 并与黏膜相关性淋巴组织(MALT)淋巴瘤及胃癌的关系密切。因

此, *H pylori* 的根治成为大家关注的问题。但是临床上 *H pylori* 根除率却不高, 其原因主要是日益突出的抗生素耐药问题。本文就有关 *H pylori* 对抗生素耐药性的研究近况作一阐述。

关键词: 幽门螺杆菌; 抗生素; 耐药

潘秀珍, 彭孝纬, 彭如洁. 幽门螺杆菌对抗生素耐药研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 806-813

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/806.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与慢性胃炎、消化性溃疡和胃癌的发生都有密切关系, 与消化系统以外疾病的关系也不断被发现。毫无疑问, *H pylori* 是影响人类健康的致病菌^[1]。对 *H pylori* 感染进行根除治疗的适应证在增加, 但治疗失败的病例也在增加。导致 *H pylori* 根除治疗失败的原因是多方面的, 但 *H pylori* 对抗生素产生耐药是导致根除失败的最主要原因^[2-4]。因此, 关于 *H pylori* 对抗生素耐药方面的研究也越来越受到普遍关注, 本文就 *H pylori* 耐药菌株的流行病学、耐药机制、耐药产生的原因及其对策等方面的研究进展进行简要的评述。目前临床上用于治疗 *H pylori* 的抗生素主要有硝基咪唑类(甲硝唑、替硝唑)、大环内酯类(克拉霉素、阿奇霉素)、β-内酰胺类(阿莫西林)、四环素、呋喃唑酮和喹诺酮类(环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星)等。

1 *H pylori* 耐药菌株流行病学

1.1 耐药的地区差异 不同国家或同一国家不同地方 *H pylori* 对主要抗生素的耐药状况有明显的差异, 一般来说, 在发展中国家 *H pylori* 对甲硝唑的耐药率远高于发达国家, 但 *H pylori* 对克拉霉素的耐药率并不高于发达国家, 甚至更高。对阿莫西林、四环素、呋喃唑酮耐药率各地报道的都很低, 一般 <5%。耐药的地区差异主要与不同地区以往抗生素的使用状况有关。

1.1.1 硝基咪唑类: 用于根除 *H pylori* 的硝基咪唑

■同行评议者

关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

类抗生素主要有甲硝唑和替硝唑。甲硝唑具有高效的杀菌作用, 其作用不受胃酸影响, 价格低廉, 因此成为治疗 *H pylori* 感染的首选药物。但甲硝唑的耐药非常普遍, 根据1995-1998年的全球统计数据, *H pylori* 对甲硝唑的耐药率从11%到95%不等, 发达国家、欧美国家的耐药率比发展中国家、亚洲国家低, Magraud *et al*^[45] 的研究报道: *H pylori* 对甲硝唑的耐药率在发展中国家(50%-80%)明显高于发达国家(9%-12%)。根据最新的调查结果, 科威特^[6]和伊朗^[7] *H pylori* 对甲硝唑的耐药率分别为70%和63%, 其中高度耐药的菌株(MIC>256 mg/L)分别占到65%和72%。而荷兰1997-2002年1125例 *H pylori* 培养阳性病例中仅有14.4%对甲硝唑原发耐药, 瑞典333例 *H pylori* 菌株中也仅有16.2%对甲硝唑原发耐药^[8-9]。我国于2005年对十九个省市 *H pylori* 耐药流行病学调查^[10]表明我国 *H pylori* 对甲硝唑的耐药率在不同地区存在很大差异, 其耐药率为50%-100%不等。由于甲硝唑在发展中国家广泛使用, 特别用于妇科和口腔科疾病, 导致其耐药菌株日益增多。发达国家对甲硝唑使用较少, 因此耐药率较低。德国1995-2003年全国调查甲硝唑耐药率为26.1%^[11], 而2006年再次调查则为27.5%^[12], 其耐药率未见明显升高; 但日本 *H pylori* 对甲硝唑的原发耐药率已由1997-1998年的6.6%增加到1999-2000年的12%^[13]; 印度对甲硝唑的原发耐药率至2005年已升到85%^[14]; 北京地区 *H pylori* 对甲硝唑的耐药情况从1999年的36.3%上升到2005年的79.2%^[15]; 上海地区 *H pylori* 的耐药率在1995-1999年间, 从42%上升到70%^[16]; 福建地区的研究显示 *H pylori* 甲硝唑耐药率从2003年的34%上升至2006年的55.88%^[17]。

1.1.2 大环内酯类: 根除 *H pylori* 的大环内酯类抗生素主要有克拉霉素和阿齐霉素。克拉霉素被认为是根除 *H pylori* 最有效的抗生素, 各国报道的原发耐药率范围从1%到41.9%不等。土耳其87例功能性消化不良和十二指肠溃疡的 *H pylori* 菌株中对克拉霉素原发耐药为27.6%^[18], 意大利40例 *H pylori* 菌株中对克拉霉素原发耐药为21.9%^[19]。相反, 荷兰和瑞典对克拉霉素原发耐药仅为1.0%(11/1123)和1.5%^[8-9]。 *H pylori* 对克拉霉素耐药有逐年升高的趋势。日本东京地区 *H pylori* 对克拉霉素的耐药率从1995年的6.2%上升至2000-2001年的22.1%^[20], 而且其MIC₉₀值也从1995-1998年的<1 mg/L上升到1999年的8 mg/L。北京地区 *H pylori* 对克拉霉素的耐药从

1999年的10%上升到2005年的41.9%^[15]。上海地区 *H pylori* 对克拉霉素的耐药率在1995-1999年间, 也从0%上升到10%^[16]。许多研究发现在儿童和青少年中克拉霉素的耐药率高于成人, 欧洲一项2002-2006年对1233例儿童的研究显示克拉霉素耐药率达24%^[21]。另外, 大环内酯类药物的获得性耐药率很高, 克罗埃西亚北部的一项研究^[22]显示阿齐霉素的原发和继发耐药率分别为49.2%和56.6%; 韩国的一项研究^[23]显示, 首次根除 *H pylori* 治疗失败的患者的耐药率高于原发耐药率, 其中克拉霉素和阿奇霉素升高的最多(13.8%→85.1%, 32.3%→89.6%); McMahon *et al*^[24]的研究也显示, 既往有大环内酯类药物应用史的 *H pylori* 感染者, 其克拉霉素耐药率可达到30%(37/125, $P<0.001$)。

1.1.3 β -内酰胺类: 阿莫西林是一种 β -内酰胺类药物, 杀菌能力强, 价格较便宜, 而且发现阿莫西林与克拉霉素的联合应用可以降低克拉霉素的耐药性, 因此阿莫西林成为根除 *H pylori* 治疗的良好药物之一。 *H pylori* 对他的耐药很少见, 各地的耐药率介于0%-5%之间, 但Watanabe *et al*^[25]的研究显示MIC值介于0.04-1 mg/L的 *H pylori* 菌株逐年增多, 同时对阿莫西林耐药菌株的根除率只有25%, 提示未来对阿莫西林耐药的 *H pylori* 会越来越多, 而且可能会成为导致治疗失败的一个重要因素。

1.1.4 喹诺酮类: 由于甲硝唑和克拉霉素的耐药问题日益严重, 应用喹诺酮类药物进行根除 *H pylori* 的治疗也越来越多, 特别在西方国家。英国的研究^[26]显示 *H pylori* 对环丙沙星的耐药率为7.5%, 意大利为9.7%^[19], 比利时16.8%(82/488), 日本15.0%(76/507)^[27-28]。 *H pylori* 对喹诺酮类的耐药率也在增加, 法国2001-2005年的调查^[29]显示环丙沙星的耐药率为12.4%, 且耐药率逐年升高, 德国931株 *H pylori* 对环丙沙星耐药情况的调查^[30]显示, 其耐药率从2001年的9.7%上升到2005年的22.1%。

1.2 *H pylori* 耐药相关因素分析 与 *H pylori* 耐药相关的因素主要有性别、年龄、所患疾病、地区及种族等。美国一项3624例患者的荟萃研究^[31]发现女性患者对甲硝唑及克拉霉素的耐药率明显高于男性; 老年患者、患有非活动性溃疡患者对克拉霉素的耐药率较高; 年轻患者对甲硝唑的耐药率较高。欧洲的许多研究^[32-34]也都发现女性患者耐药率高于男性, 而 *H pylori* 对抗生素的耐药率随着年龄的增加而减少^[35], 这与上述美国的研

■相关报道

Magraud *et al* 的研究报道: *H pylori* 对甲硝唑的耐药率在发展中国家(50%-80%)明显高于发达国家(9%-12%)。根据最新的调查结果, 科威特和伊朗 *H pylori* 对甲硝唑的耐药率分别为70%和63%, 英国的研究显示 *H pylori* 对环丙沙星的耐药率为7.5%, 意大利为9.7%, 比利时16.8%(82/488), 日本15.0%(76/507)。法国2001-2005年的调查显示环丙沙星的耐药率为12.4%, 且耐药率逐年升高, 德国931株 *H pylori* 对环丙沙星耐药情况的调查显示, 其耐药率从2001年的9.7%上升到2005年的22.1%。

■应用要点

本文就*H pylori*耐药菌株的流行病学、耐药机制、耐药产生的原因及其对策等方面的研究进展进行简要的评述,希望大家对日益严重的抗生素耐药问题能够有足够的认识。

究结果不尽一致。但是,也有研究^[15,36-37]显示对抗生素的耐药与性别、年龄无关。法国一项2751例患者的荟萃研究^[2]发现非溃疡性消化不良患者对克拉霉素的耐药率高于十二指肠溃疡患者。总之,关于抗生素耐药与性别、年龄和所患疾病关系的分析,各地的研究报道不尽相同,可能与选取人群的地区以及样本的大小有关。甲硝唑耐药与性别有关,考虑是女性患者使用甲硝唑治疗生殖道感染的机会大于男性患者。抗生素耐药与年龄有关,即年轻的患者甲硝唑耐药率较高而年老的患者克拉霉素耐药率较高,这可能与不同疾病使用不同抗生素有关,即妇科疾病较多见于年轻患者,常用甲硝唑来治疗;呼吸道疾病多见于老年患者,常用克拉霉素来治疗。*H pylori*的耐药最主要还是与抗生素的广泛使用有关,在抗生素严格管理的地区如瑞典,*H pylori*的耐药就很低,较少使用抗生素的农村地区*H pylori*的耐药也远低于城市,使用抗生素治疗失败后*H pylori*的继发性耐药一般都在50%以上,甚至对多种抗生素耐药。

2 产生耐药的机制和原因

2.1 硝基咪唑类 甲硝唑的抗菌机制,其有效成分硝基咪唑被细菌的硝基还原酶还原成一种亚硝基衍生物,后者能引起DNA的损伤,最终导致细菌死亡。*H pylori*对甲硝唑的耐药机制比较复杂,目前还不是非常清楚,但多数研究认为主要是由于*H pylori*的基因突变使细菌还原硝基的能力下降,无法使甲硝唑还原生成足够的具有杀菌作用的亚硝基衍生物,从而导致*H pylori*对甲硝唑耐药性的产生,包括*rdxA*基因(编码的氧不敏感的NADPH硝基还原酶)、*FrxA*基因(编码NADPH黄素氧化还原酶)和*FdxB*基因(编码铁氧化还原蛋白类似物)的突变,基因突变是导致*H pylori*对甲硝唑耐药的主要原因。Matteo *et al*^[38]的研究发现基因突变的不同类型与耐药程度有关:*rdxA*基因和*FrxA*基因突变引起*rdxA*和*FrxA*过早断裂的耐药菌株,往往表现高度耐药(MICs>128 mg/L);单独的*rdxA*基因突变引起蛋白过早断裂与中等水平耐药(MICs, 64-128 mg/L)有关;单独的*FrxA*基因错义突变只在低度耐药(MICs, 8-64 mg/L)的菌株中起作用。但是,同时也有研究^[39]显示*rdxA*基因突变是甲硝唑耐药的充分和必要条件,而*FrxA*基因突变与甲硝唑耐药无明显相关。

除了上述遗传学方面的原因,*H pylori*对甲

硝唑耐药的产生可能还有其他一些原因,如:*RecA*的过度表达导致DNA修复增强,不同菌株其代谢状态及酶系统变化的差异,甲硝唑排出机制增强等。另外,对甲硝唑耐药的产生通常与以往对该药的使用有关,NADPH硝基还原酶使甲硝唑活化为羟胺等有诱变作用的中间物,可随机在基因组中引入转换碱基突变。McMahon的研究^[48]显示对甲硝唑耐药的患者有60%之前使用过该药,显著高于对甲硝唑敏感的患者(10%)($P<0.001$)。

2.2 大环内酯类 克拉霉素的抗菌机制是药物进入细胞内,与核糖体紧密结合,作用于23S rRNA上的多肽转移环,抑制多肽转移酶,阻止肽链延长,从而抑制蛋白质的合成。关于*H pylori*对克拉霉素的耐药机制,比较一致地观点是23S rRNA V区点突变引起克拉霉素与核糖体结合力下降。目前发现的23S rRNA基因突变类型主要有A2143G、A2142G、A2142C等。其中A2143G较常见,还存在A2143G+A2142G、A2143G+A2142C的双重突变^[40]。研究^[37-38]发现的突变位点T2182C,常与A2143G突变同时存在,但T2182C突变是否参与耐药仍存在争议^[43],分析可能是地域差异及实验方法的不同引起的。在中国东北的一项研究还发现了与耐药有关的新的突变位点:G2224A、C2245T和T2289C。关于基因突变类型与耐药程度的关系,目前还了解甚少。发生2143位突变的菌株,其MIC值范围很广(从 ≤ 0.016 mg/L到 ≥ 256 mg/L都有可能);而发生2142位突变的菌株,其MIC值大多 ≥ 64 mg/L。

关于克拉霉素诱导耐药的研究,Kobayashi *et al*^[44]将根除治疗失败患者的敏感菌株暴露在克拉霉素的作用下比根除成功患者的敏感菌株更容易变成克拉霉素耐药菌株,分析其基因突变,发现23S rRNA基因突变在诱导前就已经存在。提示克拉霉素可能是作为一个诱导因素,使突变的基因表达而产生耐药。

有许多方法可对*H pylori* 23S rRNA的突变进行检测,一类是以PCR为基础的检测,包括限制性内切酶片段长度多态性的PCR产物分析(PCR-RFLP)、PCR-DNA酶联免疫分析、PCR-寡核苷酸连接分析法(PCR-OLA)、PCR-反向杂交探针分析及最近使用的TaqMan real-time PCR、PCR-变性的高效液相色谱法(PCR-DHPLC)、测定反应产物微小序列的MALDI-

TOF质谱测定法等^[40,42,45]. 还有直接在石蜡包埋组织切片上进行检测的荧光原位杂交(FISH)技术^[46]. 使用以上方法不仅能快速有效地检测出对克拉霉素的敏感性, 从而选择根除*H pylori*的合理治疗方案, 而且也能为耐药机制的进一步研究提供依据.

2.3 β -内酰胺类 阿莫西林可专一性地与细菌内膜上的靶蛋白PBPs(青霉素结合蛋白)结合, 抑制肽聚糖的合成, 从而发挥杀菌作用. 细菌对 β -内酰胺类药物产生耐药主要与 β -内酰胺酶的合成、PBPs的变异、细胞膜的通透性降低等有关. 而在对阿莫西林耐药的*H pylori*菌株中尚未发现 β -内酰胺酶, 提示*H pylori*对阿莫西林的耐药与 β -内酰胺酶无关. 有研究将阿莫西林高度耐药(MIC = 64 mg/L)的*H pylori*的DNA转化到敏感菌株内, 使敏感菌株也产生同样的高度耐药性, 分析耐药*H pylori*的PBPs基因序列, 发现他们的pbp1A都存在36个核苷酸的突变, 导致PBP1A的C-末端蛋白(青霉素结合区域)的10个氨基酸改变, 但是获得耐药的菌株的MIC值在8-64 mg/L之间不等, 提示可能还有其他因素参与阿莫西林高度耐药性的产生. Gerrits *et al*^[47]的研究也证实了是由于PBP1A保守序列及邻近序列的多重突变使*H pylori*对阿莫西林产生了耐药性.

2.4 四环素 四环素的抗菌机制是通过结合核糖体亚单位, 抑制蛋白质的合成, 从而发挥抗菌作用. 细菌对四环素产生耐药的机制包括: (1)膜外排基因过度表达, 使细胞内的药物浓度降低, 从而减少四环素与核糖体的结合; (2)通过细胞质中核糖体保护蛋白(TetM、TetO和TetS)的作用, 降低核糖体对四环素的亲和力或促进四环素从核糖体上释放出来; (3)在氧和NADPH的作用下, TetX的产物使四环素的酶失活; (4)16S rRNA基因突变引起四环素结合位点的改变. 核糖体保护蛋白TetO的具体作用是通过结合到核糖体上引起大范围的基因重排, 导致70S rRNA译码中心C1214及A1408位点的改变, 从而抑制四环素的作用并促进结合四环素的释放. 对于16S rRNA基因突变的研究, 发现其核苷酸711-1071片段中连续三个碱基对的置换(AGA₉₂₆₋₉₂₈ → TTC)与MICs ≥ 4 mg/L的耐药有关, 而单个或两个碱基对的置换引起MICs在1-4 mg/L的耐药. 因此, 与克拉霉素一样, 也可以用real time PCR的方法检测16S rRNA的基因突变, 从而推断对四环素的耐药性^[48]. 最近的研究^[49]发现, 具有

H pylori 1165基因的菌株可诱导成中度耐药菌株(MICs, 4-6 mg/L), *H pylori* 1165基因的突变可导致菌株对四环素的敏感性增加而且丧失了可诱导耐药的特性, 同时用RT-PCR的方法在野生和诱导菌株中都检测出*H pylori* 1165基因的转录产物, 提示是在翻译或翻译后水平调控基因的功能.

2.5 其他 喹诺酮类药物耐药的机制可能与gyrA基因突变导致DNA旋转酶(喹诺酮的靶酶)的改变有关. 日本的一项*H pylori*对左氧氟沙星耐药的研究^[28]显示, 左氧氟沙星的耐药率为15.0%, 耐药菌株中有83.3%存在gyrA突变(Asn-87; Asp-91), 显著高于敏感菌株的突变率(14.0%), Asn-87突变较多见而且与耐药水平无关, Asp-91突变与低度耐药相关, 同时还发现4.4%耐药菌株中存在gyrB基因突变, 而在敏感菌株中未发现gyrA基因的突变. 利福霉素类抗生素常用于治疗结核病, 较少用于*H pylori*的治疗, 其耐药的产生是由rpoB基因突变介导的^[50]. *H pylori*对呋喃唑酮的耐药可能与*H pylori* porD和oorD基因的突变有关.

3 减少*H pylori*耐药发生的对策

*H pylori*耐药菌株的产生明显降低了根除治疗的疗效^[2,4,24], 给临床治疗带来了困难. 因此, 避免耐药菌株的产生、逆转抗生素的耐药或提高含有抗生素的根除*H pylori*疗法的疗效等是今后*H pylori*治疗研究的重点. 目前, 可以考虑采取以下措施:

3.1 严格掌握*H pylori*根除适应证, 选用正规、有效的治疗方案 *H pylori*根除治疗不规范或者没有严格按照*H pylori*根除适应证进行治疗是*H pylori*产生耐药性的重要原因. 全球感染*H pylori*的人数超过50%, 我国也属于高感染国家(平均感染率59%), 但是并非所有感染*H pylori*的人都需要做*H pylori*根除治疗, 应根据2003年全国*H pylori*学组安徽桐城共识意见的建议来掌握*H pylori*根除适应证及推荐的治疗方案进行规范的治疗, 同时也要加强基层医生对*H pylori*治疗知识的普及与更新, 从而让所有患者都能得到规范化的治疗.

3.2 联合用药, 避免使用单一抗生素根除*H pylori* 任何一种抗生素的单独使用都很难达到根除*H pylori*的效果, 而且容易使*H pylori*产生继发性耐药. 铋剂或PPI与抗生素的联合应用不仅能减少*H pylori*耐药菌株的产生, 而且还能增加抗生

■同行评价
本文内容丰富, 具有临床实用价值.

素的活性以及抗生素在胃内的药物浓度。克拉霉素和阿莫西林由于在胃内受胃酸影响较大,在选用时应尽量与PPI合用。另外,有研究^[51]显示根除*H pylori*治疗的三联方案中当含有克拉霉素和甲硝唑时,选择雷尼替丁枸橼酸铋(RBC)比选择PPI能获得更高的*H pylori*根除率。另有研究表明RBC可以增强克拉霉素对*H pylori*耐药菌株的抗菌活性,体外试验显示RBC加克拉霉素1 d后,其对耐药菌株的抗菌活性为原来的100倍以上。临床试验报道使用RBC加克拉霉素和甲硝唑三联疗法在克拉霉素或者甲硝唑耐药的情况下,根除率仍可达到94%。有资料显示对采用标准的PPI三联(包括奥美拉唑、兰索拉唑、潘托拉唑)根除失败的患者,继续采用RBC加四环素和替硝唑三联疗法治疗1 wk,根除率仍可达到86%。

3.3 避免使用对*H pylori*耐药的抗生素当*H pylori*对某种抗生素产生耐药时,在再次治疗中应避免使用这类抗生素,否则将严重影响*H pylori*的根除治疗效果。如果患者既往治疗中曾经用过甲硝唑或者克拉霉素,由于这两种抗生素容易产生继发性耐药和交叉耐药,在治疗时应注意选择,尽量避免使用。呋喃唑酮和呋喃硫唑酮等硝基呋喃类抗生素耐药率低,而且价格便宜,与PPI和(或)铋剂及其他抗生素联合应用均取得很好的疗效,甚至对标准一线疗法、二线疗法及利福平为基础的疗法失败的患者,仍有很高的根除率^[52]。有研究^[53]显示对标准三联治疗失败患者,左氧氟沙星加阿莫西林和奥美拉唑三联与铋剂加四环素和甲硝唑的三联疗法的根除*H pylori*的疗效相当,提示可选用喹诺酮类药物作为补救四联疗法的药物之一。因此,在甲硝唑耐药率较高的地区,可以用呋喃唑酮代替甲硝唑进行治疗。阿莫西林的耐药菌株较少见,但临床上使用阿莫西林前需进行青霉素的过敏试验,日本的一项临床研究^[54]显示,用四环素代替阿莫西林的*H pylori*根除疗法同样安全有效,因此可用于对青霉素敏感的患者。由于甲硝唑和克拉霉素耐药菌株的增多,利福霉素类药物也较多地应用于临床的研究和治疗,可显著提高对甲硝唑和克拉霉素多重耐药菌株的根除率^[55]。当然,如果有条件能够以药物敏感试验的结果来选择抗生素则将会得到更好的疗效,或者以当地*H pylori*对抗生素耐药的情况作为选择抗生素的参考。

3.4 不断开发治疗*H pylori*的新药,包括中西医的治疗。氨基乙酸是一种简单的氨基酸,他是一些

细菌的代谢产物,过量的氨基乙酸可以抑制细菌的生长。体外研究表明,氨基乙酸对*H pylori*有明显的抑菌作用,而且其对耐克拉霉素*H pylori*同样具有明显的抑制作用,因此本品有可能成为一种新的抗*H pylori*药物^[56]。另外一种新的广谱抗生素Rifaximin,体外实验表明具有很高的抗*H pylori*活性,口服后在胃肠道内有很高浓度,也有望成为新的抗*H pylori*药物^[57]。另外,非抗生素药物,例如植物的提取物、益生菌和抗氧化剂等,许多都具有潜在的抗菌作用,而且还具有天然、经济、安全等特点,因此,就这些非抗生素药物对*H pylori*的抗菌作用研究,国内外有众多报道。最近,我国的一项多中心分析^[58]显示在根除*H pylori*标准三联疗法中加入乳酸杆菌,不仅能提高*H pylori*根除率(83.6% vs 74.8%),而且能减少药物的副作用(24.7% vs 38.5%)。

3.5 对一线治疗失败者,改用补救疗法或替代方案补救疗法应尽量避免使用咪唑类药物,可改用新的药物,如呋喃唑酮、左氧氟沙星等;对于连续治疗失败者,建议间隔3-6 mo之后再行*H pylori*根除治疗,因反复治疗后会使*H pylori*球形变而对抗生素越来越不敏感。

3.6 努力研究和开发*H pylori*疫苗,让*H pylori*感染的免疫防治变成现实。免疫接种是在大规模人群中预防和控制感染性疾病的经典和有效方法,目前已经有很多学者致力于*H pylori*疫苗的研究^[59],有些研究已进入临床试验阶段,如将来能够研制出可用于人类的高效无毒的*H pylori*疫苗,不仅可以减少患者的经济负担,而且可以避免耐药菌株的产生,并能够对已产生抗生素耐药的菌株有效。

4 参考文献

- 1 Fox JG, Wang TC. Helicobacter pylori--not a good bug after all! *N Engl J Med* 2001; 345: 829-832
- 2 Broutet N, Tchamgoue S, Pereira E, Lamouliatte H, Salamon R, Megraud F. Risk factors for failure of Helicobacter pylori therapy--results of an individual data analysis of 2751 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 99-109
- 3 Kim JM, Kim JS, Jung HC, Kim N, Kim YJ, Song IS. Distribution of antibiotic MICs for Helicobacter pylori strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4843-4847
- 4 Koivisto TT, Rautelin HI, Voutilainen ME, Heikkinen MT, Koskenpato JP, Farkkila MA. First-line eradication therapy for Helicobacter pylori in primary health care based on antibiotic resistance: results of three eradication regimens. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 773-782
- 5 Magraud F. H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing.

- Gut* 2004; 53: 1374-1384
- 6 John Albert M, Al-Mekhaizeem K, Neil L, Dhar R, Dhar PM, Al-Ali M, Al-Abkal HM, Haridas S. High prevalence and level of resistance to metronidazole, but lack of resistance to other antimicrobials in *Helicobacter pylori*, isolated from a multiracial population in Kuwait. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 1359-1366
 - 7 Mobares AM, Tomatari FH, Amini M, Doust, RH. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric biopsy specimens in Iran. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 (Suppl 1): S619
 - 8 Janssen MJ, Hendrikse L, de Boer SY, Bosboom R, de Boer WA, Laheij RJ, Jansen JB. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in a Dutch region: trends over time. *Neth J Med* 2006; 64: 191-195
 - 9 Storskrubb T, Aro P, Ronkainen J, Wreiber K, Nyhlin H, Bolling-Sternevald E, Talley NJ, Engstrand L, Agreus L. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains in a random adult Swedish population. *Helicobacter* 2006; 11: 224-230
 - 10 胡品津, 胡伏莲. 中华医学会第四次全国幽门螺杆菌学术会议纪要. *中华消化杂志* 2005; 25: 698-699
 - 11 Wolle K, Leodolter A, Peitz U, Malfertheiner P. A 9-year survey of primary antibiotic resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* in Germany. *Helicobacter* 2004; 9: 584
 - 12 Wolle K, Peitz U, Malfertheiner P. Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of *Helicobacter pylori* in Germany. *Helicobacter* 2006; 11: 402
 - 13 Perez Aldana L, Kato M, Nakagawa S, Kawarasaki M, Nagasako T, Mizushima T, Oda H, Kodaira J, Shimizu Y, Komatsu Y, Zheng R, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M. The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance. *Helicobacter* 2002; 7: 306-309
 - 14 Datta S, Chattopadhyay S, Patra R, De R, Ramamurthy T, Hembram J, Chowdhury A, Bhattacharya SK, Berg DE, Nair GB, Mukhopadhyay AK. Most *Helicobacter pylori* strains of Kolkata in India are resistant to metronidazole but susceptible to other drugs commonly used for eradication and ulcer therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 51-57
 - 15 Cheng H, Hu FL. The epidemiology of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Beijing. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 2754-2757
 - 16 史彤, 刘文忠, 萧树东, 徐蔚文. 上海地区幽门螺杆菌对抗生素耐药率的变迁. *中华消化杂志* 2000; 39: 576
 - 17 林辉, 彭孝纬, 何利平, 潘秀珍. 对甲硝唑耐药幽门螺杆菌中rdxA基因的表达. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 28-31
 - 18 Baglan PH, Bozdayi G, Ozkan M, Ahmed K, Bozdayi AM, Ozden A. Clarithromycin resistance prevalence and Ica gene status in *Helicobacter Pylori* clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. *J Microbiol* 2006; 44: 409-416
 - 19 Marzio L, Coraggio D, Capodicasa S, Grossi L, Cappello G. Role of the preliminary susceptibility testing for initial and after failed therapy of *Helicobacter pylori* infection with levofloxacin, amoxicillin, and esomeprazole. *Helicobacter* 2006; 11: 237-242
 - 20 Rimbara E, Noguchi N, Tanabe M, Kawai T, Matsumoto Y, Sasatsu M. Susceptibilities to clarithromycin, amoxycillin and metronidazole of *Helicobacter pylori* isolates from the antrum and corpus in Tokyo, Japan, 1995-2001. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 307-311
 - 21 Koletzko S, Richy F, Bontems P, Crone J, Kalach N, Monteiro ML, Gottrand F, Celinska-Cedro D, Roma-Giannikou E, Orderda G, Kolacek S, Urruzuno P, Martinez-Gomez MJ, Casswall T, Ashorn M, Bodanszky H, Megraud F. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. *Gut* 2006; 55: 1711-1716
 - 22 Marusic Z, Plecko V, Katicic M, Zele-Starcevic L, Budimir A, Bedenic B, Stanko A, Presecki, Bosnjak Z, Kalenic S. Primary and secondary resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole and azithromycin in the northern part of Croatia. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 (Suppl 1): S242-S243
 - 23 Kim JM, Kim JS, Kim N, Kim SG, Jung HC, Song IS. Comparison of primary and secondary antimicrobial minimum inhibitory concentrations for *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 6-13
 - 24 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
 - 25 Watanabe K, Tanaka A, Imase K, Tokunaga K, Sugano H, Kai A, Ishida H, Itoh T, Takahashi S. Amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*: studies from Tokyo, Japan from 1985 to 2003. *Helicobacter* 2005; 10: 4-11
 - 26 Chisholm SA, Owen RJ. Rates of Ciprofloxacin and Rifampicin Resistance are Low in Persistent *Helicobacter pylori* Infections in the UK. *Helicobacter* 2006; 11: 397
 - 27 Bogaerts P, Berhin C, Nizet H, Glupczynski Y. Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter* 2006; 11: 441-445
 - 28 Miyachi H, Miki I, Aoyama N, Shirasaka D, Matsumoto Y, Toyoda M, Mitani T, Morita Y, Tamura T, Kinoshita S, Okano Y, Kumagai S, Kasuga M. Primary levofloxacin resistance and gyrA/B mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter* 2006; 11: 243-249
 - 29 Rouault E, Buissonniere A, Labadi L, Blumrich A, Lamouliatte H, Megraud F. A Five Year Follow-up of *Helicobacter pylori* Resistance to Fluoroquinolones in Bordeaux, France. *Helicobacter* 2006; 11: 399
 - 30 Glocker E, Stueger H, Kist M. Increasing Quinolone Resistance in *Helicobacter pylori* in Germany. *Helicobacter* 2006; 11: 398
 - 31 Meyer JM, Silliman NP, Wang W, Siepmann NY, Sugg JE, Morris D, Zhang J, Bhattacharyya H, King EC, Hopkins RJ. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of H. pylori antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. *Ann Intern Med* 2002;

- 136: 13-24
- 32 Glupczynski Y, Megraud F, Lopez-Brea M, Andersen LP. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 820-823
 - 33 Pilotto A, Rasso M, Leandro G, Franceschi M, Di Mario F. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Northeast Italy: a multicentre study. GISU. Interdisciplinary Group for the Study of Ulcer. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 763-768
 - 34 Parsons HK, Carter MJ, Sanders DS, Winstanley T, Lobo AJ. *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance in the United Kingdom: the effect of age, sex and socio-economic status. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1473-1478
 - 35 Cameron EA, Powell KU, Baldwin L, Jones P, Bell GD, Williams SG. *Helicobacter pylori*: antibiotic resistance and eradication rates in Suffolk, UK, 1991-2001. *J Med Microbiol* 2004; 53: 535-538
 - 36 Elviss NC, Owen RJ, Xerry J, Walker AM, Davies K. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns and genotypes in adult dyspeptic patients from a regional population in North Wales. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 435-440
 - 37 Elviss NC, Owen RJ, Breathnach A, Palmer C, Shetty N. *Helicobacter pylori* antibiotic-resistance patterns and risk factors in adult dyspeptic patients from ethnically diverse populations in central and south London during 2000. *J Med Microbiol* 2005; 54: 567-574
 - 38 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
 - 39 Masaoka T, Suzuki H, Kurabayashi K, Nomoto Y, Nishizawa T, Mori M, Hibi T. Could frameshift mutations in the *frxA* and *rdxA* genes of *Helicobacter pylori* be a marker for metronidazole resistance? *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24 (Suppl 4): 81-87
 - 40 de Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Valle ND, Burattini O, Cea U, Stoppino G, Amoroso A, Stella F, Morini S, Panella C, Ierardi E. Primary clarithromycin resistance in Italy assessed on *Helicobacter pylori* DNA sequences by TaqMan real-time polymerase chain reaction. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 429-435
 - 41 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
 - 42 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
 - 43 Christophe B. T2182C Mutation Is Not Associated with Clarithromycin Resistance in *Helicobacter pylori* [Letter]. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 868-870
 - 44 Kobayashi I, Saika T, Muraoka H, Murakami K, Fujioka T. *Helicobacter pylori* isolated from patients who later failed H. pylori eradication triple therapy readily develop resistance to clarithromycin. *J Med Microbiol* 2006; 55: 737-740
 - 45 Momynaliev KT, Selezneva OV, Kozlova AA, Vereshchagin VA, Il'ina EN, Govorun VM. A2144G is the main mutation in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *Genetika* 2005; 41: 1338-1344
 - 46 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
 - 47 Gerrits MM, Godoy AP, Kuipers EJ, Ribeiro ML, Stoof 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
 - 48 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
 - 49 Li Y, Dannelly HK. Inactivation of the putative tetracycline resistance gene HP1165 in *Helicobacter pylori* led to loss of inducible tetracycline resistance. *Arch Microbiol* 2006; 185: 255-262
 - 50 Coulon C, Lascols C, Cattoir V, Cambau E. *Helicobacter pylori* Resistance to Rifamycin is Connected to *rpoB* Mutations. *Helicobacter* 2006; 11: 399
 - 51 Gisbert JP, Gonzalez L, Calvet X. Systematic review and meta-analysis: proton pump inhibitor vs. ranitidine bismuth citrate plus two antibiotics in *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter* 2005; 10: 157-171
 - 52 Qasim A, Sebastian S, Thornton O, Dobson M, McLoughlin R, Buckley M, O'Connor H, O'Morain C. Rifabutin- and furazolidone-based *Helicobacter pylori* eradication therapies after failure of standard first- and second-line eradication attempts in dyspepsia patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 91-96
 - 53 Gisbert JP, Fuentes J, Carpio D, Tito L, Guardiola J, Tomas A, Olivares D, Calvet X. 7-day rescue therapy with ranitidine bismuth citrate after *Helicobacter pylori* treatment failure. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 1249-1253
 - 54 Matsushima M, Suzuki T, Kurumada T, Watanabe S, Watanabe K, Kobayashi K, Deguchi R, Masui A, Takagi A, Shirai T, Muraoka H, Kobayashi I, Mine T. Tetracycline, metronidazole and amoxicillin-metronidazole combinations in proton pump inhibitor-based triple therapies are equally effective as alternative therapies against *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 232-236
 - 55 Miehke S, Hansky K, Schneider-Brachert W, Kirsch C, Morgner A, Madisch A, Kuhlisch E, Bastlein E, Jacobs E, Bayerdorffer E, Lehn N, Stolte M. Randomized trial of rifabutin-based triple therapy and high-dose dual therapy for rescue treatment of *Helicobacter pylori* resistant to both metronidazole and clarithromycin. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24:

- 395-403
- 56 Minami M, Ando T, Hashikawa SN, Torii K, Hasegawa T, Israel DA, Ina K, Kusugami K, Goto H, Ohta M. Effect of glycine on *Helicobacter pylori* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3782-3788
- 57 Quesada M, Sanfeliu I, Junquera F, Segura F, Calvet X. Evaluation of *Helicobacter pylori* susceptibility to rifaximin. *Gastroenterol Hepatol* 2004; 27: 393-396
- 58 Tong JL, Ran ZH, Shen J, Zhang CX, Xiao SD. Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 155-168
- 59 Kabir S. The current status of *Helicobacter pylori* vaccines: a review. *Helicobacter* 2007; 12: 89-102

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议性的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

Ss-A/Ro 60 ku亚单位变异体1在胃癌多药耐药中的作用

韩全利, 张龙方, 张希东, 金晓维, 杨玲, 王新, 丁杰

■背景资料

肿瘤细胞的多药耐药性是肿瘤化疗失败的主要原因, 虽然导致肿瘤多药耐药的众多机制被阐明, 但仍不能完全解释肿瘤的多药耐药。本文对胃癌耐药相关分子Ro 60变异体1的功能进行了研究。

韩全利, 金晓维, 杨玲, 中国人民解放军空军总医院干部病房三区 北京市 100036

张龙方, 中国人民解放军空军总医院超声诊断科 北京市 100036

张希东, 中国人民解放军空军总医院肝胆外科 北京市 100036

王新, 丁杰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院全军消化病研究所 陕西省西安市 710032

韩全利, 2003年第四军医大学博士, 主要从事胃癌多药耐药的研究。

作者贡献分布: 此课题由韩全利, 张龙方, 杨玲, 王新及丁杰设计; 研究过程由韩全利, 张龙方, 张希东, 金晓维及王新操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由杨玲及丁杰提供; 数据分析由韩全利, 张龙方及张希东完成; 本论文写作由韩全利, 张龙方及张希东完成。

通讯作者: 韩全利, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院干部病房三区. hanquanli@yahoo.com.cn
电话: 010-66928118-6132 传真: 010-66928132

收稿日期: 2007-10-15 修回日期: 2008-02-23

Role of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit variant 1 in multi-drug resistance of gastric cancer

Quan-Li Han, Long-Fang Zhang, Xi-Dong Zhang, Xiao-Wei Jin, Ling Yang, Xin Wang, Jie Ding

Quan-Li Han, Xiao-Wei Jin, Ling Yang, Department of Geratology, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China

Long-Fang Zhang, Department of Ultrasonic Diagnosis, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China

Xi-Dong Zhang, Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100036, China

Xin Wang, Jie Ding, Department of Gastroenterology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Dr. Quan-Li Han, Department of Geratology, General Hospital of Chinese PLA Air Force, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100036, China. hanquanli@yahoo.com.cn

Received: 2007-10-15 Revised: 2008-02-23

Abstract

AIM: To investigate the possible role of Ro 60 variant 1 in multi-drug resistance (MDR) of gastric cancer.

METHODS: Ro 60 variant 1 encoding gene was cloned using RT-PCR method. Ro 60 variant 1 sense eukaryotic expression vector was constructed using DNA recombination technique

and transfected into SGC7901 cells with Lipofectamine™ 2000. Drug sensitivity was detected by MTT assay. IC₅₀ values of gastric cancer cells for chemotherapy drugs were calculated. Intracellular accumulation of adriamycin in gastric cancer cells was measured by sorting fluorescence-activated cells.

RESULTS: The expression level of Ro 60 variant 1 in SGC7901 cells was increased after transfection with sense genes. *In vitro* drug sensitivity assay showed that the sensitivity of SGC7901 cells transfected with Ro 60 variant 1 genes was significantly decreased compared with SGC7901 and SGC7901-pcDNA3.1 cells on vincristine (IC₅₀: 2.87 ± 0.10 mg/L vs 0.47 ± 0.07 mg/L, 0.63 ± 0.08 mg/L, *P* < 0.01), 5-FU (IC₅₀: 3.89 ± 0.12 mg/L vs 0.59 ± 0.17 mg/L, 0.92 ± 0.12 mg/L, *P* < 0.01), mitomycin (IC₅₀: 1.02 ± 0.06 mg/L vs 0.50 ± 0.04 mg/L, 0.73 ± 0.09 mg/L, *P* < 0.05), cisplatin (IC₅₀: 1.15 ± 0.06 mg/L vs 0.46 ± 0.04 mg/L, 0.52 ± 0.05 mg/L, *P* < 0.01) and adriamycin (IC₅₀: 0.45 ± 0.03 mg/L vs 0.15 ± 0.03 mg/L, 0.16 ± 0.02 mg/L, *P* < 0.01). Flow cytometry revealed that accumulation of adriamycin in SGC7901 cells transfected with Ro 60 variant 1 gene was decreased (50.39 ± 2.09 mg/L vs 94.99 ± 4.07 mg/L, 88.06 ± 2.67 mg/L, *P* < 0.01), when compared with SGC7901 and SGC7901-pcDNA3.1 cells.

CONCLUSION: SGC7901 cells transfected with Ro 60 variant 1 sense genes exhibit MDR. Ro 60 variant 1 might play a certain role in MDR of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Ss-A/Ro 60 ku subunit; Variant; Multi-drug resistance; Gene transfection

Han QL, Zhang LF, Zhang XD, Jin XW, Yang L, Wang X, Ding J. Role of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60 ku subunit variant 1 in multi-drug resistance of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 814-818

摘要

目的: 对Ro 60变异体1在胃癌多药耐药中的功能进行研究。

■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

方法: 克隆Ro 60变异体1编码基因, 构建Ro 60变异体1编码基因的正义真核表达载体, 将其转入SGC7901细胞, 应用半定量RT-PCR技术, 对基因转染细胞进行鉴定, 通过MTT法进行体外药物敏感性分析, 借助流式细胞仪检测细胞内蓄积的阿霉素。

结果: 成功构建Ro 60变异体1正义真核表达载体; 应用脂质体介导法将其转入SGC7901, 其表达量明显增加; 体外药物敏感性试验提示, 与SGC7901和SGC7901-pcDNA3.1细胞相比, 转染细胞对长春新碱(IC_{50} : 2.87 ± 0.10 mg/L vs 0.47 ± 0.07 mg/L, 0.63 ± 0.08 mg/L, $P < 0.01$)、5-氟尿嘧啶(IC_{50} : 3.89 ± 0.12 mg/L vs 0.59 ± 0.17 mg/L, 0.92 ± 0.12 mg/L, $P < 0.01$)、丝裂霉素(IC_{50} : 1.02 ± 0.06 mg/L vs 0.50 ± 0.04 mg/L, 0.73 ± 0.09 mg/L, $P < 0.05$)、顺铂(IC_{50} : 1.15 ± 0.06 mg/L vs 0.46 ± 0.04 mg/L, 0.52 ± 0.05 mg/L, $P < 0.01$)、阿霉素(IC_{50} : 0.45 ± 0.03 mg/L vs 0.15 ± 0.03 mg/L, 0.16 ± 0.02 mg/L, $P < 0.01$)的敏感性减低; 流式细胞仪检测结果显示, 转染细胞内阿霉素的蓄积减少(50.39 ± 2.09 mg/L vs 94.99 ± 4.07 mg/L, 88.06 ± 2.67 mg/L, $P < 0.01$)。

结论: Ro 60变异体1真核表达载体转染SGC7901细胞后, 显示多药耐药特性。

关键词: 胃癌; Ss-A/Ro 60 ku亚单位; 变异体; 多药耐药; 基因转染

韩全利, 张龙万, 张希东, 金晓维, 杨玲, 王新, 丁杰. Ss-A/Ro 60 ku亚单位变异体1在胃癌多药耐药中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 814-818
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/814.asp>

0 引言

肿瘤细胞的多药耐药性^[1-4]是肿瘤化疗失败的主要原因, 现在, 肿瘤多药耐药的众多机制已经被阐明, 但是这些机制仍不能完全解释肿瘤的多药耐药。鉴于此, 我们对胃癌耐药细胞中的耐药相关分子进行了研究, 从耐药胃癌细胞中克隆了与耐药相关的多个已知分子和未知分子^[5]。其中Ss-A/Ro核蛋白60 ku亚单位(Ro 60)是在耐长春新碱的胃癌细胞系SGC7901/VCR中高表达的基因^[6], 我们前期的研究表明, 在将Ro 60真核表达载体转染到药敏细胞SGC7901后, 该细胞显示了一些多药耐药的特性, 这提示Ro 60在胃癌多药耐药中发挥了一定的作用^[7]。在克隆Ro 60编码基因的时候, 我们发现了Ro 60编码基因的

两种变异体, 研究表明, Ro 60的两种变异体在SGC7901/VCR中的表达强度也高于SGC7901细胞^[8]。因此, 我们推测Ro 60的这两种变异体也具有与Ro 60相似的功能, 为此, 我们首先对Ro 60的变异体1(Ro 60 V1)进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞SGC7901及其耐药亚系SGC7901/VCR由第四军医大学消化病研究所保存; RPMI 1640及胰蛋白酶购自Hyclone公司; 胎牛血清购自浙江金华公司; T4 DNA连接酶、IPTG、X-gal及dNTP购自上海生工公司; DNA胶回收试剂盒购自华舜公司; Taq酶及各种限制性DNA内切酶购自TaKaRa公司; 质粒DNA提取试剂盒购自Omega公司; LipofectamineTM2000购自Gibco公司。

1.2 方法

利用RNA提取试剂盒提取SGC7901/VCR的总RNA, 逆转录法制备cDNA, 以RT-PCR法克隆Ro 60 V1编码基因, 上游引物为: 5'ATA ACG AGG GAG AGG AGA AAG G3'; 下游引物为: 5'GTG TCC ACC TGC ACT CCA TGT C3', 按Taq酶说明书中反应体系行PCR反应, PCR产物行10 g/L琼脂糖凝胶电泳分离, 并以DNA胶回收试剂盒回收纯化该片段。PCR产物经与pUCm-T载体连接、转化感受态细菌, 获得了重组有阳性cDNA片段的重组T载体; 对多个重组T载体进行DNA序列测定, 挑取与Ro 60 V1的cDNA序列完全一致的克隆进行下面的工作。利用DNA重组技术将Ro 60 V1克隆至真核表达载体pcDNA3.1/V5-His, Ro 60 V1正向连接在pcDNA3.1/V5-His载体CMV启动子的下游。按照脂质体LipofectamineTM2000说明书的操作步骤, 将Ro 60 V1正义表达载体和pcDNA3.1/V5-His分别转入对数生长中期的胃癌细胞SGC7901中, 并用300 mg/L G418对转染细胞进行筛选。应用半定量RT-PCR技术, 检测Ro 60 V1在正义基因转染细胞及对照细胞中的表达, 以GAPDH为内参照。

1.2.1 体外药物敏感性试验: 收获对数生长中期的基因转染细胞及其对照细胞, 按照每孔 10^3 接种入96孔板, 置于细胞培养箱中按常规培养; 将阿霉素(ADR)、顺铂(CDDP)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、丝裂霉素(MMC)、长春新碱(VCR)按不同的浓度加入细胞中, 每个浓度设4个复孔, 继续培养72 h后, 按常规方法加入MTT及DMSO,

■创新盘点

虽然Ro 60 V1是一个已知的分子的变异体, 研究表明, Ro 60 V1在胃癌的多药耐药中发挥了一定的作用。

■应用要点

本文旨在阐明Ro 60编码基因变异体1在胃癌多药耐药中的功能,这将有助于大家理解胃癌多药耐药的产生及调节机制。

表 1 胃癌细胞对化疗药物的IC₅₀值(mean ± SD, mg/L, n = 4)

细胞	VCR	5-FU	MMC	CDDP	ADR
SGC7901	0.47 ± 0.07	0.59 ± 0.17	0.50 ± 0.04	0.46 ± 0.04	0.15 ± 0.03
SGC7901-pcDNA3.1	0.63 ± 0.08	0.92 ± 0.12	0.73 ± 0.09	0.52 ± 0.05	0.16 ± 0.02
SGC7901-Ro 60 V1	2.87 ± 0.10 ^b	3.89 ± 0.12 ^b	1.02 ± 0.06 ^a	1.15 ± 0.06 ^b	0.45 ± 0.03 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs SGC7901, SGC7901-pcDNA3.1细胞。

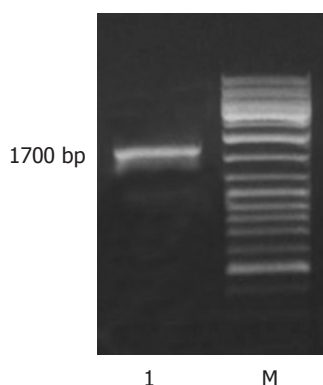


图 1 PCR产物的10 g/L琼脂糖凝胶电泳结果. 1: PCR产物; M: 100 bp DNA标记物。

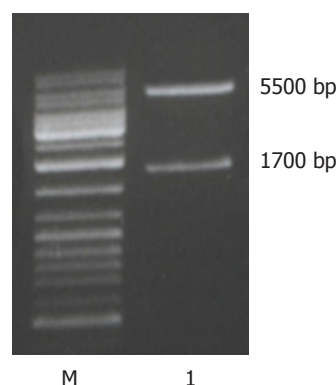


图 2 Ro 60 V1正义表达载体的酶切鉴定结果. M: 100 bp DNA标记物; 1: pcDNA3.1-Ro 60 V1经Not I、Xba I双酶切。

于490 nm处测A值, 计算细胞的存活率: 细胞存活率 = (实验组A值-空白对照组A值)/(阴性对照组A值-空白对照A值) × 100%; 同时计算细胞对每种药物的IC₅₀值。

1.2.2 细胞内阿霉素蓄积的检测: 收获对数生长中期的细胞, 按照每孔8000个细胞接种入6孔板中; 培养过夜后, 每孔加入阿霉素至终浓度为5 mg/L, 继续培养1 h, 收获细胞, 以PBS洗涤细胞后, 上流式细胞仪检测细胞内的阿霉素荧光强度。

统计学处理 应用SPSS11.0统计软件包, 对各组均数进行t检验。

2 结果

通过对来自SGC7901/VCR细胞的cDNA进行PCR扩增(图1), PCR产物经与pUCm-T载体连接、转化感受态细菌, 获得了重组有阳性cDNA片段的重组T载体; 利用DNA重组技术将Ro 60 V1从T载体亚克隆至真核表达载体pcDNA3.1/V5-His, 并通过限制酶切技术对构建的正义表达载体进行了鉴定(图2)。将构建成功的Ro 60 V1的正义表达载体和pcDNA3.1/V5-His通过脂质体介导法分别转导入对数生长中期的胃癌细胞SGC7901, 经过3 mo的G418筛选, 获得了稳定转染的抗性细胞, 分别将其命名为SGC7901-Ro 60 V1、SGC7901-pcDNA3.1。

应用半定量RT-PCR技术, 检测了Ro 60 V1在正义基因转染细胞及对照细胞中的表达。结果表明, 与SGC7901细胞和转染有空载体的

SGC7901细胞相比, 转染有正义基因的SGC7901细胞中的Ro 60 V1的表达量明显升高(图3)。

2.1 体外药物敏感性试验 上调Ro 60 V1在药敏细胞SGC7901的表达, 可降低药敏细胞对VCR、MMC、5-FU、CDDP和ADR的敏感性, 与SGC7901和SGC7901-pcDNA3.1细胞相比, 有显著性差异(表1)。

2.2 细胞内阿霉素蓄积的检测 流式细胞仪检测结果显示, 在正义转染细胞中, 与SGC7901细胞和SGC7901-pcDNA3.1细胞相比, SGC7901-Ro 60 V1细胞内蓄积的阿霉素明显减低(50.39 ± 2.09 mg/L vs 94.99 ± 4.07 mg/L, 88.06 ± 2.67 mg/L, P<0.01)。

3 讨论

胃癌细胞的多药耐药性是胃癌化疗失败的主要原因, 我们以前的研究发现, 在胃癌细胞的多药耐药中, 除了有P-gp、MRP、GST等经典的耐药分子参与外^[9-13], 凋亡基因的改变、蛋白激酶C以及某些离子通道也参与了胃癌细胞多药耐药性的形成^[14-18]。为了深入研究胃癌细胞MDR的发生机制, 我们应用改良差示PCR技术比较了胃癌长春新碱耐药细胞SGC7901/VCR与药敏细胞SGC7901基因表达的差异, 结果表明, 与药敏细胞SGC7901相比, Ro 60在耐药细胞SGC7901/VCR中的表达明显上调, 此结果得到了反向Northern blot的证实。在克隆Ro 60编码基因的时候, 我们发现了Ro 60编码基因的两种变异体, 研

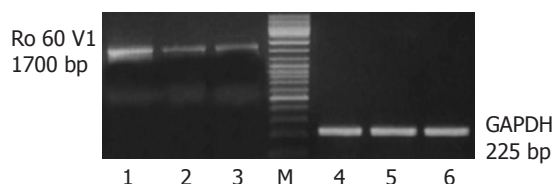


图3 转染细胞Ro 60 V1基因表达的半定量RT-PCR检测结果。1: SGC7901-Ro 60 V1(Ro 60 V1); 2: SGC7901-pcDNA3.1(Ro 60 V1); 3: SGC7901(Ro 60 V1); M: 100 bp DNA标记物; 4: SGC7901-Ro 60 V1(GAPDH); 5: SGC7901-pcDNA3.1(GAPDH); 6: SGC7901(GAPDH)。

究表明, Ro 60的两种变异体在SGC7901VCR中的表达强度也高于SGC7901细胞, 为了了解Ro 60变异体的功能, 我们首先对Ro 60的变异体1进行了研究。

Ro 60是从由人T淋巴母细胞白血病(MOLT-4)细胞mRNA构建的cDNA文库中首次克隆得到的^[19], 人Ro 60基因定位于第一号染色体1q31区, 全长cDNA为1890 bp, 编码525个氨基酸残基, 分子质量为60 ku^[20]。Ro 60是多种自身免疫性疾病^[21]的自身抗原。目前Ro 60的功能一直不是很清楚^[22-26], 在前期研究中, 我们已经证实了Ro 60在胃癌耐药细胞中高表达, 通过基因克隆、基因重组和转染, 我们获得了Ro 60高表达的SGC7901细胞, 体外药敏实验结果表明, Ro 60高表达的SGC7901细胞对多种化疗药物产生了明显的耐药性。因药物摄入减少和/或药物外排增多导致的细胞内药物蓄积减少, 是肿瘤细胞耐药产生的机制之一^[27-29], 流式细胞仪检测结果表明, Ro 60正义基因转染的细胞后, 细胞外排ADR的能力增强, 由此提示, Ro 60基因影响胃癌细胞耐药表型与药物在细胞内的蓄积有关^[7]。由于Ro 60 V1是在Ro 60基因cDNA的1727位和1728位核苷酸之间插入了52 bp的核苷酸, 仅使Ro 60基因编码蛋白质羧基端的11个氨基酸出现了变化, 所以我们推测Ro 60 V1也具有与Ro 60相似的功能。

通过基因克隆、基因重组和转染, 我们获得了Ro 60 V1正义基因转染的细胞, 应用半定量RT-PCR技术, 检测了Ro 60 V1在正义基因转染细胞及对照细胞中的表达, 结果表明, SGC7901细胞在转染Ro 60 V1真核表达载体后, 其Ro 60 V1表达出现增加, 表明我们成功构建了Ro 60 V1表达上调的SGC7901细胞。体外药敏实验结果表明, 增强Ro 60 V1在药敏细胞SGC7901的表达后, 细胞对VCR、5-FU、MMC、CDDP及ADR的敏感性明显降低, 表明Ro 60 V1在

SGC7901细胞表达上调后SGC7901对多种化疗药物产生了明显的耐药性。流式细胞仪检测结果表明, Ro 60 V1正义基因转染的细胞后, 其细胞内蓄积的ADR明显减少, 提示细胞外排ADR的能力增强。Ro 60 V1正义基因转染的细胞后细胞外排ADR的能力增强, 由此提示, Ro 60 V1基因影响胃癌细胞耐药表型与药物在细胞内的蓄积有关。Ro 60 V1在肿瘤多药耐药方面的功能与Ro 60完全相同。

总之, 与Ro 60一样, Ro 60 V1的表达导致SGC7901细胞对化疗药物产生了部分耐药性, 提示Ro 60 V1基因可能参与了胃癌细胞MDR的形成, Ro 60及Ro 60 V1参与MDR的机制尚需进一步研究。

4 参考文献

- 1 Roepe PD. The role of the MDR protein in altered drug translocation across tumor cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1241: 385-405
- 2 Deng L, Tatebe S, Lin-Lee YC, Ishikawa T, Kuo MT. MDR and MRP gene families as cellular determinant factors for resistance to clinical anticancer agents. *Cancer Treat Res* 2002; 112: 49-66
- 3 Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract* 2005; 14 Suppl 1: 35-48
- 4 Sawicka M, Kalinowska M, Skierski J, Lewandowski W. A review of selected anti-tumour therapeutic agents and reasons for multidrug resistance occurrence. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 1067-1081
- 5 Zhao Y, You H, Liu F, An H, Shi Y, Yu Q, Fan D. Differentially expressed gene profiles between multidrug resistant gastric adenocarcinoma cells and their parental cells. *Cancer Lett* 2002; 185: 211-218
- 6 Wang X, Lan M, Shi YQ, Lu J, Zhong YX, Wu HP, Zai HH, Ding J, Wu KC, Pan BR, Jin JP, Fan DM. Differential display of vincristine-resistance-related genes in gastric cancer SGC7901 cell. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 54-59
- 7 韩全利, 丁杰, 张龙方, 王新, 郭长存, 乔泰东, 张学庸, 樊代明. Ss-A/Ro 核蛋白60 ku 亚单位在胃癌多药耐药中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 256-260
- 8 韩全利, 丁杰, 郭长存, 王新, 乔泰东, 张学庸, 樊代明. Ss-A/Ro核蛋白60 ku 亚单位及其变异体在耐药胃癌细胞中的表达. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2788-2790
- 9 Ferte J. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem* 2000; 267: 277-294
- 10 Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Perrotton T, Di Pietro A. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. *Med Res Rev* 2005; 25: 453-472
- 11 Mealey KL. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Ther* 2004; 27: 257-264
- 12 Mizutani T, Hattori A. New horizon of MDR1 (P-glycoprotein) study. *Drug Metab Rev* 2005; 37:

■名词解释

多药耐药性: 肿瘤细胞对某一化疗药物产生耐药后, 对其他化学结构和/或作用机制不同的化疗药物也产生交叉耐药性。

■同行评价

本文选题新颖, 研究方法先进, 数据客观, 结论明确, 具有较好的学术价值。

- 489-510
- 13 Asakura T, Ohkawa K. Chemotherapeutic agents that induce mitochondrial apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 577-590
- 14 Xiao B, Shi YQ, Zhao YQ, You H, Wang ZY, Liu XL, Yin F, Qiao TD, Fan DM. Transduction of Fas gene or Bcl-2 antisense RNA sensitizes cultured drug resistant gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 421-425
- 15 韩英, 时永全, 曹云新, 樊代明. 蛋白激酶C的激活剂及抑制剂对P-糖蛋白表达及功能的影响. *中华消化杂志* 2001; 21: 349-352
- 16 Zhao Y, Xiao B, Chen B, Qiao T, Fan D. Upregulation of drug sensitivity of multidrug-resistant SGC7901/VCR human gastric cancer cells by bax gene transduction. *Chin Med J (Engl)* 2000; 113: 977-980
- 17 韩英, 时永全, 李玲, 樊代明. 蛋白激酶C同工酶PKC- α 及PKC- β I在胃癌及其耐药细胞中的表达和功能. *中华肿瘤杂志* 2001; 23: 103-106
- 18 韩英, 时永全, 张宏博, 张森利, 王春梅, 樊代明. 肿胀激活状态下蛋白激酶C同工酶亚型在胃癌耐药细胞系的亚细胞分布变化及其意义. *中华医学杂志* 2001; 81: 328-331
- 19 Ben-Chetrit E, Gandy BJ, Tan EM, Sullivan KF. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest* 1989; 83: 1284-1292
- 20 Chan EK, Tan EM, Ward DC, Matera AG. Human 60-kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen gene (SSA2) localized to 1q31 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1994; 23: 298-300
- 21 von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-358
- 22 O'Brien CA, Wolin SL. A possible role for the 60-kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes Dev* 1994; 8: 2891-2903
- 23 Shi H, O'Brien CA, Van Horn DJ, Wolin SL. A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens. *RNA* 1996; 2: 769-784
- 24 Chen X, Quinn AM, Wolin SL. Ro ribonucleoproteins contribute to the resistance of *Deinococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 2000; 14: 777-782
- 25 Chen X, Wolin SL. The Ro 60 kDa autoantigen: insights into cellular function and role in autoimmunity. *J Mol Med* 2004; 82: 232-239
- 26 Wahren-Herlenius M, Muller S, Isenberg D. Analysis of B-cell epitopes of the Ro/SS-A autoantigen. *Immunol Today* 1999; 20: 234-240
- 27 Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455: 152-162
- 28 Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 1986; 47: 371-380
- 29 Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1973; 323: 466-483

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写. (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

丹参对肝星状细胞一氧化氮合酶表达的影响

姚冬梅, 房澍名, 杨川杰, 姚希贤

姚冬梅, 房澍名, 杨川杰, 姚希贤, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

姚冬梅, 主治医师, 主要从事慢性肝病研究。

作者贡献分布: 此课题由姚冬梅、房澍名、杨川杰及姚希贤设计; 研究过程由姚冬梅、房澍名操作完成; 数据分析由姚冬梅、房澍名及杨川杰完成; 本论文写作由姚冬梅、姚希贤、房澍名及杨川杰完成。

通讯作者: 姚冬梅, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科. ydm8080@126.com

电话: 0311-66002951

收稿日期: 2007-10-14 修回日期: 2008-01-22

Effect of radix salviae miltiorrhizae on expression of nitric oxide synthase in hepatic stellate cells

Dong-Mei Yao, Shu-Ming Fang, Chuan-Jie Yang, Xi-Xian Yao

Dong-Mei Yao, Shu-Ming Fang, Chuan-Jie Yang, Xi-Xian Yao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Dong-Mei Yao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping Western Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. ydm8080@126.com

Received: 2007-10-14 Revised: 2008-01-22

Abstract

AIM: To investigate the effect of radix salviae miltiorrhizae (RSM) on the expression of nitric oxide synthase (NOS) in hepatic stellate cells (HSCs).

METHODS: RSM cream was prepared, and then we examined the effects of RSM on the expression of inducible NOS and endothelial NOS in HSCs by the immunocytochemistry.

RESULTS: In the activated HSCs, RSM increased the expression of inducible NOS, and the absorbency increased from 0.034 ± 0.001 to 0.053 ± 0.002 ($P < 0.05$). However, there were no significant changes in the expression of endothelial NOS.

CONCLUSION: RSM increased the expression of iNOS in the activated HSCs.

Key Words: Radix salviae miltiorrhizae; Nitric oxide synthase; Hepatic stellate cell; Immunocytochemistry

Yao DM, Fang SM, Yang CJ, Yao XX. Effect of radix salviae miltiorrhizae on expression of nitric oxide synthase in hepatic stellate cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(8): 819-822

摘要

目的: 探讨丹参降门脉压作用是否与促进NOS表达有关。

方法: 制备丹参浸膏, 借助细胞免疫组化的方法观察丹参对一氧化氮合酶(NOS)iNOS和eNOS表达的影响。

结果: 丹参可促进活化的HSCs iNOS表达, 其棕色吸光度值增加, 同干预前相比有显著性差异(0.053 ± 0.002 vs 0.034 ± 0.001 , $P < 0.05$), 而eNOS表达无明显变化。

结论: 丹参可促进活化的HSCs iNOS表达。

关键词: 丹参; 一氧化氮合酶; 肝星状细胞; 免疫组化

姚冬梅, 房澍名, 杨川杰, 姚希贤. 丹参对肝星状细胞一氧化氮合酶表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 819-822
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/819.asp>

0 引言

近年来学者们对丹参(radix salviae miltiorrhizae, RSM)、丹参复方制剂及丹参有效成分在慢性肝病治疗中作用进行了深入研究, 已得到广泛共识, 并通过动物实验与临床研究证实了其抗肝纤维化的作用机制^[1-3], 但目前尚缺乏其在肝硬化门脉高压治疗中的研究, 李校天通过胆总管结扎法, 制备犬肝硬化门脉高压模型, 表明丹参可降低肝硬化犬门静脉压力^[4-5], 但其机制尚未完全阐明, 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)收缩是介导肝硬化门脉高压的主要因素, 丹参降门脉压作用是否与促进HSCs一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)表达有关, 目前尚无定论。因此, 本课题通过采用细胞免疫组化的

■背景资料

丹参是目前临床应用较为广泛的主要活血化瘀药物, 以丹参为主药的系列组方已证实具有肯定的抗肝纤维化作用, 但目前尚缺乏其在肝硬化门脉高压治疗中的研究。本研究即从细胞水平探讨了丹参降门脉压力的可能机制。

■同行评议者

龚国忠, 教授, 中南大学湘雅二医院肝病研究中心; 朴云峰, 教授, 吉林大学第一临床医院消化科

■研发前沿

HSCs是介导慢性肝病发展的重要因素, 目前关于丹参及其单体在HSCs介导肝纤维化中的机制研究非常深入, 但丹参介导HSCs收缩的机制尚无定论。

方法观察制备的丹参浸膏对HSCs一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)-诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)表达的影响, 为进一步从细胞水平探讨丹参降门脉压作用的机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 肝星状细胞株CFSC由美国Greenwel教授建株并惠赠, 其表型为活化的HSCs。兔抗一氧化氮合酶2(iNOS)抗体购于武汉博士德生物工程有限公司, 兔抗一氧化氮合酶3(eNOS)抗体购于美国Santa Cruz公司, 兔SP试剂盒购于北京中山生物技术有限公司, 丹参购自石家庄市乐仁堂, 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 丹参浸膏提取: 丹参500 g, 加蒸馏水温火煮沸20 min, 取药液纱布过滤。共2次, 将2次药液混合后以4000 r/min离心15 min, 取上清, 加950 mL/L乙醇至60%-80%体积, 0-4℃静置过夜。弃沉淀, 取上清于旋转蒸发仪负压蒸馏, 蒸干乙醇和水分后即得丹参浸膏, 并稀成50 g生药/L备用。

1.2.2 细胞培养: 将冷冻保存于液氮中的HSCs复苏后接种于含100 mL/L胎牛血清、 1×10^5 IU/L青霉素、 1×10^5 μg/L链霉素、4 mmol/L L-谷氨酰胺及1 mol/L HEPES的10% RPMI 1640培养液(pH7.4)中, 37℃、50 mL/L CO₂条件下培养。当细胞呈单层致密状时, 用0.25%胰蛋白酶消化后以1:3传代, 24 h换液, 72 h再次传代。

每次实验均在呈指数生长的细胞中进行, 将2 cm×2 cm盖玻片预先放置在6孔培养板, 细胞消化后以 1.0×10^7 /L的密度接种2 mL制备爬片, 培养箱中孵育至细胞80%融合时, 弃培养液, 换不含胎牛血清的细胞培养液继续培养24 h, 使细胞基本同步化于G₀期后进行实验。

1.2.3 细胞爬片制备: 细胞消化后以 1.0×10^7 /L的密度接种1.5 mL制备爬片, 培养箱中孵育至细胞90%融合时, 弃培养液, 换不含胎牛血清的细胞培养液继续培养24 h, 使细胞基本同步化于G₀期后进行实验。根据预试验结果, 丹参的干预浓度为4.22 g/L, 干预24 h后收集细胞爬片。

1.2.4 细胞免疫组化: 经冷PBS漂洗、300 mL/L甲醇固定、冷PBST漂洗、1% Triton-X100修复, 暴露抗原、冷PBST冲洗、3%甲醇-过氧化氢封闭内源性过氧化物酶、蒸馏水漂洗、100 mL/L山羊血清封闭非特异性结合位点、加入一抗

(iNOS浓度为1:200, eNOS浓度为1:100)、冷PBST漂洗、加入二抗(生物素化IgG)、漂洗、加入三抗(链霉卵白素标记的HRP)、漂洗、DAB显色、脱水封片等过程。

结果分析采用华东师范大学计算机图像分析系统免疫组织化学图像分析软件, 所取参数为阳性细胞计数比率和棕色吸光度值, 取200×高倍视野下NOS显色摄取图像, 用细胞计数软件作定量分析代表阳性细胞计数比率, 同时用同一视野测细胞吸光度代表免疫反应强度。

统计学处理 所有结果以mean±SD表示, 组间比较采用独立样本t检验, 应用SPSS10.0统计软件处理。

2 结果

2.1 iNOS表达 活化的HSCs胞质表达iNOS, 呈淡黄色, 经图像分析, 其阳性细胞数为84.62%±7.11%, 棕色吸光度值为0.034±0.001, 丹参干预后, 其阳性表达为棕黄色, 散在分布深棕黄色阳性细胞, 阳性细胞数为89.12%±11.01%, 同干预前相比无显著性差异, 而棕色吸光度为0.053±0.002, 同干预前相比有显著性差异($P<0.05$, 表1, 图1A-B)。

2.2 eNOS表达 活化的HSCs胞质表达eNOS, 呈淡黄色, 经图像分析, 其阳性细胞数为91.06%±7.22%, 棕色吸光度值为0.023±0.005, 经丹参干预后阳性细胞数为89.73%±4.12%, 棕色吸光度值为0.028±0.002, 同干预前相比均无显著性差异(表1, 图1C-D)。

3 讨论

丹参是目前临床应用较为广泛的主要活血化瘀药物, 以丹参为主药的系列中药组方抑肝纤、复方861合剂、扶正化瘀方、强肝胶囊以及“益肝浓缩煎剂”等已证实具有肯定的抗肝纤维化作用^[1-3]。但其在门脉高压治疗中的研究尚少, 李校天 *et al*通过临床和动物实验研究表明, 丹参可改善肝硬化患者临床症状, 降低门静脉内径, 门静脉血流量, 同时降低肝硬化犬门静脉压, 而对平均动脉压、心率无影响^[4-5]。表明丹参既可有效降低肝硬化犬的门静脉压力, 又无全身血液动力学副作用, 为一有希望的降门脉压药物。

目前研究表明丹参对门脉高压的治疗机制可能与其减轻肝血窦阻力, 增加肝血流, 改善肝脏微循环等有关。为了探讨丹参降门脉压力是

■相关报道

一项动物实验证实丹参可降低门脉压力, 但其机制尚未阐明, 有一项中药复方的研究证实其可通过促进HSCs iNOS表达而实现, 但目前缺乏丹参单味药的相关研究。

表 1 丹参对NOS表达的影响

	对照组		丹参	
	阳性细胞比率(%)	吸光度	阳性细胞比率(%)	吸光度
iNOS	84.62 ± 7.11	0.034 ± 0.001	89.12 ± 11.21	0.053 ± 0.002 ^a
eNOS	91.06 ± 7.22	0.023 ± 0.005	89.73 ± 4.12	0.028 ± 0.002

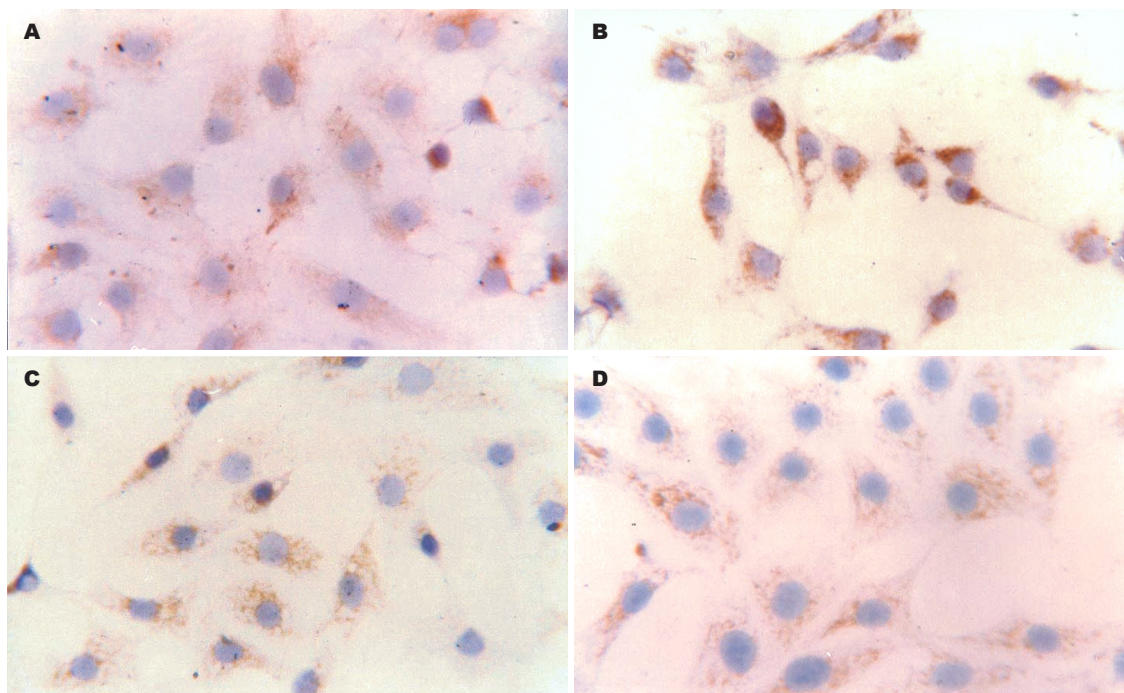
^a*P* < 0.05 vs 对照组.

图 1 丹参对NOS表达影响. A: iNOS对照组; B: iNOS丹参组; C: eNOS对照组; D: eNOS丹参组.

否通过抑制HSC收缩而实现, 本研究从丹参对HSCs NOS表达进行了研究. 当前研究表明内皮素-1(endothelin-1, ET-1)与一氧化氮(nitric oxide, NO)是调节HSCs舒缩、影响肝窦血流量及肝内阻力的主要因素^[6-11]. 正常情况下, 肝窦内皮细胞(sinusoidal endothelial cell, SEC)合成、分泌NO及ET, 两者处于生理性平衡状态, 对调节肝脏微循环中发挥重要作用; 肝硬化时, SEC合成NO、ET-1减少^[12-13], 但是活化的HSCs合成分泌NO、ET-1可能代偿性增加, 表明尽管硬化肝脏产生NO障碍, 但可通过代偿机制在一定程度上促使NO合成, 但ET-1、NO合成增加并不均衡, ET-1增加更为明显, 从而导致HSCs收缩性增加^[12-18], 肝硬化时此种NO、ET-1生理平衡被破坏, 在肝硬化肝脏微循环障碍发生发展中具有重要意义. 因此, 通过药物促进NOS合成或拮抗ET-1作用可能对门脉高压治疗发挥作用. 本研究观察了丹参对HSCs NOS表达的影响, 结果表明, 活化的

HSCs表达iNOS、eNOS两种NOS, 经丹参干预后, iNOS表达增强, 棕色吸光度同用药前相比有显著性差异, 而eNOS用药前后无明显变化, 表明丹参对HSCs的作用在一定程度上是由iNOS所诱导. 目前丹参对NOS表达的研究结论不一, 不同类型细胞作用有所不同, 有的表现为对NOS抑制^[19-20], 有的为促进NOS合成^[21-22], 丁惠国 *et al*^[23]观察到复方中药861可促进大鼠HSCs iNOS的表达, 本研究亦观察到复方861的君药-丹参可促进大鼠HSCs iNOS表达, 表明丹参亦可能直接作用于HSCs, 促使NO增加. 因此, 从机制上表明丹参介导门脉压力的下降至少在一定程度上是诱导iNOS的表达所致.

4 参考文献

- 刘平, 刘乃明, 徐列明, 刘成. 丹参酸乙对大鼠肝细胞增殖及胶原生成的影响. 中华肝病杂志 1996; 4: 235-236
- 王晓玲, 刘平, 童普德, 谭英姿, 钱汝红, 胡旭东, 蒋文娟. 丹参对转化生长因子β1刺激的NIH/3T3细胞表达

■应用要点

丹参已广泛应用于临床, 对其在慢性肝病中治疗机制的深入研究将为其更广泛地应用于临床提供依据.

■同行评价

本文在细胞水平探讨丹参降门脉压的作用机制,有一定的科学性和先进性,建议继续动物水平的试验,为临床研究打下基础,如能开发单体药物对中药现代化工作则更有意义。

- 1 I 型胶原和c-fos mRNA的影响. 中西医结合肝病杂志 2001; 11: 19-20
- 2 王泰龄, 王宝恩, 张怀宏, 刘霞, 段钟平, 张晶, 马红, 李新民, 李宁章. 中药复方861对慢性肝炎肝纤维化治疗作用的病理研究. 胃肠病学和肝病学杂志 1998; 7: 148-153
- 3 李校天, 姚希贤, 李涛, 王燕. 丹参对门脉高压血流动力学影响的实验与临床研究. 中华内科杂志 1997; 36: 450-453
- 4 Yao XX, Cui DL, Sun YF, Li XT. Clinical and experimental study of effect of Raondix Salviae Militiorrhiza and other blood-activating and stasis-eliminating Chinese herbs on hemodynamics of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 439-442
- 5 Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 337-349
- 6 Zhang JX, Pegoli W Jr, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1994; 266: G624-G632
- 7 Rockey DC, Weisiger RA. Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology* 1996; 24: 233-240
- 8 Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 1993; 213: 815-823
- 9 Rockey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest* 1995; 95: 1199-1206
- 10 Oda M, Han JY, Yokomori H. Local regulators of hepatic sinusoidal microcirculation: recent advances. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000; 23: 85-94
- 11 Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone A, Groszmann RJ, Sessa WC. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest* 1997; 100: 2923-2930
- 12 Sakamoto M, Uen T, Nakamura T, Hashimoto O, Sakata R, Kin M, Ogata R, Kawaguchi T, Torimura T, Sata M. Estrogen upregulates nitric oxide synthase expression in cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 2001; 34: 858-864
- 13 Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, Palazzetti B, Tallet D, del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8897-8902
- 14 姚希贤, 姚冬梅, 房红梅, 杨川杰, 张晓岚, 刘丽, 苏素文, 王川. 内皮素-1对活化肝星状细胞增殖及钙离子影响的调控机制研究. 中华消化杂志 2004; 24: 659-662
- 15 姚冬梅, 房树名, 杨川杰, 修贺明, 苏素文, 姚希贤. 丹参对内皮素-1介导的肝星状细胞Ca²⁺的影响机制. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2488-2492
- 16 Shah V, Cao S, Hendrickson H, Yao J, Katusic ZS. Regulation of hepatic eNOS by caveolin and calmodulin after bile duct ligation in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1209-G1216
- 17 Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, van Goor H, Jansen P, Benedetti A, Moshage H. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. *Liver* 2001; 21: 1-12
- 18 Luo WB, Wang YP. Magnesium lithospermate B inhibits hypoxia-induced calcium influx and nitric oxide release in endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 1135-1142
- 19 王洁, 吴俊芳, 张均田. 总丹酚酸的抗脑缺血研究. 中国药理学通报 1999; 15: 164-166
- 20 谭效锋, 田菲. 活血保心冲剂对冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛患者血一氧化氮及心血管调节肽的影响. 中国中西医结合急救杂志 1999; 6: 56-58
- 21 黄迪南, 侯敢, 祝其锋. 复方丹参注射液对巨噬细胞一氧化氮合成的影响. 中国老年学杂志 1999; 19: 41-42
- 22 丁惠国, 王宝恩, 尚宏伟, 王兴翠, 唐素珍, 贾继东, 赵春惠. 复方中药861对大鼠肝星状细胞系一氧化氮合酶表达及其活性的影响. 中国中西医结合杂志 2002; 22: 362-364

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

家兔非酒精性脂肪肝纤维化形成中层粘连蛋白及透明质酸的变化

赵迎庆, 王炳元

赵迎庆, 沈阳市第五人民医院消化内科 辽宁省沈阳市 110023

王炳元, 中国医科大学第一附属医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

赵迎庆, 2003年中国医科大学硕士, 副主任医师, 主要从事肝脏疾病的研究。

作者贡献分布: 赵迎庆, 王炳元对此文均有贡献; 此课题设计和论文写作由二人共同完成; 研究过程、数据分析由赵迎庆完成。

通讯作者: 赵迎庆, 110023, 辽宁省沈阳市铁西区兴顺街188号, 沈阳市第五人民医院消化内科. yingqingzhao@hotmail.com

电话: 024-25403783-2105

收稿日期: 2007-10-13 修回日期: 2008-02-19

Successive observation of laminin and hyaluronic acid on the formation of non-alcoholic fatty liver fibrosis in rabbits

Ying-Qing Zhao, Bing-Yuan Wang

Ying-Qing Zhao, Department of Gastroenterology, Shenyang Fifth People's Hospital, Shenyang 110023, Liaoning Province, China

Bing-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Ying-Qing Zhao, Department of Gastroenterology, Shenyang Fifth People's Hospital, 188 Xingshun Street, Tiexi District, Shenyang 110023, Liaoning Province, China. yingqingzhao@hotmail.com

Received: 2007-10-13 Revised: 2008-02-19

Abstract

AIM: To observe the changes of laminin (LN) and hyaluronic acid (HA) on the formation of non-alcoholic fatty liver fibrosis in rabbits.

METHODS: Firstly, the rabbit models of fatty liver and liver fibrosis were set up by hypercholesterolemia. Liver tissues were collected and the histopathological changes were observed using transmission endoscopy and staining methods. Immunohistochemistry was used to detect LN expression and radioimmunoassay was used to measure serum HA concentration. Successive observation was used to outline the dynamic changes of basement membrane of hepatic sinusoid during the formation of non-alcoholic fatty liver fibrosis in rabbits.

RESULTS: Sinusoidal capillarization was characterized by defenestration of sinusoidal endothelial cells (SEC) and formation of basement membrane. Along with the formation of liver fibrosis, the positive expression (area percentage) of LN on sinusoidal wall and the concentration (mg/L) of serum HA increased gradually, and both of them reached the peak at 8 wk; there were significant differences in contrast with those in the normal group (LN: 25.2 ± 1.0 vs 5.1 ± 0.7 , $P < 0.01$; serum HA: 1422.18 ± 20.9 vs 1189.3 ± 13.1 , $P < 0.01$). After stopping high-sterone feeding, the positive expression of LN and concentration of HA decreased gradually.

CONCLUSION: The changes of serum HA concentration are in accordance with the defenestration of hepatic sinusoid and LN changes. LN and HA may be used as cardinal markers for hepatic sinusoidal capillarization and liver fibrosis.

Key Words: Laminin; Hyaluronic acid; Non-alcoholic fatty liver; Liver fibrosis; Hepatic sinusoidal capillarization

Zhao YQ, Wang BY. Successive observation of laminin and hyaluronic acid on the formation of non-alcoholic fatty liver fibrosis in rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 823-828

摘要

目的: 研究非酒精性脂肪肝家兔肝纤维化形成过程中肝窦壁层粘连蛋白(LN)及透明质酸(HA)的变化。

方法: 用高脂饲料诱发脂肪肝的方法建立家兔非酒精性肝病动物模型, 取肝组织用扫描电镜、特殊染色等进行病理组织形态学观察; 免疫组化检测LN; 放射免疫法测定血清HA, 研究非酒精性脂肪肝家兔在肝纤维化形成过程中肝窦壁基底膜成分的动态变化。

结果: 肝窦毛细血管化, 即窗孔消失、基底膜形成; 肝窦壁LN表达(面积百分比)和血清HA含量(mg/L)均随着肝纤维化形成逐渐增加, 在

■背景资料

肝窦毛细血管化是肝纤维化过程中一个重要的病理改变, 目前对肝窦毛细血管化在非酒精性脂肪肝纤维化中的形成过程尚少见报道。肝窦内皮下基底膜的形成是肝纤维化过程中肝窦毛细血管化的一个重要特征, 而关于基底膜主要成分层粘连蛋白、以及反应肝窦内皮细胞功能的透明质酸含量在非酒精性脂肪肝纤维化过程中的动态变化尚缺乏系统的研究。

■同行评议者

郝春秋, 副教授, 第四军医大学唐都医院传染科(全军感染病防治中心)

■研究前沿

本文用高脂饲料诱发脂肪肝的方法建立家兔非酒精性肝病动物模型,通过病理组织形态学观察、层粘连蛋白的免疫组化观察及血清透明质酸测定,研究了非酒精性脂肪肝家兔在肝纤维化形成过程中肝窦壁基底膜成分的动态变化。而有关层粘连蛋白如何诱导整合素的表达还有待深入研究。

8 wk末阳性最强,均与对照组有显著性差异(LN: 25.2 ± 1.0 vs 5.1 ± 0.7 , $P < 0.01$; 血清HA: 1422.18 ± 20.9 vs 1189.3 ± 13.1 , $P < 0.01$), 停止造模后逐渐下降,但停药8 wk均强于正常组。

结论: 家兔肝纤维化形成过程中,肝窦壁功能性基底膜被破坏,发生肝窦毛细血管瘤化。血清HA含量的变化与电镜下SEC去窗孔的改变,以及LN的变化相一致。

关键词: 层粘连蛋白; 透明质酸; 非酒精性脂肪肝; 肝纤维化; 肝窦毛细血管瘤化

赵迎庆, 王炳元. 家兔非酒精性脂肪肝肝纤维化形成中层粘连蛋白及透明质酸的变化. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 823-828

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/823.asp>

0 引言

多种原因可导致肝纤维化,但形成的机制至今仍然不清。有人认为肝窦内皮细胞(liver sinusoids endothelial cell, LSEC)的失窗孔化和肝窦毛细血管瘤化(sinusoid capillarization)的形成是其中的发病机制之一^[1-5],而肝窦内皮下基底膜的形成是肝纤维化过程中肝窦毛细血管瘤化的一个重要特征^[6-9]。有关基底膜的主要成分层粘连蛋白(laminin, LN),以及反映肝窦内皮细胞功能的透明质酸(hyaluric acid, HA)含量在非酒精性脂肪肝肝纤维化过程中动态变化尚缺乏系统的研究。我们采用Buyssens的方法^[10]成功地建立了实验性高胆固醇血症家兔肝纤维化模型,对此领域进行初步的探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰白种家兔40只,体质量2.5-3.5 kg,由中国医科大学实验动物部提供,用平衡饲料喂养1 wk后随机分模型组25只,对照组15只,分笼饲养。模型组家兔给予高脂饲料喂养,即在普通平衡饲料基础上加2%胆固醇,该剂量持续8 wk末,之后停用胆固醇,用平衡饲料再继续观察8 wk(共16 wk);对照组给予普通平衡饲料喂养16 wk。于2、4、8、12、16 wk末分别处死模型组家兔各5只及对照组家兔各3只。经ip麻醉后,经心脏灌流固定,从肝右叶中部切取肝组织,40 g/L甲醛溶液固定,制备光镜标本。

1.2 方法

1.2.1 肝脏组织病理学检测: HE染色及VG苦味酸染色, VG苦味酸染色结果用病理图像分析仪(北京微电子所PJ2000型)分析,测定胶原纤维面

积百分比。每张切片选取四周及中央5个区域,均取该区域中胶原纤维含量最多的视野(每个视野至少包括1个中央静脉),10倍物镜下测定胶原纤维面积百分比(胶原纤维面积/肝组织面积 $\times 100\%$),取平均值。另取肝组织,25 mg/L戊二醛溶液固定后,制备电镜标本。

1.2.2 层粘连蛋白免疫组织化学染色: 按免疫组化ABC法染色。兔抗人层粘连蛋白多克隆抗体ABC试剂盒及DAB显色试剂均购自武汉博士德公司。免疫组化染色结果用病理图像分析仪分析,以细胞膜/细胞质中有棕黄色颗粒或线状沉积为阳性,测定阳性反应面积比,每张切片选取四周及中央5个区域,均取该区域中阳性反应最多的视野,10倍物镜下测定阳性反应面积比(阳性面积/肝组织面积 $\times 100\%$),取平均值。

1.2.3 血浆透明质酸测定: 于2、4、8 wk末和停药后4、8 wk末分别对模型组家兔各5只及对照组家兔各3只,耳缘静脉取血,分离血浆,按照上海海军医学研究所生产的放免测定试剂盒说明书测定HA的含量。

统计学处理 数据用mean \pm SD表示,模型组和对照组比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 家兔非酒精性脂肪肝纤维化模型的制备情况 对照组HE染色可见正常中央静脉及放射状排列的肝板。VG苦味酸染色可见中央静脉及汇管区有极少量的胶原纤维。模型组2 wk末, HE染色可见肝细胞轻度脂肪变性及点状坏死, VG苦味酸染色较对照组轻度增加。4 wk末, 模型组HE染色可见肝细胞中重度脂肪变性, 炎性细胞浸润加重, VG苦味酸染色较前稍增加。8 wk末模型组HE染色肝细胞坏死增多, 炎性细胞浸润成团, VG苦味酸染色终末静脉(包括中央静脉)增厚, 胶原纤维向窦周隙延伸, 窦周纤维组织较前增加(图1)。停止造模4 wk末HE染色肝细胞坏死及炎性细胞浸润明显减轻, 停止造模8 wk末可见肝细胞轻度脂肪变, VG苦味酸染色胶原纤维染色逐渐减弱, 但至16 wk末仍强于正常组。VG苦味酸染色病理图像分析结果可见模型组胶原纤维面积百分比明显高于对照组($P < 0.01$, 表1)。

2.2 电镜下肝窦内皮细胞的变化 对照组的LSEC扁平, 胞核及细胞器排列规则, 远侧胞质呈薄片状, 有许多窗孔, 内皮下缺乏基底膜(BM)(图2A)。模型组2 wk末, 部分肝窦内皮细胞远侧胞质窗孔

表 1 家兔肝组织胶原纤维及LN面积比和HA的变化

指标	分组	t/wk				
		2	4	8	12	16
胶原纤维面积比	对照组	4.5±0.2	4.6±0.6	4.8±0.5	4.7±0.4	4.3±0.8
	模型组	5.1±0.3	12.5±0.8 ^a	18.5±0.9 ^{ad}	11.1±0.7 ^a	6.2±0.3 ^a
LN面积比	对照组	4.4±0.1	4.8±0.5	5.1±0.7	5.1±0.6	4.9±0.7
	模型组	5.3±0.2	17.7±0.8 ^a	25.2±1.0 ^{ad}	15.3±0.5 ^a	9.8±1.7 ^a
血清HA(μg/L)	对照组	1191.3±12.9	1188.4±15.8	1189.3±13.1	1189.9±13.1	1189.9±13.6
	模型组	1211.5±21.3	1320.3±21.5 ^a	1422.18±20.9 ^{ad}	1280.4±21.1 ^a	1208.2±15.7

^a $P<0.05$ vs 前期; ^{ad} $P<0.01$ vs 对照组.

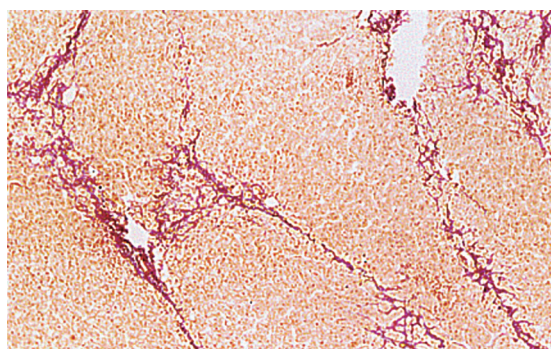


图 1 家兔肝纤维化模型组8 wk末(VG×100).

数减少, 内皮下尚未见基底膜形成; 4 wk末, 窗孔数减少或消失, 内皮下已开始有不完全的基底膜形成, 同时有功能活跃的纤维母细胞形成(图2B); 8 wk末进一步加重, 甚至可见完整的BM形成(图2C). 停止高脂饲料喂养12 wk末, 失窗孔及内皮下BM形成有所减轻, 内皮下基底膜成不连续状. 16 wk末, 失窗孔及内皮下BM形成明显减轻(图2D).

2.3 肝组织层粘连蛋白免疫组织化学染色 LN在正常家兔汇管区血管壁表达阳性, 肝窦壁没有层粘连蛋白表达(图3A), 以后随着肝纤维化程度的增加, 肝窦壁阳性着色增强而显著(图3B), 并沿肝窦呈连续着色. 8 wk末阳性最强(图3C), 停止造模后阳性逐渐减弱, 但至16 wk时仍强于正常组(图3D). 免疫组化病理图象分析结果见表1.

2.4 透明质酸含量的变化 模型组2 wk末, 家兔血清HA含量开始增高, 至8 wk末时达到高峰(与对照组比较 $P<0.01$), 停止造模后家兔血清透明质酸含量逐渐下降, 但停药8 wk时仍强于正常组(表1).

3 讨论

在肝纤维化的病理形成过程中, 绝大部分都经

过脂肪肝的阶段, 因此研究脂肪肝的形成和脂肪肝时的病理、各种病理生理的改变, 对防止肝纤维化的发生与发展具有重要的意义^[11-16]. 许多原因可引起脂肪肝, 其中长期和大量进食高脂肪、高胆固醇饮食为常见的原因. 我们用Buyssens的方法成功建立了实验性高胆固醇血症家兔脂肪肝伴小叶中心肝纤维化模型. 应用HE染色和VG苦味酸染色发现, 随造模时间的延长脂肪变性、点状坏死和炎性细胞浸润逐渐加重, 8 wk末炎性细胞浸润成团, 停药后逐渐好转; 纤维化的发生也有同样的趋势, 但停药后有所减轻并未迅速好转. 说明脂肪变性和炎性细胞浸润是一个急性过程, 较易恢复, 一旦发展到胶原的沉积, 恢复明显减慢. 该实验也再次提示重视脂肪肝的重要性^[16-17].

SEC是特殊化的毛细血管内皮细胞, 在肝窦形成无隔膜、无BM的窗孔(fenestrae), 这种窗孔结构有利于肝细胞和血液之间进行物质的交换, 在维持肝脏结构和实现各种功能中起着非常重要的作用^[18-21]. 各种原因导致的肝纤维化中均可见肝窦结构发生不同程度的改变, 即出现肝窦内皮细胞持续去窗孔和内皮下基底膜形成, 甚至形成肝窦毛细血管化. 肝窦毛细血管化是肝纤维化过程中的一个重要的病理改变, 肝窦内皮下基底膜形成是肝窦毛细血管化的一个重要特征^[22]. 该实验中电镜下超微结构观察, 正常的SEC扁平, 胞核及细胞器排列规则, 远侧胞质呈薄片状, 有许多窗孔, 内皮下缺乏基底膜. 高胆固醇喂养2 wk末, 可见部分SEC远侧胞质窗孔数减少, 但无基底膜形成; 4 wk末, 窗孔数减少或消失, 内皮下已开始有不完全的基底膜形成, 同时有功能活跃的纤维母细胞形成; 8 wk末进一步加重, 甚至可见完整的基底膜形成; 停止高脂饲料8 wk末, 失窗孔及内皮下基底膜形成明显减轻.

■创新盘点

家兔肝纤维化形成过程中, 肝窦壁功能性基底膜被破坏, 取而代之由于层粘连蛋白在肝组织中不断沉积, 并沿肝窦壁形成基底膜, 发生肝窦毛细血管化. 血清透明质酸含量的变化与电镜下肝窦内皮细胞去窗孔的改变, 以及层粘连蛋白的变化相一致, 提示层粘连蛋白及透明质酸在肝窦毛细血管化及肝纤维化的发病机制中有着重要的作用.

■应用要点

本研究为非酒精性脂肪肝病纤维化的发病机制提供了基础,对逆转肝纤维化有重要的临床意义。

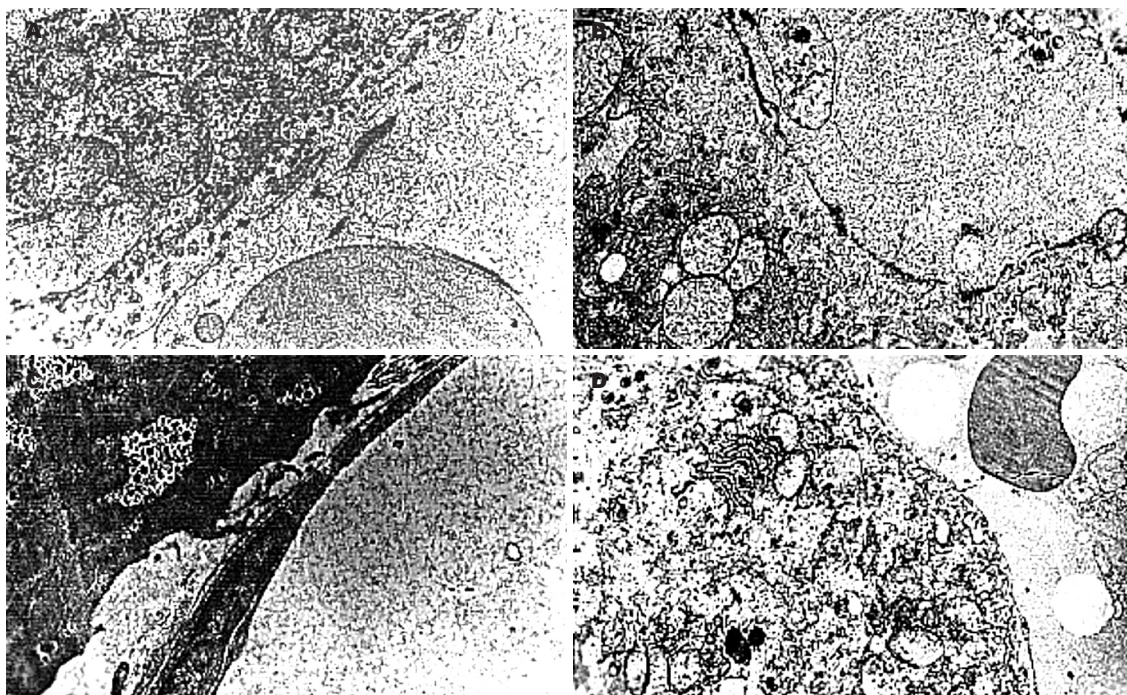


图 2 家兔肝纤维化电镜(TEM × 10 000). A: 对照组; B: 模型组4 wk末; C: 模型组8 wk末; D: 模型组停药8 wk.

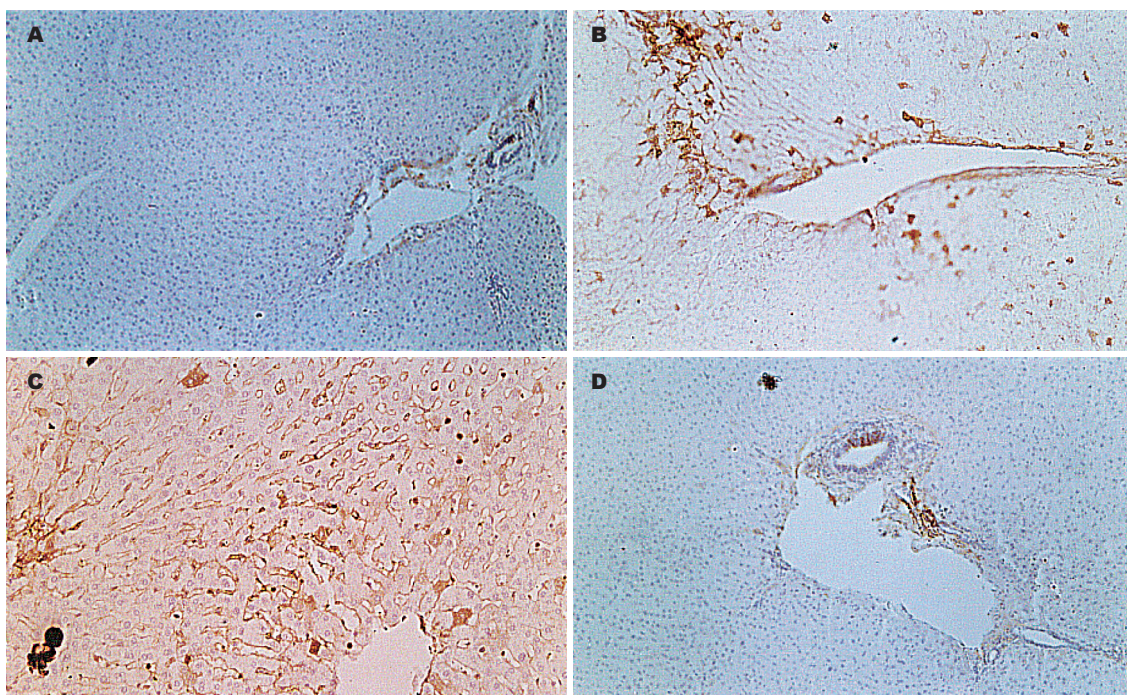


图 3 家兔肝纤维化LN表达(SABC × 200). A: 对照组; B: 模型组4 wk末; C: 模型组8 wk末; D: 模型组停药8 wk末.

结果提示在脂肪肝形成过程中就伴随着SEC的去窗孔化和基底膜的形成,后者是肝纤维化形成的基础。

有研究表明,一些物质可调节肝窦内皮细胞的窗孔和肝窦毛细血管化,其中层粘连蛋白(laminin, LN)较最为重要^[23-27]. LN为分子质量较大的糖蛋白,能与IV型胶原、非胶原性糖及硫酸

酸肝素等多种基质成分交联,并能自身交联,在基底膜形成过程中起重要作用. 据报道, LN在正常肝窦几乎不表达,而在慢性肝炎碎片状坏死灶和肝硬变纤维间隔附近的肝窦明显表达,肝硬化再生结节中的肝窦表达也增强^[28]. 本实验中可见,正常肝窦无LN分布;随着造模时间的延长,肝窦壁着色逐渐增强,停止造模后逐渐减弱,

纤维化各期窦周LN着色阳性面积比差异有显著性($P<0.01$)。LN的变化与电镜下的基底膜变化相一致, 表明LN可作为肝窦毛细血管化基底膜形成的一个重要标志。

肝损伤过程中HA的浓度升高被认为与星状细胞合成和分泌增多, 以及SEC摄取和降解功能减退有关。有学者认为他是反映SEC表型发生改变标志^[29]。本实验过程中, 血清HA含量的变化与电镜下SEC去窗孔化的改变, 以及组织学中LN的变化相一致, 提示HA浓度的变化可能间接地反映肝窦毛细血管化的强弱。我们观察到LN及HA在非酒精性脂肪肝家兔肝纤维化形成过程中的变化, 为非酒精性脂肪肝纤维化的发病机制提供了基础, 但LN如何诱导整合素的表达还有待深入研究。

4 参考文献

- 1 Tamaki S, Ueno T, Torimura T, Sata M, Tanikawa K. Evaluation of hyaluronic acid binding ability of hepatic sinusoidal endothelial cells in rats with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1996; 111: 1049-1057
- 2 Cogger VC, Warren A, Fraser R, Ngu M, McLean AJ, Le Couteur DG. Hepatic sinusoidal pseudocapillarization with aging in the non-human primate. *Exp Gerontol* 2003; 38: 1101-1107
- 3 Xu GF, Wang XY, Ge GL, Li PT, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes of capillarization and peri-sinusoid fibrosis in alcoholic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 238-243
- 4 Xu B, Broome U, Uzunel M, Nava S, Ge X, Kumagai-Braesch M, Hultenby K, Christensson B, Ericzon BG, Holgersson J, Sumitran-Holgersson S. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. *Am J Pathol* 2003; 163: 1275-1289
- 5 Lu X, Liu P, Liu C, Xu G, Wang X, Chen W, Li F. Role of hepatic sinusoidal endothelium injury in hepatic fibrogenesis induced by dimethylnitrosamine in rats. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2002; 10: 441-444
- 6 Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C, Dioguardi N, Grizzi F. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2248-2256
- 7 Wang BY, Ju XH, Fu BY, Zhang J, Cao YX. Effects of ethanol on liver sinusoidal endothelial cells-fenestrae of rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 422-426
- 8 Maru Y, Hirose H, Shibuya M. An oncogenic form of the Flt-1 kinase has a tubulogenic potential in a sinusoidal endothelial cell line. *Eur J Cell Biol* 2000; 79: 130-143
- 9 Neubauer K, Kruger M, Quondamatteo F, Knittel T, Saile B, Ramadori G. Transforming growth factor-beta1 stimulates the synthesis of basement membrane proteins laminin, collagen type IV and entactin in rat liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 1999; 31: 692-702
- 10 Buysens N, Kockx MM, Herman AG, Lazou JM, Van den Berg K, Wisse E, Geerts A. Centrolobular liver fibrosis in the hypercholesterolemic rabbit. *Hepatology* 1996; 24: 939-946
- 11 Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 638-644
- 12 Martinez-Hernandez A, Martinez J. The role of capillarization in hepatic failure: studies in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14: 864-874
- 13 Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev* 2004; 5: 27-42
- 14 Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34: 9-19
- 15 Saadeh S. Nonalcoholic Fatty liver disease and obesity. *Nutr Clin Pract* 2007; 22: 1-10
- 16 Leclercq IA. Pathogenesis of steatohepatitis: insights from the study of animal models. *Acta Gastroenterol Belg* 2007; 70: 25-31
- 17 Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 663-678
- 18 Nakamura S, Muro H, Suzuki S, Sakaguchi T, Konno H, Baba S, Syed AS. Immunohistochemical studies on endothelial cell phenotype in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997; 26: 407-415
- 19 Luna G, Paez J, Cardier JE. Expression of the hematopoietic stem cell antigen Sca-1 (LY-6A/E) in liver sinusoidal endothelial cells: possible function of Sca-1 in endothelial cells. *Stem Cells Dev* 2004; 13: 528-535
- 20 Alonso CR, George J, Pesce CG, Bissell DM, Kornbliht AR. Fibronectin transcription in liver cells: promoter occupation and function in sinusoidal endothelial cells and hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295: 1077-1084
- 21 Deaciuc IV, Bagby GJ, Niesman MR, Skrepnik N, Spitzer JJ. Modulation of hepatic sinusoidal endothelial cell function by Kupffer cells: an example of intercellular communication in the liver. *Hepatology* 1994; 19: 464-470
- 22 Lu X, Liu P, Xu GF, Liu CH, Li FH, Liu C. The role of hepatic sinusoid capillarization during the formation of portal hypertension in fibrotic rats induced by dimethylnitrosamine. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 595-598
- 23 Matsumoto S, Yamamoto K, Nagano T, Okamoto R, Ibuki N, Tagashira M, Tsuji T. Immunohistochemical study on phenotypical changes of hepatocytes in liver disease with reference to extracellular matrix composition. *Liver* 1999; 19: 32-38
- 24 Yao L, Yao ZM, Yu T. Influence of BOL on hyaluronic acid, laminin and hyperplasia in hepatofibrotic rats. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 872-875
- 25 Drakes ML, Lu L, McKenna HJ, Thomson AW. The influence of collagen, fibronectin, and laminin on the maturation of dendritic cell progenitors propagated from normal or Flt3-ligand-treated mouse liver. *Adv Exp Med Biol*

■名词解释

肝窦毛细血管化: 各种原因导致的肝纤维化中可见肝窦结构发生不同程度的改变, 即出现肝窦内皮细胞持续去窗孔和内皮下基底膜形成。

■同行评价

本文实验设计合理,内容新颖,方法先进,所得结果可靠,图片资料可信,文献引用得当,讨论具体客观,是一篇较好的论著。

- 1997; 417: 115-120
- 26 Straub AC, Stolz DB, Ross MA, Hernández-Zavala A, Soucy NV, Klei LR, Barchowsky A. Arsenic stimulates sinusoidal endothelial cell capillarization and vessel remodeling in mouse liver. *Hepatology* 2007; 45: 205-212
- 27 Leite AR, Corrêa-Giannella ML, Dagli ML, Fortes MA, Vegas VM, Giannella-Neto D. Fibronectin and laminin induce expression of islet cell markers in hepatic oval cells in culture. *Cell Tissue Res* 2007; 327: 529-537
- 28 Nakayama Y, Takahara T, Miyabayashi CR, Itoh H, Watanabe A, Sasaki H, Muragaki Y, Ooshima A, Inoue K. Ultrastructural localization of type IV collagen and laminin in the Disse space of rat liver with carbon tetrachloride induced fibrosis. *Liver* 1991; 11: 260-271
- 29 Nanji AA, Tahan SR, Khwaja S, Yacoub LK, Sadrzadeh SM. Elevated plasma levels of hyaluronic acid indicate endothelial cell dysfunction in the initial stages of alcoholic liver disease in the rat. *J Hepatol* 1996; 24: 368-374

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表,同时保护作者与《世界华人消化杂志》的合法权益,本刊对修回稿要求如下。

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表,所有作者均符合作者条件,所有作者均同意该文代表其真实研究成果,保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系,修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信,保证无泄密,如果是几个单位合作的论文,则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部。

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回的,作重新投稿处理。

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期);起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布;作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(常务副总编辑:张海宁 2008-03-18)

肝癌差异表达基因EEG1的克隆和鉴定

黄春玲, 王效民, 张忠英, 邱兴峰, 刘平果, 李岗山, 彭友源

黄春玲, 张忠英, 厦门大学附属中山医院临床检验中心 福建省厦门市 361004

王效民, 邱兴峰, 刘平果, 李岗山, 彭友源, 厦门大学附属中山医院肝胆外科 福建省厦门市 361004

黄春玲, 1999年福建医科大学本科毕业, 2002年福建医科大学临床检验诊断学硕士, 主管技师, 主要从事分子诊断学的研究工作。

作者贡献分布: 此课题由黄春玲, 王效民, 张忠英设计; 研究过程由黄春玲, 王效民, 张忠英, 邱兴峰, 刘平果, 李岗山及彭友源操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王效民提供; 数据分析由黄春玲, 张忠英完成; 本论文写作由黄春玲, 王效民, 张忠英完成。

通讯作者: 王效民, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201-209号, 厦门大学附属中山医院肝胆外科. wxm@xmzsh.com
电话: 0592-2292203 传真: 0592-2212328

收稿日期: 2006-05-20 修回日期: 2008-01-20

Cloning and identification of human hepatocellular carcinoma-related genes

Chun-Ling Huang, Xiao-Min Wang, Zhong-Ying Zhang, Xin-Feng Qiu, Ping-Guo Liu, Gang-Shan Li, You-Yuan Peng

Chun-Ling Huang, Zhong-Ying Zhang, Xiamen Center for Clinic Laboratory, Xiamen Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Xiao-Min Wang, Xin-Feng Qiu, Ping-Guo Liu, Gang-Shan Li, You-Yuan Peng, Department of Xiamen Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Correspondence to: Professor Xiao-Min Wang, Xiamen Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, 201-209 Hubin Southern Road, Xiamen 361004, Fujian Province, China. wxm@xmzsh.com

Received: 2006-05-20 Revised: 2008-01-20

Abstract

AIM: To clone and identify the differentially expressed gene fragments in hepatocellular carcinoma (HCC) and normal liver tissues and to explore the molecular pathogenesis of HCC.

METHODS: Fluorescent mRNA differential display (mRNA-DD) was used to compare the differential gene expression in HCC and normal liver tissue samples. The obtained gene fragments were cloned and sequenced. The sequences were submitted to the GenBank for homologue analysis using BLAST software. RT-PCR was performed to detect the expression of each differential gene fragment in HCC and normal tissue samples.

RESULTS: Gel imaging scan revealed a 500-600 bp differential gene fragment. The sequence of this gene fragment was compared with that in GenBank, showing that this gene fragment was homologous to EEG1 (99%). RT-PCR demonstrated that the expression of this gene fragment was significantly lower in HCC tissue samples than in normal tissue samples ($P = 0.001$).

CONCLUSION: EEG1 gene expression is much lower in HCC tissue than in normal tissue. Its down-regulated expression in HCC tissues is probably related to the carcinogenesis of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; mRNA differential display; Gene cloning

Huang CL, Wang XM, Zhang ZY, Qiu XF, Liu PG, Li GS, Peng YY. Cloning and identification of human hepatocellular carcinoma-related genes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 829-832

摘要

目的: 筛选和克隆肝癌和正常肝组织差异表达的基因片段, 以探讨肝癌的发病机制。

方法: 应用mRNA差异显示技术(mRNA-DD), 比较肝癌及正常肝组织基因表达的差异, 对获得的差异基因片段进行克隆、测序, 测序结果提交GenBank数据库中进行同源性分析, 并对其中一条有明显差异的基因用半定量RT-PCR分析该基因在正常肝组织及肝癌组织中的表达情况。

结果: 凝胶扫描显示在500-600 bp处有一条差异片段, 差异条带经酶切图谱分析证实重组质粒是目的克隆, 将片段测序结果与GenBank数据库进行同源性比较发现该片段与已知基因EEG1高度同源(99%)。RT-PCR结果显示在肝癌组织中EEG1 mRNA的表达水平明显低于正常肝组织($P = 0.001$)。

结论: EEG1基因在肝癌组织中的表达明显低于正常肝组织, 提示EEG1基因的表达下调可能与肝癌的发病有关。

■背景资料

原发性肝细胞癌(简称肝癌)是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一, 尤其近年来在我国肝癌年死亡率已上升为恶性肿瘤的第二位, 发病机制迄今未完全阐明, 治疗棘手, 研究肝癌患者的癌组织和癌旁正常肝组织的基因表达差异, 筛选和克隆肝癌发生、发展相关的基因, 旨在为探讨肝癌的分子发病机制提供理论依据。

■同行评议者

党双锁, 副教授, 西安交通大学第二医院感染科; 杨冬华, 教授, 暨南大学附属第一医院

■创新盘点

本文利用差异显示技术研究发现差异表达基因EEG1, 其在肝癌组织中的表达明显低于正常肝组织, 该基因的表达下调可能与肝癌的发病密切相关。

关键词: 肝癌; mRNA差异显示; 基因克隆

黄春玲, 王效民, 张忠英, 邱兴峰, 刘平果, 李岗山, 彭友源. 肝癌差异表达基因EEG1的克隆和鉴定. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 829-832

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/829.asp>

0 引言

原发性肝细胞癌(简称肝癌)是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一, 全世界每年新发肝癌约26万例, 其中42.5%分布在中国. 20世纪以来, 我国肝癌年死亡率已上升为恶性肿瘤的第二位, 在城市仅次于肺癌, 在农村仅次于胃癌^[1]. 肝癌起病隐匿, 进展迅速, 生存质量差, 生存期短. 为此, 对其发生发展机制的研究成为当前的迫切要求, 随着分子生物学、细胞生物学、分子遗传学和人类基因组学等学科的飞速发展, 人们研究发现肝癌的发生是多因素、多阶段、多基因相互作用的结果. 目前已经发现与人类肝癌的发生有关的基因有: c-erbB-2^[2], IGF-II^[3], p53^[4], c-myc^[5], TGF α ^[6], N-ras^[7]等, 但仍有许多与肝癌发生发展有关的基因有待进一步确定.

近年来发展了多种筛选差异表达基因的方法, 包括差异显示PCR(differential display)^[8], 消减杂交(subtraction hybridization)^[9], RDA(representational difference analysis)^[10], 基因芯片(microarray)^[11]等, 各有其优缺点. 我们利用新近发展起来的荧光标记的差异显示技术对肝癌患者的癌组织和癌旁正常肝组织的基因差异表达进行研究, 以期分离到与肝癌发生发展相关的基因.

1 材料和方法

1.1 材料 外科经手术切除并经病理学确诊的15例肝癌及癌旁正常肝组织标本, 所有病例术前均未接受化学药物的治疗: 男11例, 女4例, 平均年龄45.1岁. 于距肿瘤边缘5 cm外及肿瘤处分别取组织块, 组织离体后立即放入液氮中速冻, 并置于-70℃冰箱中保存. TRIzol购自Invitrogen公司, FluoroDD试剂盒购自Genomex公司, pGEM T-easy试剂盒、Taq DNA聚合酶、DNA回收试剂盒、质粒DNA纯化系统和EcoR I酶均购自Promega公司, PCR引物由上海博亚公司合成, DH5 α 菌株由厦门大学抗癌中心惠赠. Genomex LR DNA差异显示系统、Genomex SC荧光图像扫描系统、Mastercycler梯度PCR仪、DU650紫外分光光度计及UVI凝胶成像系统.

1.2 方法 参照TRIzol试剂盒说明书提取组织的总RNA, DNase I 清除总RNA中的DNA, 紫外分光光度计测定其浓度及纯度, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量. 应用Hieroglyph mRNA Profile kit试剂盒进行第一链合成. 选择引物T7(dT12)AP2、T7(dT12)AP7为第一链合成的锚定引物, 各以总RNA 1 μ g为模板, 合成cDNA. 反应体系包括1 \times SuperScript II RT缓冲液, dNTP各25 μ mol/L, DTT 10 mmol/L及3 U SuperScript II RT反转录酶, 25℃孵育5 min, 42℃ 10 min, 50℃ 60 min, 72℃ 15 min, 至-20℃保存待用. 应用FluoroDD Kit试剂盒进行DDRT-PCR扩增: 分别以1.5 μ L反转录产物为模板, 体系其中包括1 \times PCR缓冲液II, 3.75 mmol/L MgCl₂, dNTP各50 μ mol/L, 与反转录所用锚定引物相对应的TMR荧光标记的3'端TMR-AP引物0.35 μ mol/L, 5'端随机引物ARP 0.35 μ mol/L, 及AmpliTaq DNA聚合酶0.5 U, 每一反应总体积为10 μ L. 程序设定如下: 95℃预变性2 min, 94℃变性15 s, 50℃复性30 s, 72℃延伸2 min共4个循环, 94℃变性15 s, 60℃复性30 s, 72℃延伸2 min共25个循环, 72℃延伸7 min. PCR产物在Genomex LR电泳仪上样, 在56 g/L聚丙烯酰胺凝胶上以电压3000 V、功率100 W、温度52℃的条件电泳4.5 h. 电泳结束后, 将凝胶在荧光图像扫描仪Genomex SC上扫描. 用手术刀切取含有明显差异的cDNA条带, 加入TE缓冲液50 μ L, 37℃水浴1 h, 使DNA从胶中溶到TE缓冲液中, 以T7 22-mer(5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3')和M13 24-mer(5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3')为引物进行再扩增. 扩增条件同第一次PCR. 按凝胶回收试剂盒说明书将扩增产物回收、纯化. 纯化后的片段与pGEM T-Easy载体进行连接反应, 连接产物转化DH5 α 感受态细胞, 通过 α 互补实验鉴定阳性克隆, 提取质粒后进行EcoR I酶切鉴定. 将提取的阳性克隆质粒DNA纯化及测序(上海博亚公司). 应用BLAST程序将所得到的测序结果与GenBank数据库进行同源性比较. 对感兴趣的片段进行RT-PCR检测, 按序列分析结果设计引物, 上游引物为5'-AAAGCCCAGGATGAGAGGTT-3', 下游引物为5'-ACTGCCGAGGAAGAG TCAAA-3', 扩增产物为326 bp. 以 β -actin作内部参照物, 上游引物为5'-CCCTGGACTTCGAGCAAGAGAT-3', 下游引物为5'-GTTTCTGCGC AAGTTAGG-3'. PCR过程同时设立阴阳对照, 取PCR产物10 μ L进行

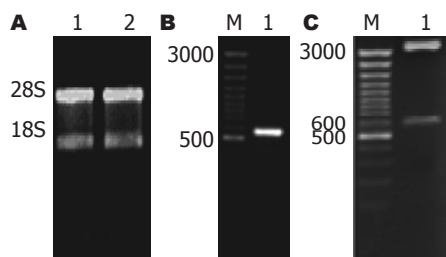


图1 差异条带EEG1基因的鉴定. A: 总RNA的电泳结果. 1: 正常肝组织; 2: 肝癌组织; B: 差异条带的PCR再扩增产物电泳图. M: DNA Marker; 1: EEG1再扩增产物; C: 质粒EEG1 *EcoR* I 酶切结果. M: DNA Marker; 1: 质粒EEG1 *EcoR* I 酶切后产物.

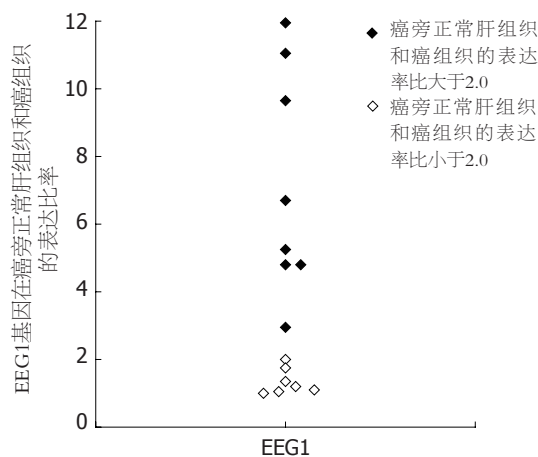


图2 EEG1基因在癌旁正常肝组织与癌组织中的表达率比.

10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察电泳带, 凝胶成像分析系统(UVI)扫描拍照, 并测定电泳带的密度值, 计算目的片段电泳带密度与 β -actin电泳带密度的相对值以衡量目的基因的相对表达水平.

统计学处理 利用SPSS11.0软件包采用非参数检验、配对样本的秩和检验对数据进行分析.

2 结果

提取的总RNA的纯度经紫外分光光度法检测, A_{260}/A_{280} 比值均在1.8-2.0之间, 电泳检测显示提取的RNA条带完整, 28S与18S的比值约为2.0 (图1A). 凝胶扫描显示每条泳道均有条带, 条带分布在300-1200 bp且条带清晰. 其中在500-600 bp处有一条差异片段, 在正常肝组织中的表达明显高于癌组织. 将获得的差异条带再次进行PCR扩增, 经琼脂糖凝胶电泳可见明亮清晰的单一条带(图1B).

EcoR I 酶切重组质粒, 得到一约580 bp的片段和约3000 bp的pGEM T-Easy载体, 酶切图谱分析证实重组质粒是目的克隆, 将片段测序结果

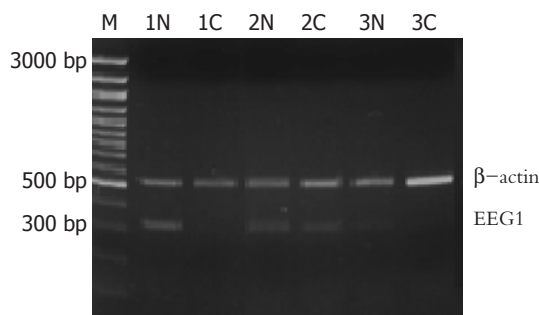


图3 EEG1基因RT-PCR的电泳图. M: DNA Marker; 1N, 2N, 3N: 3例正常肝组织; 1C, 2C, 3C: 相应3例的肝癌组织.

与GenBank数据库进行同源性比较发现该片段与基因EEG1有99%同源性(图1C). 将EEG1片段在肝癌中的表达状况进行RT-PCR证实后发现, 15例肝癌组织及正常肝组织中, EEG1在肝癌组织中的表达水平显著低于正常肝组织($P = 0.001$, 图2-3).

3 讨论

mRNA差异显示技术是1992年Liang *et al*^[12]摸索出的用于筛选差异表达基因的一种有效的方法, 经过不断的改进^[13-14], 目前这一技术已十分成熟. 他仅需少量的总RNA, 因此所需的组织标本量少, 并且具有简便、灵敏、实验周期短、效率高、可同时比较多种不同生理状态或不同发育阶段的细胞内基因表达差异等优点. 目前该技术已用于多种肿瘤的研究, 是进行分子生物学的常用方法. mRNA差异显示技术可以检测出不同生理、病理状态下基因表达的变化, 能有效地筛选肿瘤恶性转化进程中差异表达的基因^[15]. 1998年Scuric *et al*^[16]应用mRNA差异显示(DDPCR)技术分析肝癌组织和癌旁正常组织间基因的差异表达情况, 发现其中一个基因在肝癌组织中的表达明显高于正常肝组织, 同源性分析表明该基因与醛化还原酶家族有高度的同源性. 王征旭 *et al*^[17]用差异显示法克隆和鉴定了一个肝癌高表达的新基因SWT-2, 研究发现该基因的高表达可能与肝癌细胞的浸润和转移能力有关. Zeng *et al*^[18]用差异显示法分离鉴别了一个在肝癌组织中有很强的表达, 而在癌旁肝组织表达较弱或不表达的新基因HCCA1, 结合临床及病理学的分析表明, HCCA1与HBV或HCV感染、AFP水平及有无肝硬化无关, 而与肝癌的分级、门静脉癌栓形成与否有关.

尽管目前已有不少关于肝癌差异基因的报道, 但由于肝癌的发生是一个多基因参与, 通过

■应用要点

本实验结果提示 EEG1在肝癌组织中的表达下调可能与肝癌的发病有关, 虽然目前该工作还处于探索阶段, 但在不久的将来有可能作为肝癌早期诊断的辅助手段而应用于临床.

■名词解释

mRNA差异显示技术:可同时对多个基因进行分析比较的灵敏、简便的方法,其基本原理是利用一套带有poly(T)的锚定引物和一套随机引物的组合来覆盖所有的mRNA家族,进行反转录和PCR扩增以获得不同长度的cDNA片段,通过测序胶电泳将大小不同的cDNA片段分离以进行比较。

不同基因在不同时相的差异表达进行调控的复杂过程^[19]。加强对肝癌相关基因的研究,必将会加深我们对肝癌本质的认识,同时能为肝癌早期诊断提供新的分子诊断标记,为肝癌的基因治疗提供新的可能的靶点。为此我们应用mRNA差异显示技术研究肝癌及其相应的正常肝组织差异表达的基因,以期从中筛选出与肝癌发病有关的基因。我们通过对其中一条差异明显的条带进行克隆,测序后进行同源性分析发现该序列与已知基因EEG1(embryonic epithelia gene 1)有99%同源性。EEG1又名SLC43A3(solute carrier family 43, member 3)属于膜转运蛋白超家族^[20]。EEG1基因是Stuart *et al*^[21]在研究与肾生长发育有关的基因时发现的,由于该基因在胚胎上皮组织中高度表达,因此将其命名为“胚胎上皮基因”(EEG1)。EEG1位于人11号染色体上,由14个外显子组成,全长共20 kb。研究发现,EEG1在早期的胚胎中高表达,随着胚胎的发育表达量逐渐下降,而在成人组织中,其在成人心脏的表达量最大,其次是肺、肝、脾和肾。研究还发现EEG1可编码一种具有膜转运功能的蛋白,该蛋白可能与胚胎生长发育过程中的营养及代谢物的转运有关。其具体功能目前尚不十分清楚,关于该基因在肝癌组织中的表达情况也尚未见到报道。我们的研究发现EEG1基因在正常肝组织中的表达量较高,其在肝癌组织中的表达明显低于正常肝组织($P = 0.001$),并通过RT-PCR的验证。该研究结果提示EEG1在肝癌组织中的表达下调可能与肝癌的发病有关,该基因的变化可能是肝癌众多发病因素中的某个环节或是病变的结果,其与肝癌的关系有待进一步的分析。

4 参考文献

- 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
- Niu ZS, Wang M. Expression of c-erbB-2 and glutathione S-transferase-pi in hepatocellular carcinoma and its adjacent tissue. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4404-4408
- Tsai JF, Jeng JE, Chuang LY, You HL, Wang LY, Hsieh MY, Chen SC, Chuang WL, Lin ZY, Yu ML, Dai CY. Serum insulin-like growth factor-II as a serologic marker of small hepatocellular carcinoma. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 68-75
- Sung CO, Yoo BC, Koh KC, Cho JW, Park CK. Prognostic significance of p53 overexpression after hepatic resection of hepatocellular carcinoma. *Korean J Gastroenterol* 2005; 45: 425-430
- Ikeguchi M, Hirooka Y. Expression of c-myc mRNA in hepatocellular carcinomas, noncancerous livers,

- and normal livers. *Pathobiology* 2004; 71: 281-286
- Chung YH, Kim JA, Song BC, Lee GC, Koh MS, Lee YS, Lee SG, Suh DJ. Expression of transforming growth factor-alpha mRNA in livers of patients with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 977-982
- Kim YC, Song KS, Yoon G, Nam MJ, Ryu WS. Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis. *Oncogene* 2001; 20: 16-23
- Kim DG. Differentially expressed genes associated with hepatitis B virus HBx and MHBs protein function in hepatocellular carcinoma. *Methods Mol Biol* 2006; 317: 141-155
- Dong XY, Pang XW, Yu ST, Su YR, Wang HC, Yin YH, Wang YD, Chen WF. Identification of genes differentially expressed in human hepatocellular carcinoma by a modified suppression subtractive hybridization method. *Int J Cancer* 2004; 112: 239-248
- Huang R, Xing Z, Luan Z, Wu T, Wu X, Hu G. A specific splicing variant of SVH, a novel human armadillo repeat protein, is up-regulated in hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 2003; 63: 3775-3782
- Cheung ST, Leung KL, Ip YC, Chen X, Fong DY, Ng IO, Fan ST, So S. Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 551-556
- Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; 257: 967-971
- Lohmann J, Schickle H, Bosch TC. REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Biotechniques* 1995; 18: 200-202
- 郝纯毅, 赵敏, 李勇, 邢宝才, 吕有勇, 黄信孚. 降低mRNA差异显示技术假阳性率的一种方法. 中国生物化学与分子生物学报 2002; 18: 110-114
- Chung JG, Yeh KT, Wu SL, Hsu NY, Chen GW, Yeh YW, Ho HC. Novel transmembrane GTPase of non-small cell lung cancer identified by mRNA differential display. *Cancer Res* 2001; 61: 8873-8879
- Scuric Z, Stain SC, Anderson WF, Hwang JJ. New member of aldose reductase family proteins overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 27: 943-950
- 王征旭, 王红阳, 吴孟超. 一个新的人类肝癌相关基因的克隆和表达. 中华外科杂志 2001; 39: 185-187
- Zeng JZ, Wang HY, Chen ZJ, Ullrich A, Wu MC. Molecular cloning and characterization of a novel gene which is highly expressed in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2002; 21: 4932-4943
- Wang XW, Hussain SP, Huo TL, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechot C, Harris CC. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002; 181-182: 43-47
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Physiol Rev* 2004; 84: 465-468
- Stuart RO, Pavlova A, Beier D, Li Z, Krijanovski Y, Nigam SK. EEG1, a putative transporter expressed during epithelial organogenesis: comparison with embryonic transporter expression during nephrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F1148-F1156

■同行评价

本文方法先进, 图表清晰, 结果可信。

不同潮气量机械通气对失血性及内毒素休克复苏早期兔小肠病理的影响

刘菲, 张海英, 刘志

刘菲, 张海英, 刘志, 中国医科大学附属第一医院急诊科 辽宁省沈阳市 110001

刘菲, 博士, 主治医师, 讲师, 主要从事危重病、多器官功能障碍研究。

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 20062092

作者贡献分布: 此课题由刘志, 刘菲及张海英设计; 研究过程由刘菲及张海英操作完成; 数据分析及论文写作由刘菲完成。

通讯作者: 刘志, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院急诊科. liuzhicmu2004@yahoo.com.cn

电话: 024-83283055

收稿日期: 2007-10-22 修回日期: 2008-02-10

Effects of mechanical ventilation with different tidal volumes on small intestine injury of early resuscitated hemorrhagic and endotoxic shock rabbits

Fei Liu, Hai-Ying Zhang, Zhi Liu

Fei Liu, Hai-Ying Zhang, Zhi Liu, Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20062092

Correspondence to: Dr. Zhi Liu, Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. liuzhicmu2004@yahoo.com.cn

Received: 2007-10-22 Revised: 2008-02-10

Abstract

AIM: To study the characteristics of small intestine injury of early resuscitated hemorrhagic and endotoxic shock rabbits and the choice of tidal volume for mechanical ventilation.

METHODS: A resuscitation model of hemorrhagic and endotoxic shock rabbit was established. Rabbits were resuscitated by ventilation with a tidal volume of 4-6 mL/kg, 8-10 mL/kg and 12-15 mL/kg, respectively, for 2 hours according to their grouping. Blood gas, gastric pHi, histopathology and ultra-structure and cell apoptosis of small intestine were examined with TUNEL method.

RESULTS: The small intestine pathologic score

and apoptosis index (AI) of endotoxic shock rabbits were higher than those of hemorrhagic shock rabbits. Electron microscopy showed that the intercellular junction of endotoxic shock rabbits was more seriously injured. The pathologic score and AI of rabbits ventilated with a tidal volume of 12-15 mL/kg were much higher than those of rabbits ventilated with a tidal volume of 4-6 mL/kg and 8-10 mL/kg. Electron microscopy showed that the epithelial cilia of rabbits ventilated with a tidal volume of 12-15 mL/kg were more seriously injured. No statistical difference was found in pathologic score and AI of rabbits ventilated with a tidal volume of 4-6 mL/kg and 8-10 mL/kg. The gastric pHi was negatively related with the pathologic score of small intestine, but there was no statistic difference in gastric pHi among the rabbits.

CONCLUSION: Small intestine injury of early resuscitated hemorrhagic shock rabbits is more serious than that of endotoxic shock rabbits. Ventilation with a tidal volume higher than 8-10 mL/kg is not suitable for early resuscitation of hemorrhagic and endotoxic shock rabbits. Gastric pHi can show the degree of small intestine injury, but is not a sensitive index.

Key Words: Hemorrhagic shock; Endotoxic shock; Mechanical ventilation; Tidal volume; Small intestine

Liu F, Zhang HY, Liu Z. Effects of mechanical ventilation with different tidal volumes on small intestine injury of early resuscitated hemorrhagic and endotoxic shock rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 833-838

摘要

目的: 研究失血性和内毒素休克复苏早期小肠损伤的特点, 探讨机械通气潮气量的选择。

方法: 建立兔失血性和内毒素休克及复苏模型, 复苏同时给予4-6 mL/kg、8-10 mL/kg、12-15 mL/kg的潮气量机械通气2 h, 观察血气分析, 胃pHi, 小肠光镜、电镜病理及TUNEL

■背景资料

目前对机械通气的研究多以肺保护为研究侧重, 但已有学者提出应将“保护性”的概念从单纯的肺保护延伸到全身器官的保护。休克是临床常见的急危重症, 容易发展至MODS。小肠在MODS的发生和发展中起到重要作用, 机械通气常是休克治疗中不可缺少的措施之一。

■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系; 刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

■相关报道

Gurkan *et al* 研究发现机械通气治疗的ARDS患者多数不是死于ARDS本身, 而主要死于MODS; Imai的研究也显示损伤性机械通气可能引起肺外器官(肾和小肠)的损伤。

法检测凋亡。

结果: 内毒素休克小肠病理评分和凋亡指数(AI)高于失血性休克, 内镜下内毒素休克细胞间连接破坏较重, 两种休克大潮气量组小肠病理评分和AI都高于中小潮气量组, 内镜下大潮气量组小肠上皮细胞纤毛损伤加重, 两种休克中小潮气量组小肠病理评分和AI无统计学差异, 胃pHi和小肠病理评分负相关, 但各组胃pHi水平无统计学差异。

结论: 内毒素休克复苏早期小肠病理损伤比失血性休克重, 两种休克复苏早期均不适合采用高于8-10 mL/kg的潮气量机械通气。胃pHi虽然可以一定程度的反应小肠的损伤情况, 但不是反应小肠损伤程度的敏感指标。

关键词: 失血性休克; 内毒素休克; 机械通气; 潮气量; 小肠

刘菲, 张海英, 刘志. 不同潮气量机械通气对失血性及内毒素休克复苏早期兔小肠病理的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 833-838
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/833.asp>

0 引言

临床研究发现机械通气治疗的急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)患者多数不是死于ARDS本身, 而主要死于多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[1]. 目前对机械通气的研究多以肺保护为研究侧重, 但已有学者提出应将“保护性”的概念从单纯的肺保护延伸到全身器官的保护^[2], 目前国内外对于这种更广义的保护性机械通气的研究很少。

休克是临床常见的急危重症, 容易发展至MODS. 小肠在MODS的发生和发展中起到重要作用, 机械通气的常是休克治疗中不可缺少的措施之一. 本研究分别以失血性和内毒素休克为模型, 研究两种休克复苏早期小肠病理的特点及不同潮气量通气对其影响, 从小肠损伤角度探讨休克复苏早期机械通气的潮气量选择。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰白兔48只(中国医科大学实验动物部提供), 体质量2.5-3.2 kg, 雌雄不限, 按随机数字表法分为6组, 每组8只, I组: 失血性休克小潮气量(4-6 mL/kg)通气组; II组: 失血性休克中等潮气量(8-10 mL/kg)通气组; III组: 失血性休

克大潮气量(12-15 mL/kg)通气组; IV组: 内毒素性休克小潮气量通气组; V组: 内毒素性休克中等潮气量通气组; VI组: 内毒素性休克大潮气量通气组。

1.2 方法

1.2.1 模型制备: 兔称质量后经300 g/L乌拉坦3-4 mL/kg耳缘静脉注射麻醉, 仰卧位固定, 气管切开、插管, 颈内动静脉插管, 抽动脉血测血气, 要求入选条件pH7.30-7.40, PaO₂>80 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa), PaCO₂ 32-45 mmHg, 气管插管接呼吸机(Bear 1000/es), 吸入氧浓度(FiO₂)21%, 压力控制通气, 调节吸气压力使潮气量(Vt)8-10 mL/kg, 呼气末正压(PEEP) 0 cm H₂O. 经口下带硅胶囊胃管, 硅胶囊内注入生理盐水4 mL. 稳定0.5 h.

失血性休克及复苏模型: 兔经动脉快速放血使平均动脉压(MAP)38-42 mmHg维持1 h后给予静脉血液回输及生理盐水静脉滴注, 维持动脉收缩压(SBP)在90-100 mmHg.

内毒素休克及复苏模型: 内毒素(Sigma L-2880 From E.coli Serotype 055:B5)1 mg/kg静脉注射(速度0.1 mg/min), 使MBP 38-42 mmHg维持1 h后给予静脉滴射生理盐水及多巴胺, 维持SBP在90-100 mmHg.

1.2.2 指标测定: 休克时机机械通气FiO₂为21%, Vt为8-10 mL/kg, PEEP为0 cm H₂O(1 cm H₂O = 0.098 kPa). 复苏时FiO₂为40%, PEEP为0 cm H₂O, 呼吸40次/min, 按分组要求的潮气量机械通气2 h. 测定复苏及指定机械通气 = 2 h后血气分析指标(瑞士AVL公司AVL OMNI血气分析仪). 抽取胃硅胶囊内生理盐水, 用血气分析仪检测其PiCO₂. 根据公式计算pHi水平: $pHi = 6.1 + \lg[(HCO_3^-)/(0.03 \times PiCO_2)]$

1.2.3 病理学检查: 动物快速放血处死, 开腹取出Tris韧带下20 cm处小肠1 cm长一段. 将留取的小肠剪开, 用0-4℃生理盐水冲洗干净, 黏膜朝上在滤纸上展平, 剪成1 cm×1 cm两块, 分别用100 g/L甲醛和25 g/L戊二醛固定, 留作病理HE染色观察、细胞凋亡检测以及电镜分析用。

小肠HE染色病理切片400×光镜下观察, 小肠黏膜损伤程度参考Chiu评分法评分^[3]: 0分: 正常黏膜; 1分: 绒毛顶端上皮间隙增大; 2分: 上皮层和固有层中度分离; 3分: 绒毛两侧有大量分离伴有部分绒毛顶端破损; 4分: 绒毛破损伴有固有层毛细血管大量暴露; 5分: 固有层破坏、出血及溃疡. 每个动物观察10个视野, 评分

表 1 各组血流动力学指标及其比较($n=8$)

分组	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	MBP(mmHg)	脉压(mmHg)	HR(次/min)	补液mL/(kg·h)	多巴胺量mg/(kg·h)
I 组	94.88±3.00	54.38±4.44	67.88±3.41	40.50±4.50	195.13±21.64	29.63±4.37	15.63±13.39
II 组	97.25±3.62	56.25±7.91	69.92±6.08	41.00±6.37	199.88±20.00	28.25±3.96	3.38±9.55 ^a
III 组	93.88±6.13	55.38±9.52	68.21±7.82	38.50±7.27	190.50±17.58	31.00±4.44	6.63±12.29
IV 组	92.88±4.76	49.13±6.20	63.70±5.34	43.75±4.56	201.25±14.51	26.38±4.10	25.25±7.74
V 组	94.63±4.90	51.88±6.92	66.13±6.06	42.75±3.81	210.00±13.40	26.13±3.19	24.63±7.73 ^c
VI 组	93.13±4.42	52.13±6.81	65.79±4.73	41.00±8.23	205.38±28.01	27.25±3.96	26.25±7.09 ^e

^a $P<0.05$ vs I 组; ^c $P<0.05$ vs II 组; ^e $P<0.05$ vs III 组。

表 2 各组血气分析指标及PHi、小肠病理半定量评分和AI的比较($n=8$)

分组	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	PHi	小肠病理评分	小肠AI
I 组	6.72±0.08	111.30±20.08	67.00±17.67	8.38±1.92	7.03±0.14	22.38±5.15	3.99±0.41
II 组	6.90±0.16 ^a	155.86±30.83 ^a	39.58±10.62 ^a	7.50±2.08	7.05±0.11	20.75±5.18	3.54±0.60
III 组	6.95±0.08 ^a	193.41±38.37 ^{ac}	29.48±8.49 ^a	6.34±1.71 ^a	6.94±0.14	28.00±6.50 ^c	5.11±0.53 ^{ac}
IV 组	6.66±0.08	104.50±18.43	70.99±15.12	8.00±2.94	6.98±0.12	30.25±5.55 ^a	6.16±0.55 ^a
V 组	6.77±0.15	130.14±30.08	46.28±15.76 ^a	6.38±1.53	7.00±0.10	32.50±9.37 ^c	5.90±0.45 ^c
VI 组	6.95±0.09 ^{gi}	181.98±28.27 ^{gi}	29.20±9.25 ^{gi}	6.04±1.29	6.92±0.14	42.63±11.15 ^{gie}	7.93±0.55 ^{gie}

^a $P<0.05$ vs I 组; ^c $P<0.05$ vs II 组; ^e $P<0.05$ vs III 组; ^{ac} $P<0.05$ vs IV 组; ^{gi} $P<0.05$ vs V 组。

总和为小肠病理评分。

应用细胞凋亡原位检测试剂盒(Roche Cat No.1684817)检测小肠组织细胞凋亡(TUNEL法),计数5个高倍视野(400×)下细胞凋亡数,细胞凋亡指数(AI)以平均凋亡细胞数/100个细胞表示。

统计学处理 数据以mean±SD表示,应用SPSS11.5统计软件分析。相同休克的三组(I、II、III及IV、V、VI)均数间比较采用SNK法进行方差分析;相同潮气量的两组(I、IV和II、V和III、VI)均数间比较采用两独立样本 t 检验;相关性分析采用直线相关性分析。

2 结果

各组SBP、动脉舒张压(DBP)、MBP、心率(HR)、脉压及补液(生理盐水)量间无统计学差异。多巴胺用量内毒素休克多于失血性休克,内毒素休克的三组(IV、V、VI)多巴胺用量无统计学差异,失血性休克的三组(I、II、III)中, I 组多巴胺用量多于II组(表1)

血气分析指标显示: I、IV组都表现为明显的高碳酸血症, III、VI组表现为过度通气。相同潮气量的两种休克(I、IV, II、V和III、VI)组间血气分析指标无统计学差异(表2)。各组pHi

水平无统计学差异(表2)。小肠病理评分和AI内毒素休克高于失血性休克,失血性休克的三组III组高于I组和II组, I、II两组间无统计学差异;内毒素休克的三组VI组高于IV组和V组, IV、V两组间无统计学差异(表2)。

病理观察显示: (1)光镜下观察: 内毒素休克小肠病理损伤程度比失血性休克严重,大潮气量通气小肠病理损伤较重: I 组损伤相对较轻,小肠黏膜绒毛结构较完整,表现为轻中度的间质水肿和部分绒毛顶端破损。III组绒毛损伤加重,伴固有层毛细血管暴露。IV组绒毛破损,伴固有层大量毛细血管暴露; VI组损伤最重,绒毛破损严重,甚至失去绒毛结构,固有层破坏、出血和溃疡(图1); (2)电镜下观察: 内毒素休克细胞间连接破坏较重,大潮气量通气小肠上皮细胞纤毛损伤加重: I 组小肠上皮细胞纤毛致密,细胞间连接紧密(图2A), IV组上皮细胞纤毛较致密,多数细胞间连接增宽(图2B), III组小肠上皮细胞纤毛减少或消失,细胞间连接较紧密,部分线粒体溶解(图2C), VI组线粒体空泡变性,上皮细胞坏死,核溶解,完全失去正常的纤毛及细胞间连接结构(图2D)。

两种休克的小肠病理评分都和血气分析指标无直线相关性,两种休克的小肠病理评分都和

■创新盘点

本文探讨失血性和内毒素休克小肠损伤的特点以及不同潮气量通气各自的变化,并研究了对于不同休克以及不同潮气量通气下胃pHi的研究。

■应用要点

本研究有利于全面认识小肠在MODS的发生和发展中的作用,深入研究不同休克的病理特点,为这些高危人群应采用怎样的通气策略提出一个新的思维。

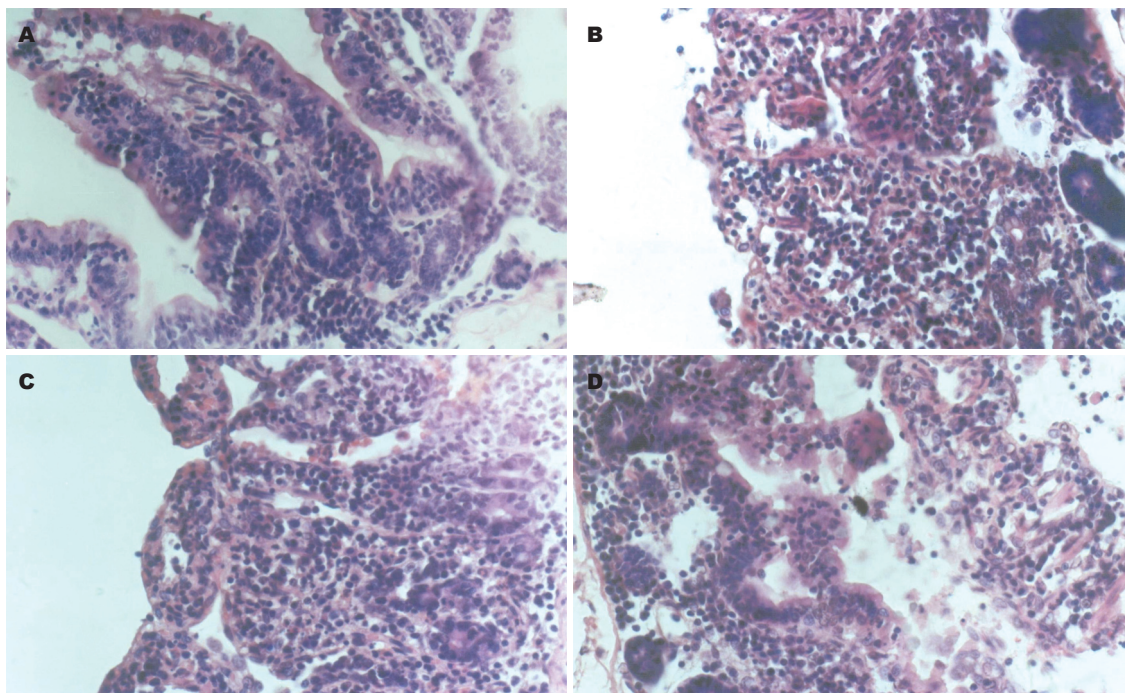


图1 小肠病理组织光镜图片(HE × 400). A: I组; B: IV组; C: III组; D: VI组.

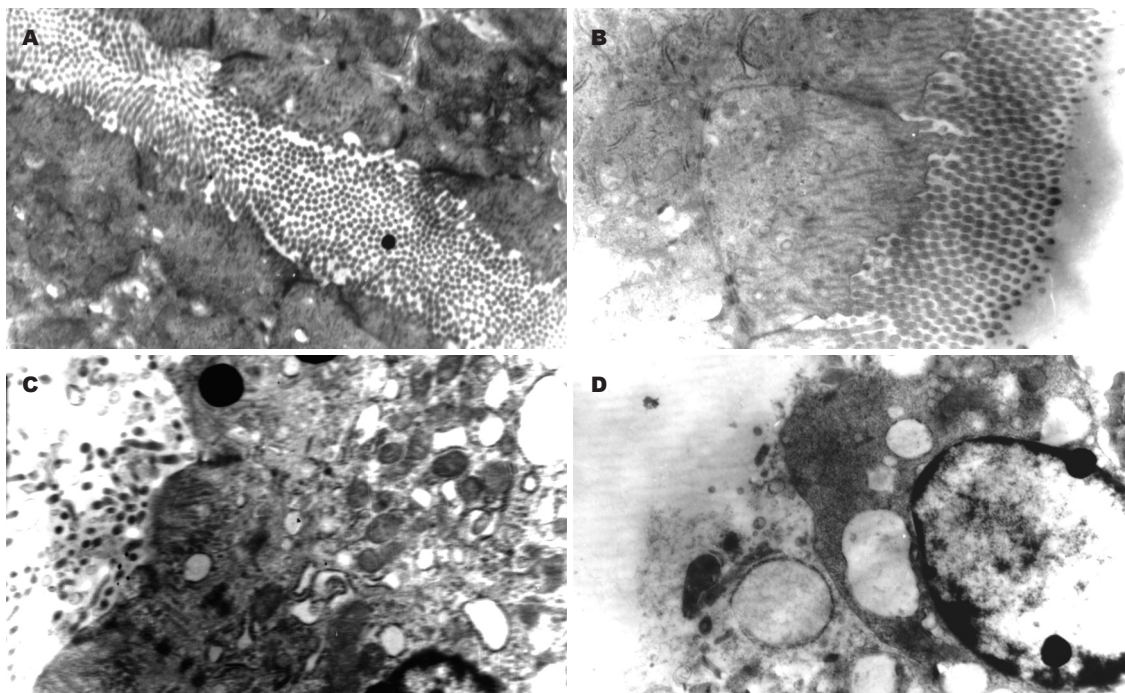


图2 小肠病理组织电镜图片(× 8000). A: I组; B: IV组; C: III组; D: VI组.

pHi水平负相关,和AI正相关(表3),两种休克pHi水平和血气分析指标无明显直线相关性(表4)。

3 讨论

临床危重病治疗中经常设法改善血气指标,改善血氧饱和度,提升血氧分压等。但本研究的结果却显示血气分析指标和小肠病理评分没有明显的相关性,不是氧分压越高,器官损伤越小。

ARDS network临床实验中保护性小潮气量通气患者的血氧分压低于大潮气量组,但预后却比大潮气量组好,所以有学者提出允许性低氧血症的观点^[4]。血氧分压、血氧含量以及氧合指数等是否能很好评估危重患者MODS的发生和发展还有待探究。

胃肠黏膜pHi水平可以反应黏膜的血流灌注情况。本研究结果也显示胃pHi在两种休克模

表 3 血气分析、pHi和小肠病理半定量评分的相关性($n=8$)

指标	失血性休克		内毒素休克	
	r	P	r	P
pH	0.328	0.118	0.396	0.055
PaO ₂	0.385	0.063	0.375	0.071
PaCO ₂	-0.339	0.105	-0.308	0.144
HCO ₃ ⁻	-0.215	0.313	0.033	0.879
pHi	-0.417	0.043	-0.464	0.022
AI	0.424	0.039	0.413	0.045

型中都和小肠的病理评分负相关。然而小肠病理评分各组间存在差异, 胃pHi水平各组间差异却不明显, 说明胃pHi虽然可以一定程度的反应小肠的损伤情况, 但不是反应小肠损伤程度的敏感指标, 可能对pHi的动态观察比单独的结果意义更大。两种休克所检测的血气指标都和胃pHi没有明显的相关性, 提示不能用血气分析结果来估计pHi的水平。

本研究结果显示, 大潮气量通气在两种休克都表现为小肠病理损伤明显加重, 病理评分和凋亡指数都明显高于中小潮气量组, 电镜下观察到, 大潮气量组小肠上皮细胞纤毛损伤加重。Gurkan和Imai的研究也显示损伤性机械通气可能引起肺外器官的损伤^[5-6]。可能因为过大的潮气量造成的肺内炎症因子的生成和释放入血, 加重小肠的损害^[7-8]。

内毒素休克全身小血管开放, 有效血容量相对不足, 失血性休克血容量绝对不足, 反应性血流重新分布, 小肠的缺血缺氧程度可能相对较重。而本实验结果显示内毒素休克小肠病理评分和AI都明显高于失血性休克, 可能是小肠对于内毒素的损伤作用较敏感, 而对缺血缺氧的损伤作用敏感性相对差, 可能和内毒素对小肠上皮细胞间连接的损伤作用有关^[9]。电镜下也观察到内毒素休克小肠上皮细胞间连接破坏相对严重。

本实验在各组都应用相同剂量的肝素和肌松剂, 各组休克血压、复苏血压、复苏液体等血流动力学指标差异无统计学意义。内毒素休克多巴胺用量大于失血性休克, 反映出两种休克的血流动力学特点, 有研究显示多巴胺应用可以减轻小肠损伤^[10], 也有研究显示多巴胺应用可能对内脏代谢不利^[11], 内毒素休克小肠损伤情况可能也受多巴胺应用的影响, 多巴胺对小肠的作用还有待研究。

I组和II组小肠病理评分和凋亡指数差异

表 4 血气指标和pHi的相关性($n=8$)

指标	失血性休克组		内毒素休克组	
	r	P	r	P
pH	0.209	0.327	-0.188	0.380
PaO ₂	-0.111	0.606	-0.168	0.434
PaCO ₂	0.006	0.976	0.344	0.099
HCO ₃ ⁻	0.241	0.257	0.293	0.165

都没有显著性。但I组多巴胺用量多于II组, 间接反映失血性休克应用4-6 mL/kg小潮气量通气可能会造成循环的不稳定, 可能和小潮气量通气造成的低氧血症和高碳酸血症对机体内环境的影响有关^[8]。所以在失血性休克采用8-10 mL/kg的潮气量通气比较合理。

IV组、V组和VI组多巴胺用量无显著性差异, 提示潮气量不同导致的机体内环境差异等因素不是影响内毒素休克多巴胺用量的主要因素。IV组和V组小肠病理评分和凋亡指数差异均无统计学意义, 可能是中小潮气量通气相比, 中等潮气量通气下肺炎症介质释放较多, 而小潮气量通气导致高碳酸血症或低氧血症使内脏血流相对减少^[8], 所以两种潮气量通气导致小肠的损伤程度差异不显著。但笔者对内毒素休克肺损伤的研究显示4-6 mL/kg的潮气量通气, 肺损伤相对较小^[12], 所以在内毒素采用4-6 mL/kg的潮气量通气比较适合。

4 参考文献

- 1 Milberg JA, Davis DR, Steinberg KP, Hudson LD. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): 1983-1993. *JAMA* 1995; 273: 306-309
- 2 du Cheyron D. Lung injury and renal failure: from protective ventilation to renal protection. *Crit Care Med* 2005; 33: 1460-1461
- 3 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483
- 4 Abdelsalam M. Permissive hypoxemia: is it time to change our approach? *Chest* 2006; 129: 210-211
- 5 Gurkan OU, O'Donnell C, Brower R, Ruckdeschel E, Becker PM. Differential effects of mechanical ventilatory strategy on lung injury and systemic organ inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L710-L718
- 6 Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de Perrot M, Fischer S, Edwards V, Cutz E, Liu M, Keshavjee S, Martin TR, Marshall JC, Ranieri VM, Slutsky AS. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2003; 289: 2104-2112
- 7 Pinhu L, Whitehead T, Evans T, Griffiths M. Ventilator-

■同行评价

本文内容新颖, 结论可靠, 具有一定的科学性和可读性。

- associated lung injury. *Lancet* 2003; 361: 332-340
- 8 Kaiper JW, Groeneveld ABJ, Slutsky AS, Plotz FB. Mechanical ventilation and acute renal failure. *Crit Care Med* 2005; 33: 1408-1415
- 9 Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, Fioramonti J, Eutamene H, Bueno L. Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am J Pathol* 2005; 167: 1071-1079
- 10 潘文东, 杨正文, 周明, 李木惠, 张道全. 小剂量多巴胺对烫伤大鼠休克期肠黏膜的保护作用. *中华烧伤杂志* 2002; 18: 213-215
- 11 Jakob SM, Ruokonen E, Takala J. Effects of dopamine on systemic and regional blood flow and metabolism in septic and cardiac surgery patients. *Shock* 2002; 18: 8-13
- 12 刘菲, 刘志. 不同潮气量机械通气对失血性及内毒素休克复苏早期兔肺的影响. *中华结核和呼吸杂志* 2007; 30: 549-550

编辑 喻荣彬 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 •

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, shxhhy2008@yahoo.cn或czs.xiaohua@163.com

穿心莲内酯对肝硬化大鼠肠道通透性的作用及临床意义

覃慧敏, 吴春明, 李洪涛, 宋建新

覃慧敏, 三峡大学第一临床医学院宜昌市中心人民医院感染科 湖北省宜昌市 443003

吴春明, 温州市中医院肝病科 浙江省温州市 325000

李洪涛, 宋建新, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科 湖北省武汉市 430030

覃慧敏, 2006年同济医学院硕士, 副主任医师, 主要从事肝病的临床和教学研究。

湖北省卫生厅科研基金资助项目, No. NX200506

作者贡献分布: 此课题由宋建新设计; 研究过程由覃慧敏、吴春明操作完成; 数据分析由覃慧敏、李洪涛完成; 本论文写作由覃慧敏、吴春明、李洪涛完成。

通讯作者: 宋建新, 430030, 武汉市硚口区解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科。

songsingsjx@sina.com

电话: 027-83663602

收稿日期: 2007-10-11 修回日期: 2008-01-26

Role of andrographolide in the permeability of intestinal tract of cirrhosis rats and its clinical significance

Hui-Min Qin, Chun-Ming Wu, Hong-Tao Li, Jian-Xin Song

Hui-Min Qin, Department of Infectious Diseases, Yichang Central People's Hospital, the First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443003, Hubei Province, China

Chun-Ming Wu, Department of Liver Diseases, Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China

Hong-Tao Li, Jian-Xin Song, Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: the Research Project from Department of Public Health of Hubei Province, No. NX200506

Correspondence to: Dr. Jian-Xin Song, Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. songsingsjx@sina.com

Received: 2007-10-11 Revised: 2008-01-26

Abstract

AIM: To detect the impact of andrographolide on the permeability of intestinal tract of cirrhosis rats by high performance liquid chromatography and to probe its clinical significance.

METHODS: The discharge rate of mannitol (M) and lactulose (L) in cirrhosis rats was detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and compared with the standard curve.

RESULTS: The lactulose/mannitol (L/M) discharge rate in cirrhosis rats was significantly higher than that in normal rats (0.036 ± 0.012 vs 0.026 ± 0.009 , $P < 0.05$) and significantly lower in the andrographolide and norfloxacin intervention group than that in the control group (0.022 ± 0.010 , 0.022 ± 0.007 vs 0.036 ± 0.012 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The permeability of intestinal tract of cirrhosis rats is significantly higher than that of normal rats and significantly lower in the andrographolide and norfloxacin intervention group than that in the control group.

Key Words: Andrographolide; Cirrhosis; Intestinal permeability; High performance liquid chromatography

Qin HM, Wu CM, Li HT, Song JX. Role of andrographolide in the permeability of intestinal tract of cirrhosis rats and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 839-843

摘要

目的: 检测穿心莲内酯对肝硬化大鼠肠道通透性的影响, 并探讨其可能的临床意义。

方法: 采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测研究对象尿液标本中甘露醇(mannitol, M)和乳果糖(lactulose, L)排出率比值, 通过计算甘露醇和乳果糖的排出率来评估肠道通透性。

结果: 在上述色谱条件下, 肝硬化大鼠尿液标本中乳果糖/甘露醇排出率较正常大鼠(0.036 ± 0.012 vs 0.026 ± 0.009 , $P < 0.05$)显著增高。穿心莲及诺氟沙星干预组较对照组L/M显著降低(0.022 ± 0.010 , 0.022 ± 0.007 vs 0.036 ± 0.012 , $P < 0.05$)。

结论: 肝硬化大鼠较正常大鼠肠道通透性显著性增高。肝硬化大鼠中, 穿心莲及诺氟沙星干预组大鼠的肠道通透性较对照组显著降低。

关键词: 穿心莲内酯; 肝硬化; 肠道通透性; 高效液相色谱法

■背景资料

自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是肝硬化患者晚期常见的严重并发症之一, 现已明确SBP的发生及发展与肝硬化患者肠黏膜屏障功能受损、肠道通透性升高造成肠道细菌/内毒素易位等因素相关, 而肠源性内血症更会造成对肝脏的“二次打击”。因此, 了解肝硬化时肠道通透性的变化情况以及临床常用抗感染药物在肠道通透性变化中的影响, 对于SBP的防治具有重要意义。

■同行评议者

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; 潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室

■相关报道

目前,在肝硬化并发SBP的预防和治疗中,抗生素仍然占据着主要地位,但是在临床应用中,抗生素又可能引起细菌溶解而导致内毒素的释放,引起病情恶化,而且对于晚期肝硬化患者预防性使用广谱抗生素可能导致肠道菌群失调和细菌耐药,在临床应用上一直存在争议。穿心莲作为一种有抗感染作用的中草药现已广泛应用于临床,穿心莲的主要有效部分为内酯成分。有研究显示,其抗感染作用可能是通过调节部分细菌的密度阈值感应系统(Quorum Sensing System)QS系统而达到抗感染作用的。

覃慧敏, 吴春明, 李洪涛, 宋建新. 穿心莲内酯对肝硬化大鼠肠道通透性的作用及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 839-843

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/839.asp>

0 引言

肝硬化患者晚期容易出现多种并发症,其中,自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是一种常见的严重并发症。目前研究表明肠道细菌移位(bacterial translocation, BT)是SBP发生的重要原因之一,而BT的发生与肝硬化时肠道通透性(intestinal permeability, IP)升高密切相关^[1-2]。

观察肠道通透性较为困难,现多采用间接方法即通过观察肠道大分子物质通透性的改变间接证实肠道屏障功能的变化来实现^[3]。本研究以甘露醇(mannitol, M)和乳果糖(lactulose, L)作为探针,采用高效液相色谱分析法(HPLC)测定肝硬化大鼠尿中甘露醇和乳果糖排出率比值来评估肠道通透性。

穿心莲为爵床科植物Andrographis paniculata(Burm. f. Nees),其主要有效成分是穿心内酯,目前研究证实穿心莲具有一定的抗菌、抗病毒、增强免疫等作用,临床上广泛用于治疗上呼吸道感染、细菌性菌痢等感染性疾病,但其在SBP治疗中的作用未见有报道^[4-6]。我们采用穿心莲成药作用于实验性肝硬化大鼠,观察穿心莲对肝硬化大鼠肠道通透性的影响,从而为进一步了解穿心莲在肝硬化SBP及细菌移位中的作用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar δ 大鼠60只,体质量200-250 g(由同济医学院实验动物中心提供)。所有大鼠自由进食水,2次/wk sc 40%-50%四氯化碳油溶液(剂量:0.3 mL/100 g体质量),连续12 wk。仪器:德国Schambeck SFD GmbH高压液相色谱系统, System Gold V810(美国Beckman公司), RI2000示差折光检测器, NH2色谱柱(4.6 mm×250 mm×5 mm, Waters), 超声振荡仪, 分析天平。主要试剂:乳果糖标准品和甘露醇标准品(色谱纯, Sigma公司);乳果糖分子探针(Solvay Pharmaceuticals B.V, 荷兰),甘露醇分子探针(上海源聚生物科技有限公司),硫柳汞(北京欣经科生物技术有限公司),阴阳离子交换树脂(天津标准科技有限公司),醋酸,乙腈,超纯水。

1.2 方法

1.2.1 研究对象标本的收集:造模成功后随机选取肝硬化大鼠40只,另取40只正常大鼠作为对照。将所有大鼠禁食8-10 h后,取2 mL乳果糖/甘露醇混合液(含乳果糖100 mg,甘露醇50 mg)灌胃。收集其后8 h尿液,记总量,将尿样标本加防腐剂硫柳汞(0.2 mg/mL)后混匀,置于-20℃冰箱保存待检。

1.2.2 标本检测前的处理:将冻存的样品解冻,摇匀后取4 mL离心(10 000 r/min)10 min。取上清加入50 mL/L醋酸2-3滴,加热煮沸3-5 min,冷却后再次离心(10 000 r/min)10 min。取上清经阴阳离子交换树脂去离子,再以0.22 μm滤器过滤后,用超声振荡仪振荡20 min后上机待检。

1.2.3 肠道通透性的检测:(1)标准溶液的配制:精密称取乳果糖标准品5 g、甘露醇标准品2.5 g,加流动相1 L制成标准品溶液。梯度溶液的配制:精密量取上述溶液1、2、10、20、50、100、200 mL分别置1 L量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀作为标准溶液。(2)色谱条件:色谱柱: NH2柱(4.6 mm×250 mm×5 mm, Waters);高压泵: S9404SM不锈钢微量泵SS 0.01-3.0;柱温:室温;流动相:乙腈:水(70:30 V/V);流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL; RI2000示差折光检测器。(3)HPLC分析:取预处理后的尿样品0.2 mL从进样口注入至HPLC仪,由切换阀自动进样20 μL。进样后开始记录,至待测峰全部出现,基线平稳后停止记录。(4)标准曲线的绘制:用System Gold V810配套软件对色谱图进行积分处理,得峰面积积分值。以峰面积积分值为纵座标,进样浓度(mg/L)为横座标,建立甘露醇和乳果糖的标准曲线和回归方程。(5)回收率和乳果糖/甘露醇排出率L(%) / M(%)的计算:用尿样品加标准品进行测定,计算甘露醇和乳果糖的回收率。根据标准曲线和回归方程计算样品中的甘露醇排出率和乳果糖排出率,得出乳果糖/甘露醇排出率L(%) / M(%)。

统计学处理 用统计分析软件SPSS12.0进行数据分析,数据用mean±SD表示。采用t检验, P<0.05有显著性统计学意义。

2 结果

在上述色谱条件下,甘露醇和乳果糖标准品溶液、尿液样品中各组分均能实现基线分离,峰形良好。不同浓度甘露醇的加样回收率在92.7%-98%之间,乳果糖的加样回收率在91.3%-

表 1 8 h内甘露醇和乳果糖尿中排出率的比值(mean ± SD)

分组	LAC(%)	MAN(%)	L(%) / M(%)
肝硬化大鼠	0.020 ± 0.010 ^a	0.614 ± 0.190	0.036 ± 0.012 ^a
正常大鼠	0.0129 ± 0.007	0.502 ± 0.143	0.026 ± 0.009

^a*P* < 0.05.

97.4%之间.

2.1 甘露醇和乳果糖的标准曲线 结果表明甘露醇和乳果糖分别在25-1000 mg/L和50-2000 mg/L, 范围内与积分峰面积呈线性关系. 回归方程分别为: $y(m) = 4032.8x + 6599.2$, $r(m) = 0.9992$; $y(l) = 1905.5x + 3499.1$, $r(l) = 0.9992$. 其中 $y(m)$ 为甘露醇浓度, $y(l)$ 为乳果糖浓度, x 为峰面积; $r(m)$ 和 $r(l)$ 分别为二者的相关系数.

2.2 峰形曲线 甘露醇和乳果糖的出峰时间分别为6.721 min和9.242 min. 见图1-2.

2.3 肝硬化大鼠和正常大鼠肠道通透性比较 结果以甘露醇(M)和乳果糖(L)在尿中的排出率及其比值表示. 数据显示肝硬化大鼠尿中乳果糖排出率及L/M比值均比正常大鼠显著增高(*P* < 0.05, 表1). 肝硬化大鼠肝组织及肠道组织HE染色见图3A-B.

2.4 肝硬化大鼠各干预组肠道通透性的比较 结果以甘露醇(M)和乳果糖(L)在尿中的排出率及其比值表示. 数据显示穿心莲组和诺氟沙星组大鼠尿中乳果糖排出率及L/M比值均比对照组大鼠显著增高(*P* < 0.05, 表2). 诺氟沙星组、穿心莲组及混合组肠道组织切片见图3C-E.

3 讨论

自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是肝硬化患者晚期常见的严重并发症之一, 现已明确SBP的发生及发展与肝硬化患者肠黏膜屏障功能受损、肠道通透性升高造成肠道细菌/内毒素易位等因素相关, 而肠源性内毒血症更会造成对肝脏的“二次打击”^[7-9]. 因此, 了解肝硬化时肠道通透性的变化情况以及临床常用抗感染药物在肠道通透性变化中的影响, 对于SBP的防治具有重要意义.

30年前Caridis *et al*^[10]首次通过引入肠黏膜通透性的概念指出, 肠黏膜上皮具有被某些物质分子以非载体或通道介导的方式进行被动扩散的特性^[11]. 正常情况下, 肠道黏膜上皮组织紧密连接完好, 可通过肠上皮细胞吸收小分子物质(如甘露醇), 但当肠道黏膜机械屏障功能受损

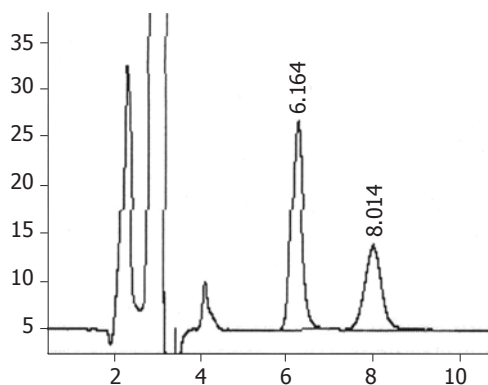


图 1 标准品的峰形曲线.

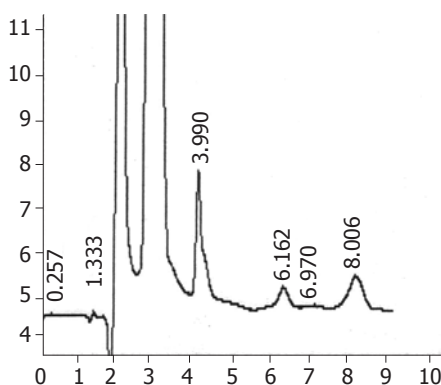


图 2 正常大鼠尿样峰形曲线.

时上皮细胞间紧密被破坏, 大分子物质(如乳果糖)在旁路的吸收会增加, 从而显示肠道通透性增高, 肠道通透性增高是肠道黏膜机械屏障功能受损的间接反映指标^[12]. 根据这一原理, 本研究应用Liu *et al*^[3]报道的方法, 即采用高压液相色谱法+示差折光检测器(HPLC-RID)检测大鼠尿中甘露醇/乳果糖排泄率的比值来反应肠道通透性.

通过应用该方法, 我们发现前者显著高于后者(*P* < 0.05), 与国外报道一致^[13-15]. 其机制可能是由于硬化时门静脉压力升高, 肠道血流缓慢, 黏膜下毛细血管和静脉扩张淤血, 使氧和营养物质输送到黏膜的时间延长, 代谢产物不能及时转运. 肠微循环障碍, 黏膜出现缺血性改变. 肠黏膜血流量的改变致黏膜水肿、血管扩张、肌肉纤维增生、肠绒毛/陷窝比下降以及肌性黏膜增粗, 破坏了肠黏膜屏障的完整性, 导致肠道通透性升高^[16].

同时我们发现, 在肝硬化大鼠中, 穿心莲组、诺氟沙星组均较生理盐水对照组L/M显著降低(*P* < 0.05). 数据显示: 穿心莲组的甘露醇排出率变化不大, 而乳果糖尿中排出率下降, L/M明显低于对照组中. 这表明穿心莲能增强肠上

■创新盘点

目前研究证实穿心莲具有一定的抗菌、抗病毒、增强免疫等作用, 临床上广泛用于治疗上呼吸道感染、细菌性菌痢等感染性疾病, 但其在SBP治疗中的作用未见有报道. 本文采用穿心莲成药作用于实验性肝硬化大鼠, 观察穿心莲对肝硬化大鼠肠道通透性的影响.

■应用要点

本文为进一步了解穿心莲在肝硬化SBP及细菌移位中的作用提供理论依据。

表 2 各组的肠黏膜通透性改变(mean ± SD)

分组	n	LAC(%)	MAN(%)	L/M
穿心莲组	11	0.012 ± 0.017 ^a	0.529 ± 0.145	0.022 ± 0.010 ^a
诺氟沙星组	10	0.012 ± 0.022 ^a	0.530 ± 0.128	0.022 ± 0.007 ^a
诺氟沙星+穿心莲组	9	0.014 ± 0.003	0.502 ± 0.143	0.029 ± 0.008
对照组	10	0.020 ± 0.010	0.614 ± 0.190	0.036 ± 0.012

^aP<0.05 vs 对照组.

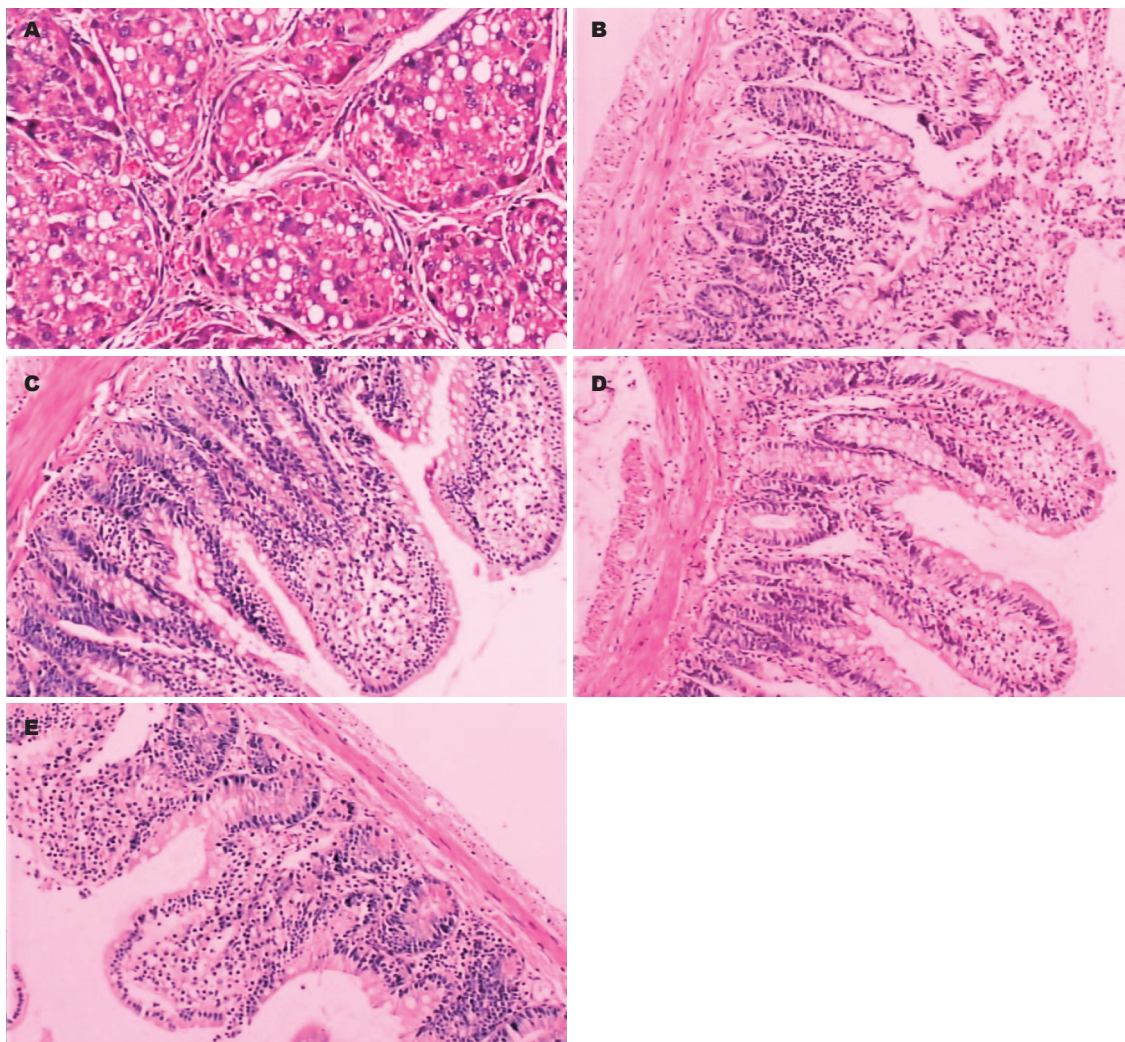


图 3 各组肠道组织及肝脏组织HE染色. A: 肝硬化模型组肝脏切片(×400); B: 肝硬化模型组肠道切片; C: 诺氟沙星组肠道切片; D: 穿心莲组肠道切片; E: 混合组肠道切片(B-E均为×800倍).

皮细胞及细胞间紧密连接,阻止肠道内大分子物质(乳果糖)的通过,吸收减少,排出率下降.提示肝硬化大鼠中,穿心莲及诺氟沙星干预组大鼠的肠道通透性较生理盐水对照组显著降低,即穿心莲和诺氟沙星可以显著降低肝硬化大鼠的肠道通透性.

目前,在肝硬化并发SBP的预防和治疗中,抗生素仍然占据着主要地位,但是在临床应用

中,抗生素又可能引起细菌溶解而导致内毒素的释放,引起病情恶化^[17],而且对于晚期肝硬化患者预防性使用广谱抗生素可能导致肠道菌群失调和细菌耐药,在临床应用上一直存在争议^[18].

穿心莲作为一种有抗感染作用的中草药现已广泛应用于临床,穿心莲的主要有效部分为内酯成分^[19],即穿心莲甲、乙、丙、丁素等,其

体外实验证实穿心莲在体外并无直接杀菌作用. 近年来研究显示, 穿心莲的抗感染作用可能是通过调节部分细菌的密度阈值感应系统(Quorum Sensing System)QS系统而达到抗感染作用的^[20]. 此外, 有实验证实穿心莲还能抑制急性炎症早期的毛细血管通透性增高而起到抗组织渗出的作用, 因而有明显抗炎作用, 其中大剂量组抗炎作用甚至强于阿司匹林, 其作用机制尚不明确^[13].

总之, 通过实验, 我们发现肝硬化大鼠较正常大鼠的肠道通透性明显升高; 穿心莲可以显著降低肝硬化大鼠的肠道通透性. 本实验中, 穿心莲+诺氟沙星组肝硬化大鼠肠道通透性与对照组相比, 无显著差异, 考虑可能与实验标本数较少有关, 另外, 穿心莲在SBP治疗及降低肠道通透性中对于剂量的依赖, 安全性等仍有待于进一步研究.

4 参考文献

- Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 353-372
- Almeida J, Galhenage S, Yu J, Kurtovic J, Riordan SM. Gut flora and bacterial translocation in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1493-1502
- Liu H, Zhang S, Yu A, Qu L, Zhao Y, Huang H, Li J. Studies on intestinal permeability of cirrhotic patients by analysis lactulose and mannitol in urine with HPLC/RID/MS. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14: 2339-2344
- 顾利红, 朱品业. 薄层扫描法测定穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的含量. *中草药* 2000; 31: 260
- 高学敏. 中药学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 552-557
- 沈映君. 中药药理学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 239-245
- Hillebrand DJ. Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2002; 5: 479-489
- Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41: 422-433
- Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 961-965
- Caridis DT, Reinhold RB, Woodruff PW, Fine J. Endotoxaemia in man. *Lancet* 1972; 1: 1381-1385
- Lunn PG, Northrop-Clewes CA, Downes RM. Intestinal permeability, mucosal injury, and growth faltering in Gambian infants. *Lancet* 1991; 338: 907-910
- 秦环龙, 高志光. 肠上皮细胞紧密连接在肠屏障中的作用研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 443-447
- Fujii T, Seki T, Maruoka M, Tanaka J, Kawashima Y, Watanabe T, Sawamura T, Inoue K. Lactulose-L-rhamnose intestinal permeability test in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2001; 19: 158-169
- Parlesak A, Schafer C, Schutz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000; 32: 742-747
- Pascual S, Such J, Esteban A, Zapater P, Casellas JA, Aparicio JR, Girona E, Gutiérrez A, Carnices F, Palazón JM, Sola-Vera J, Pérez-Mateo M. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1482-1486
- Ersoz G, Aydin A, Erdem S, Yuksel D, Akarca U, Kumanlioglu K. Intestinal permeability in liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 409-412
- Strauss E, Caly WR. Spontaneous bacterial peritonitis: a therapeutic update. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4: 249-260
- Wong F, Bernardi M, Balk R, Christman B, Moreau R, Garcia-Tsao G, Patch D, Soriano G, Hoefs J, Navasa M. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. *Gut* 2005; 54: 718-725
- 邓文龙. 四种穿心莲内酯的药理作用比较. *药学学报* 1982; 17: 195
- Li HT, Qin HM, Wang WH, Li GJ, Wu CM, Song JX. Effect of andrographolide on QS regulating virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2006; 31: 1015-1017

■同行评价

本文立题有依据, 设计合理, 操作规范, 技术难度大, 结果可靠, 讨论观点明确, 条理性强, 研究结果先进.

编辑 潘伯荣 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 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版. 在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/submission@wjgnet.com>, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxx.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d. 来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬). (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

胃癌高发区人群胃黏膜病变与细胞增殖、凋亡的关系

潘凯枫, 张阳, 张联, 马峻岭, 冯国双, 周彤, 李吉友, 游伟程

■背景资料

细胞增殖和凋亡的异常在胃癌的发病中起重要作用。山东省临朐县是我国北方的胃癌高发区, 在高发区大样本人群中对不同胃黏膜病变细胞增殖和凋亡状况进行研究, 对明确胃癌的发生机制、指导胃癌预防具有重要意义。

潘凯枫, 张阳, 张联, 马峻岭, 冯国双, 周彤, 游伟程, 北京大学临床肿瘤学院 北京肿瘤医院 北京市肿瘤防治研究所流行病学研究室 北京市 100036

李吉友, 北京大学临床肿瘤学院 北京肿瘤医院 北京市肿瘤防治研究所病理科 北京市 100036

潘凯枫, 1989年北京大学医学部本科, 2006年在职申请获得北京大学医学博士学位, 副研究员, 主要从事分子流行病学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30772515

北京大学“211”肿瘤学科群资助项目, No. 529

作者贡献分布: 此课题由潘凯枫, 游伟程设计; 研究过程由潘凯枫, 张阳, 张联, 马峻岭, 周彤及李吉友操作完成; 数据分析由冯国双, 潘凯枫及游伟程完成; 本论文写作由潘凯枫及游伟程完成。

通讯作者: 游伟程, 100036, 北京市海淀区阜成路52号, 北京大学临床肿瘤学院, weichengyou@yahoo.com

电话: 010-88196036 传真: 010-88122437

收稿日期: 2008-01-28 修回日期: 2008-03-06

Relationship between precancerous gastric lesions and cell proliferation and apoptosis in a high-risk population

Kai-Feng Pan, Yang Zhang, Lian Zhang, Jun-Ling Ma, Guo-Shuang Feng, Tong Zhou, Ji-You Li, Wei-Cheng You

Kai-Feng Pan, Yang Zhang, Lian Zhang, Jun-Ling Ma, Guo-Shuang Feng, Tong Zhou, Wei-Cheng You, Department of Cancer Epidemiology, Peking University School of Oncology, Beijing Cancer Hospital & Institute, Beijing 100036, China

Ji-You Li, Department of Pathology, Peking University School of Oncology, Beijing Cancer Hospital & Institute, Beijing 100036, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772515; National “211” Project in Peking University, No. 529

Correspondence to: Dr. Wei-Cheng You, Department of Cancer Epidemiology, Peking University School of Oncology, Beijing Cancer Hospital & Institute, 52 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100036, China. weichengyou@yahoo.com
Received: 2008-01-28 Revised: 2008-03-06

Abstract

AIM: To evaluate the relationship between gastric lesions and cell proliferation and apoptosis activity.

METHODS: A total of 1523 subjects received an endoscopic examination and five biopsies were obtained from standard sites of the stomach. Expression of Ki-67 was assessed by immunohistochemistry, and apoptotic cells were detected

with the terminal deoxynucleotide transferase mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) method.

RESULTS: Among the subjects screened by endoscopic examination, 93.8% had chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia or dysplasia. The prevalence rates of gastric lesions varied in different sites of the stomach. In the greater curvature of the body, the proportion of normal mucosa or superficial gastritis was 84.56%, but dysplasia was only 0.07%. In the angulus, the proportion of normal mucosa or superficial gastritis was reduced to 19.19%, while the proportion of dysplasia reached 5.26%. Furthermore, gastric lesions were positively associated with cell proliferation activity, showing a tendency to increase Ki-67 labeling index according to the severity of gastric lesions. However, no significant association was seen between gastric lesion and cell apoptosis ($P = 0.159$).

CONCLUSION: Advanced gastric lesions, such as intestinal metaplasia and dysplasia, tend to occur along the lesser curvature of stomach, where gastric cancer occurs. Imbalance in cell proliferation and apoptosis can be observed in advanced gastric lesions.

Key Words: Gastric cancer; Precancerous lesions; Cell proliferation; Apoptosis

Pan KF, Zhang Y, Zhang L, Ma JL, Feng GS, Zhou T, Li JY, You WC. Relationship between precancerous gastric lesions and cell proliferation and apoptosis in a high-risk population. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 844-849

摘要

目的: 研究山东省临朐县胃癌高发区人群中胃黏膜病变与细胞增殖、凋亡的关系。

方法: 通过对1523例受试者进行胃内窥镜检查, 在胃内不同部位取胃黏膜活检进行病理学诊断, 明确胃黏膜病变的分布。采用免疫组化方法检测Ki-67表达, 采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL), 评

■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室

价不同病变细胞凋亡状况。

结果: 在受检人群中, 93.8%患有慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生或异型增生。各种病变在胃内分布不同, 在胃体大弯处, 正常或浅表性胃炎占84.56%, 异型增生仅占0.07%, 而在胃角处正常或浅表性胃炎为19.19%, 而异型增生则为5.26%。研究还发现, 细胞增殖与病变程度相对应, 随着病变的加重, 增殖趋于活跃, 不同病变之间存在明显差异, 但细胞凋亡程度未见明显差异($P=0.159$)。

结论: 在大样本人群研究中, 明确了肠上皮化生、异型增生等癌前病变与胃癌发生部位的一致关系及细胞增殖和凋亡的失调。

关键词: 胃癌; 癌前病变; 细胞增殖; 凋亡

潘凯枫, 张阳, 张联, 马峻岭, 冯国双, 周彤, 李吉友, 游伟程. 胃癌高发区人群胃黏膜病变与细胞增殖、凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 844-849

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/844.asp>

0 引言

胃癌在中国及世界范围内居各类恶性肿瘤死因的第二位^[1-3]。我国每年大约有36-40万人死于胃癌^[4]。胃癌的发生是多因素参与的多阶段病理变化过程, 是多基因改变累积的结果, 最终引起上皮细胞的增殖失控或凋亡受阻而导致胃癌的发生^[5-6]。

细胞增殖和凋亡的异常在胃癌的发病中起重要作用, 已有大量相关研究的报道^[7-8]。然而, 由于胃癌的异质性和生物学行为的复杂性, 从胃癌细胞系或动物模型获得的研究结果难以准确反映胃黏膜长期演变过程中细胞增殖和凋亡的异常演变。因此, 对不同胃黏膜病变阶段细胞增殖和凋亡状况进行研究, 对理解胃癌的发生、发展机制具有重要意义。

目前已有幽门螺杆菌感染与细胞增殖和凋亡关系的研究报道^[9-11], 但尚缺乏从浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎到异型增生阶段胃黏膜演变过程的系统研究。山东省临朐县是我国北方的胃癌高发区之一, 1980年胃癌标化死亡率为38/10万, 其中男性为70/10万, 胃癌组织学类型以肠型为主^[12]。自1983年起我们在临朐县建立了胃癌高发现场, 在高危人群中开展了一系列胃癌及癌前病变的病理流行特征、癌前病变的渐变过程及环境因素、遗传因素的研究, 并针对病因学开展了干预试验^[13-20]。在此基础上, 本研

究对不同胃黏膜病变的分布及与细胞增殖、凋亡的关系进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料 2002年, 我们在山东省临朐县胃癌高发区采用整群随机抽样的方法在5个乡镇中随机选择12个自然村, 以35-64岁(2002-01的实足年龄)居民为研究对象。在12个村中, 除精神异常、怀孕、病重、长期外出口外, 共登记3167人, 其中2850人参加了体检和静脉抽血, 占登记人口的90.0%。经过体检, 适合接受胃内镜检查者为2734人, 完成胃内镜检查者2638人, 受检率为96.5%。在受检者中有2579例(97.8%)完成胃黏膜病理学诊断。在进行胃内镜检查的同时收集详细的人口学资料、吸烟及饮酒资料。

在上述人群中随机选择1523例具有不同胃黏膜病变的受试者为本次研究对象。其中, 有吸烟资料的为1472例, 有饮酒资料的为1469例。

本研究经过北京大学临床肿瘤学院伦理道德委员会审查通过, 所有受试者均签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 胃内镜检查及病理学诊断: 受检者在常规体检后, 空腹进行胃内镜检查。检查前用1%地卡因进行喉部局部麻醉, 然后由1-2名主治医师以上的消化科医师及2名助手用日产Olympus-Q20胃内窥镜对食道及全胃进行检查。在胃内窥镜直视下, 观察并描述胃黏膜状况, 并根据Sydney分类系统^[21]推荐的五个标准部位取胃黏膜活检。在胃内镜检查后的d 2, 由专门的医师对受检者进行回访。

在胃镜检查时对胃窦大弯、胃窦小弯、胃角、胃体大弯和胃体小弯5处标准部位分别取胃黏膜活检组织, 并进行病理学诊断。胃黏膜活检组织经40 g/L福尔马林固定、石蜡包埋、切片、HE染色, 由3名副主任医师以上病理医生按照Sydney^[21]和Padova国际分类^[22]标准对每个活检组织分别进行诊断。在全部完成5个部位病理诊断后, 受检者以取材部位中最严重病变为最高病理诊断。胃黏膜病变由轻至重依次诊断为: 浅表性胃炎(superficial gastritis, SG)、慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)、肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)、不确定性异型增生(indefinite dysplasia, Ind DYS)和异型增生(dysplasia, DYS)。在本研究人群中, 由于诊断为正常胃黏膜的受试者很少, 因此, 在分析中

■研究前沿

目前关于胃癌发生过程中细胞增殖和凋亡状况的研究主要来自于胃癌细胞系或动物模型, 尚未见在大样本人群中的研究报道。

■创新盘点

本文对胃癌高危人群胃内不同部位7000多例胃黏膜组织标本进行分析,在国内外尚属首次。结果表明在癌前病变阶段已经存在细胞增殖和凋亡失衡,并且可能随着病变的加重,失衡状态越明显。

将正常胃黏膜与SG合并(SG/N)进行分析。

1.2.2 细胞增殖水平(Ki-67)的免疫组化检测:将石蜡切片经过二甲苯脱蜡,梯度酒精(100%→95%→90%→85%→80%)水化后,加入30 mL/L H₂O₂封闭内源性过氧化物酶,室温10 min。PBS洗5 min×3次。切片放入0.01 mol/L枸橼酸钠抗原修复液中,450 W微波加热,92-95℃ 5 min×2次,室温冷却。滴加50 g/L脱脂牛奶封闭,37℃水浴30 min。倾去多余牛奶,滴加一抗(Ki-67 mAb, 1:100稀释,北京中杉金桥公司),4℃冰箱过夜。PBS洗5 min×3次。滴加通用二抗IgG(PV-9000 Immuno-Bridge, 美国GBI公司),37℃水浴30 min, PBS洗5 min×3次。用新鲜配制的二氨基联苯氨(DAB)显色液进行显色,封片,用光学显微镜进行观察。

细胞核被染成棕黄色或深棕黄色为阳性细胞,以3-5个高倍视野(×40倍)内计数500个上皮细胞,以平均100个细胞中阳性细胞的个数为Ki-67标记指数(Ki-67 labeling index)。

1.2.3 组织标本凋亡细胞的原位检测:本实验采用原位凋亡检测试剂盒(TACS, XLTM-Basic, R&D Systems, Inc.)对凋亡细胞进行原位检测。该试剂盒是根据脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick and labeling, TUNEL)原理进行检测。主要步骤为首先制备4 μm的石蜡包埋的组织切片,进行脱蜡、再水化,加入蛋白酶K溶液(试剂盒提供),37℃消化30 min,将切片置于1×TdT标记溶液中5 min,加50 μL标记反应混合液,置37℃湿盒中孵育1 h,终止反应后,加入50 μL稀释的抗体溶液,37℃孵育1 h,再加入Streptavidin-HRP溶液,室温孵育20 min。用DAB试剂盒(北京中杉金桥公司)进行显色,再用甲基绿复染,封片,用光学显微镜进行观察。

每次实验均设立一个阳性对照和阴性对照,以监测实验过程中标记、染色和复染过程。该公司提供的阳性对照片为细胞涂片,但考虑到细胞涂片与我们要检测的组织切片在细胞通透性等方面有一定的差距,因此采用与检测的组织切片具有相同来源的切片,用蛋白酶K消化后,用DNase I处理作为阳性对照,切片不加TdT酶做为阴性对照。凋亡细胞以细胞核被染成棕黄色或深棕黄色为阳性。由于胃镜取材较小,并且凋亡细胞数较少,因此在病变部位胃黏膜上皮细胞内出现的凋亡细胞全部计数(一般为5-7个高倍视野)。

统计学处理

将胃黏膜病变按病理诊断轻重依次赋值为1-5(1 = SG/N, 2 = CAG, 3 = IM, 4 = Ind DYS, 5 = DYS),为有序分类变量。胃内5个部位(1 = 胃体小弯, 2 = 胃体大弯, 3 = 胃角, 4 = 胃窦小弯, 5 = 胃窦大弯)为无序分类变量。对研究对象的基本资料采用一般的统计学描述分析,无序分类变量采用卡方检验进行分析,多个有序分类变量采用Ridit(relative to an identified distribution)分析。

年龄、性别、吸烟及饮酒状况与不同癌前病变的关系及不同癌前病变与细胞凋亡程度之间的关系采用Ridit分析,不同癌前病变与细胞增殖程度之间的关系采用Kruskal-Wallis非参数检验方法进行分析。Ridit分析用Excel实现,其他分析均以SAS 8.2(SAS Institute, Cary, NC, USA)统计软件实现,P值取双侧,以0.05为临界值。

2 结果

在1523例受试者中,有最高诊断的为1475例,男780例,占52.9%,平均年龄51.0±6.5岁;女695例,占47.1%,平均年龄50.5±6.3岁,受试者不同胃黏膜病变的年龄、性别、吸烟及饮酒状况分布见表1。

从表1可以看出,各种癌前病变在不同性别间存在明显差异($P = 0.03$),而年龄、吸烟及饮酒状况在不同病变中的分布均无明显差别($P > 0.05$)。

2.1 胃黏膜病变在胃内不同解剖部位的分布在1475例有最高诊断的受试者中,SG/N 92例(6.2%)、CAG 331例(22.4%)、IM 391例(26.5%)、Ind DYS 522例(35.4%)、DYS 139例(9.4%)。

因每位受试者均在胃内五个标准部位取胃黏膜活检,理论上1523例受试者应有标本数7615个,但实际操作中由于取材未达黏膜肌层或其他原因,实际分析标本数为7504个,其中诊断为SG/N 3076(41.0%)、CAG 1909(25.4%)、IM 1196(16.0%)、Ind DYS 1143(15.2%)、DYS 180(2.4%)。

我们对各种癌前病变在胃内发生部位进行了比较(表2),结果显示:胃体大弯主要以SG/N为主,占84.56%,随着病变的加重,检出比例逐渐下降。相反,发生在胃角和胃窦小弯的SG/N比例明显低于胃体大弯,而随着病变的加重,重度病变的检出比例明显高于胃体大弯,说明重度病变多集中在胃角和胃窦小弯处。

表 1 不同胃黏膜病变的性别、吸烟及饮酒状况比较

	SG/N	CAG	IM	Ind DYS	DYS	合计
年龄(岁)						
<45	9	67	73	119	14	282
≥45	83	264	318	403	125	1193
性别						
男	71	190	176	259	84	780
女	21	141	215	263	55	695
吸烟状况						
吸烟	49	125	113	181	66	534
不吸烟	43	204	278	341	72	938
饮酒状况						
饮酒	46	137	125	191	68	567
不饮酒	46	192	265	329	70	902

表 2 各种胃黏膜病变在胃内不同部位的检出率(%)

胃内部位	SG/N	CAG	IM	Ind DYS	DYS	合计(n)
胃体小弯	47.43	18.34	19.00	13.32	1.91	1516
胃体大弯	84.56	9.48	3.25	2.65	0.07	1509
胃角	19.19	31.58	19.85	24.12	5.26	1501
胃窦小弯	19.11	31.56	22.81	23.01	3.50	1486
胃窦大弯	34.12	36.53	14.88	13.20	1.27	1492

经Ridit分析显示, 癌前病变的严重程度在胃黏膜的不同部位之间存在明显差异($P<0.0001$)。胃内不同部位的平均Ridit值分别为: 胃体大弯0.27、胃体小弯0.48、胃窦大弯0.51、胃窦小弯0.62、胃角0.63, 表明胃体大弯的病变最轻, 其次为胃体小弯和胃窦大弯, 而胃角和胃窦小弯的病变程度最重。

2.2 不同胃黏膜病变细胞增殖水平的比较 为了比较不同胃黏膜病变细胞增殖水平, 我们对五个部位胃黏膜组织标本的Ki-67标记指数进行了分析。共有7300例组织标本完成了Ki-67免疫组化检测, 结果显示: Ki-67标记指数的均值和中位数均有随着病变的加重而逐渐增加趋势(图1), SG/N均值为 0.102 ± 0.085 (中位数: 0.078)、CAG均值为 0.136 ± 0.091 (中位数: 0.122)、IM均值为 0.157 ± 0.102 (中位数: 0.138)、Ind DYS均值为 0.181 ± 0.111 (中位数: 0.166)、DYS均值为 0.189 ± 0.117 (中位数: 0.152), 经趋势检验有显著性差异($P<0.0001$)。对胃内不同部位Ki-67标记指数进行比较, 结果发现, 胃体大弯处Ki-67标记指数的均值最低, 为 0.095 ± 0.079 (中位数: 0.070), 其次为胃体小弯, 均值为 0.128 ± 0.101 (中位数: 0.100), 胃窦大弯和胃窦小弯的均值分别为

表 3 各种胃黏膜病变细胞凋亡水平的比较

凋亡	胃黏膜病变(%)					合计(n)
	SG/N	CAG	IM	Ind DYS	DYS	
0	43.18	22.33	17.14	15.03	2.32	4044
≤2	40.84	27.23	14.53	14.96	2.44	1638
3-10	37.36	28.55	15.45	16.20	2.43	1191
>10	31.06	37.50	12.31	16.29	2.84	528

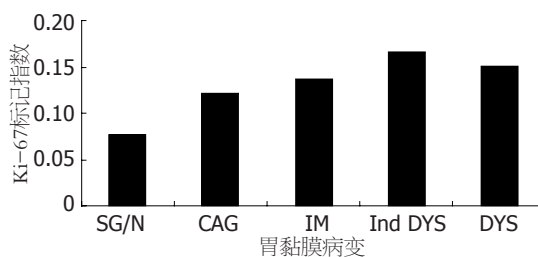


图 1 不同胃黏膜病变Ki-67标记指数中位数的比较

0.145 ± 0.097 (中位数: 0.126)和 0.149 ± 0.101 (中位数: 0.130), 而胃角处的均值最高, 为 0.152 ± 0.105 (中位数: 0.130), 经趋势检验有显著性差异($P<0.0001$)。

2.3 不同胃黏膜病变细胞凋亡水平的比较 共有7401例胃黏膜组织标本进行了凋亡细胞的原位检测。将细胞凋亡水平划分为四个数量级, 分别为: 凋亡细胞数为0, 小于等于2, 3-10及大于10个。通过对不同胃黏膜病变细胞凋亡水平进行比较(表3), 不同病变之间和解剖部位之间细胞凋亡水平没有明显差异($P=0.159$, $P=0.397$)。

3 讨论

本研究对一组胃癌高危人群胃内不同部位7000多例胃黏膜组织标本进行分析, 采用分子流行病学、病理学等多学科合作方式, 对不同胃黏膜病变的分布及不同病变细胞增殖、凋亡状况进行了系统研究, 在国内外尚属首次。

1988年Correa提出了肠型胃癌的发病假说^[23], 即在慢性胃炎病变基础上, 组织发生了肠上皮化生和异型增生的多阶段变化过程, 最终导致胃癌。我们在临朐县开展的前瞻性研究发现, 患有重度肠上皮化生和中重度异型增生的人群发展为胃癌的危险性分别增加20及100余倍^[12], 这种高强度关联充分证明胃癌的发生经历了多阶段的癌前病变过程。

由浅表性胃炎到异型增生的一系列病变在胃内不同部位存在明显差异。我们前期对临朐县胃癌及癌前病变进行分析发现, 70%的胃癌发

■应用要点

本研究结果为明确胃癌发生机制提供了重要依据。

■同行评价

本文条理清楚,文笔流畅,重点突出,样本数大,具有很好的科学意义。

生在胃窦或胃角,肠上皮化生和异型增生呈灶状分布但也多集中在胃窦或胃角^[12,24]。进一步对应分析表明,胃癌发生部位与肠上皮化生和异型增生高度对应。本次研究也发现,在胃癌高发区人群中,90%以上的人患有慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生和异型增生,并且重度病变多集中在胃角和胃窦小弯。这一结果再一次证明胃癌与癌前病变密切相关,是多阶段演变过程导致的最终结果。

在正常情况下,细胞增殖和凋亡处于平衡,胃黏膜上皮才能维持生理功能,在慢性炎症时,在炎症因子或其他因素的持续作用下,细胞生长调控系统发生紊乱,导致细胞过度增殖,凋亡受阻,平衡失调^[8,10],最终导致胃癌的发生。

在明确胃黏膜病理形态学变化的同时,对不同病变细胞增殖和凋亡进行比较,发现随着胃黏膜病变的加重,细胞增殖水平逐渐增高,不同病变之间差异明显,两者存在明显的相关性。另外,研究还发现,细胞增殖状况在胃内并非随机分布,Ki-67标记指数在浅表性胃炎分布较为集中的胃体大弯处最低,而以肠上皮化生和异型增生较为集中的胃角和胃窦小弯处最高,再一次证明两者高度相关,既随着病变的加重,细胞增殖水平逐渐增加。

与细胞增殖一样,细胞凋亡对维持胃黏膜正常机能发挥同等重要作用。在对7000余例组织标本研究发现,随着病变加重,细胞增殖趋于活跃,但细胞凋亡程度并未相应增加,因而造成细胞增殖和凋亡失衡,增加发生癌变的危险。韩国Lee *et al*^[25]研究发现,在幽门螺杆菌感染组,细胞增殖和凋亡水平均明显增加,并且随着病变的加重,从慢性萎缩性胃炎到肠上皮化生细胞凋亡指数和增殖指数的比值逐渐降低。一些研究也表明,幽门螺杆菌感染能促进胃黏膜上皮细胞的增殖和凋亡,并且,不同幽门螺杆菌菌株之间存在明显差异^[9,10,26]。另外,研究还发现,不同病变之间细胞增殖、凋亡相关基因如p53、Bax、Bcl-2的表达也存在差异^[27-30]。然而,在不同胃黏膜病变阶段包括从浅表性胃炎到异型增生这一系列病变过程中细胞增殖和凋亡状况如何,尚未见报道。我们的结果表明,在癌前病变阶段,随着病变的加重,细胞增殖的速度明显增加,但细胞凋亡程度却未见差异,说明在癌前病变阶段已经存在细胞增殖和凋亡失衡,并且可能随着病变的加重,这种失衡状态越明显。

本研究尚存在一些不足之处。首先,我们只

分析了不同胃黏膜病变的细胞增殖和凋亡状况,对细胞增殖、凋亡相关基因的表达状况尚未深入研究。其次,未对幽门螺杆菌感染与细胞增殖和凋亡的关系进行分析。

总之,本研究通过在胃癌高发区大样本的人群流行病学研究,再次明确了不同胃黏膜病变的分布规律,并发现随着胃黏膜病变的加重,细胞增殖水平逐渐加快,但细胞凋亡程度在不同病变之间未见差异,从而导致癌前病变的进展,增加胃癌发生的风险。

4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 8: S4-S66
- 2 Parkin DM, Muir CS. Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* 1992; : 45-173
- 3 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 4 游伟程. 胃癌. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2006: 52-61
- 5 Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1995; 333: 32-41
- 6 Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 28-37
- 7 Shiotani A, Iishi H, Ishiguro S, Tatsuta M, Nakae Y, Merchant JL. Epithelial cell turnover in relation to ongoing damage of the gastric mucosa in patients with early gastric cancer: increase of cell proliferation in paramalignant lesions. *J Gastroenterol* 2005; 40: 337-344
- 8 Konturek PC, Kania J, Konturek JW, Nikiforuk A, Konturek SJ, Hahn EG. H. pylori infection, atrophic gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PPAR gamma and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis. *Med Sci Monit* 2003; 9: SR53-SR66
- 9 Yu J, Leung WK, Go MY, Chan MC, To KF, Ng EK, Chan FK, Ling TK, Chung SC, Sung JJ. Relationship between Helicobacter pylori babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut* 2002; 51: 480-484
- 10 Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by Helicobacter pylori infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 16-26
- 11 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-789
- 12 You WC, Li JY, Blot WJ, Chang YS, Jin ML, Gail MH, Zhang L, Liu WD, Ma JL, Hu YR, Mark SD, Correa P, Fraumeni JF Jr, Xu GW. Evolution of precancerous lesions in a rural Chinese population at high risk of gastric cancer. *Int J Cancer* 1999; 83: 615-619
- 13 You WC, Li JY, Zhang L, Jin ML, Chang YS, Ma JL, Pan KF. Etiology and prevention of gastric cancer: a population study in a high risk area of China. *Chin J Dig Dis* 2005; 6: 149-154
- 14 游伟程. 胃癌及癌前病变的研究与干预——23年胃

- 癌高发现场的实践. 北京大学学报(医学版) 2006; 38: 565-570
- 15 Liu F, Pan K, Zhang X, Zhang Y, Zhang L, Ma J, Dong C, Shen L, Li J, Deng D, Lin D, You W. Genetic variants in cyclooxygenase-2: Expression and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population. *Gastroenterology* 2006; 130: 1975-1984
 - 16 Zhang L, Shen L, Ma JL, Pan KF, Liu WD, Li J, Xiao SD, Lin SR, Classen M, You WC. Eradication of H pylori infection in a rural population: one-day quadruple therapy versus 7-day triple therapy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3915-3918
 - 17 Lu W, Pan K, Zhang L, Lin D, Miao X, You W. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor {alpha} and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2005; 26: 631-636
 - 18 You WC, Zhang L, Gail MH, Chang YS, Liu WD, Ma JL, Li JY, Jin ML, Hu YR, Yang CS, Blaser MJ, Correa P, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Xu GW. Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1607-1612
 - 19 You WC, Zhang L, Yang CS, Chang YS, Issaq H, Fox SD, Utermahlen WE, Zhao L, Keefer L, Liu WD, Chow WH, Ma JL, Kneller R, Ho MY, Fraumeni JF Jr, Xu GW, Blot WJ. Nitrite, N-nitroso compounds, and other analytes in physiological fluids in relation to precancerous gastric lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 47-52
 - 20 You WC, Brown LM, Zhang L, Li JY, Jin ML, Chang YS, Ma JL, Pan KF, Liu WD, Hu Y, Crystal-Mansour S, Pee D, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Xu GW, Gail MH. Randomized double-blind factorial trial of three treatments to reduce the prevalence of precancerous gastric lesions. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 974-983
 - 21 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181
 - 22 Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, Riddell RH, Sipponen P, Watanabe H. Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 167-176
 - 23 Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48: 3554-3560
 - 24 You WC, Blot WJ, Chang YS, Li JY, Jin M, Zhao YX, Kneller RW, Xie YQ, Zhang L, Xu GW. Comparison of the anatomic distribution of stomach cancer and precancerous gastric lesions. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 1150-1153
 - 25 Lee KM, Lee DS, Yang JM, Ahn BM, Lee EH, Yoo JY, Kim YJ, Chung IS, Sun HS, Park DH. Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cell kinetics and expression of apoptosis-related proteins in gastric carcinogenesis. *Korean J Gastroenterol* 2003; 42: 12-19
 - 26 Zhang Z, Yuan Y, Gao H, Dong M, Wang L, Gong YH. Apoptosis, proliferation and p53 gene expression of H. pylori associated gastric epithelial lesions. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 779-782
 - 27 Kurosawa A, Miwa H, Hirose M, Tsune I, Nagahara A, Sato N. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by Helicobacter pylori through increased phosphorylated p53, p21 and Bax expression in endothelial cells. *J Med Microbiol* 2002; 51: 385-391
 - 28 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. Helicobacter pylori infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 107-113
 - 29 Vukobrat-Bijedić Z, Radović S, Husić-Selimović A, Gornjaković S. Tumor suppresser gene p53 expression in premalignant lesions and gastric carcinoma - prognostic value. *Bosn J Basic Med Sci* 2007; 7: 7-10
 - 30 Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer* 2002; 2: 8

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

凋亡抑制因子Survivin和Livin在胃癌中的表达及意义

程平, 秦蓉, 张红, 吴继锋, 王道斌

■背景资料

Survivin和Livin是IAP家族中的两名新成员, 在肿瘤组织异常高表达并与肿瘤的浸润、转移甚至预后密切相关。但二者在胃癌中的亚细胞表达与其病理病因和预后关系的相关报道尚未见。

程平, 秦蓉, 张红, 吴继锋, 安徽医科大学基础医学院病理学教研室 安徽省合肥市 230032

王道斌, 安徽医科大学第一附属医院中心实验室 安徽省合肥市 230022

程平, 2005年安徽医科大学本科, 现硕士在读, 主要从事消化系统疾病的病理研究。

安徽省教育厅自然科学基金资助项目, No. JK341B

作者贡献分布: 秦蓉与程平对此文所作贡献两均等; 此课题由秦蓉, 张红, 吴继锋及程平设计; 研究过程由程平, 张红, 王道斌操作完成; 数据分析由程平, 秦蓉完成; 本论文写作由秦蓉, 程平完成。

通讯作者: 秦蓉, 230032, 安徽医科大学基础医学院病理学教研室, rongqincn@yahoo.com.cn

电话: 0551-5161130 传真: 0551-5211189

收稿日期: 2007-11-19 修回日期: 2008-01-25

Expression of Survivin and Livin in gastric cancer and its clinical significance

Ping Cheng, Rong Qin, Hong Zhang, Ji-Feng Wu, Dao-Bing Wang

Ping Cheng, Rong Qin, Hong Zhang, Ji-Feng Wu, Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Dao-Bing Wang, Central Laboratory, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of the Department of Education of Anhui Province, No. JK341B

Correspondence to: Dr. Rong Qin, Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China. rongqincn@yahoo.com.cn

Received: 2007-11-19 Revised: 2008-01-25

Abstract

AIM: To investigate the expression of Survivin and Livin of apoptosis inhibitors in gastric cancer cells.

METHODS: Immunohistochemical staining (S-P method) for Survivin and Livin was performed in 70 gastric cancer tissue samples and 48 adjacent tissue samples and BGC-823 cell, and its relationship with clinical pathological features and prognosis was analyzed.

RESULTS: Survivin and Livin were detected both in cytoplasm and in nuclei of gastric cancer cells. The expression of Survivin and Livin was higher in gastric cancer tissue samples than in adjacent tissue samples (32.86% vs 2.08%,

44.29% vs 4.17%, $P < 0.01$). Their expression in cytoplasm was significantly related with the differentiation degree ($P = 0.007$, $P = 0.018$) and histological type ($P = 0.005$, $P = 0.049$) of gastric cancer. The expression of Survivin in cytoplasm was significantly related with distant metastasis of gastric cancer. The expression of Survivin in nuclei was correlated with the growth pattern and distant metastasis of gastric cancer. The 5 years survival rate of gastric cancer patients having a high Survivin expression was lower than that of those having a low Survivin expression (40% vs 66%, $P = 0.04$).

CONCLUSION: Survivin and Livin are over-expressed in gastric cancer cells. A high Survivin expression in nuclei can serve as an important parameter of prognosis of gastric carcinoma patients.

Key Words: Gastric neoplasma; Survivin; Livin; BGC-823 cell; Immunohistochemistry

Cheng P, Qin R, Zhang H, Wu JF, Wang DB. Expression of Survivin and Livin in gastric cancer and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 850-855

摘要

目的: 探讨凋亡抑制因子Survivin和Livin在胃癌中的表达和临床病理因素及预后的关系。

方法: 采用免疫组化SP法检测胃癌组织70例、癌旁组织48例及人胃癌细胞株BGC-823中Survivin及Livin的表达, 分析Survivin和Livin的表达与临床病理因素及预后之间的关系。

结果: Survivin和Livin在胃癌组织的高表达率显著高于癌旁组织(32.86% vs 2.08%, 44.29% vs 4.17%, $P < 0.01$); 胞质Survivin和Livin高表达与胃癌的分化程度($P = 0.007$, $P = 0.018$)及组织学类型有关($P = 0.005$, $P = 0.049$), 胞质Survivin还与胃癌转移有关; 胞核Survivin高表达与胃癌的生长方式及远处转移有关, 其5年生存率明显低于Survivin核阴性和低表达组(40% vs 66%, $P = 0.04$)。

■同行评议者

熊斌, 教授, 武汉大学中南医院肿瘤科

结论: Survivin、Livin可作为判断胃癌恶性程度和预后的标志。

关键词: 胃肿瘤; Survivin; Livin; BGC-823细胞; 免疫组织化学

程平, 秦蓉, 张红, 吴继锋, 王道斌. 凋亡抑制因子Survivin和Livin在胃癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 850-855

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/850.asp>

0 引言

凋亡是一种程序性细胞死亡, 广泛参与细胞的各种生理、病理过程, 不仅对细胞发生、分化和维持机体稳态都有很重要的作用, 而且还可以通过清除变异的细胞和改变基因表达阻止细胞发生转化。因此, 如果凋亡被抑制, 基因发生突变的细胞就会得以继续生存, 从而通过突变导致肿瘤的发生和发展。IAPs(inhibitors of apoptosis proteins)是一组以抑制caspase为主要作用机制的凋亡调控因子。其中Survivin和Livin是IAPs家族中最具有表达特异性的两种凋亡抑制蛋白, 在人类多种肿瘤组织中异常表达^[1]。Lopes *et al*研究表明Survivin、Livin在肿瘤组织中高表达与肿瘤的发生发展、转移甚至预后相关^[2-5]。Ponnelle *et al*认为Survivin和Livin的生物学功能与其亚细胞定位密切相关, 但在胃癌中的亚细胞表达情况与其生物学功能的关系尚未见相关报道^[6-8]。本研究旨在观察凋亡抑制蛋白Survivin及Livin在胃癌组织中的表达和亚细胞定位与病理病因及预后的关系并探讨其在人胃癌细胞株BGC-823中的表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料 收集安徽医科大学第一附属医院病理科2000-01/2006-12间胃癌手术切除标本70例, 术前均无放化疗。男性52例, 女性18例; 年龄35-87(中位年龄61)岁; 70例均有完整随访资料, 随访时间1-82 mo, 中位随访时间16 mo。按WHO胃癌组织学分类及分级标准归类(表1)。以48例癌旁胃黏膜组织为对照。人胃癌细胞株BGC-823(蚌埠医学院病理教研室于东红教授惠赠, 源自中国科学院上海细胞生物研究所)培养于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中, 置37℃、50 mL/L CO₂的培养箱, 取对数生长期细胞用于实验。兔抗人Survivin多克隆抗体购于Labvision生物公司(Rb-6), 兔抗人Livin多克隆抗体购于武汉博士德

生物公司(BA1743); 免疫组化SP试剂盒均购自福州迈欣生物技术公司, DAB显色试剂盒购于北京金桥生物技术公司, DMEM购自Gibco公司。

1.2 方法 免疫组化染色: 所有组织标本经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μm厚切片, 0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液抗原修复, SP免疫组化染色。所用抗Survivin抗体浓度为1:100, 抗Livin抗体浓度为1:50。染色步骤按说明书进行, DAB显色, 苏木素复染, 透明封固。以已知的阳性切片作阳性对照(阳性对照: Survivin以人胃腺癌上皮, Livin以人乳腺癌上皮), 以PBS代替一抗作阴性对照。取对数生长期的BGC-823细胞接种于6孔板中(含多聚赖氨酸处理过的盖玻片), 置37℃、50 mL/L CO₂的培养箱中培养过夜, 950 mL/L乙醇固定30 min, SP免疫组化染色, 方法同上。Survivin及Livin阳性结果判定标准^[9]: 以胞核和(或)胞质出现黄色或黄棕色染色为阳性细胞。随机观察10个高倍镜(400×)视野, 阳性表达细胞数<5%为0分, 5%-24%为1分, 25%-49%为2分, >50%为3分, 0分为表达阴性, 1分为表达弱阳性, 2-3分为表达强阳性。

统计学处理 应用SPSS10.0软件进行统计学分析。根据资料性质使用 χ^2 检验、Spearman检验、Wilcoxon秩和检验和Kruskal-Wallis法。采用Kaplan-Meier法分析生存率并经Log rank检验。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果 Survivin、Livin阳性染色主要位于胃癌细胞的胞质和(或)细胞核。Survivin高表达率为32.86%(23/70), 胞质、胞核Survivin高表达率均为28.57%(20/70), 癌旁组织Survivin高表达率为2.08%(1/48)。Livin高表达率为44.29%(31/70), 胞质、胞核Livin高表达率分别为42.86%(30/70), 40%(28/70), 癌旁Livin高表达率为4.17%(2/48)。胃癌组织Survivin及Livin高表达率显著高于癌旁组织($P<0.01$, 图1)。

2.2 胃癌不同分化程度及不同组织学类型中Survivin和Livin的表达 胞质Survivin, Livin表达在高、中、低分化腺癌间差异有显著性($P<0.05$); 胞质Survivin表达在乳头状腺癌与差分化腺癌之间差异有显著性($P<0.01$)。胞质Livin表达在差分化腺癌及黏液腺癌与乳头状腺癌之间差异有显著性($P<0.05$, 表1); 胞核Survivin、Livin表达与胃癌的分化程度及组织学类型均无明显相关性。

2.3 Survivin、Livin的表达与胃癌临床病理因素间的关系 浸润型胃癌胞核Survivin阳性

■创新盘点

本文首次在胃癌组织和细胞中系统研究并阐述了Survivin和Livin的亚细胞表达与临床病理病因和预后的关系及意义。

■应用要点

本研究有助于肿瘤发病机制的阐明,并为肿瘤的诊治提供更充分的理论依据。

表 1 胃癌不同分化程度及不同组织学类型中细胞质Survivin和Livin的表达

分组	n	Survivin				P值	Livin				P值
		-	+	++	高表达率(%)		-	+	++	高表达率(%)	
胃癌											
Ⅰ级	17	1	9	7	41.18	0.007	4	2	11	64.71	0.018
Ⅱ级	15	4	5	6	40		1	7	7	46.67	
Ⅲ级	38	15	16	7	18.42		15	11	12	31.58	
组织学类型											
乳头状腺癌	13	1	5	7	53.85 ^a	0.005	2	2	9	69.23 ^a	0.049
管状腺癌	19	4	9	6	31.58		3	7	9	47.37	
差分化腺癌	34	13	16	5	14.71		12	10	12	35.29 ^c	0.013
黏液细胞癌/ 黏液腺癌	4	2	0	2	50		3	1	0	0	

^a $P<0.05$ vs 差分化癌; ^c $P<0.05$ vs 黏液癌。

表达率为58.33%(7/12), 溃疡型胃癌阳性表达率为22.41%(13/58), 两者之间有明显差异($P<0.05$); 有远处转移组胞质(或核)Survivin阳性表达率为47.83%(11/23), 无远处转移组表达率19.15%(9/47), 胞质(或核)Survivin表达与胃癌远处转移呈正相关, 有明显的差异($P<0.05$)。Livin表达与胃癌的分级、分类有关, 与其余各临床病理因素间均无明显相关性。

2.4 Survivin表达与5年生存率的关系 70例患者, 29例死亡, 其中20例发生远处转移, 6例局部复发, 3例远处转移伴局部复发, 总5年生存率为58.6%(41/70)。胞核Survivin高表达组患者5年生存率为40%(8/20), 阴性表达组为66%(33/50), 两组间差异有统计学意义($P<0.05$, 图2)。

2.5 对影响胃癌预后的多因素分析 Survivin、Livin表达经两两比较发现均无相关性。COX回归分析表明仅临床分期TNM对预后有独立的影响(回归系数 = 20.86, $P = 0.00$)。

3 讨论

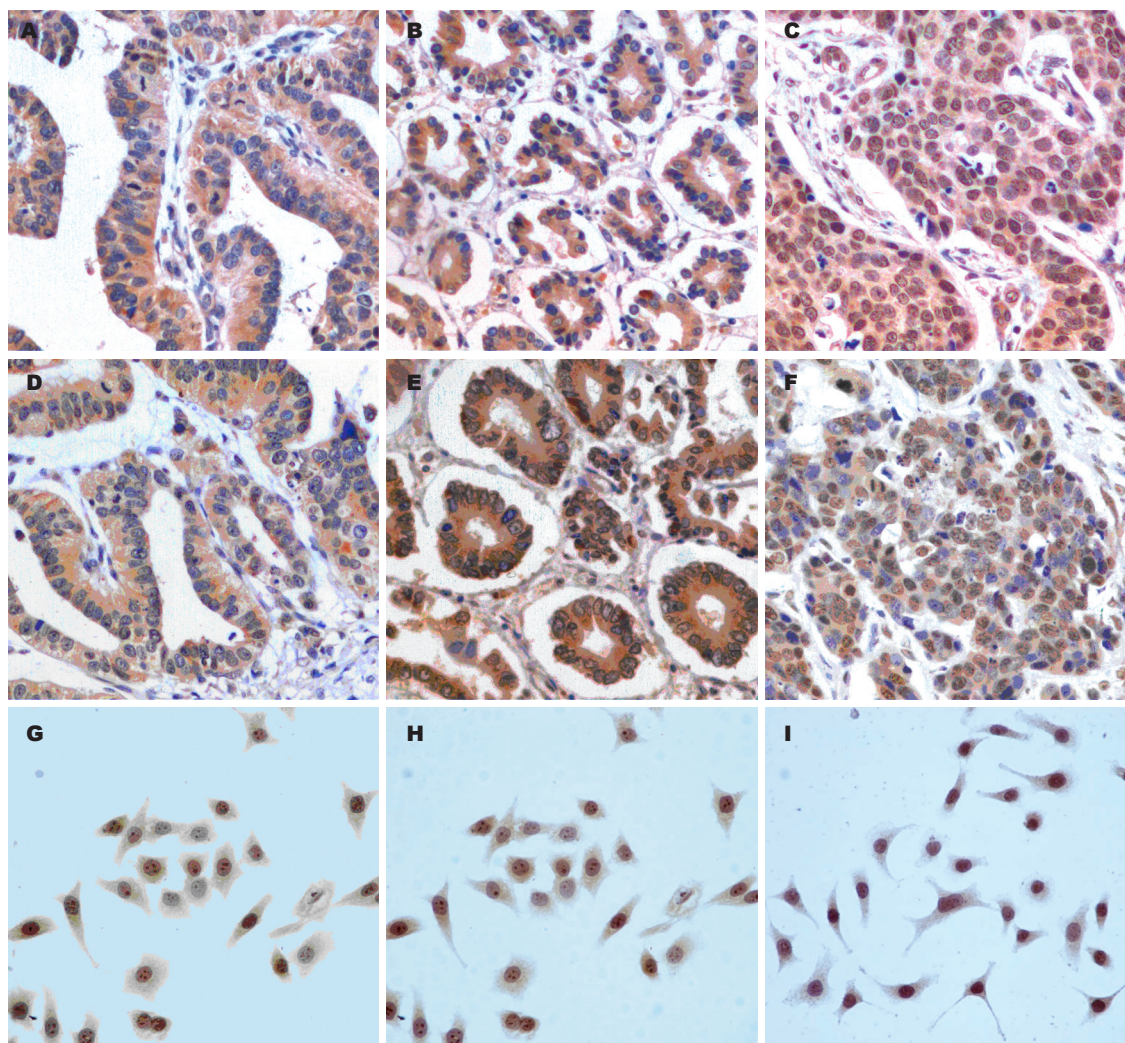
细胞的过度增殖和/或细胞凋亡受到抑制在肿瘤的发生与演进过程中发挥了重要的作用。IAPs是一组caspase抑制蛋白, 在人类中包括8个成员: c-IAP1, c-IAP2, NAIP, XIAP, Ts-IAP, Apollon, Survivin, Livin, 通过BIR结构域与caspase结合并抑制caspase活性, 发挥抗细胞凋亡的作用^[1]。其中Survivin和Livin是IAP家族中新发现的两种蛋白, 两者都可以直接或间接抑制caspase凋亡信号转导过程中的起始分子caspase-9的活化、活性以及效应分子caspase-3/-7的活性而阻断凋亡的发生过程^[10-11]。另外, Survivin在有丝分

裂期与纺锤体上的微管蛋白作用而调节细胞分裂, 在G2/M期高表达, 而在G1和S期迅速降解^[12]。Survivin和Livin的表达具有特异性, 在绝大多数分化成熟的组织(除胎盘等)不表达或低表达, 而在胚胎组织以及大多数实体瘤组织中高表达^[13-14]。

本研究发现Survivin在胃癌的细胞质或(和)细胞核高表达, 表达率均为28.57%; 癌旁胃黏膜组织可见少量表达, 明显低于胃癌组织的表达($P<0.01$)。这与Lee *et al*^[15], Chiou *et al*^[16]的报道的相一致。Livin主要表达在胃癌的细胞质或(和)细胞核, 高表达率分别为42.86%和40%, 癌旁胃黏膜组织也可见少量表达, 但明显低于胃癌组织的表达($P<0.01$)。此外, 细胞免疫组化亦已证实Survivin和Livin在人BGC-823胃癌细胞株中细胞核和细胞质均表达。

Survivin的亚细胞表达与预后关系, 相关文献报道还存在着一定的争议。Kleinber *et al*认为在卵巢癌^[7]、骨肉瘤^[17]、乳腺癌^[18]、膀胱癌^[19], 胞核Survivin的表达与预后成良性相关; 而在食道鳞状上皮癌^[20]、肺非小细胞癌^[21]、套细胞淋巴瘤^[22]中, 胞核Survivin的表达与预后成恶性相关。此外, Ponnelle *et al*^[23]发现在结肠癌组织中, 胞核Survivin的表达与患者3年生存率无相关性, 胞质Survivin表达组患者的3年生存率明显高于阴性组, 两者呈正相关。这可能是由于组织标本的来源和抗体不同或者Survivin亚细胞判定标准的不一致所致。本研究发现胞核Survivin高表达组患者的5年生存率明显低于阴性组, 胞质Survivin表达与预后无明显的相关关系。

Engels *et al*^[24]认为Survivin的生物学功能



■名词解释

凋亡抑制因子(IAP): 是一类N端含1-3个串联的杆状病毒IAP重复序列(BIR)的重要的抗细胞凋亡因子。

图1 Survivin、Livin在胃癌中的表达(S-P法×400倍). A: Survivin在乳头状腺癌的胞质呈阳性反应; B: Survivin在管状腺癌的胞质呈阳性反应; C: Survivin在差分化腺癌的胞质和胞核呈强阳性反应; D: Livin在乳头状腺癌的胞质呈阳性反应; E: Livin在管状腺癌的胞质呈强阳性反应; F: Livin在差分化腺癌的胞质和胞核呈强阳性反应; G: Survivin在BGC-823细胞的胞核和胞质均呈强阳性; H: Survivin在BGC-823细胞的胞质呈阳性; I: Livin在BGC-823细胞的胞核和胞质呈阳性。

与其亚细胞定位密切相关, 位于细胞核内的Survivin通过调节有丝分裂避免正常细胞的转化, 抑制肿瘤的发生发展; 胞质中的Survivin具有对抗化疗和(或)放疗的诱导凋亡行为, 从而抑制细胞凋亡, Falleni *et al*^[25]还发现胞质Survivin的表达可促进肿瘤的分化. 本研究中证实胞质Survivin的表达随胃癌的分级升高而增强, 肿瘤分化越好, 表达率越高. 胞质或胞核Survivin在发生远处转移的胃癌组织中的表达率明显高于未发生转移组($P<0.05$), 这提示Survivin高表达能促进胃癌细胞转移, 这种促肿瘤转移的能力与其表达强度相关, 而与其亚细胞的分布差异无相性. 此外, 胞核Survivin的表达率在浸润型胃癌组明显高于溃疡型胃癌组($P<0.05$), 这表明Survivin核表达与胃癌的生长方式有关. 本研究提示胃癌组织中胞质Survivin表达促进肿瘤分

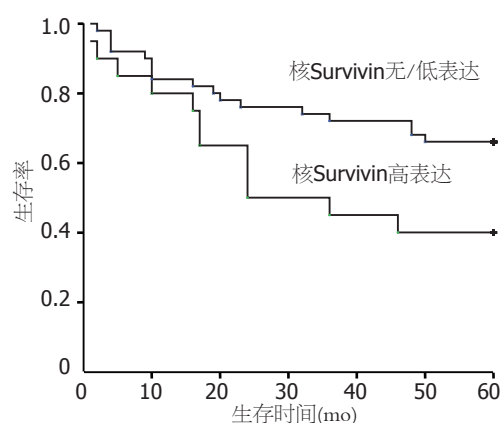


图2 核Survivin高表达组与低/无表达组胃癌患者生存曲线. $P<0.05$.

化, 而胞核Survivin表达促进肿瘤浸润生长和转移, 使得患者预后相对不良.

Nachmias *et al*^[26-27]研究发现细胞核和胞质

■同行评价

本文科学结论较明确, 实验证据充足, 讨论条理分明, 参考文献恰当, 具有一定的科学性和可读性。

共表达的Livin, 可以抑制caspase, 对抗细胞凋亡。而定位在细胞质的Livin是一种突变体(tLivin), 不仅失去抗凋亡活性, 而且获得诱导细胞凋亡的活性。但是关于Livin的亚细胞表达与临床病理因素及预后关系, 仅Nedelcu *et al*^[28]报道在高分化的骨肉瘤中胞核Livin表达与预后成负相关, 胞质Livin的表达与预后没有明显相关性。本实验发现胞质Livin高表达率随肿瘤分化程度的降低而下降, 即肿瘤分化越好, 表达率越高。Livin亚细胞表达与胃癌的复发、转移及5年生存率之间无明显相关性。虽然研究发现胞核或胞质Livin高表达组患者的5年生存率(46.43%, 53.33%)均低于阴性组(66.47%, 62.5%), 但是均无统计学意义。可能由于Livin亚细胞表达的判定标准还不完善或者本实验样本量较小引起。研究发现Survivin与Livin在鼻咽癌^[9], 胃癌中的表达都增强, 二者无相关性, 提示两者的上调机制有差异, 但是具体机制有待进一步研究。

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤, 严重威胁生命健康, 但是胃癌的发现常常在中晚期, 错过了良好的手术时期, 而胃癌对于化放疗都不敏感, 因此胃癌的治疗成为一大难题。研究表明, 利用RNA干扰技术能够在哺乳动物肿瘤细胞内阻断特异基因mRNA表达, 从而增强了肿瘤细胞对凋亡诱导剂的敏感。已有实验用siRNA技术沉默Survivin与Livin基因表达, 抑制肿瘤增殖并取得了一定的成效^[29-30]。初步的研究成果显示了Survivin与Livin可能成为抗肿瘤治疗的合适目标。

总之, 本研究表明Survivin和Livin在胃癌组织和细胞中高表达, 但Survivin与Livin表达之间无相关性。胃癌组织中胞核Survivin的表达可促进胃癌细胞的转移, 与患者的预后呈负相关, 可作为判断胃癌恶性程度和预后的辅助指标。

致谢: 衷心感谢安徽医科大学病理教研室赵文娣老师对本课题的大力协助和支持。

4 参考文献

- Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 231-243
- 耿婉如, 李宁, 余琦, 周会芹, 许红民. Survivin在大肠癌中表达的意义及其与Bcl-2的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 305-309
- 许远鸿, 欧阳兵, 于国志, 郭可建. Survivin、P16及RB表达与原发性胆囊癌发生和发展的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1389-1392
- Wagener N, Crnković-Mertens I, Vetter C, Macher-Göppinger S, Bedke J, Gröne EF, Zentgraf H, Pritsch M, Hoppe-Seyler K, Buse S, Haferkamp A,

- Autschbach F, Hohenfellner M, Hoppe-Seyler F. Expression of inhibitor of apoptosis protein Livin in renal cell carcinoma and non-tumorous adult kidney. *Br J Cancer* 2007; 97: 1271-1276
- Lopes RB, Gangeswaran R, McNeish IA, Wang Y, Lemoine NR. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *Int J Cancer* 2007; 120: 2344-2352
- Ponnelle T, Chapusot C, Martin L, Bouvier AM, Plenchette S, Faivre J, Solary E, Piard F. Cellular localisation of survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 504-510
- Kleinberg L, Flørenes VA, Silins I, Haug K, Trope CG, Nesland JM, Davidson B. Nuclear expression of survivin is associated with improved survival in metastatic ovarian carcinoma. *Cancer* 2007; 109: 228-238
- Chau GY, Lee AF, Tsay SH, Ke YR, Kao HL, Wong FH, Tsou AP, Chau YP. Clinicopathological significance of survivin expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 2007; 51: 204-218
- Xiang Y, Yao H, Wang S, Hong M, He J, Cao S, Min H, Song E, Guo X. Prognostic value of Survivin and Livin in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2006; 116: 126-130
- Kappler M, Rot S, Taubert H, Greither T, Bartel F, Dellas K, Hänsen G, Trott KR, Bache M. The effects of knockdown of wild-type survivin, survivin-2B or survivin-delta3 on the radiosensitization in a soft tissue sarcoma cells in vitro under different oxygen conditions. *Cancer Gene Ther* 2007; 14: 994-1001
- Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001; 276: 3238-3246
- Knauer SK, Bier C, Habtemichael N, Stauber RH. The Survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function. *EMBO Rep* 2006; 7: 1259-1265
- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; 22: 8581-8589
- Lin JH, Deng G, Huang Q, Morser J. KIAA, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 820-831
- Lee GH, Joo YE, Koh YS, Chung IJ, Park YK, Lee JH, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. Expression of survivin in gastric cancer and its relationship with tumor angiogenesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 957-963
- Chiou SK, Moon WS, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin expression in the stomach: implications for mucosal integrity and protection. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 374-379
- Trieb K, Lehner R, Stulnig T, Sulzbacher I, Shroyer KR. Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 379-382
- Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R, Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 1077-1083
- Lehner R, Lucia MS, Jarboe EA, Orlicky D, Shroyer AL, McGregor JA, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of the IAP

- protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10: 134-138
- 20 Grabowski P, Kühnel T, Mühr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Höpfner M, Germer CT, Scherübl H. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 88: 115-119
- 21 Shinohara ET, Gonzalez A, Massion PP, Chen H, Li M, Freyer AS, Olson SJ, Andersen JJ, Shyr Y, Carbone DP, Johnson DH, Hallahan DE, Lu B. Nuclear survivin predicts recurrence and poor survival in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 1685-1692
- 22 Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A, Marcé S, Villamor N, Ott G, Montserrat E, Campo E, Colomer D. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol* 2004; 164: 501-510
- 23 Ponnelle T, Chapusot C, Martin L, Bouvier AM, Plenchette S, Faivre J, Solary E, Piard F. Cellular localisation of survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 504-510
- 24 Engels K, Knauer SK, Metzler D, Simf C, Struschka O, Bier C, Mann W, Kovács AF, Stauber RH. Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. *J Pathol* 2007; 211: 532-540
- 25 Falleni M, Pellegrini C, Marchetti A, Oprandi B, Buttitta F, Barassi F, Santambrogio L, Coggi G, Bosari S. Survivin gene expression in early-stage non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2003; 200: 620-626
- 26 Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, Drize O, Kadouri L, Lotem M, Peretz T, Mandelboim O, Ben-Yehuda D. Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug-resistant melanoma. *Cancer Res* 2003; 63: 6340-6349
- 27 Nachmias B, Lazar I, Elmalech M, Abed-El-Rahaman I, Asshab Y, Mandelboim O, Perlman R, Ben-Yehuda D. Subcellular localization determines the delicate balance between the anti- and proapoptotic activity of Livin. *Apoptosis* 2007; 12: 1129-1142
- 28 Nedelcu T, Kubista B, Koller A, Sulzbacher I, Mosberger I, Arrich F, Trieb K, Kotz R, Toma CD. Livin and Bcl-2 expression in high-grade osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 237-244
- 29 Miao GY, Lu QM, Zhang XL. Downregulation of survivin by RNAi inhibits growth of human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1170-1174
- 30 Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene. *Oncogene* 2003; 22: 8330-8336

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末。标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体。(常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

胃癌组织TGF- β 1和TGF- β R1及其前体mRNA的表达意义

韩慧, 徐璐, 刘希双, 司海运, 王宝中

■背景资料

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一。最近研究发现, 转化生长因子- β (TGF- β)家族的分泌紊乱及其传导通路的中断与肿瘤的发生发展关系密切, 与恶性肿瘤的发展及转移有重要影响。

韩慧, 徐璐, 青岛大学医学院病理生理教研室 山东省青岛市 266021
刘希双, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266000
韩慧, 司海运, 王宝中, 聊城市人民医院肿瘤科 山东省聊城市 252000
韩慧, 青岛大学医学院病理生理教研室在职硕士, 医师。
国家自然科学基金资助项目, No. 30470642, No. 30670780
青岛市科技局资助项目, No. 05-1-JC-93
山东省卫生厅资助项目, No. 鲁卫科教函(2007)37
作者贡献分布: 韩慧与徐璐对此文所作贡献两均等; 此课题由韩慧, 徐璐及刘希双设计; 研究过程由韩慧, 徐璐, 刘希双, 司海运及王宝中操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由徐璐提供; 数据分析由韩慧, 徐璐完成; 本论文写作由韩慧, 徐璐及刘希双完成。
通讯作者: 徐璐, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大学医学院病理生理教研室. xu.luo@163.com
电话: 0532-82991713 传真: 0532-83813986
收稿日期: 2007-11-02 修回日期: 2008-02-27

Expression of transforming growth factor β 1 and its type I receptor in gastric cancer

Hui Han, Luo Xu, Xi-Shuang Liu, Hai-Yun Si, Bao-Zhong Wang

Hui Han, Luo Xu, Department of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Xi-Shuang Liu, Affiliated Hospital of Medical School of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China
Hai-Yun Si, Bao-Zhong Wang, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, Shandong Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30470642 and 30670780; Qingdao Scientific and Technique Division, No. 05-1-JC-93; Health Department of Shandong Province, No. (2007)37
Correspondence to: Dr. Luo Xu, Department of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, 38 Dengzhou Road, Qingdao 266021, Shandong Province, China. xu.luo@163.com
Received: 2007-11-02 Revised: 2008-02-27

Abstract

AIM: To evaluate the significance of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and its β I type receptor (TGF- β R1) in the pathogenesis of gastric carcinoma.

METHODS: TGF- β 1 and TGF- β R1 were detected by immunohistochemistry in and real-time PCR (RT-PCR) 50 cases of gastric carcinoma, 19 cases of atrophic gastritis and 18 cases of normal gastric mucosa.

RESULTS: Immunohistochemistry demonstrated that the positive expression rates of TGF- β 1 and TGF- β R1 were significantly higher in gastric carcinoma (80.0% and 75.0%) than in normal gastric mucosa (33.3 % and 27.8%) and atrophic gastritis (36.8 % and 36.8%) ($P < 0.01$). The lower the differentiation of gastric carcinoma was, the higher the expression of TGF- β 1 and TGF- β R1 was ($r = 35.58$, $P < 0.01$). Furthermore, the expression of TGF- β 1 and TGF- β R1 mRNA was significantly higher in gastric carcinoma than in normal gastric mucosa and atrophic gastritis (TGF- β 1: 4.20 ± 0.51 vs 9.15 ± 2.12 , 8.22 ± 1.81 ; TGF- β R1: 1.28 ± 0.48 vs 5.55 ± 1.48 , 4.19 ± 0.95).

CONCLUSION: High expression of TGF- β 1 and TGF- β R1 is correlated with the development, biologic behavior and prognosis of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Transforming growth factor- β 1; Transforming growth factor β I type receptor; Immunohistochemistry; Real time PCR

Han H, Xu L, Liu XS, Si HY, Wang BZ. Expression of transforming growth factor β 1 and its type I receptor in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 856-861

摘要

目的: 探讨TGF- β 1和TGF- β R1蛋白及其前体mRNA的表达与胃癌发生发展的关系。

方法: 采用免疫组化和实时PCR(real-time PCR)方法, 对胃癌50例、萎缩性胃炎19例和正常胃黏膜18例的TGF- β 1和TGF- β R1蛋白及其前体mRNA的表达进行检测。

结果: 胃癌组织中TGF- β 1和TGF- β R1蛋白表达明显增强, 其阳性率(80.0%和75.0%)明显高于正常胃黏膜组(33.3%和27.8%)及萎缩性胃炎组(36.8%和36.8%), 差异有显著性($P < 0.01$)。胃癌组织的分化程度越低, TGF- β 1、TGF- β R1蛋白表达的阳性率越高($r = 35.58$, $P < 0.01$)。同样, 胃癌组织中TGF- β 1和TGF- β R1前

■同行评议者

吴健雄, 教授, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院腹部外科

体mRNA的表达明显高于萎缩性胃炎组(TGF- β 1: 4.20 ± 0.51 vs 9.15 ± 2.12 , 8.22 ± 1.81 ; TGF- β R1: 1.28 ± 0.48 vs 5.55 ± 1.48 , 4.19 ± 0.95).

结论: TGF- β 1和TGF- β R1的高表达与胃癌的发生发展、生物学行为和预后可能有关.

关键词: 胃肿瘤; 转化生长因子- β 1; 转化生长因子受体- β 1; 免疫组化; 实时聚合酶链式反应

韩慧, 徐璐, 刘希双, 司海运, 王宝中. 胃癌组织TGF- β 1和TGF- β R1及其前体mRNA的表达意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 856-861

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/856.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一. 据统计, 中国胃癌患者的死亡率占全部恶性肿瘤的首位. 与其他恶性肿瘤一样, 胃癌的发生机制不明. 最近研究发现, 转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)家族的分泌紊乱及其传导通路的中断与肿瘤的发生发展关系密切. 在TGF- β 家族中, 人类有TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3三种形态存在, 三者的生物学作用相似, 其中TGF- β 1含量最高且具有代表性. TGF- β 1是一多功能细胞生长因子, 为DPC4基因的信号传递蛋白, 他通过与其受体(如TGF- β R1)结合能抑制多种细胞的增殖、分化并促进细胞间质的形成^[1-2]. 已证实TGF- β 1、TGF- β R1表达与恶性肿瘤生物学行为和预后密切相关^[3-8]. DPC4基因为抑癌基因, 其蛋白产物Smad4对恶性肿瘤的发生发展及转移有重要影响^[9]. 因此, 我们采取免疫组织化学和分子生物学方法, 对胃癌组织中TGF- β 1、TGF- β R1蛋白及其前体mRNA的表达进行了检测, 以了解胃癌组织细胞中TGF- β 1和TGF- β R1的表达状况, 探讨其生物学意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集青岛大学医学院附属医院病理科和聊城市人民医院病理科新鲜标本87例, 其中胃癌50例, 萎缩性胃炎19例, 正常胃黏膜18例. 50例胃癌中, 男36例, 女14例, 年龄37-69岁. 取材后立即放入液氮中备用. 病理诊断全部经2名以上高年资病理医师按WHO肿瘤国际组织学分类标准复查.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 切片脱蜡至水洗, 滴加

30 mL/L过氧化氢20 min以抑制内源性过氧化物酶; 0.01 mol/L PBS冲洗, 正常羊血清封闭非特异性抗原20 min, 倾去后滴加TGF- β 1一抗(1:100, 美国Sigma公司), 4℃湿盒内孵育过夜, 0.01 mol/L PBS洗5 min 3次, 滴加二抗(生物素标记)室温30 min, 经0.01 mol/L PBS冲洗后滴加SABC(室温20 min), DAB显色液显色3-10 min, 自来水终止, 苏木精复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片观察. 采用PBS液代替一抗作阴性对照, 已知阳性标本作阳性对照. TGF- β 1和TGF- β R1免疫阳性细胞的结果判定以组织细胞中出现棕色或棕褐色颗粒为准, 每张切片随机观察5个视野, 每个视野观察100个细胞, 共计数500个细胞中染色阳性的细胞数, 根据阳性细胞的多少分为I级(<30%), II级(30%-70%)和III级(>70%).

1.2.2 总RNA的提取和单链cDNA合成: 取组织标本50-100 mg, 加入TRIzol(Invitrogen公司产品)1 mL, 冰冷状态下匀浆. 按每毫升TRIzol试剂添加氯仿0.2 mL, 振荡15 s, 室温下放置2-3 min, 12 000 g离心15 min(4℃), 保留上层水相. 按每毫升TRIzol加异丙醇0.5 mL, 混匀, 室温放置10 min, 12 000 g离心10 min(4℃), 弃上清留沉淀. 用750 mL/L的乙醇1 mL漂洗RNA沉淀, 7500 g离心5 min(4℃). 用无RNA酶水重溶RNA, 紫外分光光度计测A值, $A_{260/280}$ 比值为1.9-2.2取总RNA 3 μ L(1g/L), 引物Oligo-d(T16)1 μ L(10 nmol/L), 10 \times RT缓冲液2 μ L, dNTPs 2.5 mmol/L 4 μ L, Rnase抑制剂1 μ L, AMV逆转录酶1 μ L(Invitrogen公司产品), 至反应总体积为20 μ L. 反应条件: 42℃ 1 h; 95℃ 5 min.

1.2.3 实时PCR(Real Time PCR)实验: 实时动态定量PCR采用5700型定量PCR仪(PE公司产品)对各种mRNA起始拷贝进行分析^[10]. 以看家基因GAPDH设为内参, 分别取正常对照组、萎缩性胃炎和胃癌组织, 提取总RNA, 并反转录为单链cDNA(ss-cDNA), 各取ss-cDNA产物1 μ L作为待测样品. 所有的待测样品均一式两份, 分别对TGF- β 1、TGF- β R1和GAPDH进行扩增(引物见表1), 扩增反应应用SYBR Green I 定量PCR试剂盒(日本东洋坊公司)和5700型定量PCR仪完成, 扩增条件: 95℃ 1 min预变性, 然后按95℃ 30 s, 54℃ 15 s, 72℃ 15 s, 共做40个循环. 最后按照94℃ 0 s, 55℃ 15 s, 94℃ 0 s作熔解曲线, 温度变化速度为0.1℃/s. 反应结束后, 由电脑自动分析计算出定量结果. 将不含ss-cDNA模板的PCR反应体系设为阴性对照.

■ 研究前沿

据统计中国胃癌患者的死亡率占全部恶性肿瘤的首位. 与其他恶性肿瘤一样, 胃癌的发生机制不明. 最近研究发现, 转化生长因子- β 与肿瘤的发生发展关系密切. 研究热点在于探讨胃癌组织中TGF- β 1、TGF- β R1蛋白及其前体mRNA在胃癌组织表达及其生物学意义.

■相关报道

近年,国内外学者发现TGF- β 1和TGF- β R1的表达与肝癌、肠癌的生长、转移、浸润及其预后有着密切关系。阳性表达者TGF- β 1表达增多,肿瘤生长慢、不易转移和浸润,预后良好。

表 1 扩增人TGF- β 1和 TGF- β R1前体mRNA的引物

寡核苷酸	序列
TGF- β 1.for	5'-CACCCGCGTGCTAATGG-3'
TGF- β 1.rev	5'-ATGCTGTGTGTACTCTGCTTGAAC-3'
TGF- β R1.for	5'-ACCTTCTGATCCATCCGTT-3'
TGF- β R1.rev	5'-CGCAAAGCTGTCAGCCTAG-3'
Oligo-dT ₁₆ anchor primer	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC(T) ₁₆ -3
GAPDH.for	5'-AGCTGAACGGGAAGCTCAC-3'
GAPDH.rev	5'-GCTGTTGAAGTCAGAGGAGAC-3'

表 2 胃癌组织中TGF- β 1蛋白的表达

分组	TGF- β 1					TGF- β R1			
	<i>n</i>	I	II	III	阳性率(%)	I	II	III	阳性率(%)
正常胃黏膜	18	5	1	0	33.3	4	1	0	27.8
萎缩性胃炎	19	4	3	0	36.8	5	2	0	36.8
胃癌	50	10	19	11	80.0 ^a	8	18	9	75.0 ^a

^a $P<0.05$ vs 胃癌。

统计学处理 数据均用mean \pm SD表示,多组间率的比较采用R \times C列联表卡方检验。实时PCR结果分析用 Δ Ct值表示^[11],即 Δ Ct = CtTGF- β 1/CtGAPDH, χ^2 检验进行两组间比较, $P<0.05$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中TGF- β 1和TGF- β R1蛋白的表达 胃癌组织中TGF- β 1和TGF- β R1蛋白阳性表达率显著高于正常胃组织(图1A-B)和萎缩性胃炎组(图1C-D)($P<0.01$,表2-3),但萎缩性胃炎与正常对照组无显著差异($P>0.05$)。棕黄色颗粒物质分布于胞核、胞质和间质中。阳性细胞多见于癌巢坏死区的周边,有时密集成团,部分黏液腺癌的阳性物质弥漫分布于间质或腺体的腔膜面或腺腔中(图1E-F)。低分化胃癌组织TGF- β 1, TGF- β R1阳性表达率高于高/中分化组(9/10, 9/10 vs 2/13, 3/13; 16/27, 16/27),差异均有显著性($P<0.05$)。27例TGF- β 1阳性组织中, TGF- β R1阳性22例; 23例TGF- β 1阴性组织中TGF- β R1阴性18例,两者表达阳性率呈正相关($P<0.05$)。

2.2 胃癌组织中TGF- β 1和TGF- β R1 mRNA的表达 与正常对照组和萎缩性胃炎组相比,胃癌组织中TGF- β 1和TGF- β R1 mRNA的表达明显增加($P<0.05$);但萎缩性胃炎组与正常组相比TGF- β 1和TGF- β R1 mRNA的表达无显著改变

表 3 胃癌组织中TGF- β 1和TGF- β R1 mRNA的表达

分组	<i>n</i>	Δ Ct _{TGF-β1-GAPDH}	Δ Ct _{TGF-β R1-GAPDH}
正常胃黏膜	18	8.22 \pm 1.81 ^b	4.19 \pm 0.95 ^b
萎缩性胃炎	19	9.15 \pm 2.12 ^b	5.55 \pm 1.48 ^b
胃癌	50	4.20 \pm 0.51	1.28 \pm 0.48

^b $P<0.01$ vs 胃癌。

($P>0.01$,表3,图2)。

3 讨论

恶性肿瘤在体内发生发展是一个错综复杂的过程,受到多种相关基因的调控。多种肿瘤组织TGF表达增高,并参与肿瘤增殖、分化及凋亡等病理生理过程^[12-16]。TGF- β 是一族结构和功能密切相关的活性多肽, TGF- β 1是这一家族的主要成员。TGF- β 1是多类细胞增殖抑制剂,广泛参与细胞的分化、增殖、形态改变、黏附、转移、细胞外基质产生及凋亡等^[17-20]。

在体外TGF- β 1可通过阻止细胞从G₁→S期,对上皮起源细胞有明显的生长抑制作用^[14],恶性肿瘤中常有TGF- β 1表达降低或缺失^[21]。近年,国内外学者发现TGF- β 1和TGF- β R1的表达与肝癌、肠癌的生长、转移、浸润及其预后有着较密切关系^[22-23]。阳性表达者TGF- β 1表达增多,肿瘤生长慢、不易转移和浸润,预后良好。本组资料也显示,组织学分级 I 级、癌细胞浸润未

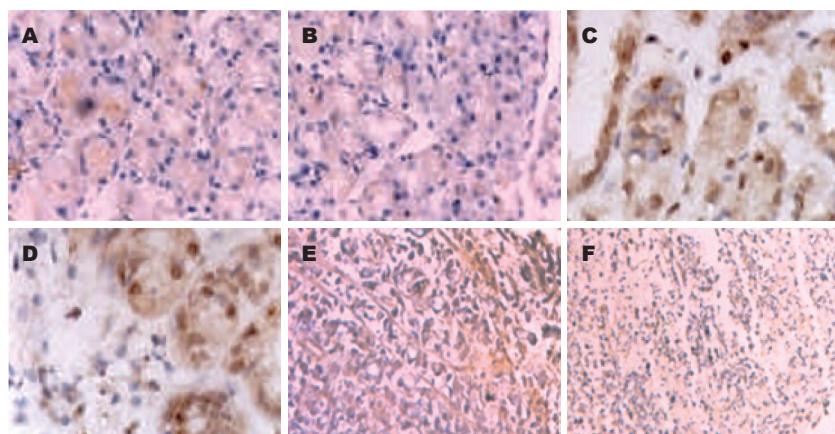


图1 胃黏膜组织TGF- β 1和TGF- β R1的表达. A-B: 正常胃黏膜组织TGF- β 1和TGF- β R1的表达(SABC \times 400); C-D: 萎缩性胃炎组织TGF- β 1和TGF- β R1的表达(SABC \times 600); E-F: 胃癌组织TGF- β 1和TGF- β R1的表达(SABC \times 100).

应用要点

胃癌组织细胞中TGF- β 1和TGF- β R1的表达的研究为临床胃癌早期诊断和预后判断提供的有价值的实验依据.

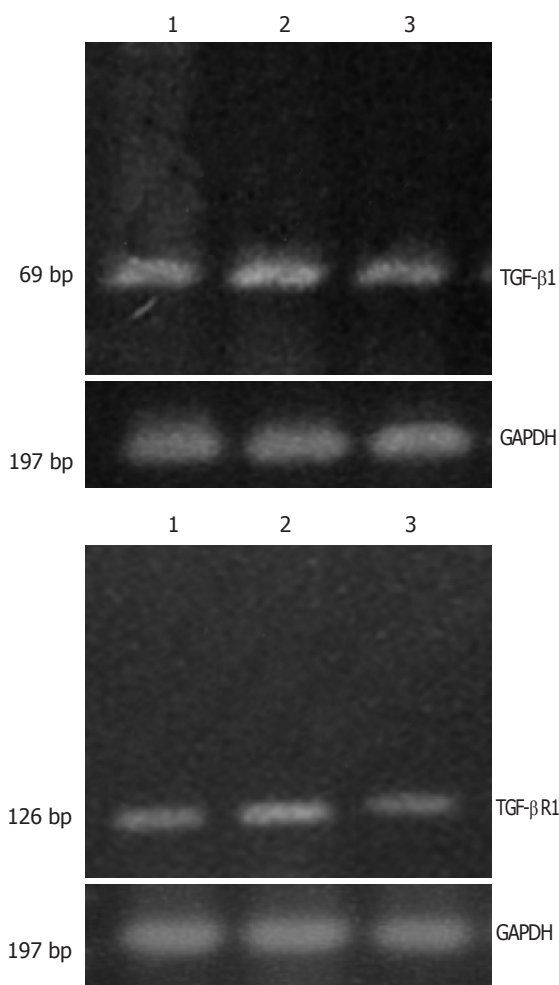


图2 胃癌组织TGF- β 1和TGF- β R1 mRNA的表达. 1: 正常胃黏膜; 2: 胃癌; 3: 萎缩性胃炎.

至深肌层和无淋巴结转移的胃癌其TGF- β 1和TGF- β R1阳性率明显高于组织学分级Ⅲ级(癌细胞浸润至深肌层或浆膜层和淋巴结转移)的胃癌, 提示TGF- β 1和TGF- β R1可能在抑制胃癌生长、转移和浸润方面有重要作用.

TGF- β 信号转导通路的机制是^[12]: TGF- β 配体与膜受体(最常见的是Ⅰ和Ⅱ型)结合后,

形成Ⅰ和Ⅱ型两种受体异聚体, 该异聚体可以活化(磷酸化)下游的Smad2、Smad3蛋白, 进而与Smad4结合形成转录复合物进入细胞核内, 调节靶基因的转录, 发挥抑制生长效应. 因此, TGF- β 和Smad4是TGF- β 转导通路中起瓶颈作用的关键因子. 但依细胞类型和生理环境不同, TGF- β 1可以表现出促进和抑制两方面的作用. Yanagihara *et al*^[24]研究表明, TGF- β 1在体外能抑制胃癌细胞株HSC-39和HSC-43的增殖, 并诱导其凋亡; 本研究结果显示, TGF- β 1蛋白在肿瘤中高表达, 且随着胃癌分化程度降低而升高, 其说明TGF- β 1在肿瘤恶性转化及增殖中可能起一定作用, 这与Naef *et al*^[25]的研究结果一致. 另外, TGF- β 1在肿瘤中高表达的原因还可能由于胃癌组织细胞失去了对TGF- β 1的敏感性^[26], 导致TGF- β 1的反馈性表达升高; 而升高的TGF- β 1表达失去TGF- β 1抑制肿瘤生长的作用, 却没有丧失对NK, LAK等免疫细胞的抑制作用^[27-29], 因此TGF- β 1高表达可能是促进肿瘤细胞发生免疫逃逸的原因之一. 有研究发现^[30], TGF- β 1可以明显诱导原代培养的小鼠肝细胞发生凋亡, 在经TGF- β 1处理的正常小鼠肝细胞中凋亡阳性率为55%, 而未经TGF- β 1处理的细胞样本中阳性率仅为20%; Saito *et al*^[31]研究发现TGF- β 1在胃癌组织中的表达明显与血管内皮生长因子呈正比, 提示TGF- β 1可能与肿瘤血管生成也有一定关系.

Hirayama *et al*^[32]报告, 早期穿透型胃癌组织中即有TGF和TGF- β 受体的高表达, 并认为与此型胃癌较强的生长浸润能力有关. Mahara *et al*^[33]报道, 多种从硬癌类型的胃癌组织建立的细胞株(如Kato-III)TGF- β 1分泌明显增高, 并促进肿瘤细胞的增生及大量胶原间质的沉积. TGF- β 1为DPC4基因的信号传递蛋白, Smad4的分子结

■同行评价

本文研究方法尚严谨,数据分析欠规范,文章讨论部分欠佳,内容条理尚可,所得结论有科学价值。

构及其作用类似于TGF- β 1,两者在恶性肿瘤的表达存在正相关关系。本研究表明,肿瘤组织TGF- β 1和TGF- β R1蛋白及其前体mRNA的表达均明显高于正常对照组和萎缩性胃炎组,结果提示,TGF- β 1和TGF- β R1的表达可能与胃癌的发生和发展有关。另外本研究还发现,低分化胃癌组织中TGF- β 1和TGF- β R1的阳性表达率明显高于高或中度分化组,提示,TGF- β 1和TGF- β R1的表达可能也与组织的分化程度有关。虽然伴中、重度肠腺化生的萎缩性胃炎组织中TGF- β 1和TGF- β R1的表达略高于正常胃组织,但差异无显著性。因此TGF- β 1和TGF- β R1能否作为判断癌前病变的指标需要更多的病例及随访观察来证明。

4 参考文献

- 1 Wraha JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994; 370: 341-347
- 2 李京红. 转化生长因子 β 受体研究进展. 国外医学生理病理科学与临床分册 1998; 18: 28-30
- 3 Xu Y, Pasche B. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No 1: R14-R20
- 4 Bian Y, Knobloch TJ, Sadim M, Kaklamani V, Raji A, Yang GY, Weghorst CM, Pasche B. Somatic acquisition of TGFBR1*6A by epithelial and stromal cells during head and neck and colon cancer development. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 3128-3135
- 5 Cox DG, Penney K, Guo Q, Hankinson SE, Hunter DJ. TGFBR1 and TGFBR1 polymorphisms and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *BMC Cancer* 2007; 7: 175
- 6 Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D, Poynard T. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology* 1995; 21: 760-766
- 7 Takanami I, Imamura T, Hashizume T, Kikuchi K, Yamamoto Y, Kodaira S. Transforming growth factor beta 1 as a prognostic factor in pulmonary adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 1994; 47: 1098-1100
- 8 刘化驰, 杨秉辉, 潘志刚. 转化生长因子 β 型受体表达与癌肿预后的关系. 中华肝脏病杂志 1999; 7: 20-21
- 9 O'Brien C. New tumor suppressor found in pancreatic cancer. *Science* 1996; 271: 294
- 10 Jin C, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Muxin W, Nakajima M, Yokohata K, Ito O, Hayakawa T. Motilin regulates interdigestive gastric blood flow in dogs. *Gastroenterology* 2002; 123: 1578-1587
- 11 Bodin L, Beaune PH, Lorient MA. Determination of Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Gene Copy Number by Real-Time Quantitative PCR. *J Biomed Biotechnol* 2005; 2005: 248-253
- 12 Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791
- 13 Hsiao YW, Liao KW, Chung TF, Liu CH, Hsu CD, Chu RM. Interactions of host IL-6 and IFN-gamma and cancer-derived TGF-beta1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression.

- 14 Mincione G, Di Marcantonio MC, Artese L, Vianale G, Picciarelli A, Piccirilli M, Perrotti V, Rubini C, Piattelli A, Muraro R. Loss of expression of TGF-beta1, TbetaR1, and TbetaR2 correlates with differentiation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 2008; 32: 323-331
- 15 Langenskiold M, Holmdahl L, Falk P, Angenete E, Ivarsson ML. Increased TGF-Beta1 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2008
- 16 Ehata S, Hanyu A, Hayashi M, Aburatani H, Kato Y, Fujime M, Saitoh M, Miyazawa K, Imamura T, Miyazono K. Transforming growth factor-beta promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1. *Cancer Res* 2007; 67: 9694-9703
- 17 Yasuda K, Aoshiba K, Nagai A. Transforming growth factor-beta promotes fibroblast apoptosis induced by H2O2. *Exp Lung Res* 2003; 29: 123-134
- 18 Yeh YY, Chiao CC, Kuo WY, Hsiao YC, Chen YJ, Wei YY, Lai TH, Fong YC, Tang CH. TGF-beta1 increases motility and alphavbeta3 integrin up-regulation via PI3K, Akt and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 1292-1301
- 19 Lee KB, Jeon JH, Choi I, Kwon OY, Yu K, You KH. Clusterin, a novel modulator of TGF-beta signaling, is involved in Smad2/3 stability. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 905-909
- 20 Buijs JT, Henriquez NV, van Overveld PG, van der Horst G, Ten Dijke P, van der Pluijm G. TGF-beta and BMP7 interactions in tumour progression and bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24: 609-617
- 21 Nabokikh A, Ilhan A, Bilban M, Gartner W, Vila G, Niederle B, Nielsen JH, Wagner O, Base W, Luger A, Wagner L. Reduced TGF-beta1 expression and its target genes in human insulinomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 115: 674-682
- 22 Cao Y, Deng C, Townsend CM Jr, Ko TC. TGF-beta inhibits Akt-induced transformation in intestinal epithelial cells. *Surgery* 2006; 140: 322-329
- 23 Ji GZ, Wang XH, Miao L, Liu Z, Zhang P, Zhang FM, Yang JB. Role of transforming growth factor-beta1-smad signal transduction pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 644-648
- 24 Yanagihara K, Tsumuraya M. Transforming growth factor beta 1 induces apoptotic cell death in cultured human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 1992; 52: 4042-4045
- 25 Naef M, Ishiwata T, Friess H, Buchler MW, Gold LI, Korc M. Differential localization of transforming growth factor-beta isoforms in human gastric mucosa and overexpression in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1997; 71: 131-137
- 26 Fukumura Y, Suda K, Mitani K, Takase M, Kumasaka T. Expression of transforming growth factor beta by small duct epithelium in chronic, cancer-associated, obstructive pancreatitis: an in situ hybridization study and review of the literature. *Pancreas* 2007; 35: 353-357
- 27 Kim R, Emi M, Tanabe K, Uchida Y, Toge T. The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy. *Cancer*

- 2004; 100: 2281-2291
- 28 Weller M, Wick W, Platten M. Role of TGF-beta in oncogenesis. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 353
- 29 Weller M, Fontana A. The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; 21: 128-151
- 30 Arendt E, Ueberham U, Bittner R, Gebhardt R, Ueberham E. Enhanced matrix degradation after withdrawal of TGF-beta1 triggers hepatocytes from apoptosis to proliferation and regeneration. *Cell Prolif* 2005; 38: 287-299
- 31 Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. The expression of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 1455-1462
- 32 Hirayama D, Fujimori T, Satonaka K, Nakamura T, Kitazawa S, Horio M, Maeda S, Nagasako K. Immunohistochemical study of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in the penetrating type of early gastric cancer. *Hum Pathol* 1992; 23: 681-685
- 33 Mahara K, Kato J, Terui T, Takimoto R, Horimoto M, Murakami T, Mogi Y, Watanabe N, Kohgo Y, Niitsu Y. Transforming growth factor beta 1 secreted from scirrhou gastric cancer cells is associated with excess collagen deposition in the tissue. *Br J Cancer* 1994; 69: 777-783

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 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

胃癌远处隐匿性腹膜转移组织学检测的意义

邵永胜, 彭开勤, 张应天, 吴文良, 赵建国

■背景资料

腹膜转移是胃癌根治性手术后最常见的复发形式, 是影响胃癌疗效的关键问题之一。手术后出现腹膜转移的胃癌患者, 可能在手术时即已存在腹膜转移, 只是肉眼看不见或触摸不到而已。这种情况出现于何种分期的患者, 其发生率高以及其对预后的判断价值如何, 目前尚无确定的文献资料。

邵永胜, 彭开勤, 张应天, 吴文良, 赵建国, 江汉大学附属医院胃肠外科 湖北省武汉市 430015

邵永胜, 江汉大学附属医院胃肠外科主任, 副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤的基础与临床研究。

作者贡献分布: 邵永胜与彭开勤对此文所作贡献均等; 此课题由邵永胜, 彭开勤及张应天设计; 研究过程由邵永胜, 彭开勤, 吴文良及赵建国操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由吴文良提供; 数据分析由邵永胜及吴文良完成; 本论文写作由邵永胜, 彭开勤及张应天完成。

通讯作者: 邵永胜, 430015, 湖北省武汉市香港路168号, 江汉大学附属医院胃肠外科。shaoyongsheng1211@medmail.com.cn
电话: 027-82440571 传真: 027-82426502

收稿日期: 2007-08-24 修回日期: 2008-02-26

Histologic detection and significance of distant occult peritoneal metastasis of gastric carcinoma

Yong-Sheng Shao, Kai-Qin Peng, Ying-Tian Zhang, Wen-Liang Wu, Jian-Guo Zhao

Yong-Sheng Shao, Kai-Qin Peng, Ying-Tian Zhang, Wen-Liang Wu, Jian-Guo Zhao, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuhan 430015, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Yong-Sheng Shao, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangnan University, 168 Xianggang Road, Wuhan 430015, Hubei Province, China. shaoyongsheng1211@medmail.com.cn

Received: 2007-08-24 Revised: 2008-02-26

Abstract

AIM: To analyze the incidence rate and relative factors of distant occult peritoneal metastasis (DOMP) of gastric carcinoma as well as their influences on prognosis.

METHODS: Fifty-eight patients with gastric carcinoma undergoing radical surgery in our hospital from January 2002 to December 2003 were selected, and distant metastasis was not found by preoperative imaging examination and routine intraoperative physical exploration. Before closing abdomen in operation, two slices of peritoneum from each side of Tau's cavity were cut for HE and cytokeratin immunohistochemical staining. The gender, age of patients, tumor location, size, invasion depth, differentiation degree, Laurén classification and lymph node metastasis were compared between the DOPM and non-

DOMP cases. Logistic multivariable regression analysis was used to distinguish whether the above variables are independent relative factors for DOMP.

RESULTS: Among the 58 cases, there were 12 cases with DOMP, accounting for 20.7%. Single factor analysis showed that DOMP is associated with the gender of patients, tumor size, invasion depth, Laurén classification (diffusing class) and lymph node metastasis, but had nothing to do with the age patients, tumor location and differentiation degree. Logistic multivariable regression analysis showed that the independent relative factors of DOMP were Laurén classification (diffusing class) and tumor size, but not the gender, age of patients, tumor location, invasion depth, differentiation degree and lymph node metastasis. Among 58 cases, the 5-year survival rate of patients was 100% in stage I and II, 94.1% in stage III and 24.7% in stage IV ($P < 0.001$). The 5-year survival rate of DOMP patients was 30.3%, which was similar to that of the stage-N3 patients (22.1%), but significantly different from that of the stage-III patients ($P < 0.001$).

CONCLUSION: DOMP occurs frequently in gastric carcinoma, so routine detection for DOMP should be applied to in patients with advanced gastric carcinoma and diffusing classification (Laurén classification).

Key Words: Gastric carcinoma; Peritoneal metastasis; Stage; Classification; Immunohistochemistry

Shao YS, Peng KQ, Zhang YT, Wu WL, Zhao JG. Histologic detection and significance of distant occult peritoneal metastasis of gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 862-868

摘要

目的: 分析胃癌远处隐匿性腹膜转移(distant occult peritoneal metastasis, DOPM)的发生率、相关因素及其对预后的影响。

方法: 选择我院2002-01/2003-12收治胃癌根

■同行评议者

关晓辉, 主任医师, 吉林北华大学附属医院消化内科

治性手术患者58例, 术前影像学检查或术中常规理学检查皆未发现远处转移. 所有患者于手术结束关腹前, 分别于陶氏腔两侧切取两片腹膜, 行HE染色和细胞角蛋白(cytokeratin)免疫组化染色检查. 比较有DOPM与无DOPM患者的性别、年龄、肿瘤部位、大小、侵犯深度、分化程度和Laurén分型, 以及淋巴结转移状况; 并对上述变量进行Logistic多因素回归分析, 判断是否为DOPM的独立相关因素.

结果: 在58例患者中, 有12例发现DOPM, 占20.7%. 单因素分析结果表明, DOPM与患者的性别、肿瘤大小、侵犯深度、Laurén分型(弥漫型)以及淋巴结转移状况等相关, 与患者的年龄、肿瘤部位和分化程度不相关. Logistic多因素回归分析结果显示, 胃癌患者发生DOPM的独立相关因素依次是Laurén分型(弥漫型)和肿瘤大小, 患者的性别、年龄、肿瘤部位、侵犯深度、分化程度和淋巴结转移状况并非DOPM的独立相关因素. 本组病例中Ⅰ期和Ⅱ期患者的5年生存率为100%, Ⅲ期患者的5年生存率为94.1%, Ⅳ期患者的5年生存率为24.7% ($P<0.001$). Ⅳ期患者中, 有DOPM患者的5年生存率为30.3%, 与N3期患者的5年生存率(22.1%)接近, 与Ⅲ期患者5年生存率的差异有显著性 ($P<0.001$).

结论: 胃癌远处隐匿性腹膜转移发生率较高. 对进展期胃癌和具备Laurén分型弥漫型等危险因素胃癌患者, 术中应常规检测是否存在隐匿性腹膜转移.

关键词: 胃癌; 腹膜转移; 分期; 分型; 免疫组化

邵永胜, 彭开勤, 张应天, 吴文良, 赵建国. 胃癌远处隐匿性腹膜转移组织学检测的意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 862-868

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/862.asp>

0 引言

腹膜转移是胃癌最常见的转移形式, 也是胃癌根治性手术后最常见的复发形式, 是影响胃癌疗效的关键问题之一^[1-4]. 腹膜转移通常出现在胃癌手术后, 但也有许多患者在手术时即已存在腹膜转移^[5]. 胃癌手术中, 对于肉眼可见的或可触诊的腹膜转移容易诊断, 问题是肉眼看不见的和触摸不到的腹膜转移往往容易漏诊. 因此, 实际工作中胃癌远处腹膜转移的诊断存在一定困难^[1,6-7].

当腹膜远处转移为微小病灶时, 术前影像学检查不能发现, 术中详细理学检查也无法察

觉, 这种病变称之为远处隐匿性腹膜转移(distant occult peritoneal metastasis, DOPM). 关于胃癌的DOPM出现于何种分期的患者, 其发生率高低以及对预后的判断价值如何, 目前尚无确定的文献资料. 因此, 我们于胃癌手术中常规取陶氏腔腹膜活检, 以检测肉眼看不见的和触摸不到的DOPM, 为胃癌分期和术后治疗提供组织学证据.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2002-01/2003-12胃癌根治性手术58例, 姑息性手术、以及术前影像学检查或术中常规理学检查发现远处转移患者除外. 其中, 男37例, 女21例; 年龄36-82(中位56)岁. 包括胃窦癌35例, 行远端胃D2切除术; 贲门癌和近端胃癌11例, 行近端胃D2切除术; 胃体癌11例, 行全胃D3切除术; 残胃癌1例, 行残胃D3切除术. 手术结束关腹前, 分别于陶氏腔两侧切取2片0.2 cm×0.5 cm腹膜, 创面缝扎止血. 腹膜标本单独送病检, 常规石蜡包埋切片, 行HE染色和细胞角蛋白(cytokeratin)免疫组化染色检查. 对于有DOPM患者, 术后除了全身化疗外, 还加用腹腔内化疗.

1.2 方法

1.2.1 单因素分析: 比较有DOPM患者与无DOPM患者的性别、年龄、肿瘤部位、大小、侵犯深度、分化程度和Laurén分型, 以及淋巴结转移状况. 其中, 两组患者性别、肿瘤部位、侵犯深度、分化程度、Laurén分型和淋巴结转移状况的比较用 χ^2 检验, 年龄和肿瘤大小的比较用 t 检验. 肿瘤大小指甲醛固定标本上的原发灶大小, 以肿瘤长径×短径(cm^2)计算. 淋巴结检查采用淋巴结显示技术^[8], 将整块切除的标本经甲醛固定、乙醇-丙酮脱水和美兰染色后, 全数取出标本中的淋巴结; 每枚淋巴结作连续6张切片HE染色和单张切片cytokeratin染色镜检, 判断有无癌转移. 然后, 根据UICC/AJCC1997年公布的第5版胃癌TNM分期方案进行N分期: 无淋巴结转移为N0期, 淋巴结转移1-6枚为N1期, 淋巴结转移7-15枚为N2期, 淋巴结转移 ≥ 16 枚为N3期, 有DOPM患者视为M1, 即为Ⅳ期.

1.2.2 Logistic多因素回归分析: 通过Logistic多因素回归分析, 判断上述变量是否为DOPM的独立相关因素.

1.2.3 累积生存率分析: 对本组患者全数随访, 用Kaplan-Meier方法计算累积生存率, 绘制生存率曲线. 对不同T分期患者、不同N分期患者, 以及

■ 研发前沿

关于胃癌腹膜转移的检测方法很多. 术前血清肿瘤标志物如CEA、CA19-9和CA72-4预测胃癌腹膜转移的价值尚无统一意见. 而无论是细胞学检查、化学发光酶联免疫法或RT-PCR技术, 仅仅只是确定腹腔内游离癌细胞的存在, 这些技术对腹膜转移、复发有一定的预测价值, 但不能确诊腹膜转移. RT-PCR是其中最为敏感的技术, 但也因此产生很多假阳性的结果.

■创新盘点

本研究于胃癌手术中切取陶氏腔腹膜作病理学检查,可以发现肉眼看不见的和触摸不到的隐匿性腹膜转移灶,具有准确分期和判断预后的实用价值,并能术中、术后腹腔内化疗提供组织学依据。

不同TNM分期(I-IV期)患者的累积生存率进行Log-rank检验。

统计学处理 本研究所有统计学处理均采用SPSS11.5统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

在本组58例中,有12例发现DOPM(图1A-B),占20.7%。

2.1 单因素分析 本组男性患者37例,其中11例发现DOPM,占29.7%;女性21例,1例发现DOPM,占4.76% ($\chi^2 = 5.089$, $P = 0.024$, 表1)。12例有DOPM患者平均年龄 59.8 ± 15.4 岁,46例无DOPM患者平均年龄 56.4 ± 12.3 岁 ($t = 0.796$, $P = 0.430$)。贲门癌和近端胃癌11例,其中2例发现DOPM,占18.2%;胃体癌12例,其中4例发现DOPM,占33.3%;胃窦癌35例,其中6例发现DOPM,占17.1% ($\chi^2 = 1.480$, $P = 0.477$)。12例有DOPM患者平均肿瘤大小为 $33.0 \pm 31.2 \text{ cm}^2$,46例无DOPM患者平均肿瘤大小为 $11.5 \pm 9.4 \text{ cm}^2$ ($t = 4.094$, $P < 0.001$)。肿瘤原发灶在黏膜或黏膜下层(T1期)6例,均未发现DOPM;肿瘤侵犯肌层(T2期)15例,也未发现DOPM;肿瘤侵犯浆膜(T3期)22例,其中5例发现DOPM,占22.7%;肿瘤穿透浆膜或侵犯邻近器官(T4期)15例,其中7例发现DOPM,占46.7% ($\chi^2 = 11.703$, $P = 0.008$)。低分化和未分化癌34例,其中8例发现DOPM,占23.5%;中分化癌19例,其中3例发现DOPM,占15.8%;高分化癌5例,其中1例发现DOPM,占20.0% ($\chi^2 = 0.447$, $P = 0.800$)。Laurén弥漫型23例,其中12例发现DOPM,占52.2%;肠型29例,其他型6例,均未发现DOPM ($\chi^2 = 23.025$, $P < 0.001$)。本组病例共取得淋巴结3289枚,平均 56.7 ± 22.4 (30-132)枚;32例无淋巴结转移,26例有淋巴结转移,转移率44.8%。转移淋巴结394枚,平均 15.2 ± 15.2 (1-69)枚。

按照UICC/AJCC的第5版胃癌TNM分期方案,本组病例中N0期32例,其中1例(3.2%)发现DOPM;N1期8例,均未发现DOPM;N2期9例,其中5例(55.6%)发现DOPM;N3期9例,其中6例(66.7%)发现DOPM ($\chi^2 = 26.365$, $P < 0.001$)。

2.2 Logistic多因素回归分析 对DOPM相关因素的Logistic多因素回归分析结果中OR指优势比(odds ratio),95%CI指优势比OR的95%可信区间见表2。

2.3 累积生存率分析 本组患者术后全数随访,随

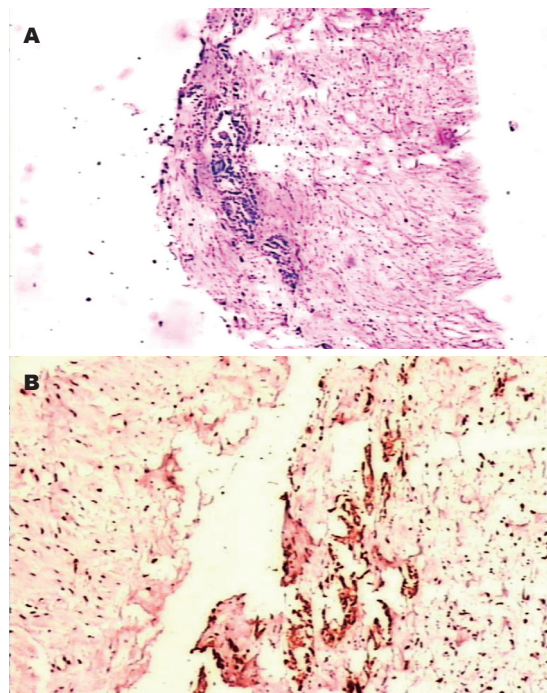


图1 隐匿性腹膜转移。A: 孤立的腺管状癌组织(HE × 160); B: CK18阳性(SABC × 400)。

表1 DOPM相关因素的单因素分析(n)

因素		DOPM	
		有	无
性别	男	11	26 ^a
	女	1	20 ^a
肿瘤大小(cm ²)		33.0 ± 31.2	11.5 ± 9.4 ^b
肿瘤侵犯深度	T1	0	6 ^b
	T2	0	15 ^b
	T3	5	17 ^b
	T4	7	8
肿瘤分化	低	8	26 ^b
	中	3	16 ^b
	高	1	4 ^b
Laurén分型	弥漫型	12	11
	肠型	0	29 ^b
	其他型	0	6 ^b
淋巴结转移	N0	1	31 ^b
	N1	0	8 ^b
	N2	5	4
	N3	6	3 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

访时间36-48(中位42) mo。在58例患者中,有13例在随访期间因肿瘤复发死亡,其中12例因腹膜转移死亡,1例因肝转移死亡。存活的45例中,有1例术中腹膜活检发现DOPM,术后6 mo发现肝转移和腹膜转移,目前正在接受全身和腹腔

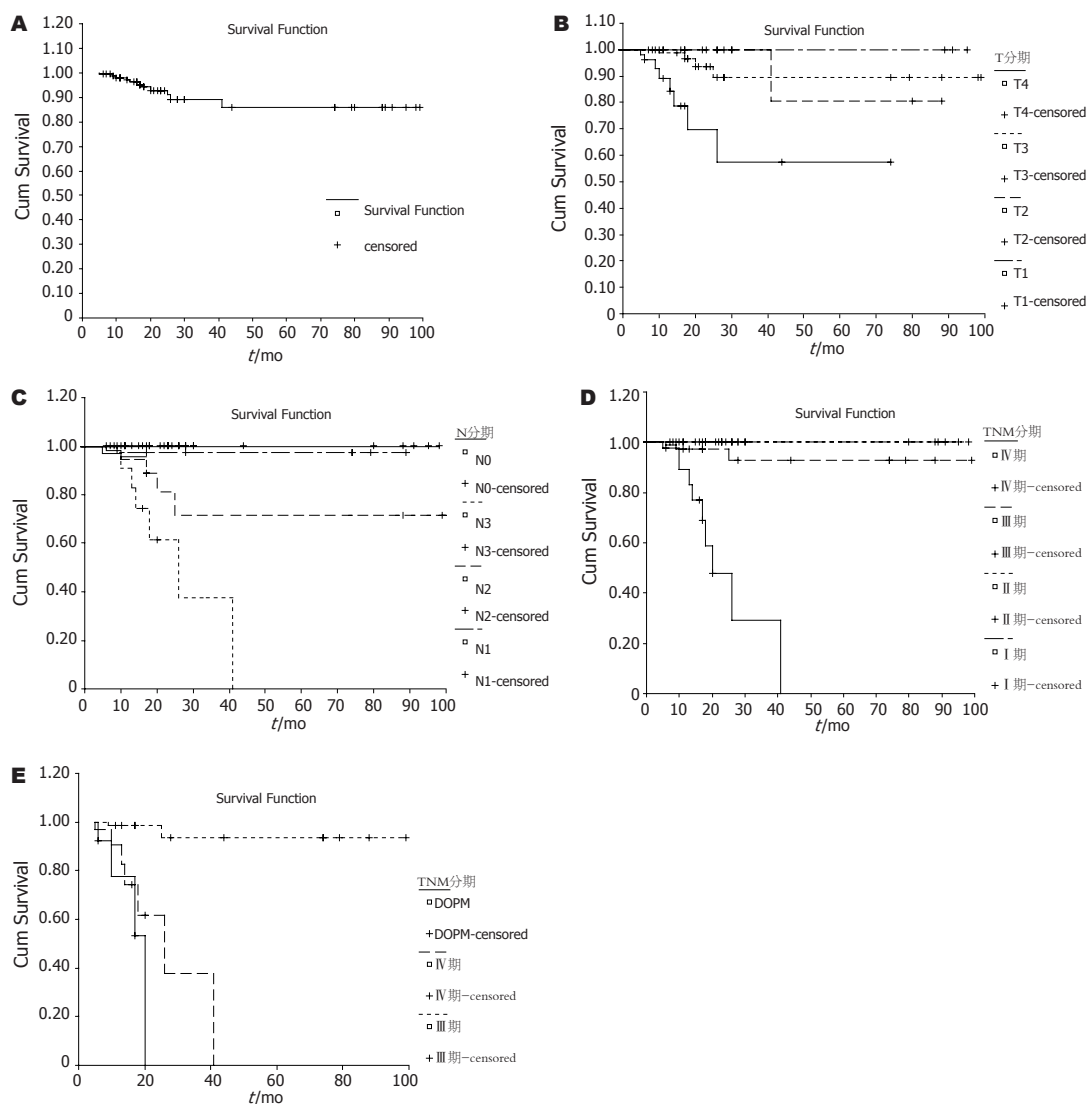


图2 胃癌患者生存率曲线. A: 58例; B: T分期; C: N分期; D: TNM分期; E: DOPM与Ⅲ、Ⅳ期.

应用要点

本研究有助于对胃癌根治性手术患者进行准确分期, 并能为术中、术后腹腔内化疗提供组织学依据, 有望减少胃癌手术后腹膜复发的发生率, 可延长隐匿性腹膜转移胃癌患者的生存时间和改善生活质量.

内化疗. 本组总体5年生存率为88.3%(图2A). 按照UICC/AJCC的第5版胃癌TNM分期方案, 本组病例中T1期6例的5年生存率为100%, T2期15例的5年生存率为90.5%, T3期22例的5年生存率为90.8%, T4期15例的5年生存率为64.3%($P<0.001$, 图2B). N0期32例的5年生存率为100%, N1期8例的5年生存率为97.6%, N2期9例的5年生存率为73.9%, N3期9例的5年生存率为22.1%($P<0.001$, 图2C). I期18例和II期12例的5年生存率为100%, III期13例的5年生存率为93.2%, IV期15例的5年生存率为25.3%($P<0.001$, 图2D). 有6例因DOPM(M1)而定为IV期, 另9例因N3而定为IV期. 为了分析DOPM对预后的影响, 将6例DOPM患者的累积生存率与III期和IV期(N3)患者的累积生存率进行比较. 结果III期患者的5年生存率为94.1%, DOPM患者的5年生存率30.3%, IV期(N3)患者的5年生存率为22.1%($P<0.001$, 图2E).

表2 DOPM相关因素的Logistic回归分析

因素	Wald χ^2	P值	OR	95% CI
性别(男)	2.474	0.061	0.010	0.000–1.241
年龄	0.596	0.440	0.962	0.873–1.061
肿瘤部位	1.087	0.297	0.414	0.079–2.173
肿瘤大小	4.297	0.038	1.067	1.004–1.134
肿瘤侵犯深度	1.927	0.165	3.432	0.602–19.577
肿瘤分化程度	0.637	0.425	2.231	0.311–16.025
Laurén弥漫型	8.613	0.003	0.029	0.003–0.309
淋巴结转移	0.040	0.842	0.776	0.064–9.388

3 讨论

近年Fujimura *et al*^[9]提出一种胃癌腹膜转移的体积评分系统, VS0表示腹盆腔无癌转移, VS1为转移灶直径 <10 mm, VS2为转移灶直径1–5 cm, VS3为转移灶直径 >5 cm或者邻近器官被肿瘤包裹. VS0, VS1, VS2和VS3的评分分别为为

同行评价

本文采用免疫组化染色方法分析胃癌远处隐匿性腹膜转移的发生率及其对预后的影响,具有一定的科学性和可读性,进一步充实了该领域的研究。

0, 1, 2, 3分。总分1-3分为1级, 4-6分为2级, 7-9分为3级, >9分为4级。通过对85例有腹膜转移的胃癌手术或腹腔镜探查患者随访发现, 日本传统的胃癌腹膜转移分级(P0, P1, P2和P3)与预后无相关性; 按照新的腹膜转移体积评分系统, 1-4级患者的50%存活时间分别为1.23, 0.66, 0.67和0.32年。可以看出, 腹膜转移的程度与预后有密切的关联, 无腹膜转移和有腹膜微小转移的胃癌患者可望通过手术和辅助治疗获得治愈。因此, 及时发现胃癌的隐匿性腹膜转移、及时给予相应的辅助治疗可望改善预后。我们通过腹膜活检发现肉眼看不见的和触摸不到的腹膜转移, 结合临床和切片组织学检查可以认为是腹膜微小转移或腹膜转移的早期形式。其主要意义在于指导术后辅助治疗, 同时为准确分期提供组织学依据。

Brigand *et al*^[5]提出, 胃癌患者腹膜转移的相关危险因素包括Laurén分型弥漫-混合型、肿瘤侵犯深度(尤其是侵犯浆膜)、淋巴结转移和肿瘤大小。Yoo *et al*^[6]的单因素和多因素分析结果表明, 肿瘤侵犯浆膜和淋巴结转移是胃癌术后复发的危险因素, 年轻、浸润或弥漫型、未分化癌和全胃切除术是胃癌术后腹膜复发的危险因素。国内张成武 *et al*^[10]的Logistic多因素回归分析结果显示, 胃癌术后腹膜复发的独立相关因素依次为肿瘤侵犯深度、肿瘤大体分型和术后早期腹腔化疗。吴泽宇 *et al*^[11]对76例有腹膜转移胃癌患者的临床病理资料进行回顾性分析发现, 胃癌腹膜转移与肿瘤部位、大小、分化程度、浸润深度和浆膜侵犯密切相关。

我们对DOPM的相关危险因素也进行了分析。单因素分析结果表明, DOPM与患者的性别、肿瘤大小、侵犯深度、Laurén分型(弥漫型)以及淋巴结转移状况等相关, 与患者的年龄、肿瘤部位和分化程度不相关。Logistic多因素回归分析结果显示, 胃癌患者发生DOPM的独立相关因素依次是Laurén分型(弥漫型)和肿瘤大小, 患者的性别、年龄、肿瘤部位、侵犯深度、分化程度和淋巴结转移状况并非DOPM的独立相关因素。因此, 对于进展期胃癌和具备上述危险因素的胃癌患者, 除术中详细病理学检查有无远处腹膜转移以外, 有必要检测是否存在隐匿性腹膜转移。

术前血清肿瘤标记物如CEA, CA19-9和CA72-4等对胃癌术后复发有一定的预测价值。但关于术前血清肿瘤标记物预测胃癌术后复

发、尤其是预测腹膜转移的确切价值尚无统一意见^[12-14]。Aoyagi *et al*^[15]对40例胃癌手术标本进行免疫组化染色, 检测原发病灶血管内皮生长因子(VEGF)的表达, 并进行免疫组化染色评分。结果发现, 发生腹膜复发病例的VEGF评分为 9.4 ± 2.46 , 未发生腹膜复发病例的VEGF评分 3.47 ± 2.36 。作者因此提出, 胃癌原发病灶VEGF高表达提示术后腹膜复发的可能, VEGF评分可以作为胃癌术后腹膜转移的预测指标。国内吴晴 *et al*^[16]应用免疫组织化学ABC法检测253例胃癌组织中VEGF的表达, 发现肿瘤组织中VEGF的表达与肿瘤分化程度、TNM分期、腹膜转移等密切相关($P < 0.01$)。上述研究仅说明VEGF的表达与胃癌腹膜转移密切相关, 而并未提及其对腹膜转移的预测价值。目前也未见通过检测VEGF的表达来预测胃癌腹膜转移的文献报告, 更无预测敏感性和特异性的数据资料。

腹腔灌洗液检查包括腹腔灌洗液细胞学检查、常规方法检测腹腔灌洗液中的肿瘤标记物水平, 以及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测腹腔灌洗液中的肿瘤标记物。腹腔灌洗液细胞学检查是检测腹腔游离癌细胞的常用方法, 但根据腹腔灌洗液细胞学检查阳性结果, 判断或预测腹膜转移缺乏敏感性; 而且细胞学检查阴性也可能存在腹膜转移^[2]。Yamamoto *et al*^[15]用化学发光酶联免疫法检测229例胃癌患者术中腹腔灌洗液中CEA、CA125和CA19-9的水平。结果发现, 腹腔灌洗液中CEA的水平是判断胃癌腹膜转移的一个重要指标, 敏感性为75.8%, 特异性为90.8%。因为腹腔灌洗液细胞学检查缺乏敏感性, 所以许多学者用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测腹腔灌洗液, 以提高诊断腹膜转移的敏感性。其中报告最多的是检测腹腔灌洗液中的CEA-mRNA^[2-3, 17, 19]。RT-PCR技术查CEA-mRNA预测腹膜转移的价值优于细胞学检查, 可替代细胞学检查作为预测胃癌腹膜复发的敏感方法^[13, 17]。但正是RT-PCR技术的敏感, 也因此产生很多假阳性的结果^[20]。

不少学者将腹膜转移归咎于手术引起的癌细胞脱落和种植, 因而在手术中用生物胶封盖癌肿表面, 术毕再进行腹腔灌洗。实际上, 80%以上的进展期胃癌患者手术时腹腔内即已存在游离的癌细胞^[17]。肿瘤腹膜转移的步骤, 除了肿瘤细胞的脱落和种植, 还包括肿瘤细胞在腹膜上的黏附、侵入和生长^[15]。因此, 发现腹腔内游离

的癌细胞并不等于已经发生腹膜转移. 无论是细胞学检查、化学发光酶联免疫法或RT-PCR技术, 仅仅只是确定游离癌细胞的存在^[17]. 这些技术通过确定游离癌细胞的存在, 对腹膜转移、复发有一定的预测价值, 但不能确诊腹膜转移. 我们对术前常规检查和术中病理学检查无远处转移的58例胃癌手术患者, 手术中切取陶氏腔腹膜, 作HE染色和细胞角蛋白免疫组化染色病理学检查, 结果发现, 12例(20.7%)存在隐匿性腹膜转移灶, 为准确分期和术后化疗提供了组织学依据. 无论如何, 腹腔灌洗液中发现癌细胞与腹膜活检证实有转移灶, 显然存在本质上的区别, 前者仅提示可能存在或发生腹膜转移, 后者则是组织学上已确认有腹膜转移. Yoshikawa *et al*^[21]报告128例有腹膜转移胃癌患者的手术治疗结果, 总体平均生存时间为188 d. 其中, 行姑息性切除术患者的平均生存时间为259 d, 行旁路手术患者的平均生存时间为173 d, 剖腹探查无法手术患者的平均生存时间为108 d. 可见, 有腹膜转移的胃癌患者预后极差^[5].

本组病例中有12例术中腹膜活检发现DOPM, 其中8例分别于术后5-26 mo死于腹膜转移, 1例于术后6 mo发现肝转移和腹膜转移, 目前正在接受全身和腹腔内化疗; 另外3例在随访期间无瘤生存. 从生存率分析结果看, 本组病例的累积生存率分别与肿瘤侵犯深度(T分期)、淋巴结转移程度(N分期)和TNM分期明显相关. 从图2E结果看, III期患者的5年生存率为94.12%, DOPM患者的5年生存率30.26%, IV期患者的5年生存率为22.09%; DOPM患者的5年生存率与IV期患者相近, 而与III期患者相比有明显差异($P<0.001$). 因此, DOPM虽然是腹膜微小转移或腹膜转移的早期形式, 仍然应该看作是胃癌的远处转移, 分期应该是M1期(IV期).

总之, 胃癌患者(尤其是具备上述危险因素患者)手术中应常规切取陶氏腔腹膜送检, 以发现肉眼看不见的和触摸不到的隐匿性腹膜转移灶, 为准确分期和术后腹腔内化疗提供组织学依据.

4 参考文献

- 1 戴冬秋. 胃癌腹膜转移研究之策略. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1049-1051
- 2 Tokuda K, Natsugoe S, Nakajo A, Miyazono F, Ishigami S, Hokita S, Takao S, Eizuru Y, Aikou T. Clinical significance of CEA-mRNA expression in peritoneal lavage fluid from patients with gastric cancer. *Int J Mol Med* 2003; 11: 79-84
- 3 Fujii S, Kitayama J, Kaisaki S, Sasaki S,

- Seto Y, Tominaga O, Tsuno N, Umetani N, Yokota H, Kitamura K, Tsuruo T, Nagawa H. Carcinoembryonic antigen mRNA in abdominal cavity as a useful predictor of peritoneal recurrence of gastric cancer with serosal exposure. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21: 547-553
- 4 Wang Z, Zhang X, Xu H, Zhou X, Jiang L, Lu C. Detection of peritoneal micrometastasis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for heparanase mRNA and cytology in peritoneal wash samples. *J Surg Oncol* 2005; 90: 59-65
- 5 Brigand C, Arvieux C, Gilly FN, Glehen O. Treatment of peritoneal carcinomatosis in gastric cancers. *Dig Dis* 2004; 22: 366-373
- 6 Yoo CH, Noh SH, Shin DW, Choi SH, Min JS. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma. *Br J Surg* 2000; 87: 236-242
- 7 Yamamoto M, Baba H, Kakeji Y, Endo K, Ikeda Y, Toh Y, Kohnoe S, Okamura T, Maehara Y. Prognostic significance of tumor markers in peritoneal lavage in advanced gastric cancer. *Oncology* 2004; 67: 19-26
- 8 彭开勤, 张应天, 刘文, 龚少敏, 全卓勇, 邵永胜, 刘丽江. 一种新的胃癌淋巴结分期方案. 中华外科杂志 2001; 39: 908-910
- 9 Fujimura T, Ishii K, Oyama K, Miyashita T, Kinami S, Ninomiya I, Kitagawa H, Fushida S, Nishimura G, Kayahara M, Shimizu K, Ohta T, Miwa K. A new scoring system for peritoneal metastasis in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2003; 6: 146-152
- 10 张成武, 邹寿椿, 赵大建, 施敦. 胃癌术后复发及其相关因素分析. 中华胃肠外科杂志 2004; 7: 282-285
- 11 吴泽宇, 詹文华, 何裕隆, 汪建平. 胃癌腹膜转移临床病理分析76例. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2241-2243
- 12 Marrelli D, Pinto E, De Stefano A, de Manzoni G, Farnetani M, Garosi L, Roviello F. Preoperative positivity of serum tumor markers is a strong predictor of hematogenous recurrence of gastric cancer. *J Surg Oncol* 2001; 78: 253-258
- 13 Gaspar MJ, Arribas I, Coca MC, Diez-Alonso M. Prognostic value of carcinoembryonic antigen, CA 19-9 and CA 72-4 in gastric carcinoma. *Tumour Biol* 2001; 22: 318-322
- 14 Duraker N, Celik AN. The prognostic significance of preoperative serum CA 19-9 in patients with resectable gastric carcinoma: comparison with CEA. *J Surg Oncol* 2001; 76: 266-271
- 15 Aoyagi K, Kouhiji K, Yano S, Miyagi M, Imaizumi T, Takeda J, Shirouzu K. VEGF significance in peritoneal recurrence from gastric cancer. *Gastric Cancer* 2005; 8: 155-163
- 16 吴晴, 于颖彦, 王一, 朱莉菲, 丁红华, 陈栋晖, 胡宏慧, 周小寒. 微血管计数和血管内皮生长因子在胃癌浸润转移中的作用. 实用癌症杂志 2002; 17: 154-156
- 17 Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Mochizuki Y, Yamamura Y, Fujiwara M, Hibi K, Ito K, Akiyama S, Tatematsu M, Nakao A. Detection of disseminated cancer cells in linitis plastica-type gastric carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34: 525-531
- 18 Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Kanemitsu Y, Shimizu Y, Hirai T, Yasui K, Kato T, Tatematsu M. Quantitative detection of disseminated free cancer cells in peritoneal washes with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction: a sensitive predictor of outcome for

- patients with gastric carcinoma. *Ann Surg* 2002; 235: 499-506
- 19 Zhang YS, Xu J, Luo GH, Wang RC, Zhu J, Zhang XY, Nilsson-Ehle P, Xu N. Detection of carcinoembryonic antigen mRNA in peritoneal washes from gastric cancer patients and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1408-1411
- 20 Kodera Y, Nakanishi H, Ito S, Yamamura Y, Fujiwara M, Koike M, Hibi K, Ito K, Tatematsu M, Nakao A. Prognostic significance of intraperitoneal cancer cells in gastric carcinoma: detection of cytokeratin 20 mRNA in peritoneal washes, in addition to detection of carcinoembryonic antigen. *Gastric Cancer* 2005; 8: 142-148
- 21 Yoshikawa T, Kanari M, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Noguchi Y. Should gastric cancer with peritoneal metastasis be treated surgically? *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1712-1715

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 •

世界华人消化杂志计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-、 \pm 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d, 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm \times 6 cm \times 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \cdot d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

NAT2基因多态性与温州汉族人群炎症性肠病遗传易感性的相关性

林李淼, 陈浩, 陈碧红, 张定亮, 王建璋, 郑波, 林秀清

林李淼, 陈浩, 陈碧红, 张定亮, 王建璋, 郑波, 林秀清, 浙江省温州医学院附属二医院消化内科 浙江省温州市 325027
林李淼, 1997年上海医科大学本科毕业, 主治医师, 主要从事消化道炎症性疾病及肿瘤研究。

作者贡献分布: 林李淼与陈浩对此文所作贡献均等; 此课题由林李淼, 陈浩及陈碧红设计; 研究过程由林李淼, 陈浩, 陈碧红, 张定亮, 王建璋, 郑波及林秀清共同完成; 数据分析由王建璋, 郑波, 林秀清完成; 本论文写作由林李淼, 陈浩及陈碧红完成。

通讯作者: 林李淼, 325027, 浙江省温州市学院西路109号, 浙江省温州医学院附属二医院消化内科. linlimiao@yahoo.com.cn

电话: 0577-88816311 传真: 0577-88816411
收稿日期: 2007-10-26 修回日期: 2008-01-24

Correlation between N-acetyltransferase 2 gene polymorphisms and genetic susceptibility to inflammatory bowel disease

Li-Miao Lin, Hao Chen, Bi-Hong Chen, Ding-Liang Zhang, Jian-Zhang Wang, Bo Zheng, Xiu-Qing Lin

Li-Miao Lin, Hao Chen, Bi-Hong Chen, Ding-Liang Zhang, Jian-Zhang Wang, Bo Zheng, Xiu-Qing Lin, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Dr. Li-Miao Lin, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, 109 Xueyuan Western Road, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China. linlimiao@yahoo.com.cn
Received: 2007-10-26 Revised: 2008-01-24

Abstract

AIM: To investigate the correlation between N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms and genetic susceptibility to inflammatory bowel disease (IBD).

METHODS: One hundred and nineteen patients with IBD and 120 controls were recruited in this study. The wild-type allele (NAT2 4) and three variant alleles (NAT2 5B, 6A and 7B) of NAT2 were determined with the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism method.

RESULTS: In IBD cases, the frequency of NAT2 4, NAT2 5B, NAT2 6A, NAT2 7B was

55.9%, 6.7%, 23.5% and 13.9%, respectively. No statistically significant difference was found in the frequencies between the IBD patients and controls. The frequency of rapid genotype and intermediate genotype and slow genotype in IBD patients was 35.3%, 41.2% and 23.5%, respectively. No statistically significant difference was found between the IBD patients and controls.

CONCLUSION: There is no correlation between genetic polymorphisms of NAT2 and IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Acetyltransferase; Polymorphism genetics

Lin LM, Chen H, Chen BH, Zhang DL, Wang JZ, Zheng B, Lin XQ. Correlation between N-acetyltransferase 2 gene polymorphisms and genetic susceptibility to inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 869-873

摘要

目的: 探讨温州汉族人群中炎症性肠病(IBD)遗传易感性与N-乙酰基转移酶2(NAT2)基因型多态性的相关性。

方法: 采用聚合酶链反应-限制性片断长度多态性方法, 在119例IBD患者及120例健康对照者中, 检测NAT2野生型等位基因(NAT2 4)和3种突变型等位基因(NAT2 5B, 6A和 7B)的频率。

结果: 在IBD组中, NAT2 4, NAT2 5B, NAT2 6A和NAT2 7B等位基因频率分别是55.9%, 6.7%, 23.5%和13.9%, 与正常对照组比较无显著差异。CD组和UC组中各等位基因频率与正常对照组比较无显著差异; 将NAT2基因型分为快型、中间型和慢型, 分别为35.3%, 41.2%和23.5%, 与正常对照组比较亦无显著差异; 对IBD各组进一步分层, 也无显著性差异。

结论: NAT2基因型多态性和炎症性肠病遗传易感性无显著性相关。

■背景资料

N-乙酰基转移酶(NAT)是人体内重要的Ⅱ相代谢酶, NAT有NAT1和NAT2 2种同工酶, NAT2存在明显的遗传多态性。炎症性肠病是一组慢性肠道炎症性疾病, 病因尚未明确, 遗传、环境因素对其发病有重要影响。有研究发现吸烟是克罗恩病的危险因素, 但却是溃疡性结肠炎的保护因素, 而NAT2是烟草的主要代谢酶, 因此, NAT2基因多态性可能与IBD的发病存在联系。

■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; 姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

■研究前沿

慢性乙酰化基因型者对环境致病原的代谢能力降低,因此容易导致一系列与外界环境因素相关的疾病的发生。目前的研究热点重点在于NAT2基因多态性和多种肿瘤的关系,以及其他如炎症性肠病等与外界环境因素密切相关疾病的关系。

关键词: 乙酰基转移酶; 炎症性肠病; 基因多态性

林李淼, 陈浩, 陈碧红, 张定亮, 王建峰, 郑波, 林秀清. NAT2基因多态性与温州汉族人群炎症性肠病遗传易感性的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 869-873

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/869.asp>

0 引言

N-乙酰基转移酶(NAT)是人体内重要的Ⅱ相代谢酶,可催化芳香胺类和杂环胺类物质的乙酰化过程,在一些药物代谢以及致癌物质的灭活或活化过程中起着重要的作用。NAT有NAT1和NAT2 2种同工酶,NAT2存在明显的遗传多态性。NAT2常见的有4种等位基因,即野生型等位基因NAT2 4和3种突变型等位基因NAT2 5B, 6A, 7B,在种族之间和地域分布上存在显著差异。炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组慢性肠道炎症性疾病,主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),病因尚未明确,遗传、环境因素对其发病有重要影响。吸烟是CD的危险因素,但却是UC的保护因素,而NAT2是烟草的主要代谢酶,因此,NAT2基因多态性可能与IBD的发病有关。我们通过对温州汉族人群中IBD患者和健康体检者的NAT2基因多态性分布进行研究,以探讨NAT2基因多态性与IBD的相关性,并为IBD的流行病学调查提供重要的遗传学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 2000-03/2007-04在我院以及温州市其他大型综合性医院住院或门诊就医的IBD患者119例,诊断标准参照2001年中华医学会关于“对炎症性肠病诊断治疗规范的建议”^[1],经临床、内镜及组织学、放射学、实验室综合性诊断筛选入组。其中男性64例,女性55例,发病年龄23-81(平均 38.7 ± 1.22)岁;UC患者101例,CD患者18例。在UC患者中:初发型35例(34.7%),慢性复发型47例(46.5%),慢性持续型18例(17.8%),暴发型1例(1.0%);轻型38例(37.6%),中型42例(41.6%),重型21例(20.8%);直肠炎32例(31.7%),直肠乙状结肠炎27例(26.7%);左半结肠炎25例(24.8%),全结肠炎17例(16.8%);活动期95例(94.1%),缓解期6例(5.9%);伴肠外表现者14例(13.9%),不伴肠外表现者87例(86.1%)。在CD患者中,小肠型10例(55.5%),结肠型3例(16.7%),回结肠型5例(27.8%);轻度11例(61.1%),中度4例(22.2%),重度3例(16.7%);伴肠外表现者2例

(11.1%),不伴肠外表现者16例(88.9%)。

对照组共120例,均来我院门诊健康体检者,男68例,女52例,年龄25-77(平均 43.82 ± 6.73)岁。全部研究对象均为无血缘关系的温州汉族人。

1.2 方法 通过采用信函调查、电话询问、面谈以及向患者的经治医师咨询等方式,随访患者的一般情况和治疗情况。

1.2.1 基因组DNA提取: 取外周静脉血5 mL, EDTA抗凝,蛋白酶K消化,酚/氯仿法抽提DNA。

1.2.2 NAT2基因多态性检测: 采用限制性片段长度PCR技术扩增NAT2目的基因。引物参考文献^[2]设计:上游5'-GCCTCAGGTGCCTTGCAATTT-3';下游5'-CGTGAGGGTAGAGAGGATAT-3'。PCR反应总体积50 μ L,其中含 $10 \times$ PCR缓冲液5 μ L, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 200 μ mol/L dNTPs, 2种引物各2 pmol, DNA聚合酶1U, 模板DNA30 ng。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 然后95 $^{\circ}$ C 50 s, 55 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 共30个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min,得到长度为535 bp片段。将10 μ L上述扩增产物分别与5 U的Kpn I, BamH I 37 $^{\circ}$ C水浴3 h, 5 U的Taq I 65 $^{\circ}$ C水浴3 h,进行酶切反应(限制性内切酶购自深圳晶美生物工程有限公司)。酶切产物用80 g/L的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,1 g/L的硝酸银染色分析结果。通过酶切片段的大小可直接判断是否存在NAT2 5B, 6A, 7B等NAT2突变型等位基因。根据4种等位基因不同组合,可将人群划分为3种类型:快乙酰化基因型、中间乙酰化基因型以及慢乙酰化基因型(表1)。

统计学处理 采用 χ^2 检验确认Hardy-Weinberg平衡,检验研究样本的群体代表性。采用 χ^2 检验及Fisher精确检验比较各组等位基因、基因型频率分布的差异。统计在SPSS10.0软件包中进行。

2 结果

2.1 等位基因及基因型频率总体分布 IBD组和UC组与对照组NAT2基因多态性比较,各等位基因及基因型频率总体分布差异无统计学意义(表2)。对IBD组内再进行分层,由于CD组数量少,分层意义不大,本研究主要根据疾病类型、轻重程度、部位、肠外表现对UC进行分层,分别进行亚组的比较,各亚组的等位基因及基因型频率分布差异也无统计学意义(表3)。

2.2 正常对照组NAT2基因多态性与国外人种比较 NAT2各等位基因分布存在明显的种族差异(表4)。

表 1 NAT2突变型等位基因判断

突变等位基因	突变位点	限制性内切酶	识别序列	野生型酶切片段/bp	突变型酶切片段/bp
NAT2 5B	481C→T	<i>Kpn</i> I	G-GTAC'C	483;53	535
NAT2 6A	590G→A	<i>Taq</i> I	T'CG-A	205;170;160	330;205
NAT2 7B	857G→A	<i>Bam</i> H I	G'GATCC	428;107	535

表 2 UC组与对照组NAT2基因多态性比较

分组	n	等位基因频率(%)				乙酰化基因型频率(%)		
		NAT2 4	NAT2 5B	NAT2 6A	NAT2 7B	快型	中间型	慢型
对照组	120	136(56.7)	18(7.5)	56(23.3)	30(12.5)	45(37.5)	46(38.3)	29(24.2)
IBD	119	133(55.9)	16(6.7)	56(23.5)	33(13.9)	42(35.3)	49(41.2)	28(23.5)
UC	101	112(55.4)	13(6.4)	48(23.8)	29(14.4)	35(34.7)	42(41.6)	24(23.7)
CD	18	21(58.3)	3(8.3)	8(22.2)	4(11.1)	7(38.9)	7(38.9)	4(22.2)

表 3 UC组内分层NAT2基因多态性比较

分组	n	等位基因频率(%)				乙酰化基因型频率(%)		
		NAT2 4	NAT2 5B	NAT2 6A	NAT2 7B	快型	中间型	慢型
初发型	35	39(55.7)	5(7.1)	15(21.4)	11(15.7)	13(37.1)	13(37.1)	9(26.8)
慢性复发型	47	54(57.4)	5(5.3)	22(23.4)	13(13.8)	16(34.0)	22(46.8)	9(19.2)
慢性持续型	18	19(52.8)	2(5.6)	10(27.8)	5(13.8)	6(33.3)	7(38.9)	5(27.8)
暴发型	1	0(0)	1(50)	1(50)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)
轻型	38	45(59.2)	4(5.3)	16(22.3)	11(14.5)	13(34.2)	19(50.0)	6(15.8)
中型	42	47(60.0)	6(7.1)	20(23.8)	11(13.1)	15(35.7)	17(40.5)	10(23.8)
重型	21	20(47.6)	3(7.1)	12(28.6)	7(16.7)	7(33.3)	6(28.6)	8(38.1)
直肠炎	32	35(54.7)	3(4.7)	16(25.0)	10(15.6)	10(31.2)	15(46.9)	7(21.9)
直肠乙状结肠炎	27	32(59.3)	4(7.4)	11(20.3)	7(13.0)	11(40.8)	10(37.0)	6(22.2)
左半结肠炎	25	27(54.0)	4(8.0)	13(26.0)	6(12.0)	8(32.0)	11(44.0)	6(24.0)
全结肠炎	17	18(52.9)	2(5.9)	8(23.5)	6(17.7)	6(35.3)	6(35.3)	5(29.4)
伴肠外表现	14	13(46.4)	2(7.2)	7(25.0)	6(21.4)	5(35.7)	3(21.4)	6(42.9)
不伴肠外表现	87	99(56.8)	11(6.3)	41(23.6)	23(13.2)	30(34.5)	39(44.8)	18(20.7)

2.3 正常对照组NAT2基因多态性与其他地区汉族人群比较 NAT2各等位基因的分布存基本上类似, NAT2 4 均大于50%(表5)。

3 讨论

N-乙酰基转移酶广泛分布于胃、小肠、结肠和肝脏中, 而NAT2主要分布在肝组织中, 是一种肝细胞胞质(非微粒体)代谢酶, 主要催化异烟肼、普鲁卡因胺、磺胺药等胍类化合物和具有致癌性的芳香胺或杂环胺类化合物在人体内的II相代谢反应(氮位的乙酰化)。NAT2基因位于人类染色体8p22, 编码区为870 bp, 编码290个氨基酸。至今为止, 已有26个NAT2等位基因被证实^[10]。他主要存在7个位点的点突变, 其中

表 4 温州汉族健康人群与国外人种NAT2等位基因频率分布(%)

人种	n	NAT2 4	NAT2 5B	NAT2 6A	NAT2 7B
日本人	316	64.0	1.9 ^a	23.1	11.1
高加索人	744	25.0 ^b	45.0 ^b	28.0	1.3 ^b
非洲人	256	36.0 ^b	30.0 ^b	22.0	2.0 ^b
温州汉族健康人群	120	56.7	7.5	23.3	12.5

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 温州汉族健康人群。

有5个导致编码氨基酸的改变。这7个突变的等位基因位点是191[G→A(Arg64→Glu)], 282[C→T(Tyr94)], 341[T→C(Ile114→Thr)], 481[C→T(Leu161)], 590[G→A(Arg197→Gln)], 803[A→

■相关报道

NAT2基因的多态性具有显著的种族和地区差异, 不同人群间其突变等位基因可能存在差异, 基因型亦有所不同。有报道显示NAT2基因型和结肠癌、膀胱癌、肺癌和乳腺癌等多种肿瘤的发生有关, 还与风湿性关节炎、外源性支气管哮喘、帕金森氏病、系统性红斑狼疮、阿尔茨海默病和帕金森病等的遗传易感性有关, 值得进一步研究探讨。

■创新盘点

本文研究了温州汉族人群的NAT2基因型分布, 并从溃疡性结肠炎是大肠癌的癌前病变入手, 联系吸烟对CD和UC有不同的影响, NAT2又是烟草的主要代谢酶, 考虑到不同的NAT2基因频率分布和IBD的发病之间可能存在关系, 从而就此进行进一步的研究。本文的研究显示: IBD的NAT2基因型和等位基因频率总体分布与对照组差异无统计学意义, 提示NAT2基因多态性在IBD的遗传发病机制中不起重要作用。

■应用要点

本研究通过探讨 NAT2 基因多态性与 IBD 的相关性, 以求对 IBD 的发病机制研究有所贡献, 并为 NAT2 相关疾病的流行病学调查提供重要的遗传学依据。

表 5 温州汉族健康人群与其他地区汉族人群的 NAT2 等位基因频率分布(%)

人种	n	NAT2 4	NAT2 5B	NAT2 6A	NAT2 7B
北京 ^[3]	138	67.4	5.4	15.1	11.9
北京 ^[4]	88	61.2	4.0	20.3	14.5
天津 ^[5]	100	64.0	4.0	16.0	16.0
河北 ^[6]	237	48.7	5.1	15.6	30.6
福建 ^[7]	168	60.4	1.8	24.1	13.7
南京 ^[8]	120	62.5	4.58	18.8	14.2
新加坡华人 ^[9]	187	51.1	6.9	32.1	9.9
温州汉族健康人群	120	56.7	7.5	23.3	12.5

G(Lys268→Arg)]和857[G→A(Gly286→Glu)]. 目前所发现的 NAT2 的 26 种突变等位基因均是由这 7 个点突变组合而成的, 包括 NAT2 4, 5A, 5B, 5C, 6A, 6B, 6C, 7A, 7B, 14A, 14B, 14C, 14D 等. 研究证实 NAT2 基因突变能影响 NAT2 酶的表达、稳定性及催化活性, 除野生型 NAT2 4 和 2 种罕见的基因型(NAT2 12, NAT2 13)外, 均导致 NAT2 酶乙酰化能力的下降^[10-11]. 在亚洲和高加索人群中, 常见突变型等位基因均为 NAT2 5B(341, 481 和 803 位点突变), 6A(282 和 590 位点突变), 7B(282 和 857 位点突变), 占全部突变的 90% 以上. 根据这 4 种等位基因可将人群划分为 3 种类型: 快乙酰化基因型(NAT2 4 的纯合子)、中间乙酰化基因型(NAT2 4 与各种突变型等位基因 NAT2 5B, 6A, 7B 的杂合子)和慢乙酰化基因型(各种突变型等位基因 NAT2 5B, 6A, 7B 的组合). 通过对 NAT2 4 等 4 种等位基因型的检测, 能预测个体的乙酰化表型^[12], 快乙酰化基因型和中间乙酰化基因型表型一般为快型乙酰化, 慢乙酰化基因型表型为慢型乙酰化. NAT2 基因的多态性具有显著的种族和地区差异, 东方亚洲人以快乙酰化基因型和中间乙酰化基因型为主(>70%), 而西方白种人以慢乙酰化基因型为主(>53%)^[13]. 在北非, 慢乙酰化基因型可占 90%, 欧美为 40%-70%, 在日本, 则只有 10%, 而在加拿大爱斯摩人, 慢乙酰化基因型仅占 5%^[14]. 本研究 120 例健康人, 频率最高的等位基因是 NAT2 4(56.7%), 其次是 NAT2 6A(23.3%)和 NAT2 7B(12.5%), NAT2 5B(7.5%)为少见等位基因, 未检测到 NAT2 14 突变等位基因. 快乙酰化基因型、中间乙酰化基因型和慢型乙酰化基因者在本研究中所占的比例分别为 37.5%, 38.3% 和 24.2%, 提示浙江汉族人群中以快型乙酰化者

为主. 以上结果与其他相关资料比较, 野生型在中国人和日本人中频率最高, 但在高加索和非洲人群中出现频率不高; 突变型 NAT2 5B 在高加索和非洲人群中最常见, 但在亚洲人群中少见. 非洲人群 NAT2 14 等位基因频率较高, 而在其他种群中均十分罕见. 在中国汉族各地区人群之间的 NAT2 基因频率分布大致类似, NAT2 4 均大于 50%, 以快乙酰化基因型和中间乙酰化基因型为主, 慢乙酰化基因型比例低.

NAT2 做为一种肝细胞胞质(非微粒体)药物代谢酶, 催化许多致癌性的芳香胺或杂环类化合物在人体内的 II 相代谢反应, 慢性乙酰化代谢者对芳香胺或杂环类致癌物的解毒能力降低, 因此容易导致结肠癌、膀胱癌、肺癌和乳腺癌等多种肿瘤的发生^[10]. 近来研究又发现 NAT2 基因多态性还与风湿性关节炎^[15]、外源性支气管哮喘^[16]、帕金森氏病^[17]及系统性红斑狼疮^[18]等一系列与外界环境因素相关的疾病有关. 慢性乙酰化代谢者对环境中的致病原的代谢能力降低, 就容易导致这些疾病的发生. 溃疡性结肠炎病因尚不明确, 目前认为是由多因素相互作用的结果, 包括环境因素、免疫因素及遗传因素等. 且目前认为大肠癌的癌前病变主要是大肠腺瘤和腺瘤病, 其次是溃疡性结肠炎. 吸烟对 CD 和 UC 有不同的影响, 而 NAT2 是烟草的主要代谢酶. 因此, 不同的 NAT2 基因频率分布和 IBD 的发病之间可能存在关系. 我们的研究显示: IBD 的 NAT2 基因型和等位基因频率总体分布与对照组差异无统计学意义, 提示 NAT2 基因多态性在 IBD 的遗传发病机制中不起重要作用. 在本研究中的病例组和对照组的样本含量均不够大, 可能不足以发现两者间实际存在的差异, 另外也不能忽略个体间基因在体内表达水平不同, 即基因型和表型之间存在个体差异, 有待在以后的研究中进一步扩大样本量以证实.

4 参考文献

- 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. 中华消化杂志 2001; 21: 236-239
- Tanigawara Y, Kita T, Aoyama N, Gohara M, Komada F, Sakai T, Kasuga M, Hatanaka H, Sakaeda T, Okumura K. N-acetyltransferase 2 genotype-related sulfapyridine acetylation and its adverse events. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1058-1062
- 欧阳晓春, 余小骊, 刘振华, 吴多斌. 阿尔茨海默病与细胞色素 P4501A1 和 N-乙酰基转移酶基因多态性的相关研究. 广东医学 2007; 28: 884-887
- 郝钢跃, 张维东, 陈永和, 张道新, 张玉海. NAT2 基因多态性与膀胱癌遗传易感性的关系. 中华肿瘤杂志

- 2004; 26: 283-286
- 5 洪雁, 张本恕. N-乙酰基转移酶基因多态性与帕金森病遗传易感性关系的研究. 中华神经外科杂志 2002; 18: 30-33
- 6 何路军, 刘敬闪, 乔芳, 孙晓峰, 牟振云, 姜玲玲. 河北汉族人群NAT2基因多态性分析. 中国输血杂志 2004; 17: 322-324
- 7 高建平, 黄跃东, 梁建平, 蔡秀珍. 福建地区汉族人群N-乙酰基转移酶基因多态性. 中国现代医学杂志 2003; 13: 32-34
- 8 卢建丰, 曹晓梅, 刘志海, 曹文, 郭联庆, 卓海通, 凌树森, 陈亚利, 赵权, 王卫萍, 李芳秋. 中国人群N-乙酰基转移酶多态性的基因分析. 中国药理学报 1998; 19: 347-351
- 9 Lee EJ, Zhao B, Seow-Choen F. Relationship between polymorphism of N-acetyltransferase gene and susceptibility to colorectal carcinoma in a Chinese population. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 513-517
- 10 Fretland AJ, Leff MA, Doll MA, Hein DW. Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 207-215
- 11 Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* 2002; 506-507: 65-77
- 12 Kumagai S, Komada F, Kita T, Morinobu A, Ozaki S, Ishida H, Sano H, Matsubara T, Okumura K. N-acetyltransferase 2 genotype-related efficacy of sulfasalazine in patients with rheumatoid arthritis. *Pharm Res* 2004; 21: 324-329
- 13 Bell DA, Taylor JA, Butler MA, Stephens EA, Wiest J, Brubaker LH, Kadlubar FF, Lucier GW. Genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1689-1692
- 14 Lin HJ, Han CY, Lin BK, Hardy S. Slow acetylator mutations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 Asians, blacks, Hispanics, and whites: application to metabolic epidemiology. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 827-834
- 15 Pawlik A, Ostaneck L, Brzosko I, Gawroska-Szklarz B, Brzosko M, Dabrowska-Zamojcin E. Increased genotype frequency of N-acetyltransferase 2 slow acetylation in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72: 319-325
- 16 Nacak M, Aynacioglu AS, Filiz A, Cascorbi I, Erdal ME, Yilmaz N, Ekinci E, Roots I. Association between the N-acetylation genetic polymorphism and bronchial asthma. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 54: 671-674
- 17 Chan DK, Lam MK, Wong R, Hung WT, Wilcken DE. Strong association between N-acetyltransferase 2 genotype and PD in Hong Kong Chinese. *Neurology* 2003; 60: 1002-1005
- 18 Cooper GS, Treadwell EL, Dooley MA, St Clair EW, Gilkeson GS, Taylor JA. N-acetyl transferase genotypes in relation to risk of developing systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004; 31: 76-80

■同行评价

本文内容较新, 书写规范, 具有一定的科学性和先进性, 但讨论部分对已有文献讨论过多, 对本文资料讨论略显不足。

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 •

世界华人消化杂志作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。《世界华人消化杂志》要求所有署名人员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。(常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

HO-CO系统与肝硬化门脉高压血液动力学改变的研究进展

段志军, 刘洁, 赵钢, 杨冬, 李蕾蕾

■背景资料

血红素氧合酶与内源性一氧化碳作为HO-CO系统在血管调节中发挥重要的生物学效应, 近年来HO-CO系统与PH血液动力学方面关系的研究开始受到诸多学者的重视, 然而仍有很多方面悬而未决, 对于现有研究的回顾将会对更深层次的研究提供依据和思路。

段志军, 刘洁, 赵钢, 杨冬, 李蕾蕾, 大连医科大学附属第一医院消化科 辽宁省大连市 116011

辽宁省科技攻关资助项目, No. 225003

作者贡献分布: 本文由段志军和刘洁完成; 赵钢校对; 杨冬和李蕾蕾查阅整理文献。

通讯作者: 段志军, 116011, 辽宁省大连市, 大连医科大学附属第一医院消化科. cathydoctor@yahoo.com

电话: 0411-83635963-3081 传真: 0411-83632383

收稿日期: 2007-11-17 修回日期: 2008-01-30

Research progress in the relationship between HO-CO pathway and haemodynamic variation of cirrhotic portal hypertension

Zhi-Jun Duan, Jie Liu, Gang Zhao, Dong Yang, Lei-Lei Li

Zhi-Jun Duan, Jie Liu, Gang Zhao, Dong Yang, Lei-Lei Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Supported by: the Scientific and Technological Project of Liaoning Province, No. 225003

Correspondence to: Professor Zhi-Jun Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. cathydoctor@yahoo.com

Received: 2007-11-17 Revised: 2008-01-30

Abstract

Hyperkinetic circulation may present in patients with cirrhotic portal hypertension. Some papers about hemeoxygenase/endogenous carbon monoxide as HO-CO pathway, which significantly affects the regulation of blood vessel and correlates closely with the persistence of portal hypertension, variation of hepatic microcirculation and hyperkinetic circulatory state in cirrhotic portal hypertension, were published. This article gives a brief overview on the above respects in three parts, which were haemodynamic variation of cirrhotic portal hypertension, biologic activity of HO-CO pathway and their correlations.

Key Words: HO-CO pathway; Liver cirrhosis; Portal hypertension

Duan ZJ, Liu J, Zhao G, Yang D, Li LL. Research progress in the relationship between HO-CO pathway and haemodynamic variation of cirrhotic portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 874-878

摘要

肝硬化门脉高压患者多存在高动力循环状态, 有报道血红素氧合酶(hemeoxygenase, HO)与内源性一氧化碳(carbon monoxide, CO)作为HO-CO系统在血管调节中发挥重要的生物学效应, 与肝硬化门静脉高压(portal hypertension, PH)的持续存在、肝微循环变化以及高动力循环状态有着密切的关系. 本文将从肝硬化PH的血液动力学改变、HO-CO系统的生物学活性和HO-CO系统与PH的血液动力学改变等三部分的研究进展作一综述。

关键词: HO-CO系统; 肝硬化; 门静脉高压

段志军, 刘洁, 赵钢, 杨冬, 李蕾蕾. HO-CO系统与肝硬化门脉高压血液动力学改变的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 874-878

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/874.asp>

0 引言

在肝硬化发展中存在着血液动力学紊乱, 有人称之为高动力循环. 迄今为止, 肝硬化高动力循环的发生和持续变化仍被认为是一个十分复杂的病理生理过程. 目前, 一些参与或影响因素的研究已经有一定的进展, 有研究认为血红素氧合酶(hemeoxygenase, HO)与内源性一氧化碳(carbon monoxide, CO)作为HO-CO系统在血管调节中发挥重要的生物学效应, 与肝硬化门静脉高压(portal hypertension, PH)的持续存在、肝微循环变化以及高动力循环状态有着密切的关系. 本文将对这一方面的研究进展做一综述。

1 肝硬化PH的血液动力学改变

肝硬化发展的一系列病理变化造成肝内循环紊乱, 表现为血管床缩小、闭塞或扭曲. 肝内门静

■同行评议者

董蕾, 教授, 西安交通大学第二附属医院消化内科

脉、肝静脉和肝动脉小支三者之间失去正常关系, 并相互出现交通吻合支等, 成为PH形成的病理基础, 导致门静脉阻力的增加和门静脉血流的增多, 而侧支循环的开放是PH具有特征性意义的表现. 当门静脉压力增高超过200 mmH₂O时, 正常消化器官和脾的回心血液流经肝脏受阻, 门静脉系统许多部位与腔静脉之间门-体侧支循环建立. Maroto *et al*^[1]研究发现, 门体静脉分流导致PH患者多伴有高心输出量、外周和内脏血管扩张、周围血管阻力下降、平均动脉压明显下降、内脏高动力循环、肾血容量减少、高肾素血症和加压系统活性增高等高动力循环状态, 门脉流入量大增而使门静脉继续维持高压. 因此, 在PH形成因素中, 血流流出时的阻力增加往往是始动因素, 而血流量的增加则对PH的维持起重要作用. 在这种高动力循环的发生机制中, 目前国内外的研究结果达成共识, 即内脏及外周血管广泛舒张是其主要原因所在^[2-3]. 可能与血管扩张物质增多, 缩血管物质相对减少以及血管对内源性缩血管物质反应性降低有关^[4-5]. 一氧化氮(nitric oxide, NO)、CO、前列环素、肿瘤坏死因子和内皮素等均参与这一过程.

2 HO-CO系统的生物学活性

上世纪八十年代, HO最早被发现存在于微粒体中, 并受金属离子的调节. 后来又有学者在睾丸中发现该酶的同工酶. 近年来的研究表明, HO是哺乳动物和啮齿动物的微粒体中的一种蛋白酶, 是催化血红素(heme)分解生成CO、胆绿素(biliverdin)和Fe²⁺的限速酶. HO包括3种亚型. HO-1也叫第32号热休克蛋白(heat shock protein32, HSP32), 不仅对金属离子敏感, 而且还对一切可造成病理性损伤的因素有反应, 这些因素包括热休克、缺血、谷胱甘肽(glutathione, GSH)耗竭、放射、缺氧、高氧、细胞转化和疾病状态, HO的底物血红素、重金属、过氧化物、紫外线、缺氧和炎症细胞因子等都可刺激诱导而上调HO-1水平, 因此该型同工酶也叫诱导型HO. HO-1主要分布于网状内皮细胞丰富的组织中, 其中在肝、脾组织中最多. HO-1及其产物有抗氧化应激、抗凋亡、抗炎症及改善微循环等作用, 被认为是减轻肝脏缺血再灌注损伤的一种新的方法^[6]. 有研究表明, HO-1还参与胚胎和血管的发育^[7-8]. CO在HO催化血红素降解过程中产生, 是继NO之后引起广泛关注的又一气体信使分子. CO跟NO一样作为第二信使促进具有

生理活性的3', 5'-环鸟嘌呤核苷单磷酸(cGMP)的产生. 内源性CO除了有机物的氧化(如生物膜的脂质过氧化)外, heme的生理降解是其主要来源. 大量证据表明内源性CO是体内广泛分布的多功能气体信号分子, 能降低促炎基因表达而提高抗炎基因表达, 减轻炎症反应^[9], 具有神经传递及松弛血管平滑肌、扩张血管、组织血小板聚集和抵抗细胞凋亡等作用^[10-13], 在生理状态下, CO是肝血管阻力的主要调节者, 能使肝窦保持低张低阻状态保持肝窦的血流灌注^[14-15], 对保持肝窦的舒张状态起关键作用^[16]. Pannen *et al*^[17]用锌原卟啉(zincum protoporphyrin, ZnPP)(HO抑制剂)消除内源性CO能引起肝血管阻力的明显升高, 而亚硝基左旋精氨酸甲酯(L-nitro-arginine methylester, L-NAME)作为一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂则仅引起肝血管阻力的轻微上升, 说明相对于CO, NO对肝窦的调节作用是很小的. HO-1的另一产物胆绿素, 是较强的氧化剂, 能减轻内皮细胞中黏附分子的表达, 抑制炎症粒细胞和炎症巨噬细胞聚集, 提高抗凋亡分子的表达^[18]. HO-2对HO-1的调节剂无反应, 在特定组织中稳定地表达, 主要分布于脑、睾丸和肝组织, 是生理状态下HO的主要存在形式, 不易被诱导, 因而被称为结构型HO, 其唯一的调节剂是肾上腺糖皮质激素. 也有人把HO-2和HO-3均归为原型, 还有学者将HO-3称为未确定型HO, HO-3在脾、肝、脑、睾丸、心、肾、前列腺等多个器官组织中均可发现, 其催化活性最弱. HO的作用底物为铁原卟啉(ferrum protoporphyrin, FePP), 但HO仅能辨认卟啉环, 不能辨认环内金属, 所以与FePP结构相似的非生理性金属原卟啉如锌原卟啉、锡原卟啉等均能与FePP竞争而抑制HO的活性.

3 HO-CO系统与PH的血液动力学改变

上世纪九十年代, Tsuchiya *et al*发现了肝硬化大鼠肝脏HO-1 mRNA表达明显升高. Fernandez *et al*^[19]在部分结扎门静脉引起大鼠PH模型上也发现肝脏及腹腔内脏器均有HO-1 mRNA高表达现象. Makino *et al*^[16]分别对肝硬化PH、特发性门脉高压(idiopathic portal hypertension, IPH)和非门脉高压患者进行肝脾组织活检, 采用多克隆抗体免疫组织化学方法检测HO的分布情况, 结果显示, 在正常对照组肝脏, HO-1主要在枯否细胞亚群表达. 在PH组, 90%以上HO-1在枯否细胞表达, 肝脏总HO活性较对照组明显升

■研发前沿

HO-CO系统的生物学活性方面的研究很多, 但在门静脉高压血液动力学方面的研究尚属于起步阶段.

■创新盘点

本文对HO-CO系统与肝硬化PH血液动力学改变研究进展进行综述,目的是进一步加深对这一方面的了解和研究,寻求干预PH形成或者降低PH的治疗方法。

高。在IPH组,HO-1在枯否细胞表达降低,肝细胞内无表达,而脾脏中HO-1蛋白水平和mRNA表达显著增多。研究发现肝硬化PH患者和IPH患者HO-1表达具有明显差异主要与肝窦内血管壁剪应力有关。肝硬化PH组和IPH组肝窦内血流动力学改变显著不同,IPH被认为可能是肝窦前血管收缩的结果,引起肝脏灌注压降低,局部血管剪应力降低;相反,肝硬化PH时,肝窦内压力升高并伴随着高动力循环状态,提示肝窦内剪应力升高。Kobayashi *et al*^[20]报道,继发于门脉高压的缺血再灌注和过高剪应力可以增加移植肝中HO-1的表达。枯否细胞可能作为一种感受器细胞,调节肝窦局部血流动力学变化,并可通过HO-1表达的变化改变其降解血红素的能力。在大鼠门静脉部分结扎的PH模型中,肝窦前门脉压升高,窦内血流动力学减低,脾脏中HO-1 mRNA表达显著增多,与IPH患者相似。但HO-1在PH大鼠和IPH患者的肝内表达存在差异:PH大鼠HO-1在肝细胞中明显表达,而IPH患者无表达;IPH患者肝脏枯否细胞中HO-1蛋白表达明显减少,而PH大鼠无明显减少。引起动物与人类HO-1表达的差异可能与枯否细胞和肝细胞对缺氧的反应性不同有关,缺氧是决定HO-1启动活性的关键因素^[21]。

有研究报道,肝硬化鼠腹腔脏器中HO的活性除肝脏及肾脏不明显外其他脏器均有显著上升,其血中NO及CO的水平明显高于正常对照组,且二者存在着相关关系。CO主要通过可溶性鸟苷酸环化酶—环磷酸鸟苷(solubility guanylate cyclase-cyclic guanosine monophosphate, sGC-cGMP)途径产生如平滑肌松弛等生理效应,此外还可通过调节K⁺通道的活性传递生理信息,参与调节血管的舒张效应。CO与sGC的亚铁血红素部分有很高的亲和力,可以相互结合产生CO-亚铁血红素(carbon monoxide-heme, CO-heme),它可以与该酶的卟啉部分相结合,在其催化部位附近导致构型改变,从而激活cGMP,导致cGMP生成增多,发挥第二信使的效应。CO的作用机制与NO相同,也均为血管扩张物质,对肝脏的血液循环有重要的调节作用。但NO主要为肝动脉的扩张剂,对门脉血管床的影响较小;而内源性CO对肝动脉的作用较小,对保持门脉血管的松弛状态非常重要,同时肝脏实质细胞产生的CO在保持肝窦舒张状态中起关键作用。CO和NO在PH的病理生理过程中可能存在着平衡和协同作用^[22]。CO和NO产物还参与肝肺综合症肺

部病理改变^[23-24]。

在病理情况下,CO的过量产生则会产生不同的结果。在急性肝损伤时,CO的产生可以扩张局部血管、维持血管灌注、改善微循环,具有抗损伤的作用。肝硬化时,CO过量产生,一方面可以松弛肝血窦、对抗血管阻力增加;另一方面也可引起内脏血管过度扩张、血管阻力下降、血流量增加,引起并加重PH的高动力循环。目前CO过量产生的原因尚不清楚,据报道推测也与NO相似。一些学者的报道提出了在肝硬化PH时HO-1表达明显增强,全血CO水平升高^[25-26]。PH大鼠腹腔脏器中HO活性也是增高的^[27]。HO-1通过CO产物在PH中重要的病理生理学作用^[28]。国内学者的研究表明,PH患者的脾动脉局部HO-1被诱导表达增加,而HO-2含量不变,这显示HO-2分解血红素产生CO作为内源性CO的重要来源主要参与维持生理状态下内脏血管的扩张,保证局部组织器官的充分血液供应,达到局部血流动力学平衡状态;而PH时由于内脏血液动力学紊乱,出现局部组织缺氧、内毒素血症、炎性因子释放等刺激因素,继而诱导机体代偿性合成HO-1,试图通过其强大的催化血红素分解功能产生更大量的内源性CO,以舒张血管平滑肌,扩张血管达到缓解局部缺氧缺血的目的^[29]。

Suematsu *et al*^[30]曾用ZnPP阻止CO产生可以使肝脏灌注压升高,而灌注CO后可显著降低已升高的血管阻力,推测ZnPP通过抑制HO产生CO,消除CO引起的血管收缩抑制作用,ZnPP明显增加血管环的收缩效应。HO-CO系统介导PH时肠系膜上动脉和腹主动脉血管环的低收缩反应,参与PH高动力循环状态的形成。另有研究^[5]显示,门静脉部分狭窄大鼠的肠系膜上动脉和腹主动脉对苯肾上腺素的收缩效应都较假手术组显著降低,表明门静脉部分狭窄的PH大鼠内脏血管对苯肾上腺素等缩血管物质的反应性降低,这种病理生理情况可能是门脉高压高动力循环的重要原因。

4 结论

HO-CO系统在维持PH高动力循环状态中发挥着十分重要的作用^[31]。因此,探讨HO-CO系统与PH的关系,对于研究PH的机制、进一步寻求诊断和治疗手段具有重要的临床意义。关于肝硬化PH及其高动力循环状态的维持和发展,尚有许多未知问题有待探究。有研究表明,提高肝脏中

HO活性可以干预肝纤维化进程, 抑制肝硬化的发展^[32]. 随着研究的不断深入, 必将对肝硬化PH的干预和治疗, 减少并发症以提高患者的生活质量产生重大而深远的影响.

5 参考文献

- Maroto A, Gines P, Arroyo V, Ginas A, Salo J, Cleria J, Jimenez W, Bru C, Rivera F, Rodes J. Brachial and femoral artery blood flow in cirrhosis: relationship to kidney dysfunction. *Hepatology* 1993; 17: 788-793
- 李大鹏, 杨镇, 邓小荣, 李德旭, 王新保. 门静脉高压症患者脾血管内皮素-1mRNA的表达. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 865-866
- 曾金华, 杨镇, 徐钧. 门静脉高压症患者肝外血管平滑肌细胞凋亡及其相关基因表达的研究. *中华实验外科杂志* 2003; 20: 749-751
- Kiel JW, Pitts V, Benoit JN, Granger DN, Shepherd AP. Reduced vascular sensitivity to norepinephrine in portal-hypertensive rats. *Am J Physiol* 1985; 248: G192-G195
- Erario MA, Gonzales S, Romay S, Eizayaga FX, Castro JL, Lemberg A, Tomaro ML. Role of heme oxygenase/carbon monoxide pathway on the vascular response to noradrenaline in portal hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32: 196-201
- Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 1653-1656
- Watanabe S, Akagi R, Mori M, Tsuchiya T, Sassa S. Marked developmental changes in heme oxygenase-1 (HO-1) expression in the mouse placenta: correlation between HO-1 expression and placental development. *Placenta* 2004; 25: 387-395
- Fernandez M, Bonkovsky HL. Vascular endothelial growth factor increases heme oxygenase-1 protein expression in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 634-640
- Alcaraz MJ, Fernandez P, Guillen MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 2541-2551
- Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ, Figdor CG. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 551-571
- Soares MP, Brouard S, Smith RN, Bach FH. Heme oxygenase-1, a protective gene that prevents the rejection of transplanted organs. *Immunol Rev* 2001; 184: 275-285
- Soares MP, Usheva A, Brouard S, Berberat PO, Gunther L, Tobiasch E, Bach FH. Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 321-329
- Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 17950-17961
- Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 1995; 96: 2431-2437
- Pannen BH, Bauer M. Differential regulation of hepatic arterial and portal venous vascular resistance by nitric oxide and carbon monoxide in rats. *Life Sci* 1998; 62: 2025-2033
- Makino N, Suematsu M, Sugiura Y, Morikawa H, Shiomi S, Goda N, Sano T, Nimura Y, Sugimachi K, Ishimura Y. Altered expression of heme oxygenase-1 in the livers of patients with portal hypertensive diseases. *Hepatology* 2001; 33: 32-42
- Pannen BH, Kohler N, Hole B, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J Clin Invest* 1998; 102: 1220-1228
- Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, Yamashita K, Csizmadia E, Lassman C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Bach FH. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 2004; 40: 1333-1341
- Fernandez M, Bonkovsky HL. Increased heme oxygenase-1 gene expression in liver cells and splanchnic organs from portal hypertensive rats. *Hepatology* 1999; 29: 1672-1679
- Kobayashi T, Sato Y, Yamamoto S, Takeishi T, Hirano K, Watanabe T, Takano K, Naito M, Hatakeyama K. Augmentation of heme oxygenase-1 expression in the graft immediately after implantation in adult living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2005; 79: 977-980
- 张军霞, 冯志杰. 血红素氧合酶——一氧化碳系统与门脉高压症. *国外医学内科分册* 2004; 3: 111-113
- Goh BJ, Tan BT, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide synthase and heme oxygenase expressions in human liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 588-594
- Schroeder RA, Ewing CA, Sitzmann JV, Kuo PC. Pulmonary expression of iNOS and HO-1 protein is upregulated in a rat model of prehepatic portal hypertension. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2405-2410
- Zhang J, Ling Y, Luo B, Tang L, Ryter SW, Stockard CR, Grizzle WE, Fallon MB. Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2003; 125: 1441-1451
- Tran TT, Martin P, Ly H, Balfe D, Mosenifar Z. Carboxyhemoglobin and its correlation to disease severity in cirrhotics. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 211-215
- Gonzales S, Perez MJ, Perazzo JC, Tomaro ML. Antioxidant role of heme oxygenase-1 in prehepatic portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4149-4155
- Fernandez M, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Increased heme oxygenase activity in splanchnic organs from portal hypertensive rats: role in modulating mesenteric vascular reactivity. *J Hepatol* 2001; 34: 812-817
- Matsumi M, Takahashi T, Fujii H, Ohashi I, Kaku R, Nakatsuka H, Shimizu H, Morita K, Hirakawa M, Inagaki M, Sadamori H, Yagi T, Tanaka N, Akagi R. Increased heme oxygenase-1 gene expression in the livers of patients with portal hypertension due to severe hepatic cirrhosis. *J Int Med Res* 2002; 30: 282-288
- 徐鋈耀, 杨镇, 孙政, 李涛, 许荣华. 门静脉高压症患者

■应用要点

本文将近年来在这一方面的研究进展予以综述, 旨在唤起更多学者的关注, 以寻求干预门静脉高压的形成或者降低门静脉高压的治疗方法.

■同行评价

本文内容新颖,层次清楚,论述清晰,语言通顺,观点明确,对临床及科研有很好的指导作用.

- 脾动脉局部血红素氧合酶表达异常及意义. 中华实验外科杂志 2005; 22: 1461-1463
- 30 Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 1995; 96: 2431-2437
- 31 Angermayr B, Mejias M, Gracia-Sancho J, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Fernandez M. Heme oxygenase attenuates oxidative stress and inflammation, and increases VEGF expression in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2006; 44: 1033-1039
- 32 Tsui TY, Lau CK, Ma J, Glockzin G, Obed A, Schlitt HJ, Fan ST. Adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer suppresses the progression of micronodular cirrhosis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2016-2023

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 •

世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成t_{1/2}或T, V_{max}不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

吲哚胺2, 3双加氧酶在病毒感染中的作用

曾道炳, 卢实春

曾道炳, 卢实春, 首都医科大学附属北京佑安医院肝胆外科
北京市 100069

国家自然科学基金资助项目, No. 30671977

首都医科发展科研基金资助项目, No. 2005-2034

通讯作者: 卢实春, 100069, 北京市丰台区右安门外西头条8号,
首都医科大学附属北京佑安医院肝胆外科.

lsc620213@yahoo.com.cn

电话: 010-83997160 传真: 010-83997160

收稿日期: 2007-11-07 修回日期: 2008-02-08

Function of indoleamine 2, 3-dioxygenase in viral infection

Dao-Bing Zeng, Shi-Chun Lu

Dao-Bing Zeng, Shi-Chun Lu, Department of Hepatobiliary Surgery, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No.30671977 and Capital Medical Developing Research Foundation of Beijing, No. 2005-2034

Correspondence to: Dr. Shi-Chun Lu, Department of Hepatobiliary Surgery, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, 8 Xitou Tiao, Youanmenwai, Fengtai District, Beijing 100069, China. lsc620213@yahoo.com.cn

Received: 2007-11-07 Revised: 2008-02-08

Abstract

The enzyme indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), which catalyzes the first and rate-limiting step in the kynurenine pathway of tryptophan degradation, plays a key role in the antiviral immune. IDO mediates IFN- γ antiviral and serves immunoregulatory and tolerogenic functions. In this review, we introduce the studies on the antiviral immune of IDO in viral infection.

Key Words: Indoleamine 2, 3-dioxygenase; Virus; Immune

Zeng DB, Lu SC. Function of indoleamine 2, 3-dioxygenase in viral infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(8): 879-884

摘要

吲哚胺2, 3双加氧酶(indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO)是色氨酸犬尿氨酸代谢途径的限速酶。IDO在抗病毒免疫中起重要作用, 他能介导IFN- γ 抗病毒及有免疫调节和致免疫耐受功能。本文就其在抗病毒免疫方面作一综述。

关键词: 吲哚胺2, 3双加氧酶/IDO; 病毒; 免疫

曾道炳, 卢实春. 吲哚胺2, 3双加氧酶在病毒感染中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 879-884

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/879.asp>

0 引言

吲哚胺2, 3双加氧酶(indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO)是色氨酸犬尿氨酸代谢途径的限速酶。近来的研究表明, IDO参与许多疾病的免疫调节, 如自身免疫反应性疾病^[1], 抗病毒免疫^[2], 肿瘤的免疫逃避^[3], 以及移植免疫^[4]等。现就IDO在抗病毒免疫中的最新研究进展综述如下。

1 IDO的生物学性质

1967年在兔的肠道组织中发现IDO。人类IDO是含血红素的单一肽链, 由403个氨基酸残基组成, 分子质量约42 kDa, 其等电点为6.9。而小鼠IDO分子量为45 639 Da, 由407个氨基酸残基组成, 其氨基酸序列与人IDO有61%的同源性。人IDO基因位于第8号染色体上, 长15 kb, 包括10个外显子和9个内含子, 为单拷贝基因。IDO基因启动子长1245 bp, 含有2个干扰素刺激反应元件(ISRE), 这2个ISRE样序列间隔1 kb, 他们在IFN- γ 诱导IDO基因转录中必不可少。此外, 5'端还包括X-box和Y-box。他们是主要组织相容性复合物II类基因启动子中干扰素反应区域的必要组成部分。该区域还有与干扰素调节因子-1(IRF-1)结合序列一致或互补的6个序列, 表明IFN能影响IDO基因的表达^[5], 基因表达的调节区域位于5'端。

IDO广泛分布于人和其他哺乳动物(如兔、大鼠、小鼠)的肝外组织(肝内为L-色氨酸2, 3-二加氧酶, 即TDO), 在肺、小肠和胎盘组织中活性相对较高, 主要由外周血单核、巨噬细胞和胎盘滋养层细胞分泌。IDO与TDO催化的反应相同, 均是催化色氨酸分解为犬尿酸, 但其分子质量大小、底物特异性、辅助因子和免疫原性等方面有所不同。IDO底物主要有D-色氨酸、5-羟

■背景资料

IDO是色氨酸犬尿氨酸代谢途径的限速酶。色氨酸是细胞维持活化和增殖所必需的氨基酸, 同时也是构成蛋白质不可缺少的重要成分, 色氨酸的缺乏可使细胞功能受限, 而色氨酸的代谢是受IDO调控的。正常情况下, IDO呈低水平表达, 而在炎症或感染过程中其表达明显增加。IDO的活性表达导致微环境中色氨酸的耗竭, 从而使细胞处于一种“色氨酸饥饿”状态, 处于迅速分裂期的细胞或病原微生物尤为敏感, T细胞也不例外。IDO在病毒感染中的作用可以概括如下: 在病毒感染早期, 病毒诱导IFN- γ 产生, 进而上调IDO, 非特异性抑制病毒复制; 由于持续升高的IDO能导致免疫抑制和减少T细胞反应, 故为病毒播散及持续感染创造了一个良好的环境, 从而使感染慢性化。

■同行评议者

曹洁, 副教授, 第二军医大学微生物学教研室; 高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科

■研发前沿

目前国内外关于IDO在病毒感染中的研究主要集中在HIV、CMV、HCV的感染,我国是一个乙肝大国,慢性无症状乙型肝炎病毒携带者约10%左右,携带的人口总数可能超过1.3亿,而目前对乙肝的治疗仍是一大难题,对IDO在乙肝患者中的深入研究,可为抗乙肝病毒治疗提供一个全新的治疗策略。

色胺、5-羟-L-色氨酸和L-色氨酸,据研究表明L-色氨酸是其最适底物。其催化反应如下: L-色氨酸 \rightarrow ^{IDO}L-甲酰犬尿酸 \rightarrow L-犬尿酸 \rightarrow 3-羟犬尿酸 \rightarrow 喹啉酸 \rightarrow 尼克酰胺。

因而多数学者应用高压液相色谱法(HPLC)测定其底物(tryptophan, Trp)和/或其产物(甲酰犬尿酸、犬尿酸)的含量来反映IDO的活性。

近年来对IDO的生物学特性进行了更为深入的研究,发现IDO或相关代谢产物的表达细胞主要分布于胸腺髓质和次级淋巴器官的T细胞区,并散见于一些免疫耐受或免疫特赦组织中,如胸腺、胃肠道黏膜、附睾、胎盘及眼前房等,而且都特异地表达在巨噬细胞或树突状细胞上。表达于DC上的IDO对于调节免疫具有非常重要的作用。IDO活性组成性地高表达于附睾和胎盘等重要脏器,低水平表达于脾脏、淋巴结和胸腺等淋巴器官,表明其活性并不只是一种诱导型的宿主防御机制,而在免疫系统的调控中同样发挥着重要作用。

2 IDO的免疫调节作用机制

色氨酸是细胞维持活化和增殖所必需的氨基酸,同时也是构成蛋白质不可缺少的重要成分,色氨酸的缺乏可使细胞功能受限,而色氨酸的代谢是受IDO调控的。IDO基因的功能在进化过程中是非常保守的。正常情况下,IDO呈低水平表达,而在炎症或感染过程中其表达明显增加。IDO的活性表达导致微环境中色氨酸的耗竭,从而使细胞处于一种“色氨酸饥饿”状态,处于迅速分裂期的细胞或病原微生物尤为敏感。T细胞也不例外,据Mellor *et al*^[6]的研究表明:表达IDO的人单核巨噬细胞和树突状细胞及鼠树突状细胞,都能促使专职抗原呈递细胞抑制T细胞的增殖。Xiao *et al*^[7]证实了重组IDO转染的非专职抗原呈递细胞也具有抑制抗原特异性T细胞反应的能力。IDO还可抑制T细胞介导的、因主要组织相容性复合体(MHC)不相容引起的同种异体移植物的排斥反应^[8]。其抑制T细胞的可能为以下两种机制:在T细胞增殖的G₁中期有一个对色氨酸缺乏很敏感的调控点,故在IDO存在时T细胞不能高效增殖,也无法进行克隆扩增^[6]。这种静息的T细胞对凋亡更加敏感,也会造成T细胞的缺乏,引起细胞免疫的障碍^[9-10]。另一方面,IDO催化色氨酸降解产生的代谢产物对T细胞有毒性^[9,11-12]。这种毒性效应不同于缺乏色氨酸产生的效应,同时宿主T细胞对IDO的毒性效应

比肿瘤细胞更敏感。上述的两个可能机制都可能形成明显的免疫抑制,但这需要每一个可活化T细胞都与一个富含IDO的细胞发生接触。实际上,这种假设的可能性很小,故可能只是一个局部免疫抑制机制而不是全身免疫耐受的机制。

IDO的活性表达在免疫系统的反应调控中发挥着重要作用。他可通过降解局部组织中的色氨酸,影响淋巴细胞的功能,在肿瘤逃逸、母胎耐受、慢性感染、自身免疫性疾病和移植耐受中发挥重要的代谢性免疫调节作用^[13]。使用IDO的特异性抑制剂1-甲基色氨酸(1-MT)后,妊娠小鼠很快发生了针对胎鼠的异基因排斥反应^[14]。而在自身免疫性疾病的小鼠模型中,使用1-MT能使症状加重,并且增加了T细胞介导的结肠炎模型的致死率^[15]。以上事实说明在很多情况下IDO是外周免疫抑制和耐受的内在性机制,而不是全身机制。

综上所述,IDO可能通过以下两条途径发挥其抑制细胞增殖效应:(1)启动产生色氨酸的3种代谢产物(即:L-犬尿酸、吡啶甲酸和喹啉酸)的生化反应级联效应;(2)耗竭细胞外微环境中的色氨酸,以增强3种代谢产物的抑制细胞增殖的潜能^[12]。

3 IDO表达的调控

正是由于IDO在免疫耐受的发生中起着非常重要的作用,其表达必然受到严格的控制。IDO的主要激活物是IFN- γ ,而IFN- α 和IFN- β 在体外有很弱的效应,在体内则不能激活IDO。研究发现,不同来源的细胞,包括髓系来源的细胞,如单核细胞分化的巨噬细胞和树突状细胞、内皮细胞和一些肿瘤细胞都能在IFN- γ 作用下增加IDO的表达。信号转导和活化转录因子1(STAT1)干扰素调节因子1(IRF1)能在IFN- γ 作用下协调作用,诱导IDO的表达。Silva *et al*^[16]发现缺乏IFN- γ 和IRF1的小鼠感染时不能表达IDO,说明IDO的表达受IFN- γ 和IRF1的调控。但IFN- γ 并不是促进IDO表达的唯一因素。IFN- γ 的诱导物脂多糖(LPS)也能激活IDO,而且也能增强IFN- γ 的激活作用。有学者发现肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和地塞米松能增强IFN- γ 激活IDO的作用,而且地塞米松还能协同LPS激活IDO。另外其他一些炎症细胞因子如IL-1也可诱导IDO表达^[17]。而一些前炎症因子的成熟信号(如CD40L的表达)可能导致IDO表达的下调^[18]。相反,耐受信号(如调节性T细胞CTLA-4的表达)可能上调IDO的表达,从

而抑制T细胞反应^[19]. Musso *et al*^[20]报道IL-4既能抑制IFN- γ 激活人单核细胞IDO的作用, 也能抑制巨噬细胞活化吡啶酸的作用, 表明IL-4不仅影响色氨酸(tryptophan, Trp)代谢产物的生成而且限制这些产物的功能, 从而发挥抑制IDO活性的作用. 另外, Yuan *et al*^[21]报道转化生长因子- β (TGF- β)能够在转录水平和转录后水平选择性抑制IDO和色氨酸tRNA合成酶mRNAs的表达. 以上资料表明, IDO的活性与细胞因子的功能密切相关, 机体Trp水平受细胞因子的调控. 因此, IDO表达的调控是复杂的, 并且具有细胞特异性, 机体可通过调节IDO的表达达到精细调节免疫功能的目的.

4 IDO与病毒感染

基于以上事实, IDO在炎症或感染过程中起着重要的作用, 而其在病毒感染过程中是否起着同样的作用? 大量的研究表明IFN- γ 抗寄生虫、细菌及病毒的活性与IDO有关^[22-23]. 已经阐明IDO能介导IFN- γ 抗病毒, 比如人类巨细胞病毒(CMV)^[24]和单纯疱疹病毒1(HSV-1)^[2]. Obojes *et al*^[25]的研究表明: IFN- γ 诱导产生的IDO在被麻疹病毒感染的上皮细胞、内皮细胞和星形胶质细胞中起着重要的抗病毒作用.

在对艾滋病患者的研究中发现: 大多数艾滋病患者都有中枢神经系统的HIV感染, 而其中有一部分人会发生AIDS痴呆综合征^[26], 其发生此综合征的原因是HIV-1感染的巨噬细胞或小神经胶质细胞分泌大量的神经毒素, 包括兴奋毒素喹啉酸^[27], 而喹啉酸的合成是受IDO调控的. 另有研究表明: 脑内功能性IDO活性增加会使神经毒素增加, 从而导致神经认知功能障碍和HIV-1相关性痴呆(HIV-1-associated dementia, HAD)^[28-30]. IDO活性增加与色氨酸的消耗, 全身和脑HIV-1感染的进展及HAD相关^[31-32]. Grant RS *et al*^[33]在培养的人单核细胞来源的巨噬细胞(monocyte-derived macrophages, MDM)中检测HIV-1的不同病毒系别(HIV1-BaL, HIV1-JRFL, and HIV1-631)对IDO的诱导效应时发现: 被HIV1-JRFL和 HIV1-631感染的MDM 48 h后均有明显的IDO蛋白和犬尿酸合成增加, 而被HIV1-BaL感染的MDM则无. IDO有免疫调节和致免疫耐受功能^[11-12, 34-37]. 通过表达IDO, 特定抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)能调节T细胞反应^[3]. APC过度表达IDO能导致免疫抑制和减少T细胞反应^[38]. Burudi *et al*^[39]的研究表明

猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)感染的猴脑内IFN- γ 水平、上调的IDO、脑病理改变和病毒载量有直接关系. 因此可以想像, 病毒进入脑内诱导产生的IFN- γ , 使巨噬细胞和小胶质神经细胞产生IDO, 喹啉酸水平增加导致神经毒性. 而且, 由于病毒感染的结节内IDO有免疫抑制作用, 故为病毒播散及持续感染创造了一个良好的环境. 因此, HIV感染的宿主脑内IDO不仅参与神经毒性作用, 而且使免疫系统清除HIV无能. Potula *et al*^[40]用人外周血淋巴细胞和颅内注射自体HIV-1感染的MDM所致脑炎小鼠构建了重型免疫缺陷小鼠, 当用1-MT处理此小鼠后, 外周血中人CD3⁺, CD8⁺, CD8⁺/INF- γ ⁺ T细胞, 和 HIV-1^{gag/pol}-专职CTL明显高于对照组. 在小鼠基底神经节内注射MDM 2 wk后, 再用1-MT处理此小鼠, 结果发现脑内含有HIV-1感染的MDM区域的CD8⁺ T淋巴细胞数比对照组高2倍. wk 3时, 用1-MT处理的小鼠脑内HIV感染的MDM比对照组减少了89%. 因此, 控制HIV脑炎患者的IDO活性也许可能会增加HIV专职CTL的产生, 从而导致其脑内HIV感染的巨噬细胞数量减少.

另外, 眼球内是一个免疫特赦区, 其主要是因为人视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial, RPE)上的TGF- β 2能抑制IFN- γ 上调的II类抗原, 从而改变其APC的特性^[41]. 终末期AIDS的主要并发症之一就是CMV视网膜炎. 有研究表明: 当HIV感染患者的CD4⁺细胞计数少于100/mm³时, 就很易发生机会性感染的CMV视网膜炎^[42-43]. 人和牛视网膜内, IFN- γ 能诱导IDO的表达^[44-45], 与IL-1 β 结合便形成一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOSII)的诱导体^[46]. 已有研究证实HIV感染患者CMV感染的视网膜神经胶质细胞表达NOSII^[47]. 大量的模式表明NOSII具有抗病毒效应^[48]. Bodaghi *et al*^[24]的研究表明CMV下调NOSII途径依赖于功能性的病毒基因组. 然而, IFN- γ 诱导IDO途径对CMV的复制有强烈抑制作用. 他们推测, 在CMV感染的RPE细胞里用IFN- γ 刺激也许能产生多聚腺苷酸化IDO mRNA. 因此用增加L色氨酸的量来检测抑制CMV复制是否能被逆转. 结果显示色氨酸逆转IFN- γ 的抑制效应非常明显, 而且和剂量相关. 但是RT-PCR结果示CMV感染对IDO mRNA的转录并没有任何影响. 另外, 他们用L-NMMA处理被IFN- γ /IL-1 β 处理的细胞并不能增加CMV的复制, 提示在RPE细胞内, CMV感染与L-NMMA

■相关报道

IDO与AIDS痴呆综合征及AIDS主要并发症之一的CMV视网膜炎有关, 并有免疫调节和致免疫耐受功能. IDO的产生, 使HCV能成功逃逸T细胞免疫, 进而导致很高的慢性感染率.

■应用要点

本文对IDO在乙肝患者中的深入研究,可为抗乙肝病毒治疗提供一个全新的治疗策略。

都诱导NO合成。而且, L-NMMA+L-色氨酸与单用L-色氨酸相比,并不能增加病毒的复制,提示IFN- γ /IL-1 β 的抑制效应主要是由于IFN- γ 诱导IDO的产生。

HCV慢性感染的特征即T细胞反应无力,对抗原决定簇的识别减少。而急性感染或用IFN治疗后病毒的清除则与有力的多克隆T细胞反应相关^[49]。HCV感染细胞与激活了的T淋巴细胞相互接触便诱导IDO的产生^[50]。IFN- γ 是CHC患者肝内上调了一种促炎细胞因子,在IFN- γ 作用下HCV复制使细胞极易产生高水平的IDO^[52]。但是IDO并不影响HCV感染细胞内的HCV复制活性,因为用IFN- γ +IDO抑制剂(1-MT)或+犬尿氨酸处理HCV感染的细胞,与单用IFN- γ 相比,并不引起其HCV-RNA水平的变化^[42]。可以推测,上调IDO可能系HCV逃逸T细胞免疫的一种策略,而不是直接影响HCV复制的一种机制。由于IDO的产生,使HCV能成功逃逸T细胞免疫,进而导致很高的慢性感染率。另外在对感染HCV的黑猩猩及人肝组织的研究中发现:CHC患者与黑猩猩肝内也有上调的IDO,且肝组织内IDO mRNA水平与CTLA-4 mRNA水平有显著直接相关性^[42]。这些研究为治疗HCV感染提出了一个全新的干预治疗目标。

总之,IDO在病毒感染中的作用可以概括如下:在病毒感染早期,病毒诱导IFN- γ 产生,进而上调IDO,非特异性抑制病毒复制;由于持续升高的IDO能导致免疫抑制和减少T细胞反应,故为病毒播散及持续感染创造了一个良好的环境,从而使感染慢性化。

5 结论

IDO是色氨酸犬尿氨酸代谢途径的限速酶。他在抗病毒免疫中起着重要的作用。至今为止,国内外对IDO与HBV感染的关系研究鲜有报道。我国是一个乙肝大国,慢性无症状乙型肝炎病毒携带者约10%左右,携带的人口总数可能超过1.3亿,而目前对乙肝的治疗仍是一大难题,对IDO在乙肝患者中的深入研究,可为抗乙肝病毒治疗提供一个全新的治疗策略。

6 参考文献

- Xiao BG, Wu XC, Yang JS, Xu LY, Liu X, Huang YM, Bjelke B, Link H. Therapeutic potential of IFN-gamma-modified dendritic cells in acute and chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol* 2004; 16: 13-22
- Adams O, Besken K, Oberdörfer C, MacKenzie CR,

- Takikawa O, Däubener W. Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *J Virol* 2004; 78: 2632-2636
- Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 2004; 114: 280-290
- Takikawa O, Habara-Ohkubo A, Yoshida R. IFN-gamma is the inducer of indoleamine 2,3-dioxygenase in allografted tumor cells undergoing rejection. *J Immunol* 1990; 145: 1246-1250
- Chon SY, Hassanain HH, Pine R, Gupta SL. Involvement of two regulatory elements in interferon-gamma-regulated expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J Interferon Cytokine Res* 1995; 15: 517-526
- Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *J Immunol* 2003; 170: 5809-5813
- Xiao BG, Liu X, Link H. Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2,3-dioxygenase axis. *Steroids* 2004; 69: 653-659
- Miki T, Sun H, Lee Y, Tandin A, Kovscek AM, Subbotin V, Fung JJ, Valdivia LA. Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplant Proc* 2001; 33: 129-130
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1069-1077
- Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002; 107: 452-460
- Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 2002; 196: 447-457
- Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 2002; 196: 459-468
- Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 762-774
- Mellor AL, Sivakumar J, Chandler P, Smith K, Molina H, Mao D, Munn DH. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nat Immunol* 2001; 2: 64-68
- Gurtner GJ, Newberry RD, Schloemann SR, McDonald KG, Stenson WF. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology* 2003; 125: 1762-1773
- Silva NM, Rodrigues CV, Santoro MM, Reis LF, Alvarez-Leite JL, Gazzinelli RT. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in

- vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 2002; 70: 859-868
- 17 Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 2005; 106: 2375-2381
 - 18 Grohmann U, Fallarino F, Silla S, Bianchi R, Belladonna ML, Vacca C, Micheletti A, Fioretti MC, Puccetti P. CD40 ligation ablates the tolerogenic potential of lymphoid dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166: 277-283
 - 19 Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 2003; 24: 242-248
 - 20 Musso T, Gusella GL, Brooks A, Longo DL, Varesio L. Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood* 1994; 83: 1408-1411
 - 21 Yuan W, Collado-Hidalgo A, Yufit T, Taylor M, Varga J. Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-beta: selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *J Cell Physiol* 1998; 177: 174-186
 - 22 Gupta SL, Carlin JM, Pyati P, Dai W, Pfefferkorn ER, Murphy MJ Jr. Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. *Infect Immun* 1994; 62: 2277-2284
 - 23 Habara-Ohkubo A, Shirahata T, Takikawa O, Yoshida R. Establishment of an antitoxoplasma state by stable expression of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 1993; 61: 1810-1813
 - 24 Bodaghi B, Goureau O, Zipeto D, Laurent L, Virelizier JL, Michelson S. Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol* 1999; 162: 957-964
 - 25 Obojes K, Andres O, Kim KS, Däubener W, Schneider-Schaulies J. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon. *J Virol* 2005; 79: 7768-7776
 - 26 González-Scarano F, Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 219-240
 - 27 Brew BJ, Corbeil J, Pemberton L, Evans L, Saito K, Penny R, Cooper DA, Heyes MP. Quinolinic acid production is related to macrophage tropic isolates of HIV-1. *J Neurovirol* 1995; 1: 369-374
 - 28 Sardar AM, Reynolds GP. Frontal cortex indoleamine-2,3-dioxygenase activity is increased in HIV-1-associated dementia. *Neurosci Lett* 1995; 187: 9-12
 - 29 Kerr SJ, Armati PJ, Pemberton LA, Smythe G, Tattam B, Brew BJ. Kynurenine pathway inhibition reduces neurotoxicity of HIV-1-infected macrophages. *Neurology* 1997; 49: 1671-1681
 - 30 Heyes MP, Saito K, Lackner A, Wiley CA, Achim CL, Markey SP. Sources of the neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1-infected patients and retrovirus-infected macaques. *FASEB J* 1998; 12: 881-896
 - 31 Fuchs D, Forsman A, Hagberg L, Larsson M, Norkrans G, Reibnegger G, Werner ER, Wachter H. Immune activation and decreased tryptophan in patients with HIV-1 infection. *J Interferon Res* 1990; 10: 599-603
 - 32 Andersson LM, Hagberg L, Fuchs D, Svennerholm B, Gisslén M. Increased blood-brain barrier permeability in neuro-asymptomatic HIV-1-infected individuals--correlation with cerebrospinal fluid HIV-1 RNA and neopterin levels. *J Neurovirol* 2001; 7: 542-547
 - 33 Grant RS, Naif H, Thuruthiyil SJ, Nasr N, Littlejohn T, Takikawa O, Kapoor V. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in primary human macrophages by human immunodeficiency virus type 1 is strain dependent. *J Virol* 2000; 74: 4110-4115
 - 34 Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1069-1077
 - 35 Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 1999; 189: 1363-1372
 - 36 Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 2000; 164: 3596-3599
 - 37 Mellor AL, Chandler P, Baban B, Hansen AM, Marshall B, Pihkala J, Waldmann H, Cobbold S, Adams E, Munn DH. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int Immunol* 2004; 16: 1391-1401
 - 38 Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 2002; 196: 447-457
 - 39 Burudi EM, Marcondes MC, Watry DD, Zandonatti M, Taffe MA, Fox HS. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in simian immunodeficiency virus-infected monkey brains. *J Virol* 2002; 76: 12233-12241
 - 40 Potula R, Poluektova L, Knipe B, Chrastil J, Heilman D, Dou H, Takikawa O, Munn DH, Gendelman HE, Persidsky Y. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enhances elimination of virus-infected macrophages in an animal model of HIV-1 encephalitis. *Blood* 2005; 106: 2382-2390
 - 41 Gabrielian K, Osusky R, Sippy BD, Ryan SJ, Hinton DR. Effect of TGF-beta on interferon-gamma-induced HLA-DR expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 4253-4259
 - 42 Hoover DR, Peng Y, Saah A, Semba R, Detels RR, Rinaldo CR Jr, Phair JP. Occurrence of cytomegalovirus retinitis after human immunodeficiency virus immunosuppression. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 821-827
 - 43 Jabs DA, Enger C, Bartlett JG. Cytomegalovirus retinitis and acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 75-80
 - 44 Malina HZ, Martin XD. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the aqueous humor, iris/ciliary body, and retina of the bovine eye.

■同行评价

吲哚胺2, 3双加氧酶(IDO)与抗病毒免疫作用一文选题紧扣当前研究热点, 文章具有较高的科学性和可读性。

- 45 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1993; 231: 482-486
- 45 Nagineni CN, Pardhasaradhi K, Martins MC, Detrick B, Hooks JJ. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun* 1996; 64: 4188-4196
- 46 Goureau O, Hicks D, Courtois Y. Human retinal pigmented epithelial cells produce nitric oxide in response to cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198: 120-126
- 47 Dighiero P, Reux I, Hauw JJ, Fillet AM, Courtois Y, Goureau O. Expression of inducible nitric oxide synthase in cytomegalovirus-infected glial cells of retinas from AIDS patients. *Neurosci Lett* 1994; 166: 31-34
- 48 Reiss CS, Komatsu T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections? *J Virol* 1998; 72: 4547-4551
- 49 Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, Calvo P, Unutmaz D, Weiner AJ, Choo QL, Shuster JR, Kuo G, Bonino F. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993; 104: 580-587
- 50 Larrea E, Riezu-Boj JL, Gil-Guerrero L, Casares N, Aldabe R, Sarobe P, Civeira MP, Heeney JL, Rollier C, Verstrepen B, Wakita T, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ, Prieto J. Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2007; 81: 3662-3666
- 51 Abbate I, Romano M, Longo R, Cappiello G, Lo Iacono O, Di Marco V, Paparella C, Spano A, Capobianchi MR. Endogenous levels of mRNA for IFNs and IFN-related genes in hepatic biopsies of chronic HCV-infected and non-alcoholic steatohepatitis patients. *J Med Virol* 2003; 70: 581-587

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同角的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者)。文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。(常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

维甲酸和肠道免疫稳态

郑丽坤, 张磊, 陈乃耀

郑丽坤, 陈乃耀, 华北煤炭医学院 河北省唐山市 063000
张磊, 华北煤炭医学院附属开滦医院骨科 河北省唐山市 063000
作者贡献分布: 本综述写作由郑丽坤、张磊及陈乃耀完成。
通讯作者: 郑丽坤, 063000, 河北省唐山市, 华北煤炭医学院。
zheng_likun@sina.com.cn
电话: 0315-3025897
收稿日期: 2007-11-30 修回日期: 2008-02-26

Role of retinoic acid in gut immune homeostasis

Li-Kun Zheng, Lei Zhang, Nai-Yao Chen

Li-Kun Zheng, Nai-Yao Chen, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Lei Zhang, Department of Orthopedics, Kailuan Hospital Affiliated to North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Correspondence to: Li-Kun Zheng, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, Hebei Province, China.
zheng_likun@sina.com.cn
Received: 2007-11-30 Revised: 2008-02-26

Abstract

FOXP3⁺ regulatory T cells play a key role in controlling immune pathological reactions and preventing organs from immune damages. In the gut, native T cells express FOXP3 when antigens make T cells active. It is necessary for the retinoic acid and transforming growth factor β (TGF- β) to involve in the procession. The retinoic acid is the metabolite of vitamin A produced by gut-associated dendritic cells, with induction T cells to produce integrin $\alpha_4\beta_7$ and CCR₉, which enhance the ability in transferring native T cells into regulatory T cells, and regulatory T cells migrate preferentially to the small intestine. Besides, retinoic acid can make ROR γ t weak, resulting in the reduction of Th17 and the improvement of regulatory T cell transformation.

Key Words: Retinoic acid; Regulatory T cell; Dendritic cell

Zheng LK, Zhang L, Chen NY. Role of retinoic acid in gut immune homeostasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 885-891

摘要

Foxp3⁺调节性T细胞在调控免疫病理、防止机体遭受免疫损伤中起到重要作用。在肠道, 初始T细胞受到抗原激活后表达Foxp3, 这一过程需要维甲酸和转移生长因子(TGF- β)的参与。维甲酸是肠道相关树突状细胞产生的维生素A的代谢产物, 通过诱导T细胞产生整合素 $\alpha_4\beta_7$ 和CCR₉, 提高外周天然T细胞转化为调节性T细胞的能力, 并使其定居肠道。此外维甲酸还可以减少ROR γ t, 来降低Th17、提高调节性T细胞的转化。

关键词: 维甲酸; 调节性T细胞; 树突状细胞

郑丽坤, 张磊, 陈乃耀. 维甲酸和肠道免疫稳态. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 885-891
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/885.asp>

0 引言

为了维持体内的免疫稳态, 小肠的免疫系统已经进化并具备了足够抗炎免疫调节机能: 对无毒害食物和肠道中的共栖微生物发生耐受, 避免机体发生自身免疫性疾病和超敏反应; 同时肠道的免疫系统还会识别并清除局部入侵的致病原, 以避免机体受损。肠道免疫的建立和维护, 调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)发挥着不可或缺的作用。肠道是大量Treg的定居场所, 包括Foxp3⁺的Treg。这些Treg大多来自于胸腺, 但也可来自外周天然T细胞。肠道微环境更适宜外周Treg的发育, 在肠道中天然T细胞受到抗原激活后诱发表达Foxp3。在此过程中需要CD103⁺树突状细胞和TGF- β 的共同参与, 近年来维生素A的代谢产物维甲酸在提高Treg转化中的作用备受重视, 一方面他能上调T细胞上 $\alpha_4\beta_7$ 、CCR9等移居肠道的受体, 另一方面他能够通过减少孤儿受体(ROR γ t)从而提高Treg的转化。本文将对维甲酸和肠道免疫稳态作一综述。

1 Treg和肠道免疫

具有调节功能的T细胞有很多亚群, 目前了解

■背景资料

为了维持体内的免疫稳态, 小肠的免疫系统具备了抗炎免疫调节机能, 从而避免机体受损。肠道是大量Foxp3⁺的Treg的定居场所, 它在肠道免疫的建立和维护中发挥着不可或缺的作用。

■同行评议者

白爱平, 副教授, 中山大学附属第一医院消化内科

■ 研发前沿

近年来维甲酸在提高Treg转化中的作用备受重视,一方面他能上调T细胞上 $\alpha 4\beta 7$ 、CCR9等移居肠道的受体,另一方面他能通过减少孤儿受体(ROR γ t)从而提高Treg的转化。

最多的是F $oxp3^{+}CD4^{+}CD25^{+}$ Treg, 不同于传统意义上的Th1和Th2, 此类细胞同时具有免疫灭能和免疫抑制两大特征。在人类和小鼠中, 表达F $oxp3$ 的Treg在维持免疫耐受的作用已被证实^[1-6], 但是这种细胞的来源依然没有完全弄清。以前大多数研究集中在从胸腺中发育而来的CD4 $^{+}CD25^{+}$ F $oxp3^{+}$ 的Treg, 然而具有调节功能的T细胞也可来自于外周天然T细胞, 这些细胞的表型和从胸腺发育而来的Treg相似, 但是他们的形成方式不同^[7-8]。外周淋巴组织中Treg的产生需要抗原和TGF- β 参与, 经TCR刺激后, CD4 $^{+}CD25^{+}$ T细胞表达F $oxp3$ 并获得了抑制活性^[9-10]; 给予口服半抗原, 也能诱导外周F $oxp3^{+}$ 的Treg的发育^[7-11]。肠道就是诱导外周Treg的主要器官之一, 肠道微环境有利于诱发Treg生成。

天然T细胞被抗原激活后, 变成效应、记忆T细胞, 并获得了移居到结外组织的能力。在肠道抗原刺激下发育来的效应T细胞, 表达识别回归肠道的受体, 特别是 $\alpha 4\beta 7$ 、CCR9和TECK/CCL25受体, 导致这些细胞优先移居到小肠^[12-16]。同样被皮肤抗原刺激并诱导出效应T细胞, 表达能识别回归皮肤的受体, 如: 细胞因子受体CCR4和CCR10。Marjan在体内试验中已经证实, T细胞遇到抗原时的微环境, 决定了他优先移居的场所^[17]。

2 树突状细胞(dendritic cells, DCs)和肠道Treg

肠道相关淋巴组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)包括集合淋巴结、肠系膜淋巴结、肠黏膜固有层和肠上皮细胞, 其中的DCs被认为对外周Treg的发育和移居肠道起重要的作用^[18]。小肠黏膜固有层DCs含量丰富^[19-20], MHC II $^{+}CD11c^{+}$ DCs占细胞总数的10%-15%, 而脾脏DCs只有不到细胞总数的3%。80%以上黏膜固有层中DCs表达CD11b $^{+}$ ^[21], 不表达CD4和CD8 α ^[22]。脾脏CD11b $^{+}$ DCs不表达CD103, CD11b $^{-}$ DCs弱表达CD103, 相反25%以上的黏膜固有层CD11b $^{+}$ DCs高表达CD103^[22]。集合淋巴结和肠系膜淋巴结中的DCs, 特异性的表达CD103 $^{+}$ 、CD8 $^{-}$ 、CD11b $^{+}$ 。正常小鼠肠系膜淋巴结(MLN)中CD103 $^{+}$ 的DCs, 能够提高天然T细胞转化成为F $oxp3^{+}$ Treg的能力。在CD4 $^{+}CD25^{+}$ Treg调控的结肠炎试验中, 需要表达CD103 DCs的参与^[23], 这一点提示CD103 $^{+}$ 的DCs在诱导Treg的反应中起到特定的作用。Janine *et al*^[24]比较了从正常BALB/C小鼠分离来的CD103 $^{+}$ 和CD103 $^{-}$ DCs,

诱导来源于DO11.10 SCID小鼠脾脏的CD4 $^{+}$ T细胞F $oxp3^{+}$ 的表达, 发现其对T细胞的增殖和聚集的作用是相当的, 然而在培养的d 3和d 7, 利用流式细胞仪探测到了只有CD103 $^{+}$ 的DCs能够诱导F $oxp3^{+}$ 的表达。在培养中F $oxp3^{+}$ 的诱导依赖于DCs的数量, CD103 $^{+}$ DCs的减少导致F $oxp3^{+}$ Treg比例的减少。除了诱导F $oxp3$ 的表达外, CD103 $^{+}$ 的DCs还能维持原有F $oxp3^{+}CD4^{+}CD25^{+}$ T细胞的数量^[24]。从DO11.10BALB/C小鼠脾脏获得的CD4 $^{+}CD25^{+}$ T细胞, F $oxp3^{+}$ 表达在TCR转基因(KJ-1.26 $^{+}$)部分, 在开始培养时, 75%的KJ-1.26 $^{+}$ 的T细胞表达F $oxp3^{+}$, 随着培养时间的延长, 这个比例随之下降, 一个可能的原因是F $oxp3$ T细胞衍生物的污染, 并不是F $oxp3$ 基因的下调, 然而在培养中加入CD103 $^{+}$ 的DCs, 在培养的d 7 F $oxp3$ 表达的比例较开始时更高, 这点说明了除诱导F $oxp3$ 的表达外, CD103 $^{+}$ DCs还能保持已有F $oxp3$ 的数量^[24]。

Jason *et al*为了进一步检测是否黏膜固有层DCs能够诱导Treg的转化, 分离脾脏(SP)和黏膜固有层(Lp)的DCs, 分别和CD4 $^{+}$ eGFP-(强化绿色荧光蛋白)T细胞共培养, 培养基中分别加入抗CD3抗体、抗CD3抗体和TGF- β , 抗CD3抗体单独存在时不能诱导F $oxp3$ 的表达, 加入TGF- β 后在两个培养基中均能诱导F $oxp3$ 的表达。同时检测到LpDCs培养中诱导出F $oxp3$ 的表达显著的高于SpDCs^[22]。这点说明了在DCs诱导Treg发生过程中需要TGF- β 的参与^[7,25]。

TGF- β 除了维持外周F $oxp3^{+}CD4^{+}CD25^{+}$ Treg的功能外^[26], 还能诱导天然T细胞F $oxp3$ 的表达^[24,27-29]。Janine *et al*在CD103 $^{+}$ 的DCs诱导F $oxp3$ 的试验中进一步研究了TGF- β 的作用。天然T细胞分别和CD103 $^{+}$ 、CD103 $^{-}$ 的DCs培养, 加入TGF- β 抗体后, 完全阻断了F $oxp3$ 的表达, 揭示了TGF- β 在表达CD103的DCs诱导转化F $oxp3^{+}$ Treg的过程中起到了调节功能。他们还证实CD103 $^{+}$ 和CD103 $^{-}$ DCs亚群功能是不同的, CD103 $^{+}$ 的DCs较CD103 $^{-}$ 的DCs, 能够产生更高水平的有活性的TGF- β ^[24]。在CD103 $^{+}$ 的DCs培养中, 有足够的内源性TGF- β , 约10%天然T细胞转化为F $oxp3^{+}$ 的T细胞。Janine *et al*进一步研究了加入不同浓度的外源性TGF- β 对FOXP3转化的影响, 结果外源性的TGF- β 的加入能够提高这种转化。1 μ g/L的TGF- β 可使约50%的T细胞表达F $oxp3$, 然而在CD103 $^{-}$ 的DCs培养体系中加入TGF- β , 只有数量很少的F $oxp3^{+}$ T细胞产

生, 这个比例显著低于CD103⁺的培养^[24]. 尽管在试验中加入外源性的TGF- β 已经是他的活化形式, 跳过了TGF- β 的活化过程, 但是即使加入高浓度的活性TGF- β , 也不能使CD103⁺DCs诱导出与CD103⁺DCs相近水平的Foxp3, 提示了不是CD103⁺的DCs产生一种抑制因子, 就是缺乏一种重要的共因子.

3 维甲酸

3.1 维甲酸的代谢及相关受体 维生素A参加了机体多种生物学过程, 包括视力、生殖、上皮细胞的分化、骨骼发育和免疫^[30-31]. 维生素A对视力的作用依靠他的代谢产物, 11-顺-维A醛, 而对于其他系统的作用依靠他的代谢产物维甲酸, 主要是全反式维甲酸(all-trans-RA)和9-顺-维甲酸(9-cis-RA)^[30]. 肝脏的伊藤细胞(Ito cells)是维生素A主要的储存库, 然而我们不知道, 是否这些细胞能够将维生素A转化成维甲酸, 如果可以那他们也参与了天然T细胞转化为Treg, 最近的研究揭示了他们有产生免疫的作用^[32], 维生素A在肝脏中以视黄基酯的形式存在, 在进入血液循环之前先被水解. 血浆中的视黄醇水平能保持在一定的范围内归功于肝脏的储存^[33]. 然而肝脏细胞, 是否能够代谢维生素A成维甲酸, 并不清楚. 小鼠血浆中视黄醇的正常值是0.8-1.2 μmol ^[34], 约95%的血浆视黄醇和细胞连接蛋白相连, 进而进入细胞内氧化代谢产生维A醛^[35], 随后转变成维甲酸并连接于细胞核的受体上, 一种是维甲酸受体(RAR), 包括 α 、 β 和 γ 3种表型, 另一种为类维生素A X受体(RXR), 包括 α 、 β 和 γ 3种表型^[30-36]. 9-cis-RA能和RAR和RXR相连, all-trans-RA连接于RAR, 在高浓度时可以和RXR连接.

由视黄醇到维A醛的过程是可逆的, 这个过程被酒精脱氢酶(ADH)的亚家族催化^[37]. ADH5整合素的mRNA表达在所有次级淋巴组织来源的树突状细胞上, 除此之外集合淋巴结的树突状细胞表达ADH1和ADH2整合素的mRNA. 由维A醛到维甲酸这个不可逆的反应过程被维A醛脱氢酶(RALDH)催化^[35], 到目前为止可以肯定至少有4种该整合素表型, 其中有三种整合素表型能在次级淋巴组织中检测到, 集合淋巴结的树突状细胞表达RALDH1 mRNA, 肠系膜淋巴结的树突状细胞表达RALDH2 mRNA, RALDH3 mRNA在以上两个场所中都是弱表达^[24,37]. 在外周淋巴结中以上各种RALDH mRNA的表达是

相对低的, 仅仅弱表达RALDH2 mRNA. 这点说明肠系膜淋巴结和集合淋巴结的树突状细胞较外周淋巴结的树突状细胞, 有更强的催化产生维甲酸的能力.

3.2 维甲酸和体内免疫 维生素A缺乏的动物, 其胸腺和脾脏出现萎缩, 人体内维生素A缺乏会导致对多种微生物易感性的升高, 补充维生素A能够减少严重疾病的死亡率^[38-40]. 以上作用主要依赖于维生素A的代谢产物-维甲酸及其衍生物, 他们参与了体内的免疫过程, 维甲酸除了能抑制B细胞和T细胞的增殖外^[41-43], 还能减轻炎症反应, 临床上用维甲酸治疗套细胞淋巴瘤和痤疮分别依赖两者的作用机制^[44]. 维甲酸及其衍生物的这种功能上的多效性, 主要是通过细胞核内维甲酸受体(RAR)和视黄醇X受体(RXR)介导的^[45-46], 然而每种受体的作用还不是很清楚. Chen *et al*^[47]用全反式维甲酸(ATRT)治疗C57BL6小鼠, 其脾脏和骨髓中CD19⁺细胞系显著的升高, 然而淋巴前体细胞总数是减少的, 从而提出ATRT在抑制祖细胞扩增的同时, 加速了他们进一步分化为B系淋巴细胞^[47], 这也正是维生素A能增强抗感染免疫功能的作用机制^[48], 同时在这个实验中, 利用PCR的方法证实了RAR- α 介导了这一过程^[47-49]. Dzhagalov *et al*^[50]在RAR- γ 缺陷小鼠体内实验中, 得出了RAR- γ 对于T细胞和B细胞的发育不是必要的, 但是对于CD8⁺效应T细胞的分化和IFN- γ 的产生是必要的. 除此之外Chen *et al*提出, 维甲酸通过提高细胞表面sIgG1和CD138的表达加速B细胞的成熟, 从而提高机体的体液免疫功能^[51].

3.3 维甲酸对 $\alpha 4\beta 7$ 、CCR9的调节 感染性疾病与婴幼儿持续性腹泻有密切关系, 已经证实维生素A在肠道免疫中发挥重要作用, 能够显著地减少该病的致死率. 肠系膜淋巴结和集合淋巴结的DCs分泌维生素A的代谢产物维甲酸, 经抗原刺激后能上调天然CD4⁺T细胞上 $\alpha 4\beta 7$ 整合素和CCR9的表达^[17], 相反维生素A的缺乏, 则导致了淋巴组织中活性T细胞和记忆T细胞上 $\alpha 4\beta 7$ 和CCR9的减少, 同时还导致小肠黏膜固有层T细胞缺乏^[37]. Makoto *et al*对比观察视黄醇缺乏的小鼠和对照小鼠体内维生素A的浓度分别为 $0.13 \pm 0.04 \mu\text{mol}$ 和 $1.08 \pm 0.05 \mu\text{mol}$ ^[37], 维生素A缺乏的小鼠, 脾脏、肠系膜淋巴结、集合淋巴结中 $\alpha 4\beta 7$ CD4⁺记忆、活化T细胞显著减少, 而次级淋巴组织中 $\alpha 4\beta 7$ -CD4⁺T细胞并没有减少^[17]. 在体外试验中all-trans-RA在0.1 nmol时能显著的

■相关报道

以前的研究多集中在胸腺来源的Treg, 现已证实可来自外周天然T细胞, 且肠道微环境更适宜他的发育, 在此过程中需要CD103⁺树突状细胞和TGF- β 的共同参与.

应用要点

本文有利于进一步
了解肠道免疫
的调节机制。

提高T细胞上 $\alpha 4\beta 7$ 的表达, 9-cis-RA在1 nmol或更高浓度时能起到相似的作用, 视黄醇和维A醛, 在100 nmol或是更高浓度时才能起到相似的作用^[37]. 另一方面维A醛脱氢酶抑制剂枸橼醛, 或者是维甲酸受体拮抗剂LE135/LE540(52), 能显著抑制DCs诱导T细胞上 $\alpha 4\beta 7$ 整合素和CCR9的表达, 而RXR拮抗剂PA452无相同的抑制作用^[37-53], 由此说明了维甲酸和/或RAR参与了T细胞移居肠道的过程. 因为 $\alpha 4\beta 7$ 整合素能和肠道血管的黏膜固有层细胞黏附分子连接^[54], CCR9能和小肠隐窝上皮的胸腺表达因子配体连接^[55], 所以可以理解为经抗原刺激后的T淋巴细胞, 在肠道相关CD103⁺的DCs的作用下, 通过维甲酸上调了 $\alpha 4\beta 7$ 和CCR9的表达, 从而移居到GALT中.

3.4 维甲酸参与肠道免疫耐受 Micah *et al*研究发现在天然T细胞转化为Foxp3⁺T细胞的过程中, 维生素A的参与是一个重要的因素^[56]. 在CD4⁺Foxp3⁺转化为CD4⁺Foxp3⁺的体外试验中, 含有IL-2和TGF- β 的培养体系中FOXP3的转化率为15%-50%, 加入维甲酸后转化率可>90%或更高, 另一方面维甲酸受体拮抗剂LE135/LE540能减少这种转化^[37]. 在加入外源性TGF- β 的CD103⁺和CD103⁻DCs的培养体系中, CD103⁺的培养体系中诱导Foxp3⁺T细胞的比例大于CD103⁻的培养基, 然而在外源性TGF- β 和维甲酸都存在的情况下, 两种培养体系中Foxp3⁺T细胞的数量和比例相似^[24]. 由此说明了在T细胞转化为Foxp3⁺T细胞的过程中维甲酸是共因子^[2].

Micah *et al*进一步研究发现维甲酸单独并不能引发Foxp3的转化^[22,24,56], 需要TGF- β 和IL-2的参与^[9-10,57], 在这个试验中, IL-2的浓度不变, 加入不同浓度条件下的TGF- β , 在相同的培养条件下维甲酸的加入显著提高了转化率. 同时发现维甲酸在小于1 nmol时作用显著, 在30-100 nmol时维甲酸能抑制T细胞的增殖^[58].

孤儿受体(ROR γ t)参与了Th17的基因转录^[59-60], 他和维甲酸诱导Treg的产生相关. Mucida *et al*的体外研究证实, TGF- β 和IL-6共同存在的情况下^[61], T细胞转化为辅助性Th17细胞^[62-64], Th17和Treg作用相反, 能加强主动免疫和炎症反应, 同炎症性肠病、类风湿性关节炎、特异性的变态反应密切相关^[65-66]. 然而如在培养初期加入维甲酸, T细胞则转化为Treg^[67]. 为了验证维甲酸能调控ROR γ t, 在含有炎症刺激因子的培养基中, 加入TGF- β 能诱导出高水平

的ROR γ t, 然而加入维甲酸后这种表达明显的减少. 在体内试验中进一步验证维甲酸对Th17增殖的抑制作用, 给受试小鼠口服致病源, 并分别经RA和RAR抑制剂LE540处理^[68], 在接受RA治疗的小鼠能检测到T17细胞减少, 而接受LE540治疗的小鼠和对照组比较没有明显的不同. 综合以上的试验结果, 维甲酸在体内和体外均可抑制Th17细胞的增殖, 从而使T细胞转化为Treg, 其作用机制是通过直接减少ROR γ t^[67].

体外产生的Foxp3⁺CD4⁺T细胞是否能在体内抑制效应T细胞, Mucida *et al*^[67]做了共转移试验, 用CD45RBHICD4⁺T细胞在免疫缺陷的小鼠体内诱导出结肠炎, 同时将在不同环境下诱导出的CD4⁺T细胞转移进小鼠体内. 结果在没有细胞因子的环境下激活CD4⁺T细胞和CD45RB-HICD4⁺细胞能导致结肠炎, 相反如果共转移的是在TGF- β 参与下激活的CD4⁺T细胞, 能部分的阻止本病的发生, 如果共转移的是在TGF- β 和维甲酸都存在的环境下激活的CD4⁺T细胞, 则不发生该病^[67], 这说明了在体外TGF- β 和维甲酸都存在的情况下诱导产生的Foxp3⁺的T细胞在体内也能发挥抑制效应细胞的功能^[56,67].

4 结论

Treg在免疫耐受中的作用是肯定的, 在体外培养中DCs能诱导并扩增调节性T细胞, 且这一过程依靠TGF- β 的参与, 维甲酸的加入可加强这种转化率, 在体外扩增的Treg在体内仍可抑制效应T细胞的功能, 从而达到抑制自身免疫损伤的作用. 目前除了维甲酸在体内外的研究取得一定的成果外, 近期有证据表明了低于生理水平的维甲酸可能导致了TGF- β 功能的失调, 提高ROR γ t的表达, 使得Th17细胞的增殖多于调节性T细胞, 引发了免疫功能的失衡. 这些结果为我们治疗免疫性疾病提供了新的思路, 由于维甲酸的副作用, 维甲酸受体激活剂可能更适用于体内试验. 此外是否维甲酸只能作用于天然T细胞转化为Treg, 能否用于转化已经激活的或是分化的T细胞, 从而阻断已经发生不必要的免疫反应. 因为部分免疫缺陷的患者体内Treg的数量是正常的, ROR γ t的提出使我们有了治疗的新视角, 那就是能否通过减少ROR γ t抑制Th17细胞的增殖, 从而达到治疗免疫性疾病.

5 参考文献

- 1 Powrie F, Read S, Mottet C, Uhlig H, Maloy K.

- Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis Found Symp* 2003; 252: 92-98; discussion 98-105, 106-114
- 2 Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 2005; 204: 184-194
 - 3 Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle P, Neurath MF. Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 2006; 55: 671-680
 - 4 Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, Angeli V, Li Y, Boros P, Ding Y, Jessberger R, Trinchieri G, Lira SA, Randolph GJ, Bromberg JS. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006; 7: 652-662
 - 5 Karim M, Kingsley CI, Bushell AR, Sawitzki BS, Wood KJ. Alloantigen-induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4+ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol* 2004; 172: 923-928
 - 6 Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 337-342
 - 7 Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005; 6: 1219-1227
 - 8 Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 2004; 199: 1401-1408
 - 9 Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198: 1875-1886
 - 10 Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 2004; 172: 5149-5153
 - 11 Sun JB, Raghavan S, Sjöling A, Lundin S, Holmgren J. Oral tolerance induction with antigen conjugated to cholera toxin B subunit generates both Foxp3+CD25+ and Foxp3-CD25- CD4+ regulatory T cells. *J Immunol* 2006; 177: 7634-7644
 - 12 Johansson-Lindbom B, Svensson M, Wurbel MA, Malissen B, Márquez G, Agace WW. Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J Exp Med* 2003; 198: 963-969
 - 13 Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, Palmqvist C, Marquez G, Förster R, Agace WW. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 2005; 202: 1063-1073
 - 14 Siewert C, Menning A, Dudda J, Siegmund K, Lauer U, Floess S, Campbell DJ, Hamann A, Huehn J. Induction of organ-selective CD4+ regulatory T cell homing. *Eur J Immunol* 2007; 37: 978-989
 - 15 Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Rosemblatt M, Von Andrian UH. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 2003; 424: 88-93
 - 16 Svensson M, Marsal J, Ericsson A, Carramolino L, Brodén T, Márquez G, Agace WW. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha-beta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest* 2002; 110: 1113-1121
 - 17 Mora JR, von Andrian UH. Retinoic acid: an educational "vitamin elixir" for gut-seeking T cells. *Immunity* 2004; 21: 458-460
 - 18 Stagg AJ, Kamm MA, Knight SC. Intestinal dendritic cells increase T cell expression of alpha4beta7 integrin. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1445-1454
 - 19 Chirido FG, Millington OR, Beacock-Sharp H, Mowat AM. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1831-1840
 - 20 Pavli P, Woodhams CE, Doe WF, Hume DA. Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria. *Immunology* 1990; 70: 40-47
 - 21 Niess JH, Reinecker HC. Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 687-691
 - 22 Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007; 204: 1775-1785
 - 23 Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V, Uhlig HH, Bourne T, Johansson-Lindbom B, Agace WW, Parker CM, Powrie F. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* 2005; 202: 1051-1061
 - 24 Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007; 204: 1757-1764
 - 25 Wan YY, Flavell RA. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 5126-5131
 - 26 Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1061-1067
 - 27 Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, Waldmann H. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 2004; 172: 6003-6010
 - 28 Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant* 2004; 4: 1614-1627
 - 29 Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and expansion of T cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of TGF-beta. *J Immunol* 2005; 174: 1446-1455
 - 30 Kastner P, Mark M, Chambon P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 1995; 83: 859-869
 - 31 Napoli JL. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1440: 139-162
 - 32 Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, Modlin RL, Liblau RS, Gressner AM, Kaufmann SH. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T

同行评价

本文选题准确, 但文章仅对维甲酸在调节性T细胞产生过程中的作用进行了综述, 缺少对维甲酸在机体免疫反应中的作用部分。

- cell responses. *Immunity* 2007; 26: 117-129
- 33 von Boehmer H. Oral tolerance: is it all retinoic acid? *J Exp Med* 2007; 204: 1737-1739
 - 34 Molrine DC, Polk DB, Ciamarra A, Phillips N, Ambrosino DM. Impaired human responses to tetanus toxoid in vitamin A-deficient SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. *Infect Immun* 1995; 63: 2867-2872
 - 35 Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4315-4324
 - 36 Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995; 83: 841-850
 - 37 Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 2004; 21: 527-538
 - 38 Semba RD, Ndugwa C, Perry RT, Clark TD, Jackson JB, Melikian G, Tielsch J, Mmiro F. Effect of periodic vitamin A supplementation on mortality and morbidity of human immunodeficiency virus-infected children in Uganda: A controlled clinical trial. *Nutrition* 2005; 21: 25-31
 - 39 Villamor E, Fawzi WW. Effects of vitamin a supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 446-464
 - 40 Grubestic RB, Selwyn BJ. Vitamin A supplementation and health outcomes for children in Nepal. *J Nurs Scholarsh* 2003; 35: 15-20
 - 41 Ludányi K, Nagy ZS, Alexa M, Reichert U, Michel S, Fésüs L, Szondy Z. Ligation of RARgamma inhibits proliferation of phytohaemagglutinin-stimulated T-cells via down-regulating JAK3 protein levels. *Immunol Lett* 2005; 98: 103-113
 - 42 Kupumbati TS, Cattoretti G, Marzan C, Farias EF, Taneja R, Mira-y-Lopez R. Dominant negative retinoic acid receptor initiates tumor formation in mice. *Mol Cancer* 2006; 5: 12
 - 43 Chen Q, Ross AC. Inaugural Article: Vitamin A and immune function: retinoic acid modulates population dynamics in antigen receptor and CD38-stimulated splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 14142-14149
 - 44 Guidoboni M, Zancai P, Cariati R, Rizzo S, Dal Col J, Pavan A, Gloghini A, Spina M, Cuneo A, Pomponi F, Bononi A, Doglioni C, Maestro R, Carbone A, Boiocchi M, Dolcetti R. Retinoic acid inhibits the proliferative response induced by CD40 activation and interleukin-4 in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2005; 65: 587-595
 - 45 Maret M, Ruffie C, Periquet B, Campo AM, Menevret M, Phelep A, Dziewiszek K, Druilhe A, Pretolani M. Liposomal retinoic acids modulate asthma manifestations in mice. *J Nutr* 2007; 137: 2730-2736
 - 46 Morikawa K, Nonaka M. All-trans-retinoic acid accelerates the differentiation of human B lymphocytes maturing into plasma cells. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1830-1838
 - 47 Chen X, Esplin BL, Garrett KP, Welner RS, Webb CF, Kincade PW. Retinoids accelerate B lineage lymphoid differentiation. *J Immunol* 2008; 180: 138-145
 - 48 Wei D, Yang Y, Wang WP. Effect of retinoic acid on the development of B cells from lymph nodes of young children and the pathway of the effect. *Zhonghua Erke Zazhi* 2005; 43: 360-363
 - 49 Blomhoff HK. Vitamin A regulates proliferation and apoptosis of human T- and B-cells. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 982-984
 - 50 Dzhagalov I, Chambon P, He YW. Regulation of CD8+ T lymphocyte effector function and macrophage inflammatory cytokine production by retinoic acid receptor gamma. *J Immunol* 2007; 178: 2113-2121
 - 51 Chen Q, Ross AC. Retinoic acid promotes mouse splenic B cell surface IgG expression and maturation stimulated by CD40 and IL-4. *Cell Immunol* 2007; 249: 37-45
 - 52 Umemiya H, Fukasawa H, Ebisawa M, Eyrolles L, Kawachi E, Eisenmann G, Gronemeyer H, Hashimoto Y, Shudo K, Kagechika H. Regulation of retinoid actions by diazepinylbenzoic acids. Retinoid synergists which activate the RXR-RAR heterodimers. *J Med Chem* 1997; 40: 4222-4234
 - 53 Takahashi B, Ohta K, Kawachi E, Fukasawa H, Hashimoto Y, Kagechika H. Novel retinoid X receptor antagonists: specific inhibition of retinoid synergism in RXR-RAR heterodimer actions. *J Med Chem* 2002; 45: 3327-3330
 - 54 Miyasaka M, Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 360-370
 - 55 Wurbel MA, Philippe JM, Nguyen C, Victorero G, Freeman T, Wooding P, Miazek A, Mattei MG, Malissen M, Jordan BR, Malissen B, Carrier A, Naquet P. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* 2000; 30: 262-271
 - 56 Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 2007; 204: 1765-1774
 - 57 Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 2004; 172: 5213-5221
 - 58 Racke MK, Burnett D, Pak SH, Albert PS, Cannella B, Raine CS, McFarlin DE, Scott DE. Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. IL-4 production correlates with improved disease course. *J Immunol* 1995; 154: 450-458
 - 59 Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121-1133
 - 60 Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, Kastelein RA. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 2007; 132: 2359-2370
 - 61 Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 12099-12104
 - 62 Vldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an

- inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24: 179-189
- 63 Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-238
- 64 Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231-234
- 65 Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-476
- 66 Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 233-240
- 67 Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007; 317: 256-260
- 68 Li Y, Hashimoto Y, Agadir A, Kagechika H, Zhang X. Identification of a novel class of retinoic acid receptor beta-selective retinoid antagonists and their inhibitory effects on AP-1 activity and retinoic acid-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 15360-15366

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文. 以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按 ●、○、■、□、▲、△ 顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第 3 套为 ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

核因子- κ B及其调控产物在实验性自身免疫性肝炎中的表达及意义

杨兰兰, 鲍启德, 崔东来, 王彦

■背景资料

在世界范围内, 自身免疫性肝炎(AIH)占慢性肝炎的10%-20%, 严重的AIH患者如果不治疗, 3年的生存率为50%, 10年为10%。研究表明NF- κ B、ICAM-1等细胞因子在CCl₄诱导小鼠急性肝损伤发病机制中起着重要作用, 并可能是各种急性肝损伤的共同途径, 调控NF- κ B及其产物活性有可能成为防治急性肝损伤的新靶点。

杨兰兰, 王彦, 河北大学护理学院 河北省保定市 071000
鲍启德, 河南安阳地区医院消化内科 河南省安阳市 455000
崔东来, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

作者贡献分布: 杨兰兰与鲍启德对此文章所作贡献均等; 此课题由杨兰兰、鲍启德、崔东来及王彦设计; 研究过程由杨兰兰、鲍启德操作完成; 研究所用试剂及分析工具由崔东来提供; 数据分析由杨兰兰完成; 本论文写作由杨兰兰、鲍启德完成。

通讯作者: 杨兰兰, 071000, 河北省保定市裕华东路342号, 河北大学医学部护理学院. lanlan0125@126.com
电话: 0312-5075626

收稿日期: 2007-11-29 修回日期: 2008-01-30

Expression of NF- κ B and its regulation products in experimental autoimmune hepatitis and its significance

Lan-Lan Yang, Qi-De Bao, Dong-Lai Cui, Yan Wang

Lan-Lan Yang, Yan Wang, Department of Nursing, Hebei University, Baoding 071000, Hebei Province, China

Qi-de Bao, Department of Gastroenterology, Anyang Area Hospital, Anyang 455000, Henan Province, China

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

Correspondence to: Lan-Lan Yang, Department of Nursing, Hebei University, 342 Yuhua Eastern Road, Baoding 071000, Hebei Province, China. lanlan0125@126.com

Received: 2007-11-29 Revised: 2008-01-30

Abstract

AIM: To investigate the expression of nuclear factor kappa B (NF- κ B), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in experimental autoimmune hepatitis (EAH) model and to explore the role of those molecules in liver injury of EAH.

METHODS: EAH model was induced by intraperitoneal injection of syngeneic S-100 antigen emulsified in complete Freud's adjuvant into C57BL/6 on days 1, 7, 14 and 21. On the 28 day, animals were killed. Expressions of NF- κ B, ICAM-1, TNF- α and IL-6 were observed using histoimmunocytochemistry

RESULTS: Liver cells in the control group were

radially arranged from the central venous to the all sides. No inflammatory infiltration was observed in the portal area. Histology showed patchy necrosis of liver cells and lymphocyte infiltration in the EAH model. NF- κ B, ICAM-1, TNF- α and IL-6 were not expressed in the control group but positively expressed in the model group.

CONCLUSION: NF- κ B and its regulation products play an important role in the process of hepatic cell injury by regulating the expression of ICAM-1, TNF- α and IL-6.

Key Words: Experimental autoimmune hepatitis; Autoimmune; Nuclear factor kappa B; Mice

Yang LL, Bao QD, Cui DL, Wang Y. Expression of NF- κ B and its regulation products in experimental autoimmune hepatitis and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 892-895

摘要

目的: 观察实验性自身免疫性肝炎(experimental autoimmune hepatitis, EAH)肝组织中核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)及其调控产物细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)在EAH中的表达和在肝损伤中的作用。

方法: 采用肝抗原S-100与弗氏完全佐剂充分乳化后, 予d 1、7、14和21 C57BL/6小鼠ip诱导EAH模型, 于d 28处死所有小鼠。免疫组织化学方法观察NF- κ B、ICAM-1、TNF- α 、IL-6的表达。

结果: 对照组肝细胞以中央静脉为中心向四周呈放射状排列, 汇管区无炎症浸润, EAH模型组小鼠肝组织学可见肝细胞片状坏死和淋巴细胞浸润。对照组中未观察到NF- κ B、ICAM-1、TNF- α 和IL-6的表达, 而模型组中均有阳性表达。

■同行评议者

刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院传染科

结论: NF- κ B通过调控ICAM-1、TNF- α 和IL-6的基因表达, NF- κ B及其调控产物可能在EAH的肝细胞损伤过程中起着重要的作用。

关键词: 实验性自身免疫性肝炎; 核因子- κ B; 小鼠

杨兰兰, 鲍启德, 崔东来, 王彦. 核因子- κ B及其调控产物在实验性自身免疫性肝炎中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 892-895

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/892.asp>

0 引言

核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)作为肝脏的重要细胞因子在肝损伤发生发展过程中起着重要的作用. NF- κ B能调控免疫应答、炎症反应、细胞黏附、细胞生长分化和凋亡所必需的许多细胞因子和黏附分子等相关基因的转录和表达^[1]. 近年研究表明, NF- κ B及其调控产物在肝脏炎症、肝纤维化的发生及发展中起重要作用^[2], 并且广泛参与炎症及免疫性疾病的发病过程^[3]. 本研究通过肝抗原S-100腹腔免疫小鼠诱导实验性自身免疫性肝炎(experimental autoimmune hepatitis, EAH)模型, 观察肝组织中NF- κ B、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素6(interleukin-6, IL-6)的表达, 探讨NF- κ B及其调控产物在EAH肝损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级雄性C57BL/6小鼠65只, 周龄4 wk, 体质量 20.32 ± 0.86 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 自由进食进水. 兔抗ICAM-1多克隆抗体、兔抗TNF- α 多克隆抗体、兔抗IL-6多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, 小鼠抗NF- κ B mAb, 兔和小鼠SP试剂盒均购自北京中山生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 肝抗原制备: 取同种系小鼠25只, 脱颈致死. 取出肝脏置冰上, 将肝组织剪碎, 生理盐水反复冲洗除去血液, 与等量的生理盐水在冰水中进行匀浆, 匀浆后行超声粉碎, 使肝细胞内蛋白质充分释出. 将匀浆以1500 r/min离心10 min, 取上清然后以超速离心机以3400 r/min离心1 h, 取上清液, 即含肝抗原, 称S-100抗原. 此抗原用前新制备较好。

1.2.2 分组与实验: 全部小鼠称质量后随机分为

两组, 对照组和模型组, 每组20只. 对照组小鼠于实验d 1、7、14、21分别ip 0.5 mL的生理盐水与等量的弗氏完全佐剂的充分乳化液1 mL, 模型组动物注射0.5 mL的肝抗原(S-100)与等量的弗氏完全佐剂的充分乳化液1 mL. d 28对所有小鼠摘眼球取血, 以备测ALT、AST、A(白蛋白)、G(球蛋白); 取肝左叶40 g/L甲醛固定, 用于HE染色和NF- κ B、ICAM-1、TNF- α 、IL-6的免疫组织化学染色. -

1.2.3 血清和肝组织指标检测: 血清ALT、AST、A、G的测定采用生化法. 采用HE染色观察肝组织病理损伤. NF- κ B、ICAM-1、TNF- α 、IL-6免疫组织化学染色采用SP法, 按试剂盒说明进行操作。

统计学处理 所有数据以mean \pm SD表示, 组间比较用 t 检验. $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 正常组小鼠运动活跃, 精神进食好, 毛浓密光亮. 模型组小鼠随实验进行变得反应迟缓、少动, 常做萎靡状, 弓背喜卧, 进食欠佳, 毛稀疏干燥, 粗乱蓬松。

2.2 肝脏肉眼观察 对照组, 肝脏呈红褐色, 表面光滑, 质地柔软, 边缘锐利; 模型组, 肝脏呈深红色, 表面可见白色斑点, 质地较脆, 边缘变钝。

2.3 小鼠血清ALT、AST、A和G含量 模型组血清ALT、AST、G含量显著高于对照组, A含量低于对照组, 两者比较均有显著性差异($P < 0.01$, 表1)。

2.4 肝损伤的病理改变 正常对照组肝细胞以中央静脉为中心向四周呈放射状排列, 肝小叶结构清晰, 肝细胞间联系紧密; 肝细胞核大而圆, 核仁明显, 胞质丰富均匀, 汇管区无炎症浸润, 结构清晰可见(图1A). 模型组肝细胞片状损伤坏死, 主要见于中央静脉和汇管区, 坏死区和血窦中有炎性细胞浸润, 肝血窦充血扩张, 部分细胞有脂肪变性, 部分细胞核呈花瓣样改变, 部分核碎裂(图1B)。

2.5 肝组织中NF- κ B、ICAM-1、TNF- α 和IL-6的表达 对照组中未观察到NF- κ B、ICAM-1、TNF- α 和IL-6的表达, 而模型组中均有阳性表达. NF- κ B主要表达于汇管区和中央静脉周围的肝细胞胞核中, 呈棕褐色, 胞质也有表达(图2A). ICAM-1部分表达在中央静脉及汇管区肝细胞坏死周围的肝细胞胞质中, 呈棕褐色颗粒(图2B). TNF- α 以中央静脉及汇管区周围肝细胞阳性表

■ 相关报道

近年来研究表明, 在缺血-再灌注、刀豆素A及CCl₄等所致肝损伤中NF- κ B表达均明显上调, 并促进多种炎症介质的转录表达, 加重肝损伤. 俞卫锋 *et al*证实, 抑制肝组织中NF- κ B的活性对缺血-再灌注早期供肝损伤有保护作用. Ledebur *et al*研究发现, 活化的NF- κ B可诱导细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的基因转录. NeubauerK *et al*研究表明在CCl₄诱导的急性肝损伤中, ICAM-1的表达明显上调, 48 h后主要表达在肝细胞坏死区域, 且ICAM-1表达强弱与肝细胞坏死程度密切相关, 并认为ICAM-1的上调和炎症细胞的集聚可能是其致肝损伤的关键。

■应用要点

本文通过建立小鼠自身免疫性肝炎模型,探讨NF- κ B及其调控的炎症因子在AIH发病中的作用及自身免疫性肝炎肝损伤机制,有可能对其治疗开辟新的途径,为自身免疫性肝炎的发病机制研究提供新的思路。

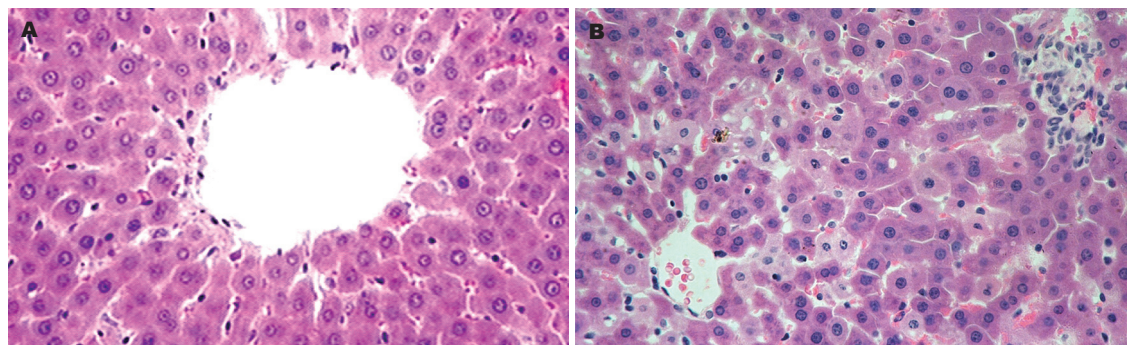


图1 小鼠肝脏HE染色(HE × 200). A: 对照组; B: 模型组.

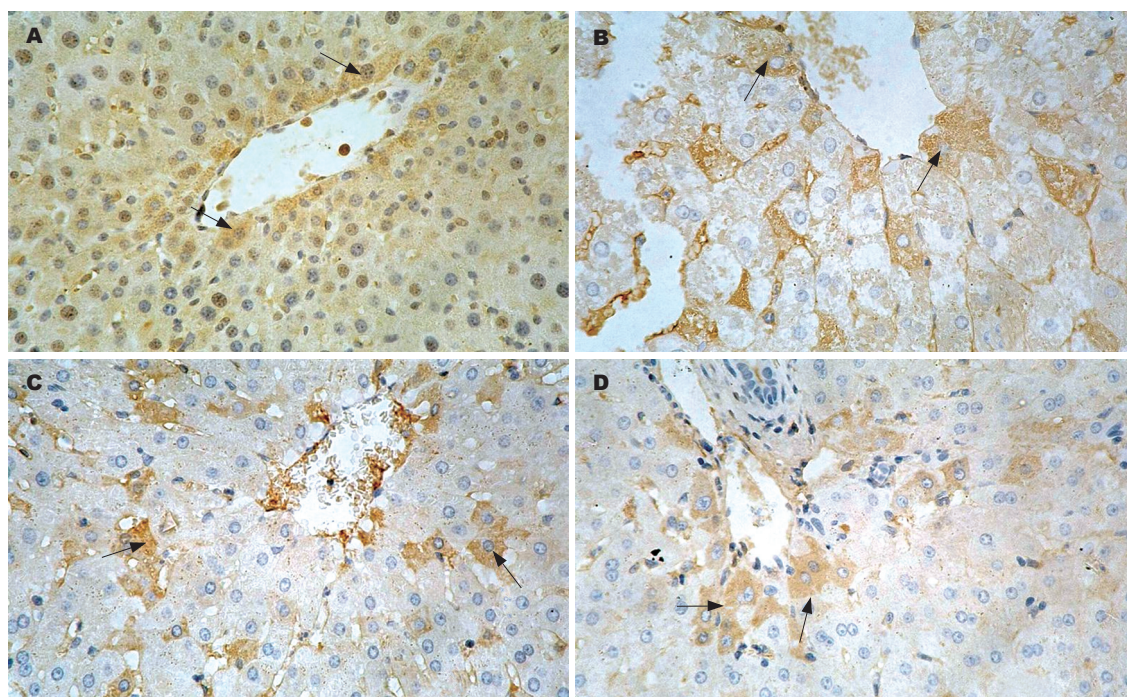


图2 小鼠肝组织中NF- κ B及其调控产物的阳性表达(SP × 200). A: NF- κ B; B: ICAM-1; C: TNF- α ; D: IL-6.

表1 小鼠血清ALT、AST、A和G含量(mean ± SD)

分组	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	A(g/L)	G(g/L)
对照组	20	42.72 ± 9.59	167.85 ± 9.56	36.83 ± 2.64	22.87 ± 2.76
模型组	19	147.87 ± 12.35 ^b	433.17 ± 10.24 ^b	25.87 ± 2.19 ^b	30.64 ± 2.84 ^b
P值		0.001	0.001	0.001	0.001

^bP < 0.01 vs 对照组.

达为主,主要在胞质内,呈棕褐色颗粒,肝窦、部分单核细胞、淋巴细胞和胆管上皮细胞有弱阳性表达(图2C). IL-6部分表达在中央静脉及汇管区周围肝细胞胞质中,呈棕褐色颗粒,肝窦、部分单核细胞也有表达(图2D).

3 讨论

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一

种以高丙种球蛋白血症、血清自身抗体阳性、组织学检查汇管区炎症及碎屑样坏死为特征的自身免疫性疾病,早期诊断,适当治疗能延长患者生存率,提高生活质量.目前AIH发病机制尚不十分清楚.现对AIH机制的探讨大多是通过建立EAH动物模型进行.

本实验根据文献报道略加改进,采用易感动物C57BL/6小鼠,以同种系小鼠肝抗原

S-100与弗氏完全佐剂充分乳化后, 4次腹腔免疫即诱导出实验性自身免疫性肝炎。研究表明^[13]EAH是由T淋巴细胞引起的肝抗原特异性自身免疫反应模型, 并且在发病中T细胞反应先于肝组织学变化和ALT升高, 说明T细胞在介导肝细胞坏死时的重要作用。

NF- κ B是真核细胞中普遍存在的一种转录因子, 活化后可激活多种相关基因的转录表达。在正常细胞中, NF- κ B与其抑制蛋白I κ B结合, 存在于胞质中, 当细胞受到外界刺激时如病毒、细菌感染、紫外线照射、氧化应激等, I κ B被迅速磷酸化, 释放NF- κ B使之转入胞核内, 结合于特定的 κ B序列, 启动和调节众多与免疫、炎症反应有关的基因转录, 其中包括TNF- α 、 β 、粒/巨噬细胞集落刺激因子(GCSF)、IL-6、ICAM-1等。而NF- κ B通过调控他们的转录过程, 直接参与肝脏的急性和慢性炎症。

ICAM-1是免疫球蛋白IgG超家族的细胞黏附糖蛋白, 通过与配体淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1)结合, 介导白细胞迁移和黏附。大量白细胞聚集造成微循环障碍, 通过呼吸爆发产生大量氧自由基, 破坏生物膜, 引起或加重组织损伤。大量研究表明, 在缺血/再灌注肝损伤^[4]、酒精性肝病^[5]、自身免疫性肝病与肝纤维化^[6]中, ICAM-1在肝细胞及肝窦内皮细胞上的表达均明显上调。

TNF- α 、IL-6均为致炎细胞因子, 是炎症的重要介质, 能刺激T、B细胞、NK细胞、单核细胞等使其功能活性增强, 并与抗原改变了的肝细胞膜成分发生反应, 造成肝细胞坏死, 转氨酶升高。有研究显示^[7], 慢性肝病患者血清TNF- α 、IL-6水平显著高于对照组, 其水平随病情加重而升高, 随病情好转而降低, 提示TNF- α 、

IL-6水平可作为肝功能受损的指标, 动态测定血清中TNF- α 、IL-6水平有利于监测病情。

本实验在引发小鼠自身免疫性肝损伤时, 肝脏NF- κ B活性及ICAM-1、TNF- α 、IL-6含量显著增加, 这表明NF- κ B有调控S-100引起的免疫反应和细胞因子表达的作用, 并参与自身免疫性肝炎肝损伤的发病过程。这些细胞因子之间构成复杂的分子网络, 在肝脏疾病的发生与发展过程中和肝功能变化方面可能起着重要的作用。降低NF- κ B活性可能减轻免疫反应和细胞因子过度表达引起的肝损伤, 是一种治疗自身免疫性肝炎的方法。

4 参考文献

- 1 Nemeth ZH, Hasko G, Vizi ES. Pyrrolidine dithiocarbamate augments IL-10, inhibits TNF- α , MIP-1 α , IL-12, and nitric oxide production and protects from the lethal effect of endotoxin. *Shock* 1998; 10: 49-53
- 2 Liu SL, Degli Esposti S, Yao T, Diehl AM, Zern MA. Vitamin E therapy of acute CCl₄-induced hepatic injury in mice is associated with inhibition of nuclear factor kappa B binding. *Hepatology* 1995; 22: 1474-1481
- 3 Baldwin AS Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 3-6
- 4 Weigand MA, Plachky J, Thies JC, Spies-Martin D, Otto G, Martin E, Bardenheuer HJ. N-acetylcysteine attenuates the increase in alpha-glutathione S-transferase and circulating ICAM-1 and VCAM-1 after reperfusion in humans undergoing liver transplantation. *Transplantation* 2001; 72: 694-698
- 5 Nanji AA, Griniuvienė B, Yacoub LK, Fogt F, Tahan SR. Intercellular adhesion molecule-1 expression in experimental alcoholic liver disease: relationship to endotoxemia and TNF alpha messenger RNA. *Exp Mol Pathol* 1995; 62: 42-51
- 6 Nakanuma Y, Yasoshima M, Tsuneyama K, Harada K. Histopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on expression of adhesion molecules. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 35-47
- 7 陈军政, 胡波. 病毒性肝炎患者血清TNF- α 、IL-6的水平变化. *检验医学* 2004; 19: 167

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本文创新性较差, 国内外同类研究性文章较多, 文字表达较为简单。

乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织NF- κ B p65的影响

范恒, 段雪云, 庄雄, 吕建芳, 寿折星

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)的发病机制与免疫异常有关, 具有免疫调节作用的细胞因子在UC的发病过程中起重要作用。许多细胞因子的产生可能与NF- κ B的信号转导和转录激活因子有关。NF- κ B活化可能是UC发生发展的关键点。

范恒, 庄雄, 吕建芳, 寿折星, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科 湖北省武汉市 430022

段雪云, 湖北中医学院附属医院药剂科 湖北省武汉市 430061

中国博士后科学基金资助项目, No. 2005037679

作者贡献分布: 此课题由范恒设计; 研究过程由范恒、段雪云、庄雄、吕建芳、寿折星操作完成; 数据分析及论文写作由范恒完成。

通讯作者: 范恒, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科. fanheng009@yahoo.com.cn
电话: 027-85726395

收稿日期: 2007-12-11 修回日期: 2008-02-08

Effect of Wumeiwan on NF- κ B p65 in colon tissue of rats with ulcerative colitis

Heng Fan, Xue-Yun Duan, Xiong Zhuang,
Jian-Fang Lv, Zhe-Xing Shou

Heng Fan, Xiong Zhuang, Jian-Fang Lv, Zhe-Xing Shou,
Department of Integrated Traditional and Western Medicine,
Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Xue-Yun Duan, Department of Medicament, the Affiliated Hospital of Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Supported by: the Postdoctor Science Foundation of China, No. 2005037679

Correspondence to: Dr. Heng Fan, Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. fanheng009@yahoo.com.cn

Received: 2007-12-11 Revised: 2008-02-08

Abstract

AIM: To compare the effects of Wumeiwan (WMW) and solfasalazine (SASP) on NF- κ B p65 in colon tissue of rats with ulcerative colitis (UC) and to analyze their mechanism of action.

METHODS: A model of UC was induced by administration of dinitro-chlorobenzene (DNCB) and acetic acid. Fifty-six SD rats (28 males and 28 females) were randomly divided into normal control group ($n = 14$), model group ($n = 14$), SASP group ($n = 14$), and WMW group ($n = 14$). Changes of NF- κ B p65 in rat colon tissue were observed after treatment with DNCB and acetic acid.

RESULTS: NF- κ B p65 was not expressed or weakly expressed in normal colon tissue. The positive expression rate of NF- κ B p65 was significantly higher in WMW and SASP groups than in normal control group ($26.32\% \pm 9.65\%$, $31.23\% \pm 5.18\%$ vs $45.67\% \pm 4.2\%$, $P < 0.01$). The positive expression rate of NF- κ B p65 was significantly lower in WMW group than in model group. There were significant differences between WMW and SASP groups ($P < 0.05$).

CONCLUSION: NF- κ B is closely related with the development of UC. WMW can treat UC by suppressing the activity of NF- κ B p65.

Key Words: Ulcerative colitis; Experiment research; Necrosis factor- κ B p65; Wumeiwan

Fan H, Duan XY, Zhuang X, Lv JF, Shou ZX. Effect of Wumeiwan on NF- κ B p65 in colon tissue of rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 896-899

摘要

目的: 比较乌梅丸与西药柳氮磺胺吡啶SASP组对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织NF- κ B p65疗效的大小, 并分析其作用机制。

方法: 应用2, 4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立UC大鼠模型, 将56只健康SD大鼠(雌雄各半), 按雌雄随机分4组, 分别为乌梅丸组、SASP组、模型组和正常组, 分别观察治疗后大鼠结肠黏膜组织匀浆NF- κ B p65的变化。

结果: 在正常结肠组织中NF- κ B p65无或仅有弱阳性表达, 模型组结肠黏膜组织NF- κ B p65阳性细胞表达率明显高于正常组($45.67\% \pm 4.25\%$ vs 10.45 ± 5.20 , $P < 0.05$), 乌梅丸($26.32\% \pm 9.65\%$)和SASP($31.23\% \pm 5.18\%$)组阳性细胞率则明显低于模型组, 乌梅丸组阳性细胞率较SASP组更低。

结论: NF- κ B与UC发病关系密切, 乌梅丸可能通过抑制NF- κ B p65活性调节免疫功能达到

■同行评议者

陈治水, 主任医师,
解放军第二一
医院中医科

治疗的目的。

关键词: 溃疡性结肠炎; 溃疡性结肠炎; NF- κ B p65; 乌梅丸

范恒, 段雪云, 庄雄, 吕建芳, 寿折星. 乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织NF- κ B p65的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 896-899
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/896.asp>

0 引言

许多证据表明, 循环和肠道局部细胞因子表达异常是UC发病的重要机制之一^[1-6], 许多与此密切相关的细胞因子基因启动子或增强子部位均有 κ B位点, NF- κ B在核内与 κ B序列结合促进多种炎性细胞因子如IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α 及TNF- β 等的基因转录^[7]. 所以, NF- κ B活化可能是UC发生发展的关键点, 本实验主要观察乌梅丸对UC大鼠组织NF- κ B p65的影响, 以探讨乌梅丸治疗UC的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药物及其制备: 乌梅丸组成药物及剂量如下: 乌梅16 g、细辛6 g、干姜10 g、黄连16 g、当归4 g、附子6 g、蜀椒4 g、桂枝6 g、生晒参6 g、黄柏6 g. 乌梅丸方药物按传统方法配制含生药浓度分别为0.515 g/mL的水煎剂. 西药柳氮磺胺吡啶(SASP)批号为: 200111002, 由上海三维制药公司生产(250 mg/片). 柳氮磺胺吡啶药物制备: 将88片SASP用研钵研细, 用100目筛筛过, 然后再研, 配成0.026 kg/L混悬液。

1.1.2 试剂: 兔抗大鼠NF- κ B p65 mAb, 美国NeoMakers公司生产, 批号: 9034P501D. 免疫组化试剂盒, 晶美生物工程有限公司生产, 批号: DEC 022005, 包括: 封闭液, 为100 mL/L山羊血清和抗兔生物素化二抗HRP标记链亲合素均为即用型; DAB底物缓冲液, 20 \times 浓溶液; DAB显色液, 20 \times 浓溶液; DAB底物溶液, 20 \times 浓溶液. EDTA抗原修复液(pH9.0), 50 \times 浓缩液, 用蒸馏水稀释后使用。

1.2 方法

1.2.1 动物分组: 将SD健康大鼠56只(雌雄各半, 体重300 \pm 50 g), 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供. 按雌雄随机分4组, 各组均为14只(雌雄各半), 第4组为正常组, 对第1、2、3进行造模, 分别为乌梅丸组、SASP组和

模型组, 各组体质量统计学比较无显著性差异($P>0.05$).

1.2.2 模型制备: 应用2,4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立UC大鼠模型^[9-10]. 将大鼠颈背部用100 g/L Na₂S脱毛后, 以20 g/L DNCB丙酮液0.25 mL(5滴)滴背, 1次/d, 连续14 d, 在d 15以直径3 mm导尿管经肛门插入结肠8 cm处, 注入0.1% DNCB乙醇0.25 mL, 在d 16同部位注入80 mL/L醋酸溶液2 mL, 准确计时10 s后, 再用5 mL生理盐水冲洗. 再饲养2 wk, 30 d后造模完成。

1.2.3 给药方法: 乌梅丸组: 每只大鼠分别用上配制的乌梅丸液 3 mL ig, 每天一次; SASP组: 该组每只大鼠用SASP混悬液3 mL, 每天一次; 模型组、正常组: 每组每只大鼠均以蒸馏水3 mL灌胃, 每天一次, 以上均给药15 d。

1.2.4 标本处理及切片染色: 于d 16分别断头处死全部大鼠, 剖结肠标本, 将需要做免疫组化的标本, 经多聚甲醛固定, 然后在0.1MPBS4 $^{\circ}$ C中过夜, 换液1次. 750 mL/L 乙醇90 min, 950 mL/L 乙醇90 min, 1000 mL/L乙醇90 min换3次, 1000 mL/L二甲苯60 min换2次. 石蜡包埋后, 切片37 $^{\circ}$ C干燥过夜. 切片染色严格按试剂盒操作步骤进行。

1.2.5 NF- κ B p65表达结果判断: 所有切片均在同一条件的光学显微镜下观察. 结果以胞核或胞质中发现棕黄色或褐色颗粒状物者为阳性细胞, 阴性对照应无棕黄色反应产物. 采用以下染色积分评价标准^[8]: 在40倍高倍镜下选取典型视野计数100个细胞, 其中阳性细胞数作为NF- κ B p65计数值, 并以百分率表示。

统计学处理 采用SPSS10.0软件处理其数据资料, 结果以mean \pm SD表示, 进行 t 检验。

2 结果

2.1 模型检测 每天连续观察大鼠大便性状、饮食、毛发、活动状态等, d 16后, 可见大鼠逐渐产生典型UC活动期症状, d 30后(造模完成), 每组随机抽取大鼠2只, 处死后取其结肠, 病理确认结肠出现的充血、水肿、炎细胞浸润、隐窝脓肿、杯状细胞减少、腺体破坏及小溃疡形成等一系列变化。

2.2 UC大鼠NF- κ B p65表达 大多数NF- κ B的阳性染色都表现在核内, 而仅有少量的NF- κ B阳性细胞表现为胞质着色. 呈弥漫或颗粒性分布, 多呈深棕黄色或褐色、粗颗粒状分布。

■应用要点

本文为深入探讨UC中NF- κ B激活的信号传导途径和自身调节过程, 为寻找和研究阻断活化的特异性抑制剂, 为进一步研究提供指导, 将为阐明UC发病机制及治疗带来新的希望。

■同行评价

本文研究工作有一定科学性,具有一定的参考价值。

表 1 乌梅丸对UC大鼠NF- κ B p65表达的影响(mean \pm SD, %)

分组	n	阳性细胞率
正常组	10	10.45 \pm 5.20 ^b
模型组	7	45.67 \pm 4.25
SASP组	8	31.23 \pm 5.18 ^b
乌梅丸组	7	26.32 \pm 9.65 ^{bc}

^aP<0.05 vs SASP组; ^bP<0.01 vs 模型组。

2.3 乌梅丸对UC大鼠NF- κ B p65表达的影响 在正常组织NF- κ B p65无或仅有弱阳性表达, 模型组肠黏膜组织NF- κ B阳性细胞表达率明显高于正常组, 乌梅丸和SASP组阳性细胞率则明显低于模型组(P<0.01), 乌梅丸组阳性细胞率则明显低于SASP组 (P<0.05, 表1)。

3 讨论

研究发现, 已有100余种基因(包括细胞因子、黏附分子、免疫性受体、促、抑凋亡蛋白等)均可被NF- κ B调控^[11-12]。NF- κ B家族由5个成员构成^[9,13], 包括NF- κ B1(p50/p105), NF- κ B2(p52/p100), p65(ReIA), ReIB及C-Rel等。根据他们的跨域激活能力分为两组, 第一组具有转录活性ReIA(p65), ReIB和c-Rel, 第二组不具有转录活性NF- κ B1(p50)和NF- κ B(p52), 其中ReIA(p65)具有显著的促炎活性^[14]。在静息状态下, NF- κ B二聚体与IKB单体偶联, 以无活性的形式存在于细胞质中, NF- κ B只有在炎症状态下, 才能被活化, 而NF- κ B p65具有显著的促炎活性。

Schreiber *et al*^[12]采用Western blot及电泳迁移率改变法(EMSA)发现在UC患者肠活检组织核提取物中的NF- κ B p65蛋白水平明显增高, 他能与B淋巴细胞中免疫球蛋白 κ 轻链基因增强子 κ B序列(GGGACTTTCC)特异性结合并具有转录调节活性, 故被命名为核因子- κ B(NF- κ B)。研究表明, NF- κ B是在进化中高度保守的一种转录因子, 广泛存在于各种组织中, 能与许多细胞基因的启动子和增强子中的 κ B转录序列特异结合, 启动或调节相关基因转录, 在免疫和炎症反应、细胞生长、病毒感染及某些疾病急性期反应等方面起重要作用^[14-22]。已有资料表明UC中NF- κ B活性增高的同时伴有IL-1、IL-6, TNF- α 等水平上升。IL-1, TNF- α 可促进NF- κ B进一步活化, 后者通过正反馈使IL-1、TNF- α 分泌更加增多, 同时使其他细胞因子IL-6, IL-8等表达也增加, 产生级联反应, 使炎症过程得到放大和持续。

近来有不少研究发现致炎细胞因子和抗炎细胞因子的功能、数量之间的平衡可能与核因子的活化、信号转导和转录激活因子等有关。其中NF- κ B是一种能与多种基因启动子或增强子部位 κ B位点发生特异性结合并促进其相关基因转录的核因子。NF- κ B是调节细胞因子(IL-1、IL-8等)表达的主要和基本因子, 在UC的发病机制中起着重要的作用。

研究表明肠道局部炎症损伤是UC重要的病理基础及NF- κ B活化的基础, 多种炎症因子参与了病理损伤过程, 也有研究显示^[23], NF- κ B与UC关系密切。在UC中, NF- κ B被诱导剂激活, 调节炎症递质的产量, 进而导致UC炎症黏膜的损伤, NF- κ B可能在其中发挥枢纽作用^[24]。因此, 我们可以推测在UC的发病过程中, NF- κ B活化在复杂的细胞因子网络失调中可能是一中心环节。

我们的研究显示, 在UC大鼠中, NF- κ B活性增高, 提示NF- κ B与UC发病关系密切, 在UC的发生、发展中占有重要地位, 对肠组织中炎症细胞因子等基因转录的调控可能是其作用的机制之一, 其表达水平可能有助于病情活动性的观察与判断, 可以作为评价病情活动性的指标之一, 其表达量也可以作为评价UC肠道病理损害的指标之一。乌梅丸能抑制NF- κ B p65活性, 从而使溃疡性结肠炎大鼠免疫功能恢复正常, 达到治疗的目的。但NF- κ B在UC中的具体作用机制尚不十分清楚, NF- κ B在UC中活化及调节过程以及对炎症因子表达调控的具体过程等尚有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 Brown KA, Back SJ, Ruchelli ED, Markowitz J, Mascarenhas M, Verma R, Piccoli DA, Baldassano RN. Lamina propria and circulating interleukin-6 in newly diagnosed pediatric inflammatory bowel disease patients. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2603-2608
- 2 Sasaki M, Jordan P, Houghton J, Meng X, Itoh M, Joh T, Alexander JS. Transfection of IL-10 expression vectors into endothelial cultures attenuates alpha4beta7-dependent lymphocyte adhesion mediated by MAdCAM-1. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 3
- 3 Tamura K, Fukuda Y, Sashio H, Takeda N, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Tamura K, Satomi M, Yamada T, Yamamura T, Yamamoto Y, Furuyama J, Okamura H, Shimoyama T. IL18 polymorphism is associated with an increased risk of Crohn's disease. *J Gastroenterol* 2002; 37 Suppl 14: 111-116
- 4 Ito H, Hirotsu T, Yamamoto M, Ogawa H, Kishimoto T. Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody inhibits leukocyte recruitment and promotes T-cell apoptosis in a murine model of Crohn's disease. *J*

- Gastroenterol* 2002; 37 Suppl 14: 56-61
- 5 Schmidt C, Marth T, Wittig BM, Hombach A, Abken H, Stallmach A. Interleukin-12 antagonists as new therapeutic agents in inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 2002; 70: 177-183
 - 6 Lochner M, Forster I. Anti-interleukin-18 therapy in murine models of inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 2002; 70: 164-169
 - 7 Sen P, Wallet MA, Yi Z, Huang Y, Henderson M, Mathews CE, Earp HS, Matsushima G, Baldwin AS Jr, Tisch RM. Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF-kappaB activation in dendritic cells. *Blood* 2007; 109: 653-660
 - 8 Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696
 - 9 Fan H, Qiu MY, Mei JJ, Shen GX, Liu SL, Chen R. Effects of four regulating-intestine prescriptions on pathology and ultrastructure of colon tissue in rats with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4800-4806
 - 10 范恒, 邱明义, 梅家俊, 沈关心, 刘松林. 理肠中药方对溃疡性结肠炎大鼠结肠细胞凋亡及其调控基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1119-1124
 - 11 Dikopoulos N, Schmid RM, Bachem M, Buttenschoen K, Adler G, Chiang JY, Weidenbach H. Bile synthesis in rat models of inflammatory bowel diseases. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 222-230
 - 12 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
 - 13 Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11
 - 14 Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 477-484
 - 15 Matsunaga T, Hokari S, Koyama I, Harada T, Komoda T. NF-kappa B activation in endothelial cells treated with oxidized high-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 313-319
 - 16 Huang WC, Chen JJ, Chen CC. c-Src-dependent tyrosine phosphorylation of IKKbeta is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Biol Chem* 2003; 278: 9944-9952
 - 17 Zaninoni A, Imperiali FG, Pasquini C, Zanella A, Barcellini W. Cytokine modulation of nuclear factor-kappaB activity in B-chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol* 2003; 31: 185-190
 - 18 Chen YM, Tu CJ, Hung KY, Wu KD, Tsai TJ, Hsieh BS. Inhibition by pentoxifylline of TNF-alpha-stimulated fractalkine production in vascular smooth muscle cells: evidence for mediation by NF-kappa B down-regulation. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 950-958
 - 19 Kis A, Yellon DM, Baxter GF. Role of nuclear factor-kappa B activation in acute ischaemia-reperfusion injury in myocardium. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 894-900
 - 20 Calder VL, Bondeson J, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. Antigen-specific T-cell downregulation by human dendritic cells following blockade of NF-kappaB. *Scand J Immunol* 2003; 57: 261-270
 - 21 Clermont F, Adam E, Dumont JE, Robaye B. Survival pathways regulating the apoptosis induced by tumour necrosis factor-alpha in primary cultured bovine endothelial cells. *Cell Signal* 2003; 15: 539-546
 - 22 Rakonczay Z, Jarmay K, Kaszaki J, Mándi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takács T. NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 696-709
 - 23 Nosti-Escanilla MP, Pena AS. NF-kappa B and inflammatory intestinal diseases. *Rev Esp Enferm Dig* 1998; 90: 113-119
 - 24 甘华田, 欧阳钦, 陈友琴, 夏庆杰. 溃疡性结肠炎患者肠黏膜 κ 基因结合核因子的活化及抗炎药物的作用. *中华医学杂志* 2002; 82: 384-388

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

本刊讯 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策, 具体格式如: (1)作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成. (2)同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科. (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

卡巴胆碱减轻大鼠烫伤休克期肠内补液时肠组织氧自由基的损伤

车晋伟, 胡森, 耿世佳, 吴静, 王磊, 杜颖, 田易军, 盛志勇

■背景资料

通过消化道途径进行休克液体复苏简单易行, 在战争和自然灾害时对大批创、烧伤休克人员的抗休克治疗较传统静脉途径更有优势, 对于减少消化道补液时的肠道并发症、提高复苏效率, 对于提高创伤急救水平、降低死亡率具有积极意义。

车晋伟, 胡森, 耿世佳, 吴静, 王磊, 杜颖, 田易军, 盛志勇, 中国人民解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室 北京市 100037

军队十一五专项课题基金资助项目, No. 06Z055

作者贡献分布: 此课题由胡森、车晋伟设计; 研究过程由车晋伟、陈玲、耿世佳、吴静、王磊及杜颖及田易军操作完成; 研究所用试剂及分析工具由胡森提供; 数据分析由车晋伟完成; 本论文写作由车晋伟、胡森及盛志勇完成。

通讯作者: 胡森, 100037, 北京市阜成路51号, 中国人民解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室. hs82080@yahoo.com.cn

电话: 010-66867397 传真: 010-68989391

收稿日期: 2007-11-16 修回日期: 2008-01-26

Carbachol alleviates oxygen free radical injury in gut during enteral resuscitation of burn shock in rats

Jin-Wei Che, Sen Hu, Shi-Jia Geng, Jing Wu, Lei Wang, Ying Du, Yi-Jun Tian, Zhi-Yong Sheng

Jin-Wei Che, Sen Hu, Shi-Jia Geng, Jing Wu, Lei Wang, Ying Du, Yi-Jun Tian, Zhi-Yong Sheng, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China

Supported by: the Special Foundation of Military Medical Project during the 11th Five-Year Plan Period, No. 06Z055

Correspondence to: Sen Hu, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to General Hospital of Chinese PLA, 51 Fucheng Road, Beijing 100037, China. hs82080@yahoo.com.cn

Received: 2007-11-16 Revised: 2008-01-26

Abstract

AIM: To investigate the effects of carbachol on oxygen free radical injury in gut during enteral resuscitation of burn shock in rats.

METHODS: A 35% TBSA full thickness scald injury was induced in 38 Wistar rats. The rats were divided randomly into four groups: scald with no therapy (scald alone, $n = 8$), scald with enteral infusing either a glucose electrolyte solution (GES, $n = 10$) or GES containing carbachol (60 $\mu\text{g/kg}$, GES/CAR, $n = 10$), and scald with enteral infusing only carbachol (CAR, $n = 10$). GES was infused into intestine through a duo-

denal stomy according to Parkland formula (4 mL·1%TBSA/kg) 30 min after scald and carbachol was administered simultaneously through the same path. Four hours after injury, the initial jejunum was collected for evaluation of xanthine oxidase (XOD), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) and assessment of the pathologic damages.

RESULTS: The activity of XOD and MPO, and the MDA level were 13.2%, 21.3% and 21.1% higher in the GES containing carbachol treatment groups than in the scald alone group ($P < 0.05$). Resuscitation with GES/CAR resulted in significantly lower levels of XOD (1.36 ± 0.37 vs 2.51 ± 0.56 , $P < 0.01$), MDA (3.97 ± 1.57 vs 6.59 ± 1.50 , $P < 0.01$) and MPO (0.47 ± 0.14 vs 0.83 ± 0.21 , $P < 0.01$) than resuscitation with GES. The parameters in the CAR group were the lowest. The gut lesions were mild in the CAR and GES/CAR groups, severe in the CAR alone group, and most severe in the GES group.

CONCLUSION: Carbachol can alleviate gut oxygen free radical injury during enteral resuscitation of burn shock, which might be associated with its anti-inflammation effects, inhibition of XOD activity and generation of oxygen free radicals in gut tissue.

Key Words: Carbachol; Burn; Enteral Resuscitation; Gut

Che JW, Hu S, Geng SJ, Wu J, Wang L, Du Y, Tian YJ, Sheng ZY. Carbachol alleviates oxygen free radical injury in gut during enteral resuscitation of burn shock in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 900-903

摘要

目的: 研究拟胆碱药卡巴胆碱(carbachol, CAR)对大鼠烫伤休克期肠内补液时肠组织氧自由基损伤的影响。

方法: 38只♂Wistar大鼠, 采用沸水法(100℃, 10 s)造成35%TBSAⅢ度烫伤。随机分为不

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

复苏组(单烫组, $n = 8$)、葡萄糖-电解质溶液(glucose electrolyte solution)复苏组(GES组, $n = 10$)、单纯卡巴胆碱治疗组(CAR组, $n = 10$)和GES+CAR复苏组(GES/CAR组, $n = 10$)。两液体复苏组在伤后30 min将GES经十二指肠造口匀速泵入, 按Parkland公式设定补液速率, CAR组和GES/CAR组在伤后30 min将CAR以 $60 \mu\text{g/kg}$ 溶于0.5 mL生理盐水中一次注入十二指肠。所有大鼠在伤后4 h处死, 取空肠组织测定脂质过氧化物丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性, 并观察肠组织病理学变化。

结果: 烫伤后GES组肠组织XOD、MPO活性和MDA含量分别高于单烫组13.2%、21.3%和21.1%, 并有统计学意义($P < 0.05$); GES/CAR组XOD, MPO和MDA均较GES组明显下降(1.36 ± 0.37 vs 2.51 ± 0.56 ; 0.47 ± 0.14 vs 0.83 ± 0.21 ; 3.97 ± 1.57 vs 6.59 ± 1.50 , $P < 0.01$); CAR组各指标数值最低。肠组织病理损伤也表现为CAR组和GES/CAR组最轻, 单烫组次之, GES组损伤最重。

结论: 卡巴胆碱能有效减轻烫伤休克大鼠肠内复苏时的肠道氧自由基损伤, 机制可能与其抗炎作用和抑制黄嘌呤氧化酶活性、减少氧自由基生成有关。

关键词: 卡巴胆碱; 烧伤; 口服复苏; 肠

车晋伟, 胡森, 耿世佳, 吴静, 王磊, 杜颖, 田易军, 盛志勇. 卡巴胆碱减轻大鼠烫伤休克期肠内补液时肠组织氧自由基的损伤. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 900-903
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/900.asp>

0 引言

口服液体复苏是主要针对战争、自然灾害和突发事件等特殊环境下由于烧伤休克伤员液体供应受限, 难以实施早期静脉复苏时进行的救治措施^[1]。但烧伤休克时肠道处于严重缺血缺氧状态, 导致肠组织过氧化损伤, 使得肠吸收功能受到抑制, 影响口服补液的复苏效果。我们以往的研究证明拟胆碱药物卡巴胆碱能有效抑制肠缺血再灌注时的促炎因子释放, 减轻缺血缺氧状态下的肠组织炎症反应^[2]。本研究在口服葡萄糖-电解质溶液(GES)中加入卡巴胆碱, 旨在观察卡巴胆碱能否抑制大鼠烫伤休克早期经口服途径补液时氧自由基生成, 减轻肠组织的过氧化损伤, 为提高烧伤休克早期口服补液的疗效、降低胃肠并发症提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar δ 大鼠38只(200-230 g), 购自中国医学科学院动物中心。GES配方: 每1 L水中溶解3.5 g NaCl、2.5 g NaHCO_3 、1.5 g KCl和20 g葡萄糖, 使用前置于37℃恒温水浴箱预热。卡巴胆碱购于美国Sigma公司产品, ZNB-XB型输液泵购于北京科力丰科技发展有限公司产品, 黄嘌呤氧化酶(XOD)、髓过氧化物酶(MPO)和脂质过氧化物丙二醛(MDA)检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所产品。

1.2 方法

1.2.1 模型制备与分组: 大鼠用200 g/L乌拉坦肌注麻醉后, 背部脱毛, 用沸水(100℃, 10 s)造成30% TBSAⅢ度烫伤。伤后立即于腹正中线切开腹壁, 暴露十二指肠上端, 于幽门远端1 cm处行十二指肠造口并插入一段无菌胶管, 外接ZNB-XB型输液泵。随机分为不复苏组(单烫组, $n = 8$)、葡萄糖-电解质溶液(glucose electrolyte solution)复苏组(GES组, $n = 10$)、单纯卡巴胆碱治疗组(CAR组, $n = 10$)和GES+CAR复苏组(GES/CAR组, $n = 10$)。单烫组烫伤后无处理; GES组和GES/CAR组在烫伤后30 min开启输液泵进行肠内补液, 补液速度按Parkland公式设定, 即伤后第一个24 h输注液体量为每公斤体质量每1%烧伤面积4 mL, 前8 h输注一半, 前4 h输注1/4; CAR组和GES/CAR组在烫伤后30 min将卡巴胆碱以 $60 \mu\text{g/kg}$ 溶于0.5 mL生理盐水中一次注入十二指肠。

1.2.2 指标检测: 所有大鼠在烫伤后4 h处死, 取空肠起始段10 cm测肠组织中黄嘌呤氧化酶(XOD)、髓过氧化物酶(MPO)和脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量。各指标均使用检测试剂盒测定, 严格按说明书操作。

1.2.3 组织病理观察: 肠组织标本用体积分数为40 g/L的中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片, 苏木精-伊红(HE)染色, 光镜下观察。

统计学处理 实验数据采用SPSS11.0统计软件处理, 结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 进行组间方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

光镜下单烫组小肠绒毛结构完整, 黏膜上皮及腺上皮杯状细胞增多, 伴炎细胞浸润; GES组小肠绒毛排列紊乱, 部分黏膜上皮脱落, 大量淋巴细胞和单核细胞浸润, 伴有轻度腺体增生和炎细胞嗜腺体现象; GES/CAR组小肠绒毛结构较

■研发前沿

通过增加胃肠道排空、吸收功能提高补液效率; 通过减轻胃肠道组织缺血再灌注损伤、保护胃肠道屏障功能等手段减少并发症等问题都需要进一步研究和解决。

■创新盘点

国内外对于烧伤休克期的消化道途径补液问题较为关注, 但相关研究成果不多。本研究通过胆碱能抗炎药的作用减轻烧伤休克肠内补液时的肠组织损伤具有创新性。

■应用要点

本研究为烧伤休克口服补液时减轻肠道并发症,提高复苏效果提供了新的有效途径和实验依据。

表 1 卡巴胆碱对大鼠烫伤休克早期肠内补液时XOD、MPO活性和MDA含量的影响(mean ± SD)

指标	分组			
	单烫组	GES组	CAR组	GES/CAR组
XOD (U/gprot)	2.22 ± 0.54	2.51 ± 0.56	1.02 ± 0.28 ^{bd}	1.36 ± 0.37 ^{bc}
MPO (U/gprot)	0.69 ± 0.11	0.83 ± 0.21 ^a	0.43 ± 0.11 ^{bc}	0.47 ± 0.14 ^{bc}
MDA (μmol/gprot)	5.49 ± 1.07	6.59 ± 1.50 ^a	3.24 ± 0.86 ^{bd}	3.97 ± 1.57 ^{bd}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 单烫组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs GES组。

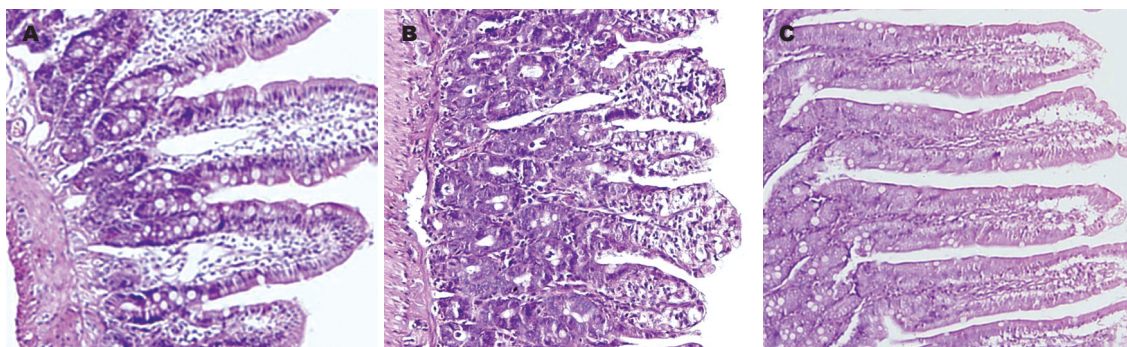


图 1 肠组织病理改变(H&E × 40). A: 单烫组; B: GES组; C: GES/CAR组。

完整,排列整齐,有少量黏膜上皮脱落,炎细胞浸润不明显, CAR组与GES/CAR组差别不明显(图1)。烫伤后4 h给予GES, GES复苏组XOD、MPO活性和MDA含量均高于单烫组(分别高出13.2%、21.3%和21.1%),而CAR组和GES/CAR组各指标均明显较GES组减少,并有统计学意义(表1)。

3 讨论

通过消化道途径进行休克液体复苏具有操作简单、携带方便、使用要求低等特点,在战争和自然灾害时对大批创、烧伤休克人员的抗休克治疗较传统静脉途径更有优势,已经越来越受到国内外学者的重视^[3]。但至今仍无一个公认的可行性好、治疗效果理想的口服复苏方案问世,主要原因在于烧伤休克时的胃肠功能显著减退,使得消化道途径补液效率低下,难以达到静脉复苏的疗效。

肠内液体进入血循环的关键步骤是肠道吸收,烧伤休克时机体为满足重要生命脏器的血液供应,将胃肠道血液重新分布至心、肺、脑等脏器,肠组织处于严重缺血缺氧状态,此时肠内给予大量液体,首先加重了肠道的“工作负担”,导致组织缺氧状况加剧;其次补液一定程度上恢复缺血肠组织灌流,这样形成肠道局部范围内的缺血-再灌注效应,会进一步加重组织

损伤。氧自由基大量生成是缺血-再灌注时组织氧化损伤的重要环节,而黄嘌呤氧化酶途径是氧自由基生成的主要途径之一,在复苏过程中缺血组织重新获得氧供给,此时缺血肠组织中堆积的ATP代谢产物次黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶的催化作用下大量生成黄嘌呤,同时稳态的分子氧被转化为极不稳定的氧自由基,氧自由基几乎能与任何细胞成分发生反应,造成细胞结构、代谢和功能的全面紊乱,甚至死亡^[4-6]。因此,减轻缺血-再灌注时氧自由基损伤对改善口服复苏时肠组织损伤、提高肠吸收功能乃至复苏效果都非常重要。

卡巴胆碱是拟胆碱药,能同时兴奋M样和N样受体,兴奋M样受体具有促进胃肠动力、扩张血管的作用,以往临床用于胃肠胀气和尿潴留等病症。根据“胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway)”理论^[7],近年我们对卡巴胆碱兴奋N样受体的作用作了深入研究,证明卡巴胆碱能结合细胞膜上的胆碱能受体α7亚单位,发挥有效的抗炎作用,从而保护失血性休克和缺血再灌注时的器官功能^[8-10],体外细胞实验还证明卡巴胆碱对肠上皮细胞过氧化损伤具有明显保护作用^[11],因此本研究在烧伤休克口服补液时应用卡巴胆碱,观察其对肠组织的氧自由基生成和组织过氧化损伤有抑制和保护作用。

XOD是氧自由基生成的黄嘌呤氧化酶途

■名词解释

胆碱能抗炎通路: 中枢神经系统可通过胆碱能副交感神经传出纤维及其递质调节全身性炎症反应,通过传出迷走神经刺激而释放乙酰胆碱并特异性结合于炎症细胞表面的胆碱能N受体的α7亚基,抑制致炎细胞因子释放;具有快速、直接、局限、整合地调节炎症反应的特点,受到医学界广泛重视,有相当重要的临床和研究价值。

径中的关键酶, 其活性高低直接决定组织氧自由基含量多少, 有研究报告在急性胰腺炎早期黄嘌呤脱氢酶(XDH)向XOD转化增多, 是引起肠道内皮细胞损伤的重要原因^[12], 因此XOD活性可作为反映组织氧自由基生成的灵敏指标. MDA是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引起脂质过氧化作用而形成的过氧化物, 其含量可反映细胞受氧化应激时脂质过氧化程度, 从而间接反映组织细胞过氧化损伤的程度^[13]. 正常情况下MPO存在于中性粒细胞, 在机体受损时中性粒细胞聚集于损伤组织并大量释放MPO, 因此组织局部MPO活性与受损伤程度呈显著正相关. 我们的实验结果证明卡巴胆碱能明显降低肠组织中的XOD、MPO活性, 抑制MDA生成, 减轻组织病理损害, 从而对肠道的组织结构和功能起到保护作用. 其作用机制应当与卡巴胆碱兴奋胆碱能抗炎通路、抑制缺血再灌注时过氧化损伤引起的促炎因子释放有关.

可见卡巴胆碱用于烧伤休克早期肠内补液, 既能通过扩张血管增加肠道血流、促进吸收, 又能通过抗炎作用减轻肠组织炎症反应和氧自由基损伤、减少体液的渗出和丢失, 对于提高肠道对复苏液的吸收效率有一举两得的效果. 本研究为烧伤休克口服补液时减轻肠道并发症、提高复苏效果提供了新的有效途径和实验依据.

4 参考文献

- 1 Thomas SJ, Kramer GC, Herndon DN. Burns: military options and tactical solutions. *J Trauma*

- 2003; 54: S207-S218
- 2 胡森, 姜小国, 石德光, 吕艺, 黎君友, 孙丹, 盛志勇. 卡巴胆碱对缺血-再灌注损伤时肠道局部炎症反应的影响. *中国危重病急救医学* 2003; 15: 748-750
- 3 车晋伟, 胡森, 盛志勇. 烧(创)伤休克战地液体复苏研究进展. *解放军医学杂志* 2007; 32: 271-273
- 4 de Haan JB, Bladier C, Lotfi-Miri M, Taylor J, Hutchinson P, Crack PJ, Hertzog P, Kola I. Fibroblasts derived from Gpx1 knockout mice display senescent-like features and are susceptible to H₂O₂-mediated cell death. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 53-64
- 5 Parks DA. Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 1989; 30: 293-298
- 6 Zima T, Stípek S, Tesar V, Němec K, Měchurová A. Free radicals in the pathogenesis of selected diseases. *Cas Lek Cesk* 1995; 134: 291-295
- 7 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458-462
- 8 姜小国, 胡森, 石德光, 晋桦, 吕艺, 韩翠华, 孙丹, 盛志勇. 卡巴胆碱对肠缺血-再灌注大鼠血浆肿瘤坏死因子- α 和白介素-10含量的影响. *中国危重病急救医学* 2003; 15: 167-169
- 9 吕艺, 姜小国, 曹卫红, 白玉梅, 孙丹, 胡森, 盛志勇. 卡巴胆碱对缺血-再灌注动物脏器功能的保护作用. *中华急诊医学杂志* 2006; 15: 228-231
- 10 邹晓防, 林凯, 吕艺, 黎君友, 陆江阳, 胡森, 盛志勇. 缺血-再灌注时卡巴胆碱对大鼠肠上皮细胞的保护作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 625-628
- 11 邹晓防, 胡森, 吕艺, 孙娜, 石新惠, 李泽峰, 盛志勇. 卡巴胆碱对肠上皮细胞氧化损伤的保护作用研究. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1273-1275
- 12 Granell S, Bulbena O, Genesca M, Sabater L, Sastre J, Gelpi E, Closa D. Mobilization of xanthine oxidase from the gastrointestinal tract in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol* 2004; 4: 1
- 13 Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540

同行评价

本文有一定的科学性, 创新性和可读性.

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

原发性肉瘤样肝细胞癌的临床与CT特征

杨炼, 陈立波

■背景资料

肉瘤样肝细胞癌(sarcomatoid hepatocellular carcinoma, SHC)是一种少见类型的肝细胞癌,与一般类型肝细胞癌相比,SHC临床表现、预后等均有显著差异,因而有必要提高对该类肿瘤的诊断准确性。

杨炼, 陈立波, 华中科技大学附属协和医院肝胆外科 湖北省武汉市 430022

教育部新世纪优秀人才资助项目

作者贡献分布: 杨炼负责资料收集、分析及文章撰写; 陈立波负责病例提供及研究指导。

通讯作者: 陈立波, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学协和医院肝胆外科. libo_chen@hotmail.com

电话: 027-85351623

收稿日期: 2007-12-20 修回日期: 2008-02-05

Clinical and CT characteristics of primary sarcomatoid hepatic carcinoma

Lian Yang, Li-Bo Chen

Lian Yang, Li-Bo Chen, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: Fund from Ministry of Education for the New Century Talents

Correspondence to: Li-Bo Chen, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. libo_chen@hotmail.com

Received: 2007-12-20 Revised: 2008-02-05

Abstract

AIM: To summarize the clinical and spiral CT characteristics of primary sarcomatoid hepatic carcinoma in order to improve its diagnosis.

METHODS: CT findings of 8 patients with primary sarcomatoid hepatic carcinoma were analyzed retrospectively. Plain and enhanced spiral CT scan was performed for all patients.

RESULTS: All the 8 patients were males with a mean age of 43 years. Of them, 6 had fever. Laboratory test showed a normal count of WBC and positive HBsAg. AFP was normal in 2 patients and 123 g/L in 6 patients. All the patients had a Child-Pugh A of liver function, 7 had no liver cirrhosis. The diameter of primary sarcomatoid hepatic carcinoma ranged 5 -10 cm. Huge cystic-solid lesions with irregular septa were found in 2 patients, multiple nodulated soft tissue shadows in 4 patients, and inhomogeneous low-density lesion with un conspicuous enhancement in the other 2 patients. Can-

cer embolus in the portal vein was displayed in 3 out of the 8 patients.

CONCLUSION: Primary sarcomatoid hepatic carcinoma is characterized by hepatic sarcoma and carcinoma. Its diagnosis depends largely on pathology and immunohistochemistry.

Key Words: Hepatic neoplasm; Sarcomatoid hepatocellular carcinoma; Tomography; X-ray; Clinical characteristics

Yang L, Chen LB. Clinical and CT characteristics of primary sarcomatoid hepatic carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(8): 904-907

摘要

目的: 总结肉瘤样肝细胞癌的临床与CT影像学特征, 以提高对该类肝脏肿瘤的诊断水平。

方法: 回顾性分析8例肉瘤样肝细胞癌的临床表现、病理特点和CT特征性表现。

结果: 8例患者均为男性, 平均年龄40岁, 均出现上腹部胀痛, 其中6例(6/8)出现发热, 但血常规提示WBC计数正常, HBsAg均为阳性, 血清甲胎球蛋白2例正常, 余6例平均约123 g/L, 肝功能均为Child-Pugh A级, 7例无肝硬化基础。8例肉瘤样肝细胞癌均为巨块型, 直径约5-10 cm, 以单发、团块状、囊实性病变为主, 多无肝硬化背景(7/8例)。6例CT平扫表现为囊实性低密度影, 其内见条状分隔影(2例)及散在分布的条状、结节状软组织密度影(4例), 增强扫描呈不均匀强化, 余2例CT平扫表现为不规则低密度影, 增强扫描未见明显强化。3例可见门静脉癌栓。

结论: 肉瘤样肝细胞癌的临床与CT特征具有肝细胞癌及肉瘤的双重特征。

关键词: 肝肿瘤; 肉瘤样癌; 体层摄影术; X线计算机; 临床特征

杨炼, 陈立波. 原发性肉瘤样肝细胞癌的临床与CT特征. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 904-907

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/904.asp>

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

0 引言

肉瘤样肝细胞癌(sarcomatoid hepatocellular carcinoma, SHC)是一种少见的肝细胞癌,仅占肝细胞癌的1.4%-9%^[1-2]。国内外关于SHC的报道着重于病理、组织来源方面,有关SHC的影像学及临床表现的报道较少^[3-5]。由于SHC和肝细胞肝癌相比临床表现、预后等均有显著差异,因而有必要提高对该类肿瘤的诊断准确性。本文对我院近年来切除的8例术前未接受任何治疗的原发性SHC的临床表现、CT影像学特征进行总结,并与病理相对照,以提高临床对该疾病诊断的准确性。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-09/2007-09本院手术的肝细胞癌患者620例,收集其中术后病理诊断为肉瘤样肝细胞癌患者8例,占同期肝细胞癌的1.3%(8/620)。8例患者均为男性,年龄24-59(平均40)岁。临床上均出现上腹部胀痛症状,其中6例(6/8)出现持续或间断发热,但血常规提示WBC计数正常。症状出现时间较短,约20 d-3 mo,平均45 d。HBsAg均为阳性,无1例HBcAg阳性;血清甲胎球蛋白正常2例,余6例约23-230 μg/L,平均123 μg/L;肝功能改变不明显,8例均为Child-Pugh A级,血清学检查多有r-GT及球蛋白轻度升高;8例中仅1例43岁患者伴肝硬化,余7例无肝硬化。所有病例术前均未接受任何治疗。

1.2 方法 分析上述病例临床表现、相关化验检查结果、CT图像、手术中所见及病理与免疫组织化学表型。使用Siemens Somatom Sensation 16层螺旋CT扫描仪,所有病例均行中上腹部CT平扫及双期增强扫描,未做延迟扫描。患者仰卧。层距、层厚均为8 mm,扫描管电压120 kv,管电流200 mAs,螺距1.0。增强扫描采用高压注射器经肘静脉注射对比剂碘普胺(300 mg I/mL)80-100 mL,注射流率3.0 mL/s,注射对比剂后30 s行全肝动脉期扫描,60 s行门脉期扫描。

2 结果

2.1 CT表现 (1)肿瘤大小、形态、边缘等改变:本组8例肿瘤均为巨块型,直径约5-10 cm;形态以团块状为主(类圆形),占75%(6/8例),2例形态不规则;肿瘤边缘多清楚,与周围正常肝组织可有明显分界,但无1例肿瘤包膜形成;肿瘤数目单发占75%(6/8例),多发(包括子灶)占25%;肿瘤发生部位不定,以左半肝多见(5/8例),未见明显

跨肝裂生长;3例门静脉癌栓形成,占37%;在肝脏基础疾病方面,仅1例合并肝硬化。(2)CT平扫及增强:6例肿瘤CT平扫呈囊实性、团块状低密度影,其内见不规则条状分隔影(2/6例)、散在分布的结节状或条带状软组织密度影(4/6例);增强扫描示囊性成分无强化,实性成分不同程度强化(图1)。其余2例肿瘤病灶无明显边界,形状不规则。平扫呈密度欠均匀的低密度影,增强未见明显强化。其中3例可见门脉癌栓形成,表现为增强扫描示增粗的门静脉内见不规则的充盈缺损影形成。上述8例腹膜后均未见明显肿大淋巴结。

2.2 术中所见 8例病例均行肿块处肝叶切除,术中见6例病灶呈团块状,边缘较清楚,其中1例病灶与肝门部广泛粘连,其余部分边界亦清楚。余2例病灶边界不清,与上述CT表现相符。术中所示病灶大小、部位与CT所测基本一致。

2.3 病理及免疫组织化学表型 (1)镜下表现特征:肿瘤组织HE切片中均有多少不等的典型肝细胞癌组织成分及梭形细胞组成的肉瘤样组织成分,其细胞核深染,可见多核、巨核,核分裂多见(图2)。(2)免疫化学特征:8例肿瘤Vimentin及CK的阳性表达率均为100%,Hepa及AFP阴性(2例)或灶状阳性。2例S-100灶状阳性,2例NSE阳性。未见明确的横纹肌肉瘤、骨肉瘤成分。

3 讨论

SHC指肿瘤的一部分或大部分被肉瘤样纺锤形或梭形肿瘤细胞替代,其内不含明确的横纹肌肉瘤、骨肉瘤成分,因此而区别于癌肉瘤^[6]。有文献报道其发生率占肝细胞癌的1.4%-9%。但复习近年来国内外相关文献对于该病均为零散报道^[7-10],本组8例病例约占同期手术切除肝癌的1.3%(8/620),亦低于文献报道发生率。同时肉瘤样成分可继发于术前接受的放、化疗及介入治疗^[3]。因而原发性SHC在肝肿瘤中的实际比例还有待明确。该病在我国的文献报道较少,估计与对该类肿瘤认识不足,病理检查时相关标志物检测不足有关。据报道,SHC预后较差,手术切除仍是治疗首选,可辅助采用对癌及肉瘤均敏感的阿霉素、顺铂、环磷酰胺等化疗药物及介入治疗。因而有必要通过总结该病的临床、影像学特征,以提高对该类疾病的早期诊断水平。

总结本组病例临床特点并复习文献^[8-10],可以认为原发性SHC的发病年龄及性别分布类似于一般类型的肝细胞癌(HCC),多为中青年及男性。

■创新盘点

本文对8例术前未接受任何治疗的原发性SHC的临床表现、CT影像学特征进行总结,旨在总结原发性SHC的临床特征及CT影像学特征。

■应用要点

原发性SHC的临床及CT表现均有一定的特征性-具有肉瘤和肝细胞癌的双重特性,但本质上SHC仍是一种肝细胞癌,掌握本文所述的临床和CT诊断及鉴别诊断要点,我们在术前不仅能作出肝癌的诊断,还能提示其肉瘤样成分的存在,对选择进一步治疗方案帮助较大。

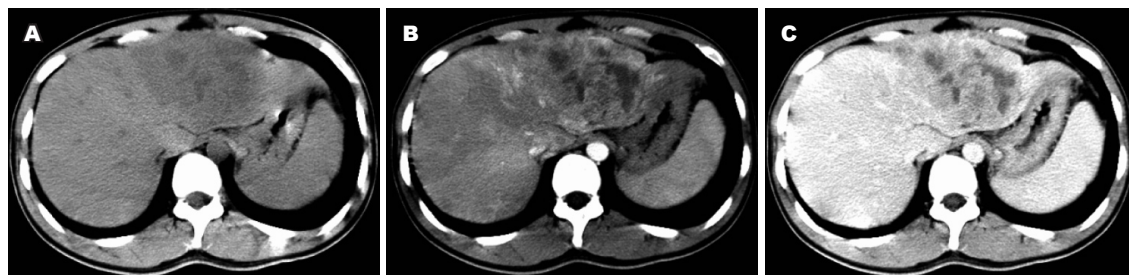


图1 肝左叶肉瘤样肝细胞癌的CT特征。A: 肝左叶SHC, CT平扫示肝左叶一囊实性低密度团块影, 边缘较清楚; B: CT增强动脉期扫描, 示病灶内囊性密度影无强化, 软组织密度影轻度强化, 分布散在, 呈结节状; C: CT增强扫描静脉期, 示病灶内软组织密度影强化程度较动脉期明显。

在我国同样与乙肝病毒有关, 如本组8例HBsAg均为阳性。但SHC又不同与一般类型的HCC, 具有其自身特征: (1)发热可以是最常见的症状之一, 本组6例患者有发热症状, 而WBC计数正常, 提示为非感染性发热, 发热可能与其含有肉瘤样成分有关。 (2)患者出现症状时间往往较短, 本组8例患者出现症状最短约20 d, 最长约90 d, 平均50 d。 (3)尽管具有HBV感染背景, 但大多数原发性SHC患者多无肝硬化基础及肝功能明显损害, 这与我们绝大多数HCC患者具有明显的肝硬化和肝功能损害具有明显区别, 也有别于一般HCC的乙肝-肝硬化-肝癌的发展过程。 (4)AFP水平往往正常或处于较低水平, 免疫组织化学表型肿瘤细胞AFP染色阴性或灶状阳性。 (5)SHC的预后一般比该部位的无肉瘤样成分的肝细胞癌要差, 5年生存率极低, 多数在确诊半年内死亡。

关于原发性SHC的影像学表现的文献较少, 一般认为SHC的影像学特征为缺血性肿瘤的表现^[11-13]。我们则认为正是由于SHC的细胞类型的特异性-具有肉瘤样间质和上皮两种成分, SHC的CT表现具有肉瘤和一般类型肝细胞癌的双重特征: (1)可类似于肝肉瘤, 生长迅速, 肿块体积较大, 且原发性SHC肿块的形态以团块状多见, 边界多清楚, 囊性成分所占比例较一般类型肝细胞癌增加, 肿瘤内有不同程度的实性部分, 所占比例较一般类型肝细胞癌减少, 可呈分隔状(类似多房囊性肉瘤)或结节状改变^[14]; (2)可具有肝细胞癌的强化方式, 病灶内的实性成分于动脉期即有不同程度的强化, 静脉期示强化程度可有减低, 类似一般类型肝细胞癌的CT强化方式; (3)可有门脉癌栓存在, 本组中有3例可见门脉癌栓形成。门脉癌栓在肝肉瘤是较少见的, 而多见于一般类型的肝细胞癌。本组8例病例病灶均为巨块型, 体积较大, 直径约5-10 cm; 其中

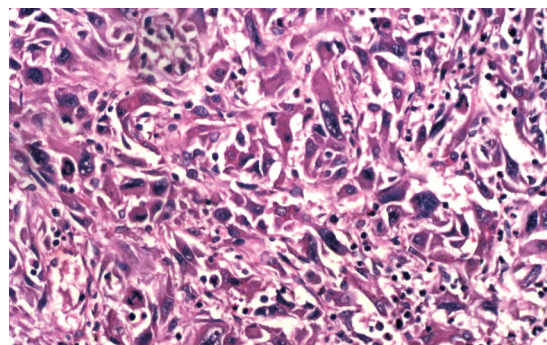


图2 SHC肿瘤组织(HE染色×400)。肿瘤细胞呈梭形, 细胞核深染, 异型明显, 可见多核、巨核, 核分裂多见。

6例呈团块状, 边缘较清楚, 部分向肝外突出, 但无明显肿瘤包膜存在。CT平扫均呈程度不等的囊实性低密度影, 其内见不规则条状分隔影(2/6例)、散在分布的结节状或条带状软组织密度影(4/6例)。增强扫描示囊性成分无强化, 实性成分不同程度强化。余2例病灶无明显边界, 形状不规则, 平扫呈密度欠均匀的低密度影, 增强未见明显强化。

SHC应与以下几种疾病相鉴别: (1)肝脏未分化胚胎性肉瘤: 肝肉瘤可分为血管源性和非血管源性两种, 前者如肝血管内皮肉瘤CT强化类似肝海绵状血管瘤, 与SHC较易区分; 后者如肝脏未分化胚胎性肉瘤属非血管源性肝肉瘤, CT多表现为单发、较大的混杂密度改变, 伴有不同程度的坏死或囊变, 增强扫描有边缘及实质部分强化, 与SHC鉴别较困难。但肝肉瘤患者大多无乙肝及肝硬化病史, AFP多为阴性, 螺旋CT扫描多表现为肝内囊性或囊实性病灶-单发囊性或多房囊性, 囊性成分为主, 极少见到门静脉系统受侵犯和癌栓形成^[14-15]。并且病灶内出血较常见。本组8例未见1例病灶内出血。确诊必须依赖病理学及免疫组织化学检查。 (2)肝脓肿: 因SHC患者临床上多有发热史, 且CT表现可呈囊

性低密度病灶内见条状分隔影, 有时与不典型肝脓肿不易鉴别. 但SHC囊性成分CT值变化范围较大, 可有脂肪密度存在, 肝脓肿脓液的CT值往往较单一, 类似水的CT值; SHC实性成分强化持续时间较短, 肝脓肿病灶强化后多见靶征且脓肿壁多持续强化. 同时临床上SHC患者血常规WBC计数往往正常; 肝脓肿血常规WBC计数可以升高. 此外门静脉癌栓也可以作为鉴别要点. (3)一般类型肝细胞癌: 需与SHC进行鉴别的肝细胞癌多为巨块型肝癌, 后者CT表现多为实性肿块, 囊性成分比例较少, 且多位于病灶中心; 边界多不清楚, 形态并不规则; 周围肝组织多有肝硬化表现; 瘤旁常见子灶; 且临床上AFP多呈阳性.

总之, SHC的临床及CT表现均有一定的特征性-具有肉瘤和肝细胞癌的双重特性, 但本质上SHC仍是一种肝细胞癌, 掌握上述的临床和CT诊断及鉴别诊断要点, 我们不仅能作出肝癌的诊断, 还能提示其肉瘤样成分的存在, 对选择进一步治疗方案帮助较大. 但确诊往往需要借助免疫组化的帮助, 必须明确肉瘤样组织中CK、Hepa、AFP等上皮性标记物的阳性表达, 否则与肌源性的、神经源性等真正间叶来源的肉瘤很难区别.

4 参考文献

- 1 Maeda T, Adachi E, Kajiyama K, Takenaka K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. Spindle cell hepatocellular carcinoma. A clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 15 cases. *Cancer* 1996; 77: 51-57
- 2 Kakizoe S, Kojiro M, Nakashima T. Hepatocellular carcinoma with sarcomatous change. Clinicopathologic and immunohistochemical studies of 14 autopsy cases. *Cancer* 1987; 59: 310-316
- 3 Koda M, Maeda Y, Matsunaga Y, Mimura K, Murawaki Y, Horie Y. Hepatocellular carcinoma with sarcomatous change arising after radiofrequency ablation for well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2003; 27: 163-167
- 4 Murata M, Miyoshi Y, Iwao K, Wada H, Shibata K, Tateishi H, Shimano T, Ohasawa M, Imai Y, Nishikawa M, Kobayashi T, Nakamura Y. Combined hepatocellular/cholangiocellular carcinoma with sarcomatoid features: genetic analysis for histogenesis. *Hepatol Res* 2001; 21: 220-227
- 5 Kim DG, Park SY, Kim H, Chun YH, Moon WS, Park SH. A comprehensive karyotypic analysis on a newly established sarcomatoid hepatocellular carcinoma cell line SH-J1 by comparative genomic hybridization and chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 132: 120-124
- 6 方铨华, 林雪平. 肉瘤样癌及癌肉瘤的新认识. *肿瘤研究与临床* 2005; 17: 138-139
- 7 Cho MS, Lee SN, Sung SH, Han WS. Sarcomatoid hepatocellular carcinoma with hepatoblastoma-like features in an adult. *Pathol Int* 2004; 54: 446-450
- 8 方铨华, 张谷, 陈波, 程晔. 肉瘤样肝细胞癌: 12例临床及病理分析. *中华肝胆外科杂志* 2007; 13: 18-21
- 9 Eriguchi N, Aoyagi S, Okuda K, Hara M, Fukuda S, Tamae T, Ohdo M, Kanazawa N, Kawabata M, Kodama T, Nishimura K, Hamada S. Unusual liver carcinomas with sarcomatous features: analysis of four cases. *Surg Today* 2001; 31: 530-533
- 10 Han JH, Park YN, Jung WH, Chi HS, Park C. A case with sarcomatoid hepatocellular carcinoma. *Yonsei Med J* 1998; 39: 390-394
- 11 王成林. 肝脏少见类型癌病理、CT和MRI诊断(二). *中国CT和MRI杂志* 2006; 4: 46-48
- 12 Kaibori M, Kawaguchi Y, Yokoigawa N, Yanagida H, Takai S, Kwon AH, Uemura Y, Kamiyama Y. Intrahepatic sarcomatoid cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol* 2003; 38: 1097-1101
- 13 Schneider G, Massmann A, Fries P, Kramann B, Remberger K. MRI of sarcomatoid carcinoma of the liver. *Eur J Radiol* 2005; 54: 63-67
- 14 丛振杰, 贺书杰, 殷薇薇, 祈延芳. 肝脏未分化胚胎性肉瘤的螺旋CT表现. *中华肝胆外科杂志* 2007; 13: 209-221
- 15 朱朝勇, 李富秀, 旦措毛. 肝原发肉瘤样癌1例. *临床荟萃* 2006; 21: 550

编辑 李军亮 电编 郭海丽

■同行评价

本文条理分明, 证据充分, 结论明确, 具有一定的临床指导意义.

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

• 消息 •

世界华人消化杂志网络版的发表前链接

本刊讯 本刊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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

溶酶体相关4次跨膜蛋白质基因多态性与肝癌易感性的关系

孙桂珍, 李卓, 郝娃, 牛京勤, 殷继明, 严艳

■背景资料

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染在我国是一个重要的问题, 人体被HBV感染后可发展成为HBV携带者、慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌。原发性肝癌发病率逐年增加, 治疗手段有限, 早期诊断是改善预后的关键。

孙桂珍, 首都医科大学附属北京佑安医院临床检验中心 北京市 100069

李卓, 郝娃, 牛京勤, 殷继明, 严艳, 北京市卫生局肝炎研究所 北京市 100069

通讯作者: 李卓, 100069, 北京市卫生局肝炎研究所。

lizhuo_youan@163.com

电话: 010-83997427

收稿日期: 2007-12-28 修回日期: 2008-02-13

Relationship between lysosome-associated protein transmembrane 4β polymorphism and susceptibility to liver cancer

Gui-Zhen Sun, Zhuo Li, Wa Hao, Jing-Qin Niu, Ji-Ming Yin, Yan Yan

Gui-Zhen Sun, Beijing Youan Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China
Zhuo Li, Wa Hao, Jing-Qin Niu, Ji-Ming Yin, Yan Yan, Institute of Hepatitis, Beijing 100069, China
Correspondence to: Zhuo Li, Institute of Hepatitis, Beijing 100069, China. lizhuo_youan@163.com
Received: 2007-12-28 Revised: 2008-02-13

Abstract

AIM: To investigate the possible association between allelic variation of lysosome-associated protein transmembrane 4β (LAPTM4β) and genetic susceptibility to liver cancer.

METHODS: Genotype of LAPTM4β was detected in 190 patients with liver cancer, 175 healthy adults and 190 chronic hepatitis B (CHB) patients by special primers-based polymerase chain reaction. Genotypic distribution of LAPTM4β was analyzed by χ^2 test.

RESULTS: The allelic frequency of *1 and *2 was 68.8%, 33.3%, 73.21%, 26.8%, 75.7% and 24.29% in the of HCC, chronic hepatitis B and healthy control groups, which was significantly different between the HCC and healthy control groups ($\chi^2 = 6.979$, $P = 0.008$). The risk of suffering from HCC was increased 1.547-fold. The LAPTM4β genotypes *1*1, *2*2, and *1*2 were 37.9%, 57.9% and 4.2% in the HCC group, 50.5%, 45.3% and 4.2% in the CHB group and 56.6%,

38.3% and 5.1% in the health control group ($\chi^2 = 14.854$, $P < 0.005$).

CONCLUSION: The allele of LAPTM4β is associated with the genotypic susceptibility to liver cancer.

Key Words: Susceptibility to liver cancer; Polymorphism gene; Hepatitis B; Lysosome-associated protein transmembrane 4 beta

Sun GZ, Li Z, Hao W, Niu JQ, Yin JM, Yan Y. Relationship between lysosome-associated protein transmembrane 4β polymorphism and susceptibility to liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 908-911

摘要

目的: 探讨溶酶体相关4次跨膜蛋白质B (lysosome-associated protein transmembrane 4 beta, LAPTM4B) 基因多态性与肝癌易感性的关系。

方法: 应用病例对照研究方法, 收集190例肝癌患者、190例慢性乙型肝炎患者、175例健康献血者全血, 分离白细胞, 提取基因组DNA, 采用特异性引物PCR方法, 扩增LAPTM4B第一外显子5'UTR内的部分序列, 对三组人群进行分析研究。 χ^2 检验分析肝癌组与对照组LAPTM4B的基因多态性和其他相关因素的相关性。

结果: LAPTM4B等位基因在三组观察对象中的分布, *1和*2在健康对照组的频率分别是75.71%和24.29%, 慢肝组73.16%和26.84%, 肝癌组中66.84%和33.45%, 三组比较等位基因分布频率有统计学意义, 健康对照组与肝癌组比较有统计学意义 ($\chi^2 = 6.979$, $P = 0.008$)。LAPTM4B的基因型LAPTM4B1*1型、LAPTM4B*1/2混合型和LAPTM4B2*2型在肝癌组中的频率分别是37.9%、57.9%和4.2%、慢肝组50.5%、45.3%和4.2%、健康对照组56.6%、38.3%和5.1%, 三组间三种基因型分布频率比较有统计学意义 ($\chi^2 = 14.854$, $P < 0.005$)。

结论: 基因型*1/2和等位基因*2可能与肝癌

■同行评议者

党双锁, 副教授, 西安交通大学第二医院感染科

的发生有关。

关键词: 肝癌易感性; 基因多态性; 乙型肝炎; 溶酶体相关4次跨膜蛋白质B

孙桂珍, 李卓, 郝娃, 牛京勤, 殷继明, 严艳. 溶酶体相关4次跨膜蛋白质基因多态性与肝癌易感性的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 908-911

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/908.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染在我国是一个严重的问题, 人体被HBV感染后可发展成为HBV携带者、慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌^[1]. 肝癌是常见消化道恶性肿瘤, 死亡率在全部恶性肿瘤中位居第二, 对人类健康造成极大危害^[2-6]. 因此, 在乙型肝炎病毒感染的高危人群中开展筛查和随访是原发性肝癌早期发现的主要途径之一, 而正确地评价个体发生肝癌的危险性, 有助于制定符合成本效益原则的随访策略. 刘建军 *et al*^[7]已有的研究表明在四种肝组织(正常成年人、胎肝、肝癌及配对非肝癌肝组织)中筛选出溶酶体相关4次跨膜蛋白质B(lysosome-associated protein transmembrane 4 beta, LAPTMB4B), 这种蛋白质在正常人肝癌组织中表达量很低, 但是在肝癌组织中高度表达. 该基因定位于人的染色体8q22.1的基因, 具有7个外显子, 6个内含子, DNA 全长2245个核苷酸, 在LAPTMB4B第一外显子5'UTR内的一段序列存在差异, 可分为LAPTMB4B*1和LAPTMB4B*2. 即LAPTMB4B*1只有一段19 bp的序列, 而LAPTMB4B*2由一段19 bp序列重复紧密相连的38个bp序列组成. 人群中存在携带不同形式的基因多态性个体, 并且初步证明他的单核苷酸多态性与肿瘤发生的危险性有关, 已有研究显示LAPTMB4B等位基因突变可能增加慢性HBV感染者或暴露于黄曲霉毒素高危人群相关肝癌的危险性. 我们通过病例对照研究, 探讨LAPTMB4B多态性与肝癌易感性之间的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-2007年北京佑安医院住院慢性乙型肝炎患者, 临床诊断参照2005年慢性乙型肝炎防治指南的诊断标准. 肝癌患者临床诊断根据2001年中国抗癌协会肝癌专业委员会制定的肝癌临床诊断标准, 通过影像学结合AFP或者组织病理学确诊为原发性肝癌. 原发性肝癌患者190

表 1 LAPTMB4B基因多态性在三组观察对象中的分布 *n*(%)

分组	<i>n</i>	LAPTMB4B2*2型	LAPTMB4B1*1型	LAPTMB4B*1/2混合型
健康对照组	175	9(5.1)	99(56.6)	67(38.3)
肝纤维化组	190	8(4.2)	96(50.5)	86(45.3)
原发性肝癌组	190	8(4.2)	72(37.9)	110(57.9)

例, 男152例, 女38例, 平均年龄 57.5 ± 12.8 岁; 慢性乙型肝炎患者190例, 男164例, 女26例, 平均年龄 47.5 ± 16.5 岁; 健康献血员175例, 男135例, 女40例, 平均年龄 24.5 ± 4.5 岁. 收取全部观察对象的静脉血(抗凝血), 分离白细胞和血浆, -20°C 冰箱储存备用.

1.2 方法 采用常规的蛋白酶K消化, 酚-氯仿处理方法, 提取患者白细胞基因组DNA. 引物设计参照文献[7]; PCR扩增条件: 30 μL 反应体积含有模板DNA 5 μL , dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$, 上游引物/下游引物各为0.1 $\mu\text{mol/L}$, Taq酶1 μL , 94°C 预变性180 s, 94°C 40 s, 55°C 40 s, 72°C 45 s, 扩增35个循环. PCR产物鉴定: 取PCR产物10 μL , 用60 g/L的丙烯酰胺凝胶电泳, EB染色, 紫外灯下观察结果.

统计学处理 研究数据用SPSS11.5软件进行统计分析, 计数资料用 χ^2 检验, 统计学检验均为双侧, $P < 0.05$ 为有统计学意义. OR和95%CI用于评价估计研究因素与肝癌的相关性.

2 结果

2.1 LAPTMB4B单核苷酸多态性 结果表明PCR产物为223 bp为基因型LAPTMB4B2*2, 204 bp为LAPTMB4B1*1基因型, 同时有223 bp条带与204 bp条带为LAPTMB4B*1/2混合型.

2.2 LAPTMB4B等位基因与基因型多态性在三组观察对象中的分布 LAPTMB4B基因型在三组不同人群中的分布具有显著性差异($\chi^2 = 14.854$, $P = 0.005$). 应用 χ^2 检验的多组间的两两比较显示原发性肝癌组分别与健康对照组、肝纤维化组比较, LAPTMB4B2*2型无统计学意义; 健康对照组LAPTMB4B*1/1型携带频率高于其他两组, 原发性肝癌组显著低于其他两组. LAPTMB4B*1/2混合型在原发性肝癌组携带频率为57.9%, 高于健康对照组38.3%和肝纤维化组45.3%(表1), 统计学处理差异有显著性($\chi^2 = 14.003$, $P = 0.000$; OR = 2.257, 95% CI = 1.469-3.468; $\chi^2 = 6.367$, $P = 0.012$, OR = 1.705, 95% CI = 1.125-2.585).

■ 研究前沿

临床上需要更为理想的肝癌特异性血清标志物用于高危人群的筛查和临床诊断. 肝癌是一种高度异质性的肿瘤, 单个肿瘤标志物的诊断敏感性有限, 但是联合检测多个指标有望提高对肝癌的筛查和诊断效率.

■应用要点

虽然单个基因SNP不太可能在肝癌的发生中起主要作用,但是突变频率较高的SNPs可在公共卫生领域应用于肝癌的筛查和预防。深入探讨基因与环境因子、基因与基因之间的相互作用,期望在肝癌的分子病理学方面获得突破。

表 2 LPTM4B*1型与LPTM4B*2等位基因携带频率 (%)

	*2型	*1型	χ^2	<i>P</i>	<i>OR</i>	95% CI
原发性肝癌组	126(33.15)	254(66.84)	3.609	0.057	1.352	[0.990, 1.846]
肝纤维化组	102(26.84)	278(73.16)	6.979	0.008	1.547	[1.118, 2.139]
健康对照组	85(24.29)	265(75.71)	0.625	0.429	1.144	[0.820, 1.597]

三组比较LPTM4B等位基因*1与*2比较有显著性差异($\chi^2 = 7.608, P = 0.022$)。两两比较显示原发性肝癌组分别与肝纤维化组和健康对照组比较 $\chi^2 = 3.609, P = 0.057, \chi^2 = 6.979, P = 0.008$, 肝纤维化组与健康人群组比较没有差异。*2等位基因在健康人群中显著低于原发性肝癌组, 原发性肝癌组和健康人群组与肝纤维化组比较*2等位基因频率没有差异(表2)。

3 讨论

原发性肝癌发病率逐年增加, 治疗手段有限, 早期诊断是改善预后的关键。肝癌具有明确的危险因素, 临床上一般结合血清AFP测定和肝脏B超或者CT检查在高危人群中进行筛查, 使得早期肝癌的诊断率有所提高, 已有的研究显示血清AFP水平与肿瘤负荷有关, 在早期肝癌中敏感性更低。在良性肝病患者中约有20%-40%血清AFP水平异常, 使得临床上有时对血清AFP中等水平升高的解释很困难。一般认为AFP水平大于400 mg/L对肝癌的患者具有诊断意义。影像学检查对于直径小于2 cm肝癌诊断较为困难, 需要进行有创的组织病理学检查来确诊。组织病理学检查作为诊断肝癌的金标准有潜在的使肿瘤扩散的危险, 对分化程度较好的肝癌与良性肝病基础上高度发育不良的结节有时也很难鉴别。临床上需要更为理想的肝癌特异性血清标志物用于高危人群的筛查和临床诊断。肝癌是一种高度异质性的肿瘤, 单个肿瘤标志物的诊断敏感性有限, 但是联合检测多个指标有望提高对肝癌的筛查和诊断效率。慢性病毒感染、酒精和黄曲霉毒素暴露等为肝癌的致病因子。各种原因导致的肝硬化均可发生肝癌, 尤其是病毒感染和相关的肝硬化。约25%的肝硬化患者一生中会发生肝癌。但是并不是所有的危险因素暴露者一生中均会发生肝癌, 提示遗传因素可能也与肝癌的发生有关。虽然单个基因SNP不太可能在肝癌的发生中起主要作用, 但是突变频率较高的SNPs可在公共卫生领域应用于肝癌的筛查和预防。深入探讨基因与环境因子、基因与

基因之间的相互作用, 有望在肝癌的分子病理学方面获得突破。

LPTM4B是一种在成人肝脏中表达很低而在绝大多数肝癌组织中高度表达的蛋白质。LPTM4B1*1和LPTM4B2*2两个等位基因所编码的蛋白质结构、功能与活性不同。由于这重复的19个bp碱基序列的插入, 使得*1等位基因5'UTR中的终止密码消失, 而蛋白质编码框在N端延长。LPTM4BN 端蛋白序列是分子的重要功能部分, 他可能在细胞信号传导、配体与受体的结合等方面起重要作用。已有的研究表明, LPTM4B是一个保守的与细胞增殖, 分化相关的重要新基因, 他的过表达可能与细胞增殖加快, 增殖恶性转化有关^[7-9]。

Liu *et al*研究发现LPTM4B等位基因在人群中存在3种基因形式, 分别为1*1、2*2和1*2; 在肝癌患者中2*2携带率显著高于健康对照组, 2*2携带者患肝癌的风险是非2*2型个体的2.89倍, 结果显示2*2型与肝癌的易感性有关^[10-12]。李昌林 *et al*对131例肺癌患者和104例健康对照者进行了有关LPTM4B基因多态性的研究显示1*和2*的基因频率在肺癌组分别为74.8%和25.2%, 在健康对照组为72.1%和27.9%, 两组间比较无明显差异, 提示LPTM4B基因多态性可能与肺癌易感无关。

本研究采用病例对照研究方法, 应用等位基因特异性引物扩增方法检测LPTM4B基因多态性, 探讨多态性与肝癌易感性之间可能存在的关系, 进一步验证等位基因型是否为肝癌的危险因素。首先证明在健康献血员、慢性乙型肝炎患者和肝癌患者中LPTM4B存在三种等位基因的形式, LPTM4B等位基因*2在肝癌组患者中高于对照组, 这一结果与刘韵荣的研究结果相似; 在肝癌患者中LPTM4B等位基因*1的频率显著低于健康献血员、慢性乙型肝炎患者组; 基因型和等位基因比较具有显著性差异。对基因型的分析显示原发性肝癌组与健康对照组和肝纤维化组比较LPTM4B*1/*2混合型分布频率显著高于其他两个组, 这一点与其

他报道不同, 我们认为, 由于*1/*2混合型造成两条DNA链碱基序列排列不匹配, 可能增加感染HBV后成为HCC的易感性。

肝癌严重危害人民健康, 研究他的发病机制试图发现早期的相关性指标具有重要的临床意义。对LAPTM4B基因多态性^[13-15]的深入研究可能为我们提供一些有关肝癌发生的信息。

4 参考文献

- 1 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 2 Uchimura S, Iizuka N, Tamesa T, Miyamoto T, Hamamoto Y, Oka M. Resampling based on geographic patterns of hepatitis virus infection reveals a common gene signature for early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2007; 27: 3323-3330
- 3 Coronado GD, Taylor VM, Tu SP, Yasui Y, Acorda E, Woodall E, Yip MP, Li L, Hislop TG. Correlates of hepatitis B testing among Chinese Americans. *J Community Health* 2007; 32: 379-390
- 4 Jung YJ, Kim YJ, Kim LH, Lee SO, Park BL, Shin HD, Lee HS. Putative association of Fas and FasL gene polymorphisms with clinical outcomes of hepatitis B virus infection. *Intervirology* 2007; 50: 369-376
- 5 Amin J, O'Connell D, Bartlett M, Tracey E, Kaldor J, Law M, Dore G. Liver cancer and hepatitis B and C in New South Wales, 1990-2002: a linkage study. *Aust N Z J Public Health* 2007; 31: 475-482
- 6 Liu C, Cheng B. Association of polymorphisms of human leucocyte antigen-DQA1 and DQB1 alleles with chronic hepatitis B virus infection, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in Chinese. *Int J Immunogenet* 2007; 34: 373-378
- 7 Liu Y, Zhang QY, Qian N, Zhou RL. Relationship between LAPTM4B gene polymorphism and susceptibility of gastric cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 311-316
- 8 Maeda K, Horikoshi T, Nakashima E, Miyamoto Y, Mabuchi A, Ikegawa S. MATN and LAPTM are parts of larger transcription units produced by intergenic splicing: intergenic splicing may be a common phenomenon. *DNA Res* 2005; 12: 365-372
- 9 Deng LJ, Zhang QY, Liu B, Zhou RL. Relationship between LAPTM4B gene polymorphism and susceptibility of lung cancer. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2005; 37: 302-305
- 10 Shao GZ, Zhou RL, Zhang QY, Zhang Y, Liu JJ, Rui JA, Wei X, Ye DX. Molecular cloning and characterization of LAPTM4B, a novel gene upregulated in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 5060-5069
- 11 Liu X, Zhou R, Zhang Q, Zhang Y, Shao G, Jin Y, Zhang S, Lin M, Rui J, Ye D. Identification and characterization of LAPTM4B encoded by a human hepatocellular carcinoma-associated novel gene. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2003; 35: 340-347
- 12 Zhou L, He XD, Chen J, Cui QC, Qu Q, Rui JA, Zhao YP. Overexpression of LAPTM4B-35 closely correlated with clinicopathological features and post-resectional survival of gallbladder carcinoma. *Eur J Cancer* 2007; 43: 809-815
- 13 Uchimura S, Iizuka N, Tamesa T, Miyamoto T, Hamamoto Y, Oka M. Resampling based on geographic patterns of hepatitis virus infection reveals a common gene signature for early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2007; 27: 3323-3330
- 14 Peng C, Zhou RL, Shao GZ, Rui JA, Wang SB, Lin M, Zhang S, Gao ZF. Expression of lysosome-associated protein transmembrane 4B-35 in cancer and its correlation with the differentiation status of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2704-2708
- 15 Lo SS, Lin SC, Wu CW, Chen JH, Yeh WI, Chung MY, Lui WY. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with risk of gastric adenocarcinoma and lymphovascular tumor invasion. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 2250-2256

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本研究立题结合临床需要, 进行了有价值的探索, 具有新的发现, 书写流畅, 方法可靠, 有一定的参考价值。

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

●消息●

2007年度山西省期刊质量评估结果揭晓

本刊讯 2007年参加山西省期刊质量评估的期刊有196种, 其中社科类期刊110种, 科技类期刊86种。结果评出一级(优秀)期刊93种, 社科类47种, 科技类46种, 其中包含《世界胃肠病学杂志(英文版)》; 二级期刊96种, 社科类59种, 科技类37种, 其中包含《世界华人消化杂志》; 三级期刊共7种, 社科类4种, 科技类3种。特别需要强调的是, 《世界胃肠病学杂志(英文版)》连续9年被评为一级(优秀)期刊。(常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)

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!

蔡三军 主任医师
复旦大学附属肿瘤医院腹部外科

陈耀凯 副教授
第三军医大学西南医院全军感染病研究所

邓长生 教授
武汉大学中南医院消化内科

范志宁 主任医师
南京医科大学第二附属医院内镜中心

高春芳 研究员
第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科

巩鹏 副教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

纪小龙 教授
武警总医院纳米医学研究所

季国忠 副教授
南京医科大学第二附属医院消化科

金瑞 教授
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李国威 教授
西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

李晓宇 主任医师
航天中心医院院办

刘连新 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科三病房

刘铁夫 教授
哈尔滨医科大学附属第四医院消化科

吕宾 教授
浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

牛建昭 教授
北京中医药大学细胞生物化学实验室

朴熙绪 教授
延边大学附属医院消化内科

孙明军 教授
中国医科大学附属第一医院内镜中心

孙秀发 教授
华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系

田晓峰 教授
大连医科大学附属第二医院

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

徐智 教授
北京大学第三医院外科

阎晓初 副教授
第三军医大学西南医院病理研究所

杨冬华 教授
广州市天河区暨南大学附属第一医院消化内科

郁宝铭 教授
上海市第八人民医院结直肠中心

张继明 教授
复旦大学附属华山医院肝炎研究室

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系

张明辉 副主任医师
河北医科大学第一医院肝病中心(传染病)

周国雄 主任医师
南通大学附属医院消化内科

周伟平 教授
上海东方肝胆外科医院肝外三科