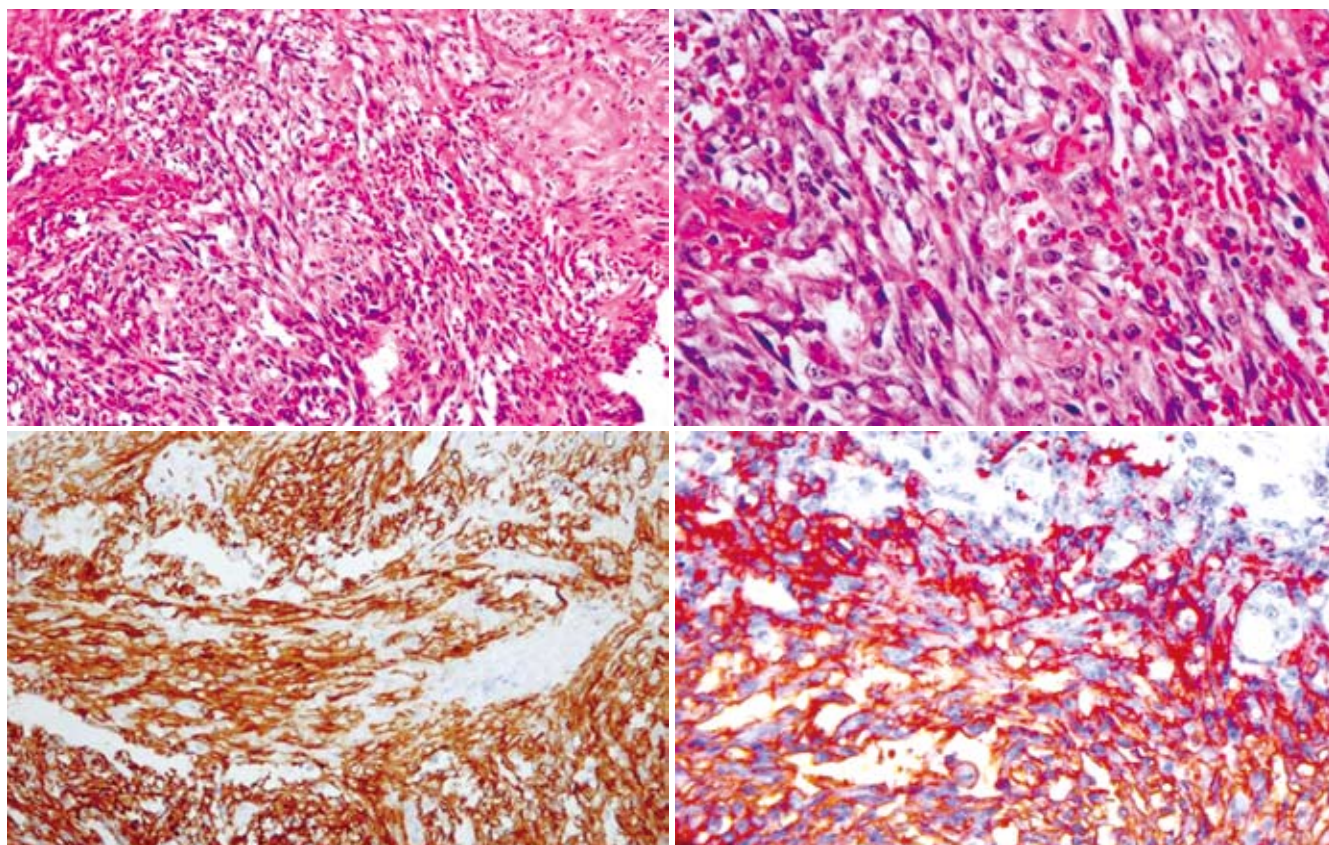


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008年5月28日 第16卷 第15期 (Volume 16 Number 15)



15 / 2008

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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
杨思凤教授
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
程英升主任医师
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
陈军贤主任医师
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
孙自勤教授
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
宛新建副教授
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
夏时海副教授
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

张春清教授
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
邹晓平主任医师

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
陈凜教授
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
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
傅廷亮教授
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
吕明德教授
吕云福教授
梅铭惠教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
彭志海教授
钱建民教授
乔岐禄主任医师
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦仁义教授
邱宝安主任医师
邱双健副教授

世界华人消化杂志®

编辑委员会

邱伟华副主任医师
裘正军教授
任建安教授
荣大庆教授
邵永孚教授
沈柏用副教授
沈世强教授
沈岩主任医师
师英强教授
施诚仁教授
宋世兵主任医师
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙家邦教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭群友副教授
汤恢焕教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王要军教授
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
吴泰瑞教授
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
李瑗教授
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

陈克敏教授
程红岩教授
褚建国主任医师
官泳松教授
韩新巍教授
胡红杰主任医师
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
刘海峰主任医师
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
倪才方教授
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
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 5 月 28 日

第 16 卷

第 15 期

(总第239期)

述 评

1597 肿瘤多肽疫苗的研究进展

余彤, 杨建民

基 础 研 究

1602 针刺足三里穴对冷应激性胃溃疡大鼠下丘脑与肾上腺SP和POMC表达的影响

孙锦平, 王路宁, 柳国芳, 尹岭

1607 荧光原位明胶酶谱法对肝组织明胶酶活性的检测

陈倩, 沈丽, 何琦麟, 陶艳艳, 刘成海

1612 ¹H-MRS在鉴定大鼠非酒精性脂肪肝模型构建中的作用

刘再毅, 梁长虹, 王秋实, 刘于宝, 徐莉, 郑君惠

1617 苦参碱对大鼠小体积肝移植缺血再灌注损伤的保护作用

刘浩, 仇毓东, 毛谅, 朱新华, 丁义涛

1622 COL1A1-shRNA表达质粒构建及抑制COL1A1表达的有效序列的筛选

芦军, 赵金满, 孟艳, 余永红

1628 高灵敏度薄膜生物传感器基因芯片系统的研制

宋家武, 信芝, 姚蓝, 李啸峰, 唐健熹, 周小军, 吴波, 孙爱静, 吴洲清

临 床 研 究

1634 金属蛋白酶抑制基因RECK在食管鳞癌中的表达及生物学意义

高冬玲, 李晟磊, 陈奎生, 赵志华, 赵秋民, 刘宗文, 张云汉

1639 人脐带间充质干细胞生物学特性及向类肝细胞的分化

闫俊卿, 韩涛, 朱争艳

1645 巨噬细胞移动抑制因子在炎症性肠病发病中的作用

张启芳, 邱小芬, 张翠萍, 杨建彬, 陈卓琳

文 献 综 述

1649 腺病毒载体在乙型肝炎生物治疗中的应用

韩红霞, 唐红

1655 肝干细胞与肝损伤的研究进展

姚鹏, 李绍祥

1661 Fas/FasL在急性胰腺炎肝损伤中的作用

张晓华, 袁柏思, 朱人敏

1666 γ -Synuclein与肿瘤发生发展的研究进展

叶青, 郑民华

1672 大承气汤在腹部外科的应用举隅

李桂, 马军宏, 尚海涛, 周振理

研 究 快 报

1677 胃泌素及其受体拮抗剂丙谷胺对肝癌细胞株生长的影响

江春平, 孔诚, 丁义涛

1681 小檗碱对高果糖饲养诱导胰岛素抵抗大鼠肝组织HNF-4 α 表达的影响

高志强, 陆付耳, 冷三华, 谢美娟, 徐丽君, 王开富, 邹欣

临 床 经 验

1685 老年胃食管反流病患者心理健康评估和干预157例

李军, 李严严, 张丽娟, 朱宇欣

1688 三腔单囊管压迫胃底静脉前后食管曲张静脉压力的变化

芦菲, 刘冰熔, 刘红霞, 郑善国

1692 人胃腺癌组织的自体荧光及其吸收、散射特性

何博华, 魏华江, 陈雪梅, 王娟

1696 经内镜放置金属支架治疗胃出口恶性梗阻9例

王志勇, 孙丽伟, 吴建良, 李丽, 马菊妹, 胡娇娣

	1700 拉米夫定联合TACE治疗原发性肝癌合并肝硬化30例 李岩, 阙志超, 韩涛 1704 黄疸婴儿人巨细胞病毒的检测 马艳萍, 吉耀华, 刘庆, 王继东, 何蓉, 齐莹, 孙峥嵘, 阮强
病理报告	1708 横结肠淋巴瘤误诊1例 代时莉, 王敏, 杨秦南, 万群
致谢	1710 致谢世界华人消化杂志编委
消息	1611 世界华人消化杂志被收录情况 1627 世界华人消化杂志正文要求 1633 第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会征文通知 1638 世界华人消化杂志网络版的发表前链接 1654 世界华人消化杂志计量单位标准 1660 世界华人消化杂志中文摘要要求 1671 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标 1676 世界华人消化杂志修回稿须知 1687 世界华人消化杂志栏目设置 1691 世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策 1703 世界华人消化杂志作者署名要求 1707 世界华人消化杂志外文字符标准 1709 世界华人消化杂志投稿方式
封面故事	Seung-Woo Lee, Chun-Young Song, Young-Hwa Gi, Sang-Beom Kang, Yon-Soo Kim, Soon-Woo Nam, Dong-Soo Lee, Jong-Ok Kim. Hepatic angiosarcoma manifested as recurrent hemoperitoneum. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 14(18): 2935-2938 http://www.wjgnet.com/1007-9327/14/2935.asp
本期责任人	编务 江艳; 送审编辑 程剑侠; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁; 英文审读 王先林; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

<div>  <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创刊 1993-01-15 改刊 1998-01-25 出版 2008-05-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总编辑 马连生 常务副总编辑 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>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志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。</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</p> <p>2008年版权归世界华人消化杂志所有</p>
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

May 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 15

EDITORIAL	1597 Progress in peptide vaccines for tumors <i>Yu T, Yang JM</i>
BASIC RESEARCH	<p>1602 Effect of acupuncture at the acupoint ST 36 on substance P and proopiomelanocortin expression in hypothalamus and adrenal in rats with cold-restraint stress-induced ulcer <i>Sun JP, Wang LN, Liu GF, Yin L</i></p> <p>1607 Detection for gelatinase activity of liver using fluorescent <i>in situ</i> zymography <i>Chen Q, Shen L, He QL, Tao YY, Liu CH</i></p> <p>1612 Evaluation of nonalcoholic fatty liver model in rats using ¹H-proton magnetic resonance spectroscopy <i>Liu ZY, Liang CH, Wang QS, Liu YB, Xu L, Zheng JH</i></p> <p>1617 Protective effect of matrine against ischemia and reperfusion injury in rat partial liver transplantation <i>Liu H, Qiu YD, Mao L, Zhu XH, Ding YT</i></p> <p>1622 Construction of COL1A1-shRNA expression plasmid and screening of effective sequences to inhibit COL1A1 expression <i>Lu J, Zhao JM, Meng Y, Yu YH</i></p> <p>1628 Development of clinical highly sensitive biosensor-based microarray system <i>Song JW, Xin Z, Yao L, Li XF, Tang JX, Zhou XJ, Wu B, Sun AJ, Wu ZQ</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>1634 Expression and biological significance of matrix metalloproteinase inhibitor RECK gene in esophageal squamous cell carcinoma <i>Gao DL, Li SL, Chen KS, Zhao ZH, Zhao QM, Liu ZW, Zhang YH</i></p> <p>1639 Biological characteristics and differentiation into hepatocyte-like cells of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells <i>Yan JQ, Han T, Zhu ZY</i></p> <p>1645 Pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in inflammatory bowel disease <i>Zhang QF, Qiu XF, Zhang CP, Yang JB, Chen ZL</i></p>
REVIEW	<p>1649 Application of adenoviral vector in biotherapy for hepatitis B virus infection <i>Han HX, Tang H</i></p> <p>1655 Advance in hepatic stem cells and liver injury <i>Yao P, Li SX</i></p> <p>1661 Role of Fas/FasL in acute pancreatitis-associated liver injury <i>Zhang XH, Yuan BS, Zhu RM</i></p> <p>1666 Advances in γ-Synuclein and progression of tumors <i>Ye Q, Zheng MH</i></p> <p>1672 Application of dachengqi decoction in abdominal surgery <i>Li G, Ma JH, Shang HT, Zhou ZL</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>1677 Effects of gastrin and its antagonist proglumide on proliferation of human hepatoma cell lines <i>Jiang CP, Kong C, Ding YT</i></p> <p>1681 Effects of berberine on the expression of hepatocyte nuclear factor-4α in rats with fructose-induced insulin resistance <i>Gao ZQ, Lu FE, Leng SH, Xie MJ, Xu LJ, Wang KF, Zou X</i></p>
CLINICAL PRACTICE	1685 Mental health evaluation and psychological intervention of elderly patients with gastroesophageal reflux diseases: an analysis of 157 cases <i>Li J, Li YY, Zhang LJ, Zhu YX</i>

	<p>1688 Pressure changes in intra-oesophageal varices during sclerotherapy using a gastric-balloon tamponade <i>Lu F, Liu BR, Liu HX, Zheng SG</i></p> <p>1692 Properties of autofluorescence, absorption coefficient and scattering coefficient spectra for human gastric adenocarcinoma tissues <i>He BH, Wei HJ, Chen XM, Wang J</i></p> <p>1696 Treatment of malignant gastric outlet obstruction using metal stent placement: an analysis of 9 cases <i>Wang ZY, Sun LW, Wu JL, Li L, Ma JM, Hu JD</i></p> <p>1700 Lamivudine therapy after transcatheter arterial chemoembolization for patients with Hepatocellular carcinoma complicated by hepatitis B virus: an analysis of 30 cases <i>Li Y, Kan ZC, Han T</i></p> <p>1704 Detection of human cytomegalo virus in infants with jaundice <i>Ma YP, Ji YH, Liu Q, Wang JD, He R, Qi Y, Sun ZR, Ruan Q</i></p>
CASE REPORT	<p>1708 One-case analysis of misdiagnosis for transverse colon lymphoma <i>Dai SL, Wang M, Yang QN, Wan Q</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>1710 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Seung-Woo Lee, Chun-Young Song, Young-Hwa Gi, Sang-Beom Kang, Yon-Soo Kim, Soon-Woo Nam, Dong-Soo Lee, Jong-Ok Kim.</i> Hepatic angiosarcoma manifested as recurrent hemoperitoneum. <i>World J Gastroenterol</i> 2008; 14(18): 2935-2938 http:// www.wjgnet.com/1007-9327/14/2935.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jian-Xia Cheng</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> English Language Reviewer: <i>Xian-Lin Wang</i> 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 May 28, 2008

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

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

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

肿瘤多肽疫苗的研究进展

余彤, 杨建民

余彤, 杨建民, 浙江省人民医院消化内科 浙江省杭州市 310014

余彤, 温州医学院 浙江省温州市 325000

杨建民, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事消化系统肿瘤相关基础与临床研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30570816

作者贡献分布: 余彤与杨建民对此文所作贡献均等.

通讯作者: 杨建民, 310014, 浙江省杭州市上塘路158号, 浙江省人民医院消化内科. jianminyang@hotmail.com

电话: 0571-85893430 传真: 0571-85131448

收稿日期: 2008-02-06 修回日期: 2008-05-07

Progress in peptide vaccines for tumors

Tong Yu, Jian-Min Yang

Tong Yu, Jian-Min Yang, Department of Gastroenterology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570816

Correspondence to: Jian-Min Yang, Department of Gastroenterology, Zhejiang Provincial People's Hospital, 158 Shangtang Road, Hangzhou 310014, Zhejiang Province, China. jianminyang@hotmail.com

Received: 2008-02-06 Revised: 2008-05-07

Abstract

Immunotherapy for tumor has been a hotspot in recent research. The peptide vaccines are now drawing extensive attention since it is chemically stable, easily prepared and devoid of oncogenic potential. Research showed that antitumor effect of peptide vaccines was closely related to its immunogenicity which can be enhanced by immunoadjuvant, multiple-antigen peptides, multiple-epitope peptides or combination with adjuvant, dendritic cells, Th epitopes or cell-penetrating peptides. Although peptide vaccines were somewhat effective for some malignant tumors, there existed such problems as unsatisfying immunogenicity, inconsistency between intensity of immune response and clinical results, and HLA type restriction, which require further investigation.

Key Words: Tumor; Immunotherapy; Peptide vaccine; Immunogenicity

Yu T, Yang JM. Progress in peptide vaccines for tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1597-1601

摘要

近年来, 随着免疫学的不断发展, 肿瘤的免疫疗法已成为当前研究的热点, 而多肽疫苗因其化学性质稳定、易于制备、无潜在致癌性等优点, 更是受到广泛关注. 研究发现, 应用免疫佐剂、多抗原分支肽、全长或多表位叠加抗原肽、融合穿膜肽, 增加Th表位及联合树突状细胞等方法, 可提高免疫原性, 增强抗肿瘤作用. 多肽疫苗临床治疗一些恶性肿瘤也已取得一定效果, 但尚存在免疫原性欠佳、免疫应答、临床疗效不尽一致及受HLA表型限制等问题, 还需进一步深入研究解决.

关键词: 肿瘤; 免疫治疗; 多肽疫苗; 免疫原性

余彤, 杨建民. 肿瘤多肽疫苗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(15): 1597-1601

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1597.asp>

0 引言

肿瘤传统治疗包括手术、化疗、放疗或是这些方法的联合. 手术因无法彻底清除残存的肿瘤细胞而致复发; 放疗和化疗在杀伤肿瘤细胞的同时也杀伤正常细胞而致患者难以坚持. 随着对肿瘤发生、发展分子机制研究的深入和生物技术的迅速发展, 生物治疗已经成为肿瘤治疗的第四种模式, 包括体细胞疗法与细胞因子疗法、放射靶向治疗、基因治疗、分子靶向治疗及肿瘤疫苗等^[1]. 其中, 肿瘤多肽疫苗已成为近年研究的热点, 与当前研究的另一大热点分子靶向治疗相比, 两者均具有治疗特异性高、不损伤机体正常细胞、毒副作用低、患者治疗依从性好、生活质量高等优点, 但分子靶向治疗也存在仅对靶分子表达阳性的部分肿瘤细胞有效、肿瘤型别专一性强、临床有效率低、价格昂贵等问题, 而肿瘤多肽疫苗则具有化学性质稳定、制作方便、无需细菌病毒等载体、肿瘤型别通用性强、有效率高、治疗费用相对较低等优势^[2-3]. 本文就多肽疫苗的作用机制, 增强疫苗免疫原性的途径, 及其在临床肿瘤治疗中的应用作一简要叙述.

■背景资料

随着对肿瘤发生、发展分子机制研究的深入和生物技术的迅速发展, 生物治疗已经成为肿瘤治疗的第四种模式, 包括体细胞疗法与细胞因子疗法、放射靶向治疗、基因治疗、分子靶向治疗及肿瘤疫苗等.

■同行评议者

张凤春, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤中心

■研发前沿

随着免疫学的不断发展,肿瘤的免疫疗法已成为当前研究的热点,而多肽疫苗因其许多优点,更受到广泛的关注.

1 T细胞抗肿瘤免疫的机制

T细胞的活化是多肽疫苗抗肿瘤免疫反应的关键步骤(图1). 抗原特异性T细胞反应由抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)对抗原多肽的递呈开始. 肿瘤抗原多肽必需经APC加工处理后形成主要组织相容性分子复合物(major histocompatibility complex, MHC), 才能被T细胞受体(T cell receptor, TCR)识别, 产生抗原特异性激发信号. 树突状细胞(dendritic cell, DC)是递呈作用最强的APC, 大量表达诸如CD80、CD86等共刺激分子和CD83等特异性标志物的MHC I类和II类分子. DC吞噬多肽疫苗中的多肽后迁移到外周淋巴结, 并将8-10个氨基酸长度的抗原肽和MHC-I类分子的结合物递呈给以CD8作为细胞表面标志的细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL). 幼稚的T细胞在APC递呈的多肽-MHC分子复合物和共刺激分子双信号的作用下转化为成熟的效应细胞, 迁移到炎症、肿瘤部位从而启动了有效的杀伤反应, 通过穿孔素/颗粒酶和(或)Fas/Fas-L途径溶解靶细胞. 不同细胞毒T淋巴细胞亚群的杀伤靶细胞机制略有不同: CD8⁺ CTL主要通过颗粒依赖性途径杀伤靶细胞和病原, DN CTL(CD8-CD4⁻)主要是通过FasL-Fas介导但无法杀伤病原体, 而CD4⁺ CTL则可通过任一途径杀伤靶细胞.

那些长度约为14-25个氨基酸的抗原肽则和MHC-II类分子结合, 然后递呈给以CD4作为细胞表面标志的辅助T淋巴细胞(helper T lymphocyte, HTL, Th). Th细胞在激发和维持抗肿瘤免疫的过程中起到了重要的作用. 许多研究已经证实, CD4 Th细胞和DC的CD40-CD40L之间的相互作用是激发和活化CD8 CTL的关键. CD4 Th细胞通过CD40-CD40L信号途径和分泌IL-2的方法激活幼稚DC以辅助CD8 CTL反应. CD4 Th细胞识别了DC递呈的抗原后, 反过来激活载有抗原的DC, 一旦被活化, 这些DC就可以有效的激发CD8 CTL对肿瘤抗原做出反应. CD4 Th细胞分为Th1和Th2两种类型. 活化的Th1 CD4细胞分泌IL-2等细胞因子来激活CD8 CTL、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)和巨噬细胞以作为抗体依赖细胞介导的细胞毒作用的效应细胞. Th2 CD4细胞分泌IL-4、IL-5、IL-6等细胞因子来激活B细胞以介导体液免疫. 另外, 记忆性CD4 Th细胞还在维持保护性免疫中起关键性作用. 同时, CD4 Th细胞还可以释放出如IFN- γ 、TNF之类的细胞因子来维持CD8 CTL的生长和增殖并协助其发挥抗肿瘤的作用^[4-6].

2 肿瘤抗原

活化的T细胞对肿瘤细胞的杀伤始于机体的免疫系统对肿瘤抗原性物质的识别. 肿瘤抗原是肿瘤特异性免疫应答的重要靶抗原, 分为肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA)和肿瘤相关性抗原(tumor-associated antigen, TAA)两种^[7-8]. TSA是只在肿瘤细胞表达, 而在正常细胞中不表达的抗原分子, 因此不存在宿主免疫耐受和发生自身免疫的可能. 这些抗原多来源于病毒抗原, 变异蛋白或是融合蛋白. 相对于TSA, TAA在正常组织和肿瘤组织中均有表达, 但肿瘤细胞的表达量明显高于正常组织, 如CEA、AFP、CA19-9等. 发生免疫耐受和自身免疫反应是此类疫苗可能潜在的问题, 因此如何提高人体免疫系统对TAA特异性CTL和HTL表位的识别是多肽疫苗研究中的关键所在, 而肿瘤抗原表位鉴定的发展使这个问题能得以有效的解决.

3 多肽疫苗

肿瘤多肽疫苗因制作工序简单、费用低廉、化学性质稳定、无致癌性等优点而成为肿瘤免疫治疗的新方法. 理想的多肽疫苗免疫原性强, 能激活抗原特异性CTL和HTL反应, 有效杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无毒害作用. 但是普通的多肽抗原因其表位单一、分子量小易降解等原因而致免疫原性弱, 只能激发低水平的CTL反应, 不能获得理想的抗肿瘤效果. 故在多肽疫苗设计过程中需重点解决提高免疫原性的问题.

4 提高多肽疫苗免疫原性的方法

4.1 免疫佐剂 佐剂属于非特异性免疫原性增强剂, 其本身不能引起有效的抗肿瘤免疫反应, 但可以模拟病原体制造的危险信号, 刺激免疫系统, 参与刺激淋巴细胞增殖与分化, 引起机体炎症反应, 另外还可以保护抗原肽不被蛋白酶降解, 并缓慢释放到细胞外. 佐剂包括福氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)、福氏不完全佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)、IL-2、热休克蛋白(heat shock protein, HSP)等^[3,9]. 目前免疫佐剂的使用没有一个特定的规则, 但其选择可能和抗原肽种类、注射方法、肿瘤类型等有关. Scheibenbogen *et al*^[10]以GM-CSF和KLH作为MHC-I限制性酪氨酸酶多肽疫苗的佐剂对43名高危黑色素瘤患者进行免疫接种实验以比较不同佐剂对多肽疫苗作用的影响, 结果表明单

独以GM-CSF为佐剂的9名患者中有4名出现特异性T细胞反应, 单独以KLH为佐剂的患者中未出现类似反应, 而GM-CSF和KLH联合作为佐剂则可增强多肽的免疫原性. 说明不同的佐剂对多肽产生不同的影响, 而联合使用佐剂可以增强多肽的免疫原性.

4.2 联合树突状细胞 DC是目前发现的体内功能最强的T细胞刺激物, 其最大的特点是能显著刺激初始型T-淋巴细胞增殖, 是机体免疫反应的始动者. DC能高水平的表达与抗原递呈有关的MHC- I类和MHC- II类分子, 摄取肿瘤相关抗原后递呈给T细胞, 激活相应的 $CD4^+$ T细胞和 $CD8^+$ T细胞, DC还可以借助表达的粘附分子与T细胞膜表面的相应配体CD28和CTL A-4的相互作用而活化Th细胞, 使Th细胞产生大量的细胞因子, 进一步调节活化的Th细胞, 以增强机体的细胞免疫和体液免疫功能, 发挥主动免疫的抗肿瘤作用, 在抗肿瘤免疫中具有重要的作用. 故把成熟的DC和多肽联合制成疫苗免疫机体也是提高多肽疫苗免疫原性的一种有效的方法^[11-13].

4.3 多抗原分支肽 单体肽抗原表位成分简单, 引发的免疫反应针对性强, 但其表位肽的分子量小, 在体内易降解, 从而不能激发满意的保护性免疫反应, 因而有免疫原性低的缺陷. 1988年Tam实验室提出了多抗原肽(multiple antigen peptides, MAPs)的设计方案, 采用分子量小且免疫原性弱的赖氨酸为核心基质, 将若干条(一般为4条或8条)抗原表位相同的单体肽耦联在一起, 形成树枝状结构. 这种设计模式在加强了抗原优势表位的肽链结构特异性的同时还增大了抗原的分子质量, 不但很好的模拟了天然表位构象, 而且无需再耦联载体蛋白便能诱生高滴度、高亲和力的抗体, 改善了其抗原抗体反应的活性, 从而加强了抗原性, 在疫苗开发和肿瘤免疫治疗上有着巨大的应用前景^[14]. Ciesielski *et al*^[15]以赖氨酸桥连接8条EGFRvIII单体肽形成的八分支肽来免疫恶性神经胶质瘤小鼠, 同时用或不用GM-CSF作为佐剂, 结果表明MAPs联合GM-CSF效靶比20:1组杀伤率超过40%, 单用MAPs组杀伤率10%, 未免疫组杀伤率为0%, 各组间有显著差异($P<0.05$).

4.4 全长或多表位叠加抗原肽 当前研究的单表位肽疫苗多是经过预测筛选的HLA表型限制性疫苗, 只适用于特定HLA表型的患者, 应用范围相对较窄. 全长抗原蛋白制成的疫苗或多表位叠加的疫苗存在多个已知或未知的受不同

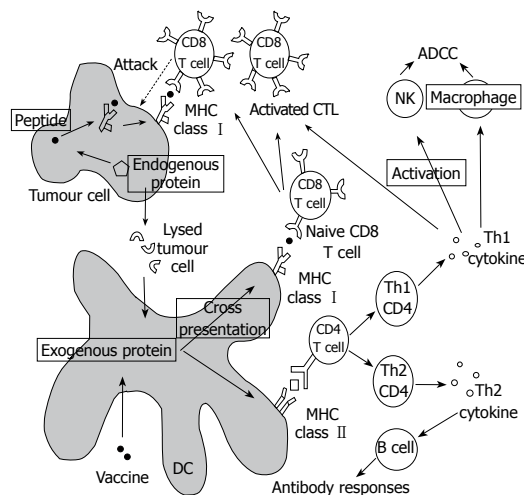


图1 T细胞抗肿瘤免疫的机制. 在多肽疫苗治疗中, T细胞的活化是抗肿瘤免疫反应的关键. ADCC: 抗体依赖细胞介导的细胞毒作用.

MHC限制的抗原表位, 他们负载DC后能以多抗原表位的形式递呈到DC表面, 从而可以产生多个克隆的CTL细胞, 针对不同HLA I类和II类表型均能引起有效的T细胞反应, 其杀伤效果明显高于单抗原表位疫苗^[16]. Slingluff *et al*^[17]在一项前瞻性随机临床研究中比较了多表位肽疫苗与单一表位肽疫苗应用于黑色素瘤患者时的免疫原性. 多表位肽疫苗由12肽的黑色素细胞分化蛋白和肿瘤-睾丸抗原混合而成, 而单一表位肽疫苗仅含4肽的黑色素细胞分化蛋白, 结果显示12肽的多表位肽疫苗在所有患者均产生了免疫性, 并较对照组诱导出了更为广泛且更强烈的免疫反应.

4.5 增加Th表位 如前所述, $CD4^+$ Th细胞在激发和维持抗肿瘤免疫的过程中起到了重要的作用. 单一表位多肽因主要组织相容性复合物多态性原因, 使其免疫应答因缺乏适当的辅助T淋巴细胞而无法引导出充分的细胞毒性T淋巴细胞和抗体反应. 故在多肽疫苗中增添Th表位成为提高疫苗免疫原性、增强T细胞反应的又一个有效的途径. Dechamma *et al*^[18]在研究中以PPRV来源的MAP1-MAP6等6条多分支肽为抗原, 分别单独及联合通用Th表位免疫新西兰兔, 以研究Th表位对多肽免疫原性的影响, 结果表明联用Th表位免疫组抗体效价比单独免疫组明显增高.

4.6 融合穿膜肽 一些多肽疫苗穿透力不强, 不易进入APC细胞, 难以形成“抗原肽-MHC I类分子”复合物, 最终表现为弱免疫原性, 因而不能有效的激发特异性免疫反应. 如何使免疫原有效的进入APC细胞的MHC- I类系统, 是肿瘤免疫治疗研究中急需解决的一个难题. 近年来, 一

■ 相关报道

Slingluff *et al*在一项前瞻性随机临床研究中比较了多表位肽疫苗与单一表位肽疫苗应用于黑色素瘤患者时的免疫原性. 结果显示12肽的多表位肽疫苗在所有患者均产生了免疫性, 并较对照组诱导出了更为广泛且更强烈的免疫反应.

■应用要点

肿瘤多肽疫苗因制作工序简单、费用低廉、化学性质稳定、无致癌性等优点而成为肿瘤免疫治疗的新方法。

些具有细胞膜穿透能力的多肽相继被发现,他们可穿过细胞膜进入细胞质甚至细胞核,而细胞膜却完好无损。这些多肽具有水溶性、低裂解性并通过非吞噬作用进入各种细胞膜,称之为穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPP)。其可介导如DNA、多胺类,甚至比自身分子量大很多倍的寡聚核苷酸进入细胞。该分子可以作为一种全新的载体,他不需要能量,可以挂载的分子类型多且分子质量大。有研究报道,将肿瘤抗原或CTL表位与一些可穿透细胞膜的短肽序列融合后,可以使其更快速、更有效地进入活细胞胞质,且明显增强其免疫原性^[19-21]。借助穿膜肽的作用增强多肽疫苗的免疫原性及穿膜能力,在肿瘤疫苗开发及药物体内转运等方面具有诱人的前景,值得进一步的研究。

5 多肽疫苗的临床应用

黑色素瘤通常对常规全身治疗耐受,且被认为是一种具有高免疫原性的肿瘤,非常适合进行免疫治疗,因此目前大部分的肿瘤多肽疫苗临床研究都集中于该疾病。Letsch *et al*^[22]运用多肽疫苗治疗9名至少进行过3次黑色素瘤切除术后又再次复发的患者,并进行长期随访,其中2名在随访期内(分别27 mo, 42 mo)未见复发,另2名仅出现单处或多处早期复发(均可经手术切除)并在其后随访期内(分别18 mo, 65 mo)未见复发,且4名停止复发的患者均对疫苗产生了免疫应答,该研究小组认为应用多肽疫苗可以延长恶性黑色素瘤复发间隔时间。Atzpodien *et al*^[23]以黑色素瘤抗原MelanA/MART1, MAGE-1, gp100及酪氨酸酶联合GM-CSF构建多肽疫苗治疗24名恶性黑色素瘤复发切除术后的患者,结果显示2年内未出现转移者占8.6%, 2年内未出现远处转移者占68%, 2年总的生存率为85%,且治疗过程中患者耐受良好,未见严重副反应。

与黑色素瘤相比,多肽疫苗应用于其他肿瘤的临床报道相对较少。Yamanaka *et al*^[24]分析神经胶质瘤治疗的相关文献后,认为基于多肽的免疫疗法可以成功诱导抗胶质瘤免疫反应,且能延长神经胶质瘤患者的生存期而没有明显的副反应。Noguchi *et al*^[25]将个性化的多肽疫苗用于局限性前列腺癌患者根治术(RRP)前治疗,以单纯行RRP的患者作为对照,结果表明多肽疫苗安全且无严重副作用,实验组CTL反应和抗多肽IgG滴度增加,CD45RO(+)浸润细胞的强度明显高于对照组,并且CD8(+)T细胞浸润仅在实验组出现,提示应用多肽疫苗后增强了免

疫反应。Bolonaki *et al*^[26]以多肽TERT572Y免疫22名进展期非小细胞性肺癌患者,第2次免疫后有16(76.2%)个患者出现TERT572Y特异性T细胞反应,而此比率在第6次免疫后上升到90.9%,整个实验过程中,病情稳定率达36.4%(8/22)。并且研究者在其后的随访中发现,出现早期免疫应答的患者比无应答的患者中位生存期明显延长(分别为30.0 mo和4.1 mo),提示免疫应答率和生存时间成正相关。Sato *et al*^[27]用多肽疫苗治疗HLA-A24限制性进展期大肠癌患者,每名患者在14个候选肽中选择4种作为多肽疫苗进行免疫治疗,免疫应答监测使用不同的检测方法。结果用标准51Gr释放实验检测有56%的患者出现特异性CTL反应,用DTH反应检测有30%的患者出现阳性反应,用抗多肽抗体检测有70%的患者出现血清抗多肽抗体。然而临床反应和免疫应答并不完全一致,完成实验的10例患者中只有1例部分缓解,1例病情稳定,而其他的病情继续进展。

6 结论

随着计算机模拟信息学和免疫学的发展,各种新的肿瘤相关抗原的CTL表位不断被预测和鉴定并应用至临床,使人工合成多肽疫苗治疗恶性肿瘤的方法得以成为现实。多肽疫苗因其合成简单、成本低廉、无明显副作用、免疫针对性强等优点而较其他治疗方法更具有竞争性,因而具有更广泛的应用前景。但是其本身也存在一些问题,如人工合成多肽疫苗免疫原性欠佳,受HLA表型限制,在一些临床研究中免疫应答和临床反应不一致等,需要进一步的研究以不断完善和解决。

7 参考文献

- 1 Yang JM, Peng ZH, Si SH, Liu WW, Luo YH, Ye ZY. KAI1 gene suppresses invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells in vitro and in animal models. *Liver Int* 2008; 28: 132-139
- 2 Goto Y, Matsuzaki Y, Kurihara S, Shimizu A, Okada T, Yamamoto K, Murata H, Takata M, Aburatani H, Hoon DS, Saida T, Kawakami Y. A new melanoma antigen fatty acid-binding protein 7, involved in proliferation and invasion, is a potential target for immunotherapy and molecular target therapy. *Cancer Res* 2006; 66: 4443-4449
- 3 Bijker MS, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH. Design and development of synthetic peptide vaccines: past, present and future. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6: 591-603
- 4 Lee GR, Kim ST, Spilianakis CG, Fields PE, Flavell RA. T helper cell differentiation: regulation by

- cis elements and epigenetics. *Immunity* 2006; 24: 369-379
- 5 Tsuruma T, Hata F, Furuhashi T, Ohmura T, Katsuramaki T, Yamaguchi K, Kimura Y, Torigoe T, Sato N, Hirata K. Peptide-based vaccination for colorectal cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 799-807
 - 6 Nasta F, Ubaldi V, Pace L, Doria G, Pioli C. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 inhibits GATA-3 but not T-bet mRNA expression during T helper cell differentiation. *Immunology* 2006; 117: 358-367
 - 7 Schietinger A, Philip M, Yoshida BA, Azadi P, Liu H, Meredith SC, Schreiber H. A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen. *Science* 2006; 314: 304-308
 - 8 Deveci MS, Deveci G. Prognostic value of p53 protein and MK-1 (a tumor-associated antigen) expression in gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 2007; 10: 112-116
 - 9 Kwissa M, Kasturi SP, Pulendran B. The science of adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6: 673-684
 - 10 Scheibenbogen C, Schadendorf D, Bechrakis NE, Nagorsen D, Hofmann U, Servetopoulou F, Letsch A, Philipp A, Foerster MH, Schmittel A, Thiel E, Keilholz U. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and foreign helper protein as immunologic adjuvants on the T-cell response to vaccination with tyrosinase peptides. *Int J Cancer* 2003; 104: 188-194
 - 11 Decker WK, Xing D, Shpall EJ. Dendritic cell immunotherapy for the treatment of neoplastic disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 113-125
 - 12 Papewalis C, Wuttke M, Jacobs B, Domberg J, Willenberg H, Baehring T, Cupisti K, Raffel A, Chao L, Fenk R, Seissler J, Scherbaum WA, Schott M. Dendritic cell vaccination induces tumor epitope-specific Th1 immune response in medullary thyroid carcinoma. *Horm Metab Res* 2008; 40: 108-116
 - 13 Connolly NC, Whiteside TL, Wilson C, Kondragunta V, Rinaldo CR, Riddler SA. Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 284-292
 - 14 Amexis G, Young NS. Multiple antigenic peptides as vaccine platform for the induction of humoral responses against dengue-2 virus. *Viral Immunol* 2007; 20: 657-663
 - 15 Ciesielski MJ, Kazim AL, Barth RF, Fenstermaker RA. Cellular antitumor immune response to a branched lysine multiple antigenic peptide containing epitopes of a common tumor-specific antigen in a rat glioma model. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 107-119
 - 16 Chen L, Liang GP, Tang XD, Chen T, Cai YG, Fang DC, Yu ST, Luo YH, Yang SM. In vitro anti-tumor immune response induced by dendritic cells transfected with hTERT recombinant adenovirus. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 927-934
 - 17 Slingluff CL Jr, Petroni GR, Chianese-Bullock KA, Smolkin ME, Hibbitts S, Murphy C, Johansen N, Grosh WW, Yamshchikov GV, Neese PY, Patterson JW, Fink R, Rehm PK. Immunologic and clinical outcomes of a randomized phase II trial of two multi-peptide vaccines for melanoma in the adjuvant setting. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6386-6395
 - 18 Dechamma HJ, Dighe V, Kumar CA, Singh RP, Jagadish M, Kumar S. Identification of T-helper and linear B epitope in the hypervariable region of nucleocapsid protein of PPRV and its use in the development of specific antibodies to detect viral antigen. *Vet Microbiol* 2006; 118: 201-211
 - 19 Kinyanjui MW, Fixman ED. Cell-penetrating peptides and proteins: new inhibitors of allergic airways disease. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 1-7
 - 20 Morris MC, Deshayes S, Heitz F, Divita G. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol Cell* 2008; 100: 201-217
 - 21 Cohen JL, Almutairi A, Cohen JA, Bernstein M, Brody SL, Schuster DP, Frechet JM. Enhanced cell penetration of Acid-degradable particles functionalized with cell-penetrating peptides. *Bioconjug Chem* 2008; 19: 876-881
 - 22 Letsch A, Keilholz U, Fluck M, Nagorsen D, Asemussen AM, Schmittel A, Thiel E, Scheibenbogen C. Peptide vaccination after repeated resection of metastases can induce a prolonged relapse-free interval in melanoma patients. *Int J Cancer* 2005; 114: 936-941
 - 23 Atzpodiën J, Reitz M. GM-CSF plus antigenic peptide vaccination in locally advanced melanoma patients. *Cancer Biother Radiopharm* 2007; 22: 551-555
 - 24 Yamanaka R, Itoh K. Peptide-based immunotherapeutic approaches to glioma: a review. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7: 645-649
 - 25 Noguchi M, Yao A, Harada M, Nakashima O, Komohara Y, Yamada S, Itoh K, Matsuoka K. Immunological evaluation of neoadjuvant peptide vaccination before radical prostatectomy for patients with localized prostate cancer. *Prostate* 2007; 67: 933-942
 - 26 Bolonaki I, Kotsakis A, Papadimitraki E, Aggouraki D, Konsolakis G, Vagia A, Christophylakis C, Nikoloudi I, Magganis E, Galanis A, Cordopatis P, Kosmatopoulos K, Georgoulis V, Mavroudis D. Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2727-2734
 - 27 Sato Y, Maeda Y, Shomura H, Sasatomi T, Takahashi M, Une Y, Kondo M, Shinohara T, Hida N, Katagiri K, Sato K, Sato M, Yamada A, Yamana H, Harada M, Itoh K, Todo S. A phase I trial of cytotoxic T-lymphocyte precursor-oriented peptide vaccines for colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 2004; 90: 1334-1342

■同行评价

本文选题先进, 层次清楚, 学术价值较好。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

针刺足三里穴对冷应激性胃溃疡大鼠下丘脑与肾上腺SP和POMC表达的影响

孙锦平, 王路宁, 柳国芳, 尹岭

■背景资料

应激性溃疡(SU)是指患者遭受各类重伤或重病以及其他应激情况下,出现胃、十二指肠黏膜的急性病变,主要表现为胃、十二指肠黏膜的糜烂、浅溃疡、渗血等。在应激性溃疡的发病机制中,除有消化道局部胃黏膜的保护屏障作用减弱,还有机体的整体因素参与,其中最重要的是机体的神经内分泌功能失调。P物质(SP)和POMC不论在中枢还是在外周的靶器官都参与了应激性溃疡的形成。但目前对于二者在中枢与周围的作用并不明确。

孙锦平, 王路宁, 柳国芳, 青岛大学医学院附属医院急诊神经内科 山东省青岛市 266003

尹岭, 中国人民解放军总医院神经信息中心 北京市 100853
孙锦平, 2004年于中国人民解放军总医院博士, 副主任医师, 主要从事神经内分泌的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30171135

作者贡献分布: 本研究的设计由孙锦平与尹岭完成, 实验操作由孙锦平完成; 王路宁、柳国芳参与论文资料查询、整理, 图像处理及数据统计由王路宁与柳国芳完成。

通讯作者: 尹岭, 150086, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院神经信息中心. yinling1955@sina.com

电话: 010-66937547

收稿日期: 2008-01-12 修回日期: 2008-04-16

Effect of acupuncture at the acupoint ST 36 on substance P and proopiomelanocortin expression in hypothalamus and adrenal in rats with cold-restraint stress-induced ulcer

Jin-Ping Sun, Lu-Ning Wang, Guo-Fang Liu, Ling Yin

Jin-Ping Sun, Lu-Ning Wang, Guo-Fang Liu, Department of Emergency Neurology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Ling Yin, Center of Neuroinformatics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30171135

Correspondence to: Dr. Ling Yin, Center of Neuroinformatics, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. yinling1955@sina.com

Received: 2008-01-12 Revised: 2008-04-16

Abstract

AIM: To study the protective effect of acupuncture at the acupoint ST 36 against cold-restraint stress-induced ulcer and the expression of substance P (SP) and proopiomelanocortin (POMC) associated with stress in hypothalamus and adrenal in rats.

METHODS: Twenty-two rats were randomized into 3 groups: normal control group ($n = 6$), stress group ($n = 8$), acupuncture group ($n = 8$). The rats in the acupuncture group received acupuncture at the acupoint ST 36 before cold-restraint stress. Ulcer index and serum cortisol level were

used to evaluate the protective effect of acupuncture at the acupoint ST 36; reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of SP and POMC in hypothalamus and adrenal, and the images were analyzed with semi-quantitative method.

RESULTS: The ulcer index and serum cortisol level in the acupuncture group were significantly lower than those in the stress group (9.75 ± 1.91 vs 26.25 ± 4.40 , $P < 0.01$; 66.83 nmol/L \pm 12.25 nmol/L vs 104.38 nmol/L \pm 8.31 nmol/L, $P < 0.01$). The expression of SP was up-regulated in hypothalamus (1.02 ± 0.42 vs 0.45 ± 0.12 , $P < 0.05$) but down-regulated in adrenal (1.88 ± 0.82 vs 2.93 ± 1.08 , $P < 0.05$) in the acupuncture group as compared with that in the stress group. Acupuncture at the acupoint ST 36 inhibited the stress-induced POMC expression in hypothalamus (0.56 ± 0.14 vs 0.82 ± 0.19 , $P < 0.01$). There was no POMC expression in adrenal in the rats with stress-induced ulcer.

CONCLUSION: Acupuncture at acupoint ST 36 can protect gastric mucosa against cold-restraint stress-induced ulcer by up-regulating SP expression in hypothalamus and down-regulating POMC expression in hypothalamus and SP expression in adrenal.

Key Words: Stress ulcer; Substance P; Proopiomelanocortin; Reverse transcription polymerase chain reaction

Sun JP, Wang LN, Liu GF, Yin L. Effect of acupuncture at the acupoint ST 36 on substance P and proopiomelanocortin expression in hypothalamus and adrenal in rats with cold-restraint stress-induced ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1602-1606

摘要

目的: 研究针刺足三里穴对冷应激性急性胃溃疡的保护作用, 以及应激大鼠下丘脑和肾上腺SP和POMC mRNA的表达情况。

方法: 大鼠22只随机分成3组: 正常对照组(6

■同行评议者

王邦茂, 教授, 天津医科大学总医院消化内科; 陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

只)、单纯应激组(8只)、针刺预防应激组(8只)。针刺预防组先给予针刺足三里穴,再冷应激。胃黏膜溃疡指数和RT-PCR法研究针刺足三里对大鼠的冷应激性溃疡的保护作用和下丘脑、肾上腺的SP、POMC的表达,经图像分析系统照相并进行半定量。

结果:与单纯应激组比较,针刺足三里穴可以明显减少冷应激造成的溃疡指数(9.75 ± 1.91 vs 26.25 ± 4.40 , $P < 0.01$),抑制应激造成的皮质醇分泌增加($66.83 \text{ nmol/L} \pm 12.25 \text{ nmol/L}$ vs $104.38 \text{ nmol/L} \pm 8.31 \text{ nmol/L}$, $P < 0.01$),上调下丘脑的SP的表达(1.02 ± 0.42 vs 0.45 ± 0.12 , $P < 0.05$),下调肾上腺SP的表达(1.88 ± 0.82 vs 2.93 ± 1.08 , $P < 0.05$);下丘脑POMC在应激过程中表达增高,针刺能抑制POMC的表达,针刺预防应激组与单纯应激组相比差异显著(0.56 ± 0.14 vs 0.82 ± 0.19 , $P < 0.01$);肾上腺中无POMC表达,不参与应激过程。

结论:针刺对冷应激溃疡具有保护作用,该种保护作用是通过生理性上调下丘脑SP的表达,下调POMC的病理性表达及抑制肾上腺SP而实现的。

关键词: 应激性溃疡; P物质; 前阿黑皮素原; 逆转录聚合酶链反应

孙锦平, 王路宁, 柳国芳, 尹岭. 针刺足三里穴对冷应激性胃溃疡大鼠下丘脑与肾上腺SP和POMC表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1602-1606

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1602.asp>

0 引言

应激性溃疡(stress ulcer, SU)是指患者遭受各类重伤或重病以及其他应激情况下,出现胃、十二指肠黏膜的急性病变,主要表现为胃、十二指肠黏膜的糜烂、浅溃疡、渗血等。损伤多局限胃底部黏膜表层,偶尔浸及黏膜下层。临床表现主要为上消化道出血,很少发生穿孔。在应激性溃疡的发病机制中,除有消化道局部胃黏膜的保护屏障作用减弱,还有机体的整体因素参与,其中最重要的是机体的神经内分泌功能失调。目前认为,下丘脑在神经内分泌失调中具有最重要的作用。应激主要是中枢神经递质及神经肽通过植物神经系统及下丘脑-垂体-肾上腺轴影响胃肠,进而引起胃肠黏膜的病理变化,造成溃疡的发生。我们已经在前期报道了一氧化氮合成酶在应激性溃疡中的作用机制及针刺的调节作用^[1]。而中枢神经系统内的前阿黑

皮素原(preproopiomelanocortin, POMC)是 β -内啡肽、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、和 α -促黑素细胞激素(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH)等的共同的前体物质。 β -内啡肽属于内源性阿片肽,主要参与机体对痛觉的调制、学习、记忆、生殖内分泌、免疫调节等。他也是机体的主要应激激素之一,主要功能是使机体在不同的应激状态下保持稳态。众多的研究结果也都说明, P物质(substance P, SP)和POMC不论在中枢还是在外周的靶器官都参与了应激性溃疡的形成。但目前对于二者在中枢与周围的作用并不明确,本研究的目的在于揭示二者在应激性溃疡形成过程中的作用方式,继续寻求应激性溃疡的神经内分泌紊乱的基础及针刺对其保护作用的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SD δ 大鼠22只(由中国人民解放军总医院实验动物中心提供),体质量 $200 \pm 50 \text{ g}$,动物随机分成正常对照组(6只)、单纯应激组(8只)、针刺预防应激组(8只),共3组。冷应激组只给与冷刺激;针刺预防组先给与针刺足三里穴1 wk,然后给与冷应激;正常对照组不给与任何刺激,与其他两组在相同条件下喂养。SD δ 大鼠禁食24 h,可自由饮水,活动不受限制。实验前1 h禁水。称质量,乙醚轻度麻醉,四肢束缚于特制木板上,待其清醒后,置于 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 冷室内,经过3 h,腺胃部出现点状出血与线状或直径为1-2 mm的表浅性圆形溃疡,即制成冷束缚应激性溃疡模型。

1.2 方法 将大鼠放置于特制的鼠笼内,双后肢充分暴露,根据中国针灸学会实验针灸研究会制定的“动物针灸穴位图谱”选取双侧足三里穴,每日上午9:00-10:00时给予电针刺激,每次30 min,持续1 wk。刺激仪选用WQ1002K型济生多用治疗仪。刺激参数:疏密波,频率2-20 Hz,起始强度为2 V,每刺激10 min强度增加1 V。将三组大鼠处置后立即断头,按大鼠脑解剖图谱取下丘脑和肾上腺,放入液氮冻存。同时取胃黏膜,采用Guth^[2]计算方法计算胃黏膜损伤指数:斑点糜烂计为1分;糜烂长度 $<1 \text{ mm}$ 计为2分;1-2 mm计为3分;2-3 mm计为4分; $>4 \text{ mm}$ 计为5分。

采用TRIzol的一步法提取。RNA的定量及纯度鉴定:取出适量RNA稀释成一定倍数(10倍),应用分光光度计内置的RNA测定程序,根据 A_{260} 的值计算RNA浓度,并根据 A_{260}/A_{280} 比值计算其

■ 相关报道

国内外众多的研究都已表明, SP和POMC不论在外周的靶器官还是在神经中枢内,均参与了应激性溃疡的形成。

■ 创新盘点

本研究从下丘脑-肾上腺-胃黏膜-外周血这一完整的应激过程中研究了SP及POMC的作用。

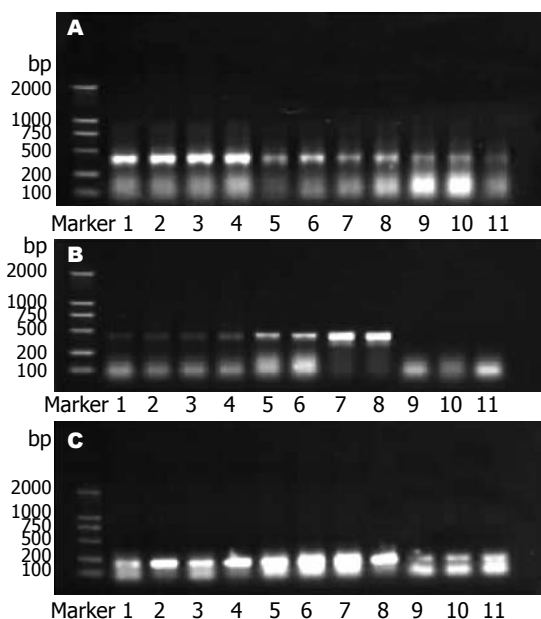


图1 针刺足三里穴对冷应激性胃溃疡大鼠下丘脑与肾上腺SP和POMC表达的影响。A: 下丘脑SP组; B: 肾上腺SP组; C: 肾上腺POMC组; 1-4: 针刺预防应激组; 5-8: 单纯应激组; 9-11: 正常对照组。

纯度, 要求为1.8-2.0。比值低于1.7者弃去。

RT-PCR: 取20 μg 总RNA逆转录合成cDNA, 逆转录体系共40 μL , 包括: Oligo dT1.5 μL , 25 mmol的dNTPs 2 μL , 加DEPC水至26 μL 混匀, PCR仪中加热至65 $^{\circ}\text{C}$ 持续5 min, 然后取出置于冰上, 离心30 s加入5 \times buffer 8 μL , 0.1 mmol DTT 4 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min后加Superscript II 逆转录酶各2 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 加热45 min, 75 $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min以灭活逆转录酶, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR反应步骤: 每个反应体系共30 μL , 包括: 10 \times buffer 3 μL , dNTPs (2.5 mmol) 1.8 μL , sense primer(10 mmol/L) 1.2 μL , antisense primer(10 mmol/L) 1.2 μL , cDNA(per) 2 μL , MilliQ H₂O 20.3 μL 。反应体系预变性5 min, 加入Taq酶 0.5 μL , 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 复性30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min, SP和POMC均为32个循环。大鼠组织中的SP的引物序列为: rSP-sense: 5' \rightarrow CCC GAG CCC TTT GAG CAT<3'; rSP-Antisense: 5' \rightarrow CTG AGG AGG TCA CCA CAT<3'; 扩增片段长度为453 bp; rPOMC-sense: 5' \rightarrow TCA CCA CGG AAA GCA ACC<3', rPOMC-Antisense: 5' \rightarrow TCT TCC TCC GCA CGC CTC TG<3', 扩增片段长度为208 bp; 扩增对照选用 β -actin, 引物序列为5' \rightarrow AAC CCT AAG GCC AAC CTG GAA AAG<3'和5' \rightarrow TCG TGA GGT AGT CTG TCA GGT<3', 扩增片段长度为241 bp。用RT-PCR方法分别扩增POMC、SP及内参 β -actin基因。PCR扩增用20 g/L琼脂糖凝胶电泳,

溴化乙锭染色显示, 用凝胶图像分析系统进行照相。取电泳凝胶的底片, 应用Image-pro-plus图像分析系统分析进行光密度扫描, 以目的基因光密度值与内参照基因光密度值的比值作为该样品中目的基因的相对转录量。最后以目的基因的相对转录量为参数进行统计分析, 对图片进行半定量研究。

放射免疫分析法观察血浆皮质醇含量的测定: 测定大鼠颈动脉血的皮质醇含量, 放免试剂盒由北京北方生物技术研究生产。

统计学处理 采用SPSS10.0软件包进行统计分析及作图, 溃疡指数计算采用mean \pm SD表示, 结果应用均数的 t 检验。RT-PCR数据采用ANOVA单因素方差分析。

2 结果

单纯应激组指数计算结果为26.25 \pm 4.40, 针刺预防溃疡组的指数为9.75 \pm 1.91, 正常对照组指数为0。针刺预防溃疡组与单纯应激组相比 $P<0.01$, 统计学差异极显著。

2.1 SP mRNA的表达 下丘脑SP mRNA的表达: 对3组实验结果的半定量分析结果表明: 针刺预防应激组下丘脑SP mRNA表达与 β -actin mRNA的吸光度比值(A 比值)为1.02 \pm 0.42; 单纯应激组 A 比值为0.45 \pm 0.12; 正常对照组 A 比值为0.38 \pm 0.05; 针刺预防应激组与正常对照组相比, 有统计学差异($P<0.05$); 针刺预防应激组与单纯应激组相比也有统计学差异($P<0.05$); 应激组与正常对照组相比, 无统计学差异($P>0.05$, 图1A)。

肾上腺SP mRNA的表达: 针刺预防应激组 A 比值为1.88 \pm 0.82; 单纯应激组 A 比值为2.93 \pm 1.08; 正常对照组的 A 比值为1.08 \pm 0.44; 其中, 针刺预防应激组与单纯应激组相比, 有统计学差异($P<0.05$); 应激组与正常对照组相比, 有显著统计学差异($P<0.01$); 针刺预防应激组与正常对照组相比无统计学差异($P<0.01$, 图1B)。

2.2 POMC mRNA的表达 下丘脑POMC mRNA的表达: 针刺预防应激组大鼠下丘脑的POMC mRNA A 比值为0.56 \pm 0.14; 单纯应激组 A 比值为0.82 \pm 0.19; 正常对照组 A 比值为0.40 \pm 0.11; 针刺预防应激组与单纯应激组相比有显著统计学差异($P<0.01$); 单纯应激组与正常对照组相比有极显著差异($P<0.001$); 针刺预防应激组与正常对照组相比无统计学差异($P>0.05$, 图1C)。肾上腺POMC mRNA的表达: 有统计学差异。

2.3 血浆皮质醇含量变化结果(nmol/L) 单纯应激组皮质醇含量为104.38 \pm 8.31; 针刺预防应激组

为 66.83 ± 12.25 ; 正常对照组为 79.1 ± 11.07 . 针刺预防应激组与单纯应激组相比统计学差异显著($P < 0.001$). 针刺预防应激组与正常对照组相比有统计学差异($P < 0.05$); 单纯应激组与正常对照组相比有显著差异($P < 0.001$).

3 讨论

SP作为重要的脑肠肽之一, 在中枢神经系统和胃肠道中均有广泛的分布, 他不仅存在于内分泌和旁分泌细胞, 发挥激素和局部递质作用, 也存在于内源性和外源性神经元, 起到神经递质的作用. SP在周围主要位于免疫功能重要的地方, 如皮肤、胃肠道及呼吸道. SP的生理作用是广泛而多样的, 他不但参与伤害性信息的传递, 而且在外周释放后可使血管扩张, 增加血流量及血管通透性, 使血浆蛋白外渗, 引起神经源性炎症反应, 并与免疫调节及营养防御有密切关系^[3].

SP在消化系统主要是兴奋性肽能神经递质, 可引起下食管括约肌(lower esophageal sphincter, LES)收缩. 有研究表明, 反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)患者LES局部组织内的SP明显低于对照组, 提示SP参与了LES运动功能的调节并对LES起到了保护作用^[4]. 水浸束缚应激可引起大鼠胃酸分泌增加, 应激1、2、4 h组壁细胞呈现泌酸活跃状态, 并与胃黏膜损伤程度有明显相关性. 提示胃酸在应激性溃疡的发生发展过程中具有重要意义^[5].

用盐酸刺激胃后, 可以导致大多数肠肌层抑制性运动神经元(使肌肉舒张)的活化, 这些神经元的活化部分是由辣椒素敏感的感觉传入神经纤维介导的^[6]. 有人在研究西曲酸酯治疗胃溃疡的机理时发现, 该药 po 后能刺激感觉传入纤维释放降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)和SP及提高胃黏膜局部血流量. 服药后40-90 min能够提高血浆中SP的浓度, 提示SP参与了胃黏膜的保护机制^[7]. 在研究生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α)对酒精所致的胃黏膜损害的保护作用发现, 该因子的保护作用亦通过感觉神经的激活和感觉神经肽CGRP的释放实现的, 而另一种感觉神经肽SP则与该种保护作用无关^[8].

高巍 *et al* 研究证明针刺足三里穴通过刺激机体合成和释放SP增多而达到对胃肠道免疫的调节, 从而实现对胃肠道疾病及功能的调整作用, 并通过淋巴系统从另一方面达到对全身免疫系统的正向调节作用^[9].

我们的研究结果显示: 在冷束缚应激过程中, 下丘脑的SP表达并没有明显增强, 与正常对照组见的比较未见统计学差异. 而针刺足三里穴却明显增加了下丘脑SP的表达, 说明SP在下丘脑不参与应激性溃疡这一病理过程, 而是参与了针刺反应, 这可能是针刺足三里穴能够提高机体免疫力的又一个佐证.

肾上腺的神经支配来自胸8-11的交感节前纤维, 经内脏大、小神经抵达肾上腺, 肾上腺接受广泛的非经典递质: NO、NPY、CGRP、SP神经支配, 表明肾上腺的神经支配, 尤其是肽能神经支配十分丰富. 我们的实验也证明了肾上腺确实接受SP的支配. 且SP参与了应激性溃疡这一病理过程. 冷应激可以使肾上腺上SP的表达明显升高, 针刺足三里后, 可以减低肾上腺SP因为冷应激而造成的表达增高. 说明了针刺可以下调SP的病理性反应增高对机体造成的损伤, 对其抑制作用可以有效地保护胃黏膜因应激而造成的损伤. 本实验结果也证明了在中枢神经系统, 尤其是下丘脑, 和在外周肾上腺SP的作用是不相同的, 这与SP的作用方式和作用机制有关.

目前, 有关 β -内啡肽与应激的关系研究颇多, 报道的结果也不尽相同. Holtt *et al* 报道用间歇性足底电休克应激3 d后可以使垂体前叶POMC mRNA水平增加近2倍, 同样处理7 d后仍可见其升高, 但对垂体中叶的POMC mRNA水平无显著影响. Hanger研究组发现, 急性冷暴可促进垂体中叶POMC mRNA的表达, 慢性冷暴则相反, 使中叶的POMC mRNA表达水平降低.

现代研究证明, 内源性阿片肽分布于几乎整个胃肠道, 主要为甲啡肽和亮啡肽, 存在于胃肠道壁内神经、平滑肌和分泌细胞中. β -内啡肽在胃肠道内含量较低, 主要存在于分泌细胞中. 陈佩杰 *et al* 研究发现, 给与大鼠6 wk过度负荷的训练后, 下丘脑、垂体、外周血3个水平上神经肽的变化是不一致的, 下丘脑和外周血中 β -内啡肽含量明显升高^[10], 与颜军 *et al*^[11]通过冷应激训练得到的结果一致, 提示由于过度负荷造成上述神经肽在合成、储存、运输和释放等众多环节上出现不协调. 除参与应激时对疼痛、情绪、胃肠黏膜的调节外, β -内啡肽还参与应激时对血糖的调节^[12].

实验中, 采用止血带压迫肢体局部, 造成组织局部缺血, 研究在不同的乳酸盐和剩余碱浓度下, 外周组织的POMC的释放情况. 实验结果显示, 在缺血应激的第一时间, 就有非垂体组织的 β -内啡肽免疫复合物的释放^[13].

■应用要点

本研究为临床治疗应激性溃疡提供了理论基础, 同时也为临床治疗应激性溃疡提供新的方向.

■同行评价

本文内容新颖, 科学性较好, 讨论条理分明, 具有较好的学术价值。

本实验的研究结果表明, 下丘脑内的 β -内啡肽参与了对冷应激溃疡的反应: 单纯的冷应激可以造成下丘脑 β -内啡肽表达的明显增高, 针刺足三里穴后可以使冷应激造成的 β -内啡肽表达增高得到有效的抑制。已有研究证明电针足三里穴还能够使慢性应激致疲劳大鼠下丘脑内升高的 β -内啡肽含量趋于正常, 从而减轻 β -内啡肽对应激所致疲劳后脑组织的损伤, 起到调节心理-神经-免疫网络和对慢性疲劳综合征治疗的作用^[14], 这与我们的实验结果是相符合的。有研究显示中枢或外周给与脑啡肽的类似物, 可以减轻大鼠的应激性胃溃疡, 中枢给与 β -内啡肽也有该种保护作用。这一结果与我们所得到的结果不一致, 分析原因可能为机体对于急性应激和慢性应激的反应程度不一致造成的。在一定的范围内, β -内啡肽的反应性增高是机体对伤害性刺激和病理过程的一种保护性反应, 但是当伤害的程度超过了机体所能够防御的范围, 机体的过于强烈的反应也就成为了机体的损伤因素。另一方面, 外源性的 β -内啡肽和机体自身合成的内源性的 β -内啡肽的作用也可能是不同的, 因为外源性的 β -内啡肽也要通过内源性的受体才能发挥作用, 在受体无明显增加或减少的情况下, 外源性 β -内啡肽对机体影响的机制是不可能完全一致的, 可能还有其他肽类、递质及受体的参与。有研究表明在整个应激过程中, 大鼠血浆及胃黏膜中 β -内啡肽含量稳定不变, 提示外周 β -内啡肽在应激过程中不起重要作用^[15]。本研究也从周围的角度观察了 β -内啡肽在应激性溃疡过程中的表达, 得到了同样的结果: β -内啡肽在肾上腺上无表达, 说明肾上腺上无 β -内啡肽的分布和支配, 当然与机体的应激过程无关。

致谢: 本研究过程得到了中国人民解放军总医院内分泌实验室主任母义明教授的亲自指导及协助, 并在研究过程中得到田庆华和郑一博士的帮助, 在此表示衷心感谢。

4 参考文献

1 Sun JP, Pei HT, Jin XL, Yin L, Tian QH, Tian

- SJ. Effects of acupuncture Tsusanli (ST36) on expression of nitric oxide synthase in hypothalamus and adrenal gland in rats with cold stress ulcer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4962-4966
- 2 Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979; 76: 88-93
- 3 贵宝, 孙晋浩, 刘执玉. CGRP及SP在炎症过程中对细胞增殖及组织修复的影响. *解剖科学进展* 2002; 8: 82-87
- 4 夏金荣, 张忠兵, 汪毅, 纓才良, 沈琰, 孔梅, 汤永祥. NO、VIP和SP在反流性食管炎中的病理生理学作用. *临床消化病杂志* 2002; 14: 198-200
- 5 李玉梅, 邹晓平, 李兆申, 彭贵勇, 湛先保, 屠振兴, 房殿春, 许国铭. 应激性溃疡时大鼠胃壁细胞功能及超微结构的动态变化. *中国病理生理杂志* 2003; 19: 1058-1061
- 6 Schicho R, Schemann M, Pabst MA, Holzer P, Lippe IT. Capsaicin-sensitive extrinsic afferents are involved in acid-induced activation of distinct myenteric neurons in the rat stomach. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 33-44
- 7 Katagiri F, Sato Y, Itoh H, Takeyama M. Cetraxate raises levels of calcitonin gene-related peptide and substance P in human plasma. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 557-561
- 8 Vongthavaravat V, Mesiya S, Saymeh L, Xia Y, Harty RF. Mechanisms of transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) induced gastroprotection against ethanol in the rat: roles of sensory neurons, sensory neuropeptides, and prostaglandins. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 329-333
- 9 高巍, 黄裕新, 陈洪, 赵宁侠, 王庆莉, 秦明, 张洪新. 电针足三里对大鼠ir-SP及细胞免疫的影响. *第四军医大学学报* 2001; 22: 793-796
- 10 陈佩杰, 李红武, 徐锋鹏, 任杰, 庞洁. 6周不同负荷训练后大鼠下丘脑、垂体和血浆 β -内啡肽、强啡肽A1-13、精氨酸加压素以及缩宫素的变化. *中国运动医学杂志* 1999; 18: 36-38
- 11 颜军, 金其贯, 顾晓明. 运动训练对大鼠中枢和外周 β -内啡肽含量的影响. *体育与科学* 2001; 22: 58-64
- 12 张向晖, 蔡伟雄. β -内啡肽、神经肽Y对慢性应激下STZ鼠血糖水平的影响. *中国医师杂志* 2001; 3: 659-661
- 13 Matejec R, Schulz A, Harbach HW, Uhlich H, Hempelmann G, Teschemacher H. Effects of tourniquet-induced ischemia on the release of proopiomelanocortin derivatives determined in peripheral blood plasma. *J Appl Physiol* 2004; 97: 1040-1045
- 14 孟宏, 王京京, 姜亨圭, 林磊, 时宇静, 图娅. 电针对慢性应激致疲劳模型大鼠下丘脑 β -内啡肽的影响. *针灸临床杂志* 2003; 19: 59-60
- 15 邹晓平, 雷银雪, 刘枫, 李兆申, 许国铭. 血浆及胃粘膜中 β -内啡肽在大鼠应激性溃疡中的变化极作用. *胃肠病学* 2000; 5: 229-239

编辑 潘伯荣 电编 吴鹏朕

荧光原位明胶酶谱法对肝组织明胶酶活性的检测

陈倩, 沈丽, 何琦麟, 陶艳艳, 刘成海

陈倩, 沈丽, 何琦麟, 陶艳艳, 刘成海, 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所 上海市 201203

刘成海, 上海高校中医内科学E-研究院 上海市 201203
陈倩, 博士在读, 主要从事中医药抗肝纤维化的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30772869

作者贡献分布: 此课题由刘成海设计; 研究过程由陈倩, 沈丽, 何琦麟及陶艳艳操作完成; 图片分析由陈倩和刘成海完成; 本论文写作由陈倩, 刘成海及陶艳艳完成。

通讯作者: 刘成海, 201203, 上海市浦东新区蔡伦路1200号, 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所。

chenghai_liu@yahoo.com.cn

电话: 021-51328888-8111 传真: 021-51328500

收稿日期: 2007-12-04 修回日期: 2008-04-07

Detection for gelatinase activity of liver using fluorescent *in situ* zymography

Qian Chen, Li Shen, Qi-Lin He, Yan-Yan Tao, Cheng-Hai Liu

Qian Chen, Li Shen, Qi-Lin He, Yan-Yan Tao, Cheng-Hai Liu, Liver Disease Institute, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Cheng-Hai Liu, E-institute of Traditional Chinese Medicine Internal Medicine, Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 201203, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772869

Correspondence to: Dr. Cheng-Hai Liu, Liver Disease Institute, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Cailun Road, Pudongxin District, Shanghai 201203, China. chenghai_liu@yahoo.com.cn

Received: 2007-12-04 Revised: 2008-04-07

Abstract

AIM: To establish fluorescent *in situ* zymography for gelatinase activity of liver and observe the feature of gelatinase activity in liver tissues with fibrosis and acute injury.

METHODS: Hepatic fibrosis of rats was induced by administration of dimethylnitrosamine (DMN) intraperitoneally and acute liver injury of mice by injection of GalN and lipopolysaccharide (LPS) intraperitoneally. Gelatin substrate of green fluorescence was mounted on cryostat sections of liver tissues from the above two models, incubated for 8-24 h, and then the nuclei were counterstained with Hoechst. The green fluo-

rescence of gelatinase and blue fluorescence of nuclei were observed under fluorescence microscope, and the images were overlapped.

RESULTS: Fluorescent *in situ* zymography for gelatinase activity was established successfully. With this method, a low level of gelatinase activity was detected in the sinus hepaticus of normal liver sections; however, it was enhanced in the sinus hepaticus of liver sections with fibrosis and acute injury. Gelatinase activity in the fibrous septum of liver fibrosis sections was strong.

CONCLUSION: Fluorescent *in situ* zymography is sensitive, directviewing and convenient in the detection of gelatinase activity level and position and of great significance for the studies on pathology and pharmacology of liver.

Key Words: Gelatinase activity; Fluorescent *in situ* zymography; Liver

Chen Q, Shen L, He QL, Tao YY, Liu CH. Detection for gelatinase activity of liver using fluorescent *in situ* zymography. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1607-1611

摘要

目的: 建立荧光原位明胶酶谱法, 观察纤维化和急性损伤肝组织明胶酶活性表达特点。

方法: 复制二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化模型与N-乙酰半乳糖胺/脂多糖急性肝损伤模型, 取其肝组织冰冻切片, 将绿色荧光明胶底物附着于肝组织冰冻切片上, 置于酶反应缓冲液中避光孵育8-24 h; 再以Hoechst液复染细胞核, 在荧光显微镜下分别以蓝光激发拍摄明胶酶绿色荧光和紫光激发拍摄细胞核蓝色荧光, 并将图像重叠。

结果: 成功建立荧光原位明胶酶谱法。正常大鼠肝组织仅在肝窦周围少量明胶酶表达, 纤维化及急性肝损伤肝组织肝窦处明胶酶活性增强, 纤维化肝组织纤维间隔处明胶酶活性也较强。

结论: 荧光原位明胶酶谱法具有灵敏、直观,

■背景资料

MMPs是参与细胞外基质降解的主要酶家族, 根据其功能特点和底物特异性, 分为间质性胶原酶、基底膜性胶原酶、溶基质素、膜型基质金属蛋白酶和金属弹力蛋白酶5大类。明胶酶是其中重要的一类, 他主要有两种形式, 一种被糖化, 分子量为92 kDa, 命名为MMP-9; 另一种非糖化, 分子量为72 kDa, 被称为MMP-2。MMP-2/9主要参与IV型胶原、明胶和V型胶原等的降解代谢, 在组织炎症、纤维化与肿瘤转移等诸多病理过程中发挥重要作用, 因此对明胶酶活性进行分析具有重要意义。组织明胶酶活性检测方法有很多种, 其中明胶酶谱法最为常用。

■同行评议者

姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

■相关报道

1994年Kleiner *et al*建立的明胶酶谱法是一种基于SDS-PAGE电泳和反相凝胶染色的蛋白酶检测方法,其原理在于:含明胶酶的样本可分解凝胶中的底物明胶,电泳后进行显色、脱色后可见蓝色背景下的白色条带。

简便的优点,可较好分析肝组织明胶酶活性水平与表达位置,对研究肝脏病理与药理具有重要意义。

关键词: 明胶酶活性; 荧光原位明胶酶谱法; 肝脏

陈倩, 沈丽, 何琦麟, 陶艳艳, 刘成海. 荧光原位明胶酶谱法对肝组织明胶酶活性的检测. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1607-1611

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1607.asp>

0 引言

明胶酶, 亦称IV型胶原酶^[1]、基膜性胶原酶^[2]等, 属于基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的一种, 即MMP-2/9, 主要参与IV型胶原、明胶和V型胶原等的降解代谢, 在组织炎症、纤维化与肿瘤转移等诸多病理过程中发挥重要作用^[2-7]. 因而分析明胶酶的功能变化即其活性水平, 对于诸多疾病的病理机制、药物作用机制等的研究具有重要意义. 组织明胶酶活性测定有多种方法, 近期我们利用荧光标记的明胶底物, 改良酶底物反应方法, 成功原位检测肝组织明胶酶表达位置与活性水平, 用于急性肝损伤与肝纤维化的病理研究。

1 材料和方法

1.1 材料 EnzChek明胶酶检测试剂盒, 购自Molecular Probes公司. 包括: DQ-明胶(dye-quenched-gelatin)(1 mg×5支), 10×反应液(50 mL, 含0.5 mol/L Tris-HCl, 1.5 mol/L NaCl, 50 mmol/L CaCl₂, 2 mmol/L Sodium azide, pH7.6), IV型胶原酶(500 U), NaCl, 分析纯; KCl, 分析纯; KH₂PO₄, 分析纯; Na₂HPO₄·12H₂O, 分析纯; 琼脂糖凝胶, 均购自上海国药集团. Hoechst染色液, 购自Beyotime公司. 荧光显微镜为Olympus公司生产。

1.2 方法

1.2.1 配制溶液: PBS缓冲液由NaCl 40.9 g, KCl 1.0 g, KH₂PO₄ 1.35 g, Na₂HPO₄·12H₂O 14.35 g, ddH₂O定容至5000 mL, pH: 7.3-7.4; 1×反应液: 取10×反应液2 mL, 加18 mL ddH₂O配制成20 mL, 充分混匀; 1 mg/mL DQ-明胶: 1 mg DQ明胶溶解于1 mL H₂O中, 充分混匀, 配制成1 mg/mL浓度的DQ-明胶。

1.2.2 制模: (1)肝纤维化模型: Wistar δ 大鼠16只, SPF级, 体质量160±10 g, 中科院上海实验动物中心提供, 饲养于上海中医药大学实验动物中心. 随机分为正常组(8只), 模型组(8只). 采取

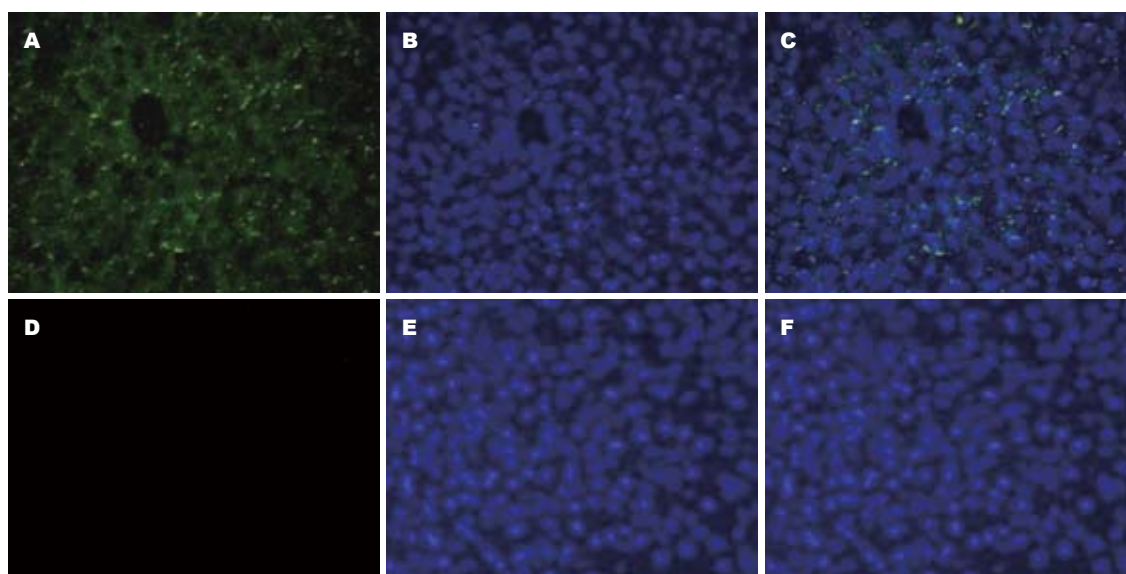
ip DMN 10 μg/kg, 隔天1次, 连续4 wk, 共14次. 正常组注射等量生理盐水. (2)急性肝损伤模型: BABL/c δ 小鼠20只, SPF级, 体质量22-24 g, 购自中国人民解放军第二医科大学, 饲养于上海中医药大学实验动物中心, 自由饮食. 随机分成正常组(10只), 模型组(10只). 参照文献[8], 以N-乙酰半乳糖胺(N-acetylgalactosamine, GalN)900 mg/kg和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)10 μg/kg小鼠体质量的剂量, ip模型组小鼠, 诱导急性肝损伤. 正常组ip以等量生理盐水. 6 h后处死小鼠, 留取肝组织标本。

1.2.3 明胶酶活性测定: (1)制备肝组织冰冻切片, 厚度大约为6-8 μm. (2)称取1 g琼脂糖加入100 mL PBS中, 微波炉加热至琼脂糖充分溶解, 4℃放置备用. (3)使用前将10 g/L琼脂糖液置于恒温水浴箱中100℃温浴至液体析出, 吸取琼脂糖析出液于Eppendorf管中, 将1 kg/L DQ-明胶按1:10的比例溶解于10 g/L琼脂糖析出液中, 充分混匀. (4)每片肝组织切片滴加50 μL DQ-明胶/琼脂糖混合液, 4℃避光凝胶5 min. (5)将组织切片置于1×反应液中, 37℃避光孵育8-24 h(根据拍摄时荧光强弱调整孵育时间). (6)PBS充分洗涤, 5 min×3次. (7)每片组织切片滴加50 μL Hoechst复染细胞核, 室温避光静置10 min, PBS洗涤, 5 min×3次. (8)荧光显微镜下进行检测, 蓝色光激发拍摄明胶绿色荧光, 紫色光激发拍摄细胞核蓝色荧光, DP Controller软件拍摄. 以10 g/L琼脂糖液代替DQ-明胶/琼脂糖混合液作阴性对照^[9].

2 结果

2.1 正常肝组织明胶酶活性表达的拍摄与特点 蓝光激发后拍下绿色明胶荧光; 换成紫光激发, 同一视野拍摄蓝色染核荧光, 将两张图片重叠, 即可见肝组织明胶酶活性表达. 图1A依稀可见组织结构, 大部分为本底自发荧光, 较为黯淡, 明胶荧光呈较亮点状, 经重叠后的图1C可见本底自发荧光部分已被图1B中的细胞核覆盖, 只可见在肝窦部位表达的明胶荧光, 活性较微弱. 图1D-F为阴性对照, 未见任何绿色荧光, 可见此方法特异性强。

2.2 纤维化与急性肝损伤肝组织的明胶酶活性表达特点 正常大鼠仅少量散在荧光, 即肝窦周围少量活性明胶酶表达(图2A). 肝纤维化大鼠肝组织可见胶原纤维增生并形成纤维间隔, 绿色荧光布满整个纤维间隔, 与正常肝组织比较, 肝窦部位明胶酶活性增强, 荧光连成片状(图2B).



■应用要点
荧光原位明胶酶谱法具有灵敏、直观、简便的优点,可较好分析肝组织明胶酶活性水平与表达位置。

图 1 正常大鼠肝组织荧光原位明胶酶谱图(×200). A: 蓝色光激发后, 拍摄的明胶酶活性荧光; B: 紫色光激发后, 拍摄的核染荧光; C: 明胶酶活性检测(图A)与核检测图片(图B)重叠后; D: 阴性对照明胶酶活性荧光; E: 阴性对照核染荧光; F: 图D和图E重叠后。

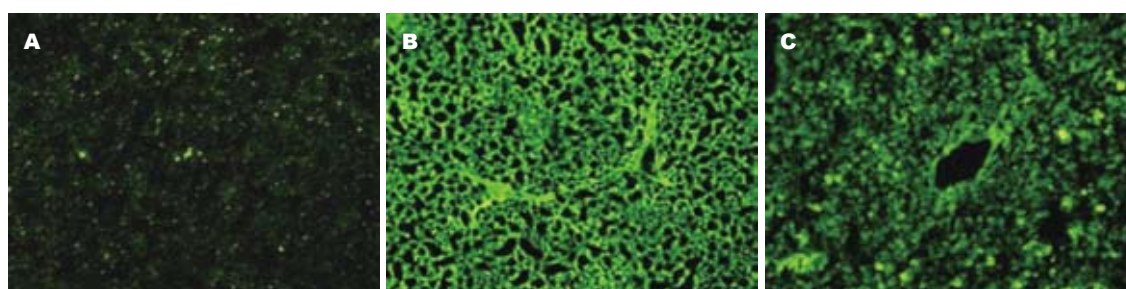


图 2 大鼠肝组织荧光原位明胶酶谱图(×100). A: 正常大鼠; B: 肝纤维化大鼠; C: 急性肝损伤小鼠。

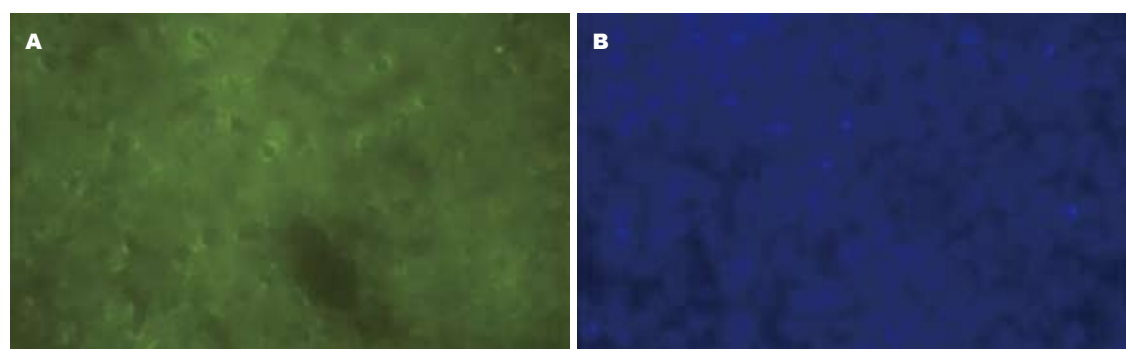


图 3 常见问题图例. A: 切片过厚; B: 荧光淬灭, 核弥散。

急性肝损伤小鼠肝组织的明胶酶也可见肝窦部位明胶酶活性增强, 但肝组织结构破坏, 荧光部分连接成片(图2C)。

2.3 常见问题及原因 实验中我们曾经为了更好的凸现明胶酶的荧光亮度, 试想增加切片的厚度, 但虽然有较好的荧光, 却由于组织过厚, 显微镜下观察出现双层组织而影响拍摄观察(图3A)。此外, 滴加Hoechst染细胞核后, 如果荧光显微镜下拍摄时间过长, 或其他原因放置时间过长, 荧

光已经淬灭, 拍摄的核出现弥散(图3B)。

3 讨论

MMPs是一族参与细胞外基质降解的主要水解蛋白酶^[10-11], 目前已发现25个成员, 根据其功能特点和底物特异性, 分为间质性胶原酶、基底膜性胶原酶、溶基质素、膜型基质金属蛋白酶和金属弹力蛋白酶5大类^[12-13]。自1962年发现MMPs以来, 其生理病理意义得到广泛研究, 目

■名词解释

明胶酶: 亦称IV型胶原酶、基膜性胶原酶等, 属于基质金属蛋白酶(MMPs)的一种, 即MMP-2/9, 主要参与IV型胶原、明胶和V型胶原等的降解代谢, 在组织炎症、纤维化与肿瘤转移等诸多病理过程中发挥重要作用。

前认为其在生长发育、环境诱导与疾病原因引起的组织生理适应与病理变化中均发挥重要作用^[14]。基底膜性胶原酶包括明胶酶A(MMP-2或称72 kDa IV型胶原酶)和明胶酶B(MMP-9或称92 kDa IV型胶原酶)^[15], 其作为MMPs的一类, 可降解IV型胶原等基底膜成分, 在肝脏炎症、纤维化、免疫、肿瘤转移等过程中均发挥着重要作用^[5,16-19]。在炎症损伤时, 基底膜破坏, 肝组织的稳态微环境破坏, 导致肝细胞凋亡^[20]、肝星状细胞活化^[21]、肿瘤细胞转移等诸多病理变化, 有研究表明, MMP-2/9活性与肿瘤预后明显相关, 我们也发现MMP-2/9活性增加与肝细胞凋亡、肝纤维化发生显著相关。

目前明胶酶活性检测方法包括明胶酶谱法、荧光明胶酶谱法、原位明胶酶谱法, 其中明胶酶谱法最为常用^[22-24]。1994年Kleiner *et al*^[25]建立的明胶酶谱法是一种基于SDS-PAGE电泳和反相凝胶染色的蛋白酶检测方法, 其原理在于: 含明胶酶的样本可分解凝胶中的底物明胶, 电泳后进行显色、脱色后可见蓝色背景下的白色条带; 其具有以下特点: 半定量分析MMPs活性, 可区分酶原和活化型酶两种形式。而后Molecular Probes公司2001年推出EnzChek荧光明胶酶检测试剂盒, 用荧光胶体耦连物代替普通明胶, 明胶酶分解荧光明胶, 释放荧光肽, 荧光的增加与明胶酶的活性成正比。该方法比普通明胶酶谱法更为方便和直观, 但缺点在于要经组织匀浆或血清分离等过程, 容易导致蛋白降解及部分酶活性丢失; 无法进行组织定位观察^[26]。

MMP-2/9活性定位检测具有重要意义。肝组织结构复杂, 具有多个功能结构区域, 如肝窦、肝小叶等^[27], 病变时常有不同部位的病理变化, 如出现纤维间隔与假小叶等^[28]。因此观察特定部位的MMP-2/9活性变化及其组织结构破坏, 对于肝脏病理机制与药效作用研究等均具有重要意义^[29-30]。而原位酶谱法在冰冻组织切片上进行酶谱分析, 可组织定位, 既综合了上述两种方法的优点, 又克服了形态定位缺乏之不足。实验中我们取荧光明胶酶谱法的直观与原位明胶酶谱法的定位优点, 将这两种方法相结合并进行改良, 利用荧光明胶底物, 成功进行荧光原位明胶酶谱法检测, 组织切片上各部位明胶酶的活性一目了然, 对研究肝脏组织病理等具有重要意义。该方法具有灵敏, 直观, 简便的特点, 但需要注意组织放血或冲洗干净, 冰冻切片应低温保存; 制

片厚薄适中、琼脂糖胶的浓度一定要适当, 过稀无法粘住在切片上, 过稠则粘得太牢, 妨碍显微镜下观察。孵育时注意避光, Hoechst显色后注意避光, 尽快拍摄。同时实验时需要设立阴性对照, 防止假阳性。注意复染与图像重叠等, 以便清晰的显示组织结构。

此外, 本实验发现, 正常大鼠仅少量散在荧光, 即肝窦周围少量活性明胶酶表达。肝纤维化大鼠肝组织可见胶原纤维增生并形成纤维间隔, 绿色荧光布满整个纤维间隔, 与正常肝组织比较, 肝窦部位明胶酶活性增强, 荧光连成片状。急性肝损伤小鼠肝组织的明胶酶也可见肝窦部位明胶酶活性增强, 但肝组织结构破坏, 荧光部分连接成片。即不同的肝脏病变其明胶酶活性与组织病变等具有不同的特点。

4 参考文献

- 1 Hrabec E, Naduk J, Strek M, Hrabec Z. Type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) and their substrates--intracellular proteins, hormones, cytokines, chemokines and their receptors. *Postepy Biochem* 2007; 53: 37-45
- 2 Cheng S, Pollock AS, Mahimkar R, Olson JL, Lovett DH. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *FASEB J* 2006; 20: 1898-1900
- 3 Le NT, Xue M, Castelnoble LA, Jackson CJ. The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. *Front Biosci* 2007; 12: 1475-1487
- 4 Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 2007; 46: 955-975
- 5 Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 9-34
- 6 Baraldo S, Bazzan E, Zanin ME, Turato G, Garbisa S, Maestrelli P, Papi A, Miniati M, Fabbri LM, Zuin R, Saetta M. Matrix metalloproteinase-2 protein in lung periphery is related to COPD progression. *Chest* 2007; 132: 1733-1740
- 7 Arthur MJ. Fibrosis and altered matrix degradation. *Digestion* 1998; 59: 376-380
- 8 晏春根, 谢青, 周霞秋, 徐玉敏, 俞红, 郭清. Toll样受体4在D-氨基半乳糖/内毒素介导的急性肝损伤中的表达. *中华传染病杂志* 2004; 22: 189-192
- 9 Brassart B, Fuchs P, Huet E, Alix AJ, Wallach J, Tamburro AM, Delacoux F, Haye B, Emonard H, Hornebeck W, Debelle L. Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276: 5222-5227
- 10 Vempati P, Karagiannis ED, Popel AS. A biochemical model of matrix metalloproteinase 9 activation and inhibition. *J Biol Chem* 2007; 282: 37585-37596
- 11 Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007; 26:

- 587-596
- 12 Wielockx B, Lannoy K, Shapiro SD, Itoh T, Itohara S, Vandekerckhove J, Libert C. Inhibition of matrix metalloproteinases blocks lethal hepatitis and apoptosis induced by tumor necrosis factor and allows safe antitumor therapy. *Nat Med* 2001; 7: 1202-1208
- 13 Das S, Mandal M, Chakraborti T, Mandal A, Chakraborti S. Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview. *Mol Cell Biochem* 2003; 253: 31-40
- 14 Ethell IM, Ethell DW. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neurosci Res* 2007; 85: 2813-2823
- 15 Ye HQ, Azar DT. Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 913-921
- 16 Reif S, Somech R, Brazovski E, Reich R, Belson A, Konikoff FM, Kessler A. Matrix metalloproteinases 2 and 9 are markers of inflammation but not of the degree of fibrosis in chronic hepatitis C. *Digestion* 2005; 71: 124-130
- 17 Li J, Leschka S, Rutschow S, Schwimbeck PL, Husmann L, Noutsias M, Westermann D, Poller W, Zeichhardt H, Klingel K, Tschope C, Schultheiss HP, Pauschinger M. Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine myocarditis. *Eur J Pharmacol* 2007; 554: 60-68
- 18 Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 717-724
- 19 Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1705: 69-89
- 20 Olle EW, Ren X, McClintock SD, Warner RL, Deogracias MP, Johnson KJ, Colletti LM. Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2006; 44: 540-549
- 21 Chong LW, Hsu YC, Chiu YT, Yang KC, Huang YT. Anti-fibrotic effects of thalidomide on hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2006; 13: 403-418
- 22 Frederiks WM, Mook OR. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 711-722
- 23 Cheng XC, Fang H, Xu WF. Advances in assays of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2008; 23: 154-167
- 24 Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005; 38: 73-83
- 25 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994; 218: 325-329
- 26 Yoshida T, Adachi E, Nigi H, Fujii S, Yanagi M. Changes of sinusoidal basement membrane collagens in early hepatic fibrosis induced with CCl₄ in cynomolgus monkeys. *Pathology* 1999; 31: 29-35
- 27 Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* 2005; 33: 27-34
- 28 Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007; 47: 598-607
- 29 Han YP. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S88-S91
- 30 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 443-453

■同行评价

本文内容新颖, 质量较好, 对研究肝脏病理与药理具有重要意义。

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 2008-05-28)

^1H -MRS在鉴定大鼠非酒精性脂肪肝模型构建中的作用

刘再毅, 梁长虹, 王秋实, 刘于宝, 徐莉, 郑君惠

■背景资料

随着饮食结构的改变, 非酒精性脂肪肝(NAFL)的发病率逐渐增高。众多学者构建了NAFL动物模型来研究其发病机制和评价治疗效果。过去判断构建模型是否成功依赖于病理学检查, 具有一定的局限性, 因此需要发展可以在体、无创的分析方法来判定是否构建模型成功。

刘再毅, 梁长虹, 王秋实, 刘于宝, 徐莉, 郑君惠, 广东省人民医院放射科 广东省广州市 510080
刘再毅, 2004年四川大学华西医学中心博士, 副主任医师, 主要从事腹部影像诊断及分子影像的研究。
中国博士后科学基金资助项目, No. 20070410816
广东省医学科学技术研究基金项目资助, No. A2005018, No. B2007003
广东省科技计划项目, No. 2005B10401040
作者贡献分布: 此课题由刘再毅, 梁长虹及王秋实设计; 研究过程由刘再毅, 王秋实, 刘于宝, 徐莉及郑君惠完成; 数据分析由刘再毅完成; 本论文写作由刘再毅及梁长虹完成。
通讯作者: 梁长虹, 510080, 广东省广州市, 广东省人民医院放射科. dr_liang62@hotmail.com
电话: 020-83870125 传真: 020-83870125
收稿日期: 2007-11-21 修回日期: 2008-02-23

Evaluation of nonalcoholic fatty liver model in rats using ^1H magnetic resonance spectroscopy

Zai-Yi Liu, Chang-Hong Liang, Qiu-Shi Wang,
Yu-Bao Liu, Li Xu, Jun-Hui Zheng

Zai-Yi Liu, Chang-Hong Liang, Qiu-Shi Wang, Yu-Bao Liu, Li Xu, Jun-Hui Zheng, Department of Radiology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
Supported by: the China Postdoctoral Science Foundation, No.20070410816; the Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province, No. A2005018, and No. B2007003; and the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, No.2005B10401040
Correspondence to: Chang-Hong Liang, Department of Radiology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. dr_liang62@hotmail.com
Received: 2007-11-21 Revised: 2008-02-23

Abstract

AIM: To investigate the use of ^1H magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS) in the evaluation of nonalcoholic fatty liver model in rats.

METHODS: Nonalcoholic fatty liver disease model in Wistar rats ($n = 24$) was induced with high-fat diet. Eight rats fed with normal diet were used as controls. ^1H -MRS was performed to confirm fatty liver at 0, 4, 8 and 12 wk. Degrees of fatty liver were evaluated pathologically. Blood of the rats were collected before sacrifice to analyze the liver function and serum alanine

aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C).

RESULTS: Mild fatty liver was observed at 4 wk with predominantly microvesicular steatosis. The degree of fatty liver progressed with the time, and moderate to severe fatty liver was induced at 12 wk. Except for 1 rat at 4 wk, fatty liver was successful induced in the rest 23 rats (grade 1 in 3, grade 2 in 14 and grade 3 in 6 rats according to the pathological grading system). Liver index, liver function and serum TC, TG and HDL-C were higher in experiment group than those in control group. Relative liver fat content measured by ^1H -MRS in control group was $13.0\% \pm 7.1\%$, lower than 21%, and it was $56.7\% \pm 16.4\%$ in experiment group, higher than 28%. There was significant difference between the above groups ($t = 5.78$, $P < 0.001$).

CONCLUSION: Nonalcoholic fatty liver model can be induced with high-fat and high-cholesterol diet in rats, and ^1H -MRS can be used to evaluate the fatty liver noninvasively.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver; ^1H magnetic resonance spectroscopy; Rat

Liu ZY, Liang CH, Wang QS, Liu YB, Xu L, Zheng JH. Evaluation of nonalcoholic fatty liver model in rats using ^1H -proton magnetic resonance spectroscopy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1612-1616

摘要

目的: 探讨 ^1H -MRS在鉴定大鼠非酒精性脂肪肝模型建立中的作用。

方法: 以高脂高胆固醇饮食喂养Wistar大鼠($n = 24$)构建非酒精性脂肪肝模型, 正常饮食喂养大鼠($n = 8$)作为对照组。使用 ^1H -MRS第0、4、8和12周检查肝脏的脂肪含量, 并对肝组织进行脂肪肝病理分析。在处死大鼠前收集大鼠血液作血清ALT、AST、TC、TG和HDL-C分析。

结果: 大鼠肝细胞内从第4周即出现脂滴空泡,

■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

程度较轻, 以小泡性脂滴为主, 随着时间的增加, 脂肪肝程度明显加重, 第12周时多为中重度脂肪肝, 细胞内出现较多大泡性脂滴空泡. 24只实验大鼠中, 除1只在第4周时未造模成功外, 其他均造模成功, 按照病理分级, 1级3只, 2级14只, 3级6只. 实验组肝指数、肝功能及血脂检查均高于对照组. 使用 ^1H -MRS分析, 对照组的脂肪相对含量为 $13.0\% \pm 7.1\%$, 均小于21%, 实验组平均 $56.7\% \pm 16.4\%$, 均大于28%, 两组间有统计学意义($t = 5.78, P < 0.001$).

结论: 使用高脂高胆固醇配方饮食可成功构建大鼠非酒精性脂肪肝模型, ^1H -MRS在脂肪肝模型建立的鉴定中有重要的价值.

关键词: 非酒精性脂肪性肝; 氢质子磁共振波谱; 大鼠

刘再毅, 梁长虹, 王秋实, 刘于宝, 徐丽, 郑君惠. ^1H -MRS在鉴定大鼠非酒精性脂肪肝模型构建中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1612-1616

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1612.asp>

0 引言

随着生活水平的提高, 非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)在人群中的发病率逐渐增高, 也受到越来越多的重视. 在不同的国家, 人群的NAFL发生率约为10%-24%. 约有67%的肥胖者存在单纯的肝脂肪变性, 有90%的病态肥胖患者存在肝脂肪变性. 小孩的发生率约为2.6%, 肥胖的小孩的发生率则高达22.5%-52.8%^[1-6]. 为此, 国内外研究者使用多种方法构建了NAFL动物模型以满足对其发病机制和临床干预实验的需要^[7-12]. 但由于很多方法费时、操作复杂、成本高, 限制了其在科学研究中的应用. 并且传统判断模型是否构建成功的方法是随机处死动物作肝脏病理学分析, 该方法既耗费动物, 又不精确, 因此迫切需要一种新的模型鉴定方法. 氢质子磁共振波谱(proton magnetic resonance spectroscopy, ^1H -MRS)可以无创、在体分析组织中代谢产物的含量^[13-19]. 本研究拟采取改良高脂高胆固醇饮食的方式构建NAFL模型, 并探讨 ^1H -MRS在判断模型是否构建成功中的价值.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♀清洁级Wistar大鼠32只, 由中山大学北校区动物实验中心提供, 体质量150-180 g, 平均 165 ± 15 g. 分笼饲养, 自然光照, 可自由进食饮水. 适应性饲养1 wk后随机分为实验组(n

= 24)和对照组($n = 8$). 实验组以高脂高胆固醇配方饮食喂养, 对照组以普通饮食喂养. 实验组饮食配方: 基础饲料(875 g/kg)+猪油(100 g/kg)+胆固醇(20 g/kg)+胆酸钠(50 g/kg). 其中, 基础饲料由中山大学北校区动物实验中心提供, 猪油为市售, 胆固醇及胆酸钠购至广州南方化波公司. ^1H -MRS采集仪器: GE 1.5 T超导核磁共振仪; 线圈: 50 mm正交鸟笼动物线圈.

1.2 方法 在喂养开始前(即第0周), 从对照组中随机抽取2只进行肝脏 ^1H -MRS脂肪定量分析和病理分析. 于4、8、12 wk分别从对照组中随机抽取2只、在实验组中分别随机抽取4、8、12只大鼠进行肝脏 ^1H -MRS脂肪定量分析和脂肪肝病理分析. 波谱采集完毕, 称大鼠体质量, 然后过量麻醉法处死大鼠, 抽取血液作肝功能ALT, GGT, AST和血清血脂水平(包括总胆固醇TC; 三酰甘油TG; HDL-C)检查. 检验均用Bechman全自动生化分析仪, 试剂由Bechman提供. 所有检验均在我院中心实验室完成. 摘取肝脏并测量质量, 计算肝/体质量指数.

1.2.1 肝脏 ^1H -MRS检查: 使用水合氯醛(0.3 mL/kg)ip, 将大鼠俯卧位置于线圈内, 肝脏置于线圈中心位置, 于大鼠周围适当填塞以固定大鼠尽可能抑制呼吸动度. 扫描定位相, 序列: 3-pl T2* SPGR(TR/TE: 84.7/1.6 ms, 层厚/层间距: 5/2 mm), 并扫描轴位T₂WI图像(FSE, TR/TE: 3000/85.2 ms, ETL: 15; 层厚/层间距: 3/1 mm; FOV: 8 mm×8 mm; 矩阵: 192×160). 使用T₂WI轴位图像作为定位相, 结合3-pl T2* SPGR的冠状位和矢状位图像, 在肝左叶上方层面放置感兴趣容积(VOI), 大小: 5-6 mm×5-6 mm×5-6 mm. 尽量避开皮下脂肪、肝裂和较为粗大的血管及胆管. 在VOI上、下、左、右、前、后放置饱和带, 以减少VOI外的组织的信号污染. 采集序列为点分辨波谱法(PRESS), 参数: TR/TE: 1500/35 ms; 点阵: 2048; 采集次数: 192; 自动匀场及抑水. ^1H -MRS波谱分析及脂肪含量定量分析: 使用SAGE 7.3(GE Medical system). 步骤: 数据零填充1倍→3 Hz的Gaussian函数处理→傅立叶变换→谱线基线校正→谱线相位校正→确定水和脂肪波峰位置→函数拟合积分得到水及脂肪波峰下面积. 以水峰作为内参照, 定位于 4.7×10^{-6} 处, 其波谱下面积积分为 $s_{\text{水}}$; 脂肪峰则包括位于 1.3×10^{-6} 处的亚甲基峰、 0.9×10^{-6} 处的甲基峰、 2.0×10^{-6} 和 2.8×10^{-6} 处的邻近羧基和烯属基团的亚甲基峰, 积分四者的面积和为 $s_{\text{脂}}$.

■ 研究前沿

肝细胞内脂肪异常蓄积往往与胰岛素抵抗及各种代谢综合征有十分密切的关系. 准确测量肝细胞内脂肪含量的含量对NAFL的各种研究具有十分重要的意义.

■应用要点

¹H-MRS能准确判断脂肪肝的程度,可以用来判断NAFL模型是否构建成功。

表 1 鼠肝/体质量指数、肝功能及血脂变化

指标	实验组	对照组
肝/体质量指数(%)	3.37 ± 0.40	1.96 ± 0.20
AST(μkat/L)	10.93 ± 4.85	5.58 ± 1.18
ALT(μkat/L)	2.49 ± 0.98	1.33 ± 0.29
GGT(μkat/L)	0.37 ± 0.22	0.17 ± 0.04
TC(mmol/L)	2.07 ± 0.63	1.22 ± 0.36
TG(mmol/L)	1.59 ± 0.58	1.11 ± 0.13
HDL-C(mmol/L)	1.13 ± 0.33	0.63 ± 0.16

则肝脏的脂肪含量定义为: 脂% = $s_{脂}/(s_{脂}+s_{水}) \times 100\%$ [13,15]。

1.2.2 脂肪肝程度病理分级: 在肝左叶取组织于40 g/L中性甲醛固定, 取样位置尽可能位于¹H-MRS的VOI区域, 石蜡包埋, 常规切片, 行HE染色, 光镜下常规病理学观察。观察脂肪浸润的肝细胞数量占肝细胞总数的比例进行分级, 标准为: 0级为<5%的肝细胞受累, 即正常肝组织; 1级为5%-33%的肝细胞受累; 2级为34%-66%的肝细胞受累; 3级为>66%的肝细胞受累。

统计学处理 使用SPSS分析实验组和对照组体质量、肝/体质量指数、肝功能和血清血脂水平的差别(由于正常对照组大鼠在各时间点数量较小, 因此在比较上述指标时, 不在各时间点分别比较, 而是采取对照组和试验组总体均数之间进行比较)。 $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物情况 实验组动物喂养2 wk后, 出现皮毛蓬乱无光泽, 食欲减低, 但实验组和对照组体重均增加, 二者间无统计学意义($t = 1.21$, $P>0.05$)。实验组肝/体质量指数、肝功能及血脂检查均高于对照组(表1)。

2.2 肝脏病理观察 对照组大鼠肝脏色泽鲜红, 边缘锐利(图1A); 实验组大鼠肝脏体积增大, 呈淡黄色, 可见较明显的脂肪颗粒样物质(图1B)。光镜观察实验组大鼠肝细胞内从在第4周检查时即出现脂滴空泡, 程度较轻, 以小泡性脂滴为主, 随着时间的增加, 脂肪肝程度明显加重, 第12周时多为重度脂肪肝, 细胞内大泡性脂滴空泡增多。同时, 肝细胞索排列紊乱, 肝窦变窄, 并有少量炎性细胞浸润(图2)。而对照组大鼠肝脏肝小叶结构清晰, 肝细胞索排列整齐, 肝窦正常, 未有炎性细胞浸润(图2)。实验组按照病理分级轻度3只、中度14只、重度6只。4 wk时检测1只造模未成功(表2)。

表 2 大鼠实验性脂肪肝构建组成表(n)

	4 wk	8 wk	12 wk	合计
0级	1	0	0	1
1级	2	1	0	3
2级	1	5	8	14
3级	0	2	4	6
合计	4	8	12	24

2.3 肝脏¹H-MRS 使用¹H-MRS分析(图2), 对照组的脂肪相对含量为 $13.0\% \pm 7.1\%$, 均小于21%, 实验组平均 $56.7\% \pm 16.4\%$, 均大于28%, 两组间有统计学意义($t = 5.78$, $P<0.001$)。

3 讨论

NAFL模型的建立有多种方法, 包括营养法、药物中毒法、高脂饮食加药物中毒法和物理刺激法。其中最常用的方法是营养法。营养法中又以高脂饮食配方常用, 主要是在基础饲料中增加不同比例的猪油或其他植物油。高脂饮食配方法由于简单易行、构建成功率高、与人类饮食结构接近等优点深得研究者青睐[7-12]。在复习文献的基础上, 本研究对配方作了改进。食物中加入较多的猪油, 摄入的过多脂肪堆积在细胞内, 从而导致脂肪肝。加入的胆固醇和胆盐易导致细胞内发生过氧化反应, 产生自由基和醛类物质, 产生的醛类物质又可与谷胱甘肽、过氧化酶等抗氧化剂的活性部位结合, 减少对自由基的清除, 会引起所谓的二次攻击, 会加速NAFL的形成[7]。据文献报道, 使用高脂饮食法在12 wk时可以成功构建脂肪肝[8-9]。但我们添加了胆固醇和胆盐, 故理论上会加速脂肪肝的形成, 因此本组实验将实验组的检测时间点定为4、8、12 wk。预计到4 wk时脂肪肝可能程度很轻, 因此在第4周只对4只实验组大鼠作相应处理, 而在第8、12周分别为8和12只动物。本研究结果表明, 本配方可以成功构建不同程度大鼠脂肪肝模型, 在本组中除了在第4周时1只大鼠没有形成脂肪肝外, 其他均形成不同程度的脂肪肝, 其中轻、中、重度脂肪肝分别为3、14、6只。同时, 实验组大鼠的肝/体质量指数、肝功能和血脂水平平均高于对照组。大体外观和光镜观察结果均与文献报道类似[6,8-11]。

在NAFL的实验中, 确定造模成功与否对实验进行具有重要的指导意义。传统的方法是根据经验, 在特定时间点随机抽取动物处死后对肝脏作病理学检查[7,9,11,12]。但此方法不能保证所

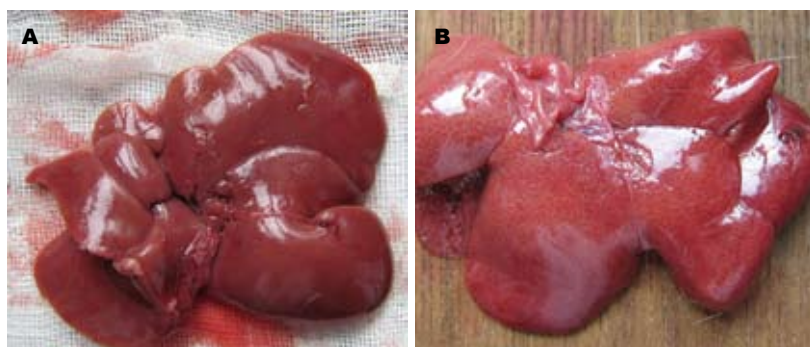
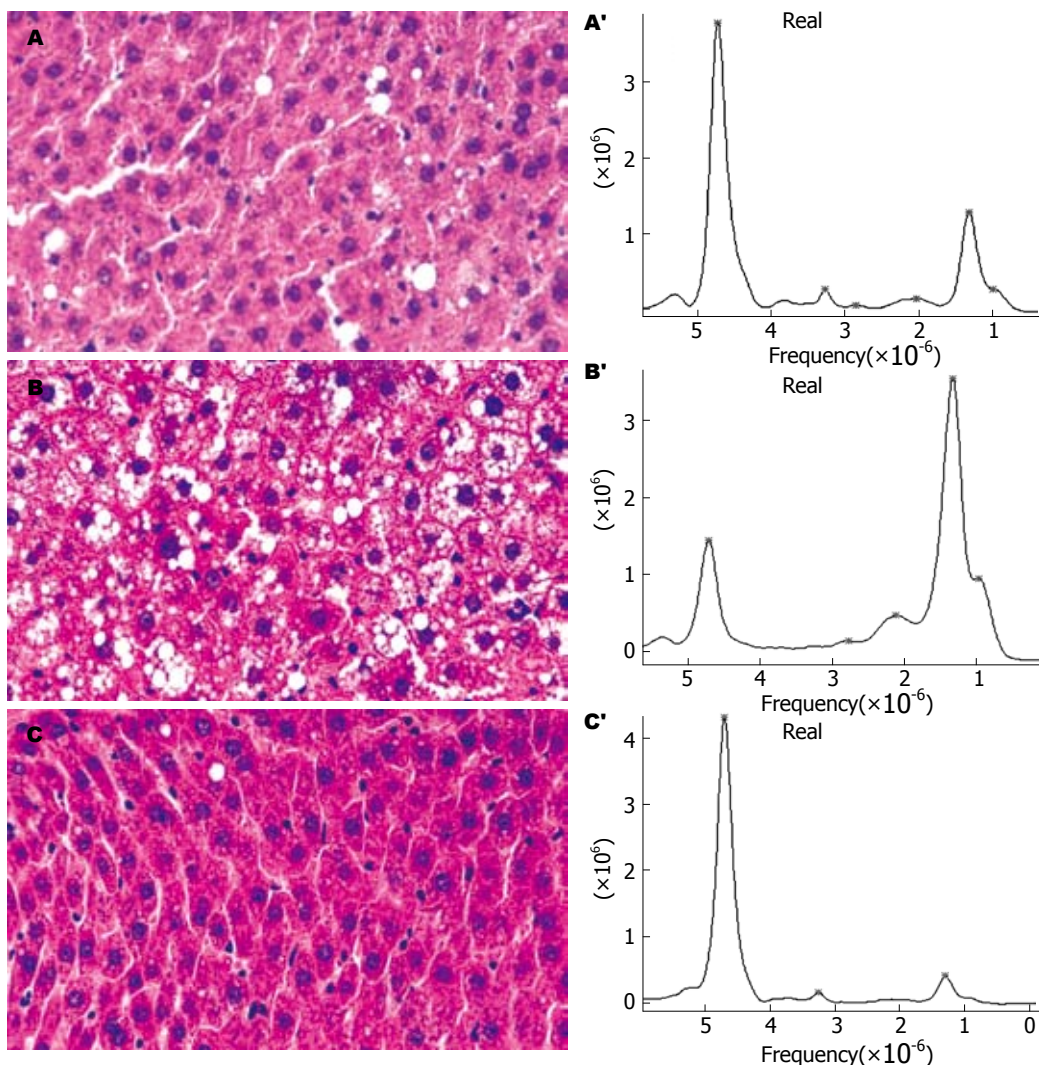


图 1 大鼠实验性脂肪肝外观.

A: 正常; B: 脂肪肝.

■名词解释

氢质子磁共振波谱(^1H -MRS): 磁共振技术发展新的应用, 其基本原理是根据代谢物质内氢质子所处的局部化学环境不同引起该氢质子在磁共振波谱中吸收信号的位置不同, 即化学位移来判断组织中代谢产物的性质和数量. 该技术具有无创、在体及动态检测组织内代谢产物浓度的优势.

图 2 大鼠实验性脂肪肝组织病理(HE $\times 200$)和 ^1H -MRS谱线. A, A': 轻度; B, B': 中度; C, C': 正常.

有的动物均造模成功, 不能对每个动物进行脂肪肝程度的分级, 并且耗费试验动物. 从表2可以看出, 在第8周和12周时均有中、重度模型构建成功, 因此单纯依靠构建时间来判断是否构建成功或者程度不够精确, 不能确保NAFL研究的试验组和对照组具有可比性. 因而需要一种无创、准确的方法来进行模型的鉴定. 研究证实, ^1H -MRS是一种功能强大的分析工具, 可以无创、定量分析肝细胞中脂肪的含量(主要是三酰

甘油, TG), 因此非常适用于肝脏脂肪的活体定量分析及纵向随访研究^[13-19].

^1H -MRS是医学影像学近年来发展的新的检查手段, 作为一种无创伤性研究活体器官组织的代谢、生化变化及化合物定量分析的方法, 被众多学者用来进行脂肪肝的定量分析^[13-14]. 其基本原理是, 在同一外部磁场中, 各代谢产物中的氢质子所处的局部化学环境却不同(核外电子云密度不同和所受屏蔽作用的不同造成), 从而

■同行评价

本文为非酒精性脂肪肝动物模型的研究提供了一种新的非损伤性评价方法,内容新颖,具有一定的参考价值。

引起相同氢质子在磁共振波谱中吸收信号的位置差异,通常用化学位移的大小(以磁共振频率的百万分之一)来表示。在MRS波谱中,横坐标表示化学位移,纵坐标代表代谢产物的信号强度,波峰下面积则代表该代谢产物在组织中的含量。在肝脏的典型波谱谱线中,可以见到位于 4.7×10^{-6} 处的水峰,通常作为内参照标准来衡量肝内脂肪的相对含量。脂肪峰则根据脂肪中氢质子所处的基团位置不一样出现4个不同的波峰,包括位于 1.3×10^{-6} 处的亚甲基峰、 0.9×10^{-6} 处的甲基峰、 2.0×10^{-6} 和 2.8×10^{-6} 处的邻近羧基和烯属基团的亚甲基峰,通常以亚甲基峰最明显,甲基峰其次^[17,20]。在后处理波谱数据时,分别积分水峰($s_{\text{水}}$)和脂肪峰下面积($s_{\text{脂}}$),根据公式:脂% = $s_{\text{脂}} / (s_{\text{脂}} + s_{\text{水}}) \times 100\%$ 就可以得到肝脏脂肪的相对含量^[20]。我们首次使用¹H-MRS来判断脂肪肝动物模型是否构建成功,结果得到轻度脂肪肝的脂肪相对比(脂%)均大于28%,平均 $56.7\% \pm 16.4\%$ 。而对照组的相对含量则多小于20%,平均 $13.0\% \pm 7.1\%$ 。从试验结果可以看出,如果¹H-MRS测得的脂肪相对含量大于28%,则可以大致判断脂肪肝模型建立成功。但是,本研究中只有9例正常大鼠肝脏,轻度NAFL只有3例,准确判断正常肝脏和NAFL的分界线还需要扩大样本含量。

总之,采用本研究的饮食配方饮食,在8-12 wk时即可构建出中至重度大鼠NAFL模型,且¹H-MRS可无创、准确判断构建NAFL模型是否成功及其程度。

4 参考文献

- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346: 1221-1231
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 1844-1850
- Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI, Petersen KF. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 797-802
- Schrauwen P. High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. *Proc Nutr Soc* 2007; 66: 33-41
- Schrauwen-Hinderling VB, Hesselink MK, Schrauwen P, Kooi ME. Intramyocellular lipid content in human skeletal muscle. *Obesity (Silver Spring)* 2006; 14: 357-367
- 范建高. 非酒精性脂肪性肝病的过去、现在和将来.

- 中华肝病杂志 2007; 15: 641-643
- Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE, Follansbee MH, Oberley LW, Rahemtulla A, Nanji AA. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology* 1998; 27: 1317-23
- 杨英昕, 毕秀丽, 朱培庭. 非酒精性脂肪肝动物模型研究摘要. *中医药学刊* 2005; 23: 647-651
- 邹强, 王滨, 高志芹, 吕世军. 适于影像学定量诊断研究的脂肪肝动物模型的建立. *临床放射学杂志* 2000; 19: 727-729
- 卢明芳, 王雯. 软脉灵对大鼠非酒精性脂肪肝的预防作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1213-1218
- 王倩, 管小琴. 大鼠非酒精性脂肪肝造模方法的改进. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1219-1224
- 陈香, 李建薇, 胡耀敏, 张祥迅, 田浩明. 吡格列酮和非诺贝特对SD大鼠体脂分布及能量代谢的调节作用. *中华内分泌代谢杂志* 2007; 23: 20-23
- Chan DC, Watts GF, Ng TW, Hua J, Song S, Barrett PH. Measurement of liver fat by magnetic resonance imaging: Relationships with body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipids in healthy men. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8: 698-702
- De Feyter HM, Schaart G, Hesselink MK, Schrauwen P, Nicolay K, Prompers JJ. Regional variations in intramyocellular lipid concentration correlate with muscle fiber type distribution in rat tibialis anterior muscle. *Magn Reson Med* 2006; 56: 19-25
- Hadigan C, Liebaw J, Andersen R, Holalkere NS, Sahani DV. Magnetic resonance spectroscopy of hepatic lipid content and associated risk factors in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 46: 312-317
- Hwang JH, Stein DT, Barzilai N, Cui MH, Tonelli J, Kishore P, Hawkins M. Increased intrahepatic triglyceride is associated with peripheral insulin resistance: in vivo MR imaging and spectroscopy studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E1663-E1669
- Ishii M, Yoshioka Y, Ishida W, Kaneko Y, Fujiwara F, Taneichi H, Miura M, Toshihiro M, Takebe N, Iwai M, Suzuki K, Satoh J. Liver fat content measured by magnetic resonance spectroscopy at 3.0 tesla independently correlates with plasminogen activator inhibitor-1 and body mass index in type 2 diabetic subjects. *Tohoku J Exp Med* 2005; 206: 23-30
- Kottrönen A, Seppälä-Lindroos A, Bergholm R, Yki-Järvinen H. Tissue specificity of insulin resistance in humans: fat in the liver rather than muscle is associated with features of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 2008; 51: 130-138
- Liska D, Dufour S, Zern TL, Taksali S, Calí AM, Dziura J, Shulman GI, Pierpont BM, Caprio S. Interethnic differences in muscle, liver and abdominal fat partitioning in obese adolescents. *PLoS ONE* 2007; 2: e569
- Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E462-E468

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

苦参碱对大鼠小体积肝移植缺血再灌注损伤的保护作用

刘浩, 仇毓东, 毛凉, 朱新华, 丁义涛

刘浩, 仇毓东, 毛凉, 朱新华, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

刘浩, 2005级南京大学硕士, 主要从事肝脏移植方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由丁义涛和仇毓东设计; 研究程由刘浩, 毛凉及朱新华操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由仇毓东提供; 数据分析由刘浩, 毛凉及朱新华完成; 本论文写作由刘浩, 毛凉, 朱新华及仇毓东完成。

通讯作者: 仇毓东, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科。yudongqiu510@163.com

电话: 025-83594913

收稿日期: 2008-03-14 修回日期: 2008-04-30

Protective effect of matrine against ischemia and reperfusion injury in rat partial liver transplantation

Hao Liu, Yu-Dong Qiu, Liang Mao, Xin-Hua Zhu, Yi-Tao Ding

Hao Liu, Yu-Dong Qiu, Liang Mao, Xin-Hua Zhu, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@163.com

Received: 2008-03-14 Revised: 2008-04-30

Abstract

AIM: To investigate the protective effect of matrine against ischemia and reperfusion injury in rats with partial liver transplantation.

METHODS: Using the 30% small-for-size liver transplantation (SLT) model, 322 male SD rats were randomly divided into sham operation group, SLT group, SLT+low-dose matrine (40 mg/kg) group and SLT+high-dose matrine (80 mg/kg) group. Serum samples were collected to measure the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) at 2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d and 7 d after reperfusion of the portal vein. The one-week survival rate was observed in each group. Tissue samples were collected for observation of the morphologic changes under optical and electron microscope and detection of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) expression using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: In comparison with those in the SLT group, the one-week survival rates were increased markedly in the low- and high-dose matrine treatment groups (80%, 70% vs 50%, both $P < 0.05$). The levels of ALT, AST and LDH as well as the expression of IL-6 and TNF- α were decreased significantly in the low- and high-dose matrine treatment groups at 2 h, 4 h, and 1 d post-transplantation. The rats in matrine-treated groups showed reduced severity of ultrastructural changes in both hepatic cells and sinusoidal endothelial cells (SEC).

CONCLUSION: Matrine can prevent hepatic cells and SEC from ischemia and reperfusion injury during partial liver transplantation in rats, and the mechanism is associated with the release inhibition of inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α .

Key Words: Matrine; Partial liver transplantation; Ischemia and reperfusion injury; Enzyme-linked immunosorbent assay

Liu H, Qiu YD, Mao L, Zhu XH, Ding YT. Protective effect of matrine against ischemia and reperfusion injury in rat partial liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1617-1621

摘要

目的: 探讨苦参碱对大鼠小体积肝移植缺血再灌注损伤的保护作用及机制。

方法: 采用大鼠30%小体积肝移植模型, δ SD大鼠322只随机分为假手术组、小体积肝移植对照组和高、低剂量苦参碱治疗组(60、40 mg/kg)。观察术后1 wk生存率, 检测移植术2h、4h、1d、2d、3d、7d后ALT、AST及LDH值。光镜及电镜下评估移植肝病理形态学改变, ELISA法检测肝脏IL-6、TNF- α 表达。

结果: 与对照组比较, 苦参碱高、低剂量治疗组术后1 wk生存率显著增加(80%, 70% vs 50%, 均 $P < 0.05$)。术后2h、4h、1d ALT、AST及LDH明显降低($P < 0.01$)。苦参碱治疗组中肝细胞和肝窦内皮细胞凋亡减少、细胞形态明显改善, 苦参碱治疗组术后2h、4h、1d肝脏

■背景资料

肝移植作为治疗终末期肝病的最为有效的手段, 挽救了大量重症肝病患者的生命。然而, 供肝的匮乏已成为制约肝移植发展的重要因素, 许多患者在等待供体中死亡。以劈离式肝移植、活体肝移植为代表的部分肝移植技术的成熟和推广, 在一定程度上缓解了供肝短缺的矛盾。

■同行评议者

王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室

■相关报道

本课题组前期研究中发现,苦参碱可以在一定程度上对全肝移植的冷保存缺血再灌注损伤有保护作用。

组织中IL-6, TNF- α 水平明显降低($P<0.01$)。

结论:苦参碱可减轻肝细胞及肝窦内皮细胞的损伤,改善小体积肝移植术后缺血再灌注损伤,其机制可能与苦参碱抑制肝移植术后IL-6、TNF- α 等炎症因子的释放有关。

关键词:苦参碱;小体积肝移植;缺血再灌注损伤;酶联免疫吸附实验

刘浩, 仇毓东, 毛凉, 朱新华, 丁义涛. 苦参碱对大鼠小体积肝移植缺血再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1617-1621

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1617.asp>

0 引言

近年来,活体肝移植(living donor liver transplantation, LDLT)技术逐渐成熟,临床应用日益广泛,已经成为尸体全肝移植的重要补充。但由于供肝体积小于受体原肝,他所承受的缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)较全肝移植更为严重,并且直接影响到移植物和患者的存活。因此,对小体积供肝IRI的保护已经成为基础和临床研究的重要课题。本研究选择具有抗炎、抗氧化、免疫抑制和保肝等作用的中药单体苦参碱(matrine)^[1-2],采用大鼠30%的小体积肝移植模型^[3],探讨其对小体积肝移植IRI的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD大鼠322只购于南京军区总医院动物实验中心,体质量210-230 g。苦参碱购自广州明兴制药厂,均选择同一批号的药物,ELISA试剂盒购于博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模:实验大鼠随机分为假手术组(46只)、对照组(92只)和苦参碱治疗组(184只)。假手术组仅行单纯的开关腹手术,对照组行30%的小体积肝移植术;苦参碱治疗组依据苦参碱剂量不同治疗组又分为低剂量(40 mg/kg)苦参碱治疗组(92只)、高剂量(60 mg/kg)苦参碱治疗组(92只)。治疗组受体在术前30 min ip相应剂量的苦参碱,然后再行供肝植入术。移植术后2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d共6个时间点,每组每时间点设6个样本行肝功能、光镜和电镜检查。各组另设10个样本用于观察1 wk生存率。

大鼠小体积肝移植模型基本参照Man *et al*^[3]所采用的小体积肝移植方法进行。应用规则性肝切除技术,切除大鼠肝脏的左叶和中叶,保留

右叶和尾状叶作为供肝行小体积肝移植术。整个手术中,供体手术时间约30 min,后台时间约30 min,受体手术时间约为1 h。手术无肝期约为17-19 min,模型稳定率为95%。

1.2.2 生存率统计:对假手术组(10只),小体积肝移植对照组、低剂量苦参碱治疗组(40 mg/kg)和高剂量苦参碱治疗组(60 mg/kg)(各10对)小体积肝移植后的1 wk生存率进行统计。

1.2.3 肝功能测定:各组分别于移植术后2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d经大鼠腹主动脉抽取1 mL血液,离心后取血清标本来测定大鼠ALT、AST、LDH(生化测定在南京市鼓楼医院检验科使用多功能生化分析仪进行)。

1.2.4 病理学检测:各组分别于移植术后2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d各取20 g大鼠肝右叶组织,置于40 g/L的甲醛中,再取10个1 mm³大小的大鼠肝右叶组织置于电镜保存液中后,制作成光镜和电镜标本,在光镜(BX-50)和透射电镜(JEM-1200EX)下观察移植肝脏组织病理形态学改变的情况。

1.2.5 肝脏IL-6, TNF- α 的表达:各组分别于移植术后2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d取10 g左右肝脏组织冻存于液氮罐中,取0.1 g的肝脏组织加入1 mL的PBS溶液中做成组织匀浆,ELISA法检测肝脏IL-6, TNF- α 表达水平。

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示,多组样本均数比较采用单因素方差分析,先进行方差齐性检验,然后采用Student-Newman-Keuls检验进行两两比较,以双侧 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,全部统计分析采用SPSS15.0软件实现。

2 结果

2.1 1 wk生存率比较 小体积肝移植术后,对照组大鼠的1 wk生存率为50%。与对照组比较,苦参碱低剂量治疗组术后的1 wk生存率为70%,高剂量治疗组术后的1 wk生存率为80%,统计学差异显著($P<0.05$)。苦参碱治疗组之间比较,无明显统计学差异(图1)。

2.2 肝功能变化 术后2 h, 4 h和1 d的ALT、AST、LDH值:小体积肝移植各组与假手术组比较均增高,统计学差异极显著($P<0.01$),苦参碱治疗组与对照组比较均降低,统计学差异极显著($P<0.01$),高剂量治疗组与低剂量治疗组比较也有所降低,统计学差异显著($P<0.05$,图2)。

2.3 病理学改变 小体积肝移植后,光镜下观察发现,对照组可见以小叶中央静脉为中心的灶状凝固性坏死,伴大量炎性细胞浸润;而小剂量苦参碱治疗组可见肝小叶结构基本正常,少数肝

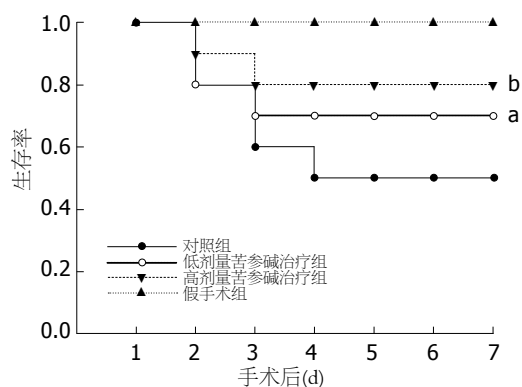


图 1 实验大鼠的1wk生存率比较. ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组.

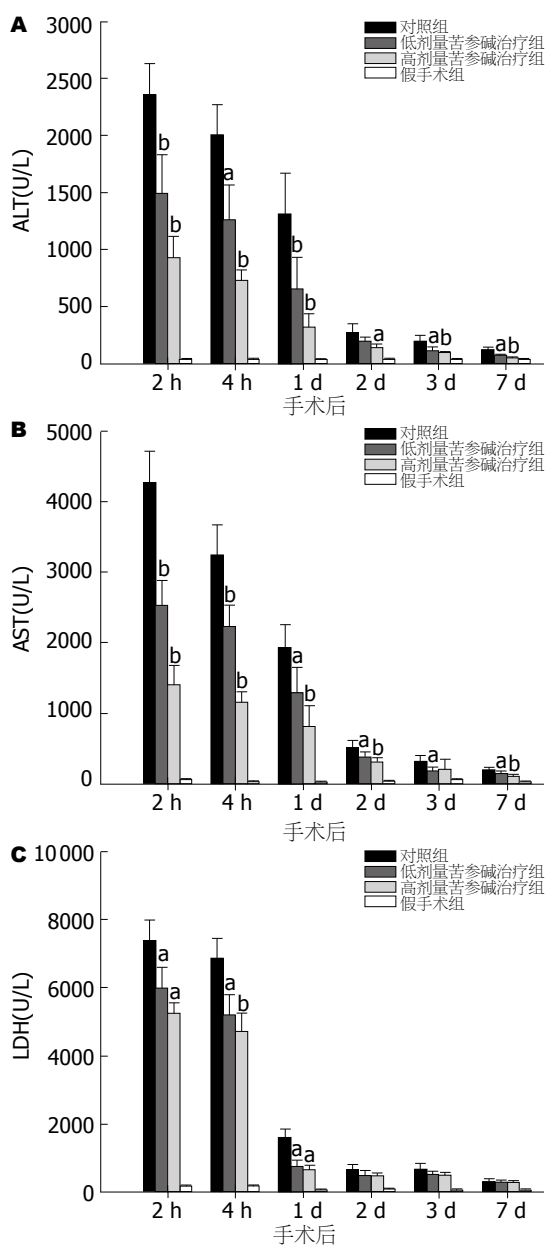


图 2 肝功能变化. A: ALT; B: AST; C: LDH; ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组.

细胞呈空泡变性, 很少有肝细胞坏死, 炎症反应明显减少. 大剂量治疗组与小剂量组组织学改

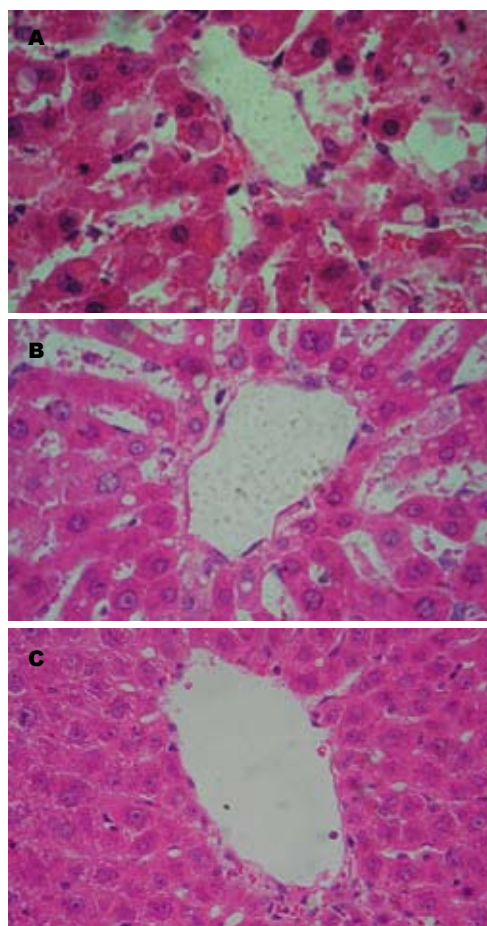


图 3 移植后1 d肝脏组织学切片光镜观察(HE染色, $\times 400$). A: 对照组; B: 低剂量苦参碱治疗组; C: 高剂量苦参碱治疗组.

变基本相似(图3).

小体积肝移植后, 电镜下观察发现, 对照组肝细胞核皱缩, 染色质浓集, 线粒体空泡化明显, 粗面内质网扩张, 肝窦内皮细胞不连续, 高度肿胀, 核膜不完整, 可见凋亡的内皮细胞; 而小剂量苦参碱治疗组肝细胞膜完整, 细胞核圆居中, 肝窦内皮细胞内皮轻度水肿, 血窦腔内炎症细胞的浸润程度明显轻于对照组, 未见凋亡的内皮细胞. 大剂量治疗组与小剂量组组织学改变相似(图4).

2.4 IL-6和TNF- α 的活性 与对照组比较, 苦参碱治疗组术后各时间点IL-6和TNF- α 值均降低, 统计学差异极显著($P<0.01$). 与低剂量治疗组比较, 高剂量治疗组术后各时间点IL-6和TNF- α 值也有所降低, 统计学差异显著($P<0.05$, 图5).

3 讨论

当前, 肝移植已成为治疗终末期肝病的最为有效的手段, 挽救了大量重症肝病患者的生命. 然而, 供肝的匮乏已成为制约肝移植发展的重要

■创新盘点

本研究采用保留大鼠右叶和双尾叶的方式成功建立了30%的大鼠小体积肝移植这个肝衰模型.

■应用要点

本研究为进一步研究苦参碱在小体积肝移植“小肝综合征”防治中的应用奠定了理论基础。

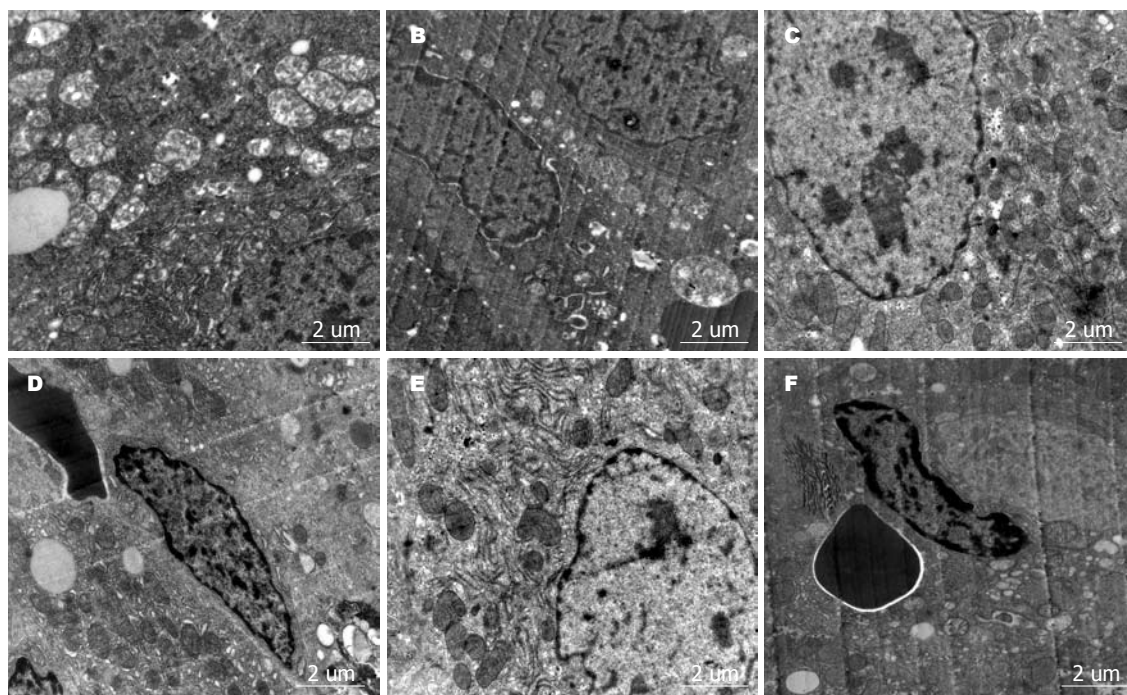


图4 移植后1 d肝脏组织电镜观察(EM, ×12000). A: 对照组; B: 小体积肝移植组肝窦内皮细胞; C: 低剂量苦参碱治疗组肝细胞; D: 低剂量苦参碱治疗组肝窦内皮细胞; E: 高剂量苦参碱治疗组肝细胞; F: 高剂量苦参碱治疗组肝窦内皮细胞。

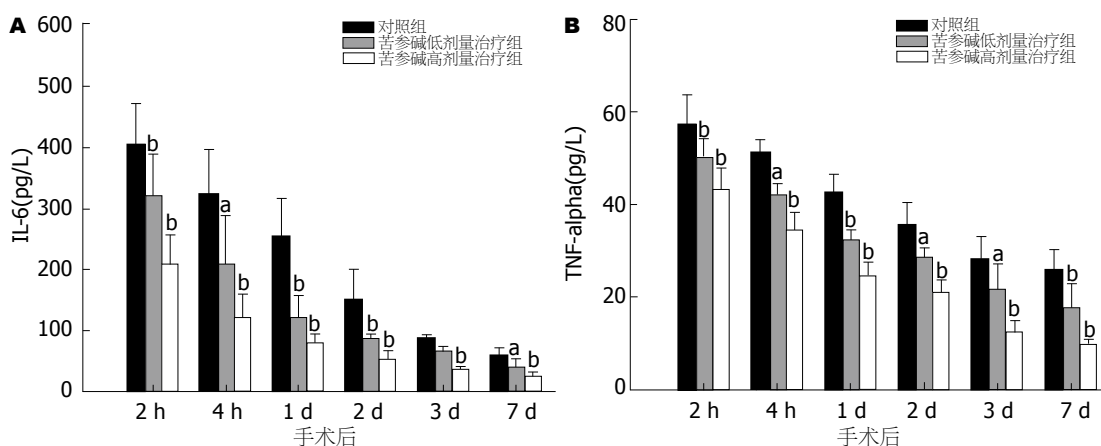


图5 IL-6和TNF-α的活性. A: IL-6; B: TNF-α; ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

因素,许多患者在等待供体中死亡.以劈离式肝移植、活体肝移植为代表的部分肝移植技术的成熟和推广,在一定程度上缓解了供肝短缺的矛盾.但是,由于移植肝体积的减小,他所承受的门静脉高灌注压更高、遭受的IRI更严重^[4-8],这在一定程度上增加了部分肝移植术后并发症的发生率,影响了治疗效果.近年来,人们进行了大量的实验和临床研究,采用了诸如缺血预处理、药物干预、术式的改进等^[9-10]方法预防和治疗部分肝移植的IRI.我们通过前期的研究,建立了大鼠30%小体积肝移植模型,术后1 wk生存率约为50%,与梁廷波 *et al*^[11]和叶晟 *et al*^[12]报道相类似.在此基础上,选择药物干预的手段,初

步探讨了对大鼠小体积移植肝IRI的保护作用.

苦参碱是从中药苦参中提取的具有苦参次碱-15-酮基本结构的化合物,具有抗炎、抗氧化、保肝等作用,已经广泛应用于各类项肝病的临床治疗.我们在前期的研究中发现苦参碱可以在一定程度上改善全肝移植过程中的IRI^[13-15].本实验重点观察了苦参碱在小体积肝移植中对移植肝的IRI有无保护作用,以及不同剂量苦参碱的疗效差别.研究结果显示:与对照组50%的1 wk生存率相比,苦参碱低剂量治疗组术后1 wk生存率为70%,高剂量治疗组术后的1 wk生存率为80%,苦参碱低剂量与高剂量治疗组均未发生明显的毒性反应.通过肝功能检测

发现,苦参碱治疗组术后各时间点ALT、AST及LDH值较对照组均显著降低,提示治疗组术后肝功能有明显的改善,而高剂量治疗组肝功能指标的改善更加明显。病理学检测发现,对照组移植肝组织学标本在光镜下可见以多处灶状坏死,伴大量炎性细胞浸润;而苦参碱治疗组的肝小叶结构基本正常,很少有肝细胞坏死,炎症反应明显减少。电镜观察发现,对照组肝细胞线粒体空泡化明显,内质网扩张,肝窦内皮细胞肿胀,并可见凋亡的内皮细胞。苦参碱治疗组肝细胞膜完整,肝窦内皮细胞内皮轻仅度水肿,血窦腔内炎性细胞的浸润程度明显轻于对照组,未见凋亡的内皮细胞。我们又通过ELISA法对炎症因子IL-6、TNF- α 表达水平的检测发现,苦参碱治疗组术后各时间点IL-6和TNF- α 值较对照组均显著降低,提示治疗组术后IL-6和TNF- α 的释放减少,而高剂量治疗组术后IL-6和TNF- α 水平表达减少得更加明显。由此可见,苦参碱在一定程度上可以减轻肝内实质细胞和非实质细胞的损伤,对肝细胞、肝窦内皮细胞有较好地保护作用。初步的形态学检查发现肝细胞和内皮细胞的凋亡减少。通过减轻肝窦内皮细胞的炎症损伤,可有效改善肝脏的微循环障碍,减轻小体积肝移植术后的IRI。我们认为,苦参碱可通过抑制肝脏组织中IL-6、TNF- α 等炎症因子的释放,减轻移植肝内细胞的炎症损伤,降低肝脏的酶学指标,达到改善术后移植肝功能的目的,最终提高小体积肝移植的生存率。以往有文献报道,苦参碱减轻移植IRI可能通过IL-6、TNF- α 通路;苦参碱还能作用于NO途径,清除氧自由基、减少钙超载从而保护细胞结构^[16]。而以上的研究为我们进一步探讨苦参碱减少IRI、保护小体积移植肝功能的具体机制提供了思路。

总之,本实验在大鼠30%的小体积肝移植模型的基础上,采用术前给予苦参碱药物干预的方法,通过1 wk生存率统计,肝脏酶学指标和炎症因子表达水平的检测以及光镜和电镜观察肝细胞和肝窦内皮细胞形态,阐明了苦参碱对于小体积肝移植术后移植肝IRI具有良好的保护作用。实验结果为进一步研究苦参碱在小体积肝移植“小肝综合征”防治中的应用奠定了理论基础。

4 参考文献

1 Lin W, Zhang JP, Hu ZL, Qian DH. Inhibitory effect

- of matrine on lipopolysacchride-induced tumor necrosis factor and interleukin-6 production from rat Kupffer cells. *Yaoxue Xuebao* 1997; 32: 93-96
- 2 Zhang JP, Zhang M, Zhou JP, Liu FT, Zhou B, Xie WF, Guo C. Antifibrotic effects of matrine on in vitro and in vivo models of liver fibrosis in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 183-186
- 3 Man K, Lo CM, Ng IO, Wong YC, Qin LF, Fan ST, Wong J. Liver transplantation in rats using small-for-size grafts: a study of hemodynamic and morphological changes. *Arch Surg* 2001; 136: 280-285
- 4 Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF- α /IL-6-dependent mechanism. *Hepatology* 2002; 36: 812-818
- 5 Franco-Gou R, Peralta C, Massip-Salcedo M, Xaus C, Serafin A, Roselló-Catafau J. Protection of reduced-size liver for transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 1408-1420
- 6 Palmes D, Budny TB, Dietl KH, Herbst H, Stratmann U, Spiegel HU. Detrimental effect of sinusoidal overperfusion after liver resection and partial liver transplantation. *Transpl Int* 2005; 17: 862-871
- 7 Glanemann M, Eipel C, Nussler AK, Vollmar B, Neuhaus P. Hyperperfusion syndrome in small-for-size livers. *Eur Surg Res* 2005; 37: 335-341
- 8 Zhong Z, Schwabe RF, Kai Y, He L, Yang L, Bunzendahl H, Brenner DA, Lemasters JJ. Liver regeneration is suppressed in small-for-size liver grafts after transplantation: involvement of c-Jun N-terminal kinase, cyclin D1, and defective energy supply. *Transplantation* 2006; 82: 241-250
- 9 朱应乾,覃云,王茂旭,杜富波,刘厚东,李素芝.缺血预处理对高原大鼠肝脏缺血/再灌注损伤早期的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 287-289
- 10 吕平,刘芳,王春友,姚忠,陈道达,田源,张锦辉,吴毅华.亚硝酸盐还原成一氧化氮保护肝脏对抗缺血再灌注损伤. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 346-350
- 11 梁廷波,郑树森,徐骁,范上达.两种不同方法的大鼠小体积肝移植模型建立比较. *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 320-322
- 12 叶晟,韩本立,董家鸿.大鼠系列减体积原位肝移植的实验研究. *肝胆外科杂志* 2003; 11: 220-223
- 13 Zhu XH, Qiu YD, Shi MK, Wu B, Zheng XG, Ding YT. Effect of matrine on cold ischemia and reperfusion injury of sinusoidal endothelial cells in rat orthotopic liver transplantation. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 169-174
- 14 Zhu XH, Qiu YD, Shen H, Shi MK, Ding YT. Effect of matrine on Kupffer cell activation in cold ischemia reperfusion injury of rat liver. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1112-1116
- 15 Zhu X, Qiu Y, Shi M, Ding Y. Matrine protects sinusoidal endothelial cells from cold ischemia and reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation. *Ann Clin Lab Sci* 2003; 33: 216-225
- 16 Essani NA, Fisher MA, Jaeschke H. Inhibition of NF-kappa B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF- α formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury. *Shock* 1997; 7: 90-96

■同行评价

本研究内容新颖,实验对照设计合理,统计学方法恰当,符合伦理学要求,具有较好的可读性。

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

COL1A1-shRNA表达质粒构建及抑制COL1A1表达的有效序列的筛选

芦军, 赵金满, 孟艳, 余永红

■背景资料

肝纤维化发生机制是肝损害持续存在, 机体发生的修复反应, 造成细胞外基质合成, 降解与沉积不平衡的病理过程, 而胶原是细胞外基质得主要成分, 其中以 I 型胶原, 如果能减少其合成, 就能延缓肝纤维化向肝硬化的转变。RNAi 技术是一种新型发展起来的技术手段, 能高效、特异地抑制细胞内源或外源性靶基因的表

达。

芦军, 赵金满, 孟艳, 余永红, 中国医科大学第一附属医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
芦军, 硕士, 主要从事肝硬化的临床研究。
辽宁省教育厅高等学校科学技术基金资助项目, No. 05L452
作者贡献分布: 赵金满与芦军对此文所作贡献均等; 此课题由赵金满与芦军设计; 研究过程由芦军, 孟艳及余永红操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由赵金满提供; 数据分析由芦军, 孟艳及余永红完成; 本论文写作由芦军完成; 赵金满修改校正。
通讯作者: 赵金满, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学第一附属医院消化内科. jinmanzhao@163.com
电话: 024-23268744
收稿日期: 2008-01-08 修回日期: 2008-03-19

Construction of COL1A1-shRNA expression plasmid and screening of effective sequences to inhibit COL1A1 expression

Jun Lu, Jin-Man Zhao, Yan Meng, Yong-Hong Yu

Jun Lu, Jin-Man Zhao, Yan Meng, Yong-Hong Yu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the Science and Technology Foundation of the Colleges and Universities of Liaoning Education Office, No. 05L452

Correspondence to: Dr. Jin-Man Zhao, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, 92 Beiern Road, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. jinmanzhao@163.com

Received: 2008-01-08 Revised: 2008-03-19

Abstract

AIM: To construct and select procollagen type 1 alpha 1 (COL1A1) short hairpin RNA (shRNA) expression plasmid that can inhibit COL1A1 mRNA expression in rat hepatic stellate cell (HSC).

METHODS: Rat COL1A1 cDNA sequence was obtained from NCBI website. Three small interfering RNA sequences were selected through online design of the Whitehead Institute. The corresponding double-stranded DNA was used to construct pGPU6/GFP/Neo plasmids, namely pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A, pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B and pGPU6/GFP/Neo-

shRNA-C. HSC-T6 cells were transfected with a green fluorescent protein (GFP)-labeled siRNA to assess the transfection efficiency. To get most effective and optimal dosage siRNA, the three plasmids (1, 2, 3, 4 μ g) were transfected into HSC-T6 cells with Lipofectamine 2000 respectively, and the untreated HSC-T6 cells were used as controls. The expression of COL1A1 mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) after the most effective and optimal dosage was used.

RESULTS: The expression plasmids targeting on COL1A1 mRNA were successfully constructed, and confirmed by agarose electrophoresis and sequence analysis. The transfection efficiencies at a dose of 1, 2, 3, and 4 μ g were approximately 16.7%, 20.3%, 23.5%, and 22.3%, and 2 μ g was considered as the most optimal dosage in each group. The inhibitory rates of COL1A1 mRNA levels in the HSC-T6 cells transfected with pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A, pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B, and pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C were 16.6%, 63.3%, and 80.3%, respectively, when 2 μ g siRNA plasmid was used.

CONCLUSION: The constructed expression plasmid pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C can effectively inhibit the expression of COL1A1 mRNA, providing a new method and material for the treatment of liver fibrosis.

Key Words: Procollagen type 1 alpha 1; Hepatic stellate cell; RNA interference; Plasmid; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Lu J, Zhao JM, Meng Y, Yu YH. Construction of COL1A1-shRNA expression plasmid and screening of effective sequences to inhibit COL1A1 expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1622-1627

摘要

目的: 构建和筛选对大鼠肝星状细胞前 I 型胶原 $\alpha 1$ 链(COL1A1)mRNA有抑制作用的 COL1A1短发夹RNA (shRNA)的表达质粒。

■同行评议者

冯志杰, 主任医师, 河北医科大学第二医院消化内科

方法: 从NCBI网站获得大鼠的COL1A1 cDNA序列, 根据Whitehead研究所的siRNA设计软件设计3条理论上最佳的siRNA序列, 相应的双链DNA被插入pGPU6/GFP/Neo质粒中, 即pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A、pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B和pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C. 为得到高效沉默COL1A1-siRNA, 以脂质体LipofectAMINE2000, 将1、2、3、4 μ g DNA质粒转染至HSC-T6细胞中, 并观察转染效果. 将最佳沉默siRNA导入HSC-T6细胞, RT-PCR分析各组的COL1A1 mRNA表达水平.

结果: 靶向COL1A1 mRNA的3个shRNA重组质粒载体pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A、pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B和pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C经测序分析, shRNA编码序列与设计的片段完全一致, 经酶切凝胶电泳证实载体构建成功. 1、2、3、4 μ g组转染效率分别为16.7%、20.3%、23.5%和22.3%, 以2 μ g siRNA为最佳剂量, pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A、pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B和pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C对COL1A1 mRNA的抑制率分别为16.6%、63.3%和80.3%.

结论: 筛选出的pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C表达质粒能高效地抑制转染细胞COL1A1 mRNA的表达, 从而为肝纤维化治疗提供新的方法和材料.

关键词: 前I型胶原 α 1链; 肝星状细胞; RNA干扰; 质粒; 逆转录-聚合酶链反应

芦军, 赵金满, 孟艳, 余永红. COL1A1-shRNA表达质粒构建及抑制COL1A1表达的有效序列的筛选. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1622-1627
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1622.asp>

0 引言

肝纤维化是各种病因引起的慢性肝病, 使肝脏中胶原蛋白的增生和降解失衡, 进而导致肝脏内纤维结缔组织异常沉积的病理过程, 最终可导致肝硬化. 在肝纤维化中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)主要成分是胶原, 其中I型胶原为主要成分, 现已证明肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活是产生I型胶原导致纤维化发生发展的中心环节, 通过减少HSC中前I型胶原的产生, 逆转或减慢肝纤维化的发展^[1-2]. RNAi技术是一种新型发展起来的技术手段, 现今被广泛应用到疾病治疗研究中. RNAi是一种进化上保守的基因组水平的免疫监控

机制, 通过RNaseIII内切核酸酶Dicer的作用产生小的(21-23 nt)短小干扰性RNA(short interfering RNA, siRNA), 介导其互补同源mRNA序列的特异性降解, 能高效、特异地抑制细胞内源或外源性靶基因的表达^[3-5]. 本研究构建以U6启动子控制下的能产生针对COL1A1的短发夹环状小干扰RNA(short hairpin RNA, shRNA)表达质粒, shRNA能在RNA多聚酶III(Pol HI)启动子的控制下从DNA模板合成, RNA Pol HI能介导3'端以4-5个T结尾的小的、非编码的转录的合成. 拟用构建质粒转染大鼠肝星状细胞, 筛选出能高效沉默I型胶原序列.

1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂真核表达载体pGPU6/GFP/Neo购自上海吉玛公司; *E. coli* JM109购自Promega公司; *E. coli* DH5 α 购自Invitrogen公司; 质粒抽提试剂盒购自Qiagen公司; 逆转录试剂盒购自Promega公司; TRIzol(r)试剂购自Invitrogen公司; 限制性内切酶BamHI、BbsI、T4连接酶、Taq酶, 脂质体转染试剂盒LipofectAMINE2000和DMEM购自宝生物工程(中国)有限公司; DNA2000Marker, G418(Gibco公司); 小牛血清购自杭州四季青生物公司; 大鼠肝星状T6细胞由中国肿瘤医院生物检测中心惠赠.

1.2 方法

1.2.1 目的基因RNAi靶点设计和合成shRNA: 在GenBank中找到大鼠HSC的 α 1(I)mRNA基因序列, 序列号为XM_001081230(GeneID: 29393), 应用Whitehead研究所的siRNA设计软件, 通过计算机网络(网站为<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNA>)辅助设计siRNA, 结合RNAi效率预测公式进行评估, 包括分析自由能特性, 与mRNA的空间可接触性, 排除偏靶(off-target)效应等, 最终筛选出3条理论上最佳的siRNA序列. Colla1-A: 5'-GAGTATGGAAGCGAAGGTTCC-3', 3'-CTCATACCTTCGCTTCCAAGG-5'. Colla1-B: 5'-ACAAGGTGACAGAGGCATAAA-3', 3'-TGTTCCACTGTCTCCGTATTT-5'. Colla1-C: 5'-TGATGGTTCTCCTGGCAAAGA-3', 3'-AC TACCAAGAGGACCGTTTCT-5'; 同时设阴性对照. 作为阴性对照的siRNA应和选中的siRNA序列有相同的组成, 但和mRNA没有明显的同源性. 将选中的siRNA序列打乱设计阴性对照序列 5'-GTTCTCCGAACGTGTCACGT-3', 5'-ACGT GACACGTTCCGGAGAA-3', 同样检查结果以保

■ 相关报道

有报道经门静脉注射肝纤维化大鼠CTGF siRNA发现, 治疗组大鼠肝组织CTGF mRNA及蛋白表达显著下调, 肝组织炎症、坏死及纤维化显著减轻. Kim *et al*将TGF β 1 siRNA用于CCl₄肝损伤大鼠模型同样发现, 肝脏表达TGF β 1、 β -SMA、I型胶原含量均明显下降.

■创新盘点

本研究通过RNA干扰的方法抑制大鼠肝星状细胞COL1A1 mRNA的表达,从而减少I型胶原的合成.

证和靶细胞中其他基因没有同源性. shRNA模板中的loop结构选用了TTCAAGAGA以避免形成终止信号, shRNA的转录终止序列采用T6结构. 正义链模板的5'端添加了CACC, 与*Bbs* I酶切后形成的黏端互补; 反义链模板的5'端添加了GATC, 与*Bam*H I酶切后形成的黏端互补; 如果siRNA的第一个碱基不是G, 则在CACC后补加一个G(以上正义链和反义链由上海吉玛生物公司合成). 将DNA oligo分别用TE(pH8.0)溶解, 浓度为100 μ mol/L. 取相应的正义链和反义链oligo溶液, 按照如下配比配置退火反应体系, 在PCR仪上按照如下程序进行退火处理: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 85 $^{\circ}$ C 5 min; 75 $^{\circ}$ C 5 min; 70 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C保存. 退火处理后得到的shRNA模板, 用于连接反应.

1.2.2 酶切和连接反应: 载体pGPU6/GFP/Neo经*Bam*H I, *Bbs* I双酶切, 37 $^{\circ}$ C酶切1 h, 琼脂糖电泳, 使用Agarose Gel DNA Purification Kit Ver2.0回收, 电泳检测估算浓度, 稀释浓度至50 mg/L. 将退火片段与经酶切后的载体混和进行连接反应, 置22 $^{\circ}$ C水浴反应过夜过夜.

1.2.3 重组质粒的转化、筛选和鉴定: 各取连接产物5 μ L接种到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中进行转化, 分别接种于卡那霉素抗性的LB平板上, 37 $^{\circ}$ C恒温箱培养过夜. 分别挑取单克隆菌落接种于LB培养液中(含卡那霉素终浓度为30 mg/L), 37 $^{\circ}$ C恒温摇床培养过夜, 用小提试剂盒小量提取质粒, 并分别用*Bam*H I, *Pst* I分别酶切鉴定. 阳性重组载体应该可以被*Bam*H I切开, 而不能被*Pst* I切开. 收集酶切鉴定正确的重组质粒, 送上海英骏生物技术有限公司进行测序鉴定. 将构建成功的载体分别命名为pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A、pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B、pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C、阴性对照载体pGPU6/GFP/Neo-shRNA-N. 将鉴定证实的细菌扩增培养, 摇至对数生长期, 每0.8 mL过夜培养细菌加0.2 mL无菌甘油, 混匀后-70 $^{\circ}$ C冰箱保存.

1.2.4 HSC-T6细胞培养及转染: 将大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)细胞接种至225 cm²培养瓶中, 每瓶加入15 mL DMEM混合培养液(含100 mL/L FBS及100 kU/L青霉素、100 g/L链霉素、4 mmol/L谷氨酰胺及1 mol/L HEPES), 置37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L恒温CO₂培养箱中, 细胞为贴壁生长, 每3天以2.5 g/L胰蛋白酶消化传代. 转染前一天24孔板培养细胞, 设定1、2、3、4 μ g, 不同量的DNA质粒, 每个四个复孔, 按照脂质体转染试剂盒LipofectAMINE2000操作说明转染细胞, 质粒和

脂质体以1:4配比, 转染后48 h, 消化细胞, 流式细胞仪测定转染效率. 选取最佳剂量进行转染, 转染后24 h传代, 加入G418进行筛选, G418浓度为600 mg/L, 2 wk后挑取单克隆株扩大培养. 获得稳定表达细胞系, 分别建立表达pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A、pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B、pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C和阴性对照的单克隆大鼠肝星状细胞株.

1.2.5 半定量RT-PCR测不同pGPU6/GFP/Neo-shRNA表达质粒对COL1A1的影响: 细胞总RNA提取按TRIzol操作说明书进行, COL1A1 mRNA和 β -actin的引物用引物设计软件Primer Premier5.0设计, 其中 β -actin为内参照. 引物由上海闪晶生物技术有限公司合成, 分别为Colla1 F: CATAAAGGGTCATCGTGGC Colla1 R: TCAGGCTCTTGAGGGTAGTGT; β -Actin-F: 5-TGACCCAGATCATGTTTGAGACC-3 β -Actin-R: 5-CAGTGGTACGACCAGAGGCA-3. 根据一步法RT-PCR试剂盒说明检测COL1A1. 并摄影后应用计算机图像分析系统行灰度扫描. 以与 β -actin的PCR产物DNA条带灰度值之比(COL1A1/ β -actin)作为反映COL1A1 mRNA水平的相对指标, 计算抑制率. 抑制率的计算为: 以条带灰度代表DNA的含量. 干扰载体对COL1A1 mRNA表达的抑制率采用下式计算: 抑制率(%) = $(1 - A1 \times A2c / A1c \times A2) \times 100$. A1: 转染干扰载体细胞的COL1A1 mRNA含量; A2: 转染干扰载体细胞的 β -actin mRNA的含量; A1c: 转染shRNA-N细胞的COL1A1 mRNA含量. A2c: 转染shRNA-N载体细胞 β -actin mRNA含量.

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示, 采用SPSS.13软件分析数据, 组间比较采用多组单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 质粒酶切鉴定 限制性内切酶*Pst* I酶和*Bam*H I双酶切质粒pGPU6/GFP/Neo-shRNA(图1A), 然后各取5 μ L酶切产物在10 g/L的琼脂糖凝胶上进行电泳(图1B-C). 图1B中M为1 amda/*E.co*l30 I; 左侧为pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A(1-6)和pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B(1-6)*Pst* I酶切结果; 其右侧为pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A和pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B(1-6)*Bam*H I酶切结果. 图1C中M为1amda/*E.co*l30 I; 左侧为pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C(1-6)和pGPU6/GFP/Neo-

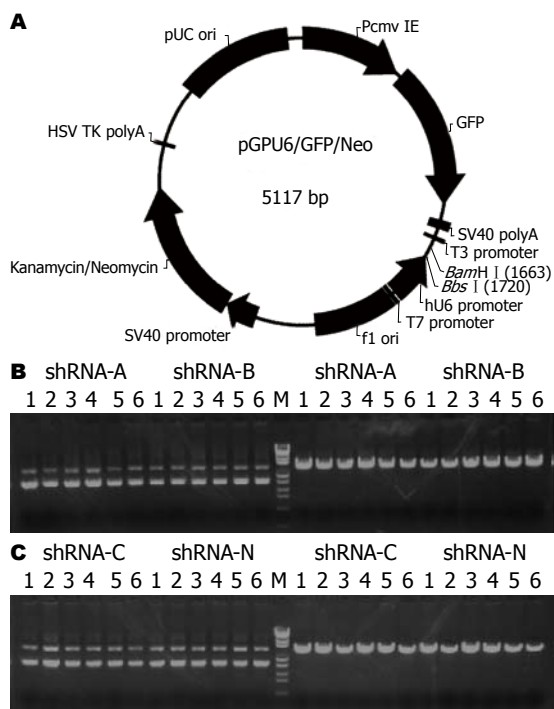


图1 质粒酶切鉴定。A: pGPU6/GFP/Neo-shRNA表达载体结构示意图; B-C: 重组载体的酶切鉴定。

shRNA-N(1-6)*Pst* I 酶切结果; 其右侧为pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C(1-6)和pGPU6/GFP/Neo-shRNA-N(1-6)*Bam*HI 酶切结果。

2.2 重组质粒的DNA测序鉴定和细胞转染效率测定 重组质粒经自动基因测序仪测序(上海英俊生物技术有限公司)。结果与设计序列完全相符, 所含目的基因序列准确无误, 重组质粒构建成功。真核表达载体pGPU6/GFP/Neo-shRNA带有一突变的绿色荧光蛋白的报告基因, 能发出高亮度的绿色荧光, 应用流式细胞仪分析转染效率显示, 1、2、3、4 μ g不同量的DNA质粒转染效率分别为 $16.7\% \pm 1\%$ 、 $20.3\% \pm 2\%$ 、 $23.5\% \pm 2\%$ 、 $22.3\% \pm 3\%$, 以2 μ g为最佳剂量。

2.3 稳定转染的细胞株中COL1A1 mRNA表达的检测 半定量RT-PCR检测HSC内COL1A1 mRNA水平, 结果显示空白组和pGPU6/GFP/Neo-shRNA-N无显著差异($P>0.05$)pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A、B、C、N各组之间均有显著性差异($P<0.001$, 表1)。

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病共有的病理改变, 其本质是以胶原为主的ECM合成增多, 而降解相对减少, 两者失去动态平衡, 致使过多ECM沉积于肝内^[6]。研究表明ECM中主要成分是胶原, 正常肝脏胶原蛋白占总蛋白5%-10%, 其中I型胶原蛋

表1 shRNA质粒干扰COL1A1-mRNA表达变化(目的基因/ β -actin灰度比)和抑制率

分组	灰度比	抑制率(%)
空白组	0.91 ± 0.03	0.10 ± 0.10
pGPU6/GFP/Neo-shRNA-N	0.90 ± 0.03	0.00 ± 0.03
pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A	0.75 ± 0.05	16.6 ± 0.40
pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B	0.33 ± 0.04	63.3 ± 0.30
pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C	0.18 ± 0.06	80.3 ± 0.60

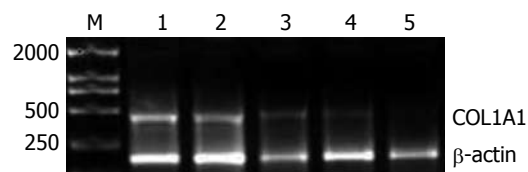


图2 M: DNA2000 marker; 1: 空白组; 2: pGPU6/GFP/Neo-shRNA-N; 3: pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A; 4: pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B; 5: pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C。

白占总胶原蛋白的40%-50%, III型胶原蛋白占总胶原蛋白的40%-50%, 肝纤维化时胶原蛋白可占总蛋白的50%甚至更多, 其中I型胶原蛋白占总胶原蛋白升至60%-70%, III型胶原蛋白降至20%-30%。可见肝纤维化时主要是肝脏中I型胶原过度增加的结果。进一步研究发现HSC合成分泌I型胶原为主, 且整个肝脏胶原合成的数量以HSC合成的胶原为主, 现已证明HSC激活是产生I型胶原导致纤维化发生发展的中心环节, 与肝脏内细胞, 基质, 介质相互作用构成了复杂的网络系统, 造成肝纤维化的发生发展^[7-11]。理论上, 如果设法能阻断HSC中 $\alpha 1(I)$ 链的合成, HSC中缺少 $\alpha 1(I)$ 链, 而不能和 $\alpha 2(I)$ 链结合产生前I型胶原, 从而达到减少I型胶原合成的目的, 有效阻止肝纤维化进展。

RNAi作为一种新型的基因研究手段和治疗手段, 逐渐被广泛应用到生命科学当中。在肝纤维化基因研究和治疗中, Kim *et al*^[12]利用以质粒为载体的TGF- $\beta 1$ siRNA注入到CCl₄肝纤维化大鼠体内, 结果发现I型胶原蛋白和 α -平滑肌动蛋白(α -SMA)表达水平下降, 肝脏损害减轻。我们可以看出RNA干扰对于肝纤维化治疗是一个很好的策略。由于RNAi具有高度特异性、高效性、高成功率和模板选择性、效果可预测并且迅速、经济, 具有良好的应用前景。有效的基因沉默, 需要设计和筛选特异、高效的靶基因RNAi序列, 以及通过有效方法把有效序列导入目的细胞是RNA干扰试验成功的关键^[13-15]。我们

应用要点

利用RNA干扰抑制COL1A1 mRNA的表达, 为进一步治疗肝脏纤维化提供了方法和途径。

同行评价

本文选材新颖, 技术先进, 论据充分, 国内外相关报道较少, 有一定的应用价值.

在设计RNA干扰有效序列是通过计算机网络进行第一步设计, 然后根据Tuschl新算法的设计原则既(N4)A(N6)T(N2)H(N5)W(N2), 其中N为任意核苷酸, A为腺嘌呤, T为胸腺嘧啶, H为不是鸟嘌呤, W为是A而不是G或C(胞嘧啶), 选取和上述原则相近的序列, 排除偏靶(off-target)效应, 最终筛选出3条理论上最佳的序列, 结果和原则最为相近的序列沉默效果最好, 而其他较差, 考虑和序列作用靶点有关^[16-21]. 通过实验我们可以看到结合多种筛选方式选择有效序列, 能大大提高筛选成功率, 节约实验成本, 节省实验时间. 将siRNAs转入细胞是RNA干扰关键技术之一, 常规方法有: 脂质体转染、电穿孔法、微注射法^[22-24]. 电穿孔法和微注射法操作复杂, 并且细胞死亡率较高, 而且需要较好的设备, 虽然脂质体(本课题使用LipfectamineTM 2000)转染试剂介导的转染, 操作简单, 而且不需要复杂的设备, 可以直接转染小的siRNA, 又可以转染质粒DNA, 且适合多种细胞类型使用, 但也存在对于不同细胞转染效率不一, 本课题转染细胞株效率不高, 进行G418稳定筛选, 工作量加大, 实验成本增加. 因此进一步研究高效导入HSC工具, 是十分必要的, 近年来相关实验, 应用腺相关病毒和慢病毒作为载体越来越多, 但腺病毒的免疫效应需进一步改善, 而以慢病毒为载体, 目的片段被整合到基因组当中, 这是否造成肿瘤的发生需要进一步研究^[25-27].

总之, 本实验的siRNA设计是成功的, 除pGPU6/GFP/Neo-shRNA-A抑制无明显效果外, pGPU6/GFP/Neo-shRNA-B和pGPU6/GFP/Neo-shRNA-C均产生了很好的抑制效果, 在COL1A1 mRNA水平均能较显著抑制COL1A1的表达, 而且设计的shRNA-C靶点抑制效率达到80.3%, 表明我们筛选出了具有高效沉默COL1A1的小干扰RNA表达质粒, 为深入研究肝纤维化的RNAi靶向基因治疗体内实验奠定了基础.

参考文献

- 施贵静, 赵金满. 肝星形细胞的生物学特性和肝纤维化. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1179-1183
- Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515
- Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 505-508
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
- Sarem M, Znaidak R, Macias M, Rey R. Hepatic

- stellate cells: it's role in normal and pathological conditions. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 93-101
- Rockey DC. Antifibrotic therapy in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 95-107
- Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
- Shen H, Fan J, Burczynski F, Minuk GY, Cattini P, Gong Y. Increased Smad1 expression and transcriptional activity enhances trans-differentiation of hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2007; 212: 764-770
- Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S79-S84
- Brandao DF, Ramalho LN, Ramalho FS, Zucoloto S, Martinelli Ade L, Silva Ode C. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. *Acta Cir Bras* 2006; 21 Suppl 1: 54-57
- Blum HE. Molecular therapy and prevention of liver diseases. *Adv Med Sci* 2007; 52: 29-36
- Kim KH, Kim HC, Hwang MY, Oh HK, Lee TS, Chang YC, Song HJ, Won NH, Park KK. The antifibrotic effect of TGF-beta1 siRNAs in murine model of liver cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 1072-1078
- Harborth J, Elbashir SM, Vandenburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Weber K, Tuschl T. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003; 13: 83-105
- Hamada M, Ohtsuka T, Kawaida R, Koizumi M, Morita K, Furukawa H, Imanishi T, Miyagishi M, Taira K. Effects on RNA interference in gene expression (RNAi) in cultured mammalian cells of mismatches and the introduction of chemical modifications at the 3'-ends of siRNAs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002; 12: 301-309
- Ohnishi Y, Tokunaga K, Hohjoh H. Influence of assembly of siRNA elements into RNA-induced silencing complex by fork-siRNA duplex carrying nucleotide mismatches at the 3'- or 5'-end of the sense-stranded siRNA element. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 516-521
- Hossbach M, Gruber J, Osborn M, Weber K, Tuschl T. Gene silencing with siRNA duplexes composed of target-mRNA-complementary and partially palindromic or partially complementary single-stranded siRNAs. *RNA Biol* 2006; 3: 82-89
- Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet CM. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9632-9636
- Miyagishi M, Taira K. Development and application of siRNA expression vector. *Nucleic Acids Res Suppl* 2002; 113-114
- Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 497-500
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A,

- Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 22 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15: 188-200
- 23 Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001; 20: 6877-6888
- 24 Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002; 26: 199-213
- 25 Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 326-330
- 26 Qu Z, Lou D, Pan Y. The role of IkappaBalpha in TNF-alpha-induced apoptosis in hepatic stellate cell line HSC-T6. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007; 27: 407-410
- 27 Mao HX, Yi ZW, Wu XC, Dang XQ, He XJ, Cao Y, Mo SH. Effects of siRNAs silencing transforming growth factor-beta1 on fibronectin in SD rat masangial cells. *Zhonghua Erke Zazhi* 2007; 45: 494-497

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^a $P<0.05$, ^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, 表内个位数、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, 并拷入光盘内; 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 2008-05-28)

高灵敏度薄膜生物传感器基因芯片系统的研制

宋家武, 信芝, 姚蓝, 李啸峰, 唐健熹, 周小军, 吴波, 孙爱静, 吴洲清

■背景资料

基因芯片技术是1990年代发展起来的一项高新生物技术, 以其检测时的高通量以及平行分析的特点, 一直为专家学者所瞩目, 被越来越多地应用于临床诊断。但传统的芯片平台因基于荧光标记技术, 应用时需要昂贵的扫描设备以及操作复杂, 技术要求高, 在临床应用中一直难以推广普及。

宋家武, 信芝, 姚蓝, 李啸峰, 唐健熹, 周小军, 吴波, 中山大学附属第五医院消化内科 广东省珠海市 519000

宋家武, 孙爱静, 珠海赛乐奇生物技术有限公司 广东省珠海市 519000

吴洲清, 武汉大学附属中南医院肿瘤科 湖北省武汉市 430071

宋家武, 华中科技大学同济医学院博士, 硕士生导师, 留美高级访问学者, 主要从事肝脏病学及消化病学的基因诊断和基因治疗相关研究。

科技部国家创新基金资助项目, No. 06C26214401607

广东省科技计划项目, No. 2006B36030019

珠海市科技计划项目, No. PC20041050

广西壮族自治区科技计划项目, No. 0330004-16

珠海市留学回国人员创新创业基金, No. 珠留资200609

湖北省自然科学基金, No. 2004AA301C98

湖北省科技攻关项目, No. 2005AA304B05

作者贡献分布: 此课题由宋家武设计; 研究过程由宋家武、信芝、姚蓝、唐健熹及吴波操作完成; 论文写作由宋家武和信芝完成; 数据分析由宋家武、李啸峰及周小军完成; 研究所用试剂及芯片由孙爱静提供; 病例收集由宋家武、信芝、姚蓝及吴洲清完成。

通讯作者: 宋家武, 519000, 广东省珠海市梅华东路52号, 中山大学附属第五医院消化内科, songjw@sinochips.cn

电话: 0756-3318499

收稿日期: 2007-11-13 修回日期: 2008-03-14

Development of clinical highly sensitive biosensor-based microarray system

Jia-Wu Song, Zhi Xin, Lan Yao, Xiao-Feng Li, Jian-Xi Tang, Xiao-Jun Zhou, Bo Wu, Ai-Jing Sun, Zhou-Qing Wu

Jia-Wu Song, Zhi Xin, Lan Yao, Xiao-Feng Li, Jian-Xi Tang, Xiao-Jun Zhou, Bo Wu, Department of Digestive Diseases, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Jia-Wu Song, Ai-Jing Sun, Zhuhai Sinochips Biotechnology Co. Ltd, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Zhou-Qing Wu, Department of Tumor, the Affiliated Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Supported by: the National Innovation Fund for Technology Based Firm Projects, No. 06C26214401607; the Key Science and Technology Projects of Guangdong Province, No. 2006B36030019; the Key Science and Technology Projects of Zhuhai City, No. PC20041050; the Key Science and Technology Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0330004-16; the Innovation Fund for the Returned Overseas Chinese Scholars, No. 200609; the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2004AA301C98; and the Key Science and Technologies Projects of Hubei Province, No. 2005AA304B05

Correspondence to: Jia-Wu Song, Department of Digestive Diseases, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China. songjw@sinochips.cn

Received: 2007-11-13 Revised: 2008-03-14

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

Abstract

AIM: To develop a sensitive and less instrument-dependent clinical microarray system, in which the microarray signal can be amplified in situ and identified by naked eyes.

METHODS: A group of capture probes for a specific target nucleic acid that was made according to a specific region such as hepatitis B virus (HBV) YMDD motif were arrayed on a thin-film biosensor in a well. A set of detected probes labeled with Au nanoparticle were used to take the place of the fluorescence labeled probes in classic microarray. The single-strand PCR product was reacted with the capture and detected probes and the deposition of capture-biotin-streptin-Au nanoparticle compound appeared on the surface of the microarray. After *in situ* amplification in this sensitive system, we could read the signal on this chips by naked eyes or the digital camera. HBV YMDD mutation detection was applied to identify the sensitivity and specificity of the microarray system.

RESULTS: The signal of the biosensor microarray could be acquired by common camera or naked eyes without instruments and we could determine the kind of mutation according to the place of the positive signal. The signal-noise ratio were high enough to make the signal absolutely yes and no both in synthesized target oligos and serum samples. The microarray could identify a single base change of selected lamivudine resistance-related mutation as well as multiple mutations at the same time with a high stability, sensitivity, and specificity. We used the biosensor system to test 23 serum samples with YMDD mutation, and the result was coincident with the sequencing result and the signal could be acquired by naked eyes.

CONCLUSION: The thin-film based microarray system which exploits nanoparticle material and biosensor technique can amplify the signal in situ that can be detected by simple instruments or even unaided eyes. Its attractive features are

the nonintervention of instrumentation required to detect signal, as well as its high versatility and accuracy.

Key Words: Biosensor; Microarray; *In situ* amplification; Nanoparticle

Song JW, Xin Z, Yao L, Li XF, Tang JX, Zhou XJ, Wu B, Sun AJ, Wu ZQ. Development of clinical highly sensitive biosensor-based microarray system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1628-1633

摘要

目的: 在传统基因芯片技术基础上, 应用生物传感器技术, 研制一种能将基因芯片信号原位放大后达肉眼判读灵敏度, 无需专用基因芯片检测仪器就可使用, 易于在基层医疗单位推广的薄膜生物传感器基因芯片诊断系统。

方法: 在薄膜生物传感器基片基础上, 经过表面化学处理, 使特定的基因捕获探针在传感器表面固定, 形成特定检测目的生物传感器基因芯片。并以乙肝病毒YMDD区的特异序列设计为例, 通过特定的YMDD区的捕获探针, 以矩阵的形式点样于传感器芯片表面来实现本系统。同时, 纳米金标记的检测探针取代了传统芯片中的荧光标记探针。扩增后的目的PCR片段与捕获探针、生物素标记探针、链亲蛋白纳米金探针进行反应, 最后得到探针-生物素-链亲蛋白-纳米金复合物, 并在芯片表面经生物传感器芯片将信号原位放大, 获得肉眼观的芯片信号并进行分析, 完成芯片诊断。以乙型肝炎病毒YMDD突变为例, 观察该芯片系统对临床诊断标本诊断的可靠性。

结果: 基因芯片的检测信号经生物传感器原位放大后能肉眼判读或借助普通数码照像机或计算机扫描, 根据信号出现的特定位置即可确定突变的类型。且该生物传感器基因芯片系统信噪比高, 在人工合成的寡核苷酸及临床血清的检测中, 均可实现生物芯片阴阳性信号完全的有或无的判读; 临床血清标本检测证实, 使用该传感器芯片系统对前期经过测序确定为YMDD突变的23份临床血清结果与测序结果完全一致。

结论: 薄膜生物传感器基因芯片集纳米材料、生物传感器技术及原位放大技术为一体, 实现了信号的肉眼判读, 具有通用性高, 准确可靠, 无需大型设备, 易于在基层医疗单位推广使用。

关键词: 生物传感器; 基因芯片; 原位放大; 纳米

宋家武, 信芝, 姚蓝, 李啸峰, 唐健熹, 周小军, 吴波, 孙爱静, 吴洲清. 高灵敏度薄膜生物传感器基因芯片系统的研制. *世界华人消化杂志* 2008; 16(15): 1628-1633

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1628.asp>

0 引言

基因芯片技术自问世以来^[1], 以其基于核酸杂交的检测高度特异性, 检测时的高通量以及平行分析的特点^[2-5], 1998年被美国科学促进会评为当年十大科技进展之一^[6], 并将为临床基因诊断提供高效、高度特异的基因诊断技术, 为医学诊断及治疗技术进步做出杰出的贡献, 解决传统基因诊断技术所不能解决的系列难题^[7-9]。

传统的基因芯片技术, 无论是微阵列, 还是原位合成的寡核苷酸基因芯片, 均使用荧光标记探针技术^[10-11], 应用时需要昂贵的激光扫描设备^[12], 此外, 传统技术不能完全消除阴性信号, 阴阳性信噪比对比低, 存在人为判断其阴阳性结果。这些因素严重制约了基因芯片技术在临床中的广泛应用。本款基因芯片在前期系列研究基础之上^[13-16], 应用金银纳米材料标记技术及生物传感器技术, 将检测信号特异性原位放大, 肉眼或只需简单光学设备和仪器就能实现信号的准确判读, 较好地解决了基因芯片在临床应用中的瓶颈问题。

1 材料和方法

1.1 材料 在直径约10-20 mm硅片上按真空气相沉积法镀膜镀以一定厚度的氮化硅, 再用旋转真空镀膜机将TSPS(T结构聚氨二甲基硅烷烃, UCT, Bristol, PA)的薄膜^[17-18], 制备出相应的生物传感器基片, 再镀以多聚苯丙氨酸-赖氨酸涂层, 最后经1-10 fmol/L盐酸琥珀酰亚胺基胍烟酸盐处理约20 min, 清水洗净供芯片制作。

1.2 方法 为实现对突变位点的特异性诊断, 我们以乙型肝炎病毒L528M突变位点设计了2个位点检测的检测探针, 并在标记探针的3'端进行生物素标记, 由美国(Invitrogen Life Tech)合成, HPLC纯化, 以便于与金纳米材料标记链亲蛋白(streptavidin)商业化纳米金探针交联。基因捕获探针C1的设计: 经检索分析现有基因库(www.ncbi.nlm.nih.gov)中所有乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)基因序列, 选择HBV高度保守的P基因YMDD区附近区域片段, 设计相应的探针并由美国合成(Invitrogen Life Tech)相应的探针^[13]。上述高效液相色谱纯化的捕获探针, 由

■ 研发前沿

近年来, 芯片技术的发展较快, 特别是临床应用类芯片, 成为各国竞相发展的领域。其突破点主要是从改变其基于荧光分子的探针标记技术及降低检测设备成本入手。

■创新盘点

本研究实现了基因芯片生物检测信号的原位放大,达到肉眼观水平。

珠海赛乐奇生物技术有限公司按以下矩阵(图1A)用德国Gisem Nanoplotter芯片点样仪进行点样,室温下与生物传感器芯片表面的化学涂层进行化学反应,形成共价结合的化合物,经清水漂洗,干燥,备用。传统基因芯片的制备方法同我们研究相同。采用化学合成的含有L528M突变的DNA寡核苷酸(表1)、我室保存的YMDD突变质粒及长期使用拉米夫定的患者血清作为阳性标准品^[13-14]。按以往文献报道方法^[13-15],制备相应的传统基因芯片,并将上述阳性标准品及扩增的PCR产物进行检测。目的基因片段的PCR扩增按以下引物: L: 5'-GAT GTG TCT GCG GCG T-3', R: 5'-GTA AACTGA GCC AGG AGA AA(GenBank 4490408)为引物,在50 μ L的PCR扩增体系中加入20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L $MgCl_2$ 及0.2 mmol/L dATP, dGCT, dTTP和dCTP(Amersham, UK)及100 nmol/L引物1 μ L,再加入Taq酶33.34 nkat,经95 $^{\circ}$ C 5 min预变性后,再以94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s和72 $^{\circ}$ C 30 s为一周期,30个循环扩增。扩增后的PCR扩增产物95 $^{\circ}$ C加热3 min,迅速置于冰上;取10 μ L PCR扩增产物加入到25 μ L 2 \times 连接酶混合液,加水至50 μ L(以上试剂由珠海赛乐奇生物技术有限公司提供),并据公司操作说明按以下步骤进行:将60 $^{\circ}$ C预热连接酶混合液芯片上,在60 $^{\circ}$ C反应10 min; 0.01 mol/L NaOH洗涤3 \times 5-10 s;再将芯片置0.1 \times SSC中洗涤3 \times 1-2 min;空气干燥,将制备的streptoavidin金纳米探针每片3滴滴于芯片表面,常温反应5 min;用0.1 \times SSC洗涤芯片3次 \times 1-2 min;并在最后用干净空气吹干芯片表面,凉干后扫描或数码相机照相,计算机判读结果。

2 结果

2.1 基因芯片可见光信号的实现 我们通过改变传统的探针,将特异性杂交探针3'端标以生物素分子,该特异性杂交探针再与可见包被有纳米金颗粒的链亲蛋白结合,形成纳米金探针^[19],该探针在可见光条件下,即可实现信号的显示(图2),成功实现了传统荧光探针至可见光探针的转化,为实现信号的肉眼判读奠定了基础。基于纳米金探针有效地替代了传统芯片基于荧光标记的探针,但其灵敏度,肉眼条件下的观察,与荧光探针标记的激光扫描仪下获得的检测信号比较,灵敏度较低,不易形成稳定的阳性信号(宋家武,未发表资料)。而本芯片研究结果显示:

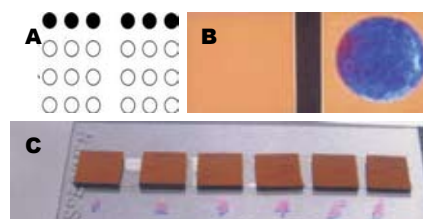


图1 矩阵及杂交信号。A: 生物传感器芯片点样矩阵; B: 放大照片; C: 实际结果。

生物传感器基因芯片能有效地在原位放大基因芯片上杂交后的生物信号,在肉眼条件下,或借助简单的数码相机,获得清晰的阳性和阴性信号(图1B-C)。

2.2 检测的灵敏度和阴阳性信号对比度 为研究在肉眼可观察的条件下,本芯片可检测的DNA水平,我们合成了L528M单链DNA,分别稀释成1、0.1、0.01、0.001 μ mol/L,取1 μ L进行检测,其最低检测浓度为0.01 μ mol/L,即最低检测病毒载量浓度为 1×10^{-14} mol/L,图2)。专用的生物传感器基因芯片信号处理技术,有效增强了信号特异性;显著增加阴阳性信号对比度,并有效地消除了背景信号。我们在芯片系统中引入了珠海赛乐奇生物技术有限公司的专利信号处理技术^[16],在生物传感器芯片有效放大检测信号的同时,有效地降低了背景信号,与传统基因芯片比较,真正实现了检测阳性信号与阴性信号有和无的分辨(图3A-B)。

2.3 检测YMDD突变的特异性 为了验证YMDD突变检测基因芯片对YMDD突变检测的特异性,我们应用化学合成的含有YMDD突变位点的寡核苷酸链作为阳性标准品及YMDD突变质粒对芯片以往经测序证实的23份血清,对其中的共46个次突变位点标本进行了检测,结果如前面图显示:所有样本的突变均能实现完全有或无显示,阴阳性结果对比显著,阴性结果完全无信号。

3 讨论

基因芯片技术是1990年代发展起来的一项高新生物技术^[1,6,20-21],他可以实现一次检测全基因组在特定条件下的基因表达或检测全基因组或特定的核苷酸或序列的改变。在各种基因相关性疾病,如传染病和遗传性疾病的诊断、基因多态性分析等具有独特的应用前景^[22-26]。

基于荧光标记探针的基因芯片检测技术是其使用时需要大型设备的根本原因^[27]。由于其信号弱,必须经过激发,才能发光,需要精密而

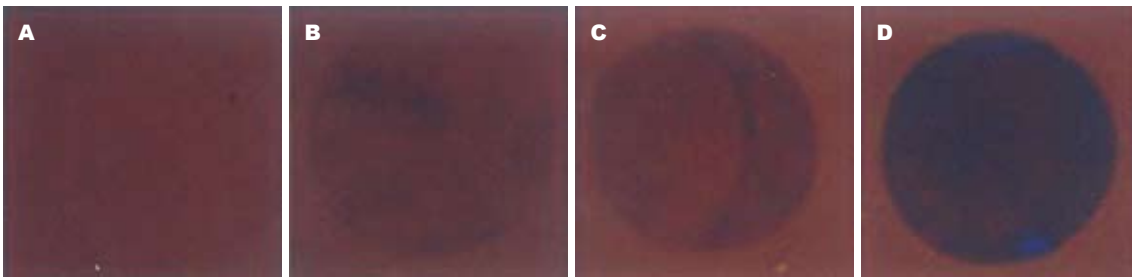


图 2 不同浓度人工合成的L528M寡核苷酸在本基因芯片上的检测效果. A: 0.001 $\mu\text{mol/L}$; B: 0.01 $\mu\text{mol/L}$; C: 0.1 $\mu\text{mol/L}$; D: 1 $\mu\text{mol/L}$.

■应用要点
本款基因芯片实现了基因芯片信号的肉眼判读, 集高度的灵敏度、特异性及可重复性于一体, 背景清晰, 能特异性鉴别单个或多个基因位点的突变, 操作简单, 成本低廉, 是一种既经济又可靠的新型基因芯片技术, 具有广阔的临床应用前景.

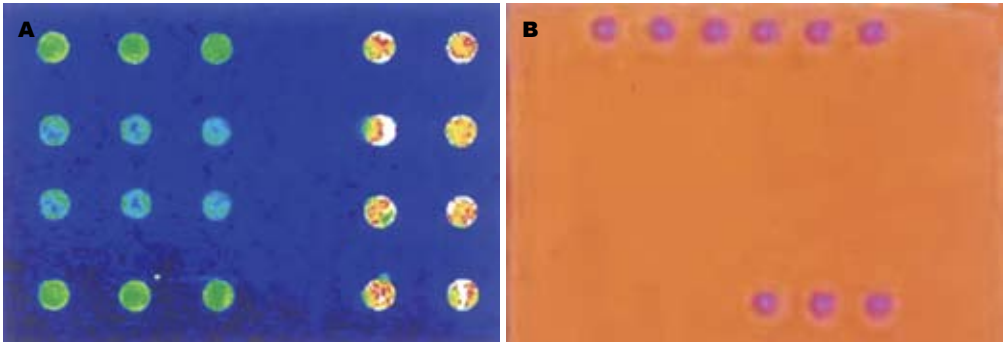


图 3 生物传感器基因芯片与传统基因芯片信号. A: 传统基因芯片; B: 生物传感器基因芯片阴阳性信号的完全有和无效果.

表 1 特异性标记性探针序列	
L528M位点突变检测捕获探针	AAAAAAAAAACGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCT AAAAAAAAAACGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCA
L528M检测标记探针	TGGCTCAGTTTACTAGTGCC-biotin
乙型肝炎YMDD区PCR扩增引物	TGCACCTGTATCCCATCC TTTGTATTAGGAGGCTGTAG
L528M阳性单链寡核苷酸	L528M A GGCAGTAGTAAACTGAGCCAAGAGAAACGGACTGAGGCCC L528M T GGCAGTAGTAAACTGAGCCATGAGAAACGGACTGAGGCCC

昂贵的激光扫描设备. 在临床检测应用过程中, 由于检测单位需要投资购置大的激光扫描设备, 一方面, 显著增加了进行相关检测的投资成本, 另一方面, 亦直接增加了应用的成本, 显著地限制了该技术的应用范围, 并成为该技术在临床推广中的瓶颈问题. 因此, 从技术上解决其需要使用基因芯片扫描仪的必备条件是, 改变其基于荧光分子的探针标记方法和技术. 早期Taton *et al*研究报告提示^[28], 基因芯片的检测信号可望通过纳米金材料技术的应用, 实现基因芯片检测信号由传统的荧光信号转化为可见光判读, 从而有望解决技术推广中需要荧光扫描仪的难题. 本研究结果表明, 纳米金标记的探针技术, 完全可以实现基因芯片信号的可见光判读. 然而, 在现有临床检测条件下, 现有纳米材料可见光探针技术在临床应用过程中, 存在着灵敏度

偏低, 普通光学设备判读时, 灵敏度不够和获得信号欠稳定的问题(宋家武, 未发表资料). 因此, 其检测信号有待更进一步的放大, 其技术有待更进一步的完善.

生物传感器技术, 品种繁多, 对待检信号的实现方法很多, 如光电传感, 压电传感, 化学传感等传感器技术^[29-31]. 本芯片平台引入了生物传感器原位放大技术, 使临床检测用的基因芯片信号, 转化为可见光信号, 并经原位放大, 达到肉眼观水平, 从而有效地解决了这一棘手的推广问题, 为临床上广泛使用基因芯片诊断多基因, 多位点突变疾病, 提供了一种全新的诊断技术. 我们开发研制的该款基因芯片有效地整合当前的多项高新技术, 特别是创造性地将生物传感器技术与基因芯片技术、纳米材料技术及通用纳米材料探针技术进行整合, 并充分利

■同行评价

本研究内容新颖,论据充分,结论明确,讨论条理分明,但实验对照的设计欠合理可靠。

用了多项技术特点,实现了基因芯片生物检测信号的原位放大,显著地提高了检测的灵敏度,实现了基因信号的肉眼判读或应用简单数字成像设备如数码相机、CCD成像即可获取信号,从而从技术上解决了不需要荧光扫描仪等大型设备的难题。与传统的基因芯片相比,本技术和产品在灵敏度上,较之传统的基因芯片技术,将信号放大了数个数量级,灵敏度显著增加。另一方面,由于杂交洗涤条件的革新,在确保了特异性阳性信号实现的条件下,由于杂交洗脱条件严谨,非特异性信号降低至最低程度。与传统的基因芯片技术相比,真正实现了阴阳性信号的特异性检测。同时,该基因芯片开发出能基于高温连接酶技术的特异性信号实现方式,有效地降低了背景,使信噪比显著提高,在信号上完全实现了有和无的分辨。

总之,本研究结果证明,本款基因芯片集生物传感器基因芯片技术与纳米材料技术为一体,实现了基因芯片信号原位特异性放大,达到肉眼判读的水平,具有高度的灵敏度、特异性及可重复性,背景清晰,能特异性鉴别单个或多个基因位点的突变,操作简单,成本低廉,有效地解决了传统基因芯片在应用过程中,需要大型检测设备、不利于推广的瓶颈问题,是一种既经济又可靠的新型基因芯片技术。

4 参考文献

- Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 1991; 251: 767-773
- Pellois JP, Zhou X, Srivannavit O, Zhou T, Gulari E, Gao X. Individually addressable parallel peptide synthesis on microchips. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 922-926
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 10614-10619
- Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000; 405: 827-836
- Xiao Y, Segal MR, Yang YH, Yeh RF. A multi-array multi-SNP genotyping algorithm for Affymetrix SNP microarrays. *Bioinformatics* 2007; 23: 1459-1467
- Breakthrough of the year. The runners-up. *Science* 1998; 282: 2157-2161
- Gerhold DL, Jensen RV, Gullans SR. Better therapeutics through microarrays. *Nat Genet* 2002; 32 Suppl: 547-551
- Ragoussis J, Elvidge G. Affymetrix GeneChip system: moving from research to the clinic. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6: 145-152
- Shomaker TS, Ward K. Microarray technology in biomedical research. *Hawaii Med J* 2006; 65: 253-256
- Duyk GM. Sharper tools and simpler methods. *Nat Genet* 2002; 32 Suppl: 465-468
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-470
- 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 461-463
- Song J, Lin J, Ni X, Kong X, Wu H, Xie Y, Mao Y. Development of lamivudine-resistance microarray and its reliability in clinical examination. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002; 10: 468
- Song JW, Lin JS, Kong XJ, Liang KH. Clinical study of oligonucleotide microarray on monitoring the lamivudine-resistance mutations in hepatitis B virus. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003; 11: 361-363
- 宋家武, 林菊生, 孔心涓, 梁扩囊. 检测拉米夫定耐药位点基因芯片的研制及其应用初探. *中华检验医学杂志* 2003; 25: 83-85
- 宋家武, 杨又春. 一种高灵敏度生物传感器基因芯片及临床诊断技术. *中华人民共和国知识产权局* CN200610024197.8
- Jenison R, La H, Haeberli A, Ostroff R, Polisky B. Silicon-based biosensors for rapid detection of protein or nucleic acid targets. *Clin Chem* 2001; 47: 1894-1900
- Jenison R, Yang S, Haeberli A, Polisky B. Interference-based detection of nucleic acid targets on optically coated silicon. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 62-65
- Huhtinen P, Soukka T, Lovgren T, Harma H. Immunoassay of total prostate-specific antigen using europium(III) nanoparticle labels and streptavidin-biotin technology. *J Immunol Methods* 2004; 294: 111-122
- Marshall A, Hodgson J. DNA chips: an array of possibilities. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 27-31
- Service RF. Microchip arrays put DNA on the spot. *Science* 1998; 282: 396-399
- Belgrader P, Benett W, Hadley D, Long G, Mariella R Jr, Milanovich F, Nasarabadi S, Nelson W, Richards J, Stratton P. Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument. *Clin Chem* 1998; 44: 2191-2194
- Debouck C, Goodfellow PN. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet* 1999; 21: 48-50
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 1999; 21: 20-24
- Sapolsky RJ, Hsie L, Berno A, Ghandour G, Mittmann M, Fan JB. High-throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays. *Genet Anal* 1999; 14: 187-192
- Jain KK. Applications of biochips: from diagnostics to personalized medicine. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2004; 7: 285-289
- Kricka LJ. Nucleic acid detection technologies -- labels, strategies, and formats. *Clin Chem* 1999; 45: 453-458
- Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes.

- 29 *Science* 2000; 289: 1757-1760
- Ferrari M, Cremonesi L, Bonini P, Stenirri S, Foglieni B. Molecular diagnostics by microelectronic microchips. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5: 183-192
- 30 Ferrari M, Stenirri S, Bonini P, Cremonesi L. Molecular diagnostics by microelectronic microchips. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 462-467
- 31 Kumar Khanna V. Existing and emerging detection technologies for DNA (Deoxyribonucleic Acid) finger printing, sequencing, bio- and analytical chips: a multidisciplinary development unifying molecular biology, chemical and electronics engineering. *Biotechnol Adv* 2007; 25: 85-98

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 •

第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入 新技术研讨会征文通知

本刊讯 为满足全国专家、学者和临床一线医师对消化性病变介入/内镜新技术研究、探讨和交流的需求, 进一步提升国内消化系疾病尤其是消化道恶性病变介入/内镜诊治的技术水平, 上海同仁医院联合福建省肿瘤医院, 定于2008-11-7/12在福建省福州市举办第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会。会议由福建省抗癌协会、福建省消化内镜学会和福建省放射学会介入学组具体承办。中华消化内镜学杂志、中华放射学杂志、世界华人消化杂志和介入放射学杂志共同参与协办。会议将着重介绍消化道病变内镜治疗、介入放射学治疗、肿瘤内外科治疗的新理论、新技术和新方法, 为各相关交叉学科之间的相互交流和研讨搭建一个平台。本次会议拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管和胃肠道等消化道管腔内支架治疗应用技术和发生的问题, 以及消化道病变的消化内镜、介入放射和内外科治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨。会议中还将安排疑难案例讨论及手术操作演示, 内容精彩。参会者将授予国家级一类继续医学教育学分10分。

1 征稿内容

消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等; 消化系良性病变(如: 门静脉高压、胆道结石和消化道出血等)的内镜及介入新技术应用; 消化病诊治边缘交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验和个案报告等稿件。

2 征稿要求

(1)专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文; (2)论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果和结论四要素。经验交流、短篇报道等全文限1000字以内; (3)所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文。优秀论文将安排在国家级杂志上发表; (4)邮寄稿件要求Word格式打印, 并附软盘, 特别鼓励E-mail投稿(以附件Word格式传送); (5)截稿日期: 2008-08-31。

3 联系方式

林海澜, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院介入科. hailan@pub2.fz.fj.cn; 手机: 13850171973, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120

施宏, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院内镜科. endoshihong@hotmail.com; 手机: 13959105615, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120

金属蛋白酶抑制基因RECK在食管鳞癌中的表达及生物学意义

高冬玲, 李晟磊, 陈奎生, 赵志华, 赵秋民, 刘宗文, 张云汉

■背景资料

RECK基因是1998年发现的一种新型转移抑制基因, 通过抑制MMP活性与肿瘤血管生成从而阻断肿瘤侵袭和转移。本研究对其在食管鳞癌组织中蛋白及mRNA表达水平的检测有助于研究RECK基因与食管鳞癌发生、发展的关系。

高冬玲, 李晟磊, 陈奎生, 赵志华, 赵秋民, 刘宗文, 张云汉, 郑州大学第一附属医院病理科; 河南省肿瘤病理重点实验室 河南省郑州市 450052

高冬玲, 高级实验师, 副主任技师, 主要从事肿瘤病理的研究。

“十五”“211工程”重点学科建设基金资助项目, No. 2002-2

作者贡献分布: 此课题由张云汉和陈奎生指导; 高冬玲和李晟磊设计; 研究过程由高冬玲、李晟磊、赵志华、赵秋民及刘宗文操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由赵秋民提供; 数据分析由高冬玲和李晟磊完成; 本论文写作由高冬玲和李晟磊完成。

通讯作者: 张云汉, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 郑州大学第一附属医院病理科; 河南省肿瘤病理重点实验室。 yhzhang@zzu.edu.cn

电话: 0371-66658175 传真: 0371-66658175

收稿日期: 2008-01-02 修回日期: 2008-03-03

Expression and biological significance of matrix metalloproteinase inhibitor RECK gene in esophageal squamous cell carcinoma

Dong-Ling Gao, Sheng-Lei Li, Kui-Sheng Chen, Zhi-Hua Zhao, Qiu-Min Zhao, Zong-Wen Liu, Yun-Han Zhang

Dong-Ling Gao, Sheng-Lei Li, Kui-Sheng Chen, Zhi-Hua Zhao, Qiu-Min Zhao, Zong-Wen Liu, Yun-Han Zhang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the “Tenth Five-Year Plan” Research Foundation for the Key Constructional Project (211 Project) of Zhengzhou University, No. 2002-2

Correspondence to: Yun-Han Zhang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, 40 Daxue Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. yhzhang@zzu.edu.cn

Received: 2008-01-02 Revised: 2008-03-03

Abstract

AIM: To explore the expression of reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs (RECK) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its correlations with the occurrence and development of ESCC.

METHODS: A total of 62 ESCC specimens, resected in Anyang Tumor Hospital of Henan Province

from February 26 to March 16, 2006, were collected. All the cases didn't receive chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy. SP immunohistochemical method and *in situ* hybridization were used to detect the expression of RECK protein and mRNA in the 62 carcinoma specimens, 31 cancer-adjacent specimens (within 3 cm) and 62 normal esophageal epithelial specimens.

RESULTS: The protein and mRNA expression of RECK were closely related with the tumor grades, infiltration and lymphatic metastasis in ESCC. The expression rates of RECK protein were increased ordinally in carcinoma specimens, cancer-adjacent epithelium and normal esophageal epithelial specimens, and there was a significant difference in group comparison (RECK protein: $\chi^2 = 10.331$, $P < 0.01$; RECK mRNA: $\chi^2 = 19.186$, $P < 0.01$). There was a positive correlation between the protein and mRNA expression of RECK ($r = 0.416$, $P < 0.01$) in ESCC.

CONCLUSION: Lower expression of RECK has a correlation with the pathogenesis of and development of ESCC, and RECK may be a new assistant index for early diagnosis and prognosis of ESCC.

Key Words: Reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs; Esophageal squamous cell carcinoma; Immunohistochemistry; *In situ* hybridization

Gao DL, Li SL, Chen KS, Zhao ZH, Zhao QM, Liu ZW, Zhang YH. Expression and biological significance of matrix metalloproteinase inhibitor RECK gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1634-1638

摘要

目的: 研究RECK基因在食管鳞癌组织中的表达情况及其与食管鳞癌发生、发展的关系。

方法: 2006-02-26/2006-03-16河南省安阳市肿瘤医院食管癌手术切除标本62例, 所有病例术

■同行评议者

王健生, 副教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

前均无化疗、放疗及免疫治疗史. 全部病理组织学证实均为鳞状细胞癌. 全部样本分别在癌灶、癌旁3 cm以内及远端正常黏膜组织分别取材62、31和62例. 采用免疫组化SP法和原位杂交方法进行RECK蛋白及mRNA的检测.

结果: 食管鳞癌组织中RECK蛋白及mRNA表达均与癌的组织学分级、浸润深度及淋巴结转移密切相关; 在食管鳞癌癌变过程中RECK蛋白及mRNA表达在癌组织、癌旁不典型增生组织及正常黏膜组织中的表达率依次增高, 组间比较有明显差异(RECK蛋白: $\chi^2 = 10.331$, $P < 0.01$; RECK mRNA: $\chi^2 = 19.186$, $P < 0.01$); RECK蛋白与mRNA的表达呈正相关关系($r = 0.416$, $P < 0.01$).

结论: RECK低表达与食管鳞癌的发生、发展有关, RECK可作为食管鳞癌早期诊断的辅助指标.

关键词: RECK; 食管鳞癌; 免疫组化; 原位杂交

高冬玲, 李晟磊, 陈奎生, 赵志华, 赵秋民, 刘宗文, 张云汉. 金属蛋白酶抑制基因RECK在食管鳞癌中的表达及生物学意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1634-1638

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1634.asp>

0 引言

食管癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 为了寻找食管癌早期诊断的科学方法, 目前针对侵袭及转移机制的研究已经进入了分子生物学的水平. RECK(reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs, RECK)基因是日本科学家Takahashi *et al*^[1]于1998年发现的一种新型抑癌基因, 该基因普遍存在于各种正常组织和非肿瘤细胞系中, 而在一些肿瘤细胞系和肿瘤基因转化的成纤维细胞中, 其表达被抑制. 目前的研究表明, RECK基因的突变与缺失与食管癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤的密切相关^[2-7]. 我们采用免疫组化SP法及原位杂交方法检测RECK基因在62例食管鳞癌组织、31例癌旁不典型增生组织及62例正常食管黏膜组织的表达情况, 以期探讨RECK的表达与食管鳞癌临床病理特征的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 62例食管癌手术切除标本于2006-02-26/2006-03-16取自食管癌高发区河南省安阳市肿瘤医院, 所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史. 其中男36例, 女26例, 年龄38-75(平均

60.6±9.5)岁. 全部病理组织学证实均为鳞状细胞癌. 其中组织学分级 I 级15例, II 级25例, III 级22例; 伴淋巴结转移者20例, 无淋巴结转移者42例. 浸润深度分3组, 浸达浅肌层者7例, 浸达深肌层者14例, 浸达纤维膜者41例. 全部样本分别在癌灶、癌旁3 cm以内及远端正常黏膜组织3处取材, 经40 g/L多聚甲醛液固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度4-6 μm , 分别用于HE、免疫组化及原位杂交染色. 鼠抗人RECK mAb购自美国Santa Cruz公司, SP免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术开发公司. 原位杂交5'端生物素标记、全硫代修饰探针由北京奥科生物技术有限公司合成, 探针序列: CTTGCCCTCTGTGTATTGCC.

1.2 方法 免疫组化采用SP法, RECK mAb稀释倍数为1:100, DAB显色, 苏木素复染. 染色步骤严格按说明书进行; 原位杂交切片经新鲜配制二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水后, 用新鲜配制的5 mL/L H₂O₂室温处理30 min, 以灭活内源性过氧化物酶; 30 g/L柠檬酸新鲜配制蛋白酶(0.01 g/L), 37℃, 10 min, 消化标本DNA结合蛋白; 每张玻片滴加20 μL 不含RECK探针的预杂交液(42℃), 预杂交4 h; 加含探针(1 mg/L)的杂交液, 42℃湿盒内杂交12-16 h; 0.1×标准柠檬酸盐(SSC)42℃洗后, 加SA-Bio-AP 37℃, 10 min; 漂洗后加BCIP/NBT显色剂, 避光显色0.5-2 h. 免疫组化以PBS液代替 I 抗体作为阴性对照, 原位杂交以不含RECK探针的标本作阴性对照. 阳性对照为已知的RECK阳性的乳腺癌组织切片. RECK蛋白阳性信号均呈棕黄色颗粒样物质, 位于细胞质内. RECK mRNA阳性信号呈紫蓝色颗粒, 位于细胞质内. 免疫组化结果判定: 高倍镜下随机选取5个视野(每个视野观察细胞数不少于200个), 按阳性细胞所占百分比及着色深浅进行结果判定^[8-9]. (1)按切片中细胞着色深浅评分: 0分, 细胞无显色; 1分, 浅黄色; 2分, 棕黄色; 3分, 棕褐色. (2)按阳性细胞数占同类细胞数的百分比, <30%为1分, 30%-70%为2分, >70%为3分. 取(1), (2)两项评分的乘积作为总积分, 0-1分为阴性(-), 2-3分为弱阳性(+), ≥ 4 分为阳性(++). 原位杂交结果判定^[10]: 在200倍显微镜下随机选择5个区域, 计数每个视野阳性细胞的百分比, 再取其平均值. 表达结果采用半定量评估: 阴性为阳性细胞数<10%, 弱阳性为阳性细胞数10%-15%, 中度阳性为阳性细胞数15%-50%, 强阳性为阳性细胞数 $\geq 50\%$.

■ 相关报道

国内外学者采用RT-PCR、原位杂交、Western blot和免疫组织化学等技术分别检测了RECK基因在胃癌、肝癌、乳腺癌等肿瘤中的表达量, 以期揭示RECK基因与肿瘤发生、发展及浸润、转移的关系, 有学者构建了RECK基因的真核表达载体并转染了恶性肿瘤细胞株, 继而筛选出了稳定表达该基因的细胞株.

■创新视点

本研究首次采用免疫组织化学及原位杂交技术联合检测RECK基因食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜组织的表达情况,探讨RECK在食管癌发生、发展中的作用。

表 1 RECK在食管鳞癌组织、非典型增生及正常黏膜组织中蛋白及mRNA的表达

	RECK蛋白				χ^2	<i>P</i>	RECK mRNA			χ^2	<i>P</i>
	<i>n</i>	-	+	阳性率(%)			-	+	阳性率(%)		
正常黏膜上皮	62	9	53	85.5	10.331	0.006	11	51	82.3	19.186	0.000
非典型增生	31	9	22	71.0			12	19	61.3		
鳞癌	62	25	37	59.7			34	28	45.2		

表 2 RECK蛋白及mRNA表达与食管鳞癌临床生物学行为的关系

	RECK蛋白				χ^2	<i>P</i>	RECK mRNA			χ^2	<i>P</i>
	<i>n</i>	-	+	阳性率(%)			-	+	阳性率(%)		
组织学分级											
Ⅰ	15	1	14	93.3	10.422	0.005	4	11	73.3	6.799	0.033
Ⅱ	25	11	14	56.0			16	9	40.0		
Ⅲ	22	13	9	40.9			14	8	31.8		
浸润深度											
浅肌层	7	0	7	100.0	8.550	0.014	1	6	85.7	7.862	0.020
深肌层	14	5	9	64.3			6	8	57.1		
纤维膜	41	20	21	51.2			27	14	34.1		
淋巴结转移											
无	42	13	29	69.0	4.751	0.029	17	25	59.5	9.121	0.003
有	20	12	8	40.0			17	3	15.0		

统计学处理 应用SPSS11.0统计学软件,采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 RECK蛋白在食管鳞癌组织中的表达及其与临床生物学行为的关系 RECK蛋白阳性表达主要位于肿瘤细胞的胞质中,呈浅黄色至深黄色(图1,表1-2)。

2.2 RECK mRNA在食管鳞癌组织中的表达及其与临床生物学行为的关系 RECK mRNA阳性表达主要位于食管鳞状上皮细胞的胞质中,呈蓝紫色颗粒(图2)。在食管鳞癌癌变过程中RECK mRNA表达在癌组织、癌旁不典型增生组织及正常黏膜组织中的表达率依次增高,分别为59.7% (37/62)、71.0%(22/31)、85.5%(53/62),组间比较有明显差异($\chi^2 = 10.331$, $P < 0.01$,表1)。RECK mRNA表达与食管鳞癌患者组织学分级、浸润深度、淋巴结转移有关(χ^2 分别为10.422, 8.550, 4.751, P 均 < 0.05 ,表2)。

2.3 RECK蛋白及mRNA在食管鳞癌组织中表达的相关性分析 RECK蛋白及mRNA在食管鳞癌组织中的表达呈正相关关系,在RECK蛋白表达阳性的37病例中,其mRNA表达阳性的占23例,而在RECK蛋白表达阴性的25病例中,其mRNA

表达阴性的占20例,两组之间比较有显著性差异($r = 0.416$, $P < 0.01$,表3)。

3 讨论

RECK基因是近年来发现的与肿瘤的恶性表型有密切关系的一种新型的基因,能够抑制肿瘤的增殖和侵袭^[11-16]。RECK基因编码大约110 kDa的跨膜蛋白,有多个表皮生长因子样的重复区和丝氨酸蛋白酶抑制物相似区域。RECK基因普遍存在于各种正常组织和非肿瘤细胞系中,而在一些肿瘤来源的细胞系和肿瘤基因转化的成纤维细胞中,其表达被抑制^[17-20]。当恢复RECK基因表达则抑制了一些肿瘤细胞系的转移或恶性表型,同时抑制这些细胞分泌基质金属蛋白酶MMP-9和MMP-2等^[21-24]。本研究应用原位杂交技术和免疫组化技术系统的对比研究了食管黏膜上皮癌变过程中RECK的变化规律及其与食管鳞癌临床生物学行为的关系。

本实验研究结果显示,RECK mRNA及其蛋白在癌组织的表达均低于在正常组织和不典型增生组织中的表达,差异有统计学意义。表明RECK基因在食管鳞状细胞癌中无论转录水平还是蛋白水平均有表达下调,这就说明了RECK低表达的肿瘤具有更强的侵袭能力,提示RECK

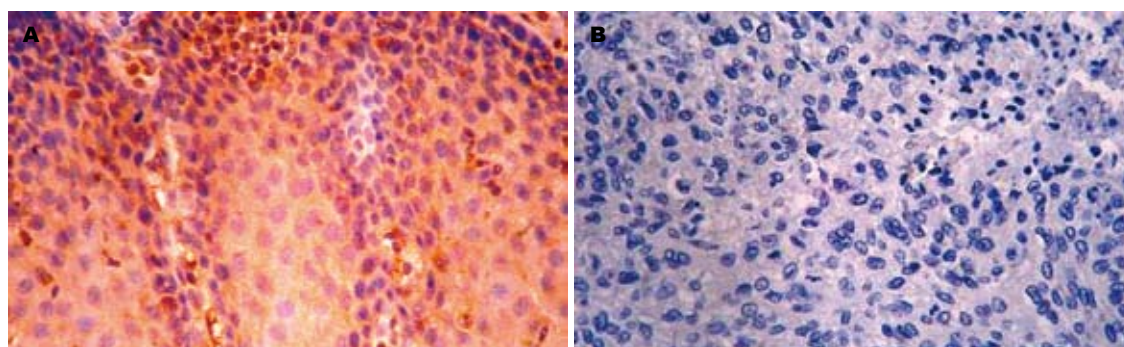


图 1 RECK的表达(SP × 200). A: 正常黏膜; B: 癌组织.

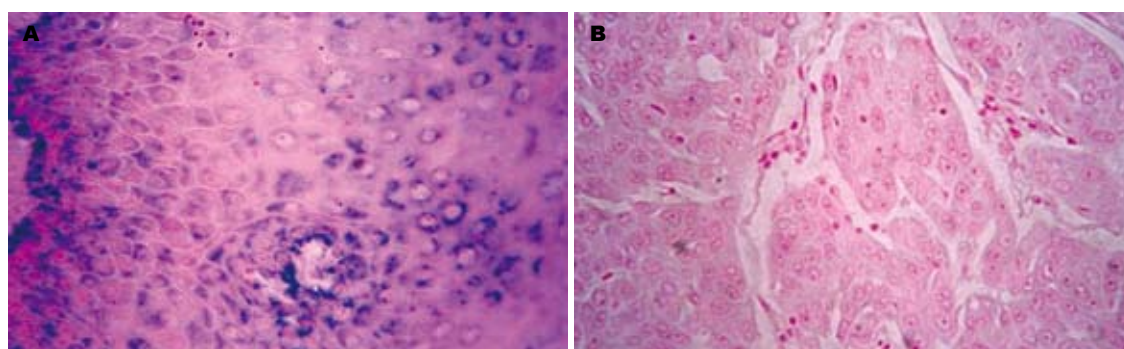


图 2 RECK mRNA的表达(ISH × 200). A: 正常黏膜; B: 癌组织.

表 3 RECK蛋白及mRNA在食管鳞癌中的表达及相关性

RECK蛋白表达	n	RECK mRNA表达		r	P
		+	-		
+	37	23	14	0.416	0.001
-	25	5	20		

的低表达可能与食管癌的发生有关. RECK mRNA及其蛋白的表达均与肿瘤的分化程度有关, 分化程度越高, 其表达越高, 提示RECK的表达对食管癌恶性程度的评估有一定的参考价值. 食管癌组织中RECK mRNA与其蛋白的表达密切相关, 提示RECK mRNA的表达情况可以间接反映其蛋白表达水平, 食管癌组织中RECK mRNA的阳性表达率略低于RECK蛋白表达率, 62例食管癌中仅发现14例RECK蛋白阳性而mRNA阴性, 提示可能存在RECK基因转录后调节, 对于RECK mRNA和RECK蛋白同时无表达的20例食管鳞状细胞癌, 推测可能为RECK基因的纯合性缺失或启动子高甲基化所致.

研究结果表明RECK基因在正常食管组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中均有表达, 但在食管癌组织中的表达水平显著降低, 提示在食管鳞癌中RECK mRNA及蛋白表达量的变

化与高度潜在的侵袭和转移有较强的关系, 与预后有关, 可作为判断预后的一项指标, 有利于我们进一步了解食管癌的生物学行为, 为食管癌的早期诊断和治疗提供一个新的途径.

4 参考文献

- 1 Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitauro Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13221-13226
- 2 Li SL, Gao DL, Zhao ZH, Liu ZW, Zhao QM, Yu JX, Chen KS, Zhang YH. Correlation of matrix metalloproteinase suppressor genes RECK, VEGF, and CD105 with angiogenesis and biological behavior in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6076-6081
- 3 Span PN, Sweep CG, Manders P, Beex LV, Leppert D, Lindberg RL. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 2710-2715
- 4 Masui T, Doi R, Koshiba T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Koizumi M, Toyoda E, Tulachan S, Ito D, Kami K, Mori T, Wada M, Noda M, Imamura M. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1779-1784
- 5 Chang HC, Cho CY, Hung WC. Downregulation of RECK by promoter methylation correlates with

■应用要点

RECK基因可作为食管癌的早期诊断和判断预后的分子指标.

■同行评价

本研究方法设计合理, 结果明确, 科学性和可读性均能反映国内食管鳞癌中RECK的相关研究水平.

- lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2007; 98: 169-173
- 6 da Silva Cardeal LB, Brohem CA, Corrêa TC, Winnischofer SM, Nakano F, Boccardo E, Villa LL, Sogayar MC, Maria-Engler SS. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. *Biochem Cell Biol* 2006; 84: 713-719
- 7 Huber RM, Reck M, Gosse H, von Pawel J, Mezger J, Saal JG, Kleinschmidt R, Steppert C, Stepling H. Efficacy of a toxicity-adjusted topotecan therapy in recurrent small cell lung cancer. *Eur Respir J* 2006; 27: 1183-1189
- 8 李晟磊, 赵秋民, 刘宗文, 赵志华, 高冬玲, 郑湘予, 陈奎生, 张云汉. 食管鳞癌中RECK和MMP-9蛋白表达的相关性及临床病理意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1082-1086
- 9 刘军, 付卫, 张波, 张同琳. 结肠癌组织中S100A4基因的表达及其意义. *中华肿瘤防治杂志* 2007; 22: 1703-1706
- 10 曹学全. 食管鳞癌中组织蛋白酶B、层粘连蛋白及Syndecan-1表达与浸润转移关系的研究. *郑州大学学报(医学版)* 2007; 43: 1-4
- 11 Takenaka K, Ishikawa S, Kawano Y, Yanagihara K, Miyahara R, Otake Y, Morioka Y, Takahashi C, Noda M, Wada H, Tanaka F. Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1617-1623
- 12 Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 167-175
- 13 Sasahara RM, Brochado SM, Takahashi C, Oh J, Maria-Engler SS, Granjeiro JM, Noda M, Sogayar MC. Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. *Cancer Detect Prev* 2002; 26: 435-443
- 14 Hsu MC, Chang HC, Hung WC. HER-2/neu represses the metastasis suppressor RECK via ERK and Sp transcription factors to promote cell invasion. *J Biol Chem* 2006; 281: 4718-4725
- 15 Kondo S, Shukunami C, Morioka Y, Matsumoto N, Takahashi R, Oh J, Atsumi T, Umezawa A, Kudo A, Kitayama H, Hiraki Y, Noda M. Dual effects of the membrane-anchored MMP regulator RECK on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J Cell Sci* 2007; 120: 849-857
- 16 Rabien A, Burkhardt M, Jung M, Fritzsche F, Ringsdorf M, Schick Tanz H, Loening SA, Kristiansen G, Jung K. Decreased RECK expression indicating proteolytic imbalance in prostate cancer is associated with higher tumor aggressiveness and risk of prostate-specific antigen relapse after radical prostatectomy. *Eur Urol* 2007; 51: 1259-1266
- 17 Clark JC, Thomas DM, Choong PF, Dass CR. RECK-a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 675-683
- 18 Chang HC, Liu LT, Hung WC. Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis suppressor RECK. *Cell Signal* 2004; 16: 675-679
- 19 Chang HC, Cho CY, Hung WC. Silencing of the metastasis suppressor RECK by RAS oncogene is mediated by DNA methyltransferase 3b-induced promoter methylation. *Cancer Res* 2006; 66: 8413-8420
- 20 Sasahara RM, Takahashi C, Noda M. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 668-675
- 21 Cho CY, Wang JH, Chang HC, Chang CK, Hung WC. Epigenetic inactivation of the metastasis suppressor RECK enhances invasion of human colon cancer cells. *J Cell Physiol* 2007; 213: 65-69
- 22 Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of MT1-MMP, RECK, and EMMPRIN in ameloblastic tumors. *J Oral Pathol Med* 2006; 35: 345-351
- 23 Oh J, Diaz T, Wei B, Chang H, Noda M, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 upregulates RECK expression via dephosphorylation of paxillin tyrosine residues 31 and 118. *Oncogene* 2006; 25: 4230-4234
- 24 Takagi S, Kato Y, Asano K, Ohsaki T, Bosnakovski D, Hoshino Y, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Matrix metalloproteinase inhibitor RECK expression in canine tumors. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 761-767

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 2008-05-28)

人脐带间充质干细胞生物学特性及向类肝细胞的分化

闫俊卿, 韩涛, 朱争艳

闫俊卿, 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
韩涛, 天津市第三中心医院肝内科 天津市 300170
朱争艳, 天津市肝胆疾病研究所 天津市 300170
闫俊卿, 天津医科大学在读硕士, 主要从事肝病研究。
作者贡献分布: 此课题由韩涛及朱争艳设计; 研究过程由韩涛、闫俊卿及朱争艳完成; 研究所用试剂及分析工具由闫俊卿提供; 本论文写作由韩涛和闫俊卿完成。
通讯作者: 韩涛, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院肝内科。 yjqrr@163.com
电话: 022-84112604
收稿日期: 2008-01-17 修回日期: 2008-03-25

Biological characteristics and differentiation into hepatocyte-like cells of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

Jun-Qing Yan, Tao Han, Zheng-Yan Zhu

Jun-Qing Yan, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cell, Tianjin 300170, China
Tao Han, Department of Liver Diseases, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China
Zheng-Yan Zhu, Tianjin Institute of Hepatobiliary Diseases, Tianjin 300170, China
Correspondence to: Tao Han, Department of Liver Diseases, Tianjin Third Central Hospital, 83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China. yjqrr@163.com
Received: 2008-01-17 Revised: 2008-03-25

Abstract

AIM: To investigate the biological characteristics of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (MSCs), and to study the possibility of their differentiation into hepatocyte-like cells.

METHODS: MSCs were isolated from human umbilical cord; after serial subcultivation *in vitro*, surface immunological markers in MSCs were detected by immunocytochemical staining and flow cytometry. cell cycle and growth activity were also detected. Hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor-4 (FGF-4), oncostatin M (OM) were adopted to effectively induce hepatic differentiation, and specific surface phenotype of liver cells was detected by immunocytochemical staining. *In vitro* functions of the induced and uninduced cells were identified by glycogen staining.

RESULTS: MSCs were isolated from human umbilical cord successfully, presenting fibroblastic morphology and long-term stability. These cells were positive for CD29, CD105, and Vimentin, but were negative for CD34 and CD31. MSCs could be induced to differentiate into hepatocyte-like cells that were positive for albumin, alpha fetoprotein, cytokeratin 18, cytokeratin 19 and glycogen staining.

CONCLUSION: Human umbilical cord-derived MSCs are able to differentiate into functional hepatocyte-like cells, and may serve as a cell source for tissue engineering and cell therapy of hepatic diseases.

Key Words: Umbilical cord; Mesenchymal stem cell; Hepatocyte; Differentiation; Immunocytochemistry; Flow cytometry

Yan JQ, Han T, Zhu ZY. Biological characteristics and differentiation into hepatocyte-like cells of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1639-1644

摘要

目的: 研究脐带间充质干细胞(umbilical cord-mesenchymal stem cells, UC-MSCs)生物学的特性及向肝细胞分化的可能性。

方法: 从脐带中分离间充质干细胞, 体外行传代培养, 检测脐带间充质干细胞表面免疫标志、细胞周期和生长活性等, 利用肝细胞生长因子、成纤维生长因子4和抑瘤素等细胞因子诱导脐带间充质干细胞向肝细胞分化, 用免疫细胞方法对诱导和未诱导的细胞进行免疫学检测, 糖原染色进行功能鉴定。

结果: 从人脐带中可分离到贴壁生长的间充质干细胞, 细胞形态类似成纤维细胞, 可在体外进行长期稳定培养; CD29、CD105和Vimentin表达阳性, 基本不表达CD34、CD31, 经加入细胞因子可成功将间充质干细胞向肝细胞诱导分化, 分化的细胞表达肝细胞表面标志物ALB、AFP、CK18和CK19, 糖原染色呈现阳性。

■背景资料

目前肝细胞移植用于治疗终末期肝病被认为是一种较为有效的治疗手段之一, 肝细胞的来源成为近年来的研究热点, UC-MSCs易于获得, 能够实现体外大量扩增, 具有多向分化能力, 是一种较为理想的细胞来源。

■同行评议者

任粉玉, 副教授, 延边大学附属医院消化内科

■研究前沿

MSCs的来源较为广泛,究竟何种来源的MSCs能够成为细胞治疗的理想种子及其在多向分化过程中的调控机制成为目前的研究热点、重点和亟待解决的问题。

结论:人脐带中可成功分离到间充质干细胞,细胞可实现体外长期培养,表达脐带间充质干细胞的表面标志,在体外脐带间充质干细胞诱导分化为肝细胞,有望成为细胞替代治疗的理想来源之一。

关键词:脐带;间充质干细胞;肝细胞;分化;免疫细胞化学;流式细胞术

闫俊卿, 韩涛, 朱争艳. 人脐带间充质干细胞生物学特性及向类肝细胞的分化. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1639-1644
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1639.asp>

0 引言

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有显著的自我更新和多向分化能力的细胞,他来源丰富,主要有骨髓、脐血、脐带、全身结缔组织和器官间质^[1-3]。目前骨髓是实验和临床研究中MSCs的主要来源,但骨髓存在有自身局限性,脐血中能否获得MSCs仍存在有争议^[4-5]。已有研究报道脐带中富含MSCs,易于获得,分离成功率高,具有多向分化的能力,因此选择脐带作为研究对象。本实验旨在通过研究其生物学特性及向肝细胞分化的能力,为人工肝、肝细胞移植等提供理想的种子细胞。

1 材料和方法

1.1 材料 脐带取自天津市第三中心医院住院的健康足月产妇,均征得父母授权同意及伦理委员会批准。DMEM/F12培养基、胎牛血清(FBS)、IV型胶原酶均为美国Gibco公司产品;肝细胞生长因子(HGF)、成纤维生长因子4(FGF4)、抑瘤素(OSM)购自美国Properio; ITS(25 g/L 胰岛素、25 g/L转铁蛋白、25 mg/L亚硒酸钠)、胰酶为美国Sigma公司产品;免疫组化用mAb和SABC试剂盒为中山金桥公司产品;荧光标记小鼠抗人抗体:CD29-FITC、CD34-PE、CD90-PE、CD105-FITC购自晶美生物有限公司;红细胞裂解液;细胞培养基:DMEM/F12+50 mL/L FBS+100 kU/L青霉素+100 kU/L链霉素。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:脐带自手术台取下后,浸入PBS内,4℃保存,在操作台内取出脐带,用PBS冲洗净脐动脉和脐静脉内的血液,脐带剪碎后,置于恒温振荡仪内,加入IV型胶原酶(1 g/L)60 min,胰酶(1.25 g/L)30 min,经完全消化后,滤网过滤收集细胞,加入适量红细胞裂解液进一步去除红细胞。细胞培养基重悬细胞,调整细胞密度至

$5 \times 10^6/L$,接种于T25培养瓶内,孵箱内培养,5 d后换液,每3 d换液1次,待细胞生长至80%-90%融合后进行传代培养。

1.2.2 细胞生长活性测定:取脐带MSCs,调整细胞密度至 $5 \times 10^3/L$,接种于96孔板内,于接种后1、3、5、7 d利用MTT法进行检测;每组6孔,同时以无细胞培养液作为空白对照,于490 nm处分光光度计检测各组细胞的A值,取均值绘制生长曲线。

1.2.3 细胞周期分析:取对数生长期细胞,制备单细胞悬液,酒精固定48 h。加入1 mL PI染液4℃避光染色30 min。流式细胞仪(美国Beckman公司)检测,MultiCycle软件对该细胞周期DNA含量进行分析,确定细胞周期分布。

1.2.4 免疫细胞化学检测:取培养脐带MSCs,制备细胞涂片,用CD105、Vimentin、CD34、CD31 mAb对脐带MSCs进行免疫细胞化学染色,按SABC试剂盒要求操作,置显微镜下观察染色情况,结果进行拍照。

1.2.5 流式细胞仪检测:取脐带MSCs经胰酶消化后,充分吹打制备单细胞悬液,加入待检测指标CD29-FITC、CD34-PE、CD105-FITC,流式细胞仪进行检测。

1.2.6 诱导分化:取第9代细胞接种于12孔板内,细胞浓度调整为 $5 \times 10^7/L$,设置对照组和诱导组,无血清培养1 d后,加入DMEM培养基、HGF(20 μg/L)、FGF4(10 μg/L)、ITS(50 g/L)、地塞米松(0.5 μmol)、烟碱(0.61 g/L)培养10 d后,加入DMEM培养基、OSM(50 mg/L)、地塞米松(0.5 μmol)、ITS(50 g/L)培养18 d,共培养28 d,分别于1、2、3和4 wk取细胞进行相关实验。

1.2.7 肝细胞的免疫细胞化学染色鉴定:分别于1、2、3和4 wk收集细胞进行检测,观察不同时间点细胞形态的变化,细胞化学染色测定肝细胞特异表面标志物ALB、AFP、CK18和CK19(方法同上)。

1.2.8 糖原染色:取不同时间点对照组和诱导组细胞,中性福尔马林固定10 min,10 g/L碘酸水溶液5-10 min,蒸馏水洗多次后晾干, Schiff液10-15 min,蒸馏水洗5 min,苏木素复染细胞核1-3 min,蒸馏水洗5 min,脱水,透明,封片。

2 结果

2.1 脐带MSCs的培养 人脐带MSCs经剪碎后加入IV型胶原酶及胰酶,可有效地分离到MSCs,细胞呈贴壁生长特性,形态为长梭形,类似于成

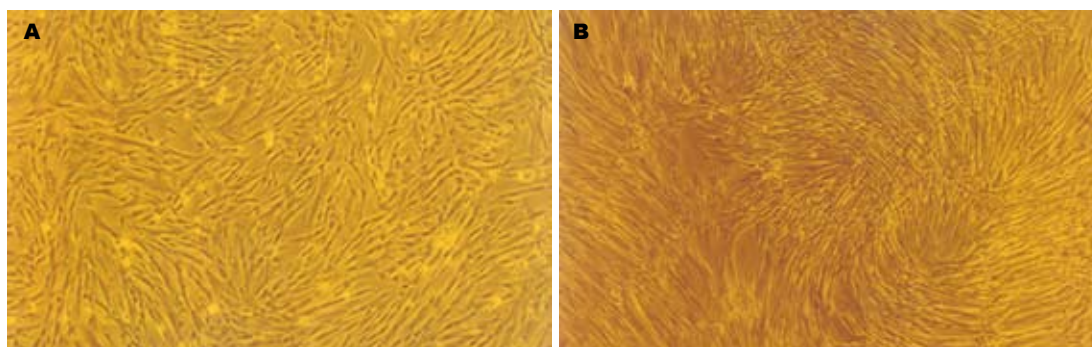


图 1 MSCs形态学观察($\times 40$). A: 原代培养7 d后; B: 第3代细胞生长达80%~90%融合.

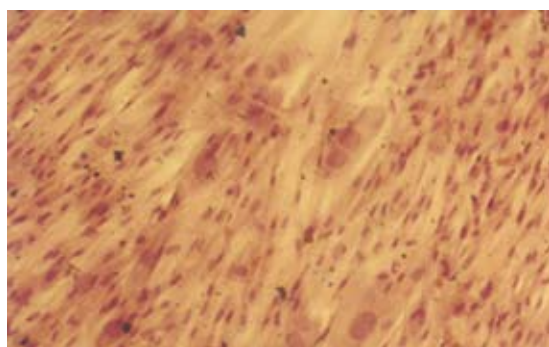


图 2 培养MSCs HE染色结果(HE $\times 100$).

纤维细胞, 漩涡样生长. 细胞大小不一, 经10-15 d培养后进行传代培养, 细胞增殖速度快, 约每周传代1次, 传代次数已达到20次以上(图1), HE染色可见细胞体积较大, 核浆比例大(图2), 细胞生长80%以上处于 G_0/G_1 期(图3), MTT检测可见细胞生长呈上升趋势, 具有良好的长活性(图4).

2.2 脐带MSCs的鉴定 细胞表达CD29、CD105和Vimentin, 基本不表达造血细胞标志CD34和内皮细胞标志CD31. 流式细胞仪检测示表达CD29、CD105和CD90, 不表达CD34与免疫细胞化学检测结果一致(图5-6).

2.3 脐带MSCs向肝细胞的诱导分化 通过实验分别于光镜下观察诱导前和诱导后1、2、3、4 wk细胞形态的变化, 诱导前细胞具有MSCs的细胞形态, 呈长梭形, 不规则形, 贴壁生长. 在诱导后1 wk可观察到少部分细胞突起逐渐消失, 逐渐变圆, 随着诱导时间的延长, 圆形细胞逐渐增多, 细胞形态似肝细胞(图7A-C). 于不同时间点收集诱导后的细胞, 行免疫细胞化学染色观察, 在诱导1 wk时细胞开始表达肝细胞表面标志物AFP、CK18和CK19, 不表达ALB; 在诱导3 wk时, 开始表达成熟肝细胞标志ALB, 同时观察到AFP、CK18和CK19的表达下降. 在4 wk时, ALB表达增强(图7D-G). 对实验组和对照组细胞

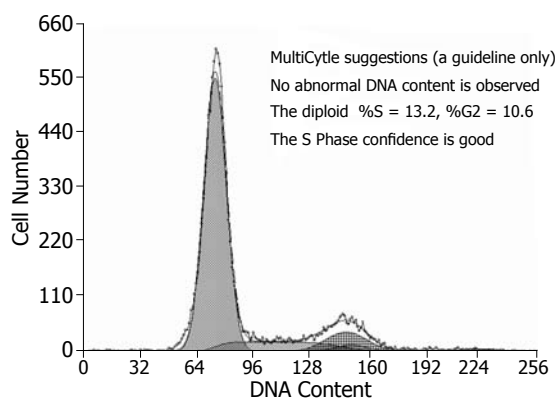


图 3 细胞周期分析.

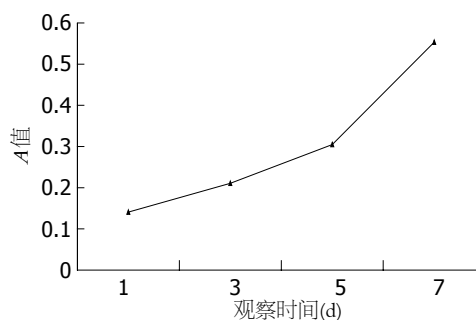


图 4 第6代细胞生长曲线.

进行糖原PAS染色, 4 wk时对照组细胞糖原染色阳性, 说明经诱导后的细胞具有肝细胞功能特性(图7H).

3 讨论

MSCs是中胚层来源的一类具有多向分化能力的干细胞^[6-7], 相比较各种来源的MSCs可发现脐带更具优势, 他易于获得, 取材方便, 排除了伦理道德方面的限制, 可用于广泛研究. 经多数研究证实脐带来源的MSCs与骨髓来源的MSCs在生物学特性方面极为相似, 且可进一步分化为心肌细胞、脂肪细胞和神经细胞等^[8-14], 关于他向肝细胞分化能力的报道尚少.

■相关报道

研究发现脐带中MSCs分离成功率高, 在体外能够大量扩增, 因而越来越受到大家的关注.

■创新盘点

本实验在总结以往研究的基础上,进一步优化诱导方案,实现了UC-MSCs向肝细胞的诱导分化.

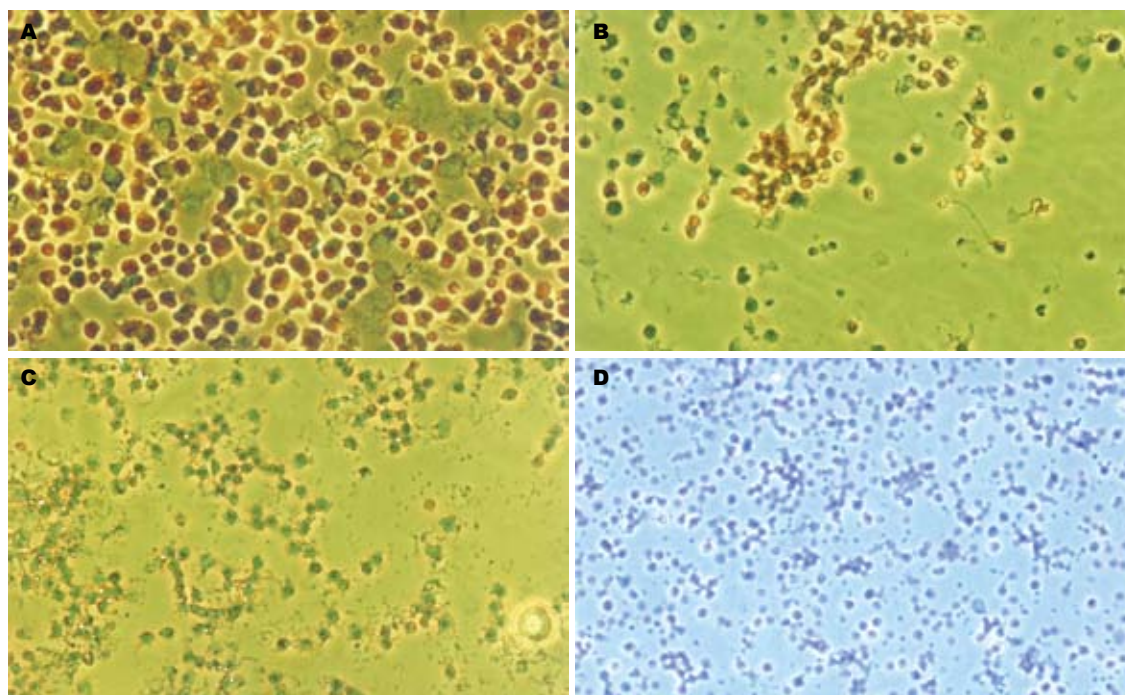


图 5 脐带MSCs(免疫细胞化学染色×100). A: CD105; B: Vimentin; C: CD34; D: CD31.

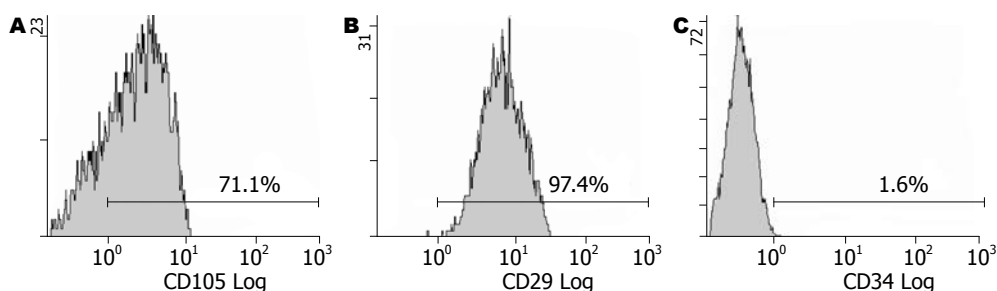


图 6 第6代脐带MSCs流式细胞仪检测结果. A: CD105; B: CD29; C: CD34.

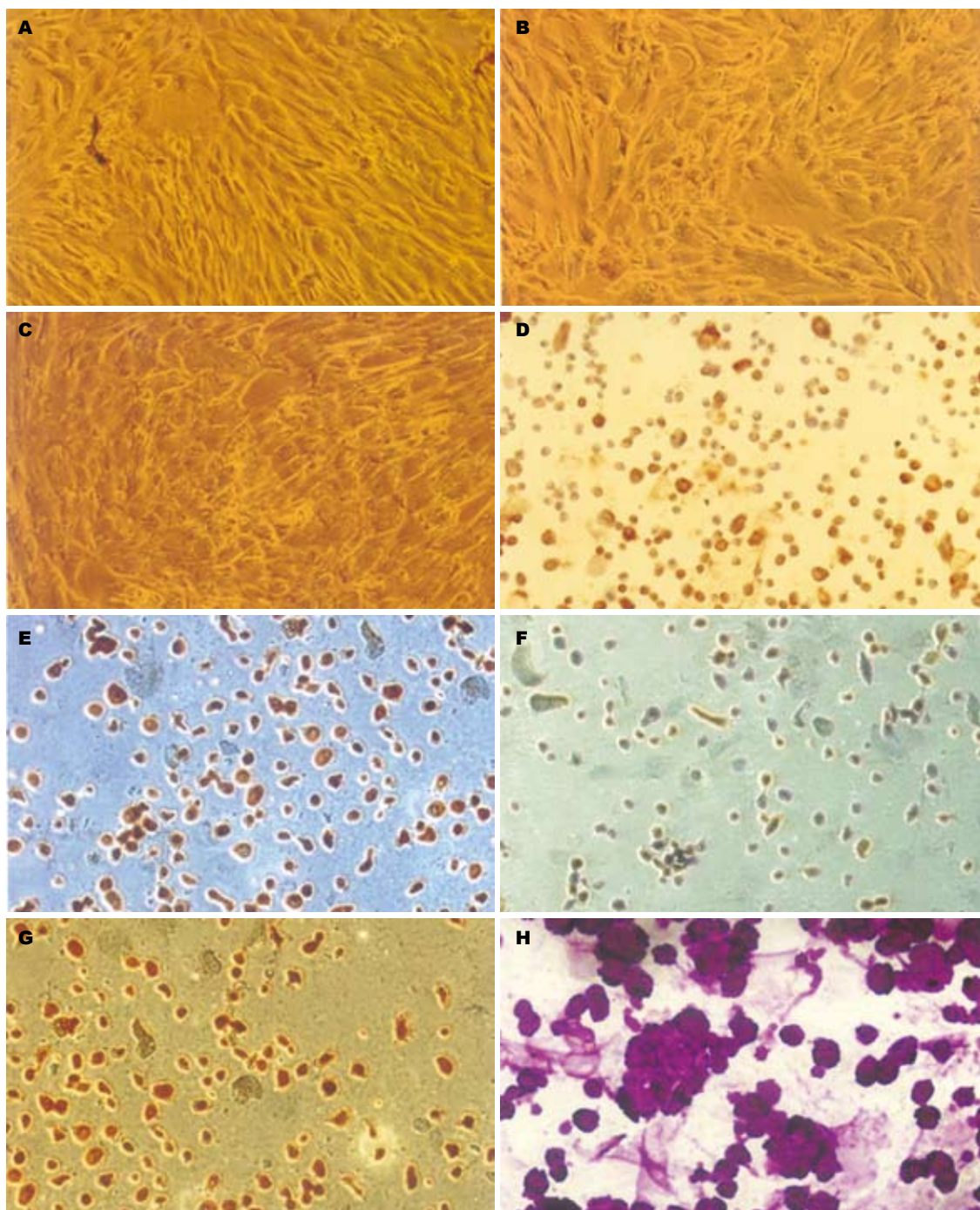
MSCs缺乏特异的细胞表面标志物,表达CD29、CD44、CD54、CD105、CD73和CD166;不表达CD3、CD34、CD45、CD117、CD133、CD31和HLA-DR等^[3,15-16].因此不宜用流式、免疫磁珠等方法分离.本实验通过其贴壁生长的特性进行纯化,经免疫细胞化学和流式细胞仪检测得到细胞强表达CD29、CD105和Vimentin;不表达CD34和CD31.与文献报道相一致^[17-19].

MSCs向肝细胞的诱导分化突破了胚层的限制,实现了跨胚层分化,是一个复杂的变化过程,需要模拟体内肝损伤后的肝细胞再生微环境及众多的细胞因子参与才可实现,目前体外实验中用于肝细胞诱导的主要有HGF、FGF4、EGF、OSM、ITS和地塞米松等,其中肝细胞生长因子可刺激肝细胞的增殖并参与肝脏的再生,是调节肝脏生长和功能的关键因子.通过参考众

多文献及进行多次预实验后,我们将文献所报道的诱导方法进行优化改进,调整诱导因子的用量及作用时间,实现MSCs向肝细胞的诱导^[20-22].

实验中我们进行免疫细胞化学检测了肝细胞特异标志AFP、ALB、CK18和CK19,结果发现在诱导的过程中细胞可表达上述指标,本实验中诱导组1 wk开始表达AFP,到4 wk时已基本不表AFP,而ALB呈现阳性表达,CK18、CK19在2 wk开始有表达,初步分析得出MSCs向肝细胞分化是一个逐渐变化的过程,由未成熟到成熟的过程.肝脏是唯一能够生成和储存糖原的器官,成熟的肝细胞具有生成糖原的能力,于4 wk糖原染色呈现阳性,说明诱导后细胞初步具有成熟肝细胞的特性^[23-27].这些研究结果与文献报道相一致.

因此通过实验证明人脐带MSCs在一定条件下可转化为类肝细胞,然而这仅是一个最基



■应用要点

本实验通过研究UC-MSCs的生物学特性及向肝细胞的诱导分化,为间充质干细胞提供了新的来源,同时为肝病的治疗带来新的思路。

图7 对照组及诱导组细胞检测结果. A: 对照组细胞($\times 10$); B: 诱导2 wk后细胞($\times 10$); C: 诱导4 wk后细胞($\times 10$); D: 诱导2 wk后AFP免疫细胞化学染色($\times 20$); E: 诱导2 wk后CK18免疫细胞化学染色($\times 20$); F: 诱导2 wk后CK19免疫细胞化学染色($\times 20$); G: 诱导4 wk后ALB免疫细胞化学染色($\times 20$); H: 诱导4 wk糖原染色($\times 40$).

本的研究,我们对这种跨胚层的分化过程认识的远远不够,分化是如何启动、调控、终止仍是一团迷雾,所以欲使脐带MSCs成为细胞移植治疗及组织工程的理想种子细胞仍有待研究^[28-29]。

4 参考文献

- 1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential

- of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
- 2 Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001; 86: 1099-1100
- 3 Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25: 2739-2749
- 4 Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal

■同行评价

本研究内容新颖,设计基本合理,结果可信,具有较好的学术价值。

- progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-242
- 5 Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121: 368-374
- 6 D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1115-1122
- 7 Sudo K, Kanno M, Mihaara K, Ogawa S, Hiroyama T, Saijo K, Nakamura Y. Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and/or adipogenic cells in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations. *Stem Cells* 2007; 25: 1610-1617
- 8 Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22: 1330-1337
- 9 Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006; 91: 1017-1026
- 10 Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1477-1486
- 11 Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21: 105-110
- 12 Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansoerge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005; 33: 1402-1416
- 13 Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LL, Cerqueira A, Carvalho MD, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells* 2008; 26: 146-150
- 14 Hardy SA, Maltman DJ, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells as mediators of neural differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008; 3: 43-52
- 15 袁源, 杨树源, 韩忠朝, 张晓辉. 人脐带间充质干细胞分离纯化及基本生物学特性的研究. *中华实验外科杂志* 2006; 23: 118
- 16 Fong CY, Richards M, Manasi N, Biswas A, Bongso A. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reprod Biomed Online* 2007; 15: 708-718
- 17 Titorencu I, Jinga VV, Constantinescu E, Gafencu AV, Ciohodaru C, Manolescu I, Zaharia C, Simionescu M. Proliferation, differentiation and characterization of osteoblasts from human BM mesenchymal cells. *Cytotherapy* 2007; 9: 682-696
- 18 Schrepfer S, Deuse T, Lange C, Katzenberg R, Reichenspurner H, Robbins RC, Pelletier MP. Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2007; 16: 105-107
- 19 Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 249-282
- 20 Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284
- 21 Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 258-264
- 22 Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, Shao JZ, Xiang LX. In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem* 2007; 102: 52-63
- 23 Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1153-1161
- 24 Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7461-7465
- 25 Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-S53
- 26 Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 833-848
- 27 Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J* 2008; 275: 1260-1273
- 28 Salgado AJ, Oliveira JT, Pedro AJ, Reis RL. Adult stem cells in bone and cartilage tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006; 1: 345-364
- 29 Yoshikawa T, Mitsuno H, Nonaka I, Sen Y, Kawanishi K, Inada Y, Takakura Y, Okuchi K, Nonomura A. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. *Plast Reconstr Surg* 2008; 121: 860-877

编辑 李军亮 电编 何基才

巨噬细胞移动抑制因子在炎症性肠病发病中的作用

张启芳, 邱小芬, 张翠萍, 杨建彬, 陈卓琳

张启芳, 陈卓琳, 广西壮族自治区南溪山医院消化内科 广西壮族自治区桂林市 541002

张翠萍, 邱小芬, 广西壮族自治区南溪山医院病理科 广西壮族自治区桂林市 541002

杨建彬, 广西壮族自治区南溪山医院检验科 广西壮族自治区桂林市 541002

张启芳, 2005年广西医科大学硕士, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病的临床研究。

广西壮族自治区卫生厅科研资助项目, No. Z2005120

通讯作者: 张启芳, 541002, 广西壮族自治区桂林市, 广西壮族自治区南溪山医院消化内科. zhangqifang-gl@163.com

电话: 0773-3849749

收稿日期: 2008-02-17 修回日期: 2008-03-22

Pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in inflammatory bowel disease

Qi-Fang Zhang, Xiao-Fen Qiu, Cui-Ping Zhang, Jian-Bin Yang, Zhuo-Lin Chen

Qi-Fang Zhang, Xiao-Fen Qiu, Cui-Ping Zhang, Jian-Bin Yang, Zhuo-Lin Chen, Nan Xishan Hospital Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Health Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. Z2005120

Correspondence to: Qi-Fang Zhang, Department of Gastroenterology, Nan Xishan Hospital Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. zhangqifang-gl@163.com

Received: 2008-02-17 Revised: 2008-03-22

Abstract

AIM: To explore the pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in patients with inflammatory bowel disease.

METHODS: A total of 38 patients with ulcerative colitis (UC) at the active stage, 18 patients with Crohn's disease (CD), 23 patients with other forms of colitis and 20 normal controls were enrolled in the study. The levels of MIF in the sera and intestinal tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry, respectively. Meanwhile, the levels of high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) were measured by latex-enhanced immunoturbidimetry.

RESULTS: The levels of MIF in the sera were

significantly higher in UC, CD and other forms of colitis than those in normal controls (10.599 ± 1.895 , 8.981 ± 1.409 , 8.498 ± 2.242 $\mu\text{g/L}$ vs 5.363 ± 1.841 $\mu\text{g/L}$; all $P < 0.01$). The serum MIF levels were significantly higher in the hs-CRP-positive cases with UC than those in the hs-CRP-negative cases (11.025 ± 1.863 $\mu\text{g/L}$ vs 9.408 ± 1.485 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.05$). However, the levels of MIF in CD patients were not significantly different from those levels in other forms of colitis. The rate of MIF express was significantly increased in colonic mucosa in UC than that in CD or other forms of colitis (100.00% vs 78.26% , 66.67% , 65.00% ; $P < 0.001$).

CONCLUSION: MIF may play a role in the pathogenesis of UC. MIF may be used as a marker of disease activity in UC and control of MIF production may have therapeutic effects.

Key Words: Crohn's disease; High sensitivity C-reactive protoein; Macrophage migration inhibitory factor; Ulcerative colitis

Zhang QF, Qiu XF, Zhang CP, Yang JB, Chen ZL. Pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1645-1648

摘要

目的: 探讨巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)发病中的意义。

方法: 2005-03/2007-11广西壮族自治区南溪山医院及外院住院活动期溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者38例, 克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者18例, 其他结肠炎患者23例, 健康体检者20例。ELISA检测受试者血清MIF含量, LAB-SA免疫组化测定肠黏膜组织MIF蛋白表达。采用胶乳增强免疫透射比浊法检测超敏C-反应蛋白(Hs-CRP)。

结果: UC、CD及其他结肠炎患者的血清MIF水平均高于正常对照者(10.599 ± 1.895 , 8.981 ± 1.409 , 8.498 ± 2.242 $\mu\text{g/L}$ vs 5.363 ± 1.841

■背景资料

免疫因素参与炎症性肠病(IBD)的发病, 已得到多数学者公认。巨噬细胞移动抑制因子(MIF)是一种重要的促炎细胞因子, 在机体的炎症和免疫反应中起重要作用, 国内外均有报道证实MIF参与多种炎症性疾病的发病, 然而MIF在IBD发病机制中的作用尚未明确。国内仅在大鼠溃疡性结肠炎模型中有所研究, 尚缺乏相关的临床研究资料。

■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■研究前沿

MIF是目前国内外医学专家研究的热点, MIF在IBD发病机制中的作用的报道尚不多, 国内仅在大鼠溃疡性结肠炎(UC)模型中有所研究, 尚缺乏相关的临床研究资料。

$\mu\text{g/L}$; 均 $P<0.01$); hs-CRP阳性的UC患者MIF水平高于hs-CRP阴性的UC患者($11.025\pm 1.863\mu\text{g/L}$ vs $9.408\pm 1.485\mu\text{g/L}$, $P<0.05$), 而hs-CRP阳性的CD患者MIF水平未见显著升高, CD患者的血清MIF水平与其他结肠炎患者的血清MIF水平比较无显著性差异。UC患者的肠黏膜MIF表达与其他结肠炎、CD患者和正常对照者比较, 均具有显著差异(100.00% vs 78.26% , 66.67% , 65.00% ; $P<0.001$)。

结论: MIF参与溃疡性结肠炎的发病过程, 可能是溃疡性结肠炎活动的指标, 控制MIF的产生可能有治疗作用。

关键词: 克罗恩病; 超敏-C反应蛋白; 巨噬细胞移动抑制因子; 溃疡性结肠炎

张启芳, 邱小芬, 张翠萍, 杨建彬, 陈卓琳. 巨噬细胞移动抑制因子在炎症性肠病发病中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1645-1648

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1645.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(crohn's disease, CD), 其病因和发病机制至今不明^[1], 可能与免疫、感染、遗传和精神活动等多因素有关, 目前免疫因素在IBD发病中的作用已得到肯定且研究日益深入。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种重要的促炎细胞因子^[2], 在机体的炎症和免疫反应中起重要作用, Yamaguchi *et al*^[3]和张启芳 *et al*^[4]报道证实MIF参与多种炎症性疾病的发病, 然而MIF在IBD发病机制中的作用尚未阐明, 国外Ohkawara *et al*已有MIF在IBD方面的报道^[5-7], 但是目前国内的报道甚少, 尤其是临床研究罕见。为探讨MIF在IBD发病中的作用, 本研究检测了UC、CD和其他结肠炎患者血清MIF的含量及肠黏膜组织中MIF的表达, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-03/2007-11广西壮族自治区南溪山医院及外院住院活动期UC患者38例, 男22例, 女16例, 年龄16-78(平均41.13)岁; CD患者18例, 男10例, 女8例, 年龄20-49(平均30.78)岁。全部病例均符合2000年成都召开的全国炎症性肠病研讨会制订的《对炎症性肠病的诊断治疗规范的建议》所规定的诊断标准^[8]。其他结肠炎(包括慢

性感染性结肠炎13例、缺血性肠炎6例、憩室炎4例)共23例, 男12例, 女11例, 年龄22-68(平均45.71)岁; 健康体检者20例作为正常对照, 男10例, 女10例, 年龄20-46岁。

1.2 方法

1.2.1 血清MIF浓度及超敏C-反应蛋白(hs-CRP)的测定: 清晨空腹静脉采血, 静置后离心分离出血清, -80°C 保存待测。MIF采用ELISA检测, 试剂盒为R&D公司产品, 实验操作严格按说明书进行。hs-CRP采用胶乳增强免疫透射比浊法, 试剂盒为上海复星长征医学科学有限公司产品。hs-CRP浓度超过3 mg/L为hs-CRP阳性。

1.2.2 MIF蛋白检测: 肠道标本来源部位: UC患者在乙状结肠和(或)直肠活检, CD患者在回肠末段和(或)右半结肠活检、或来自外科手术中小肠或右半结肠标本, 其他结肠炎在结肠和(或)直肠炎症明显处活检, 正常对照者在乙状结肠和(或)直肠活检。应用LAB-SA免疫组化试剂盒测定肠黏膜组织MIF蛋白表达。一抗为兔抗MIF(美国Zymed公司)1:2000稀释。用PBS代替一抗作为阴性对照。以胞质出现明显的棕黄色颗粒为MIF阳性细胞, 以阳性细胞在同类细胞中的百分比评判染色强度, 染色细胞 $<5\%$ (-); 染色细胞 $5\%-25\%$ 之间(+); 染色细胞 $>25\%$ (++)^[9]。

统计学处理 计算值以mean \pm SD表示。血清MIF数据两组间比较采用 t 检验, 多组间先采用 F 检验分析, 然后再用 q 检验进行组间比较, 免疫组化结果比较采用Ridit分析, $P<0.05$ 认为差异具有显著性。

2 结果

2.1 血清MIF水平 UC、CD及其他结肠炎患者血清MIF水平均高于对照组($P<0.001$), 其中以UC患者的升高最明显, 且UC组高于CD及其他结肠炎组($P<0.05$), 而CD组与其他结肠炎组比较无显著性差异(表1)。

2.2 不同hs-CRP水平IBD患者的血清MIF情况 UC患者中hs-CRP阳性20例, 阴性18例, hs-CRP阳性的UC患者MIF水平($11.025\pm 1.863\mu\text{g/L}$)高于hs-CRP阴性的UC患者MIF水平($9.408\pm 1.485\mu\text{g/L}$, $P<0.05$)。CD患者中hs-CRP阳性的有12例, 但这些患者的MIF水平与hs-CRP阴性患者的MIF水平无显著差别($P>0.05$, 表2)。

2.3 MIF在不同患者肠黏膜中的表达 正常对照者的肠黏膜有MIF弱表达, 主要位于黏膜表面的上皮细胞, 固有层的腺体很少表达。结肠炎时

■相关报道

Murakami *et al*的研究认为MIF参与了溃疡性结肠炎的发病, 是UC活动的灵敏指标, MIF主要在人类大肠黏膜的炎症细胞表达, 而实质细胞不表达。

表 1 各组患者血清MIF ($\mu\text{g/L}$, mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	MIF
UC组	38	10.599 \pm 1.895 ^{ab}
CD组	18	8.981 \pm 1.409 ^a
其他结肠炎组	23	8.498 \pm 2.242 ^a
对照组	20	5.363 \pm 1.841

^a $P < 0.05$ vs CD组, 其他结肠炎组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

表 2 不同hs-CRP水平BD患者的血清MIF水平 ($\mu\text{g/L}$, mean \pm SD)

UC组	UC		CD	
	<i>n</i>	MIF	<i>n</i>	MIF
hs-CRP(+)/UC组	28	11.025 \pm 1.863 ^a	12	9.152 \pm 1.325
hs-CRP(-)/UC组	10	9.408 \pm 1.485	6	8.64 \pm 1.635

^a $P < 0.05$ vs hs-CRP(-)/UC组.

大肠的上皮细胞和炎症细胞均有表达, 轻度炎症的病例, MIF表达较弱, 主要位于黏膜表面上皮细胞, 固有层的腺体较少表达; 炎症程度越重, MIF表达愈强、愈广泛, 黏膜表面的上皮细胞、固有层的腺体及炎症细胞均有强表达(图1). 其中, UC患者的肠黏膜MIF表达率为100%、染色明显增强, 与其他结肠炎、CD患者或正常对照组比较均具有显著差异($P < 0.001$), 但是CD及其他类型结肠炎患者的MIF表达与对照组比较无显著差别($P > 0.05$).

3 讨论

MIF是一种115个氨基酸的蛋白质, 脑垂体前叶和单核巨噬细胞是血MIF的主要来源(中枢和外周来源), MIF能够抑制巨噬细胞的游走, 促进巨噬细胞在炎症局部的聚集、增生、激活及分泌一些细胞因子, 在炎症和内毒素血症中起重要作用; MIF还能够对抗糖皮质激素的抗炎作用, 两者共同调节机体的免疫和炎症过程^[10-11].

CRP是由肝脏合成的一种急性蛋白质, 正常血清中含量甚微, 在炎症急性期、风湿热、类风湿性关节炎、恶性肿瘤、外伤等患者血清中含量增高. 检测CRP对疾病的诊断虽无特异性, 但其浓度上升是各种原因引起的炎症和组织损伤的灵敏指标^[12], 已有较多的研究^[13-14]证实活动期UC患者CRP的水平增高, 而hs-CRP比普通CRP更灵敏、准确性更高. 本组资料hs-CRP阳性UC患者的MIF水平高于hs-CRP阴性UC患者的MIF水平, 可能提示UC患者炎症及组织损伤

表 3 各组患者肠黏膜的MIF表达

分组	<i>n</i>	大肠黏膜的MIF表达			
		-	+	++	阳性率(%)
UC组	38	0	6	32	100.00 ^b
CD组	18	6	11	1	66.67
其他结肠炎组	23	5	16	2	78.26
对照组	20	7	13	0	65.00

^b $P < 0.01$ vs 其他三组.

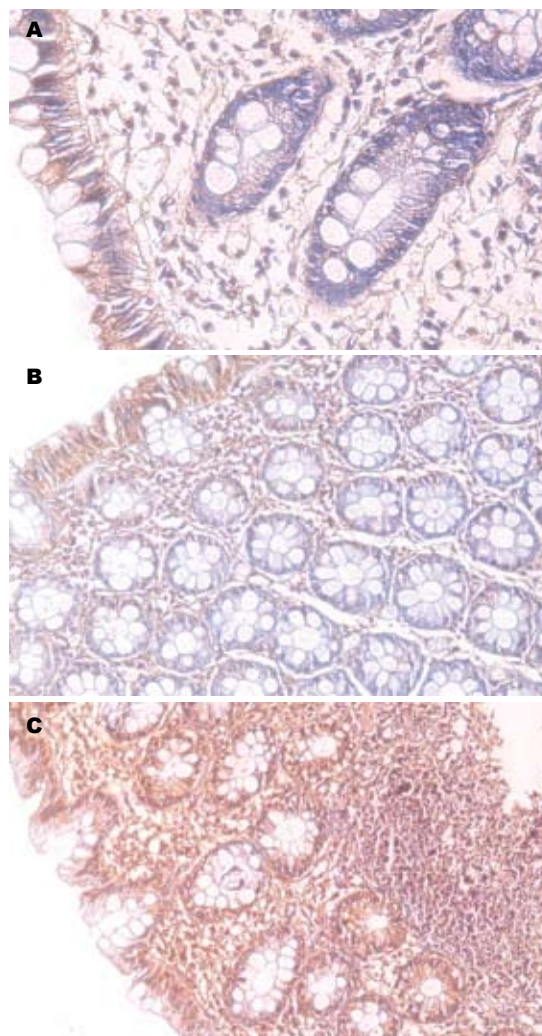


图 1 肠黏膜MIF表达(免疫组化S-P法). A: 正常肠黏膜($\times 400$); B: 轻度炎症的UC患者肠黏膜($\times 200$); C: 炎症较重的UC患者肠黏膜($\times 200$).

愈严重, 则MIF的产生愈多, 血清MIF水平愈高.

Ohkawara *et al*^[15]的研究显示MIF在大鼠结肠的上皮细胞及炎症细胞均有表达, 正常条件下的大鼠结肠黏膜上皮细胞的MIF表达较弱, 在硫酸葡聚糖钠(DDS)诱导的结肠炎中MIF表达则明显增强. 本研究显示正常对照组肠黏膜有MIF弱表达, 主要位于黏膜表面的上皮细胞, 结肠炎

■创新盘点

本研究首次在国内从临床角度探讨了MIF在人类IBD发病中作用.

■同行评价

本文从临床角度阐明MIF在溃疡性结肠炎发病中的作用,有一定的学术意义和临床参考价值.

时上皮细胞和炎症细胞均有MIF表达,炎症程度越重, MIF表达愈强、愈广泛, 黏膜表面的上皮细胞、固有层的腺体及炎症细胞均表达, 本研究结果与Ohkawara *et al*的动物实验研究结果基本一致, 但是与Murakami *et al*^[6]研究结果有差别: Murakami *et al*认为MIF主要在炎症细胞表达, 而实质细胞(parenchymal cell)不表达, MIF表达的结果主要根据炎症细胞的数目.

本组资料显示UC患者的血清MIF水平高于CD及其他结肠炎患者的血清MIF水平, hs-CRP阳性UC患者的MIF水平高于hs-CRP阴性UC患者的MIF水平; UC患者的肠黏膜MIF表达率为100%、染色明显增强, 与CD、其他结肠炎患者及正常对照者比较具有显著差异($P<0.01$), 提示MIF参与UC的发病过程, 可能是UC活动的指标, 控制MIF的产生可能达到治疗UC的效果, MIF可作为临床上判断疾病活动程度和观察疗效的灵敏指标. CD患者的血清MIF水平与其他结肠炎患者比较无显著差别, hs-CRP阳性CD患者的血清MIF水平无显著升高, CD患者肠黏膜的MIF表达与其他结肠炎患者及正常对照者的MIF表达也无显著差别, 提示MIF可能不是CD发病的主要因素.

4 参考文献

- 1 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205
- 2 Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit Rev Immunol* 1997; 17: 77-88
- 3 Yamaguchi E, Nishihira J, Shimizu T, Takahashi T, Kitashiro N, Hizawa N, Kamishima K, Kawakami Y. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1244-1249
- 4 张启芳, 梁志海, 唐国都, 邓德海, 覃锦耀, 邱小芬. 巨噬细胞移动抑制因子在急性坏死性胰腺炎发病中的作用. *胰腺病学* 2006; 6: 326-329
- 5 Ohkawara T, Miyashita K, Nishihira J, Mitsuyama K, Takeda H, Kato M, Kondo N, Yamasaki Y, Sata M, Yoshiki T, Sugiyama T, Asaka M. Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 241-248
- 6 Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 337-343
- 7 Griga T, Wilkens C, Wirkus N, Epplen J, Schmiegell W, Klein W. A polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor gene is involved in the genetic predisposition of Crohn's disease and associated with cumulative steroid doses. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 784-786
- 8 欧阳钦, 胡品津, 钱家鸣, 郑家驹, 胡仁伟. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. *胃肠病学* 2007; 12: 488-495
- 9 Castellà E, Ariza A, Fernández-Vasalo A, Roca X, Ojanguren I. Expression of CD44H and CD44v3 in normal oesophagus, Barrett mucosa and oesophageal carcinoma. *J Clin Pathol* 1996; 49: 489-492
- 10 Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gerns D, Donnelly T, Bucala R. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 7849-7854
- 11 Bernhagen J, Bacher M, Calandra T, Metz CN, Doty SB, Donnelly T, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J Exp Med* 1996; 183: 277-282
- 12 Gambino R. C-reactive protein--undervalued, underutilized. *Clin Chem* 1997; 43: 2017-2018
- 13 Dunker MS, Ten Hove T, Bemelman WA, Slors JF, Gouma DJ, Van Deventer SJ. Interleukin-6, C-reactive protein, and expression of human leukocyte antigen-DR on peripheral blood mononuclear cells in patients after laparoscopic vs. conventional bowel resection: a randomized study. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1238-1244
- 14 Cabrera-Abreu JC, Davies P, Matek Z, Murphy MS. Performance of blood tests in diagnosis of inflammatory bowel disease in a specialist clinic. *Arch Dis Child* 2004; 89: 69-71
- 15 Ohkawara T, Takeda H, Nishihira J, Miyashita K, Nihiwaki M, Ishiguro Y, Takeda K, Akira S, Iwanaga T, Sugiyama T, Asaka M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin Exp Immunol* 2005; 141: 412-421

编辑 李军亮 电编 何基才

腺病毒载体在乙型肝炎生物治疗中的应用

韩红霞, 唐红

韩红霞, 唐红, 四川大学华西医院感染性疾病中心, 生物治疗国家重点实验室感染性疾病研究室 四川省成都市 610041
国家重点基础研究973计划资助项目, No. 2006CB504300
通讯作者: 唐红, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院感染性疾病中心, 生物治疗国家重点实验室感染性疾病研究室.
htang6198@hotmail.com
电话: 028-81822623
收稿日期: 2008-02-02 修回日期: 2008-03-08

Application of adenoviral vector in biotherapy for hepatitis B virus infection

Hong-Xia Han, Hong Tang

Hong-Xia Han, Hong Tang, Center for Infectious Diseases, West China Hospital of Sichuan University; Division of Molecular Biology of Infectious Diseases, State Key Laboratory of Biotherapy, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Supported by: the National Basic Research Program of China (973 Program), No. 2006CB504300

Correspondence to: Hong Tang, Center for Infectious Diseases, West China Hospital of Sichuan University; Division of Molecular Biology of Infectious Diseases, State Key Laboratory of Biotherapy, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. htang6198@hotmail.com

Received: 2008-02-02 Revised: 2008-03-08

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is a worldwide public health problem. Especially in China about 120 million are estimated to be HBV chronic carriers. For those infected with HBV, there has been no curable treatment. However, biotherapy provides a new clue for future treatment. An appropriate vector is the essential factor in determining efficiency of biotherapy. Owe to its own properties, Adenoviral vector has gained increasing interest in the biotherapy of HBV infection recently. This review focused on the progress in the biotherapy of HBV infection using adenoviral vector.

Key Words: Hepatitis B virus; Adenoviral vector; Biotherapy; Gene therapy

Han HX, Tang H. Application of adenoviral vector in biotherapy for hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1649-1654

摘要

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个严重的公共卫生问题, 特别是在我国, 约有1.2亿人为慢性HBV携带者. 对已感染HBV者, 目前治疗效果尚不理想, 生物治疗为其提供了新的思路. 理想的载体系统是决定生物治疗效率的重要因素. 腺病毒载体由于自身的优势在乙型肝炎生物治疗研究中受到越来越多的重视. 本文就腺病毒载体在乙型肝炎生物治疗研究中的应用作一综述.

关键词: 乙型肝炎病毒; 腺病毒载体; 生物治疗; 基因治疗

韩红霞, 唐红. 腺病毒载体在乙型肝炎生物治疗中的应用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(15): 1649-1654

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1649.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染所致的乙型肝炎是一种严重威胁人类健康的传染病, 不仅感染人数众多^[1-2], 且持续HBV感染易导致肝硬化和肝细胞癌等的发生^[3-5]. 我国约有1.2亿人为慢性HBV携带者, 对已感染乙型肝炎病毒HBV者, 目前常用的化学药物及免疫疗法效果尚不够理想. 生物治疗的问世及其迅速发展为乙型肝炎的治疗提供了新的思路, 基因治疗是其最重要的一个方面. 理想的载体系统是决定生物治疗效率的重要因素. 腺病毒载体由于包装容量大、感染效率高、外源基因表达水平较高及相对安全等优点已成为目前最常用的生物治疗载体之一. 由于腺病毒本身具有一定的嗜肝性^[6], 肝脏又是重组腺病毒基因表达的主要器官^[7], 腺病毒载体在乙型肝炎生物治疗研究中受到越来越多的重视. 腺病毒载体用于抗HBV生物治疗的研究必将促进乙型肝炎生物治疗向临床应用的深入发展. 本文就腺病毒载体在乙型肝炎生物治疗研究中的应用作一综述.

1 腺病毒载体

腺病毒的毒粒无包膜, 基因组为dsDNA, 长约

■背景资料

生物治疗已成为癌症治疗的第四模式, 正试图于严重威胁人类健康的病毒性疾病的生物治疗. 腺病毒载体作为目前最常用的生物治疗载体之一, 在乙型肝炎生物治疗研究中受到越来越多的重视.

■同行评议者

陈建杰, 主任医师, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病科

■ 研发前沿

乙型肝炎生物治疗是近年来研究的热点,更为有效的载体系统-腺病毒载体的开发促进了乙型肝炎生物治疗更深入的研究。

36 kb, 外包被二十面体对称的蛋白质衣壳。早期转录基因有6个: E1A、E1B、E2A、E2B、E3和E4, 大多编码基因表达调节蛋白, 与病毒复制及晚期基因表达的活化有关。晚期转录基因有5个: L1-L5, 大多编码结构蛋白。人类腺病毒已发现49个血清型, 分为A-F 6个亚群。目前应用的腺病毒载体主要是在病原性较低的人类腺病毒C亚群Ad2和Ad5的基础上构建的。

腺病毒载体作为目前最常用的生物治疗载体之一具有包装容量大、感染效率高、外源基因表达水平较高且相对较安全等优点^[8], 但也存在一些不足^[9]: 如免疫原性较强, 用量较大时有一定的毒性, 不能持续表达所需产物及需重复给药等, 从而在一定程度上制约其临床应用。因此, 各国学者正在通过不同方式对腺病毒载体进行改造, 以降低其免疫原性, 增加外源基因表达。

第一代腺病毒载体^[10]去除E1区(为病毒复制所必需)和E3区(与逃避宿主的免疫反应有关), 为复制缺陷型腺病毒, 需辅助细胞反式补偿E1区功能才能包装出病毒颗粒。但在宿主细胞内仍有低水平的病毒蛋白表达, 二次应用时宿主强烈的免疫反应使外源基因的表达迅速消失, 且高滴度时有一定的细胞毒性。为降低免疫反应, 一种方法是尽量去除腺病毒的基因。第二代腺病毒载体^[9]在去除E1、E3的基础上进一步敲除E2、E4区。近年来又出现一种叫“无肠腺病毒(gutless adenovirus)”又名辅助病毒依赖型腺病毒(helper-dependent adenovirus, HD-Adv)的第三代腺病毒载体^[11-12], 他一般是由两端反向末端重复序列、包装信号和末端结合蛋白等组成。他几乎完全去除腺病毒基因, 不仅大大降低免疫反应, 而且使可插入的外源基因长度达36 kb, 这样就可以插入调控序列, 使外源基因的表达具有可控性, 但这种载体需依赖辅助病毒反式提供才能够复制和包装, 故存在病毒滴度不高、辅助病毒污染等缺点, 尚需更进一步改进。亦有学者对腺病毒载体的纤维结构进行改造^[13-15]使其靶向转导以降低免疫反应, 或者构建携带器官特异性启动子的重组腺病毒^[16]实现目的基因的靶向转录表达, 使其更安全、有效。

利用人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因启动子替代野生型腺病毒E1A自身启动子构建肿瘤特异性增殖型腺病毒载体AdhTERT。在AdhTERT载体上插入外源抗肿瘤基因^[17], 在肿瘤细胞中病毒复制发生溶瘤作用, 另一方面hTERT基因启动子调控

外源插入基因特异表达, 产生抗肿瘤作用。

2 在乙型肝炎生物治疗研究中的应用

2.1 介导核酶对HBV基因表达的抑制作用 核酶(ribozyme)是具有裂解活性的RNA分子, 能特异地结合并切割靶RNA分子。通过设计针对HBV基因编码区不同位点的锤头状核酶, 可特异性识别并切割HBV特定基因编码区mRNA, 从而抑制HBV表达。在证实核酶对HBV表达有抑制作用的基础上, 为进一步提高核酶的表达效率及向应用过渡, 李谨革 *et al*^[18]将针对HBV C区(1942-1944、2029-2031、2063-2065位点)的多位点核酶克隆入腺病毒载体中, 将重组腺病毒RAdCMV-Rz123感染2.2.15细胞, 可表达出目的核酶, 并发挥核酶的剪切作用, 对HBeAg表达的抑制率最高达87.1%, 比他们^[19]在前期实验中应用的其他载体表达的多位点核酶对HBV C基因表达的抑制率都高(其中, pDCTRZA-Rz123即由表达核酶的理想启动子tRNA所启动表达的多位点核酶对HBV C基因表达的抑制率最高, 为81%)。证实重组腺病毒表达的多位点核酶对HBV表达有明显的抑制作用, 提示核酶可能是一种有效的抗病毒手段, 也说明了腺病毒载体的实用性, 为将来用于临床治疗乙型肝炎提供了一定的理论依据。

2.2 介导RNA干扰在抗HBV研究中的应用 RNA干扰(RNA interference, RNAi)^[20]是短片断双链小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)诱导序列高度同源的mRNA降解的转录后基因沉默机制。在应用RNAi抗HBV感染的研究中, 在体外细胞和动物体内均已证实siRNA对HBV具有较强的抑制作用^[21-23]。质粒载体构建方便, 在筛选有效siRNA靶位时被广泛采用。但是, 质粒载体也存在一些不足, 如转染效率低、目的基因表达时间短暂。体内试验目前普遍采用小鼠尾静脉高压注射质粒, 通过快速注射大量液体的方法引起小鼠一过性右心衰使质粒进入肝脏, 这种方法有一定的技术难度且对小鼠影响较大, 显然不适合用于以后的临床治疗。为克服质粒载体上述缺点, Uprichard *et al*^[24]构建了携带针对HBV基因组重叠区域的polIII-siRNA表达框的重组腺病毒AdEasy-shRNA, 在体外HBV阳性肝细胞株中, 表达shHBV546和shHBV765, 均显著抑制了HBV mRNA的表达。尾静脉注射 2×10^9 pfu重组腺病毒将HBV shRNA导入复制型HBV转基因小鼠体内, 结果肝内HBV RNA转录水

平、血清HBsAg和HBeAg分泌水平均明显下降。在干扰素受体缺陷的HBV转基因小鼠, 同样观察到shRNA对HBV RNA转录、HBsAg和HBeAg分泌直接特异的抑制作用, 排除了腺病毒感染诱发机体非特异的干扰素抗病毒反应。可能是由于第一代腺病毒载体潜在的毒性作用, 第20天时90%的重组腺病毒被清除。尽管如此, 该研究用腺病毒载体介导siRNA肝靶向运输, 首次验证了siRNA对已存在的HBV基因转录和表达特异的抑制作用, 对RNAi将来用于临床治疗慢性HBV感染具有指导意义。

Carmona *et al*^[25]利用RNA polIII的启动子U6合成了一系列靶向HBx保守序列的shRNA, 将shRNA 5、shRNA 6表达框分别克隆至腺病毒载体构建了重组腺病毒ADV shRNA 5和ADV shRNA 6, 尾静脉注射 5×10^9 pfu重组腺病毒将shRNA导入HBV转基因小鼠, 二者均显著降低了小鼠血清中HBsAg和HBeAg的含量, 血清中HBV DNA也有明显下降。表明腺病毒载体介导的靶向HBx特异序列的shRNA能够较显著地抑制HBV复制, 有望成为应用RNAi治疗慢性HBV感染的候选靶位, 具有一定的临床应用前景。

2.3 治疗性乙肝疫苗研究中的应用 乙肝疫苗能比较有效地预防HBV的感染。随着基因重组技术及免疫学的发展, 不仅使得常规疫苗实现了优化组合, 而且出现了免疫复合物性疫苗、DNA疫苗、DC疫苗等新型疫苗, 为利用乙肝疫苗来防治HBV感染提供了新思路。DNA疫苗^[26]是把编码某种免疫原的外源基因克隆到真核表达载体上, 再以重组体免疫机体, 引起特异性的免疫应答, 从而达到预防和治疗疾病的目的。DNA疫苗虽然比常规疫苗具有明显的优势, 既安全又可持续诱导体液免疫和细胞免疫^[27], 但是, 由于质粒转导效率低, 体内只有十分有限的DNA分子被抗原递呈细胞尤其是树突状细胞(dendritic cell, DC)摄取, 影响了其免疫效果。为了提高DNA疫苗的免疫应答需改善DNA的运输或/和使用有效的免疫佐剂, 或者更为有效的是活化DC, 以恢复和增强DC的抗原递呈功能。

腺病毒载体已被证实较质粒载体有更高的基因转移效率^[28-32,34]和诱导更强的保护性免疫(尤其是特异性CTL细胞免疫)^[29-32], 作为疫苗载体具有明显的优势, 已被广泛应用于新型抗病毒基因疫苗的研究中^[31-33]。Isogawa *et al*^[34]研究发现, 肌肉免疫100 μ g表达HBV中分子包膜蛋白的

质粒pCMV-S2.S和静脉感染 2×10^9 pfu携带1.3倍HBV基因组的复制缺陷型重组腺病毒Ad-HBV, 二者诱导均产生了针对包膜蛋白的特异性CTL免疫应答, 但有不同的分布: 前者优先聚集于脾脏, 也存在于引流淋巴结和外周血; 而后者主要存在于肝脏。表明iv Ad-HBV可产生靶向肝脏的特异性CTL免疫应答, 这对主要依赖细胞免疫以清除肝内HBV的乙型肝炎的治疗尤为有效。提示腺病毒载体是一种具有前途的抗HBV基因疫苗载体。

He *et al*^[35]构建了携带HBsAg及共刺激因子B7-1编码基因的重组腺病毒RA1310和仅携带HBsAg编码基因的重组腺病毒RA1312, 分别免疫BALB/c小鼠, 在小鼠体内都观察到了HBsAg的有效表达, 都产生了针对HBsAg特异性的CTL应答及特异性抗体, 而共表达HBsAg及B7-1的重组腺病毒RA1310获得了较强的CTL应答及抗体滴度, 提示重组腺病毒能诱导强而有效的细胞免疫, 共刺激因子B7-1可增强特异性细胞免疫和体液免疫。周智 *et al*^[36]构建了共表达HBsAg及B7-2的重组腺病毒rAdv-HBs-B7-2, 免疫小鼠亦产生了有效的免疫应答, 且在低剂量时未观察到明显副作用。以上研究利用腺病毒载体介导HBsAg与共刺激因子共表达, 成功地诱导了有效的细胞免疫及体液免疫, 这正是疫苗发展的方向, 为研制具有预防和治疗双重作用的新型疫苗提供了新思路。

在病毒感染和肿瘤发生中, 存在DCs抗原递呈功能缺陷。提高DCs抗原递呈功能, 诱导强而有力的特异性细胞免疫已成为抗病毒和肿瘤免疫治疗的新途径。目前提高DCs抗原递呈功能的方法有两种: 抗原多肽冲击致敏DC疫苗和基因修饰DC疫苗。其中, 基因修饰DC疫苗能诱导出更强而持久的CTL细胞免疫^[37-39]。已有研究证明腺病毒载体能介导目的基因高效转染DC^[40-43,46], 而并不影响DC的表型、抗原递呈功能和诱导特异性的免疫应答^[43-45,47], 是介导基因修饰DC理想的载体系统。黄茵 *et al*^[46]在成功构建携带HBsAg编码基因的重组腺病毒Ad-S, 并观察到能高效转染小鼠骨髓DC和表达HBsAg的前期实验基础上, 他们最近的研究表明^[47], Ad-S转导的DC能诱导比HBsAg蛋白冲击DC及DNA疫苗更强的I型免疫应答和针对HBsAg的特异性CTL细胞免疫, 对HBV转基因小鼠血清HBsAg、HBV DNA水平和肝内HBcAg和HBsAg表达均有较迅速和

■ 相关报道

Gong *et al*构建了linker介导的乙型肝炎靶向核糖核酸酶(TR)重组腺病毒RAAd/TRL, 与pcDNA3.1载体相比, 证实了腺病毒载体的有效性。

■创新盘点

本文结合乙型肝炎生物治疗研究进展,客观阐述了腺病毒载体的作用:显示出不错应用前景的同时也有不足之处,同时提出进一步研究的方向。

明显的抑制作用。腺病毒载体介导抗原基因修饰的DC疫苗显示了更强的抗HBV的潜力,有可能成为慢性乙型肝炎免疫治疗的新的有效手段。

2.4 在细胞内干涉性蛋白抗HBV研究中的应用
细胞内抗体是指将所需抗体的编码基因导入靶细胞,在其内表达出具有生物活性的抗体并与相应抗原结合,以达到治疗的目的。单链抗体ScFv是细胞内抗体技术最常用的抗体形式。汤正好 *et al*^[48]利用AdEasy系统构建了表达抗-HBc ScFv重组腺病毒Ad-ScFv,获得了较高的病毒滴度,感染真核细胞后高效表达抗-HBc ScFv,且表达的抗-HBc ScFv具有HBcAg特异性结合活性,为ScFv的进一步研究及开展乙型肝炎基因免疫治疗提供了一定的实验基础。另外,在抑制性多肽、自杀基因抗HBV的研究中,腺病毒载体亦常被用来介导其转基因表达。Scaglioni *et al*^[49]构建了携带HBV核心蛋白显性失活突变体(dominant negative mutant)编码基因的重组腺病毒AdHBV DN,感染HepG2.2.15, 2 d感染率达90%-95%,明显地抑制HBV的复制,抑制率达90%。与逆转录病毒相比,腺病毒载体介导的HBV DN显示了更高的抗病毒效率。Gong *et al*^[50]构建了linker介导的乙型肝炎靶向核糖核酸酶(HBV targeted ribonuclease, TR)重组腺病毒RAD/TRL,与pcDNA3.1载体相比,证实了腺病毒载体的有效性。

3 结论

生物治疗是一种前景十分好的抗HBV治疗手段,但要真正实现生物治疗的临床应用还需要许多相关方面更深入的研究。腺病毒载体由于转导效率高、外源基因表达水平较高、相对较安全等优点被广泛应用于生物治疗的研究中,又由于其具有一定的嗜肝性亦被肝病研究者青睐。腺病毒载体还有很多技术问题需要解决,最迫切的是如何降低免疫原性及细胞毒性。随着对腺病毒分子生物学研究的进一步深入及乙型肝炎发病机制的全面了解,开发出能够应用于临床治疗乙型肝炎的重组腺病毒制剂的前景十分乐观。

4 参考文献

- Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-1745
- Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: S158-S168
- Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced

- oncogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 74-81
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2: 1129-1133
- Chen G, Lin W, Shen F, Iloeje UH, London WT, Evans AA. Past HBV viral load as predictor of mortality and morbidity from HCC and chronic liver disease in a prospective study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1797-1803
- Binley K, Askham Z, Martin L, Spearman H, Day D, Kingsman S, Naylor S. Hypoxia-mediated tumour targeting. *Gene Ther* 2003; 10: 540-549
- Connelly S, Mech C. Delivery of adenoviral DNA to mouse liver. *Methods Mol Biol* 2004; 246: 37-52
- McNeish IA, Bell SJ, Lemoine NR. Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes. *Gene Ther* 2004; 11: 497-503
- Gao GP, Yang Y, Wilson JM. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol* 1996; 70: 8934-8943
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8802-8806
- Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franklin L, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Bett AJ, Caskey CT. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 7866-7871
- Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 1998; 18: 180-183
- Biermann V, Volpers C, Hussmann S, Stock A, Kewes H, Schiedner G, Herrmann A, Kochanek S. Targeting of high-capacity adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 1757-1769
- Stoff-Khalili MA, Stoff A, Rivera AA, Mathis JM, Everts M, Wang M, Kawakami Y, Waehler R, Mathews QL, Yamamoto M, Rocconi RP, Siegal GP, Richter DF, Dall P, Zhu ZB, Curiel DT. Gene transfer to carcinoma of the breast with fiber-modified adenoviral vectors in a tissue slice model system. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1203-1210
- Shinozaki K, Suominen E, Carrick F, Sauter B, Kähäri VM, Lieber A, Woo SL, Savontaus M. Efficient infection of tumor endothelial cells by a capsid-modified adenovirus. *Gene Ther* 2006; 13: 52-59
- Pastore L, Morral N, Zhou H, Garcia R, Parks RJ, Kochanek S, Graham FL, Lee B, Beaudet AL. Use of a liver-specific promoter reduces immune response to the transgene in adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1773-1781
- Zhang Q, Nie M, Sham J, Su C, Xue H, Chua D, Wang W, Cui Z, Liu Y, Liu C, Jiang M, Fang G, Liu X, Wu M, Qian Q. Effective gene-viral therapy for telomerase-positive cancers by selective replicative-competent adenovirus combining with endostatin gene. *Cancer Res* 2004; 64: 5390-5397
- 李谨革, 张嵘, 周永兴, 连建奇, 王九平. 腺病毒表达

- Ribozyme在细胞内对HBV的免疫作用. 解放军医学杂志 2003; 28: 243-245
- 19 李谨革, 连建奇, 贾战生, 冯志华, 聂青和, 王九平, 黄长形, 白雪帆. 不同载体表达核酶对HBV mRNA细胞内表达的阻断作用. 世界华人消化杂志 2003; 11: 161-164
 - 20 Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 110-119
 - 21 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003; 37: 764-770
 - 22 Kayhan H, Karatayli E, Turkiymaz AR, Sahin F, Yurdaydin C, Bozdayi AM. Inhibition of hepatitis B virus replication by shRNAs in stably HBV expressed HEPG2 2.2.15 cell lines. *Arch Virol* 2007; 152: 871-879
 - 23 McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 639-644
 - 24 Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 773-778
 - 25 Carmona S, Ely A, Crowther C, Moolla N, Salazar FH, Marion PL, Ferry N, Weinberg MS, Arbuthnot P. Effective inhibition of HBV replication in vivo by anti-HBx short hairpin RNAs. *Mol Ther* 2006; 13: 411-421
 - 26 Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 927-974
 - 27 Sasaki S, Takeshita F, Xin KQ, Ishii N, Okuda K. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. *Methods* 2003; 31: 243-254
 - 28 Sprinzl MF, Oberwinkler H, Schaller H, Protzer U. Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier. *J Virol* 2001; 75: 5108-5118
 - 29 Maeda K, West K, Hayasaka D, Ennis FA, Terajima M. Recombinant adenovirus vector vaccine induces stronger cytotoxic T-cell responses than recombinant vaccinia virus vector, plasmid DNA, or a combination of these. *Viral Immunol* 2005; 18: 657-667
 - 30 Sandig V, Youil R, Bett AJ, Franklin LL, Oshima M, Maione D, Wang F, Metzker ML, Savino R, Caskey CT. Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1002-1007
 - 31 Casimiro DR, Chen L, Fu TM, Evans RK, Caulfield MJ, Davies ME, Tang A, Chen M, Huang L, Harris V, Freed DC, Wilson KA, Dubey S, Zhu DM, Nawrocki D, Mach H, Troutman R, Isopi L, Williams D, Hurni W, Xu Z, Smith JG, Wang S, Liu X, Guan L, Long R, Trigona W, Heidecker GJ, Perry HC, Persaud N, Toner TJ, Su Q, Liang X, Youil R, Chastain M, Bett AJ, Volkin DB, Emini EA, Shiver JW. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol* 2003; 77: 6305-6313
 - 32 Shiver JW, Fu TM, Chen L, Casimiro DR, Davies ME, Evans RK, Zhang ZQ, Simon AJ, Trigona WL, Dubey SA, Huang L, Harris VA, Long RS, Liang X, Handt L, Schleif WA, Zhu L, Freed DC, Persaud NV, Guan L, Punt KS, Tang A, Chen M, Wilson KA, Collins KB, Heidecker GJ, Fernandez VR, Perry HC, Joyce JG, Grimm KM, Cook JC, Keller PM, Kresock DS, Mach H, Troutman RD, Isopi LA, Williams DM, Xu Z, Bohannon KE, Volkin DB, Montefiori DC, Miura A, Krivulka GR, Lifton MA, Kuroda MJ, Schmitz JE, Letvin NL, Caulfield MJ, Bett AJ, Youil R, Kaslow DC, Emini EA. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 2002; 415: 331-335
 - 33 Bruña-Romero O, Lasarte JJ, Wilkinson G, Grace K, Clarke B, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. *Hepatology* 1997; 25: 470-477
 - 34 Isogawa M, Kakimi K, Kamamoto H, Protzer U, Chisari FV. Differential dynamics of the peripheral and intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis B surface antigen. *Virology* 2005; 333: 293-300
 - 35 He XS, Chen HS, Chu K, Rivkina M, Robinson WS. Costimulatory protein B7-1 enhances the cytotoxic T cell response and antibody response to hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 7274-7278
 - 36 周智, 张定凤, 任红. HBsAg及B₍₇₋₂₎抗原重组腺病毒载体感染免疫研究. 中华肝脏病杂志 2001; 9: 111-113
 - 37 Oh ST, Kim CH, Park MY, Won EH, Sohn HJ, Cho HI, Kang WK, Hong YK, Kim TG. Dendritic cells transduced with recombinant adenoviruses induce more efficient anti-tumor immunity than dendritic cells pulsed with peptide. *Vaccine* 2006; 24: 2860-2868
 - 38 Nakamura M, Iwahashi M, Nakamori M, Ueda K, Ojima T, Naka T, Ishida K, Yamaue H. Dendritic cells transduced with tumor-associated antigen gene elicit potent therapeutic antitumor immunity: comparison with immunodominant peptide-pulsed DCs. *Oncology* 2005; 68: 163-170
 - 39 Qiu SJ, Lu L, Qiao C, Wang L, Wang Z, Xiao X, Qian S, Fung JJ, Ye SL, Bonham CA. Induction of tumor immunity and cytotoxic t lymphocyte responses using dendritic cells transduced by adenoviral vectors encoding HBsAg: comparison to protein immunization. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 429-438
 - 40 Kirk CJ, Mulé JJ. Gene-modified dendritic cells for use in tumor vaccines. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 797-806
 - 41 Zhong L, Granelli-Piperno A, Choi Y, Steinman RM. Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 964-972
 - 42 Ochoa-Callejero L, Berraondo P, Crettaz J, Olagüe C, Vales A, Ruiz J, Prieto J, Tennant BC, Menne S, González-Aseguinolaza G. Woodchuck dendritic cells generated from peripheral blood mononuclear cells and transduced with recombinant human adenovirus serotype 5 induce antigen-specific cellular immune responses. *J Med Virol* 2007; 79: 522-529
 - 43 Matsui M, Moriya O, Abdel-Aziz N, Matsuura Y, Miyamura T, Akatsuka T. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus. *Vaccine* 2002; 21: 211-220
 - 44 Herrera OB, Brett S, Lechler RI. Infection of

■应用要点

随着生命科学与生物技术的不断发展,近年来乙型肝炎生物治疗研究取得了重大进展,有可能成为预防和治疗慢性HBV感染的新的有效途径。

■同行评价

本文引用参考文献比较全面,客观地指出腺病毒载体在应用中的不足,显示出不错的应用前景,同时提出进一步的研究方向,是一篇较好的综述。

- mouse bone marrow-derived dendritic cells with recombinant adenovirus vectors leads to presentation of encoded antigen by both MHC class I and class II molecules-potential benefits in vaccine design. *Vaccine* 2002; 21: 231-242
- 45 Maccormac LP, Jacque JM, Chain B. The functional consequences of delivery of HIV-1 Nef to dendritic cells using an adenoviral vector. *Vaccine* 2004; 22: 528-535
- 46 黄茵, 陈智, 贾红宇, 蔡玲斐. HBsAg重组腺病毒载体的构建及在树突状细胞的表达. *浙江预防医学* 2006; 18: 1-3, 11
- 47 Huang Y, Chen Z, Jia H, Wu W, Zhong S, Zhou C. Induction of Tc1 response and enhanced cytotoxic T lymphocyte activity in mice by dendritic cells transduced with adenovirus expressing HBsAg. *Clin Immunol* 2006; 119: 280-290
- 48 汤正好, 马会慧, 臧国庆, 余永胜, 李刚, 姚集鲁. 抗HBc-ScFv基因复制缺陷型腺病毒载体的构建及其体外表达. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 734-738
- 49 Scaglioni P, Melegari M, Takahashi M, Chowdhury JR, Wands J. Use of dominant negative mutants of the hepadnaviral core protein as antiviral agents. *Hepatology* 1996; 24: 1010-1017
- 50 Gong WD, Zhao Y, Yi J, Ding J, Liu J, Xue CF. Anti-HBV activity of TRL mediated by recombinant adenovirus. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2574-2578

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 $10\text{ cm} \times 6\text{ cm} \times 4\text{ cm}$. 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·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 2008-05-28)

肝干细胞与肝损伤的研究进展

姚鹏, 李绍祥

姚鹏, 李绍祥, 中国人民解放军北京军区总医院全军肝病中心 北京市 100700

通讯作者: 姚鹏, 100700, 北京市, 中国人民解放军北京军区总医院全军肝病中心. pyao1@sohu.com

收稿日期: 2008-01-30 修回日期: 2008-03-22

Advance in hepatic stem cells and liver injury

Peng Yao, Shao-Xiang Li

Peng Yao, Shao-Xiang Li, Center for Hepatology, General Hospital of Chinese PLA Beijing Command, Beijing 100700, China

Correspondence to: Peng Yao, Center for Hepatology, General Hospital of Chinese PLA Beijing Command, Beijing 100700, China. pyao1@sohu.com

Received: 2008-01-30 Revised: 2008-03-22

Abstract

The liver diseases remain major causes of death all over the world. Although orthotopic liver transplantation is an effective treatment for end-stage liver diseases. However, shortage of healthy livers for transplantation worldwide have urgently limited the use of liver transplantation for acute and chronic liver diseases. Stem cells play an important role in the concert of liver regeneration. Hepatic stem cells have been shown experimentally to participate in liver proliferation. Furthermore, it has been postulated that hepatic stem cells are able to transdifferentiate into both hepatocytes and bile duct cells. These data indicate a possible role and therapeutic potential of hepatic stem cells in liver diseases. In this paper, we reviewed the application of stem cells in liver diseases.

Key Words: Hepatic stem cells; Liver injury; Liver disease

Yao P, Li SY. Advance in hepatic stem cells and liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1655-1660

摘要

肝脏疾病是影响人类健康的严重疾病, 目前尚没有令人满意的治疗措施, 肝移植技术由于供

体的数量、昂贵的价格等因素使其应用受到限制。近年来, 越来越多的研究对于干细胞进行了探索, 研究表明, 肝干细胞在一定条件下可以分化为肝实质细胞, 并在肝损伤修复中起重要作用, 本文就干细胞在肝脏疾病中的应用研究作一综述。

关键词: 肝干细胞; 肝脏损伤; 肝脏疾病

姚鹏, 李绍祥. 肝干细胞与肝损伤的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1655-1660

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1655.asp>

0 引言

肝功能严重衰竭, 目前还没有特效的治疗措施, 尽管肝移植为肝衰竭患者提供了有效的治疗方法, 但是由于其费用高昂, 供体肝源有限, 从而使肝移植的广泛应用受到了限制。最近几年关于肝再生机制和干细胞的可塑性研究发现, 在严重肝损伤的动物模型实验、供受者性别不同的人体肝移植、骨髓移植等研究中证实, 干细胞向肝细胞转化和参与了肝脏功能重建, 体外诱导分化研究也证实, 干细胞具有向肝细胞转化的潜能^[1], 最近也有人在人体治疗实验中发现骨髓干细胞参与肝脏再生^[2], 这些结果均提示干细胞可能在肝脏结构与功能重建中发挥治疗作用。

1 肝干细胞与肝

1.1 肝干细胞的定义 干细胞是指具有无限或被延长自我修复能力的细胞, 按分化能力而言分为: 原始干细胞, 具有多种分化能力^[3], 可以自我更新, 并参与有机体的一生组织修复; 前体细胞, 存在于有机体某一组织器官内, 仅向有限的几种组织细胞分化; 成熟组织中的分化细胞, 不能自我修复, 不具有分化能力。肝干细胞属于前体细胞, 来源于肝脏Herring(汇管区和终末小胆管的连接部分)间隙和肝内胆管^[4-5], 具有双向分化潜能, 能够分化为肝实质细胞和胆管上皮细胞^[6-8]。这种细胞具有特殊的形态特征: 形态较小、核质比率高, 具有卵圆形细胞核, 故又称卵圆细胞^[9]。

■背景资料

肝功能严重衰竭, 目前还没有特效的治疗措施, 肝移植技术由于供体的数量、昂贵的价格等因素使其应用受到限制, 最近的研究发现干细胞可能在肝脏结构与功能重建中发挥治疗作用。

■同行评议者

许戈良, 教授, 安徽省立医院肝胆外科; 陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

■研究前沿

肝干细胞的起源, 骨髓干细胞向肝实质细胞的转化, 干细胞移植治疗肝脏疾病是该研究领域的热点.

1.2 肝干细胞的主要功能 早在1958年Wilson *et al*就提出假说: 在肝组织中可能存在干细胞^[10]. 之后人们在齧齿类动物的肝组织中发现了双向分化潜能的卵圆细胞^[11-12], Haruna *et al*^[13]证实人的肝组织中也存在这种双潜能的肝祖细胞. 科学家进一步对卵圆细胞进行了克隆和鉴定, 发现其在体外培养能够大量增殖, 细胞移植后在形态和功能上可分化为肝细胞和胆管上皮细胞, 这种具有强大增殖能力和分化潜能的细胞即为肝干细胞. 肝干细胞及其生物功能的确认, 使肝干细胞的研究进入了一个新的时代. 以后大量的实验证实了肝干细胞的分化潜能. 体外实验培养的肝干细胞经诱导可分化为肝实质细胞^[13-14], 植入动物体内肝干细胞也可分化为肝实质细胞及胆管上皮细胞, 含肝干细胞的肝细胞悬液移植动物脾内可获得大量的由干细胞分化而来的肝实质细胞^[14-15], 并能够提高实验性肝衰竭动物的存活率; 肝干细胞在正常情况下处于静止状态, 但在肝再生能力受到毁灭性打击时, 可以观察到肝干细胞的激活、增殖并向肝细胞等分化^[15]. 此时肝干细胞的增殖与分化可能对肝损伤修复具有极为重要的意义.

1.3 肝干细胞的确认标志 肝干细胞是一族异源细胞群, 表达肝细胞系及胆系不同的细胞形态标志. 根据其形态特征及定位将其分为3个细胞型. I型细胞, 具有原始的形态, 定位于增生的胆管附近并且围绕肝细胞呈腺状排列; II型细胞, 与I型细胞具有相似的共同形态特征, 但只定位于胆管增生区, 与胆小管细胞毗邻; III型细胞, 具有I型细胞的共同特征, 并具有成熟肝细胞的形态, 即突出的细胞核和丰富的细胞质^[16]. 在大鼠也发现了类似的3种具有不同免疫学特性的细胞群: 原始的卵圆细胞, 不表达甲胎蛋白(AFP), 角蛋白19(CK19), OV-6或谷胱甘肽S-转移酶(π -GST); 肝细胞样卵圆细胞, 表达AFP, 但不表达OV-6或 π -GST; 胆管样卵圆细胞, 不表达AFP但表达CK19, OV-6和 π -GST. 大多数卵圆细胞表达胚胎和胆管特异的细胞标志, 只有少数细胞共同表达胚胎和成熟肝细胞标志^[17-20].

1.4 肝干细胞的来源 肝干细胞的存在, 最初是在2-乙酰氨基苄(2-AAF)处理的小鼠肝内^[20], 发现有卵圆细胞的诱导增殖, 表达AFP, 推测卵圆细胞可能来自肝内定位的前体细胞. 进一步研究显示, 增殖及分化为肝细胞的前体细胞首先发现在Hering管, 因此认为, Hering管是肝祖细胞及其子代卵圆细胞的来源.

Suzuki *et al*^[21]在发育的小鼠肝脏分离出一种肝干细胞群, 具有多向分化潜能及自我更新能力. 然而, 不像卵圆细胞, 他们不表达肝细胞及胆管细胞特有的细胞标志. 他们能够在体外扩增并且在体内重构肝细胞、胆管细胞、胰岛及肠上皮结构, 这种细胞可能代表定居肝内的肝祖细胞.

另外, 从胰腺分离的胰岛前体细胞体外培养也可分化为肝样细胞^[22-23], 这是否提示在胚胎发育过程中, 一些原始的多能干细胞一直保持着未分化状态, 滞留在机体组织内. 无论怎样, 研究肝干细胞的起源是一个十分重要的课题, 对于肝干细胞的进一步基础及临床应用研究具有重要意义.

2 骨髓干细胞是肝细胞的重要来源

骨髓内存在大量的成体干细胞, 被称为自体损伤细胞修复库. 研究表明骨髓干细胞具有向一些成体细胞分化的潜能, 可以分化为包括神经细胞^[24]、心肌细胞^[25]、血管内皮细胞^[26-27]、软骨细胞^[28]以及肝实质细胞^[29]. 在体外诱导剂的作用下, 骨髓干细胞可以向肝实质细胞转化. 在体内, 肝脏微环境诱导骨髓干细胞向肝实质细胞转化也得到研究的证实.

1999年Petersen *et al*^[30]发现肝干细胞和一些肝细胞可能部分来源于骨髓或与骨髓相关. 他们进行了以下研究: (1)将♂大鼠的骨髓移植到致死量照射的同源♀大鼠, 用DNA探针检测受鼠肝内有无雄性来源的Y染色体; (2)用表达MHC II类抗原L21-6的Lewis大鼠作为受体, 不表达L21-6的Brown-Norway大鼠作为供体进行全肝移植, 以确定肝外来源的L21-6阳性细胞是否能够定位于移植的肝脏; 他们发现, 在骨髓移植后13 d, 在肝内检测到了Y染色体信号, 在这一时间卵圆细胞开始分化为肝细胞. 如果分化为肝细胞的卵圆细胞来自肝脏, 将不会有肝细胞表达Y染色体信号, 但结果显示, 一些肝细胞表达明显的Y染色体信号, 表明他们来源于骨髓供体细胞. 同样, 他们在全肝移植后发现, 在移植的肝脏内发现有明显的L21-6阳性细胞, 这表明一些卵圆细胞来源于肝外. 实验表明, 骨髓中含有能够分化为肝细胞潜能的干细胞, 一些卵圆细胞可能来源于骨髓.

骨髓干细胞可以分化为肝细胞, 这种现象是也可发生在人类. 2000年英国科学家Theise *et al*^[31]报道, 在接受男性骨髓移植的女性患者肝

脏标本中检测到了Y染色体阳性信号, 接受来自女性肝脏的男性肝移植患者也发现了Y染色体阳性的骨髓来源细胞, 来自骨髓的细胞分化成了肝细胞并表达肝细胞的表面标志. 实验表明, 人类骨髓干细胞确实可以转移定位于肝脏并分化为成熟的肝实质细胞, 而部分肝干细胞也来源于骨髓细胞. 这种现象被称为“转移分化”现象, 多在肝损伤时发生, 分化发生的刺激可能是多方面的, 包括细胞因子、内环境的改变、肝损伤等.

科学家还发现在新鲜的骨髓细胞中检测到表达AFP的肝前细胞, 表达AFP的肝前细胞能够被旁分泌的HGF诱导分化. 骨髓干细胞能够分化为多种细胞, 包括骨^[32-33]、肌肉、脂肪、心肌细胞等. 上述研究表明骨髓干细胞同样可能分化成为肝实质细胞. 骨髓中的肝前细胞可以用于肝衰竭的移植治疗而不必考虑组织相容性抗原(major histocompatibility, MHC)的配型问题^[34], 因为患者自身的骨髓细胞就可以用于移植. 此外HGF^[35-36]也可以通过促进包括骨髓干细胞的肝前细胞分化用于肝硬化治疗, 血液病^[37-39]治疗, 肌肉损伤修复^[40], 神经系统疾病^[41]及心血管疾病^[42-43]已应用于临床, 并取得了良好效果. 自体骨髓干细胞移植治疗肝损伤将为肝脏疾病的治疗提供新的途径.

3 肝干细胞与肝再生

3.1 肝干细胞的增殖分化 在对肝细胞损害的响应中, 肝脏启动一种免疫应答机制^[44-46], 分泌一系列复杂的细胞因子和化学增殖素, 这些信号将促进Kupffer细胞和星状细胞浸润到损害区. 肝干细胞可能通过诱导趋化因子如干细胞因子(stem cell factor, SCF)^[47-48], 从骨髓中募集而来. 肝干细胞迁移到肝脏并且通过Hering管浸润到肝小叶. 此外, 肝内定居的原始细胞可能是肝干细胞的另一来源. Kupffer细胞和星状细胞释放一系列细胞因子, 包括EGF^[49], aFGF, TGF- α 、HGF和TGF- β , 刺激卵圆细胞的增殖、分化^[50], 参与肝损伤的修复及肝细胞再生. 最后, Kupffer细胞和星状细胞释放的TGF- α 触发卵圆细胞的凋亡机制^[51-53], 并且最终导致卵圆细胞介导的肝再生停止. 这样, Kupffer细胞、星状细胞和卵圆细胞释放的细胞因子协同作用, 调控卵圆细胞的增殖和肝实质的重构.

3.2 肝损伤诱导肝干细胞增殖分化 不论肝干细胞来源如何, 有一点已证实, 肝干细胞的增殖发生在肝细胞的增殖能力和功能受到损害时候^[54-56].

他们增殖并迁移到损坏的肝小叶替代损失的实质. 在包括HBV/HCV感染^[57-58]、药物和酒精性肝病^[16,59-61]等病理过程中, 均可见到卵圆细胞的出现. 对调控这一过程的因子和激活卵圆细胞机制的阐明, 将有助于理解卵圆细胞的生物功能, 并且了解骨髓来源干细胞和卵圆细胞之间的联系, 将促进对干细胞介导肝再生机制的研究.

4 干细胞在肝病治疗中的临床应用前景

肝脏疾病是影响人类健康的严重疾病, 目前尚没有理想的治疗方法. 干细胞研究具有广泛前景, 在发育生物学、基因功能、细胞治疗和组织细胞替代治疗等领域发挥重要作用, 干细胞本身及诱导分化产生的肝实质细胞可以广泛应用于基因治疗、细胞移植及生物人工肝等方面.

4.1 干细胞移植治疗肝脏疾病 干细胞移植是将干细胞植入体内, 分化为有功能的实质细胞, 以替代因退变、损伤、基因缺陷或自身免疫而受损的细胞, 重构组织器官的结构和功能. 细胞移植已具有较为完备的实验及理论基础, 在理论与技术方面均为干细胞在肝脏疾病中的应用提供了保障, 蕴涵着巨大的潜能. 骨髓干细胞可直接来源于成人的骨髓或外周血, 采集方便, 不存在伦理上的争议, 使其有成为干细胞移植的理想选择^[62].

Shi *et al*^[63]将胚胎干细胞经脾脏进行移植, 治疗Wilson's病模型鼠, 移植后在肝内可见胚胎干细胞来源的肝细胞增殖, 说明脾脏内移植的胚胎干细胞有分化为成熟肝细胞的能力. 苏娟 *et al*^[64]用人胎肝干细胞在小鼠脾内移植, 移植后发现胎肝干细胞能在损伤肝脏中增殖并分化为肝细胞. Kushida *et al*^[65]也通过门静脉进行干细胞移植治疗Wilson's病小鼠.

我们成功地采用患者自体骨髓分离纯化骨髓干细胞, 经肝动脉方式移植入肝脏治疗慢性肝功能衰竭^[66]. 初步临床应用结果显示, 患者接受自体骨髓干细胞移植治疗后肝功能改善且临床症状有所改善. 然而, 由于该项目开展的时间较短, 病例数有限, 对于其疗效和副作用的准确评估还需要进一步观察.

4.2 在生物人工肝中的应用前景 人工肝支持系统是终末期肝病患者度过危险期或肝移植等待治疗的手段之一^[67-69], 然而, 获取足够数量的肝细胞供临床应用十分困难, 猪肝细胞作为肝细胞源已广泛应用^[70-73], 但尚存争议. 干细胞具有很强的再生能力及定向分化潜能, 将干细胞在一定条件下培养扩增, 诱导分化成为成熟肝

■ 相关报道

2000年英国科学家Theise *et al*报道, 在接受男性骨髓移植的女性患者肝脏标本中检测到了Y染色体阳性信号, 接受来自女性肝脏的男性肝移植患者也发现了Y染色体阳性的骨髓来源细胞, 来自骨髓的细胞分化成了肝细胞并表达肝细胞的表面标志. 实验表明, 人类骨髓干细胞确实可以转移定位于肝脏并分化为成熟的肝实质细胞, 而部分肝干细胞也来源于骨髓细胞.

■创新盘点

本文论述了肝干细胞的存在和在肝损伤时发挥作用,肝干细胞和骨髓干细胞之间的联系,并重点论述骨髓干细胞是肝细胞的重要来源并在肝损伤的修复中起着重要的作用。

细胞,作为肝细胞源,将具有很好的应用前景。

4.3 肝病基因治疗 对于遗传性代谢障碍方面的肝脏疾病,可以利用转基因技术将缺陷基因转入干细胞,筛选出阳性细胞移植入患病肝脏,纠正代谢机能障碍。

总之,干细胞的研究已挑战了传统的细胞生物学理论,为疾病的治疗开辟了新的领域。相信在不久的将来,干细胞会在肝病的细胞治疗、组织工程和基因治疗方面发挥越来越重要的作用,为肝病的治疗开辟崭新的途径^[74]。

5 参考文献

- 1 Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, Rashed LA, Sabry D, Hassouna AA, Hasan NM. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007; 40: 893-899
- 2 Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, Baharvand H, Ghavamzadeh A, Malekzadeh R. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 2007; 10: 459-466
- 3 Oh SH, Hatch HM, Petersen BE. Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 405-409
- 4 Tee LB, Smith PG, Yeoh GC. Expression of alpha, mu and pi class glutathione S-transferases in oval and ductal cells in liver of rats placed on a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. *Carcinogenesis* 1992; 13: 1879-1885
- 5 Tee LB, Kirilak Y, Huang WH, Smith PG, Morgan RH, Yeoh GC. Dual phenotypic expression of hepatocytes and bile ductular markers in developing and preneoplastic rat liver. *Carcinogenesis* 1996; 17: 251-259
- 6 Costa AM, Tuchweber B, Lamireau T, Yousef IM, Balabaud C, Rosenbaum J, Desmoulière A. Role of apoptosis in the remodeling of cholestatic liver injury following release of the mechanical stress. *Virchows Arch* 2003; 442: 372-380
- 7 Schoemaker MH, Ros JE, Homan M, Trautwein C, Liston P, Poelstra K, van Goor H, Jansen PL, Moshage H. Cytokine regulation of pro- and anti-apoptotic genes in rat hepatocytes: NF-kappaB-regulated inhibitor of apoptosis protein 2 (cIAP2) prevents apoptosis. *J Hepatol* 2002; 36: 742-750
- 8 Reed JC. Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mitt* 1996; : 72-100
- 9 Chandrasekaran P, Seagle C, Rice L, Macdonald J, Gerber DA. Functional analysis of encapsulated hepatic progenitor cells. *Tissue Eng* 2006; 12: 2001-2008
- 10 Wilson JW, Leduc EH. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* 1958; 76: 441-449
- 11 Bartolonisaintomer F. The behavior and evolution of the "oval cells" after hepatectomy, in the liver of rats poisoned with D.A.B. *Arch De Vecchi Anat Patol* 1963; 40: 109-132
- 12 Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003; 120: 117-130
- 13 Haruna Y, Saito K, Spaulding S, Nalesnik MA, Gerber MA. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology* 1996; 23: 476-481
- 14 Grisham JW, Coleman WB, Smith GJ. Isolation, culture, and transplantation of rat hepatocytic precursor (stem-like) cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 204: 270-279
- 15 Sell S. Liver stem cells. *Mod Pathol* 1994; 7: 105-112
- 16 Sell S. Comparison of liver progenitor cells in human atypical ductular reactions with those seen in experimental models of liver injury. *Hepatology* 1998; 27: 317-331
- 17 Yan ZY, An W, Wang P, Jia JD. Isolation and preliminary characterization of a kind of rat liver potential progenitor cells small round hepatic cells. *Shiyan Shengwu Xuebao* 2004; 37: 475-481
- 18 Qin AL, Zhou XQ, Zhang W, Yu H, Xie Q. Characterization and enrichment of hepatic progenitor cells in adult rat liver. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1480-1486
- 19 Tsamandas AC, Antonacopoulou A, Kalogeropoulou C, Tsota I, Zabakis P, Giannopoulou E, Liava A, Tzelepi V, Tepetes K, Petsas T, Kardamakis D, Kalofonos HP. Oval cell proliferation in cirrhosis in rats. An experimental study. *Hepatol Res* 2007; 37: 755-764
- 20 Corcelle V, Stieger B, Gjinovci A, Wollheim CB, Gauthier BR. Characterization of two distinct liver progenitor cell subpopulations of hematopoietic and hepatic origins. *Exp Cell Res* 2006; 312: 2826-2836
- 21 Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, Onodera M, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 2002; 156: 173-184
- 22 Wang X, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Liver repopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mouse pancreatic cells. *Am J Pathol* 2001; 158: 571-579
- 23 Yang LJ. Liver stem cell-derived beta-cell surrogates for treatment of type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* 2006; 5: 409-413
- 24 Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 148-152
- 25 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705
- 26 Masek LC, Sweetenham JW. Isolation and culture of endothelial cells from human bone marrow. *Br J Haematol* 1994; 88: 855-865
- 27 Zhang N, Li J, Luo R, Jiang J, Wang JA. Bone marrow mesenchymal stem cells induce angiogenesis and attenuate the remodeling of diabetic cardiomyopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116: 104-111
- 28 Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ.

- Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4857-4861
- 29 Zhou BJ, Zhong CP, Gu YD, Zhang XH, Liang CM, Wu CQ. [Effects of hepatectomized rat serum on the transdifferentiation of adult rat bone marrow cells into hepatocyte-like cells. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2004; 12: 730-733
 - 30 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
 - 31 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
 - 32 Saini A, Stewart CE. Adult stem cells: the therapeutic potential of skeletal muscle. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006; 1: 157-171
 - 33 Mankani MH, Kuznetsov SA, Robey PG. Formation of hematopoietic territories and bone by transplanted human bone marrow stromal cells requires a critical cell density. *Exp Hematol* 2007; 35: 995-1004
 - 34 Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, Hashemi SM, Ghanaati H, Zare Mehrjardi N, Kazemi Ashtiani S, Malekzadeh R, Baharvand H. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3359-3363
 - 35 Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4497-4504
 - 36 Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3479-3484
 - 37 Graef T, Kuendgen A, Fenk R, Zohren F, Haas R, Kobbe G. Successful treatment of relapsed AML after allogeneic stem cell transplantation with azacitidine. *Leuk Res* 2007; 31: 257-259
 - 38 Gesundheit B, Or R, Amar A, Filon D, Gail A. Gaucher-like cells in beta-thalassemia patient after bone marrow transplantation. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006; 28: 203-204
 - 39 Hájek R, Zácková D, Büchler T, Penka M, Krahulcová E, Korístek Z, Vinklárková J, Adler J, Janovská E, Indrák K, Faber E, Doubek M, Klabusay M, Oltová A, Kuglík P, Bourková L, Dusek L, Mareschová I, Mayer J, Vorlíček J. Treatment of chronic myeloid leukemia with autologous transplantation using peripheral blood stem cells or bone marrow cultured in IL-2 followed by IL-2, GM-CSF, and IFN-alpha administration. *Med Oncol* 2003; 20: 69-76
 - 40 Kohlman-Trigoboff D, Lawson JH, Murphy MP. Stem cell use in a patient with an ischemic foot ulcer: a case study. *J Vasc Nurs* 2006; 24: 56-61
 - 41 Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1364-1369
 - 42 Brehm M, Strauer BE. Successful therapy of patients in therapy-resistant cardiogenic shock with intracoronary, autologous bone marrow stem cell transplantation. *Dtsch Med Wochenschr* 2007; 132: 1944-1948
 - 43 Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, Karatasakis G, Peristeri I, Theodorakos A, Leontiadis E, Plessas N, Theodosaki M, Graphakos S, Cokkinos DV. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007; 69: 773-781
 - 44 Nayak NC, Tandon BN. Liver specific autoimmunity and chronic liver disease--an enigmatic relationship. *Ann Acad Med Singapore* 1980; 9: 172-175
 - 45 Eddleston AL, Mondelli M. Immunopathological mechanisms of liver cell injury in chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 1986; 3 Suppl 2: S17-S23
 - 46 Moriyama T, Guilhot S, Klopchin K, Moss B, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL, Kanagawa O, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science* 1990; 248: 361-364
 - 47 Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112: 160-169
 - 48 Gaça MD, Pickering JA, Arthur MJ, Benyon RC. Human and rat hepatic stellate cells produce stem cell factor: a possible mechanism for mast cell recruitment in liver fibrosis. *J Hepatol* 1999; 30: 850-858
 - 49 Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995; 22: 28-36
 - 50 Isfort RJ, Cody DB, Richards WG, Yoder BK, Wilkinson JE, Woychik RP. Characterization of growth factor responsiveness and alterations in growth factor homeostasis involved in the tumorigenic conversion of mouse oval cells. *Growth Factors* 1998; 15: 81-94
 - 51 Nguyen LN, Furuya MH, Wolfrum LA, Nguyen AP, Holdren MS, Campbell JS, Knight B, Yeoh GC, Fausto N, Parks WT. Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2007; 45: 31-41
 - 52 Park DY, Suh KS. Transforming growth factor-beta1 protein, proliferation and apoptosis of oval cells in acetylaminofluorene-induced rat liver regeneration. *J Korean Med Sci* 1999; 14: 531-538
 - 53 Isfort RJ, Cody DB, Stuard SB, Randall CJ, Miller C, Ridder GM, Doersen CJ, Richards WG, Yoder BK, Wilkinson JE, Woychik RP. The combination of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta induces novel phenotypic changes in mouse liver stem cell lines. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 24): 3117-3129
 - 54 Heo J, Factor VM, Uren T, Takahama Y, Lee JS, Major M, Feinstein SM, Thorgerirsson SS. Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver. *Hepatology* 2006; 44: 1478-1486
 - 55 Katoonizadeh A, Nevens F, Verslype C, Pirenne J, Roskams T. Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study.

■应用要点

骨髓干细胞直接来源于成人的骨髓或外周血, 采集方便, 不存在伦理上的争议, 使其有成为干细胞移植的理想选择。

■同行评价

干细胞的研究是组织工程中的重要课题,为疾病治疗开辟了新领域,本文为肝脏干细胞研究的综述性文章,具有较好的学术价值,但论述缺乏新意。

- Liver Int* 2006; 26: 1225-1233
- 56 Kuhlmann WD, Peschke P. Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 343-359
- 57 Alison MR. Liver stem cells: implications for hepatocarcinogenesis. *Stem Cell Rev* 2005; 1: 253-260
- 58 Lowes KN, Croager EJ, Abraham LJ, Olynyk JK, Yeoh GC. Upregulation of lymphotoxin beta expression in liver progenitor (oval) cells in chronic hepatitis C. *Gut* 2003; 52: 1327-1332
- 59 Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, Achten R, Verslype C, Diehl AM. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 2003; 163: 1301-1311
- 60 Yin L, Lynch D, Sell S. Participation of different cell types in the restitutive response of the rat liver to periportal injury induced by allyl alcohol. *J Hepatol* 1999; 31: 497-507
- 61 Preisegger KH, Factor VM, Fuchsbichler A, Stumptner C, Denk H, Thorgeirsson SS. Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease. *Lab Invest* 1999; 79: 103-109
- 62 Inderbitzin D, Avital I, Gloor B, Keogh A, Candinas D. Functional comparison of bone marrow-derived liver stem cells: selection strategy for cell-based therapy. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1340-1345
- 63 Shi Z, Liang XL, Lu BX, Pan SY, Chen X, Tang QQ, Wang Y, Huang F. Diminution of toxic copper accumulation in toxic milk mice modeling Wilson disease by embryonic hepatocyte intrasplenic transplantation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3691-3695
- 64 苏娟, 李文林, 陶欣荣, 朱海英, 王新民, 李建秀, 田棣, 余宏宇, Joseph T Lau, 胡以平. 人胎肝干细胞在重症联合免疫缺陷小鼠损伤肝脏中的植入. 第二军医大学学报 2005; 26: 243-246
- 65 Kushida T, Inaba M, Hisha H, Ichioka N, Esumi T, Ogawa R, Iida H, Ikehara S. Crucial role of donor-derived stromal cells in successful treatment for intractable autoimmune diseases in mrl/lpr mice by bmt via portal vein. *Stem Cells* 2001; 19: 226-235
- 66 姚鹏, 胡大荣, 王帅, 闻炜, 周一鸣, 龚丽娟. 自体骨髓干细胞移植治疗慢性肝衰竭研究. 肝脏 2005; 1: 171-173
- 67 Rozga J. Liver support technology--an update. *Xenotransplantation* 2006; 13: 380-389
- 68 Awad SS, Hemmila MR, Soldes OS, Sawada S, Rich PB, Mahler S, Gargulinski M, Hirschl RB, Bartlett RH. A novel stable reproducible model of hepatic failure in canines. *J Surg Res* 2000; 94: 167-171
- 69 Dixit V, Gitnick G. The bioartificial liver: state-of-the-art. *Eur J Surg Suppl* 1998: 71-76
- 70 Chen SC, Hewitt WR, Watanabe FD, Eguchi S, Kahaku E, Middleton Y, Rozga J, Demetriou AA. Clinical experience with a porcine hepatocyte-based liver support system. *Int J Artif Organs* 1996; 19: 664-669
- 71 Naik S, Trenkler D, Santangini H, Pan J, Jauregui HO. Isolation and culture of porcine hepatocytes for artificial liver support. *Cell Transplant* 1996; 5: 107-115
- 72 Zhou X, Liu L, Kano J, Mukaiyama T, Tokiwa T. Isolation and cultivation of porcine hepatocytes for extracorporeal artificial liver support system. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 946-949
- 73 Enosawa S, Miyashita T, Fujita Y, Suzuki S, Amemiya H, Omasa T, Hiramatsu S, Suga K, Matsumura T. In vivo estimation of bioartificial liver with recombinant HepG2 cells using pigs with ischemic liver failure. *Cell Transplant* 2001; 10: 429-433
- 74 Faris RA, Konkin T, Halpert G. Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease. *Artif Organs* 2001; 25: 513-521

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 2008-05-28)

Fas/FasL在急性胰腺炎肝损伤中的作用

张晓华, 袁柏思, 朱人敏

张晓华, 袁柏思, 朱人敏, 中国人民解放军南京军区总医院
消化内科 江苏省南京市 210002

作者贡献分布: 本文综述由张晓华和袁柏思完成; 朱人敏审核。
通讯作者: 朱人敏, 210002, 江苏省南京市, 中国人民解放军南京军区总医院消化内科. jszhxh@sina.com
电话: 025-80860027

收稿日期: 2008-01-26 修回日期: 2008-03-20

Role of Fas/FasL in acute pancreatitis-associated liver injury

Xiao-Hua Zhang, Bo-Si Yuan, Ren-Min Zhu

Xiao-Hua Zhang, Bo-Si Yuan, Ren-Min Zhu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Nanjing Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xiao-Hua Zhang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Nanjing Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. jszhxh@sina.com

Received: 2008-01-26 Revised: 2008-03-20

Abstract

Fas/FasL-mediated apoptosis is involved in acute pancreatitis-associated liver injury. It up-regulates proapoptotic pathways in the liver and promotes hepatocellular injury as well as hepatocellular apoptosis during acute pancreatitis. The signal of the production of FasL and the expression of FasL were up-regulated in Kupffer cells during acute pancreatitis. Then, FasL activates Fas-associated death domain (FADD) and unmasks its death effector domain (DED) followed by subsequent activation of the Caspase cascade and downstream effector Caspases, ultimately resulting in DNA cleavage and hepatocellular apoptosis. This review aimed to elucidate the construction, distribution and function of Fas/FasL, and to highlight mechanism of acute pancreatitis-associated liver injury mediated by Fas/FasL.

Key Words: Fas/FasL; Acute pancreatitis; Liver injury; Apoptosis

Zhang XH, Yuan BS, Zhu RM. Role of Fas/FasL in acute pancreatitis-associated liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1661-1665

摘要

Fas/FasL介导的凋亡参与急性胰腺炎肝损伤的发生发展, 急性胰腺炎上调肝内的促凋亡通路并且促使肝细胞损伤和肝细胞凋亡. 急性胰腺炎时通过上调Kupffer细胞内FasL生成的信号使FasL表达增加, FasL激活Fas相关的死亡域和暴露死亡效应结构域, 随后活化Caspase级联反应和下游的效应Caspases, 最终导致DNA裂解和肝细胞凋亡, 从而介导肝损伤. 本文就Fas/FasL结构、分布、功能及介导急性胰腺炎肝损伤的机制作一综述.

关键词: Fas/Fas配体; 急性胰腺炎; 肝损伤; 凋亡

张晓华, 袁柏思, 朱人敏. Fas/FasL在急性胰腺炎肝损伤中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(15): 1661-1665

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1661.asp>

0 引言

Fas, 即Apo-1/CD95, 属于肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家族的一种细胞表面蛋白, 自1989年发现以来, 已证实他参与多种病理生理过程^[1-4]. 1993年Suda *et al*^[5]从细胞毒T细胞杂交瘤分离到Fas/Apo-1配体(Fas/Apo-1ligand, Fas/Apo-1L), 属于TNF家族的成员之一, 由激活的淋巴细胞(如T细胞和NK细胞)产生, 其功能是作为这些细胞毒细胞的效应子来清除被病毒及细菌感染的细胞或新生细胞. FasL与Fas阳性靶细胞结合时可诱导细胞凋亡^[6-8]. 有报道表明FasL介导的凋亡在肝病、急性肾衰竭和甲状腺炎的实质细胞损伤中起重要的作用^[9-15]. 但是有关急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)时Kupffer细胞中FasL表达及其在肝细胞损伤中的作用却少见详细阐述. 本文就Fas/FasL介导AP肝损伤的机制作一综述.

1 Fas/FasL结构、分布及功能

Fas和FasL分子均是由胞外区、跨膜区、胞内区三个部分所组成. Fas分子质量约为36 kDa. Fas蛋白属于I型跨膜糖蛋白, 其N端在膜外, C端在膜内. 跨膜区由17个aa组成, 胞内区为145个aa, 其

■背景资料

肝损伤是急性胰腺炎(AP)病情严重程度判断及预后的重要指标, 已有研究表明AP时枯否细胞生成的细胞因子TNF介导肝细胞损伤, 而Fas配体(FasL)是TNF家族成员之一, FasL介导的凋亡在肝细胞凋亡中起重要作用.

■同行评议者

洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科

■研究前沿

AP肝损伤的发病机制中FasL/Fas介导的肝细胞凋亡致肝损伤是热点研究问题,需要更进一步的实验和临床研究去阐明其机制。

中含有70个aa的保守序列,在细胞凋亡的过程中发挥信号传导的作用,称为死亡结构域(death domain, DD)^[16-17]。Fas抗原具有4个重要区域与死亡信号传导有关:胞外2个,即死亡信号激发域和诱导程序性细胞死亡的抗Fas mAb作用域,前者是特异性FasL与Fas抗原结合并诱导程序性细胞死亡的部位;胞内2个,即死亡抑制域和死亡域,死亡域氨基酸发生突变就阻止凋亡信号传导。Fas分布于多种细胞上,如胸腺细胞,外周活化T、B淋巴细胞、NK细胞,内皮细胞,某些组织在一定条件下也可诱导Fas表达。Fas主要以膜受体的形式存在,当编码细胞膜Fas(membrane-binding Fas, mFas)跨膜区的DNA外显子缺失突变时,改变的mRNA选择性剪接可产生可溶形式的Fas(soluble Fas, sFas),存在于外周血中。sFas与FasL有很高的亲和力,可通过与mFas分子竞争结合FasL而阻断Fas介导的细胞凋亡^[13]。

FasL是Fas在体内的天然配体,分子质量31 kDa,糖基化后分子质量36-43 kDa,分子C端位于胞膜外,与TNF家族蛋白很相似,是典型的II型膜蛋白,属于TNF家族成员。FasL以膜结合蛋白和可溶性蛋白两种形式存在,在人体的分布相当局限,只有睾丸组织基质细胞、角膜、虹膜和视网膜上皮细胞持续表达FasL,静息的T淋巴细胞不表达,受抗原或丝裂原刺激后活化的T淋巴细胞快速表达Fas,通过Fas/FasL结合而介导细胞凋亡^[8,13,18-20]。可溶性FasL(sFasL)分子是通过金属蛋白酶介导的FasL胞外段蛋白溶解而从细胞表面释放,并以三聚体形式存在,能诱导细胞凋亡,sFasL三体能与1个Fas单体结合,也能与3个Fas单体交叉联结。

2 Fas/FasL、细胞凋亡与AP肝损伤

2.1 Kupffer细胞FasL生成的信号调节 AP时释放的炎症介质经血液循环到达肝脏,通过Kupffer细胞内信号转导通路的激活来介导一系列生物学效应^[21-23]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)是一类存在于大多数真核细胞内,转导胞外信号引起细胞反应的丝/苏氨酸蛋白激酶,是细胞内一类重要信号系统。其中,p38MAPK信号通路是MAPKs家族的重要组成部分,他经外界刺激应激而激活,故又称为MAPK应激信号通路,其在全身炎症反应、细胞分化及凋亡等方面具有十分重要的作用^[24-28],被认为是细胞信息传递的交汇点和共同通路。细胞受到刺激后通过下述信号传

导路线激活p38MAPK:胞外信号→MEKK5→MKK3/MKK6→p38MAPK, p38MAPK受到磷酸化激活后通过级联反应作用于下游的转录因子而使FasL mRNA表达上调和FasL蛋白增加^[29-31]。NF-κB是由MAPK超家族的应激调节蛋白激酶激活的,这些上游的NF-κB调节物质包括p38MAPK、ERK1/2和SAPK/JNK,受到不同的胞外刺激导致磷酸化,激发级联反应调节多种转录因子作用于NF-κB^[32-33]。胰弹性蛋白酶作用于Kupffer细胞介导p38MAPK、ERK1/2和SAPK/JNK的磷酸化和激活NF-κB,这些物质的活化都是时间依赖性的;Kupffer细胞抑制剂氯化钆能通过减弱NF-κB和上游的调节物质(ERK1/2和SAPK/JNK)的激活来抑制胰弹性蛋白酶介导的FasL mRNA的上调,提示FasL来源于Kupffer细胞并且FasL和NF-κB的活化是通过MAPK的各条不相互依赖的通路激活的^[34]。

2.2 FasL介导AP肝损伤 肝损伤是AP进程中全身炎症反应的临床表现之一,肝功能损害已成为评估AP严重程度的Ranson评分和急性生理和慢性健康评估II(APACHE II)系统的独立指标^[35-39],对预测AP临床预后尤为重要。Gallagher *et al*^[40]体内实验研究表明,雨蛙素诱导小鼠AP后,肝损伤的标志物-血清AST、LDH水平随时间依赖性的增高,并和血清FasL水平增高相平行,同时小鼠肝脏中FasL mRNA及其蛋白表达亦同时上调;而且FasL表达增加与肝脏凋亡通路中重要的调节酶p38MAPK磷酸化和Caspase-3激活相关,提示雨蛙素诱导AP激活肝脏内凋亡前通路,促进肝细胞损伤和死亡。用Kupffer细胞抑制剂氯化钆预处理能够降低预期升高的AP小鼠血清FasL水平及肝脏中FasL mRNA及FasL的表达。类似的结果同样出现在体外试验中,Kupffer细胞和肝细胞共同培养时,胰弹性蛋白酶(其在体外能够模拟AP的体内效应)处理的Kupffer细胞培养液中肝细胞损伤的标志酶AST、LDH呈时间依赖性的明显增加,并使肝细胞的存活力明显下降;同时胰弹性蛋白酶也上调Kupffer细胞内FasL基因及其蛋白表达,并明显增加上清液中FasL水平,而且Kupffer细胞中Fas也在同一时间里上调,这些物质的上调都呈时间依赖性,而用氯化钆处理后则明显降低上述各物质的水平,并且减少p38MAPK磷酸化和Caspases-3的活化。用FasL单独作用于肝细胞能够降低肝细胞存活力和明显增加肝细胞的凋亡数目,并增加p38MAPK的磷酸化和Caspase-3的活化,而FasL

mAb能减弱FasL介导的对肝细胞的上述作用^[41]. 另有研究表明^[42]: 胆碱缺乏的乙硫氨酸饮食诱导的小鼠AP肝脏FasL、Fas和p38MAPK表达明显上调, 从而诱导肝细胞凋亡, 而在FasL和Fas基因缺陷小鼠的肝脏p38MAPK表达明显减少, 并减少肝细胞凋亡. 上述研究均表明, AP通过上调Kupffer细胞产生Fas/FasL导致肝损伤, FasL在肝细胞凋亡中起着关键性作用. 最近研究表明, AP相关性肝损伤的严重程度取决于Kupffer细胞上调Fas/FasL表达与其自身凋亡之间的平衡^[43].

2.3 Caspases级联反应介导肝细胞凋亡 Caspases级联反应是细胞凋亡执行的重要步骤^[44-46]. 凋亡信号传导途径有两条: 一条是死亡受体传导途径, 另一条是线粒体传导途径^[47-50]. 细胞膜表面存在死亡受体超家族, 当Fas和相应的配体FasL结合后将引起受体聚集, Fas和FasL结合形成死亡诱导信号复合物, 复合物的胞内结构将和胞质中的结合器分子-Fas相关死亡结构域(fas-associated death domain, FADD)结合, FADD末端的死亡效应器结构域(death effector domain, DED)再和Caspase-8前体结合, 使Caspase-8前体水解活化, 再作用于下游底物Caspase-3前体, 将其水解成活性Caspase-3并最终引起细胞凋亡^[51-53]. 当细胞外和细胞内的损害信号传导到线粒体上后, 在线粒体表面存在由对凋亡起相反作用的蛋白因子组成的Bcl-2家族, 他们竞争调节细胞色素C的释放, 如果促使凋亡的一方大于另一方, 线粒体将释放细胞色素C^[54], 后者和胞质中的凋亡激活因子1(Apaf-1)及Caspase-9前体结合形成凋亡酶体(apoptosome), 使Caspase-9前体水解活化, 再进一步水解Caspase-3前体而最终诱发凋亡^[55-56]. 以上两条途径是经典的凋亡传导途径, 其中Caspase-8和Caspase-9作为起始Caspase, 而Caspase-3作为效应器Caspase^[57]. Caspase-3的作用底物是 β -淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP), 其产物是淀粉样 β 肽(A β), A β 将最终触发凋亡^[58]. 有研究发现, 内质网可能是凋亡的新途径, 参与此途径的是Caspase-12, 内质网在应激作用下将Caspase-12前体激活, Caspase-12是否直接触发凋亡尚不清楚, 但A β 引起凋亡必须有Caspase-12的参与, 目前此途径的具体细节有待进一步研究^[59].

许多研究表明, 肝细胞凋亡是通过线粒体传导途径^[60-65]. 通过转基因小鼠对Fas信号研究显示: FADD和Caspase-8是介导凋亡所必需, 而Bcl-2或Bcl-x(L)并不能阻滞FasL介导的肝细

胞凋亡, 提示Fas诱导的细胞死亡信号和Bcl-2家族对凋亡调节的通路是不同的^[66]. 最近Imao *et al*^[67]研究表明, Fas可能依赖Caspase-8(外部途径)和线粒体(内部途径)两条途径激活Caspase-3, 如果线粒体依赖途径被阻滞, 另一途径能够代偿; 而TNFR则主要单独通过线粒体介导的Caspase-9激活途径, 进而激活Caspase-3, 导致肝细胞凋亡.

3 结论

Fas/FasL系统介导的肝细胞凋亡在AP相关的肝损伤中发挥着重要作用, 他参与AP肝损伤的发生发展过程. AP上调肝内促凋亡通路并且促使肝细胞损伤和肝细胞凋亡, 即通过活化的TNFR受体家族成员Fas, FasL激活Fas相关的死亡域和暴露死亡效应结构域, 随后活化Caspase级联反应和下游的效应Caspases, 最终导致DNA裂解和肝细胞凋亡, 从而介导肝损伤. 因此, 以Fas/FasL为靶目标, 阐明其在AP肝细胞损伤中的作用机制, 将为AP临床治疗提供理论和实验依据. 由此提示我们如果能抑制枯否细胞Fas/FasL的表达, 或是用相应的抗体中和其作用, 或是通过RNA干扰技术干扰Fas/FasL的表达, 将有可能达到防治AP肝损伤的目的.

4 参考文献

- Whiteside TL. The role of death receptor ligands in shaping tumor microenvironment. *Immunol Invest* 2007; 36: 25-46
- Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 493-500
- Massari LP, Kastelan M, Gruber F. Epidermal malignant tumors: pathogenesis, influence of UV light and apoptosis. *Coll Antropol* 2007; 31 Suppl 1: 83-85
- Harada T, Taniguchi F, Izawa M, Ohama Y, Takenaka Y, Tagashira Y, Ikeda A, Watanabe A, Iwabe T, Terakawa N. Apoptosis and endometriosis. *Front Biosci* 2007; 12: 3140-3151
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169-1178
- Hirsch CS, Johnson JL, Okwera A, Kanost RA, Wu M, Peters P, Muhumuza M, Mayanja-Kizza H, Mugerwa RD, Mugenyi P, Ellner JJ, Toossi Z. Mechanisms of apoptosis of T-cells in human tuberculosis. *J Clin Immunol* 2005; 25: 353-364
- Keckler MS. Dodging the CTL response: viral evasion of Fas and granzyme induced apoptosis. *Front Biosci* 2007; 12: 725-732
- Wesche-Soldato DE, Chung CS, Gregory SH, Salazar-Mather TP, Ayala CA, Ayala A. CD8+ T cells promote inflammation and apoptosis in the liver after sepsis: role of Fas-FasL. *Am J Pathol* 2007;

■创新盘点

本文从FasL/Fas介导的肝细胞凋亡来阐明AP肝损伤的发病机制, 对AP的治疗具有潜在的临床意义.

■应用要点

- 通过抑制 FasL/Fas 的表达,从而抑制肝细胞凋亡通路进而达到保护作用,有望成为控制 AP 发生发展及保护肝脏的新措施。
- 171: 87-96
 - 9 Meza-Lamas E, Bollain-y-Goytia JJ, Ramírez-Sandoval R, Sánchez-Rodríguez SH, López-Robles E, Avalos-Díaz E, Herrera-Esparza R. Camptothecin induces the transit of FasL trimers to the cell surface in apoptotic HEp-2 cells. *Cell Mol Biol Lett* 2006; 11: 299-311
 - 10 Korkolopoulou P, Saetta AA, Levidou G, Gigelou F, Lazaris A, Thymara I, Scliri M, Bousboukea K, Michalopoulos NV, Apostolikas N, Konstantinidou A, Tzivras M, Patsouris E. c-FLIP expression in colorectal carcinomas: association with Fas/FasL expression and prognostic implications. *Histopathology* 2007; 51: 150-156
 - 11 Boselli D, Losana G, Bernabei P, Bosisio D, Drysdale P, Kiessling R, Gaston JS, Lammas D, Casanova JL, Kumararatne DS, Novelli F. IFN-gamma regulates Fas ligand expression in human CD4+ T lymphocytes and controls their anti-mycobacterial cytotoxic functions. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2196-2204
 - 12 Zhang LJ, Zheng WD, Shi MN, Wang XZ. Effects of interleukin-10 on activation and apoptosis of hepatic stellate cells in fibrotic rat liver. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1918-1923
 - 13 Myśliwiec J, Okota M, Nikolajuk A, Górka M. Soluble Fas, Fas ligand and Bcl-2 in autoimmune thyroid diseases: relation to humoral immune response markers. *Adv Med Sci* 2006; 51: 119-122
 - 14 Elsing C, Harenberg S, Stremmel W, Herrmann T. Serum levels of soluble Fas, nitric oxide and cytokines in acute decompensated cirrhotic patients. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 421-425
 - 15 Yang B, Harris KP, Jain S, Nicholson ML. Caspase-7, Fas and FasL in long-term renal ischaemia/reperfusion and immunosuppressive injuries in rats. *Am J Nephrol* 2007; 27: 397-408
 - 16 Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-243
 - 17 Contassot E, Gaide O, French LE. Death receptors and apoptosis. *Dermatol Clin* 2007; 25: 487-501, vii
 - 18 Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol* 2002; 196: 125-134
 - 19 Mao H, Liu Q, Zhang J, Gu H, Wang L, Zhou X, Yin H, Zhang L, Xie F, Jiang G. Effects of specific antisense oligonucleotide inhibition of Fas expression on T cell apoptosis induced by Fas ligand. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 1714-1722
 - 20 Chang HW, Jeng CR, Lin CM, Liu JJ, Chang CC, Tsai YC, Chia MY, Pang VF. The involvement of Fas/FasL interaction in porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus co-inoculation-associated lymphocyte apoptosis in vitro. *Vet Microbiol* 2007; 122: 72-82
 - 21 Folch-Puy E. Importance of the liver in systemic complications associated with acute pancreatitis: the role of Kupffer cells. *J Pathol* 2007; 211: 383-388
 - 22 Wang X, Zhao X, Shi C, Börjesson A, Chen Z, Axelsson J, Zhao H, Andersson R. Potential mechanisms and significance of acute pancreatitis-associated liver injury. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 604-613
 - 23 Liu HB, Cui NQ, Li DH, Chen C. Role of Kupffer cells in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis-associated lung injury of rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 403-407
 - 24 Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1358-1375
 - 25 Su Q, Chen J, Fang Q. Modulation of the p38MAPK pathway in failing human myocardium secondary to rheumatic heart disease. *J Heart Valve Dis* 2007; 16: 683-689
 - 26 Nold MF, Nold-Petry CA, Fischer D, Richter B, Blaheta R, Pfeilschifter J, Muhl H, Schranz D, Veldman A. Activated protein C downregulates p38 mitogen-activated protein kinase and improves clinical parameters in an in-vivo model of septic shock. *Thromb Haemost* 2007; 98: 1118-1126
 - 27 Gahring LC, Osborne-Hereford AV, Vasquez-Opazo GA, Rogers SW. Tumor necrosis factor alpha enhances nicotinic receptor up-regulation via a p38MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem* 2008; 283: 693-699
 - 28 Hirai H, Shibata T, Aoyama T, Yoshiyama M, Omura T, Suehiro S. Activation of mitogen-activated protein kinases, activator protein-1, and nuclear factor-kappaB during acute rejection after heterotopic heart transplantation in rats. *Osaka City Med J* 2006; 52: 9-19
 - 29 Guilloton F, Jean C, de Thonel A, Laurent G, Quillet-Mary A. Granzyme B induction signalling pathway in acute myeloid leukemia cell lines stimulated by tumor necrosis factor alpha and Fas ligand. *Cell Signal* 2007; 19: 1132-1140
 - 30 Ubol S, Kasisith J, Pitidhamabhorn D, Tepsumethanol V. Screening of pro-apoptotic genes upregulated in an experimental street rabies virus-infected neonatal mouse brain. *Microbiol Immunol* 2005; 49: 423-431
 - 31 Tanaka N, Kamanaka M, Enslen H, Dong C, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA. Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. *EMBO Rep* 2002; 3: 785-791
 - 32 Bai YP, Liu YH, Chen J, Song T, You Y, Tang ZY, Li YJ, Zhang GG. Rosiglitazone attenuates NF-kappaB-dependent ICAM-1 and TNF-alpha production caused by homocysteine via inhibiting ERK1/2/p38MAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360: 20-26
 - 33 Ma X, Jia YT, Qiu DK. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates experimental autoimmune hepatitis: involvement of nuclear factor kappa B. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4249-4254
 - 34 Murr MM, Yang J, Fier A, Gallagher SF, Carter G, Gower WR Jr, Norman JG. Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF-kappaB. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 20-25
 - 35 Kaya E, Dervisoglu A, Polat C. Evaluation of diagnostic findings and scoring systems in outcome prediction in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3090-3094
 - 36 Göçmen E, Klc YA, Yoldaş O, Ertan T, Karaköse N, Koç M, Tez M. Comparison and validation of scoring systems in a cohort of patients treated for biliary acute pancreatitis. *Pancreas* 2007; 34: 66-69
 - 37 Yeung YP, Lam BY, Yip AW. APACHE system is better than Ranson system in the prediction of

- severity of acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 294-299
- 38 Taylor SL, Morgan DL, Denson KD, Lane MM, Pennington LR. A comparison of the Ranson, Glasgow, and APACHE II scoring systems to a multiple organ system score in predicting patient outcome in pancreatitis. *Am J Surg* 2005; 189: 219-222
- 39 Khan AA, Parekh D, Cho Y, Ruiz R, Selby RR, Jabbour N, Genyk YS, Mateo R. Improved prediction of outcome in patients with severe acute pancreatitis by the APACHE II score at 48 hours after hospital admission compared with the APACHE II score at admission. *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation. Arch Surg* 2002; 137: 1136-1140
- 40 Gallagher SF, Yang J, Baksh K, Haines K, Carpenter H, Epling-Burnette PK, Peng Y, Norman J, Murr MM. Acute pancreatitis induces FasL gene expression and apoptosis in the liver. *J Surg Res* 2004; 122: 201-209
- 41 Yang J, Gallagher SF, Haines K, Epling-Burnette PK, Bai F, Gower WR Jr, Mastorides S, Norman JG, Murr MM. Kupffer cell-derived Fas ligand plays a role in liver injury and hepatocyte death. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 166-174
- 42 Gallagher SF, Peng Y, Haines K, Baksh K, Epling-Burnette PK, Yang J, Murr MM. Fas/FasL play a central role in pancreatitis-induced hepatocyte apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 467-474; discussion 474-475
- 43 Peng Y, Gallagher SF, Landmann R, Haines K, Murr MM. The role of p65 NF-kappaB/RelA in pancreatitis-induced Kupffer cell apoptosis. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 837-847
- 44 Denault JB, Salvesen GS. Apoptotic caspase activation and activity. *Methods Mol Biol* 2008; 414: 191-220
- 45 Hatano E. Tumor necrosis factor signaling in hepatocyte apoptosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S43-S44
- 46 Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 491-508
- 47 Estève MA, Carré M, Braguer D. Microtubules in apoptosis induction: are they necessary? *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7: 713-729
- 48 Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev* 2007; 39: 443-455
- 49 Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets* 2007; 8: 493-500
- 50 Majors BS, Betenbaugh MJ, Chiang GG. Links between metabolism and apoptosis in mammalian cells: applications for anti-apoptosis engineering. *Metab Eng* 2007; 9: 317-326
- 51 Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, Blenis J, Tschopp J. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 241-243
- 52 Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 2000; 12: 599-609
- 53 Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 2000; 12: 611-620
- 54 Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1423-1433
- 55 Cain K. Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug Metab Rev* 2003; 35: 337-363
- 56 Ferrer I, Planas AM. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 329-339
- 57 Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol* 2008; 414: 13-21
- 58 Mehmet H. Caspases find a new place to hide. *Nature* 2000; 403: 29-30
- 59 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403: 98-103
- 60 Fischer R, Baumert T, Blum HE. Hepatitis C virus infection and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4865-4872
- 61 Lapierre P, Béland K, Alvarez F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Transl Res* 2007; 149: 107-113
- 62 Reinehr R, Häussinger D. CD95 activation in the liver: ion fluxes and oxidative signaling. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462: 124-131
- 63 Sastre J, Serviddio G, Pereda J, Minana JB, Arduini A, Vendemiale G, Poli G, Pallardo FV, Vina J. Mitochondrial function in liver disease. *Front Biosci* 2007; 12: 1200-1209
- 64 Chen J, Delannoy M, Odwin S, He P, Trush MA, Yager JD. Enhanced mitochondrial gene transcript, ATP, bcl-2 protein levels, and altered glutathione distribution in ethinyl estradiol-treated cultured female rat hepatocytes. *Toxicol Sci* 2003; 75: 271-278
- 65 Guha M, Kumar S, Choubey V, Maity P, Bandyopadhyay U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. *FASEB J* 2006; 20: 1224-1226
- 66 Huang DC, Hahne M, Schroeter M, Frei K, Fontana A, Villunger A, Newton K, Tschopp J, Strasser A. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 14871-14876
- 67 Imao M, Nagaki M, Imose M, Moriwaki H. Differential caspase-9-dependent signaling pathway between tumor necrosis factor receptor- and Fas-mediated hepatocyte apoptosis in mice. *Liver Int* 2006; 26: 137-146

同行评价

本文内容全面, 语言流畅, 可读性好, 但学术价值一般。

编辑 程剑侠 电编 何基才

γ -Synuclein与肿瘤发生发展的研究进展

叶青, 郑民华

■背景资料

γ -Synuclein是神经突触核蛋白(synuclein)家族的一员, 生理状态下主要定位于神经系统, 但近来研究发现其在多种肿瘤中异常高表达, 这种组织特异性的丧失使其有望成为肿瘤诊断的标志物和生物治疗的靶点。

叶青, 郑民华, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科; 上海市微创外科临床医学中心 上海市 200025

作者贡献分布: 叶青与郑民华对此文所作贡献均等; 写作由叶青完成; 郑民华审校。

通讯作者: 郑民华, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科; 上海市微创外科临床医学中心。zmhtiger@yeah.net

电话: 021-64370045-664553

收稿日期: 2008-02-20 修回日期: 2008-03-25

Advances in γ -Synuclein and progression of tumors

Qing Ye, Min-Hua Zheng

Qing Ye, Min-Hua Zheng, Department of General Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University Medical College; Shanghai Minimally Invasive Surgery Center, Shanghai 200025, China

Correspondence to: Min-Hua Zheng, Department of General Surgery, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University Medical College; Shanghai Minimally Invasive Surgery Center, 197 Ruijin Second Road, Shanghai 200025, China. zmhtiger@yeah.net

Received: 2008-02-20 Revised: 2008-03-25

Abstract

γ -Synuclein with strong tissue specificity, a member of the synuclein family, is mainly located in nervous system. Recently, elevated levels of γ -Synuclein was detected in various types of cancers, such as breast, ovarian, liver, gastric cancers, etc., especially in their advanced stages, which indicated loss of tissue specificity in cancer development and also suggested that γ -Synuclein might serve as a new tumor marker. Additionally, multiple pathways influence the regulation of γ -Synuclein expression. γ -Synuclein has also been shown to promote invasion and metastasis of breast and ovarian cancers and enhance cancers' tolerance to some chemotherapies. Overexpression of γ -synuclein also interferes with drug-induced apoptotic responses, which makes it a potential target for treatment.

Key Words: γ -Synuclein; Tumor marker; Regulation; Invasion; Metastasis

■同行评议者

姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

Ye Q, Zheng MH. Advances in γ -Synuclein and progression of tumors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(15): 1666-1671

摘要

目的: γ -Synuclein是神经突触核蛋白(synuclein)家族的一员。在生理状态下, 它主要分布于神经系统, 具有明显的组织特异性。 γ -Synuclein最早发现于人乳腺癌cDNA文库, 近来在肝癌、胃癌和胰腺癌等消化系统肿瘤中也发现 γ -Synuclein的异常高表达, 在晚期肿瘤中表达尤其升高, 提示其在肿瘤的发生发展过程中丧失了原先的组织特异性, 有望成为一个有效的肿瘤标志物。同时, 多种途径介导了 γ -Synuclein表达的调控, γ -Synuclein的过表达能够增加乳腺癌、卵巢癌细胞的侵袭转移能力以及对某些化疗药的耐受性, 也使得其成为潜在的治疗靶点。

关键词: γ -Synuclein; 肿瘤标志物; 调控; 侵袭; 转移

叶青, 郑民华. γ -Synuclein与肿瘤发生发展的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1666-1671

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1666.asp>

0 引言

神经突触核蛋白(synucleins)是一个广泛分布于中枢神经系统突触前成分内的小分子可溶性蛋白质家族, 由 α -Synuclein、 β -Synuclein和 γ -Synuclein 3个成员组成。他们是一组氨基酸序列及结构高度同源的天然伸展蛋白。目前, 对于他们的生物学功能还未充分了解。已有研究显示他们与神经系统的发育及某些神经变性疾病相关。近来研究发现 γ -Synuclein在多种肿瘤特别是晚期肿瘤中异常高表达, 过度表达 γ -Synuclein的肿瘤细胞丧失有丝分裂检查调控能力, 导致染色体非整倍体。在体内和体外试验发现 γ -Synuclein能够增加肿瘤细胞的侵袭转移能力以及对某些化疗药耐药。 γ -Synuclein作为肿瘤标志物已经在乳腺癌中被广泛的研究, 与其他多种肿瘤包括肝癌、胃癌、胰腺癌等消化系统肿瘤的关系也逐渐受到关注, 使得 γ -Synuclein作为新的肿瘤标志物和治疗靶点成为可能^[1]。

1 γ -Synuclein基因及编码蛋白的结构特点

1997年, Ji *et al*^[2]通过直接差异cDNA序列(direct

differential cDNA sequencing)方法从人乳腺癌cDNA文库中分离出BCSG1; 1998年, Lavedan *et al*^[3]从脑基因组文库和脑cDNA文库中克隆出 γ -Synuclein(SNCG); 同年, Ninkina *et al*^[4]报道了一个新的基因persyn. GenBank比较3者的序列极为相似, 只有5个核苷酸的差异, 且3'非编码区无差异, 被认为是同一基因, 因此 γ -Synuclein基因又称为BCSG1或persyn. γ -Synuclein位于染色体10q23.2-q23.3, 长约5.0 kb, 有5个外显子和4个内含子. 外显子1区域包含一个CpG岛, 基因序列中存在4个SNP(single nucleotide polymorphism), 分别为起始密码子-19(C→A); 第3个外显子密码子65(G→C); 第4个外显子密码子(T→A), 并导致氨基酸的改变, Val 110 Glu; 3'非编码区终止密码子后122 bp处(C→T). 转录产物mRNA长约1.0 kb, 编码蛋白有127个氨基酸. γ -Synuclein与 α 、 β -Synuclein序列分别有55.9%和54.3%的同源性. Synuclein家族的N末端序列高度保守, 由5-6个KTKEGV重复序列组成, 易于形成若干个周期性的双极性 α 螺旋结构. 每一个 α 螺旋的极性侧与非极性侧的交界处各有两个Lys残基. 这种双极性 α 螺旋的结构和载脂蛋白的双极性 α 螺旋极为相似, 因此可能同样具备可交换性的脂结合能力. γ -Synuclein C末端的酸性功能域与 α 、 β -Synuclein差异较大, 导致其具有相对不同的组织及亚细胞定位^[1,5].

2 γ -Synuclein的组织分布、亚细胞定位及功能特点

γ -Synuclein表达组织特异性较高, 主要位于外周神经系统的背侧基底神经节与三叉神经节以及中枢神经系统的黑质、海马、丘脑和尾状核等处. 在胚胎及新生儿的大脑组织中 γ -Synuclein表达缺失, 而随着年龄的增加逐渐升高; 在胚胎的第10-11天, 三叉神经节发育成型, γ -Synuclein的表达也逐渐达到成人水平^[1]; 在神经组织内, γ -Synuclein高表达的区域神经微丝H(neurofilament H, NF-H)、神经微丝L(neurofilament L, NF-L)、神经微丝M(neurofilament M, NF-M)的含量显著降低, 提示 γ -Synuclein可能在神经系统的发育及神经微丝网络构建过程中起重要作用^[4,6]. α -Synuclein大量存在于Parkinson病(PD)的Lewy小体内, 同时还是Alzheimer病(AD)淀粉样变性的成分中为非 β 淀粉样蛋白(non-amyloid A β protein component of AD amyloid, NAC)的前体, β 、

γ -Synuclein在相应区域内的代偿性升高可能抑制 α -Synuclein蛋白的异常聚集, 起神经保护作用, α 、 β 、 γ -Synuclein蛋白表达的平衡失调可能导致神经变性疾病^[1]. 此外, 视网膜、视神经及外周循环的淋巴细胞中也能检测到中等程度的表达^[7]. 在卵巢、睾丸、结肠、心脏、乳腺、肾脏、肝脏、前列腺、肺脏、胸腺和胎盘等组织表达量极低或不表达^[1-4]. 在亚细胞水平, γ -Synuclein主要定位于胞质, 但也存在动态变化, 在有丝分裂的后期及末期定位于中间体及纺锤体极端, 并与中心体蛋白相互作用, 提示其与有丝分裂及细胞周期调控可能具有密切联系. 而在应激状态下, γ -Synuclein从核周胞质向细胞核移动, 可能调控某些基因在应激情况下的表达^[8].

3 γ -Synuclein与肿瘤的关系

3.1 γ -Synuclein在肿瘤中的表达 肿瘤的进程中, γ -Synuclein的分布逐渐丧失组织特异性. Ji *et al*^[2]首先发现 γ -Synuclein的mRNA和蛋白在乳腺癌组织中高表达, 且与乳腺癌分期相关: 在正常乳腺组织中无表达, 在早期乳腺癌中低表达(15%), 而在晚期乳腺癌中高表达(74%). 通过Northern blot检测人乳腺癌细胞株SKBR-3M、MCF-7、H3396、NDA-MB-231、T47D、H3922、H3914、ZR-75-1的mRNA, 除MCF-7和H3396, 其余细胞株均表达 γ -Synuclein, 尤以乳腺浸润导管癌细胞株H3922表达最高. 在卵巢癌细胞系和组织中同样发现 γ -Synuclein异常高表达^[9], γ -Synuclein作为肿瘤标志物逐渐引起了人们的重视. Guo *et al*^[10]用免疫组化检测了438例乳腺癌中 γ -Synuclein蛋白的表达, 发现在肿瘤分期($P<0.0001$)、肿瘤大小($P=0.004$)、淋巴结转移($P<0.0001$)方面有显著的统计学意义, 在III/IV期、肿瘤直径>2 cm或有淋巴结转移的病例, γ -Synuclein的表达都较之其他临床病理类型显著升高. 随访发现 γ -Synuclein阳性患者的3年及5年生存率和无瘤生存率都明显低于阴性患者($P<0.05$), 提示 γ -Synuclein可以作为乳腺癌的预后因子. Bruening *et al*^[11]用免疫组化和Western blot检测发现45例的卵巢癌有33例 γ -Synuclein高表达, 未分化癌、子宫内膜样癌、黏液癌、浆液乳头状癌的阳性率分别为55%、50%、67%、85%, 且20%的癌前病变形态, 包括: 卵巢上皮囊肿、上皮肥大增生, 形成

■研究前沿

通过检测 γ -Synuclein表达水平及其甲基化程度来预测肿瘤的进展及预后正在乳腺癌及消化系统肿瘤中进行广泛的研究, 更有研究人员试图在体液中验证其临床实用性, 并已取得很好效果.

■相关报道

刘静文 *et al* 近期的研究表明 γ -Synuclein 在多种恶性肿瘤均有异常表达, 且与肿瘤转移及肿瘤耐药可能有密切的关系, 在临床肿瘤预后评价及肿瘤化疗等临床研究上有广阔应用前景。

假复层及乳头状结构的标本有 γ -Synuclein 阳性染色, γ -Synuclein 可能参与了卵巢癌变的早期事件。Zhao *et al*^[12] 用免疫组化在肝癌组织检测 γ -Synuclein 的表达, 阳性率为 65.7% (46/70), III/IV 期 (44/50, 88%) 明显高于 I/II 期 (2/20, 10%) ($P < 0.0001$), 有远处转移的 (15/15, 100%) 明显高于无转移的 (31/55, 56.4%) ($P < 0.002$)。此外, 在部分肿瘤患者的血清和尿液中检测到了 γ -Synuclein 的存在。Li *et al*^[13] 通过 Western blot 在 38% (21/56) 的胰腺癌患者血清中直接检测到了 γ -Synuclein 的表达, 而与之对应的正常人血清中未能检测到 γ -Synuclein, I \rightarrow III 期的阳性率分别为 22%、38%、50%。部分研究也证实了在乳腺癌患者血清中也可以检测到 γ -Synuclein 的表达^[14]。Iwaki *et al*^[15] 利用蛋白质组学技术, 在膀胱癌患者尿液中找到差异表达蛋白 γ -Synuclein。此外, 在胃癌、肺癌、前列腺癌等肿瘤的研究中亦发现 γ -Synuclein 的异常高表达^[16], 而 Zhou *et al* 的研究却发现 γ -Synuclein 在 59.3% (16/27) 的食管鳞状癌中低表达^[17], γ -Synuclein 与这些肿瘤临床病理特征的关系尚须进一步研究。

3.2 γ -Synuclein 表达的调控 在乳腺癌的基因组中未发现 γ -Synuclein 基因的突变及扩增现象, 故 γ -Synuclein 的异常高表达可能源于转录水平^[18]。Lu *et al*^[18] 用亚硫酸盐修饰乳腺癌和卵巢癌细胞的基因组 DNA, 发现在乳腺癌细胞系中, γ -Synuclein 阳性细胞的 CpG 岛的 15 个 CpG 位点完全没有甲基化, 而在 γ -Synuclein 阴性细胞中则呈现高度且不均一的甲基化, 低甲基化程度和 γ -Synuclein 的表达呈正相关。卵巢癌细胞也有类似的低甲基化程度与 γ -Synuclein 表达的正相关效应, 不同的是, γ -Synuclein 阴性的卵巢癌细胞系 15 个 CpG 位点呈现均一的高度甲基化, 提示 γ -Synuclein 基因的甲基化水平具有组织特异性。用脱甲基化剂 5'-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5'-Aza-2'-deoxycytidine) 处理 γ -Synuclein 阴性的乳腺癌和卵巢癌细胞, 均能恢复 γ -Synuclein 的表达^[18]。Yanagawa *et al*^[19] 用甲基化 PCR 检测 105 例胃癌组织发现, 发现有 40 例 (38.1%) 呈现明显的去甲基化状态。其中, 有淋巴结转移的显著高于无淋巴结转移 (51% 26/51, 26% 14/54, $P < 0.05$), II-IV 期显著高于 I 期 (48% 27/56, 27% 13/49, $P < 0.05$)。Zhao *et al*^[12] 在 70 例肝硬化标本中发现 64.3% 的组织存在 γ -Synuclein 基因 CpG 岛的部分或完全去

甲基化, 黄曲霉毒素 B1 和二甲亚硝胺等致肝癌毒素能够诱导肝癌细胞 HepG2 的 γ -Synuclein 基因 CpG 岛去甲基化, 从而提高 γ -Synuclein 的表达。Liu *et al*^[20] 发现香烟中提取物能够通过降低甲基转移酶 3B (DNMT3B) 的含量使得 γ -Synuclein 基因 CpG 岛无法甲基化, 从而提高 γ -Synuclein 的表达并增加肺癌 A549 细胞的侵袭转移能力。通过检测 γ -Synuclein 去甲基化水平在肿瘤的早期诊断及预后评估中可能具有潜在的应用价值。

AP-1 (activator protein 1) 通过与 DNA 序列中的 AP-1 元件特异结合而介导许多基因的转录激活。AP-1 主要由 c-jun 同二聚体和 c-jun/c-fos 异二聚体组成。 γ -Synuclein 基因的两个 AP-1 元件: 内含子 1 内的 (+)612-(+)618 (TGACTCA) 和其相反链上的 (+)605-(+)598 (TGACCTC), 其中任何一个突变或缺失都会明显降低 γ -Synuclein 启动子的活性^[1,18,21]。Lu *et al*^[22] 选用 AP-1 激活剂佛波酯 (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) 处理 SKBR-3、T47D、HepG2 等细胞, 免疫沉淀实验显示 TPA 刺激 c-jun 与含有内含子 AP-1 位点的染色质区域结合, 同时, γ -Synuclein 启动子的活性和 γ -Synuclein mRNA 的表达增强。T47D 细胞转染 c-jun 显性失活突变的 TAM67 后, γ -Synuclein mRNA 和蛋白的表达明显减少。由于 AP-1 元件是许多细胞间信号通路的汇集点, 一些细胞因子如: OM、TGF- β 、TGF- α 及 EGF 等也可能通过 AP-1 元件调控 γ -Synuclein 的转录^[18]。

γ -Synuclein 内含子 1 的 5' 端还存在一抑制转录活性的调控序列 RE1 (+)293-(+)499, RE1 结合蛋白与 RE1 结合可抑制 γ -Synuclein 转录, 肝脏可表达 RE1 结合蛋白, 但乳腺癌组织和正常乳腺上皮细胞不表达 RE1 结合蛋白; 在 γ -Synuclein 基因的启动子上游存在富含 GC 序列 (-)202-(-)176 的区域, 转录因子 Sp1 可以与该区域特异结合, 若该区域缺失或突变, 则降低 γ -Synuclein 启动子活性^[1,21]; 反式转录因子 CREB 蛋白 (cyclin AMP-responsive element binding protein) 的丝氨酸位点被 cAMP 依赖性蛋白激酶 (cAMP-dependent protein kinase) 或钙/钙调蛋白激酶 (calcium/calmodulin (CaM)-dependent protein kinase) 磷酸化激活后, 能够结合于 γ -Synuclein 基因 5' 端启动子区的同源启动子元件 CRE 一回文序列 TGACGTCA (-)1098-(-)1090, 从而增加 γ -Synuclein 的转录活性。转染突变的编码 CREB 蛋白的基因后, 乳腺癌细胞 γ -Synuclein 基因的转

录活性明显降低^[21]。

3.3 γ -Synuclein的生物学功能与肿瘤的发生发展 研究已证实转染 γ -Synuclein的乳腺癌细胞停泊依赖及非依赖性细胞生长能力增强^[19,23-24]。Lu *et al*^[22]发现用反义 γ -Synuclein能够抑制乳腺癌T47D细胞的非停泊依赖性生长能力。Gupta *et al*^[25]用酵母双杂交技术发现了与 γ -Synuclein相互作用的蛋白质—有丝分裂控制点蛋白BubR1, γ -Synuclein能够通过26S蛋白酶体降解BubR1蛋白, 使得肿瘤细胞跨过有丝分裂控制点的限制而持续性增长, 也造成了染色体非整倍体现象。Inaba *et al*^[26]研究提示 γ -Synuclein并不降低BubR1蛋白的量, 而是通过结合于BubR1竞争性抑制了BubR1与微管动力蛋白—着丝粒蛋白E(centromeric protein E, CENP-E)的结合, 从而抑制了有丝分裂控制点的信号通路。因此 γ -Synuclein的过表达不仅导致BubR1功能的丧失, 也抑制了caspase3和caspase9的活性, 使肿瘤细胞对噻氮酯唑(nocodazole)耐药^[27]。Jiang *et al*^[28-30]研究发现, γ -Synuclein能够作为伴侣蛋白参与热休克蛋白为基础的雌激素受体ER- α 蛋白复合物的组装, 从而增加ER- α 的转录以及与其配体雌激素的结合能力, 似乎 γ -Synuclein增加乳腺癌增殖能力是ER- α 依赖性的, 然而Inaba *et al*^[26]发现, 过度表达 γ -Synuclein的ER- α 阳性或阴性的乳腺癌细胞的增殖能力都显著增强, 也伴随有丝分裂阻滞的标志物—细胞分裂调控蛋白2(Cdc2)激酶活性和组蛋白H3磷酸化水平的降低。此外, γ -Synuclein在细胞有丝分裂的后期及末期定位于中间体及纺锤体极端, 并与中心体蛋白相互作用, 中心体功能失调常造成染色体不稳定性、非整倍体以及多重纺锤体极等现象, γ -Synuclein在其中所起的作用尚不明^[8]。

Surgucheva *et al*^[31]在视网膜母细胞瘤的研究中发现转染 γ -Synuclein的细胞的基质金属蛋白酶MMP9、MMP2表达增强, 从而通过降解及重塑细胞外基质, 以利于肿瘤细胞的迁移穿过细胞基质、基底膜、血管及淋巴管而向远处侵袭。 γ -Synuclein可能通过激活MAPK信号通路磷酸化激活AP-1, 而导致MMP9、MMP2基因转录活性的增强; MAPs(microtubule-associated protein, MAPs)主要参与微管的装配并增加微管的稳定性。 γ -Synuclein通过和MAPs作用调节

细胞骨架的结构和装配动态, 增强细胞的运动性, 现已认识到细胞骨架重组可能导致肿瘤细胞具有更大的侵袭性^[24]。Pan *et al*^[32]研究发过表达 γ -Synuclein能够激活小G蛋白RHO家族成员, 包括: RHO/RAC/CDC42等的GTP结合的激活型, 从而增强乳腺癌及卵巢癌细胞的迁移及侵袭能力。如果用RHO/RAC/CDC42等抑制剂C. difficile Toxin B则能够抑制转染及未转染 γ -Synuclein的乳腺癌及卵巢癌细胞的迁移及侵袭能力; Jia *et al*^[24]实验用 γ -Synuclein转染乳腺癌MDA-MBA-435细胞, 发现转染后的细胞在体外具有更强的迁移侵袭能力, 接种于裸鼠后, 转染后的细胞成瘤后体积更大, 免疫组化提示淋巴结转移及肺转移的情况更明显。

Pan *et al*^[33]发现转染 γ -Synuclein的乳腺癌及卵巢癌细胞对紫杉醇和长春碱等化疗药耐药性增强, 伴随JNK信号通路及下游的Caspase3活性的减弱, 同时ERK1/2激酶的活性增强, 如果用ERK通路的抑制剂U0126先处理细胞, 能够缓解抗微管形成和有丝分裂的化疗药紫杉醇和长春碱的耐药, γ -Synuclein的过表达对DNA损伤化疗药依托泊甙的作用则没有影响。Singh *et al*^[34]的研究证实 γ -Synuclein与有丝分裂控制点蛋白BubR1的相互作用可能增强肿瘤细胞的耐药。他们设计了一个能与 γ -Synuclein相互作用的多肽片段ANK, 向转染 γ -Synuclein后的乳腺癌MCF-7细胞注射ANK, 能够达到与抗微管化疗药噻氮酯唑对未转染的MCF-7细胞一样的杀伤效果。同时还发现ANK使转染 γ -Synuclein的MCF-7细胞对紫杉醇的耐药性下降了3.5倍。免疫共沉淀证实了ANK竞争性抑制了 γ -Synuclein与有丝分裂控制点蛋白BubR1的结合; 流式细胞仪证实了细胞周期G₁期的DNA含量增加, 组蛋白H3磷酸化水平增加, 提示ANK恢复了转染 γ -Synuclein的MCF-7细胞对紫杉醇的敏感性, 有丝分裂阻滞作用增强。

总之, 生理状态下, γ -Synuclein的分布具有很高的组织特异性, 主要表达于神经组织, 而在病理状态下, 特别是在肿瘤的发生发展过程中, γ -Synuclein的分布丧失了组织特异性, 在原先不表达或低表达 γ -Synuclein的组织中, 如乳腺、卵巢、肝、胃、胰腺等异常高表达, 具备了作为一个有效的肿瘤标志物的条件。目前, γ -Synuclein作为乳腺癌诊断的标志物及影响预后的因子已进行了广泛的研究, 而 γ -Synuclein的

■创新盘点

本文系统总结近年来 γ -Synuclein基因在各肿瘤中的研究进展, 从基因和蛋白的表达、表达的调控及对肿瘤生物学特性的影响等方面揭示了 γ -Synuclein作为肿瘤标志物和生物治疗靶点的潜在应用价值。

■应用要点

γ -Synuclein 消化系统肿瘤中有较好的肿瘤表达特异性, 有望成为良好的肿瘤标志物。

生物学功能, 包括对消化系肿瘤的侵袭转移、凋亡、化疗耐药的影响尚未明了。对 γ -Synuclein 的生物学功能及相关机制的深入研究, 以及作为血清及体液肿瘤标志物和化疗耐药判断的运用价值在临床上的进一步检验, 使其有望成为一个新的肿瘤诊断标志物及治疗的靶点。

4 参考文献

- Ahmad M, Attoub S, Singh MN, Martin FL, El-Agnaf OM. Gamma-synuclein and the progression of cancer. *FASEB J* 2007; 21: 3419-3430
- Ji H, Liu YE, Jia T, Wang M, Liu J, Xiao G, Joseph BK, Rosen C, Shi YE. Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res* 1997; 57: 759-764
- Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, Buchholtz S, Dutra A, Nussbaum RL, Polymeropoulos MH. Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene. *Hum Genet* 1998; 103: 106-112
- Ninkina NN, Alimova-Kost MV, Paterson JW, Delaney L, Cohen BB, Imreh S, Gnuchev NV, Davies AM, Buchman VL. Organization, expression and polymorphism of the human persyn gene. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1417-1424
- Lavedan C. The synuclein family. *Genome Res* 1998; 8: 871-880
- Surguchov A, Palazzo RE, Surgucheva I. Gamma synuclein: subcellular localization in neuronal and non-neuronal cells and effect on signal transduction. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001; 49: 218-228
- Surguchov A, McMahan B, Masliah E, Surgucheva I. Synucleins in ocular tissues. *J Neurosci Res* 2001; 65: 68-77
- Surgucheva I, McMahon B, Surguchov A. gamma-synuclein has a dynamic intracellular localization. *Cell Motil Cytoskeleton* 2006; 63: 447-458
- Czekierdowski A, Czekierdowska S, Wielgos M, Smolen A, Kaminski P, Kotarski J. The role of CpG islands hypomethylation and abnormal expression of neuronal protein synuclein-gamma (SNCG) in ovarian cancer. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; 27: 381-386
- Guo J, Shou C, Meng L, Jiang B, Dong B, Yao L, Xie Y, Zhang J, Chen Y, Budman DR, Shi YE. Neuronal protein synuclein gamma predicts poor clinical outcome in breast cancer. *Int J Cancer* 2007; 121: 1296-1305
- Bruening W, Giasson BI, Klein-Szanto AJ, Lee VM, Trojanowski JQ, Godwin AK. Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary. *Cancer* 2000; 88: 2154-2163
- Zhao W, Liu H, Liu W, Wu Y, Chen W, Jiang B, Zhou Y, Xue R, Luo C, Wang L, Jiang JD, Liu J. Abnormal activation of the synuclein-gamma gene in hepatocellular carcinomas by epigenetic alteration. *Int J Oncol* 2006; 28: 1081-1088
- Li Z, Scwabas GM, Peng B, Hess KR, Abbruzzese JL, Evans DB, Chiao PJ. Overexpression of synuclein-gamma in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2004; 101: 58-65
- Wu K, Quan Z, Weng Z, Li F, Zhang Y, Yao X, Chen Y, Budman D, Goldberg ID, Shi YE. Expression of neuronal protein synuclein gamma gene as a novel marker for breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 101: 259-267
- Iwaki H, Kageyama S, Isono T, Wakabayashi Y, Okada Y, Yoshimura K, Terai A, Arai Y, Iwamura H, Kawakita M, Yoshiki T. Diagnostic potential in bladder cancer of a panel of tumor markers (calreticulin, gamma-synuclein, and catechol-o-methyltransferase) identified by proteomic analysis. *Cancer Sci* 2004; 95: 955-961
- Liu H, Liu W, Wu Y, Zhou Y, Xue R, Luo C, Wang L, Zhao W, Jiang JD, Liu J. Loss of epigenetic control of synuclein-gamma gene as a molecular indicator of metastasis in a wide range of human cancers. *Cancer Res* 2005; 65: 7635-7643
- Zhou CQ, Liu S, Xue LY, Wang YH, Zhu HX, Lu N, Xu NZ. Down-regulation of gamma-synuclein in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1900-1903
- Lu A, Gupta A, Li C, Ahlborn TE, Ma Y, Shi EY, Liu J. Molecular mechanisms for aberrant expression of the human breast cancer specific gene 1 in breast cancer cells: control of transcription by DNA methylation and intronic sequences. *Oncogene* 2001; 20: 5173-5185
- Yanagawa N, Tamura G, Honda T, Endoh M, Nishizuka S, Motoyama T. Demethylation of the synuclein gamma gene CpG island in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2447-2451
- Liu H, Zhou Y, Boggs SE, Belinsky SA, Liu J. Cigarette smoke induces demethylation of prometastatic oncogene synuclein-gamma in lung cancer cells by downregulation of DNMT3B. *Oncogene* 2007; 26: 5900-5910
- Lu A, Li Q, Liu J. Regulatory mechanisms for abnormal expression of the human breast cancer specific gene 1 in breast cancer cells. *Sci China C Life Sci* 2006; 49: 403-408
- Lu A, Zhang F, Gupta A, Liu J. Blockade of AP1 transactivation abrogates the abnormal expression of breast cancer-specific gene 1 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 31364-31372
- Liu J, Spence MJ, Zhang YL, Jiang Y, Liu YE, Shi YE. Transcriptional suppression of synuclein gamma (SNCG) expression in human breast cancer cells by the growth inhibitory cytokine oncostatin M. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 62: 99-107
- Jia T, Liu YE, Liu J, Shi YE. Stimulation of breast cancer invasion and metastasis by synuclein gamma. *Cancer Res* 1999; 59: 742-747
- Gupta A, Inaba S, Wong OK, Fang G, Liu J. Breast cancer-specific gene 1 interacts with the mitotic checkpoint kinase BubR1. *Oncogene* 2003; 22: 7593-7599
- Inaba S, Li C, Shi YE, Song DQ, Jiang JD, Liu J. Synuclein gamma inhibits the mitotic checkpoint function and promotes chromosomal instability of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94: 25-35
- Mao Y, Abrieu A, Cleveland DW. Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* 2003; 114: 87-98
- Jiang Y, Liu YE, Lu A, Gupta A, Goldberg ID, Liu J, Shi YE. Stimulation of estrogen receptor signaling by gamma synuclein. *Cancer Res* 2003; 63: 3899-3903
- Liu YE, Pu W, Jiang Y, Shi D, Dackour R, Shi YE. Chaperoning of estrogen receptor and induction of

- mammary gland proliferation by neuronal protein synuclein gamma. *Oncogene* 2007; 26: 2115-2125
- 30 Jiang Y, Liu YE, Goldberg ID, Shi YE. Gamma synuclein, a novel heat-shock protein-associated chaperone, stimulates ligand-dependent estrogen receptor alpha signaling and mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 4539-4546
- 31 Surgucheva IG, Sivak JM, Fini ME, Palazzo RE, Surguchov AP. Effect of gamma-synuclein overexpression on matrix metalloproteinases in retinoblastoma Y79 cells. *Arch Biochem Biophys* 2003; 410: 167-176
- 32 Pan ZZ, Bruening W, Godwin AK. Involvement of RHO GTPases and ERK in synuclein-gamma enhanced cancer cell motility. *Int J Oncol* 2006; 29: 1201-1205
- 33 Pan ZZ, Bruening W, Giasson BI, Lee VM, Godwin AK. Gamma-synuclein promotes cancer cell survival and inhibits stress- and chemotherapy drug-induced apoptosis by modulating MAPK pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 35050-35060
- 34 Singh VK, Zhou Y, Marsh JA, Uversky VN, Forman-Kay JD, Liu J, Jia Z. Synuclein-gamma targeting peptide inhibitor that enhances sensitivity of breast cancer cells to antimicrotubule drugs. *Cancer Res* 2007; 67: 626-633

■同行评价

本文条理分明, 有系统的分析和有价值的科学结论, 若能将综述的重点放在胃肠肿瘤方面, 将是一篇很好的文章.

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位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病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、中医药学、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 2008-05-28)

大承气汤在腹部外科的应用举隅

李桂, 马军宏, 尚海涛, 周振理

■背景资料

大承气汤古时即有记载及广泛应用, 目前临床上应用也较为广泛, 最常应用于腹部外科急腹症、急性肝炎、急性肾炎和糖尿病等。

李桂, 尚海涛, 天津南开医院肿瘤外科 天津市 300100
马军宏, 周振理, 天津南开医院胃肠外科 天津市 300100
作者贡献分布: 此课题由李桂与马军宏设计; 收集资料由李桂, 马军宏, 尚海涛及周振理完成; 本论文写作由李桂, 马军宏及周振理完成。
通讯作者: 李桂, 300100, 天津市, 天津南开医院肿瘤外科。
giantaoding@163.com
电话: 022-27022268-2810
收稿日期: 2007-12-12 修回日期: 2008-03-14

Application of Dachengqi decoction in abdominal surgery

Gui Li, Jun-Hong Ma, Hai-Tao Shang, Zhen-Li Zhou

Gui Li, Hai-Tao Shang, Department of Oncological Surgery, Nankai Hospital of Tianjin City, Tianjin 300100, China

Jun-Hong Ma, Zhen-Li Zhou, Department of Gastrointestinal Surgery, Nankai Hospital of Tianjin City, Tianjin 300100, China

Correspondence to: Gui-Li, Department of Oncological Surgery, Nankai Hospital of Tianjin City, Tianjin 300100, China. giantaoding@163.com

Received: 2007-12-12 Revised: 2008-03-14

Abstract

Dachengqi decoction was documented and applied widely since the ancient time, and at present it still has been used widely, usually in acute abdomen, acute hepatitis, acute nephritis and diabetes, etc. This paper reviewed Dachengqi decoction from perspectives of clinical and experimental research. For clinical research, its healing effects on acute ileus, acute pancreatitis, postoperative gastrointestinal disorder, delayed gastric emptying, gastrointestinal floating caused by mechanical ventilation as well as its influence on multiple organ dysfunction syndrome (MODS) were reviewed; experimental research confirmed that Dachengqi decoction can enhance experimental rats' antibacterial capability, effectively regulate gastrointestinal motility and reduce antiperistalsis, promoting the recovery from digestive disorders. And it is effective in treatment and prevention of Endotoxemia and multiple organ failure and promote the immunological function of severely injured patients.

■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

Key Words: Dachengqi decoction; Clinical research; Experimental research

Li G, Ma JH, Shang HT, Zhou ZL. Application of Dachengqi decoction in abdominal surgery. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(15): 1672-1676

摘要

大承气汤自古时起即有记载及广泛应用, 目前临床上应用较为广泛, 最常应用于腹部外科急腹症、急性肝炎、急性肾炎和糖尿病等。本文就临床研究及实验研究两方面加以综述。临床研究阐述了其在治疗急性肠梗阻、急性胰腺炎、治疗术后胃肠功能障碍、治疗胃排空障碍、治疗机械通气所致胃肠胀气、对MODS的影响等六方面的研究及应用; 实验研究证实了大承气汤可提高试验用小鼠的抗菌能力, 并且可有效调节胃肠动力, 减少胃肠逆蠕动的发生, 从而促进消化障碍性疾病的康复, 同时大承气汤可以有效防治内毒素血症和多器官功能损害的发生, 并可提高严重创伤感染患者的免疫功能。

关键词: 大承气汤; 临床研究; 实验研究

李桂, 马军宏, 尚海涛, 周振理. 大承气汤在腹部外科的应用举隅. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1672-1676
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1672.asp>

0 引言

大承气汤为苦寒攻下峻剂, 原为阳明腑实, 热结旁流, 里热实证之热厥、痉病或发狂者而设。目前, 临床将该方常用于急腹症、急性肝炎、急性肾炎和糖尿病等, 且对于该方的研究已取得了明显的进展。现将2000年以来对该方的研究综述如下。

1 临床研究

1.1 治疗急性肠梗阻 大承气汤治疗急性肠梗阻一直是临床上研究的课题, 贺立群^[1]以大承气汤为主, 中西医结合治疗术后早期炎性肠梗阻30例, 结果全部治愈; 王维钊^[2]用大承气汤及足三里穴位注射VitB1治疗术后早期炎性肠梗阻, 结

果显示32例全部治愈;张宇 *et al*^[3]对46例术后早期炎性肠梗阻患者随机对照观察,结果两组差异有显著意义($P<0.05$),均证明中西医结合治疗术后早期炎性肠梗阻是一种满意而有效的治疗方法^[4]。为了探讨术后早期炎性肠梗阻非手术疗法的疗效,王永勤^[5]采用生大黄及复方大承气汤保留灌肠,发现上述方法可协同保护胃肠屏障功能^[6-9],促使肠管蠕动^[10-12],有加速炎性粘连吸收的作用。杨湘跃 *et al*^[13]以大承气汤为主的中西医结合非手术治疗单纯性肠梗阻82例,总有效率91.46%,明显高于对照组。叶新民^[14]以复方大承气汤治疗粘连性肠梗阻78例,78例均于用药后2-4 h自觉肠蠕动增强,听诊肠鸣音活跃,但无气过水音,继之排便,排气直至痊愈,均于第一次用药1-2 h后,患者即可有肛门排气,或排便,于第2次药后0.5-1 h出现排稀水样便,随之腹痛腹胀消失或明显缓解。轻者用药1剂的占52例,中等者用药2剂占14例,重者用药3剂占12例,无1例中转手术。赵园 *et al*^[15]将117例患者随机分为2组。对照组52例,予西医保守治疗;治疗组65例,在对照组治疗基础上予复方大承气汤(胃管注入,并予大承气汤滴注灌肠,治疗组总有效率、治愈率分别为90.77%、75.38%,对照组对应分别为71.15%、55.77%。

1.2 治疗急性胰腺炎 中医学认为,急性胰腺炎主要由于肝郁气滞,脾胃实热进而转化为湿热郁滞引起^[16-17],治疗应给与疏肝理气、通里攻下^[19-22]、清热利湿为主。西医认为应该限制患者饮食,让患者胃肠充分休息,以避免胰腺组织的过度分泌,戴勇 *et al*^[23]将78例急性胰腺炎患者随机分成两组,对照组采用西医常规治疗同时给与大承气汤等低位灌肠,结果发现在24-48 h内,对照组的腹痛腹胀缓解率为17.5%,治疗组为28.9%。3 d以内,对照组缓解率为62.5%,治疗组为89.4%。两组患者血清淀粉酶化验结果比较5 d后,结果有显著性差异($P<0.01$),提示用大承气汤分次低位灌肠治疗急性胰腺炎,利于毒素的排出^[24-26],纠正了由于毒素所引起的肠麻痹^[27-29],又避免了胰腺可能引起的胰腺分泌亢进^[30],能明显缩短疗程、减少并发症^[31-32]、提高治愈率^[33-34]、减少住院时间。欧宏宇^[35]采用大承气汤及清胰汤治疗重症急性胰腺炎43例,结果以治愈,好转,无效表示(治愈:腹部体征消失,血、尿淀粉酶等实验室检查正常,无假性胰腺囊肿形成,无慢性胰腺炎症状。好转:腹部体征减轻、血尿淀粉酶降低,腹腔内无渗出液,转为慢性胰

腺炎及有假性胰腺囊肿形成。无效:腹部体征未消失,较治疗前加重,根据Ranson氏指标评估预后差),结果43例中18例中转手术治疗,其余均中西医结合非手术治疗,并且明显降低了病死率,减少或避免术后并发症。李志新 *et al*^[36]对6例重症胰腺炎合并腹腔间隔室综合征(abdominal compartment syndrome, ACS)患者采用大承气汤通腑攻下为主的中西医结合综合治疗,结果5例患者成功缓解病情,大便通畅,腹胀明显缓解,呼吸减慢,心率下降,血压降低,避免进展为典型的ACS^[37],体现了通腑攻下法的恰当应用对ACS的预防作用^[38]。李俊达 *et al*^[39]用加味大承气汤治疗急性胆源性胰腺炎29例,治疗组有效率为93.1%,对照组有效率为79.3%,认为加味大承气汤可能有利于十二指肠乳头炎症水肿的消退^[40],促使细小结石和胆汁胰液的排出,降低胰胆管内压,而起治疗作用,所以取得较好的疗效。

1.3 治疗术后胃肠功能障碍 王庆才 *et al*^[41]用大承气汤加味治疗肠癌术后或腹盆腔灌注化疗药后所致粘连性肠梗阻(燥屎内结型)取得了较好的临床效果。龚发军 *et al*^[42]用大承气汤灌胃观察对腹部术后胃肠动力障碍的影响,结果治疗组肠鸣音恢复、肛门排气及排便时间明显早于对照组($P<0.01$),证明大承气汤有明显改善腹部术后动力障碍的作用^[43],可促进术后胃肠功能的恢复^[44]。为了探讨复方大承气汤治疗胃癌术后功能性胃排空障碍的疗效,李保东^[45]将22例患者分成中西医结合及西药两组,治疗组加服复方大承气汤,结果治疗组进食的恢复时间、每日平均胃液量与对照组比较有显著性差异($P<0.01$)。刘吕敏^[46]以大承气汤治疗48例机械通气所致胃肠胀气时发现,大承气汤加味对机械性所致胃肠胀气具有良好的疗效^[47-48]。李辉^[49]以大承气汤加减,观察腹部术后47例患者腹胀缓解情况,结果显效35例,好转12例,总有效率为100%^[50]。杨利群 *et al*^[51]采用莱菔承气汤灌肠的方法,对急腹症术后127例患者进行分组观察,结果治疗组术后显效率、有效率和无效率分别为70.7%、23.9%、5.4%,对照组术后显效率、有效率和无效率分别为45.7%、20.0%、34.3%^[52]。

1.4 对MODS的影响 武若君 *et al*^[53]观察了大承气汤灌肠对多脏器功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的影响,结果两组对比,治疗组肠鸣音恢复时间、肛门排气时间、腹胀消退时间、MODS好转及恢复时间差异具有显著意义,说明该方可改善MODS患

■研发前沿

目前,大承气汤在临床及试验研究方面已取得明显成绩,其发展还将需要大量的临床研究和实验探索。

■应用要点

大承气汤可以有效防治内毒素血症和多器官功能损害的发生,并可提高严重创伤感染患者的免疫功能。

者的器官功能^[54]。陈海龙 *et al*^[55-56]对SD大鼠进行ip无菌酵母多糖A制备大鼠MODS模型,结果显示MODS时大鼠肠道细菌微生态出现明显变化,发生肠源性内毒素血症和细菌易位;从而说明大承气汤可以调整肠道菌群,恢复肠道微生态平衡,增加机体定植抗力,防治细菌易位和内毒素血症。

2 实验研究

2.1 大承气汤或其组分大黄对小鼠抗菌能力的影响 胡萍 *et al*^[57]分别对小鼠ip大承气汤或大黄煎预防治疗2 d后,再ip大肠杆菌(10^{11} /L)或变形杆菌(10^9 /L)建立腹膜炎模型,继续用药治疗2 d,发现模型治疗组小鼠死亡数及相应菌血症发生率明显低于对照组($P<0.05$),大承气汤和大黄煎对大肠杆菌和变形杆菌感染的小鼠均有良好保护作用,预防加治疗组和模型组治疗后存活鼠进行心脏血涂片,血培养细菌呈阴性,而死亡鼠呈阳性结论,证实大承气汤^[58]及大黄^[59]有良好的抗菌作用。

2.2 有效调节胃肠动力,促进消化障碍性疾病康复 齐清会 *et al*^[60]应用消化道灌注测压、胃电图描记、胃动素的放免测定、口-盲传输时间测定等手段,直接观察大承气冲剂对人体消化道运动功能的影响,结果发现大承气冲剂可显著改善术后胃电节律的紊乱,提高移动性运动复合波(migrating motor complex, MMC)III期的幅度和时间,减少胃肠逆蠕动的发生,增加血中胃动素水平^[61],减少口-盲传输时间,促进胃肠运动功能的恢复^[62],结果显示大承气冲剂是有效的胃肠动力药,能有效治疗消化道运动障碍疾病。许继德 *et al*^[63]观察小、中和大剂量大承气汤在内毒素血症中对小鼠炭末推进率和湿粪计数的影响。结果显示中剂量大剂量大承气汤组均能显著增加炭末推进率($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。提示大承气汤可增强内毒素血症小鼠胃肠运动。

2.3 抑制血清内毒素 万幸 *et al*^[64]选用酵母多糖诱导小鼠全身性炎症反应综合征模型,给予大承气汤后,分别在6、12和24 h等时点用鲎试剂微量法测定小鼠血清内毒素含量,用放射免疫法测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)含量,结果证实SIRS状态下模型小鼠血清内毒素、TNF- α 、IL-6均升高,与同时点模型组比较,大承气汤6、12 h时点可以明显抑制血清内毒素的升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);大承气汤6 h组TNF- α 水平降低(与造模后6 h组相比, $P<0.05$);

血清IL-6水平方面,大承气汤各组比正常组升高的幅度均较模型组低,在24 h时点,大承气汤组与模型组相比显著降低($P<0.05$),说明大承气汤在治疗SIRS过程中,可以有效抑制内毒素的转移^[65]和TNF- α 、IL-6等炎症反应性细胞因子的产生^[66]。李红^[67]将大白鼠作为实验对象,制成4组模型,分别用加味大承气汤、大承气汤、甲硝唑和生理盐水对大鼠进行治疗并检测24、72 h、给药后6 d血清中ET及TNF含量,结果提示清、下、益、活四法并用的加味大承气汤组能血清中ET及TNF的浓度迅速地降低。给药6 d后内毒素减毒率达50%,与另3组比较有显著性差异,并且大鼠组织器官的病理损害较轻,提高了大鼠的生存率,说明加味大承气汤可有效防治内毒素血症和多器官功能损害的发生^[68]。

2.4 对严重创伤感染患者免疫功能的影响 邢迎红 *et al*^[69]将严重创伤感染患者45例随机分为两组,治疗组应用大承气汤鼻饲治疗24例,对照组采用常规治疗21例,观察患者外周血核细胞表面人白细胞抗原DR(HLA-DR)表达变化及MODS发生情况,结果对照组HLA-DR恢复缓慢,治疗组HLA-DR恢复迅速,对照组MODS发生率为66.67%,治疗MODS发生率为29.17%($P<0.05$),提示大承汤可调节患者的免疫功能^[70],降低严重创伤感染MODS的发生率。唐文富 *et al*以承气汤加减治疗急性胰腺炎,结果显示能改善SAP患者受损的细胞免疫功能,改善病情^[71]。

3 参考文献

- 1 贺立群. 中西医结合治疗术后早期炎性肠梗阻30例. 南华大学学报 2003; 31: 362-363
- 2 王维钊. 术后早期炎性肠梗阻32例中西医结合治疗的临床分析. 右江医学 2006; 34: 634-635B
- 3 张宇, 何清源, 蒋敦厚, 叶永青. 复方大承气汤治疗腹部术后早期炎性肠梗阻分析. 陕西中医 2007; 28: 53-54
- 4 王继弟, 李滨, 张素君. 大承气汤研究进展. 山东中医杂志 2004; 23: 571-573
- 5 王永勤. 术后早期炎性肠梗阻非手术疗法探. 腹部外科 2003; 16: 181-182
- 6 吴威中, 崔乃强, 何清宇, 田在善, 林秀珍, 杨文修, 齐请会, 伍孝先, 解基良, 郭世铎. 通里攻下法在腹部外科疾病中的应用与基础研究. 中国中西医结合外科杂志 2004; 1
- 7 李志军, 汤日波, 张万祥. 肠道屏障功能损害与SIRS/MODS的发生及其防治. 中国危重病急救医学 2000; 12: 766-768
- 8 肖菲, 康焰. 肠道细菌移位的研究现状. 中国普外基础与临床杂志 2006; 13: 240-243
- 9 梁存河, 蒋朱明. 胃肠屏障研究的几个热点问题. 中国危重病急救医学 2001; 13: 202-204
- 10 杨红, 胡军. 复方大承气汤灌肠对腹部手术胃肠功能

- 恢复作用观察. 中国中医急症 2008; 17: 112
- 11 毕恩旭, 孙文娟, 王光军. 急腹术后延迟性肠麻痹临床分析. 菏泽医学专科学校学报 2007; 19: 41-42
- 12 王君, 邹原, 宫德正. 中药对胃肠运动的促进作用. 大连医科大学学报 2001; 23: 72-74
- 13 杨湘跃, 王小华. 中西医结合治疗单纯性肠梗阻82例. 四川中医 2002; 20: 30-31
- 14 叶新民. 复方大承气汤治疗粘连性肠梗阻78例. 上海中医药杂志 2005; 39
- 15 赵园, 彭金军, 韩红军. 中西医结合治疗粘连性肠梗阻65例疗效观察. 新中医 2006; 38: 53-54
- 16 潘万能, 徐刚, 叶宇, 刘月刚, 李劲, 李荣祥. 全疗程中西医结合治疗重症急性胰腺炎的疗效观察. 四川中医 2006; 24: 47-48
- 17 崔乃强, 吴咸中. 重症急性胰腺炎治疗的现状与展望. 中国危重病急救医学 2004; 16: 75-76
- 18 张继良, 王东君. 大柴胡汤治疗急性胰腺炎52例. 陕西中医 2006; 27: 31
- 19 黄海涛, 王学友. 重症急性胰腺炎中西医结合治疗近况. 中国临床医生 2006; 34: 43-45
- 20 陈剑. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎临床研究. 河南中医学院学报 2005; 20: 35-36
- 21 郑晓梅, 黄宗文. 通里攻下法治疗急性胰腺炎进展. 中国中医急症 2005; 14: 264-265
- 22 王幼黎, 陈文寿. 通里攻下法在重症急性胰腺炎治疗中的作用. 现代中西医结合杂志 2002; 11: 1197-1198
- 23 戴勇. 中西医结合治疗急性胰腺炎38例. 陕西中医 2005; 26: 19
- 24 孙成考, 卞耀臣. 血必净对重症急性胰腺炎患者内皮细胞功能及血浆内毒素影响的临床研究. 长春中医药大学学报 2007; 23: 37-38
- 25 王友清, 叶子. 通腑清下汤对急性胰腺炎患者肠道屏障保护作用的影响. 中医杂志 2007; 48: 325-327
- 26 邓碧珠. 清热解毒通腑、活血化瘀治疗急性胰腺炎临床观察. 中国中医急症 2005; 14: 840-841
- 27 曹福凯, 钱峻, 金小晶, 张明德. 调味承气加味方治疗轻型急性胰腺炎并发肠麻痹31例. 河南中医 2003; 23: 67-68
- 28 林瑜. 中药灌肠治疗急性胰腺炎肠麻痹33例. 福建中医药 2006; 37: 39-40
- 29 陈洁明, 沈跃进, 莫耘松, 白玉芬. 大承气汤加味灌肠治疗急性胰腺炎肠麻痹36例. 中国中医急症 2006; 15: 1289
- 30 张相彩, 徐颖颖. 急性胰腺炎的药物治疗进展. 中国医院药学杂志 2004; 24: 433-434
- 31 刘淑梅, 窦雅丽, 梁桃. 个体化阶段性营养支持治疗急性胰腺炎. 中国临床医学 2007; 14: 532-533
- 32 熊炯圻, 韩保卫, 王春友, 陶京, 李晓辉. 分阶段营养对重症急性胰腺炎患者感染性并发症的影响. 消化外科 2006; 5: 86-88
- 33 刘俊, 范崇九, 殷杰, 张德进, 吕振冠, 谢孝东, 陈玉泉, 沈洪薰, 朱良春. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎的临床研究. 肝胆胰外科杂志 2004; 16: 269-270
- 34 吴骏, 温思齐, 谢鐸. 对提高重症急性胰腺炎治愈率的临床思考(附28例报告). 岭南现代临床外科 2005; 5: 237-239
- 35 欧宏宇. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎. 陕西中医 2005; 26: 883
- 36 李志新, 邱锦芳, 张忠. 通腑攻下法治疗重症胰腺炎合并腹腔间隔室综合征临床体会. 新中医 2004; 36: 33-34
- 37 张赞华, 酈岳. 大承气汤治疗腹腔间隔室综合征疗效观察. 浙江中西医结合杂志 2007; 17: 612-613
- 38 汤耀卿, 雷若庆. 提高对重症急性胰腺炎合并腹腔间隔室综合征的认识. 外科理论与实践 2001; 6: 361-362
- 39 李俊达, 葛君华, 何剑琴. 加味大承气汤治疗急性胆源性胰腺炎29例. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 657
- 40 王洪源. 复方大承气汤治疗急性胆源性胰腺炎16例. 医药产业资讯 2006; 3: 69
- 41 王庆才. 仲景方药与肿瘤临床. 辽宁中医杂志 2002; 2: 344-346
- 42 龚发军, 申巧云. 大承气汤对腹部术后胃肠动力障碍的影响. 湖南中医药导报 2003; 9: 42-43
- 43 张细江. 大承气汤对危重症患者胃肠功能衰竭防治作用的研究. 实用中西医结合临床 2005; 5: 7-8
- 44 金伟飞, 王仲迪. 复方大承气汤灌胃促进腹部手术后胃肠功能恢复的疗效观察. 现代中西医结合杂志 2004; 13: 1301-1302
- 45 李保东. 复方大承气汤治疗胃癌术后功能性胃排空障碍. 中国现代医学杂志 2002; 12: 78-80
- 46 刘吕敏. 加味大承气汤治疗机械通气所致胃肠胀气. 四川中医 2002; 20: 49
- 47 王兰, 李黎明, 晁彦公, 边伟帅, 焦庆贵. 加味大承气汤对机械通气患者胃肠功能保护作用临床研究. 北京中医药大学学报 2006; 29: 788-789
- 48 余丹凤, 张庚, 胡马洪. 大承气汤加味对危重症患者胃肠功能衰竭及肺部感染的影响. 中国中医急症 2003; 12: 416-418
- 49 李辉. 中药消胀排气汤治疗术后腹胀47例. 陕西中医 2001; 22: 26
- 50 孟伟, 李保东. 复方大承气汤治疗食管贲门癌术后胃排空障碍. 中国煤炭工业医学杂志 2001; 4: 732
- 51 杨利群, 陈哲宇. 莱菔承气汤灌肠对术后腹胀的治疗作用. 中国中西医结合外科杂志 2003; 9: 194-195
- 52 黄继东, 陈国盛. 大承气汤熨剂对急腹术后恢复的临床研究. 辽宁中医药大学学报 2007; 9: 10-11
- 53 武若君, 李秦, 刘京涛, 魏福岭. 大承气汤灌肠对多脏器功能障碍综合征的临床应用. 中国现代医学杂志 2003; 13: 76-77
- 54 孙元莹, 李志军, 王今达. 大承气汤与多脏器功能障碍综合征. 辽宁中医学院学报 2006; 8: 36-37
- 55 陈海龙, 吴咸中, 关凤林, 康白. 大承气汤对MODS时肠道细菌微生态学影响的实验研究. 中国微生态学杂志 2007; 19: 132-134
- 56 陈海龙, 吴咸中, 关凤林. 中医通里攻下法对多器官功能不全综合征时肠道屏障功能保护作用的实验研究. 中国中西医结合杂志 2000; 20: 121-123
- 57 胡萍, 白凤菊, 李东升, 张才丽, 吴咸中. 大承气汤及大黄治疗小鼠细菌性腹膜炎. 中国中西医结合杂志 2000; 20: 53-54
- 58 魏生林, 魏淑艳. 中西医结合治疗急性阑尾炎116例观察. 甘肃中医 2003; 16: 27
- 59 岳云升, 李仲兴, 王秀华, 赵建宏, 杨敬芳, 王鑫. 用新方法进行大黄对308株临床菌株抗菌活性研究. 航空航天医药 2004; 15: 16-18
- 60 齐清会, 王简, 回建峰, 江力, 吴咸中. 大承气冲剂对人体胃肠运动功能的影响. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 21
- 61 冯敬坤, 岳华, 李爱英, 张风华, 宋翠森, 曹刚. 大承气汤对家兔胃动素分泌和胃电活动影响的实验研究. 河北中医药学报 2002; 17: 1-4
- 62 徐璐, Theo Peeters. 胃动素受体突变对胃动素和红霉素激活作用的影响. 滨州医学院学报 2004; 27: 318-319
- 63 许继德, 樊雪萍, 孙黎明, 李建华. 大承气汤对内毒素血症小鼠胃肠运动的影响. 现代中西医结合杂志 2004; 13: 3249-3250
- 64 万幸, 刘倩娟, 王培训. 大承气汤对全身性炎症反应干预作用的实验研究. 广州中医药大学学报 2003; 20: 153-156
- 65 冯立民, 陈海龙, 关凤林. 阳明腑实证时内毒素与炎症介质的变化及复方大承气汤的治疗作用. 中国中西医

同行评价

本文将大承气汤的应用及其部分实验研究进行了综述,有一定的可读性和参考意义。

- 结合外科杂志 2003; 9: 351-353
- 66 王春妍, 杨世忠, 迟宝荣. 大承气汤对急性肝损伤大鼠肠源性内毒素血症生物学效应的阻断作用. 中西医结合肝病杂志 2006; 16: 356-358
- 67 李红. 加味承气汤对继发性腹膜炎大鼠血清ET及TNF影响的实验研究. 湖北中医学院学报 2002; 4: 24-25
- 68 蔡光先, 王银山, 周兵, 郑爱华, 胡学军. 大承气汤对失血性休克大鼠IL-6、IL-10影响的研究. 中医药学刊 2003; 21: 1229-1230
- 69 邢迎红, 崔克亮, 曹书华, 李健, 高红梅. 大承气汤对危重患者单核细胞表面人白细胞抗原DR表达的影响. 中国急救医学 2002; 22: 226-227
- 70 陈光远, 唐文富, 黄宗文, 夏庆, 梁文琼, 蒋俊明, 邹才华. 大承气汤对犬急性坏死性胰腺炎红细胞免疫影响的实验研究. 湖南中医药导报 2003; 9: 94-95
- 71 唐文富, 万美华, 朱林, 陈光远, 夏庆, 黄熙. 生长抑素联合中药对急性胰腺炎患者免疫功能的影响及临床疗效. 中西医结合学报 2005; 3: 103-107

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出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、补充或删节时, 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, 须经得《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 2008-05-28)

胃泌素及其受体拮抗剂丙谷胺对肝癌细胞株生长的影响

江春平, 孔 诚, 丁义涛

江春平, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

孔诚, 江苏省肿瘤医院放疗科 江苏省南京市 210008
卫生部重点项目基金资助项目, No. WKJ2005-2-032

南京市重点项目基金资助项目, No. ZKX0410

作者贡献分布: 江春平对本文作主要贡献; 此课题由江春平、孔诚及丁义涛设计; 研究过程由江春平与孔诚完成; 研究所用新试剂及分析工具由丁义涛提供; 数据分析由江春平与孔诚完成; 本论文写作由江春平、孔诚及丁义涛完成。

通讯作者: 丁义涛, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科. yitaoding@hotmail.com
电话: 025-83304616

收稿日期: 2008-01-27 修回日期: 2008-04-02

Effects of gastrin and its antagonist proglumide on proliferation of human hepatoma cell lines

Chun-Ping Jiang, Cheng Kong, Yi-Tao Ding

Chun-Ping Jiang, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Cheng Kong, Department of Radiotherapy, Tumor Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Supported by: the Major Programs of Ministry of Health, No. WKJ2005-2-032; and the Science Foundation of Nanjing City, No. ZKX0410

Correspondence to: Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yitaoding@hotmail.com

Received: 2008-01-27 Revised: 2008-04-02

Abstract

AIM: To determine the effects of gastrin and its receptor antagonist proglumide on the proliferation of hepatoma cell lines, and to evaluate the possibility of non-cytotoxic therapy for liver cancers.

METHODS: The vitality and cycle distribution of 4 liver cancer cell lines treated with gastrin and proglumide were analyzed using MTT colorimetric assay and flow cytometry.

RESULTS: Gastrin significantly stimulated the proliferation of QGY-7701 and Bel-7402 at a concentration approximate to physiological levels, and shifted G_0/G_1 phase to S, G_2/M phase

of Bel-7402, which could be blocked by gastrin receptor antagonist proglumide. And excessive gastrin exerted inhibitory effect on QGY-7701. However, Gastrin had no effect on HepG2 and SMMC-7721 cell lines. Proglumide at a high concentration significantly inhibited all cell lines.

CONCLUSION: Gastrin can promote proliferation of liver cancer cells and DNA synthesis while Proglumide inhibit gastrin. Gastrin receptor antagonist may become a new endocrine approach to some liver cancers.

Key Words: Liver cancer; Gastrin; Proglumide; Cell proliferation; Cell cycle; Human hepatoma cell lines

Jiang CP, Kong C, Ding YT. Effects of gastrin and its antagonist proglumide on proliferation of human hepatoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1677-1680

摘要

目的: 研究胃泌素及胃泌素受体拮抗剂丙谷胺对肝癌细胞株的增殖的影响, 并探讨肝癌患者非细胞毒内分泌治疗的可能性。

方法: 采用MTT比色分析法研究在不同浓度胃泌素和其受体拮抗剂丙谷胺的干预下, 4种人肝癌细胞株的增殖情况, 选取1种细胞株, 用流式细胞仪分析在胃泌素及丙谷胺作用下的周期分布。

结果: 胃泌素在接近生理浓度下促进QGY-7701和Bel-7402的增殖, 丙谷胺对胃泌素的作用有抑制作用。过量的胃泌素对QGY-7701有抑制效果。胃泌素对HepG2和SMMC-7721无明显促增殖作用。丙谷胺在高浓度下对所有细胞株皆有明显的抑制作用。胃泌素可促使Bel-7402 G_0/G_1 期细胞向S、 G_2/M 期转化, 加用丙谷胺后胃泌素的上述作用消失。

结论: 胃泌素对肝癌细胞株有促增殖作用及促进DNA合成, 丙谷胺对其有抑制作用, 可能成为肝癌内分泌辅助治疗的一个新的途径。

关键词: 肝癌; 胃泌素; 丙谷胺; 细胞增殖; 细胞周期

■背景资料

近10多年来, Gas和CCK-2R与肿瘤的关系引起关注。大量体外研究表明, Gas可刺激胃、结肠、小细胞肺癌、甲状腺髓样癌等肿瘤细胞生长, 细胞株过表达或异位表达CCK-2R, 在加有Gas的培养基中其细胞增殖加快, DNA、蛋白质合成旺盛。在过表达Gas基因小鼠及Gas基因敲除小鼠的体内研究也充分证实Gas能调节肿瘤细胞增殖、迁移、分化。

■同行评议者

李方儒, 教授, 天津市南开医院(天津市中西医结合医院)内科; 戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

■ 研发前沿

针对Gas或CCK-2R的靶向治疗已成为开辟肿瘤新治疗途径中充满希望的方法之一。

江春平, 孔诚, 丁义涛. 胃泌素及其受体拮抗剂丙谷胺对肝癌细胞株生长的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1677-1680

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1677.asp>

0 引言

胃泌素是一种多肽激素, 主要由胃窦和十二指肠黏膜的G细胞分泌, 与胃泌素受体特异性结合, 具有刺激胃酸分泌和营养胃肠黏膜的作用. 近年发现, 胃泌素对消化系统肿瘤及胰腺癌具有生长促进作用, 这种作用可被其受体拮抗剂所阻断. 而在肝癌中胃泌素是否具有类似的促增殖作用文献报道较少. 为进一步了解胃泌素及其受体拮抗剂对肝癌生长的影响, 我们选取SMMC-7721、HepG2、QGY-7701和Bel-7402 4种人HCC细胞株, 研究胃泌素及其受体拮抗剂丙谷胺对肝癌细胞株增殖活性的影响, 并观察胃泌素及丙谷胺对Bel-7402细胞周期的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 17肽胃泌素(G17)购自AnaSpec公司. 丙谷胺购自Sigma公司. MTT(四甲基偶氮唑盐)与DMSO, 南京大治生物科技有限公司. 碘化丙啶RNA酶试剂盒, 联科生物技术有限公司. 4种人肝癌细胞株HepG-2、SMMC-7721、QGY-7701、Bel-7402购自南京凯基生物公司. RPMI 1640培养基, GIBCO公司. 新生牛血清, 民海生物工程有限公司. 2.5 g/L胰蛋白酶(trypsin), Gibco公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: HepG-2、QGY-7701、Bel-7402、SMMC-7721均采用含100 mmol/L新生牛血清的RPMI 1640培养基(添加2 mmol/L L-谷氨酰胺)在37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度条件下细胞常规培养, 隔天换液, 2-3 d传代, 采用2.5 g/L胰酶消化贴壁细胞.

1.2.2 细胞增殖实验: MTT比色分析法, 选择对数生长期细胞, 经2.5 g/L胰蛋白酶消化后, 用RPMI 1640培养基调整细胞浓度为 1×10^8 个/L, 接种于96孔板. 每孔加细胞悬液90 μ L(本底对照组加无血清培养基90 μ L), 采用无血清培养基培养24 h, 以使细胞周期同步化后分组进行以下实验: (1)本底对照组, 不含细胞. 加无血清培养基10 μ L; (2)细胞对照组, 不含药物. 加无血清培养基10 μ L; (3)胃泌素组, 加RPMI 1640培养基配制胃泌素溶液(下同)10 μ L, 使其终浓度为 10^{-5} - 10^{-10} mol/L, 设6个浓度段; (4)丙谷胺组, 加丙谷胺溶液10 μ L, 使其终浓度为 10^{-2} - 10^{-4} mol/L, 设3个浓度段; (5)胃泌素+丙谷胺组, 加胃泌素和丙谷胺溶液各10

μ L, 使其终浓度为分别为 10^{-7} 和 10^{-3} mol/L. 每个浓度5个复孔, 继续培养48 h后每孔加MTT液(5 g/L)15 μ L, 继续孵育4 h. 去上清, 每孔加入150 μ L DMSO, 振荡, 30 min内在酶标仪上测定A_{490 nm}值. 每种细胞重复3次以上.

1.2.3 细胞周期分析: 选取Bel-7402的单细胞悬液, 调整细胞浓度为 5×10^8 /L, 接种于24孔培养板, 每孔500 μ L, 每组设3个复孔, 无血清培养24 h, 以同步化. 待细胞贴壁, 弃去培养基, 每孔加含5 mol/L小牛血清的培养液450 μ L, 对照组加无血清的培养液50 mL, 胃泌素组加胃泌素液50 μ L, 使其终浓度为 10^{-7} mol/L, 丙谷胺组加丙谷胺液50 μ L, 使其终浓度为 10^{-2} mol/L, 胃泌素加丙谷胺组加胃泌素液及丙谷胺液各25 μ L, 使其终浓度为分别约为 10^{-7} 和 10^{-2} mol/L. 置37℃, 50 mL/L CO₂恒温培养箱中培养, 每日换液. 培养48 h后以1 g/L的胰蛋白酶消化, 收集细胞, PBS洗涤2次后用2 mL PBS制成细胞悬液, 充分打匀, 缓慢加入1.5 mL冷乙醇固定24 h, RNA酶孵育15 min, 碘化丙啶染色, 流式细胞仪测定细胞各周期分布.

统计学处理 所有数据以mean \pm SD表示, 经student-t检验或ANOVA, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 胃泌素、丙谷胺及胃泌素+丙谷胺对肝癌细胞株增殖的影响 Bel-7402显示出胃泌素在 10^{-7} 和 10^{-8} mol/L时, 具有明显的刺激增殖作用. QGY-7701中, 胃泌素在较高浓度 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} mol/L时, 具有抑制生长作用, 在接近生理浓度 10^{-9} 和 10^{-10} mol/L时, 具有促增殖作用. 对于HepG2、SMMC-7721, 未观察到胃泌素有明显的促增殖作用. HepG2、QGY7701、SMMC-7721、Bel-7402四种肝癌细胞株, 在丙谷胺浓度为 10^{-2} mol/L时, 皆有显著的抑制作用, 但 10^{-3} mol/L和 10^{-4} mol/L时, 丙谷胺未观察到明显的抑制作用. Bel-7402在胃泌素(10^{-7} mol/L)+丙谷胺(10^{-3} mol/L)联合用药组与同浓度单用胃泌素组相比, 增殖作用明显变小, 显示丙谷胺对胃泌素促增殖作用有拮抗作用. QGY7701在胃泌素(10^{-7} mol/L)+丙谷胺(10^{-3} mol/L)联合用药组相对于同浓度单用胃泌素组, 其抑制作用得以逆转, 显示丙谷胺对胃泌素在较高浓度下的抑制增殖作用亦有拮抗作用. HepG2、SMMC-7721在胃泌素(10^{-7} mol/L)+丙谷胺(10^{-3} mol/L)联合用药组未观察到与相同浓度胃泌素组有明显的差别(图1).

2.2 胃泌素及丙谷胺对Bel-7402细胞周期的影响 应用流式细胞仪进行Bel-7402细胞各周期分析. 结果显示, 胃泌素组G₀期细胞比例明显减少, S

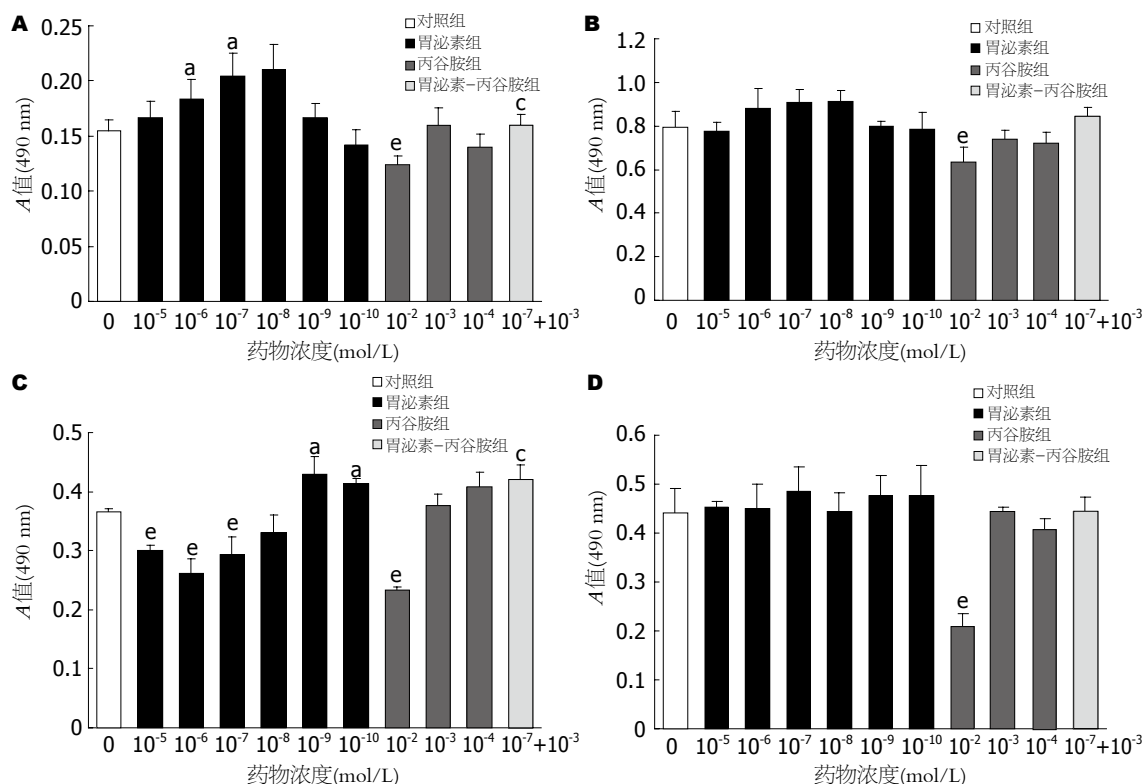


图1 胃泌素+丙谷胺对4种肝癌细胞株的影响. A: Bel-7402; B: HepG2; C: QGY-7701; D: SMMC-7721, $^aP<0.05$ vs 细胞对照组, $^eP<0.05$ vs 胃泌素组, $^cP<0.05$ vs 细胞对照组.

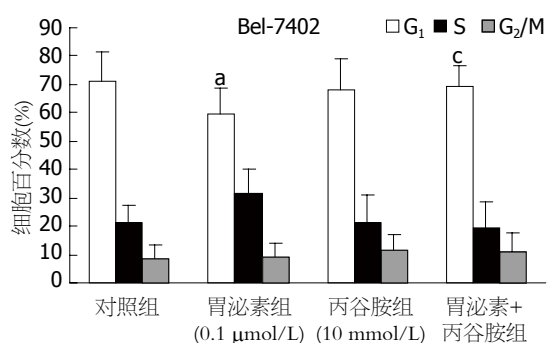


图2 胃泌素及丙谷胺对Bel-7402细胞周期的影响. $^aP<0.05$ vs 细胞对照组; $^eP<0.05$ vs 胃泌素组.

期及 G_2/M 期细胞比例增加, 表明胃泌素可促进细胞DNA合成, 使 G_0/G_1 期细胞向S、 G_2/M 期转化, 加丙谷胺后胃泌素的上述作用消失(图2).

3 讨论

对于肝癌细胞株Bel-7402, QGY-7701, 胃泌素在生理浓度或接近生理浓度的条件下, 是一种营养性的多肽, 可以显著性促进肝癌的生长. 已经知道, G17是通过GR起作用的, 两者结合通过磷脂酶C^[1-2], 非受体酪氨酸激酶^[3-4], 蛋白酪氨酸磷酸化^[4-5], 细胞分裂素活化蛋白激酶^[5-6]等重要信号传导途径最终调节基因转录表达. 我们同时也观察到在QGY-7701细胞株中过高的胃泌素的浓度,

导致细胞生长的抑制, 可能因为负反馈作用使得GR基因的下调表达有关^[7]. 而观察到的胃泌素受体拮抗剂丙谷胺对胃泌素的增殖效果的抑制作用, 则是通过竞争性结合胃泌素受体, 或阻断了支配性的胃泌素自分泌途径所导致的.

在进行MTT增殖实验及流式细胞分析细胞周期前都对细胞进行周期同步化处理, 这可以增加细胞短期增殖的敏感性^[8]. 流式细胞周期分析显示了胃泌素明显减少Bel-7402 G_0/G_1 期细胞比例, 使 G_0/G_1 期细胞向S、 G_2/M 期转化. 联合应用胃泌素受体拮抗剂丙谷胺后细胞增殖减慢, G_0/G_1 期细胞比例增加. 可见胃泌素起到类似生长因子的作用. 而丙谷胺对其作用有拮抗作用.

本研究显示, 在SMMC-7721和HepG2细胞株中, 没有显示出胃泌素的促进作用, 可能的解释有: (1)两种细胞株均为我科一直培育传代的细胞株, 在细胞株反复传代过程中, 可能丧失某些生物特性. (2)非酰胺化形式的胃泌素在SMMC-7721和HepG2细胞中可能是更重要的受体激动剂. 文献也表明, 非酰胺化形式的胃泌素可能是更重要的促有丝分裂剂, 甘氨酸延展胃泌素^[9-11]以及前胃泌素多肽^[12-13]可以促进肿瘤生长. (3)在肝癌细胞系中胃泌素的促生长作用可能通过GR的突变体CCK-C受体作用, 这种突变体的

■同行评价

本研究思路清晰,设计合理,方法得当,具有一定的科学意义与参考价值。

作用与GR没有关联。有文献报道CCK2受体的突变存在在胰腺、结直肠和胃癌^[14-16],在这些肿瘤中已经被检测到的CCK2受体的一种错剪接形式具有组成性的活性和营养性的效果^[14-15]。(4)在胃肠道肿瘤中,不同形式的胃泌素是以自分泌的方式来促进肿瘤生长的^[17-19],并且已达最大激活效力^[20],可能不依赖于循环中的胃泌素^[21-22]。

近年来,小分子多肽靶向治疗为肿瘤的内分泌治疗提供的新的思路。放射标记或细胞毒多肽结合受体蛋白可用于过表达相应受体的肿瘤的诊断和靶向治疗。体外GR在肝癌发生发展中发挥促进作用的证实,暗示了未来GR可能的应用价值:检测相应蛋白或因子表达用于肿瘤的诊断,利用配基受体的高亲和力,高特异性的结合,给予GR特异性拮抗剂或抗胃泌素抗体,或干扰下游相关位点,阻断胃泌素受体作用途径,用于肝癌的分子靶向治疗(包括预防性干预治疗)。鉴于此类药物相对于化疗药物副作用较小,可以长期较大量使用,具有一定的临床应用潜力。胃泌素及其特异性的拮抗剂将来有可能作为肝癌综合治疗的辅助性药物^[23-24]。

4 参考文献

- 1 Yassin RR, Clearfield HR, Little KM. Gastrin's trophic effect in the colon: identification of a signaling pathway mediated by protein kinase C. *Peptides* 1993; 14: 1119-1124
- 2 Yassin RR, Murthy SN. Possible involvement of protein kinase C in mediating gastrin-induced response in rat colonic epithelium. *Peptides* 1991; 12: 925-927
- 3 Yassin RR, Abrams JT. Gastrin induces IP3 formation through phospholipase C gamma 1 and pp60c-src kinase. *Peptides* 1998; 19: 47-55
- 4 Singh P, Narayan S, Adiga RB. Phosphorylation of pp62 and pp54 src-like proteins in a rat intestinal cell line in response to gastrin. *Am J Physiol* 1994; 267: G235-G244
- 5 Seva C, Kowalski-Chauvel A, Blanchet JS, Vaysse N, Pradayrol L. Gastrin induces tyrosine phosphorylation of Shc proteins and their association with the Grb2/Sos complex. *FEBS Lett* 1996; 378: 74-78
- 6 Seufferlein T, Withers DJ, Broad S, Herget T, Walsh JH, Rozengurt E. The human CCKB/gastrin receptor transfected into rat1 fibroblasts mediates activation of MAP kinase, p74raf-1 kinase, and mitogenesis. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 383-393
- 7 Seva C, Scemama JL, Bastie MJ, Pradayrol L, Vaysse N. Lorglumide and loxiglumide inhibit gastrin-stimulated DNA synthesis in a rat tumoral acinar pancreatic cell line (AR42J). *Cancer Res* 1990; 50: 5829-5833
- 8 Kusyk CJ, McNiel NO, Johnson LR. Stimulation of growth of a colon cancer cell line by gastrin. *Am J Physiol* 1986; 251: G597-G601
- 9 Pannequin J, Delaunay N, Buchert M, Surrel F, Bourgaux JF, Ryan J, Boireau S, Coelho J, Pélégri A, Singh P, Shulkes A, Yim M, Baldwin GS, Pignodel C, Lambeau G, Jay P, Joubert D, Hollande F. Beta-catenin/Tcf-4 inhibition after progastrin targeting reduces growth and drives differentiation of intestinal tumors. *Gastroenterology* 2007; 133: 1554-1568
- 10 Seva C, Dickinson CJ, Yamada T. Growth-promoting effects of glycine-extended progastrin. *Science* 1994; 265: 410-412
- 11 Singh P, Xu Z, Dai B, Rajaraman S, Rubin N, Dhruva B. Incomplete processing of progastrin expressed by human colon cancer cells: role of noncarboxyamidated gastrins. *Am J Physiol* 1994; 266: G459-G468
- 12 Singh P, Owlia A, Varro A, Dai B, Rajaraman S, Wood T. Gastrin gene expression is required for the proliferation and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res* 1996; 56: 4111-4115
- 13 Van Solinge WW, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Falkmer UG, Rehfeld JF. Expression but incomplete maturation of progastrin in colorectal carcinomas. *Gastroenterology* 1993; 104: 1099-1107
- 14 Hellmich MR, Rui XL, Hellmich HL, Fleming RY, Evers BM, Townsend CM Jr. Human colorectal cancers express a constitutively active cholecystokinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth. *J Biol Chem* 2000; 275: 32122-32128
- 15 Ding WQ, Kuntz SM, Miller LJ. A misspliced form of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in pancreatic carcinoma: role of reduced cellular U2AF35 and a suboptimal 3'-splicing site leading to retention of the fourth intron. *Cancer Res* 2002; 62: 947-952
- 16 Laghi L, Ranzani GN, Bianchi P, Mori A, Heinemann K, Orbetegli O, Spauldo MR, Luinetti O, Franciscani S, Roncalli M, Solcia E, Malesci A. Frameshift mutations of human gastrin receptor gene (hGARE) in gastrointestinal cancers with microsatellite instability. *Lab Invest* 2002; 82: 265-271
- 17 Smith JP, Verderame MF, Ballard EN, Zagon IS. Functional significance of gastrin gene expression in human cancer cells. *Regul Pept* 2004; 117: 167-173
- 18 Wang X, Wei DP, Cai MY. Expression of gastrin in human gastric cancer cell line and effect of anti-gastrin mAb on the cell growth. *Zhonghua Zhongliu Xue* 2005; 27: 276-278
- 19 Zhou JJ, Chen ML, Zhang QZ, Hu JK, Wang WL. Coexpression of cholecystokinin-B/gastrin receptor and gastrin gene in human gastric tissues and gastric cancer cell line. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 791-794
- 20 Baldwin GS, Zhang QX. Measurement of gastrin and transforming growth factor alpha messenger RNA levels in colonic carcinoma cell lines by quantitative polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1992; 52: 2261-2267
- 21 Hoosein NM, Kiener PA, Curry RC, Brattain MG. Evidence for autocrine growth stimulation of cultured colon tumor cells by a gastrin/cholecystokinin-like peptide. *Exp Cell Res* 1990; 186: 15-21
- 22 Negre F, Fagot-Revurat P, Bouisson M, Rehfeld JF, Vaysse N, Pradayrol L. Autocrine stimulation of AR4-2J rat pancreatic tumor cell growth by glycine-extended gastrin. *Int J Cancer* 1996; 66: 653-658
- 23 江春平, 孔诚, 丁义涛. 胃泌素受体作为分子靶向在肿瘤中表达及应用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 980-985
- 24 吴佩, 茆家定, 梁林虎, 闫竞一. 大肠癌胃泌素、生长抑素的表达及比势与细胞周期调控基因的相关性. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1921-1927

小檗碱对高果糖饲养诱导胰岛素抵抗大鼠肝组织HNF-4 α 表达的影响

高志强, 陆付耳, 冷三华, 谢美娟, 徐丽君, 王开富, 邹欣

高志强, 陆付耳, 冷三华, 谢美娟, 徐丽君, 王开富, 邹欣, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所 湖北省武汉市 430030

国家自然科学基金资助项目, No. 30500685

作者贡献分布: 此课题由冷三华, 陆付耳及高志强设计; 研究过程由高志强, 谢美娟, 徐丽君, 王开富及邹欣操作完成; 数据分析由高志强, 谢美娟及王开富完成; 本论文写作由高志强, 谢美娟及陆付耳完成。

通讯作者: 冷三华, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所, sanhualeng@hotmail.com
电话: 027-83663237 传真: 027-83663237

收稿日期: 2008-01-22 修回日期: 2008-04-07

Effects of berberine on the expression of hepatocyte nuclear factor-4 α in rats with fructose-induced insulin resistance

Zhi-Qiang Gao, Fu-Er Lu, San-Hua Leng, Mei-Juan Xie, Li-Jun Xu, Kai-Fu Wang, Xin Zou

Zhi-Qiang Gao, Fu-Er Lu, San-Hua Leng, Mei-Juan Xie, Li-Jun Xu, Kai-Fu Wang, Xin Zou, Institute of Integrative Traditional and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500685

Correspondence to: San-Hua Leng, Institute of Integrative Traditional and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. sanhualeng@hotmail.com

Received: 2008-01-22 Revised: 2008-04-07

Abstract

AIM: To investigate the effects of berberine on the expression of hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α) in rats with fructose-induced insulin resistance.

METHODS: SD rats were given high-fructose diet for 6 wk. All rats were divided into 4 groups: control group, common diet + berberine group, high-fructose diet group and high-fructose diet + berberine group. Berberine was given (187.5 mg/kg per day). After the experimental period of 10 wk, Plasma glucose, insulin and triglyceride levels were measured. HOMA insulin resistance index (HOMA-IR) was assayed. Fur-

thermore, RT-PCR and Western Blot were used to detect and analyze the expression of HNF-4 α and protein in liver.

RESULTS: Compared with control diet, fructose feeding induced hyperinsulinemia, higher HOMA-IR and raised triglyceride (all $P < 0.01$). Compared with fructose-fed rats, indicators above decreased significantly in the high-fructose diet + berberine group (51.62 ± 5.68 vs 64.91 ± 7.87 , $P < 0.01$; 12.40 ± 1.76 vs 16.06 ± 3.32 , $P < 0.01$; 11.16 ± 1.58 vs 14.46 ± 2.99 , $P < 0.05$). The mRNA and protein expression of HNF-4 α was decreased in the fructose-fed rats, while berberine promoted its expression.

CONCLUSION: Berberine improves fructose-induced insulin resistance probably by increasing HNF-4 α expression.

Key Words: Insulin resistance; Berberine; Liver; Hepatocyte nuclear factor-4 α ; High fructose

Gao ZQ, Lu FE, Leng SH, Xie MJ, Xu LJ, Wang KF, Zou X. Effects of berberine on the expression of hepatocyte nuclear factor-4 α in rats with fructose-induced insulin resistance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1681-1684

摘要

目的: 探讨小檗碱对高果糖饲养诱导胰岛素抵抗大鼠肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor-4 α , HNF-4 α)表达的影响以及其改善胰岛素抵抗的分子机制。

方法: 高果糖饲料喂养SD大鼠6 wk, 建立胰岛素抵抗模型; 大鼠分为4组: 正常对照组(普通饮食)、普通饮食+小檗碱处理组、高果糖饮食组及高果糖饮食+小檗碱组; 小檗碱按187.5 mg/(kg·d)灌服4 wk; 测定血糖、血清胰岛素、胰岛素抵抗指数及甘油三酯的变化; 用RT-PCR法及免疫印迹法观察肝脏HNF-4 α 基因及蛋白的表达。

结果: 高果糖饮食组胰岛素、胰岛素抵抗指

■背景资料

HNF-4 α 具有脂溶性激素受体的特性, 能够直接进入细胞核调节基因转录, 从而对机体的各种生理活动进行调控, 是糖及脂类等能量物质代谢所必需的调控因子, 其基因突变可诱发青少年发病型成人糖尿病。

■同行评议者

周霞秋, 主任医师, 上海瑞金医院感染科

■研发前沿

小檗碱具有多重生物学功能,但其机制尚不清楚。在分子水平对转录因子HNF-4 α 的研究,有望将目前国内外研究成果与其功能进行一定的衔接。

数HOMA及甘油三酯水平较正常对照组均明显升高(均 $P<0.01$),而高果糖饮食+小檗碱组与高果糖饮食组比较上述指标明显下降(51.62 ± 5.68 vs 64.91 ± 7.87 , $P<0.01$; 12.40 ± 1.76 vs 16.06 ± 3.32 , $P<0.01$; 11.16 ± 1.58 vs 14.46 ± 2.99 , $P<0.05$),小檗碱可促使肝脏表达下降的HNF-4 α 恢复。

结论: 小檗碱可改善胰岛素抵抗,其机制可能与促进HNF-4 α 的表达有关。

关键词: 胰岛素抵抗; 小檗碱; 肝脏; 肝细胞核因子4 α ; 高果糖

高志强, 陆付耳, 冷三华, 谢美娟, 徐丽君, 王开富, 邹欣. 小檗碱对高果糖饲养诱导胰岛素抵抗大鼠肝组织HNF-4 α 表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1681-1684
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1681.asp>

0 引言

肝细胞核因子4 α (hepatocyte nuclear factor-4 α , HNF-4 α)是一种具有锌指结构的转录因子,在肝脏高水平表达,参与糖脂代谢及胰岛素分泌的调控^[1]。HNF-4 α 与2型糖尿病关系密切,且胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)大鼠肝脏HNF-4 α 表达减少^[2]。小檗碱又名黄连素,是一类异喹啉类生物碱,作为抗菌药用于临床多年,近年发现他还有降压、降血糖、调脂及改善IR等药理作用,而受到医学界的重视,但对其改善IR作用机制研究尚少,本实验拟在前期实验的基础上进一步研究其对肝组织HNF-4 α 表达的影响^[3-6]。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD大鼠,♂, 32只,周龄6 wk,体重 180 ± 10 g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。小檗碱购自中国药品生物制品检定所(批号: 1107132200218),用5 g/L羧甲基纤维素的PBS溶液配制的混悬液溶解成含药混悬液,果糖为美国ADM公司产品(批号: IL62525);猪油为市售;酪蛋白、蛋氨酸、维生素及矿物质等购自武汉医药公司,血糖与血脂测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;胰岛素试剂盒购自北京原子能生物研究所。Tri Reagent试剂购自Molecular Research Center, RT-PCR试剂为Fermentas公司产品。免疫印迹主要试剂: HNF-4 α 多克隆抗体(Santa Cruze, USA), Rabbit anti Goat IgG-HRP(武汉博士德生物工程有限公司), GAPDH多克隆抗体(北京博奥森科技发展有限公司), Goat anti mouse IgG-HRP(武汉博士德生

物工程有限公司), ECL试剂盒(Sigma, USA)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 大鼠适应性饲养1 wk后,随机分为普通饮食组和高果糖饮食组,每组16只,喂以普通饲料(碳水化合物60%,粗蛋白20%-21%,粗脂肪5%,质量比);后者喂以高果糖饲料(果糖60%,酪蛋白20%,脂肪5%,质量比,造模方法参考文献[7]),第7周后,普通饮食组随机分为正常对照组(C组)和小檗碱处理组(B组),继续普通饮食;高果糖饮食组分为高果糖饮食组(F组)和小檗碱处理组(FB组)继续高果糖饮食。以上每组均8只。所有大鼠均全程自由饮水。所有小檗碱处理组均以小檗碱187.5 mg/(kg·d)(配制成10 mL/kg体重质量)ig;所有对照组均按体重以同等体积5 g/L羧甲基纤维素PBS溶液ig。第11周,禁食12 h后以10 g/L戊巴比妥钠45 mg/kg体重质量ip进行麻醉,腹主动脉取血,分离血清,用于检测各项生化指标,另取肝脏迅速冻存于液氮中,24 h后置于-80℃冰箱以待测其他指标,并处死所有大鼠。

1.2.2 血糖、胰岛素及甘油三酯检测: 血糖(Glu)用葡萄糖氧化酶法测定,血清胰岛素(Fins)用放免法测定,甘油三酯(TG)用酶学方法检测,具体操作步骤按试剂盒说明书严格操作。胰岛素抵抗指数^[8]: $HOMA-IR = \text{空腹血糖}(\text{mmol/L}) \times \text{空腹胰岛素}(\text{mIU/L}) / 22.5$ 。

1.2.3 RT-PCR: 取大鼠肝脏标本,使用Tri Reagent试剂盒,一步法提取总RNA,以紫外分光光度仪检测RNA含量与纯度,取 A_{260}/A_{280} 在1.8-2.0之间的RNA进行实验。引物由上海生物工程公司合成,序列设计如下: HNF-4 α 上游5'GGTGCCAACCTCAACTCA 3';下游5'AGGCTGCTGTCCTCGTAG 3',扩增片段长度为314 bp。为相对定量mRNA的表达量,采用GAPDH为内参照,上游: 5'GATCCCGCTAACATCAAAT 3';下游: 5'ATCAAAGGTGGAAGAATGG 3',扩增片段长度为648 bp。取1 μg RNA经逆转录合成单链cDNA后,继以PCR, HNF-4 α 扩增条件为94℃变性5 min后进行30个循环,每个循环94℃变性1 min, 57℃退火50 s, 72℃延伸50 s, 72℃终末延伸10 min。GAPDH扩增条件为94℃变性5 min后进行28个循环,每个循环94℃变性1 min, 54℃退火1 min, 72℃延伸1 min。72℃终末延伸10 min。扩增产物以20 g/L琼脂糖电泳,紫外透射分析仪观察结果,凝胶成像分析系统进行光密度扫描。结

■相关报道

国外Daphna *et al*报道, HNF-4 α 基因变异患者常伴发高脂血症,糖耐量异常和(或)胰岛素抵抗;国内吴静 *et al*报道,胰岛素抵抗大鼠存在肝脏HNF4 α 表达降低,充分提示了HNF4 α 在胰岛素抵抗病理生理学机制中的重要地位。

表 1 各组Glu, Fins, HOMA-IR和TG比较 (mean \pm SD, $n = 8$)

	Glu(mmol/L)	Fins(mIU/L)	HOMA-IR	TG(mmol/L)
C	5.21 \pm 0.63	44.47 \pm 8.25	10.31 \pm 2.34	1.23 \pm 0.46
B	5.14 \pm 0.58	49.13 \pm 5.48	11.26 \pm 2.10	1.13 \pm 0.48
F	5.63 \pm 0.72	64.91 \pm 7.87 ^b	16.06 \pm 3.32 ^b	2.50 \pm 0.74 ^b
FB	5.40 \pm 0.45	51.62 \pm 5.68 ^d	12.40 \pm 1.76 ^d	1.62 \pm 0.79 ^c

^b $P < 0.01$ vs C组, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs F组.

果以HNF-4 α /GAPDH mRNA灰度比值为指标进行统计分析.

1.2.4 免疫印迹法: 组织蛋白提取与蛋白定量: 参照Santa Cruz公司提供的方法, 应用三去污裂解液裂解组织, 提取蛋白行考马斯亮蓝G-250染色法定量; 每例标本经120 g/L聚丙烯酰胺电泳分离后, 根据预染Marker指示按LIF和GAPDH分子量大小分别取相应凝胶电转移至硝酸纤维素膜膜上, 置于5%脱脂奶粉封闭液, 室温摇床温育2 h, 再相应分别置于HNF-4 α 多克隆抗体稀释液(工作浓度1:1000)和GAPDH多克隆抗体稀释液(工作浓度1:300)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 次日TBS-T洗膜后分别置于Goat anti rat IgG-HRP二抗(工作浓度1:5000)和Goat anti mouse IgG-HRP二抗(工作浓度1:5000)摇床温育2 h和进行杂交ECL化学发光, 活体凝胶成像系统分析每条带的吸光度值, 将HNF-4 α /GAPDH的比值作为HNF-4 α 蛋白的相对表达量.

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件进行分析, 各组计量资料以mean \pm SD表示.

2 结果

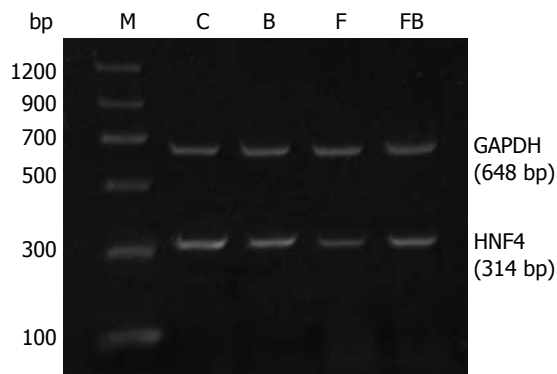
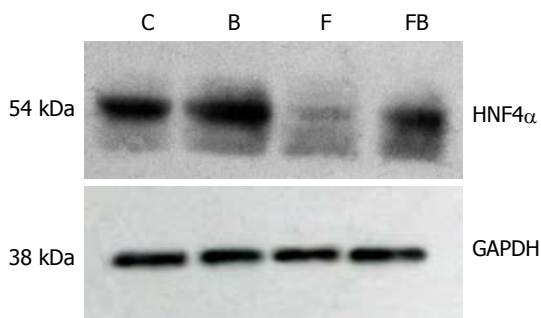
2.1 血清Glu, Fins, HOMA-IR和TG水平比较 各组之间Glu差异没有显著性意义, F组Fins、HOMA-IR及TG均比C组显著增高; B组及FB组上述指标比F组显著降低; B组与C组比较, 各指标差异无显著性(表1).

2.2 HNF-4 α 的基因表达 C组、B组、F组及FB组的HNF-4 α 吸光度值比分别为: 1.39 \pm 0.27, 1.25 \pm 0.12, 0.68 \pm 0.24, 1.04 \pm 0.14; F组mRNA表达水平明显低于C组($P < 0.01$), FB组明显高于F组($P < 0.05$, 图1).

2.3 HNF-4 α /GAPDH灰度值 F组HNF-4 α 的蛋白表达水平低于C组, FB组高于F组(图2).

3 讨论

利用高果糖饮食诱导大鼠IR的造模方法被国外实验室广泛应用, 模型稳定, 被国外同行所接受.

图 1 RT-PCR法检测肝脏HNF-4 α mRNA表达.图 2 免疫印迹检测肝脏HNF-4 α 蛋白表达.

该方法诱导的大鼠具有显著的高胰岛素血症与高甘油三酯血症, 外周胰岛素敏感性明显下降, 是研究药物改善IR机制的良好实验模型^[9-13]. 本实验证实果糖组大鼠具有明显的高胰岛素血症, HOMA-IR较正常对照组明显升高, 血清TG显著增加, 成功复制出IR模型, 为研究小檗碱作用机制提供可靠的基础.

HNF-4 α 属类固醇激素受体超家族的孤儿受体, 其特征是含有2个高度保守的区域, 即位于氨基端的含2个“锌指基序”的DNA结合区和位于羧基端的配体结合区, 分子量约54 kDa, 在肝脏、肾脏、消化道上皮均有较多表达, 在胰岛较低水平表达. HNF-4 α 是肝脏最重要的转录因子之一, 具有脂溶性激素受体的特性, 直接进入细胞核, 调节基因转录, 从而调控机体的各种生理活动. 他是葡萄糖转运蛋白2、醛缩酶B、丙酮酸激酶基因表达所必需的; HNF-4 α 还可与糖异生途径中限速酶之一的丙酮酸羧激酶基因启动子区的糖皮质激素反应单元相互作用; HNF-4 α 可抑制肝糖异生, 促进葡萄糖摄取以及促进糖酵解等作用参与血糖调节. 成人体内HNF-4 α 的缺乏还影响脂类合成, 且与血清TG和脂蛋白水平改变有关. 故HNF-4 α 在肝脏IR的发生机制中有重要的作用^[14-17]. 肝脏作为调节血糖平衡的主要外周器官, 研究HNF-4 α 在肝脏的表

■创新盘点

本实验以高果糖饲养诱导胰岛素抵抗, 模型稳定, 国际认可度高, 重点研究小檗碱对HNF-4 α 的作用, 能较好的解释其改善胰岛素抵抗效应.

■应用要点

对小檗碱分子改善胰岛素抵抗机制的深入研究, 有助于彻底阐明其作用机制, 对推动中医药的发展具有重要意义.

■同行评价

本文发现小檗碱能够下调高果糖饲养诱导胰岛素抵抗大鼠肝脏HNF-4 α 表达,可能是其改善胰岛素抵抗的主要机制,是其药理作用研究的新进展,有较好的学术价值。

达具有科学意义。

本实验首次研究HNF-4 α 在小檗碱改善IR中的作用。实验数据显示,长期高果糖饮食诱导实验大鼠产生IR;同时伴有HNF-4 α 在肝脏mRNA及蛋白水平的表达明显降低,这与文献报道IR大鼠HNF-4 α 表达降低相一致^[2,18-19]。而小檗碱可增强IR大鼠肝脏HNF-4 α mRNA及蛋白表达,改善IR大鼠的高胰岛素血症,胰岛素抵抗指数明显降低,提示了HNF-4 α 是小檗碱的药理效应中的重要一环,有资料表明,小檗碱能上调或下调大鼠多种肝脏代谢相关基因表达变化^[20-21],故推测HNF-4 α 很可能是小檗碱直接作用的一个新靶点。

有文献报道小檗碱可进入细胞核内^[22],与靶因子结合,产生生物学效应,至于小檗碱在细胞核内的具体作用方式,从而引发诸如增强外周胰岛素敏感性,抗氧化、清除自由基的功能,尚有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 龙云,唐红,刘聪,何芳,刘丽,赵连三,黄飞骏.肝细胞核因子4 α 和3 β 在人主要器官中的表达.世界华人消化杂志 2006;14: 2504-2509
- 2 吴静,张素华,倪银星,李全民.非诺贝特对胰岛素抵抗大鼠肝脏肝细胞核因子mRNA表达的影响.中华糖尿病杂志 2005; 13: 14-16
- 3 Leng SH, Lu FE, Xu LJ. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 496-502
- 4 刘锋,冷三华,陆付耳,官纯寿,高志强,徐丽君,王开富.小檗碱对HepG2细胞肝细胞核因子基因表达的影响.中国中西医结合消化杂志 2007; 15: 141-144
- 5 欧阳礼枝,陆付耳,刘文军,高志强,徐丽君.小檗碱对胰岛素抵抗大鼠肝脏葡萄糖激酶及其调节蛋白的影响.世界华人消化杂志 2007; 15: 885-889
- 6 王春波,陆付耳,冷三华,杨明炜,王开富,徐丽君.小檗碱对HepG2细胞葡萄糖激酶活性及其mRNA表达的影响.中国药理学通报 2007; 23: 1145-1147
- 7 Hsieh PS. Reversal of fructose-induced hypertension and insulin resistance by chronic losartan treatment is independent of AT2 receptor activation in rats. *J Hypertens* 2005; 23: 2209-2217
- 8 Olatunji LA, Soladoye AO. Increased magnesium intake prevents hyperlipidemia and insulin resistance and reduces lipid peroxidation in fructose-fed rats. *Pathophysiology* 2007; 14: 11-15
- 9 Prieto PG, Cancelas J, Moreno P, Villanueva-Penacarrillo ML, Malaisse WJ, Valverde I. Effects of diet supplementation with olive oil and guar upon fructose-induced insulin resistance in normal rats.

Endocrine 2007; 31: 294-299

- 10 Lin HJ, Loh CH, Liao MT, Liu TT, Hsieh PS. Attenuation of hypertriglyceridemia-induced pressor effect in rats with fructose-induced insulin resistance. *Chin J Physiol* 2007; 50: 16-21
- 11 Hsieh PS, Cheng WT, Liu TT, Loh CH, Chang BC. Diminution of hypertriglyceridemia-induced pressor effect under hyperinsulinemic condition in normal and fructose-induced insulin resistant rats. *Chin J Physiol* 2007; 50: 99-104
- 12 Suganthi R, Rajamani S, Ravichandran MK, Anuradha CV. Effect of food seasoning spices mixture on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *J Med Food* 2007; 10: 149-153
- 13 Ai J, Wang N, Yang M, Du ZM, Zhang YC, Yang BF. Development of Wistar rat model of insulin resistance. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3675-3679
- 14 Love-Gregory L, Permutt MA. HNF4 α genetic variants: role in diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 397-402
- 15 Roth U, Curth K, Unterman TG, Kietzmann T. The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 2623-2631
- 16 Prieur X, Schaap FG, Coste H, Rodriguez JC. Hepatocyte nuclear factor-4 α regulates the human apolipoprotein AV gene: identification of a novel response element and involvement in the control by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α , AMP-activated protein kinase, and mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 3107-3125
- 17 Sanguino E, Roglans N, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC. Atorvastatin reverses age-related reduction in rat hepatic PPAR α and HNF-4. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 853-861
- 18 Xu C, Arinze IJ, Johnson J, Tuy TT, Bone F, Ernberger P, Massillon D. Metabolic dysregulation in the SHROB rat reflects abnormal expression of transcription factors and enzymes that regulate carbohydrate metabolism. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 305-312
- 19 吴静,张素华,倪银星.2型糖尿病大鼠肝脏肝细胞核因子(HNF)-4 α 、HNF-1 α 基因表达研究.中华内分泌代谢杂志 2005; 21: 325-326
- 20 辛华雯,吴笑春,李馨,余爱荣,张勤,仲明远,朱敏,刘幼英.盐酸小檗碱致大鼠肝脏代谢相关基因表达变化的基因芯片研究.中国药理学通报 2004; 20: 1122-1126
- 21 Brusq JM, Ancellin N, Grondin P, Guillard R, Martin S, Saintillan Y, Issandou M. Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine. *J Lipid Res* 2006; 47: 1281-1288
- 22 Ovadekova R, Jantova S, Letasiova S, Stepanek I, Labuda J. Nanostructured electrochemical DNA biosensors for detection of the effect of berberine on DNA from cancer cells. *Anal Bioanal Chem* 2006; 386: 2055-2062

编辑 李军亮 电编 郭海丽

老年胃食管反流病患者心理健康评估和干预157例

李军, 李严严, 张丽娟, 朱宇欣

李军, 李严严, 张丽娟, 朱宇欣, 中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市100853

作者贡献分布: 本文设计及写作由李军完成; 数据分析由李军和李严严完成; 数据采集由李军, 李严严, 张丽娟及朱宇欣完成。

通讯作者: 李军, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院南楼临床部消化科, zyyjlzr@sohu.com

电话: 010-66876246

收稿日期: 2008-03-17 修回日期: 2008-05-08

Mental health evaluation and psychological intervention of elderly patients with gastroesophageal reflux diseases: an analysis of 157 cases

Jun Li, Yan-Yan Li, Li-Juan Zhang, Yu-Xin Zhu

Jun Li, Yan-Yan Li, Li-Juan Zhang, Yu-Xin Zhu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Jun Li, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. zyyjlzr@sohu.com

Received: 2008-03-17 Revised: 2008-05-08

Abstract

AIM: To analyze the mental health and determine psychological intervention of elderly patients with gastroesophageal reflux diseases.

METHODS: One hundred and fifty-seven elderly patients with gastroesophageal reflux diseases admitted to our hospital during May 2007 and December 2007 were enrolled. Symptom check list-90 (SCL-90) were completed twice by patients before and after the intervention.

RESULTS: Final score of SCL-90 and number of symptomatic items were higher than that of domestic norm ($t = 2.61$, $t = 2.57$, both $P < 0.01$). Except psychotic factors, hostility and phobic anxiety, scores in other factors of SCL-90 were higher than that of domestic norm. There was a significant score difference before and after the psychological intervention ($t = 1.99$, $P < 0.05$) with a significant score decrease in anxiety, depression and somatization.

CONCLUSION: Mental health of elderly pa-

tients with gastroesophageal reflux diseases is significantly lower than that of normal population. Psychological intervention is effective in alleviating psychological disorders and improving subjective clinical symptoms.

Key Words: Gastro esophageal reflux diseases; Mental health; Psychological intervention; Elderly patients

Li J, Li YY, Zhang LJ, Zhu YX. Mental health evaluation and psychological intervention of elderly patients with gastroesophageal reflux diseases: an analysis of 157 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1685-1687

摘要

目的: 分析老年胃食管反流病患者的心理状况, 并探讨干预措施。

方法: 2005-05/2007-12我院住院和门诊老年胃食管反流病患者157例, 对其采用症状自评量表和国际上通行的ABC认知疗法进行心理干预。

结果: 老年胃食管反流病患者干预前SCL-90总分, 阳性项目数显著高于国内常模($t = 2.61$, $t = 2.57$, 均 $P < 0.01$), 除精神病性及敌对、恐怖外, 其余因子均高于国内常模, 心理干预后SCL-90总分与干预前有显著差异($t = 1.99$, $P < 0.05$), 其中焦虑、抑郁及躯体化水平均明显降低。

结论: 老年胃食管反流病患者的心理健康水平显著低于正常人群, 心理干预可减轻心理障碍并缓解患者主观临床症状。

关键词: 胃食管反流病; 心理健康; 干预; 老年患者

李军, 李严严, 张丽娟, 朱宇欣. 老年胃食管反流病患者心理健康评估和干预157例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(15): 1685-1687

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1685.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastro esophageal reflux disease, GERD)是消化系常见疾病之一, 已经证实该病

■背景资料

近年来, 胃食管反流病的发病率有所上升, 在老年人群中更是明显, 躯体和心理因素的影响, 明显降低了患者的生活质量。

■同行评议者

沈薇, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科; 潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室

■研发前沿

在生物治疗的基础上提高老年胃食管反流病患者的身心健康,是目前研究热点之一。

患者工作效率^[1]、生活质量下降^[2],且伴有明显的心理因素^[3]和食管外表现^[4]。而老年患者还具有发病率高、病变程度重、复发率高的特点^[5],生物、心理和社会因素的综合影响,使老年患者承受着不同程度的心理和生活压力,极大的影响疾病的治疗和预后,因此了解老年GERD患者心理健康状况,寻找可行的干预措施对疾病的防治具有重要的临床意义。我们采用症状自评量表(symptom check list-90, SCL-90)随机对157例住院和门诊的老年GERD患者进行神经心理调查,并使用国际通行的ABC认知疗法进行干预,以了解该类患者的心理状况及干预后的心理变化,为医疗和康复工作提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-05/2007-12我院住院和门诊老年GERD患者157例,男118例,女39例,年龄66-84(平均76.1±3.7)岁,大专以上24例,中专39例,中学64例,小学21例,文盲及半文盲9例,均无精神病史。

1.2 方法 采用症状自评量表SCL-90在患者入院初期或初诊时完成首次评定工作,评定前向患者详细解释填表方法及注意事项,受检者独立完成,不得受他人影响,文盲、半文盲采用提问式,随后进行ABC心理干预,时间为4-5 d,每天60-90 min,本文采用的具体干预方法为:(1)在患者系统治疗前进行;(2)为患者提供轻松的就医环境;(3)给患者及家属详细介绍GERD的基本知识,包括发病因素、症状、治疗方案及预后,有意识增强患者信心;(4)纠正患者对该病的错误认知;(5)建立正确对待疾病的心理行为理念;(6)干预过程中有针对性的采取心理治疗(如暗示疗法、音乐疗法、行为疗法等);(7)个别辅导与集体治疗相结合;(8)介绍医学治疗对以后生活的重要意义,使患者打消顾虑和增强治疗决心,第6天进行SCL-90量表的复测并开始系统治疗。

统计学处理 统计患者SCL-90中阳性项目数(2分以上),同时计算每个患者的总分和总均分(AT, AT = 总分/90),并确定为1级(无症状, AT = 1),2级(轻度, 1<AT≤2, 3级(中度, 2<AT≤3), 4级(重度, AT>3)。计算躯体化、强迫、人际关系敏感、抑郁、焦虑、敌对、恐怖、偏执和精神病性共9项因子的得分并于国内常模进行比较^[6]。复测后得分与干预前得分进行比较。统计分析采用 t 检验。

2 结果

2.1 SCL-90总分 老年GERD患者总分最高307分,

最低90分,平均136.03±29.10分,阳性项目数平均为28.54±17.21,与国内常模(24.9±18.4)比较,具有显著性差异($t = 2.61, P < 0.01$)。所有老年GERD患者中, SCL-90总分1级4人,占2.53%; 2级145人,占92.4%, 3级8人,占5.1%,无4级(重度)患者。老年GERD患者SCL-90评分同国内常模比较,除精神病性及敌对、恐怖外,其余因子及阳性项目数均显著高于国内常模($P < 0.1-0.5$, 表1)。

3 讨论

症状自评量表SCL-90是用来衡量患者的自觉症状及其严重程度的精神症状自评表,包括90个项目,采用5级评分制,分别为1分(没有症状)、2分(轻度)、3分(中度)、4分(偏重)和5分(极严重),涉及到感知觉、情感、思维、意识、行为以及生活习惯、人际交往、甚至饮食、睡眠等内容,能充分反映出患者的病情及相应的精神心理状态,对临床医疗及护理工作均有重要的指导意义^[7]。调查结果表明,老年GERD患者在SCL-90上出现阳性症状项的数目及大部分因子得分均显著高于正常人群。由此可见该类患者的心理健康水平显著低于正常人群,其中在躯体化、抑郁、焦虑3种症状表现的最为显著。

认知-行为干预是1980年代末国际上发展起来的心理治疗的新方向,是针对经典的认知治疗和行为的欠缺而发展起来的疗法。ABC技术是其中一种临床常用的认知疗法。A(acting stimulus)指与情感有关的激发事件B(beliefs)指信念,包括理性或非理性的信念C(emotion and behavioral consequences)代表情绪和行为的结果,通常临床工作中强调A与C之间的关系,甚至认为A和C间存在必然关系,而忽视B在其中的调节作用。事实上A与C之间有B的中介因素。不合理甚至是错误的个人认知观念是导致疗效欠佳的重要原因之一。

国外研究发现,心理因素和GERD患者的躯体症状相关^[8],且心理干预可减轻此类患者的症状^[9],国内有报道对该病进行精神药物及心理辅导联合治疗对减轻症状有效^[10],但未见有老年人群的相关报道。本研究发现,ABC认知干预可缓解患者的多种心理压力,在焦虑、抑郁和躯体化上均可收到良好的效果,有效减轻患者心理障碍和主观临床症状,证实心理干预措施在治疗中可以起到积极作用。

对GERD患者来说,躯体症状和心理障碍是互相影响的。疾病的慢性化,进一步加重了患者

■应用要点

得当的心理干预措施可以减轻老年胃食管反流病患者心理障碍及临床主观症状,对提高临床诊治水平有较好的参考和应用价值。

表 1 老年GERD患者心理干预前后及国内常模SCL-90量表对比

	本组患者		国内常模	干预前与 常模比较(t)	干预前 后比较(t)
	干预前	干预后			
总分	136.03 ± 29.10	130.11 ± 23.18	129.96 ± 38.76	2.61	1.99
阳性项目数	28.54 ± 17.21	25.03 ± 15.28	24.92 ± 18.41	2.57	1.91
阳性均分	2.71 ± 0.52	2.57 ± 0.59	2.60 ± 0.59	2.65	2.65
躯体化	1.57 ± 0.49	1.47 ± 0.39	1.37 ± 0.48	5.11	2.00
强迫	1.71 ± 0.45	1.69 ± 0.47	1.62 ± 0.58	2.50	0.38
人际关系	1.73 ± 0.42	1.69 ± 0.46	1.65 ± 0.51	2.39	0.81
抑郁	1.58 ± 0.39	1.47 ± 0.51	1.50 ± 0.59	2.68	2.15
焦虑	1.51 ± 0.42	1.40 ± 0.39	1.39 ± 0.43	3.58	2.40
敌对	1.53 ± 0.55	1.49 ± 0.51	1.48 ± 0.56	1.10	0.67
恐怖	1.29 ± 0.41	1.27 ± 0.43	1.23 ± 0.41	1.83	0.42
偏执	1.55 ± 0.59	1.51 ± 0.53	1.43 ± 0.57	2.55	0.63
精神病性	1.32 ± 0.33	1.40 ± 0.39	1.39 ± 0.43	1.31	0.76

■同行评价
本研究立意依据充分,设计严谨,方法成熟,结果可靠,论点明确,是一篇实用性文章。

的心理负担^[11]。作为临床工作人员,全面掌握该类患者的躯体和心理状况十分重要。治疗方案中,既要有针对个体症状表现的医疗措施,也要针对个体的心理障碍采取合适的心理干预,减轻其心理负担,增强对疾病的了解和对医生及治疗的信任感,提高患者自我调节水平,即可缓解患者主观临床症状,又可改善其生活质量,起到提高疗效的作用。

4 参考文献

1 Wahlqvist P, Guyatt GH, Armstrong D, Degl'innocenti A, Heels-Ansdell D, El-Dika S, Wiklund I, Fallone CA, Tanser L, Veldhuyzen van Zanten S, Austin P, Barkun AN, Chiba N, Schünemann HJ. The Work Productivity and Activity Impairment Questionnaire for Patients with Gastroesophageal Reflux Disease (WPAI-GERD): responsiveness to change and English language validation. *Pharmacoeconomics* 2007; 25: 385-396

2 Mokrowiecka A, Jurek K, Pińkowski D, Małeckapanas E. The comparison of Health-Related Quality of Life (HRQL) in patients with GERD, peptic ulcer disease and ulcerative colitis. *Adv Med Sci* 2006; 51: 142-147

3 Lee YC, Wang HP, Chiu HM, Liao SC, Huang SP,

Lai YP, Wu MS, Chen MF, Lin JT. Comparative analysis between psychological and endoscopic profiles in patients with gastroesophageal reflux disease: a prospective study based on screening endoscopy. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 798-804

4 梁晓燕, 高青. 胃食管反流病的食管外表现及其临床进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3387-3390

5 王升, 吴本俨, 吴道宏. 老年胃食管反流病98例5年随访报告. *解放军医学杂志* 2004; 29: 358-359

6 金华, 吴文源, 张明园. 中国正常人SCL-90评定结果的初步分析. *中国神经精神疾病杂志* 1986; 12: 260-263

7 Locke GR 3rd, Weaver AL, Melton LJ 3rd, Talley NJ. Psychosocial factors are linked to functional gastrointestinal disorders: a population based nested case-control study. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 350-357

8 Wright CE, Ebrecht M, Mitchell R, Anggiansah A, Weinman J. The effect of psychological stress on symptom severity and perception in patients with gastro-oesophageal reflux. *J Psychosom Res* 2005; 59: 415-424

9 Kalinowska E, Tarnowski W, Bielecki K, Banasiewicz J. Quality of life before and after laparoscopic fundoplication. Does quality of life depend on psychological factors? Preliminary report. *Wiad Lek* 2006; 59: 772-777

10 高彦, 陈绳武, 蓝宇. GERD患者的心理因素及综合治疗. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2148-2150

11 谢秀梅, 李别非, 余国龙. 老年慢性病患者心理状况分析. *中国现代医学杂志* 2003; 18: 73-75

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 2008-05-28)

三腔单囊管压迫胃底静脉前后食管曲张静脉压力的变化

芦菲, 刘冰熔, 刘红霞, 郑善国

■背景资料

食管静脉曲张破裂出血是肝硬化最严重的并发症之一, 其死亡率较高。传统应用三腔二囊管压迫治疗经济、方便, 有效率达60%。但过程较痛苦, 且不能长时间压迫, 一旦解除气囊压迫又易再次发生出血。目前, 内镜下硬化剂注射治疗被认为是较有效的方法, 急诊止血率可达90%以上, 并可以反复治疗, 提高患者存活率。

芦菲, 刘冰熔, 刘红霞, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

郑善国, 黑龙江省大庆市龙南医院, 黑龙江省大庆市 163311
作者贡献分布: 芦菲与刘冰熔对此文献均等; 此课题由刘冰熔与芦菲设计; 研究过程由刘冰熔、芦菲及刘红霞操作完成; 数据分析由芦菲与郑善国完成; 本论文写作由芦菲完成。

通讯作者: 刘冰熔, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科。liubingrong@medmail.com.cn
电话: 0451-86605143

收稿日期: 2007-12-11 修回日期: 2008-01-27

Pressure changes in intra-oesophageal varices during sclerotherapy using a gastric-balloon tamponade

Fei Lu, Bing-Rong Liu, Hong-Xia Liu, Shan-Guo Zheng

Fei Lu, Bing-Rong Liu, Hong-Xia Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Shan-Guo Zheng, Longnan Hospital of Daqing, Daqing 163311, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Bing-Rong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. liubingrong@medmail.com.cn

Received: 2007-12-11 Revised: 2008-01-27

Abstract

AIM: To determine the intra-oesophageal varices pressure (IOVP) after a gastric balloon tamponade is inserted in cirrhotic patients with esophageal varices.

METHODS: Before sclerotherapy, IOVP was continuously measured in eight cirrhotic patients with esophageal varices through a sclerotherapy needle. We got the primitive pressure right after the puncture. A gastric-balloon tamponade was inserted and IOVP was measured again. Bleeding was monitored. Changes of the pressure before and after sclerotherapy were compared and analyzed.

RESULTS: The IOVP was significantly different before and after a gastric balloon tamponade is inserted ($t = 5.55, P < 0.005$). Furthermore, after sclerotherapy, no surge of blood occurred, and blood infiltration appeared in

2 cases. No bleeding was found in the other patients.

CONCLUSION: Pulling a gastric-balloon tamponade can reduce IOVP effectively. Endoscopic sclerotherapy under the press of the modified gastric-balloon tamponade is a relatively safe and effective procedure in treatment of lethal bleeding esophagogastric varices.

Key Words: Gastric-balloon tamponade; Intra-oesophageal varices pressure; Gastro-esophageal varices; Endoscopic variceal sclerotherapy

Lu F, Liu BR, Liu HX, Zheng SG. Pressure changes in intra-oesophageal varices during sclerotherapy using a gastric-balloon tamponade. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1688-1691

摘要

目的: 研究肝硬化食管静脉曲张患者在放置三腔单囊管压迫胃底静脉前、后食管曲张静脉压力的变化。

方法: 8例肝硬化食管静脉曲张患者在单胃囊三腔管牵引下, 采用50 g/L鱼肝油酸钠行食管静脉内注射。在单胃囊三腔管牵引前、后测曲张静脉的压力变化情况, 并观察注射后针孔出血情况。

结果: 单胃囊三腔管压迫胃底静脉前、后食管曲张静脉内的压力改变有显著性差异($t = 5.55, P < 0.005$)。经单胃囊三腔管压迫后再予以硬化剂注射治疗后, 未发生涌血, 2例为少量渗血, 其余无出血。

结论: 硬化治疗时, 改良的三腔单胃囊管牵引可有效降低食管曲张静脉内的压力, 使硬化治疗的疗效更确切、简便、安全。

关键词: 三腔单囊管; 测压; 食管静脉曲张; 硬化治疗

芦菲, 刘冰熔, 刘红霞, 郑善国. 三腔单囊管压迫胃底静脉前后食管曲张静脉压力的变化. *世界华人消化杂志* 2008; 16(15): 1688-1691

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1688.asp>

■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

0 引言

食管静脉曲张出血是肝硬化最严重的并发症之一, 病死率较高。部分患者三腔二囊管压迫止血无效, 除众多并发症外, 三腔管不能长时间压迫, 而一旦解除气囊压迫又易发生再出血。目前, 急诊内镜治疗是行之有效的方法, 可以反复治疗, 提高患者存活率。但由于大量出血期间食管内充满血液造成视野不清而无法看清出血灶; 插镜诱发恶心可引起呕血涌入气管等情况发生, 以致紧急内镜止血治疗成功率不高。而择期治疗时, 往往因为曲张静脉内压力很高, 硬化剂注射后退针时穿刺处经常发生明显喷血或涌血, 影响视野及操作, 甚至由于大量出血而被迫中止治疗。为避免以上情况的发生, 可以在内镜硬化治疗时联合给予三腔单胃囊管(简称改良三腔管)牵引压迫胃底静脉, 以降低食管曲张静脉内的压力, 有临床应用表明此种方法是有效的、安全的。但究竟能使静脉压力下降幅度达到多少仍无人涉及。因此我们就三腔单囊管压迫前、后食管曲张静脉内压力的变化情况作了前瞻性临床研究, 在内镜直视下对曲张静脉进行穿刺测压, 以期进一步证实此种方法的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2006-10/2007-10在我院住院的肝硬化食管静脉曲张出血后择期硬化剂治疗术前志愿行静脉内测压者8例。均为男性。年龄43-70(平均57)岁。乙肝肝硬化合并食管静脉曲张6例, 酒精性肝硬化2例。肝功能Child分级: A级7例, B级1例。根据国内食管静脉曲张内镜下诊断分级标准^[1]重度食管静脉曲张6例, 中度2例。日本Olympus CV260型电子胃镜, COOK公司生产的23G内镜注射针, 硬化剂系国产50 g/L鱼肝油酸钠, 改良三腔管(将三腔二囊管去掉食管囊保留胃囊), L形腰穿脑脊液测压玻璃管、延长管、三通器、生理盐水溶液。

1.2 方法

1.2.1 压力测定: 予以心电、血压监护, 吸氧, 保持静脉输液通路。电子胃镜常规检查食管、胃及十二指肠球部, 观察食管静脉曲张的程度, 有无糜烂、溃疡等情况。退出电子胃镜, 常规经鼻送入只保留胃囊的三腔单囊管, 确定胃囊进入胃腔后向胃囊内注入200 mL气体。将硬化剂注射针与测压装置相连接, 使生理盐水充盈整个注射针管及测压导管, 以形成一个无泡的液性封闭导管系统。再次送入电子胃镜至食管下段, 并由活检孔道送入硬化注射针, 选择食管下段

较粗大的曲张静脉作穿刺, 利用物理连通器液压原理, 玻璃测压管的液面静止不动时, 可读出曲张静脉内压力(cmH_2O)。由助手牵拉已充气的三腔单囊管(约1 kg的拉力)以完全或部分阻断流向食管静脉的血流, 并再次观察玻璃测压管中水柱的升降情况。当液面再次静止不动时读出三腔单囊管压迫后的曲张静脉内的压力。测压完毕后硬化剂注射针与测压装置分离, 与充满50 g/L鱼肝油酸钠的注射器相连, 进行常规硬化剂注射治疗。

1.2.2 注射部位: 食管贲门区静脉丛的供血主要来自胃左静脉穿过浆膜肌层黏膜下层, 其位于齿状线下2-4 cm小弯侧, 是发生大出血的重要区域。本组中胃食管交界处及其上方2-5 cm范围为静脉曲张破裂的特定部位, 准确地选择该部位行硬化剂注射治疗(EIS), 注射点遵循沿食管壁自下而上呈螺旋形分布的原则, 选择出血部位曲张静脉下方, 快速准确进针, 斜向刺入曲张静脉内, 快速、足量推注硬化剂。如无法明确出血部位, 可在贲门附近不同平面采用静脉内快速、足量注射, 同样达到止血效果。每次注射3-5点, 每点4-6 mL, 硬化剂平均用量35 mL。

1.2.3 治疗后观察: 次注射拔针后观察针孔的出血情况(喷血、涌血、渗血或是基本无出血)。硬化治疗结束退出胃镜后继续牵拉三腔单囊管15 min, 观察无其他不良反应后可撤出三腔单囊管。

统计学处理 所得数据采用配对 t 检验的统计学方法分析。

2 结果

8例肝硬化患者所测得的食管下段曲张静脉内的压力范围为32-60 cmH_2O (23.52-44.10 mmHg, 3.14-5.98 kPa)不等, 平均为 $41.63 \pm 6.76 \text{ cmH}_2\text{O}$ (30.60 \pm 4.97 mmHg, 4.08 \pm 0.66 kPa)。经单胃囊三腔管牵拉后压力下降至 $30.25 \pm 5.05 \text{ cmH}_2\text{O}$ (22.23 \pm 3.71 mmHg, 2.96 \pm 0.49 kPa), 平均下降幅度27%。单胃囊三腔管压迫胃底静脉前、后食管曲张静脉内的压力改变间的差异有非常显著性($t=5.55$, $P<0.005$)。经单胃囊三腔管压迫后再予以硬化剂注射治疗后, 未发生涌血, 2例为少量渗血, 其余无出血。4例患者于治疗后出现中上腹不适感, 3例感到胸骨后疼痛, 1例右肋下疼痛, 经制酸、保护胃黏膜等对症治疗后症状消失。未发现术后远处栓塞的患者。

3 讨论

食管静脉曲张破裂出血是肝硬化患者常见的严

■ 研发前沿

对于肝硬化食管静脉曲张患者, EIS已被广泛应用。但由于患者食管曲张静脉的压力较高, 对于大量出血期间的内镜急诊治疗, 食管内充满血液导致视野不清, 无法看清出血灶; 而对于择期治疗的患者, 因曲张静脉内压力较高, 硬化剂注射治疗时易造成注射针孔的涌血、喷血而影响操作。

■相关报道

目前,已有文献报道在硬化治疗前先采用单胃囊的三腔管牵引压迫胃底静脉,以降低曲张静脉内的压力,使活动性出血暂时停止或减轻,视野变清晰,从而快速准确地完成EIS.

重并发症,其死亡率较高,需立即抢救.传统应用三腔二囊管压迫有效率可达60%,关于他的效果应当说是有效的,但又不能令人满意.近期再出血率仍高约42%^[2].由于以往使用三腔管时食道囊也注入气体,因食管囊压力较高^[3],严重影响食管黏膜的局部血液供应,出现胸痛、胸闷,患者难以耐受,多不能坚持,从而影响效果^[4-5].胡季平 *et al*^[6]认为根据门静脉高压时侧支循环的血流情况,只要行胃囊压迫,就能阻断或部分阻断食管静脉血流.目前有报道一些医院仅采用单纯胃囊充气压迫止血,止血成功率达77%^[7],并且免除了食道囊注气后的窒息感,避免了食管囊压迫所引起的食管黏膜糜烂、溃疡、出血.但是鉴于近年药物治疗^[8]和内镜治疗的进步,目前已不推荐气囊压迫作为首选止血措施.但气囊压迫仍可为药物止血、硬化、结扎治疗及手术治疗做好准备,以争取更多的时间.

目前,多主张肝硬化患者在发现食管静脉曲张后及时给予预防性的硬化剂注射治疗(EIS),以减少曲张静脉破裂出血的危险性.对于食管静脉曲张破裂大出血而言硬化治疗更是行之有效的方法^[9],明显优于外科急诊分流术、断流术或TIPS,且不受胸腹水限制,适应症较外科急诊手术宽^[9-12].文献报道经双囊三腔管和加压素暂时止血后数小时行EIS,可提高止血率,减少并发症^[11].因此,在硬化治疗前先采用单胃囊的三腔管牵引,压迫胃底静脉,使活动性出血暂时停止或减轻,视野变清晰,从而快速而准确地完成EIS,为抢救赢得时间.其操作简便,可以在床边进行,大大增加了EIS的安全性.有报道称三腔单囊管牵引下联合硬化治疗急诊止血率为96.2%,并发症发生率8.5%,与EIS直接相关的死亡率1.7%^[13].而三腔单囊管压迫下联合硬化和套扎治疗的止血成功率更达100%^[14].我们认为此操作应尽量使患者在麻醉下进行,可以减少经鼻放置三腔单囊管所引起的不适感和恐惧感;而且在全麻下,胃镜刺激所引发的恶心会减轻,从而减少食管蠕动,使硬化治疗过程免受干扰.若使用改良导丝法置管可使插管的成功率有所提高^[15].另有报道称^[16]在施行单胃囊压迫联合硬化治疗时曾有患者自己强行拉拔已充气的三腔管而导致食管穿孔,所以在操作时应格外注意.

吴云林 *et al*^[17]曾采用液压传感原理,其测得的10例肝硬化患者食管下段曲张静脉内的压力范围为10-70 mmHg(1.33-9.33 kpa),平均为36.8 ± 2.48 mmHg(4.91 ± 0.33 kpa).在本次实验中

所测得的曲张静脉内的基础压力较高,平均为41.63 ± 6.76 cmH₂O(30.60 ± 4.97 mmHg, 4.08 ± 0.66 kPa).在此次实验中,经三腔单囊管压迫胃底静脉后,食管曲张静脉内的压力降低至30.25 ± 5.05 cmH₂O(22.23 ± 3.71 mmHg, 2.96 ± 0.49 kPa),平均下降幅度为27%.本次研究进一步证实了经单胃囊的三腔管压迫胃底静脉可有效降低食管曲张静脉内的压力.

此外,我们曾在动物实验中作过前期研究.通过远端不完全结扎大耳白兔的下腔静脉以模拟食管静脉曲张时三腔单囊管压迫胃底静脉,观察到不完全结扎前后静脉压力及血流速均有明显变化:下腔静脉原始压力为12.3 ± 2.09 cmH₂O(9.04 ± 1.54 mmHg),不完全结扎后压力下降为9.86 ± 2.0 cmH₂O(7.25 ± 1.47 mmHg), $P < 0.05$;未结扎时血流速为7.06 ± 1.59 mL/min,不完全结扎后血流速降为4.76 ± 1.47 mL/min, $P < 0.05$.单纯硬化治疗后的血流速为3.19 ± 2.4 mL/min,先结扎再给与硬化治疗后的血流速为1.68 ± 0.69 mL/30 s, $P < 0.05$;且两组硬化治疗后血栓病理损害比较经统计学分析有差异($\chi^2 = 4.859$, $P < 0.05$).以上数据表明:当人为干预使血管变窄后,血管内压力和血流速均明显下降,并且在压迫后行硬化治疗与单纯硬化治疗相比较,血流速亦下降明显.因此,动物实验从侧面证实了对于食管静脉曲张患者,在治疗前若先给与压迫胃底静脉可使血管内压力降低,血流速减慢,对治疗是有益的.

我们总结单胃囊压迫联合硬化治疗有以下优点:(1)单囊管压迫后使局部血流减慢、停滞.硬化剂不易消散,与血管接触时间延长,更易形成血栓,使疗效更确切.(2)压迫后胃腔内的血液和胃液不会反流入食管,故视野清楚,内镜治疗操作更准确.(3)压迫后食管静脉血流压力减低,注射后针孔出血机会减少.(4)血管内压力和血流速的降低可减少硬化剂向远处游移的可能性,可大大减少硬化剂栓子发生远处栓塞的危险性.(5)改良去掉食道囊后,只对贲门、胃底静脉进行有效压迫,而对气管、心脏、胸主动脉无严重的压迫症状,患者无极度不适感.(6)在治疗中间,可随时放松牵引,以寻找有无其他活动性出血灶.放松牵引后,插入食道贲门部的胃囊立即滑入胃腔,以利于贲门小弯部位的观察和治疗.同时,急诊EIS救治致死性食管静脉曲张破裂大出血出现以下情况时:(1)肝硬化患者活动性大出血不止,循环功能不全,已出现休克;(2)由于

出血量大, 内镜下视野相当不清楚; (3)内镜下食管下段曲张静脉多处破裂出血, 或当完成一处EIS后, 无法继续其余出血部位的EIS; (4)大出血者为夜间由外院转来, 急诊入院时已插入三腔管, 仍出血不止, 可在改良三腔管的牵引下给予硬化剂注射等积极治疗。

4 参考文献

- 1 中华医学会消化内镜学分会. 食管胃静脉曲张内镜下诊断和治疗规范试行方案(2003年). 中华消化内镜杂志 2004; 21: 149-151
- 2 程荣堃, 柯建利, 陈秀琴. 食管静脉曲张大出血带管急诊硬化法. 中华消化内镜杂志 2000; 17: 229
- 3 叶任高. 内科学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 511
- 4 杜雅菊, 陈小宇, 王红梅, 郭惠春. 善得定与三腔二囊管治疗食管胃底静脉曲张出血的临床观察. 哈尔滨医科大学学报 2001; 35: 244
- 5 周萍, 钟夏蓉. 使用改良三腔二囊管止血的方法. 局解手术学杂志 1996; 5: 31-32
- 6 胡季平, 许玉莲. 改进型三腔二囊管填塞治疗门静脉高压上消化道出血38例报告. 中国血吸虫病防治杂志 1999; 11: 163
- 7 于月华, 秦北宁, 古彩喆. 单用三腔管胃囊压迫治疗门脉高压上消化道出血30例观察. 实用肝病杂志 1999; 4: 184
- 8 丁惠国. 肝硬化门脉高压症内科治疗的选择与评价.

- 9 世界华人消化杂志 2007; 15: 1579-1582
- Cheng CY, Chen GH, Chang CS, Tseng CC, Chen TY, Lin CK, Pan HK, Huang CK, Hsieh PF, Huang PT. Sclerotherapy on liver cirrhosis with esophageal variceal bleeding: eight years of experience. *Zhonghua Yixue Zazhi (Taipei)* 1994; 54: 321-328
- 10 王帅, 闻炜, 姚鹏, 龚丽娟, 邱萍, 胡大荣. 肝硬化并门脉高压性胃病的临床研究. 世界华人消化杂志 2006; 14: 533-535
- 11 Nos P, Sala T, Pertejo V, Berenguer M, Garrigues V, Pons V, Juan M, Berenguer J. Endoscopic sclerotherapy versus oesophageal transection in the prevention of variceal rebleeding. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 231-235
- 12 程留芳, 王志强, 王志军, 令狐恩强. 230例食管胃静脉曲张出血患者急诊硬化治疗. 中华消化内镜杂志 1997; 14: 271-273
- 13 沈云志, 茹佩瑛, 赵建妹, 陈建平, 将伟, 王申, 张文明, 王扬, 汪良芝, 孙克文. 食管静脉曲张破裂大出血急诊硬化治疗. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 160-162
- 14 全红, 涂湘华, 吴铁镛. 二腔一囊管压迫并用内镜硬化和套扎同时治疗食管静脉曲张破裂出血. 中华消化内镜杂志 2003; 20: 414-415
- 15 彭贺新. 三腔二囊管插入方法的改良. 中华消化杂志 2002; 22: 623
- 16 陈建平. 改良单囊三腔管压迫下内镜硬化治疗时拉拔三腔管致食管穿孔的治疗. 中华消化内镜杂志 2003; 20: 210
- 17 吴云林, 杨根妹, 王莉, 王玲玲, 陆和平, 翟祖康, 汪石湖, 徐家裕. 奥曲肽降低食管曲张静脉压力及减少硬化剂针孔出血的临床研究. 中华消化杂志 1995; 15: 11-14

■同行评价

本研究有一定的风险, 难度较大, 具有较好的实用价值, 可指导临床操作。

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 2008-05-28)

人胃腺癌组织的自体荧光及其吸收、散射特性

何博华, 魏华江, 陈雪梅, 王娟

■背景资料

胃癌是人类最常见消化系统肿瘤, 手术切除是目前唯一的根治性措施, 其疗效关键与早期诊断有关, 光谱检测有望在胃癌早期和其他影像学手段未能查出前作出正确判断。

何博华, 广东药学院外科教研室 广东省广州市 510310
魏华江, 华南师范大学激光生命研究所 广东省广州市 510631
陈雪梅, 中山大学附属第一医院眼科 广东省广州市 510080
王娟, 广东药学院护理教研室 广东省广州市 510310
广东省自然科学基金资助项目, No. 06032270
广东省医学科学基金资助项目, No. A2006309
作者贡献分布: 此课题由何博华, 魏华江, 陈雪梅及王娟设计; 研究过程由何博华与魏华江操作完成; 数据分析由陈雪梅与王娟完成; 本论文写作由何博华与陈雪梅完成。
通讯作者: 何博华, 510310, 广东省广州市, 广东药学院外科教研室, hebohua39@tom.com
电话: 020-87335448
收稿日期: 2008-01-16 修回日期: 2008-03-16

Properties of autofluorescence, absorption coefficient and scattering coefficient spectra for human gastric adenocarcinoma tissues

Bo-Hua He, Hua-Jiang Wei, Xue-Mei Chen, Juan Wang

Bo-Hua He, Department of Surgery, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, Guangdong Province, China

Hua-Jiang Wei, Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong Province, China

Xue-Mei Chen, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Sun Yet-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Juan Wang, Department of Nursing, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, Guangdong Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 06032270, and the Medical Science Foundation of Guangdong Province, No. A2006309

Correspondence to: Bo-Hua He, Department of Surgery, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, Guangdong Province, China. hebohua39@tom.com

Received: 2008-01-16 Revised: 2008-03-16

Abstract

AIM: To investigate the characteristics of autofluorescence, absorption coefficient spectrum and scattering coefficient spectrum for human gastric adenocarcinoma tissues.

METHODS: Twenty-eight samples of human gastric adenocarcinoma taken from tumorous regions and non-tumorous regions were used.

Autofluorescence, absorption coefficient and scattering coefficient spectra for gastric wall tissues were measured.

RESULTS: Peak value of autofluorescence spectrum for gastric adenocarcinoma was significantly lower than that for non-tumorous gastric wall tissues and double-peak was present. Absorption coefficient for gastric adenocarcinoma tissues with a spectral range of 300-720 nm wavelength, was significantly lower than that for non-tumorous gastric wall tissues ($P < 0.01$). Scattering coefficient for gastric adenocarcinoma tissues, with a spectral range of 480-1100 nm wavelength, was significantly lower than that for non-tumorous gastric wall tissues ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Autofluorescence, absorption coefficient and scattering coefficient spectra can differentiate gastric adenocarcinoma tissues from non-tumorous gastric wall tissues effectively.

Key Words: Gastric adenocarcinoma; Autofluorescence; Absorption coefficient; Scattering coefficient

He BH, Wei HJ, Chen XM, Wang J. Properties of autofluorescence, absorption coefficient and scattering coefficient spectra for human gastric adenocarcinoma tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1692-1695

摘要

目的: 探讨人胃腺癌组织的自体荧光强度及吸收、散射特性。

方法: 测定28例人胃腺癌标本的肿瘤及非肿瘤区域组织的自体荧光强度及吸收系数光谱和散射系数光谱。

结果: 人胃腺癌组织自体荧光光谱的峰值明显低于非肿瘤胃壁组织自体荧光光谱峰值并出现双峰; 人胃腺癌组织吸收系数在300-720 nm光谱范围内明显低于非肿瘤胃壁组织, 有显著性差异($P < 0.01$), 散射系数在480-1100 nm光谱范围内也明显低于非肿瘤胃壁组织, 有显著性差异($P < 0.01$)。

■同行评议者

郝纯毅, 主任医师, 北京肿瘤医院肿瘤外科

结论: 人胃腺癌组织的自体荧光强度及吸收、散射特性光谱可有效识别人胃腺癌组织与非肿瘤胃壁组织。

关键词: 胃腺癌; 自体荧光; 吸收系数; 散射系数

何博华, 魏华江, 陈雪梅, 王娟. 人胃腺癌组织的自体荧光及其吸收、散射特性. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1692-1695
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1692.asp>

0 引言

胃癌是人类最常见的消化系统肿瘤, 早期发现及治疗能从根本上改变胃癌患者的预后. 激光技术已逐渐成为消化系统肿瘤诊断和治疗的重要手段, 配合内镜技术可实现在体、原位、可视化和实时探测. 癌组织与正常组织的组成成分不同, 分子结构不同, 他们所对应的荧光光谱、吸收系数光谱和散射系数光谱也不相同. 关键问题是肿瘤组织与正常组织之间是否存在组织光学特性的差异及确定诊断的光谱范围. 我们测定28例胃腺癌标本的肿瘤及非肿瘤区的组织的自体荧光光谱、吸收系数光谱和散射系数光谱, 并对其进行了分析和对比, 报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 实验用组织样品来自28例外科手术切除的人胃腺癌标本. 本实验全过程除生理盐水外, 未使用其他任何试剂. 所有组织块在光学检测后送广东药学院附属第一医院作病理检查, 所用试剂、材料不详. 荧光光谱测定采用PE公司的LS-55荧光光谱仪(Perkin-Elmer, USA, model: LS-55), 吸收系数光谱和散射系数特性的测量Lambda 35紫外/可见分光光度计(Perkin-Elmer, USA, model: Lambda 35)及附件中的积分球(Labsphere, USA, model: RSA-PE-20).

1.2 方法

1.2.1 样品的制备: 实验用组织样品来自28例外科手术切除的人胃腺癌标本, 切除后立即用生理盐水冲洗掉表面的血液及分泌物, 在肿瘤中心区域取20 mm×20 mm以上全层组织块(光学检测后作病理检查证实全部均为胃腺癌), 同时在肿瘤可见边缘30 mm以外区域取20 mm×20 mm以上胃壁全层组织块(光学检测后作病理检查证实全部均未见肿瘤浸润), 将样品置于装有冷生理盐水(4℃以下)的器皿中, 3 h内在自然状态及室温为20℃环境下分别完成自体荧光光谱的测量. 然后尽快将样品用生理盐水保存于超

低温(-75℃)冰箱速冻冷藏. 吸收系数光谱和散射系数检测前, 将组织样品用冰冻切片机切割, 生成面积为12 mm×12 mm含胃壁全层的人胃腺癌组织样品及非肿瘤胃壁组织样品. 然后分别将组织样品在自然状态及室温为20℃环境下分别进行吸收系数光谱和散射系数特性的测量, 从手术切除到样品准备和测量全过程在24 h内完成.

1.2.2 光学检测: 将组织样品固定在样品支架上(黏膜面向上), 荧光光谱测定采用PE公司的LS-55荧光光谱仪. 设置狭缝宽度为2.0 nm, 分别用360 nm和390 nm波长激光激发组织发出自体荧光并测定其荧光强度, 扫描的波长范围设置在400-700 nm, 所有样品重复测量10次. 实验数据由荧光光谱仪配套软件采集及作统计学处理, 并自动生成荧光光谱曲线. 吸收系数光谱和散射系数特性的测量采用具有积分球附件的Lambda 35紫外/可见分光光度计, 该附件中的积分球内部直径为50 mm. 设置分光光度计的狭缝宽度为2.0 nm, 扫描的波长范围设置在300-1100 nm, 测定方式设置为反射. 在积分球的样品反射窗处放置角度为0度的样品支架, 将组织样品固定在样品支架上(黏膜面向上), 使得入射光入射到组织的黏膜面平面上的入射角为0度, 积分球所测量的反射率(不包括镜面反射)为组织样品的漫反射率Rs, 移去组织样品并在样品反射窗处放置硫酸钡反射板做参比, 积分球所测量的反射率(不包括镜面反射)为100%漫反射率R100, 移开样品反射窗处放置的硫酸钡反射板, 积分球所测量的反射率为零漫反射率R0. 人胃腺癌组织样品和非肿瘤胃壁组织样品在同样的实验条件下测量各项漫反射率, 每个组织样品的测量都使用同一块硫酸钡标准板作R100的定标, 每个组织样品分别按照上述过程在300-1100 nm光谱范围内重复测量10次, 获取的图像信号输送到电子计算机进行图像分析和数据处理.

2 结果

2.1 自体荧光光谱曲线 用360 nm波长激光激发的胃腺癌自体荧光光谱曲线与非肿瘤胃壁自体荧光光谱曲线相比, 两者曲线形状差异非常明显, 非肿瘤胃壁自体荧光光谱曲线为较平滑的单峰曲线, 而胃腺癌荧光光谱曲线则呈明显的双峰, 峰值明显低于非肿瘤胃壁自体荧光光谱曲线的峰值. 用390 nm波长激光激发的胃腺癌自体荧光光谱曲线与非肿瘤胃壁自体荧光光谱

■研发前沿

肿瘤组织光学特性的研究主要集中在肿瘤荧光光谱研究, 比较肯定的是正常组织和肿瘤组织发出的荧光光谱存在差异. 但由于激发波长不同, 产生荧光光谱曲线的形态相异, 如何选择激发波长目前尚不一致.

■相关报道

史晓凤 *et al*报道, 用偏最小二乘法(PLS)区分癌组织与正常组织的敏感度为83.3%, 特异度为95.2%, 阳性预测度为94.6%. 其识别胃癌的价值高于传统的光谱分析方法.

创新视点

本研究既检测了自体荧光光谱的差异,又检测了吸收系数和散射系数。从光谱的形态角度多层次分析胃腺癌标本的肿瘤区与非肿瘤区的光学指标差异。

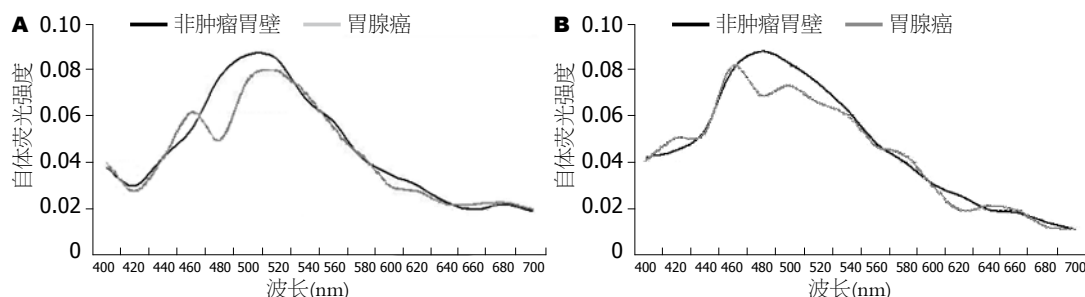


图1 激光激发胃腺癌组织与非肿瘤胃壁组织的自体荧光光谱曲线。A: 360 nm波长; B: 390 nm波长。

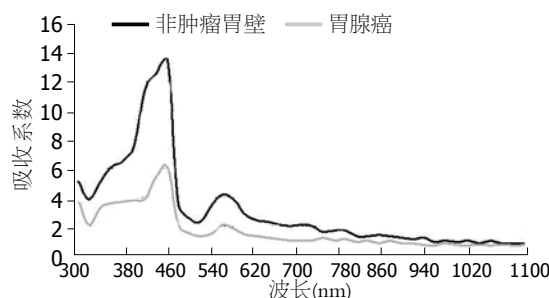


图2 胃腺癌组织与非肿瘤胃壁组织的吸收系数光谱。

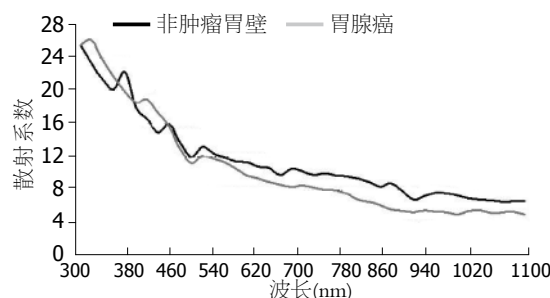


图3 胃腺癌组织与非肿瘤胃壁组织的散射系数光谱。

曲线相比,两者曲线形状差异非常明显,非肿瘤胃壁自体荧光光谱曲线为较平滑的单峰曲线,而胃腺癌荧光光谱曲线则呈不规则的多峰,峰值明显低于非肿瘤胃壁自体荧光光谱曲线的峰值,峰值所处波长位置前移。用不同波长激光激发的非肿瘤胃壁自体荧光光谱曲线的形状基本一致,均为较平滑的单峰曲线,而胃腺癌自体荧光光谱曲线的形状各异,呈现双峰或多峰形状,随着激发波长增大而变得更不规则,无论胃腺癌还是非肿瘤胃壁自体的自体荧光光谱曲线峰值所处波长位置随激发波长增大而前移(图1)。

2.2 吸收系数光谱 胃腺癌组织及非肿瘤胃壁组织对不同波长的激光的吸收系数均随着激光波长的增大而明显改变(图2)。最大值都在波长460 nm,非肿瘤胃壁组织为 $(13.52 \pm 0.54)/\text{mm}$,胃腺癌组织值 $(6.12 \pm 0.25)/\text{mm}$,两者比值达2.2,差异非常显著($P < 0.01$),而最小值在波长1100 nm,非肿瘤胃壁组织为 $(0.8 \pm 0.06)/\text{mm}$,胃腺癌组织值 $(0.72 \pm 0.05)/\text{mm}$,两者非常接近,差异无显著性($P > 0.05$)。在波长300-720 nm范围,胃腺癌组织及非肿瘤胃壁组织的吸收系数有显著性的差异($P < 0.01$),在波长720-1100 nm范围,胃腺癌组织及非肿瘤胃壁组织的吸收系数无显著性的差异($P > 0.05$),其中在波长860-1100 nm范围,胃腺癌组织及非肿瘤胃壁组织的吸收系数渐趋一致。

2.3 散射系数光谱 胃腺癌组织及非肿瘤胃壁组织对不同波长的激光的散射系数均随着激光波

长的增大而明显减小(图3)。在波长300-480 nm范围,胃腺癌组织及非肿瘤胃壁组织的散射系数无显著性的差异($P > 0.05$),在波长480-1100 nm范围,胃腺癌组织的散射系数明显低于非肿瘤胃壁组织的散射系数,有显著性的差异($P < 0.01$)。

讨论

胃癌是人类最常见的消化系统肿瘤,严重威胁人类的健康和生命。目前临床上诊断胃癌的主要手段仍是胃镜和上消化道造影检查。上消化道造影检查只能检测到较大的肿瘤,对于体积小的肿瘤无法识别,且对肿瘤病理性质无法判断。胃镜检查能较直观地观察肿瘤但仍需取组织进行活检方可判断其病理性质。术界人士希望能在胃镜检查中在体、实时探测观察肿瘤并判断组织的病理性质。通过测量生物组织光学特性从而判断组织的病理性质^[1-3],有望实现。

目前,对肿瘤组织光学特性的研究主要集中在肿瘤荧光光谱研究,已有较多的实验结果表明,正常组织和肿瘤组织发出的荧光光谱存在差异^[4-6]。人体组织内有许多能发出荧光的生物分子。由于癌组织的分子结构、代谢的改变导致荧光光谱的不同^[7-9],本文的荧光光谱曲线也清楚地显示人胃腺癌组织自体荧光光谱与非肿瘤胃壁组织自体荧光光谱有显著性差异,容易根据荧光光谱曲线识别胃腺癌与非肿瘤胃壁组织。生物分子有各自的最佳激发波长,不同生

物分子的荧光激发效率不同, 当激发激光波长变化时, 发出的荧光存在差异, 我们选用360 nm和390 nm波长激发的胃腺癌自体荧光光谱曲线与非肿瘤胃壁自体荧光光谱曲线也是随着激发波长变化而变化, 两者在荧光光谱曲线的形状的差异、峰值的差异及峰值所处波长位置的差异亦非在所有波长激发的荧光光谱曲线都具有显著性。

在生物医学光子学的研究及其应用, 测量组织的漫反射率和透射率也是组织光学特性非侵入法测量的一个重要组成^[10-11], 对于特定的生物组织以及特定的激光波长, 其吸收系数和散射系数是确定的^[12], 光在生物组织中传输与生物组织的光学特性密切相关^[13], 在生物组织中由光辐射所产生的空间分辨漫反射和透射特性含有组织的组份和结构等信息, 通过测量生物组织的空间分辨反射率能够定量地反映生物组织的吸收和散射特性, 从而判断组织的病理性质^[14-15]。胃腺癌组织及非肿瘤胃壁组织吸收系数光谱和散射系数光谱在较大的波长范围内有显著性差异, 吸收系数在波长300-720 nm范围, 散射系数在波长480-1100 nm范围; 吸收系数最大值的差异更显著, 非肿瘤胃壁组织吸收系数最大值与胃腺癌组织的比值达2.2。值得注意的是, 临床上常用于胃肠道诊治的激光波长(488 nm, 514.5 nm, 532 nm, 630 nm和632.8 nm)均在该有显著性差异的波长范围; 这有利于将吸收系数光谱和散射系数光谱的检测推广应用于胃腺癌的临床诊断。

本文所提供数据因样品数有限, 尚不足以确立以自体荧光光谱、吸收系数光谱及散射系数光谱检测诊断胃腺癌的标准, 希望能为胃肠道肿瘤光谱诊断数据库的建立提供有意义的参考数据。

4 参考文献

- Mayinger B, Horner P, Jordan M, Gerlach C, Horbach T, Hohenberger W, Hahn EG. Endoscopic fluorescence spectroscopy in the upper GI tract for the detection of GI cancer: initial experience. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2616-2621
- 翟力平, 李世荣, 高草, 张继光, 丁华野, 华益慰. 激光诱发荧光光谱诊断结肠癌的可行性研究. *中华肿瘤杂志* 1998; 20: 76-77
- 唐伟跃, 王杰芳, 徐平. 胃癌组织拉曼光谱的研究. *中国激光* 2004; 25: 82-83
- Silveira L Jr, Betiol Filho JA, Silveira FL, Zângaro RA, Pacheco MT. Laser-induced fluorescence at 488 nm excitation for detecting benign and malignant lesions in stomach mucosa. *J Fluoresc* 2008; 18: 35-40
- Zheng W, Lau W, Cheng C, Soo KC, Olivo M. Optimal excitation-emission wavelengths for autofluorescence diagnosis of bladder tumors. *Int J Cancer* 2003; 104: 477-481
- 殷光中, 谭纪伏, 于常青, 窦晓鸣. 胃癌荧光光谱特性初步研究. *中国激光医学杂志* 2004; 13: 232-235
- Shi XF, Ma J, Mao WZ, Li Y, Zheng RE, Meng JW. Applying partial least-squares discriminant analysis on autofluorescence spectra to identify gastric cancer. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* 2006; 26: 295-298
- 马君, 毛伟征, 李颖, 史晓风, 王荣, 郑荣儿, 孟继武. 自体荧光光谱检测胃浆膜识别胃癌组织. *中国激光医学杂志* 2005; 14: 74-79
- Li BH, Xie SS. Autofluorescence excitation-emission matrices for diagnosis of colonic cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3931-3934
- 魏华江, 巫国勇, 何博华, 鲁建军, 张薇, 许静芬. 采用不同的光传输模型比较研究结肠的散射和吸收特性: 离体结肠肿瘤的光学诊断. *激光生物学报* 2006; 15: 445-452
- 彭亦学, 刘小林. 生物组织的折射率对漫反射光分布的影响. *激光生物学报* 2002; 11: 454-457
- Bartek M, Wang X, Wells W, Paulsen KD, Pogue BW. Estimation of subcellular particle size histograms with electron microscopy for prediction of optical scattering in breast tissue. *J Biomed Opt* 2006; 11: 064007
- 魏华江, 邢达, 何博华, 陈雪梅, 巫国勇, 鲁建军. 无损光学法测量人胃粘膜/粘膜下层组织的光衰减特性. *激光生物学报* 2007; 16: 167-172
- Key H, Davies ER, Jackson PC, Wells PN. Optical attenuation characteristics of breast tissues at visible and near-infrared wavelengths. *Phys Med Biol* 1991; 36: 579-590
- Fawzy YS, Petek M, Tercelj M, Zeng H. In vivo assessment and evaluation of lung tissue morphologic and physiological changes from non-contact endoscopic reflectance spectroscopy for improving lung cancer detection. *J Biomed Opt* 2006; 11: 044003

■同行评价

本研究设计合理, 方法先进, 结果阐述适当, 讨论具有针对性, 具有较好的临床参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

经内镜放置金属支架治疗胃出口恶性梗阻9例

王志勇, 孙丽伟, 吴建良, 李 丽, 马菊妹, 胡娇娣

■背景资料

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率及死亡率仅次于肺癌, 多见于胃窦, 胃窦癌晚期常致幽门梗阻, 即胃出口恶性梗阻, 内镜下放置金属支架解除胃癌所致胃出口恶性梗阻的报道较少。

王志勇, 孙丽伟, 吴建良, 李丽, 马菊妹, 胡娇娣, 杭州市第二人民医院消化科(杭州师范大学医学院附属医院) 浙江省杭州市 310015

浙江省医药卫生科学研究基金计划(B类)资助项目, No. 2007B176

作者贡献分布: 王志勇对本文作主要贡献; 此课题设计由王志勇, 孙丽伟, 吴建良, 李丽, 马菊妹及胡娇娣完成; 研究过程由王志勇及马菊妹操作完成; 数据分析由王志勇, 孙丽伟及吴建良完成; 本论文写作由王志勇, 孙丽伟及吴建良完成。

通讯作者: 王志勇, 310015, 浙江省杭州市, 杭州市第二人民医院(杭州师范大学医学院附属医院)消化科。wzy157@hzcnc.com

电话: 0411-83600680 传真: 0411-83631284

收稿日期: 2007-12-22 修回日期: 2008-01-25

Treatment of malignant gastric outlet obstruction using metal stent placement: an analysis of 9 cases

Zhi-Yong Wang, Li-Wei Sun, Jian-Liang Wu, Li Li, Ju-Mei Ma, Jiao-Di Hu

Zhi-Yong Wang, Li-Wei Sun, Jian-Liang Wu, Li Li, Ju-Mei Ma, Jiao-Di Hu, Department of Digestive Diseases, the Second People's Hospital of Hangzhou City (the Affiliated Hospital of Hangzhou Teacher University Medical College), Hangzhou 310015, Zhejiang Province, China

Supported by: the Medical Health Science Research Foundation of Zhejiang Province, No. 2007B176

Correspondence to: Dr. Zhi -Yong Wang, the Second People's Hospital of Hangzhou City (the Affiliated Hospital of Hangzhou Teacher University Medical College), Hangzhou 310015, Zhejiang Province, China. wzy157@hzcnc.com

Received: 2007-12-22 Revised: 2008-01-25

Abstract

AIM: To investigate the clinical efficacy and technique skills of metallic stent placement for malignant gastric outlet obstruction.

METHODS: Nine advanced gastric cancer patients with obstruction of digestive tract were included in this study, and 2 methods were adopted. The first, stents were placed under endoscope by straight sight (stent pusher: 140 mm in length and 4-6 mm in diameter). The second, duodenal stents were placed under endoscope by straight sight via biopsy channel (3.2 or 4.2 mm in diameter).

RESULTS: All the patients received stent placement successful at the first try. Among the pa-

tients, 3 received stents of 2 cm×10 cm, and 6 received stents of 2 cm×8 cm. Pylorus stents, duodenal stents, and esophageal stents were placed in 2 cases, 6 cases and 1 case, respectively. The first method was used in 7 cases, while the second was used in 2 cases. Stents were expanded about 90% under X-ray 24-48 h after operation, and the patients could take in liquid food 24 h after operation. The common complications included nausea, vomiting, upper digestive tract hemorrhage and upper abdominal pain, etc. Obstructive jaundice was found in 1 case. After 3-mo following up, no stent migration, breaking off and obstruction occurred. Of the 9 cases, 3 survived 10-15 d and 2 survived 1-2 mo. The rest 5 cases had survived 3 mo. The mean unimpeded time was 53.4 d.

CONCLUSION: Technique skills should be stressed when metallic stent placement is used in the treatment of malignant gastric outlet obstruction. The efficacy of metallic stent placement depends on the location of metallic stents and disease indications.

Key Words: Gastric cancer; Malignant gastric outlet obstruction; Metallic stent placement; Efficacy; Technique skill

Wang ZY, Sun LW, Wu JL, Li L, Ma JM, Hu JD. Treatment of malignant gastric outlet obstruction using metal stent placement: an analysis of 9 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1696-1699

摘要

目的: 探讨内镜下放置金属支架治疗胃出口恶性梗阻的效果及技术技巧。

方法: 进展期胃癌幽门梗阻患者9例, 采用两种方法治疗: (1)经内镜直视下放置支架(支架推送器直径4-6 mm, 长度约140 mm); (2)经内镜直视下放置经钳道(可通过3.2 mm或4.2 mm的活检孔)的十二指肠支架。

结果: 本组9例支架放置皆1次成功, 其中放置2 cm×10 cm支架3例, 放置2 cm×8 cm支架6例; 放置特制幽门支架2例, 放置十二指肠支架

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

6例, 放置食道支架1例. 采用方法1放置7例, 采用方法2放置2例. 术后24-48 h摄片示支架膨胀约90%, 术后24 h恢复进流食. 常见并发症是恶心、呕吐, 上消化道出血和上腹疼痛等, 1例支架术后出现进行性黄疸. 随访3 mo, 无支架移位, 脱落及梗阻. 生存10-15 d者3例, 生存1-2 mo者2例, 已生存3 mo者4例, 平均通畅期为53.4 d.

结论: 内镜下放置金属支架治疗胃出口恶性梗阻应采用一定的技术技巧, 治疗疗效取决于支架位置是否合适以及病变范围.

关键词: 胃癌; 胃出口恶性梗阻; 金属支架; 疗效; 技术技巧

王志勇, 孙丽伟, 吴建良, 李丽, 马菊妹, 胡娇娣. 经内镜放置金属支架治疗胃出口恶性梗阻9例. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1696-1699
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1696.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率及死亡率仅次于肺癌, 多见于胃窦, 胃窦癌晚期常致幽门梗阻, 即胃出口恶性梗阻, 外科手术虽是解除梗阻的方法, 但由于病程晚期, 患者一般情况差, 常已无手术指征, 而维持生命所需的胃肠减压, 静脉内营养或经皮小肠置管营养难以提高患者的生活质量. 金属支架置入技术是近年来国内外开展的一项新技术^[1-18], 主要用于解除食管及贲门等部位的严重狭窄, 但内镜下放置金属支架解除胃癌所致胃出口恶性梗阻的报道较少, 且支架置入方法与常规的食管支架置入有所不同, 按照常规的食管支架置入方法往往难以成功, 我们成功为9例胃出口恶性梗阻患者放置金属支架, 摸索出一些技术技巧, 现总结如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2006-04/2007-08我院经内镜及病理确诊的进展期胃癌幽门梗阻患者9例, 胃窦癌2例, 胃窦幽门浸润癌5例, 胃体窦幽门浸润癌2例; 病理类型: 腺癌4例, 胃体腺鳞癌1例, 印戒细胞癌2例, 腺癌部分为印戒细胞癌2例; 9例患者插入内镜见胃腔有大量潴留物, 术前进食情况按stooler标准分级: IV级8例, III级1例; 术前B超、CT、MRI等或体检明确有远处转移4例, 其中1例腹腔转移, 大量腹水形成; 不能行根治性手术或患者及家属拒绝开腹手术, 或全身情况极差, 经短期营养治疗无效, 或伴有严重的心肺等内科疾

患, 不能耐受开腹手术. 男性4例, 女性5例, 年龄46-88(平均年龄75)岁.

采用Olympus XQ-240型电子内镜. 所用支架为MTN型形状记忆钛镍合金肠道支架(南京微创), 直径20-22 mm, 长80-100 mm. 幽门支架的设计: 测量幽门及胃窦恶性狭窄的长度, 狭窄宽度, 支架口侧端设计为大漏斗型和碟盘型, 支架肛侧端设计为球状, 支架直径一般设计为20-22 mm, 支架长度为测量幽门及胃窦恶性狭窄的长度加30-40 mm. 支架推送器选用: (1)一次性使用腔道支架置入器MTN-CR-(4-6)/(1000-1400)-L(南京微创), 直径为4-8 mm, 长度为140 mm. 导丝为直径0.38 mm的萨氏扩张器配套带弹簧头的金属导丝. (2)经内镜直视下放置经钳道(可通过3.2 mm或4.2 mm的活检孔)的十二指肠支架推送器(南京微创), 直径2 cm气囊扩张器(南京微创).

1.2 方法 按常规胃镜检查进行术前准备, 患者取左侧卧位, 插胃镜, 先对食管胃进行常规检查. 我们采用两种放置方法:

1.2.1 经内镜直视下放置支架: 胃镜在进入胃窦部时可见幽门被肿瘤阻塞, 进入狭窄段, 内镜先端部通过狭窄部至十二指肠降部下段, 确定狭窄部的长度和其上缘距门齿的距离, 经活检钳道插入金属导丝, 保留金属导丝并防止滑出, 退出胃镜, 沿导丝插入带支架推送器尽可能接近胃窦恶性狭窄及幽门位置, 再从支架推送器下方插入胃镜并右旋转镜身90度, 同时推送支架推送器, 镜身的旋转使得镜身上方的支架推送器远离胃大弯侧沿小弯方向到达十二指肠降部上端, 确认支架在梗阻段的位置合适后直视下释放支架.

1.2.2 经内镜直视下放置经钳道的十二指肠支架: 经内镜钳道放置的十二指肠支架推送器, 由于是非治疗用的内镜, 十二指肠支架推送器不能经钳道通过, 我们将斑马导丝经内镜活检钳道插入至头端再插入到装置支架的十二指肠支架推送器的腔道穿出, 拉紧斑马导丝两端, 将装置支架的十二指肠支架推送器和内镜一起插入至十二指肠降部, 然后将斑马导丝拉出, 再退出内镜, 释放支架. 支架释放后如位置不佳可调整. 观察支架膨胀良好后退镜, 9例患者中1例患者狭窄部位镜身难以通过, 先予直径2 cm气囊扩张后沿导丝置入支架.

1.2.3 疗效判定: 患者治疗后症状消失分为5级: 0级为能进普食, I级为能进软食, II级为能进半流质, III级为能进流质, IV级为完全梗阻不能进

■ 研发前沿

内镜下放置金属支架解除胃癌所致胃出口恶性梗阻的报道较少, 且支架置入方法与常规的食管支架置入有所不同, 按照常规的食管支架置入方法往往难以成功.

■应用要点

本研究探讨内镜下放置金属支架治疗胃出口恶性梗阻的效果及技术技巧;同时,对胃出口恶性梗阻患者放置支架的适应症和相应并发症也十分关注,有利于临床医生参考和借鉴。

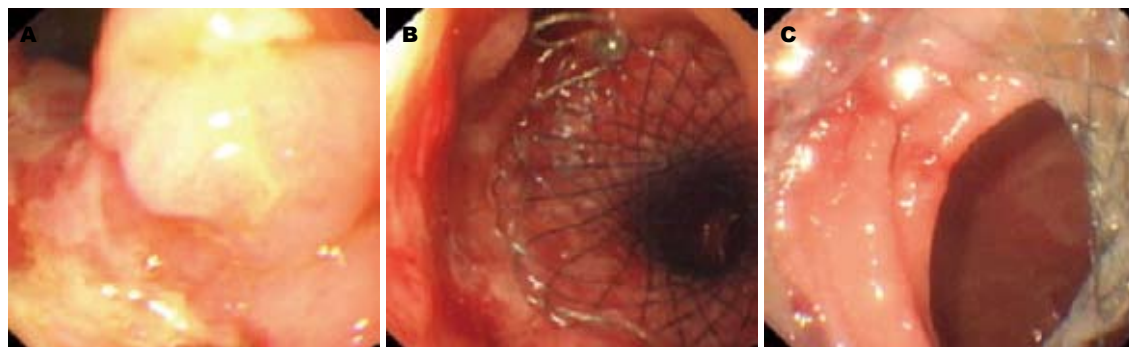


图1 胃出口恶性梗阻支架. A: 胃出口恶性梗阻; B: 胃出口恶性梗阻支架近端; C: 胃出口恶性梗阻支架远端.

食. 进展期胃癌合并幽门梗阻内镜治疗的疗效分为: (1)显效(CR): 症状消失达0级或I级, 疗效稳定超过1 mo; (2)有效(PR): 症状明显好转达II级, 可少于1 mo; (3)微效(MR): 症状好转达III级, 可持续4 wk; (4)无效(NR): 症状无好转或恶化, 评级为IV级, 病情恶化或死亡.

2 结果

9例患者中, 其中3例放置2 cm×10 cm支架, 6例放置2 cm×8 cm支架; 放置特制幽门支架2例, 放置十二指肠支架6例, 放置食管支架1例. 术后24-48 h摄片示支架膨胀约90%, 术后24 h恢复进食, 术后进食改善情况: I级1例, II级3例, III级4例, IV级1例; 疗效: 显效4例, 有效1例, 微效1例, 无效3例. 无穿孔及大出血等, 6例患者术后出现恶心、呕吐, 2-3 d后缓解, 4例患者出现上腹隐痛, 2例患者伴黑便, 1例患者出现肠道感染, 1例并发黄疸及电解质紊乱, 10 d后死亡. 2例患者恶心呕吐明显, 予胃肠减压, 每天引流液约1800 mL, 15 d后由于全身状况差及难以纠正的电解质紊乱家属放弃治疗, 1例胃窦癌胃体受浸润患者支架后恶心、呕吐, 15 d后予内镜下再次置入第2个支架. 随访3 mo, 无支架移位, 脱落及梗阻. 生存10-15 d者3例, 生存1-2 mo者2例, 已生存3 mo者4例, 平均通畅期为53.4 d(图1).

3 讨论

我国是胃癌高发国家之一, 由于经济因素及传统观念等的影响, 大部分患者出现临床症状方才就诊, 内镜检查发现的肿瘤大部分为进展期, 由于发生周围及远处转移, 绝大多数患者已失去手术机会, 部分老年患者患有严重的心、肺及糖尿病等疾病, 不能耐受手术打击, 只能应用各种保守疗法, 特别是术后复发转移的患者, 只能行空肠造瘘维持营养, 患者不能经口进食, 带引流管, 非常痛苦, 生活质量很差. 已有许多应

用记忆合金支架成功解除消化道梗阻的报道. Janusdhowski^[2]、Pinto^[3]、Nevitt *et al*^[4]首先报道了胃、十二指肠内支架置入. 国内首先是1998年李天晓 *et al*^[5]作了临床应用的报道. 而Scott-Mackie^[1]利用硬质导丝和特制的推送系统改良了传送系统, 从而提高了经口十二指肠内支架置入的成功率, 为胃肠道内远距离内支架置入的应用奠定了基础. 由于十二指肠经口距离远、弯道多, 同时胃囊又有屯积缓冲作用, 及至出现症状并引起重视时往往梗阻已较严重, 并使肠管走向变异度增大, 这使内支架安置困难. 此外, 支架放置困难与发送装置太短及患者的解剖位置变异有关, 已有报道对支架发送装置进行改进以克服这些困难. Feretis *et al*^[6]应用可固定延长管防止发送装置在胃内打圈. 近年来由韩国引进的用于血管的分体式内镜下直视支架放置(EMS)和其置放技术, 由于具有不少突出的优点, 如克服了裸支架和覆膜EMS的各自缺点, 细长柔顺性好的输送装置易于通过迂曲的胃肠道, 已被引用于胃、十二指肠恶性梗阻的治疗. 支架置入的方法: (1)经体外解剖开口或手术造瘘道口于X线引导下支架放置: 茅爱武 *et al*^[7]报道在X线监视下通过递送导管或胃镜经口送入超滑导丝并使之过狭窄、阻塞段; 经交换导管替换软头特硬导丝后由硬导丝引入输送器将支架送入狭窄段释放. 对完全阻塞使用胃镜仍不能将导丝送入者则在X线监视下经胃镜用微波或热极烧灼形成小通道后再送入导丝引入支架. 支架释放后根据狭窄段扩张情况酌情用球囊导管行内扩张或适当调整支架位置. (2)内镜下直视支架放置: 能准确了解病变部位及周围性质, 有利于正确选择支架的类型、尺寸, 遇到出血、移位、穿孔等并发症能及时发现和处理. 钟霞 *et al*^[8]报道在导引钢丝的头端系一根长约3 cm的黑线并打结, 将活检钳由内镜

的活检孔道插入并用活检钳夹住导丝头端的黑线结,使导丝贴附于内镜镜身与内镜同时插入并通过梗阻狭窄段,进入十二指肠,放置支架是将导丝贴附于内镜镜身与内镜同时插入狭窄部位,使得导丝轻易而准确地通过狭窄部位。我们经内镜下为9例胃出口恶性梗阻患者成功放置金属支架,有效改善患者进食情况,提高患者生活质量,总有效率为66.7%,本组6例胃窦癌及胃窦幽门浸润癌放置支架后效果明显,2例胃体窦幽门浸润癌及腹腔转移,大量腹水形成,放置支架后效果差,认为治疗疗效取决于支架位置是否合适以及病变的范围等。并摸索了一些内镜下放置幽门支架的方法^[9]:首先根据术前胃镜检查测量的门齿距胃出口恶性梗阻的距离选择支架及支架推送器型号,有厂家定做支架及足够长度的支架推送器。由于胃出口恶性梗阻距离门齿较远和管腔直径较大,支架置入时其活动性大,导丝和支架推送器常因无良好的支撑点而在胃内打圈,带导丝的支架推送器往往沿胃大弯到达胃的一定部位便无法继续推进,我们采用从支架推送器下方插入胃镜,当胃镜进入胃底体后向右旋转镜身90度,同时推送支架推送器,镜身的旋转使得镜身上方的支架推送器远离胃大弯侧沿小弯方向进入十二指肠。其中1例患者胃出口恶性梗阻严重,镜身无法通过,因此无法放置导引钢丝,我们采用直径2 cm的气囊扩张器先行扩张,后进镜,置入导丝,沿导丝成功置入支架。另外支架释放位置宁低勿高,偏低时可收紧支架缘的回收线上调支架,支架过高难以下调,往往需取出支架重新放置。本组9例病例支架置放皆1次成功,采用全程内镜下放置支架术,只要置管前定位准确,操作方法得当,可以不用在X线定位以及监视下进行,操作简便、直观、避免X线照射,所用时间缩短,减少患者痛苦。

另外,胃出口恶性梗阻患者放置支架的适应症和相应并发症^[10-16]也是值得我们关注的,我们通过对9例胃出口恶性梗阻患者放置支架观察,最常见的并发症是恶心、呕吐,上消化道出血,上腹疼痛等,本组患者支架术后6例出现恶心、呕吐,但一般2-3 d后就能自行缓解,其中2例胃体窦幽门浸润癌患者(1例85岁高龄,另1例腹腔转移,大量腹水形成)支架术后恶心、呕吐明显,予胃肠减压,每天引流液约1800 mL,认为可能由于胃癌病变广泛,胃肠功能紊乱,胃液产生过多,胃蠕动功能下降及失去幽门的防反流的作用,导致肠内容物逆流等有关。因此,我们

认为胃体窦幽门广泛浸润癌及有腹腔转移,腹水形成的患者不是放置支架的适应征,由于病例数有限有待进一步观察;1例支架术后出现腹痛和进行性黄疸,认为可能是支架远端位置过低,支架下缘压迫十二指肠乳头导致胆汁排泄受阻所致,应重新上调整支架位置,但该患者放弃治疗。因此,需要总结大量的临床资料,明确胃出口恶性梗阻支架置入的适应症,提高疗效,防止严重并发症的发生。

4 参考文献

- 1 Scott-Mackie P, Morgan R, Farrugia M, Glynos M, Adam A. The role of metallic stents in malignant duodenal obstruction. *Br J Radiol* 1997; 70: 252-255
- 2 Januschowski R. Stents for the palliative treatment of malignant gastric outlet stenoses. *Dtsch Med Wochenschr* 1997; 122: 578-582
- 3 Pinto IT. Malignant gastric and duodenal stenosis: palliation by peroral implantation of a self-expanding metallic stent. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1997; 20: 431-434
- 4 Nevitt AW, Vida F, Kozarek RA, Traverso LW, Raltz SL. Expandable metallic prostheses for malignant obstructions of gastric outlet and proximal small bowel. *Gastrointest Endosc* 1998; 47: 271-276
- 5 李天晓, 韩新巍, 马文章, 冯广森, 高建波, 李荫太, 李树新. 胃十二指肠良恶性狭窄的内支架治疗. *中华放射学杂志* 1998; 32: 658-660
- 6 Feretis C, Benakis P, Dimopoulos C, Georgopoulos K, Milas F, Manouras A, Apostolidis N. Palliation of malignant gastric outlet obstruction with self-expanding metal stents. *Endoscopy* 1996; 28: 225-228
- 7 茅爱武, 高中度, 杨仁杰, 江伟竣, 程英升, 范红, 蒋廷辉. 内支架治疗消化道恶性梗阻198例. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 369-370
- 8 钟霞, 于皆平. 内镜下置放记忆合金支架对胃、十二指肠恶性狭窄的姑息治疗. *中国内镜杂志* 2002; 8: 4-5
- 9 王志勇, 李丽, 孙丽伟, 吴建良, 马菊妹, 胡娇娣. 经内镜放置金属支架治疗胃出口恶性梗阻-附4例报道. *中华消化内镜杂志* 2007; 24: 389-391
- 10 徐高峰, 朱兴龙, 吉洪海, 殷为民, 徐龙湘. 胃流出道恶性梗阻的金属支架置入治疗. *实用医学影像杂志* 2007; 8: 48-50
- 11 张宁, 兰克涛, 孙吉芳, 江怡怡. 内镜下金属支架联合射频治疗恶性幽门梗阻的临床探讨. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 141-142
- 12 金珍成, 陈伟训. 金属支架在晚期胃癌消化道梗阻中的应用. *江西医药* 2007; 42: 291-292
- 13 尧登华, 李政文, 吕黄勇, 熊瑛. 金属支架在十二指肠恶性肿瘤致胃出口梗阻中的应用. *西南军医* 2007; 9: 63
- 14 陈伟敏, 张永根, 傅晶, 王敖荣. 金属内支架置入治疗晚期胃癌的消化道梗阻(附2例报告). *右江民族医学院学报* 1999; 5: 826
- 15 茅爱武, 高中度, 杨仁杰, 程英升, 尚克中, 肖湘生. 内支架置入结合动脉内化疗治疗十二指肠恶性梗阻. *中华放射学杂志* 1998; 32: 655-657
- 16 程英升, 茅爱武, 杨仁杰, 庄奇新, 尚克中. 胃肠道狭窄或梗阻内支架置入术后常见并发症及处理. *介入放射学杂志* 1998; 7: 17
- 17 陈福元, 范志宁. 经胃镜放置金属支架治疗上消化道恶性狭窄. *临床医学* 2003; 23: 30-31

■同行评价

本文结论较明确, 讨论条理分明, 参考文献恰当充分, 具有一定临床实用参考价值。

拉米夫定联合TACE治疗原发性肝癌合并肝硬化30例

李岩, 阚志超, 韩涛

■背景资料

TACE对原发性肝癌有较好的疗效, 但需要多次重复, 且对于肝功能C级的患者不适合进行。合并肝癌的肝硬化患者中, 乙型肝炎病毒如果仍然有复制, 常伴有明显的肝细胞坏死和炎症。对这部分患者进行有效的抗病毒治疗可以降低肝组织的炎症坏死, 改善肝功能, 延长生存期。

李岩, 阚志超, 韩涛, 天津市第三中心医院肝内科 天津市 300170

作者贡献分布: 李岩与阚志超对此文所作贡献均等; 此课题设计由李岩, 阚志超及韩涛完成; 研究过程由李岩操作完成; 本论文写作由李岩与韩涛完成。

通讯作者: 李岩, 300170, 天津市河东区津塘公路83号, 天津市第三中心医院肝内科。_li_yan629@yahoo.com.cn

电话: 022-84112181

收稿日期: 2008-03-16 修回日期: 2008-04-30

Lamivudine therapy after transcatheter arterial chemoembolization for patients with Hepatocellular carcinoma complicated by hepatitis B virus: an analysis of 30 cases

Yan Li, Zhi-Chao Kan, Tao Han

Yan Li, Zhi-Chao Kan, Tao Han, Department of Hepatology, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China
Correspondence to: Yan Li, Department of Hepatology, Tianjin Third Central Hospital, 83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China. _li_yan629@yahoo.com.cn
Received: 2008-03-16 Revised: 2008-04-30

Abstract

AIM: To evaluate therapeutic effects and prognosis of lamivudine therapy after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) complicated by hepatitis B virus (HBV).

METHODS: Sixty patients with advanced HCC complicated by HBV and cirrhosis were randomly divided into 2 groups: TACE + lamivudine treatment group ($n = 30$) and TACE control group ($n = 30$). HBV-DNA, Child-pugh score and 2-year survival rate were measured.

RESULTS: After one or two years' treatment, Rate of HBV-DNA of treatment group was significantly lower than that of the control group ($\chi^2 = 9.788, P = 0.002, \chi^2 = 3.962, P = 0.047$). Child-pugh scores of treatment group were significantly lower than those of the control group (7.13 ± 1.30 vs $8.44 \pm 1.79, 7.40 \pm 1.35$ vs 9.09 ± 1.76 respectively, both $P < 0.05$). 1-year and 2-year

survival rates were 66.67% and 36.67% respectively ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Lamivudine therapy after TACE can inhibit duplication of HBV, protect liver functions and improve survival rate in patients with HCC complicated by HBV.

Key Words: Lamivudine therapy; Hepatocellular carcinoma; Hepatitis B virus; Transcatheter arterial chemoembolization

Li Y, Kan ZC, Han T. Lamivudine therapy after transcatheter arterial chemoembolization for patients with Hepatocellular carcinoma complicated by hepatitis B virus: an analysis of 30 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1700-1703

摘要

目的: 探讨拉米夫定联合肝动脉化疗栓塞 (TACE) 治疗HBV DNA阳性合并肝硬化的肝细胞癌(HCC)患者的疗效和预后。

方法: 将60例HBV DNA阳性合并肝硬化中、晚期HCC患者随机分为TACE+拉米夫定治疗组(30例), 单纯TACE对照组(30例), 观察比较两组患者HBV DNA定量、Child-pugh积分及2年生存率。

结果: 治疗1年及2年后, 治疗组HBV DNA阳性率均显著低于对照组($\chi^2 = 9.788, P = 0.002, \chi^2 = 3.962, P = 0.047$), 肝功能Child-pugh积分治疗组明显小于对照组 (7.13 ± 1.30 vs $8.44 \pm 1.79, 7.40 \pm 1.35$ vs 9.09 ± 1.76 , 均 $P < 0.05$)。治疗组和TACE组2年生存率分别为66.67%和36.67% ($P < 0.05$)。

结论: TACE联合应用拉米夫定治疗HBV DNA阳性合并肝硬化的HCC患者, 可抑制乙型肝炎病毒复制, 保护患者肝功能, 提高患者生存率。

关键词: 拉米夫定; 肝细胞癌; 乙肝病毒; 经动脉化疗栓塞术

李岩, 阚志超, 韩涛. 拉米夫定联合TACE治疗原发性肝癌合并肝

■同行评议者

刘彬彬, 副研究员, 复旦大学附属中山医院、复旦大学肝癌研究所; 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

硬化30例. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1700-1703
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1700.asp>

0 引言

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤, 多伴有慢性肝炎病毒的感染, 其中以乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染最为多见, 早期肝癌一般没有临床症状, 只能通过查体发现, 一旦出现症状多为晚期, 失去手术机会. 而且多因为肝硬化基础肝功能储备不佳, 影响了进一步的治疗. 拉米夫定是核苷类似物, 能有效抑制病毒复制, 从而改善肝功能, 为肝癌的栓塞化疗创造良好的条件, 延长生存时间.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-05/2007-05于我院住院的原发性肝癌伴有乙型肝炎肝硬化且HBV DNA阳性的住院患者60例, 排除其他重叠性病毒感染. 年龄从30-70(平均年龄46)岁. 肝癌诊断符合肝癌诊断标准. 其中Child-pugh A级12名, Child-pugh B级48名.

1.2 方法

1.2.1 分组及给药: 按性别、年龄及Child-pugh分级、肿瘤CtIp分期匹配原则将患者分成对照组和治疗组, 对照组给予常规TACE治疗后, 以后根据肝功能条件每1-2月, 重复TACE治疗, 同时给以保肝、对症、支持治疗; 治疗组除上述治疗外, 给予拉米夫定100 mg/d, 疗程2年. 观察治疗前后Child-pugh评分、HBV DNA定量和病毒变异及生存率等情况.

1.2.2 TACE治疗: 采用Sedinger技术经皮穿刺股动脉插管至肝固有动脉, 造影成功, 确立肿瘤供血动脉, 给以丝裂霉素(MMC)10 mg/m², 氟尿嘧啶脱氧核苷(FUDR)1000 mg/m², 顺铂40 mg/m²行化疗术, 栓塞剂为超液化碘化油, 肿瘤体积较大时加用明胶海绵颗粒混合注入, 间隔4-6 wk行第2次插管化学栓塞, 以后根据肝功能及肿瘤情况重复进行TACE治疗.

1.2.3 检测方法: 肝功能检测采用TBA120全自动生化分析仪和配套试剂检测; 血清HBV DNA的检测采用实时荧光定量PCR方法检测, 试剂为荧光定量PCR试剂, 荧光定量PCR仪为ABI7000; YMDD突变检测采用基因芯片法, 试剂盒由天津市第三中心医院肝病研究所提供.

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件进行计

量资料的 t 检验和计数资料的卡方检验.

2 结果

2.1 临床转归 治疗结束时, 在60例患者中死亡29例. 对照组19例, 5例死于上消化道出血, 4例死于肝癌破裂出血, 4例死于肝肾综合征, 6例死于肝功能衰竭; 治疗组10例, 4例死于上消化道出血, 3例死于原发性肝癌肺转移, 2例死于肝功能衰竭, 1例死于肝性脑病.

2.2 两组患者治疗前后肝功能比较 在治疗前, 两组患者Child-pugh评分无显著性差异; 治疗后1年和2年时, 治疗组肝功能Child-pugh评分明显小于对照组有显著性差异($P<0.05$).

拉米夫定组治疗1年和2年后, 患者肝功能稳定, Child-pugh评分与治疗前比较无明显变化($P>0.05$). 而对照组中1年时, Child-pugh评分与治疗前比较无明显变化($P>0.05$); 但2年后, Child-pugh评分与治疗前比较明显变大($P<0.05$), 提示肝功能恶化(表1).

2.3 带瘤生存时间 1年生存率治疗组为80%, 对照组为60%, 但无统计学意义; 2年生存率治疗组为66.7%, 对照组为36.7%, 两组生存率比较差异有统计学意义($P<0.05$, 表2).

2.4 治疗前后病毒复制指标的比较 治疗前治疗组HBV DNA与对照组比较无显著性差异, 而治疗后1年和2年, 治疗组HBV DNA均显著低于对照组及治疗前(均 $P<0.01$, 表3).

2.5 YMDD突变及其对患者转归的影响 治疗组患者治疗1年时YMDD突变率分别为12.5%(3/24). 其中均为YIDD突变, 均出现ALT, TBIL一过性升高, 继续服用拉米夫定加阿德福韦酯治疗后, 2例病情稳定, 另外1例患者出现肝功能衰竭, 肝昏迷消化道出血死亡. 2年时YMDD突变率为25%(5/20), 其中3例为YIDD突变, 另外2例为YVDD突变, 出现肝功能恶化, 经改用恩替卡韦1 mg治疗后, 肝功能逐渐好转.

3 讨论

原发性肝癌在我国是常见恶性肿瘤之一, 在我国肿瘤发病率排在前列. 在肝癌病因学方面, 目前倾向于多因素、多步骤发生且各因素间有相互作用的观点. 其中在病毒病因中, 国内外研究结果一致认为, HBV持续感染是肝癌最重要的病因之一, 在发展中国家尤为突出^[1-2]. WHO肝癌预防会议指出: HBV与肝癌相关性高达80%.

原发性肝癌其恶性程度高, 死亡率在消化

■研究前沿

失代偿期乙型肝炎硬化的患者, 核苷类似物类抗病毒药物可明显改善疾病的预后, 并且降低肝癌的发生率, 但是长期使用该类药物后出现的病毒耐药是值得注意及进一步研究的课题.

■相关报道

Bolukbas *et al* 研究发现拉米夫定可抑制HBV DNA聚合酶活性,从而阻止病毒复制,减轻肝脏组织炎症,进而实现肝功能的持续稳定。

表 1 两组肝癌患者Child积分变化

分组	治疗前	1年	2年
治疗组	7.83 ± 1.42	7.13 ± 1.30 ^c	7.40 ± 1.35 ^c
对照组	7.77 ± 1.48	8.44 ± 1.79	9.09 ± 1.76 ^a

^a*P* < 0.05 vs 治疗前; ^c*P* < 0.05 vs 对照组。

表 2 两组肝癌患者生存率比较(% , *n* = 30)

分组	1年	2年
治疗组	80(24/30)	66.7(20/30)
对照组	60(18/30)	36.7(11/30)
χ^2 值	2.86	5.41
<i>P</i>	0.09	0.02

系统恶性肿瘤中居第3位。手术切除是本病的首选治疗方法,但大多数患者确诊时已失去手术切除的最佳治疗时机,而且切除后的复发率高,内、外科医师此时的注意力大多忽视了抗HBV治疗。由于肝癌、肝硬化、慢性乙型肝炎患者存在细胞免疫功能受抑现象,这使HBV在体内长期存在,难以清除,有利于肝癌的发生和发展^[3]。

TACE对原发性肝癌有较好的疗效,但TACE属于姑息性治疗方法,需要多次重复,且对于肝功能C级的患者不适合进行。肝癌一旦出现症状多为晚期,多合并肝硬化,常常出现转氨酶升高、黄疸、腹水、肝性脑病、上消化道出血等并发症,预后很差。失代偿性肝硬化患者中,HBV如果仍然有复制,常伴有明显的肝细胞坏死和炎症。对这部分患者进行有效的抗病毒治疗可以降低肝组织的炎症坏死,使病情得到一定的改善。

拉米夫定作为核苷类抗病毒药物,主要抑制HBV DNA聚合酶活性,从而阻止病毒复制,减轻肝脏组织炎症,进而实现肝功能的持续稳定^[4]。而长期口服拉米夫定降低体内HBV载量,减少HBV-DNA在肝细胞核内的整合机会,可降低HBsAg 阳性原发性肝癌的发生率^[5]。我们的研究发现,对于原发性肝癌同时HBV DNA阳性的患者,加用拉米夫定治疗后,1年的HBV DNA阴转率为87.5%,2年HBV DNA阴转率为75%,明显高于未用组。

已有几项开放的对照或非对照临床研究表明,在HBV DNA阴转和ALT改善方面,肝硬化患者应用拉米夫定可以获得与慢性乙型肝炎患者

表 3 治疗前后HBV DNA阳性率变化

分组	治疗组	对照组	χ^2 值	<i>P</i>
治疗前	30/30	30/30		
1年	3/24	17/18	9.788	0.002
2年	5/20	10/11	3.962	0.047

同样的效果,并且是安全的,显著延缓疾病的进展,大多数患者接受拉米夫定治疗1年之后会出现肝脏组织学改善,并降低失代偿和肝癌的发生^[6-8]。在我们的研究中,1年和2年时治疗组肝功能积分明显好于对照组,生存率也是明显高于对照组。

TACE治疗需要重复多次进行,且对肝功能有较高要求,肝功能好的患者,一般营养条件较好,TACE后恢复快,能耐受多次治疗,故肝癌控制好,生存时间长,并发症少。对于原发性肝癌的治疗,我们发现除了针对肿瘤的措施以外,保持肝功能稳定也是十分重要的。

拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的主要问题是HBV聚合酶基因区YMDD的变异。一般慢性乙型肝炎患者在拉米夫定治疗后1、2和3年的YMDD变异率分别为17.0%、39.0%和57.0%,在失代偿性乙型肝炎肝硬化患者中1年和2年的变异率为11.0%和27.2%^[9-11]。在本研究中我们观察到1年和2年变异率分别为12.5%和25%,与上述资料近似。尽管出现了变异,但是很多患者还是可以保持用拉米夫定带来的肝功能的改善^[12-13]。同时,也有部分患者因为病毒变异后出现肝功能失代偿甚至死亡^[14-15]。出现病毒变异后,经过加用阿德福韦或换用恩替卡韦治疗后,大部分患者获得了临时的肝功能好转,延长了患者生命。根据以上研究结果我们认为,对于乙型肝炎肝硬化合并原发性肝癌的患者,如果HBV呈阳性结果,使用拉米夫定长期治疗对患者是有好处的,但需要监测HBV的变化,一旦出现病毒变异,应尽早换药或联合用药以防肝功能衰竭。

4 参考文献

- Mahmood S, Niiyama G, Kamei A, Izumi A, Nakata K, Ikeda H, Suehiro M, Kawanaka M, Togawa K, Yamada G. Influence of viral load and genotype in the progression of Hepatitis B-associated liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; 25: 220-225
- Wands JR. Prevention of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2004; 351: 1567-1570
- 孔丽, 姚树坤, 刘金星, 王娜. 原发性肝癌患者细胞免疫功能变化及其与转归的关系. *中华肝脏病杂志*

- 2005; 13: 194-197
- 4 Bolukbas C, Bolukbas FF, Kendir T, Akbayir N, Ince AT, Abut E, Horoz M, Dalay AR, Sokmen MH, Ovunc O. The effectiveness of lamivudine treatment in cirrhotic patients with HBV precore mutations: a prospective, open-label study. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1196-1202
 - 5 Liaw YF. Prevention and surveillance of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25 Suppl 1: 40-47
 - 6 Kapoor D, Gupta RC, Wakil SM, Kazim SN, Kaul R, Agarwal SR, Raisuddin S, Hasnain SE, Sarin SK. Beneficial effects of lamivudine in hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33: 308-312
 - 7 Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, Tanwandee T, Tao QM, Shue K, Keene ON, Dixon JS, Gray DF, Sabbat J. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004; 351: 1521-1531
 - 8 Hann HW, Fontana RJ, Wright T, Everson G, Baker A, Schiff ER, Riely C, Anschutz G, Gardner SD, Brown N, Griffiths D. A United States compassionate use study of lamivudine treatment in nontransplantation candidates with decompensated hepatitis B virus-related cirrhosis. *Liver Transpl* 2003; 9: 49-56
 - 9 Perrillo RP, Wright T, Rakela J, Levy G, Schiff E, Gish R, Martin P, Dienstag J, Adams P, Dickson R, Anschutz G, Bell S, Condreay L, Brown N. A multicenter United States-Canadian trial to assess lamivudine monotherapy before and after liver transplantation for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 33: 424-432
 - 10 Fontana RJ, Keefe EB, Carey W, Fried M, Reddy R, Kowdley KV, Soldevila-Pico C, McClure LA, Lok AS. Effect of lamivudine treatment on survival of 309 North American patients awaiting liver transplantation for chronic hepatitis B. *Liver Transpl* 2002; 8: 433-439
 - 11 Takamura M, Ichida T, Ohkoshi S, Tsubata S, Osaki A, Aoyagi T, Nomoto M, Uehara K, Terada H, Aoyagi Y. Decompensated lamivudine-resistant hepatitis B virus-related cirrhosis treated successfully with adefovir dipivoxil allowing surgery for hepatocellular carcinoma. *Intern Med* 2007; 46: 367-371
 - 12 Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, Brown N, Woessner M, Boehme R, Condreay L. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 687-696
 - 13 Nakanishi S, Michitaka K, Miyake T, Hidaka S, Yoshino I, Konishi I, Iuchi H, Horiike N, Onji M. Decompensated hepatitis B virus-related cirrhosis successfully treated with lamivudine allowing surgery for hepatocellular carcinoma. *Intern Med* 2003; 42: 416-420
 - 14 Wang JH, Lu SN, Lee CM, Lee JF, Chou YP. Fatal hepatic failure after emergence of the hepatitis B virus mutant during lamivudine therapy in a patient with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 366-369
 - 15 Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J, Brosgart CL. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003; 348: 800-807

■同行评价

本研究验证了拉米夫定联合TACE治疗原发性肝癌合并肝硬化的疗效, 分析及评价指标均比较合理, 具有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志作者署名要求

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 2008-05-28)

黄疸婴儿人巨细胞病毒的检测

马艳萍, 吉耀华, 刘庆, 王继东, 何蓉, 齐莹, 孙峥嵘, 阮强

■背景资料

人巨细胞病毒可造成感染患儿的多器官、多系统受累。黄疸是消化系统受累的最常见的临床表现, 抗病毒治疗可以有效地改善病情。因此检测黄疸患儿的人巨细胞病毒, 对于临床治疗具有重要意义。

马艳萍, 吉耀华, 刘庆, 王继东, 何蓉, 齐莹, 孙峥嵘, 阮强, 中国医科大学附属盛京医院病毒研究室 辽宁省沈阳市 110004
作者贡献分布: 本研究由马艳萍, 吉耀华, 刘庆及王继东操作完成; 课题设计和论文写作由马艳萍, 齐莹, 孙峥嵘, 何蓉及阮强完成。
通讯作者: 马艳萍 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院病毒研究室。

yanping_ma@yahoo.com.cn

电话: 024-83956560 传真: 024-23892617

收稿日期: 2008-01-23 修回日期: 2008-03-29

Detection of human cytomegalo virus in infants with jaundice

Yan-Ping Ma, Yao-Hua Ji, Qing Liu, Ji-Dong Wang, Rong He, Ying Qi, Zheng-Rong Sun, Qiang Ruan

Yan-Ping Ma, Yao-Hua Ji, Qing Liu, Ji-Dong Wang, Rong He, Ying Qi, Zheng-Rong Sun, Qiang Ruan, Virology Laboratory, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yan-Ping Ma, Virology Laboratory, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. yanping_ma@yahoo.com.cn

Received: 2008-01-23 Revised: 2008-03-29

Abstract

AIM: To investigate the diagnosis of human cytomegalo virus (HCMV) infection in infants with jaundice.

METHODS: Urine specimens were collected from 248 infants with jaundice and 50 control infants without jaundice to detect HCMV DNA using fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). Blood samples were collected from infants with jaundice to detect HCMV IgM antibody using chemi-luminescent immunoassay (CLIA). Among HCMV DNA positive infants, quantitative levels of HCMV DNA were compared between HCMV IgM positive group and the negative group.

RESULTS: The FQ-PCR positive rate of the infants with jaundice (41.5%) was significantly higher than that of control infants (2.0%) ($P < 0.01$). CLIA positive rate of the infants with jaundice was 19.8%. HCMV DNA of the HCMV IgM positive group were significantly higher than

that of the negative group ($t = 5.51, P < 0.01$).

CONCLUSION: FQ-PCR is a sensitive and effective test for early diagnosis of HCMV infection in infants.

Key Words: Infants; Jaundice; Fluorescent quantitative polymerase chain reaction; Chemi-luminescent immunoassay; Human cytomegalovirus

Ma YP, Ji YH, Liu Q, Wang JD, He R, Qi Y, Sun ZR, Ruan Q. Detection of human cytomegalo virus in infants with jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1704-1707

摘要

目的: 探讨黄疸婴儿HCMV感染的诊断。

方法: FQ-PCR检测248例黄疸婴儿和50例对照组患儿尿液中HCMV DNA, 化学发光免疫分析法(CLIA)检测黄疸婴儿血清HCMV IgM抗体, 在尿液HCMV DNA阳性黄疸婴儿中, 比较血清HCMV IgM抗体阳性与阴性组HCMV DNA拷贝数的差异。

结果: 黄疸婴儿尿液HCMV DNA的阳性率为41.5%, 对照组患儿阳性率为2.0%, 两者有统计学意义($P < 0.01$)。CLIA检测黄疸婴儿血清HCMV IgM抗体的阳性率为19.8%。在尿液HCMV DNA检测阳性的黄疸患婴儿中, IgM抗体阳性组的尿液HCMV DNA拷贝数显著高于阴性组($t = 5.51, P < 0.01$)。

结论: FQ-PCR检测尿液HCMV DNA是早期诊断婴儿HCMV感染的敏感有效的方法。

关键词: 婴儿; 黄疸; 荧光定量PCR; 化学发光免疫分析法; 人巨细胞病毒

马艳萍, 吉耀华, 刘庆, 王继东, 何蓉, 齐莹, 孙峥嵘, 阮强. 黄疸婴儿人巨细胞病毒的检测. *世界华人消化杂志* 2008; 16(15): 1704-1707

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1704.asp>

0 引言

婴儿黄疸根据发生的机制和部位分为肝前性

■同行评议者

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)

黄疸、肝细胞性黄疸和肝后性黄疸。后两者主要是肝细胞和肝内外胆管的病变, 造成直接胆红素或间接胆红素增高^[1]。临床上多种因素引起婴儿黄疸, 研究表明, 人巨细胞病毒(human cytomegalo virus, HCMV)可侵犯肝细胞和肝内外胆管系统, 是婴儿黄疸的重要病原之一^[2-4], 因此早期诊断黄疸患儿是否为HCMV感染, 是正确实施治疗, 减轻黄疸症状的前提。本研究采用荧光定量PCR方法检测婴儿尿液HCMV DNA含量, 结合血清HCMV IgM抗体检测, 探讨黄疸婴儿HCMV感染的诊断。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-07/2007-06中国医科大学附属盛京医院住院的黄疸患儿248例, 50例来自小儿外科无黄疸症状的住院患儿作为对照, 所有患儿年龄为3 wk-12 mo。HCMV DNA荧光定量试剂盒为中山医科大学达安基因诊断公司产品, 包括DNA提取液, 单人单管反应液, HCMV标准阳性模板, 阴性对照。荧光定量检测仪(PE-7700)为美国PE公司生产。化学发光免疫分析法(CLIA)试剂为意大利Sorin公司原装进口。意大利Sorin公司生产Liaison化学发光免疫分析仪。

1.2 方法

1.2.1 标本采集: 在知情同意的情况下, 采集所有被检验者静脉血2 mL, 离心分离血清, 4℃保存, 24 h内进行HCMV IgM检测。同时, 留取所有被检验者尿液5-10 mL, -20℃保存, 24 h内进行HCMV DNA检测。

1.2.2 化学发光免疫分析法: 异鲁米诺-抗体复合物与结合在固相载体上的HCMV IgM反应。加入启动试剂, 引发化学发光反应, 产生光信号。异鲁米诺-抗体数量和光单位成正比。通过计算, 得到校准品、样品或质控品中HCMV IgM的浓度。

1.2.3 FQ-PCR测定: 选用HCMV AD169株基因组中编码即刻早期转录调节蛋白的IE1基因的一段高度保守的非编码区为扩增靶序列, 长度为86 bp。引物: P1 5'TGGGCTAACTATGCAGAGCA 3', P2 5'AGCCATTGGTGGTCTTAGGG3'。在PCR反应中, 利用Taq酶5'-3'外切酶活性将荧光探针切断, 通过荧光值的变化, 利用阳性标准品制成的标准曲线进行定量。反应体系50 μL, 同时设置不加模板的阴性对照。扩增条件: 93℃ 2 min, 93℃ 45 s, 55℃ 1 min, 10个循环; 93℃ 30 s, 55℃ 45 s, 30个循环。计算机对整个PCR反应过程中荧光量进行实时检测, 当反应结束时自动绘制出每个被检对象的PCR扩增曲线, 通过与标

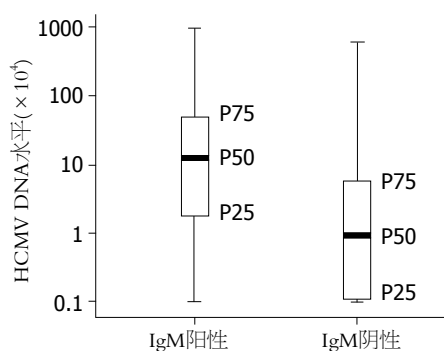


图1 两组尿液中HCMV DNA水平。

准品的扩增曲线比较进行定量。

统计学处理 SPSS13.0软件进行 χ^2 检验, 偏态分布中位数、四分位数比较和正态分布 t 检验, P 值取0.01。

2 结果

248例患儿尿液中HCMV DNA定量检测阳性103例, 阳性率为41.5%。50例对照组患儿尿液中HCMV DNA定量检测阳性仅有1例, 阳性率为2.0%。两组患儿阳性率比较具有显著差异($\chi^2 = 30.51, P < 0.01$)。248例患儿血清中HCMV IgM抗体检测阳性49例, 阳性率为19.8%。HCMV IgM抗体检测阳性患儿中有47例尿液HCMV DNA定量检测阳性, 2例阴性。根据血清HCMV IgM抗体结果, 将FQ-PCR方法检测尿液HCMV DNA阳性的103例患儿分为IgM阳性组与阴性组。IgM阳性组患儿47例, 尿液HCMV DNA拷贝数为 1.00×10^3 - 95.78×10^6 , 中位数(P50)为 1.23×10^5 , 下四分位数(P25)为 1.72×10^4 , 上四分位数(P75)为 5.41×10^5 , IgM阴性组患儿56例, 尿液HCMV DNA拷贝数为 1.00×10^3 - 6.04×10^6 , 中位数P50为 9.43×10^4 , P25为 1.11×10^3 , P75为 5.94×10^4 。与IgM阴性组比较, IgM阳性组患儿尿液HCMV DNA拷贝数分布在较高水平(图1)。两组尿液HCMV DNA拷贝数对数值 $\log_{10}X$ 呈正态分布, IgM阳性组均值为 5.04 ± 1.01 , IgM阴性组均值为 4.23 ± 0.99 。两组对数值均值比较具有显著差异($t = 5.51, P < 0.01$, 表1)。

3 讨论

本研究采用FQ-PCR法检测黄疸婴儿尿液中的HCMV DNA。结果在248例黄疸婴儿中103为阳性, 阳性率达到41.5%。而来自对照组患儿的阳性率仅为2%, 两者比较具有非常显著的统计学差异($P < 0.001$), 从而进一步支持CMV感染是婴儿黄疸的重要病因之一。

■ 研发前沿

人巨细胞病毒在感染患儿中的致病机制一直是该研究领域的热点。病毒的基因及编码产物的功能以及与致病性的关系尚在研究当中。

■创新盘点

本文比较了荧光定量PCR方法检测黄疸患儿活动性巨细胞病毒感染和非活动性感染尿液中的病毒拷贝数,就荧光定量PCR方法对黄疸患儿巨细胞病毒感染的检测进行了较深入的分析评价。

表 1 IgM阳性组与IgM阴性组尿液HCMV DNA拷贝数对数值比较

分组	n	均值	标准差	标准误	最小值	最大值
IgM阳性组	47	5.04	1.03	0.12	3.00	6.99
IgM阴性组	56	4.23	0.99	0.11	3.00	6.79

由于HCMV感染后在体内长期存在,具有潜伏和再活化的生物学特性^[5].因此区分HCMV潜伏感染与活化感染临床治疗和判断预后至关重要.目前我国主要以间接ELISA法检测血清HCMV IgM抗体为实验室诊断指标^[6-7].IgM阳性提示近期有HCMV活动性感染或潜伏的病毒可能被激活.本研究采用的CLIA方法检测血清HCMV IgM抗体,阳性率为19.8%,敏感性高于ELISA法^[8].但是,HCMV抗体的产生有一段“窗口期”,由于IgM抗体产生本身具有滞后性,当患者被病原体感染约2 wk后IgM抗体才能达到被检测到的水平,而依据患者机体免疫力的不同,此时病原体有可能已被机体免疫反应抑制而处于潜伏感染状态.另一方面,有些患者,尤其是部分婴幼儿,免疫系统发育尚不完善,不能产生被测数量的特异性IgM抗体或滞后产生IgM抗体,易造成假阴性结果.因此,不能单独依靠血清IgM抗体检测判断是否存在HCMV活动性感染.

FQ-PCR是目前最为准确和快速的微生物定量方法^[9-10],能更早检测到病毒感染,甚至比出现临床症状的时间提前3-10 d^[11].有研究采用定量PCR技术检测外周血细胞和脑脊液中HCMV DNA含量,能够从HCMV DNA水平的多少来鉴别潜伏性感染和活动性感染,对诊断活动性HCMV感染及潜伏性HCMV感染有确诊意义^[12-15].而HCMV感染后,局部排毒量与机体内病毒量密切相关,检测尿中HCMV量可很好反映机体内HCMV病毒量^[11-13],而且取材方便,无创,易为家长和小儿接受.在本研究,49例患儿HCMV IgM检测阳性,表明存在HCMV活动性感染,期中47例患儿FQ-PCR检测尿HCMV DNA为阳性,说明FQ-PCR检测对于HCMV活动性感染的诊断具有很好的敏感性;2例阴性可能与HCMV尿液间歇排毒有关,也可能感染已被抑制,而抗体消除滞后.有56例患儿尿液HCMV DNA检测阳性,而血清HCMV IgM抗体检测阴性.其中有3例患儿2 wk后复查IgM抗体结果转为阳性.由于IgM阴性组存在较低水平的HCMV DNA,排除个别免疫应答异常者外,这些患者中大多数尚处于感染早期,说明FQ-PCR检测对于

HCMV感染的早期诊断和HCMV性疾病预防具有重要意义.两组患儿尿HCMV DNA拷贝数对数值呈正态分布,对数值的均值比较具有统计学意义,IgM阳性患儿显著高于IgM阴性患儿,符合活动性HCMV感染者的病毒量显著高于非活动性感染者这一事实.但是,由于两组患儿尿HCMV DNA拷贝数重叠范围很大,尚不能确定明确的DNA拷贝数界限来预测HCMV活动性感染.本研究结果显示血清HCMV IgM阳性患儿中75%的患儿大于 1.72×10^4 ,血清HCMV IgM检测阴性患儿中75%的患儿小于 5.94×10^4 ,IgM阳性患儿尿HCMV DNA拷贝数分布在较高水平.因此,FQ-PCR检测尿液中HCMV DNA量对于判断是否为HCMV活动性感染能够具有一定意义.对于血清HCMV IgM抗体检测阴性而尿HCMV DNA拷贝数较高的黄疸患儿,应间隔一段时间重复检测血清HCMV IgM抗体,或根据临床症状判断是否存在HCMV活动性感染.

4 参考文献

- 1 闻德亮. 婴儿黄疸的临床诊断与治疗. 中国临床医生 2000; 5: 6-7
- 2 Munro SC, Trincado D, Hall B, Rawlinson WD. Symptomatic infant characteristics of congenital cytomegalovirus disease in Australia. *J Paediatr Child Health* 2005; 41: 449-452
- 3 王宝香, 朱润庆. 婴儿肝炎综合征、胆道闭锁、胆总管囊肿与巨细胞病毒感染的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1745-1747
- 4 Leung AK, Sauve RS, Davies HD. Congenital cytomegalovirus infection. *J Natl Med Assoc* 2003; 95: 213-218
- 5 刘薇, 蒋玉红, 王亚秋, 李伟. 血清总胆汁酸在婴幼儿巨细胞病毒肝炎中的动态变化及临床意义. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2563-2565
- 6 夏吉荣, 王富兰, 祝继华. 人巨细胞病毒活动性感染的分析. 重庆医科大学学报 2003; 28: 195-197
- 7 Zhang C, Shen K, Jiang Z, He X. Early diagnosis and monitoring of active HCMV infection in children with systemic lupus erythematosus. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 1309-1312
- 8 吉耀华, 王岳平, 阮强, 王继东, 刘庆, 陈淑荣, 孙峥嵘, 何蓉, 齐莹, 马艳萍. CLIA和ELISA检测婴儿肝病综合征患者人巨细胞病毒特异性IgM抗体的比较. 临床儿科杂志 2007; 25: 532-536
- 9 Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 190-212
- 10 Gokahmetoglu S, Deniz E. Comparison of real-time, and qualitative polymerase chain reaction assays in detection of cytomegalovirus DNA

- in clinical specimens. *Saudi Med J* 2007; 28: 1658-1661
- 11 Risatti GR, Callahan JD, Nelson WM, Borca MV. Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 500-505
- 12 Wildemann B, Haas J, Lynen N, Stinge K, Storch-Hagenlocher B. Diagnosis of cytomegalovirus encephalitis in patients with AIDS by quantitation of cytomegalovirus genomes in cells of cerebrospinal fluid. *Neurology* 1998; 50: 693-697
- 13 Schäfer P, Laufs R. Experience with quantitative PCR for the management of HCMV disease. *Intervirology* 1996; 39: 204-212
- 14 Ferreira-Gonzalez A, Fisher RA, Weymouth LA, Langley MR, Wolfe L, Wilkinson DS, Garrett CT. Clinical utility of a quantitative polymerase chain reaction for diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. *Transplantation* 1999; 68: 991-996
- 15 Fox JC, Griffiths PD, Emery VC. Quantification of human cytomegalovirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 9): 2405-2408

■同行评价

本文材料组织较好, 语言流畅, 统计合理、规范, 但学术价值一般。

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tl/2或T_{1/2}, Vmax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*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *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}, *V*_d, *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 2008-05-28)

横结肠淋巴瘤误诊1例

代时莉, 王敏, 杨秦南, 万群

■背景资料

恶性淋巴瘤起源于淋巴结和淋巴组织, 而淋巴结和淋巴组织遍布全身, 且与血液系统相互沟通, 故淋巴瘤可发生在身体任何部位, 其中, 淋巴结、扁桃体、脾及骨髓是最易受累的部位。由于每个患者的病变部位和范围不同, 故淋巴瘤的临床表现具有多样性。恶性淋巴瘤的发病率, 在西方国家占癌肿的第8位, 在我国占恶性肿瘤的第9位(男性)和第11位(女性), 其中非何奇金淋巴瘤(NHL)的发病率每年以3%的速度增长, 并且有逐年增加的趋势。

代时莉, 王敏, 杨秦南, 万群, 贵州省黔西南州人民医院内一科 贵州省黔西南州 562400

作者贡献分布: 代时莉、王敏负责诊治, 组织会诊; 代时莉、王敏、杨秦南、万群共同收集资料; 写作由代时莉完成。

通讯作者: 代时莉, 562400, 贵州省黔西南州人民医院内一科。daishili2005@126.com

电话: 0859-3299152

收稿日期: 2007-12-27 修回日期: 2008-03-04

One-case analysis of misdiagnosis for transverse colon lymphoma

Shi-Li Dai, Min Wang, Qin-Nan Yang, Qun Wan

Shi-Li Dai, Min Wang, Qin-Nan Yang, Qun Wan, the First Department of Internal Medicine, People's Hospital, Qianxi'nan 562400, Guizhou Province, China

Correspondence to: Shi-Li Dai, the First Department of Internal Medicine, People's Hospital, Qianxi'nan 562400, Guizhou Province, China. daishili2005@126.com

Received: 2007-12-27 Revised: 2008-03-04

Abstract

Transverse colon involvement of malignant lymphoma is rare in clinic. It has peculiar manifestations, and is easy to be misdiagnosed. We report a patient who has been misdiagnosed with pyogenic peritonitis, intestinal perforation, and intestinal tuberculosis. He was confirmed with non-Hodgkin's lymphoma in a superior hospital after focuses were found by colonoscopy. Clinicians should be broad-minded, patients should be transferred to a superior hospital if necessary.

Key Words: Transverse colon; Lymphoma; Misdiagnosis

Dai SL, Wang M, Yang QN, Wan Q. One-case analysis of misdiagnosis for transverse colon lymphoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1708-1709

摘要

恶性淋巴瘤在横结肠受累, 临床少见, 表现特殊, 易造成误诊, 本例患者曾被误诊为化脓性腹膜炎、肠穿孔和肠结核等疾病, 经肠镜检查才发现病灶, 转上级医院最终确诊。临床医生要拓

宽思路, 若条件有限时尽快转上级医院确诊。

关键词: 横结肠; 淋巴瘤; 误诊

代时莉, 王敏, 杨秦南, 万群. 横结肠淋巴瘤误诊1例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(15): 1708-1709

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1708.asp>

0 引言

恶性淋巴瘤累及胃肠道部位以小肠为多, 其次为胃, 结肠很少受累^[1], 现将我院1例以腹膜刺激征为首发症状的横结肠淋巴瘤报道如下。

1 病例报告

患者为20岁男性, 因发热1 wk(39-41℃), 持续腹痛2 d, 院外输氨苄青霉素不缓解, 于2006-11-16入我院普外科。体查: 体温40.3℃, 血压100/50 mmHg, 急性病容, 浅表淋巴结不大, 腹平, 肌卫, 全腹压痛, 以下腹为主, 有反跳痛, 肝脾不清, 移动性浊音(±), 肠鸣音正常。做诊断性腹腔穿刺抽出脓性分泌物, 涂片白细胞4+, 红细胞2-4; 血常规: WBC $8.4 \times 10^9/L$, 中性74.9%, Hb 127 g/L, 血小板 $237 \times 10^9/L$, 肝肾功能、电解质、淀粉酶、凝血四项正常, 诊断为肠伤寒并穿孔。急诊剖腹探查, 术中见脓性分泌物200 mL, 小肠充血水肿, 反复查找均未见肠穿孔灶及肠管包块, 后关腹, 予头孢派酮和氟罗沙星抗感染1 wk, 仍发热, 体温波动在38-40℃, 伴盗汗。转至感染科, 作胸片正常, 血培养及肥达反应阴性, 继头孢派酮和甲硝唑抗感染及支持治疗, 1 wk后病情同上, 但患者渐进性消瘦。2006-11-28因心率减慢(心率50次/分)转至我科, 查体: 体温38℃, 脉搏50次/min, 恶病质, 浅表淋巴结未及肿大, 心肺(-), 舟状腹, 腹中一长约10 cm手术切口愈合好, 减张线未拆, 左上腹压痛, 肝脾未及, 神经系统(-)。查血钾3.1 mmol/L, 考虑系低钾引起, 予补钾后心率很快升至70-80次/min。因病情诊断未明, 停抗生素监测热型, 做胸腹盆腔CT平扫正常, 心脏彩超正常, 血、大便及骨髓培养阴性, PPD阴性,

■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



图1 纤维结肠镜检查
结果.

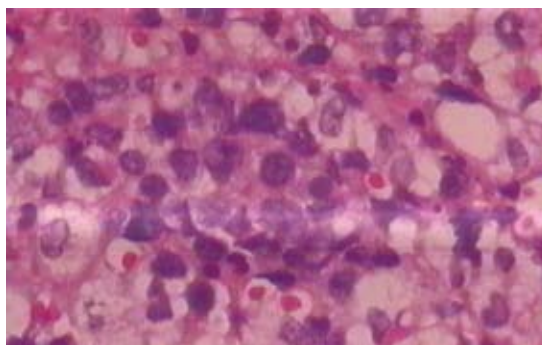


图2 病理检查结果.

■同行评价

本文报道结肠淋巴瘤, 临床少见, 对临床医生有一定的帮助.

尿常规正常, 血常规: WBC $9.94 \times 10^9/L$, 中性粒细胞74%, 血红蛋白106 g/L, 血小板 $178 \times 10^9/L$ 之间, 血涂片未找到疟原虫, 血沉53 mm/h, C反应蛋白228 mg/L, 骨髓提示感染征象, 请全院会诊倾向伤寒和肠道结核. 监测体温为不规则热(36-39℃), 患者仍诉左上腹痛, 盗汗明显, 未解血便, 无咳嗽、咯血. 做结肠镜检查见横结肠中段及结肠脾曲两处巨大溃疡面, 基底污秽, 覆盖厚白苔及大量坏死物质, 溃疡边缘不规则, 隆起增生样改变, 局部肠腔狭窄(图1), 并做活检恶性细胞生长, 未分型(图2). 追问病史, 发热前2 mo患者开始有盗汗, 再次体检在腋下扣及一花生米大小的淋巴结. 转上级医院, 最后诊断为非霍奇金淋巴瘤, 后因经济困难出院返家, 未治疗.

2 结果

淋巴瘤是一组原发于淋巴结或淋巴组织的恶性肿瘤, 部分原发于结外的淋巴瘤由于侵犯部位不同, 其表现复杂多样, 尤其是在疾病早期缺乏特异性, 少数患者可仅表现为急腹症而误诊^[2]. 本例因发热后出现腹痛, 有腹膜刺激征, 诊断性腹穿抽出脓性腹腔积液, 而本地伤寒常年流行, 入院时血象不高, 根据本地常见病种诊断为伤寒肠穿孔是有依据的, 在剖腹探查时见腹腔脓液, 未发现穿孔肠管及包块, 未想到溃疡型. 因

此辗转于外科、感染科、内科之间, 造成诊断延误. 主要原因: (1)没仔细询问病史, 仅围绕常见病、多发病诊治, 导致患者在多科之间辗转, 病情迁延加重时才做进一步检查而确诊. (2)临床医师思路狭窄, 对不明原因的发热、腹痛未能及时作相关的骨髓检查及结肠镜检查也是导致延误诊断的原因之一. (3)淋巴瘤是恶性血液病, 以结肠受累临床少见, 加之本患者骨髓象改变不明显, 易造成误诊. 通过此次教训, 我们体会到: (1)临床工作中详细询问病史, 仔细体格检查, 仍然是基本功, 是作出正确诊断的重要依据. (2)患者出现发热、盗汗、腹痛及腹膜刺激征时, 除考虑常见病外, 亦要想到少见的血液系统恶性疾病, 及时进行相关检查以求及时正确诊断, 防延误病情. (3)基层医院医生也要通过在临床实践中不断学习, 拓宽思路, 要考虑到少见病的特殊表现, 如果条件有限尽早转上级医院, 以求明确诊断.

3 参考文献

- 1 陈灏珠. 实用内科学(下册). 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 2405
- 2 王芸, 汤敏, 秦海春, 郭强, 范红. 原发性T细胞性恶性淋巴瘤1例. 中国实用内科杂志 2002; 22: 175

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>/在线提交未成功, 请通过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/tgxz.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 2008-05-28)

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

陈红松 副研究员
北京大学人民医院; 北京大学肝病研究所

陈建荣 副教授
南通大学第二附属医院急诊医学中心

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

陈亚军 主任医师
首都医科大学附属北京儿童医院普外科

程英升 主任医师
上海交通大学附属第六人民医院放射科; 上海交通大学影像医学研究所

房林 副教授
同济大学附属上海市第十人民医院普外科

韩天权 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

季国忠 副教授
南京医科大学第二附属医院消化科

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

李涛 主治医师
北京大学人民医院肝胆外科

刘改芳 主任医师
河北医科大学第三医院消化内科

刘海林 主任医师
上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

刘杞 教授
重庆医科大学病毒性肝炎研究所

禄韶英 主治医师
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

潘秀珍 教授
福建省立医院消化研究室

沈柏用 副教授
上海市交通大学医学院瑞金医院肝胆胰外科中心

王炳元 教授
中国医科大学附属第一医院消化内科

王鲁 副教授
复旦大学附属中山医院肝外科; 复旦大学肝癌研究所

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

闻勤生 教授
中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科

吴健雄 教授
中国医学科学院中国协和医科大肿瘤医院肿瘤医院腹部外科

吴君 主任医师
贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科

许文燮 教授
上海交通大学生命科学院生物医学工程系

杨维良 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外四科

张声生 教授
首都医科大学附属北京中医医院消化中心

张晓岚 教授
河北医科大学第二医院消化内科

张绪清 副教授
中国人民解放军第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所

周士胜 教授
大连大学医学院医学研究中心