

# 离子通道与疾病

张宗明, 裘法祖

张宗明, 清华大学第一附属医院普外科 北京市 100016  
裘法祖, 华中科技大学同济医学院附属同济医院外科 湖北省武汉市 430030  
张宗明, 男, 1963-12-12 生, 山东省成武县人, 汉族, 清华大学第一附属医院普外科教授、主任医师、博士生导师, 1994-07 月毕业于同济医科大学, 获外科学博士学位, 1994-09/1996-06 北京医科大学外科学博士后, 1997-09/2001-04 美国俄亥俄州立大学、耶鲁大学博士后, 主要从事普通外科临床和基础研究, 已在《美国科学院院报(PNAS)》等杂志发表学术论文 60 多篇, 参编全国高等医学院校五年制、七年制、八年制《外科学》教材等著作 9 部, 承担国家自然科学基金、教育部“跨世纪优秀人才培养计划”等 5 项基金, 兼任教育部科学技术委员会生命科学一部学部委员, 国际肝胆胰外科学会中国分会委员, 中华外科学会实验外科学组委员, 《世界华人消化杂志》、《中华实验外科杂志》等 9 种杂志编委。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30270532  
教育部“跨世纪优秀人才培养计划”基金资助项目, 教技函[2002]48 号  
上海市教委“曙光计划”基金资助项目, No. 02SG20  
项目负责人: 张宗明, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊 6 号, 清华大学第一附属医院普外科, zhangzongming@yahoo.com  
电话: 010-64372362 传真: 010-64361322  
收稿日期: 2005-01-17 接受日期: 2005-01-28

## 摘要

细胞离子通道的结构和功能正常是维持生命过程的基础, 其基因变异和功能障碍与许多疾病的发生和发展有关。离子通道的主要类型有钾、钠、钙、氯和非选择性阳离子通道, 各型又分若干亚型。离子通道的主要功能是: 提高细胞内钙浓度, 触发生理效应; 决定细胞的兴奋性、不应性和传导性; 调节血管平滑肌的舒缩活动; 参与突触传递; 维持细胞的正常体积。离子通道的主要研究方法为膜片钳技术、分子生物学技术、荧光探针钙图像分析技术。离子通道病是指离子通道的结构或功能异常所引起的疾病。疾病中的离子通道改变是指由于某一疾病或药物引起某一种或几种离子通道的数目、功能甚至结构变化, 导致机体发生或纠正某些病理改变。从离子通道与疾病的关系角度, 加强分子生物学、生物物理学、遗传学、药理学等多学科交叉深入研究, 对于深入探讨某些疾病的病理生理机制、早期诊断及发现特异性治疗药物或措施等均具有十分重要的理论和实际意义。

关键词: 离子通道

张宗明, 裘法祖. 离子通道与疾病. 世界华人消化杂志 2005;13(5):585-587  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/585.asp>

## 0 引言

离子通道(ion channel)是细胞膜上的一类特殊亲水性蛋白质微孔道, 是神经、肌肉细胞电活动的物质基础。随着分子生物学、膜片钳技术的发展, 人们对离子通道的分子结构及特性有了更加深入的认识, 并发现离子通道的功能、结构异常与许多疾病的发生和发展有关<sup>[1]</sup>。近年来, 对于离子通道与疾病关系

的研究取得了重大进展, 不仅阐明了离子通道的分子结构突变可导致某种疾病, 而且还明确了某些疾病可影响某种离子通道功能甚至结构。本文论述离子通道的主要类型、功能、研究方法及其与疾病的关系。

## 1 离子通道的主要类型

离子通道的开放和关闭, 称为门控(gating)。根据门控机制的不同, 将离子通道分为三大类: (1) 电压门控性(voltage gated), 又称电压依赖性(voltage dependent)或电压敏感性(voltage sensitive)离子通道: 因膜电位变化而开启和关闭, 以最容易通过的离子命名, 如  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cl^-$  通道 4 种主要类型, 各型又分若干亚型。(2) 配体门控性(ligand gated), 又称化学门控性(chemical gated)离子通道: 由递质与通道蛋白质受体分子上的结合位点结合而开启, 以递质受体命名, 如乙酰胆碱受体通道、谷氨酸受体通道、门冬氨酸受体通道等。非选择性阳离子通道(non-selective cation channels)系由配体作用于相应受体而开放, 同时允许  $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$  或  $K^+$  通过, 属于该类。(3) 机械门控性(mechanogated), 又称机械敏感性(mechanosensitive)离子通道: 是一类感受细胞膜表面应力变化, 实现胞外机械信号向胞内转导的通道, 根据通透性分为离子选择性和非离子选择性通道, 根据功能作用分为张力激活型和张力失活型离子通道。此外, 还有细胞器离子通道, 如广泛分布于哺乳动物细胞线粒体外膜上的电压依赖性阴离子通道(voltage dependent anion channel, VDAC), 位于细胞器肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR)或内质网(endoplasmic reticulum, ER)膜上的 Ryanodine 受体通道、 $IP_3$  受体通道。

## 2 离子通道的主要功能

离子通道的主要功能有: (1) 提高细胞内钙浓度, 从而触发肌肉收缩、细胞兴奋、腺体分泌、 $Ca^{2+}$  依赖性离子通道开放和关闭、蛋白激酶的激活和基因表达的调节等一系列生理效应; (2) 在神经、肌肉等兴奋性细胞,  $Na^+$  和  $Ca^{2+}$  通道主要调控去极化,  $K^+$  主要调控复极化和维持静息电位, 从而决定细胞的兴奋性、不应性和传导性; (3) 调节血管平滑肌舒缩活动, 其中有  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cl^-$  通道和某些非选择性阳离子通道

参与; (4) 参与突触传递, 其中有  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cl^-$  通道和某些非选择性阳离子通道参与; (5) 维持细胞正常体积, 在高渗环境中, 离子通道和转运系统激活使  $Na^+$ 、 $Cl^-$ 、有机溶液和水分进入细胞内而调节细胞体积增大; 在低渗环境中,  $Na^+$ 、 $Cl^-$ 、有机溶液和水分流出细胞而调节细胞体积减少。

### 3 离子通道的主要研究方法

研究离子通道功能的最直接方法是用膜片钳技术直接测定通过离子通道的电流或测量细胞膜电位的变化。膜片钳技术是利用一个玻璃微吸管电极完成膜片或全细胞电位的监测、钳制和膜电流的记录, 通过观测膜电流的变化来分析通道个体或群体的分子活动、探讨离子通道特性。分子生物学技术为离子通道的分子结构分析、基因克隆、功能表达研究提供了有力工具, 对于编码离子通道亚单位的基因结构可采用基因定位克隆确定其在染色体上的定位, 用逆转录-聚合酶链反应、Northern 杂交等明确其在器官组织中的分布, 用 Western 杂交检测基因表达产物等。荧光探针钙图像分析技术为检测细胞内游离钙离子浓度提供了有效手段, 常用的荧光探针有 Fura-2/AM、Indo-1/AM、Fluo-3/AM、Calcium Green 等, 常用的检测仪器有双波长显微荧光光度计、激光扫描共聚焦显微镜等, 目前国外 Olympus、Zeiss、Spex 等公司已生产了测定细胞内游离钙离子的显微荧光装置, 国内自行研制的活细胞钙离子浓度荧光显微检测系统也已问世<sup>[2]</sup>。将离子浓度图像记录和膜片钳记录结合, 同时进行光电联合检测, 从离子产生的离子浓度、图像变化和电信号变化多个方面研究离子通道, 将获得更多的离子通道功能信息。

### 4 离子通道病(channelopathy)

离子通道病是指离子通道的结构或功能异常所引起的疾病, 具体表现在编码离子通道亚单位的基因发生突变或表达异常, 或体内出现针对通道的病理性内源性物质时, 离子通道的功能发生不同程度的减弱或增强, 导致机体整体生理功能紊乱, 形成某些先天性或后天获得性疾病, 主要累及神经、肌肉、心脏、肾脏等系统和器官。迄今为止, 研究比较清楚的离子通道病主要涉及钾、钠、钙、氯通道领域, 现简介如下:

4.1 钾通道病 钾离子通道在所有可兴奋性和非兴奋性细胞的重要信号传导过程中具有重要作用, 其家族成员在调节神经递质释放、心率、胰岛素分泌、神经细胞分泌、上皮细胞电传导、骨骼肌收缩、细胞容积等方面发挥重要作用。已经发现的钾通道病有常染色体显性良性家族性新生儿惊厥(benign familial neonatal

convulsions, BFNC)、1-型发作性共济失调(episodic ataxia type 1)、阵发性舞蹈手足徐动症伴发作性共济失调(paroxysmal choreoathetosis with episodic ataxia)、癫痫、1-, 2-, 5-, 6-型长QT综合征、Jervell 和 Lange-nielsen 综合征<sup>[3]</sup>、Andersen 综合征<sup>[4]</sup>等。

4.2 钠通道病 钠离子通道在大多数兴奋细胞动作电位的起始阶段起重要作用, 已经发现的钠通道病有高钾型周期性麻痹、正常血钾型周期性麻痹、部分低钾型周期性麻痹、先天性副肌强直、各型钾加重的肌强直、先天性肌无力、3-型长QT综合征、1-型假性醛固酮减少症、Liddle 综合征<sup>[5]</sup>、全面性癫痫热性发作叠加症(generalized epilepsy with febrile seizures plus)<sup>[6]</sup>等。

4.3 钙通道病 钙离子通道广泛存在于机体的不同类型组织细胞中, 参与神经、肌肉、分泌、生殖等系统的生理过程。已经发现的钙通道病有家族性偏瘫型偏头痛、低钾型周期性瘫痪、2-型发作性共济失调、6-型脊髓小脑共济失调、中央脊髓性肌病(central core disease of muscle)、恶性高热、Lambert-Eaton 肌无力综合征<sup>[7]</sup>、癫痫等。

4.4 氯通道病 氯离子通道广泛分布于机体的兴奋性细胞和非兴奋性细胞膜及溶酶体、线粒体、内质网等细胞器的质膜, 在细胞兴奋性调节、跨上皮物质转运、细胞容积调节和细胞器酸化等方面具有重要作用。已经发现的氯通道病有先天性肌强直(Thomsen 型)、隐性遗传全身性肌强直(Becker 型)、囊性纤维化病、遗传性肾结石病、3-型 Bartter 综合征<sup>[8]</sup>等。

需要说明的是, 相当数量的离子通道病并不是新出现的疾病, 而是早已出现甚至早被熟知的疾病, 只是此前一直未发现其在离子通道水平存在病变, 如癫痫、偏头痛等; 有些离子通道病为单一离子通道结构或功能异常而至, 如 1-型发作性共济失调是由于 KCNA1 基因突变引起, 该基因位于染色体 12p13 上, 编码电压依赖性钾离子通道; 也有些离子通道病涉及多种离子通道结构或功能异常, 如癫痫与 L 型电压依赖性钙通道( $\alpha 1$  D 亚单位基因表达减弱)、电压依赖性钾通道(KCNQ2 和 KCNQ3 基因突变)、乙酰胆碱受体通道( $\alpha 4$  和  $\beta 2$  亚单位基因突变)等有关。

### 5 离子通道病的主要研究方法

离子通道病研究作为近年来新兴的一门前沿交叉学科研究方向, 正在成为基础医学、临床医学和生命科学工作者研究的热点, 其研究的关键因素之一在于离子通道病模型的制备。

对先天性离子通道病, 多采用基因克隆技术将可疑的致病基因剔除或插入(knock out/Knock in)

在整体动物上制造基因突变, 生产转基因动物; 或将离子通道基因直接微注射于细胞表达系统, 如爪蟾卵母细胞 (*xenopus oocyte*)、人胚肾细胞 (HEK293)、中华仓鼠卵母细胞 (CHO) 等, 然后对其所表达的离子通道进行单通道记录和分析, 并与野生型进行比较。

对获得性离子通道病, 主要采用以患者血清或提纯的免疫球蛋白被动转移或人工重组抗原主动转移于整体实验动物的免疫学方法; 或将传代细胞与患者血清或纯化的抗体共同培养, 而后对其电生理变化进行检测。

通过制备上述离子通道病研究模型, 结合分子生物学、膜片钳记录、荧光探针钙图像分析、细胞内电生理记录、免疫组化等多种技术手段进行在体 (*in vivo*) 和离体 (*in vitro*) 实验研究, 是目前离子通道病的主要研究策略。

## 6 疾病中的离子通道改变

病变中的离子通道改变是指由于某一疾病或药物引起某一种或几种离子通道的数目、功能甚至结构变化, 导致机体发生或纠正某些病理生理改变。比如老年性痴呆 (Alzheimer's disease, AD), 大量的研究发现 AD 患者体内的一些内源性致病物质 (如  $\beta$ -淀粉样蛋白、 $\beta$ -淀粉样蛋白前体、早老素蛋白-1, 2) 与钾通道、钙通道功能异常密切相关, 可能通过影响钾通道、钙通道的本身结构和 / 或调节过程等, 参与 AD 患者早期记忆损失、认知功能下降等症状的出现。又如脑缺血, 脑缺血后能量代谢紊乱, 细胞内 ATP 合成下降, 突触间隙的谷氨酸剧增, 谷氨酸作用于 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体, 引起受体依赖性  $\text{Ca}^{2+}$  通道开放,  $\text{Ca}^{2+}$  内流增加, 导致神经细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载; 谷氨酸还可经非 NMDA 途径使  $\text{Na}^+$  通道开放, 引起  $\text{Na}^+$  通内流增加, 随即引起  $\text{Cl}^-$  和  $\text{H}_2\text{O}$  内流, 导致神经细胞急性渗透性肿胀。再如支气管哮喘, 致病因素作用于肥大细胞后, 引起细胞膜钙通道开放,  $\text{Ca}^{2+}$  内流, 促使 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇 ( $\text{PIP}_2$ ) 水解产生肌醇三磷酸 ( $\text{IP}_3$ ), 后者促进肌浆网释放  $\text{Ca}^{2+}$ , 导致胞内  $\text{Ca}^{2+}$  增多, 进而激活钙-钙调蛋白依赖性酶 (磷酸化酶激酶、腺苷酸环化酶、磷酸二酯酶等) 参与肥大细胞脱颗粒, 释放组胺, 导致炎症反应和哮喘发作; 钙通道阻滞剂硝苯地平、维拉帕米能阻断钙通道, 减少胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度, 抑制肥大细胞脱颗粒, 减轻炎症递质的反应性, 缩短哮喘发作时间, 改善哮喘症状。

## 7 问题和展望

随着分子生物学、生物物理学、遗传学、药理学等

多学科交叉研究的深入, 已经逐步明确了许多离子通道的分子结构, 克隆了相应离子通道的 cDNA, 使得阐明离子通道结构与功能的关系、基因突变与疾病的关系成为现实, 从而部分解开了长期以来一直困扰人类的某些疾病的病因、发病机制和治疗之谜。但还有一些问题有待深入研究, 比如基因突变与疾病的不一致性, 具体表现为尽管发现某种离子通道病确实存在基因突变、细胞膜离子电流变化, 然而只有部分患者有临床症状和体征, 另一部分患者却无任何症状和体征; 又如多种离子通道结构或功能异常导致的离子通道病, 为什么不同基因的突变或功能异常会出现相同或相似的症状和体征; 再如由于离子通道自身的复杂性和多样性, 使得人们对一些离子通道病的认识存在一定的局限性, 同时还有一些可能的离子通道病没被认识等。

从离子通道与疾病的关系角度, 进一步加强分子生物学、生物物理学、遗传学、药理学等多学科交叉深入研究, 通过建立稳定的离子通道病研究模型和先进的研究方法, 深入研究离子通道的结构和功能, 深入探讨离子通道病的基因结构和功能异常, 加强特异性离子通道协同或拮抗药物开发, 加强特异性离子通道亚基基因干预治疗研究, 将对深入探讨某些疾病的病理生理机制、早期诊断及发现特异性治疗药物或措施等均具有十分重要的理论和实际意义。

## 8 参考文献

- 1 Hatta S, Sakamoto J, Horio Y. Ion channels and diseases. *Med Electron Microsc* 2002;35:117-126
- 2 兰李, 周云燕, 杨志勇, 翟安连, 徐涛. 活细胞钙离子浓度荧光显微检测系统的研制和应用. *生物医学工程研究* 2004;23:114-117
- 3 Chorbachi R, Graham JM, Ford J, Raine CH. Cochlear implantation in Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002;66:213-221
- 4 Hosaka Y, Hanawa H, Washizuka T, Chinushi M, Yamashita F, Yoshida T, Komura S, Watanabe H, Aizawa Y. Function, subcellular localization and assembly of a novel mutation of KCNJ2 in Andersen's syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:409-415
- 5 Swift PA, MacGregor GA. The epithelial sodium channel in hypertension: genetic heterogeneity and implications for treatment with amiloride. *Am J Pharmacogenomics* 2004;4:161-168
- 6 Spampinato J, Kearney JA, de Haan G, McEwen DP, Escayg A, Aradi I, MacDonald BT, Levin SI, Soltesz I, Benna P, Montalenti E, Isom LL, Goldin AL, Meisler MH. A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for beta subunit interaction. *J Neurosci* 2004;24:10022-10034
- 7 Nishimune H, Sanes JR, Carlson SS. A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* 2004;432:580-587
- 8 Waldegger S, Jentsch TJ. Functional and structural analysis of CIC-K chloride channels involved in renal disease. *J Biol Chem* 2000;275:24527-24533

# 树突状细胞与丙型肝炎病毒感染研究

冯志华, 李 军

冯志华, 李军, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院  
陕西省西安市 710038  
冯志华, 女, 1964-11-08 生, 山西省忻州市人, 汉族, 第四军医大学博士, 硕士生导师, 副教授、副主任医师, 主要从事丙型肝炎治疗性疫苗研究, 主编及参编医学专著 5 部, 获军队及省部级科技成果奖 3 项, 负责及参与国家自然科学基金课题 8 项。  
国家自然科学基金资助项目, No. 39800122, No. 30170822  
项目负责人: 冯志华, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院, Fengzh@fmmu.edu.cn  
电话: 029-83377165 传真: 029-83377165  
收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-01-20

## 摘要

树突状细胞(DC)在捕获丙型肝炎病毒(HCV)并向靶器官传播的过程中扮演了重要的角色。本文就病毒感染前后 DC 的作用及功能变化, 尤其是 HCV 感染过程中, DC 可能通过其表面特异性 C 型凝集素-细胞间黏附分子 3 结合非整合素分子(DC specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin, DC-SIGN)保护病毒转运、促进病毒感染靶细胞的路径, DC-SIGN 可能将 HCV 传递给肝细胞以及 B 或 T 淋巴细胞亚群等做一简要的综述。

**关键词:** 树突状细胞; 丙型肝炎病毒

冯志华, 李军. 树突状细胞与丙型肝炎病毒感染研究. 世界华人消化杂志 2005; 13(5):588-591  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/588.asp>

## 0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DC)为体内重要的专职抗原呈递细胞(APC), 是机体 T 淋巴细胞特异性免疫应答的直接启动和调控者。近年来, 树突状细胞的分化发育、抗原加工呈递机制及其在肿瘤、感染、自身免疫性疾病和移植排斥中的作用已经成为免疫学的前沿领域, 从树突状细胞中找寻免疫新分子是目前免疫学领域的一大研究热点。对 DC 的研究不仅有助于阐明机体免疫应答的调控机制, 而且可以了解 DC 对相关疾病发生的影响, 从而制定相应的预防和防治措施。

## 1 病毒感染时 DC 的作用

保护机体免受病原体侵袭对免疫系统是一个巨大的挑战, 在此过程中 DC 扮演了重要的角色。在病毒血症的第一、第二阶段, 于外周循环中被病毒感染的 DC 干细胞与未成熟 DC, 可快速捕获入侵的病原体并将其有效地加工为肽段(抗原)<sup>[1]</sup>。之后 DC 进入向心的淋

巴组织, 将抗原呈递至 MHCs 并自身发育成熟, 从而有效地活化淋巴组织中特异的幼稚 T 细胞。活化的 T 细胞分化为效应性 T 细胞, 移至感染部位抵抗病原体。DC 通过调控诱导效应性 T 细胞的级别, 控制机体对抗特异病原体免疫反应的程度。依赖 DC 识别呈递的病原体的不同, 幼稚 T 细胞可分化为 Th1 细胞, 分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-12 等, 或分化为 Th2 细胞, 分泌 IL-4、IL-6 以及 IL-10 等。Th1 细胞可有效地对抗细胞内病原体, 部分原因为 IFN- $\gamma$  激活了被感染细胞内的抗微生物机制。相反, Th2 细胞可有效地对抗胞外病原体如寄生虫, 部分原因是通过诱导产生的免疫球蛋白 E 和嗜酸细胞杀死了寄生虫。

## 2 病毒感染后 DC 的功能变化

**2.1 DC 可以激活抗病毒 CTL 反应** DC 是抗病毒反应的主要激活因子。DC 是最有效的激活记忆 CTL 反应的抗原呈递细胞, DC 激活病毒反应的作用已经在人类流感模型中得到证实。流感病毒在感染过程中合成的血凝素与非结构蛋白(NS)可以高效地感染人 DC。但这种感染不具有复制能力, 并且 DC 的生存依赖于 IFN- $\alpha$  的存在; 相反, 巨噬细胞被感染后则很快发生了凋亡。DC 介导流感病毒特异性 CTL 反应的产生原理有三种可能: 少量的病毒直接感染 DC 就足以产生有潜力的 CTL, 并且这很可能发生于气道上皮感染的早期, 在那里 DC 可以快速聚集; DC 还可以摄取无活性的流感病毒用以引发 CTL 反应, 据推测这一过程很可能是利用结合与融合功能来使病毒进入细胞当中; 最后, DC 通过从凋亡细胞中获得的被加工的病毒抗原, 推测 DC 很可能获得了诱发病毒特异性 I 类限制性 CTL 交叉反应的能力。

**2.2 DC 在病毒免疫逃避中的作用** 病毒已经形成了许多用以逃避宿主免疫反应的机制。这包括: 减少抗原表位的表达(如隐性的 EB 病毒感染), MHC 表位的基因突变, CTL 克隆的耗竭(HIV-1 与淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒, LCMV), 下调 MHC-I 类与 MHC-肽复合物的表达, 产生免疫细胞因子与受体, 下调某些决定性的细胞因子以及利用 DC 作为媒介来扩增并传播病毒至靶细胞等。

有报道, 将麻疹病毒(MV)感染的 DC 与同源活化的 T 细胞联合培养, 结果产生了大量的 DC 与 T 细胞凋亡小体, 提示活化的 T 细胞可以诱发 Fas 介导的 DC 的凋亡, 并且 MV 感染的 DC 诱发的 TRAIL(TNF-

related apoptosis-inducing ligand)可以杀伤T细胞. 进一步研究发现, 天然同源的CD4<sup>+</sup> T细胞的免疫抑制作用也是由MV感染的DC引起的, 而非T细胞的凋亡作用, 并且这些T细胞即使存活也不具有免疫性. 由此可见, MV诱发的T细胞循环的阻断可能由来自DC的游离病毒, 或由DC表面病毒糖蛋白与缺乏转染的T细胞的相互作用来介导完成.

与MV相似, HIV感染也可以诱发病毒特异性CTL以及抗体反应, 但这一免疫反应不足以具有保护性, 不能阻止疾病的进程. 虽然HIV在DC中复制不强, 但病毒颗粒的表位在未成熟的人DC中是通过外源性MHC-I类途径递呈的, 并且能够在缺乏病毒蛋白复合物的条件下活化CTL. 外源性HIV抗原的递呈要求有充足的病毒受体相互作用以及病毒与细胞膜的融合. 无症状的HIV感染患者中, 只有很少的DC具有微弱的激活CD4<sup>+</sup>T细胞增生的能力, 这一改变也许与CD4<sup>+</sup>记忆T细胞的产生与衰退有关. 在鼠中的研究发现, CD4<sup>+</sup> T细胞与其同源的DC上的抗原接触后, 被活化并表达CD40L, 从而诱发CD40介导的DC的活化, 后者又进一步产生Th1类细胞因子(如IL-12), 提高CD8<sup>+</sup> CTL的反应效率. 有意思的是, 来源于HIV感染患者的DC产生IL-12的能力较弱, 在AIDS发作时, CTL反应逐渐减少甚至消失, 这些可能与CD4<sup>+</sup> T细胞的衰退有关. 而当患者HIV特异性CD4<sup>+</sup>T细胞增生反应较强时, 则循环中的CTL保持在一个较高的水平, 并能很好的控制病毒血症. 近来的研究显示, HIV患者不同疾病阶段的单核细胞来源的DC均可在体外激活增生HIV特异性的CTL. 由此可见, 感染HIV而造成的DC对IL-12的产生作用的减弱, 不是由CD4<sup>+</sup>T细胞减弱的CD40交联引起的, 而是受病毒以及病毒感染的方式控制的.

近来对慢性丙型肝炎病毒(HCV)感染患者的研究发现, 来源于患者单核细胞的DC在体外具有正常的表现型和成熟能力, 但缺少不同的兴奋功能, 后者可以被外源性的IL-2与IL-12恢复. 因此可见CD4<sup>+</sup> Th1细胞反应与HCV诱发的清除病毒的免疫反应强度相关, 如果DC缺乏抗原递呈作用和/或缺乏刺激产生Th1活化细胞因子的能力, 就必然会导致抗HCV免疫反应的低下, 使病毒持续感染.

综上所述, DC的功能不是一成不变的, 他将不断地与反应中来自环境的信号相适应. 这些信号包括: 抗炎症的细胞因子(IL-10, TGF- $\beta$ 等), 病原体的特异性及被DC识别的能力, 不同的DC亚型, 邻近的T细胞的作用. 病毒利用DC的功能, 形成了多种逃逸机制. 弄清楚DC上的病毒受体与受体介导的信号机制, 以及病毒如何调节抗原呈递作用或DC在自然环境中的

活化过程, 对进一步了解病毒病理与病毒逃逸机制是十分重要的. 这将有助于设计出新型的针对感染病毒DC的抗感染疫苗, 他将通过表达相应抗原来达到以DC为基础的免疫治疗作用.

### 3 DC与HCV感染

3.1 DC通过特异性的受体识别HCV抗原 HCV感染与其他病毒性肝炎的结局不同, HCV感染具有较高的慢性化比例, 有时高达80%以上, 因而具有更大的危害性. HCV感染目前尚无有效的预防和治疗措施, 主要是由于对HCV感染路径的研究相对滞后. 虽然已有CD81、LDL-R作为HCV受体, 捕获HCV并将其介导入靶细胞感染路径的报道, 而CD81在组织中的广泛分布, 无法解释HCV的趋向性; LDL-R的表达虽与HCV的趋向性一致, 但至今无其与HCV膜蛋白结合的直接证据<sup>[2]</sup>.

最近发现, DC结合的HIV-1可被有效的传递给靶细胞-CD4<sup>+</sup>T细胞<sup>[3-4]</sup>. DC特异性C型凝集素DC-SIGN(DC specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin, 树突状细胞表面特异性细胞间黏附分子3结合非整合素分子; 已命名为CD209)在此过程中扮演了很重要的角色<sup>[5]</sup>, 他主要通过其与HIV-1包膜糖蛋白gp120的高亲和力作用捕获HIV-1<sup>[5]</sup>. 然而, DC-SIGN并不是促进HIV-1对DC的感染, 而是保护病毒不被降解. 结合DC-SIGN的HIV-1即可被传递至易感的CD4<sup>+</sup>T细胞. 除了可传递HIV-1, DC-SIGN还可增强病毒对T细胞的感染: 低病毒浓度时, 如果没有DC以反式作用方式的协助, 就检测不到感染的T细胞<sup>[5]</sup>. 这提示, 当HIV-1浓度较低如在体内感染的早期时, DC-SIGN的存在对病毒快速有效的感染T细胞至关重要. 最近的研究还证明, DC-SIGN也可作为其他许多病原体的受体, 包括丙型肝炎病毒(HCV)<sup>[6]</sup>、巨细胞病毒(CMV)<sup>[7]</sup>, Ebola病毒<sup>[8]</sup>, SARS冠状病毒(SARS-CoV)<sup>[9]</sup>, 幽门螺旋杆菌<sup>[10]</sup>, 肺结核分支杆菌<sup>[11]</sup>, 利什曼原虫<sup>[12]</sup>和曼氏血吸虫<sup>[13]</sup>. 越来越清楚的证据表明, 除了HIV-1以外, 其他的病原体也以DC-SIGN为目标, 达到生存的目的.

3.2 HCV感染后DC功能变化 有报道<sup>[14-15]</sup>证明, 人感染HCV后, 外周血中骨髓源性DC、浆细胞源性DC及DC前体均较常人有着显著的下降, 且前二者刺激CD4<sup>+</sup>T细胞的作用降低, 分泌IL-12 p70和IFN- $\alpha$ 的水平也减少. 当HCV患者骨髓源性DC接触初始CD4<sup>+</sup> T细胞时, 该DC刺激Th1反应的功能降低, 但初始化了更多分泌IL-10的细胞. 因此, 我们认为, HCV患者尤其是慢性HCV患者血中各型DC的数量降低, 且DC刺激分化辅助性T细胞的功能降低, 可能是HCV患者抗HCV免疫应答水平较低的原因. 因此, 如何绕过或提高DC

免疫功能低下,诱导出更强有力的、更具广泛性的免疫应答,应当成为目前免疫治疗亟待解决的突出问题之一。

我们在国家自然科学基金的资助下,将HCV C基因与人IgG1 Fc基因融合,构建分泌融合蛋白的真核表达载体<sup>[16]</sup>,转染经体外活化的DC之后,接种BALB/c小鼠,利用已建立的表达HCV C抗原的靶细胞(SP2/O-HCV-C, H-2<sup>d</sup>)及其荷瘤鼠(BALB/c小鼠)模型,发现融合基因修饰的DC,在体内外诱导的抗HCV特异性CTL、T细胞增生及抗体应答的强度明显高于单独HCV C-DNA疫苗接种组<sup>[17]</sup>。我们据此推测:直接将DNA疫苗转染经体外激活的DC,可能绕过功能低下DC对质粒DNA表达产物摄取不足的环节,使病毒抗原在DC内直接加工、提呈。而活化的CD4<sup>+</sup> Th 据其分泌的Th<sub>1</sub>与Th<sub>2</sub>类细胞因子的不同,可调节免疫的平衡,增强细胞和/或体液免疫应答的强度<sup>[17]</sup>。从而为提高基因疫苗诱导免疫应答的效率提供新的手段,可望为HCV防治提供新的思路和理论依据。

3.3 DC-SIGN介导丙肝病毒转染肝细胞 HCV也可利用DC-SIGN将树突状细胞作为转运体以确保感染的进行,这可能与HIV的机制相同<sup>[18]</sup>。

DC-SIGN主要表达于髓系树突状细胞<sup>[19-22]</sup>,在肝脏枯否细胞中也可检测到DC-SIGN<sup>[18]</sup>,枯否细胞是肝脏稳定的巨噬细胞,与肝细胞及肝窦状核内皮细胞(liver specific endothelial cells, LSEC)相邻,而LSEC表面也表达DC-SIGN的同源分子L-SIGN(Liver and Lymphoid specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin)<sup>[23]</sup>。另外,浆细胞源的DC可转移到肝脏中,肝脏内已检测到有DC-SIGN阳性的细胞<sup>[20-21]</sup>。

DC-SIGN和L-SIGN作为C型凝集素,其最基本的特征就是可通过碳末端碳水化合物识别结构域(CRD)与糖蛋白的甘露糖残基相互作用<sup>[24-25]</sup>,这种作用为钙依赖性。而HCV病毒E1/E2蛋白在天然状态下是高度糖基化的。HCV病毒E2蛋白高度甘露糖化的糖基与L-SIGN和DC-SIGN有高度亲和性(kd分别为6 nm和3 nm)<sup>[26]</sup>。有研究证明,重组的可溶性E2蛋白,患者体内的HCV病毒,以HCV包膜糖蛋白包装的假型逆转录病毒均可与L-SIGN和DC-SIGN特异性结合<sup>[23, 26-27]</sup>。

此外,在研究中还发现,(1)其他C型凝集素如langerin, CD23, CLEC-1/2并不与HCV的E2结合<sup>[26-27]</sup>;(2)一些病毒糖基化的包膜蛋白对SIGN分子的亲和力很低或并不与其结合<sup>[7, 28]</sup>;(3)抗L-SIGN和抗DC-SIGN的单抗以及甘露糖均可抑制DC对可溶性E2和HCV的捕获<sup>[29]</sup>。这些都证明了SIGN分子与HCV作用的特异性。

因此我们认为,位于黏膜组织和血循环中的DC-

SIGN<sup>+</sup> DC可能在病毒首先感染的位点捕获HCV。DC是抗原呈递细胞,可与B和T淋巴细胞直接作用<sup>[30-32]</sup>,某些DC可能也被HCV感染。另外,DC通过易位作用从血液穿过肝窦状隙内皮细胞到达肝细胞,从而浓集感染性病毒颗粒并使其与易感的肝细胞直接接触,将HCV传递给肝细胞<sup>[6]</sup>。

#### 4 结语

总之,树突状细胞在捕获HCV病毒并向靶器官传播的过程中扮演了重要的角色,在HCV感染中,可能存在通过树突状细胞表面DC-SIGN进行的保护病毒转运以及促进病毒感染靶细胞的路径,DC-SIGN可能将HCV传递给肝细胞以及B或T淋巴细胞亚群。肝脏枯否细胞中检测到DC-SIGN以及在肝窦状核内皮细胞中发现的L-SIGN使解释HCV的嗜肝细胞性成为可能。DC可能就是HCV感染的传播者,DC的这种通过DC-SIGN或类似DC-SIGN的分子将其他病原体传递给靶细胞的作用是以以前所没有考虑到的。这将是树突状细胞研究领域又一新热点,也是HCV感染机制研究的一个意外收获。有关DC及DC-SIGN的基础研究已很深入,DC-SIGN单抗也已研制开发。弄清DC及DC-SIGN的功能,将有助于进一步阐明HCV感染靶细胞的路径,阐明DC-SIGN在HCV传播和感染病理中的作用,尤其是HCV极高比率的慢性化机制以及母婴传播机制,可望为丙型肝炎的治疗措施和预防性疫苗的研究提供新的思路和理论依据。

我们已在国内外研究的基础上,进一步研究HCV感染过程中DC的功能变化,研究体内各种细胞因子的改变,加速对DC-SIGN的功能性研究,确定DC-SIGN与HCV作用位点,从而在未来的HCV治疗中通过阻断DC-SIGN对HCV病毒的捕获和呈递,切断HCV在体内的传播,为HCV感染提供较有前景的治疗策略。

#### 5 参考文献

- 1 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252
- 2 Feng ZH, Wang QC, Nie QH, Jia ZS, Zhou YX. DC-SIGN: Binding receptor for HCV? *World J Gastroenterol* 2004;10:925-929
- 3 Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* 1992;257:383-387
- 4 Pope M, Betjes MG, Romani N, Hirmand H, Cameron PU, Hoffman L, Gezelter S, Schuler G, Steinman RM. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 1994;78:389-398
- 5 Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000;100:587-597
- 6 Kudo S, Matsuno K, Ezaki T, Ogawa M. A novel migration

- pathway for rat dendritic cells from the blood:hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* 1997;185:777-784
- 7 Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houles C, Fieschi F, Arenzana-Seisdedos F, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 2002;17:653-664
  - 8 Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muniz O, Corbi AL, Delgado R. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* 2002;76:6841-6844
  - 9 Yang ZY, Huang Y, Ganesh L, Leung K, Kong WP, Schwartz O, Subbarao K, Nabel GJ. pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *J Virol* 2004;78:5642-5650
  - 10 Appelmelk BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Cutting edge:carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* 2003;170:1635-1639
  - 11 Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, Van Kooyk Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* 2003;197:7-17
  - 12 Colmenares M, Puig-Kroger A, Pello OM, Corbi AL, Rivas L. Dendritic cell(DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin(DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for Leishmania amastigotes. *J Biol Chem* 2002;277:36766-36769
  - 13 van Die I, van Vliet SJ, Nyame AK, Cummings RD, Bank CM, Appelmelk B, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for Schistosoma mansoni egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis-x. *Glycobiology* 2003;13:471-478
  - 14 Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Itose I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2004;190:1919-1926
  - 15 Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N, Onji M. Decreased interferon-alpha production and impaired T helper 1 polarization by dendritic cells from patients with chronic hepatitis C. *Clin Exp Immunol* 2004;137:559-565
  - 16 冯志华, 王全楚, 周永兴, 郝春秋, 聂青和. HCV-Fc 融合基因疫苗真核表达载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2003;11:697-700
  - 17 Wang QC, Feng ZH, Zhou YX, Nie QH. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T and B cell responses by dendritic cells expressing a modified antigen targeting receptor. *World J Gastroenterol* 2005;11:557-560
  - 18 Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Cosset FL, Altmeyer R. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 2004;279:32035-32045
  - 19 Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, van Kooyk Y. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem* 2002;277:11314-11320
  - 20 Pohlmann S, Soilleux EJ, Baribaud F, Leslie GJ, Morris LS, Trowsdale J, Lee B, Coleman N, Doms RW. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2670-2675
  - 21 Bashirova AA, Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Eilering JB, Martin MP, Wu L, Martin TD, Viebig N, Knolle PA, KewalRamani VN, van Kooyk Y, Carrington M. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin(DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 2001;193:671-678
  - 22 Soilleux EJ, Morris LS, Lee B, Pohlmann S, Trowsdale J, Doms RW, Coleman N. Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *J Pathol* 2001;195:586-592
  - 23 Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. L-SIGN(CD 209L)is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4498-4503
  - 24 Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 2001;294:2163-2166
  - 25 Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem* 2001;276:28939-28945
  - 26 Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Fong S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003;278:20358-20366
  - 27 Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 2003;77:4070-4080
  - 28 Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birs DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN(CD209)mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 2003;197:823-829
  - 29 Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussemart L, Manix C, Olson WC, Gardner JP, Dragic T. L-SIGN(CD209L)and DC-SIGN(CD209)mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;39:14067-14072
  - 30 Wykes M, Pombo A, Jenkins C, MacPherson GG. Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *J Immunol* 1998;161:1313-1319
  - 31 Kushnir N, Liu L, MacPherson GG. Dendritic cells and resting B cells form clusters in vitro and in vivo:T cell independence, partial LFA-1 dependence, and regulation by cross-linking surface molecules. *J Immunol* 1998;160:1774-1781
  - 32 Dubois B, Massacrier C, Caux C. Selective attraction of naive and memory B cells by dendritic cells. *J Leukocyte Biol* 2001;70:633-641

# 肿瘤基因单核苷酸多态性研究及个体化医疗的思考

许玲, 孙大志, 余志红

许玲, 孙大志, 余志红, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院中医科 上海市 200003

许玲, 女, 1967-3-8 出生, 浙江衢州人, 汉族, 1995 年毕业于上海中医药大学, 获博士学位, 副教授, 主要从事中西医结合防治肿瘤的临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271626

项目负责人: 许玲, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科, czzyk@smmu.edu.cn

电话: 021-63610109-73406

收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-01-20

## 摘要

单核苷酸多态性(SNPs)是指存在于某一人群或个体基因组内的单个碱基发生突变, 从而导致了群体与群体及个体与个体之间的差异。肿瘤患者个体治疗敏感性和与治疗相关的毒副反应等均与 SNPs 有关。解析人类基因组的碱基序列差异, 将为相关联的医药领域疾病的治疗带来革命性飞跃, 在不久的将来有望实现“量体裁衣”式的个体化给药治疗方案。

**关键词:** 单核苷酸多态性; 肿瘤; 基因; 个体化医疗

许玲, 孙大志, 余志红. 肿瘤基因单核苷酸多态性研究及个体化医疗的思考. 世界华人消化杂志 2005;13(5):592-595  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/592.asp>

## 0 引言

肿瘤是严重威胁人类生命健康的疾病之一, 目前已开展手术、化疗、放疗、生物治疗、中医药治疗等多种治疗方法, 然而疗效仍不能令人满意。化疗、放疗等疗效确凿, 但他们是“双刃剑”, 既能抑制肿瘤细胞的增生和转移, 又对患者机体产生毒副作用, 因此对于肿瘤的治疗急需一种能最大限度防治肿瘤、改善生活质量, 最大限度的降低毒副作用的个体化的治疗方案、剂量及疗程。因此“个体化医疗”对于肿瘤患者来说意义重大。

人类基因组图谱解码后, 生物科技研究展开崭新的一页, 科学家经解读及分析基因组所含的遗传信息, 发现人类基因组单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是疾病易感性、外显性、抵抗性以及药物反应性等生物学性状差别的重要遗传学基础<sup>[1-2]</sup>。单核苷酸多态性研究所揭示的人种、人群和个体之间 DNA 序列的差异以及这些差异所表现的意义将对疾病的诊断、治疗和预防带来革命性的变化—实现针对个人量身打造的个体化医疗。

东汉末年, 祖国医学的医圣张仲景就创立了六经辨证和脏腑辨证的辨证论治体系, 开创了“个体

化医疗”的先河, 一千七百多年后的今天, 随着基因组学、蛋白质组学、药物基因组学和生物信息学的发展, 从多因素分析、基因的相互作用、多层次生物信息整合等着手研究, 现代医学科学家提出了个体化医学的思想<sup>[3]</sup>。在为祖国医学自豪的同时, 我们应该思索如何进行中医现代化的研究。

## 1 人类基因组的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)特性及应用

基因组 DNA 是生物体各种生理、病理性状的物质基础。人类众多个体的基因组序列的一致性高达 99% 以上, 但个体之间各种性状的差异仍然很大, 包括对疾病的易感性、对同一疾病治疗药物的反应性等。基因的 SNPs 是形成个体间差异的重要遗传学基础。

SNPs 是指普通人群中发生在基因序列中的某一单个核苷酸改变的比率超过 1%, 这种单个核苷酸改变包括碱基对的替换、核苷酸插入和碱基缺失。SNPs 在人类基因组中广泛存在, 平均每 500-1 000 个碱基对中就有 1 个, 估计其总数达 300 万个甚至更多。

在基因组 DNA 中, 任何碱基均有可能发生变异, 因此 SNP 既有可能在基因序列内, 也有可能是在基因外的非编码区序列上。总的来说, 位于编码区的 SNP (cSNPs) 比较少, 因为在外显子内, 其变异率仅为周围序列的 1/5。但他在遗传疾病的研究中却有重要意义。因此 cSNPs 的研究更受关注。

从对生物的遗传性状的影响上来看, cSNPs 又可分为 2 种: 一种是同义 cSNPs (synonymous cSNPs), 即所致的编码序列的改变并不影响其所翻译的蛋白质的氨基酸序列, 突变碱基与未突变碱基的含义相同; 另一种是非同义 cSNPs (non-synonymous cSNPs), 指碱基序列的改变可使以其为蓝本翻译的蛋白质序列发生改变, 从而影响了蛋白质的功能, 这种改变常是导致生物性状改变的直接原因。cSNPs 中约有一半为非同义 cSNPs。

人类基因组单核苷酸多态性研究所揭示的人种、人群和个体之间 DNA 序列的差异以及这些差异所表现的意义将对疾病的诊断、治疗和预防带来革命性的变化。今后单核苷酸多态性的研究将在多个领域发挥重要作用, 其中包括: (1) 进行疾病的遗传连锁分析 (linkage analysis) 及关联分析 (association analysis), 用于疾病易感基因定位; (2) 在药物基因

组学(pharmacogenomics)研究中,可通过检测 SNPs 的遗传多态性标记揭示人群中不同个体对不同药物的敏感性差异的根本原因<sup>[4]</sup>. 这些研究将为“个体化医疗”奠定基础.

## 2 单核苷酸多态性与肿瘤的治疗

肿瘤严重威胁着人类的生命健康,化疗、放疗等已在肿瘤治疗中广泛应用,但他们是“双刃剑”,既能抑制肿瘤细胞的增生和转移,又对患者正常组织、器官产生毒副作用,如消化道反应、骨髓抑制等,临床中发现不同的肿瘤患者其疗效和毒副反应有差异.近年来,随着人类基因组计划的开展,人们已认识到肿瘤是复杂性疾病,肿瘤的发生和进展与遗传变异有关.通过从遗传的角度研究疾病治疗中存在的遗传基础的个体差异,人们已经发现部分基因单核苷酸多态性(SNPs)与药物疗效、药物代谢、放射组织损伤等相关.

**2.1 肿瘤药物治疗相关基因** 不同个体对于药物治疗反应的殊异可由多种因素造成,并产生不同的后果.就遗传因素而言,药物靶体的基因变异,会改变药物与靶蛋白间的相互作用;靶蛋白合成的有关基因变异,可以改变药物的效应;药物运输蛋白的基因变异,会影响药物的吸收、分布和排出;药物代谢酶的基因变异,会改变药物的代谢;DNA 修复酶的基因变异,则可改变药物的安全性;谷胱甘肽合成酶或某些辅基合成酶的基因变异,会改变药物的代谢途径和安全性.就环境因素而言,药物代谢主要酶系细胞色素 P450 的表达诱导,可以使药物的疗效降低;P450 的抑制剂则可能引起药物与药物的相互不良作用.另外,年龄、疾病和炎症等生理病理因素的差异,均可改变药物的吸收、分布和排泄.以下就药物代谢基因、药物运输基因和疾病相关基因举例说明基因多态性在肿瘤药物治疗中的研究.

**2.1.1 药物代谢基因** 细胞色素 P450(cytochromes P450 CYP)系统为人体内代谢药物的主要酶系统,CYP450 的第 1 到第 3 家族是参与药物代谢的活性酶,而且绝大部分基因具有多态性.其中 CYP3A 亚家族的成员催化多种药物的氧化及过氧化过程,同时在人的肝脏和小肠内含量也是最为丰富的,分别占总 CYP 的 30% 和 70%<sup>[5]</sup>.有许多化疗药是 CYP3A 的作用底物,如足叶乙甙、威猛(Vm-26)、环磷酰胺、异环磷酰胺、长春碱类、紫杉醇等<sup>[6]</sup>. CYP 酶的多态性对各种药物的个体敏感性和毒性作用影响很大,由于 CYP3A 表达存在相当大的个体差异,在某些人群中可相差 30 倍以上<sup>[7]</sup>,导致了不同个体对 CYP3A 底物的生物利用率和清除率的极大差别. CYP3A 表达的差别对于治疗用药谱较窄的底物如肿瘤化疗药等尤为重要,因为这种差别可造成临床疗效

和药物毒性作用的明显不同. 对人肝脏 CYP3A5cDNA 进行的分析表明,携带 CYP3A5\*1 基因型的人其体内转录完整 CYP3A5mRNA 的量较高,且能表达出 CYP3A5 蛋白.而那些携带 CYP3A5\*3 基因型的人在第 3 内含子中存在序列的突变,编码的是异常连接的 mRNA,这种 mRNA 很快被降解,所以由其翻译的蛋白量也较少<sup>[7]</sup>. CYP3A5 的高表达往往提示对药物的清除率较高,而剂量限制性毒性作用的发生率则较低,所以对这类患者通常需要增加用药剂量才能达到满意的疗效.而对带有 CYP3A5\*3 纯合子的患者,由于 CYP3A 的含量较低,药物清除较慢,所以药物在体内存留时间延长,这类患者治疗效果往往较好,但容易出现较大的毒副作用,应该适当减少药物用量.值得注意的是,药物经过 CYP 灭活后,并不是马上就能丧失毒性排出体外,有相当一部分化疗药经 CYP 代谢后转化成致癌物,对于长期存活的肿瘤患者来说有诱发第二肿瘤的危险,而这种第二肿瘤的发生也与 CYP3A 的多态性有关. Felix *et al* 研究了 CYP3A4 基因型与治疗相关性白血病之间的关系,发现野生型 CYP3A4 与化疗引起伴有 MLL 基因移位的白血病密切相关,而携带突变型 CYP3A4 的人化疗相关性白血病的发病率则较低.这种 CYP3A4 突变型在各人种中的分布也不同,在美国白人占 9%,美国黑人占 53%<sup>[6]</sup>.

**2.1.2 药物运输蛋白基因** 人体内有很多蛋白质负责输送药物出入细胞,称为药物运输蛋白(transporters),其中一大类为 MRP 蛋白.他们输送的药物包括抗癌药物和抗病毒的核苷类药物等.在不同个体中,这类蛋白质的表达可有极大差异.如在肝癌患者的癌周组织中,属于 MRP 的一种 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的表达水平,要比正常肝组织为低.这类表达水平以及活力的差异,可以直接影响到药物在细胞内的有效浓度,进而影响药物的疗效.并且最近有研究发现表明 MRP 基因多态性与肿瘤化疗敏感性相关<sup>[8]</sup>;MRP 基因促进子及第 28 外显子单核苷酸多态性与铂类化疗效果无明显相关性,而 MRP 第 10 外显子(第 1 249 位点)的 SNP 与卵巢癌的化疗效果密切相关,提示第十外显子突变型携带者对铂类化疗药敏感.

**2.1.3 疾病相关基因** 除药物代谢过程中出现的基因突变外,导致疾病的致病基因本身发生突变后也同样可以导致机体对药物的反应发生变化.例如,癌症患者的癌细胞常可以表达一种多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein MRP),他主要是 MRP 基因突变后表达,这种蛋白可以将癌症化疗时进入肿瘤细胞的药物自发地转运到细胞外,因而对于许多化疗药物的作用影响很大<sup>[9]</sup>. MDR1 的编码产物 P-gp 是一种跨膜蛋白,作为泵将细胞内的一些药物转运到细

胞外. Kim *et al* 对美国人MDR1基因的研究发现了10个人的单核苷酸多态性, 其中4个是同义的, 6个是非同义的突变, 并可导致编码氨基酸的替换, MDR1\*1基因型在人群中最常见, 其次是MDR1\*2, 他一般同时包含了3个多态性, 即12外显子C1236T, 21外显子G2677T和26外显子C3435T, 其中21外显子G2677T是非同义的, 可造成编码蛋白Ala893Ser的替换, 而另外2个多态性则是同义的, 体内及体外实验发现, 与MDR1\*1基因型比较, 在小肠黏膜细胞上表达的MDR1\*2基因型所编码的P-gp具有更强的药物转运能力, 可把口服的P-gp底物泵出细胞, 排到肠腔内, 从而减少对这类口服药物的吸收. 这种MDR1单核苷酸多态性造成的P-gp将药物从细胞内转运到细胞外能力的差异, 势必会影响肿瘤化疗的疗效, 可以预见与MDR1\*1基因型比较, 携带MDR1\*2基因型的患者化疗疗效较差, 且易形成耐药<sup>[10-11]</sup>.

很多研究报道了醌氧化还原酶(NAD(P)H:quinone oxidoreductase, NQO1)基因多态性与发生胃癌危险性之间存在相关性<sup>[12-13]</sup>, Kolesar *et al*在对II/III期非小细胞肺癌生存期的研究中发现NQO1基因的纯合子型SNP的生存期比杂合子型、野生型显著缩短, 同时认为在肺癌化疗敏感性和预后方面, NQO1基因型很重要, 而且可能是治疗非小细胞肺癌的药物遗传学策略的有用组成部分<sup>[14]</sup>.

胃肠道肿瘤的化疗药物中5-氟尿嘧啶(5-Fu)是常用药, 目前临床上也常配合亚叶酸钙进行治疗. Kawakami *et al*研究了在胃肠肿瘤组织中亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)与叶酸库容的关系, 研究表明MTHFR在叶酸的新陈代谢中有重要作用, MTHFR基因型(C667T, Ala/Val-type)与MTHFR的活性密切相关, MTHFR基因型患者可以适合于基于5-FU的化疗, 特别适合于用亚叶酸钙进行补充治疗的针对性治疗策略中.

**2.2 肿瘤非药物治疗相关基因** 肿瘤患者的局部肿瘤对放射的敏感性及其正常组织对放射的反应问题一直受到关注, 科学家已经建立了有效的放疗患者的组织和数据库, 包括精确的放疗剂量和随访. 在对临床预后参数进行仔细的评价后发现, 肿瘤和正常组织对放疗的反应性在不同患者之间明显不同, 而且有证据表明患者对这些反应的差异性至少绝大多数来自于遗传因素. 六个乳腺癌患者放疗后其中三个发展成为严重的纤维化, 而另外三个则没有, 研究表明这是由于成纤维细胞的细胞因子表达谱有内在的不同. Andreassen *et al*报道了41例非选择性乳腺癌患者接受了乳腺切除术后放疗, 检测患者成纤维细胞中五个候选基因的SNPs:XRCC1(密码子399)、XRCQ(密码子241)、APEX(密码子148)、SOD2(密码子16)和TGF- $\beta$ 1(-509,

密码子10和密码子25), 通过这些患者详细的剂量、疗效数据, 建立了量-效反应曲线, 估计急性皮肤反应、皮肤毛细血管扩张和皮下纤维化的增强率. 发现XRCC1(密码子399)基因型和SOD2(密码子16)基因型与放疗诱导的皮下纤维化发生有关;XRCC3密码子241基因型与放疗诱导的皮下纤维化和毛细血管扩张均有关;TGF- $\beta$ 1(密码子10)基因型与放疗诱导的皮下纤维化发生有关TGF- $\beta$ 1(密码子25)基因型与放疗诱导的毛细血管扩张有关. 这些发现支持如下假说:临床正常组织放射敏感性是几个基因变异综合作用的结果, 以多种遗传标记为基础建立起来的量效模式可能对预测放疗后正常组织反应有潜在的价值.

肿瘤易感基因、肿瘤治疗相关基因与基因单核苷酸多态性关系的研究目前正广泛开展, 由于研究条件的差异、研究对象的人种、生活地域的不同、生活习惯的不同等因素使研究结果存在分歧. 同时必须注意到, 并非所有的SNP都有临床意义. 对疾病发生和药物治疗有重大影响的SNP, 估计只占数以百万计SNP的很小一部分. 从数百万存在于整个基因组的SNP, 到导致蛋白质氨基酸编码改变或基因表达调控改变的SNP, 到导致蛋白质体外活力改变的SNP, 到导致药物代谢动力学改变的SNP, 最后到导致临床药物效应改变的SNP, SNP的数目每一步都在快速递减. 怎样从数百万SNP中, 找到确有临床意义的功能性SNP, 是药物遗传学和个体化医学所面临的重大挑战. 因此, 目前尚不足以根据现有的研究来制定防治肿瘤的个体化方案. 今后需构建与肿瘤相关的人类基因信息数据库(包括SNP数据库), 同时发展有效地分析基因分型数据的生物信息学算法, 特别是将SNP数据与肿瘤和致病因素相关的计算方法. 当一个致癌基因被确定后, 我们可以研制针对该基因的有效药物;当多态性和基因表达谱等生物学特性与药物反应密切相关时, 就有望实现针对个体的最优化治疗. cDNA微阵列和高通量SNP筛选技术提供了探测DNA和RNA突变的系统方法, 相信不久的将来肿瘤的个体化医疗将成为现实, 彻底改变目前的抗癌化疗、放疗的状况.

### 3 辨证论治—中医的个体化医疗

随着现代医学的发展, 尤其是基因的问世和“后基因工程”的提出, 科学家预测“个体化”思想可能是未来医学的一种模式, 而且医学界也正在自觉或不自觉地把“个体化”的思想运用于临床. 事实上, “个体化医疗”这个问题在古今中药临床应用中, 可以说在中医诊疗系统的理论产生和发展过程中产生过巨大影响. 从某种角度而言, 中医诊疗系统之所以存在, 其主要价值在于指导中药处方等各种

疗法的选择,以进行治疗.从其产生和发展的过程来看,中医诊疗系统在发展过程中形成了辨病和辨证两个系统,如《金匱要略》、《千金要方》和《外台秘要》等属于辨病系统,《伤寒论》等属于辨证系统.其中辨病的出发点是针对疾病的产生和发展规律,而辨证系统的应用则在一定程度上解决了疾病罹患和发展过程中体质及机体反应性等因素所引起的各种变化规律,即“个体化医疗”的问题.

辨病论治,是在确立疾病诊断之后,根据疾病确立治疗原则.对于比较简单的疾病来说,辨病论治比较容易做到.但是,许多疾病都是比较复杂的过程,在这个过程中,每个阶段的病理变化不尽相同,很难找到一个一成不变的治疗方法.因此,只能根据疾病发展过程中每一阶段的病理状况来确定治疗方针,也就是说,不是单纯根据病,而是结合证来确定治疗方法.因此中医学强调辨证论治.

中医认识和治疗疾病,既辨证又辨病.同一种病,由于致病因素、气候地域、机体反应性的不同,常常表现为不同的证.所以必须在辨病的基础上结合辨证,才能有效地施治.例如胃癌这一疾病,临床中可见到脾胃虚寒型、瘀毒内阻型、胃热伤阴型、痰湿凝结型、气血双亏型等,治疗用方大相径庭.因此,辨证论治既不同于头痛医头、脚痛医脚的对症疗法,又不同于不分阶段和主次,一方一药对一病的治疗方法.

尽管“个体化医疗”问题在一千多年前就引起了中医的重视,无论在医疗理论和方法方面,还是在医药经验积累方面都在解决“个体化医疗”这个问题上形成了独特的优势,并使中医理论形成了一套行之有效的应对体系,即辨证论治体系.但是以中医药理论为基础的辨证论治体系中普遍存在着许多模糊性概念和现象,例如患者的病态信息是模糊信息的综合体.中医诊法中的望、闻、问、切就是模糊信息.这些模糊概念使中医学研究不能定量,不能重复,制约了中医的发展.另外,近年来大多采用从某个局部、某些细胞或某些基因来研究中医的“证”,就好比“瞎子摸象”,难以把握“活着的整体的人”的“证”本质.

生物信息学和后基因组学在肿瘤等复杂疾病的研究中提出:“序列→结构→相互作用→基因调控、蛋白质相互作用网络→功能”的模式,复杂性疾病在大量数据资料的分析处理基础上,正由局部朝向整体,由孤立朝向系统进行研究.中医分析和诊治疾病时,重视人体各脏腑的功能,认为人体外在的表现(症状、体征、舌象和脉象)是脏腑功能改变的反映,这种从宏观、整体的角度研究功能应该与从序列、基因调控等微观研究功能有相关性.从SNP的研

究中可以看出,SNP与人的体质、疾病的易感性、药物的反应性密切相关,而这些也正是中医辨证论治中的重要内容.因此,现代生物科技的发展也为中医药搭建了一个研究平台.

假若我们能运用循证医学和模糊数学的方法将中医的“证”的内涵予以一定程度的量化,将侧重于宏观的中医药学及其诊疗特色与侧重于微观的生物信息学进行有机结合,合理分析高通量的SNP数据,综合多层次信息,用系统的、全局的观念去研究中医证候多层次的现象及其本质,那么不久的将来,中医的个体化治疗—辨证论治,可以与疾病的分子诊断相结合,实现中医治疗理论的现代化.

#### 4 参考文献

- 1 Taningher M, Malacarne D, Izzotti A, Ugolini D, Parodi S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat Res* 1999;436:227-261
- 2 Mohrenweiser HW, Jones IM. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? *Mutat Res* 1998;400:15-24
- 3 汉雨生, 王明荣. 单核苷酸多态性分析技术及其在肿瘤研究中的应用. 国外医学肿瘤学分册 2003;30:189-193
- 4 基因有限公司专家组. 单核苷酸多态性研究前沿及主要技术方法. 生物学教学 2004;29:3-4
- 5 Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1996;49:311-318
- 6 Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung NK, Lovett BD, Nowell PC, Blair IA, Rebbeck TR. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13176-13181
- 7 Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27:383-391
- 8 杨兴升, 关根正幸, 仓田仁, 田中宪一. MRP2基因单核苷酸多态性对晚期卵巢癌铂类化疗敏感性的影响. 实用妇产科杂志 2004;20:153-155
- 9 王佐广, 温绍君, 吴兆苏. 临床药物应用与单核苷酸多态性. 中国医药导刊 2002;4:45-46
- 10 Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among european americans and african americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:189-199
- 11 迟志宏, 刘端祺, 张积仁. CYP 和 MDR1 的单核苷酸多态性对肿瘤化疗疗效的影响. 解放军医学杂志 2003;28:752-753
- 12 Ross D, Traver RD, Siegel D, Kuehl BL, Misra V, Rauth AM. A polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1): relationship of a homozygous mutation at position 609 of the NQO1 cDNA to NQO1 activity. *Br J Cancer* 1996;74:995-996
- 13 Lin P, Wang HJ, Lee H, Lee HS, Wang SL, Hsueh YM, Tsai KJ, Chen CY. NAD(P)H:quinone oxidoreductase polymorphism and lung cancer in Taiwan. *J Toxicol Environ Health A* 1999;58:187-197
- 14 Kolesar JM, Pritchard SC, Kerr KM, Kim K, Nicolson MC, McLeod H. Evaluation of NQO1 gene expression and variant allele in human NSCLC tumors and matched normal lung tissue. *Int J Oncol* 2002;21:1119-1124

# 实时荧光 PCR 研究新进展

施林祥, 李东辉

施林祥, 李东辉, 厦门大学医学院抗癌研究中心 福建省厦门市 361005  
施林祥, 男, 1977-12-29 生, 汉族, 江苏省兴化市人, 2000 年武汉大学病毒学专业本科毕业, 现为厦门大学 2002 级细胞生物学硕士研究生, 主要从事生物医学分子光谱学方面的研究.

国家自然科学基金项目资助, No. 20015005

福建省科技项目, No. 99H048

项目负责人: 李东辉, 361005, 福建省厦门市, 厦门大学医学院抗癌研究中心, dhl@xmu.edu.cn

电话: 0592-2187562 传真: 0592-2186731

收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-01-20

## 摘要

实时荧光 PCR 技术自问世以来, 以其高特异性, 高灵敏性, 可定量, 无污染, 而得到了广泛的应用. 该技术是根据荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 原理, 设计相应的荧光标记核酸探针, 通过 PCR 反应对相应靶 DNA 进行均相定性定量测定的技术. 根据检测中所使用的荧光探针分类, 目前已经开发出 TaqMan, Molecular Beacon, Scorpion, LightCycler, Single-labeled probe, ResonSense, Angler 以及双链探针等相关技术. 本文对该技术的研究进展作一综述.

**关键词:** 荧光探针; 荧光共振能量转移; 实时荧光 PCR

施林祥, 李东辉. 实时荧光 PCR 研究新进展. 世界华人消化杂志 2005;13(5):596-599

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/596.asp>

## 0 引言

1983 年美国 PE-Cetus 公司的 Mullis 博士发明了 PCR 技术, 并于 1985 年公开报道. 1987 年该技术获得了美国的专利权, 并于 1993 年获得了诺贝尔奖. 1992 年 Higuchi 提出了实时 PCR 的设想. 1996 年美国 Applied Biosystems 公司研究出实时荧光定量 PCR 技术. 该技术不仅实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 而且采用了完全闭管检测, 不需 PCR 后处理, 避免了交叉污染. 配以相应的荧光 PCR 仪, 整个 PCR 过程可实现自动化, 且耗时短, 操作方便, 较之传统的定量方法劳动强度小, 易于标准化和推广应用. 因而迅速在医学, 检验检疫, 军事, 农业, 科研等领域得到了推广应用.

## 1 FRET 原理

实时荧光 PCR 技术的关键在于荧光探针的设计. 荧光探针的种类很多, 实现检测的途径也不完全相同, 但其基本原理都是根据荧光共振能量转移原理

(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 设计的. 当一个荧光分子 (供体分子) 的荧光光谱与另一个荧光分子 (受体分子) 的激发光谱相重叠时, 供体荧光分子自身的荧光强度衰减, 受体荧光分子的荧光强度增强, 这种现象即是 FRET. FRET 现象的发生与供、受体分子的空间距离紧密相关, 一般为 7-10 nm 时即可发生. 随着距离的延长, FRET 现象显著减弱. 当 PCR 反应开始后, 根据荧光共振能量转移的原理, 荧光探针的发光基团所发出的荧光强度与 PCR 产物的数量呈对应关系, 因此对荧光信号进行检测就可以实现对 PCR 产物的准确定量.

## 2 荧光 PCR 定量原理

实时荧光 PCR 中有一个很重要的概念, 即 Ct 值. C 代表循环 (Cycle), T 代表阈值 (Threshold). Ct 值是指每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数. 一般取 PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 荧光阈值的缺省设置是 3-15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍. 研究表明, 每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, Ct 值越小. 利用已知起始拷贝数的标准品可做出标准曲线. 因此, 只要获得未知样品的 Ct 值, 即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数.

## 3 荧光 PCR 的新技术

均相荧光 PCR 检测需要在普通 PCR 的基础上加入荧光化合物, 这些荧光化合物广义上可分为嵌入荧光染料和特异性荧光探针两大类型<sup>[1]</sup>. 利用嵌入荧光染料检测只是简单的反映 PCR 反应体系中总的核酸量, 是一种非特异性的检测方法. 这些可与双链 DNA 结合的嵌入型荧光染料包括溴化乙锭、YO-PRO、YOYO、SYBR Green I 及 SYBR Gold<sup>[2]</sup>. 他们和双链结合后发出的荧光比和单链结合后发出的荧光强得多. 这种方法存在的问题是他们不能分辨特异性的 PCR 产物和其他双链 DNA, 如引物二聚体. 因此, 需要在 PCR 后进行熔链曲线分析. 而且利用嵌入荧光染料也不适合进行多重 PCR 分析<sup>[3]</sup>. 为了克服这些缺陷, 人们发展了特异性的荧光探针技术. 特异性荧光探针是把荧光化合物标记到特异性的寡核苷酸上形成荧光标记的 DNA 探针. 通过探针与 PCR 产物特异性的结合, 在 PCR 过程中可对产

物实现均相、实时、定量检测. 同时也适用于多通道检测. 已报道的实时荧光PCR检测系统(如TaqMan、分子信标), 其杂交探针的设计是建立在两种染料-荧光供体和受体之间的能量共振转移的基础上的. 根据荧光基团标记和实现能量共振转移方式的不同, 荧光PCR所用的探针可以分为五大类.

**3.1 TaqMan 探针** TaqMan 探针是一段5'端标记报告荧光基团(R), 3'端标记淬灭荧光基团(Q)的寡核苷酸, 其序列与模板DNA中的一段完全互补(图1). 报告荧光基团(R)如FAM、TET、VIC、JOE、HEX. 淬灭荧光基团为TAMRA(Q). 当探针单独存在时, 由于荧光共振能量转移的发生, R的荧光受到Q的猝灭. 在PCR过程中, 由于Taq DNA酶的5'-3'外切酶活性的作用, 使探针的5'端的R被切断, 加大了与Q的距离而使荧光恢复<sup>[4]</sup>. 另一种荧光探针Single Labeled Probe Technology, 与TaqMan技术类似. 不同之处在于其寡核苷酸探针只有一个荧光发射基团, 该基团是由带有荧光素的铋螯合物构成, 并标记在寡核苷酸探针的5'端, 而3'末端具有2个碱基不与模板配对, 以保证探针的稳定性. 在游离的状态下铋螯合物发出的荧光比连接单链寡核苷酸时强, 当探针退火与模板互补配对时, 在DNA聚合酶的5'-3'外切酶的作用下, 探针被切断铋螯合物发出较强的荧光信号, 从而实现对目的基因的分析.

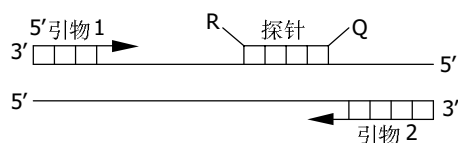


图1 TaqMan™技术原理

**3.2 分子信标** 分子信标技术由Tyagi和Krammer提出. 分子信标长约25个核苷酸, 在空间结构上呈发夹型, 由环茎杆组成(图2). 环序列与靶DNA序列互补, 长约18-20个核苷酸. 茎杆部分长约5-7个核苷酸, 由GC含量较高的与靶序列无关的互补序列构成. 分子信标的5'端标记报告基团, 3'端标记淬灭基团. 当分子信标处于自由状态时, 发夹结构的两个末端靠近使F与Q靠近. F被淬灭. 当有靶序列存在时, 分子信标与靶序列结合, 使分子信标的茎杆区被拉开. 此时R荧光不能被淬灭, 可检测到荧光<sup>[5]</sup>. 常用的荧光-淬灭分子对有Coumarin-DABCYL、EADNS-DABCYL、FAM-DABCYL、TET-DABCYL、TAMRA-DABCYL、TexasRed-DABYCL等. 建立在分子信标技术基础上的探针技术有Amplifluor、Sunrise、Amplisensor、Scorpion<sup>[6-8]</sup>等. 其中Scorpion技术应用广泛. 其设计为在分子信标的3'端通过连接臂

连接一段引物(图3). 扩增出包含发夹结构的PCR产物. 包含发夹结构的PCR产物在退火时形成分子内杂交, 发夹结构被破坏, 两个基团之间发生荧光共振能量转移, 从而发出荧光.

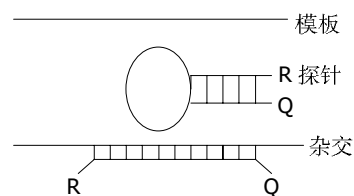


图2 分子信标技术原理

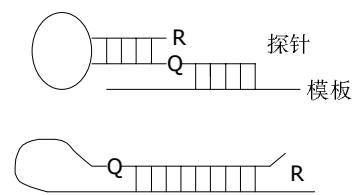


图3 Scorpion 探针技术原理

**3.3 双链探针** 双链探针又称为复合探针, 由互补的两条链构成<sup>[9-10]</sup>. 长链的5'端标记报告基团, 3'端磷酸化, 短链的3'标记淬灭基团(图4). 没有靶核苷酸存在时, 两条链形成复合体, 荧光被淬灭. 当有靶序列存在时, 带有报告荧光基团的长链探针先和靶结合, 发出荧光.

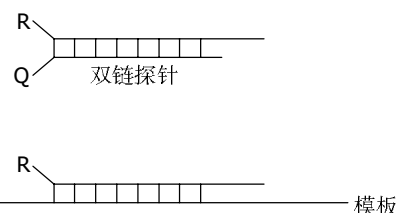


图4 双链探针技术原理

**3.4 杂交探针** 与其他种类的探针相比, 杂交探针比较容易设计, 每段探针是单标记的. 目前有三种设计形式<sup>[11-15]</sup>.

**3.4.1 探针/探针形式** 这种方式由两条相邻的探针构成, 荧光供体标记在一条探针上, 另一条相邻的探针标记一长波长的荧光受体分子(图5). 两条探针均与靶序列特异性结合, 且结合后的两条探针只相隔1-5个碱基. 当PCR退火阶段时, 两条探针均与模板相结合, 供受体荧光之间发生了FRET能量转移, 可以检测到供体荧光强度的减弱, 受体荧光强度的增强. 供受体荧光基团之间的间距为1碱基时最为合理. 在间距为5-10碱基时荧光信号强度降低50%, 但在间距15-25碱基时仍能检测出信号.

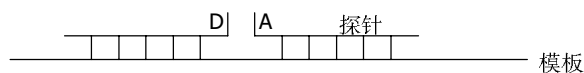


图5 探针/探针技术原理.

3.4.2 引物/探针形式 由一条单标记引物和一条单标记探针构成(图6). 标记引物可用于PCR扩增. 距引物3'端3-6个碱基的T碱基经过修饰可用于荧光染料的标记. 另一条探针的3'端标记相应的荧光可于荧光引物扩增出的链相杂交. 在杂交时供体荧光基团和受体荧光基团在相反的链上相距4-6个碱基.

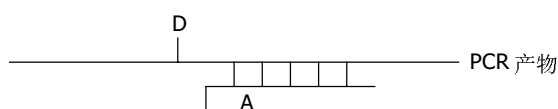


图6 引物/探针技术原理.

3.4.3 G淬灭探针形式(图7) 只用一条单标记的探针. 在杂交时可以观察到荧光的增强或减弱. 例如, 在探针杂交时FAM或BODIPY-FL在接近G核苷酸时可发生荧光淬灭<sup>[16]</sup>. 这种探针可以在3'或5'端标记. 探针设计成标记的荧光化合物与靶DNA上的G重合. 靶DNA上邻近的G会增强淬灭的效果. 但第一个位置重叠的G是最重要的.

以上的杂交探针, 5'端标记者其3'端必须磷酸化以阻止在PCR中链的延伸. 在杂交探针中供体荧光基团可采用FAM、FITC, 受体可采用LC-RED640、CY5、LC-RED705.

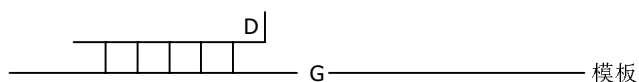


图7 G淬灭探针技术原理.

3.5 单标记荧光探针与双链嵌入染料相结合的检测模式 DNA嵌入剂可以用作荧光供体或受体. 供体可以用SYBR-GREEN I、SYBR-GOLD, 受体可用CY5或CY5.5. 在退火阶段, SYBR-GOLD DNA嵌入剂结合到产生的探针-模板DNA双螺旋里作为荧光供体, 和探针上的受体基团产生FRET作用受体产生荧光. 目前已研发出两种相关技术ResonSense、Angler<sup>[17-18]</sup>. ResonSense和Angler相类似不同在于探针部分的设计. ResonSense探针部分为单标记探针. Angler为一段探针序列通过一段化学连接头和引物相连, 扩增出包含Angler结

构的PCR产物. 退火时形成分子内杂交, 探针上的受体染料基团就会和嵌入DNA双螺旋的荧光供体基团(染料嵌入剂)SYBR-GOLD相作用而产生荧光.

除以上各种荧光探针外, 一些探针如Light-UP、Cyclicons、LUX<sup>[19-21]</sup>见之报道. 从目前国内外的科研及临床应用情况来看, 以TaqMan, 分子信标, Scorpion以及杂交探针应用较为广泛. 在国内外已开发成功并投放市场的PCR检测试剂盒中, 所运用的主要是TaqMan、分子信标以及杂交探针这三种技术. Scorpion是一种改进型的分子信标<sup>[22]</sup>. 由于其工作原理是扩增后的单个分子内的杂交, 因此有着更好的动力学和热力学特性. 相比上述三种需分子间杂交的探针, Scorpion杂交速度极快, 更适合快速热循环PCR. 但是由于其合成的难度比较高, 价格比较昂贵, 限制了其广泛的应用. 目前对TaqMan技术的改进也在进行中, Dmitri Proudinkov将淬灭剂从链3'端移至链的中间, 可以将灵敏度提高30倍以上. 同时一种可代替FAM的新的荧光染料Alexa Fluor 488及非荧光和金属淬灭剂也已应用于TaqMan技术, 可使其灵敏度进一步提高.

#### 4 实时荧光PCR技术的应用

4.1 病原体的定量监测及治疗药效评价 荧光PCR定量范围极宽, 可以准确定量出 $10^3$ 至 $10^8$ 个拷贝数的病原体, 具有重要的临床诊断价值<sup>[23-24]</sup>. 以乙肝为例, 表面抗原强阳性的患者血清中可测得高达每毫升 $10^5$ - $10^8$ 的病毒颗粒, 随着治疗的进程, 病毒拷贝数逐步降低, 部分患者完全治愈后, 血清中病毒数量便测不出. 多数患者在抗原转阴后, 血清PCR反应仍呈阳性, 常规PCR无法得出治愈与否的判定, 而采用荧光定量PCR则可以测到每微升血清含 $10$ - $1\,000$ 个病毒颗粒. 据此, 可建立乙肝治愈的分子诊断标准. 目前已广泛用于丙肝病毒、人类乳头瘤病毒、结核杆菌和食品中大肠杆菌等许多病原体的检测.

4.2 基因的点突变及单核苷酸多态性(SNP)分析 人的部分疾病是由基因的点突变引起的如人的地中海贫血病, 因此对相关基因的检测具有重要意义. 基因点突变的检测基于两条探针, 一条探针横跨突变位点, 另一条为锚定探针, 与无突变位点的靶序列杂交. 两条探针用两种不同的发光基团标记. 如靶序列中无突变, 探针杂交便完全配对, 如有突变, 则探针与靶序列不完全配对, 会降低杂交体的稳定性, 从而降低其熔解温度. 这样便可对基因的突变和多态性进行分析.

4.3 肿瘤基因的检测和诊断 肿瘤基因的病理性扩增可产生过量的表达蛋白如乳腺癌组织C-erbB-2表达阳性率可达50%左右, p53阳性也在50%左右, 还可表现

为基因拷贝数的增加和转录产物 mRNA 的增加, 这两种变化都可通过荧光PCR的方法进行检测. 肿瘤基因的检测中主要检测以下几种常见癌基因 C-erbB2、c-myc、N-myc、K-ras、int2、N-ras、Mdm2、C-fas、K-sam、Met.

4.4 DNA指纹及个体识别 人的肌红蛋白小卫星基因,  $\beta$ -珠蛋白基因、apob 等基因具有多态性而且在不同的个体中其重复次数也是有差异的. 这种基因的多态性和重复次数的差异性已被应用于个体识别、亲子关系鉴定及法医物证. 其灵敏度已达到可以从一根头发、一个细胞、一个精子取得具有个体特征的 DNA 指纹图谱, 目前其应用领域已发展到骨髓、器官移植配型及动物遗传种系的研究中.

4.5 转基因产品的检测 随着现代生物技术的发展, 转基因食品已逐步进入普通百姓的生活. 由于转基因食品所具有的潜在非安全性, 食品的检测越来越引起各国政府和有关食品监督机构的重视, 基于转基因食品所含特异 DNA 片段的荧光 PCR 检测方法已广泛应用于食品的检测. 目前主要检测转基因作物中特有的启动子 35S、终止子 NOS、耐除草剂基因 EPSPS 和抗虫基因 CryIA (b) 等转基因成分, 以确定是否为转基因产品.

荧光 PCR 技术自建立以来, 发展迅速、应用广泛, 表明其具有强大的生命力. 近些年来, 许多科研工作者基于荧光 PCR 的基本原理对荧光 PCR 技术进行不断深入的研究和改进, 使荧光 PCR 技术得到了进一步地完善, 并在此基础上开发出了许多新的荧光 PCR 技术. 随着荧光PCR技术的不断发展该技术将在生物学和医学基础研究、农业、疾病诊断、新药开发、食品、环保等广泛的领域中得到更加广泛的推广应用.

## 5 参考文献

- 1 杨祥宇, 宋健, 冯荣秀. 荧光标记染料. 化学通报 2003;9:615-620
- 2 Hernandez M, Esteve T, Prat S, Pla M. Development of real-time PCR systems based on SYBR® Green I, Amplifluor™ and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. *J Cereal Sci* 2004;39:99-107
- 3 Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KSJ. Real-Time Multiplex PCR Assays. *METHODS* 2001;25:430-442
- 4 Proudnikov D, Yuferov V, Zhou Y, LaForge KS, Ho A, Kreek MJ. Optimizing primer-probe design for fluorescent PCR. *J Neuroscience Methods* 2003;123:31-45
- 5 Broude NE. Stem-loop oligonucleotides: a robust tool for molecular biology and biotechnology. *TRANSD Biotechnol* 2002;20:249
- 6 Schweitzer B, Kingsmore S. Combining nucleic acid amplification and detection. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:21-27
- 7 Saha BK, Tian B, Bucy RP. Quantitation of HIV-1 by real-time PCR with a unique fluorogenic probe. *J Virol Met* 2001;93:33-42
- 8 Rickert AM, Borodina TA, Kuhn EJ, Lehrach H, Sperling S. Refinement of single-nucleotide polymorphism genotyping methods on human genomic DNA: amplifluor allele-specific polymerase chain reaction versus ligation detection reaction-TaqMan. *Analytical Biochemistry* 2004;330:288-297
- 9 Wang SQ, Wang XH, Chen SH, Guan W. A New fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique. *Analytical Biochemistry* 2002;309:206-211
- 10 Kong DM, Huang YP, Zhang XB, Yang WH, Shen HX, Mi HF. Duplex probes: a new approach for the detection of specific nucleic acids in homogenous assays. *Analytic Chimica Acta* 2003;491:135-143
- 11 Pals G, Young C, Mao HS, Worsham MJ. Detection of a single base substitution in a single cell using the LigheCycler. *J Biochem Biophys Methods* 2001;47:121-129
- 12 Hnatyszyn HJ, Podack ER, Young AK, Seivright R, Spruill G, Kraus G. The use of real-time PCR and fluorogenic probes for rapid and accurate genotyping of newborn mice. *Mol Cell Probes* 2001;15:169-175
- 13 Kraus G, Cleary T, Miller N, Seivright R, Young AK, Spruill G, Hnatyszyn HJ. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Mol Cell Pro* 2001;15:375-383
- 14 Steffensen R, Hoffmann K, Varming K. Rapid genotyping of *MBL2* gene mutations using real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *J Immunol Met* 2003;278:191-199
- 15 Bernard PS, Pritham GH, Wittwer CT. Color multiplexing Hybridization probes using the apolipoprotein E locus as a model system for genotyping. *Anal Biochem* 1999;273:221-228
- 16 Crockett AO, Wittwer CT. Fluorescein-Labeled oligonucleotides for Real-Time PCR: Using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. *Anal Biochemi* 2001;290:89-97
- 17 Lee AL, Siddle RH, Page RH. ResonSense: simple linear fluorescent probes for quantitative homogeneous rapid polymerase chain reaction. *Analytic Chimica Acta* 2002;457:61-70
- 18 Punia P, Cane P, Teo CG, Saunders N. Quantitation of hepatitis B lamivudine resistant mutants by real-time amplification refractory mutation system PCR. *J Hepatol* 2004;40:986-992
- 19 Isacson J, Cao H, Ohlsson L, Nordgren S, Svanvik N, Westman G, Kubista M, Sjoback R, Sehlsted U. Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. *Mol Cell Pro* 2000;14:321-328
- 20 Svanvik N, Stahlberg A, Sehlstedt U, Sjoback R, Kubista M. Detection of PCR products in real time using Light-up probes. *Anal Biochem* 2000;287:179-182
- 21 Kandimalla ER, Agrawal S. 'Cyclicons' as hybridization-based fluorescent primer-probes: synthesis, properties and application in real-time PCR. *Bioorg Med Chem* 2000;8:1911-1916
- 22 Taveau M, Stockholm D, Spencer M, Richard I. Quantitation of splice variants using molecular beacon or scorpion primers. *Anal Biochemi* 2002;305:227-235
- 23 Aliyu SH, Aliyu MH, Salihu HM, Parmar S, Jalal H, Curran MD. Rapid detection and quantitation of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using a new fluorescent (FRET) detection system. *J Clinical Virol* 2004;30:191-195
- 24 Saukkoriipi A, Palmu A, Kilpi T, Leinonen M. Real-time quantitative PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear fluid of children with acute otitis media. *Mol Cell Probes* 2002;16:385-390

# 口咽胃肠道环境对 Der p2-rBCG 行为的影响

史皆然, 师长宏, 吴昌归, 张金山

史皆然, 吴昌归, 第四军医大学西京医院呼吸内科 陕西省西安市 710032  
师长宏, 第四军医大学基础部微生物学教研室 陕西省西安市 710032  
张金山, 第四军医大学基础部组织胚胎学教研室 陕西省西安市 710032  
史皆然, 男, 1966-09-21 生, 山东省蓬莱市人, 汉族, 2003 年第四军医大学医学博士毕业, 副主任医师, 副教授, 主要从事过敏性哮喘发病机理的研究。国家自然科学基金资助项目, No. 30370626

项目负责人: 史皆然, 710033, 陕西省西安市长乐西路 127 号, 第四军医大学西京医院呼吸内科。sjr196698@163.net  
电话: 029-83375237 传真: 029-83374512  
收稿日期: 2004-12-27 接受日期: 2005-01-13

## Influence of oral cavity and gastrointestinal tract environment on Der p2-rBCG biological behavior

Jie-Ran Shi, Chang-Hong Shi, Chang-Gui Wu, Jin-Shan Zhang

Jie-Ran Shi, Chang-Gui Wu, Department of Respiratory Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Chang-Hong Shi, Department of Microbiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Jin-Shan Zhang, Department of Histology and Embryology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30370626

Correspondence to: Jie-Ran Shi, Department of Respiratory Diseases, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. sjr196698@163.net

Received: 2004-12-27 Accepted: 2005-01-13

## Abstract

**AIM:** To investigate the influence of oral cavity and gastrointestinal tract environment on the biological behavior of recombinant *Bacillus Calmette-Guerin* (rBCG) that expresses with allergen Der p2 after oral inoculation.

**METHODS:** Four groups of 6 to 8 week old Balb/c mice were vaccinated orally with 100  $\mu$ L of  $10^9$  CFU with natural BCG or three kinds of rBCGs. The BCG CFU was counted in several tissue (oral pharyngeal lymphoid tissues (OLT), gut associated lymphoid tissues (GALT), spleen, lung and liver) and feces from the inoculated Balb/c mice at different time after inoculation. The DNA and mRNA of Der p2 gene in various tissue were identified by PCR and RT-PCR, respectively.

**RESULTS:** All three kinds of rBCGs were observed in mucosal-associated lymphoid tissues, indicating that they could penetrate the mucosa of oral cavity and gastrointestinal tract. The Der p2 gene was expressed by rBCG in above tissues.

**CONCLUSION:** It is suggested that the oral cavity and gastrointestinal tract environment does not interrupt rBCG expressed Der p2 from inducing immune response after oral inoculation.

**Key Words:** Oral cavity; Gastrointestinal tract; Der P2-rBCG; Biological behavior

Shi JR, Shi CH, Wu CG, Zhang JS. Influence of oral cavity and gastrointestinal tract environment on Der p2-rBCG biological behavior. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):600-603

## 摘要

**目的:** 观察口服接种过敏原基因(Der p2)重组(r)BCG 口咽胃肠道环境对 Der p2-rBCG 行为的影响。

**方法:** 以野生 BCG 为对照, 给予 Balb/c 小鼠口服接种三种方式(分泌、胞壁和胞内)表达 Der p2 的 rBCG  $1 \times 10^9$  CFU, 连续 5 d, 计数不同时间粪便、口咽淋巴组织(OLT)、消化道相关淋巴组织(GALT)以及肝脏、脾脏和肺脏中 BCG 的细菌数;用 PCR 和内参照 RT-PCR 法测定由 rBCG 携带入各组织中的 Der p2 存在和表达状况。

**结果:** 三种 rBCG 均可通过口咽和胃肠道黏膜, 进入黏膜相关淋巴组织;各淋巴组织中的 rBCG 仍能表达其所携带的外源基因, 并在各淋巴组织中表达外源蛋白。

**结论:** rBCG 口服免疫后口咽胃肠道环境对 rBCG 生物学行为所产生的影响并不妨碍诱导理想的免疫应答。

**关键词:** 口咽; 胃肠道; Der p2-rBCG; 生物学行为

史皆然, 师长宏, 吴昌归, 张金山. 口咽胃肠道环境对 Der p2-rBCG 行为的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(5):600-603

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/600.asp>

## 0 引言

采用 BCG 或 rBCG 调节宿主的非特异性和特异性免疫应答, 用于相关疾病的防治是国内外研究热点<sup>[1]</sup>. 我们以往的研究显示, ip 接种可表达过敏原的重组 BCG 能诱导 Balb/c 小鼠产生过敏原特异性的 Th1 优势应答, 对过敏性疾病防治有利. 然而, 分支杆菌抗原和其菌体成分的特殊性, 使得重复注射接种会引起宿主强烈的不良反应, 给强化免疫带来困难. 口咽胃肠道作

为机体开放的门户, 拥有数量和面积巨大的免疫组织, 因而免疫学潜能极大; 口服接种 rBCG 较注射免疫在许多方面具有优势. 鉴于此, 我们采用口服途径免疫 Der p2-rBCG 于 Balb/c 小鼠, 通过检测口咽消化道不同部位相关淋巴组织和主要脏器中 rBCG 的数量, 以及 rBCG 在各组织中表达 Der p2 的情况, 以评价口咽胃肠道环境对 Der p2-rBCG 行为的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** BCG D2-PB302S 甲 10 株 (Pasteur 1173 属) 由第四军医大学基础部微生物教研室保存; 分泌型 (SEC)、胞壁型 (CW) 和胞内型 (IC) Der p2 重组 BCG 为作者构建<sup>[2-3]</sup>. SPF 级雌性 6-8 周龄 BALB/c 小鼠 32 只, 由第四军医大学实验动物中心提供, 分为 4 组. 动物免疫前夜禁水, 次日晨分别给予 100  $\mu$ L ( $\times 10^{13}$  CFU/L) 用 100 mL/L 甘油混悬的胞内、胞壁和胞外分泌三种方式表达 Der p2 的 rBCG 和 BCG 口服接种, 随后再给予 30 g/L NaHCO<sub>3</sub> 50  $\mu$ L, 连续 5 d. 分别接种 BCG 或 rBCG 于 200 mL 7H9 (含 ADC) 于 37℃ 培养至  $A = 1.2A_{600U}$ , 以大肠杆菌为参照, 用比浊法进行定量. 将适量培养物原液用 100 mL/L 甘油洗涤 2 次, 根据所测定的细菌密度, 按接种要求将各组培养物用 100 mL/L 甘油稀释成  $10^{13}$  CFU/L. 分别于末次免疫后 2, 14, 28 和 56 d 处死小鼠, 无菌分离每只小鼠的口咽淋巴组织 (OLT, 包括下颌下腺、腺体周淋巴结和颈淋巴结)、消化道相关淋巴组织 (GALT, 包括派伊尔结、肠系膜淋巴结)、脾脏、双肺和肝脏, 一部分进行组织学检查, 另一部分放于无菌的离心管中, 称重后加入生理盐水 5 mL/g. 匀浆后备用.

**1.2 方法** 分别于首次免疫后 1, 6, 8, 10, 14, 28 和 56 d 收集各组小鼠粪便, 用 2 g/L 孔雀绿和 30 g/L NaOH 处理, 再用 20 mL/L HCl 中和, 14 470 g 离心后, 用生理盐水 1 000  $\mu$ L 稀释沉淀, 取 200  $\mu$ L 涂布于 7H11 琼脂平板. 涂皿的平板于 37℃ 培养 18 d 后计数 BCG 的 CFU. 另取匀浆组织液 200  $\mu$ L, 涂布于 7H11 琼脂平板. 于 37℃ 培养 18 d 后计数 BCG 的 CFU. 将上述涂皿后剩余的 OLT, GALT 和脾脏组织匀浆物液分成 2 份, 参照文献和 Trizol RNA 提取操作指南抽提总 DNA 和 mRNA. 所得总 DNA 用 RNase 消化; 以所得 mRNA 作模板, 按 AMV-RTase 说明, 以 OligodT<sub>18</sub> 为引物进行反转录. 参照 Taq 酶说明以总 DNA 和反转录产物为模板, 用 Der p2 的正反向引物行 PCR, 反转录系统用  $\beta$ -actin 作内参照. 产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色 (10 mg/L). RT-PCR 电泳图像用 Dual wavelength Flying spot Scanner CS 9000 型薄层扫描仪 (岛津公司, 日本) 扫描后于计算机上分

析扩增后 Der p2 和  $\beta$ -actin DNA 的荧光强度, 计算 D/ $\beta$  之比.

## 2 结果

**2.1 粪便和组织中 BCG 细菌计数** 各组小鼠口服免疫后次日即开始在粪便中出现, 5 次免疫后达到高峰, 随后开始下降, 随时间延长粪便中 BCG 数量递减, 至首次免疫后 14 d 各组小鼠粪便中 BCG 消失 (表 1). 无论 BCG 还是三种 rBCG 以活菌形式从粪便种排出, 一方面说明消化道环境对 BCG 的生存影响不大; 另一方面提示, 从口腔到直肠整个消化道黏膜都接触到了活的 BCG 或 rBCG, 这就有可能使 BCG 或 rBCG 与消化道的免疫组织相互作用, 使得经消化道免疫成为可能. 小鼠口服免疫后次日即可在多种组织中检测到 BCG 或 rBCG, 14 d 达高峰, 随后开始下降, 至 56 d 后淋巴结、脾、肺和肝脏中已检测不到 BCG 或 rBCG (表 2). 这说明消化系统和肺脏均获得了 BCG 或 rBCG 免疫刺激作用.

表1 不同时间粪便中 BCG 计数 ( $\times 10^4$  CFU)

Day	BCG	Der p2-rBCG		
		SEC	CW	IC
1	2.36 $\pm$ 0.78	3.15 $\pm$ 1.32	2.67 $\pm$ 0.83	4.03 $\pm$ 1.56
6	511.33 $\pm$ 131.25	752.41 $\pm$ 237.34	681.53 $\pm$ 178.43	558.76 $\pm$ 145.91
8	37.23 $\pm$ 27.95	1.61 $\pm$ 42.15	79.13 $\pm$ 55.59	77.44 $\pm$ 37.53
10	6.66 $\pm$ 5.89	7.97 $\pm$ 6.05	8.63 $\pm$ 5.72	5.51 $\pm$ 5.38
14	0	0	0	0
28	0	0	0	0
56	0	0	0	0

**2.2 Der p2 在接种动物组织中的表达** 以三种重组 BCG 免疫 14 d 小鼠的 OLT, GALT 所抽提的 DNA 为模板, 用 Der p2 的正反向引物行 PCR, 均扩增得到了约 390 bp 的 Der p2 基因 (图 1), 说明在这些组织中含有携带 Der p2 基因的 BCG, 即各种 BCG 均能穿过黏膜上皮, 进入口咽-消化道相关淋巴组织; 此外, 在脾脏和肝

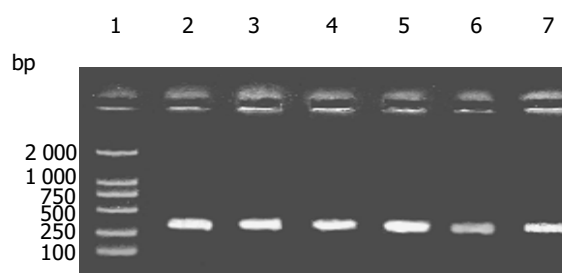


图1 口服三种重组 BCG 免疫 14 d 后 BALB/c 小鼠 OLT、GALT 和中 rBCG 中外源基因的鉴定. 1: Marker; 分别以 2 和 3: rBCG-SEC 组 OLT 和 GALT、4 和 5: rBCG-CW 组 OLT 和 GALT、6 和 7: rBCG-IC 组 OLT 和 GALT 的 DNA 为模板经用 Der p2 引物行 PCR 扩增得到约 390 bp 的 Der p2 基因.

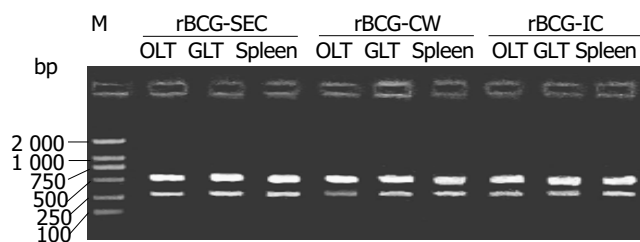


图2 口服三种重组BCG免疫14 d后BALB/c小鼠OLT、GALT和脾脏组织中rBCG外源基因的表达。M: Marker; 分别以rBCG-SEC组、rBCG-CW组和rBCG-IC组小鼠之OLT、GALT和脾脏的RNA为模板经RT-PCR, 均得到约390 bp的Der p2基因和540 bp的 $\beta$ -actin基因。

脏组织中也扩增出Der p2基因, 进一步提示各种BCG完全能够通过血行途径进入全身各系统, 达到刺激全身免疫的作用。提取各组动物三种淋巴组织(OLT, GALT和脾脏)的mRNA, 经RT-PCR均可扩增得到Der p2基因(图2), 说明携带Der p2的BCG在各组织中处于存活状态, 外源基因稳定地存在于BCG体内, 并且能够表达, 这对于诱导外源抗原特异性的免疫应答至关重要。rBCG在各组织中外源基因的表达量有所不同(图3), 一方面与rBCG在各组织中的含量有关, 另一方面在不同组织中受到免疫系统作用的强度也有所不同。

### 3 讨论

BCG作为分支杆菌的代表, 是迄今为止最安全、最稳定的疫苗之一, 因其在分子遗传学和免疫学上的许多优点而倍受重视。1990年代以来, 国内外许多学者发现, 以BCG作为载体制备外源基因重组疫苗, 既可诱发以特异性细胞毒T细胞活化为主的细胞免疫, 又

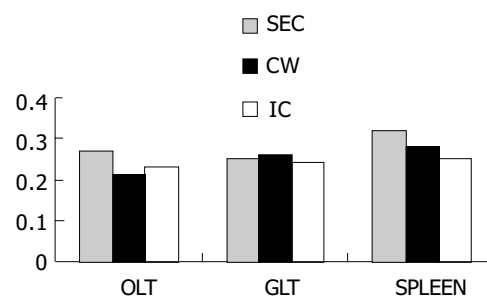


图3 不同rBCG携带入各组织中的Der p2表达定量。结果为Der p2和 $\beta$ -actin RT-PCR产物荧光亮度之比。

可以诱发以特异性抗体产生为主的体液免疫。根据不同的调节目的, rBCG成为各种相关疾病防治研究的重要手段, 并因此而成为热点<sup>[1-3]</sup>。已有的研究显示其被广泛用于病毒、细菌和寄生虫感染的防治、肿瘤治疗、以及自身免疫性疾病防治等方面的研究, 取得了令人振奋的结果<sup>[4-8]</sup>。既往我们尝试利用过敏原重组的BCG防治哮喘, 研究发现, 采用ip接种屋尘螨过敏原(Der p2)-rBCG可明显抑制Der p2诱导的Th2应答, 提示rBCG在过敏性疾病防治方面具有巨大的开发价值。

近年来, 绝大多数研究所采用的接种方式多为注射(静脉、皮下、腹腔、鼻黏膜等), 这些免疫途径所诱导的免疫应答各有不同, 为相关疾病的有效治疗提供了较多的选择<sup>[9]</sup>。然而, 分支杆菌抗原和其菌体成分的特殊性, 使得接种后所获得的免疫保护时间较短, 而短期内重复注射具有强烈的不良反应, 给强化免疫带来困难。鉴于BCG在调节免疫方面的优点和近年所取得的成果, 如何高效、特异地诱导重要疾病抗原的保护性免疫备受关注。消化道黏膜

表2 不同组织中BCG计数( $\times 10^4$ CFU)

		OLT	GALT	Lung	Spleen	Liver
BCG	2	10.35 $\pm$ 3.01	9.52 $\pm$ 2.13	4.76 $\pm$ 1.38	8.07 $\pm$ 2.19	3.58 $\pm$ 0.77
	14	74.25 $\pm$ 8.75	85.39 $\pm$ 14.76	63.45 $\pm$ 8.59	95.86 $\pm$ 15.73	43.18 $\pm$ 5.43
	28	32.12 $\pm$ 6.33	29.54 $\pm$ 9.36	5.85 $\pm$ 2.39	42.49 $\pm$ 10.27	12.34 $\pm$ 4.26
	56	0	0	0	0	0
rBCG-SEC	2	13.26 $\pm$ 2.43	8.87 $\pm$ 1.95	6.48 $\pm$ 1.92	11.23 $\pm$ 3.53	5.77 $\pm$ 1.12
	14	94.16 $\pm$ 12.35	71.67 $\pm$ 11.22	49.37 $\pm$ 6.58	93.46 $\pm$ 10.13	53.39 $\pm$ 9.84
	28	26.92 $\pm$ 4.65	33.23 $\pm$ 8.19	8.35 $\pm$ 3.27	34.91 $\pm$ 8.94	10.16 $\pm$ 3.75
	56	0	0	0	0	0
rBCG-CW	2	8.52 $\pm$ 2.84	10.36 $\pm$ 2.17	7.35 $\pm$ 2.61	9.42 $\pm$ 3.13	5.93 $\pm$ 1.09
	14	76.18 $\pm$ 9.64	83.57 $\pm$ 11.63	57.39 $\pm$ 6.95	86.49 $\pm$ 11.92	46.34 $\pm$ 4.53
	28	36.65 $\pm$ 8.74	28.18 $\pm$ 7.83	9.69 $\pm$ 3.12	44.67 $\pm$ 13.85	9.64 $\pm$ 3.78
	56	0	0	0	0	0
rBCG-IC	2	6.95 $\pm$ 2.67	7.56 $\pm$ 1.43	5.15 $\pm$ 1.62	6.56 $\pm$ 1.38	5.18 $\pm$ 1.07
	14	73.16 $\pm$ 8.37	81.66 $\pm$ 10.34	54.39 $\pm$ 6.26	81.32 $\pm$ 12.62	47.52 $\pm$ 4.61
	28	26.25 $\pm$ 4.83	25.44 $\pm$ 6.51	7.68 $\pm$ 2.42	37.33 $\pm$ 9.18	10.54 $\pm$ 3.16
	56	0	0	0	0	0

面积巨大(约 400  $\text{m}^2$ , 200 倍于皮肤表面), 解剖学结构、免疫细胞和免疫应答分子机制与外周免疫系统迥然不同. 免疫细胞的数量比其他免疫器官的总和还要多, 因而是最大的免疫器官. 有人已经观察到 rBCG 经消化道接种诱导了强烈的局部和全身抗原特异性细胞免疫应答, 具有对结核<sup>[10]</sup>和人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的防治作用<sup>[11]</sup>. 这表明, 口服摄入后, BCG 本身的一些特性(抗酸、胞壁脂质含量高)使其能够穿过消化道全长, 抵抗不利因素如胃酸和酶的降解. 更重要的是, 有研究发现经消化道黏膜免疫可以抑制由纯蛋白衍生物(PPD)引起的迟发变态反应(DTH), 从而明显减少重复接种引起的不良反应<sup>[12]</sup>. 本研究表明: 三种 rBCG 均可通过口咽和胃肠道黏膜, 进入黏膜相关淋巴组织, 甚至在全身播散. 存在于小鼠淋巴组织和各脏器中的 rBCG 仍然能持续表达其所携带的外源基因, 从而提供持久的免疫刺激和佐剂作用, 对于诱导特异性 T 细胞应答具有重要意义. 因此, 有理由相信 rBCG 口服免疫后口咽胃肠道环境对其生物学行为的影响并不妨碍诱导理想的免疫应答.

#### 4 参考文献

- Scanga CB, Le Gros G. Development of an asthma vaccine: research into BCG. *Drugs* 2000;59:1217-1221
- Shi JR, Li Y, Qi HW, Li BH, Fan XL. Construction and identification of the E. coli-BCG shuttle vector expressing lipoprotein Der p2 on cell wall of mycobacterium vaccae. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2003;19:132-135
- 史皆然, 李元, 戚好文, 李别虎, 范雄林. 利用 Hsp 基因调控元件构建胞内表达的 E. coli-BCG 穿梭载体. *中华微生物学和免疫学杂志* 2003;23:629-632
- Winter N, Lagranderie M, Gangloff S, Leclerc C, Gheorghiu M, Gicquel B. Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251nef gene induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice. *Vaccine* 1995;13:471-478
- Nascimento IP, Dias WO, Mazzantini RP, Miyaji EN, Gamberini M, Quintilio W, Gebara VC, Cardoso DF, Ho PL, Raw I, Winter N, Gicquel B, Rappuoli R, Leite LC. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live Bordetella pertussis in mice. *Infect Immun* 2001;69:1976-1982
- Kremer L, Riveau G, Baulard A, Capron A, Loch C. Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant bacillus Calmette-Guerin producing the Schistosoma mansoni glutathione S-transferase. *J Immunol* 1996;156:4309-4317
- Yamada H, Matsumoto S, Matsumoto T, Yamada T, Yamashita U. Murine IL-2 secreting recombinant Bacillus Calmette-Guerin augments macrophage-mediated cytotoxicity against murine bladder cancer MBT-2. *J Urol* 2000;164:526-531
- Yasutomi Y, Koenig S, Haun SS, Stover CK, Jackson RK, Conard P, Conley AJ, Emini EA, Fuerst TR, Letvin NL. Immunization with recombinant BCG-SIV elicits SIV-specific cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys. *J Immunol* 1993;150:3101-3107
- Grode L, Kursar M, Fensterle J, Kaufmann SH, Hess J. Cell-mediated immunity induced by recombinant mycobacterium bovis Calmette-Guerin strains against an intracellular bacterial pathogen: importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy. *J Immunol* 2002;168:1869-1876
- Aldwell FE, Tucker IG, de Lisle GW, Buddle BM. Oral delivery of Mycobacterium bovis BCG in a lipid formulation induces resistance to pulmonary tuberculosis in mice. *Infect Immun* 2003;71:101-108
- Kawahara M, Hashimoto A, Toida I, Honda M. Oral recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin expressing HIV-1 antigens as a freeze-dried vaccine induces long-term, HIV-specific mucosal and systemic immunity. *Clin Immunol* 2002;105:326-331
- Hoft DF, Brown RM, Belshe RB. Mucosal Bacilli Calmette-Guérin vaccination of humans inhibits delayed-type hypersensitivity to purified protein derivative but induces mycobacteria-specific interferon- $\gamma$  responses. *Clin Infect Dis* 2000;30(Suppl 3):S217-222

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 断奶前后仔猪胃组织中 ghrelin 基因表达及内源性生长抑素的作用

杜改梅, 石志敏, 韦习会, 张 磊, 赵茹茜

杜改梅, 石志敏, 韦习会, 张磊, 赵茹茜, 南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室 江苏省南京市 210095

杜改梅, 女, 1976-06-12 生, 山西省右玉县人, 汉族. 2003 年南京农业大学博士生.

国家自然科学基金资助项目, No. 30270975

项目负责人: 赵茹茜, 210095, 江苏省南京市, 南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室. lapb@njau.edu.cn

电话: 025-84395047

收稿日期: 2004-12-21 接受日期: 2004-01-14

## Expression of ghrelin mRNA in gastric tissue of weaning piglets and the role of endogenous somatostatin

Gai-Mei Du, Zhi-Min Shi, Xi-Hui Wei, Lei Zhang, Ru-Qian Zhao

Gai-Mei Du, Zhi-Min Shi, Xi-Hui Wei, Lei Zhang, Ru-Qian Zhao, Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30270975

Correspondence to: Ru-Qian Zhao, Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China. lapb@njau.edu.cn

Received: 2004-12-21 Accepted: 2005-01-14

## Abstract

**AIM:** To study the expression of ghrelin mRNA in gastric tissue of weaning piglets, to investigate the correlation between relative gastric growth and fundus expression of ghrelin mRNA in weanling piglets, and to study the role of endogenous somatostatins.

**METHODS:** Eighteen litters of newborn piglets were divided randomly to control and treatment groups. From 12 days of age, piglets in treatment group were fed with starter diet supplemented with 120 mg cysteamine to deplete endogenous somatostatin (SS). Piglets were weaned on the 35<sup>th</sup> day of age (d35) in both groups. 6 piglets from each group were slaughtered on d28, d35, d36.5, d38, d42 and d45, respectively. A semi-quantitative RT-PCR was applied to detect the level of ghrelin mRNA in gastric fundus and antrum with 18S rRNA as an internal standard.

**RESULTS:** Ghrelin mRNA was detected in both fundus and antrum, which was more abundant in fundus than in antrum. Ghrelin mRNA expression in fundus exhibited a

trend of increase from d38 to d45, reaching a peak on d45. Cysteamine significantly increased the level of ghrelin mRNA expression on d35, d36.5 and d38.

**CONCLUSION:** Ghrelin is involved in the regulation of gastric growth, and endogenous somatostatin downregulates ghrelin expression.

**Key Words:** Ghrelin; Somatostatins; Piglets; Gastric tissue

Du GM, Shi ZM, Wei XH, Zhang L, Zhao RQ. Expression of ghrelin mRNA in gastric tissue of weaning piglets and the role of endogenous somatostatin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(5):604-607

## 摘要

**目的:** 研究仔猪断奶前后胃组织中 ghrelin 基因表达和其对胃组织发育性变化的影响, 同时对内源性生长抑素的作用也进行了研究.

**方法:** 实验选取新生仔猪 18 窝, 随机分为实验组和对照组, 自 12 d 起, 对照组饲喂基础乳猪料, 实验组在基础日粮中添加 120 mg 半胱胺, 以耗竭内源性生长抑素, 两组仔猪均于 35 d 断奶. 分别于 28, 35, 36.5, 38, 42 和 45 d 随机选取实验组和对照组仔猪各 6 头, 屠宰, 称量胃重和体重并采集胃底和胃窦黏膜, 用 RT-PCR 方法, 以 18S rRNA 作内标, 定量分析胃底和胃窦组织中 ghrelin mRNA 的丰度.

**结果:** 胃底 ghrelin mRNA 的丰度明显高于胃窦部; 胃底 ghrelin mRNA 水平在 35 和 36.5 d 较低, 随后逐渐增加. 45 d ghrelin mRNA 水平显著高于 35, 36.5 和 38 d ( $P<0.05$ ); 半胱胺能提高胃底 ghrelin mRNA 表达, 其中 35, 36.5 和 38 d 时试验组 ghrelin mRNA 表达显著高于对照组 ( $P<0.05$ ).

**结论:** Ghrelin 能直接或间接作用于胃组织, 调节胃的生长, 表明 Ghrelin 与胃的形态和功能发育具有密切的关系; 内源性生长抑素可抑制胃底 ghrelin mRNA 的表达.

**关键词:** ghrelin 基因; 生长抑素; 仔猪; 胃组织

杜改梅, 石志敏, 韦习会, 张磊, 赵茹茜. 断奶前后仔猪胃组织中 ghrelin 基因表达及内源性生长抑素的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13(5):604-607  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/604.asp>

## 0 引言

生长素(ghrelin)是1999年发现的一种含有28个氨基酸残基的多肽,他主要由胃黏膜的一种内分泌细胞分泌<sup>[1]</sup>.近年来,许多学者用放射免疫法(RIA)、免疫组织化学法和分子生物学方法在人和大鼠上对 ghrelin 及其受体进行了一些研究,发现 ghrelin 可以促进胃酸分泌和胃肠运动<sup>[2-3]</sup>.

研究表明,胃功能发育缓慢,胃酸分泌不足是导致仔猪腹泻的重要原因之一<sup>[4]</sup>,那么 ghrelin 是否参与仔猪断奶前后胃的生长和功能发育的调节?为了研究这一问题,首先必须对断奶前后仔猪胃组织中 ghrelin 基因表达的动态变化有所了解,而迄今关于仔猪胃组织中 ghrelin 基因表达的研究尚未见报道.生长抑素(SS)也是一种产生于胃泌酸区的肽类物质,是胃酸分泌的强抑制剂,他以旁分泌的方式抑制许多胃肠道肽类激素的分泌<sup>[5]</sup>.半胱胺(cysteamine, CS)能破坏 SS 半胱氨酸残基上的二硫键,使 SS 生物活性丧失<sup>[6]</sup>.研究表明,半胱胺(Cysteamine, CS)不仅能迅速降低大鼠下丘脑、胃和十二指肠的 SS-14 的免疫活性和生物活性,而且对 SS mRNA 的表达也有直接或间接的抑制作用<sup>[7]</sup>.大鼠的免疫组化实验表明,SS 免疫反应细胞与 ghrelin 免疫反应细胞相接触,静脉注射 SS 可降低血清 ghrelin 的浓度<sup>[8]</sup>,那么半胱胺是否可能影响断奶仔猪胃组织中 ghrelin 基因的表达?这个问题迄今也未见相关的研究报道.鉴此,我们采用相对定量 RT-PCR 方法,研究仔猪断奶前后胃组织中 ghrelin 基因表达的发育性变化和半胱胺对 ghrelin mRNA 表达的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 反转录酶(MMLV)、DNA 聚合酶(Taq)、RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor),购自 Promega 公司;18S(内标),购自 Ambion RNA 公司.PCR 仪(Gene Amp PCR system 9600 型)为美国 Perkins Elmer 公司产品;电泳凝胶成像系统(1D Electrophoresis Documentation and analysis System 120)为美国 Kodak 公司产品.

1.2 方法 选取2或3胎次的经产新淮母猪18头,分娩后随机分为试验组和对照组各9窝.实验期间,仔猪自由吮乳和饮水,按常规程序进行免疫.仔猪12 d开始饲喂全价乳猪料;实验组仔猪饲料中添加120 mg 半胱胺.两组仔猪均于35 d断奶.分别于28, 35, 36.5, 38, 42和45 d随机选取对照组和试验组仔猪各6头,屠宰,迅速采取胃底和胃窦黏膜组织,置液氮速冻, -70℃冷冻保存.采用异硫氰酸胍—酚—氯仿一步法提取胃底和胃窦黏膜组织总RNA.用紫外分光光度

计测定总RNA浓度(260 nm),并通过变性琼脂糖凝胶电泳检验总RNA的质量.用随机引物 Random hexamer primer 对所有样品的RNA进行RT,获得各样品RNA的cDNA(RT product).RT反应总体积25  $\mu$ L,包括2  $\mu$ g总RNA,20 U RNA酶抑制剂,100 U MMLV 反转录酶,5  $\mu$ L 5 $\times$ RT buffer(含250 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 375 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L DTT),0.4 mmol/L dNTP,4  $\mu$ mol/L 随机引物.先加RNA模板,dNTP和随机引物,75℃变性5 min,立即放在冰上冷却,再加其余试剂37℃反应60 min,95℃灭活5 min. ghrelin 引物根据 GenBank (AF308930)提供的猪 preproghrelin mRNA 的全序列设计.上游引物序列为:5' -TCCTCATGGCAGACTTGG-3',下游引物序列为:5' -TGGTCTCAGGGACAATCAC-3' 由大连宝生物工程公司合成,预期PCR产物长度为326 bp.采用18S rRNA作内标,并用混合样品(待测样品等比例混合)分别对PCR反应条件、循环圈数以及目的基因引物和18S引物的比例等进行优化,来建立最佳反应条件和校正不同批次间RT和PCR效率的差异.PCR反应体积25  $\mu$ L,含模板(RT产物)2  $\mu$ L,0.5 U Taq DNA聚合酶,5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR Buffer(含50 mmol/L Tris-HCl pH9.0,100 mmol/L NaCl,1.0 mmol/L DTT,0.1 mmol/L EDTA,500 mL/L glycerol,10g/L Triton X-100),0.2 mmol/L dNTP,1.0-2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.7  $\mu$ mol/L 目的基因引物,1.0-2.2  $\mu$ L 18S rRNA 内标.PCR扩增条件为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃复性30 s,72℃延伸40 s,共25个循环;72℃延伸10 min.25个循环时,18 s和目的基因的PCR产物均在线性扩增范围.每个样品作2次重复,同时用ddH<sub>2</sub>O和RNA样品分别取代RT产物作对照,以检验是否有外源和基因组DNA污染.取20  $\mu$ L PCR产物在20 g/L的琼脂糖凝胶上电泳,EB染色.用Kodak 1D图像分析系统分析条带灰度,根据目的基因 ghrelin 和内标18S PCR产物的灰度比,确定样品中 ghrelin mRNA表达的相对含量.

**统计学处理** 所有数据用平均值 $\pm$ 标准误表示.采用SPSS 11.0统计软件统计,差异显著性检验采用独立样本 *t* 检验和单因子方差分析(one way ANOVA, LSD).

## 2 结果

仔猪在断奶后胃的相对质量呈逐渐升高趋势,38 d以前胃的发育均较为缓慢,42 d后胃的发育迅速增加,45 d时达到高峰,此时胃的相对质量明显高于28,35和36.5 d的胃相对质量.与对照组相比,日粮添加半胱胺的胃相对质量没有发生显著性变化(图1).

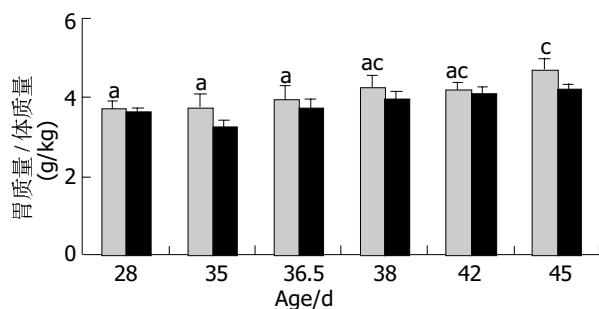


图1 仔猪断奶前后胃相对质量变化,  $^aP<0.05$ ,  $^cP<0.05$ .

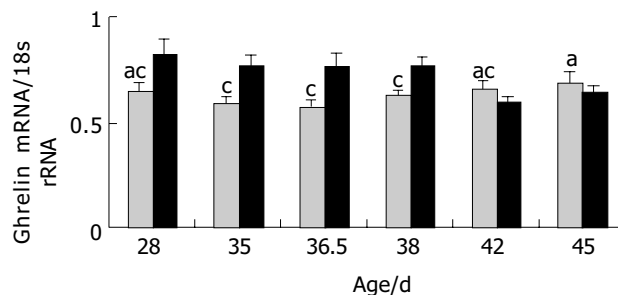


图4 仔猪断奶前后胃组织中 ghrelin mRNA 的表达,  $^aP<0.05$ ,  $^cP<0.05$ .

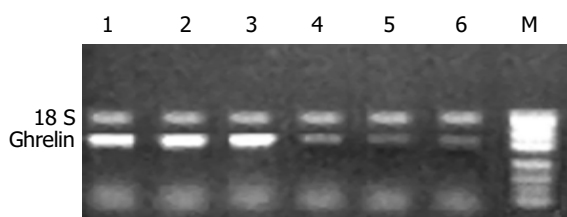


图2 断奶仔猪胃黏膜组织中 ghrelin mRNA 的表达. 1-3 胃底; 4-6 胃窦; M: DNA 分子质量标记.

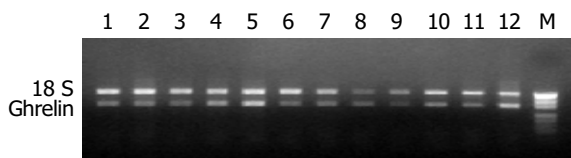


图3 仔猪断奶前后胃底组织 ghrelin mRNA 的 RT-PCR 电泳图. 1-6: 对照组 28-45 d; 7-12: 试验组 28-45 d; M: DNA marker PUC19.

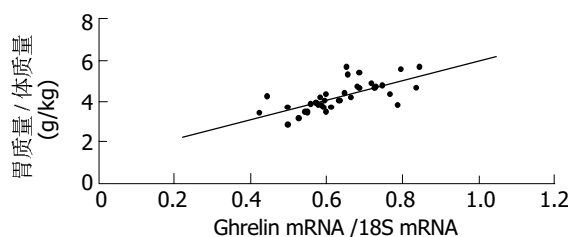


图5 胃的相对质量与断奶前后仔猪胃底 ghrelin mRNA 表达相关分析.

2.1 胃黏膜 ghrelin mRNA 表达 Ghrelin 在仔猪胃底和胃窦黏膜均有分布, 且胃底黏膜 Ghrelin mRNA 的丰度明显高于胃窦黏膜(图2).

2.2 Ghrelin mRNA 表达的发育性变化及半胱胺的作用 仔猪胃底 ghrelin mRNA 表达在断奶后呈下降趋势, 断奶后 35 和 36.5 d 时仔猪胃底 ghrelin mRNA 相对丰度较低, 随后逐渐上升, 45 d 胃底 ghrelin mRNA 丰度显著高于 35, 36.5 和 38 d ( $P<0.05$ ). 与对照组相比, 日粮添加半胱胺提高了胃底 ghrelin mRNA 的相对丰度, 且在 35, 36.5 和 38 d 时试验组胃底 ghrelin mRNA 的相对丰度明显高于对照组(图3, 4).

2.3 胃的相对质量与胃底黏膜组织 ghrelin mRNA 基因表达的相关性分析 胃的相对质量变化与胃底组织 ghrelin mRNA 表达的发育性变化相关性分析表明(图5), 胃的相对质量变化与胃底组织 ghrelin mRNA 表达的发育性变化呈中等正相关, 相关系数为  $R = 0.424$  ( $P<0.01$ ).

### 3 讨论

Ghrelin 是一种刺激摄食和促进生长激素释放的酰基

化肽, 在大鼠和人中, 他主要由胃的分泌黏膜的内分泌细胞分泌, 运用大鼠 ghrelin N 末端片段的多克隆抗体, 发现了奶牛和山羊胃中也有与 ghrelin 有免疫反应的细胞分布<sup>[9]</sup>. 运用 RT-PCR 方法证明, ghrelin mRNA 广泛分布于人体的各种组织中, 如胃底、小肠、胃窦、胰腺、膀胱和肺脏等组织<sup>[10]</sup>. 从研究报道中发现, 目前关于 ghrelin 的研究主要集中在人和大鼠身上, 而对猪特别是断奶仔猪的研究较少. 我们以断奶前后的仔猪为实验对象, 运用 RT-PCR 方法发现 ghrelin 不仅分布于胃底泌酸区黏膜, 而且也分布于胃窦, 但胃窦的 ghrelin mRNA 丰度明显低于胃底部, 这提示 ghrelin 可能参与胃酸分泌的调节. 大鼠的放射免疫测定发现, ghrelin 不仅分布于胃的泌酸区域, 而且也分布于胃窦和十二指肠<sup>[11]</sup>. Kojima *et al*<sup>[12]</sup> 用原位杂交的方法证实, 表达 ghrelin mRNA 的细胞密集分布于胃部泌酸腺的颈部至底部. 我们的研究结果均与以上结果相一致.

目前关于 Ghrelin 对胃的生长和功能发育影响的研究报道较少, 并且大多集中在 ghrelin 对胃酸分泌和胃肠运动的研究方面. 关于 ghrelin 对仔猪胃组织发育性变化的影响尚未见研究报道. 我们通过 RT-PCR 方法检测到仔猪断奶前后胃底黏膜 ghrelin mRNA 的表达呈年龄依赖性变化趋势, 且 ghrelin mRNA 的发育性变化和胃的相对质量变化模式呈中等正相关. Ghrelin 在胃肠道具有和 motilin 类似的促进胃排空作用. 动物实验显示, 外源性的 ghrelin 可以增加胃酸分泌和胃蠕动. 通过免疫组化和放射免疫法发现, 在大鼠胃中 ghrelin 免疫反应细胞随着年龄的变化而

发生变化, 且随着胃的发育, 细胞数目不断增多, 胃腺区的 ghrelin 量也增加<sup>[13]</sup>. Date *et al*<sup>[14]</sup> (2001) 研究发现, ghrelin 通过作用于中枢神经系统而调节胃酸分泌, 他们给予小鼠脑室内注射 ghrelin, 引起小鼠剂量依赖性的胃酸分泌, 迷走神经切断或给予阿托品后, 能阻断 ghrelin 引起的胃酸分泌增多. 给大鼠 iv ghrelin 可引起剂量依赖性的胃酸分泌增多, 胃收缩增强, 胃排空加快<sup>[15]</sup>. Trudel *et al*<sup>[16]</sup> 报道小鼠实验中 ghrelin 和 Des[Gln(14)] ghrelin 可促进胃和小肠排空, 并有效地缓解手术后引起的肠梗阻, 而在这一过程中大剂量的 motilin 或红霉素都无效. Sibilía *et al*<sup>[17]</sup> 报道 ghrelin 具有中枢性保护胃黏膜作用. 在小鼠模型中, 使用 ghrelin 可有效的控制由酒精引起的胃溃疡, 并呈剂量相关. 对于进食异常或手术后胃肠功能恢复缓慢的患者, ghrelin 将可能成为一个有效的治疗手段. 以上研究结果表明, Ghrelin 对胃的生长和功能发育有着重要的调节作用. 然而 Dornonville de la Cour *et al*<sup>[18]</sup> (2004) 对大鼠的实验研究证明, ghrelin 对胃酸分泌没有任何促进或抑制作用, 但静脉或脑室内注射 ghrelin 可促进胃排空. 可见目前关于 ghrelin 对胃酸分泌的作用仍存在分歧, 这可能与 ghrelin 的处理剂量, 给药途径以及评价胃酸分泌的方法等有关. 研究表明, 胃内生长抑素表达高的仔猪在断奶前胃酸分泌较少. 在我们的研究结果中, 断奶前后 ghrelin mRNA 的年龄依赖性变化趋势与血清中 GH 和垂体 GH mRNA 表达相一致; 而且 ghrelin 表达的发育性变化与相同日龄仔猪的胃生长抑素 mRNA 的表达趋势相同 (未发表), 提示 ghrelin 可能直接或间接作用于胃组织, 调节胃的生长和胃酸分泌, 这也证明了 Ghrelin 与胃的形态和功能发育具有密切的关系.

Ghrelin 的合成和分泌受到许多因素的调节, 那么, 内源性 SS 是否参与 ghrelin 基因表达的调节? 我们采用半胱胺耗竭内源性 SS, 发现断奶仔猪胃底黏膜 ghrelin mRNA 的表达丰度明显高于对照组. 在分离的大鼠胃中, GLP-1, Gastrin, Insulin, Somastostain 和 GIP 等都对胃 Ghrelin 的分泌具有调节作用, 其中 SS 对 ghrelin 分泌的调节作用较受关注, 然而研究主要集中在外源性 SS 的作用, 如在给予外源性生长抑素后 ghrelin 诱导的 GH 分泌被部分阻断; 静脉注射 SS 可降低大鼠血清 ghrelin 的浓度<sup>[8]</sup>. 对大鼠的免疫组化实验表明, SS 免疫反应细胞与 ghrelin 免疫反应细胞相接触<sup>[8]</sup>. 本研究结果提示内源性 SS 也具有抑制 ghrelin mRNA 表达的作用, 而其调节机制还有待于进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 De Ambrogi M, Volpe S, Tamanini C. Ghrelin: central and peripheral effects of a novel peptidyl hormone. *Med Sci Monit* 2003;9:RA217-RA224
- 2 Papotti M, Cassoni P, Volante M, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E. Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5052-5059
- 3 Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1300-1308
- 4 张宏福, 杨富林, 杨琳. 断奶仔猪消化道酸度及其调控研究进展. *中国畜牧杂志* 2002;38:51-52
- 5 陈元方, Yamada T. 胃肠肽类激素基础与临床. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997:257-266
- 6 高顺宾, 吴天星. 新型饲料添加剂一半胱胺的作用机制及其对动物生产性能的影响. *中国畜牧杂志* 2002;38:48-49
- 7 Papachristou DN, Liu JL, Patel YC. Cysteamine-induced reduction in tissue somatostatin immunoreactivity is associated with alterations in somatostatin mRNA. *Regul Pept* 1994;49:2372-2447
- 8 Shimada M, Date Y, Mondal MS, Toshinai K, Shimbara T, Fukunaga K, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Yoshimatsu H, Matsuo H, Nakazato M. Somatostatin suppresses ghrelin secretion from the rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302:520-525
- 9 Hayashida T, Murakami K, Mogi K, Nishihara M, Nakazato M, Mondal MS, Horii Y, Kojima M, Kangawa K, Murakami N. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domest Anim Endocrinol* 2001;21:17-24
- 10 Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2988
- 11 Dornonville dl C, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Hakanson R. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* 2001;99:141-150
- 12 Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: a novel growth-hormone releasing peptide. *Nippon Rinsho* 2001;59:1400-1407
- 13 Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001;142:788-794
- 14 Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:904-907
- 15 Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:905-908
- 16 Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, Bouin M, Plourde V, Eberling P, Poitras P. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G948-G952
- 17 Sibilía V, Rindi G, Pagani F, Rapetti D, Locatelli V, Torsello A, Campanini N, Deghenghi R, Netti C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology* 2003;144:353-359
- 18 Dornonville de la Cour C, Lindstrom E, Norlen P. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept* 2004;120:23-32

# 大黄素和黄连素对 2 型糖尿病大鼠胃肠动力的影响

杨禄红, 陆付耳, 董 慧, 徐丽君, 王开富

杨禄红, 陆付耳, 董慧, 徐丽君, 王开富, 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

杨禄红, 女, 1973-6-8 生, 汉族, 1997 年湖北中医学院本科毕业, 2002-  
2005 年华中科技大学同济医学院硕士研究生, 主要从事中西医结合治疗内  
分泌和代谢性疾病的研究。

国家自然科学基金项目, No. 30371816

项目负责人: 陆付耳, 430030, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 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. felu@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-83662577 传真: 027-83646605

收稿日期: 2004-12-07 接受日期: 2004-12-16

## Effect of emodin and berberine on gastrointestinal motility in type 2 diabetic rats

Lu-Hong Yang, Fu-Er Lu, Hui Dong, Li-Jun Xu, Kai-Fu Wang

Lu-Hong Yang, Fu-Er Lu, Hui Dong, Li-Jun Xu, Kai-Fu Wang, Institute  
of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji  
Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and  
Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by Natural Science Foundation of China. No. 30371816

Correspondence to: Dr Fu-Er Lu, Institute of Integrative Traditional  
Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College,  
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei  
Province, China. felu@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2004-12-07 Accepted: 2004-12-16

## Abstract

**AIM:** To compare the effects of emodin and berberine on the gastrointestinal motility of type 2 diabetic rats and to investigate their mechanisms.

**METHODS:** Seventy-two male Wistar rats were randomly divided into six groups, i.e., control, model, emodin, berberine, emodin plus berberine, and cisapride groups. Murine type 2 diabetes model was induced by intravenous injection of a small dose of streptozotocin plus high fat high caloric laboratory chow. The rats were treated with emodin, berberine, emodin plus berberine, or cisapride for 10 weeks. 10% mixed fluid of Arabic gum and charcoal powder was given to the animals by lavage to measure the gastrointestinal propulsive index before sacrifice. The blood glucose and serum triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) were determined by biochemical methods. Plasma and tissue levels of substance P (SP), somatostatin (SS), vasoactive intestinal polypeptide (VIP) were determined using radioimmunoassay.

**RESULTS:** In the mice treated with emodin, berberine, or

emodin plus berberine, blood glucose ( $8.87 \pm 1.3$ ,  $7.9 \pm 1.2$ ,  $7.7 \pm 1.3$ ), serum TG ( $0.57 \pm 0.39$ ,  $0.61 \pm 0.22$ ,  $0.59 \pm 0.27$ ) and TC ( $1.79 \pm 0.58$ ,  $1.85 \pm 0.42$ ,  $1.70 \pm 0.62$ ) were significantly lower than those in model group ( $10.3 \pm 1.7$ ,  $1.47 \pm 0.45$ ,  $2.18 \pm 0.17$  for glucose, TG and TC, respectively,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The murine gastrointestinal propulsive index in model group was decreased remarkably as compared with normal group ( $52.3 \pm 7.9$  vs  $60.7 \pm 12.5$ ,  $P < 0.01$ ), while those in emodin and emodin plus berberine groups were significantly elevated in comparison with model group ( $63.4 \pm 9.9$ ,  $62.7 \pm 5.7$  vs  $52.3 \pm 7.9$ ,  $P < 0.01$ ). In contrast, the index in berberine group was even lower than that in model group ( $46.5 \pm 8.7$ ,  $P < 0.05$ ). Compared with normal group, plasma and intestine levels of SS and VIP (SS:  $18.7 \pm 6.5$ ,  $47.8 \pm 14.8$ ; VIP:  $26.5 \pm 6.5$ ,  $28.8 \pm 12.3$ ) in model group were significantly raised ( $P < 0.01$ ), while plasma SP ( $35.6 \pm 6.5$ ) was decreased and tissue SP ( $70.6 \pm 20.7$ ) was increased significantly ( $P < 0.01$ ). In comparison with model group, plasma and intestine levels of SS and VIP (SS:  $15.5 \pm 3.6$ ,  $14.6 \pm 5.6$ ; VIP:  $26.5 \pm 6.5$ ,  $28.8 \pm 12.3$ ) in emodin and emodin plus berberine groups were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), but plasma SP levels in both groups were significantly increased ( $44.2 \pm 5.9$ ,  $45.2 \pm 6.6$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Berberine inhibits, while emodin promotes the gastrointestinal motility in type 2 diabetic rats. The combined application of both drugs not only reduces blood glucose and adjusts lipid profile, but also improves the gastrointestinal motility. The enhancement of the gastrointestinal motility by emodin might be partially explained by its rectification of the aberrant expression of gastrointestinal hormones.

**Key Words:** Emodin; Berberine; Gastrointestinal motility; Type 2 diabetes

Yang LH, Lu FE, Dong H, Xu LJ, Wang KF. Effect of emodin and berberine on gastrointestinal motility in type 2 diabetic rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):608-611

## 摘要

**目的:** 探讨大黄素和黄连素对 2 型糖尿病大鼠模型胃肠动力的影响及其机制。

**方法:**  $\delta$  Wistar 大鼠 72 只随机分为正常组、模型组、大黄素组、黄连素组、大黄素加黄连素组以及西沙比利

组. 以小剂量链脲佐菌素(STZ)加高糖高脂饲料诱导大鼠2型糖尿病模型, 并分别以大黄素、黄连素、大黄素加黄连素、西沙比利灌胃干预治疗10 wk. 处死动物前用100 g/L活性炭及阿拉伯树胶混悬液灌胃检测大鼠的胃肠推进指数(GPI);常规检测血糖以及血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C), 并用放免法检测大鼠血浆和肠组织生长抑素(SS)、血管活性肠肽(VIP)、P物质(SP)含量.

**结果:** 大黄素组、黄连素组以及大黄素加黄连素组的血糖( $8.87 \pm 1.3$ ,  $7.9 \pm 1.2$ ,  $7.7 \pm 1.3$ )、血清TG( $0.57 \pm 0.39$ ,  $0.61 \pm 0.22$ ,  $0.59 \pm 0.27$ )、TC( $1.79 \pm 0.58$ ,  $1.85 \pm 0.42$ ,  $1.70 \pm 0.62$ )均较模型组(分别为 $10.3 \pm 1.7$ ,  $1.47 \pm 0.45$ ,  $2.18 \pm 0.17$ )显著下降( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ). 模型组与正常组比较胃肠推进指数显著降低( $52.3 \pm 7.9$  vs  $60.7 \pm 12.5$ ,  $P < 0.01$ ), 大黄素组和大黄素加黄连素组的胃肠推进指数较模型组显著提高( $63.4 \pm 9.9$ ,  $62.7 \pm 5.7$  vs  $52.3 \pm 7.9$ ,  $P < 0.01$ ), 而黄连素组胃肠推进指数较之则显著下降( $46.5 \pm 8.7$ ,  $P < 0.05$ ). 模型组血浆和肠组织SS( $18.7 \pm 6.5$ ,  $47.8 \pm 14.8$ ), VIP( $40.8 \pm 11.4$ ,  $2.84 \pm 1.34$ )较正常组显著升高, 血浆SP( $35.6 \pm 6.5$ )显著降低, 组织SP( $70.6 \pm 20.7$ )显著升高( $P < 0.01$ );而大黄素组以及大黄素加黄连素组SS( $15.5 \pm 3.6$ ,  $14.6 \pm 5.6$ ), VIP( $26.5 \pm 6.5$ ,  $28.8 \pm 12.3$ )较模型组( $18.7 \pm 6.5$ ,  $40.8 \pm 11.4$ )显著降低( $P < 0.01$ ), 血浆SP( $44.2 \pm 5.9$ ,  $45.2 \pm 6.6$ )显著上升, 组织SP( $57.6 \pm 12.6$ ,  $60.5 \pm 12.8$ )显著下降( $P < 0.01$ ).

**结论:** 黄连素抑制2型糖尿病大鼠的胃肠动力, 而大黄素则能提高其胃肠动力;二药合用不仅更加有效降糖和调脂, 仍显示出较强的促进胃肠运动的作用. 大黄素能纠正部分胃肠激素的异常表达, 并可能是其促进2型糖尿病大鼠胃肠动力的机制之一.

**关键词:** 大黄素; 黄连素; 胃肠动力; 2型糖尿病

杨禄红, 陆付耳, 董慧, 徐丽君, 王开富. 大黄素和黄连素对2型糖尿病大鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志. 2005;13(5):608-611  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/608.asp

## 0 引言

糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis)以及肠功能紊乱是糖尿病常见的慢性并发症, 在晚期糖尿病患者中高达75%, 并且以胃肠动力不足为其主要特征<sup>[1-2]</sup>. 目前, 对本病的治疗主要以西药为主, 如西沙必利、多潘立酮(吗叮啉)、红霉素等<sup>[3-8]</sup>. 近年来, 中药治疗糖尿病及其并发症在临床及基础研究方面均取得了很大进展, 黄连素和大黄素降糖降脂以及改善胰岛素抵抗和糖尿病微血管病变的作用已获得较多实验研究<sup>[9-12]</sup>的支持. 传统医学认为小剂量大黄具有“推陈致新, 通利水谷, 调中化食, 安和五脏”(本经)的功效. 我们

在以往对黄连素治疗2型糖尿病大鼠的实验研究中观察到治疗组的大鼠出现进食减少、大便秘结的现象. 现将黄连素和大黄素分别应用以及合用于2型糖尿病大鼠模型来进一步研究其对糖尿病大鼠胃肠动力的影响, 并同时测定胃肠激素生长抑素(SS)、血管活性肠肽(VIP)、P物质(SP)在血浆和组织的表达情况, 初步探讨其机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂清洁级Wistar大鼠72只, 质量 $200 \pm 20$  g, 购自华中科技大学同济医学院实验动物中心. 链脲佐菌素(STZ)购自美国Sigma公司;血糖测定仪及试纸由强生公司提供;SS, SP, VIP放射免疫检测试剂盒由北京海科锐生物试剂公司提供. 血糖、血脂试剂盒为浙江东瓯生物制品有限公司生产. 大黄素纯度为84%, 由广州炬展公司提供;西沙必利片为西安杨森公司生产;黄连素片为成都亨达制药厂生产.

**1.2 方法** 随机选取10只大鼠作为正常组(NOR), 其余大鼠均以30 mg/kg剂量iv 0.01 mmol/L枸橼酸缓冲液配制的STZ溶液, 并在1 wk之后给予高糖高脂饲料(按大鼠普通饲料:猪油:白糖:奶粉:鸡蛋 = 63:20:30:4:2比例制成). 2 wk后经口服葡萄糖耐量试验(OGTT)选取糖耐量异常大鼠53只随机分为模型组(MOD)、大黄素组(EMO)、黄连素组(BER)、黄连素加大黄素组(B&E)、西沙必利组(CIS). 模型组以PBS 5 mL/kg灌胃;大黄素配制成8 g/L混悬液, 黄连素配制成20 g/L混悬液, 黄连素和大黄素混合溶液按每升8 g大黄素加20 g黄连素配制, 西沙必利配制成3 g/L混悬液. 每组均按5 g/L容积灌胃. 处死大鼠前禁食12 h. 大鼠处死前30 min用含有100 g/L活性炭和100 g/L阿拉伯树胶的混悬液灌胃(10 mL/kg). 以30 g/L戊巴比妥钠(2 mL/kg)ip麻醉, 将大鼠小肠全段剪取, 平铺于滤纸上量取小肠长度和墨粉经过的长度, 依照公式<sup>[13]</sup>计算胃肠通过指数.

$$\text{大鼠胃肠推进指数} = \frac{\text{碳粉前端至幽门括约肌距离 (cm)}}{\text{幽门括约肌至小肠末端距离 (cm)}} \times 100\%$$

腹主动脉取血4 mL注入以肝素钠处理的采血管, 2 000 r/min离心15 min, 并迅速分离血清, 以半自动生化分析仪检测血糖、甘油三脂、总胆固醇和高密度脂蛋白. 腹主动脉取血6 mL, 注入放有100 g/L EDTA- $\text{Na}_2$  90  $\mu\text{L}$ 以及抑肽酶25 MU的一次性试管内, 1 500 r/min低温离心15 min, 取血浆储存于 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱保存待测. 肠组织标本胃肠激素的检测:剪取大鼠胃幽门后2 cm处肠管一段, 约0.3 g, 称质量后

表1 大鼠胃肠推进指数, 血糖和血脂水平(mean±SD, mmol/L)

分组	n	GPI(%)	TG	TC	HDL-C	FBG
BER	12	46.5 ± 8.7 <sup>c</sup>	0.61 ± 0.22 <sup>d</sup>	1.85 ± 0.42 <sup>d</sup>	1.46 ± 0.23 <sup>d</sup>	7.90 ± 1.2 <sup>d</sup>
EMO	10	63.4 ± 9.9 <sup>d</sup>	0.57 ± 0.39 <sup>d</sup>	1.79 ± 0.58 <sup>d</sup>	1.45 ± 0.37 <sup>d</sup>	8.87 ± 1.3 <sup>c</sup>
B&E	10	62.7 ± 5.7 <sup>d</sup>	0.59 ± 0.27 <sup>d</sup>	1.70 ± 0.62 <sup>d</sup>	1.51 ± 0.41 <sup>d</sup>	7.70 ± 1.3 <sup>d</sup>
CIS	11	65.7 ± 7.3 <sup>d</sup>	1.39 ± 0.33	2.14 ± 0.74	1.07 ± 0.32	9.59 ± 1.5
MOD	10	52.3 ± 7.9 <sup>b</sup>	1.47 ± 0.45 <sup>b</sup>	2.18 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.09 ± 0.37	10.3 ± 1.7
NOR	10	60.7 ± 12.5	0.49 ± 0.23	1.62 ± 0.23	1.48 ± 0.14 <sup>d</sup>	6.20 ± 0.7 <sup>d</sup>

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 正常组; <sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01 vs 模型组.

立即投入煮沸的生理盐水中继续煮沸 3 min, 再加 1 mol/L 冰醋酸 1.5 mL 于 4℃ 制成匀浆, 静置 1 h, 再用 1 mol/L NaOH 1.5 mL 中和, 3 000 r/min 低温离心 30 min, 取上清储存于 -20℃ 冰箱保存待测. 用 γ 计数器同批测定血浆和组织中的 SP, SS 和 VIP 含量.

**统计学处理** 所有数据采用 SPSS10.0 软件处理, 计量资料用 mean±SD 表示. 组间比较采用 *t* 检验. 显著性水平为 *P*<0.05.

## 2 结果

**2.1 胃肠推进指数** 与正常组比较, 模型组大鼠胃肠推进指数显著降低 (*P*<0.01). 黄连素组该指标甚则尚显著低于模型组 (*P*<0.01). 大黄素组、大黄素加黄连素组、西沙必利组均显著高于模型组 (*P*<0.01). 大黄素组、大黄素加黄连素组与西沙必利组各组间比较无显著差异. (表 1)

**2.2 血糖和血脂水平** 模型组大鼠血糖、血清 TG、TC 均较正常组显著升高 (*P*<0.01), 而其血清 HDL-C 则显著下降 (*P*<0.01), 说明糖尿病模型复制成功. 黄连素组和大黄素组、大黄素加黄连素组大鼠血糖, TG, TC, HDL-C 均较模型组显著改善 (*P*<0.05 或 *P*<0.01). (表 1)

**2.3 各组胃肠激素水平** 与正常组比较, 模型组大鼠血浆和肠组织 SS、VIP 水平均显著升高 (*P*<0.01), 血浆 SP 水平显著降低 (*P*<0.01). 黄连素组大鼠各胃肠

激素与模型组比较无明显差异. 大黄素组、大黄素加黄连素组、西沙比利组血浆和肠组织 SS, SP 水平和模型组比较差异有显著性 (*P*<0.01). (表 2)

## 3 讨论

大多数糖尿病患者伴有胃肠功能障碍, 如食管动力异常、胃轻瘫、便秘、腹泻和胆囊收缩障碍等, 患病率 7~76%<sup>[14]</sup>. 发生糖尿病胃肠功能紊乱的原因尚不十分明确, 与自主神经病变、高血糖的抑制作用、胃肠激素的失调、病理结构的改变均有一定关系<sup>[15-18]</sup>. 胃肠道的运动受两方面的调节, 即肠神经系统和体液因素. 胃肠激素对二者均有调节作用, 其调节动力改变主要有两个途径: (1) 通过血液循环以内分泌的形式作用于平滑肌细胞相应的受体; (2) 经肽能神经释放神经递质以调节胃肠运动<sup>[19]</sup>. 肽能神经是肠道神经系统 (ENS) 的重要组成部分, 为主要的非胆碱能、非肾上腺能神经, 对胃肠运动的调节起着重要的作用. 已知 ENS 最主要的兴奋性递质是 SP, 而最主要的抑制性递质是 VIP. SS 刺激早期胃排空, 抑制晚期胃排空. 抑制结肠细胞的收缩和胃细胞的松弛. 用 SS 灌流大鼠离体胃发现, SS 抑制胃窦自发性和胃动素介导的胃运动<sup>[20]</sup>, 其作用机制除直接作用于 SS 受体外, 还可能部分通过胃窦局部的前列腺素介导. 另外 SS 还可抑制多种胃肠道激素的分泌以及胃肠道吸收功能<sup>[21]</sup>.

表2 大鼠血浆和肠组织 SS、SP 和 VIP 水平(mean±SD, ng/g)

组别	n	SP		SS		VIP	
		血浆	肠组织	血浆	肠组织	血浆	肠组织
BER	12	36.4±8.7	68.7±15.4	18.7±3.5	47.6±8.7	35.6±6.8	2.87±1.66
EMO	10	44.2±5.9 <sup>d</sup>	57.6±12.6 <sup>d</sup>	15.5±3.6 <sup>d</sup>	38.5±10.6 <sup>d</sup>	26.5±6.5 <sup>d</sup>	2.31±1.42 <sup>d</sup>
B&E	10	45.2±6.6 <sup>d</sup>	60.5±12.8 <sup>d</sup>	14.6±5.6 <sup>d</sup>	40.81±9.7 <sup>d</sup>	28.8±12.3 <sup>d</sup>	2.29±1.54 <sup>d</sup>
CIS	11	44.3±5.6 <sup>d</sup>	55.4±15.7 <sup>d</sup>	15.4±3.2 <sup>c</sup>	42.5±10.4 <sup>c</sup>	38.3±15.6	2.74±1.74
MOD	10	35.6±6.5 <sup>b</sup>	70.6±20.7 <sup>b</sup>	18.7±6.5 <sup>b</sup>	47.8±14.8 <sup>b</sup>	40.8±11.4 <sup>b</sup>	2.84±1.34 <sup>b</sup>
NOR	10	48.7±8.7	54.9±12.4	12.3±5.3	35.9±7.9	20.5±15.6	1.97±1.13

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 正常组; <sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01 vs 模型组.

而SP对肠道是一种兴奋性神经递质,在生理状况下,他可以刺激胃幽门的平滑肌,引起胃排空增强;同时可以刺激小肠、大肠的纵行、环行肌引起收缩,加快通过时间<sup>[22]</sup>.VIP是肠神经系统的抑制性递质,是近端胃容受性舒张所必需的生理调节素<sup>[21, 23]</sup>.其能抑制胃肠电活动,对胃体部节段性收缩及自发性的或乙酰胆碱诱发的幽门收缩均有抑制作用.

降糖降脂中药对于糖尿病动物模型的胃肠动力影响以往研究报道甚少.我们的结果表明,黄连素和大黄素均能显著降低2型糖尿病大鼠血清TG、TC水平,提高HDL-C水平;其中黄连素的降糖作用优于大黄素.二者合用则血糖、血脂各项指标均较模型组有极显著性改善( $P<0.01$ ).在胃肠动力的影响方面,黄连素抑制糖尿病大鼠的胃肠动力,这一结果能解释我们以往实验中大鼠进食减少大便秘结的现象.而大黄素能明显改善糖尿病大鼠的胃肠推进功能的减退,其程度与阳性对照的西沙必利组无明显差异.二者合用仍能显著提高糖尿病大鼠的胃肠推进指数.此外,本结果还显示,糖尿病大鼠血浆和肠组织SS, VIP水平显著上升,而血浆SP水平显著下降,肠组织SP水平显著上升,这与国内外报道相一致<sup>[24-27]</sup>.大黄素能显著提高糖尿病大鼠血浆的SP水平,降低血浆和肠组织的SS和VIP水平.这可能是大黄素改善糖尿病大鼠胃肠推进功能减退的机制之一.黄连素对于三种胃肠激素的影响无显著性意义.

总之,大黄素和黄连素均可以有效地降低2型糖尿病大鼠血糖和调节血脂,大黄素能有效改善糖尿病大鼠胃肠功能障碍.黄连素对糖尿病大鼠的胃肠运动具抑制作用,而合用大黄素则不仅降糖调脂作用更为显著,尚能抵消黄连素对胃肠运动的抑制作用.大黄素和黄连素对2型糖尿病大鼠胃肠动力影响的可能机制与其分别对胃肠激素分泌的不同调节作用有关.

#### 4 参考文献

- 1 张亚萍, 罗金燕, 张宽学. 糖尿病胃肠功能紊乱发病机制及其治疗进展. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:91-93
- 2 Horowitz M, O'Donovan D, Jones KL, Feinle C, Rayner CK, Samsom M. Gastric emptying in diabetes: clinical significance and treatment. *Diabet Med* 2002;19:177-194
- 3 Evans AJ, Krentz AJ. Should cisapride be avoided in patients with diabetic gastroparesis. *J Diabetes Complications* 1999;13:314-315
- 4 Asakawa H, Hayashi I, Fukui T, Tokunaga K. Effect of mosapride on glycemic control and gastric emptying in type 2 diabetes mellitus patients with gastropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2003;61:175-182

- 5 Vandenplas Y, Hauser B, Salvatore S. Current pharmacological treatment of gastroparesis. *J Expert Opin Pharmacother* 2004;5:2251-2254
- 6 陆广华, 滕香宇, 任颖, 范吴强, 周恒, 刘伟. 糖尿病胃动力障碍和促胃动力药的作用. 中华内分泌代谢杂志 2002;3:212-215
- 7 Smith DS, Ferris CD. Current concepts in diabetic gastroparesis. *Drugs* 2003;63:1339-1358
- 8 Chang CT, Shiau YC, Lin CC, Li TC, Lee CC, Kao CH. Improvement of esophageal and gastric motility after 2-week treatment of oral erythromycin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2003;17:141-144
- 9 Gu L, Wan Y, Wan M. Advances in the study on molecular mechanism of diabetic nephropathy treated with Rheum officinale. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2003;28:703-705
- 10 Ye F, Shen Z, Xie M. Alpha-glucosidase inhibition from a Chinese medical herb (*Ramulus mori*) in normal and diabetic rats and mice. *Phytomedicine* 2002;9:161-166
- 11 Li WL, Zheng HC, Bukuru J, De Kimpe N. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol* 2004;92:1-21
- 12 陆付耳, 冷三华, 屠庆年, 徐丽君, 杨明伟, 王开富. 黄连解毒汤与黄连素对2型糖尿病大鼠葡萄糖和脂质代谢影响的比较研究. 华中科技大学学报(医学版) 2002;31:662-665
- 13 乔娴, 刘劲松, 吴汉妮, 侯晓华. 糖尿病大鼠胃肠运动障碍的实验研究. 胃肠病学和肝病学杂志 1998;9:242-244
- 14 Perusicova J. Gastrointestinal complications in diabetes mellitus. *Vnitř Lek* 2004;50:338-343
- 15 柯美云, 蓝宇. 糖尿病胃肠并发症的动力障碍及其机制. 中华内分泌代谢杂志 2003;19:164-165
- 16 Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Vanderwinden JM, Takakura R, Kinoshita K, Miyagawa J, Chen H, Miyazaki Y, Kiyohara T, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus. *Gastroenterol Hepatol* 2002;17:666-670
- 17 Tomi S, Plazinska M, Zagorowicz E, Ziolkowski B, Muszynski J. Gastric emptying disorders in diabetes mellitus. *Pol Arch Med Wewn* 2002;108:879-886
- 18 Tripathi BK. Diabetic gastroparesis. *J Assoc Physicians India* 1999;47:1176-1180
- 19 姜若兰. 几种胃肠激素与胃肠运动的相关性. 胃肠病学 1998;3:156-158
- 20 Farthing MJ. The role of somatostatin analogues in the treatment of refractory diarrhea. *J Digestion* 1996;57(Suppl 1):107-113
- 21 周吕, 柯美云. 胃肠动力学基础与临床. 第1版. 北京: 科学出版社, 1999:137-139
- 22 Peng Y, Lin KW. Inhibition of gastric myoelectric activity and gastric motility by microinjection of substance P into dorsal vagal nucleus in rats. *Shengli Xuebao* 1999;51:557-563
- 23 Evangelista S. Involvement of tachykinin in intestinal inflammation. *Curr Pharm Des* 2001;7:19-30
- 24 Lysy J, Karmeli F, Sestieri M, Yatzkan Y, Goldin E. Decreased substance P content in the rectal mucosa of diabetics with diarrhea and constipation. *Metabolism* 1997;46:730-734
- 25 吴波, 郑长青, 林连捷, 周卓. 糖尿病性胃肠病变患者血浆P物质和胃动素的水平及意义. 世界华人消化杂志 2003;11:367-368
- 26 El-Salhy M, Spangeus A. Gastric emptying in animal models of human diabetes: correlation to blood glucose level and gut neuroendocrine peptide content. *Ups J Med Sci* 2002;107:89-99
- 27 Kunt T, Forst T, Schmidt S, Pflutzner A, Schneider S, Harzer O, Lobig M, Engelbach M, Goitom K, Pohlmann T, Beyer J. Serum levels of substance P are decreased in patients with type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000;108:164-167

# 大鼠肝脏再生过程中细胞标志物演变与骨髓细胞增生

潘孝本, 刘峰, 王松霞, 丛旭, 费然, 陈红松, 高燕, 魏来

潘孝本, 刘峰, 王松霞, 丛旭, 费然, 陈红松, 高燕, 魏来, 北京大学人民医院肝病研究所 北京市 100044

潘孝本, 男, 1975-04-26 生, 浙江省温州市人, 汉族, 北京大学肝病研究所博士研究生。

国家 863 计划资助项目, No. 2001AA216031

项目负责人: 魏来, 100044, 北京市西城区西直门南大街 11 号, 北京大学人民医院肝病研究所。weelai@163.com

电话: 010-68314422-5730 传真: 010-68322662

收稿日期: 2005-01-11 接受日期: 2005-01-26

## Changes of bone marrow cells and cell markers in regenerated liver after partial hepatectomy in rats

Xiao-Ben Pan, Feng Liu, Song-Xia Wang, Xu Cong, Ran Fei, Hong-Song Chen, Yan Gao, Lai Wei

Xiao-Ben Pan, Feng Liu, Song-Xia Wang, Xu Cong, Ran Fei, Hong-Song Chen, Yan Gao, Lai Wei, Institute of Hepatology, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China

Supported by National 863 Project, No.2001AA216031

Correspondence to: Lai Wei, Hepatology Institute, People's Hospital, Peking University, 11 Xizhimeng South Street, Beijing 100044, China. weelai@163.com

Received: 2005-01-11 Accepted: 2005-01-26

## Abstract

**AIM:** To investigate the replication and mobilization of bone marrow (BM) cells in support of liver regeneration, and the alteration of hepatic oval cell markers in the regenerated liver.

**METHODS:** In the Sprague-Dawley (SD) rats receiving 2/3 partial hepatectomy (PHx) with or without 2-acetylaminofluorene (2AAF) treatment, CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> BM cells were measured by flow cytometry. The changes in cell markers of hemopoietic stem cells, hepatic oval cells and hepatocytes in the regenerated liver were determined by fluorescence immunohistochemistry at the indicated time points after PHx.

**RESULTS:** The numbers of CD34<sup>+</sup> and CD45<sup>+</sup> BM cells were increased in both PHx (2-6 d) and PHx+2AAF (2-4 d) rats. CD34 and CD45 co-expressing cells were observed in the regenerated liver sections, which was significantly increased after 2AAF treatment. In the PHx+2AAF rats, the cell markers co-expressed with CD34 exhibited dynamic changes: Thy1.1 appeared first, followed by AFP, vimentin, CK19, and Alb; while Thy1.1, Alb, and CK19 disappeared earlier than AFP and vimentin.

**CONCLUSION:** CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> BM cells replicate during the liver regeneration in rats. The changes of the cell markers co-expressed with CD34 reflect the *in vivo* development of hepatic oval cells.

**Key Words:** Hematopoietic stem cells; Hepatic oval cells; Partial hepatectomy; Liver regeneration.

Pan XB, Liu F, Wang SX, Cong X, Fei R, Chen HS, Gao Y, Wei L. Changes of bone marrow cells and cell markers in regenerated liver after partial hepatectomy in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(5):612-616

## 摘要

**目的:** 为研究大鼠在部分肝切除术后肝再生过程中是否存在骨髓细胞的增生与动员以支持肝脏再生过程, 以及肝卵圆细胞(hepatic oval cells, HOC)在体内细胞标志物的演变过程。

**方法:** SD(Sprague-Dawley)大鼠 81 只, 随机分为 3 组: 2/3 部分肝切除组(partial hepatectomy, PHx)、2/3 部分肝切除加 2-乙酰氨基芴(2-acetylaminofluorene, 2AAF)预处理组(PHx+2AAF)及假手术组, 每组分为 9 小组( $n = 3$ ), 分别于术后 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24 d 采集大鼠骨髓细胞及再生肝组织; 采用 percoll 密度梯度液分离骨髓细胞中的单个核细胞, 并用流式细胞分析技术检测单个核细胞中 CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> 细胞比例; 采用冰冻组织切片技术进行再生肝组织切片, 并用免疫荧光组织化学染色检测再生组织中与 CD34 共表达的部分造血干细胞、肝卵圆细胞及肝细胞的细胞标志物 Thy1.1, CD45, CK19, vimentin, AFP, Alb。

**结果:** 在 PHx 模型中, 流式细胞检测结果显示大鼠骨髓单个核细胞中 CD34<sup>+</sup> 及 CD45<sup>+</sup> 细胞在术后 2, 4, 6 d 与对照组相比增高(分别为  $2.774 \pm 0.166$  vs  $1.903 \pm 0.044$ ,  $P = 0.016 < 0.05$ ;  $3.164 \pm 0.056$  vs  $1.862 \pm 0.057$ ,  $P = 0.002 < 0.01$ ;  $2.708 \pm 0.160$  vs  $1.897 \pm 0.149$ ,  $P = 0.032 < 0.05$ ), 免疫荧光组织化学染色结果示在肝组织中第 4 d 发现少量 CD34, CD45 共表达细胞, 但未检出其他共表达的细胞标志物。在 PHx+2AAF 模型中, 流式细胞仪检测结果示 CD34<sup>+</sup> 及 CD45<sup>+</sup> 细胞于术后 2, 4 d 与对照组相比增高(分别为  $2.472 \pm 0.141$  vs  $1.903 \pm 0.044$ ,  $P = 0.020 < 0.05$ ;  $2.985 \pm 0.120$  vs  $1.862 \pm 0.057$ ,  $P = 0.008 < 0.01$ ), 荧光免疫组织化学染色显示其再生肝组织中与 CD34 共表达的抗原 Thy1.1, CK19, Alb, AFP, vimentin 等存在动态演变: 在标志物出现过程

中, Thy1.1 最早出现, 随后可检出 AFP, vimentin, CK19, 而 Alb 最后检出; 在标志物的消失过程, 则 Thy1.1, Alb, CK19 最早消失, 随后 AFP, vimentin 未检出。

**结论:** 大鼠在急性肝损时的肝再生过程中存在骨髓 CD34<sup>+</sup> 与 CD45<sup>+</sup> 的细胞增生现象, 再生肝组织中与 CD34 共表达抗原的动态演变可能反映肝卵圆细胞在体内的产生与分化的演变过程。

**关键词:** 造血干细胞; 肝卵圆细胞; 部分肝切除; 肝脏再生

潘孝本, 刘峰, 王松霞, 丛旭, 费然, 陈红松, 高燕, 魏来. 大鼠肝脏再生过程中细胞标志物演变与骨髓细胞增生. 世界华人消化杂志 2005;13(5):612-616 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/612.asp>

## 0 引言

既往认为肝脏内只有库氏细胞来源于骨髓的造血系统, 但近年来关于干细胞的研究显示骨髓来源的干细胞可以向肝脏的其他细胞如肝卵圆细胞、胆管上皮细胞、肝细胞及血管内皮细胞等横向分化<sup>[1-4]</sup>, 并有研究认为骨髓来源细胞对肝脏再生可能有一定的帮助作用<sup>[5-6]</sup>; 但最近研究显示细胞融合可能是骨髓来源细胞向肝细胞所谓“分化”的主要原因<sup>[7-8]</sup>. 此外, Ng *et al*<sup>[9]</sup> 对人肝移植样本研究证实骨髓细胞在肝脏中的绝大部分分化为库氏细胞, 仅约 1.6% 的骨髓来源细胞显示为向肝细胞分化. 而 Dahlke *et al*<sup>[10]</sup> 报道在大鼠急性肝损模型中只有少数骨髓来源的细胞在再生肝组织中检出, 因此其对肝脏再生过程中的功能恢复意义不大. 但也有学者认为其从组织中检出的本身证明其可能具有重要作用, 在组织学水平, 少量的细胞也可能扮演重要的角色; 而在骨髓中本身存在着具有向肝细胞分化潜能的干细胞, 其在某些特定情况下对肝脏的再生有显著意义<sup>[11]</sup>. 因此, 关于骨髓来源细胞在肝脏再生过程中能起多大作用尚有争议<sup>[12]</sup>. 为进一步研究在不同肝损情况下骨髓细胞与肝脏再生过程可能存在的联系, 我们采用了大鼠 PHx 及 PHx/2AAF 模型, 观察肝脏再生过程中骨髓造血细胞相对计数的变化, 以及再生肝组织中一些相关细胞标志物的演变。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Percoll 密度梯度离心液 (Pharmacia 公司), 2AAF (Sigma 公司), 流式分析用荧光标记抗体: PE-抗 CD34 (小鼠来源), FITC-抗 CD45 (小鼠来源), PE-抗小鼠 IgG, FITC-抗小鼠 IgG (Sigma 公司). 抗 CD45, 抗 Thy1.1 (BD 公司), 抗 AFP (Santa Cruze 公司), 抗 Alb (ICN 公司), 抗 vimentin, 抗 CK19 (Biogenex 公司), 以上抗体均来自小鼠, FITC-抗小鼠 IgG (Santa Cruze 公司), PE-抗 CD34 (山羊来源, Sigma 公司). 流式细胞分析仪 (FACSCalibur,

BD 公司), 荧光显微镜 (AX80TF, Olympus 公司). SD 大鼠由北京实验动物中心提供, 约 10 wk 龄, 重量 200-250 g, SPF 级. 随机分为 3 组: PHx 组、PHx+2AAF 组及假手术组, 每组分为 9 小组 ( $n = 3$ ). PHx 术: 大鼠术前禁食 12 h, 乙醚吸入麻醉. 据 Higgins *et al* 所用方法从腹中线切开上腹部, 结扎并切除肝左叶及中叶, 切除量约 70%. PHx+2AAF 组, 大鼠术前 1 wk 以 20 mg/(kg·d) 2AAF 灌胃, 手术与 PHx 组相同, 术后继续以 20 mg/(kg·d) 2AAF 灌胃 1 wk. 为避免左、中肝叶切除导致绝对血容量减少而引起骨髓细胞增生的可能, 我们采用假手术组作为对照. 此组大鼠打开腹腔后, 据左、中肝叶所含血量约 1 mL, 从门静脉取血 1 mL, 不做部分肝切除. 所有动物实验均于上午 8:30-10:30 在无菌实验室完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 流式细胞分析** 部分肝切除术后不同时间点的大鼠乙醚吸入麻醉, 取左胫骨, 去除表面肌肉组织, 修剪骨垢. 用 18 号针插入胫骨踝端, 用 PBS 5 mL 冲洗入试管内, 以 100  $\mu$ m 的微孔筛过滤. 200 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 PBS 5 mL 重悬、离心 3 次. 将细胞悬液 5 mL 轻置于 570 g/L Percoll (密度为 1 073 g/L) 密度梯度液 10 mL 上, 400 r/min, 4℃ 离心 30 min, 取中间单个核细胞层. PBS 洗涤后调整单个核细胞数为  $1 \times 10^6$ /管. 每样本 2 管, 测定管加入 FITC-抗 CD45, PE-抗 CD34 各 5  $\mu$ L 避光置 4℃ 孵育 30 min. 对照管加无关抗体 PE-抗小鼠 IgG, FITC-抗小鼠 IgG 各 5  $\mu$ L 避光置 4℃ 孵育 30 min. 加入冷 PBS 200  $\mu$ L 离心洗 3 次, 以除去多余未结合抗体, 加入 1 mL 流式细胞固定液 4℃ 保存, 上流式细胞分析仪测定 CD34, CD45 双阳性细胞占单个核细胞比例 (图 1)。

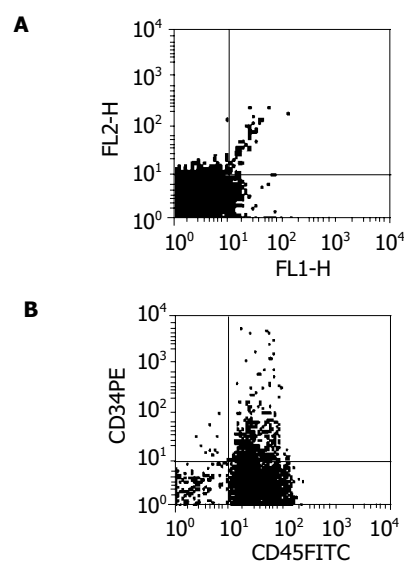


图1 骨髓单个核细胞保 CD34, CD45 阳性细胞群流式分析图, A: 加无关抗体的对照; B: 右上象限为 CD34, CD45 双阳性细胞。

表1 部分肝切除后骨髓单个核细胞中CD34+, CD45+ 细胞流式分析结果(mean±SD, %)

t/d	PHx	PHx+2AAF	control
1	1.767 ± 0.164	1.966 ± 0.203	1.749 ± 0.112
2	2.774 ± 0.166 <sup>a</sup>	2.472 ± 0.141 <sup>a</sup>	1.903 ± 0.044
4	3.164 ± 0.056 <sup>b</sup>	2.985 ± 0.120 <sup>b</sup>	1.862 ± 0.057
6	2.708 ± 0.160 <sup>a</sup>	2.073 ± 0.167	1.897 ± 0.149
8	2.078 ± 0.287	1.476 ± 0.088	1.720 ± 0.109
12	1.584 ± 0.092	1.576 ± 0.136	1.647 ± 0.161
16	1.884 ± 0.120	1.634 ± 0.061	1.759 ± 0.109
20	1.768 ± 0.074	1.985 ± 0.191	1.715 ± 0.121
24	1.792 ± 0.098	1.533 ± 0.133	1.653 ± 0.057

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01.

1.2.2 免疫双荧光组织化学 术后不同时间点的大鼠乙醚吸入麻醉,沿腹中线打开腹腔,门静脉插管,剪断肝脏的肝上与肝下下腔静脉,灌注冷PBS50 mL以冲洗循环系统中的血液细胞.切取肝脏组织(大小约5 mm×5 mm×3 mm)置液氮中固定,每组织块用冰冻切片(4-5 μm),冷丙酮固定,吹干后4℃保存.免疫组织化学:肝组织切片以PBS漂洗5 min×2次,加PBS 1:20稀释的二抗同种血清封闭液50 μL室温孵育20 min,加适当稀释一抗(各一抗稀释度:抗Thy1.1 1:100,抗-AFP1:100,抗vimentin 1:200,抗CK19 1:200,抗Alb 1:10,抗CD45 1:100)50 μL,37℃孵育60 min.PBS洗2 min×3次.加FITC-抗小鼠IgG(1:100)50 μL 37℃孵育30 min.PBS洗2 min×3次.以上各片均用PE-抗CD34(1:100)50 μL 37℃孵育30 min复染,PBS洗2 min×3次.封片,荧光显微镜(Olympus AX80TF)观察,PE-抗CD34与其他FITC标记的抗体激发后分别为红色与绿色荧光,如在同一细胞上双重表达则重叠为黄色.另我们对各切片做HE染色,以初步观察肝脏再生及肝卵圆细胞产生情况.

表2 PHx+2AAF 免疫荧光组织化学染色结果

t/d	CD34+CD45 A B C	CD34+Thy1.1 A B C	CD34+AFP A B C	CD34+CK19 A B C	CD34+Vim A B C	CD34+Alb A B C
1	---	---	---	---	---	---
2	---	-+-	---	---	---	---
4	+++	+++	-+-	-+-	-+-	---
6	++-	+++	+++	+++	+++	-+-
8	-+-	++-	+++	+++	+++	++-
12	---	-+-	++-	++-	++-	-+-
16	---	---	-+-	---	-+-	---
20	---	---	---	---	-+-	---
24	---	---	---	---	---	---

A, B, C 指组内3只大鼠相应的免疫荧光组织化学染色结果, + 为细胞标志物双表达, - 为无双表达.Vim 为 vimentin.

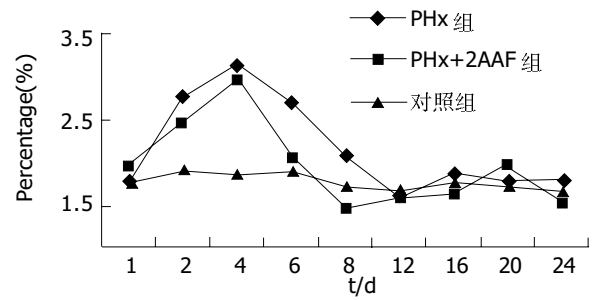


图2 大鼠部分肝切除后不同时间点骨髓单个核细胞中CD34, CD45 阳性细胞群变化曲线.

## 2 结果

2.1 骨髓细胞的流式分析结果 流式检测结果采用SPSS11.0统计学分析软件,对PHx组,PHx+2AAF组各时间点数据与对照组相应数据进行配对T检验,*P*<0.05为显著性差异水平(表1).此外,我们采用Excel软件将各组数据转换为曲线图,以直观反映其动态变化(图2).

2.2 免疫荧光组织化学结果 在PHx及PHx+2AAF组再生肝组织中,HE染色均可见大量淋巴细胞浸润(图3A).在PHx组仅散在见少量CD34+,CD45+细胞(图3B),但在PHx+2AAF组CD34与CD45共表达的细胞检出相对PHx组较多,多位于肝窦及血管周边(图3C),并在8 d可见vimentin阳性细胞镜下数量达最大值,呈散在分布(图3D).在不同的术后时间点还可检测到与CD34共表达的其他抗原(表2,图3E-F).假手术组再生肝组织中未检出与CD34及其他抗原共表达的细胞.

## 3 讨论

在肝脏损伤后的再生反应过程中,可能存在3个层次的细胞增生反应:成熟肝细胞,肝脏的干/祖细胞及骨髓来源的干细胞;不同水平的肝脏损伤模型会导致不同的细胞增生反应<sup>[13-16]</sup>.我们采用了PHx模型和PHx+2AAF

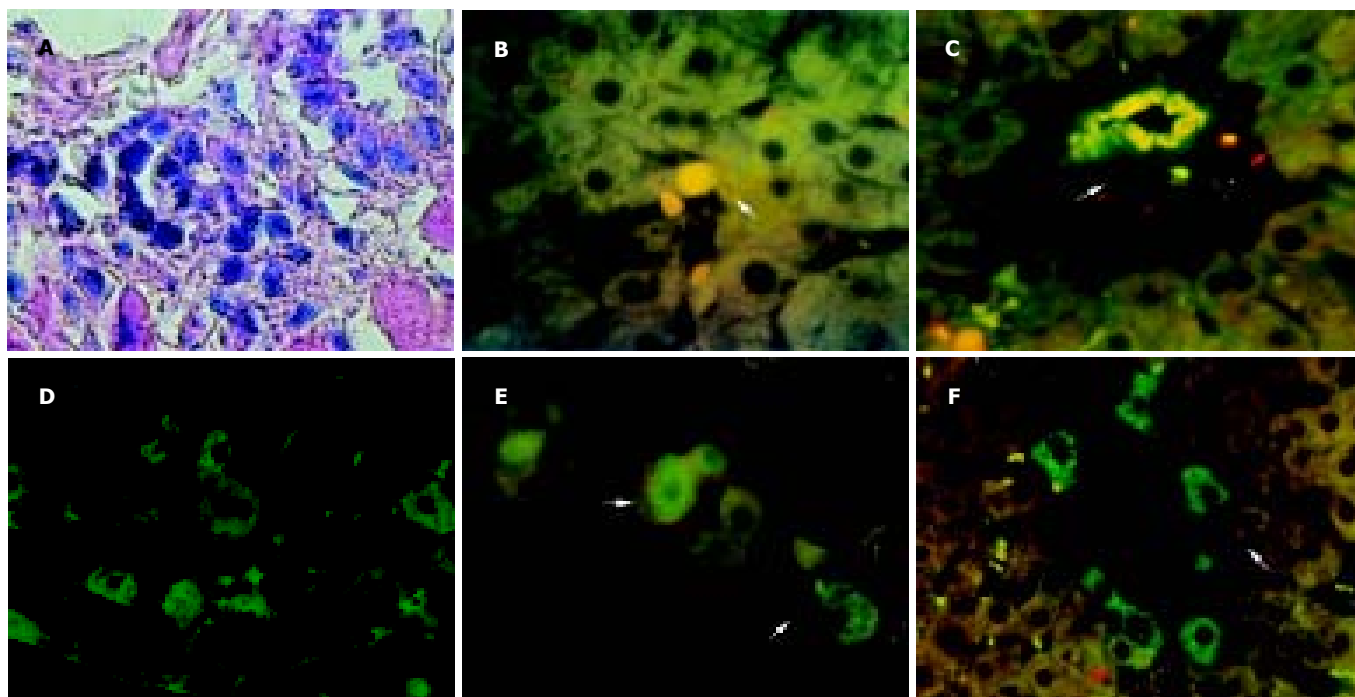


图3 免疫荧光组织化学结果 A:再生肝组织HE(PHx组, 2 d,  $\times 400$ ). B: CD34, CD45 双阳性细胞散在分布于肝窦, 数量较少(PHx组, 4 d,  $\times 1000$ ). C: 红色箭头示血管内皮细胞 CD34 单阳性, 白色箭头为 CD34 与 CK45 双阳性细胞(PHx+2AAF组, 第4 d,  $\times 400$ ). D: FITC-抗 vimentin 阳性细胞, 有大量阳性散在细胞, vimentin 蛋白在胞质内呈灯丝状排列(PHx+2AAF组, 8 d,  $\times 1000$ ). E: PE-抗 CD34 与 FITC-抗 AFP 双阳性细胞, 示 CD34 为胞膜染色(PHx+2AAF组, 8 d,  $\times 400$ ), AFP 为胞质染色. F: 白色箭头指 CK19 阳性, CD34 阴性细胞, 红色箭头为双阳性细胞(PHx+2AAF组, 12 d,  $\times 400$ ).

模型, PHx 模型是研究肝脏再生过程经典模型, 而 2AAF 可抑制肝细胞增生而使卵圆细胞激活<sup>[17]</sup>. 结果表明, 在 PHx 模型中, 肝切除后 2 d, 骨髓中的 CD34+ 与 CD45+ 细胞水平即有增高, 于 4 d 达最大值, 此后下降, 于 8 d 与对照组无显著性差异. 在 PHx+2AAF 模型中亦得到类似的结果, 其于术后 2 d, 4 d 即有增高, 但其峰值比单纯的 PHx 组低, 于术后 6 d 与对照组无显著性差异(表 1, 图 2). 骨髓中 CD34, CD45 双阳性细胞主要为造血的祖\干细胞, 其先增高后降低, 提示在急性严重肝损的情况下, 骨髓中造血细胞存在着的增生及可能迁移的过程. 大鼠在 70% 的肝切除后, 10 d 内基本完成再生过程, 其组织学重构涉及多种肝脏细胞的增生. 库氏细胞来源于血液中游走的单核细胞, 是肝脏中的重要功能细胞之一, 在肝脏的迅速再生过程需要大量的库氏细胞聚集补充;再生肝组织的 HE 染色可见有大量的炎症细胞, 主要为淋巴细胞浸润(图 3A), 这可能与肝脏的组织学重构有关. 库氏细胞和淋巴细胞均来源于骨髓造血系统, 因此骨髓中造血系细胞的增生有可能是机体对消耗的单核巨噬细胞和淋巴细胞的一种反应, 但其他是否向肝脏的其他细胞如肝细胞, 胆管上皮细胞、内皮细胞、肝卵圆细胞分化, 我们尚在做进一步研究. 图 2 中可见在 PHx+2AAF 组中骨髓造血细胞的升高程度低于单纯 PHx 组, 增高时间亦较短, 其差别是否有意义尚不明

确. 2AAF 对中 CD34+, CD45+ 细胞的分裂是否亦有一定的抑制作用, 或者 2AAF 组骨髓中造血细胞更快向外迁移而导致其值较低? 也有待进一步研究.

大鼠 PHx+2AAF 是比较常用的肝卵圆细胞产生模型, 从 PHx+2AAF 组的免疫组织化学结果 vimentin, CD34, CK19, AFP 等卵圆细胞标志物的表达, 证明我们应用此模型是成功的. 在 PHx+2AAF 组免疫双荧光组织化学检测中, 由于 CD34 是造血干细胞和肝卵圆细胞的共同标志, 因此我们采用了 CD34 作为相对固定的抗原标志物, 以此跟踪其他抗原的改变情况. 在其他的抗原中, CD45 与 Thy1.1 为造血细胞标志, Thy1.1, AFP, vimentin, CK19 等为卵圆细胞标志物、CK19 与 A1b 则分别为成熟的胆管上皮与肝细胞标志物. 在肝再生的早期我们在肝窦及门管区周边可检测出少量的 CD34 及 CD45 阳性细胞, 在 PHx+2AAF 组比单纯的 PHx 数量为多(图 3B, C), 这显示骨髓中增生的造血细胞可能参与到了肝脏的再生过程, 但由于缺乏直接跟踪指标, 因此尚需进一步证实. 在 PHx+2AAF 组再生肝组织中的免疫组化检测结果中还可以观察到以下的细胞标志物变化(表 2):在标志物出现过程中, Thy1.1 最早出现, 随后可检出 AFP, vimentin, CK19, 而 A1b 最后检出;在标志物的消失过程, 则 Thy1.1, A1b, CK19 最早消失, 此后 AFP, vimentin 随之未检出. 图 3F 荧光染色视野中多个 CK19 细胞染色单阳性, 尚有 1 个细胞有 CD34 的阳性共表达比较典型反映了细

胞标志物的演变. 我们结果示大鼠肝再生细胞标志物随时间的改变可能反应了大鼠肝卵圆细胞在体内从产生至消失过程中表面标志的变化过程, 与国外的体外实验的相关研究结果相似<sup>[18-21]</sup>. 但作为跟踪标志的CD34本身在卵圆细胞分化过程中也会消失, 结果亦示其与A1b, CK19等成熟肝细胞及胆管上皮细胞共表达时间较短. Thy1.1, CD45与CD34均是骨髓造血细胞的标志, 其在早期再生肝脏中表达以及骨髓中CD45, CD34细胞的相应增高可能提示骨髓造血细胞主动动员并迁移至肝脏以对肝再生过程的支持.

从所周知, 在肝脏的再生过程中, 机体有多种细胞因子的浓度显著改变, 如TNF $\alpha$ , HGF, TGF $\alpha$ , IGF-I, EGF及IL-6等<sup>[22-24]</sup>. 如HGF在术后1 h即急剧升高, 一直到72 h后降至正常水平. 既往发现HGF对体外培养的肝细胞有明显的促DNA合成与细胞分裂作用, 但新近的研究发现HGF对多种功能, 除细胞增生外, 还有细胞迁移与趋化作用<sup>[25]</sup>. 而据体内外实验, EGF可多种促进上皮组织细胞及某些成纤维细胞的增生<sup>[26]</sup>; 而IL-6对不同的靶细胞具有不同的促细胞增生, 抑制细胞分裂或促细胞分化作用, IL-6亦具有使骨髓中造血干细胞增生和分化的能力<sup>[27]</sup>, 肝再生过程中这些细胞因子的浓度改变可能是骨髓中造血干细胞增生的原因.

肝再生过程中的炎症可导致SDF-1水平升高, 肝损伤可激活MMP-9的活性, 这些因素可促进CXCR4的表达及SDF-1介导的造血干细胞向肝脏汇集, 而在肝损伤中升高的HGF可促使细胞突触形成, CXCR4上调及SDF-1介导的CD34+骨髓细胞的迁移, 及对干细胞因子效应的协同作用. 因此HGF, SDF-1, MMP-9等表达升高可以召集骨髓中的CD34+细胞如造血干细胞及肝分化潜能细胞定位于肝脏以有助于再生修复. 总之, 我们的研究结果反映了大鼠肝卵圆细胞在体内的分化过程, 并观察到在肝脏再生过程中存在骨髓来源细胞增生及迁移的过程, 但其在多大程度上支持肝脏的再生过程及向何种细胞分化尚需进一步研究.

#### 4 参考文献

- 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
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234
- Gao Z, McAlister VC, Williams GM. Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *Lancet* 2001;357:932-933
- Crosby HA, Nijjar SS, de Goyet Jde V, Kelly DA, Strain AJ. Progenitor cells of the biliary epithelial cell lineage. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:397-403
- Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, Nagao M, Yamaoka Y. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2002;36:653-659
- Ferry N, Hadchouel M. Liver regeneration: with a little help from marrow. *J Hepatol* 2002;36:695-697
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell Fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897-901
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-904
- Ng IO, Chan KL, Shek WH, Lee JM, Fong DY, Lo CM, Fan ST. High frequency of chimerism in transplanted livers. *Hepatology* 2003;38:989-998
- Dahlke MH, Popp FC, Bahlmann FH, Aselmann H, Jager MD, Neipp M, Piso P, Klempnauer J, Schlitt HJ. Liver regeneration in a retrorsine/CCl<sub>4</sub>-induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute? *J Hepatol* 2003;39:365-373
- Alison MR, Vig P, Russo F, Bigger BW, Amofah E, Themis M, Forbes S. Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? *Cell Prolif* 2004;37:1-21
- Grompe M. The role of bone marrow stem cells in liver regeneration. *Semin Liver Dis* 2003;23:363-72
- Zimmermann A. Liver regeneration: the emergence of new pathways. *Med Sci Monit* 2002;8:53-63
- Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001;33:738-750
- Oh SH, Hatch HM, Petersen BE. Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:405-409
- Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003;120:117-130
- Zhang Y, Bai XF, Huang CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003;9:201-204
- Yin L, Sun M, Ilic Z, Leffert HL, Sell S. Derivation, characterization, and phenotypic variation of hepatic progenitor cell lines isolated from adult rats. *Hepatology* 2002;35:315-324
- Toshihiro M. Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:1-5
- He ZP, Tan WQ, Tang YF, Zhang HJ, Feng MF. Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers. *Cell Prolif* 2004;37:177-187
- 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
- Sanz S, Pucilowska JB, Liu S, Rodriguez-Ortigosa CM, Lund PK, Brenner DA, Fuller CR, Simmons JG, Pardo A, Martinez-Chantar ML, Fagin JA, Prieto J. Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury. *Gut* 2005;54:134-141
- Serandour AL, Loyer P, Garnier D, Courselaud B, Theret N, Glaire D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A. TNF $\alpha$ -mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology* 2005;41:478-486
- Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:836-847
- Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* 1995;129:1177-1180
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211-225
- Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, Demetris AJ. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999;29:403-411

# 生长抑素诱导猕猴外周血中性粒细胞凋亡

许兰涛, 唐承薇

许兰涛, 唐承薇, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041  
许兰涛, 男, 1964-07-03 生, 副主任医师, 副教授, 博士, 主要从事消化内科的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30170875

项目负责人: 唐承薇, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院消化内科.  
sccdlx@sohu.com

电话: 028-85445341

收稿日期: 2004-12-22 接受日期: 2005-01-20

## Effect of somatostatin on apoptosis of polymorphonuclear neutrophils of rhesus monkey

Lan-Tao Xu, Cheng-Wei Tang

Lan-Tao Xu, Cheng-Wei Tang, Department of Digestology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China  
Supported by National Science Foundation of China, No.30170875

Correspondence to: Cheng-Wei Tang, Department of Digestology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. sccdlx@sohu.com

Received: 2004-12-22 Accepted: 2005-01-20

### Abstract

**AIM:** To study the effect of somatostatin on the apoptosis of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in rhesus monkey.

**METHODS:** PMNs were isolated from whole blood of normal rhesus monkey using one-step discontinuous Percoll gradient centrifugation technique. PMNs were cultured with  $5 \times 10^{-5}$  mol/L somatostatin. Cell morphology was examined by light and electronic microscopy. Apoptosis was detected by flow cytometry and DNA agarose electrophoresis.

**RESULTS:** Somatostatin at  $5 \times 10^{-5}$  mol/L induced significant apoptosis in PMNs. The cells manifested typical apoptotic morphology: cell membrane blebbing, chromatin condensation, nucleic fragmentation and apoptotic body formation. Agarose electrophoresis revealed specific DNA ladder. Flow cytometry analysis showed that the ratio of PMNs undergoing apoptosis was remarkably increased from 22.1% to 50.5% following somatostatin treatment ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Somatostatin induces apoptosis of PMNs in rhesus monkey. It may be a new target for the treatment of multiple organ dysfunction syndrome (MODS).

**Key Words:** PMN; Apoptosis; Somatostatin; Rhesus monkey; MODS

Xu LT, Tang CW. Effect of somatostatin on apoptosis of polymorphonuclear neutrophils of rhesus monkey. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(5):617-620

### 摘要

**目的:** 观察生长抑素对猕猴外周血中性粒细胞的作用。

**方法:** 用生长抑素与猕猴外周血中性粒细胞共同孵育一定时间后, 采用流式细胞仪、DNA电泳、电镜观察猕猴外周血中性粒细胞的形态变化, 细胞DNA含量分布变化。

**结果:** 生长抑素能诱导猕猴外周血中性粒细胞凋亡, 在形态学上表现为细胞膜起泡、染色质固缩、核碎裂、凋亡小体形成;电泳呈凋亡特征性Ladder带;流式细胞仪分析显示, PMN凋亡比例增高(22.1%vs50.5%。  $P < 0.01$ )。

**结论:** 生长抑素能诱导猕猴外周血中性粒细胞凋亡。

**关键词:** 猕猴; 生长抑素; 中性粒细胞; 凋亡; 多器官功能衰竭

许兰涛, 唐承薇. 生长抑素诱导猕猴外周血中性粒细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2005;13(5):617-620

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/617.asp>

### 0 引言

中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)是白细胞中功能最活跃、寿命最短的一类<sup>[1-2]</sup>. PMN不仅可以释放氧自由基、蛋白酶和炎症递质<sup>[3-4]</sup>, 并且可以与刺激因素相互作用引起瀑布效应(cascade reaction)<sup>[5-6]</sup>, 诱发多器官功能衰竭(MODS)<sup>[7-8]</sup>. 由于PMN生存周期很短, 除了从黏膜表面脱落外, 通常以凋亡和坏死的方式被清除. 当PMN发生坏死时, 炎症反应扩大, 造成周围组织损伤. 如PMN发生凋亡, 则可以被巨噬细胞或组织细胞识别并吞噬, 这是生理条件下PMN快速更替的方式. 而在病理条件下, 如炎症、感染、MODS时PMN清除方式变化, PMN凋亡与疾病的发生发展及转归的关系密切<sup>[9-17]</sup>, PMN凋亡的分子机制及调控正是目前科研领域的一个研究热点. 对这些问题的解答将揭示MODS过程中PMN的作用地位, 及提出针对MODS早期组织损伤的防治措施. 生长抑素(somatostatin, ss)是一种脑肠肽, 他不仅广泛存在于中枢神经系统和胃肠道, 在淋巴器官中也有分布. 近3 a来发现, 生长抑素除抑制脑垂体中生长激素的释放外对免疫系统

也有广泛的作用,研究表明生长抑素能减少组胺及肿瘤坏死因子等细胞因子的释放,从而逆转MODS的发展,恢复各脏器功能<sup>[18-21]</sup>.我们研究生长抑素对中性粒细胞的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Percoll分离液,右旋糖酐Dextran, Hanks液、RPMI 1640培养液、苏木素(Merk, Germany)、台盼蓝、瑞氏一姬姆萨染液、裂解液、细胞凋亡试剂盒购自博士德公司, Annexin V FITC购自晶美公司.从健康猕猴外周静脉取血5 mL,肝素抗凝,低速离心弃去富含血小板血浆,余血用右旋糖酐Dextran 500沉降红细胞,将上层细胞悬液置于Percoll分离液,以630 g/L Percoll和720 g/L percoll液密度梯度离心收集PMN, 2 500 r/min, 10 min,用Hanks液洗涤两次,2 500 r/min, 10 min,残留红细胞以冰冷等渗氯化铵溶液( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155 mmol/L,  $\text{KHCO}_3$  10 mmol/L, EDTA 0.1 mmol/L)按9:1溶解,再用Hanks液清洗2遍,悬浮于含100 mL/L的小牛血清的RPMI 1640液中,并调至 $5 \times 10^8/\text{L}$ ,分类计数PMN为95%以上,细胞完整,台盼蓝试验表明99%为活细胞.

**1.2 方法** 在培养状态下,用倒置显微镜观察细胞生长状况及形态学改变,并将 $5 \times 10^{-5}$  mol/L的生长抑素作用30 min的细胞在显微镜下观察凋亡细胞的形态.流式细胞仪检测,正常情况下分离出PMN,取两管 $5 \times 10^8/\text{L}$  PMN细胞分别与终浓度为 $5 \times 10^{-5}$  mol/L、 $5 \times 10^{-6}$  mol/L的生长抑素作用30 min,另取 $5 \times 10^8/\text{L}$ 细胞不加药作为对照.中性粒细胞用PBS洗涤二次;离心后除去上清液,加入100  $\mu\text{L}$  缓冲液;拿另一只试管加入5  $\mu\text{L}$  Annexin v;再加入10  $\mu\text{L}$  碘化丙锭;加100  $\mu\text{L}$  标本,在避光处孵育15 min;加入400  $\mu\text{L}$  PBS;上机检测.将 $5 \times 10^8/\text{L}$  PMN和 $5 \times 10^{-5}$  mol/L生长抑素作用细胞离心,然后抽提DNA并电泳.PMN加入DNA消化液500  $\mu\text{L}$ ,蛋白酶K 5  $\mu\text{L}$ ;37℃水浴摇床

摇动2 h,取出后过夜;加等体积苯酚、氯仿、异戊醇(25:24:1)震荡混匀,形成乳浊液,各抽提一次;10 000 g离心15 min,离心后上层为清亮水相,DNA溶解在其中,若混有下层液体,则按上述方法再抽提一次;将上层为清亮水相吸取移至另一新管,用大口吸管,以免损伤DNA.加入1/10 体积3 mol/L醋酸酸钠约40  $\mu\text{L}$ ,2.5倍体积冷无水乙醇,上下倒置混匀,放入-20℃冰箱30 min;12 000 g离心20 min,弃上清;加入冷乙醇1 mL;12 000 g离心5 min.弃上清,将沉淀溶于40  $\mu\text{L}$  TE液中;制胶,用TAE 100 mL溶解2 g琼脂糖,制成凝胶,在80V电压条件下,电泳30 min,紫外光透射仪下观察电泳条带并拍照.将 $5 \times 10^8/\text{L}$  PMN细胞与 $5 \times 10^{-5}$  mol/L生长抑素作用30 min, PBS清洗2次,25 g/L戊二醛固定24 h, PBS缓冲液漂洗3次,每次15 min,10 g/L锇酸固定1 h,漂洗后经梯度丙酮逐级脱水,Epon 812包埋,LKP-2088型超薄切片机切片,醋酸铀-枸橼酸铝染色后,透射电镜下观察摄片.

**统计学处理** 数据以均数±标准差(mean±SD)表示,应用方差分析处理数据,比较各实验组与对照组,确定结果差异的显著性.

## 2 结果

**2.1 细胞形态学变化** 未经生长抑素作用的中性粒细胞未见凋亡细胞和凋亡小体,(图1A)而猕猴外周血经生长抑素作用后显微镜观察见中性粒细胞体积变小,膜起泡,核浓缩,凋亡小体形成(图1B).

### 2.2 流式细胞仪检测(表1)

表1 不同浓度生长抑素对PMN凋亡率的影响

	组别	凋亡率(%)
1	对照组	22.1 ± 0.28
2	ss ( $5 \times 10^{-6}$ mol/L)	33.6 ± 0.52
3	ss ( $5 \times 10^{-5}$ mol/L)	50.5 ± 0.56

$P < 0.01$  vs 对照组.

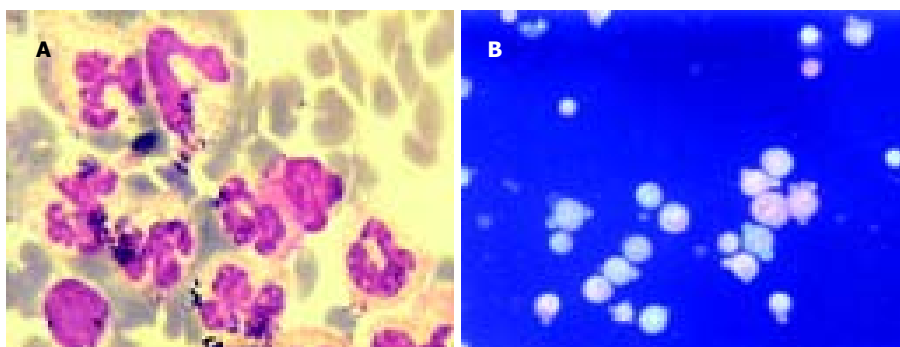


图1 中性粒细胞. A: 无凋亡图; B: 凋亡.

2.3 DNA 电泳结果 将 $5 \times 10^8$ /L PMN 细胞与 $5 \times 10^{-5}$  mol/L 生长抑素作用 30 min, DNA 电泳呈明显凋亡带, 对照组则无凋亡带(图 2).

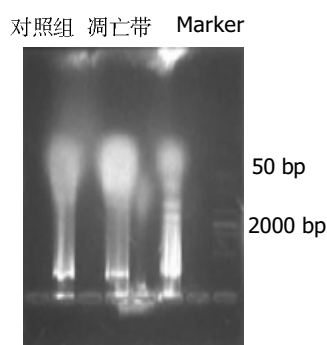


图2 DNA 电泳 Ladder 带.

2.4 电镜观察 将 $5 \times 10^8$ /L PMN 细胞与 $5 \times 10^{-5}$  mol/L 生长抑素作用 30 min, 电镜下可见染色质固缩, 聚集于核膜下成块状, 胞核固缩, 染色质凝集, 细胞质浓缩, 部分细胞碎裂成片, 形成质膜包被的大小不等的凋亡小体(图 3).

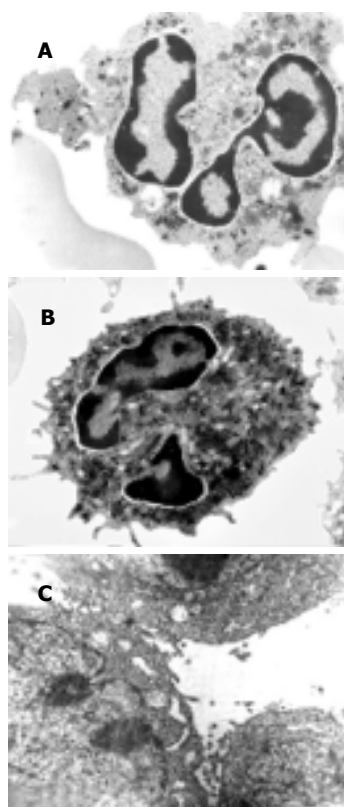


图3 中性粒细胞超微结构 TEM  $\times 8000$ . A: 正常; B: 凋亡; C: 凋亡小体.

### 3 讨论

由于分子生物学发展, 尤其是抗炎症递质治疗在临床应用中并不理想后, 国内外学者转向炎症递质调控凋亡的研究, 就凋亡和 MODS 发生机制作了新的探讨. Haslett<sup>[22-26]</sup>提出炎症反应的失调与中性粒细胞调

亡比率有关. Keel<sup>[27-30]</sup>在 MODS 研究中发现外周血中性粒细胞(PMN)凋亡延迟, 并且血中有抗凋亡因子存在. 认为凋亡延迟引起 PMN 寿命延长可能与 MODS 发生有关. Goris<sup>[31]</sup>提出经过特异性细胞因子触发凋亡可以解释进行性过度炎症反应可以发展到 MODS 的最后假说.

目前已经明确 MODS 是过度炎症反应的结果, 在创伤后有 MODS 高风险的患者中, PMN 凋亡延迟, 血浆中的递质使 PMN 凋亡延迟, 并且 PMN 的作用引发过度炎症反应及器官损伤, 创伤后 PMN 的凋亡在 MODS 的发生发展中可能具有重要作用. 凋亡区别于坏死的重要之处是凋亡的细胞能被巨噬细胞或周围组织细胞平稳识别、清除而不引发炎症反应, 因此有研究认为通过凋亡方式清除炎症部位的 PMN 是限制组织损伤, 促进炎症吸收的重要机制. 识别清除凋亡 PMN 的能力降低, 大量凋亡的 PMN 不能被及时有效地处理而裂解坏死, 炎症不易控制, 因此这种损伤很容易导致 MODS. 本实验研究表明: 生长抑素能诱导中性粒细胞凋亡, 可以减少氧自由基、蛋白酶和炎症递质的释放, 有利于巨噬细胞的吞噬, 必将为治疗 MODS 开辟新的领域.

### 4 参考文献

- 1 Diamond RD, Clark RA, Haudenschild CC. Damage to *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae by the myeloperoxidase system and oxidative products of neutrophil metabolism *in vitro*. *J Clin Invest* 1980;66:908-917
- 2 Sweeney JF, Nguyen PK, Omann G, Hinshaw DB. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor rescues human polymorphonuclear leukocytes from ultraviolet irradiation-accelerated apoptosis. *J Surg Res* 1999;81:108-112
- 3 Suzuki K, Hasegawa T, Sakamoto C, Zhou YM, Hato F, Hino M, Tatsumi N, Kitagawa S. Cleavage of mitogen-activated protein kinases in human neutrophils undergoing apoptosis: Role in decreased responsiveness to inflammatory cytokines. *J Immunol* 2001;166:1185-1192
- 4 Sweeney JF, Nguyen PK, Hinshaw DB. Caspase-3 inhibition partially protects oxidant production in apoptotic human neutrophils. *J Surg Res* 2001;98:66-70
- 5 Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor mediated and chemical induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:5053-5060
- 6 Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* 2003;5:1337-1344
- 7 Fry DE. Sepsis syndrome. *Am Surg* 2000;66:126-132
- 8 Erwig LP, Gordon S, Walsh GM, Rees AJ. Previous uptake of apoptotic neutrophils or ligation of integrin receptors downmodulates the ability of macrophages to ingest apoptotic neutrophils. *Blood* 1999;93:1406-1412
- 9 Chitnis D, Dickerson C, Munster AM, Winchur RA. Inhibition of apoptosis in polymorphonuclear neutrophils from burn patients. *Leukoc Biol* 1996;59:835-839
- 10 Dunican A, Grutkoski P, Leuenroth S, Ayala A, Simms HH. Neutrophils regulate their own apoptosis via preservation of CXCR receptors. *J Surg Res* 2000;90:32-38
- 11 Sano J, Oguma K, Kano R, Tsumagari S, Hasegawa A. Decreased apoptotic polymorphonuclear leukocyte rate in dogs with pyometra. *J Vet Med Sci* 2004;66:103-105
- 12 van Zandbergen G, Gieffers J, Kothe H, Rupp J, Bollinger A,

- Aga E, Klinger M, Brade H, Dalhoff K, Maass M, Solbach W, Laskay T. Chlamydia pneumoniae multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J Immunol* 2004;172:1768-1776
- 13 Nolan B, Collette H, Baker S, Duffy A, De M, Miller C, Bankey P. Inhibition of neutrophil apoptosis after severe trauma is NF-kappaB dependent. *Trauma* 2000;48:599-605
  - 14 Milik AM, Buechner-Maxwell VA, Sonstein J, Kim S, Seitzman GD, Beals TF, Curtis JL. Lung lymphocyte elimination by apoptosis in the murine response to intratracheal particulate antigen. *J Clin Invest* 1997;99:1082-1091
  - 15 Stockmeyer B, Beyer T, Neuhuber W, Repp R, Kalden JR, Valerius T, Herrmann M. Polymorphonuclear granulocytes induce antibody-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *J Immunol* 2003;171:5124-5129
  - 16 Gilroy DW, Colville-Nash PR, McMaster S, Sawatzky DA, Willoughby DA, Lawrence T. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy(Delta)12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. *FASEB J* 2003;17:2269-2271
  - 17 Wagner C, Iking-Konert C, Deneffle B, Stegmaier S, Hug F, Hansch GM. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 2004;103:1099-1104
  - 18 Thompson JS. Epidermal growth factor inhibits somatostatin-induced apoptosis. *J Surg Res* 1999;81:95-100
  - 19 Sener G, Sehirli AO, Satioglu H, Kacmaz A, Ayanoglu-Dulger G, Yegen BC. Octreotide improves burn-induced intestinal injury in the rat. *Peptides* 2003;24:123-127
  - 20 Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Voyich JM, Schwan TG, Musser JM, DeLeo FR. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10948-10953
  - 21 Liu Y, Zhang J, Zhao Z, Ling Y. Pro-apoptotic role of NF-kappaB pathway inhibition in lipopolysaccharide-stimulated polymorphonuclear neutrophils. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:1257-1261
  - 22 Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin Sci (Lond)* 2001;83:639-648
  - 23 Liu R, Li SD, Min JX, Xiao N, Jiang QS, Tian KL, Diao YF. PMN apoptosis and its relationship with the lung injury after chest impact trauma. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:888-892
  - 24 McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, Williams JD, Rose-John S, Jones SA, Topley N. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *J Clin Invest* 2003;112:598-607
  - 25 Solito E, Kamal A, Russo-Marie F, Buckingham JC, Marullo S, Perretti M. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. *FASEB J* 2003;17:1544-1546
  - 26 Reidy MF, Wright JR. Surfactant protein A enhances apoptotic cell uptake and TGF-beta1 release by inflammatory alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L854-L861
  - 27 Keel M, Ungethüm U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, Ertel W. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* 1997;90:3356-3363
  - 28 Miyazaki S, Ishikawa F, Fujikawa T, Nagata S, Yamaguchi K. Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide induces dynamic migration of Gr-1high polymorphonuclear neutrophils in the murine abdominal cavity. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:452-457
  - 29 Choi M, Rolle S, Wellner M, Cardoso MC, Scheidereit C, Luft FC, Kettritz R. Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood* 2003;102:2259-2267
  - 30 Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, DeLeo FR. Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 2003;170:3357-3368
  - 31 Goris RJ. MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? *World J Surg* 1996;20:418-421

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

**本刊讯** 中国科技期刊引证报告(2003 年版): 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 地区分布数 26, 机构数 138, 国际论文比 0.03, 基金论文比 0.27. 2002 年度各学科影响因子较高的 3 种期刊排名: 世界华人消化杂志影响因子 1.926, 临床医学排名第 2 位. 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊排名: 世界华人消化杂志总被引频次 4151, 排名第 1 位. 世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004 年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊, 2001 年度第一届中国百种杰出学术期刊, 2003 年度中国百种杰出学术期刊. 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. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 从 2005 年开始, 世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊, 大 16 开, 160 页, 每月 1, 15 日出版, 24 元/期, 全年 24 期, 邮发代号 82-262, 北京报刊发行局发行. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

# 幼年大鼠内毒素血症对小肠上皮细胞凋亡及 PCNA 表达的影响

吴秀清, 王虹, 孙梅, 吕庆杰, 周卓

吴秀清, 王虹, 孙梅, 中国医科大学第二附属医院儿科  
辽宁省沈阳市 110004

吕庆杰, 中国医科大学第二附属医院病理科 辽宁省沈阳市 110004

周卓, 中国医科大学第二附属医院中心实验室 辽宁省沈阳市 110004  
吴秀清, 女, 1965-03-13 生, 辽宁省建昌人, 汉族, 1987 年中国医科大学本科毕业, 1992 年中国医科大学硕士研究生毕业, 2002 年中国医科大学医学博士在读, 副主任医师, 目前主要从事儿科危重症胃肠功能障碍的研究。  
教育部留学回国人员科研启动基金资助项目, No. [2001]345

项目负责人: 孙梅, 110004, 辽宁省沈阳市三好街 36 号, 中国医科大学第二附属医院儿科, sunm@cmu2h.org

电话: 024-83955572

收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-12-08

## Effect of endotoxemia on enterocyte apoptosis and PCNA expression in baby rats

Xiu-Qing Wu, Hong Wang, Mei Sun, Qing-Jie Lv, Zhuo Zhou

Xiu-Qing Wu, Hong Wang, Mei Sun, Department of Pediatric, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Qing-Jie Lv, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Zhuo Zhou, Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Supported by the Scientific Research Foundation of the Ministry of Education to Personnel Returned from Abroad, No. [2001] 345

Correspondence to: Dr. Mei Sun, Department of Pediatric, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhaojie, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sunm@cmu2h.org

Received: 2004-11-23 Accepted: 2004-12-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of endotoxemia on enterocyte apoptosis and proliferation in baby rats, to provide theoretical evidence for anti-apoptotic or growth-promoting therapy.

**METHODS:** The model of endotoxemia of baby rats was established by intraperitoneal injection of either saline (control) or endotoxin (4 mg/kg of *Escherichia coli* lipopolysaccharide). 4 cm lower ileum was collected at 0 h (control group only), or within 10 min after dead (endotoxin group only), 2, 4, 6, 24, and 72 h after injection respectively. The pathologic changes of small intestine villus were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Apoptotic cells were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression was measured by immunohistochemistry staining.

**RESULTS:** Apoptotic activity in each endotoxin group was significantly higher than that of control group ( $37.4 \pm 7.1$ ,  $44.1 \pm 9.3$ ,  $46.6 \pm 8.2$ ,  $54.7 \pm 9.0$ ,  $45.3 \pm 7.2$  and  $33.9 \pm 6.1$  vs  $0.02 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$  respectively). PCNA expression in each endotoxin group was significantly lower than that of corresponding control group ( $P < 0.05$ ). The markedly increased apoptosis index started from 2h after injection of endotoxin, and increased continually there after, peaked at 24 h, retrieved to the level of 6 h at 72 h. The significantly decreased PCNA expression was found from 2 h ( $30.2 \pm 8.3$  vs  $74.6 \pm 16.2$ ,  $t = 6.874$ ,  $P < 0.01$ ) after injection of endotoxin, reached the lowest level at 4h ( $21.4 \pm 6.7$  vs  $74.6 \pm 18.7$ ,  $t = 7.566$ ,  $P < 0.01$ ) and 6h ( $23.9 \pm 14.7$  vs  $73.6 \pm 13.7$ ,  $t = 6.999$ ,  $P < 0.01$ ), retrieved to the level of 2 h at 24 h ( $35.8 \pm 11.4$  vs  $76.3 \pm 11.8$ ,  $t = 7.010$ ,  $P < 0.01$ ), and did not get normal at 72 h ( $59.6 \pm 18.0$  vs  $78.7 \pm 16.9$ ,  $t = 2.185$ ,  $P = 0.046$ ). Apoptosis index ( $33.9 \pm 6.1$ ) and PCNA expression ( $20.2 \pm 9.2$ ) in dead group were close to those of 2 h and 4 h after injection of endotoxin respectively. Comparison was made by the time points between ratios of PCNA expression and apoptosis index in the same hours. It was found that the ratios of endotoxin group ( $0.8 \pm 0.3$ ,  $0.5 \pm 0.1$ ,  $0.5 \pm 0.3$ ,  $0.6 \pm 0.2$ ,  $1.3 \pm 0.3$ , and  $0.6 \pm 0.2$  respectively) were significantly lower than that of control group [ $(3.2 \pm 0.8) \times 10^3$  -  $(3.7 \pm 0.7) \times 10^3$ ] ( $P < 0.01$ ), and that the ratio of dead group was close to those of 4, 6, 24 h after injection of endotoxin group, and it was approximately the lowest level.

**CONCLUSION:** Enterocyte apoptotic activity is increased and PCNA expression is decreased during endotoxemia in baby rats, and the imbalance between apoptosis and proliferation is one of the pathologic mechanisms of gut barrier impairment during severe infection.

**Key Words:** Endotoxemia; Enterocyte; Apoptosis; Proliferating cell nuclear antigen; Baby; Rats

Wu XQ, Wang H, Sun M, Lv QJ, Zhou Z. Effect of endotoxemia on enterocyte apoptosis and PCNA expression in baby rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(5):621-625

## 摘要

目的: 探讨幼年大鼠内毒素血症对小肠细胞凋亡与增生

的影响,为抗凋亡或促增生治疗提供理论依据。

**方法:**用内毒素(4 mg/kg大肠杆菌脂多糖)ip制备幼年大鼠内毒素血症模型,同等量生理盐水 ip 为对照组,分别在注射后 0 h(只限于对照组)或死后 10 min(只限于内毒素组),2, 4, 6, 24, 72 h 取 4 cm 远端回肠,HE 染色观察小肠绒毛的病理变化,原位末端标记法(TUNEL)检测小肠上皮的细胞凋亡,免疫组织化学方法测定增生细胞核抗原(PCNA)的表达。

**结果:**内毒素组各时间点小肠绒毛上皮细胞凋亡指数均明显高于对照组(分别为  $37.4 \pm 7.1$ ,  $44.1 \pm 9.3$ ,  $46.6 \pm 8.2$ ,  $54.7 \pm 9.0$ ,  $45.3 \pm 7.2$ ,  $33.9 \pm 6.1$  vs  $0.02 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), PCNA 表达均明显低于对照组( $P < 0.05$ )。注内毒素后 2 h 上皮细胞凋亡指数明显增加,随着时间延长,逐渐增加,于 24 h 达高峰,72 h 恢复到 6 h 的水平;PCNA 的表达于 2 h ( $30.2 \pm 8.3$  vs  $74.6 \pm 16.2$ ,  $t = 6.874$ ,  $P < 0.01$ )明显降低,4 h ( $21.4 \pm 6.7$  vs  $74.6 \pm 18.7$ ,  $t = 7.566$ ,  $P < 0.01$ )和 6 h ( $23.9 \pm 14.7$  vs  $73.6 \pm 13.7$ ,  $t = 6.999$ ,  $P < 0.01$ )达最低水平,24 h ( $35.8 \pm 11.4$  vs  $76.3 \pm 11.8$ ,  $t = 7.010$ ,  $P < 0.01$ )恢复到 2 h 的水平,72 h ( $59.6 \pm 18.0$  vs  $78.7 \pm 16.9$ ,  $t = 2.185$ ,  $P = 0.046 < 0.05$ )仍未达到正常。死亡组细胞凋亡指数( $33.9 \pm 6.1$ )和 PCNA 表达( $20.2 \pm 9.2$ )分别与注内毒素后 2 h 和 4 h 的接近。将同一时间点的 PCNA 表达与细胞凋亡指数的比值进行比较发现,内毒素组的比值(分别为  $0.8 \pm 0.3$ ,  $0.5 \pm 0.1$ ,  $0.5 \pm 0.3$ ,  $0.6 \pm 0.2$ ,  $1.3 \pm 0.3$ , 和  $0.6 \pm 0.2$ )明显低于正常[( $3.2 \pm 0.8$ )  $\times 10^3$  - ( $3.7 \pm 0.7$ )  $\times 10^3$ ]( $P < 0.01$ ),死亡组比值与注内毒素后 4, 6, 24 h 的接近,近于最低点。

**结论:**幼年大鼠内毒素血症时小肠上皮细胞凋亡增加,PCNA 表达降低,细胞凋亡与细胞增生之间的平衡破坏是严重感染时肠屏障破坏的病理机制之一。

**关键词:**内毒素血症;肠上皮细胞;凋亡;增生细胞核抗原;幼年;大鼠

吴秀清,王虹,孙梅,吕杰杰,周卓.幼年大鼠内毒素血症对小肠上皮细胞凋亡及 PCNA 表达的影响.世界华人消化杂志 2005;13(5):621-625  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/621.asp>

## 0 引言

严重感染是儿科危重症中胃肠功能障碍的常见病因之一,其发病机制与内毒素血症和肠屏障功能破坏密切相关,内毒素血症可通过缺氧、自由基增多、炎症递质释放致肠屏障功能破坏,大量细菌移位又加重内毒素血症,致多器官功能障碍,甚至引起死亡<sup>[1]</sup>。细胞凋亡在增生活跃的胃肠上皮是一个基本生理过程,增生和凋亡必须很好的同步才能维持黏膜上皮完整性<sup>[2-3]</sup>,从而确保其功能正常。小肠细胞凋亡与增生在内毒素血症时肠屏障功能破坏中的作用尚少见报道<sup>[4-5]</sup>。我们

采用幼年大鼠内毒素血症模型,对小肠上皮细胞凋亡及增生细胞核抗原(PCNA)的表达进行动态观察,以探讨内毒素血症时肠屏障破坏的机制,为抗凋亡或促增生治疗提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 18 日龄清洁级 Wistar 大白鼠,不分雌雄,体质量 22-40 g,与母鼠共同饲养,由中国医科大学第二临床学院实验动物中心提供。随机分为内毒素组和对照组,每组 48 只,各分为 6 个亚组(考虑到内毒素血症时的死亡率,内毒素组实际设 60 只,取材够数后剩余的鼠继续饲养,为保证例数均衡,死亡组只取 8 只)。内毒素组内毒素(大肠杆菌脂多糖, Sigma 公司产品)4 mg/kg ip<sup>[6]</sup>,配比浓度为 4 g/L,用生理盐水溶解。对照组(假注射组)生理盐水 1 mL/kg ip。每组动物分别于注射后立即(只限于对照组,为 0 点对照)或死后 10 min 内(内毒素组死亡者),2, 4, 6, 24, 72 h 6 个时间点各随机取 8 只,100 mL/L 水合氯醛 4 mL/kg ip 麻醉,为防止人为污染,无菌操作下断头处死,取远端回肠 4 cm,用冰盐水灌注清除小肠内容物,放入 0.1 mol/L PBS 配制的 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定保存,常规石蜡包埋,切片。

**1.2 方法** HE 染色光镜下观察小肠绒毛的病理变化。细胞凋亡的检测为原位末端标记法(TUNEL),试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。按说明书步骤进行,其中消化步骤采用的是放入 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH6.0)中,微波煮沸 2 min,停 5 min,再煮沸 1 min,放置自然凉。细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡细胞。阴性对照只加标记缓冲液,不加末端脱氧核糖核酸转移酶。PCNA 的表达用免疫组织化学方法测定,试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供,一抗为 1:160 小鼠抗-PCNA,按说明书方法操作。细胞核中有棕褐色颗粒者为 PCNA 阳性表达。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。应用 MetaMorph/C-5050/BX41 (UIC/Olympus, US/JP)显微图像分析系统,每张切片取 6 个高倍视野进行分析。光镜下 400 $\times$  计数 100 个细胞中凋亡细胞数,以凋亡指数表示;对 PCNA 的表达进行阳性染色的单位面积积分光密度值测定,并用积分光密度值的千分之一表示;所得结果取均值作为每张切片的值。

**统计学处理** 用 SPSS11.0 统计软件包进行,所有资料均采用 mean  $\pm$  SD 表示,组间比较采用方差分析和 LSD 法(方差齐)及校正  $t$  检验(方差不齐), $P < 0.05$  为差异有显著意义。

## 2 结果

内毒素组动物注药后 30 min 出现倦怠、抖动;1 h 后

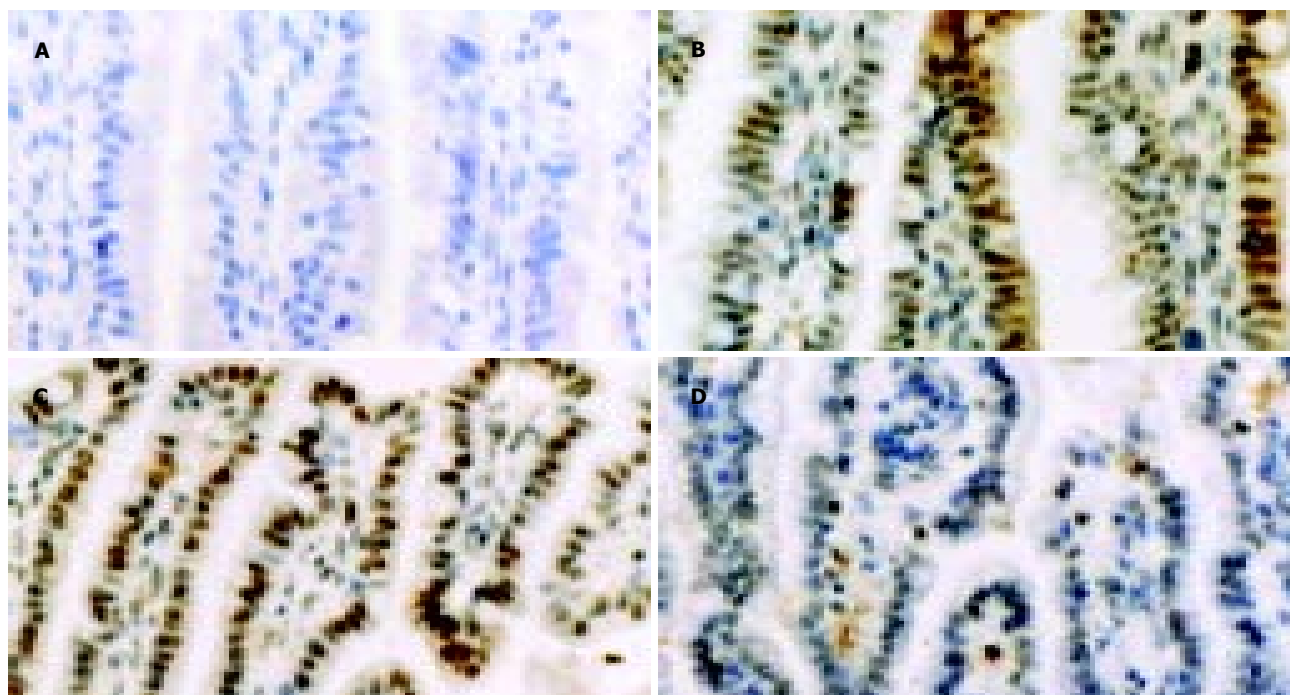


图1 小肠TUNEL染色,  $\times 400$ . A: 正常; B: 内毒素ip后4 h; C: 内毒素ip后24 h; D: 内毒素ip后死亡.

出现腹泻、腹胀、呼吸快; 4-6 h 出现口唇、四肢青紫, 周身凉, 腹胀加重, 死亡9只; 24 h 吃奶减少, 腹泻、腹胀持续, 体重不增, 活动少, 又死亡3只; 72 h 体质量下降明显, 腹胀、呼吸快减轻, 无死亡. 对照组未见异常, 3 d 内体质量增长良好. 在HE染色光镜下观察, 内毒素组小肠在2 h 未见明显异常, 在4, 6, 24, 72 h 及死亡组可见炎细胞浸润. 对照组各时间点小肠绒毛结构正常.

**2.1 小肠细胞凋亡** 内毒素ip后小肠组织, 凋亡阳性细胞数较多, 以肠绒毛端为主. 各时间点细胞凋亡指数分别为  $37.4 \pm 7.1$  (2 h),  $44.1 \pm 9.3$  (4 h),  $46.6 \pm 8.2$  (6 h),  $54.7 \pm 9.0$  (24 h),  $45.3 \pm 7.2$  (72 h) 和  $33.9 \pm 6.1$  (死亡), 而对照组仅为  $0.02 \pm 0.01$  ( $P < 0.01$ ) (图1).

**2.2 小肠PCNA表达及其与凋亡指数的比值** 正常小肠组织, 胞核PCNA阳性染色很多, 棕褐色, 位于肠绒毛基底部. 内毒素ip后小肠组织, 胞核PCNA阳性染色明显减少. 内毒素ip后2 h PCNA的表达就明显降低 ( $t = 6.874$ ,  $P < 0.01$ ), 4-6 h 近于最低 ( $t =$

$7.566$ ,  $P < 0.01$ ,  $t = 6.999$ ,  $P < 0.01$ ), 24 h 有所恢复 ( $t = 7.010$ ,  $P < 0.01$ ), 72 h 未恢复到正常 ( $t = 2.185$ ,  $P = 0.046 < 0.05$ ), 死亡组PCNA的表达则是最低点 ( $t = 7.152$ ,  $P < 0.01$ ). 内毒素组PCNA表达与凋亡指数的比值明显低于正常 ( $P < 0.01$ ), 死亡组的比值与内毒素组4-24 h 的接近 (表1, 图2).

### 3 讨论

严重感染是儿科危重症中胃肠功能障碍的常见病因之一<sup>[1, 7]</sup>, 但其发病机制还不清楚. 研究提示, 败血症时发生了肠黏膜萎缩<sup>[8]</sup>, 因此, 人们设想, 细胞凋亡增加或细胞增生能力减低在严重感染时肠功能障碍的机制中可能起一定作用. 本结果显示, 内毒素组光镜下只见到炎细胞浸润, 因此普通的光镜病理变化不能证明败血症时发生了肠屏障结构破坏. 原位细胞凋亡(TUNEL)检测则证明, 幼年大鼠内毒素血症时小肠细胞确实发生了凋亡增加. 内毒素组各时间点小肠绒毛上皮细胞凋亡指数均明显高于对照组, 差异有非常显著意义 ( $P < 0.01$ ), 注内毒素后2 h 上皮细胞

表1 小肠PCNA表达及其与凋亡指数的比值 ( $n = 8$ , mean  $\pm$  SD)

项目	分组	2 h	4 h	6 h	24 h	72 h	Dead
PCNA	对照组	$74.6 \pm 16.2$	$74.6 \pm 18.7$	$73.6 \pm 13.7$	$76.3 \pm 11.8$	$78.7 \pm 16.9$	$73.0 \pm 18.7$
	内毒素组	$30.2 \pm 8.3^b$	$21.4 \pm 6.7^{ab}$	$23.9 \pm 14.7^b$	$35.8 \pm 11.4^b$	$59.6 \pm 18.0$	$20.2 \pm 9.2^{ab}$
PCNA/凋亡指数 ( $\times 10^3$ )	对照组	$3.2 \pm 0.8$	$3.5 \pm 0.6$	$3.3 \pm 0.8$	$3.5 \pm 0.9$	$3.6 \pm 0.7$	$3.7 \pm 0.7$
	内毒素组	$0.8 \pm 0.3^f$	$0.5 \pm 0.1^{df}$	$0.5 \pm 0.3^{df}$	$0.6 \pm 0.2^f$	$1.3 \pm 0.3$	$0.6 \pm 0.2^d$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs L-24 h; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs L-72 h组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs L-2 h组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs L-2 h组; <sup>e</sup> $P < 0.01$  vs L-72 h组.

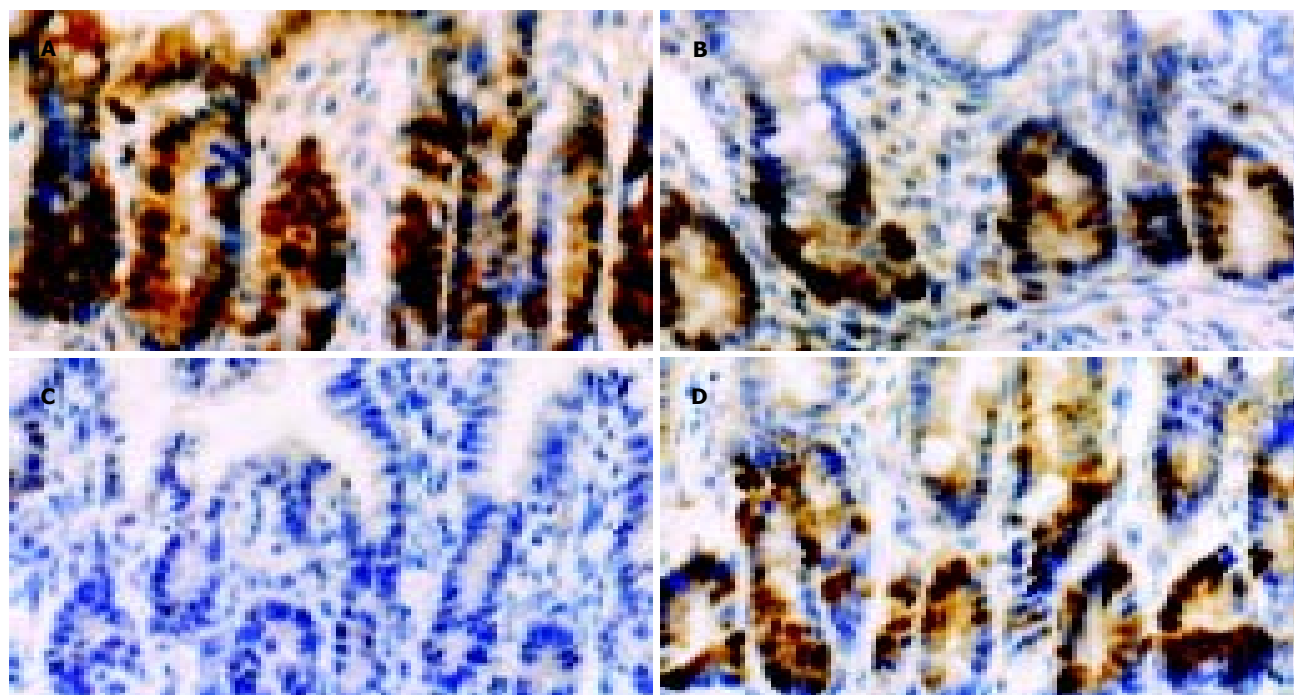


图2 小肠免疫组化染色,  $\times 400$ . A: 正常; B: 内毒素 ip 后 2 h; C: 内毒素 ip 后死亡; D: 内毒素 ip 后 72 h.

出现明显凋亡,随着时间的延长,凋亡指数逐渐增加,到 24 h 达高峰,72 h 后恢复到 6 h 的水平,而死亡组细胞凋亡的程度则与 2 h 组的接近.

增生细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)又称周期蛋白,是一种核内蛋白质,是细胞增生时所需的 DNA 聚合酶辅助蛋白,通常用来作为细胞增生的标志物,其本身也参与对细胞周期的调控<sup>[4, 9-10]</sup>. 本结果看出,内毒素组各时间点小肠绒毛上皮细胞 PCNA 的表达均明显低于对照组,差异有显著意义( $P < 0.05$ ),内毒素 ip 后 2 h PCNA 的表达就明显降低,4-6 h 近于最低,24 h 有所恢复,但 72 h 仍未恢复到正常水平,死亡组 PCNA 的表达则是最低点. 提示,内毒素血症时小肠上皮细胞不仅发生了凋亡,而且出现了增生受抑,即增生和凋亡双向异常共同造成了细胞结构平衡的破坏,由此引起一系列肠功能障碍的表现<sup>[6-7]</sup>. 此与以往的一些研究报道结果一致<sup>[5, 11-14]</sup>.

细胞凋亡参与肠屏障功能的破坏<sup>[6, 15-28]</sup>,但凋亡程度与动物死亡之间的关系却未见分析,我们发现,内毒素血症死亡组肠细胞凋亡程度并不是最重的,因此仅用细胞凋亡一个指标来衡量肠屏障结构的损伤程度是不够的,因为肠组织结构的完整取决于细胞增生与凋亡之间的平衡<sup>[29-32]</sup>,尤其在 3 mo 之内处于生长发育阶段的大鼠,其肠细胞是以增生为主<sup>[4]</sup>,因此细胞增生受抑的程度对幼年大鼠肠结构破坏起更主要作用,本死亡组的 PCNA 表达在各组中最低也证实了这一点. 为了观察增生与凋亡之间平衡破坏的程度,

本文将 PCNA 表达与凋亡指数的比值进行比较,发现内毒素组的比值均远远低于正常,除 72 h 的  $P < 0.05$  之外,其余各组的都是  $P < 0.01$ . 死亡组的比值与内毒素组 4-24 h 的比值接近,在统计学上没有差异,可认为是各组中的最低点. 72 h 后其比值呈回升趋势,但仍未达正常. 这个结果与临床所观察的死亡动物多发生在注内毒素后 24 h 之内,72 h 后死亡减少,但动物胃肠功能障碍仍持续相符. 该研究证明,小肠细胞增生与凋亡之间平衡破坏的严重程度与动物死亡密切相关. 出现 24 h 内死亡多,72 h 后死亡反而少的情况,其原因可能为:(1)内毒素血症早期不断增加肠细胞凋亡,同时抑制肠细胞的增生,破坏了肠屏障结构,致肠功能障碍,大量细菌移位又加重内毒素血症,致多器官功能障碍,甚至引起死亡<sup>[1]</sup>. (2)随着肠功能障碍的继续,能量吸收减少,加上内毒素血症造成的系统炎症反应耗竭能量<sup>[33]</sup>,主动耗能的凋亡过程受到限制或凋亡细胞在体内部分被吞噬清除<sup>[7]</sup>, (3)机体代偿性调节细胞增生以维持肠黏膜的完整性,使增生与凋亡的比值得以回升,肠黏膜结构的破坏暂时得以减轻.

上述结果提示,幼年大鼠内毒素血症时小肠上皮细胞凋亡增加,PCNA 表达降低,细胞凋亡与增生之间的平衡破坏是严重感染时肠屏障破坏的病理机制之一,导致死亡的因素不是取决于肠细胞凋亡的程度,而可能是取决于细胞增生与凋亡之间平衡破坏的程度. 本研究为治疗小儿严重感染时应用抗凋亡或促增生药物治疗胃肠功能障碍提供了理论依据.

## 4 参考文献

- 1 王茂贵. 小儿胃肠道特点、黏膜屏障与胃肠功能障碍. 中国实用儿科杂志 2001;16:2-5
- 2 Szabo I, Tarnawski AS. Apoptosis in the gastric mucosa: molecular mechanisms, basic and clinical implications. *J Physiol Pharmacol* 2000;51:3-15
- 3 Tarnawski AS, Szabo I. Apoptosis-programmed cell death and its relevance to gastrointestinal epithelium: survival signal from the matrix. *Gastroenterology* 2001;120:294-299
- 4 Wang L, Li J, Li Q, Zhang J, Duan XL. Morphological changes of cell proliferation and apoptosis in rat jejunal mucosa at different ages. *World J Gastroenterol* 2003;9:2060-2064
- 5 Sukhotnik I, Mogilner J, Krausz MM, Lurie M, Hirsh M, Coran AG, Shiloni E. Oral arginine reduces gut mucosal injury caused by lipopolysaccharide endotoxemia in rat. *J Surg Res* 2004;122:256-262
- 6 Alscher KT, Phang PT, McDonald TE, Walley KR. Enteral feeding decreases gut apoptosis, permeability, and lung inflammation during murine endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G569-576
- 7 Behrns KE, Schrum LW, Que FG. Apoptosis: cell death by proteolytic scalpel. *Surgery* 1999;126:463-468
- 8 Piguet PF, Vesin C, Donati Y, Barazzone C. TNF-induced enterocyte apoptosis and detachment in mice: induction of caspases and prevention by a caspase inhibitor, ZVAD-fmk. *Lab Invest* 1999;79:495-500
- 9 Ezaki T, Yao L, Matsuno K. The identification of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) on rat tissue cryosections and its application to double immunostaining with other markers. *Arch Histol Cytol* 1995;58:103-115
- 10 Sheen-Chen SM, Ho HT, Chen WJ, Eng HL. Obstructive jaundice alters proliferating cell nuclear antigen expression in rat small intestine. *World J Surg* 2003;27:1161-1164
- 11 谢建新, 顾岩, 赵淑民, 罗宝国, 陈丽琰, 吴肇汉, 左焕琛. 萎缩小肠黏膜上皮细胞凋亡及增生细胞核抗原表达变化的研究. 解剖学杂志 1999;22:124-127
- 12 Varedi M, Chinery R, Greeley GH Jr, Herndon DN, Englander EW. Thermal injury effects on intestinal crypt cell proliferation and death are cell position dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G157-163
- 13 王立生, 潘令嘉, 陈村龙, 李明松, 孙勇, 张亚历, 周殿元. 双歧杆菌对裸鼠移植大肠癌增生与凋亡的原位研究. 世界华人消化杂志 2000;8:429-431
- 14 彭曦, 颜洪, 陶麟辉, 赵云, 王裴, 汪仕良. 早期肠道营养对烧伤大鼠肠黏膜损伤和修复的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:1251-1254
- 15 Evans SM, Ashwood P, Warley A, Berisha F, Thompson RP, Powell JJ. The role of dietary microparticles and calcium in apoptosis and interleukin-1 $\beta$  release of intestinal macrophages. *Gastroenterology* 2002;123:1543-1553
- 16 Monack DM, Navarre WW, Falkow S. Salmonella-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation. *Microbes Infect* 2001;3:1201-1212
- 17 Sukhotnik I, Khateeb K, Krausz MM, Sabo E, Siplovich L, Coran AG, Shiloni E. Sandostatin impairs postresection intestinal adaptation in a rat model of short bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2002;47:2095-2102
- 18 Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001;293:293-297
- 19 Sileri P, Morini S, Sica GS, Schena S, Rastellini C, Gaspari AL, Benedetti E, Cicalese L. Bacterial translocation and intestinal morphological findings in jaundiced rats. *Dig Dis Sci* 2002;47:929-934
- 20 Husain SS, Szabo IL, Tamawski AS. NSAID inhibition of GI cancer growth: clinical implications and molecular mechanisms of action. *Am J Gastroenterol* 2002;97:542-553
- 21 Sun Z, Wang X, Wallen R, Deng X, Du X, Hallberg E, Andersson R. The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:415-422
- 22 Abreu MT, Palladino AA, Arnold ET, Kwon RS, McRoberts JA. Modulation of barrier function during Fas-mediated apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2000;119:1524-1536
- 23 Keefe DM, Brealey J, Goland GJ, Cummins AG. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut* 2000;47:632-637
- 24 Rollwagen FM, Yu ZY, Li YY, Pacheco ND. IL-6 rescues enterocytes from hemorrhage induced apoptosis in vivo and in vitro by a bcl-2 mediated mechanism. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;89:205-213
- 25 Wildhaber BE, Yang H, Teitelbaum DH. Total parenteral nutrition-induced apoptosis in mouse intestinal epithelium: modulation by keratinocyte growth factor. *J Surg Res* 2003;112:144-151
- 26 Lightfoot E Jr, Horton JW, Maass DL, White DJ, McFarland RD, Lipsky PE. Major burn trauma in rats promotes cardiac and gastrointestinal apoptosis. *Shock* 1999;11:29-34
- 27 Cinel I, Avlan D, Cinel L, Polat G, Atici S, Mavioglu I, Serinol H, Aksoyok S, Oral U. Ischemic preconditioning reduces intestinal epithelial apoptosis in rats. *Shock* 2003;19:588-592
- 28 Wolf SE, Ikeda H, Matin S, Debroy MA, Rajaraman S, Herndon DN, Thompson JC. Cutaneous burn increases apoptosis in the gut epithelium of mice. *J Am Coll Surg* 1999;188:10-16
- 29 Gallagher AM, Gottlieb RA. Proliferation, not apoptosis, alters epithelial cell migration in small intestine of CFTR null mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G681-687
- 30 Que FG, Gores GJ. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology* 1996;110:1238-1243
- 31 Jones BA, Gores GJ. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 1):G1174-1188
- 32 Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:109-120
- 33 MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, Sudworth P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 1999;45:223-228

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 幽门螺杆菌 HspA 亚基的表达与纯化

刘秀丽, 张兆山, 陶好霞, 展德文, 刘纯杰

刘秀丽, 张兆山, 陶好霞, 展德文, 刘纯杰, 北京生物工程研究所  
北京市 100071

刘秀丽, 女, 1971-10-10 生, 河北省固安县人, 汉族, 2002 年北京生物工程研究所博士研究生毕业, 助理研究员, 主要从事幽门螺杆菌疫苗的研究。

国家高技术研究发展计划资助项目(863 计划), No. 2004AA215213

项目负责人: 刘纯杰, 100071, 北京市丰台大路 20 号, 北京生物工程研究所, Liucj@nic.bmi.ac.cn

电话: 010-66948834 传真: 010-63833521

收稿日期: 2004-12-17 接受日期: 2005-01-26

## Expression and purification of recombinant heat shock protein A subunit of *Helicobacter pylori*

Xiu-Li Liu, Zhao-Shan Zhang, Hao-Xia Tao, De-Wen Zhan, Chun-Jie Liu

Xiu-Li Liu, Zhao-Shan Zhang, Hao-Xia Tao, De-Wen Zhan, Chun-Jie Liu, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

Supported by the Hi-tech Research and Development Program of China, No. 2004AA215213

Correspondence to: Chun-Jie Liu, Beijing Institute of Biotechnology, 20 Dongda Street, Beijing 100071, China. Liucj@nic.bmi.ac.cn

Received: 2004-12-17 Accepted: 2005-01-26

## Abstract

**AIM:** To express and purify recombinant heat shock protein A subunit (HspA) of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).

**METHODS:** Gene *hspA* was amplified by PCR, and inserted into the prokaryotic expression vector pET22b, pQE-60 and pGEX-4T-2 respectively. The plasmids were transformed into the *Escherichia coli* JM109 and BL21 (DE3). Expression of *hspA* gene was induced by IPTG and was analyzed by SDS-PAGE. The recombinant proteins were purified through nickel-affinity chromatography. Antigenicity of the recombinant proteins was analyzed by western blot.

**RESULTS:** The *hspA* gene was expressed in two forms (HspA and HspA-His<sub>6</sub>) in pQE-60. The expressed protein accounted for above 40% of the total bacterial protein. The purity of HspA and HspA-His<sub>6</sub> were 88.63% and 86.32% respectively after purification. Western blot proved that the recombinant proteins could be recognized by the anti-*H. pylori* serum.

**CONCLUSION:** HspA of *H. pylori* has been expressed and purified with high efficiency, which can be used for vaccine development and immunological investigation.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Heat shock protein A; Recombinant expression; Purification

Liu XL, Zhang ZS, Tao HX, Zhan DW, Liu CJ. Expression and purification of recombinant heat shock protein A subunit of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):626-630

## 摘要

**目的:** 利用原核表达载体高效表达幽门螺杆菌热休克蛋白 A(HspA), 并进行纯化。

**方法:** PCR 扩增 *hspA* 基因, 将其克隆至原核表达载体 pET22b, pQE-60, pGEX-4T-2 中, 转化大肠杆菌, 经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 分析表达。利用镍离子亲和层析对表达产物进行纯化。免疫印迹检测蛋白的抗原性。

**结果:** PCR 扩增得到 *hspA* 基因, 在载体 pQE-60 中以 HspA 和 HspA-His<sub>6</sub> 两种形式得到表达, 表达量高达菌体总蛋白的 40% 以上。经镍离子亲和层析后, 纯化率分别为 88.63% 和 86.32%, 但 HspA-His<sub>6</sub> 在纯化过程中发生降解。免疫印迹实验表明, HspA 和 HspA-His<sub>6</sub> 都有很好的抗原性。

**结论:** 实现了 HspA 蛋白的高效表达和纯化, 为幽门螺杆菌 HspA 亚单位疫苗的免疫实验奠定基础。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 热休克蛋白 A; 重组表达; 纯化

刘秀丽, 张兆山, 陶好霞, 展德文, 刘纯杰. 幽门螺杆菌 HspA 亚基的表达与纯化. 世界华人消化杂志 2005;13(5):626-630

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/626.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是导致慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌、胃黏膜相关性淋巴瘤(MALT)淋巴瘤等胃部疾病的主要致病细菌, 1994 年国际癌症研究所将 *H. pylori* 认定为第一类致癌因子<sup>[1-5]</sup>。流行病学资料显示, *H. pylori* 感染呈全球分布, 在发展中国家人群中, *H. pylori* 感染率高达 70-80%, 即便在发达国家, *H. pylori* 的感染率也达 50% 左右。由于胃肠道黏膜组织很适合于 *H. pylori* 的定植, 一经感染 *H. pylori*, 便很难治愈<sup>[6-10]</sup>。*H. pylori* 复合抗生素疗法, 成本昂贵; 而且通用的抗生素一般都没有专性于胃

肠环境, 因而对防治 *H. pylori* 感染的作用有限; 此外, *H. pylori* 对抗生素的抗性日益增加, 将进一步限制抗生素疗法的应用。因此, 疫苗是预防和控制 *H. pylori* 最有效的途径之一。 *H. pylori* 产生两种热休克蛋白, HspA 和 HspB, 其相对分子质量分别为  $M_{13\ 000}$  和  $M_{58\ 200}$ <sup>[11-15]</sup>。由于 HspA 参与尿素酶的组装, 并使其发挥酶活性, 分解尿素产生氨, 从而中和胃酸有利于 *H. pylori* 的定植<sup>[16-20]</sup>。由此可见 HspA 是 *H. pylori* 的重要致病因子, 同时研究已证明 HspA 是一种理想的保护性抗原成分, 并为有效的亚单位疫苗候选抗原。我们将 HspA 基因克隆至原核表达载体, 实现 HspA 蛋白的初步纯化, 为研究其生物学特性和制备 *H. pylori* 亚单位疫苗奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori* NCTC11637 为国际标准株, 大肠杆菌 JM109, BL21 ( $\lambda$ DE3), TOP010; 质粒 pET22b, pQE-60, pGEX-4T-2。由本室保存。限制性内切酶 *Nco* I, *Bam*HI 和 *Xho* I, Ex Taq DNA 聚合酶和 T<sub>4</sub> DNA 连接酶, 购自宝生物工程大连有限公司。辣根过氧化物酶标记的第二抗体, 购自 Sigma 公司。镍离子亲和层析柱 (5 mL), 购自安玛西亚公司。

### 1.2 方法

1.2.1 HspA 表达载体的构建 收集用平板厌氧培养的 *H. pylori* 菌体, 用 TE 缓冲液 (pH8.0) 洗涤和重悬后, 沸水浴 10 min, 离心取上清; 用等体积抽提液 (酚: 氯仿: 异丙醇的比例为 25:24:1) 抽提两次, 并用 2 倍乙醇沉淀和预冷 700 mL/L 乙醇洗涤; 沉淀抽干后溶于 TE 中, 制备 *H. pylori* NCTC11637 基因组模板。PCR 扩增引物为: P1: 5'-CTG CCA TGG AGT TTC AAC CAT TAG-3', P2: 5'-CGG GAT CCT TAG TGT TTT TTG TG-3', P3: 5'-CGG GAT CCG TGT TTT TTG TGA TC-3', P4: 5'-CGG GAT CCA TGA AGT TTC AAC C-3', P5: 5'-CCG CTC GAG TTA GTG TTT TTT GTG-3'。P1 和 P2 扩增的基因用于克隆至载体 pET22b, pQE-60 上, 此引物为匹配载体上的起始密码子, 将 HspA 基因上的第 4 个碱基由 A 变为 G, 从而使 HspA 蛋白的第二个氨基酸由 Lys 变为 Glu。P3 和 P2 扩增的基因用于克隆至载体 pQE-60 上, 由此 HspA 蛋白不仅第二个氨基酸由 Lys 变为 Glu, 而且 C 末端加入两个酶切位点的 4 个氨基酸和 (His)<sub>6</sub>, 为融合表达基因。P3 和 P2 扩增的基因用于克隆至载体 pGEX-4T-2 上, 与 GST 蛋白形成融合和表达。PCR 反应体系: 取 10×PCR buffer 5  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, 50 ng/ $\mu$ L 5' 和 3' 端引物 1  $\mu$ L, Ex Taq 0.5  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, 加无菌水至 50  $\mu$ L。94℃ 热变性 5 min 后, 进行 30 个“变性—复性—延伸”循环, 94℃ 变性 30 s, 56℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s。然后 72℃

延伸 10 min。利用凝胶回收试剂盒割胶回收 PCR 产物。用 *Xho* I 和 *Eco* RI 双酶切 HspA 基因和质粒 pET22b, pQE-60, pGEX-4T-2, 酶切产物用凝胶回收试剂盒割胶回收, 并在 T<sub>4</sub> DNA 连接酶作用下于 16℃ 过夜连接, 连接产物转化大肠杆菌 TOP010 后挑选阳性克隆, 经过抽提质粒、酶切分析鉴定。将得到的重组质粒分别命名为 pETH、pQEH、pQEHS 和 pGEXH。将重组质粒进行测序鉴定。

1.2.2 HspA 基因的表达及鉴定 将重组质粒 pQEH, pQEHS 转化 *E. coli* JM109 感受态, 将 pETH、pGEXH 转化 *E. coli* BL21 感受态, 筛选转化重组子。将转化菌的单克隆菌落接种至 LB 培养基 37℃ 培养 3 h,  $A_{600}$  为 0.4-0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 4 h 后, 离心收集 1 mL 菌体, 然后加入水 70  $\mu$ L, 5× 上样缓冲液 20  $\mu$ L, 1 mol/L DTT 10  $\mu$ L。煮沸 10 min, 离心 10 min, 取上清上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 鉴定转化菌的表达。在 LB 液体培养基中大量培养 400 mL 转化菌, 诱导表达离心收集菌体, 加入 0.02 mol/L 的 PB 缓冲液 (0.2 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 80 mL; 0.2 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mL; H<sub>2</sub>O, 900 mL;) 12 mL, 超声破碎 10 min, 15 000 g 离心 10 min, 收取上清和沉淀, SDS-PAGE 电泳检测表达蛋白的分布情况。

1.2.3 HspA 基因的纯化 用 10 mL 一次性注射器吸满 10 mL 水与镍柱进口进行无气泡连接, 拧去柱子末尾的堵头, 冲洗柱中的 200 mL/L 乙醇, 冲洗 20 mL, 再使柱中充满 0.1 mol/L NiSO<sub>4</sub> 约 10 mL, 然后再用去离子水冲洗 15 mL。用 Binding Buffer (0.016 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.004 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 mol/L NaCl, pH7.4) 冲洗 10 个柱体积, 约 50 mL。样品先用 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤, 上样。用 Eluting Buffer1 (10 mmol/L 咪唑, 0.016 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.004 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 mol/L NaCl, pH7.4) 平衡 25 mL, 用 Eluting Buffer2 (0.25 mol/L 咪唑, 0.016 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.004 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 mol/L NaCl, pH7.4) 洗脱, 收集 1 mL/管, SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.4 Western 印迹 SDS-PAGE 结束后, 将胶用转移缓冲液 (39 mmol/L 甘氨酸, 48 mmol/L Tris, 37 mg/L SDS, 200 mL/L 甲醇, 加水至 1 000 mL) 漂洗。同时剪一与胶大小相同的硝酸纤维素膜及滤纸。以半干核酸蛋白转移仪 0.8 mA/cm<sup>2</sup> 转移 2 h。取出硝酸纤维素膜, 用封闭液 (0.05 mol/L PBS, 0.5 mol/L NaCl, 50 g/L BSA, 5 g/L Tween-20,) 4℃ 封闭过夜。然后抗 *H. pylori* 血清稀释液, 室温下作用 2-3 h。漂洗液 (0.05 mol/L PBS, 0.5 mol/L NaCl, 0.5% Tween-20,) 漂洗 4 次, 每次 10 min。加入稀释液稀释的辣根过氧化物酶标记的第二抗体 (1:5 000 稀释, 稀释液成分: 0.01 mol/L PBS, 0.25 mol/L NaCl, 0.5% Tween-20, 0.5% BSA), 室温作用 2 h。漂洗后, 加入底物溶液 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 mol/L 柠檬酸 0.24 mol/L, 10 mL; 二胺

ATG	AAG	TTT	CAA	CCA	TTA	GGA	GAA	AGG	GTC	TTA	GTA	GAA	AGA	CTT	GAA	GAA
M	K	F	Q	P	L	G	E	R	V	L	V	E	R	L	E	E
GAG	AAC	AAA	ACC	AGT	TCA	GGC	ATT	ATC	ATC	CCT	GAT	AAC	GCT	AAA	GAA	AAG
E	N	K	T	S	S	G	I	I	I	P	D	N	A	K	E	K
CCT	TTG	ATG	GGC	GTA	GTC	AAA	GCG	GTT	AGC	CAT	AAA	ATC	AGT	GAG	GGT	TGC
P	L	M	G	V	V	K	A	V	S	H	K	I	S	E	G	C
AAA	TGC	GTC	AAA	GAA	GGC	GAT	GTG	ATC	GCT	TTT	GGC	AAA	TAT	AAA	GGT	GCA
K	C	V	K	E	G	D	V	I	A	F	G	K	Y	K	G	A
GAA	ATC	GTT	TTA	GAT	GGC	ACC	GAA	TAC	ATG	GTG	CTA	GAA	CTA	GAA	GAC	ATT
E	I	V	L	D	G	T	E	Y	M	V	L	E	L	E	D	I
CTG	GGC	ATT	GTG	GGT	TCA	GGC	TCT	TGT	TGT	CAT	ACA	GGT	AAT	CAT	GAT	CAT
L	G	I	V	G	S	G	S	C	C	H	T	G	I	H	D	H
AAG	CAT	GCT	AAA	GAG	CAT	GAA	GCT	TGC	TGT	CAT	GAT	CAC	AAA	AAA	CAC	TAA
K	H	A	K	E	H	E	A	C	C	H	D	H	K	K	H	*

图1 克隆至 pETH、pQEH 上的 Hsp A 抗原的基因序列和氨基酸序列.

基联苯氨4 mg, 300 mL/L30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 μL)室温下显色. 待显色适度时, 用2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应, 水漂洗后阴干.

## 2 结果

**2.1 hsp A 抗原基因的克隆及筛选** 重组质粒pETH, pQEH, pQEHS 和 pGEXH 经酶切分析鉴定, 表明已成功将 hsp A 抗原基因克隆至原核表达载体(图1-2). 用引物从两侧进行序列测定, 即可通读. 序列分析表明, 该序列含 hsp A 基因 357 bp, 克隆至 pETH、pQEH 上的 HspA 基因的第四个碱基由 A 变为 G, 从而使 HspA 蛋白的第二个氨基酸由 Lys 变为 Glu. 克隆至 pQEHS 末尾增加 GGA TCC AGA TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT 30 个核苷酸. 克隆至 pGEXH 上的 HspA 基因 GST 基因融合, 序列没有改变.

**2.2 重组 Hsp A 蛋白的表达** 重组的基因工程菌经 IPTG 诱导后, 经 SDS-PAGE 检测发现: 与对照 JM109 菌株相比 pQEH 和 pQEHS 均在 14 000 处表达处一条蛋白带. 初步判断应为重组 HspA 蛋白. HspA 蛋白占总蛋白的 42. 51%, HspA-His<sub>6</sub> 蛋白占总蛋白的 43. 07%. 与对照 BL21 相比 pGEXH 在 43 ku 左右表达处 3 条带, 而 pETH

没有表达带(图3).

**2.3 重组 Hsp A 蛋白的纯化** 质粒 pETH 未表达目的蛋白, 而重组 pGEXH 未明原因的表达三条带. 本实验以 pQEH 和 pQEHS 为纯化的研究对象. 取大量培养的超声离心上清和沉淀样品、纯化时的上样穿流峰样品、平衡峰样品和洗脱峰样品进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果发现 pQEH 表达的 HspA 蛋白均以可溶形式表达, 而 pQEHS 表达的 HspA-His<sub>6</sub> 蛋白部分以可溶形式表达, 部分以包涵体形式表达. HspA 蛋白与镍柱结合效果好, 在穿流峰中未检测到 HspA 蛋白. 而 HspA-His<sub>6</sub> 蛋白与镍柱结合效果差, 在穿流峰中检测到 HspA-His<sub>6</sub> 蛋白, 且在洗脱峰中 HspA-His<sub>6</sub> 蛋白出现降解带. 纯化 HspA 蛋白的纯度为 88. 63%, 而 HspA-His<sub>6</sub> 蛋白的纯度为 86. 32%(包括降解带). 从 400 mL 的培养菌中可得到 HspA 约 12 mg, 相同的菌量 HspA-His<sub>6</sub> 只能得到 3 mg 左右(图4).

**2.4 HspA 和 HspA-His<sub>6</sub> 蛋白的免疫印迹分析** 以 150 g/L 的 SDS-PAGE 将 HspA 和 HspA-His<sub>6</sub> 蛋白进行分离, 然后用抗 *H. pylori* 血清进行免疫印迹, 结果发现 HspA 纯化产物在 14 KD 左右有一阳性印迹, 而 HspA-His<sub>6</sub> 纯化

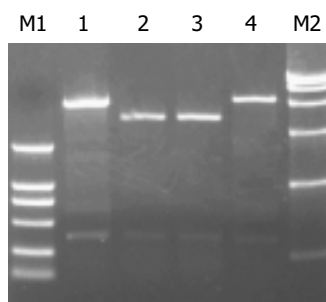


图2 重组质粒的酶切图. M1: DL2000; 1: pGEXH / *XhoI*+*Bam*H I; 2: pQEHS/*Nco* I+*Bam*H I; 3: pQEH/*Nco* I+*Bam*H I; 4: pETH/*Nco* I+*Bam*H I; M2: DL15 000.

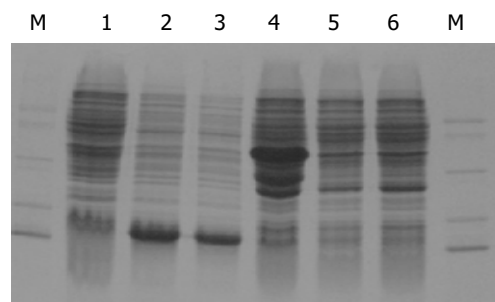


图3 HspA 重组蛋白的电泳分析图. M: Marker,(66 200,43 000,31 000, 20 100,14 400); 1: JM109,2: HspA-His<sub>6</sub>(pQEHS),3: HspA(pQEH),4: HspA (pGEXH),5: HspA(pETH),6: BL21.

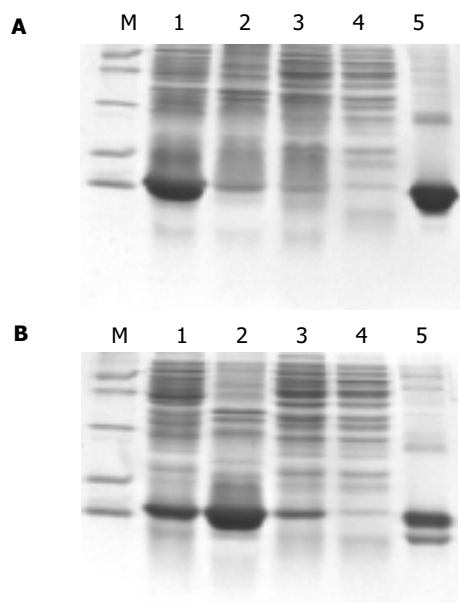


图4 HspA 纯化蛋白的电泳分析结果. A: Expression and purification of HspA; B: Expression and purification of HspA-His<sub>6</sub>. M: Marker(66 200, 43 000, 31 000, 20 100, 14 400); 1: Centrifuged Supernatant; 2: Centrifuged precipitate; 3: loading peak fraction; 4: Equilibrating peak fraction; 5: Eluting peak fraction.

产物在 14 ku 左右有 2 条阳性印迹带, 由此可见 HspA-His<sub>6</sub> 在纯化过程中有降解现象 (图 5).

### 3 讨论

*H. pylori* 中含有一个编码 13 ku 的热休克蛋白 A (HspA), 他与大肠杆菌 GroES 高度同源动物实验研究表明用 HspA (佐剂为霍乱毒素 CT) 免疫小鼠, 可使小鼠对猫胃螺杆菌攻击的保护率为 80%, 说明 HspA 是有效的保护性抗原<sup>[21]</sup>. 另外由于 HspA 蛋白序列在不同 *H. pylori* 菌株间高度保守, 因此将其单独使用或与其他抗原联用, 均可激发机体产生保护免疫, 是 *H. pylori* 疫苗的理想组分<sup>[22]</sup>. 我们将 hspA 基因克隆至不同的表达载体中, 目的是实现该基因的高度表达并利于纯化, 在 pET22b 中, 克隆的基因经测序后序列正确, 但未能实现表达. 将该基因克隆至 pGEX-4T-2 中, 使其与 GST 融合, 然后利用 GST 亲和层析对其纯化. 虽然克隆的基因序列完整无误, 但融合蛋白在表达或在检测处理过程中出现降解, 使得纯化出现困难. 可喜的是 HspA 在 pQE-60 中以 HspA 和 HspA-His<sub>6</sub> 的形式得到高效表达, 因此在纯化过程中我们以纯化 HspA 和 HspA-His<sub>6</sub> 为主.

Hsp A 位于 *H. pylori* 的表面, 其 C 端含有 4 个组氨酸和 4 个半胱氨酸, 能够特异性结合镍离子, 起到镍离子库的作用<sup>[23-29]</sup>. 尿素酶是 *H. pylori* 中重要的定植因子, 他通过分解尿素形成氨以中和胃酸, 为 *H. pylori* 的定植和生存创造条件. 尿素酶的活性与镍离子的存在有密切关系. 因此 Ure 和 Hsp A 之间通过镍离子建立

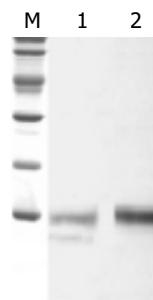


图5 重组蛋白 HspA-His<sub>6</sub> and HspA 的免疫印记分析. M: Marker(97 400, 66 200, 43 000, 31 000, 20 100, 14 400); 1: HspA-His<sub>6</sub>; 2: HspA.

起一定的联系, 在决定 *H. pylori* 定植效率方面起协同作用<sup>[30]</sup>. 我们将 hspA 基因克隆至 pQE-60 中, 因 pQE-60 中含有 6 个组氨酸, 以利于用镍亲和柱纯化, 因此我们将 hspA 基因以带有和不带有 his<sub>6</sub> 尾巴两种形式表达. 通过纯化实验发现, HspA 无论在表达形式 (可溶表达或包涵体) 还是在与亲和柱结合上比 HspA-His<sub>6</sub> 的效果都要好. 这可能是 his<sub>6</sub> 尾巴的加入不但没有增强与镍亲和柱的结合, 反而干扰了 HspA 可溶性表达和 HspA 原有的结合镍离子的作用区域, 实属画蛇添足. 实验研究表明 HspA 对镍离子有很强的网络能力, 这为 *H. pylori* 含有 HspA 的融合疫苗通过镍离子亲和层析纯化打下基础. 实验中所获得的高纯度的 HspA 蛋白为进一步进行动物免疫实验提供了大量抗原.

### 4 参考文献

- 1 Nishibayashi H, Kanayama S, Kiyohara T, Yamamoto K, Miyazaki Y, Yasunaga Y, Shinomura Y, Takeshita T, Takeuchi T, Morimoto K, Matsuzawa Y. *Helicobacter pylori*-induced enlarged-fold gastritis is associated with increased mutagenicity of gastric juice, increased oxidative DNA damage, and an increased risk of gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:1384-1391
- 2 Suleymanov Z. Expression of class I and II MHC receptors in *Helicobacter pylori*-positive patients with active gastritis and duodenal ulcer. *Turk J Gastroenterol* 2003;14:168-172
- 3 Loughlin MF. Novel therapeutic targets in *Helicobacter pylori*. *Expert Opin Ther Targets* 2003;7:725-735
- 4 Perri F, Qasim A, Marras L, O'Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8(Suppl 1):53-60
- 5 Lamarque D, M Peek R Jr. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8(Suppl 1):21-30
- 6 Nardone G, Morgner A. *Helicobacter pylori* and gastric malignancies. *Helicobacter* 2003;8(Suppl 1):44-52
- 7 Leung WK, Graham DY. Ulcer and gastritis. *Endoscopy* 2001;33:8-15
- 8 Jimenez FP, Estevez MP. Role of cytokines in chronic gastritis by *Helicobacter pylori*. *Acta. Gastroenterol Latinoam* 2001;31:137-141
- 9 Tytgat G. *Helicobacter pylori*: past, present and future. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):G30-33
- 10 Kagawa J, Honda S, Kodama M, Sato R, Murakami K, Fujioka T. Enterocromaffin-like cell tumor induced by *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2002;7:390-397
- 11 Eamranond PP, Torres J, Munoz O, Perez-Perez GI. Age-specific immune response to HspA in *Helicobacter pylori*-positive persons in Mexico. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:983-985

- 12 Jiang Z, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HspA and M<sub>18 000</sub> OMP from *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2003;9:1756-1761
- 13 Jiang Z, Pu D, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction, expression and antigenic study of bivalent vaccine candidate with 26 000 OMP and heat short protein A of human *Helicobacter pylori*. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:862-867
- 14 Yi P, Li G, Liu S, Luo S, Tao X. Effect of xiaokuiling prescription on the expression of HSP72, HSP B in gastric mucosa of patients with *Helicobacter pylori*-associated duodenal ulcer. *J Tongji Med Univ* 2001;21:310-313
- 15 Lock RA, Coombs GW, McWilliams TM, Pearman JW, Grubb WB, Melrose GJ, Forbes GM. Proteome analysis of highly immunoreactive proteins of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2002;7:175-182
- 16 Yan J, Wang Y, Shao SH, Mao YF, Li HW, Luo YH. Construction of prokaryotic expression system of ItB-ureB fusion gene and identification of the recombinant protein immunity and adjuvanticity. *World J Gastroenterol* 2004;10:2675-2679
- 17 Fujii R, Morihara F, Fukushima K, Oku T, Hifumi E, Uda T. Recombinant antigen from *Helicobacter pylori* urease as vaccine against *H pylori*-associated disease. *Biotechnol Bioeng* 2004;86:737-746
- 18 Mao YF, Yan J. Construction of prokaryotic expression system of ureB gene from a clinical *Helicobacter pylori* strain and identification of the recombinant protein immunity. *World J Gastroenterol* 2004;10:977-984
- 19 Mehta N, Benoit S, Maier RJ. Roles of conserved nucleotide-binding domains in accessory proteins, HypB and UreG, in the maturation of nickel-enzymes required for efficient *Helicobacter pylori* colonization. *Microb Pathog* 2003;35:229-234
- 20 Lu DS, Mao XH, Zou QM, Wu C, Yang J, Zhang WJ, Wang FK, Xie QH, Luo P. Recombinant *Helicobacter pylori* urease B subunit and its biological properties. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao* 2003;23:549-552
- 21 Ferrero RL, Thiberge JM, Kansau I, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6499-6503
- 22 Suerbaum S, Thiberge JM, Kansau I, Ferrero RL, Labigne A. *Helicobacter pylori* hspA-hspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. *Mol Microbiol* 1994;14:959-974
- 23 Ren H, Yi C. Role of *Helicobacter pylori* infection in pathogenesis of gastric adenocarcinoma. *J Tongji Med Univ* 1999;19:127-130
- 24 Presecki V, Katicic M, Kalenic S, Strnad M, Plecko V, Babus V, Dominis M. A vaccine against *Helicobacter pylori* infection. *Lijec Vjesn* 2002;124(Suppl 1):79-82
- 25 Li MF, Ling Z, Zhang YC, Ma AY, Sun JX, Shi HJ, Wu XF. *Helicobacter pylori* HspA Heat-shock protein gene cloning, Expression and immunogenicity. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Shanghai)* 1999;31:264-268
- 26 Liu CJ, Zhang ZS, Li SQ, Huang CF. Cloning and secretion expression of heat-shock protein 70 gene of *Helicobacter pylori*. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Shanghai)* 2000;32:524-528
- 27 Li MF, He ZY, Ling Z, Wang JY, Sheng XD, Yang GZ, Wu XF. A Candidate oral vaccine to *Helicobacter pylori* fusion protein of HspA and CtxB. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Shanghai)* 2001;33:360-364
- 28 Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):D12-19
- 29 Asante MA, Mendall MA, Ballam L, Morris J, Northfield TC. Relationship between *Helicobacter pylori*, gastric parietal cell antibodies and heat shock proteins. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1365-1370
- 30 Lee CK, Weltzin R, Thomas WD Jr, Kleanthous H, Ermak TH, Soman G, Hill JE, Ackerman SK, Monath TP. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*. *J Infect Dis* 1995;172:161-172

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 《世界胃肠病学杂志(英文版)》第二次荣获 我国期刊界的最高政府奖项—国家期刊奖百种重点期刊

**本刊讯** 由中华人民共和国新闻出版总署举办的第三届国家期刊奖评选结果已经揭晓, 由世界胃肠病学杂志社出版的《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊之后, 第二次获得此项殊荣。

第三届国家期刊奖颁奖大会于2005-02-28在北京举行。中共中央宣传部、国家新闻出版总署和国家科技部有关方面负责同志出席了颁奖大会。新闻出版总署署长暨第三届国家期刊奖评委会主任石宗源同志在颁奖大会上做了“坚持正确导向, 促进期刊繁荣”的重要讲话。国家期刊奖是经中共中央宣传部批准, 由国家新闻出版总署于1999年开始主办的我国期刊界的最高政府奖项, 每两年评选一次, 至今已举办了三届。

第三届国家期刊奖评选活动于2004-08开始。所有参评期刊经过评选工作办公室的参评资格、学术质量、出版规范、编校质量和广告内容审查后, 由专家组和评选工作委员会进行了认真、严格的评选, 于2004-12-21产生初评入围期刊名单, 并在《中国新闻出版报》等新闻媒体上进行了为期一个月的公示, 接受全社会的监督, 最终从推荐参评的976种期刊中评出获本届国家期刊奖百种重点期刊科技类期刊100种。

获第三届国家期刊奖百种重点期刊的期刊是我国9000余种期刊的优秀代表, 反映了我国期刊业近年来坚持正确舆论导向、促进期刊事业繁荣发展所取得的最新成果。(世界胃肠病学杂志社 2005-03-10)

# 幽门螺杆菌根除与灭幽门螺杆菌煎剂对慢性胃炎病变和胃黏膜屏障的影响

姚洪森, 王天轶, 姚希贤, 刘蕾

姚洪森, 中国人民武装警察部队总医院门诊部 河北省石家庄市 050051  
王天轶, 中国人民解放军白求恩国际和平医院急诊科  
河北省石家庄市 050082  
姚希贤, 刘蕾, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000  
姚洪森, 男, 1959-05-01 生, 河北省石家庄市人, 汉族, 1993 年毕业于安徽医科大学, 学士, 副主任医师。  
河北省中医管理局资助课题, No. 200335  
项目负责人: 姚希贤, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化内科, yaoxixian@163.com  
电话: 0311-7814356  
收稿日期: 2005-01-24 接受日期: 2005-01-28

## Effect of *Helicobacter pylori* eradication therapy and *H pylori*-killing Decoction on chronic gastritis and gastric mucosa barrier

Hong-Sen Yao, Tian-Yi Wang, Xi-Xian Yao, Lei Liu

Hong-Sen Yao, Outpatient Clinic of Hebei Provincial Corps, Chinese People's Armed Police Forces, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China  
Tian-Yi Wang, Department of Emergency, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China  
Xi-Xian Yao, Lei Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China  
Supported by Hebei Administration for Traditional Chinese Medicine, No. 200335  
Correspondence to: Dr. Xi-Xian Yao, Department of Gastroenterology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. yaoxixian@163.com  
Received: 2005-01-24 Accepted: 2005-01-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) eradication therapy and *H pylori*-Killing Decoction on chronic pathological mucosal changes.

**METHODS:** Forty-six chronic gastritis patients with positive *H pylori* were orally administered with Livzon Weisanlian (Bismuth agent 0.22 g, b.i.d. + Tinidazole 0.5 g, b.i.d. + Clarithromycin 0.25 g, b.i.d) for 7 days for eradication of *H pylori*. The patients were then randomly divided into 3 groups, treated with *H pylori*-Killing Decoction, Weifuchun and Gastropine respectively. After 3-month treatment, gastroscopy and histopathological biopsy of antrum and corpus were performed to assess the pathological changes of gastric mucosa. Meanwhile, the serum concentration of epidermal growth factor (EGF), the mucosal content of phospholipid and epidermal growth factor receptor (EGFR) was also detected.

**RESULTS:** After the eradication treatment of *H pylori*, the acute inflammation of gastric mucosa was reduced obviously, but no evident influence on chronic pathological changes was observed. After 3-month treatment with *H pylori*-Killing Decoction and Weifuchun, the chronic pathological changes of gastric mucosa were improved significantly. The mucosal content of phospholipid was increased remarkably, and the serum levels of EGF were decreased significantly in both groups. However, the mucosal EGFR expression was significantly increased in *H pylori*-killing decoction group, but not Weifuchun group.

**CONCLUSION:** *H pylori*-killing Decoction has therapeutic effect on the chronic pathological changes of *H pylori*-related gastritis and protective effect on gastric mucosa barrier.

**Key Words:** *Helicobacter Pylori*; Chronic gastritis; *H pylori*-Killing Decoction; Epidermal growth factor/Epidermal growth factor receptor; Phospholipid

Yao HS, Wang TY, Yao XX, Liu L. Effect of *Helicobacter pylori* eradication therapy and *H pylori*-killing Decoction on chronic gastritis and gastric mucosa barrier. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(5):631-634

## 摘要

**目的:** 观察幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)根除与灭 *H pylori* 煎剂对慢性胃炎慢性黏膜病变和胃黏膜屏障的影响。

**方法:** 46例幽门螺杆菌阳性慢性胃炎患者应用丽珠胃三联行 *H pylori* 根除治疗后, 随机分成三组; 分别予以灭 *H pylori* 煎剂、胃复春(阳性对照)、胃舒平(阴性对照)治疗 3 mo, 治疗前后行胃镜检查, 观察对慢性胃黏膜病变的治疗情况, 同时测定血清 EGF 和胃窦黏膜磷脂含量以及胃黏膜 EGFR 表达情况。

**结果:** 单纯 *H pylori* 根除后胃黏膜急性炎症明显消退, 但对慢性胃黏膜病变无明显影响。经“灭 *H pylori* 煎剂”与“胃复春”治疗后慢性胃黏膜病变明显消退, 磷脂含量显著增加, 血清 EGF 含量下降, 但前者可使 EGFR 表达增加, 而胃复春则无影响。

**结论:**“灭 *H pylori* 煎剂”对 *H pylori* 相关性慢性胃炎胃

黏膜慢性炎症具有良好治疗作用,能够增加胃黏膜表面磷脂和血清EGF含量,有增强胃黏膜屏障作用的功能。

**关键词:** 幽门螺杆菌;慢性胃炎;灭 *H pylori* 煎剂;表皮生长因子/表皮生长因子受体;磷脂

姚洪森, 王天秩, 姚希贤, 刘蕾. 幽门螺杆菌根除与灭幽门螺杆菌煎剂对慢性胃炎病变和胃黏膜屏障的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(5):631-634  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/631.asp

## 0 引言

*H pylori* 相关性胃炎 (*H pylori*-associated gastritis, HPAG) 在我国常见, 近年研究表明根除 *H pylori* 可使慢性胃炎的急性炎症消退, 但对慢性胃黏膜病变迄无明显疗效, 为此, 我们在以往对 HPAG 根除 *H pylori* 联用灭 *H pylori* 煎剂取得良好临床疗效基础上, 对比观察单纯根除 *H pylori* 后采用本药及胃舒平 (安慰剂对照组) 与胃病中药一胃复春 (阳性对照组) 对胃黏膜慢性病变和胃黏膜屏障的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2003-01/2003-12 河北医科大学第二医院 *H pylori* 阳性慢性胃炎患者 51 例, 46 例完成治疗及 3 mo 随访并经胃镜复查; 男 30 例, 女 16 例, 年龄 18-69 (平均  $47.0 \pm 13.1$ ) 岁; 胃镜活检证实为慢性浅表性胃炎 (CSG) 29 例, 慢性萎缩性胃炎 (CAG) 17 例。 *H pylori* 根除者分为 A 组 (19 例): 口服灭 *H pylori* 煎剂 1 袋, 2 次/d (由党参, 白术, 丹参, 当归, 川朴, 白芍, 乌梅等组成, 由河北省消化病研究所采用韩国中药煎药包装机制备。); B 组 (13 例): 服用胡庆余堂胃复春 4 片, 3 次/d (主要成分: 红参、香茶菜、枳壳, 杭州胡庆余堂); C 组 (14 例): 服用胃舒平 3-5 片, 2 次/d (245 mg/片, 郑州化学制药)。

**1.2 方法** *H pylori* 阳性慢性胃炎患者服用丽珠胃三联 (铋剂 0.22 g+替硝唑 0.5 g+克拉霉素 0.25 g, 2 次/d) 7 d, 停药 4 wk 后检测 *H pylori*, 根除者分为 A、B、C 三组, 服用相应药物治疗 3 mo; 分别在根除治疗前后及药物治疗 3 mo 后行胃镜检查, 于胃窦和胃体分别取材进行组织病理活检。依据症状 (上腹痛、胃胀满、食欲不振) 改善情况分为痊愈: 症状

消失; 显效: 症状基本消失; 有效: 症状减少或减轻; 无效: 症状无变化或加重。活检标本 HE 染色, 参照悉尼分类标准<sup>[2]</sup>, 将慢性炎症、活动性、萎缩、肠化、不典型增生分别分成无、轻、中、重度, 计 0, 1, 2, 3 分。分别由 2 位病理专业医师盲法进行判定, 取其平均分。磷脂测定采用酶试剂法, 石英砂将洗净胃窦黏膜研磨成匀浆, 离心取上清液。考马斯亮蓝 G 250 试剂 500  $\mu$ L, 600 nm 波长, CobasMira 全自动生化分析仪测定上清液蛋白含量。取黏膜匀浆上清液 90  $\mu$ L, 复合酶试剂 45  $\mu$ L, 全自动生化分析仪测定, 结果以 mg/g 上清液蛋白表示。血清表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 测定采用 RIA 法同批测定全部血清标本, EGF 放免药盒由北京海科锐生物技术中心提供, 严格按药盒说明书操作, 血清 EGF 含量以  $\mu$ g/L 表示。血清表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 免疫组化染色采用链霉卵白素蛋白-过氧化物酶连结法, EGFR mAb 购自北京中山生物技术公司。

**统计学处理** 计量资料采用配对 *t* 检验, 等级资料使用符号秩和检验。组间计量资料采用单因素随机区组方差分析, 计数资料采用 Ridit 分析或 Wilcoxon 法。所有数据经计算机处理。

## 2 结果

**2.1 *H pylori* 根除对胃黏膜病变影响** *H pylori* 根除后各组均出现急性炎症明显消退, 胃窦和胃体中性粒细胞浸润程度减轻, A、B、C 三组胃窦胃体和急性炎症 Wilcoxon 均分在根除前 23.42 (23.52), 16.46 (16.32), 17.71 (17.04), 后 15.58 (15.47), 10.54 (10.54), 11.29 (11.96) 比较存在统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 而胃窦 (18.34, 13.15, 15.29 vs 20.66, 13.84, 13.71) 和胃体 (17.63, 13.5, 14.1 vs 17.63, 13.5, 14.85) 慢性炎症 Wilcoxon 均分在根除前后比较无显著性差异。

**2.2 “灭 *H pylori* 煎剂” 治疗 3 mo 对胃黏膜慢性病变影响** 症状缓解率灭 *H pylori* 煎剂组为 89.5%, 胃复春组为 84.6%, 两组与胃舒平组 (50%) 比较存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 而 A、B 两组间不存在显著差异。“灭 *H pylori* 煎剂” 治疗 3 mo 对胃黏膜慢性炎症具有明显疗效, 慢性炎症细胞浸润程度明显减轻,

表1 药物治疗对胃黏膜慢性炎症影响

	A组 <i>n</i> =19		B组 <i>n</i> =13		C组 <i>n</i> =14	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
胃窦	23.62	15.37 <sup>a</sup>	16.81	16.81	13.71	13.14
胃体	24.23	14.76 <sup>a</sup>	10.19	10.83 <sup>a</sup>	15.86	15.29

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 药物治疗前。

表2 药物治疗对 EGF, 磷脂含量比较

分组	磷脂(mg/g)		血清 EGF		EGFR 平均阳性细胞率	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
A 组	78.04 ± 9.18	81.38 ± 8.08 <sup>a</sup>	0.4 453 ± 0.0 755	0.3 563 ± 0.0 513 <sup>a</sup>	35.2 ± 4.95%	48.8 ± 5.19% <sup>a</sup>
B 组	77.21 ± 11.29	80.02 ± 11.26 <sup>a</sup>	0.4 208 ± 0.0 791	0.3 720 ± 0.0 484 <sup>a</sup>	37.6 ± 4.37%	39.2 ± 5.03%
C 组	76.26 ± 11.79	78.09 ± 8.97 <sup>a</sup>	0.4 307 ± 0.0 497	0.4 086 ± 0.0 565 <sup>a</sup>	36.4 ± 5.86%	38.2 ± 6.21%

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 药物治疗前.

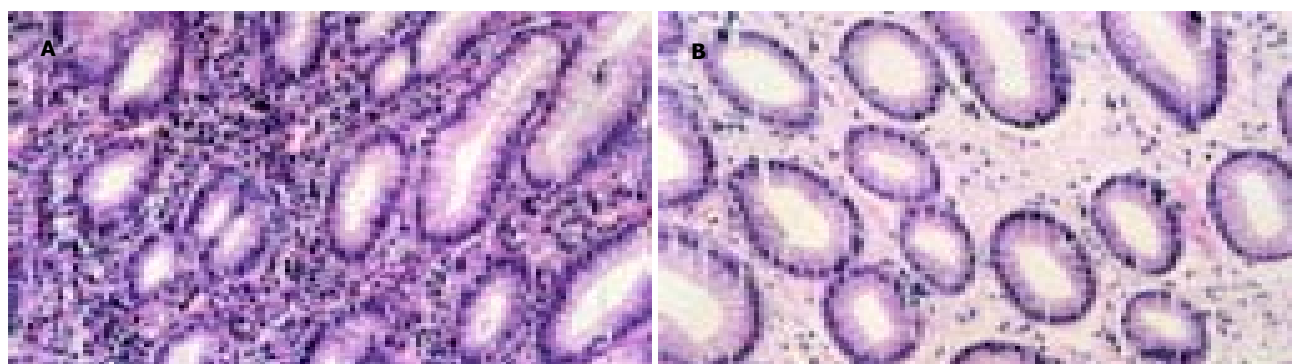
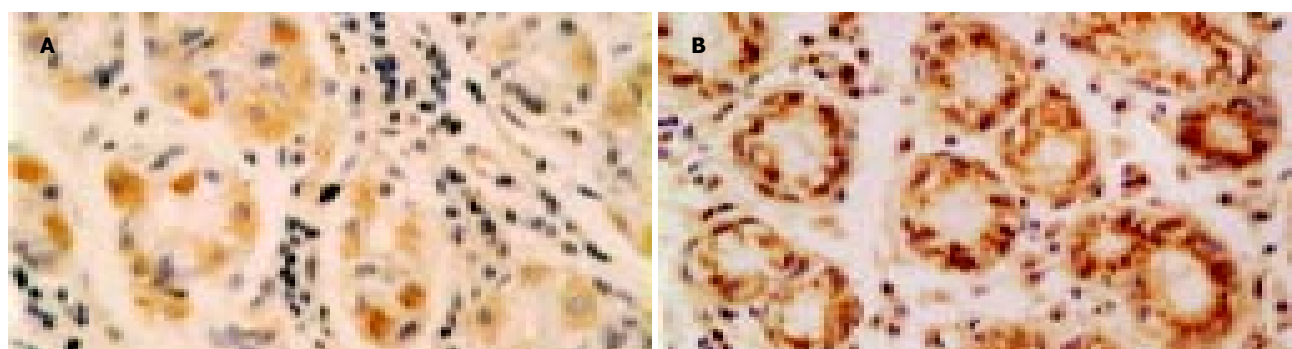
胃复春组与治疗前比较也呈现慢性炎症的缓解;胃舒平组无明显改善(表1, 图1).

**2.3 胃黏膜磷脂、血清 EGF 含量变化** 本研究证实 *H. pylori* 感染者黏膜总磷脂含量低于正常对照组, 而血清 EGF 含量较正常组增加. 经根除治疗及 3 mo 药物干预后各组均呈现磷脂含量增加, 但组间比较发现 A、B 两组磷脂含量高于 C 组. 而血清 EGF 在根除治疗后仍呈上升趋势, 经 3 mo 药物治疗, A 组和 B 组 EGF 含量降低. 而胃舒平治疗组尽管血清 EGF 含量也出现下降, 但与药物治疗前比较无统计学差异 ( $P < 0.05$ ) (表2).

**2.4 胃黏膜 EGFR 表达变化** *H. pylori* 感染者胃窦黏膜 EGFR 的表达显著增强, 单纯 *H. pylori* 根除后黏膜 EGFR 表达仍呈上升趋势, 与治疗前比较无统计学差异; 而经 3 mo 药物治疗, 灭 *H. pylori* 煎剂组较 B 组、C 组显著增加胃黏膜 EGFR 的表达(表2, 图2).

### 3 讨论

幽门螺杆菌感染是慢性胃炎的常见重要病因, 单纯根除治疗可以使胃黏膜急性炎症消退, 但对慢性炎症并无明显疗效<sup>[3-5]</sup>; 对慢性胃炎的萎缩性病变并无良策<sup>[5-9]</sup>, 单纯 *H. pylori* 根除并不能逆转肠化、不典型增生等萎缩性病变<sup>[10-13]</sup>. 近年来, 中医治疗 HPAG 取得一定成效,<sup>[14-16]</sup> 我们以往的研究表明 *H. pylori* 根除后应用灭 *H. pylori* 煎剂能够改善胃部微循环、促进黏膜病变恢复, 在缓解临床症状方面具有明显疗效; 对慢性病变亦有一定作用<sup>[17-19]</sup>. 为了进一步证明灭 *H. pylori* 煎剂对 HPAG 慢性病变的治疗作用, 我们观察了中药灭 *H. pylori* 煎剂对 HPAG 胃黏膜病变的疗效, 结果表明灭 *H. pylori* 煎剂和胃复春均能够明显减轻胃部慢性炎症浸润, 治疗前后胃窦 (23.62 vs 15.37,  $P < 0.05$ )、胃体 (24.23 vs 14.76,  $P < 0.01$ ) 慢性炎症 Wilcoxon 均分都有明显下降. 二者在缓解慢性炎症、促进黏膜磷

图1 灭 *H. pylori* 煎剂治疗前后胃黏膜慢性炎症细胞浸润变化. A: 治疗前; B: 治疗后.图2 灭 *H. pylori* 煎剂治疗前后胃窦黏膜 EGFR 表达变化. A: 治疗前; B: 治疗后.

脂含量增加等方面有相似作用,均优于胃舒平组(表1)。灭 *H pylori* 煎剂能够促进胃黏膜 EGFR 表达,平均阳性细胞率从单纯 *H pylori* 根除后的  $(35.2 \pm 4.95)\%$  上升至  $(48.8 \pm 5.2)\%$  ( $P < 0.05$ ), EGFR 平均免疫吸光度从  $0.0689 \pm 0.0384$  上升至  $0.0847 \pm 0.0275$  ( $P < 0.05$ );表明本药在增强胃黏膜屏障功能,促进黏膜病变修复方面具有一定作用,而胃复春对 EGFR 表达并无影响。上述结果表明灭 *H pylori* 煎剂、胃复春均可增加胃黏膜表面上皮磷脂厚度,促进黏膜病变修复,反馈性降低循环中 EGF 含量,二者在缓解 HPAG 慢性炎症方面均有明显功效,但灭 *H pylori* 煎剂还能使黏膜 EGFR 表达上调,有利于黏膜修复,增强黏膜屏障功能,因此具有更为良好的治疗作用。基于上述结果,我们认为对 HPAG 首先应对 *H pylori* 进行根治,并应对其慢性病变继续进行治疗。值得提出的是本次研究肠化、不典型增生病例数量较少,不能就药物对肠化、不典型增生等萎缩性病变的疗效进行比较,有待于进一步研究。

本方剂系在治疗慢性胃病(包括消化性溃疡与慢性胃炎)有效药物胃忧愈<sup>[20]</sup>基础上,经临床实践、实验研究反复改进而成。其组成特点是以沉香为君,功能温中散寒、行气、降逆、止痛,对本病常见的呃逆、反胃有明显疗效;辅以白术、云苓、厚朴等药健脾燥湿、养胃、宽中。实验研究证实本药具有促进胃黏液分泌,加强黏液-碳酸氢盐屏障作用<sup>[21-22]</sup>。为了增强对本病常见病原菌 *H pylori* 的杀灭作用根据实验研究<sup>[23]</sup>方中加入清热解毒-黄连等药。本试验为系列研究<sup>[1,19]</sup>中一部分,从促进胃黏膜屏障恢复的角度证实灭 *H pylori* 煎剂对 HPAG,尤其对慢性病变具有较对照组更为良好的治疗作用,为以往研究提供了进一步的佐证。

#### 4 参考文献

- 1 姚希贤,张琳,王娜,姚冬梅,白文元,冯丽英. *H pylori* 根除加中药疗胃煎剂对鼠慢性胃炎病变影响. 世界华人消化杂志 2004; 12:97-100
- 2 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-1181
- 3 Sung JJ, Lin SR, Ching JY, Zhou LY, To KF, Wang RT, Leung WK, Ng EK, Lau JY, Lee YT, Yeung CK, Chao W, Chung SC. Atrophy and intestinal metaplasia one year after cure of *H pylori* infection: a prospective, randomized study. *Gastroenterology* 2000;119:7-14
- 4 Schenk BE, Kuipers EJ, Nelis GF, Bloemena E, Thijs JC, Snel P, Luckers AE, Klinkenberg-Knol EC, Festen *H pylori*, Viergever PP, Lindeman J, Meuwissen SG. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on chronic gastritis during omeprazole therapy. *Gut* 2000;46:615-621
- 5 Gisbert JP, Blanco M, Pajares JM. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on histological lesions of gastric mucosa. An 18-month follow-up study. *Rev Clin Esp* 2000;200:480-484
- 6 Basso D, Gallo N, Zamboni CF, Baron M, Navaglia F, Stockreiter E, Di Mario F, Rugge M, Plebani M. Antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection: role in gastric mucosal inflammation. *Int J Clin Lab Res* 2000;30:173-178
- 7 Ruiz B, Garay J, Correa P, Fonstam ET, Bravo JC, Bravo LE, Realpe JL, Mera R. Morphometric evaluation of gastric antral atrophy: improvement after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3281-3287
- 8 Perri F, Qasim A, Marras L, O'Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2003;8(Suppl 1): 53-60
- 9 Mones J, Rodrigo L, Sancho F, Martin L, Boixeda D, Artes MT, Garcia-Cases C. *Helicobacter pylori* eradication versus one-year maintenance therapy: effect on relapse and gastritis outcome. *Rev Esp Enferm Dig* 2001;93:372-389
- 10 武志娟, 黄业芳. 中医药治疗慢性萎缩性胃炎的近况. 河北中医 2004;26:393-395
- 11 McColl KE, el-Omar EM, Gillen D. Alterations in gastric physiology in *Helicobacter pylori* infection: causes of different diseases or all epiphenomena? *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997;29:459-464
- 12 Zerbib F, Lenk C, Sawan B, Cayla R, Broutet N, Carles B, de MA, Megraud F, Lamouliatte H. Long-term effects of *Helicobacter pylori* eradication on gastric antral mucosa in duodenal ulcer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:719-725
- 13 Satoh K, Kimura K, Takimoto T, Kihira K. A follow-up study of atrophic gastritis and intestinal metaplasia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1998;3:236-240
- 14 熊红萍, 吴和木. 幽门螺杆菌相关性胃炎中医药防治的实验研究进展. 中华现代中西医杂志 2003;1:596-597
- 15 危北海, 张占海, 杨丽彩, 刘晋生, 赵敏, 赵荣来, 李乾构. 胃安素治疗慢性萎缩性胃炎的临床与实验研究. 华人消化杂志 1998; 6:114-117
- 16 危北海. 中医和中西医结合治疗慢性胃炎的现状和展望. 中华消化杂志 2000;20:295-296
- 17 姚希贤, 蒋树林. 灭幽门螺杆菌胶囊结合低剂量标准三联法治疗慢性胃炎作用的研究. 中国中西医结合脾胃杂志 1997;5:131-133
- 18 姚希贤, 冯丽英, 白文元, 王丽华, 张辉, 齐富存. 灭 *H pylori* 胶囊多联治疗 *H pylori* 阳性消化性溃疡. 世界华人消化杂志 1999;7: 766-769
- 19 王娜, 姚希贤, 张琳, 白文元, 冯丽英. 根除 *H pylori* 后应用灭 *H pylori* 煎剂对慢性胃炎病变的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11:558-561
- 20 姚希贤, 崔东来, 李兰更. “胃忧愈”治疗消化性溃疡的临床与实验研究. 胃肠病学和肝病杂志 1993;2:16-18
- 21 崔东来, 陈卫, 高国庭, 姚希贤. 胃黏膜保护方治疗消化性溃疡 80 例临床及实验研究. 新消化病学杂志 1994;2:234-235
- 22 姚金锋, 姚希贤, 郝桂敏, 宫心鹏, 张新暖. “疗胃煎剂”胃黏膜保护作用的实验研究. 中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:330-333
- 23 姚希贤, 王丙信, 李仲兴, 白文元. 对幽门螺杆菌有效中西药物筛选的实验研究. 胃肠病学和肝病杂志 1995;4:267-270

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 热休克肿瘤细胞抗原负载的树突状细胞瘤苗对原位接种结肠肿瘤的免疫预防作用

邱 健, 李国威, 隋延仿, 宋宏萍, 司少艳, 葛 伟

邱健, 李国威, 西安交通大学第二医院普外科 陕西省西安市 710004  
隋延仿, 宋宏萍, 司少艳, 葛伟, 中国人民解放军第四军医大学病理学教研室 陕西省西安市 710032

邱健, 男, 1971-07-05 生, 内蒙古武川县人, 汉族, 主治医师, 2001 年西安交通大学博士生, 主要从事胃肠道肿瘤的诊治研究。

陕西省自然科学基金资助项目, No. 2004C271

项目负责人: 李国威, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学第二医院普外科, qiujian263@126.com

电话: 029-85253261-2585 传真: 029-85251331

收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-01-20

## Prophylactic effects of dendritic cells pulsed with lysates of heat-shocked tumor cells in mice with colonic inoculation of tumor cells

Jian Qiu, Guo-Wei Li, Yan-Fang Sui, Hong-Ping Song, Shao-Yan Si, Wei Ge

Jian Qiu, Guo-Wei Li, Department of General Surgery, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004, Shaanxi Province, China  
Yan-Fang Sui, Hong-Ping Song, Shao-Yan Si, Wei Ge, Department of Pathology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Supported by Natural Science Foundation of Shaanxi Province, No. 2004C271

Correspondence to: Guo-Wei Li, Department of General Surgery, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004, Shaanxi Province, China. qiujian263@126.com

Received: 2005-01-10 Accepted: 2005-01-20

## Abstract

**AIM:** To investigate the antitumor effect of dendritic cells (DC) pulsed with lysates of heat-shocked tumor cells and the prophylactic effects of this DC tumor vaccine in mice inoculated with tumor cells in colon.

**METHODS:** CT-26 cells were heat-shocked at 42°C for 1h (HSCT-26) and then frozen-thawed repeatedly to lyse. Bone marrow-derived DCs pulsed with the lysate were used to immunize BALB/c mice. Using IFN- $\gamma$  enzyme-linked immunospot (ELISPOT) and LDH release assay, the anti-tumor response of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) was evaluated. The immunoprophylactic effect induced by heat-shocked CT-26 cell lysate pulsed DC (HSCT-26 DC) in colon cancer mouse model was compared with that induced by non-heat-shocked CT-26 cells lysate pulsed DC (CT-26 DC) on tumor volume and survival time.

**RESULTS:** Compared with CT-26 lysates, pulsing with HSCT-26 lysate enhanced the expression of MHC-II molecule (66.3% vs 59.1%) and co-stimulating molecule CD86 (39.4% vs 36.7%) on DC surface. The quantity of CTLs induced by HSCT-26 DC was more than that induced by CT-26 DC ( $P = 0.001$ ). The specific cytotoxic activity of CTLs induced by HSCT-26 DC was more potent than that of CTLs induced by CT-26 DC at the same E : T ratio. Fourteen days after colon inoculation of CT-26 cells, the tumor volume of HSCT-26 DC immunized mice was similar to that of CT-26 DC immunized mice ( $P = 0.480$ ), and both were much smaller than that of DC immunized mice ( $P = 0.000$ ). 50% of DC immunized mice suffered from peritoneal metastasis, whereas none of HSCT-26 DC immunized mice and CT-26 DC immunized mice was involved. The survival time of colon cancer model mice immunized with HSCT-26 DC was significantly longer than that of the mice immunized with CT-26 DC ( $P = 0.0384$ ).

**CONCLUSION:** Pre-heated tumor cells can enhance the antitumor effects elicited by tumor cell lysate pulsed DCs in vivo. Vaccination with DCs pulsed with lysates of heat-shocked tumor cells can prolong the survival time of mice with colon cancer by effectively suppressing the growth of colon cancer and peritoneal metastasis.

**Key Words:** Heat-shock; Dendritic cells; Colon; Tumor; Immunoprophylaxis

Qiu J, Li GW, Sui YF, Song HP, Si SY, Ge W. Prophylactic effects of dendritic cells pulsed with lysates of heat-shocked tumor cells in mice with colonic inoculation of tumor cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):635-639

## 摘要

**目的:** 研究热休克肿瘤细胞抗原负载的树突状细胞的体内抗肿瘤作用以及对原位接种结肠肿瘤小鼠的免疫保护作用。

**方法:** 肿瘤细胞 CT-26 经热休克处理后制备冻融抗原, 体外负载树突状细胞, 免疫同源小鼠(热休克组)。以 IFN- $\gamma$  ELISPOT 实验、LDH 释放实验检测小鼠体内肿瘤特异性 T 细胞免疫反应, 以原位接种结肠肿瘤的体积以及荷瘤小鼠的生存时间来评价该树突状细胞瘤

苗对结肠原位接种CT-26小鼠的免疫保护作用,并与非热休克肿瘤细胞抗原负载的树突状细胞的免疫效果(非热休克组)作一比较。

**结果:**热休克处理肿瘤细胞可提高肿瘤细胞抗原负载的树突状细胞表面MHC-II类分子(66.3% vs 59.1%)、共刺激分子CD86的表达(39.4% vs 36.7%);热休克组小鼠脾淋巴细胞中肿瘤特异性CTL数量高于非热休克组( $P=0.001$ ),相同效靶比下前者肿瘤特异性细胞毒活性强于后者;热休克组与非热休克组小鼠原位接种结肠肿瘤14 d后的肿瘤体积均明显小于单纯DC免疫组( $P=0.000$ ),但HSCT-26DC免疫组与CT-26 DC免疫组间差异无显著性( $P=0.480$ )。单纯DC免疫组50% (3/6)可见腹膜转移,CT-26 DC免疫组以及HSCT-26DC免疫组均未见腹腔转移;热休克组小鼠荷瘤生存时间显著长于非热休克组( $P=0.0384$ )。

**结论:**热休克处理肿瘤细胞可以提高肿瘤细胞抗原负载的树突状细胞的体内抗肿瘤作用,热休克肿瘤细胞抗原负载的树突状细胞瘤苗对原位接种结肠肿瘤小鼠具有良好的免疫保护作用。

**关键词:**热休克;树突状细胞;结肠;肿瘤;免疫预防

邱建,李国威,隋延仿,宋宏萍,司少艳,葛伟.热休克肿瘤细胞抗原负载的树突状细胞瘤苗对原位接种结肠肿瘤的免疫预防作用.世界华人消化杂志 2005;13(5):635-639  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/635.asp>

## 0 引言

结直肠癌是我国人群多发肿瘤之一,近年来其发病率有逐渐上升的趋势<sup>[1]</sup>。目前结直肠癌治疗首选手术切除,但是对于术后复发或转移尚缺乏有效的治疗手段<sup>[2-3]</sup>。肿瘤细胞冻融抗原负载的树突状细胞(Dendritic cell, DC),可以诱导针对该抗原的特异性细胞毒性T淋巴细胞,发挥有效的抗肿瘤免疫效应<sup>[4-6]</sup>。如何进一步增强肿瘤细胞抗原负载的DC的抗肿瘤免疫效应,有待深入研究。近年来,有研究显示热休克处理能够增强肿瘤细胞的免疫原性,提高肿瘤细胞裂解产物的免疫反应<sup>[7-9]</sup>。我们探讨热休克处理肿瘤细胞能否提高肿瘤抗原致敏DC的抗肿瘤免疫效应以及该DC瘤苗对原位接种结肠肿瘤小鼠的免疫保护作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** RPMI 1640, AIM-V, DMEM培养基为Gibco产品, Ficoll淋巴细胞分离液购自鼎国生物技术公司,胎牛血清(超级)购自杭州四季青生物制品公司,重组小鼠粒-巨细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)为R&D生物工程公司产品, FITC-仓鼠抗小鼠CD11c mAb, PE-大鼠抗小鼠I-A/I-E mAb, CD86 mAb及

其同型对照为Biolegend公司产品,购自晶美生物公司。小鼠IFN- $\gamma$  Elispot检测试剂盒为Diacclone产品, Cytotox 96检测试剂盒为Promega公司产品。恒温CO<sub>2</sub>培养箱(3548型)产自Forma Scientific公司,倒置显微镜为日本Olympus公司产品,流式细胞仪FACS calibur为美国BD公司产品。6-8 wk雌性BALB/c小鼠(H-2<sup>d</sup>)购自第四军医大学实验动物中心,饲养于SPF级环境;BALB/c鼠源结肠未分化腺癌细胞株CT-26(ATCC CRL2638)购自中南大学湘雅医学院肿瘤研究所,培养于含100 mL/LFBS DMEM,每3 d传代。

### 1.2 方法

**1.2.1 小鼠骨髓源树突状细胞的体外诱导培养及表型鉴定** 参考Lutz *et al*<sup>[10]</sup>方法,小鼠脱颈处死,750 mL/L酒精浸泡10 min,取胫骨与股骨,750 mL/L酒精浸泡1 min, RPMI1640冲洗,剪去胫、股骨两端,取2 mL RPMI1640冲洗髓腔,洗液重复吸打后过200目钢网,1 000 r/min离心10 min,红细胞裂解液10 mL重悬,4℃静置5 min,1 000 r/min离心10 min,完全培养基(RPMI1640含100 mL/L FBS、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素、10 mmol/L HEPES、50 mmol/L丙酮酸钠、20  $\mu$ g/L rmGM-CSF)重悬,1 $\times 10^9$ /L接种10 cm培养皿。3 d半量更换完全培养液。收获的DC作表面分子CD11c、I-A/I-E、CD86荧光直标抗体染色,流式细胞仪检测。

**1.2.2 热休克处理肿瘤细胞及其冻融抗原的制备并负载树突状细胞** CT-26细胞90%融合时,置42℃恒温水浴热休克1 h,37℃,50 mL/LCO<sub>2</sub>恢复2 h,胰酶消化,无血清RPMI1640洗涤后重悬,调整细胞密度为1 $\times 10^9$ /L,液氮速冻10 min,4℃融化,反复3次,12 000 g离心10 min,取上清为热休克肿瘤细胞(HSCT-26)冻融抗原;同时取未经热休克的CT-26细胞制备冻融抗原。收获第7 d培养DC,完全培养基调整细胞数密度为1 $\times 10^9$ /L,种6孔板5 mL/孔。实验组接种HSCT-26冻融抗原1 mL,对照组接种CT-26冻融抗原1 mL,阴性对照组接种无血清RPMI1640 1 mL。37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>孵育48 h,收获DC,PBS洗涤后重悬,调整DC密度为5 $\times 10^9$ /L。

**1.2.3 小鼠的免疫与结肠肿瘤原位接种方法** BALB/c小鼠9只,随机分入3组,每组3只。第1 d实验组尾静脉注射HSCT-26 DC 5 $\times 10^5$ (100  $\mu$ L)/只<sup>[11]</sup>,对照组注射CT-26 DC 5 $\times 10^5$ (100  $\mu$ L)/只,阴性对照组注射未致敏DC 5 $\times 10^5$ (100  $\mu$ L)/只,第7 d同法再次免疫,第14 d处死检测脾淋巴细胞肿瘤特异性CTL的数量及细胞毒活性。另BALB/c小鼠36只,免疫方法同前,第14 d小鼠全麻下行剖腹手术,于盲肠壁浆膜下原位注射CT-26细胞1 $\times 10^5$ (50  $\mu$ L)/只,随

机分入3组, 每组12只, 第28 d每组5只处死, 解剖测量接种肿瘤的长径( $L$ )与短径( $S$ ), 按公式  $V = (L \times S^2) / 2$  计算肿瘤体积, 并记录转移情况. 每组剩余7只观测荷瘤生存期, 以任意两组小鼠全部死亡为观察终点.

**1.2.4 IFN- $\gamma$  酶联免疫斑点实验 (IFN- $\gamma$  ELISPOT)** 灭菌磨砂玻片研磨鼠脾, RPMI1640 3 mL 重悬脾细胞并吸打数次, 淋巴细胞分离液密度梯度离心分离脾淋巴细胞, AIM-V 重悬, 调整细胞密度为  $2 \times 10^{10} / \text{L}$ , 为效应细胞. 消化CT-26细胞, 以含 50 mg/L 丝裂霉素的DMEM重悬,  $37^\circ\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$  孵育 30 min, PBS 洗涤3次, AIM-V 重悬, 调整细胞密度为  $1 \times 10^9 / \text{L}$ , 为靶细胞. 按照试剂盒说明: 700 mL/L 酒精洗板 10 min, PBS 洗3次, 甩干; PBS 10 mL 稀释捕获抗体 100  $\mu\text{L}$  包板  $4^\circ\text{C}$  过夜, PBS 洗3次, 甩干; 20 g/L 脱脂乳  $37^\circ\text{C}$  封闭 2 h, PBS 洗1次, 甩干; 每孔分别加入效应细胞  $1 \times 10^6$  (50  $\mu\text{L}$ )、靶细胞  $5 \times 10^4$  (50  $\mu\text{L}$ ),  $37^\circ\text{C}$ 、50 mL/L  $\text{CO}_2$  孵育 20 h; 加 100  $\mu\text{L}$  PBS-1 g/L Tween-20 (PBS-T),  $4^\circ\text{C}$  10 min, 甩干; PBS-T 洗板3次, 拍干; 10 mL 含 10 g/L BSA PBS 稀释 100  $\mu\text{L}$  检测抗体, 100  $\mu\text{L}$  / 孔,  $37^\circ\text{C}$  孵育 90 min, 甩干, PBS-T 洗板3次, 拍干; 10 mL 含 10 g/L BSA PBS 稀释 10  $\mu\text{L}$  链霉亲和素-碱性磷酸酶, 100  $\mu\text{L}$  / 孔,  $37^\circ\text{C}$  孵育 60 min, 甩干, PBS-T 洗3次, 拍干. 加 BCIP/NTB 100  $\mu\text{L}$ , 室温避光显色, 观察斑点形成后蒸馏水洗板3次, 甩干后  $4^\circ\text{C}$  过夜, 扫描后计数每孔斑点数, 取3复孔的平均值. 以斑点数代表分泌 IFN- $\gamma$  的肿瘤特异性 CTL 的数量. PHA 刺激作为阳性对照, 效应细胞孔不加靶细胞为空白对照.

**1.2.5 CTL 的肿瘤特异性杀伤活性测定 (LDH 释放法)** 按操作说明接种细胞至 96 孔圆底板: 靶细胞自发释放孔接种靶细胞  $5 \times 10^4$  个, 3 复孔; 靶细胞最大释放孔细胞数  $5 \times 10^4$  个, 3 复孔; 体积校正孔与培养液背景孔各加入 AIM-V 150  $\mu\text{L}$ . 效应细胞自发释放孔分别加入效应细胞  $2.5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$  和  $2 \times 10^6$  个; 实验孔分别加入  $2.5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$  和  $2 \times 10^6$  个效应细胞和  $5 \times 10^4$  个靶细胞; 以 AIM-V 调整每孔体积为 150  $\mu\text{L}$ . 1 000 r/min 离心 5 min.  $37^\circ\text{C}$ 、50 mL/L  $\text{CO}_2$  孵育 4 h 后, 体积校正孔和靶细胞最大释放孔各加入  $10 \times$  裂解液 15  $\mu\text{L}$ , 继续培养 45 min. 1 000 r/min 离心 4 min. 取每孔上清 50  $\mu\text{L}$  入 96 孔平底板. 每孔加入显色底物 50  $\mu\text{L}$ , 避光室温显色 30 min. 加入终止液 50  $\mu\text{L}$ , 490 nm 检测每孔光密度 (Optical density, OD) 值. (各孔  $A$  值的修正: 实验孔、靶细胞自发释放孔、效应细胞自发释放孔  $A$  值均减去培养液背景孔  $A$  值. 靶细胞最大释放孔  $A$  值减去体积校正孔  $A$  值.)

$$\text{杀伤率}(\%) = \frac{\text{实验组 } A - \text{效应细胞自发 } A - \text{靶细胞自发 } A}{\text{靶细胞最大 } A - \text{靶细胞自发 } A} \times 100\%$$

**统计学处理** 计量资料数据以 mean  $\pm$  SD 表示, 多组间计量资料的比较采用单因素方差分析, Kaplan-Meier 法绘制不同组别生存曲线, Log-rank 时序检验比较生存时间, 以  $P < 0.05$  为检验标准, 以 SPSS8.0 统计软件进行数据分析.

## 2 结果

**2.1 鼠骨髓源 DC 抗原负载前后的表型鉴定** 第 7 d DC 培养体系收获细胞中  $\text{CD11c}^+ \text{IA/IE}^+$  31.2%,  $\text{CD11c}^+ \text{CD86}^+$  17.7%; CT-26 抗原负载后  $\text{CD11c}^+ \text{IA/IE}^+$  59.1%,  $\text{CD11c}^+ \text{CD86}^+$  36.7%; HSCT-26 抗原负载后  $\text{CD11c}^+ \text{IA/IE}^+$  66.3%,  $\text{CD11c}^+ \text{CD86}^+$  39.4%; 1 mg/L LPS (阳性对照) 刺激 24 h 后  $\text{CD11c}^+ \text{IA/IE}^+$  69.8%,  $\text{CD11c}^+ \text{CD86}^+$  45.4%; 第 9 d DC 培养体系收获细胞 (未负载抗原)  $\text{CD11c}^+ \text{IA/IE}^+$  49.9%、 $\text{CD11c}^+ \text{CD86}^+$  28.6%.

**2.2 鼠脾淋巴细胞肿瘤特异性 CTL 数量** 以 ELISPOT 方法检测  $1 \times 10^6$  鼠脾淋巴细胞肿瘤特异性 CTL 数量, HSCT-26 DC 免疫组、CT-26 DC 免疫组、单纯 DC 免疫组间 IFN- $\gamma$ (+) 斑点数有显著性差异 ( $P = 0.0001$ ); 两两比较, HSCT-26 组 IFN- $\gamma$ (+) 斑点数明显多于 CT-26 组 ( $P = 0.001$ , 图 1).

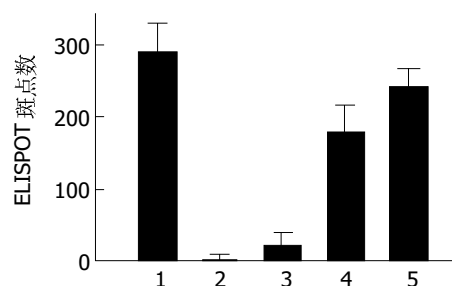


图1 不同免疫方法鼠脾淋巴细胞 IFN- $\gamma$  酶联免疫斑点实验结果. 1: 阳性对照 (1 mg/L LPS 刺激); 2: 阴性对照 (无靶细胞); 3: 单纯 DC 免疫; 4: CT-26 DC 免疫; 5: HSCT-26 DC 免疫.

**2.3 鼠脾淋巴细胞肿瘤特异性 CTL 杀伤活性** 鼠脾淋巴细胞肿瘤特异性 CTL 的细胞毒随效靶比的上升而逐渐提高. HSCT-26 DC 免疫组在效靶比为 10:1, 20:1, 40:1 时肿瘤细胞杀伤率分别为: 14.5%, 36.9%, 66.1%, 而 CT-26 DC 免疫组分别为: 9.4%, 25.0%, 43.3%, 前者均高于后者. 各组别特异性杀伤活性曲线 (图 2).

**2.4 结肠原位接种肿瘤的体积与转移情况** 单纯 DC 免疫组、CT-26 DC 免疫组均可见盲肠壁原位肿瘤形成, HSCT-26 DC 免疫组 5/6 可见盲肠壁原位肿瘤形成, 3 组肿瘤体积分别为:  $107 \pm 69 \text{ mm}^3$ 、 $24 \pm 8 \text{ mm}^3$ 、

$8 \pm 7 \text{ mm}^3$ ; HSCT-26DC 免疫组以及 CT-26 DC 免疫组分别与 DC 免疫组有显著差异 ( $P = 0.000$ ), 但 HSCT-26DC 免疫组与 CT-26 DC 免疫组间差异无显著性 ( $P = 0.480$ ). DC 免疫组 50% (3/6) 可见邻近肠道浆膜以及腹膜的种植, 伴有少量血性腹水, 未见肝脏转移. CT-26 DC 免疫组以及 HSCT-26DC 免疫组均未见腹腔或肝脏转移.

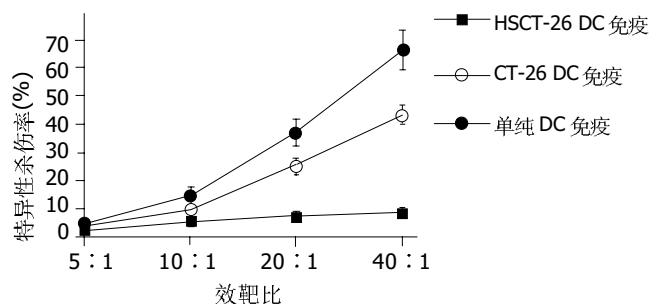


图2 不同 DC 瘤苗免疫组鼠脾肿瘤特异性 CTL 细胞毒活性.

**2.5 荷瘤鼠的生存时间** 单纯 DC 免疫组、CT-26 DC 免疫组、HSCT-26DC 免疫组小鼠中位生存时间分别为:  $27.0 \pm 1.3$  (24.4–29.6) d、 $43.0 \pm 3.9$  (35.3–50.7) d、 $57.0 \pm 7.9$  (41.6–72.4) d. Log-rank 时序检验表明 3 组生存时间不同 ( $P = 0.0001$ ). CT-26 DC 免疫组生存时间长于 DC 免疫组 ( $P = 0.0001$ ), 而 HSCT-26DC 免疫组生存时间长于 CT-26 DC 免疫组 ( $P = 0.0384$ , 图 3).

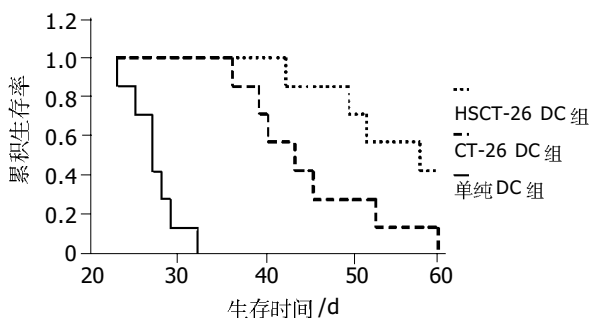


图3 不同 DC 瘤苗免疫荷瘤小鼠的生存曲线(Kaplan-Meier 法).

### 3 讨论

树突状细胞(Dendritic cell, DC)是体内专职的抗原递呈细胞(Antigen presentation cell, APC), 他摄取、处理肿瘤相关抗原, 以 MHC-I 类分子或 MHC-II 类分子依赖方式递呈至 DC 表面, 在共刺激分子的协同下, 激活 T 淋巴细胞发挥特异性的抗肿瘤免疫效应<sup>[12-13]</sup>. 目前, 激活肿瘤特异性 DC 的手段包括肿瘤抗原肽/蛋白负载、肿瘤抗原基因修饰、肿瘤整细胞或肿瘤细胞裂解产物刺激、肿瘤细胞与 DC 融合等<sup>[14]</sup>. 肿瘤整细胞或肿瘤细胞裂解产物包含一整套肿瘤抗原, 以其刺激 DC 可以简便有效地获得针对原发肿瘤多种抗原的多价 DC 瘤苗. 1998 年, Fields *et al*<sup>[15]</sup> 报告肿瘤裂解产物负

载 DC 可诱导肿瘤特异性 CTL, 以其免疫小鼠可以产生针对该肿瘤的免疫预防作用. 肿瘤裂解产物负载 DC 瘤苗现已试用于包括黑色素瘤、肾癌、淋巴瘤、结肠直肠癌在内的多种肿瘤的免疫治疗<sup>[16-20]</sup>. 人们试用 GM-CSF, IL-12 或 IFN- $\alpha$  等细胞因子基因修饰<sup>[21-22]</sup>, 或联合使用免疫佐剂 KLH、Flt3 配体或 CpG 寡核苷酸等<sup>[23-24]</sup>, 希望进一步提高 DC 瘤苗的抗肿瘤免疫效应. 热休克蛋白作为重要的分子伴侣, 与细胞内抗原肽结合, 将细胞抗原“指纹”递呈给 APC<sup>[25]</sup>. 从肿瘤细胞分离的热休克蛋白可以诱导肿瘤特异性免疫反应<sup>[26]</sup>, 热休克蛋白在体外与肿瘤抗原肽结合可诱导肿瘤特异性免疫反应<sup>[27]</sup>, 热休克处理能够提高肿瘤细胞的抗原性, 诱导机体抗肿瘤免疫反应<sup>[7]</sup>. 通过热休克肿瘤细胞提高热休克蛋白的表达, 将其裂解产物负载 DC, 如果能够高效地诱导体内抗肿瘤免疫反应, 可以简化烦琐的体外操作, 为临床提供实践性很强的制备 DC 瘤苗的方法.

本研究提示, 热休克处理能够提高肿瘤细胞冻融抗原负载的树突状细胞表面 MHC II 类分子、共刺激分子的表达, 促进 DC 的成熟, 从而提高了 DC 的抗原递呈能力. 与肿瘤细胞冻融抗原负载的 DC 相比较, 以热休克肿瘤细胞冻融抗原负载的 DC 免疫小鼠, 显著增加小鼠脾脏淋巴细胞中肿瘤特异性 CTL 的数量并且提高 CTL 的细胞毒活性, 表明热休克肿瘤细胞冻融抗原负载的 DC 能够在体内高效地诱导抗肿瘤免疫反应. 针对原位注射肿瘤细胞建立的实验性结肠癌动物模型, 以热休克肿瘤细胞冻融抗原负载的 DC 免疫可以抑制肿瘤的生长与转移, 虽然接种肿瘤早期与肿瘤细胞冻融抗原负载的 DC 的免疫预防效果相近, 但前者显著延长荷瘤小鼠的生存时间. 这一结果提示, 热休克肿瘤细胞冻融抗原负载的 DC 免疫效果可能更为持久, 从而对结肠癌模型小鼠产生更好的免疫保护作用. 这与国外近期的热应激诱导凋亡肿瘤细胞致敏 DC 的报道相近<sup>[28]</sup>. 热休克处理提高肿瘤细胞抗原负载的 DC 的抗肿瘤作用的机制有待进一步阐明, 其可能的机制包括: (1) 适当的热休克处理能够提高肿瘤细胞热休克蛋白的表达水平. 与肿瘤抗原结合的热休克蛋白, 能够通过 DC 表面分子 CD40 以及 CD91 介导而内化外源性抗原, 协助其转运、降解以及抗原肽与 MHC 分子的有效结合, 并递呈至 DC 表面, 进而激活 CTL<sup>[29-30]</sup>; (2) 与肿瘤细胞抗原结合的热休克蛋白可以提供危险信号 (Danger signal), 促进 MHC II 类分子、共刺激分子的表达以及细胞因子如 IL-12 的合成与分泌, 从而增强 DC 的抗原递呈能力<sup>[31-32]</sup>.

临床上能够接受手术治疗的结肠直肠癌患者, 多为 Dukes' C 期以下, 可以较为完整地切除肿瘤及其

局属淋巴组织, 减轻机体肿瘤负荷, 使免疫系统得以恢复. 此时辅助免疫治疗, 对于预防术后肿瘤复发、转移有重要的价值. 热休克肿瘤细胞抗原负载的DC瘤苗能够有效抑制原位结肠肿瘤的生长、减少接种肿瘤的腹腔转移灶的形成并最终延长荷瘤动物的生存时间. 本研究为临床上通过热休克肿瘤组织制备DC瘤苗进行免疫预防结直肠癌术后复发、转移提供了一定的理论依据. 该DC瘤苗对结直肠癌肝脏转移瘤的预防价值有待进一步的实验研究.

#### 4 参考文献

- Chen KX, He M, Dong SF, Wang JF, Song FJ, Wu GL. The prevalence data of colon cancer in Tianjin in two decades. *Chin J Prev Med* 2004;38:356-357
- Nicum S, Midgley R, Kerr D. Colorectal cancer. *Acta Oncol* 2003;42:263-275
- Liu LX, Zhang WH, Jiang HC. Current treatment for liver metastases from colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:193-200
- Nestle FO, Banchereau J, Hart D. Dendritic cells: on the move from bench to bedside. *Nat Med* 2001;7:761-765
- Tang ZH, Qiu WH, Wu GS, Yang XP, Zou SQ, Qiu FZ. The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:908-912
- Xie YA, Luo XL, Liang AM, Kuang ZP, Wu JN. Hepatic cancer antigen primed dendritic cells induces specific cytotoxic T lymphocytes in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12:1479-1481
- Okamoto M, Tazawa K, Kawagoshi T, Maeda M, Honda T, Sakamoto T, Tsukada K. The combined effect against colon-26 cells of heat treatment and immunization with heat treated colon-26 tumor cell extract. *Int J Hyperthermia* 2000;16:263-273
- Clark PR, Menoret A. The inducible Hsp70 as a marker of tumor immunogenicity. *Cell Stress Chaperones* 2001;6:121-125
- Todryk SM, Eaton J, Birchall L, Greenhalgh R, Soars D, Dalgleish AG, Melcher AA, Pandha HS. Heated tumour cells of autologous and allogeneic origin elicit anti-tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:323-330
- Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 1999;223:77-92
- Son YI, Egawa S, Tatsumi T, Redlinger RE Jr, Kalinski P, Kanto T. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J Immunol Methods* 2002;262:145-157
- Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, Schuler G. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* 2001;106:271-274
- Steinman RM, Dhodapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer* 2001;94:459-473
- Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2003;15:138-147
- Fields RC, Shimizu K, Mule JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9482-9487
- Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-332
- Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH Jr, Thurnher M. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:3369-3376
- Maier T, Tun-Kyi A, Tassis A, Jungius KP, Burg G, Dummer R, Nestle FO. Vaccination of patients with cutaneous T-cell lymphoma using intranodal injection of autologous tumor-lysate-pulsed dendritic cells. *Blood* 2003;102:2338-2344
- Mels AK, Mayen I, Egmond Mv M, Beelen RH, Meijer S, Richters CD. Reduction of liver metastases outgrowth by tumour antigen-pulsed dendritic cell vaccination. *Comp Hepatol* 2004;3 (Suppl 1):S54
- Rains N, Cannan RJ, Chen W, Stubbs RS. Development of a dendritic cell(DC)- based vaccine for patients with advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:347-351
- Klein C, Bueler H, Mulligan RC. Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines. *J Exp Med* 2000;191:1699-1708
- Wan Y, Bramson J, Pilon A, Zhu Q, Gaudie J. Genetically modified dendritic cells prime autoreactive T cells through a pathway independent of CD40L and interleukin 12: implications for cancer vaccines. *Cancer Res* 2000;60:3247-3253
- Audibert F. Adjuvants for vaccines, a quest. *Int Immunopharmacol* 2003;3:1187-1193
- Whiteside TL, Odoux C. Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:240-248
- Srivastava P. Heat shock proteins and immune response: methods to madness. *Methods* 2004;32:1-2
- Ueda G, Tamura Y, Hirai I, Kamiguchi K, Ichimiya S, Torigoe T, Hiratsuka H, Sunakawa H, Sato N. Tumor-derived heat shock protein 70-pulsed dendritic cells elicit tumor-specific cytotoxic T lymphocytes(CTLs) and tumor immunity. *Cancer Sci* 2004;95:248-253
- Udono H, Yamano T, Kawabata Y, Ueda M, Yui K. Generation of cytotoxic T lymphocytes by MHC class I ligands fused to heat shock cognate protein 70. *Int Immunol* 2001;13:1233-1242
- Prasad SJ, Farrand KJ, Matthews SA, Chang JH, McHugh RS, Ronchese F. Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2005;174:90-98
- Singh-Jasuja H, Hilf N, Arnold-Schild D, Schild H. The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. *Biol Chem* 2001;382:629-636
- Srivastava PK, Amato RJ. Heat shock proteins: the 'Swiss army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. *Vaccine* 2001;19:2590-2597
- Zheng H, Dai J, Stoilova D, Li Z. Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *J Immunol* 2001;167:6731-6735
- Kuppner MC, Gastpar R, Gelwer S, Nossner E, Ochmann O, Scharner A, Issels RD. The role of heat shock protein(hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol* 2001;31:1602-1609

# 苦参碱对 Con A 性肝损伤小鼠 IFN 释放及肝组织病理改变的影响

李常青, 刘丽丽, 莫传伟, 黄玲

李常青, 刘丽丽, 广州中医药大学热带医学研究所 广东省广州市 510405  
莫传伟, 广州中医药大学基础医学院 广东省广州市 510405  
黄玲, 广州中医药大学学报编辑部 广东省广州市 510405  
李常青, 男, 1965-9-28, 湖南华容县人, 汉族, 医学博士, 副主任医师, 主要从事病毒性疾病治疗的临床与实验研究工作。  
广东省科技计划资助项目, No. 2004B33001017  
项目负责人: 李常青, 510405, 广东省广州市, 广州中医药大学热带医学研究所. gzlxh2002@163.com  
电话: 020-36585461 传真: 020-86377567  
收稿日期: 2005-01-17 接受日期: 2005-02-02

## Effects of Matrine on release of interferon and pathological changes in concanavalin A-induced liver injury in mice

Chang-Qing Li, Li-Li Liu, Chuan-Wei Mo, Ling Huang

Chang-Qing Li, Li-Li Liu, Institute of Tropical Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China  
Chuan-Wei Mo, Basic Medicine College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China  
Ling Huang, Editing Department, Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China  
Supported by the Scientific and Technological Plan Foundation of Guangdong Province, No. 2004B33001017  
Correspondence to: Chang-Qing Li, Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. gzlxh2002@163.com  
Received: 2005-01-17 Accepted: 2005-02-02

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of matrine on the release of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), and the hepatic histopathology in mice with concanavalin A (Con A) induced liver injury.

**METHODS:** Forty-eight NIH mice were randomly divided into 4 groups: control group (group A), model group (group B), big dosage group of matrine (25 mg/kg, group C), small dosage group of matrine (12.5 mg/kg, group D) and bifendate group (group E). All mice except group A were injected with Con A (20 mg/kg) via the tail vein at the first day of experiment. Group C and group D were injected with matrine (25 mg/kg and 12.5 mg/kg, respectively) via the tail vein. Mice in group E were orally administered with bifendate (150 mg/kg). All the drugs were given once daily for 3 days consecutively. Four hours after the last admin-

istration of the drugs, mice were injected with Con A once again at the same dosage. Blood samples for determining aminotransferase (ALT) activity, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  concentration were collected at the 8th hour after Con A administration. Histopathological examination was also performed for liver tissue.

**RESULTS:** Serum IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in group C and group D were obviously lower than that in group B (IFN- $\gamma$ : 25.5 $\pm$ 6.1 vs 69.3 $\pm$ 33.6 ng/L, 26.5 $\pm$ 2.5 vs 69.3 $\pm$ 33.6 ng/L,  $t$  = 4.0, 4.0, respectively,  $P$  < 0.01; TNF- $\alpha$ : 49.1 $\pm$ 11.9 vs 106.7 $\pm$ 64.4 ng/L, 52.9 $\pm$ 5.2 vs 106.7 $\pm$ 64.4 ng/L,  $t$  = 2.9, 2.9, respectively,  $P$  < 0.01, but there was no significant difference compared with group E ( $P$  > 0.05). Serum ALT activity in group C and group D were apparently lower than that of group B (1 086.9 $\pm$ 675.8 vs 2 477.2 $\pm$ 529.9 nkat/L, 1 121.9 $\pm$ 957.4 vs 2 477.2 $\pm$ 529.9 nkat/L,  $t$  = 5.1, 3.9, respectively,  $P$  < 0.01). Hepatic histopathology changes were alleviated in both group C and group D compared with group E ( $P$  < 0.05).

**CONCLUSION:** Matrine has a remarkable therapeutic effect on liver injury in mice by suppressing the release of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , and alleviating the pathological changes in liver tissue.

**Key Words:** Concanavalin A; Hepatic histopathology; Matrine; Interferon

Li CQ, Liu LL, Mo CW, Huang L. Effects of Matrine on release of interferon and pathological changes in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):640-643

## 摘要

**目的:** 观察苦参碱对刀豆蛋白 A(Con A)性肝损伤小鼠 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  释放及肝组织病理改变的影响。

**方法:** NIH 小鼠 48 只随机分为 5 组, 分别为正常对照组、模型组、苦参碱大剂量组(25 mg/kg)、苦参碱小剂量组(12.5 mg/kg)和联苯双酯治疗组。除正常对照组外, 其他组于实验首日 iv Con A 20 mg/kg, 苦参碱大剂量组和小剂量组均采用尾 iv 给药, 联苯双酯组按 150 mg/kg 灌胃, 每天 1 次, 连续 3 d, 末次给药后 4 h, 再次 iv Con A 20 mg/kg, 8 h 采血检测血浆 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量、ALT 活性, 观察肝组织病理学变化。

**结果:** 苦参碱大剂量组、小剂量组小鼠 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量均明显低于模型组 (IFN- $\gamma$ :  $25.5 \pm 6.1$  vs  $69.3 \pm 33.6$  ng/L,  $26.5 \pm 2.5$  vs  $69.3 \pm 33.6$  ng/L,  $t = 4.0, 4.0$ ,  $P < 0.01$ ; TNF- $\alpha$ :  $49.1 \pm 11.9$  vs  $106.7 \pm 64.4$  ng/L,  $52.9 \pm 5.2$  vs  $106.7 \pm 64.4$  ng/L,  $t = 2.9, 2.9$ ,  $P < 0.01$ ), 但与联苯双酯组比较, 差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 苦参碱大、小剂量组血浆 ALT 活性明显低于模型组 ( $1086.9 \pm 675.8$  vs  $2477.2 \pm 529.9$  nkat/L,  $1121.9 \pm 957.4$  vs  $2477.2 \pm 529.9$  nkat/L,  $t = 5.1, 3.9$ ,  $P < 0.01$ ), 且可明显减轻肝细胞坏死及炎性细胞浸润的肝组织病理学改变, 与模型组比较差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ ).

**结论:** 苦参碱对刀豆蛋白 A 性肝损伤小鼠释放 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  有明显的抑制作用, 并可显著减轻肝组织病理改变.

**关键词:** 刀豆蛋白 A; 肝组织病理; 苦参碱; 干扰素

李常青, 刘丽丽, 莫传伟, 黄玲. 苦参碱对 Con A 性肝损伤小鼠 IFN 释放及肝组织病理改变的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(5):640-643  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/640.asp

## 0 引言

苦参碱为中药苦参、山豆根和苦豆子的主要有效成分, 苦参碱对多种实验性肝损伤模型 (包括 CCl<sub>4</sub>、脂多糖/D-氨基半乳糖、猪血清) 均有肝细胞保护作用<sup>[1-4]</sup>, 并可抑制 Kupffer 细胞、巨噬细胞释放炎性因子 TNF 和 IL-6<sup>[3-5]</sup>, 但尚未见到苦参碱对刀豆蛋白 A (Con A) 性肝损伤模型影响的研究报道. 我们以 NIH 小鼠为实验对象, 探讨苦参碱对 Con A 性肝损伤小鼠 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  释放的影响, 并观察肝脏病理组织学改变.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** NIH  $\delta$  小鼠, 体 18-22 g, 广东省医学实验动物中心提供, 刀豆蛋白 A 为美国华盛顿生物药品公司产品; 苦参碱注射液, 广州明兴制药厂生产, 每支 5 mL 含苦参碱 50 mg; 联苯双酯滴丸, 每丸含联苯双酯 7.5 mg. 谷丙转氨酶检测试剂盒购自上海申索试剂有限公司, 小鼠干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 和肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 定量检测试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司, 752 型紫外分光光度计 (上海第三分析仪器厂), Bio-Tek

ELX8000 自动酶标仪 (Bio-Tek instrument INC).

**1.2 方法** NIH 小鼠 48 只随机分为 5 组: 正常对照组 8 只, 模型组、苦参碱大剂量组 (25 mg/kg)、苦参碱小剂量组 (12.5 mg/kg) 和联苯双酯治疗组各 10 只, 除正常对照组外, 其余小鼠于实验首日上午尾 iv Con A 20 mg/kg, 并于首日、次日和第 3 d 下午各给药 1 次, 苦参碱大剂量组、小剂量组 (相当于 10 倍、5 倍临床用药剂量) 均采用尾 iv 给药, 联苯双酯按 150 mg/kg 每日灌胃, 末次给药后 4 h, 模型组和各给药组小鼠 1 次性 iv Con A 20 mg/kg, 禁食, 不禁水, 8 h 摘小鼠眼球取血, 离心分离血浆待检; 取肝左叶组织, 40 g/L 甲醛溶液固定. 血浆 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  定量测定采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法, 按试剂盒说明操作, 用 Bio-Tek ELX8000 自动酶标仪于波长 490 nm 处检测吸光度值, 制定标准曲线, 换算成 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  定量值. 血浆 ALT 活性检测采用赖氏法, 按试剂盒说明操作, 用 752 型紫外分光光度计于波长 505 nm 处检测吸光度值, 制定标准曲线, 换算成 ALT 值. 肝组织石蜡包埋切片, 常规 HE 染色后行光镜病理观察. 组织病变分级参照文献 [6], 肝细胞坏死分级: 0 级: 无病变; I 级: 肝细胞疏松肿胀, 气球样变, 有点状坏死. II 级: 肝细胞灶性坏死. III 级: 肝细胞广泛灶性坏死. 炎性细胞浸润分级: 0 级: 汇管区极少炎性细胞浸润. I 级: 汇管区、血管窦可见多个炎性细胞浸润. II 级: 汇管区、肝小叶内炎性细胞浸润明显, 肝实质破坏. III 级: 汇管区大量炎性细胞浸润, 肝实质破坏.

**统计学处理** 采用 SPSS10.0 软件包进行统计分析, 多组计量资料分析采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 多重比较采用最小显著差值法 (LSD); 多组等级资料的分析采用 Kruskal-Wallis 检验, 两两比较采用 Nemenyi 法.

## 2 结果

**2.1 血浆 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  含量和 ALT 活性** 模型组小鼠 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  含量和 ALT 活性较正常对照组明显升高, 二者比较差异有显著性意义 ( $t = 5.3, 3.4$ ,  $10.8$ ,  $P < 0.01$ , 表 1). 苦参碱大剂量组、小剂量组

表1 苦参碱对 Con A 性肝损伤小鼠血浆 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  含量和 ALT 活性的影响 (mean  $\pm$  SD)

分组	<i>n</i>	IFN- $\gamma$ (ng/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	ALT(nkat/L)
正常组	8	$12.6 \pm 1.1^b$	$29.2 \pm 1.6^b$	$410.6 \pm 123.0^b$
模型组	10	$69.3 \pm 33.6$	$106.7 \pm 64.4$	$2477.2 \pm 529.9$
苦参碱大剂量	10	$25.5 \pm 6.1^b$	$49.1 \pm 11.9^b$	$1086.9 \pm 675.8^b$
苦参碱小剂量	10	$26.5 \pm 2.5^b$	$52.9 \pm 5.2^b$	$1121.9 \pm 957.4^b$
联苯双酯	10	$29.1 \pm 3.3^b$	$55.3 \pm 4.4^b$	$1145.2 \pm 1138.6^b$

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型组.

表2 苦参碱对 Con A 性肝损伤小鼠肝组织病理改变的影响

分组	n	肝细胞坏死				炎性细胞浸润			
		0级	I级	II级	III级	0级	I级	II级	III级
正常组	8	8	0	0	0	8	0	0	0
模型组	10	0	1	6	3	0	0	3	7
苦参碱大剂量	10	6	2	2	0	5	2	3	0
苦参碱小剂量	10	6	1	3	0	5	1	4	0
联苯双酯组	10	6	1	3	0	5	2	3	0

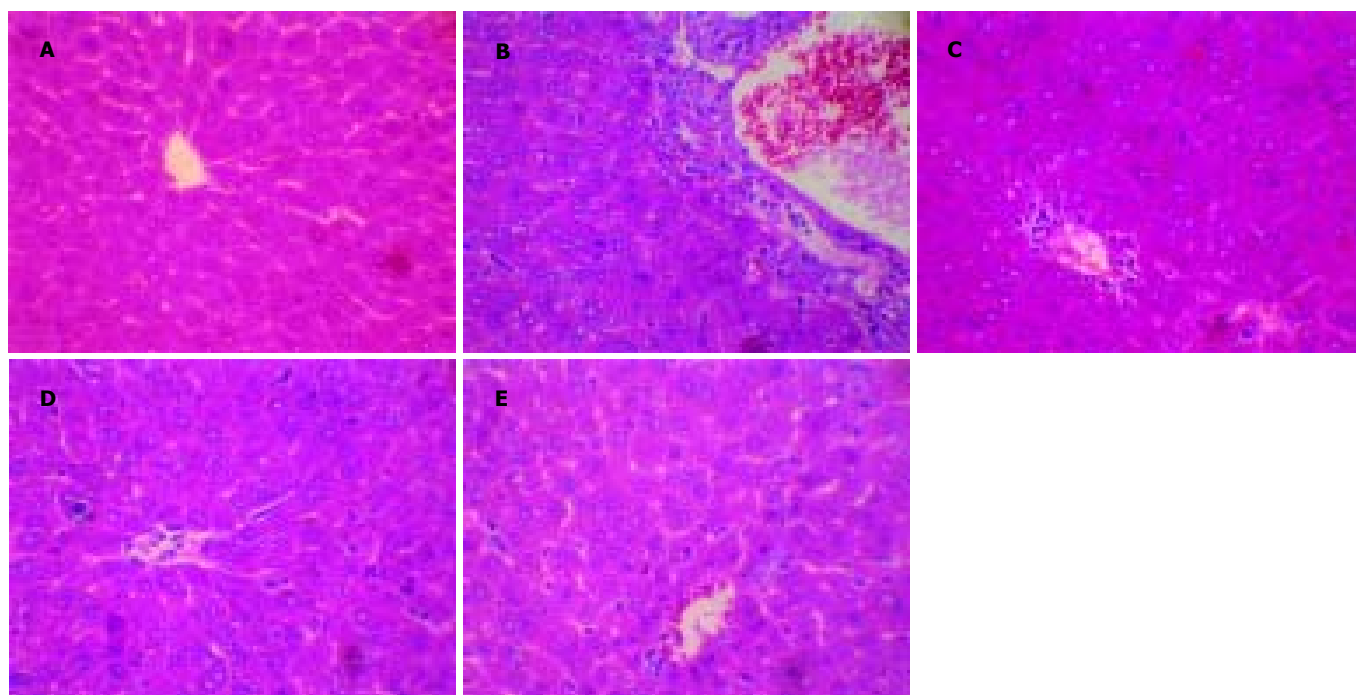
小鼠 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  含量和 ALT 活性均明显低于模型组, 差异有显著性意义 ( $t = 4.0, 4.0, 2.9, 2.9, 5.1, 3.9, P < 0.01$ ), 但与联苯双酯组比较, 差异无显著性意义 ( $t = 1.4, 1.9, 1.5, 1.1, 1.4, 0.1, P > 0.05$ ). 苦参碱大剂量组与小剂量组比较, 小鼠 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  含量和 ALT 活性的差异无显著性意义 ( $t = 0.4, 0.9, 0.1, P > 0.05$ ).

**2.2 肝组织病理改变** 光镜下见正常组肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝窦未见异常. 模型组全部小鼠肝组织均出现明显病变, 肝小叶内大多数肝细胞肿胀, 细胞质疏松化, 有的呈气球样变, 可见凋亡小体、明显的点状坏死和灶性坏死, 坏死灶可见大量炎性细胞浸润, 汇管区淋巴细胞和单核细胞炎性浸润尤为明显, 肝窦内可见红细胞堆集. 苦参碱大剂量、小剂量组和联苯双酯治疗组部分肝组织可见散在点状坏死和灶性坏死, 但肝细胞坏死程度与模型组相比明显减轻, 炎性细胞浸润显著减少. 采用 Kruskal-Wallis 法进行检验, 结果显示组间肝细胞坏死、炎性细胞浸

润的病理学改变差异均有显著性意义 ( $H_c = 22.29, 26.64, P < 0.01$ ), 采用 Nemenyi 法两两比较, 结果显示苦参碱大、小剂量组和联苯双酯组的肝细胞坏死、炎性细胞浸润病理改变均明显低于模型组, 差异具有显著性意义 ( $D = 18.50, 17.55, 17.55, 20.30, 19.40, 20.30, P < 0.05$ , 表2, 图1).

### 3 讨论

Con A 是一种被广泛应用可活化 T 细胞的有丝分裂原, Con A 诱发的小鼠肝损伤是近年来建立的实验动物模型, 通过活化 T 淋巴细胞而致免疫性肝损伤是该动物模型的基本病理特点, 与其他中毒性肝损伤模型如四氯化碳模型、D-氨基半乳糖模型相比, 该模型被认为更适于研究人类病毒性肝炎、自身免疫性肝病等的病理机制和进行抗免疫性肝损伤的药物筛选<sup>[7-19]</sup>. Con A iv 小鼠体内后, 大部分在肝脏内聚集, 表明肝脏是 Con A 体内诱导毒性的靶器官<sup>[7]</sup>. 肝窦内大量存在的巨噬细胞, 激活后产生的细胞因子 TNF- $\alpha$  可直接损

图1 小鼠肝组织学, HE,  $\times 200$ . A: 正常; B: 模型组; C: 苦参碱大剂量组; D: 苦参碱小剂量组; E: 联苯双酯组.

伤肝细胞, 导致肝细胞凋亡、坏死<sup>[20-23]</sup>; 其次, 大量活化的 T 淋巴细胞与细胞因子 IFN- $\gamma$  等随血流到达肝脏, 直接与肝细胞接触或进一步激活巨噬细胞、破坏血管内皮细胞导致肝损伤<sup>[24-25]</sup>。细胞因子 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  是引起急性肝损伤的重要炎症递质<sup>[26-27]</sup>, T 淋巴细胞活化后产生的 IFN- $\gamma$  是巨噬细胞的重要激活剂, 对促进肝内 Kupffer 细胞参与炎症反应和刺激巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$  起重要作用<sup>[28-30]</sup>, 研究表明, 预先给予抗-IFN- $\gamma$ , 或抗-TNF- $\alpha$ , 均可完全阻断 Con A 诱发的小鼠肝损伤<sup>[7, 31]</sup>。

本结果显示, 3 d 内 2 次 iv Con A 20 mg/kg, 模型组小鼠血浆 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  含量增加, ALT 活性升高; 病理学检查发现, Con A 组小鼠肝组织汇管区内大量炎性细胞浸润, 且有点状和灶性坏死。该结果再次证实 T 淋巴细胞活化导致 IFN- $\gamma$  分泌增加及刺激巨噬细胞释放过多 TNF- $\alpha$  是 Con A 性肝损伤的主要病理机制。苦参碱 2 个剂量组 Con A 诱发的急性肝损伤小鼠 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  含量明显降低, 肝细胞坏死、炎性细胞浸润的病理组织学改变显著减轻, 谷丙转氨酶活性降低, 表明苦参碱可通过抑制 T 淋巴细胞活化和 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  的释放发挥抗肝损伤作用。但苦参碱大剂量组和小剂量组对小鼠 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  的含量和肝组织病理组织学改变的差异无显著性意义 ( $P>0.05$ ), 提示超过一定的用药剂量, 并不能明显提高苦参碱抗肝损伤的作用效果, 与文献[4]报道基本一致, 因此, 选择合适的剂量用药, 或进行剂型改造, 如制备成肝靶向制剂等以提高其作用效果, 均有待进一步深入研究。

#### 4 参考文献

- 1 张明华, 李灵芝, 陈虹, 郭建新, 杨林静. 苦参碱和氧化苦参碱对 CCL<sub>4</sub> 肝损伤小鼠转氨酶的影响. 武警医学院学报 2002;11:74-75
- 2 胡振林, 张俊平, 余祥彬, 林文, 钱定华. 苦参碱对脂多糖/D-氨基半乳糖诱导的肝炎及离体巨噬细胞释放肿瘤坏死因子的影响. 中国药理学报 1996;17:351-353
- 3 胡振林, 张俊平, 万莫斌, 余祥彬, 林文, 钱定华. 苦参碱对脂多糖/痤疮丙酸杆菌诱导的小鼠肝炎及产生肿瘤坏死因子的影响. 药学报 1996;31:662-665
- 4 梁萍, 薄爱华, 薛贵平, 韩瑞, 李海峰, 许永利. 苦参碱抗免疫性肝损伤机制的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:104-108
- 5 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
- 6 于岩岩, 斯崇文, 郎振为, 田秀兰, 何群, 薛海鹏. 肿瘤坏死因子  $\alpha$  在病毒性肝炎肝坏死中的作用. 中华内科杂志 1996;35:28-31
- 7 Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by Concanavalin A. *J Clin Invest* 1992;90:196-203
- 8 张修礼, 曲建慧. 小鼠 Con A 性肝损伤模型. 世界华人消化杂志 2001;9:571-574
- 9 王新, 陈岳祥, 许才斌, 赵国宁, 黄裕新, 王庆莉. 肿瘤坏死因子  $\alpha$  与肝纤维化关系的研究. 华人消化杂志 1998;6:106-108
- 10 Khakoo SI, Ling R, Scott I, Dodi AI, Harrison TJ, Dusheiko GM, Madrigal JA. Cytotoxic T lymphocyte responses and CTL epitope escape mutation in HBsAg, anti-HBe positive individuals. *Gut* 2000;47:137-143
- 11 徐学刚, 张美稀, 董惠芳, 杨协珍, 金树根, 陈建杰, 王灵台. 肝病患者的血清肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平变化. 世界华人消化杂志 2003;11:856-858
- 12 周俊英, 赵彩彦, 甄真, 冯忠军. 病毒性肝炎肝纤维化与血清 IL-1 $\beta$  及干扰素  $\gamma$  的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:100-101
- 13 Rehmann B. Intrahepatic T cells in hepatitis B: viral control versus liver cell injury. *J Exp Med* 2000;191:1263-1268
- 14 王剑虹, 吴建波. 肝硬变患者的细胞免疫状态研究. 世界华人消化杂志 2000;8:1178-1180
- 15 王九平, 李新红, 朱勇, 王爱莲, 连建奇, 贾战生, 谢玉梅. 慢性乙型肝炎患者 T 细胞亚群, IL-2R, sIL-2R, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  变化及意义. 世界华人消化杂志 2000;8:763-766
- 16 Wang JH, Layden TJ, Eckels DD. Modulation of the peripheral T-Cell response by CD4 mutants of hepatitis C virus: transition from a Th1 to a Th2 response. *Hum Immunol* 2003;64:662-673
- 17 张美稀, 章晓鹰, 金树根, 董惠芳, 陈建杰, 王灵台. 肝病患者外周血 CD28+T 细胞亚群变化. 世界华人消化杂志 2000;8:1432-1433
- 18 Miyazawa Y, Tsutsui H, Mizuhara H, Fujiwara H, Kaneda K. Involvement of intrasinusoidal hemostasis in the development of concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology* 1998;27:497-506
- 19 黄炳贺, 姚冬生, 陈伟强, 陈一岳. 假密环菌活性物对 ConA 诱导的小鼠 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  蛋白产物表达的影响. 实用医学杂志 1998;14:531-532
- 20 李小刚, 王天才, 武忠弼, 周开敏, 唐望先, 李绍白. 刀豆蛋白 A 诱导急性肝损伤的病理学观察. 临床与实验与病理学杂志 1998;14:492-493
- 21 Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 1995;21:190-198
- 22 Ksontini R, Colagiovanni DB, Josephs MD, Edwards CK 3rd, Tannahill CL, Solorzano CC, Norman J, Denham W, Clare-Salzler M, MacKay SL, Moldawer LL. Disparate roles for TNF- $\alpha$  and Fas ligand in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 1998;160:4082-4089
- 23 张亚兵, 李之清, 张亦志. 蛇葡萄根对 Con A 诱导小鼠肝损伤的防护作用. 中西医结合肝病杂志 2000;19:26-29
- 24 Kusters S, Gantner F, Kunstle G, Tiegs G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by Concanavalin A. *Gastroenterology* 1996;111:462-471
- 25 Knolle PA, Gerken G, Loser E, Dienes HP, Gantner F, Tiegs G, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW. Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology* 1996;24:824-829
- 26 Tiegs G. Experimental hepatitis and role of cytokines. *Acta Gastroenterol Belg* 1997;60:176-179
- 27 向明, 孙汉清, 裘军, 张进芳, 郝长江. IFN- $\gamma$  受体 Ig 融合蛋白对 ConA 诱导小鼠肝损伤的保护作用. 上海免疫学杂志 2001;21:337-339
- 28 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997:118-123
- 29 Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. IFN-gamma/STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple chemokines and adhesion molecules: a critical role of IRF-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:1044-1052
- 30 Morita A, Itoh Y, Toyama T, Fujii H, Nishioji K, Kirishima T, Makiyama A, Yamauchi N, Okanoue T. Activated Kupffer cells play an important role in intra-hepatic Th1-associated necro-inflammation in Concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatol Res* 2003;27:143-150
- 31 李小刚, 王天才, 李绍白, 唐望先. 抗 TNF- $\alpha$  单抗对刀豆蛋白 A 诱导急性肝损伤的保护作用. 同济医科大学学报 2000;29:513-514

# 胃腺癌组织层粘连蛋白受体表达的意义

刘丽华, 王士杰, 单保恩, 郝国桢, 高建国, 张 召

刘丽华, 高建国, 张召, 承德医学院附属医院肿瘤科 河北省承德市 067000  
王士杰, 单保恩, 河北省肿瘤研究所 河北省石家庄市 050011  
郝国桢, 河北医科大学第二医院内科 河北省石家庄市 050000  
刘丽华, 女, 1972-12-08 生, 河北省承德市人, 汉族, 2003 年河北医科大学  
硕士, 主治医师  
项目负责人: 刘丽华, 067000, 河北省承德市南营子大街 36 号, 承德市承德  
医学院附属医院肿瘤科. cdlihua1972@yahoo.com.cn  
电话: 0314-2279385  
收稿日期: 2004-11-29 接受日期: 2004-12-21

## Expression and significance of laminin receptor in gastric adenocarcinoma

Li-Hua Liu, Shi-Jie Wang, Bao-En Shan, Guo-Zhen Hao,  
Jian-Guo Gao, Zhao Zhang

Li-Hua Liu, Jian-Guo Gao, Zhao Zhang, Department of Oncology, the  
Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China  
Shi-Jie Wang, Bao-En Shan, Hebei Cancer Institute, Shijiazhuang 050011,  
China  
Guo-Zhen Hao, Department of Internal Medicine, the Second Hospital  
of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China  
Correspondence to: Li-Hua Liu, Department of Oncology, the Affili-  
ated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China.  
cdlihua1972@yahoo.com.cn  
Received: 2004-11-29 Accepted: 2004-12-21

## Abstract

**AIM:** To determine the expression of laminin receptor (LN-R)  
in gastric adenocarcinoma and its clinicopathological  
significance.

**METHODS:** Immunohistochemical staining was performed  
on 76 cases of paraffin-embedded gastric adenocarcinoma  
tissues and 10 normal gastric mucosa tissues with mouse-  
anti-human LN-R polyclonal antibodies.

**RESULTS:** The expression of LN-R in gastric adenocarci-  
noma was significantly higher than that in normal gastric  
mucosa tissues ( $P < 0.05$ ). The expression was significantly  
associated with differentiation degree, Borrmann stage, in-  
vasion depth, tumor size and lymphatic node metastasis  
( $\chi^2 = 10.606, 9.979, 6.838, 7.611, 12.509, P < 0.05$ ). The  
positive expression was negatively correlated with the  
survival time ( $\chi^2 = 9.980, P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** LN-R might act as an important index for  
judging the invasiveness, metastasis and prognosis of  
gastric adenocarcinoma.

**Key Words:** Gastric adenocarcinoma; Laminin receptor;  
Immunohistochemistry

Liu LH, Wang SJ, Shan BE, Hao GZ, Gao JG, Zhang Z. Expression  
and significance of laminin receptor in gastric adenocarcinoma. Shijie  
Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(5):644-647

## 摘要

**目的:** 探讨 LN-R 在判断胃腺癌浸润转移及预后中的作用。

**方法:** 应用免疫组织化学 S-P 法检测 76 例胃腺癌组织和  
10 例正常胃组织中 LN-R 的表达水平, 比较 LN-R 的  
不同表达率与生存率的关系。

**结果:** LN-R 在胃腺癌组织中阳性表达率为 51.3%, 较  
正常组织 (10.0%) 显著增高 ( $P < 0.05$ ), 与分化程度、  
Borrmann 分型、浸润深度、肿块大小、淋巴结转移程  
度比较关系显著 ( $\chi^2 = 10.606, 9.979, 6.838, 7.611, 12.509, P < 0.05$ ), LN-R 阳性表达者的生存时间较  
阴性者短 ( $\chi^2 = 9.980, P < 0.05$ )。

**结论:** LN-R 是判断胃腺癌浸润转移及预后的重要指标。

**关键词:** 胃腺癌; 层粘连蛋白受体; 免疫组化

刘丽华, 王士杰, 单保恩, 郝国桢, 高建国, 张召. 胃腺癌组织层粘连蛋白受体  
表达的意义. 世界华人消化杂志 2005;13(5):644-647  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/644.asp>

## 0 引言

侵袭和转移是恶性肿瘤患者的主要死亡原因。层粘连蛋白 (laminin, LN) 是细胞外基质中重要的成分之一<sup>[1]</sup>。做为基膜的骨架成分, 他可促进血管内皮细胞的形成, 而同时成熟的血管内皮细胞亦分泌 LN 构成基底膜成分, 上皮性肿瘤转移首先要突破基底膜, LN 在其中发挥重要作用, LN 通过层粘连蛋白受体 (laminin receptor, LN-R) 在体内外发挥生物活性<sup>[2]</sup>。正常情况下, LN-R 只分布在良性细胞的基底面, 而在恶性肿瘤组织中却分布在癌细胞的整个表面, 使癌细胞更容易与基底膜黏附, 以利于其侵袭和转移。我们应用免疫组化方法检测 LN-R 在胃腺癌组织中的表达情况, 探讨其在胃腺癌浸润、转移及预后中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院 1997/1998 年未经放化疗手术切除的胃  
腺癌病理标本 76 例, 男 52 例, 女 24 例, 年龄 20-78

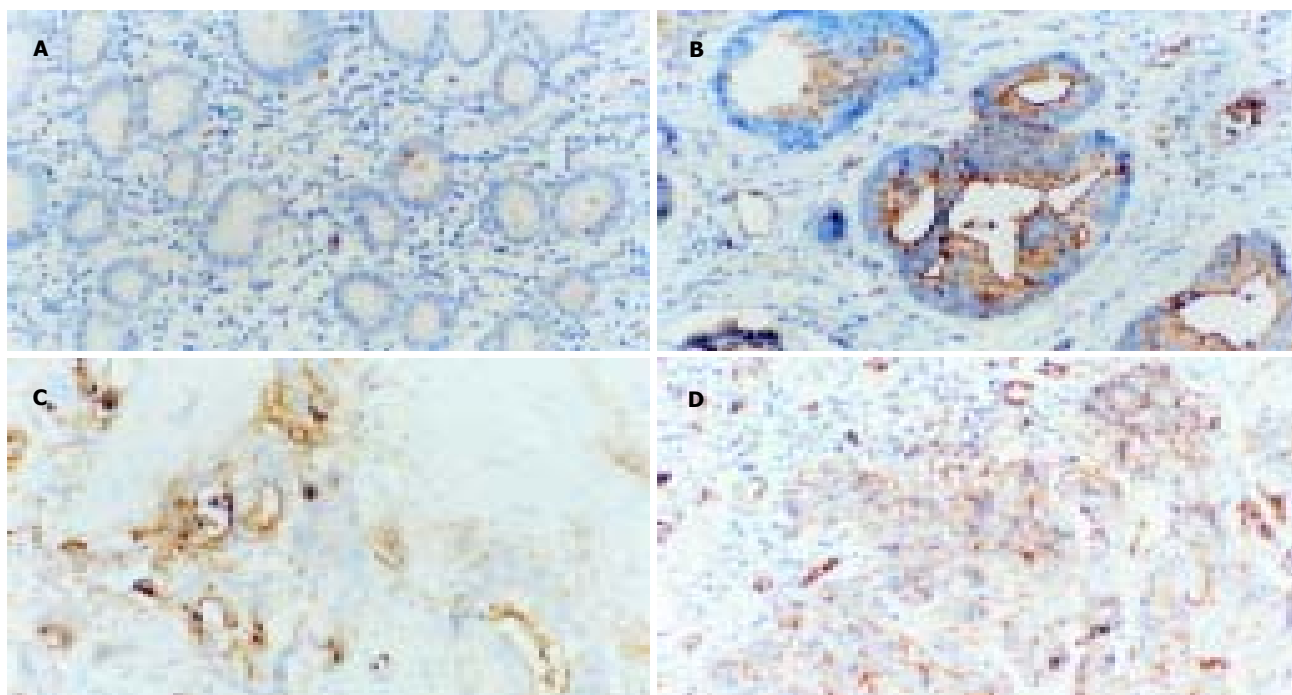


图1 LN-R在胃黏膜中的表达 S-P×200. A: 正常胃黏膜; B: 高度分化胃腺癌; C: 中度分化胃腺癌; D: 低分化胃腺癌.

(中位 54) 岁. 高分化 10 例, 中分化 23 例, 低分化 43 例; Borrman I 型 11 例, II 型 17 例, III 型 40 例, IV 型 8 例; 肿瘤浸润黏膜层 (M) 和黏膜下层 (Sm) 8 例, 固有肌层 (Pm) 28 例, 浆膜下 (SS) 和穿透浆膜层 (Se) 40 例; 肿块大小: 直径  $\geq 3$  cm 45 例, 直径  $< 3$  cm 31 例; 淋巴结转移: 阳性 44 例, 阴性 32 例. 对照组为 10 例正常胃黏膜组织. 判断标准参照《WHO1997 年国际胃癌肿瘤组织学分类》<sup>[2]</sup>. 所有标本常规石蜡包埋, 连续切片厚 5  $\mu$ m. 均有术后 5 a 随访资料. 鼠抗人 LN-R 购自北京中山生物技术公司.

**1.2 方法** 采用 S-P 法免疫组化染色如下: 石蜡切片脱蜡、水化; 30 ml/L 过氧化氢孵育; 抗原修复; 滴加一抗 (LN-R 原液 1:80 稀释); 滴加生物素标记的二抗; 加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液; DAB 显色, 苏木素复染, 透明, 封片. 以 PBS 代替一抗, 其他步骤不变作为阴性对照. 以乳腺癌标本作为阳性对照. 细胞膜或细胞质中出现棕黄色颗粒, 着色细胞数  $\geq 10\%$  为阳性, 着色细胞数  $< 10\%$  为阴性.

**统计学处理** 应用 SPSS10.0 软件进行数据处理,  $\chi^2$  检验用于比较计数资料, 用 Kaplan-Meier 法作生存分析, Logrank 法比较患者生存率. 生存时间的计算是从手术日期起到随访日期或由于复发、转移而死亡的日期为止.

## 2 结果

**2.1 胃腺癌组织 LN-R 的表达** LN-R 阳性表达于癌细胞的表面, 呈黄色颗粒状, 与阴性细胞比较差别明显 (图 1). 76 例胃腺癌组织中 LN-R 阳性表达 39 例 (51.3%),

10 例正常胃组织 LN-R 阳性表达 1 例 (10.0%), LN-R 在胃腺癌组织的表达明显高于正常胃组织 ( $P < 0.05$ ). LN-R 在胃腺癌组织中的表达水平与分化程度、Borrman 分型、浸润深度、肿块大小、淋巴结转移情况均有明显的关系 ( $P < 0.05$ , 表 1).

**2.2 LN-R 表达与生存时间的关系** 应用 Kaplan-Meier 法计算结果显示 LN-R 阳性表达者的生存时间明显短于阴性表达者 (用 Logrank 分析  $\chi^2 = 9.980$ ,  $P < 0.05$ ), 随着 LN-R 表达程度的增高生存时间缩短, (图 2).

## 3 讨论

LN-R 又称为层粘连蛋白结合蛋白, 是 LN 发挥作用的媒介. LN 是细胞外基质中非胶原糖蛋白中最重要的成分之一, 与 IV 型胶原结合形成基底膜骨架, 影响细胞黏附、运动, 调节细胞生长、分化, 并与肿瘤的浸润、转移等有关, 通过 LN-R 在体内外发挥重要生物学活性. 正常上皮及良性组织细胞仅在其基底膜面可被 LN-R 抗体着染, 而癌细胞则在整个细胞表面可见阳性反应. 在本组研究中, LN-R 在胃腺癌组织与正常胃组织的表达相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ). 正常上皮的 LN-R 极化在基底膜表面, 而恶性肿瘤中 LN-R 可扩散到整个细胞, 癌细胞表面有更多的未结合 LN-R, 为恶性肿瘤粘着于基底膜并进一步侵袭创造了条件. 在癌细胞转移过程中, 涉及到多种因素, 而癌细胞与基膜的作用是关键性步骤. 癌细胞在转移过程中至少要三次穿过基膜: 突破癌细胞下基膜而浸润结缔组织, 穿过脉管基膜而进入脉管, 再穿出脉管基膜, 转移进入靶组织. Liotta 报道<sup>[3]</sup>, 高度恶性肿瘤细胞表面较低度恶性肿瘤细胞

表1 LN-R在胃腺癌中的表达情况(76例)

肿瘤特征		<i>n</i>	阳性表达(%)	$\chi^2$	<i>P</i>
分化程度	高	10	2(20.0)	10.606	0.014
	中	23	13(56.5)		
	低	43	24(55.8)		
Borrmanna	I	11	2(18.2)	9.979	0.019
分型	II	17	6(35.3)		
	III	40	26(65.0)		
浸润深度	IV	8	5(62.5)	6.838	0.033
	M、S m	8	2(25.0)		
	Pm	28	11(39.3)		
肿块大小	SS、Se	40	26(65.0)	7.611	0.006
	<3cm	31	10(32.3)		
	≥3cm	45	29(64.4)		
淋巴结	Negative	32	9(28.1)	12.509	0.002
转移	<30%	15	9(60.0)		
	≥30%	29	21(72.4)		

有更多未结合的LN-R, 并认为瘤细胞表面LN-R的多少直接影响LN促进转移的能力. 如人浸润性乳腺癌细胞质膜特异性结合LN的能力较正常或良性乳腺癌高50倍<sup>[4]</sup>, 提示LN-R不仅数量增加, 而且其结合的活性也提高, 这为恶性肿瘤细胞粘着于基膜创造了条件. 张鸿来 *et al*<sup>[5]</sup>应用PCR技术扩增LN-R cDNA, 然后将其受体单克隆抗体处理肿瘤细胞, 结果肿瘤细胞浸润和转移能力受到抑制, 进一步证明了LN-R的表达数量与生物活性在胃腺癌浸润转移中的作用.

本研究还表明, LN-R与胃腺癌的分化程度、Borrmann分型相关, 随着肿瘤分化程度减低、肿块体积增大、浸润深度增加, LN-R表达增高, 提示LN-R与浸润、转移有关. LN-R还与胃腺癌的淋巴结转移密切相关. 在这方面国内外报道很少, 李晓玲 *et al*<sup>[6]</sup>对胃癌的研究表明67 KD-LR在印戒细胞癌中的表达率最高, 弥漫性生长的胃癌具有较高的浸润转移能力, 提示67 KD-LR阳性表达的细胞具有较高侵袭力, 且与胃癌病期进展密切相关. Fujita<sup>[7]</sup>对早期胃癌的研究表明LN表达的减少或消失是判断肿瘤侵袭基低膜

或决定肿瘤浸润生长方式的重要指标. 有人用ELISA检测血清中LN水平结果表明, 胃癌组显著高于正常组, 淋巴结转移组高于无淋巴结转移组, 肝转移组高于肝无转移组. Daneker *et al*<sup>[8]</sup>对结肠癌的研究证实癌细胞分化越低, 合成LN的能力就越低, 而低分化的癌细胞及其组织内多种细胞分泌蛋白水解酶的水平却较高. 张林 *et al*<sup>[9]</sup>用免疫组化S-P法检测胃腺癌组织中LN的表达结果表明, 在胃癌组织中LN的表型与分化程度有关: 分化型癌多呈连续线状型、间断线状型或碎片状型, 而未分化型癌则呈完全缺失型或碎片状型, LN表达类型还与胃癌的浸润深度及淋巴结转移有明显关系, 因而认为LN是胃癌浸润转移的指标. LN-R通过结合LN能促进肿瘤细胞IV型胶原酶的释放<sup>[10]</sup>. LN-R利于癌的血源性转移可能有两种途径: (1) 如果癌细胞表面的LN-R是未被占据而呈游离状态, 癌细胞可借助LN-R直接结合到宿主的LN; (2) 如果LN-R被占据而呈饱和状态, 则癌细胞借助其结合的LN为桥梁, 连接到基膜中的IV型胶原上. 瘤细胞对LN的亲合性成为影响肿瘤细胞浸润和转移的重要因素之一. 他不与组织来源有关, 而与转移能力有关. 对可转移的细胞无论癌或肉瘤, 都可选择性地与IV型胶原组织粘着. 而不转移的肉瘤细胞偏爱I型胶原(存在于结缔组织基质). 因此, LN-R可能通过增加IV型胶原蛋白的形式来促进LN与其结合, 促进细胞转移、浸润. 由此可见, LN-R在胃腺癌浸润、转移中起重要作用, 反映了肿瘤的恶性行为, 是一个有意义的指标. 通过对患者生存时间进行随访, 比较二者的关系, 我们发现LN-R与生存时间呈负相关. 因此LN-R可作为胃腺癌的预后指标之一.

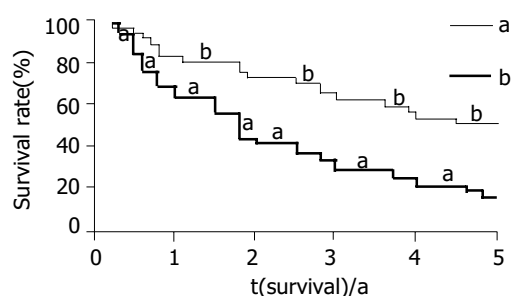


图2 LN-R表达与生存时间的关系.

## 4 参考文献

- 1 Kibbey MC, Yamamura K, Jun SH, Grant DS, Kleinman HK. Enhancement of tumor growth by basement membrane: modulate of growth and angiogenesis by laminin-derived synthetic peptides. *Cancer Treat Res* 1994;71:267-275
- 2 宁浩勇, 虞积耀. 食管和胃肿瘤组织学分型. 诊断病理学杂志, 2001;7-20
- 3 Liotta LA. Tumor invasion and metastasis-role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 1986;46:1-9
- 4 张青云, 周柔丽. 层粘连蛋白受体及其在肿瘤转移中的作用. 生理科学进展 1991;22:314-319
- 5 张鸿来, 张卫国, 吴秉铨. 利用聚合酶链式反应技术扩增层粘连蛋白受体的 cDNA. 北京医科大学学报 1994;26:33-34
- 6 李晓玲, 王艳萍, 吴东瑛, 张素敏, 辛彦. PTEN 基因编码蛋白及上皮钙粘蛋白和层粘连蛋白受体与胃癌浸润转移的关系. 中华医学杂志 2003;83:599-601
- 7 Fujita J. Correlation between laminin and fibronectin on the basement membrane and tumor progression in early gastric cancer: an immunohistochemical study. *Hokkaido Igaku Zasshi* 2000;75:25-34
- 8 Daneker GW Jr, Mercurio AM, Guerra L, Wolf B, Salem RR, Bagli DJ, Steele GD Jr. Laminin-expression in colorectal carcinomas varying in degree of differentiation. *Arch Surg* 1987;122:1470-1474
- 9 张林, 付红梅, 金树珍, 周成刚. 层粘连蛋白与胃癌分化、浸润、和转移. 实用肿瘤学杂志 1999;13:26-27
- 10 Turpeenniemi-Hujanen T, Thorgeirsson UP, Rao CN, Liotta LA. Laminin increased the release of type IV collagenase from malignant cells. *J Biol Chem* 1986;261:1883-1889

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》、《世界胃肠病学杂志（英文版）》 变更刊期获得批复

本刊讯 山西省新闻出版局于 2005-02-18 及 2005-02-25 发布文件, 分别批准《世界胃肠病学杂志（英文版）》、《世界华人消化杂志》变更刊期。

根据新出报刊[2005]58 号文件,《世界胃肠病学杂志（英文版）》自 2005-01-01 起改为周刊发行, 每月 7、14、21、28 日出版。

根据晋新出报刊发[2005]15 号文件,《世界华人消化杂志》自 2005-01-01 起改为半月刊发行, 每月 1、15 日出版。

## 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004 年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004 年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004 年版(第四版)。本版核心期刊研究, 被列为“2001 年国家社会科学基金项目”。该书定于 2004 年 7 月由北京大学出版社出版。

该书已于 1992, 1996, 2000 年出版过三版, 在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书。为了及时反映中文期刊发展变化的新情况,《中文核心期刊要目总览》2004 年版编委会, 开展了新版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况。本版核心期刊定量评价, 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达 51 种, 统计文献量达到 943 万余篇次(1999-2001 年), 涉及期刊 1 万 2 千种。本版还加大了专家评审力度, 1873 位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出 1800 种核心期刊, 分属七大编 75 个学科类目。该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺参考工具书。

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关单位的百余名专家和期刊工作参加了研究。(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)

# HepG2 细胞构成的生物人工肝脏体外氨与安定的代谢能力

王宁, 陈洋, 郭仁宣, 郭克建

王宁, 郭仁宣, 郭克建, 中国医科大学附属第一医院普外二科  
辽宁省沈阳市 110001

陈洋, 中国医科大学附属第一医院中心实验室 辽宁省沈阳市 110001  
王宁, 男, 1969-03-30 生, 沈阳人, 汉族. 1993 年毕业于大连医科大学, 现任中国医科大学附属第一医院普外二科主治医师. 2004 年于日本自治医科大学获博士学位.

项目负责人: 王宁, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普外二科. wangning690330@yahoo.com.cn

电话: 024-23256666-6237

收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-01-20

## Ammonia and diazepam metabolism capacities of a novel bioartificial liver with HepG2 cells

Ning Wang, Yang Chen, Ren-Xuan Guo, Ke-Jian Guo

Ning Wang, Ren-xuan Guo, Ke-Jian Guo, The Second Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Yang Chen, Central Experimental Laboratory, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr. Ning Wang, The Second Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, 110001, Liaoning Province, China.

wangning690330@yahoo.com.cn

Received: 2005-01-10 Accepted: 2005-01-20

## Abstract

**AIM:** To establish a bioartificial liver (BAL) that can metabolize both ammonia and diazepam (DZP).

**METHODS:** HepG2-GS-3A4 cell line was produced by transfecting cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) gene into HepG2-GS, a cell line established by Enosawa *et al* by introducing glutamine synthetase (GS) gene into HepG2 cells. After the expression of CYP3A4 was verified by Western blot and immunohistochemistry, HepG2-GS-3A4 cells were inoculated in a BAL circulatory reactor. When the cells grew to enough number, medium containing  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and DZP was infused. Samples were collected at fixed time. The concentrations of ammonia, DZP and its metabolites were analyzed by Berthelot reaction and HPLC.

**RESULTS:** The expression of CYP3A4 in HepG2-GS-3A4 was much stronger than that in HepG2 ( $P = 0.02$ ). The BAL with HepG2-GS-3A4 showed much higher capacities of ammonia and DZP metabolisms than those with HepG2 or no cells ( $P = 0.04$  and  $0.03$ ). The concentra-

tions of ammonia and DZP were decreased by 31.7% and 36.7%, respectively.

**CONCLUSION:** BAL with HepG2-GS-3A4 processes strong activities of ammonia and DZP metabolism, with advantages of stability, easy subculture and storage, and abundance of cells.

**Key Words:** Ammonia; Diazepam; Bioartificial liver; HepG2 cells

Wang N, Chen Y, Guo RX, Guo KJ. Ammonia and diazepam metabolism capacities of a novel bioartificial liver with HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):648-652

## 摘要

**目的:** 为增强 HepG2 细胞的氨和苯二氮䓬类代谢活性, 在 Enosawa *et al* 的 HepG2-GS 细胞基础上以转基因技术, 建立一种谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS) 和细胞色素 P450 3A4(CYP 3A4) 都过表达的 HepG2-GS-3A4 细胞. 并在人工肝脏循环器中培养此细胞, 以检测此人工肝脏的氨和安定(Diazepam, DZP)的代谢率.

**方法:** 以 Western 杂交和免疫组化等方法证实 CYP 3A4 蛋白过表达后, 将 HepG2-GS-3A4 细胞接种于一种人工肝脏循环器, 待细胞数量增至足够后, 充入含  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和安定的培养液, 孵育 24 h, 定时取样, 分别以 Berthelot 反应法检测氨浓度, 以 HPLC 法检测 DZP 及其代谢产物.

**结果:** CYP 3A4 蛋白在 HepG2-GS-3A4 细胞中表达显著强于 HepG2 细胞( $P = 0.02$ ). 在接种有 HepG2-GS-3A4 细胞的生物人工肝脏循环器中与 HepG2 细胞和无细胞组相比, 氨浓度明显降低( $P = 0.04$ ), 氨浓度约降低约 31.7%; DZP 浓度也明显降低( $P = 0.03$ ), 且有 DZP 的代谢产物生成产生, DZP 浓度约降低 36.7%.

**结论:** 接种有 HepG2-GS-3A4 细胞的生物人工肝脏有明显的 DZP 和氨的代谢能力, 代谢能力虽弱于文献中的猪原代肝细胞, 但具有性质稳定, 易于传代和储存, 获取细胞数量不受限制等优点.

**关键词:** 氨; 安定; 人工肝脏; HepG2 细胞

王宁, 陈洋, 郭仁宣, 郭克建. HepG2 细胞构成的生物人工肝脏体外氨与安定的代谢能力. 世界华人消化杂志 2005;13(5):648-652  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/648.asp>

## 0 引言

肝性脑病的发生是多因素共同作用的结果, 血氨和内生性苯二氮䓬共同增高发挥了重要作用<sup>[1]</sup>. Basile *et al*<sup>[2]</sup> 发现血浆苯二氮䓬浓度与肝性脑病程度相关, 并在暴发性肝功衰竭导致的肝性脑病患者血浆中检测到安定和去甲基安定. Itzhak *et al*<sup>[1]</sup> 认为血氨增高可导致肝衰小鼠的脑外周型苯二氮䓬受体和亲和力的增加. Bauer *et al*<sup>[3]</sup> 发现以苯二氮䓬受体拮抗剂氟马西尼可逆转患者的肝昏迷. 肝性脑病时产生的内生性苯二氮䓬有着与安定及其代谢产物去甲基安定、去甲羟基安定等相似的化学结构, 血氨增高可增加外周型苯二氮䓬受体和亲和力和 GABA 能抑制性神经传导<sup>[4]</sup>, 因此建立一种既能代谢氨又能代谢苯二氮䓬类物质的解毒型人工肝脏将能改善和治疗肝性脑病. 我们应用的生物人工肝脏循环器有可重复使用, 无菌操作较安全, 细胞密度高, 营养与废物在培养液和细胞之间交换更充分等优点. Enosawa *et al* 曾将过表达谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 的 HepG2 (HepG2-GS) 细胞接种于该循环器, 并使其数量增生至  $4 \times 10^9$ , 而后用其治疗、降低了急性肝功不全猪的血氨浓度, 但生存时间并未显著延长<sup>[5]</sup>. 细胞色素 P450 3A4 (Cytochrome P450 3A4, CYP 3A4) 有较高的苯二氮䓬类代谢活性<sup>[6]</sup>. 因此, 在 Enosawa *et al* 基础上, 利用转基因技术, 建立了即过表达 GS 和又过表达 CYP 3A4 的 HepG2 细胞 (HepG2-GS-3A4). 并以 HepG2-GS-3A4 细胞接种于上述生物人工肝脏循环器, 并使其活细胞数目增生至最大之后, 测定其体外代谢氨和苯二氮䓬类代表性物质安定的代谢能力.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HepG2 购于 Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan). HepG2-GS 细胞及培养液 (RDF) 由 Enosawa 惠赠 (National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan). 构建 HepG2-GS-3A4 的方法: 以含有 2 个多克隆位点, 分别以 human cytomegalovirus (CMV) 和 human elongation 1- $\alpha$  subunit (EF-1 $\alpha$ ) 基因做为启动子, 和 zeocin 耐药基因的质粒做载体. 将 hamster 鼠的 GS 和人 CYP 3A4 基因分别插入上述 2 多克隆位点. 再以脂质体转染法转染于 HepG2 细胞<sup>[7]</sup>. HepG2-GS-3A4 细胞培养于含 100 mL/L 小牛血清和 Zeocin 200 mg/L 的 D-MEM/F12:RPMI 1:1 培养液; HepG2 细胞培养于含 100 mL/L 小牛血清和青霉素 100 KU/L 和链霉素 100 mg/L 的 D-MEM/F12:RPMI 1:1 培养液; 细胞均置于 37℃, 含 50 mL/L CO<sub>2</sub> 的孵箱中培养.

### 1.2 方法

**1.2.1 Western 杂交和免疫组化法检测 CYP 3A4** 将  $10^5$

个细胞置于等张的缓冲液中, 用氮气气穴法 (cavitation) 破碎. 将 20  $\mu$ g 蛋白置于 70 g/L SDS-PAGE 胶电泳, 再转到醋酸纤维膜上, 并以人 CYP3A4 抗体杂交 (WB human CYP3A4 kit, BDGenetest, MA, USA), 以人肝微粒体作参照, 密度测量作定量分析. 免疫组化法, 先将细胞培养于分格载玻片上, 待细胞数目增生足够后, 固定, 再以上述抗体, 用 LSAB2/HRP (DAB)-kit 试剂盒 (DakoCytomation, Denmark), 进行免疫组化检测.

**1.2.2 离体检测其 DZP 和氨的代谢率** 将 HepG2-GS-3A4 细胞接种于 Enosawa *et al* 应用的同样的生物人工肝脏循环器中 (US patent 5270207 [1993]). 在循环器的反应器中, 肝细胞附着于一种缠绕于中轴的玻璃纤维膜上. 该反应器外腔内有温水循环, 使其内腔保持 37℃. 培养液、O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 可从反应器上面不断地输入. 首先, 将约  $4.0 \times 10^8$  HepG2 的细胞接种于反应器内. 24 h 后, 新鲜的培养液以 1 L/d 的速度输入反应器, 在反应器内充分混合后, 以同样速度排出<sup>[5, 19]</sup>. 实验按接种的细胞不同分 3 组: HepG2-GS-3A4 细胞; HepG2 细胞和无细胞. 每组实验各重复 4 次. 接种细胞后约 7 d, 通过检测反应器内培养液的葡萄糖和乳酸含量, 了解到反应器内细胞近汇合时, 开始测定 DZP 和氨的代谢率. 首先, 停止培养液循环. 然后将含 DZP 和 NH<sub>4</sub>Cl 的培养液充入反应器, 使其终浓度达到 DZP 5 mg/L; NH<sub>4</sub>Cl, 2.5 mmol/L. 保持反应器内恒温于 37℃ 左右. 持续充入含 50 mL/L CO<sub>2</sub> 的 O<sub>2</sub>. 分别于 0, 1, 4, 10, 24 h 取样. 并以 HPLC 法检测 DZP 及其代谢产物, 去甲基安定 (nordiazepam, NDZP)、羟基安定 (temazepam, TZP)、去甲基羟基安定 (oxazepam, OZP) 的浓度<sup>[8]</sup>, 以 Berthelot 反应法检测氨浓度<sup>[9]</sup>.

**统计学处理** 结果以 mean $\pm$ SD 表示. 以 ANOVA 对数据进行统计学分析,  $P < 0.05$  时认为有显著差异.

## 2 结果

**2.1 Western 杂交和免疫组化检测** Western 杂交结果显示, CYP 3A4 蛋白在 HepG2-GS-3A4 细胞和 HepG2 细胞中都可以检测到 (图 1A, B). 然而, HepG2-GS-3A4 细胞中的 CYP 3A4 含量约为 HepG2 的  $9(0.18 \pm 0.014 / 0.02 \pm 0.009)$  倍 ( $P < 0.05$ ) (图 2B). 免疫组化结果显示, CYP 3A4 蛋白在 HepG2-GS-3A4 细胞胞质中信号明显强于 HepG2 细胞呈强阳性 (图 1C).

**2.2 DZP 的代谢** 在未接种有肝细胞的生物人工肝脏循环器中, DZP 浓度无明显降低 ( $P > 0.05$ ); 在接种有 HepG2 细胞的生物人工肝脏循环器中, DZP 浓度有降低, 然而无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 且无 NDZP, TZP 和 OZP 的生成 (图 2A). 在接种有 HepG2-GS-3A4 细胞的生物人工肝脏循环器中, DZP 浓度明显降低 ( $P < 0.05$ ).

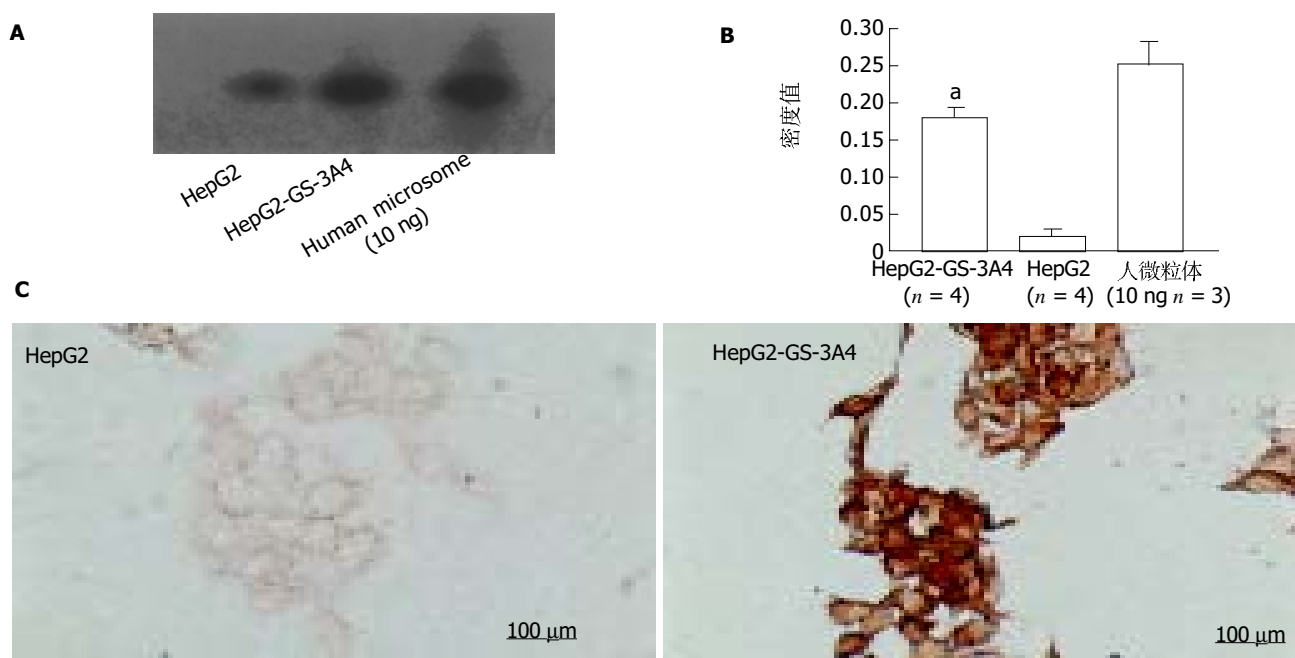


图1 CYP 3A4 蛋白检测结果. A: CYP 3A4 的 Western 杂交结果; B: 密度测定法检测 Western 杂交信号强度和 CYP 3A4 蛋白的相对量, 细胞数量为  $10^5$  cells.  $^a P < 0.05$  vs HepG2; C: CYP 3A4 的免疫组化结果, HepG2-GS-3A4 细胞呈强阳性.

且有 NDZP, TZP 产生, TZP 产量约为 NDZP 的 5.2 ( $1.3975 \pm 0.072 / 0.2701 \pm 0.015$ ) 倍. 约  $929.01 \pm 50.33 \mu\text{g}$  DZP 被代谢, NDZP, TZP 分别有  $148.55 \pm 7.54$ ,  $768.63 \pm 40.64 \mu\text{g}$  产生. DZP 浓度约降低 36.7%, 开始的 4 h 内平均速度为  $0.0587 \pm 0.004 \text{ pg}/(\text{h} \cdot \text{cell})$ , 而 24 h 平均速度为  $0.0194 \pm 0.008 \text{ pg}/(\text{h} \cdot \text{cell})$  (图 2B). 2.3 氨的代谢 在未接种有肝细胞的生物人工肝脏循环器中, 氨浓度无明显降低; 在接种有 HepG2 细胞的生物人工肝脏循环器中 (图 3), 氨浓度有降低, 然而无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 在接种有 HepG2-GS-3A4 细胞的生物人工肝脏循环器中, 氨浓度明显降低 ( $P < 0.05$ ). 氨浓度约降低 31.7%, 开始的 4 h 内平均速度为  $0.435 \times 10^{-6} \pm 0.028 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{cell})$ , 而 24 h 平均速度为  $0.075 \pm 0.005 \times 10^{-6} \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{cell})$ .

### 3 讨论

肝脏有很多重要的生理功能, 解毒是其中的一项重

要功能. 肝功能衰竭将导致很多毒素的蓄积, 如氨和内生性苯二氮䓬等<sup>[10]</sup>. 人工肝脏被寄希望于能够帮助自身肝脏执行其功能, 以延缓等待肝移植的时间, 甚至使自身肝脏得到修复而恢复正常功能<sup>[11-13]</sup>. 肝脏的大多数功能是由肝细胞来执行的. 动物传染病是猪等动物肝细胞应用的最大弊病<sup>[14]</sup>. 人正常肝细胞获得困难; 以已建立的人肝细胞系可以克服人正常肝细胞来源不足的缺陷. 有人曾以 HepG2 细胞构成的人工肝脏进行临床研究<sup>[15-16]</sup>. 虽然他们是否尚保留足够的肝细胞功能还有待评价, 然而通过基因工程人为地增加一些酶的表达来增强一些功能, 也不失为一个好的办法<sup>[13]</sup>. Enosawa *et al* 曾将 GS 基因转染于 HepG2 细胞使其过表达, 并接种于人工肝脏循环器, 并使其数量增生至  $4 \times 10^9$ , 而后用其治疗、降低了急性肝功不全猪的血氨浓度, 但生存时间并未显著延长<sup>[5]</sup>. 血氨和内生性苯二氮䓬共同增高是肝性脑病的重要发病机制之一, CYP 3A4 有较高的苯二氮䓬类代谢活

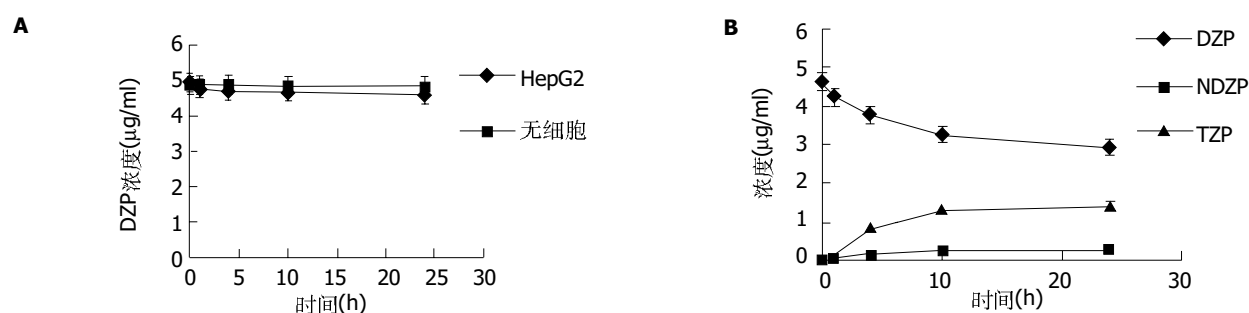
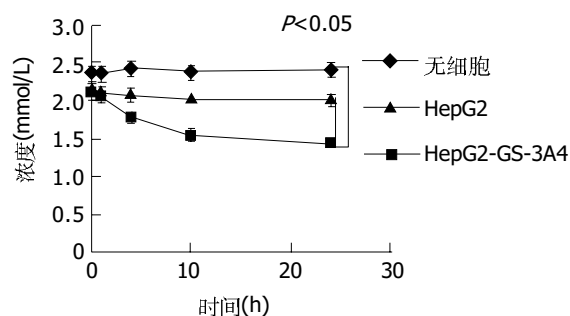


图2 DZP 的代谢. A: DZP 在接种有 HepG2 细胞和无细胞的生物人工肝脏循环器中代谢情况 ( $n = 4$ ); B: DZP 在接种有 HepG2-GS-3A4 细胞的生物人工肝脏循环器中的代谢情况 ( $n = 4$ ).

图3 氨在生物人工肝脏循环器中代谢情况( $n = 4$ ).

性. 因此, 我们在 Enosawa *et al* 基础上, 利用转基因技术, 建立了即过表达 GS 和又过表达 CYP 3A4 的 HepG2 细胞 (HepG2-GS-3A4). 在培养皿中 HepG2-GS-3A4 细胞的氨的代谢能力与 HepG2-GS 细胞无明显差异 ( $P > 0.05$ ) 均显著高于 HepG2 细胞 ( $P < 0.05$ ). 这也间接地证明了 GS 在 HepG2-GS-3A4 细胞中的过表达. Western 杂交和免疫组化结果显示 CYP 3A4 蛋白表达显著强于 HepG2 细胞. 因此, HepG2-GS-3A4 细胞安定和氨的代谢能力明显强于 HepG2. 该部分实验显示了接种有 HepG2-GS-3A4 细胞的生物人工肝脏循环器有明显的 DZP 和氨的代谢能力. DZP 和氨的代谢率与培养皿中所测得的结果相近, 说明该生物人工肝脏循环器可提供适合于 HepG2-GS-3A4 细胞生长的环境. 其开始 4 h 的代谢率较高, 分析原因为, 氨开始时渗透压高, 经 HepG2-GS-3A4 细胞代谢后浓度逐渐降低, 其进入 HepG2-GS-3A4 细胞的渗透压也逐渐降低, 故代谢速度逐渐降低. 而 DZP 为非水溶性, 需主动转运入细胞, 可能由于载体的饱和和耗能增加, 转运速度的下降, 代谢速度也逐渐降低. 在用于治疗时, 氨和内生性苯二氮䓬增高的血浆持续流入反应器, 其代谢率也许会更高一些. Bader *et al*<sup>[4]</sup> 曾将原代猪肝细胞接种于一种多层膜状的人工肝脏系统, 并以其代谢  $4.8 \mu\text{g}$  DZP, 并于接种后第 1 d DZP 的清除率为  $0.47 \pm 0.37 \text{ pg}/(\text{h} \cdot \text{cell})$ , 约为本实验所用人工肝脏系统的 8 倍. 分析原因, 原代肝细胞中含有相对健全的酶系. 而在肝细胞的第 I 相反应中不仅 CYP 3A4 能代谢 DZP, 而且其他如 3A5、2C19、2B6 等都可代谢 DZP; 而在肝细胞的第 II 相反应中还可以将 DZP 的代谢产物 OZP 和 TZP 葡萄糖醛酸化, 再随尿排出体外, 从而降低 CYP 3A4 催化的产物浓度, 而使该反应继续右移. CYP 3A4 虽只催化第 I 相反应, 但在用于治疗时, 自身肝脏细胞会完成第 II 相反应的进行, 随着 DZP 的代谢产物 OZP 和 TZP 于自身的肝细胞内葡萄糖醛酸化, 苯二氮䓬的代谢率也许会比体外实验更高一些. 正常情况下 DZP 在人体内主要代谢成 NDZP, TZP 和 OZP 三种代谢产物, 分别通过 NDZP, TZP 2 个途径 (图 4). NDZP 是在正常人

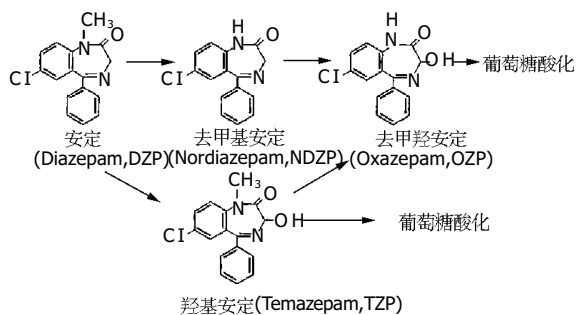


图4 DZP 的代谢途径.

体和狗体内都是其主要代谢产物<sup>[17]</sup>, 他与 DZP 的药理活性相近, 但半衰期更长 (30–200 h). 然而, TZP 和 OZP 的半衰期 (10–20 h, 5–15 h), 却比 DZP (20–100 h) 的要短得多. 因此, NDZP 的排除需要时间更长, 在 DZP 中毒或肝功能不全时危害更大. 而 HepG2-GS-3A4 细胞主要将 DZP 代谢为 TZP 而不是 NDZP, 所以如将其应用于生物人工肝脏系统中, 将大大减少了清除 DZP 及其代谢产物的时间, 为 DZP 的代谢提供很大帮助. Enosawa *et al* 曾将 HepG2-GS 细胞接种于本实验所用人工肝脏反应器, 并培养 40 d 后测得其对  $2.3 \text{ mmol/L}$  氨的清除率为  $0.5\text{--}0.6 \text{ f mol}/(\text{min} \cdot \text{cell})$ <sup>[5]</sup>. 而本实验氨的清除率为  $0.435 \text{ f mol}/(\text{min} \cdot \text{cell})$ , 因为本实验氨的实际初始浓度为  $2.098 \text{ mmol/L}$  略低, 故氨的代谢率也略低, 而实际氨的清除率基本一致. Enosawa *et al* 还将 HepG2-GS 细胞和猪原代肝细胞分别接种于生物人工肝脏循环器中, 并发现其体外代谢氨的能力为猪原代肝细胞的  $1/7\text{--}1/8$  左右<sup>[18]</sup>. 上述分析显示, HepG2-GS-3A4 细胞的代谢能力明显弱于猪原代肝细胞. 猪原代肝细胞虽然功能广泛、强大, 然而其功能发挥时间较短 (约 10 d), 且可释放出异种蛋白和细胞碎屑. 原代肝细胞每获取一次, 需自生体切除, 提取、传代均较困难, 而且有传播动物疾病的危险. 而 HepG2 虽然功能较差, 但性质稳定, 易于传代和储存, 获取细胞数量不受限制. 随着生物工程学技术的发展, 可通过转基因的方法使其具有多重、增强的功能<sup>[5]</sup>. 而且通过增加治疗时间, 和或加快血浆流经该循环器的速度, 一定能够增强其于体内代谢 DZP 和氨的代谢量. 而且, 在不远的将来, 由于生物工程的进步, 一定能获得肝细胞密度更高的人工肝脏, 和功能更强大的重组肝细胞, 而进一步增强其代谢能力.

#### 4 参考文献

- 1 Itzhak Y, Roig-Cantisano A, Dombro RS, Norenberg MD. Acute liver failure and hyperammonemia increase peripheral-type benzodiazepine receptor binding and pregnenolone synthesis in mouse brain. *Brain Res* 1995;705:345-348
- 2 Basile AS, Hughes RD, Harrison PM, Murata Y, Pannell L, Jones EA, Williams R, Skolnick P. Elevated brain concentra-

- tions of 1, 4-benzodiazepines in fulminant hepatic failure. *N Engl J Med* 1991;325:473-478
- 3 Bauer TM, Ritz R, Haberthur C, Ha HR, Hunkeler W, Sleight AJ, Scollo-Lavizzari G, Haefeli WE. Prolonged sedation due to accumulation of conjugated metabolites of midazolam. *Lancet* 1995;346:145-147
- 4 Bader A, De Bartolo L, Haverich A. High level benzodiazepine and ammonia clearance by flat membrane bioreactors with porcine liver cells. *J Biotechnol* 2000;81:95-105
- 5 Enosawa S, Miyashita T, Suzuki S. In Vivo estimation of bioartificial liver with recombinant HepG2 cells using pigs with ischemic hepatic failure. *Cell Transplant* 2001;10:429-433
- 6 Ono S, Hatanaka T, Miyazawa S, Tsutsui M, Aoyama T, Gonzalez FJ, Satoh T. Human liver microsomal diazepam metabolism using cDNA-expressed cytochrome P450s: role of CYP2B6, 2C19 and the 3A subfamily. *Xenobiotica* 1996;26:1155-1166
- 7 Miyashita T, Enosawa S, Suzuki S, Tamura A, Tanaka H, Amemiya H, Matsumura T, Omasa T, Suga K, Aoki T, Koyanagi Y. Development of a bioartificial liver with glutamine synthetase-transduced recombinant human hepatoblastoma cell line, HepG2. *Transplant Proc* 2000;32:2355-2358
- 8 Azzam RM, Notarianni LJ, Ali HM. Rapid and simple chromatographic method for the determination of diazepam and its major metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;708:304-309
- 9 Hindriks FR, Groen A. Evaluation of the enzymatic ammonia method for urine on the Du Pont automatic clinical analyzer. *J Clin Chem Clin Biochem* 1978;16:289-291
- 10 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
- 11 Naruse K, Makuuchi M. Development and perspectives of bioartificial liver support. *Hepatogastroenterology* 2002;49:91-95
- 12 Yamashita Y, Shimada M, Ijima H, Nakazawa K, Funatsu K, Sugimachi K. Hybrid-artificial liver support system. *Surgery* 2002;131(1 Suppl):S334-340
- 13 Strain AJ, Neuberger JM. A bioartificial liver--state of the art. *Science* 2002;295:1005-1009
- 14 Weiss RA. The Leeuwenhoek Lecture 2001. Animal origins of human infectious disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:957-977
- 15 Sussman NL, Chong MG, Koussayer T, He DE, Shang TA, Whisennand HH, Kelly JH. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* 1992;16:60-65
- 16 Sussman NL, Gislason GT, Conlin CA, Kelly JH. The Hepatix extracorporeal liver assist device: initial clinical experience. *Artif Organs* 1994;18:390-396
- 17 Klotz U, Antonin KH, Bieck PR. Pharmacokinetics and plasma binding of diazepam in man, dog, rabbit, guinea pig and rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1976;199:67-73
- 18 Enosawa S, Miyashita T, Suzuki S, Li XK, Tsunoda M, Amemiya H, Yamanaka M, Hiramatsu S, Tanimura N, Omasa T, Suga K, Matsumura T. Long-term culture of glutamine synthetase-transfected HepG2 cells in circulatory flow bioreactor for development of a bioartificial liver. *Cell Transplant* 2000;9:711-715

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2005北京协和国际消化疾病论坛征文通知

本刊讯 “北京协和国际消化疾病论坛”由北京协和医院主办，中华医学会北京分会、中华医学会继续教育部、中国医学论坛报、《中国卫生人才》、中国全科医学杂志社协办，现定于2005-10-20/2005-10-23在北京召开。会议将邀请国内外众多此领域具有较深造诣的知名专家参会作专题报告及内镜操作表演。国家继续教育委员会将授予与会人员 I 类继续教育学分8分。论坛期间还将举办药品及器械展览活动。

### 1 会议具体安排

地点：中国·北京京都信苑饭店（五星级）（暂定）。会务费：2005-08-15 前付费¥800 元；2005-08-15 后（含）付费¥900 元。付款方式：Bank Remittance（汇款），开户行：中国建设银行北京广安门直航，户名：北京世纪安德广告有限公司，账号：11001042200053000033。地址：北京市丰台区方城园一区17号楼A座1603室（组委会），邮编：100078。电话：010-58075131、58075132、58075088、58075099，传真：010-58075138，电子信箱：puidd@163.com。请在汇款时务必表明款项的用途为：2005 北京协和国际消化疾病论坛会务费，2005 北京协和国际消化疾病论坛秘书处 2005-1。

### 2 会议议题

会议的议题包括：（1）消化系统疾病的发病机制、诊断和治疗的研究进展；（2）消化系统肿瘤的发病机制、治疗及预防的进展；（3）消化系统内镜的应用现状及操作表演；（4）肝病及肝癌的研究进展；（5）消化系统疾病的外科治疗及研究现状。

### 3 其他事项

截稿日期：2005-07-15。大会秘书处联系人：李景南，北京协和医院消化内科 100730。电话：010-65295017，电子信箱：ljndr@yahoo.com。大会组委会联系人：王双、白雪。

# 大鼠重症急性胰腺炎发病机制中 p38 丝裂原活化蛋白激酶的作用

施新岗, 李兆申, 贾一韬, 许永春, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭

施新岗, 李兆申, 贾一韬, 许永春, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭. 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433  
施新岗, 男, 1970-02-22 生, 江苏省启东市人, 汉族, 2004 年第二军医大学博士, 主治医师, 主要从事重症急性胰腺炎发病机制和治疗研究  
项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科. zhsl@81890.net  
电话: 021-25070585  
收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-10-11

## p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in pathogenesis of severe acute pancreatitis in rats

Xin-Gang Shi, Zhao-Shen Li, Yi-Tao Jia, Yong-Chun Xu, Xiao-Hua Man, Yan-Fang Gong, Zhen-Xing Tu, Guo-Ming Xu

Xin-Gang Shi, Zhao-Shen Li, Yi-Tao Jia, Yong-Chun Xu, Xiao-Hua Man, Yan-Fang Gong, Zhen-Xing Tu, Guo-Ming Xu, Department of Gastroenterology of Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Correspondence to: Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, 174 Changhai Lu, Shanghai 200433, China. zhsl@81890.net  
Received: 2004-08-17 Accepted: 2004-10-11

## Abstract

**AIM:** To study the dynamic changes of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) phosphorylation and to assess the effect of p38 MAPK phosphorylation inhibitor in severe acute pancreatitis (SAP) in rats.

**METHODS:** The SAP model was induced by bili-pancreatic duct retrograde infusion with 5% sterile sodium taurocholate solution. Eighty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham-operation (SO) group ( $n=30$ ), SAP-NS group ( $n=25$ ) and SAP-CNI1493 group ( $n=25$ ). In the SAP-CNI1493 group, SD rats were administered with 10 mg/kg inhibitor CNI-1493 (i.v.) 30 min before induction of SAP. In SAP-NS group, rats received same volume isotonic saline (i.v.) as CNI-1493. Pancreatic tissues and serum samples were collected before and 15 min, 0.5 h, 1 h, 3 h, 6 h after operation. Western blot analysis was performed to determine the phosphorylations of p38 MAPK in the pancreas homogenates. Serum levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were measured by ELISA; Pathological changes of pancreas were examined and scored with light microscopy.

**RESULTS:** In the SO group, basal p38 MAPK phosphorylation was detected. In the SAP-NS group, the p38 MAPK phosphorylation in the pancreas homogenates reached the maximum at 15 min, remained at a similar level at 30, 60 and 180 min, and declined to the same level as that in SO group at 6 h. In the SAP-NS group and SAP-CNI1493 group, the densities of the band detected by Western blot were  $5\ 200\pm360$ ,  $3\ 500\pm250$  at 15 min, and  $4\ 910\pm320$ ,  $2\ 500\pm340$  at 30 min ( $P<0.01$ ). In SAP-CNI1493 group, the serum levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were decreased significantly as compared with those in SAP-NS group ( $P<0.01$ ). The severity of tissue damage in the SAP-CNI1493 group at 3 h were significantly attenuated in comparison with that of the SAP-NS group ( $P<0.01$ ).

**CONCLUSION:** The p38 MAPK plays an important role in the pathogenesis of SAP. Inhibition of p38 MAPK phosphorylation may be a potential approach for prevention and treatment of SAP.

**Key Words:** p38 MAPK; Severe acute pancreatitis; Phosphorylations

Shi XG, Li ZS, Jia YT, Xu YC, Man XH, Gong YF, Tu ZX, Xu GM. p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in pathogenesis of severe acute pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):653-656

## 摘要

**目的:** 研究 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号转导通路在大鼠重症急性胰腺炎(SAP)胰腺组织中的变化规律, 探讨 p38 MAPK 特异性抑制剂 CNI1493 对 SAP 的保护作用。

**方法:** 50 g/L 牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射建立雄性 SD 大鼠 SAP 模型, 随机分为 SO 组(假手术组,  $n=30$ )、SAP-NS 组( $n=25$ )及 SAP-CNI1493 组( $n=25$ ), 各组大鼠质量相似。Western blot 法检测大鼠胰腺组织磷酸化 p38 MAPK 的表达; ELISA 方法检测血清 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  水平; 光镜下评估胰腺组织病理学积分。

**结果:** SO 组胰腺组织存在磷酸化 p38 MAPK 弱表达, SAP-NS 组造模后 15 min 时磷酸化 p38 MAPK 的表达即显著增高至峰值, 3 h 后开始下降, 6 h 时磷酸化 p38

MAPK 活性与 SO 组相似。SAP-NS 组和 SAP-CNI1493 组 Western blot 检测 15, 30 min 条带光密度值  $5200 \pm 360$ ,  $3500 \pm 250$  和  $4910 \pm 320$ ,  $2500 \pm 340$ , SAP-CNI1493 组 15, 30 min 时胰腺组织磷酸化 p38 MAPK 的表达显著低于 SAP-NS 组 ( $P < 0.01$ )。SAP-CNI1493 组 3, 6 h 时间点血清 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  水平及 3 h 时间点胰腺组织病理学积分均显著低于 SAP-NS 组 ( $P < 0.01$ )。

**结论:** p38 MAPK 信号转导通路与牛磺胆酸钠大鼠 SAP 发病机制有关, CNI1493 预处理可能通过抑制 p38 MAPK 的激活、减少炎症细胞因子的产生而改善胰腺炎病理改变的严重程度。

**关键词:** p38 丝裂原活化蛋白激酶;重症急性胰腺炎;磷酸化

施新岗, 李兆申, 贾一韬, 许永春, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭. 大鼠重症急性胰腺炎发病机制中 p38 丝裂原活化蛋白激酶的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(5):653-656

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/653.asp>

## 0 引言

重症急性胰腺炎 (SAP) 因其常可并发全身炎症反应综合征 (SIRS)、全身多脏器功能障碍 (MOF) 及死亡率高, 达 10%-30% 而一直是学者们的研究热点。近年来信号转导通路在发病机制中的意义更是引起人们的兴趣, 已经有研究显示蛙皮素大鼠轻症急性胰腺炎 (MAP) 造模后早期胰腺组织 p38MAPK 即大量磷酸化活化, 而 p38MAPK 特异性抑制剂能改善胰腺炎病变的严重程度<sup>[1-2]</sup>。本研究检测 50 g/L 牛磺胆酸钠胆胰管内逆行注射诱导大鼠 SAP 模型胰腺组织 p38MAPK 磷酸化活化水平, 探讨 p38MAPK 信号转导通路特异性抑制剂 CNI-1493 对 SAP 的保护作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SD 大鼠 80 只, 清洁级,  $\delta$ , 质量 250-300 g, 购自第二军医大学实验动物中心, 本实验室适应性饲养 1 wk 开始实验, 大鼠造模前禁食 12 h, 自由饮水。牛磺胆酸钠 (Sigma 公司); 胞质蛋白试剂盒 (NE-PER Pierce 公司); p38MAPK 抑制剂 CNI-1493 (美国 Pennsylvania 州 Cruz 博士惠赠); 大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒 (上海增健生物科技公司); p38MAPK 磷酸化单克隆一抗 (Cell Signaling Technology 公司); 山羊抗小鼠 IgG-HRP 二抗 (Immuclob Labs. Inc. CA. USA); ECL 试剂盒 (LumiGLO Chemiluminescent Substrate, Lake Placid, NY)。实验前 2 h 禁水。随机分为假手术组 (SO 组,  $n = 30$ )、SAP 生理盐水干预对照组 (SAP-NS 组,  $n = 25$ ) 及 SAP-CNI1493 干预组 (SAP-CNI1493 组,  $n = 25$ )。SO 组分 0 (正常对照组), 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 每时间点 5 只;

SAP-NS 组及 SAP-CNI1493 组分造模后 15, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 每时间点 5 只。30 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 以 4 号加工钝头静脉针逆行穿刺十二指肠前壁、通过十二指肠乳头插入胆胰管远端, 分别在近肝门及胆胰管十二指肠开口处动脉夹将胆胰管两端钳闭, 以 0.2 mL/min 速度注入 5% 牛磺胆酸钠 (1 mL/kg)。SO 组开腹后仅翻动十二指肠并触摸胰腺数次, SAP-CNI1493 组于造模前 30 min, 尾静脉注入 CNI-1493 (10 mg/kg), SAP-NS 组注入相同体积的双蒸水。各时间点腹主动脉取血处死大鼠, 并迅速取胰腺组织。

**1.2 方法** 常规石蜡包埋, 在不同平面切取两张切片行 HE 染色, 由专科医师光镜下观察胰腺组织病理变化, 参照 Rongione *et al* (Gastroenterology 1997; 112:960) 标准进行评分。血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的测定采用 ELISA 方法测定。胰腺组织 100 mg 剪碎后于液氮中研磨, 按照操作说明抽提胞质蛋白, 蛋白定量采用 BCA 法。取 40  $\mu$ g 样品常规进行 SDS-PAGE 电泳后, 电转移至硝酸纤维素薄膜, 50 g/L 脱脂奶粉的 1 $\times$ TBST 溶液室温封闭。第一抗体为磷酸化 p38MAPK mAb, 第二抗体为山羊抗小鼠 IgG-HRP。ECL 显色, 照片在 Fluors Mutilmager 图像分析仪 (BioRad 公司) 上用 Quantity One 4.1 版图像分析软件进行分析, 以相应蛋白条带的平均光密度值来表示 p38MAPK 磷酸化活化水平的相对强度。

**统计学处理** 所有数据以 mean  $\pm$  SD 表示。通过 SPSS 11.0 统计软件, 采用单因素方差分析对各组均数进行显著性检验,  $P < 0.05$  具有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平** SO 组血清 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平在 0, 3 h 及 6 h 无显著性变化, 均低于其他组 ( $P < 0.01$ ); SAP-NS 组及 SAP-CNI1493 组血清 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平随造模后时间的延长而逐渐升高, 其中 SAP-CNI1493 组各时间点 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平均显著低于 SAP-NS 组 ( $P < 0.01$ , 表 1)。

**2.2 胰腺组织病理学评分** SO 组胰腺组织结构清晰, 腺泡小叶完整、无坏死、间质水肿和炎症细胞浸润。SAP-NS 组 3 h 时间点胰腺组织可见间质水肿, 小叶间隙增大, 残余腺泡肿胀; 并可见片状出血坏死和腺泡小叶结构破坏, 坏死区周围有大量的嗜中性白细胞及单核细胞等炎症细胞浸润。SAP-CNI1493 组 3 h 时间点胰腺组织水肿、炎症、出血、坏死积分及总积分显著降低 ( $P < 0.01$  vs SAP-NS group, 表 2)。

**2.3 胰腺组织 p38MAPK 磷酸化** SO 组大鼠胰腺组织中检测到少量磷酸化 p38MAPK 的表达; SAP-NS 组造模后 15 min 磷酸化 p38MAPK 的表达即显著增高至峰值, 维持 3 h 后显著下降 ( $P < 0.05$ ), 6 h 时磷酸化 p38MAPK

表1 SAP大鼠血清 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  水平 (mean  $\pm$  SD, ng/L)

分组	TNF- $\alpha$			IL-1 $\beta$		
	0	3 h	6 h	0	3 h	6 h
SO	60.3 $\pm$ 15.2	65.8 $\pm$ 20.5	66.3 $\pm$ 21.2	90.3 $\pm$ 20.2	85.8 $\pm$ 25.5	95.3 $\pm$ 27.2
SAP-NS		286.5 $\pm$ 50.3 <sup>b</sup>	500.5 $\pm$ 45.3 <sup>b</sup>		293.8 $\pm$ 46.3 <sup>b</sup>	388.0 $\pm$ 44.5 <sup>b</sup>
SAP-CNI1493		188.4 $\pm$ 31.2	355.5 $\pm$ 40.2		200.6 $\pm$ 27.3	270.7 $\pm$ 31.8

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs SO, SAP-NS group.表2 SAP 3 h大鼠胰腺组织病理学积分 (mean  $\pm$  SD,  $n=5$ )

分组	水肿	炎症	出血	坏死	总积分
SAP-NS	3.3 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.2	9.9 $\pm$ 0.4
SAP-CNI1493	2.7 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	7.5 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs SAP-NS group.

的表达与SO组相似( $P>0.05$ ). 15 min及30 min时SAP-CNI1493组胰腺组织中磷酸化p38MAPK的表达显著低于SAP-NS组相应时间点( $P<0.01$ , 表3).

### 3 讨论

近年来丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路在SAP发病机制中的作用日益引起研究者的重视, 其中p38MAPK是最主要、研究最深入的MAPK家族成员之一, 在机体应激和炎症反应调控过程中有极其重要的作用<sup>[3-5]</sup>, p38MAPK信号转导通路可与NF- $\kappa$ B通路在下游聚合<sup>[6-8]</sup>, 调控TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、E-选择素的产生. p38MAPK的激活在急性胰腺炎(AP)发生、发展起着极其重要的作用, Wagner *et al* (Digestion 1999;60:41)在雨蛙素MAP模型上发现, 造模后胰腺细胞的p38MAPK活性迅速升高, 30 min时活性达到峰值, 120 min时p38MAPK降至基础活性. Dabrowski *et al*<sup>[9]</sup>发现活性氧(ROS)可以显著激活MAP胰腺腺泡细胞内p38MAPK.

目前对p38 MAPK在AP发病机制中作用的研究主要集中于MAP模型和离体胰腺炎模型上, 对于具有更重要意义的SAP还缺乏系统的研究. 我们利用SAP大鼠模型, 发现SO组胰腺组织中能检测到磷酸化p38MAPK的弱表达, 造模后15 min时p38MAPK的表达即显著

增高至峰值, 维持较高水平3 h后开始下降, 6 h时磷酸化p38MAPK的表达与SO组相似. SO组胰腺组织中存在磷酸化p38MAPK的基础表达, 说明p38MAPK信号转导通路可能参与调节胰腺腺泡细胞的基础生理活动, 是机体在基础应激状态下就活化的信号转导通路;造模后早期胰腺组织的p38MAPK即显著活化, 提示p38MAPK信号转导通路在SAP发病的过程中参与了炎症信号转导, 对SAP的发生、发展可能具有重要的意义;SAP病理过程中p38MAPK活化维持较高水平的时间, 而且贯穿于胰腺炎整个早期病理过程, 长于以往研究报道的MAP模型中的维持较高活化水平时间<sup>[1-2]</sup>, 从细胞信号转导水平上揭示了MAP和SAP发病机制可能存在差异. p38MAPK持续的激活可引起炎症细胞因子的不断产生, 而不断产生的炎症因子使炎症反应调控失衡导致级联“瀑布”效应, 并由此导致SIRS、MOF的发生<sup>[10]</sup>. 随着对p38MAPK信号转导通路病理生理功能及其在AP发病机制中作用研究的不断加深, 已经证实p38MAPK信号转导通路可以作为MAP时抗炎治疗的靶点, 抑制p38MAPK能够发挥有效的抗炎作用, 减少细胞因子、炎症递质等释放, 减轻胰腺腺泡细胞损伤, 明显提高动物的生存率, 并且未发现明显的毒副作用<sup>[11-13]</sup>. Blinman *et al*<sup>[14]</sup>发现, 体外胰腺炎时胰腺腺泡细胞p38MAPK活性明显升高, 并且与TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,

表3 SAP大鼠胰腺组织磷酸化p38MAPK Western blot光密度检测结果 (mean  $\pm$  SD,  $n=5$ )

分组	0	15 min	30 min	1 h	3 h	6 h
SO	1 200 $\pm$ 105	—	—	—	—	—
SAP-NS		5 200 $\pm$ 360 <sup>b</sup>	4 910 $\pm$ 320 <sup>b</sup>	4 300 $\pm$ 230 <sup>b</sup>	3 800 $\pm$ 120 <sup>b</sup>	1 300 $\pm$ 140
SAP-CNI1493		3 500 $\pm$ 250	2 500 $\pm$ 340	—	—	—

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs SO, SAP-NS group.

IL-6, IL-8, MCP-1 等多种细胞因子及趋化因子的产生有关, 而采用 p38MAPK 的抑制剂如 SB-203580 等能明显抑制上述细胞因子及趋化因子的产生, 抑制程度可达 70-95%, 并且抑制细胞因子及趋化因子的程度与抑制 p38MAPK 的程度成正比. 本研究结果提示 CNI-1493 能抑制炎症细胞因子 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  的过度产生, 因此 p38MAPK 的过度激活, 刺激炎症因子的过度激活可能是胰腺炎病理改变的一个重要机制. 本研究提示 p38MAPK 是 SAP 的发病机制中一条重要的信号转导通路, p38MAPK 抑制剂可能通过调控炎症递质和细胞因子的产生而减轻 SAP 的病理改变的严重程度. 但本研究只是一个预防性给药, 着眼点还是在于机制的研究, 而且在本实验中未能分多个时间点和不同剂量、不同用药途径进行研究, 与真正的药理学研究还有一定的差距. 最近 Ge *et al*<sup>[15]</sup> 发现并不是 MKK 的蛋白也能调控 MAPK 的激活, 而且对 p38MAPK 在 AP 中的作用还有矛盾的报道, 如 Fleischer *et al*<sup>[2]</sup> 的研究发现 p38MAPK 抑制剂 SB203580 干预后出现胰蛋白酶水平升高、病理学上出现 MAP 时不应该出现的明显腺泡细胞坏死. 由于 MAPK 在炎症性疾病中作用的确切的机制仍未清楚, 因此 p38MAPK 信号转导通路活化及其抑制剂对 SAP 作用的具体机制还有待进一步深入和完善.

#### 4 参考文献

- 1 Simeone DM, Zhang L, Graziano K, Nicke B, Pham T, Schaefer C, Logsdon CD. Smad4 mediates activation of mitogen-activated protein kinases by TGF- $\beta$  in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C311-C319
- 2 Fleischer F, Dabew R, Goke B, Wagner AC. Stress kinase inhibition modulates acute experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2002;8:259-265
- 3 Ren HB, Li ZS, Xu GM, Tu ZX, Shi XG, Jia YT, Gong YF. Dynamic changes of mitogen-activated protein kinase signal transduction in rats with severe acute pancreatitis. *Chin J Dig Dis* 2004;5:123-125
- 4 Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001;81:807-869
- 5 Arbabi S, Rosengart MR, Garcia I, Jelacic S, Maier RV. Priming interleukin 8 production: role of platelet-activating factor and p38. *Arch Surg* 1999;134:1348-1353
- 6 Clifton AD, Young PR, Cohen P. A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAPkinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett* 1996;392:209-214
- 7 Janknecht R, Hunter T. Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J* 1997;16:1620-1627
- 8 Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P, Fiers W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 1996;15:1914-1923
- 9 Dabrowski A, Boguslowicz C, Dabrowska M, Tribillo I, Gabryelewicz A. Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells. *Pancreas* 2000;21:376-384
- 10 O'Neill S, O'Neill AJ, Conroy E, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Altered caspase expression results in delayed neutrophil apoptosis in acute pancreatitis. *J Leukoc Biol* 2000;68:15-20
- 11 陈浩, 李非, 程韵枫, 孙家邦. 大鼠重症急性胰腺炎病情演变中中性粒细胞的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:776-779
- 12 Yan SR, Al-Hertani W, Byers D, Bortolussi R. Lipopolysaccharide-binding protein and CD14-dependent activation of mitogen-activated protein kinase p38 by lipopolysaccharide in human neutrophils is associated with priming of respiratory burst. *Infect Immun* 2002;70:4068-4074
- 13 English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:40-45
- 14 Blinman TA, Gukovsky I, Mouria M, Zaninovic V, Livingston E, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C1993-2003
- 15 Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 2002;295:1291-1294

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# MAGE-A1, -A4 基因在大肠肿瘤中的表达及临床意义

梁 锐, 王 芳, 王开昕, 高 倩, 王志强, 杨 耘

梁锐, 王芳, 高倩, 杨耘, 昆明医学院病理学教研室 云南省昆明市 650031  
王开昕, 广东医学院附属南山医院病理科 广东省深圳市 518052  
王志强, 昆明医学院第三附属医院肿瘤外科 云南省昆明市 650031  
梁锐, 女, 1978-10-02 生, 河南省平顶山市人, 汉族, 2001 年天津医科大学本科毕业, 2002 年昆明医学院硕博连读, 在读博士, 主要从事肿瘤侵袭和转移方面的研究。  
项目负责人: 王芳, 650031, 云南省昆明市人民西路 191 号, 昆明医学院病理学教研室. wangfang\_01@hotmail.com  
电话: 0871-5338845 传真: 0871-5711875  
收稿日期: 2004-12-07 接受日期: 2005-01-20

## Expression and Clinical Significance of MAGE-A1, -A4 Genes in Human Colorectal Neoplasms

Rui Liang, Fang Wang, Kai-Xin Wang, Qian Gao, Zhi-Qiang Wang, Yun Yang

Rui Liang, Fang Wang, Qian Gao, Yun Yang, Department of Pathology, Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China  
Kai-Xin Wang, Department of Pathology, Nanshan Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518052, Guangdong Province, China  
Zhi-Qiang Wang, Department of Surgical Oncology, the Third Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China  
Correspondence to: Dr. Fang Wang, Department of Pathology, Kunming Medical College, 191 Renming Xilu, Kunming 650031, Yunnan Province, China. wangfang\_01@hotmail.com  
Received: 2004-12-07 Accepted: 2005-01-20

## Abstract

**AIM:** To explore the expression and clinical significance of MAGE-A1, MAGE-A4 genes in human colorectal neoplasm.

**METHODS:** MAGE-A1, MAGE-A4 were detected by streptavidin-peroxidase (S-P) immunohistochemistry in 38 normal colorectal mucosal tissues, 31 colorectal adenoma tissues and 83 colorectal adenocarcinoma tissues.

**RESULTS:** MAGE-A1 was located in cytoplasm, whereas MAGE-A4 was observed in both cytoplasm and nucleus. While hardly detected in normal colorectal mucosal tissues, their expression was significantly increased in colorectal neoplasm tissues ( $P < 0.01$ ). However, there was no difference between colorectal adenoma and colorectal adenocarcinoma. The expression of both genes had no relationship with sex, age, histological type, recurrence and malignant transformation of colorectal adenoma, or histological grade, depth of wall invasion and liver metastasis of colorectal adenocarcinomas. However, the expres-

sion of both genes was significantly correlated with regional lymph node metastasis in colorectal adenocarcinoma ( $P_{A1} < 0.01$ ,  $r_{SA1} = 0.287$ ,  $P_{A4} < 0.01$ ,  $r_{SA4} = 0.312$ ). There was correlation between the expression of MAGE-A1 and MAGE-A4 in colorectal adenocarcinoma with regional lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ,  $r_s = 0.247$ ).

**CONCLUSION:** MAGE-A1 and -A4 genes may play important roles in the occurrence of colorectal neoplasm and the progression of colorectal adenocarcinoma, especially the lymph nodes metastasis. So they could be regarded as two molecular markers for early diagnosis of colorectal neoplasm as well as prediction of regional lymph node metastasis of colorectal adenocarcinoma.

**Key Words:** MAGE-A1; MAGE -A4; Colorectal neoplasm

Liang R, Wang F, Wang KX, Gao Q, Wang ZQ, Yang Y. Expression and Clinical Significance of MAGE-A1, -A4 Genes in Human Colorectal Neoplasms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(5):657-661

## 摘要

**目的:** 探讨 MAGE-A1, -A4 基因在大肠肿瘤中的表达及临床意义。

**方法:** 采用免疫组化 S-P 法, 检测正常人大肠黏膜 38 例, 大肠腺瘤 31 例, 大肠腺癌组织 83 例中 MAGE-A1, -A4 蛋白的表达和定位特点。

**结果:** MAGE-A1 蛋白定位于胞质, MAGE-A4 蛋白定位于胞质及胞核;二者在正常大肠黏膜组织中几乎均不表达, 在大肠肿瘤(大肠腺瘤、大肠腺癌)中均有较高水平的表达;但在大肠腺瘤与大肠腺癌中的表达差异均无显著性;二者在大肠腺瘤中的表达与患者的性别、年龄、组织学类型、是否复发及癌变之间差异均无显著性;二者在大肠腺癌中的表达均与患者的性别、年龄、组织学分级、侵袭深度、有无肝转移之间无统计学意义, 均与有无淋巴结转移之间有统计学意义( $P < 0.01$ ), 且均呈正相关关系( $P_{A1} < 0.01$ ,  $r_{SA1} = 0.287$ ;  $P_{A4} < 0.01$ ,  $r_{SA4} = 0.312$ )。在有淋巴结转移的大肠腺癌中, MAGE-A1 与 A4 蛋白表达呈正相关关系( $P < 0.05$ ,  $r_s = 0.247$ )。

**结论:** MAGE-A1, -A4 基因可能在大肠肿瘤的发生、发展(尤其是淋巴结转移)中起作用, 有望成为诊断大肠肿瘤及其发生淋巴结转移的分子生物学标记物之一。

**关键词:** MAGE-A1 基因; MAGE-A4 基因; 大肠肿瘤

梁锐, 王芳, 王开昕, 高倩, 王志强, 杨标. MAGE-A1, -A4 基因在大肠肿瘤中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2005;13(5):657-661  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/657.asp

## 0 引言

MAGE这个术语源于黑色素瘤抗原(Melanoma antigen-encoding), Van der Bruggen *et al*<sup>[1-2]</sup> 1987年在研究黑色素瘤时首次发现了 MAGE-1 抗原(MZ2-E). 随着研究的不断深入, 目前已找到 23 个 MAGE 家族成员, 他们均位于人 X 染色体上<sup>[3]</sup>. 根据其在染色体上分布的区域不同, 将 MAGE 家族分为 A, B, C, D, E, F 六个亚家族<sup>[4]</sup>. 其中, MAGE-A 亚家族包括 12 个成员, 均位于人染色体 Xq28. 大肠癌是常见的严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均较高. 尤其是近年, 由于人们饮食结构的变化, 其发病率正在逐渐增加<sup>[5-8]</sup>. 目前, 国内还未见在大样本大肠肿瘤组织中关于 MAGE 基因与肿瘤发生、发展(侵袭和转移)关系的研究报道, 尤其是大肠腺瘤, 国内外均未见报道. 为此, 我们采用免疫组化技术, 应用 MAGE-A1, -A4 蛋白在组织切片上高度特异的 mAb MA454 和 57B<sup>[9-12]</sup>, 检测人正常大肠黏膜、大肠腺瘤、大肠腺癌组织中二者的表达和定位特点, 探讨二者与大肠肿瘤发生、发展之间的关系, 以期进一步阐明大肠癌转移的分子生物学机制, 寻找早期预测大肠癌转移的分子生物学标记物, 为大肠癌的早期诊治提供一定的参考依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 昆明医学院病理学教研室和第三附属医院外科手术切除、大肠黏膜活检及尸体解剖中临床资料完整的存档蜡块 152 例. 其中, 正常大肠黏膜组织 38 例均取自有淋巴结转移大肠腺癌手术切除标本的切缘, 切缘经组织学观察证实没有癌组织浸润、没有腺瘤样结构; 大肠腺瘤 31 例均为内窥镜活检取出标本; 大肠癌标本 83 例均为大肠癌手术切除的腺癌标本, 包括无淋巴结转移 45 例和有淋巴结转移 38 例的腺癌标本, 其中大肠癌标本中剔除了黏液腺癌和印戒细胞癌, 所有患者术前均未进行放疗和化疗. 所有标本均经 40 g/L 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4  $\mu$ m 连续切片, 做常规 HE 染色, 两位病理学专家观察切片, 按照 2000 年 WHO 肠道肿瘤组织学分型标准对大肠肿瘤的诊断、分级进行修订, 诊断意见统一.

**1.2 方法** 免疫组化染色采用 S-P 法(链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法). mAb 57B 由瑞士 Spagnoli GC

教授惠赠<sup>[13]</sup>. 浓缩型 mAb MA454、即用型 Ultra Sensitive<sup>TM</sup>-S-P 试剂盒、液体 DAB 酶底物显色试剂盒、PBS 粉剂、1 mmol/L 的 EDTA 抗原修复液(pH 8.0)、10 mmol/L 的柠檬酸抗原修复液(pH 6.0)以及抗体稀释液均为美国 Maxin 公司产品, 购自福州迈新生物技术有限公司, 步骤按试剂盒说明进行. 一抗 MA454 按 1:400 浓度稀释, 抗原修复采用 EDTA 抗原热修复法(水浴法)<sup>[9-10, 14]</sup>; 57B 按 1:20 浓度稀释, 抗原修复采用柠檬酸缓冲液高温高压抗原修复法<sup>[14-17]</sup>. 每次实验均以人睾丸组织切片作阳性对照<sup>[18]</sup>, 以 PBS 代替一抗作阴性对照<sup>[19]</sup>, 每例均设有 HE 切片作对照观察. 请两位病理学专家双盲法观察组织切片, 采用半定量积分法<sup>[20-21]</sup>判断结果. 具体操作如下: 首先确定阳性定位, 然后按照下面的标准进行评分: (1) 阳性细胞数:  $\leq 5\%$  为 0 分, 6-25% 为 1 分, 26-50% 为 2 分, 51-75% 为 3 分,  $>76\%$  为 4 分; (2) 阳性强度: 无色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄色为 3 分. 将 (1) (2) 二者积分相乘, 0 分为阴性(-), 1-4 分为弱阳性(+), 5-8 分为阳性(++), 9-12 分为强阳性(+++), 若两位专家结果相差 3 分则重新判定.

**统计学处理** 应用 SPSS11.0 统计软件包, 计数资料采用 Nonparametric Tests 方法, 相关性分析采用 Correlate 中的 Bivariate 方法.

## 2 结果

**2.1 MAGE-A1, -A4 的表达和定位特点** MAGE-A1 蛋白表达的阳性信号定位于胞质; 在正常大肠黏膜组织中, 阳性信号为浅黄色细颗粒(图 1A); 在大肠腺瘤和腺癌组织中, 阳性信号均为黄色-棕黄色粗颗粒(图 1B-D). 而 MAGE-A4 蛋白主要定位于胞质, 偶伴有胞核着色(图 2A); 在正常大肠黏膜组织中, 阳性信号为淡黄色-黄色细颗粒(图 2B); 在大肠腺瘤和腺癌组织中, 阳性信号均为黄色-棕黄色粗颗粒(图 2C-E). MAGE-A1, -A4 在正常大肠黏膜和大肠肿瘤(大肠腺瘤、大肠腺癌)组织中的表达差异均有显著性( $P < 0.01$ ), 但在大肠良、恶性肿瘤中的表达差异均无统计学意义(图 3, 表 1).

表1 MAGE-A1, -A4 蛋白表达情况的比较(P值表)

蛋白	分组	正常大肠黏膜	大肠腺瘤	大肠腺癌
MAGE-A1	正常大肠黏膜	-	<sup>b</sup> $P < 0.01$	<sup>b</sup> $P < 0.01$
	大肠腺瘤	<sup>b</sup> $P < 0.01$	-	
	大肠腺癌	<sup>b</sup> $P < 0.01$		-
MAGE-A4	正常大肠黏膜	-	<sup>d</sup> $P < 0.01$	<sup>d</sup> $P < 0.01$
	大肠腺瘤	<sup>d</sup> $P < 0.01$	-	
	大肠腺癌	<sup>d</sup> $P < 0.01$		-

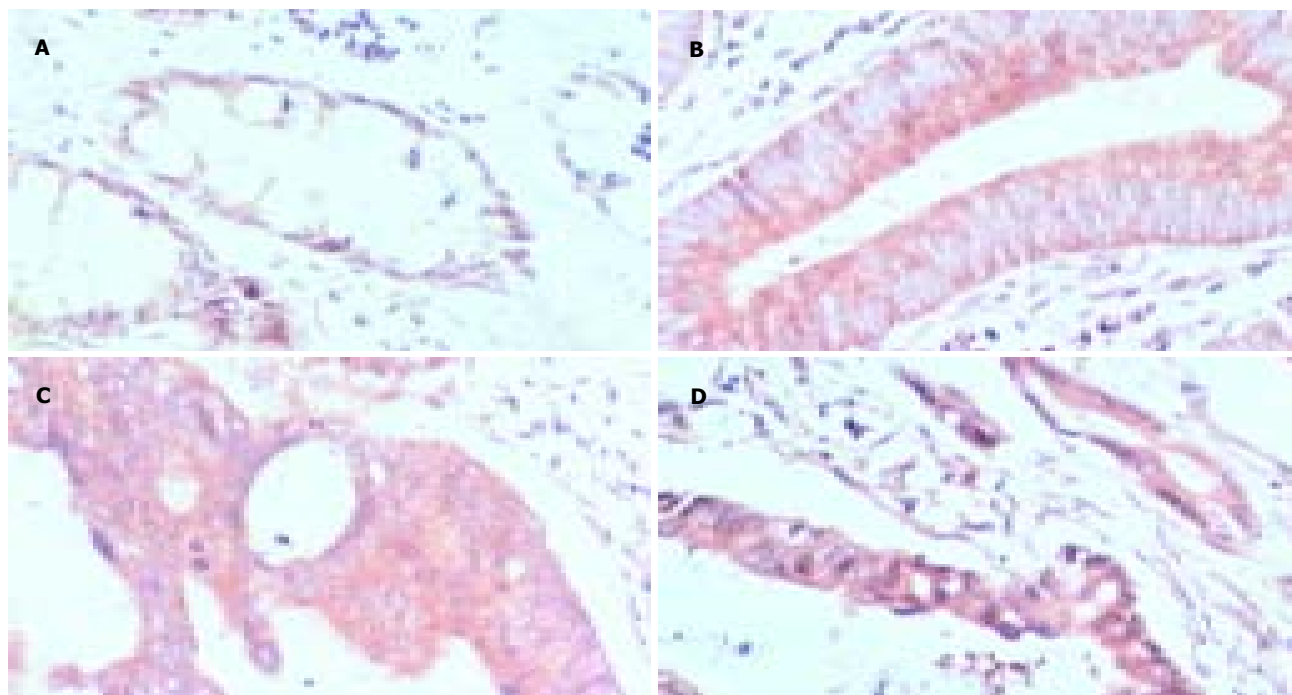


图1 MAGE-A1 蛋白在不同组织细胞胞质中的表达,S-P法, $\times 66$ . A: 正常大肠黏膜, 弱阳性(+); B: 大肠腺瘤, 阳性(++); C: 大肠腺瘤(无淋巴结转移), 阳性(++); D: 大肠腺瘤(有淋巴结转移), 强阳性(+++).

2.2 MAGE-A1, -A4 表达与大肠腺瘤临床病理学的关系 二者在大肠腺瘤中的表达均与患者的性别、年龄、组织学类型(管状、绒毛状、混合性腺瘤), 是否复发及癌变之间差异无统计学意义, 亦未见明显的相关性.

2.3 MAGE-A1, -A4 表达与大肠腺癌临床病理学的关系 二者在大肠腺癌中的表达均与患者的性别、年龄、组织学分级、侵袭深度、有无肝转移之间差异

无显著性, 但均与患者有无淋巴结转移之间差异有显著性( $P < 0.01$ ). 二者在大肠腺癌中的表达均与患者有无淋巴结转移呈正相关关系( $P_{A1} = 0.007$ ,  $r_{SA1} = 0.287$ ;  $P_{A4} = 0.003$ ,  $r_{SA4} = 0.312$ ), 而均与侵袭深度、有无肝转移之间无明显相关性(表2). 在有淋巴结转移的大肠腺癌中, MAGE-A1 与 A4 蛋白表达呈正相关关系( $P = 0.032$ ,  $r_s = 0.247$ , 表3).

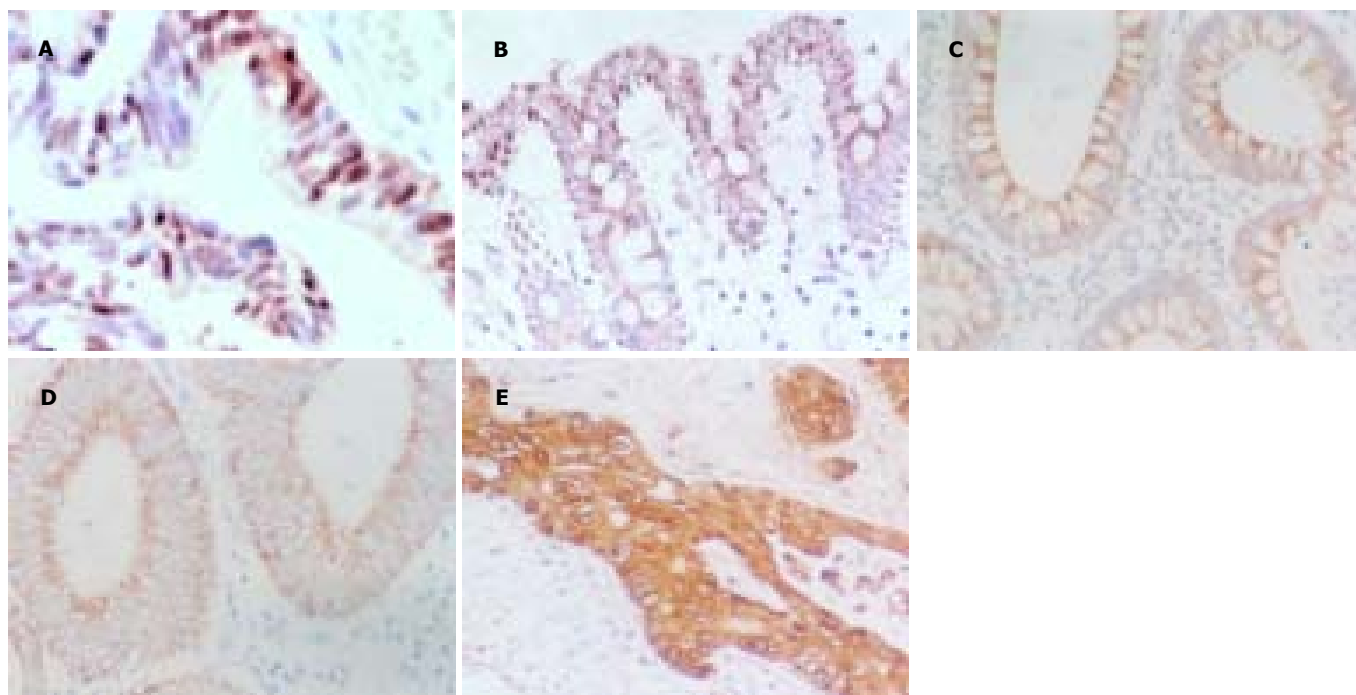


图2 MAGE-A4 蛋白在不同组织细胞中的表达 S-P法, A: 大肠腺瘤强阳性(+++), 定位于胞核和胞质,  $\times 132$ ; B: 正常大肠黏膜弱阳性(+)定位于胞质,  $\times 66$ ; C: 大肠腺瘤阳性(++), 定位于胞质,  $\times 66$ ; D: 大肠腺瘤(无淋巴结转移), 阳性(++), 定位于胞质,  $\times 66$ ; E: 大肠腺瘤(有淋巴结转移), 强阳性(+++), 定位于胞质及胞核,  $\times 66$ .

表2 MAGE-A1, -A4 蛋白表达与大肠腺癌侵袭、转移的相关性

比较项目	分组	MAGE-A1				<i>P</i> 值及 <i>r<sub>s</sub></i> 值	MAGE-A4				<i>P</i> 值及 <i>r<sub>s</sub></i> 值
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
侵袭深度	黏膜肌层以内	8	2	1	0	<sup>b</sup> <i>P</i> <0.01 <i>r<sub>s</sub></i> = 0.287	7	4	0	0	<sup>b</sup> <i>P</i> <0.01 <i>r<sub>s</sub></i> = 0.312
	黏膜肌层以外	54	9	8	1		44	19	3	6	
淋巴结转移	-	39	3	3	0	<sup>b</sup> <i>P</i> <0.01 <i>r<sub>s</sub></i> = 0.287	34	9	0	2	<sup>b</sup> <i>P</i> <0.01 <i>r<sub>s</sub></i> = 0.312
	+	23	8	6	1		17	14	3	4	
肝转移	-	49	9	6	1	<sup>b</sup> <i>P</i> <0.01 <i>r<sub>s</sub></i> = 0.287	41	17	1	6	<sup>b</sup> <i>P</i> <0.01 <i>r<sub>s</sub></i> = 0.312
	+	13	2	3	0		10	6	2	0	

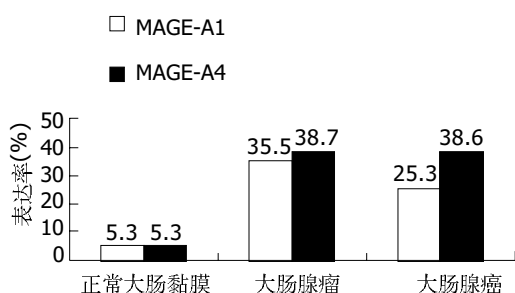


图3 MAGE-A1, -A4 在各组中的表达率.

### 3 讨论

MAGE-A1, -A4 基因均为 MAGE-A 亚家族的成员, 均定位于人染色体 Xq28. Dhodapkar *et al*<sup>[14]</sup> 的实验显示, MA454 的阳性信号定位于胞质; 57B 的阳性信号主要定位于胞质, 但也能见到胞核着色. 这一结果与我们实验中 MAGE-A1, -A4 蛋白的定位是一致的. 我们检测了 MAGE-A1, -A4 蛋白在 38 例正常大肠黏膜中的表达情况, 结果显示, 绝大多数标本不着色, 但有 2 例表现为 MA454 着色(+), 还有 2 例表现为 57B 着色(+). 这一结果与国内、外的报道均不一致, 许多文献显示, 除了睾丸组织和胎盘组织, MAGE-A 亚家族在正常组织中是不表达的, 而表达于以黑色素瘤为主的多种肿瘤组织中<sup>[11, 14, 22-24]</sup>. 考虑到我们实验中所选的 38 例正常大肠黏膜均取自有淋巴结转移的大肠腺癌手术切除标本的切缘, 我们认为产生这一差异的原因可能为这些着色(+)的标本已有癌变早期的改变(如癌肿局部区域的一些肿瘤相关分子的浓度发生了改变).

有关 MAGE-A1, -A4 在大肠腺瘤中的表达情况, 尚不曾见到国内、外文献中报道. 我们的实验显示, 二者在大肠腺瘤组织中均有较高的表达, 阳性率分别为 35.5%(11/31) 和 38.7%(12/31), 阳性信号均为黄色-棕黄色粗颗粒, 且二者在大肠腺瘤中的表达均与患者的性别、年龄、组织学类型、是否复发及癌变之间差异无统计学意义, 亦未见明显的相关性. 其表达与大肠腺瘤的预后没有相关性, 这与我们预期的

表3 MAGE-A1 与 A4 蛋白表达的相关性

蛋白表达	-	+	++	+++	<i>P</i> 值	<i>r<sub>s</sub></i> 值
MAGE-A1	23	8	6	1	<sup>a</sup> <i>P</i> <0.05	0.247
MAGE-A4	17	14	3	4		

<sup>a</sup>*P*<0.05.

设想不同, 其原因可能与样本例数不足, 存在部分失访等因素有关. Hasegawa *et al*<sup>[25]</sup> 对 80 例大肠癌标本进行 RT-PCR 研究, 发现 MAGE-A1-mRNA 的阳性率为 22.5%(18/80); Miyashiro *et al*<sup>[26]</sup> 的实验也发现 MAGE-A1-mRNA 在大肠癌组织中的表达率为 25%(3/12); 其结果与我们进行的免疫组化 MA454 的着色率 25.3%(21/83) 相一致. Park *et al*<sup>[27]</sup> 对 38 例大肠癌患者进行 RT-PCR 研究, 发现 MAGE-A4-mRNA 的阳性率为 15.8%(6/38), 其表达率低于我们进行的免疫组化 57B 的着色率 38.6%(32/83), 其原因可能与样本例数、检测方法的敏感性、mAb57B 对 MAGE-A4 的特异程度等因素有关. 总的来说, MAGE-A 亚家族的多数成员在黑色素瘤<sup>[15]</sup>、原发性肝癌<sup>[28]</sup>、食管癌<sup>[29-30]</sup>、小细胞肺癌<sup>[17, 30]</sup> 中的表达率要高于大肠癌.

我们的实验显示 MAGE-A1, -A4 在大肠腺瘤、大肠腺癌中均高表达, 且均在正常大肠黏膜中几乎不表达, 提示二者在大肠肿瘤的发生过程中具有一定的作用, 有可能作为大肠肿瘤发生的标记物. 我们的实验还表明, MAGE-A1, -A4 在大肠腺瘤中的表达与患者的年龄、性别、组织学分级、侵袭深度、肝转移之间的差异均无显著性, 但均与患者有无淋巴结转移之间的差异有统计学意义(*P*<0.01), 且均呈正相关关系(*P*<sub>A1</sub> = 0.007, *r<sub>sA1</sub>* = 0.287; *P*<sub>A4</sub> = 0.003, *r<sub>sA4</sub>* = 0.312); 提示二者在大肠腺瘤的转移中起重要作用, 有望成为大肠癌发生淋巴结转移的标记物. 此外, 在发生了淋巴结转移的大肠腺癌组织中, MAGE-A1 与 A4 蛋白表达呈正相关关系(*P* = 0.032, *r<sub>s</sub>* = 0.247), 提示二者在大肠腺癌淋巴结转移的过程中具有协同作用. 二者不仅有望用于大肠肿瘤及其转移的诊断, 其制备的肿瘤疫苗也有望用于大肠癌的免疫治疗<sup>[31]</sup>.

## 4 参考文献

- 1 徐建中, 林山. MAGE 基因与恶性肿瘤. 癌症 2003;22:1001-1004
- 2 梁锐, 王芳, 畅继武. MAGE 的研究现状及展望. 中国肿瘤临床 2004;31:1257-1260
- 3 Yakirevich E, Sabo E, Dirnfeld M, Sova Y, Spagnoli GC, Resnick MB. Morphometrical quantification of spermatogonial germ cells with the MA454 anti-MAGE-A4 antibody in the evaluation of testicular biopsies for Azoospermial. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003;11:37-44
- 4 马鸣, 俞莉章, 那彦群. 肿瘤特异性抗原 MAGE 基因的表达及意义. 国外医学泌尿系统分册 2003;23:526-529
- 5 方石岗, 杨继震, 杨帆. 消化道多原发恶性肿瘤 610 例的临床特点. 世界华人消化杂志 1999;7:812
- 6 郁宝铭, 赵任. 大肠癌分子生物学研究的现状. 世界华人消化杂志 1999;7:173-175
- 7 陈世耀, 吴同法, 刘厚钰, 王吉耀, 张善身, 张希德. 十年内镜检查分析. 世界华人消化杂志 1999;7:15-17
- 8 Wang Z, Wang F, Wang WQ, Gao Q, Wei WL, Yang Y, Wang GY. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm. *World J Gastroenterol* 2004;10:550-554
- 9 Jungbluth AA, Antonescu CR, Busam KJ, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Chen YT, Stockert E, Ladanyi M, Old LJ. Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen NY-ESO-1 but not MAGE-A1 or CT7. *Int J Cancer* 2001;94:252-256
- 10 Jungbluth AA, Stockert E, Chen YT, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Altork N, Busam KJ, Old LJ. Monoclonal antibody MA454 reveals a heterogeneous expression pattern of MAGE-A1 antigen in formalin-fixed paraffin embedded lung tumours. *Br J Cancer* 2000;83:493-497
- 11 Landry C, Brasseur F, Spagnoli GC, Marbaix E, Boon T, Coulie P, Godelaine D. Monoclonal antibody 57B stains tumor tissues that express gene MAGE-A4. *Int J Cancer* 2000;86:835-841
- 12 Rimoldi D, Salvi S, Schultz-Thater E, Spagnoli GC, Cerottini JC. Anti-MAGE-3 antibody 57B and Anti-MAGE-1 antibody 6C1 can be used to study different proteins of the MAGE-A family. *Int J Cancer* 2000;86:749-751
- 13 刘庆伦, 张昌卿, 冯凯涛. 非小细胞肺癌 MAGE-3 基因产物的表达. 中华肿瘤杂志 2002;22:138-140
- 14 Dhodapkar MV, Osman K, Teruya-Feldstein J, Filippa D, Hedvat CV, Iversen K, Kolb D, Geller MD, Hassoun H, Kewalramani T, Comenzo RL, Coplan K, Chen YT, Jungbluth AA. Expression of cancer/testes (CT) antigens MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A1, CT-7, and NY-ESO-1 in malignant gammopathies is heterogeneous and correlates with site, stage and risk status of disease. *Cancer Immun* 2003;3:9
- 15 Busam KJ, Iversen K, Berwick M, Spagnoli GC, Old LJ, Jungbluth AA. Immunoreactivity with the anti-MAGE antibody 57B in malignant melanoma: frequency of expression and correlation with prognostic parameters. *Mod Pathol* 2000;13:459-465
- 16 Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A. Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 2003;64:443-449
- 17 Bolli M, Kocher T, Adamina M, Guller U, Dalquen P, Haas P, Mirlacher M, Gambazzi F, Harder F, Heberer M, Sauter G, Spagnoli GC. Tissue microarray evaluation of Melanoma antigen E (MAGE) tumor-associated antigen expression: potential indications for specific immunotherapy and prognostic relevance in squamous cell lung carcinoma. *Ann Surg* 2002;236:785-793
- 18 Resnick MB, Sabo E, Kondratiev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E. Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int J Cancer* 2002;101:190-195
- 19 Kocher T, Zheng M, Bolli M, Simon R, Forster T, Schultz-Thater E, Remmel E, Noppen C, Schmid U, Ackermann D, Mihatsch MJ, Gasser T, Heberer M, Sauter G, Spagnoli GC. Prognostic relevance of MAGE-A4 tumor antigen expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a tissue microarray study. *Int J Cancer* 2002;100:702-705
- 20 曹立宇, 张洪福, 龚西, 孟刚. 大肠肿瘤中 p53 和 bcl-2 蛋白的表达. 临床与实验病理学杂志 2000;16:214-216
- 21 于雁, 毛银玲, 尚丽华. 大肠癌淋巴结微转移免疫组化检测与预后关系. 世界华人消化杂志 2004;12:2504-2506
- 22 Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Chen YT, Spagnoli GC, Old LJ. Expression of MAGE-antigen in normal tissues and cancer. *Int J Cancer* 2000;85:460-465
- 23 Sadanga N, Nagashima H, Mashino K, Tahara K, Yamaguchi H, Ohta M, Fujie T, Tanaka F, Inoue H, Takesako K, Akiyoshi T, Mori M. Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001;7:2277-2284
- 24 Schultz ES, Zhang Y, Knowles R, Tine J, Traversari C, Boon T, van der Bruggen P. A MAGE-3 peptide recognized on HLA-B35 and HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 2001;57:103-109
- 25 Hasegawa H, Mori M, Haraguchi M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Expression spectrum of melanoma antigen-encoding gene family members in colorectal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:551-554
- 26 Miyashiro I, Kuo C, Huynh K, Iida A, Morton D, Bilchik A, Giuliano A, Hoon DS. Molecular strategy for detecting metastatic cancer with use of multiple tumor-specific MAGE-A genes. *Clin Chem* 2001;47:505-512
- 27 Park MS, Park JW, Jeon CH, Lee KD, Chang HK. Expression of melanoma antigen-encoding genes(MAGE) by common primers for MAGE-A1 to -A6 in colorectal carcinomas among Koreans. *J Korean Med Sci* 2002;17:497-501
- 28 Zhao L, Mou DC, Leng XS, Peng JR, Wang WX, Huang L, Li S, Zhu JY. Expression of cancer-testis antigens in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:2034-2038
- 29 彭良平, 刘海燕, 冉宇靓, 王贵齐, 杨治华. MAGE-3 基因的表达检测和重组 MAGE 抗原的制备及其应用. 免疫学杂志 2002;18:107-111
- 30 Weiser TS, Ohnmacht GA, Guo ZS, Fischette MR, Chen GA, Hong JA, Nguyen DM, Schrupp DS. Induction of MAGE-3 expression in lung and esophageal cancer cells. *Ann Thorac Surg* 2001;71:295-301
- 31 Xiao J, Chen HS. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol* 2004;10:1849-1853

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# DC-SIGN与微生物感染研究进展

李 军, 冯志华

李军, 冯志华, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院 陕西省西安市 710038  
国家自然科学基金资助课题, No. 30170822  
项目负责人: 冯志华, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院. fengzh@fmmu.edu.cn  
电话: 029-83377165  
收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-01-20

## 摘要

树突状细胞(DC)在抵御病原体的过程中至关重要.然而,近来的研究表明,一些病原体破坏了DC的功能以逃脱免疫监视.许多细胞表面分子与病毒包膜糖蛋白结合后并不介导病毒抗原的加工和呈递,相反,他们可作为捕获受体将病毒颗粒传递给靶器官或敏感细胞.HIV-1就可与DC特异的C型凝集素DC-SIGN(DC specific intercellular-adhesion-molecule-3 grabbing nonintegrin, 树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3结合非整合素因子;即CD209)结合,“绑架”C,感染宿主.DC-SIGN除了可与HIV-1、HCV结合外,还可与其他多种病原体结合.对病原体和DC-SIGN的相互作用以及对DC功能的进一步研究,必将有助于抗感染的治疗.本文就DC-SIGN与微生物感染的研究进展作一综述.

李军, 冯志华. DC-SIGN与微生物感染研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13(5):662-666  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/662.asp>

## 0 引言

树突状细胞(DC)在抵御病原体的过程中至关重要.然而,越来越多的证据表明,一些病原体破坏了DC的功能以逃脱免疫监视.许多细胞表面分子与病毒包膜糖蛋白结合后并不介导病毒抗原的加工和呈递,相反,他们可作为捕获受体将病毒颗粒传递给靶器官或敏感细胞.HIV-1就可与DC特异的C型凝集素DC-SIGN(DC specific intercellular-adhesion-molecule-3 grabbing nonintegrin, 树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3结合非整合素因子;即CD209)结合,“绑架”DC,感染宿主.HIV-1与DC-SIGN结合后可不被加工呈递,且易于被传递到淋巴组织,并促进了病毒对T细胞的感染.DC-SIGN还和另外一种C型凝集素L-SIGN与丙肝病毒(HCV)包膜糖蛋白E2特异性结合,捕获病毒,继而将病毒有效“传递”给邻近的肝细胞.近来的研究证明,DC-SIGN为广谱的病原受体,除了可与HIV-1、HCV结合外,还可与其他多种病原体结合.对病原体和DC-SIGN的相互作用以及对DC功能的进一步研究,必将有助于抗感染的治疗.

## 1 树突状细胞通过特异性的受体识别病原体

未成熟的DC通过保守序列的识别受体与病原体相互作用

用,识别微生物的碳水化合物、脂质体和核酸内的典型分子排列<sup>[1]</sup>.此类受体包括类Toll受体(TLR)<sup>[2-3]</sup>和C型凝集素<sup>[4]</sup>.TLR通过细胞内信号级联放大作用,将相互作用病原体的信号传递至DC,从而引起细胞内相应的过程,如DC的成熟和抗炎细胞因子的诱导<sup>[1-2]</sup>;与此相反,C型凝集素是通过病原体的碳水化合物结构识别病原体,并将其内化,然后完成抗原的呈递和表达<sup>[5-6]</sup>.一些病原微生物可通过扰乱该模式识别受体的功能,使其生存方式得以进化,继而逃脱宿主抗微生物反应.因此,我们有必要研究病原微生物与此类受体的相互作用机制,以制定抗感染的策略.例如,DC特异性C型凝集素DC-SIGN就促进了人们对HIV-1破坏DC功能从而感染宿主机制的了解.DC-SIGN也可作为其他许多病原体的受体,包括丙肝病毒(HCV)<sup>[7]</sup>,巨细胞病毒(CMV)<sup>[8]</sup>,Ebola病毒<sup>[9]</sup>,SARS冠状病毒(SARS-CoV)<sup>[10]</sup>,幽门螺旋杆菌<sup>[11]</sup>,肺结核分枝杆菌<sup>[12]</sup>,利什曼原虫<sup>[13]</sup>和曼氏血吸虫<sup>[14]</sup>等.越来越清楚的证据表明,除了HIV-1以外,其他的病原体也以DC-SIGN为作用目标,逃避宿主免疫反应,达到生存的目的.

## 2 树突状细胞上的多功能C型凝集素DC-SIGN

DC-SIGN是一种黏附受体,对DC某些功能的发挥很重要<sup>[15]</sup>.例如,DC-SIGN可与其配体—细胞间黏附分子2(ICAM-2)结合,该配体表达于血管和淋巴管内皮上.DC-SIGN与ICAM-2的相互作用可聚集DC并实现DC的跨膜转移,这对补充DC至炎症位置以及随后DC向淋巴组织的转移可能至关重要<sup>[16]</sup>.外周组织及淋巴细胞DC上DC-SIGN的大量表达支持这种观点<sup>[17-19]</sup>.血液中DC-SIGN<sup>+</sup>DC前体的存在提示,这些前体细胞随时准备离开血液到达炎症部位,且能快速补充,在炎症部位发挥其免疫监视的作用<sup>[16, 18]</sup>.

DC-SIGN还可启动DC与幼稚T细胞的相互作用,这种功能通过DC-SIGN结合另外一种细胞配体ICAM-3<sup>[18]</sup>而实现,该配体在幼稚T细胞表面高水平表达.初始的DC-SIGN与ICAM-3的相互作用稳定了DC与T细胞胞膜的接触,从而完成T细胞与受体的衔接<sup>[18]</sup>.DC-SIGN与其细胞配体ICAM-2和ICAM-3的相互作用由N关联的糖基化介导<sup>[20]</sup>,且取决于细胞的特异性表达及活化状态.DC-SIGN也可作为抗原的受体将捕获的抗原呈递给溶酶体,在溶酶体内,抗原被加工并与MHC II类分子结合,继而呈递给T细胞<sup>[6]</sup>.

## 3 HIV借助DC-SIGN进入树突状细胞

目前,HIV越来越受到人们的关注,HIV致病机制也研

究较多. HIV-1 要感染宿主, 必须由感染的部位转移至淋巴组织, 只有这样, 病毒才能在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中复制. 此时, 未成熟 DC 充当了“传递者”, 他在感染部位捕获 HIV-1 然后将其转运至淋巴组织. 在淋巴组织中, DC 结合的 HIV-1 可被有效的传递给 CD4<sup>+</sup>T 细胞<sup>[21-22]</sup>. 在此过程中, DC-SIGN 扮演了很重要的角色, 他主要通过 HIV-1 包膜糖蛋白 gp120 的高亲和力作用捕获 HIV-1<sup>[17]</sup>. 然而, DC-SIGN 并不是促进 HIV-1 对 DC 的感染, 而是保护病毒不被降解. 结合 DC-SIGN 的 HIV-1 即可被传递至易感的 CD4<sup>+</sup>T 细胞. 已有实验表明, 结合 HIV 的 DC 与 CD4<sup>+</sup>T 细胞共培养后, 有大量的 T 细胞受染<sup>[17]</sup>. 除了可传递 HIV-1, DC-SIGN 还可增强病毒对 T 细胞的感染: 低病毒滴度时, 如果没有 DC 以反式作用方式的协助, 就检测不到感染的 T 细胞. 这提示, 当 HIV-1 浓度较低 (如在体内感染的早期) 时, DC-SIGN 的存在对病毒快速有效的感染 T 细胞至关重要.

HIV-1 感染过程中 DC-SIGN 功能的相关知识主要从体外模型获得. 现在, 灵长类模型越来越受到关注. 例如, 恒河猴短尾猿 DC-SIGN 与人 DC-SIGN 具有很高的同源性, 并且可以作为 HIV-1 的反式作用受体, 这与人 DC-SIGN 作用方式相同<sup>[23-25]</sup>. 此外, 灵长类同源体可在淋巴组织如淋巴结中大量地表达, 在 HIV-1 性传播过程中还可大量表达于黏膜组织<sup>[23-26]</sup>, 这点也与人类相同. 这就提示, 在 HIV 感染过程中, 用灵长类模型可以进一步研究 DC-SIGN 在病毒传递和病理改变过程中的功能.

DC-SIGN 在 HIV-1 传递过程中的功能首先在体外实验中证明<sup>[17]</sup>, 但近期发现, 血液中新鲜分离的 DC-SIGN<sup>+</sup>DC 前体细胞可有效传递 HIV-1 到 T 细胞<sup>[18]</sup>. 在 HIV-1 经血液传播后, 这些前体细胞可能对 HIV-1 的传递发挥了重要的作用, 当然, 在 HIV-1 经性传播途径感染机体时, 黏膜组织的 DC-SIGN<sup>+</sup>DC 作用更明显<sup>[15]</sup>. DC-SIGN 可与 HIV-1、HIV-2 和猴免疫缺陷病毒 (SIV) 的包膜糖蛋白结合, 这些病毒都是巨噬细胞和 T 细胞易感的, 提示 DC-SIGN 可能为慢病毒的通用受体<sup>[17, 27]</sup>. DC-SIGN 很可能识别 gp120 上的高甘露糖结构<sup>[28]</sup>, 但是并不能排除蛋白与蛋白相互作用的参与<sup>[20]</sup>. 我们有必要做更多的研究以确定 DC-SIGN 与 HIV-1 上 gp120 的作用位点, 这对疫苗的研究可能会有帮助.

除了 DC-SIGN 外, DC 还表达许多其他的 C 型凝集素, 有一些也能与 HIV-1 的 gp120 结合<sup>[29]</sup>. 然而, 到目前为止, 还没有发现其他的 C 型凝集素可以反式传递 HIV-1. 有实验进一步的证明了 DC-SIGN 的这一独特功能, 虽然血液中 DC-SIGN<sup>+</sup>DC 可将 HIV-1 传递给 T 细胞, 但 DC-SIGN<sup>-</sup>DC 却不能<sup>[18]</sup>, 尽管 DC-SIGN<sup>-</sup>DC 可以表达其他的 C 型凝集素来结合 HIV-1<sup>[30]</sup>. 当然, 在 HIV-1 病理过程中, 这些可与 HIV-1 结合的 C 型凝集素可能有其他的作用: 在有效的抗原呈递过程中, 假如 DC 能够捕获并将 HIV-1 呈递给 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 那么这些凝集素可能是捕获和加工 HIV-1 所必需的.

#### 4 树突状细胞:HIV-1 感染机体的双刃剑

与 DC-SIGN 结合的配体尽管被内化并呈递给溶酶体<sup>[6]</sup>, 但是与 DC-SIGN 结合的 HIV-1 病毒颗粒却相当的稳定, 并保持了长久的感染性<sup>[17]</sup>. DC-SIGN 结合的 HIV-1 可能“隐藏”在细胞内, 位于细胞膜附近, 不被降解. 此时, 病毒被内化入非溶酶体酸性细胞器, 这一过程增强了 DC-SIGN 介导的病毒对 T 细胞的感染<sup>[35]</sup>. 有两种途径可以消除 DC-SIGN 对病毒感染 T 细胞的顺式增强作用, 或令细胞内含 HIV-1 部分的 pH 值中性化, 或去除 DC-SIGN 胞质内尾部以阻止病毒内化<sup>[31]</sup>. 至于完整的病毒以及其他内化的 DC-SIGN 配体是如何逃脱溶酶体的降解, 他们是如何保护自身不受细胞的加工, 目前仍不清楚.

有人推测, DC 也可能被 HIV-1 感染<sup>[32]</sup>, 尽管这种感染不像 T 细胞被感染那么明显, 但 HIV-1 感染 DC 后, 通过 HIV-1 Nef 蛋白打乱了其在 DC-SIGN 内的转运, 降低了 DC-SIGN 对病毒的内化, 增加了其在细胞表面的表达, 从而促进了细胞黏附性的增加, 加快了病毒向 T 细胞的传递<sup>[33]</sup>.

DC-SIGN 是如何通过其 CD4- 化学因子- 受体复合物增强了病毒对细胞的感染, 目前也不清楚. 有可能是 HIV-1 gp120 与 DC-SIGN 结合后诱导病毒包膜糖蛋白发生构象变化, 使其与 CD4 和 / 或化学因子受体能进行更有效的作用, 从而促进了其与 T 细胞膜的融合. 还有一种说法认为, 病毒颗粒与 DC-SIGN 结合后可能聚集于 DC 的表面, 这样就增加了病毒与靶细胞表面 CD4 共受体复合物结合的可能性, 从而增加了入侵细胞的机率. DC-SIGN 增强病毒感染 T 细胞能力的确切分子机制, 还有待进一步深入研究.

#### 5 DC-SIGN 介导丙肝病毒转染肝细胞

HCV 也可能利用 DC-SIGN 将树突状细胞作为转运体, 从而确保感染的进行<sup>[34]</sup>. DC-SIGN 主要表达于髓系树突状细胞<sup>[19, 35-37]</sup>, 在肝脏枯否细胞中也可检测到 DC-SIGN<sup>[34]</sup>, 枯否细胞是肝脏稳定的巨噬细胞, 与肝细胞及 LSEC (Liver sinusoidal endothelial cells) 相邻. 浆细胞源的 DC 可转移到肝脏中, 肝脏内已检测到 DC-SIGN 阳性的细胞<sup>[35-36]</sup>. 更有研究证明, 重组的可溶性 E2 蛋白, 患者体内的 HCV 病毒, 以及 HCV 包膜糖蛋白包装的假型逆转录病毒均可与 DC-SIGN 和 L-SIGN 特异性结合<sup>[38-40]</sup>. 抗 DC-SIGN 和抗 L-SIGN 的单抗以及甘露糖均可抑制 DC 对可溶性 E2 和 HCV 的捕获<sup>[41]</sup>. DC 通过易位作用从血液穿过 LSEC 到达肝细胞, 从而浓集感染性病毒颗粒并使其与易感的肝细胞直接接触, 于是就将 HCV 传递给肝细胞<sup>[6]</sup>. 这些都支持 SIGN 分子与 HCV 作用的特异性.

#### 6 DC-SIGN 也作为其他病毒的受体

Alvarez *et al*<sup>[9]</sup>证明 DC-SIGN 也可作为 Ebola 病毒的入侵因子, 该病毒为致命的病原体, 可引起出血热的爆发. 未成熟 DC 可捕获 Ebola 假型病毒颗粒, 并能将病毒传递给易感的细胞. Ebola 病毒的初级靶细胞表面表达

DC-SIGN, 这提示DC-SIGN可能参与了Ebola病毒的早期感染过程<sup>[9, 42]</sup>. Simmons *et al*<sup>[43]</sup>的实验也证明, C型凝集素DC-SIGN和DC-SIGNR(L-SIGN)极易与Ebola病毒糖蛋白结合, 并且能大量增强假型Ebola病毒对初始细胞的转导, 增强可复制Ebola病毒对靶细胞的感染.

与HIV-1相同, DC-SIGN还可作为人巨细胞病毒的受体<sup>[8]</sup>, 通过DC-SIGN捕获巨细胞病毒, 保护病毒不被降解, 继而传递给靶细胞. 但巨细胞病毒还可通过DC-SIGN感染DC<sup>[8]</sup>, 巨细胞感染DC后改变了DC功能, 即细胞的抗原呈递功能和分化能力降低<sup>[44-45]</sup>.

此外, 骨髓源性DC也可与严重急性呼吸窘迫综合征冠状病毒(SARS-CoV)的spike(S)病毒包膜蛋白相互作用, 从而与病毒结合. 在该过程中, S蛋白很可能是与DC上的DC-SIGN结合<sup>[10]</sup>.

总之, 除了HIV-1、HCV以外, 其他病毒也可与DC-SIGN特异性结合, 利用DCs促进病毒对机体的感染.

## 7 DC-SIGN通过分枝杆菌的甘露糖帽捕获细菌

其他非病毒病原体也可与DC-SIGN结合感染DC<sup>[11-14]</sup>, 这些病原体通过不同的机制破坏DC-SIGN的功能以逃脱免疫监视, 这点需引起我们的重视.

DC-SIGN与含甘露糖的碳水化合物具有很高的亲和力<sup>[46]</sup>, 这在很多病原体上都得到了印证. 结核杆菌是全球危害人类健康的主要病原体之一, 相关研究也相对较多. 在细菌感染过程中, 免疫抑制是其主要问题. 尽管巨噬细胞是分枝杆菌感染的主要靶细胞, 但DC是细胞免疫反应的重要组成部分, 结核杆菌可调控DC的功能<sup>[12, 47]</sup>.

通过对该碳水化合物特异性的详细研究, 发现DC-SIGN与结核杆菌和**bovis**卡介苗的结合力很高, 他们的细胞壁上有含阿拉伯脂甘露糖(ManLAM)的甘露糖帽, 结合过程就是通过ManLAM完成的<sup>[12]</sup>, 无ManLAM的分枝杆菌菌株如减毒**smegmatis**分枝杆菌则不会与DC-SIGN结合.

DC-SIGN是DC表面的分枝杆菌的主要受体<sup>[12, 47]</sup>. 未成熟DC同时还表达高水平的甘露糖受体(MR)、CD11b和CD11c, 这些受体均可借助巨噬细胞介导DC与分枝杆菌的结合<sup>[48-49]</sup>. DC-SIGN特异性抗体可抑制DC与**bovis**卡介苗的ManLAM结合, 抑制程度在80%以上, MR特异性抗体无此抑制作用<sup>[12]</sup>. 至于DC-SIGN结合的分枝杆菌内化后如何逃脱了溶酶体降解途径, 进而大量感染人DC<sup>[50]</sup>, 尚需进一步研究.

## 8 分枝杆菌利用DC-SIGN抑制DC功能

DC表达的多种C型凝集素捕获并内化病原体, 再通过信号的传递特别是TLR信号影响免疫反应<sup>[51]</sup>. 病原体可能通过扰乱TLR信号传递, 进而调控DC依赖的免疫反应. 事实上, 分枝杆菌的ManLAM与未成熟DC结合后阻断了脂质体(LPS)介导的细胞成熟和IL-12的分泌<sup>[51]</sup>. LPS介导的细胞成熟是通过TLR4完成的, 因此, 很可能ManLAM

与未成熟DC的结合影响了TLR4的信号传递<sup>[52]</sup>. 此外, ManLAM由感染结核杆菌的巨噬细胞分泌<sup>[53-54]</sup>, 提示分枝杆菌可能特异性的分泌ManLAM干扰DC诱导的免疫反应.

甘露糖受体(MR)作为C型凝集素可与ManLAM结合<sup>[51]</sup>. 然而, 近来有实验证明, ManLAM降低了LPS介导的DC的成熟, 但事先用特异性抗体阻断DC-SIGN与ManLAM的相互作用后, 细胞成熟过程可完全恢复, 提示ManLAM通过与DC-SIGN相互作用抑制了LPS介导的DC的成熟<sup>[12]</sup>.

DC与ManLAM结合后, 干扰了DC的成熟信号, 诱导LPS活化的DC产生抗炎细胞因子IL-10<sup>[12]</sup>. DC成熟的抑制和IL-10的诱导可能增强了分枝杆菌的毒力; 未成熟的DC或IL-10处理的DC不仅刺激T细胞反应的能力降低, 而且诱导机体形成了抗原特异性耐受<sup>[55]</sup>. 因此, DC-SIGN完成的病原体识别可以调控DC介导的免疫反应, 这转换了免疫活化与缺陷之间的平衡, 从而增加了病原体存活的可能性.

## 9 DC-SIGN可能是病原体逃脱宿主免疫监视的普遍靶位

DC-SIGN可与几种含甘露糖的复合糖结合<sup>[47, 56]</sup>, 也可与含岩藻糖的Lewis血液组抗原结合(Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, Le<sup>a</sup>和Le<sup>b</sup>)<sup>[11]</sup>. DC-SIGN的碳水化合物特异性造成了DC-SIGN对大量病原体的识别模式<sup>[8-9, 12-13, 47]</sup>(表1). DC-SIGN可作为利什曼原虫的受体<sup>[13]</sup>, 这可能是通过甘露糖帽的表面磷酸脂多糖(LPG)实现的, 还可以作为Le<sup>x</sup>阳性病原体的受体, 如幽门螺旋杆菌<sup>[11]</sup>的脂多糖(LPS)和曼氏裂体吸虫的可溶性卵抗原(SEA)<sup>[14]</sup>. 这些病原体的共同特征是它们都能引起终生的慢性感染, 操纵Th1-Th2的平衡是维持其持久性的关键. 实现Th1到Th2的转换对墨西哥利什曼原虫的毒力和寿命至关重要<sup>[11]</sup>. 同样, Th2介导的针对曼氏裂体吸虫的免疫反应与病原体的持久性关系密切, SEA和其主要的聚糖抗原Le<sup>x</sup>可以引起Th1和Th2的转换<sup>[57]</sup>. 因此, 这些病原体很可能不只是通过DC-SIGN感染DC, 而且还操纵Th1-Th2的平衡以维持其持久性. 事实上, 对分枝杆菌的近期研究提示, 某些病原体可能特异性的与DC-SIGN结合以抑制DC的功能和调控免疫反应<sup>[12]</sup>. 当然, 在抗原加工和呈递的过程中, DC-SIGN对捕获和内化这些病原体也很重要.

表1 DC-SIGN识别的各种病原体

	病原体	DC-SIGN配体
病 毒	HIV-1	gp120
	HCV	E1 E2
	CMV	gB
	Ebola	GP
	SARS-CoV	S
细 菌	分枝杆菌菌株	ManLAM
	幽门螺旋杆菌	LPS
寄 生 虫	利什曼原虫	LPG
	曼氏裂体吸虫	SEA

CMV: 巨细胞病毒; SARS-CoV: 严重急性呼吸窘迫综合征冠状病毒; gB: 糖蛋白B; GP: 糖蛋白; S: spike糖蛋白; ManLAM: 阿拉伯脂甘露糖; LPS: 脂多糖; LPG: 磷酸脂多糖; SEA: 可溶性卵抗原.

## 10 结论

越来越多的证据表明, DC-SIGN 是 DC 上的病原受体, 可能参与了各种感染性病原体的传递及其引起的免疫抑制(表 1)。病毒结合 DC-SIGN 主要用于传递, 而非病毒病原体如分枝杆菌结合 DC-SIGN 主要是依赖分泌可溶性因子如 ManLAM 来调控 DC 介导的免疫活化。希望以后的研究能证实是否非病毒病原体也借助 DC-SIGN 来传递, 而病毒如 HIV-1 也借助 DC-SIGN 来抑制 DC 的功能。CMV 和 HIV-1 感染机体过程中的免疫抑制特征提示, 免疫调控的机制可能存在。事实上, 病毒包膜糖蛋白的脱落也反映了 ManLAM 的分泌, 提示病毒可能干涉 DC 的功能。

相反, 其他病原体被 DC-SIGN 捕获后即被加工并完成抗原呈递, 更利于抗病原体的有效免疫反应的产生<sup>[5]</sup>。研究鼠同源 DC-SIGN 在体内作为病原体受体捕获血源性抗原的功能<sup>[58]</sup>, 进一步研究鼠同源 DC-SIGN 的功能<sup>[59]</sup>, 都会有助于确定 DC-SIGN 在体内的重要性。DC-SIGN 可能不仅将成为抗 HIV-1、HCV 等病毒感染的主要切入点, 而且也将成为其他病原体的治疗方向。

## 11 参考文献

- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216
- Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002;14:103-110
- Thoma-Uzynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 2001;291:1544-1547
- Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 1998;163:19-34
- Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:77-84
- Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V, van Kooyk Y. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 2002;168:2118-2126
- Kudo S, Matsuno K, Ezaki T, Ogawa M. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med* 1997;185:777-784
- Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houles C, Fieschi F, Arenzana-Seisdedos F, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 2002;17:653-664
- Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muniz O, Corbi AL, Delgado R. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* 2002;76:6841-6844
- Yang ZY, Huang Y, Ganesh L, Leung K, Kong WP, Schwartz O, Subbarao K, Nabel GJ. pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *J Virol* 2004;78:5642-5650
- Appelmek BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* 2003;170:1635-1639
- Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmek B, Van Kooyk Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* 2003;197:7-17
- Colmenares M, Puig-Kroger A, Pello OM, Corbi AL, Rivas L. Dendritic cell(DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin(DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for Leishmania amastigotes. *J Biol Chem* 2002;277:36766-36769
- van Die I, van Vliet SJ, Nyame AK, Cummings RD, Bank CM, Appelmek B, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis-x. *Glycobiology* 2003;13:471-478
- Geijtenbeek TB, Engering A, Van Kooyk Y. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J Leukoc Biol* 2002;71:921-931
- Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, Alon R, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 2000;1:353-357
- Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000;100:587-597
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000;100:575-585
- Jameson B, Baribaud F, Pohlmann S, Ghavimi D, Mortari F, Doms RW, Iwasaki A. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J Virol* 2002;76:1866-1875
- Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, van Kooyk Y. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem* 2002;277:11314-11320
- Fantuzzi L, Purificato C, Donato K, Belardelli F, Gessani S. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J Virol* 2004;78:9763-9772
- Arrighi JF, Pion M, Garcia E, Escola JM, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB, Piguet V. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* 2004;200:1279-1288
- Baribaud F, Pohlmann S, Sparwasser T, Kimata MT, Choi YK, Haggarty BS, Ahmad N, Macfarlan T, Edwards TG, Leslie GJ, Arnason J, Reinhart TA, Kimata JT, Littman DR, Hoxie JA, Doms RW. Functional and antigenic characterization of human, rhesus macaque, pigtailed macaque, and murine DC-SIGN. *J Virol* 2001;75:10281-10289
- Geijtenbeek TB, Koopman G, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, van Schijndel AC, Engering A, Heeney JL, van Kooyk Y. Rhesus macaque and chimpanzee DC-SIGN act as HIV/SIV gp120 trans-receptors, similar to human DC-SIGN. *Immunol Lett* 2001;79:101-107
- Yu Kimata MT, Cella M, Biggins JE, Rorex C, White R, Hicks S, Wilson JM, Patel PG, Allan JS, Colonna M, Kimata JT. Capture and transfer of simian immunodeficiency virus by macaque dendritic cells is enhanced by DC-SIGN. *J Virol* 2002;76:11827-11836
- Schwartz AJ, Alvarez X, Lackner AA. Distribution and immunophenotype of DC-SIGN-expressing cells in SIV-infected and uninfected macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1021-1029
- Pohlmann S, Baribaud F, Lee B, Leslie GJ, Sanchez MD, Hiebenthal-Millow K, Munch J, Kirchhoff F, Doms RW. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 2001;75:4664-4672

- 28 Hong PW, Flummerfelt KB, de Parseval A, Gurney K, Elder JH, Lee B. Human immunodeficiency virus envelope(gp120) binding to DC-SIGN and primary dendritic cells is carbohydrate dependent but does not involve 2G12 or cyanovirin binding sites: implications for structural analyses of gp120-DC-SIGN binding. *J Virol* 2002;76:12855-12865
- 29 Weissman D, Fauci AS. Role of dendritic cells in immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:358-367
- 30 Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, Doms RW, Cunningham AL. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol* 2002;3:975-983
- 31 Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 2002;16:135-144
- 32 Granelli-Piperno A, Finkel V, Delgado E, Steinman RM. Virus replication begins in dendritic cells during the transmission of HIV-1 from mature dendritic cells to T cells. *Curr Biol* 1999;9: 21-29
- 33 Sol-Foulon N, Moris A, Nobile C, Boccaccio C, Engering A, Abastado JP, Heard JM, van Kooyk Y, Schwartz O. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity* 2002; 16:145-155
- 34 Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Cosset FL, Altmeyer R. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 2004;279:32035-32045
- 35 Pohlmann S, Soilleux EJ, Baribaud F, Leslie GJ, Morris LS, Trowsdale J, Lee B, Coleman N, Doms RW. DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2670-2675
- 36 Bashirova AA, Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Eilering JB, Martin MP, Wu L, Martin TD, Viebig N, Knolle PA, KewalRamani VN, van Kooyk Y, Carrington M. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin(DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J Exp Med* 2001;193:671-678
- 37 Soilleux EJ, Morris LS, Lee B, Pohlmann S, Trowsdale J, Doms RW, Coleman N. Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *J Pathol* 2001; 195:586-592
- 38 Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Foug S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 2003;278:20358-20366
- 39 Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. L-SIGN(CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4498-4503
- 40 Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 2003;77:4070-4080
- 41 Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F, Boussemart L, Manix C, Olson WC, Gardner JP, Dragic T. L-SIGN(CD209L) and DC-SIGN(CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;39:14067-14072
- 42 Baribaud F, Doms RW, Pohlmann S. The role of DC-SIGN and DC-SIGNR in HIV and Ebola virus infection: can potential therapeutics block virus transmission and dissemination? *Expert Opin Ther Targets* 2002;6:423-431
- 43 Simmons G, Reeves JD, Grogan CC, Vandenberghe LH, Baribaud F, Whitbeck JC, Burke E, Buchmeier MJ, Soilleux EJ, Riley JL, Doms RW, Bates P, Pohlmann S. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* 2003;305:115-123
- 44 Raftery MJ, Schwab M, Eibert SM, Samstag Y, Walczak H, Schonrich G. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* 2001;15:997-1009
- 45 Andrews DM, Andoniu CE, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, Degli-Esposti MA. Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat Immunol* 2001;2:1077-1084
- 46 Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 2001;294:2163-2166
- 47 Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, Legres L, Dreher D, Nicod LP, Gluckman JC, Lagrange PH, Gicquel B, Neyrolles O. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 2003;197:121-127
- 48 Ehlers MR, Daffe M. Interactions between Mycobacterium tuberculosis and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol* 1998;6:328-335
- 49 Schlesinger LS, Hull SR, Kaufman TM. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis to human macrophages. *J Immunol* 1994;152:4049-4079
- 50 Jiao X, Lo-Man R, Guernonprez P, Fiette L, Deriaud E, Burgaud S, Gicquel B, Winter N, Leclerc C. Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J Immunol* 2002;168:1294-1301
- 51 Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* 2001;166:7477-7485
- 52 Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2:675-680
- 53 Chatterjee D, Khoo KH. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology* 1998;8:113-120
- 54 Sada E, Brennan PJ, Herrera T, Torres M. Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990;28:2587-2590
- 55 Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+)T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;192: 1213-1222
- 56 Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem* 2001;276:28939-28945
- 57 Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Abe M, Harn DA Jr. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 1999;163:6712-6717
- 58 Geijtenbeek TB, Groot PC, Nolte MA, van Vliet SJ, Gangaram-Panday ST, van Duijnhoven GC, Kraal G, van Oosterhout AJ, van Kooyk Y. Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood* 2002;100:2908-2916
- 59 Park CG, Takahara K, Umemoto E, Yashima Y, Matsubara K, Matsuda Y, Clausen BE, Inaba K, Steinman RM. Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN. *Int Immunol* 2001;13:1283-1290

## BFGF, BFGFR 和 COX-2 与大肠癌的关系

韦良宏, 林瑶光

韦良宏, 林瑶光, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021  
广西科技厅科研基金资助课题(桂科基), No.0342010-4  
项目负责人: 林瑶光, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科.  
电话: 0771-5356596  
收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2005-01-05

### 摘要

碱性成纤维细胞生长因子(BFGF), BFGF 受体(BFGFR)和环氧合酶-2(COX-2)在大肠癌中的表达增加, 他们与大肠癌的相关性越来越受到人们的关注.但其确切机制仍然不清楚.现就 BFGF, BFGFR 及 COX-2 的结构与功能, 及其在大肠癌的表达及促癌机制等方面进行综述.

韦良宏, 林瑶光. BFGF, BFGFR 和 COX-2 与大肠癌的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(5):667-670  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/667.asp>

### 0 引言

细胞生长因子与肿瘤的关系已日益受到重视.多种生长因子在不同的肿瘤组织或体液中可被检测;多种细胞生长因子的受体在某些肿瘤组织中高表达;某些生长因子的编码基因与癌基因有同源性, 与血管生成关系密切.碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, BFGF)及其受体是成纤维生长因子家族中的一员, 研究证明与肿瘤发生关系密切.近年研究证明, 环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂可以在早期阶段阻止大肠癌的发生. COX-2 在大肠癌的高表达, COX-2 且与肿瘤的多种生物学行为有相关性, 说明 COX-2 在大肠癌的发病机制扮演着一个相当重要的角色.现就 BFGF, BFGFR, COX-2 的结构与功能, 及其在大肠癌中的表达及促癌机制作一综述.

### 1 BFGF, BFGFR 与大肠癌

**1.1 BFGF, BFGFR 的结构与功能** 1975 年 Groszpodarowicz 首先从牛垂体中分离出一种能引起成纤维细胞增生的多肽物质, 并命名为 BFGF. 1986 年 Abraham *et al* 测出了人的 BFGF DNA<sup>[1]</sup>. 人的基因组中仅有单拷贝的 BFGF 基因, 定位于染色体 4q26-27, 共有 4 万个碱基, 编码序列包括 3 个外显子和插入其中的 2 个内显子. 因上游起始密码子的不同, 可产生分子质量为 18-25 ku 的多种异构体, AUC 起始产生的 18 ku 的 BFGF 含 146 个氨基酸, 定位于细胞质, 而由 CUC 起始形成的分子质量为 22, 22.5, 24 ku 的 BFGF 则定位于细胞核. 现今研究 BFGF 的生物学

活性主要针对 18 ku 的亚型. BFGF 相关受体有 2 类: 一类是高亲和力受体 (FGFR<sub>1-4</sub>), 属跨膜性酪氨酸蛋白激酶类受体; 另一类是低亲和力受体 (HSPG), 即肝素样受体, 为硫酸乙酰肝素蛋白多糖类物质. 受体至少有 4 种形式, 由细胞外区、跨膜区、胞区的近膜区和酪氨酸激酶区组成, 每种 FGF 受体均能和 FGF 家族每个成员结合, 而不同 FGF 受体的表达均存在着组织细胞特异性. BFGFR 是跨膜高亲和力受体. 转化生长因子  $\beta 1$ , ACTH 均可增加 BFGF 受体数目<sup>[2]</sup>. 由于 BFGF 分子中缺乏可供分泌于胞外的信号肽序列, 因此其分泌途径目前尚不清楚, 推测可能通过细胞死亡或损伤而释放<sup>[3]</sup>, 但新近的研究认为 BFGF 可以通过一种 ATP 驱动的多肽泵跨膜转运. BFGF 在体内分布广泛, 存在于中胚层、神经外胚层的细胞及多种肿瘤细胞中, BFGF 在 HSPG 的辅助下与 FGFR 结合后, 激活受体酪氨酸激酶, 进一步使蛋白质磷酸化, 从而激活细胞内信号传递系统或诱导某些因子表达. 对这些细胞有促增生分化功能, 参与了胚胎发育、血管生成、损伤修复神经再生、肿瘤生长等多项生理及病理过程.

**1.2 BFGF, BFGFR 与大肠癌的关系** 现代分子生物学研究表明 BFGF 过度表达与肿瘤发生、发展及预后密切相关<sup>[4]</sup>. 在大肠癌中也表现出相似结果, 尚海 *et al*<sup>[5]</sup>应用 RT-PCR 技术对 50 例大肠癌进行 BFGF 及受体 mRNA 检测. 结果显示, 大肠癌中 BFGF 及受体 mRNA 基因呈高表达, 与正常及癌旁组织比较, 有显著差异. 且 BFGF 及受体 mRNA 基因表达水平与 Dukes 分期呈显著正相关. 提示 BFGF 及其受体在大肠癌的生长、进展、转移中起促进作用. 陈江 *et al*<sup>[6]</sup>应用免疫组化检测癌组织 181 例 (包括胃癌、结肠癌、膀胱癌等), 66 例癌旁组织中的 BFGF 表达状况, 也得类似的结果. BFGF 促进肿瘤血管新生, 增加肿瘤组织的血液供应, 从而为肿瘤细胞快速、无限制地增生提供氧和营养物质. 恶性肿瘤组织通过自分泌和旁分泌高度表达 BFGF 和 BFGF 受体<sup>[7]</sup>, 直接作用于各种细胞而引起细胞转化, 增生失控, 分化异常以致形成肿瘤<sup>[8]</sup>. 体外实验已证实了上述结果, 孙爱静 *et al*<sup>[9]</sup>采用免疫细胞化学染色、<sup>125</sup>I 标记抗体的原位放射免疫分析及放射受体分析方法对 RPMI4788 人大肠癌细胞 BFGF 的表达、定位及其受体进行了研究. 结果显示 RPMI4788 细胞产生的 BFGF 大部分蓄积于细胞核内, 一部分存在于细胞膜上, 并在细胞膜有其受体. 表明在肿瘤的发生发展过程中, 肿瘤细胞产生的 BFGF 有可能起自泌性生长因子的作用, 也可能直接参与核的功能. New *et al*<sup>[10]</sup>对 5 个大肠癌细胞株 CEO, CBS, FET, MOSER 和 HCT116 施加不同浓度的外源性

BFGF, 在其中4个细胞株中观察到细胞增生显著增加(24-146%), 且增生比与施加浓度呈显著正相关. 用免疫沉淀法及 Western 印迹法证实在大肠癌细胞株中有 BFGF 及其受体的表达. 以上体外试验及临床试验均提示 BFGF 及其受体与大肠癌密切相关. 但 Dechun *et al* 用原位杂交方法检测 10 例大肠癌<sup>[11]</sup>, 7 例胃癌, 4 例肝癌中 BFGF 基因表达, 发现 10 例大肠癌病例中表达 BFGF mRNA 为阴性, 提出与以上作者之相反意见. 上述结果差异可能与大肠癌异质性及研究方法, 样本大小等差异有关.

**1.3 BFGF、BFGFR 与恶性肿瘤的形成** 许多研究表明 BFGF 能够促进细胞恶性转化及肿瘤形成. 许多肿瘤细胞存在 BFGFR 的高表达, 通常比正常细胞高 10 倍以上, 有的肿瘤细胞(神经胶质瘤、横纹肌肉瘤、白血病、肺癌、黑色素瘤、肝癌等)既表达 BFGF 又表达 BFGFR, 说明 BFGF 与 BFGFR 参与了肿瘤的形成. BFGF 可能通过以下两种主要机制参与肿瘤的形成和发展: 一方面通过过表达 BFGF 而以自分泌或旁分泌方式促进细胞过度增生和肿瘤生长, BFGF 作为一种促有丝分裂因子和趋化因子, 促进肿瘤细胞的自主性生长. 恶性肿瘤组织高度表达 BFGF, BFGFR, 二者结合可以影响 RNA 聚合酶 I, 加强核蛋白体基因的转录, 促进细胞内 G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>S 转换, 从而促进细胞的分裂, 增生<sup>[12]</sup>; 另一方面通过促进新生血管形成, 为肿瘤细胞生长提供丰富营养. 血管新生是一个包括毛细血管基底膜的降解, 内皮细胞的迁移和增生、修饰胞外胶原蛋白基质的酶合成以及小管腔形成等复杂的过程. 现已证明, BFGF 在体内外均参与上述过程: 对内皮细胞有促分裂和趋化作用, 刺激内皮细胞胶原酶和纤维蛋白酶, 能降解基底膜, 并诱导毛细血管内皮细胞向三维胶原基质中迁移, 形成毛细血管样腔状结构. BFGF 除了对许多正常组织有促血管生成作用外, 对肿瘤血管的新生也有显著作用. 新生血管生成前, 肿瘤常局限 1-2 mm<sup>3</sup>, 血管形成后, 可于短期内迅速生长达 1-2 cm<sup>3</sup>, 并迅速发生转移, 试验表明随着肿瘤微血管密度的增加, 肿瘤侵袭转移等恶性潜能亦明显增加. 故 BFGF 对肿瘤生长、转移、预后起重要作用. BFGF 在许多肿瘤血管生成中是不可缺少的因素, 但并不是唯一的因素, 可能与其他细胞因子如 VEGF, PDGF, TNF- $\alpha$  共同发挥协同作用.

## 2 COX-2 与大肠癌

**2.1 COX-2 结构与功能** 人类 COX-2 基因长约 8.3 KB, 含有 10 个外显子, 9 个内含子, 位于 1q25.2-q25.3, 他的促进子含有一个保守的 TATA 盒, 转录起始点在翻译起始点上游的 134 位碱基, 转录后形成 4.5 KB mRNA, 编码一个 604 个氨基酸的开放阅读框, 含有 17 个氨基酸残基. COX-2 基因在人体组织中存在, 正常情况下, COX-2 基因是诱导性表达, 诱导作用是分两种情况下进行, 生理情况下的诱导产生 COX-2 mRNA 和蛋白质的量少, COX-2 mRNA 可以检测, 而 COX-2 蛋白质却测不出, 但他对维持人体正常生理功能起重要作用, 而病理条件下产生的

COX-2 mRNA 和蛋白质是可以检测的, 如在炎症、肿瘤形成时等等. COX-2 表达的调控主要在转录水平上, 即细胞受到刺激后经过一系列信号传导并作用于 5' 端转录, 诱导 COX-2 表达. 这些刺激因素存在于细胞内外, 主要有某些细胞因子、生长因子、炎症介质、促癌剂及一些癌基因产物等. COX-2 在机体的生理和病理方面有着广泛的作用, 如参与炎症的发生发展, 对肾功能及生殖系统的影响, 对中枢神经系统的功能, 甚至癌症的发生都发挥着重要的作用. Langenbach *et al*<sup>[13]</sup> 用基因破坏技术, 造出了专门用于研究 COX 某一亚型功能的模型, 主要观察当动物缺乏某种 COX 时, 对癌的易感性、炎症反应、胃溃疡和雌性生殖过程有何影响. 结果发现, COX 的不同亚型产生不同的前列腺素, 且具有不同的功能, 但在维持正常生理功能方面, COX-2 缺乏比 COX-1 缺乏有更深远的影响. 动物实验研究表明: COX-1 基因破坏后, 动物仍能正常生长, 但血小板的聚集能力降低, 对佛波醇酯的刺激不起反应, 分娩困难, 其后代基本不能存活; COX-2 被破坏后出现以下的表型: (1) 卵巢发育过程中黄体缺乏; (2) 肾病; (3) 心脏纤维化; (4) 容易感染腹腔炎症<sup>[14]</sup>. 目前研究显示, COX-2 在各种癌组织的高表达. 王兴鹏 *et al*<sup>[15]</sup> 用免疫组化法检测 24 例胰腺癌, COX-2 的表达为 87.5%, RT-PCR 法检测癌细胞中的 COX-2 mRNA 及 Western 印迹分析法检测癌细胞中的 COX-2 蛋白均明显上调. Wulfig *et al*<sup>[16]</sup> 用免疫组化法检测 131 例膀胱细胞癌, COX-2 的表达为 83.4%. 因此, 对 COX-2 的研究热点转向与肿瘤关系的研究.

**2.2 COX-2 与大肠癌的关系** 由于流行病学研究表明长期服用 NSAIDs (非甾体类抗炎药) 的成人, 其结直肠癌的发病率下降 40-50%<sup>[17]</sup>. 目前认为 NSAIDs 抗炎机制是由于其抑制了 COX-2 (cyclooxygenase-2, 环氧合酶-2), 导致了花生四烯酸向前列腺素和其他生物活性脂类的转变减少. 因此, 研究 COX-2 与大肠癌的发生发展的关系, 对于防治大肠癌提供了一种新的方法, 具有重大临床意义. Tsunozaki *et al*<sup>[18]</sup> 用 RT-PCR 法研究 69 例结直肠癌, 发现癌组织中表达 COX-2 为 100%, 且与直肠癌的浸润性生长有关. Katherine *et al* 用免疫组化法检测 76 例结直肠癌<sup>[19]</sup>, COX-2 表达率为 100%, 与肿瘤大小, Duke 分期, 淋巴结转移有关. 大量实验皆说明 COX-2 在大肠癌中高表达, 与大肠癌多种病理特征相关, 在大肠癌的发生发展中起着重要的作用<sup>[20-21]</sup>. 然而也存在相反的观点. Dimberg *et al*<sup>[22]</sup> 用 Western 印迹分析法检测 39 例结直肠癌 COX-2 蛋白, 结果显示直肠癌中 COX-2 高表达 (18/20), 而结肠癌中表达较低 (4/19), 二者相比有显著差异. Konno *et al*<sup>[23]</sup> 用免疫组化法检测 56 例结直肠癌, 14 例阳性表达 (25%), 42 例阴性. COX-2 与淋巴浸润有关, 但与 MVD, VEGF 无关. 总之 COX-2 在大肠癌组织中的表达各家报道不一, 缺乏大宗病例报道, 这又说明了 COX-2 在大肠癌中的作用仍需要进一步研究.

**2.3 COX-2 的促癌机制** COX-2 通过如下机制引起肿瘤发生: (1) 刺激细胞生长. 用 COX-2 cDNA 转染人结肠癌细胞

株 Colo 32 DM 后, 发现结肠癌细胞 DNA 合成明显增加, 出现增生效应<sup>[24]</sup>. 目前认为 COX-2 通过其主要产物 PGE<sub>2</sub> 刺激肿瘤细胞的增生. PGE<sub>2</sub> 产生后可通过自分泌或旁分泌途径作用于同种细胞或邻近周围组织其他类型的细胞, 与细胞膜的 EP 受体结合, 通过 G 蛋白偶联途径促进细胞增生, 也可通过核内过氧化物酶增生体激活受体 (PPAR) 直接促进细胞的生长. (2) 抑制细胞凋亡. Jones *et al*<sup>[25]</sup> 报道了人结肠癌细胞系 HCA-7 在暴露于 SC-58125 (一种选择性 COX-2 抑制剂), 其凋亡增加; 而 HCA-7 细胞预先暴露于 PGE<sub>2</sub> 后, Bcl-2 蛋白水平表达增加 4-5 倍; 在 PGE<sub>2</sub> 治疗后, 促有丝分裂蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase) 的活性显著增高, 细胞分裂加快. O' Mahony *et al*<sup>[26]</sup> 将 COX-2 的 cDNA 转染大鼠肠上皮细胞 RIE 1 获得稳定表达 COX-2 的细胞株 RIES 后, 发现 RIES 细胞抗凋亡能力显著增强, 用 COX-2 特异性抑制剂 SC58125 可抑制 RIES 的抗凋亡活性. 其机制还不完全清楚, 但至少有以下 3 条途径: 增加 Bcl-2 表达、减弱一氧化氮 (NO) 信号途径和降低细胞间神经鞘氨醇含量. (3) 刺激新生血管形成. Kawamori *et al*<sup>[27]</sup> 证明 celecoxib (一种选择性 COX-2 抑制剂), 可以抑制裸鼠结肠癌种植瘤的血管生长. Kakiuchi *et al*<sup>[28]</sup> 研究表明: 结肠癌 Caco-2 细胞系中 COX-2 过度表达, 导致促血管生长因子的大量产生, 促进了内皮细胞通过胶原基质和管状癌巢的形成. Tsujii *et al*<sup>[29]</sup> 将内皮细胞与克隆肿瘤细胞培养, 细胞高度表达 COX-2 并产生 PG、前血管生成因子, 同时刺激内皮迁移与试管细胞生长, 这结果可被选择性 COX-2 抑制剂 NS398 抑制, 而对照组无细胞高度表达 COX-2. 血管生成 (angiogenesis) 是肿瘤新生血管形成的关键因素. 血管生成包括以下几个步骤<sup>[24]</sup>: 小血管内皮细胞的激活, 细胞外基质的降解, 细胞在基质中迁移、增生, 内皮细胞组建为中空管道, 管道最终吻合形成新的毛细血管. COX-2 过度表达可刺激肿瘤新生血管的形成, 但其机制尚未完全明确. 可能与下有关: (1) 诱导血管内皮生长因子和碱性成纤维母细胞生长因子等促血管生成因子的表达, 但 COX-2 如何诱导 VEGF, BFGF 等促血管生成因子表达的确切机制尚不清楚. 可能与其催化 AA 产生的 PGs 有关. 通过基质金属蛋白酶促肿瘤血管生成. (2) 通过整合素  $\alpha\beta_3$  促血管生成. (3) 与诱导型一氧化氮合酶协同作用. (4) 激活缺氧诱导因子-1. (4) COX-2 与免疫抑制. COX-2 催化花生四烯酸产生 PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> 可抑制 T 细胞和 B 细胞的增生和自然杀伤细胞的细胞毒性反应. PGE<sub>2</sub> 也可抑制肿瘤坏死因子 (TNF $\alpha$ ) 的产生, 诱导有免疫抑制功能的白介素 10 (IL-10) 的产生. 因而, COX 抑制剂可起到免疫调节作用, 减弱肿瘤介导的免疫抑制. 在肿瘤的生长过程中, 肿瘤细胞释放的集落刺激因子可再激活 COX-2, 进一步促进肿瘤的发展.

BFGF, BFGFR 或 COX-2 在大多数结直肠肿瘤明显升高并与肿瘤的发生密切相关, 但他们是协同或各自发挥作用, 目前未见有相关报道. 随着研究的深入, 他们与肿瘤的关系会得到进一步阐明, 把他们作为靶向治疗的

目标, 将为防治肿瘤提供一种新的途径. 总之, BFGF, BFGFR 和 COX-2 在大肠癌的病理过程中起着重要的作用. 尽管对他们的研究还不够完善, 临床应用还有一段距离, 但随着研究的深入, 其会对大肠癌的治疗及疾病的预后评估有着重大的指导意义.

### 3 参考文献

- Okada-Ban M, Thierry JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:263-267
- 蒋志文. 碱性成纤维细胞生长因子受体的调节. 蚌埠医学院学报 1997;22:367-368
- Dow JK, deVere White RW. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology* 2000;55:800-806
- Oppenheim J, Fujiwara H. The role of cytokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:279-288
- 尚海, 单吉贤, 高红, 张颐. 大肠癌组织中 aFGF bFGF 及 FGFR<sub>1</sub> 表达水平的研究. 中国肿瘤临床 2003;30:424-427
- 陈江, 向军俭, 祝金泉, 黄德强, 张 |KUN| 和, 谢勇, 王崇文. 碱性成纤维细胞生长因子在恶性肿瘤细胞中表达状况及其意义. 中国现代医学杂志 2001;11:25-27
- Smith K, Fox SB, Whitehouse R, Taylor M, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Ann Oncol* 1999;10:707-713
- Weerda HG, Gamberger TI, Siegner A, Gjuric M, Tamm ER. Effects of transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor on proliferation of cell cultures derived from human vestibular nerve schwannoma. *Acta Otolaryngol* 1998;118:337-343
- 孙爱静, 贾心善, 西川克三, 吉竹佳乃. bFGF 及其受体在人大肠癌细胞中的表达和意义. 中国医科大学学报 1998;27:441-444
- New BA, Yeoman LC. Identification of basic fibroblast growth factor sensitivity and receptor and ligand expression in human colon tumor cell lines. *J Cell Physiol* 1992;150:320-326
- Li D, Bell J, Brown A, Berry CL. The observation of angiogenin and basic fibroblast growth factor gene expression in human colonic adenocarcinomas, gastric adenocarcinomas, and hepatocellular carcinomas. *J Pathol* 1994;172:171-175
- 周廷冲. 多肽生长因子基础与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 1992:45-47
- Langenbach R, Loftin C, Lee C, Tian H. Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1237-1246
- Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tian HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Ledford A, Lee CA. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 1995;83:473-482
- 王兴鹏, 徐选福, 王冰娴, 谢传高, 吴恺, 董育玮. 环氧合酶 2 在胰腺癌中表达及其抑制剂对肿瘤生长的抑制作用. 中华肝胆外科杂志 2003;9:489-491
- Wulfig C, Eltze E, von Struensee D, Wulfig P, Hertle L, Piechota H. Cyclooxygenase-2 expression in bladder cancer: correlation with poor outcome after chemotherapy. *Eur Urol* 2004;45:46-52
- Smalley WE, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 1997;39:1-20
- Tsunozaki H, Yoshinaga K, Kumagai J, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 overexpression in colorectal cancer is associated with non-polypoid growth. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32:167-171
- Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, Murray FE. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer.

- JAMA 1999;282:1254-1257
- 20 潘赛英, 胡跃, 张苏展, 陈丽荣, 王海军. 环氧合酶-2 表达与大肠癌 T N M 分期、分化及转移之间的关系. 中国肿瘤杂志 2004; 26:300
- 21 艾志龙, 陆维祺, 许建芳, 阿克苏. 环氧合酶-2 在人结直肠肿瘤中的表达及其临床意义. 中国癌症杂志 2003;13:138-140
- 22 Dimberg J, Samuelsson A, Hugander A, Soderkvist P. Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer. Gut 1999;45:730-732
- 23 Konno H, Baba M, Shoji T, Ohta M, Suzuki S, Nakamura S. Cyclooxygenase-2 expression correlates with uPAR levels and is responsible for poor prognosis of colorectal cancer. Clin Exp Metastasis 2002;19:527-534
- 24 Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997;386:671-674
- 25 Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh II, Tarnawski AS. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. Nat Med 1999;5: 1418-1423
- 26 O'Mahony CA, Beauchamp RD, Albo D, Tsujii M, Sheng HM, Shao J, Dubois RN, Berger DH. Cyclooxygenase-2 alters transforming growth factor-beta 1 response during intestinal tumorigenesis. Surgery 1999;126:364-370
- 27 Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. Cancer Res 1998;58:409-412
- 28 Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Kawai N, Yasumaru M, Kimura A, Komori M, Irie T, Miyoshi E, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. Cancer Res 2002;62:1567-1572
- 29 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 1998;93:705-716

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 第六届全国胃肠动力学术研讨会征文通知

本刊讯 为提高国内胃肠动力障碍性疾病临床和基础研究水平, 吸取国外最新研究成果, 加强对外交流与合作, 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组定于2005-11 月上旬在武汉召开全国第六届胃肠动力学术会议, 届时将邀请国内外胃肠动力学专家就本学科的基础和临床研究进展作专题演讲, 并进行广泛的学术交流. 现将征文有关事项通知如下:

### 1 征文内容

(1)胃肠动力障碍性疾病的基础和临床研究;(2)胃肠功能性疾病的基础和临床研究;(3)胃肠神经系统功能与胃肠动力学基础研究;(4)胃肠动力学检测方法的临床应用.

### 2 征文要求

(1)论文摘要不得超过800字, 电脑打印(附软盘), 格式为: 题目, 作者, 单位, 邮编, 目的, 方法, 结果和结论, 附联系电话及E-mail地址;(2)已在全国公开发表的论文不予受理.

### 3 投稿地址

武汉市解放大道1277号协和医院消化科 刘劲松 收(邮编: 430022), 电话: 027-85726381; 2 武汉市丁字桥路100号湖北省医学会 林勇 胡丽萍收(邮编: 430064), 电话: 027-87893467.

### 4 截稿日期

2005-07-30

### 5 会议具体地点

另行通知.会议信息, 论文投稿, 表格下载请登陆网站:<http://hubeiyiyuan.go.nease.net>.

中华医学会消化病学分会

消化病学分会胃肠动力学组

# 肝星状细胞的生物学特性及活化调控机制

饶慧瑛, 魏 来

饶慧瑛, 北京大学人民医院、北京大学肝病研究所 北京市 100044  
项目负责人: 饶慧瑛, 100044, 北京市, 北京大学人民医院、北京大学肝病研究所. raohuiying@163.com  
电话: 010-68314422-5725  
收稿日期: 2004-12-31 接受日期: 2005-01-20

## 摘要

激活的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是肝纤维化发生发展过程中的关键环节.正常情况下HSC参与Vit A的代谢和贮存,参与细胞外基质的合成和降解,表达细胞因子及受体.肝脏损伤后,HSC发生激活.HSC的激活是多种细胞因子的旁分泌和自分泌协同作用的结果.其中PDGF以及TGF- $\beta$ 是两个最重要的因子.PDGF能促使HSC大量分裂增生并向肝损伤部位迁徙,TGF- $\beta$ 能促进HSC合成 $\alpha$ -SMA以及合成胶原、纤维连接蛋白和蛋白多糖等细胞外基质.ET-1的收缩功能是HSC的重要生物学特性之一.肝损伤过程中,细胞与细胞间,基质与HSC间存在多种细胞因子及非肽类递质构成的复杂HSC激活调节网络.

饶慧瑛, 魏来. 肝星状细胞的生物学特性及活化调控机制. 世界华人消化杂志 2005;13(5):671-674  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/671.asp>

## 0 引言

现已明确,激活的HSC是肝纤维化发生发展过程中的关键环节.目前关于HSC的生物学特性及与肝纤维化关系的研究已经成为肝硬化研究的热点.本文就HSC的研究历史、活化通路进行了总结.

## 1 肝星状细胞的研究历史和生物学特性

关于肝星状细胞的研究已经有100多年的历史.早在1876年,Kupffer使用氯化金染色法发现肝脏中有一种呈星状形态的细胞,命名为星状细胞(stellate cells).1898年,Kupffer向兔肝内灌注印度墨水,观察到能吞噬墨水颗粒的、同样为星状形态的肝巨噬细胞(人们后来将肝巨噬细胞命名为Kupffer细胞).然而,他混淆了肝巨噬细胞和星状细胞,他误认为星状细胞位于肝窦中,星状细胞就是肝巨噬细胞.当时Kupffer的观点得到了广泛的认同.1951年,Ito发现肝窦外有一种富含脂肪的细胞,称之为伊东细胞(Ito cells)或贮脂细胞(fat-storing cells).1958年,Suzuki用银染法确定Kupffer用氯化金染色法发现的星状细胞是位于肝窦外的肝间质中,并不是肝巨噬细胞(Kupffer细胞),因此,把他重命名为间质细胞(interstitial cells).1966年,Bronfenmajer证实了伊东细胞的发现,又给该细胞起个新名叫脂细胞

(lipocytes)<sup>[1]</sup>.1971年,Wake<sup>[2]</sup>同时用氯化金染色法和苏丹红染色法发现Ito所描述的伊东细胞和Kupffer所发现的星状细胞原来是同一类型的细胞.100多年来,许多研究者对这种细胞进行了研究,同时也给他起了多个不同的名字.为了避免名称上的混乱,同时也为了纪念Kupffer的发现,1996年国际上将该细胞统一命名为HSC<sup>[3]</sup>.

HSC位于Disse间隙,紧贴着肝窦内皮细胞(sinusoidal endothelial cells, SEC)和肝细胞,并伸出大量星状分布的长胞突包绕着肝血窦.此外,HSC还伸出胞突与肝细胞、邻近的星状细胞相接触.正常肝脏中HSC的数目很少,只占肝细胞总体数目的5-8%,但HSC的立体分布和伸展足以覆盖整个肝窦微循环<sup>[4]</sup>.

正常情况下HSC表现为富含Vit A脂滴的静止型,其功能有:(1)参与Vit A的代谢和贮存:肝脏在Vit A的代谢和贮存方面起着重要的作用.视黄醛在小肠内酯化后由乳糜微粒经过淋巴管运输到肝脏.肝细胞可以摄取乳糜微粒的视黄醛酯,与特异的视黄醛结合蛋白结合后,转运到邻近的HSC.在这过程中,视黄醛的摄取、储存和转运受到细胞内视黄醛结合蛋白含量的调节<sup>[5-6]</sup>.(2)参与细胞外基质的合成和降解:在正常的肝脏中,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)约占肝脏总体重量的5%<sup>[7]</sup>.目前的研究认为,HSC是正常及纤维化肝脏中ECM的主要来源细胞.正常肝脏中HSC合成的胶原以IV型为主,I型和III型较少.HSC还能合成板层素(LM)、纤维连接蛋白(FN)、层连蛋白(LN)、腱蛋白(tenascin)、nidogen和粗纤维调素(undulin)等糖蛋白成分,以及硫酸皮素、硫酸软骨素和透明质酸等蛋白多糖<sup>[8]</sup>.正常情况下,肝脏ECM的合成和分解是处在一个动态平衡中.HSC能分泌多种胶原酶和基质降解蛋白酶如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-1、MMP-2等以降解各种细胞外基质,同时分泌组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1)防止胶原过度降解.(3)表达细胞因子及受体.正常情况下,HSC可以分泌一些细胞因子.在正常大鼠,HSC能表达肝细胞生长因子(HGF),参与肝细胞再生的调控<sup>[9]</sup>.此外,HSC还能表达很少量的转化生长因子(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、血小板衍生的生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)和胰岛素样生长因子(IGF)等,同时HSC能表达TGF- $\beta_1$ 的II、III型受体和PDGF受体的 $\alpha$ 亚单位等.(4)参与肝窦血流调节:HSC具有收缩功能.从正常肝脏中分离出来的HSC可以在多种血管活性物质的作用下产生反应.HSC伸出胞突包

绕着肝窦,因而他的舒缩可以直接调节肝血窦的微循环,从而影响着肝脏的血流分布和门静脉压力。

肝脏损伤后,星状细胞则激活成为肌成纤维样细胞(myofibroblast-like cell)-活化型<sup>[10]</sup>,此时HSC大量增生、胞体增大、Vit A脂滴消失、胶原纤维等细胞外基质分泌增多、表达具有收缩功能的 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA),其中 $\alpha$ -SMA的表达为HSC激活的标志<sup>[11]</sup>。研究表明,HSC的持续激活是肝纤维化发生发展过程中的关键环节。激活的HSC一方面通过增生和分泌细胞外基质参与肝纤维化的形成和肝内结构的重建,另一方面通过细胞收缩使肝窦内压升高,这两类变化最终奠定了肝纤维化、门静脉高压症发病的病理学基础。HSC的激活过程十分复杂,是枯否氏细胞(Kupffer Cells, KC)、肝细胞、肝窦内皮细胞以及HSC自身分泌的多种细胞因子的旁分泌和自分泌协同作用的结果。在众多的细胞因子中,TGF- $\beta$ 和PDGF起着关键性的作用。

肝脏损伤后,HSC发生激活。激活的HSC特点为:(1)胞体增大,胞突伸展,星状外观。胞质中脂滴消失,VitA含量减少。胞质内粗面内织网、高尔基体发达,具有旺盛的蛋白质合成能力。(2)细胞大量增生,并且向肝损伤部位迁徙。(3)表达 $\alpha$ -SMA,成为肌纤维样母细胞,为活化型HSC的标志。(4)具有收缩功能。(5)细胞外基质产生增多。(6)分泌多种细胞因子,表达多种受体:如TGF- $\beta_1$ 及其I型受体;PDGF及其受体 $\beta$ 亚单位;内皮素(ET)及其受体;IGF-1;FGF等。

现已明确,激活的HSC在肝硬化、门静脉高压症的发生发展中起了关键性的作用。HSC的激活分三个阶段:(1)前炎症阶段:肝细胞损伤,分泌多种细胞因子,促使HSC大量增生。(2)炎症阶段:Kupffer细胞、窦内皮细胞、炎症细胞和血小板等,分泌多种细胞因子,尤其是PDGF和TGF- $\beta$ ,促使HSC活化。(3)后炎症阶段:活化的HSC分泌细胞因子PDGF和TGF- $\beta$ ,以自分泌和旁分泌方式,促使HSC进一步活化。

## 2 肝星状细胞的活化通路

HSC的激活过程十分复杂,是与KC、肝细胞、肝窦内皮细胞相互作用的结果。HSC和这些细胞间的相互作用对HSC的激活过程和肝纤维化的发生发展具有决定性的作用,而KC作为一种炎症细胞在其中扮演了重要的角色。在实验型肝纤维化模型中,KC的浸润总是先于HSC的激活;无论从正常大鼠还是从肝纤维化大鼠中分离出来的KC的条件培养液,都能促进HSC的激活。HSC与KC的相互作用是通过一些体液递质实现的,包括趋化因子、细胞因子、细胞间黏附分子(intracellular adhesion molecule, ICAM)等<sup>[12]</sup>。KC可以产生细胞因子、氧化反应产物以及花生四烯酸影响HSC的增生,细胞外基质的生成,和收缩等功能。如KC产生的PDGF能促使HSC大量分裂增生并向肝损伤部位迁徙,TGF- $\beta$ 能促进HSC合成 $\alpha$ -SMA以及合成胶原、纤维连接蛋白和蛋白多糖等细胞外基质。正如

KC对HSC的功能具有重要的影响一样,HSC也对KC的生物学活性产生影响。HSC可以产生趋化因子巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)和ICAM,促进KC等炎症细胞的浸润<sup>[13]</sup>。此外,HSC还可产生细胞因子PDGF、TGF- $\beta$ 等促进KC的激活以及自分泌和旁分泌作用促进自身的进一步激活<sup>[7]</sup>。

HSC的激活是多种细胞因子的旁分泌和自分泌协同作用的结果。

**2.1 PDGF** PDGF是一种重要的促有丝分裂因子。肝脏损伤时,PDGF能刺激HSC大量分裂增生并聚集于炎症受损区,他是已知最强大的促进HSC分裂和增生的细胞因子。PDGF由A、B两条肽链组成,有PDGF-AA、AB、BB三种异构体。PDGF受体由 $\alpha$ 、 $\beta$ 两亚单位组成,有 $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 三种。PDGF的B链可与 $\alpha$ 、 $\beta$ 两种亚单位结合,而A链只能与 $\alpha$ 亚单位结合。静止的HSC只表达 $\alpha$ 亚单位,激活的HSC才表达 $\beta$ 亚单位<sup>[14-15]</sup>。在肝纤维化时,HSC表面的PDGF受体以 $\beta$ 受体为主, $\beta$ 受体与PDGF-BB具有较强的亲和力,因此认为PDGF-BB以及PDGF的 $\beta$ 受体在肝纤维化过程中的作用尤为突出。PDGF受体含src同源二聚体-2(SH-2)和磷酸化酪氨酸结合(phosphotyrosine-binding, PTB)两个结构域,与接头蛋白Grb2结合后可聚集交换因子mSOS,从而激活Ras,进一步促使细胞外信号调节的激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)、Raf-1激活,在转录因子E1K-1和SAP磷酸化作用下ERK转位至细胞核,使C-fos表达增加,启动HSC的增生。干扰ERK的激活可以阻断PDGF引起的HSC活化。另外PDGF与受体结合后还可引起磷脂酰肌醇-3激酶(PI-3K)聚集,使酪氨酸磷酸化,这一通路足以传递PDGF的有丝分裂信号,且在产生趋化作用中是必不可少的,转录信号传递激活因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)与PDGF受体SH-2结构域结合后,通过蛋白酪氨酸磷酸激酶JAK或酪氨酸激酶受体介导而磷酸化,发生核转位,对细胞因子启动的有丝分裂起调节作用。cAMP激活STAT后可抑制DNA的合成。细胞外 $Ca^{++}$ 经T型通道内流, $Na^+/H^+$ 交换泵对细胞内pH的调节亦是PDGF作用通路的必要环节。PDGF的三种异构体均可激活PI-3K,以-BB作用最强,-BB可促进HSC增生和移行,-AA只能促进增生,这可能是由于PDGF受体 $\alpha$ 、 $\beta$ 两亚单位的信号传导途径存在某些差异。此外,PDGF还能诱导HSC合成TGF- $\beta$ 等细胞因子促进HSC分泌细胞外基质和表达 $\alpha$ -SMA。因此,PDGF在HSC激活中起着重要的作用。正常的肝组织仅表达很少量的PDGF,肝损伤后可以观察到PDGF及其受体的表达升高。肝损伤是触发PDGF表达的因素。同TGF- $\beta$ 一样,PDGF也以正反馈的方式作用于HSC,形成放大效应,进一步促进HSC的激活。

**2.2 TGF- $\beta$**  TGF- $\beta$ 为一种高二聚体多肽,在细胞生长负调节中起核心作用,他存在于体内多种细胞,在肝内除了HSC可以分泌TGF- $\beta$ 外,KC、肝窦内皮细胞以及肝

纤维化附近的炎性细胞均可分泌, TGF- $\beta$  是目前已知最强大的促进 HSC 激活和分泌细胞外基质的细胞因子, 他能促进 HSC 合成  $\alpha$ -SMA 以及合成胶原、纤维连接蛋白和蛋白多糖等细胞外基质, 同时抑制 MMPs 合成、促进 TIMPs 合成, 使细胞外基质的降解减少。此外, TGF- $\beta$  还间接通过增强 PDGF 的作用促进 HSC 的增生。将 TGF- $\beta$  基因转移入小鼠, 使其在肝中过表达, 即可诱发肝纤维化<sup>[16]</sup>。TGF- $\beta$  有 3 种亚型, 即 TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_2$ 、TGF- $\beta_3$ , 其中 TGF- $\beta_1$  与肝纤维化关系最密切。TGF- $\beta$  通过细胞膜上的受体发挥作用, 其受体也有 I、II、III 型, 静止的 HSC 只表达 II、III 型受体, 激活的 HSC 三型受体均表达<sup>[17-18]</sup>。TGF- $\beta$  信息传递是通过其受体依次结合、磷酸化而实现的。TGF- $\beta$  与 II 型 TGF- $\beta$  受体 (T $\beta$ R-II) 结合并使之磷酸化而具有激酶活性, 后者再结合 I 型 TGF- $\beta$  受体 (T $\beta$ R-I) 并使之磷酸化具有激酶活性, 而 III 型受体即穿膜蛋白聚糖无信号传导功能。Smad 家族中 Smad2、Smad3 能结合上述 TGF- $\beta$  受体复合物中的 T $\beta$ R-I 并发生磷酸化, 继而与 Smad4 形成异源寡糖聚合物, 并且向细胞核内转移, 随后发生转录反应, 靶细胞出现生物应答效应。TGF- $\beta$  受体 I 亦经 Ras/ERK 通路促进胶原合成, 而 TGF- $\beta$  受体 II 的激活则抑制增生。Smad7 却抑制 TGF- $\beta_1$  的信息传递, 从而阻断 TGF- $\beta_1$  所诱导的合成 ECM 以及阻断 HSC 的激活<sup>[19]</sup>。正常肝脏中, TGF- $\beta$  的表达很少。TGF- $\beta$  的大量合成和分泌是在肝损伤后触发的。肝内多种细胞包括 HSC、KC、肝窦内皮细胞和肝细胞都可以合成 TGF- $\beta$ 。而 HSC 则既是这两种细胞因子的主要分泌细胞之一, 又是他们作用的主要靶细胞。更引人注目的是, HSC 分泌的 TGF- $\beta$  能以正反馈的方式促进自身及周围的 HSC 合成和分泌更多的 TGF- $\beta$ , 从而形成放大效应, 促进了 HSC 的进一步激活。

**2.3 ET-1** ET-1 在 HSC 激活早期与 ET 受体 A (ET-RA) 结合经 Ras/ERK 通路促使 C-fos 表达产生增生效应, 活化后 ET-RB 表达占优势, 使前列腺素水平增加, 导致 cAMP 增加, 使 ERK、c-Jun 氨基末端蛋白激酶 (c-Jun NH2-terminal protein kinase, JNK) 受到抑制, 从而使增生受抑。TNF- $\alpha$  则通过 NF $\kappa$ B、Ap-1、c-Jun 激酶等转录因子的调节激活 HSC。另外, c-myc 可介导脂质过氧化反应产物对 HSC 的激活, 灶黏附激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 则为整合素信号传递的中心环节。收缩功能是 HSC 的重要生物学特性之一。激活的 HSC 不但表达  $\alpha$ -SMA 和 desmin 等收缩性蛋白, 而且还表达多种血管活性物质的受体, 并能对 ET-1、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 等多种血管活性物质产生收缩和舒张反应<sup>[20]</sup>。位于 Disse 间隙的 HSC 紧贴着肝窦内皮细胞, 伸出大量长胞突, 包绕着肝血窦。因此, HSC 的舒缩可以直接调节肝血窦的微循环, 从而影响着肝脏的血流分布和门静脉压力。此外, HSC 活化增生后合成大量的细胞外基质沉积于门脉周围、肝小叶内和 Disse 腔内, 形成“肝窦毛细血管化”, 导致门脉循环压力不可逆升高。

激活的 HSC 收缩的机制为: (1) 细胞膜上 Ca<sup>++</sup> 通道表达增加, 同时 Ca<sup>++</sup> 通道大量开放, 细胞内 Ca<sup>++</sup> 浓度增加, 导致细胞收缩。(2) 细胞中出现了大量的参与收缩的结构改变, 如表达  $\alpha$ -SMA、desmin 等, 这些细胞骨架蛋白能直接引起细胞收缩。(3) 近年来研究发现, Rho 激酶 (属于 ras 家族的一种 GTP 结合蛋白) 也参与 HSC 的收缩。HSC 的收缩状态受到肝窦微循环中的血管活性物质的调节。目前认为与 HSC 的关系最为密切的血管活性物质是 ET-1 和 NO<sup>[21]</sup>。但是 Goto *et al*<sup>[22]</sup> 研究发现在门静脉高压的早期, 由于门脉血流增多星状细胞机械拉伸引起 MMP-1 生成增多以及 TIMP-1 和 TIMP-2 生成减少。

肝损伤过程中, 细胞与细胞间如激活的 KC、损伤的肝细胞、内皮细胞、血小板等与 HSC 之间; 基质与 HSC 间存在多种细胞因子及非肽类递质如活性氧、二十烷、乙醛等构成的复杂 HSC 激活调节网络。例如, 活性氧激活 KC, 使之分泌 TGF- $\beta_1$ 、PDGF 等细胞因子, 通过旁分泌激活 HSC; 而 HSC 激活后转化为肌成纤维样细胞, 也可分泌 TGF- $\beta_1$  等细胞因子通过自分泌进一步维持自身的活化状态并激活邻近 HSC。在肝损伤过程中肝细胞可吞饮潜在型的 TGF- $\beta_1$  入胞, 在胞内活化, 随损伤时膜通透性增加而释放, 以旁分泌方式激活 HSC。细胞因子间也可发生相互作用, 或协同或拮抗, 一种生长因子可促进另一种生长因子或其受体的表达, 亦可促进自身表达的增加。如 TGF- $\beta_1$  除直接作用于 HSC 外, 还可诱导 PDGF 受体的表达。肝内的实际情况则涉及更加复杂的多细胞、多因子的参与。

肝纤维化是继发于肝脏炎症或损伤后修复过程中的炎症反应, 以 ECM 在肝内过量沉积为病理特征, 最终可以导致肝硬化和肝功能衰竭。HSC 作为肝硬化发病的关键环节正在受到广泛的关注。深入开展 HSC 生物学特性以及信号转导通路的研究, 将有助于阐明肝硬化的发病机制, 并为临床治疗提供新思路和新方法。

### 3 参考文献

- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:311-335
- Wake K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 1971; 132:429-462
- Ahern M, Hall P, Halliday J. Hepatic stellate cells nomenclature (letter). *Hepatology* 1996;23:193
- Wake K. Perisinusoidal Stellate cells (fat-storing cells interstitial cells, Lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol* 1980;66:303-353
- Bronfenmajer S, Schaffner F, Popper H. Fat-storing cells (lipocytes) in human liver. *Arch Pathol* 1966;82:447-453
- Neubauer K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, Ramadori G. Glial fibrillary acidic protein—a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol* 1996;24:719-730
- Niki T, De Bleser PJ, Xu G, Van Den Berg K, Wisse E, Geerts A. Comparison of glial fibrillary acidic protein and desmin staining in normal and CCl<sub>4</sub>-induced fibrotic rat livers. *Hepatology* 1996;23:1538-1545
- Iredale JP, Murphy G, Hembry RM, Friedman SL, Arthur MJ. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of

- metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest* 1992;90:282-287
- 9 Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998;18:2-13
- 10 Faouzi S, Le Bail B, Neaud V, Boussarie L, Saric J, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Rosenbaum J. Myofibroblasts are responsible for collagen synthesis in the stroma of human hepatocellular carcinoma: an in vivo and in vitro study. *J Hepatol* 1999;30:275-284
- 11 Ballardini G, Groff P, Badii de Giorgi L, Schuppan D, Bianchi FB. Ito cell heterogeneity: desmin-negative Ito cells in normal rat liver. *Hepatology* 1994;19:440-446
- 12 Nagy NE, Holven KB, Roos N, Senoo H, Kojima N, Norum KR, Blomhoff R. Storage of vitamin A in extrahepatic stellate cells in normal rats. *J Lipid Res* 1997;38:645-658
- 13 Zou Z, Ekataksin W, Wake K. Zonal and regional differences identified from precision mapping of vitamin A-storing lipid droplets of the hepatic stellate cells in pig liver: a novel concept of addressing the intralobular area of heterogeneity. *Hepatology* 1998;27:1098-1108
- 14 Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest* 1989;84:1780-1785
- 15 Davis BH, Coll D, Beno DW. Retinoic acid suppresses the response to platelet-derived growth factor in human hepatic Ito-cell-like myofibroblasts: a post-receptor mechanism independent of raf/fos/jun/egr activation. *Biochem J* 1993;294:785-791
- 16 Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000;32:247-255
- 17 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:397-416
- 18 Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor  $\beta$ 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2572-2576
- 19 Stopa M, Benes V, Ansorge W, Gressner AM, Dooley S. Genomic locus and promoter region of rat Smad7, an important antagonist of TGF $\beta$  signaling. *Mamm Genome* 2000;11:169-176
- 20 Thimman MS, Yee HF Jr. Quantitation of rat hepatic stellate cell contraction: stellate cells contribution to sinusoidal resistance. *Am J Physiol* 1999;277(1 Pt 1):G137-143
- 21 Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;28:926-931
- 22 Goto T, Mikami KI, Miura K, Ohshima S, Yoneyama K, Nakane K, Watanabe D, Otaka M, Watanabe S. Mechanical stretch induces matrix metalloproteinase 1 production in human hepatic stellate cells. *Pathophysiology* 2004;11:153-158

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2005年全国胃病诊治研讨会征文通知

本刊讯 为了推动消化内镜及相关专业对各种胃病的诊断与治疗研究进展,中华医学会消化内镜学分会定于2005-06在大连召开全国胃病诊治研讨会.会议将安排专题报告,论文交流,图像演示及自由讨论等内容.现将征文内容及有关事宜通知如下:

### 1 征文内容

(1)各种胃病的内镜,病理诊断及分类;分型;(2)各种胃病与 *H pylori*;(3)各种胃病与胃肠激素;(4)各种胃病与胃肠动力学;(5)放大内镜对胃良性病变,癌前病变及早期胃癌的诊断应用;超声内镜对胃良性,恶性疾病的诊断应用;(6)各种胃病的药物治疗(胃黏膜保护剂,药物根除 *H pylori*,各种抗酸,抑酸剂,改善胃动力失常药剂及抗溃疡剂等);(7)内镜下对某些胃炎,溃疡病,早期胃癌的治疗;对各种胃病的诊断与治疗以及其他临床研究与基础研究.

### 2 稿件要求

全文及摘要(摘要800-1000字),均用中文打印(要求有光盘);截稿日期为2005年3月20日.

### 3 投稿地址及联系方式

地址:辽宁省沈阳市和平区砂阳路252号,中华医学会辽宁分会学术会务部(邮编:110015)

联系人:刘敏杰 电话:024-23391410,传真:024-23391410(稿件注明:“全国胃病学术会”)

主办:中华医学会消化内镜学分会

承办:中华医学会辽宁分会

# 根除幽门螺杆菌对慢性萎缩性胃炎组织中生长抑素及其受体的蛋白和mRNA表达的影响

唐卓斌, 唐海燕, 刘为纹

唐卓斌, 中国人民解放军第二五四医院消化科 天津市 300142  
唐海燕, 广东省东莞市厚街医院 广东省东莞市 523945  
刘为纹, 第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038  
项目负责人: 唐卓斌, 300142, 天津市河北区五马路 160 号, 中国人民解放军第二五四医院消化科, tzbin@163.com  
电话: 022-84683114  
收稿日期: 2004-12-17 接受日期: 2005-01-13

## 摘要

**目的:** 分析幽门螺杆菌(*H pylori*)感染及根除对慢性萎缩性胃炎(CAG)组织中的生长抑素及其受体蛋白和 mRNA 表达的影响, 探讨 *H pylori* 的致病机制及其在胃癌发生中的作用。

**方法:** 采用快速尿素酶试验、Giemsa 染色及 Warthin-Starry 银染色检测 *H pylori*; 应用免疫组织化学 SP 法和 RT-PCR 技术检测 56 例萎缩性胃炎组织中的生长抑素(somatostatin, SS)及其受体 hSSTR<sub>2</sub>、hSSTR<sub>5</sub> 蛋白和 mRNA 表达情况, 以及 *H pylori* 根除前后慢性萎缩性胃炎组织中的生长抑素蛋白和 mRNA 表达的变化。

**结果:** *H pylori* 阳性组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达均显著低于 *H pylori* 阴性组( $16.00 \pm 1.50$  vs  $21.38 \pm 1.38$ ,  $0.30 \pm 0.05$  vs  $0.57 \pm 0.13$ ,  $P < 0.001$ ), 而 *H pylori* 阳性组萎缩性胃炎组织中的 hSSTR<sub>2</sub> mRNA 和 hSSTR<sub>5</sub> mRNA 表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化。经三联治疗根除 *H pylori* 后, 慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达较治疗前显著增加( $23.16 \pm 2.74$  vs  $17.30 \pm 1.67$ ,  $0.54 \pm 0.11$  vs  $0.31 \pm 0.09$ ,  $P < 0.001$ ), 而 *H pylori* 仍为阳性者, 慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达与治疗前比较则无明显变化。

**结论:** *H pylori* 感染可以抑制慢性萎缩性胃炎组织中的生长抑素蛋白和 mRNA 表达, 及早根除 *H pylori*, 可以纠正生长抑素基因的异常表达, 这可能是 *H pylori* 感染导致慢性胃炎的重要机制之一。

唐卓斌, 唐海燕, 刘为纹. 根除幽门螺杆菌对慢性萎缩性胃炎组织中生长抑素及其受体的蛋白和 mRNA 表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(5):675-677  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/675.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是慢性胃炎的致病因素, 其机制尚不完全清楚。我们过去的研究发现慢性胃炎与生长抑素(somatostatin, SS)及其受体基因有关<sup>[1-2]</sup>。因此, 从胃肠激素基因的角度探讨 *H pylori* 感染与胃癌发生的关系可能具有重要的理论和临床意义。我们通过给 *H pylori* 感

染阳性的慢性萎缩性胃炎患者口服丽珠胃三联药物 1 wk, 采用免疫组化染色及 RT-PCR 等技术研究 *H pylori* 感染对胃黏膜上皮生长抑素及其受体基因蛋白和 mRNA 表达的影响, 并分析其在胃癌发生中的生物学意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集以上消化道症状为主要表现而在第三军医大学附属西南医院、新桥医院和大坪医院进行胃镜检查的慢性萎缩性胃炎患者 56 例。胃镜活检均取自胃窦部, 所有病例在接受胃镜检查前均无服用大量糖皮质激素和非甾体消炎药史。所有病例均经 HE 染色病理诊断证实。*H pylori* 检测采用快速尿素酶试验、Giemsa 染色及 Warthin-Starry 银染色。尿素酶试验均阳性, Giemsa 染色和 Warthin-Starry 银染色两项中至少一项阳性者判为 *H pylori* 感染阳性; 三项检查均为阴性者判为 *H pylori* 感染阴性或 *H pylori* 根除。对 46 例 *H pylori* 阳性患者均给予丽珠胃三联片剂(枸橼酸铋钾 0.22 g bid, 克拉霉素 0.25 g bid, 替硝唑 0.5 g bid)治疗 1 wk, 治疗前及治疗结束后 1 mo 接受胃镜检查。兔抗人生长抑素多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品, 即用型免疫组化试剂盒(Kit 9709)为迈新公司产品。总 RNA 提取试剂盒(Tripure™ Isolation Reagent)为德国 Boehringer Mannheim (B. M) 公司产品, RT-PCR 检测试剂盒(Access RT-PCR system, A1250)为美国 Promega 公司产品, DNA marker 为上海华美公司产品, SS 引物序列:F:5' GGCTGCGCTGTCCATCGTC 3' R:5' CAGCCAGCTTTGCGTTCTCG 3' 产物长度 285 bp. hSSTR<sub>2</sub> 引物序列:F:5' ATCTGGGGCTTGGTACACAG 3' R:5' CTTCTTCCTCTTAGAGGAGC 3' 产物长度 148 bp. hSSTR<sub>5</sub> 引物序列:F:5' GCTCTTGGTGTTCCGCGGACGT 3' R:5' CAGGTTGACGATGTTGACGGTGAAG 3' 产物长度 298 bp. 看家基因(GAPDH)引物序列:F:5' CCACCCATGGCAAATTCATGGCA 3' R:5' TCTAGACGGCAGGTCAGG TCCAC 3' 产物长度 598 bp. 所有引物均由上海 Sangon 公司合成, PAGE 纯化。

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫组化染色** 采用 SP 法, 染色程序按 SP 法操作常规进行。抗体以 1:50 稀释。最后常规 DAB 显色, 苏木素复染、脱水、透明、封固。以 PBS 代替一抗为阴性对照, 用已知 SS 蛋白阳性的正常胃组织为阳性对照。光镜下观察 5 个以上高倍视野, 计数 500 个细胞中 SS 染色阳性细胞数。

**1.2.2 RT-PCR 方法** 胃组织总 RNA 抽提严格按照试剂盒说明书进行, 并行甲醛变性胶电泳, DU640 紫外分光光

度仪测  $A$  值, 以确定完整性及含量. 反应体系如下: 5×Buffer 5  $\mu$ L、MgSO<sub>4</sub> 1  $\mu$ L、dNTP 0.5  $\mu$ L、Primer mix 1.5  $\mu$ L、AMV 0.5  $\mu$ L、Tf1 0.5  $\mu$ L、模板 RNA 1  $\mu$ L, 加灭菌水至终体积 25  $\mu$ L. 在 PCR 扩增仪 (Perkin Elmer 480) 上 48℃ 45 min 将 RNA 逆转录成 cDNA, 然后 94℃ 预变性 2 min, 均扩增 35 个循环, 反应条件为 94℃ 变性 30 s, 58℃ (SS 退火温度  $T_m = 55^\circ\text{C}$ ) 退火 40 s, 68℃ 延伸 1 min, 最后 68℃ 延伸 7 min. 取 5  $\mu$ L 目的基因和 5  $\mu$ L 各自相应的 GAPDH 的 PCR 产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳. 电泳结果经 Gel Doc 100 型成像仪输入电脑, 应用四星 SX-100 图像分析软件 (上海四星生物技术实业有限公司产品), 对条带进行吸光度峰值下面积积分, 各个目的基因与其相应的 GAPDH 积分之比, 即为该目的基因 mRNA 相对水平.

**统计学处理** 全部数据均以 mean  $\pm$  SD 表示, 组间进行  $t$  检验,  $P < 0.05$  有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 *H pylori* 感染对慢性萎缩性胃炎组织中 SS、hSSTR<sub>2</sub> 和 hSSTR<sub>5</sub> 表达的影响** 在 56 例慢性萎缩性胃炎中, *H pylori* 阳性者 46 例, *H pylori* 阴性者 10 例, *H pylori* 阳性组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达均显著低于 *H pylori* 阴性组 ( $P < 0.001$ ), 而 *H pylori* 阳性组慢性萎缩性胃炎组织中的 hSSTR<sub>2</sub> mRNA 和 hSSTR<sub>5</sub> mRNA 表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化 (表 1).

**2.2 根除 *H pylori* 感染对 SS 蛋白和 mRNA 表达的影响** 46 例 *H pylori* 感染阳性的慢性萎缩性胃炎患者均给予丽珠胃三联片剂 (枸橼酸铋钾、克拉霉素、替硝唑) 治疗, 失访 5 例, 41 例完成试验, 其中 *H pylori* 根除者 33 例, *H pylori* 未被根除者 8 例. *H pylori* 根除组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达较治疗前显著增加 ( $P < 0.001$ ), 而 *H pylori* 未被根除组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达与治疗前比较无明显变化 (表 2).

表1 *H pylori*感染对慢性萎缩性胃炎组织中 SS、hSSTR<sub>2</sub> 和 hSSTR<sub>5</sub> 表达的影响

<i>H pylori</i>	<i>n</i>	SS 蛋白	SS mRNA	hSSTR <sub>2</sub> mRNA	hSSTR <sub>5</sub> mRNA
阳性	46	16.00 $\pm$ 1.50 <sup>b</sup>	0.30 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.28 $\pm$ 0.10	0.25 $\pm$ 0.08
阴性	10	21.38 $\pm$ 1.38	0.57 $\pm$ 0.13	0.23 $\pm$ 0.07	0.27 $\pm$ 0.06

<sup>b</sup> $P < 0.001$  vs *H pylori* 阴性组.

表2 *H pylori*根除前后 SS 蛋白和 mRNA 表达

<i>H pylori</i>	<i>n</i>	SS 蛋白		SS mRNA	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
根除	33	17.30 $\pm$ 1.67	23.16 $\pm$ 2.74 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.09	0.54 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
未根除	8	15.50 $\pm$ 0.76	17.10 $\pm$ 1.30	0.34 $\pm$ 0.12	0.29 $\pm$ 0.04

<sup>b</sup> $P < 0.001$  vs 治疗前.

## 3 讨论

慢性萎缩性胃炎是一种发病率最高的胃癌前病变, 其在胃癌的发生、发展过程中起了重要作用. 大量研究表明幽门螺杆菌是慢性胃炎和胃癌的致病因素, 但是其确切的致病机制尚不完全清楚.

生长抑素是一种由胰岛、胃和小肠黏膜的 D 细胞分泌的多肽类激素, 对胃肠道有广谱的抑制作用. 我们以往的研究发现慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达明显低于正常胃黏膜组织, 而其受体 hSSTR<sub>2</sub> mRNA 在慢性萎缩性胃炎组织中的表达明显高于正常胃黏膜组织, 提示慢性萎缩性胃炎与 SS 及其受体 hSSTR<sub>2</sub> 有关<sup>[1-2]</sup>. *H pylori* 感染是否通过影响 SS 及其受体基因的表达导致慢性萎缩性胃炎尚不清楚. 因此, 我们对慢性萎缩性胃炎中 *H pylori* 感染与 SS 及其受体基因的关系进行了研究. 结果发现, *H pylori* 阳性组萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达均显著低于 *H pylori* 阴性组, 而 *H pylori* 阳性组萎缩性胃炎组织中的 hSSTR<sub>2</sub> mRNA 和 hSSTR<sub>5</sub> mRNA 表达与 *H pylori* 阴性组比较无明显变化. *H pylori* 根除组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达较治疗前显著增加, 而 *H pylori* 未被根除组慢性萎缩性胃炎组织中的 SS 蛋白和 mRNA 表达与治疗前比较无明显变化. 表明 *H pylori* 感染可以抑制生长抑素基因的表达, 及早根除 *H pylori*, 则可以纠正其异常表达. *H pylori* 有可能通过抑制生长抑素基因表达而参与慢性萎缩性胃炎的发生、发展.

我们以前的研究发现 *H pylori* 根除后, 慢性萎缩性胃炎患者的症状基本消失, 胃镜及病理均证实慢性炎症明显减轻或消失, 而 *H pylori* 未根除者, 其症状及炎症未减轻, 个别患者甚至病情加重<sup>[3]</sup>. 其他研究结果也表明根除 *H pylori* 可以阻止或延缓萎缩及肠化生的发生和发展, 从而有利于减少胃癌的发生<sup>[4-6]</sup>.

总之, 我们的研究表明, *H pylori* 感染可以抑制

慢性萎缩性胃炎组织中的生长抑素蛋白和 mRNA 表达, 这可能是 *H. pylori* 感染导致慢性胃炎的重要机制之一. 对 *H. pylori* 感染阳性的慢性萎缩性胃炎, 应积极给予抗 *H. pylori* 治疗. 及早根除 *H. pylori* 可以纠正生长抑素基因的异常表达, 并可以阻止或延缓慢性萎缩性胃炎的发生和发展, 从而降低胃癌发生的危险性.

#### 4 参考文献

- 1 唐卓斌, 刘为纹. 胃黏膜癌变过程中胃泌素、生长抑素蛋白表达及其意义. 中华消化杂志 2001;21:693-694
- 2 唐卓斌, 刘为纹. 生长抑素及其受体基因在胃黏膜癌变过程中的

- 表达. 世界华人消化杂志 2001;9:1453-1455
- 3 唐卓斌, 周子成, 杨建民, 徐采朴. 丽珠胃三联治疗幽门螺杆菌相关性胃炎及溃疡病疗效观察. 第三军医大学学报 2000;22:710-711
  - 4 Goh KL, Parasakthi N, Peh SC, Wong NW, Lo YL, Puthucherry SD. *Helicobacter pylori* infection and non-ulcer dyspepsia: the effect of treatment with colloidal bismuth subcitrate. *Scand J Gastroenterol* 1991;26:1123-1131
  - 5 Valle J, Seppala K, Sipponen P, Kosunen T. Disappearance of gastritis after eradication of *Helicobacter pylori*. A morphometric study. *Scand J Gastroenterol* 1991;26:1057-1065
  - 6 Zhou L, Sung JJ, Lin S, Jin Z, Ding S, Huang X, Xia Z, Guo H, Liu J, Chao W. A five-year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after *H. pylori* eradication. *Chin Med J(Engl)* 2003;116:11-14

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 残胃癌与残胃再发癌的手术治疗

陈俊强, 陆云飞

陈俊强, 陆云飞, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科 广西壮族自治区南宁市 530021

项目负责人: 陈俊强, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路 22 号, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科. gxhans@163.com

收稿日期: 2004-12-07 接受日期: 2004-12-18

### 摘要

目的: 探讨残胃癌和残胃再发癌有效的手术治疗方法.

方法: 回顾性研究了 19 例残胃癌和 8 例残胃再发癌患者的临床病理资料.

结果: 残胃癌和残胃再发癌的可切除率、根治性切除率分别是 84.2%、78.9% 和 62.5%、25%。残胃癌的中数生存期是  $(19.3 \pm 2.4)$ mo, 平均生存期是  $(29.8 \pm 6.0)$ mo, 1、3、5 a 生存率分别为 61.8%、22.6%、13.8%; 其中 15 例根治切除后 1、3、5 a 生存率分别为 80.1%、28.8%、22.4%; 4 例姑息性手术存活均不到 1 a。残胃再发癌的中数生存期是  $(13.0 \pm 4.3)$ mo, 平均生存期是  $(17.5 \pm 4.1)$ mo, 1、3、5 a 生存率分别为 60.8%、9.8%、0%; 6 例姑息性手术存活均不到 2 a。残胃癌和残胃再发癌中根治性切除者的生存时间均显著长于非根治性切除者 ( $P < 0.05$ )。残胃癌和残胃再发癌的生存时间统计学上无显著差异 ( $P = 0.261$ )。

结论: 根治性切除可提高残胃癌和残胃再发癌患者的生存时间, 是有效的治疗方法.

陈俊强, 陆云飞. 残胃癌与残胃再发癌的手术治疗. 世界华人消化杂志 2005; 13(5):677-679

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/677.asp>

### 0 引言

尽管目前残胃癌尚无统一的定义, 但一般认为, 残胃癌是指良性疾病行胃切除术后 10 a 以上在残胃发生的癌及尽管胃切除术后不足 10 a, 但与初次病变无关的癌; 而残胃再发癌是指初次因胃癌行胃部分切除术后 10 a 内于吻合口或缝合线附近发生的癌<sup>[1]</sup>. 前者通常被称为狭义的残胃癌, 而二者的结合则被称为广义的残胃癌<sup>[2]</sup>. 由于残胃癌和残胃再发癌具有与原发胃癌不同的淋巴引流特点, 其治疗上也有其特点, 为此我们对 19 例残胃癌和 8 例残胃再发癌的临床病理及手术治疗等情况进行分析, 探讨其有效的治疗方法.

### 1 材料和方法

1.1 材料 19 例残胃癌, 其中男 15 例, 女 4 例, 平均年龄 62 岁 (36-84 岁); 8 例残胃再发癌, 其中男 6 例, 女 2 例, 平均年龄 53 岁 (46-69 岁). 19 例残胃癌的首次手术情况: 胃溃疡 12 例 (63.2%), 十二指肠溃疡 7 例 (36.8%). Billroth I 式 6 例, Billroth II 式 13 例. 距首次手术间隔时间, 最长 26 a, 最短 7 a, 平均 18.6 a. 8 例残胃再发癌的首次手术情况: 8 例均为 Billroth II 式吻合, 距首次手术间隔时间, 最长 5 a, 最短 8 mo, 平均 3.2 a. 根据抗癌国际联盟 (UICC) 1997 年公布的 TNM 分期进行胃癌的分期, 组织学分型采用 WHO 标准.

1.2 方法 19 例残胃癌患者中行根治性手术 15 例, 其中残胃全切 + 胰体尾切除 + 脾切除 1 例, 残胃全切 + 脾切

除+横结肠部分切除2例,残胃全切+脾切除2例,残胃全切10例.姑息性手术4例,其中胃空肠吻合术2例,剖腹探查术1例,姑息性肿块切除1例.8例残胃再发癌患者中行根治性手术2例,其中残胃全切+胰体尾切除+脾切除1例,残胃全切+脾切除1例.姑息性手术6例,其中姑息性肿块切除3例,空肠造瘘1例,剖腹探查术2例.根治性切除者其消化道重建均采用Roux-en-Y食管空肠吻合术.

**统计学处理** 根据Kaplan-Meier方法计算累积生存率,使用Log rank test比较各组间生存时间有无显著差异, $P < 0.05$ 有显著意义.统计计算借助于SPSS10.0完成.

## 2 结果

**2.1 临床病理** 所有患者确诊时均伴有不同程度的临床症状,以上腹饱胀和黑便最常见,其他为恶心呕吐、嗝气、上腹隐痛不适、食欲下降和进食梗噎感等.

本组残胃癌发生部位以吻合口最常见(12例),其他依次为胃底贲门(6例)、病变累及整个残胃1例.大体分型Borrmann I型2例,Borrmann II型5例,Borrmann III型9例,Borrmann IV型3例.病理类型:高分化腺癌3例,中分化腺癌2例,低分化腺癌12例,黏液癌2例.淋巴结转移阳性11例.I期1例,II期2例,III期7例,IV期11例.

本组残胃再发癌发生部位:残胃体4例,吻合口3例,胃底贲门1例.大体分型Borrmann II型2例,Borrmann III型6例.病理类型:中分化腺癌1例,低分化腺癌6例,黏液癌1例.淋巴结转移阳性5例.II期1例,III期3例,IV期4例.两组的淋巴结转移以1-4组和7组淋巴结转移为主.

**2.2 残胃癌和残胃再发癌生存情况** 本组27例患者均获随访.19例残胃癌的中数生存期是 $(19.3 \pm 2.4)$ mo,平均生存期是 $(29.8 \pm 6.0)$ mo,1、3、5 a生存率分别为61.8%、22.6%、13.8%,其中15例根治切除后1、3、5 a生存率分别为80.1%、28.8%、22.4%.4例姑息性手术存活均不到1 a.根治性切除组与非根治性切除组的生存时间有显著差异( $P < 0.0001$ ).

8例残胃再发癌的中数生存期是 $(13.0 \pm 4.3)$ mo,平均生存期是 $(17.5 \pm 4.1)$ mo,1、3、5 a生存率分别为60.8%、9.8%、0%.6例姑息性手术存活均不到2 a.根治性切除组与非根治性切除组的生存时间有显著差异( $P = 0.0334$ ).

残胃癌和残胃再发癌的生存时间统计学上无显著差异( $P = 0.261$ ).

## 3 讨论

广义残胃癌的总发病率为0.8-8.9%,远较普通人的胃癌发病率为高.狭义残胃癌与残胃再发癌约各占一半<sup>[2-3]</sup>.本组中,残胃癌和残胃再发癌的发病率是4.8%(27/563),与文献报道的一致.

残胃目前是公认的胃癌癌前状态.研究认为,残胃癌

和残胃再发癌可能具有某些共同的发病机制:(1)胃切除术后十二指肠胃的反流,使胃黏膜受到强烈的刺激和损害,其中Billroth II式比Billroth I式术后胰液及胆汁反流更严重<sup>[4-6]</sup>.(2)幽门螺杆菌与胃癌的发生有关,胃切除术后十二指肠胃反流可促进该菌的生长<sup>[7-9]</sup>.本组中,残胃癌19例中的13例、残胃再发癌8例中的全部初次手术时胃大切采用Billroth II式,这提示我们在进行消化道重建时应尽量采用可减少或避免胆汁反流的Billroth I式或Billroth II+Braun吻合,以减少残胃癌发生的可能.

然而,残胃癌和残胃再发癌的发病机制略有不同,有研究认为,良性病变引起的残胃癌是一种新的病变,而恶性病变胃切除术后残胃再发癌可能是一种异时性的多发病变,具体表现在他们二者初次手术后发病间期、肿瘤部位和组织学类型略有不同<sup>[10-11]</sup>.Tanigawa *et al*<sup>[10]</sup>研究显示,发生残胃癌的平均时间间隔 $(25.8 \text{ a})$ 长于残胃再发癌 $(10.6 \text{ a})$ .本组中,残胃癌距首次手术间隔时间(平均 $18.6 \text{ a}$ )显著长于残胃再发癌(平均 $3.2 \text{ a}$ ),与文献报道的一致.至于发病部位,残胃癌以吻合口最常见(12/19),而残胃再发癌以残胃体(4/8)最常见,也与文献<sup>[10]</sup>报道的一致.这些差异可能正是他们不同发病机制在临床上的具体表现.

以往认为,由于残胃癌和残胃再发癌患者就诊时多属晚期,其切除率一般较低.但近年来,随着手术技巧的提高及对残胃癌和残胃再发癌浸润机制认识的深入,其切除率有所提高.Piso *et al*<sup>[12]</sup>报道可切除率为66.9%,根治性切除率为58.7%(行全胃切除+系统的淋巴结清扫),根治性切除术后5 a生存率为40.7%,认为全胃切除+系统淋巴结清扫是患者获得治愈的基础.本组中,19例残胃癌的可切除率是84.2%( $n = 16$ ),根治性切除率是78.9%( $n = 15$ );8例残胃再发癌的可切除率是62.5%( $n = 5$ ),根治性切除率是25%( $n = 2$ ).残胃癌和残胃再发癌根治性切除者生存时间显著高于非根治性切除者( $P < 0.05$ ),说明不管是残胃癌还是残胃再发癌,根治性切除均可提高患者的生存时间,是有效的治疗方法.

研究显示,残胃的淋巴引流主要有以下途径:(1)逆向引流:首次手术胃左动脉被切断,沿胃左动脉的淋巴流改向贲门右走行,再转向腹腔动脉周围;(2)胃短血管途径:切断了胃左动脉,阻断了淋巴液向腹腔动脉旁淋巴结的引流,而通过胃短血管周围淋巴结向脾门淋巴结和脾动脉周围淋巴结的引流未受到影响;(3)沿吻合的十二指肠、空肠及其系膜的淋巴引流途径;(4)纵隔内的淋巴引流.淋巴结转移以第1、2、3、4组最多,其次是第11、10、7、9组淋巴结<sup>[2]</sup>.由于残胃癌具有上述淋巴引流特点,因此其手术方法的选择也应依从其淋巴引流而作出选择.本组中,淋巴结转移也以1-4组和7组为主,与文献报道一致.我们在术中均认真清扫胃左动脉、胃后动脉和脾动脉周围的淋巴结,对于首次手术行Billroth II式胃大切者则注意清扫十二指肠、空肠及其系膜淋巴结,对

于邻近的胰、脾或横结肠受侵犯者则联合行胰体尾、脾切除或横结肠部分切除,从生存分析结果来看其疗效优于姑息性切除者,因此我们认为对于残胃癌和残胃再发癌,只要患者一般情况好,无广泛的远处转移,残胃切除联合必要的脏器切除对于提高患者的生存时间是有帮助的。

一般认为,与原发胃癌尤其是胃上部癌相比,残胃癌和残胃再发癌具有较差的预后。Bruno *et al*<sup>[13]</sup> 将48例贲门癌、21例残胃癌和298例远端胃癌进行了比较,结果显示,贲门癌、残胃癌和远端胃癌的5 a生存率分别为23.2%、17.4%和45.0%。本组中,狭义的残胃癌行根治性切除后其5 a生存率达22.4%,低于文献报道的胃癌施行根治术后的5 a生存率30-40%<sup>[14]</sup>。但Thorban *et al*<sup>[15]</sup>认为,只要行病灶切除和足够的淋巴结清扫,残胃癌可获得与原发胃癌同样的预后。

#### 4 参考文献

- 1 王靖,韩少良,邵永孚.残胃癌的淋巴结转移规律与外科治疗特点.国外医学.肿瘤学分册 2002;29:297-299
- 2 Han SL, Hua YW, Wang CH, Ji SQ, Zhuang J. Metastatic pattern of lymph node and surgery for gastric stump cancer. *J Surg Oncol* 2003;82:241-246
- 3 陈峻青.残胃癌早期诊断与现代外科治疗.中国实用外科杂志 2004;24:394-395
- 4 Zhang C, Liu ZK, Yu PW. Effects of bile reflux and intragastric microflora changes on lesions of remnant gastric mucosa after gastric operation. *World J Gastroenterol* 2004;10:1537-1539
- 5 Lorusso D, Linsalata M, Pezzolla F, Berloco P, Osella AR, Guerra V, Di Leo A, Demma I. Duodenogastric reflux and gastric mucosal polyamines in the non-operated stomach and in the gastric remnant after Billroth II gastric resection. A role in gastric carcinogenesis? *Anticancer Res* 2000;20:2197-2201
- 6 朱永湘,邱火良,何博华,谭国钊,钱聚标,肖兰凤.残胃癌若干问题的探讨(附26例报道).胃肠病学和肝病杂志 2003;12:299-300
- 7 Nakagawara H, Miwa K, Nakamura S, Hattori T. Duodenogastric reflux sustains *Helicobacter pylori* infection in the gastric stump. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:931-937
- 8 Fukuhara K, Osugi H, Takada N, Takemura M, Lee S, Morimura K, Taguchi S, Kaneko M, Tanaka Y, Fujiwara Y, Nishizawa S, Fukushima S, Kinoshita H. Effect of *H pylori* on COX-2 expression in gastric remnant after distal gastrectomy. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1515-1518
- 9 Baba M, Konno H, Tanaka T, Kamiya K, Baba S, Sugimura H, Nakamura S. Relationship of p53 and *Helicobacter pylori* to clinicopathological features of human remnant stomach cancer after gastric surgery for primary gastric cancer. *Oncol Rep* 2001;8:831-834
- 10 Tanigawa N, Nomura E, Niki M, Shinohara H, Nishiguchi K, Okuzawa M, Toyoda M, Morita S. Clinical study to identify specific characteristics of cancer newly developed in the remnant stomach. *Gastric Cancer* 2002;5:23-28
- 11 Matsui N, Yao T, Akazawa K, Nawata H, Tsuneyoshi M. Different characteristics of carcinoma in the gastric remnant: histochemical and immunohistochemical studies. *Oncol Rep* 2001;8:17-26
- 12 Piso P, Meyer HJ, Edris C, Jahne J. Surgical therapy of gastric stump carcinoma-a retrospective analysis of 109 patients. *Hepatogastroenterology* 1999;46:2643-2647
- 13 Bruno L, Nesi G, Montinaro F, Carassale G, Lassig R, Boddi V, Bechi P, Cortesini C. Clinicopathologic findings and results of surgical treatment in cardiac adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2000;74:33-35
- 14 徐惠绵,陈峻青,王舒宝.胃癌的淋巴结转移规律及其意义.中国肿瘤临床 2001;28:465-468
- 15 Thorban S, Bottcher K, Etter M, Roder JD, Busch R, Siewert JR. Prognostic factors in gastric stump carcinoma. *Ann Surg* 2000;231:188-194

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 第一届全球华人消化内镜学术大会征文通知

本刊讯 2005-10-14/2005-10-16将在上海隆重召开由中华消化内镜学会主办、第二军医大学承办的第一届全球华人消化内镜学术大会。大会的官方语言为中文和英文,现将会以征文有关事项通知如下:

### 1 会议内容

有关消化内镜基础和临床应用研究相关内容:包括上消化道内镜、大肠镜、超声内镜、小肠镜、胶囊内镜、ERCP 的诊断与治疗各个领域。

### 2 征文要求

(1)所投论文须为尚未在国内外相关领域杂志刊出或尚未被其他国际或国内学术会议收录的摘要。(2)凡报送的论文要求中英文摘要(中文摘要1000字以内)各一份,英文摘要的格式及具体要求请参考大会论文摘要投稿须知。此外从大会的官方网站 <http://www.csde.org.cn/wcge/> 直接下载论文摘要表。(3)摘要的内容可以电子邮件的形式发至WCGE2005秘书处收;也可以直接邮寄打印稿寄3.5寸软盘。(4)所有被大会接受的论文摘要都将被收入大会论文集。(5)截稿日期:2005-05-31。(6)大会秘书处的联系方式:北京市东四西大街42号中华医学会学术会务部 刘亚君;邮编:100710, 电话:010-65251575。

# 暴发性胰腺炎67例

薛平, 黄宗文, 张鸿彦, 郭佳, 赵建蕾, 郑晓梅

薛平, 黄宗文, 张鸿彦, 郭佳, 赵建蕾, 郑晓梅, 四川大学华西医院中西医结合科 四川省成都市 610041  
四川省中医药管理局科研基金资助, No. 200212  
项目负责人: 黄宗文, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院中西医结合科, huangzongwen@medmail.com.cn  
电话: 028-85422556  
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-12-18

## 摘要

**目的:** 探讨暴发性胰腺炎的临床特征及治疗措施。

**方法:** 回顾性分析我院1996/2003年收治的重症急性胰腺炎1161例中72 h内出现多脏器功能衰竭67例, 按病程长短分为早期组和晚期组, 进行对比分析。早期治疗: 尽快液体复苏, 维持有效血液循环; 发病后尽早ICU辅助呼吸治疗; 高血脂者尽快降血脂; 促进胃肠蠕动。晚期治疗: 加强营养支持, 防治感染。

**结果:** 暴发性胰腺炎以暴饮暴食、高脂饮食及酗酒等因素(38.8%)为主要诱因。死亡率为62.7%。早期组APACHE II评分明显高于晚期组( $P = 0.016$ ), CT评分早期组低于晚期组( $P = 0.017$ ), 早期组血清三酰甘油水平明显高于晚期组( $P = 0.024$ ); 暴发性胰腺炎的ARDS及肾功能衰竭发生率分别为97.0%和67.2%, 早期组的肾功能衰竭及休克的发生率明显高于晚期组( $P < 0.05$ ), 晚期组的低蛋白血症发生率及感染率明显高于早期组( $P < 0.05$ )。感染24例, 死亡15例(62.5%)。有3 d内死亡(28.4%)和14 d后死亡(17.9%)2个高峰。

**结论:** 暴发性胰腺炎早期死于全身炎症反应综合征引起的多脏器功能衰竭, 晚期死于感染引起的多脏器功能衰竭, 早期识别暴发性胰腺炎有助于提高其治愈率。

薛平, 黄宗文, 张鸿彦, 郭佳, 赵建蕾, 郑晓梅. 暴发性胰腺炎67例. 世界华人消化杂志 2005;13(5):680-681  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/680.asp>

## 0 引言

我院经过20余年的努力, 对重症急性胰腺炎(SAP)的治疗取得了进展, 将其死亡率从1980年代的40.5%降到了10.8%<sup>[1]</sup>, 在病死SAP中, 绝大部分起病早期就出现了难以控制的多脏器功能障碍(MODS)。可将发病72 h内出现器官功能障碍的SAP称为暴发性胰腺炎(fulminant acute pancreatitis, FAP)<sup>[2]</sup>。本文回顾性总结我院1996/2003年收治的FAP 67例, 现将病因、临床特征及治疗措施报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 1996-2003年收治重症急性胰腺炎1161例,

其中暴发性胰腺炎67例, 男45例, 女22例, 年龄24-76(平均 $47.9 \pm 13.8$ )岁, 治愈13例, 自动出院12例, 死亡42例。本组病例均符合亚特兰大会议的SAP的诊断标准, FAP的诊断<sup>[3]</sup>: SAP在发病后72 h内出现以下之一者: (1) 肾功能衰竭(血清肌酐 $>176.8 \mu\text{mol/L}$ ); (2) 呼吸衰竭( $\text{PaO}_2 \leq 8\text{kp}$ ); (3) APACHE II评分 $\geq 20$ 分; (4) 腹腔渗液超过3000 mL和后腹膜严重积液; (5) Glasgow $<8$ 分。

1.2 方法 为了便于分析, 本研究按病程长短将67例FAP, 分成两组。早期组: 病程在7 d内, 包括7 d内死亡和自动出院的病例, 共35例, 男22例, 女13例, 年龄26-75(平均 $49.1 \pm 14.8$ )岁。晚期组: 病程在7 d以上, 共32例, 男23例, 女9例, 年龄24-76(平均 $46.5 \pm 12.7$ )岁。

**统计学处理** 运用SPSS软件,  $t$ 检验和 $\chi^2$ 检验

## 2 结果

共死亡42例(62.7%), 早期组死亡27例(40.3%), 其中3 d内死亡19例(28.4%), 3-7 d死亡8例(11.9%), 因病情恶化自动出院8例(11.9%); 晚期组死亡15例(22.39%), 因经济原因自动出院3例(4.5%), 治愈14例(20.9%), 其中, 7-14 d死亡3例(4.5%), 14 d以后死亡12例(17.9%)。暴饮暴食、高脂饮食及酗酒等26例(38.8%), 胆系疾病13例(19.4%), 妊娠2例(3.0%), 化疗1例(1.5%), 原因不明的25例(37.3%)。早期组和晚期组发病诱因无明显差别( $P > 0.05$ )。早期组院外病程 $21.3 \pm 13.5$  h, 晚期组院外病程 $23.8 \pm 11.1$  h, 两组无明显差别( $P = 0.404$ )。早期组的Ranson评分和晚期组没有明显差异( $P = 0.633$ ), CT评分明显低于晚期组( $P = 0.017$ ), APACHE II评分明显高于晚期组( $P = 0.016$ , 表1)。早期组和晚期组血糖和血清蛋白的值无差异( $P > 0.05$ ), 但血清三酰甘油水平高于晚期组( $P = 0.024$ , 表1)。

表1 早期组和晚期组相关参数的比较(mean $\pm$ SD)

相关参数	早期( $n = 35$ )	晚期( $n = 32$ )
Ranson 评分	$4.86 \pm 1.73$	$5.06 \pm 1.77$
CT 评分	$6.44 \pm 2.19$	$8.60 \pm 2.20^b$
APACHE II 评分	$17.85 \pm 6.22$	$14.56 \pm 4.40^b$
血糖(mmol/L)	$19.27 \pm 12.15$	$17.25 \pm 8.60$
甘油三酯(mmol/L)	$9.01 \pm 6.85$	$4.92 \pm 4.42^b$
白蛋白(g/L)	$25.46 \pm 4.83$	$25.55 \pm 4.17$

<sup>b</sup>  $P < 0.01$  vs 早期。

FAP 72 h 内出现脏器功能受损依次为:ARDS 65 例(97.0%), 肾功能衰竭 45 例(67.2%), 肝损伤 37 例(55.2%), 心衰 32 例(47.8%), 休克 30 例(44.8%), 脑病 18 例(26.9%), 消化道出血 15 例(22.4%)。两组器官衰竭数目无统计学差异( $P = 0.691$ )。早期组和晚期组 ARDS、心衰及肝功能受损的发生率无明显差异( $P > 0.05$ ), 但早期(7 d 内)肾功能衰竭及休克的发生率明显高于晚期组( $P < 0.05$ ); 而消化道、感染明显低于晚期组( $P < 0.05$ , 表 2)。

表 2 早期组和晚期组并发症的比较

并发症	早期( $n = 35$ )	晚期( $n = 32$ )
器官衰竭 $n$	$3.88 \pm 1.34$	$4.03 \pm 1.67$
ARDS	33(94.3)	32(100.0)
肾功能衰竭	29(82.9)	16(50.0) <sup>a</sup>
休克	23(65.7)	7(21.9) <sup>a</sup>
心衰	17(48.6)	15(46.9)
肝功能受损	20(57.1)	17(53.1)
脑病	11(31.4)	7(21.9)
消化道出血	5(14.3)	10(31.3)
低蛋白血症	21(60.0)	30(93.8) <sup>a</sup>
感染	1(2.9)	24(75.0) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 早期。

### 3 讨论

FAP 是 SAP 中的特重型, 国外学者称之为早期重症急性胰腺炎(early severe acute pancreatitis, ESAP), 并认为其临床特点是胰腺广泛坏死, 并发症多, 可发展为难治性器官功能障碍<sup>[4]</sup>。其 3 d 内死亡率为 23.3%, 7 d 内死亡率高达 53.3%<sup>[5]</sup>, 本组 FAP 3 d 内死亡率为 28.4%, 7 d 内病死 40.3%; 7-14 d 死亡率为 4.5%, 14 d 后死亡率为 17.9%, 有明显的 2 个病死高峰期, 早期死亡率高峰可能与 SIRS 导致的 MODS 有关; 晚期死亡率高峰可能与感染导致的 MODS 有关。早期组和晚期组诱因无明显差异。暴饮暴食、脂餐及酗酒等是其发病的主要诱因(38.8%), 胆系疾病占 19.4%。与 SAP 的主要病因是胆系疾病, 有明显差异。FAP 死亡率为 62.7%, 明显高于我院同期 SAP 的死亡率(10.8%)<sup>[1]</sup>。各脏器功能衰竭的发生率依次是 ARDS(97.0%), 肾功能衰竭(67.2%), 肝功能衰竭(55.2%), 心衰(47.8%), 休克(44.8%), 脑病(26.9%)及消化道出血(22.4%)。值得一提的是: 本组肾功能衰竭明显高于报道 SAP 的(8.5-13.0%)<sup>[6]</sup>, 且仅次于 ARDS, 这可能与大量第三腔隙液的形成及血清游离脂肪酸的组织毒性, 导致肾功能损害有关。

早期组 APACHE II 评分高于晚期组( $P = 0.016$ ), 可能与早期死亡 FAP 的脏器功能受损比未死亡的 FAP 严重有关。早期组 CT 评分低于晚期组( $P = 0.017$ ), 可能与病

程早期 CT 显示胰腺坏死尚不明显有关, 多数学者认为: SAP 增强 CT 显示胰腺坏死在发病 2-3 d 以后才明显, 也有可能 FAP 的病情的严重程度与胰腺的坏死范围无正相关, 而与机体是否有过度的 SIRS 反应, 导致脏器功能受损, 发生 MODS 有关。早期组的血清三酰甘油水平明显高于晚期组( $P = 0.024$ ), 这可能与血清高三酰甘油导致血清游离脂肪酸水平升高, 从而促进 SAP 的病情恶化有关<sup>[7]</sup>。早期组休克的发生率明显高于晚期组( $P = 0.000$ ), 可能与病情恶化比晚期组快, 造成有效血液循环量迅速减少有关。早期组肾功能衰竭的发生率明显高于晚期组( $P = 0.008$ ), 可能与其休克造成的肾前性肾功能衰竭及游离脂肪酸等对肾小球的破坏作用造成的肾性肾功能不全有关。晚期组的低蛋白血症及感染发生率明显高于早期组, 可能与 FAP 早期发生过度的 SIRS, 机体处于高代谢状态, 造成蛋白质的过度分解, 再加上长期禁食有关。由于早期的过度免疫反应, 导致后期免疫低下以及营养代谢障碍、ICU 的支持治疗、胰腺坏死组织形成及腔隙积液, 导致后期的感染, 感染又导致 MODS, 从而导致 FAP 晚期的病死高峰。

FAP 是 SAP 中的极重类型, 早期 ARDS、肾功能衰竭及休克的发生率极高, 明显高于 SAP, 尽早识别有助于提高治愈率。笔者认为其早期治疗的关键是: 尽快体液复苏, 维持有效血液循环; 出现 ARDS 时, 尽早转 ICU, 呼吸机辅助呼吸治疗; 高血脂的尽快降血脂, 减轻 SIRS, 减少肾功能的损害; 促进胃肠蠕动, 缓解腹腔高压及减少肠道菌群移位和肠源性内毒素的吸收。晚期治疗: 主要是加强营养支持, 防治感染, 降低感染导致的第 2 个病死高峰的风险。总之, FAP 是 SAP 早期病死及死亡率居高不下的原因之一, 也是我们临床工作的难点, 其发生的机制尚有待于研究, 如果我们能及时、准确的识别 FAP, 正确掌握其早期和晚期的病理生理特点及其病死原因, 有针对性的治疗, 有望降低 FAP 及 SAP 的死亡率。

### 4 参考文献

- 1 刘续宝, 蒋俊明, 黄宗文, 田伯乐, 胡伟明, 夏庆, 陈光远, 李全生, 袁朝新, 罗传新, 严律南, 张肇达. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎的临床研究(附 1367 例报告). 四川大学学报(医学版) 2004;35: 204-208
- 2 孙家邦, 朱斌, 张健. 暴发性胰腺炎诊治关键探讨. 中国实用外科杂志 2003;23:53-55
- 3 毛恩强, 汤耀卿, 张圣道. 进一步改善重症急性胰腺炎预后的探讨. 中国实用外科杂志 2003;23:50-52
- 4 Isenmann R, Rau B, Beger HG. Early severe acute pancreatitis: characteristics of a new subgroup. *Pancreas* 2001;22:274-278
- 5 Tao HQ, Zhang JX, Zou SC. Clinical characteristics and management of patients with early acute severe pancreatitis: Experience from a medical center in China. *World J Gastroenterol* 2004;10:919-921
- 6 Zhu AJ, Shi JS, Sun XJ. Organ failure associated with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2570-2573
- 7 Mao EQ, Tang YQ, Zhang SD. Formalized therapeutic guideline for hyperlipidemic severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2622-2626

## 中药汤剂联合UDCA治疗非酒精性脂肪肝

白洁, 史美媛, 白云驰, 闫素珍, 赵利

白洁, 史美媛, 白云驰, 闫素珍, 赵利, 华北煤炭医学院开滦医院  
河北省唐山市 063000

项目负责人: 白洁, 063000, 河北省唐山市新华东道57号, 华北煤炭医学院  
开滦医院中西医结合肝胆病科。

电话: 0315-3025921

收稿日期: 2004-12-08 接受日期: 2005-01-13

### 摘要

**目的:** 采用中西医结合方法治疗非酒精性脂肪肝, 观察临床疗效。

**方法:** 选择106例非酒精性脂肪肝患者, 按每日就诊先后顺序随机分为中药汤剂组(C组)、中药汤剂加熊去氧胆酸组(C+U组)和护肝片组(H组)。C组以清热利湿、活血解郁为治则, 予自拟中药方剂“保肝降脂汤”口服, C+U组予同样中药方剂加熊去氧胆酸口服, H组予护肝片口服, 疗程均为3 mo。分别于治疗前后检测患者的肝功能、血脂, 并行肝脏的B超、CT影像学检查, 分析、比较三种治疗方案的临床效果。

**结果:** 治疗后, C+U组肝功能血清酶水平明显低于另两组(ALT:  $622.29 \pm 13.17$  nkat/L vs  $728.98 \pm 15.17$  nkat/L 和  $622.29 \pm 13.17$  nkat/L vs  $693.97 \pm 15.17$  nkat/L; AST:  $511.77 \pm 12.00$  nkat/L vs  $650.13 \pm 11.50$  nkat/L 和  $511.77 \pm 12.00$  nkat/L vs  $667.80 \pm 12.34$  nkat/L; ALP:  $777.99 \pm 11.84$  nkat/L vs  $1563.31 \pm 16.00$  nkat/L 和  $777.99 \pm 11.84$  nkat/L vs  $1605.32 \pm 20.1$  nkat/L;  $\gamma$ -GGT:  $1605.32 \pm 20.17$  nkat/L vs  $731.81 \pm 15.00$  nkat/L 和  $1605.32 \pm 20.17$  nkat/L vs  $756.32 \pm 14.17$  nkat/L;  $P < 0.01$ ), C组与H组比较, 各血清酶水平相近(ALT:  $728.98 \pm 15.17$  nkat/L vs  $693.97 \pm 15.17$  nkat/L; AST:  $650.13 \pm 11.50$  nkat/L vs  $667.80 \pm 12.34$  nkat/L; ALP:  $1563.31 \pm 16.00$  nkat/L vs  $1605.32 \pm 20.17$ ;  $\gamma$ -GGT:  $731.81 \pm 15.00$  nkat/L vs  $756.32 \pm 14.17$  nkat/L;  $P > 0.05$ ); C+U组、C组的总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)较治疗前均明显下降(C+U组治疗前后 TC:  $7.85 \pm 0.08$  mmol/L vs  $2.47 \pm 0.06$  mmol/L, TG:  $4.47 \pm 0.05$  mmol/L vs  $0.79 \pm 0.02$  mmol/L; C组治疗前后 TC:  $7.92 \pm 0.06$  mmol/L vs  $4.37 \pm 0.07$  mmol/L, TG:  $4.34 \pm 0.05$  mmol/L vs  $2.46 \pm 0.05$  mmol/L;  $P < 0.01$ ), C+U组下降较C组更为显著( $2.47 \pm 0.06$  mmol/L vs  $4.37 \pm 0.07$  mmol/L 和  $0.79 \pm 0.02$  mmol/L vs  $2.46 \pm 0.05$  mmol/L,  $P < 0.01$ ); 影像学的改善为 C+U组优于C组, C组优于H组, 三组脂肪肝消除率分别为 41.7%、27.5% 和 6.67% ( $P < 0.05$ ); 三组治疗方法的综合疗效显示, C+U组、C组的治愈率和总有效率均高于H组, (治愈率: 30.6% vs 3.3% 和 20.0% vs 3.3%; 总有效率: 94.4% vs 56.7% 和 82.5% vs 56.7%;  $P < 0.01$ ); C+U组的治愈率和总有效率高于C组, 但无统计学意义。

**结论:** “保肝降脂汤”治疗非酒精性脂肪肝, 在改善肝功

能的同时, 能有效地降低血脂, 消除或减轻脂肪肝; 该方剂与熊去氧胆酸合用, 则更能显著地降低肝功能血清酶和血脂水平, 肝脏的影像学改变也更加明显减轻, 从而进一步提高疗效。

白洁, 史美媛, 白云驰, 闫素珍, 赵利. 中药汤剂联合 UDCA 治疗非酒精性脂肪肝. 世界华人消化杂志 2005;13(5):682-685

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/682.asp>

### 0 引言

脂肪肝是由多种疾病和病因引起的肝脏脂肪性病变。近年来, 随着人们生活水平的提高, 脂肪肝的发病人数日趋增多, 且已成为肝纤维化和肝硬化重要的前期病变之一。本研究选择非酒精性脂肪肝患者 106 例, 随机分成三组, 分别采用自拟中药方剂“保肝降脂汤”、中药方剂加熊去氧胆酸(UDCA)和护肝片三种方法治疗, 观察临床效果, 以探讨非酒精性脂肪肝的最佳治疗方案。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择非酒精性脂肪肝患者 106 例, 诊断均符合 2001 年中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学会制定的非酒精性脂肪肝诊断标准<sup>[1]</sup>。患者按每日就诊先后顺序随机分为中药汤剂组(C组)、中药汤剂加熊去氧胆酸组(C+U组)和护肝片组(H组)。C组 40 例, 其中男性 17 例, 女性 23 例; 年龄 21-73 岁, 平均 51 岁; 其中单纯性脂肪肝 11 例, 非酒精性脂肪性肝炎 23 例, 脂肪性肝纤维化或肝硬化 6 例; 合并高血压、糖尿病、高脂血症、胆囊结石病等 28 例。C+U 组 36 例, 其中男性 15 例, 女性 21 例; 年龄 19-76 岁, 平均 52 岁; 其中单纯性脂肪肝 10 例, 非酒精性脂肪性肝炎 21 例, 脂肪性肝纤维化或肝硬化 5 例; 合并高血压、糖尿病、高脂血症、胆囊结石病等 26 例。H 组 30 例, 其中男性 13 例, 女性 17 例; 年龄 16-71 岁, 平均 50 岁; 其中单纯性脂肪肝 8 例, 非酒精性脂肪性肝炎 18 例, 脂肪性肝纤维化或肝硬化 4 例; 合并高血压、糖尿病、高脂血症、胆囊结石病等 22 例。各组患者在性别、年龄、临床分型及并发症等方面差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。

**1.2 方法** C 组以清热利湿、活血解郁为治则, 予自拟中药方剂“保肝降脂汤”(主要成分为柴胡、茵陈、双花、泽泻、黄芩、草决明、大黄、山楂、虎杖、丹参等, 随证加减)口服, 100 mL/次(含干药 65 g), 2 次/d; C+U 组予同样中药方剂加 UDCA 口服, UDCA 150 mg/次, 3 次/d; H 组予护肝片(由黑龙江葵花药业股份有限公司生产, 批号: 国药准字 Z20003336)口服, 4 片/次, 3 次/d。疗程均为 3 mo。

表1 各组治疗前后肝功能变化(mean  $\pm$  SD, nkat/L)

组别		ALT	AST	ALP	$\gamma$ -GGT
C组(n=40)	治疗前	1 242.75 $\pm$ 23.17	1 108.89 $\pm$ 16.67	2 946.09 $\pm$ 17.00	1 421.95 $\pm$ 12.50
	治疗后	728.98 $\pm$ 15.17 <sup>bd</sup>	650.13 $\pm$ 11.50 <sup>bd</sup>	1 563.31 $\pm$ 16.00 <sup>bd</sup>	731.81 $\pm$ 15.00 <sup>bd</sup>
C+U组(n=36)	治疗前	1 255.42 $\pm$ 14.50	1 098.05 $\pm$ 17.67	3 000.60 $\pm$ 17.84	1 436.29 $\pm$ 14.84
	治疗后	622.29 $\pm$ 13.17 <sup>bcdh</sup>	511.77 $\pm$ 12.00 <sup>bcdh</sup>	667.80 $\pm$ 12.34 <sup>bcdh</sup>	1 605.32 $\pm$ 20.17 <sup>bcdh</sup>
H组(n=30)	治疗前	1 239.75 $\pm$ 14.00	1 065.55 $\pm$ 15.67	2 969.43 $\pm$ 16.67	1 414.28 $\pm$ 15.50
	治疗后	693.97 $\pm$ 15.17 <sup>bd</sup>	667.80 $\pm$ 12.34 <sup>bd</sup>	1 605.32 $\pm$ 20.17 <sup>bd</sup>	756.32 $\pm$ 14.17 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 本组治疗前; <sup>d</sup> $P < 0.01$ , 治疗后三组间比较; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 治疗后H组; <sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 治疗后C组。

1.2.1 血清学检测 于清晨采取空腹血, 盲法检测患者的肝功能、血脂。检测方法采用生化分光法, 试剂盒购自德国利德曼公司。

1.2.2 影像学检查 治疗前后, 行肝脏的B超、CT检查, 观察肝脏的影像学改变。

1.2.3 疗效判定标准 综合疗效判定: (1)痊愈: 血生化指标(肝功能、血脂)和B超、CT影像学表现均转为正常。(2)好转: 血生化指标(肝功能、血脂)仍高于正常值但较治疗前降低, B超、CT影像学仍有异常改变, 但较治疗前好转, 肝CT值有所升高; 或血生化指标(肝功能、血脂)和B超、CT影像学改变中有一项以上(包括一项)未转为正常而其他指标转为正常。(3)无效: 血生化指标(肝功能、血脂)和B超、CT影像学改变与治疗前相比无改善或加重。影像学诊断结合B超和CT结果, 以CT值作为判断病变程度的主要依据。根据B超特征判断病变程度<sup>[2]</sup>: (1)轻度脂肪肝: 光点细密, 近场回声增强, 远场回声轻度衰减, 血管结构清晰。(2)中度脂肪肝: 光点细密, 前场回声增强, 远场衰减明显, 血管结构不清晰。(3)重度脂肪肝: 光点细密, 前场回声显著增强, 远场回声显著衰减, 血管结构不能辨认。根据CT表现判断病变程度<sup>[1]</sup>: (1)轻度: 肝脏密度降低, CT值稍低于脾脏, 肝/脾CT比值 $\leq 1.0$ 。(2)肝/脾CT比值 $\leq 0.7$ , 肝内血管显示不清。(3)肝脏密度显著降低甚至呈负值, 肝/脾CT比值 $\leq 0.5$ , 肝内血管清晰可见。

**统计学处理** 所有检查项目均采用盲法检测并由专职统计人员进行统计学处理。治疗前后肝功能、血脂的比较用配对 $t$ 检验; 治疗前三组间肝功能、血脂的比较用方差分析; 治疗后三组间肝功能、血脂的比较用方差分析及 $q$ 检验; 治疗前后三组间影像学变化的比较用 $\chi^2$ 检验; 综合疗效的比较用秩和检验。

## 2 结果

2.1 肝功能变化 疗程结束后, C组、C+U组和H组患者的肝功能血清酶水平均有不同程度下降, 统计学分析有显著性差异( $P < 0.01$ ); 治疗后C+U组各血清酶水平明显低于另两组, 统计学分析有显著性差异( $P < 0.01$ ); 治疗后C组各血清酶水平与H组相近, 统计学分析无显著性差异( $P > 0.05$ )。(表1)

表2 各组治疗前后血脂变化(mean  $\pm$  SD, mmol/L)

组别		TC	TG
C组(n=40)	治疗前	7.92 $\pm$ 0.06	4.34 $\pm$ 0.05
	治疗后	4.37 $\pm$ 0.07 <sup>bdf</sup>	2.46 $\pm$ 0.05 <sup>bdf</sup>
C+U组(n=36)	治疗前	7.85 $\pm$ 0.08 <sup>h</sup>	4.47 $\pm$ 0.05 <sup>h</sup>
	治疗后	2.47 $\pm$ 0.06 <sup>bdf</sup>	0.79 $\pm$ 0.02 <sup>bdf</sup>
H组(n=30)	治疗前	7.78 $\pm$ 0.07	4.34 $\pm$ 0.03
	治疗后	7.72 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	4.30 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 本组治疗前; <sup>d</sup> $P < 0.01$ , 治疗后三组间比较; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 治疗后H组; <sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 治疗后C组。

表3 各组治疗前后影像学变化

组别		重度	中度	轻度	正常
C组(n=40)	治疗前	10	16	14	
	治疗后	4	14	11	11
C+U组(n=36)	治疗前	9	14	13	
	治疗后	2	7	12	15
H组(n=30)	治疗前	6	12	12	
	治疗后	6	11	11	2

$\chi^2 = 13.36$ ,  $P < 0.05$ , 治疗后三组间比较。

2.2 血脂变化 疗程结束后, C组、C+U组TC、TG水平均明显下降, 统计学分析有显著性差异( $P < 0.01$ ); C+U组TC、TG水平较C组更低, 统计学分析有显著性差异( $P < 0.01$ ); H组TC、TG水平较治疗前稍有下降, 统计学分析无显著性差异( $P > 0.05$ )。(表2)

2.3 影像学变化 疗程结束后, 结合B超和CT结果判断肝脏的影像学变化, 以肝/脾CT比值 $> 1.0$ 作为脂肪肝消除标准。C+U组脂肪肝消除15/36例, 消除率为41.7%; C组脂肪肝消除11/40例, 消除率为27.5%; H组脂肪肝消除2/30例, 消除率为6.67%。影像学的改善情况为: C+U组优于C组, C组优于H组, 统计学分析有显著性差异( $P < 0.05$ )。(表3)

2.4 综合疗效 C组治愈率20.0%, 好转率62.5%, 总有效率82.5%; C+U组治愈率30.6%, 好转率63.9%, 总

表4 ■ 三组治疗方法疗效比较 (n, %)

组别	n	疗效			总有效 n
		痊愈	好转	无效	
C组	40	8(20.0)	25(62.5)	7(17.5)	33(82.5) <sup>b</sup>
C+U组	36	11(30.6)	23(63.9)	2(5.6)	34(94.4) <sup>b</sup>
H组	30	1(3.3)	16(53.3)	13(43.3)	17(56.7)

<sup>b</sup>P<0.01 vs H组.

有效率94.4%;H组治愈率3.3%,好转率53.3%,总有效率56.7%。两两比较,C+U组、C组的治愈率和总有效率均高于H组,经统计学分析,差异有显著性( $P<0.01$ );C+U组的治愈率和总有效率高于C组,但无统计学意义( $P>0.05$ )。(表4)

### 3 讨论

脂肪肝是由多种疾病和病因引起的肝脏脂肪性病变,可能主要与脂肪代谢异常、氧应激及脂质过氧化损伤、免疫反应、缺氧和肝微循环障碍等有关<sup>[3-4]</sup>。过去曾认为非酒精性脂肪肝是一种良性可逆性病变,但随着对其研究的深入,目前已认为不再是良性病变,他也可以发展为肝纤维化、肝硬化而导致一系列严重并发症<sup>[5]</sup>。因此,早期治疗脂肪肝以控制其病情进展,已成为我们当前面临的重要课题。

非酒精性脂肪肝的药物治疗目前尚不理想,由于大多降脂药物本身具有一定的肝损作用,因而限制了其在脂肪肝治疗中的应用<sup>[6]</sup>。目前常用的有各种抗氧化剂、胆碱、多价不饱和卵磷脂及熊去氧胆酸(UDCA)等,以及中药中的丹参、川芎、泽泻、大黄、枸杞和黄芩等<sup>[5]</sup>。

中医理论认为,脂肪肝以痰湿内停,淤阻气滞为主要病机。治疗慢性肝炎的常用中药制剂护肝片(主要成分为柴胡、茵陈、五味子等)因能疏肝解郁、清热利湿,故能减退黄疸,降低血清转氨酶,抑制肝细胞脂肪性变,促进肝细胞的修复和再生,对非酒精性脂肪肝具有一定的治疗作用<sup>[7]</sup>。

为了探讨非酒精性脂肪肝的最佳治疗方法,提高疗效,我们以清热利湿、活血解郁为治则,并结合中药的现代药理研究和脂质的生化代谢途径选择药物,自拟中药方剂“保肝降脂汤”,主要成分为:柴胡、茵陈、双花、黄芩、泽泻、草决明、大黄、山楂、虎杖、丹参等。根据中医药理,方剂中的柴胡以疏肝解郁为主,茵陈可清热利湿,并长于利胆褪黄疏肝,此二药与双花、黄芩、泽泻、草决明等药配伍,充分发挥疏肝解郁、清热利湿的功效,并兼益肾阴。方中伍以大黄,可泻下攻积,活血祛瘀;伍以山楂,消食化积,活血散瘀。而虎杖不但清热利湿,并与丹参共同发挥活血化瘀软坚之功效。根据现代药理研究和脂质的生化代谢研究,这些药物可从降低血清胆固醇、甘油三酯以及 $\beta$ 脂蛋白的含量,促进脂类在肝脏内的氧化,抑制肝脏胆固醇的合成,减轻脂质在肝脏内的沉积,以及减少其他途径如肠道对胆固醇的吸收等多方面协同作用,

达到降脂目的,同时发挥了利胆保肝作用,促进受损肝细胞的修复与再生,抑制肝脏的纤维化<sup>[8-13]</sup>。治疗结果显示,该方剂在改善患者肝功能的同时,确实能明显降低血脂总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)水平,改善肝脏的影像学表现,从而提高了临床治愈率和有效率。

我们又将目前脂肪肝治疗用药中最有希望的药物UDCA与“保肝降脂汤”联合应用,观察临床效果。结果显示,UDCA明显提高了“保肝降脂汤”对非酒精性脂肪肝的疗效,在改善肝功能、降低血脂、减轻影像学改变等方面均优于单独用“保肝降脂汤”组,使临床疗效得到了进一步提高。

UDCA作为治疗脂肪肝较有希望的药物,他发挥作用的可能机制是:(1)有类似胆固醇树脂消胆胺的作用,可降低血脂。(2)具有利胆作用,可促进胆汁分泌,减轻胆汁淤积,改善肝功能<sup>[14-15]</sup>。(3)抑制脂质过氧化反应,稳定肝细胞膜,保护线粒体<sup>[16-18]</sup>。(4)调节免疫反应,抑制单核细胞产生细胞因子<sup>[19-20]</sup>。(5)还可通过抑制转化生长因子TGF- $\beta_1$ ,从而抗肝细胞凋亡<sup>[21]</sup>。UDCA与“保肝降脂汤”联合应用可能通过以上途径促进了脂肪性病变的肝组织的修复。

总之,以清热利湿、活血解郁为治则的中药组方“保肝降脂汤”治疗非酒精性脂肪肝,在改善肝功能的同时,能有效地降低血脂,消除或减轻脂肪肝;该方剂与熊去氧胆酸(UDCA)合用,则更能显著地降低肝功能血清酶和血脂水平,肝脏的影像学改变也明显减轻,从而进一步提高了临床疗效。该研究结果提示,采用中西医结合的方法治疗非酒精性脂肪肝是一条比较理想的途径。

由于非酒精性脂肪肝是一种多病因引起的疾病,常伴发其他全身性疾病,所以对高血压、糖尿病、高脂血症、胆囊结石病等这些相关性疾病的控制程度直接影响非酒精性脂肪肝的治疗效果。另外,饮食调整和体育运动在非酒精性脂肪肝的治疗中亦不容忽视。以上两点可能是本研究部分病例不能获得明显效果甚至无效的主要原因。我们也可从此得到启示,在考虑非酒精性脂肪肝的治疗方案时,应有整体的观点,重视病因的祛除、伴发病的控制和饮食、运动治疗的配合。这样,非酒精性脂肪肝的疗效将会得到进一步提高。

### 4 参考文献

- 1 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组.非酒精性脂肪肝诊断标准(草案).中华肝脏病杂志 2001;9:325

- 2 李继强. 脂肪肝的影像学诊断. 范建高, 曾民德:脂肪肝. 上海: 上海医科大学出版社, 2000:187-190
- 3 曾民德. 脂肪肝. 中华消化杂志 1999;19:120-122
- 4 范建高, 曾民德, 王国良. 脂肪肝的发病机制. 世界华人消化杂志 1999;7:75-76
- 5 钟岚, 王国良, 范建高. 非酒精性脂肪性肝炎的研究进展. 肝脏 1999;4:177
- 6 曾民德. 降血脂药物在脂肪肝治疗中的应用. 中华肝脏病杂志 2000;8:116-117
- 7 张学武, 周敏, 胡国启. 熊去氧胆酸联合护肝片治疗非酒精性脂肪性肝炎. 中西医结合肝病杂志 2003;13:8-9
- 8 刘燕玲, 陈玉华. 浅谈脂肪肝的中医药治疗. 北京中医药大学学报 1995;18:54-55
- 9 殷国健, 朱向前, 徐力. 中西医结合治疗高脂血症脂肪肝疗效观察. 实用中西医结合杂志 1994;7:104-105
- 10 王浴生, 邓文龙, 薛春生. 中药药理与应用. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1998:70-77
- 11 罗国钧, 罗海琪. 脂肪肝的诊治思路及临床研究进展. 山西中医 1999;15:51-53
- 12 汪萌, 鞠传兰. 中医药治疗脂肪肝近况. 山东中医杂志 1999;18:239-240
- 13 于英春(译). 高脂血症与汉方. 国外医学·中医中药分册 1986;2:19
- 14 钟岚, 范建高, 王国良. 熊去氧胆酸在慢性肝病中的应用及机制. 国外医学·消化系疾病分册 1999;19:91-94
- 15 Elsing C, Sagesser H, Reichen J. Ursodeoxycholate-induced hypercholesterolemia in cirrhotic rats; Further evidence for cholehepatic shunting. *Hepatology* 1994;20:1048-1054
- 16 Rodrigues CMP, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998;101:2790-2799
- 17 Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprecht E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001;33:616-626
- 18 Guldiituna S, Zimmer G, Imhof M, Bhatti S, You T, Leuschner U. Molecular aspects of membrane stabilization by ursodeoxycholate. *Gastroenterology* 1993;104:1736-1744
- 19 Calmas Y, Gane P, Rouger P, Poupon R. Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: Effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 1990;11:12-15
- 20 Yoshikawa M, Tsujii T, Matsumura K, Yamao J, Matsumura Y, Kubo R, Fukui H, Ishizaka S. Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune response. *Hepatology* 1992;16:358-364
- 21 Keith BD. Ursodeoxycholic acid to inhibit the growth of hepatic metastases. *Med Hypotheses* 2000;55:379-382

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## *H. pylori* iceA 基因与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌的关系

张彩凤, 林志辉, 吴芳, 陈明红, 王辛, 付丹, 潘秀珍, 彭孝纬

张彩凤, 林志辉, 吴芳, 陈明红, 王辛, 付丹, 潘秀珍, 彭孝纬, 福建医科大学福建省立临床医院消化内科 福建省福州市 350001  
福建省卫生厅科研基金项目, No. 200022

项目负责人: 林志辉, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建医科大学福建省立临床医院消化内科.

电话: 0591-87699780

收稿日期: 2004-11-12 接受日期: 2004-11-29

### 摘要

**目的:** 研究幽门螺杆菌(*H. pylori*)的 iceA 基因与慢性胃炎、消化性溃疡和胃癌的关系。

**方法:** 从胃十二指肠疾病的患者胃镜活检标本中分离培养 *H. pylori*, PCR 扩增检测 *H. pylori* 的 iceA 基因共 138 例, 其中慢性浅表性胃炎 47 例、慢性萎缩性胃炎 22 例、消化性溃疡 49 例和胃癌 20 例。

**结果:** 138 例中 iceA1 基因、iceA2 基因总的阳性率分别为 47.1% 和 47.8%, 其中 36 例(26.1%)为 iceA1 和 iceA2 均阳性, 43 例(31.2%)为 iceA1 和 iceA2 均阴性。iceA1 在慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、消化性溃疡及胃癌患者 *H. pylori* 中的

阳性率分别为 44.7%、40.1%、59.2%、30.0%, iceA2 基因的阳性率分别为 53.2%、31.8%、65.3%、10.0%, iceA1 和 iceA2 在消化性溃疡中的检出率明显高于其他疾病组。

**结论:** *H. pylori* 的 iceA1 和 iceA2 基因与消化性溃疡的发病相关。

张彩凤, 林志辉, 吴芳, 陈明红, 王辛, 付丹, 潘秀珍, 彭孝纬. *H. pylori* iceA 基因与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(5): 685-687

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/685.asp>

### 0 引言

iceA 基因是 *H. pylori* 与胃黏膜细胞接触后诱导表达的基因, 包括 iceA1、iceA2 两个等位基因, 分别存在于不同的 *H. pylori* 菌株中, 被认为可能是 *H. pylori* 的又一致病因子. iceA 基因能不能作为 *H. pylori* 致病性和毒力的流行病学标志, 其等位基因的类型及意义有待于进一步研究确定. 我们分析福建地区临床分离的 *H. pylori* 菌株的 iceA 基因类型, 探讨其与胃十二指肠疾病关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 分离的 *H. pylori* 菌株来自 2003-2004 年在我院接受内镜检查的 138 例患者, 其中慢性浅表性胃炎 47 例, 慢性萎缩性胃炎 22 例, 消化性溃疡 49 例和胃癌 20 例. 疾病的诊断依据胃镜和病理学检查.

**1.2 方法** 胃窦黏膜活检标本接种于选择性琼脂培养基上 (含 75 mL/L 羊血及抗生素), 于 37℃ 微需氧环境中培养 3-5 d, 分离菌落, 经菌落形态、涂片染色以及生化反应 (尿素酶、过氧化氢酶、氧化酶) 证实, 冻存于 -70℃ 备用. 用一次性 DNA 抽提试剂盒提取冻存 *H. pylori* 菌株的基因组 DNA, 保存于 -70℃ 备用. *iceA* 基因 PCR 引物设计由博亚生物有限公司合成 (表 1). PCR 反应总体积为 25 μL. *iceA* 的反应条件为 10× 反应缓冲液 2.5 μL, dNTP 0.5 μL, 引物 1 引物 2 各 0.5 μL, TaqE1U, 模板 DNA 4 μL. *iceA* 的扩增条件为 94℃ 40 s, 54℃ 40 s, 72℃ 1 min, 共 35 个循环. PCR 扩增产物经 20 g/l 的琼脂糖凝胶电泳, 电脑图像分析仪观察、分析和摄像记录结果.

**统计学处理** 采用  $\chi^2$  检验和 Fisher 精确检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性.

## 2 结果

在 138 株 *H. pylori* 临床菌株中, *iceA1* 和 *iceA2* 的总检出率分别为 47.1% 和 47.8%, 其中 36 例 (26.1%) 为 *iceA1* 和 *iceA2* 均阳性, 43 例 (31.2%) 为 *iceA1* 和 *iceA2* 均阴性. 图 1 为 *iceA1* 和 *iceA2* 基因片段扩增结果. *iceA1* 和 *iceA2* 基因消化性溃疡组 (59.2%, 65.3%) 的检出率显著高于慢性胃炎 (43.5%, 46.4%) 和胃癌 (30%, 10%) 组 ( $P < 0.05$ ), 其他疾病组之间的 *iceA1* 和 *iceA2* 的检出率无显著性差异 ( $P > 0.05$ ). *iceA1* 基因和 *iceA2* 基因同时阳性的菌株有 36 例, 其中慢性浅表性胃炎有 12 (33.3%) 例, 慢性萎缩性胃炎有 4 例 (11.1%), 消化性溃疡有 20 例 (55.6%), 没有发现胃癌患者中有混合感染. *iceA2* 基因表现为 229 bp 和 334 bp 的片段, 部分菌株可同时具有 229 bp 和 334 bp 的基因片段. *iceA2* 的基因片段扩增结果在不同疾病的检出率有差别 (表 2).

表 1 *iceA* 基因 PCR 引物

目的基因	引物序列	产物的大小
<i>iceA1F</i>	5' GTGTTTTTAACCAAAGTATC3'	246 bp
<i>iceA1R</i>	5' CTATAGCCAGTCTCTTTGCA3'	
<i>iceA2F</i>	5' GTTGGGTATATCACAATTTAT3'	
<i>iceA2R</i>	5' TTGCCCTATTTTCTAGTAGGT3'	229 bp 334bp

表 2 *iceA2* 基因片段在不同疾病中的检出  $n(\%)$

诊断	229 bp	334 bp	229 bp+334 bp	合计
慢性浅表性胃炎	9(36.0)	7(28.0)	9(36.0)	25(37.9)
慢性萎缩性胃炎	2(28.0)	4(57.1)	1(14.3)	7(10.6)
消化性溃疡	7(21.9)	13(40.6)	12(37.5)	32(48.5)
胃癌	1(50.0)	1(50.0)	0(0.0)	2(3.0)

## 3 讨论

*iceA* 基因是 *H. pylori* 与胃黏膜细胞接触后诱导表达的基因, 包括 *iceA1*、*iceA2* 两个等位基因, 分别存在于不同的 *H. pylori* 菌株中. 其中 *iceA2* 基因变异较大, 可表现为 229 bp、334 bp、549 bp 不同长度基因片段. *iceA1* 被认为与十二指肠球部溃疡的发生密切相关, 而具有 *iceA2* 的 *H. pylori* 菌株与慢性胃炎的发生相关, 也有学者认为 *iceA2* 基因与消化性溃疡相关, 因此被认为是 *H. pylori* 的又一致病基因<sup>[4-9]</sup>. *iceA1* 与编码乳糖奈瑟菌的核酸内切酶基因 *nla III R* 同源, 但在蛋白水平的同源性仅有 52%, *iceA2* 基因的变异较大, 基因库中尚未见其有同源序列的存在<sup>[11-15]</sup>. 由于文献所报告的结果差异较大, *iceA* 基因能不能作为 *H. pylori* 致病性和毒力的流行病学标志, 其等位基因类型的相关研究的意义有待于进一步研究确定. 不同国家的学者报告的 *iceA1*、*iceA2* 检出率及其与消化系统疾病的关系也不尽相同. 在巴西<sup>[1]</sup> *iceA2* 型 *H. pylori* 菌株的检出率为 90.1%, 与消化性溃疡关系密切. Van Doorn *et al*<sup>[2]</sup> 报道 *iceA1* 基因的检出率为 56.4%, *iceA2* 基因的检出率为 26.6%, *iceA1* 基因和 *iceA2* 基因都为阳性的检出率为 14.9%, 提示部分患者可能存在 *iceA1* 和 *iceA2* 阳性的混合感染情况. *iceA1* 基因和消化性溃疡相关. *iceA1*、*iceA2* 何者与消化性溃疡有关, 或二者都有关, 有待进一步研究. 国内 *iceA* 基因的研究较少, 有限的文献认为 *iceA* 基因与消化系统疾病没有关系<sup>[3]</sup>.

迄今为止, 关于 *H. pylori iceA* 基因与胃十二指肠疾病关系有大量截然相反的研究报道, 这些相反结果可能与下列因素有关: (1) 不同地区的 *H. pylori* 菌株的 *iceA* 基因表达与否及表达类型不同; (2) *iceA* 基因可能

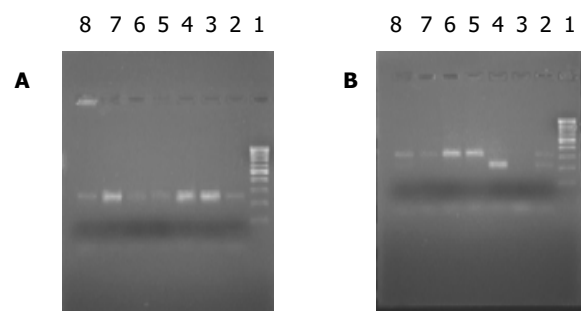


图 1 基因片段的扩增结果. A: *iceA1*: 1 为 100 bp 标志, 2-8 *iceA1* 扩增片段; B: *iceA2*: 1 为 100 bp 标志, 2、8 为同时有 229 bp 和 334 bp, 3 为 *iceA2* 阴性, 4 为 229 bp, 5-7 为 334 bp.

和 *H. pylori* 菌株的其他基因存在协同作用. 或存在更重要的毒力基因; (3) *H. pylori* 感染个体的宿主因素、环境因素等相互作用的相互作用的结果. 本结果显示在福建地区人群中, *iceA1* 基因总的阳性率为 47.1%, *iceA2* 基因总的阳性率为 47.8%. 慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、消化性溃疡和胃癌患者中分离的 *H. pylori* 菌株中, 消化性溃疡患者感染的 *H. pylori* 菌株 *iceA1* 基因和 *iceA2* 基因的阳性率均明显高于其他组. 对 *iceA2* 基因进行扩增时, 只出现了 229 bp 和 334 bp, 而没有发现文献中所报道的 549 bp 片段<sup>[2]</sup>, 日本分离的 *H. pylori* 也不具有 549 bp 的 *iceA2* 基因片段<sup>[4]</sup>. 我们发现 26.1% 患者同时存在 *iceA1*+ 和 *iceA2*+ 菌株混合性感染<sup>[10]</sup>, 高于多数文献报道情况<sup>[2]</sup>. 其原因除地域差异外, 尚需进一步研究分析. 我们认为 *iceA* 基因(包括 *iceA1*, *iceA2*) 在消化性溃疡的发病中起着重要作用, *iceA1*, *iceA2* 阳性的 *H. pylori* 菌株感染者将更有可能发生消化性溃疡. *iceA1*, *iceA2* 阳性的 *H. pylori* 菌株可以在同一患者中出现, 因此在 *H. pylori* 的防治中也应重视混合感染的存在.

#### 4 参考文献

- 1 Ashour AA, Collares GB, Mendes EN, de Gusmao VR, Queiroz DM, Magalhaes PP, de Carvalho AS, de Oliveira CA, Nogueira AM, Rocha GA, Rocha AM. *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol* 2001;39:1746-1750
- 2 Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P, Ng EK, Atherton JC, Blaser MJ, Quint WG. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* *vacA*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2597-2603
- 3 Perng CL, Lin HJ, Lo WC, Tseng GY, Sun IC, Ou YH. Genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer bleeding. *World J Gastroenterol* 2004;10:602-605
- 4 Yamaoka Y, Malaty HM, Osato MS, Graham DY. Conservation of *Helicobacter pylori* genotypes in different ethnic groups in houston, texas. *J Infect Dis* 2000;181:2083-2086
- 5 Ryan KA, van Doorn LJ, Moran AP, Glennon M, Smith T, Maher M. Evaluation of clarithromycin resistance and *cagA* and *vacA* genotyping of *Helicobacter pylori* strains from the west of Ireland using line probe assays. *J Clin Microbiol* 2001;39:1978-1980
- 6 Warburton-Timms VJ, Charlett A, Valori RM, Uff JS, Shepherd NA, Barr H, McNulty CA. The significance of *cagA*(+) *Helicobacter pylori* in reflux oesophagitis. *Gut* 2001;49:341-346
- 7 Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Conservation of the *cag* pathogenicity island is associated with *vacA* alleles and gastroduodenal disease in South African *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 2001;49:11-17
- 8 Tombola F, Pagliaccia C, Campello S, Telford JL, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. How the loop and middle regions influence the properties of *Helicobacter pylori* *VacA* channels. *Biophys J* 2001;81:3204-3215
- 9 Gonzalez-Valencia G, Atherton JC, Munoz O, Dehesa M, la Garza AM, Torres J. *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. *J Infect Dis* 2000;182:1450-1454
- 10 Kidd M, Peek RM, Lastovica AJ, Israel DA, Kummer AF, Louw JA. Analysis of *iceA* genotypes in South African *Helicobacter pylori* strains and relationship to clinically significant disease. *Gut* 2001;49:629-635
- 11 Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, van Der Ende A, van Der Hulst RW, Wirth HP, Hook-Nikanne J, Thompson SA, Blaser MJ. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis* 2000;181:273-282
- 12 Netzer P, Gut A, Brundler R, Gaia C, Halter F, Inauen W. Influence of pantoprazole on oesophageal motility, and bile and acid reflux in patients with oesophagitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1375-1384
- 13 Zheng PY, Hua J, Yeoh KG, Ho B. Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not *cagA*, *iceA*, and *vacA* in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population. *Gut* 2000;47:18-22
- 14 Gottke MU, Fallone CA, Barkun AN, Vogt K, Loo V, Trautmann M, Tong JZ, Nguyen TN, Fainsilber T, Hahn HH, Korber J, Lowe A, Beech RN. Genetic variability determinants of *Helicobacter pylori*: influence of clinical background and geographic origin of isolates. *J Infect Dis* 2000;181:1674-1681
- 15 Tombola F, Del Giudice G, Papini E, Zoratti M. Blockers of *VacA* provide insights into the structure of the pore. *Biophys J* 2000;79:863-873

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

## 慢性乙型肝炎300例的生命质量评价

李洁, 史美育, 王剑, 张文彤, 赵晓东, 张虹, 邸若虹

李洁, 史美育, 王剑, 赵晓东, 张虹, 邸若虹, 上海中医药大学上海市中医药循证医学研究中心 上海市 201203  
张文彤, 复旦大学公共卫生学院 上海市 200032  
上海市科学技术委员会生物医药资助项目, No. 014319366  
项目负责人: 李洁, 201203, 上海浦东新区蔡伦路1200号, 上海中医药大学上海市中医药循证医学研究中心, ljtcn@163.com  
电话: 021-51322636 传真: 021-51322635  
收稿日期: 2005-01-11 接受日期: 2005-01-20

### 摘要

**目的:** 通过对300例慢性乙型肝炎患者生命质量(QOL)的统计分析, 探讨影响慢性乙型肝炎患者QOL的各种影响因素, 提供改善慢性乙型肝炎患者QOL的依据;探讨QOL作为疗效评价的可行性, 针对以往QOL研究中存在的统计问题进行探讨。

**方法:** 通过对300例慢性乙型肝炎患者生命质量进行临床流行病学调查, SIP量表包括一般资料和生存质量表两部分。对于观察因素从定量和定性两大类进行统计分析, 数据处理用SPSS统计软件包进行统计分析。

**结果:** 慢性乙型肝炎患者生命质量水平下降表现为社会关系(SI)、娱乐与消遣(RP)、睡眠与休息(SR)、警觉行为(AB)、家务管理(HM)、灵活性(M)、饮食(E)、情感行为(EB)等功能障碍较为明显。影响慢性乙型肝炎患者QOL主要因素按其重要性依次为身高、性别、婚姻、吸烟史和既往史。

**结论:** 用SIP量表进行生命质量测定能较全面地评价慢性乙型肝炎患者的疗效, 具有可行性。

李洁, 史美育, 王剑, 张文彤, 赵晓东, 张虹, 邸若虹. 慢性乙型肝炎300例的生命质量评价. 世界华人消化杂志 2005;13(5):688-689  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/688.asp>

### 0 引言

全世界乙型肝炎病毒(HBV)携带者约3.5亿。根据国内1992/1994年全国血清流行病学调查, HBsAg携带率9.75%, 约1.2亿。慢性乙型肝炎患者约为3000万人, 其中10-20%可发展为肝硬化, 1-5%可演变为肝癌。HBV携带者的母亲可以通过垂直传播给婴儿, 婴儿时期感染HBV者, 90%以上感染者成为慢性HBsAg携带者, 影响下一代的健康。当今医学模式已从单纯的生物医学模式转变为生物-心理-社会医学模式, 人们认识到医学研究的对象-人, 除了要考虑其生物性外, 还必须考虑其心理因素和社会因素, 即从生物学上的人扩展到社会上的人, 要把治病扩展到治患者。人们对于生活的概念也从单纯地活着转变为如何活着, 强调的是生活质量而不仅是生存时间。生命质量(quality of life, QOL)是在WHO提倡

的健康新概念。McSweeney *et al*<sup>[1]</sup>则采用了MMPI(minnesota multiphasic personality inventory), POMS(the profile of mood status), SIP(the sickness impact profile)和KAS(the katz adjustment scale)进行生命质量研究, 并进行了比较, 认为SIP较好。Mackenzie *et al*认为该量表经过多方使用, 是一种有效的功能状态测量工具<sup>[2]</sup>。Mitchell *et al*<sup>[3]</sup>认为SIP各类得分 $\geq 2$ , 即存在功能损失。我们分析了影响慢性乙型肝炎患者QOL的各种影响因素, 以提供改善慢性乙型肝炎患者QOL的依据;探讨QOL作为疗效评价的可行性, 针对以往QOL研究中存在的统计问题进行探讨。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 上海市传染病医院、上海中医药大学附属曙光医院、上海中医药大学附属龙华医院、上海市中医医院、上海中医药大学附属岳阳医院慢性乙型肝炎患者。符合中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订(中华肝病杂志2000;8(6))病毒性肝炎防治方案的慢性乙型肝炎的诊断标准。年龄18-70岁之间, 性别不限。乙肝病毒感染病史明确, 病程 $>6$  mo。无严重的心、脑、肾、肺功能障碍及重症糖尿病, 并发肝性脑病II度以上患者, 严重的自发性细菌性腹膜炎、上消化道出血、肝肾综合征。

**1.2 方法** 正式调查之前进行调查员(医生)培训, 调查员必须具备必要的流行病学知识, 充分了解调查的目的和要求, 熟悉调查方法和调查项目的意义, 熟练掌握慢性乙型肝炎相关的基础知识。同时, 调查员必须具有实事求是的科学态度。在调查时调查员应注意把握技巧, 避免对调查对象的诱导暗示性提问。填写调查表时字迹要清楚, 并且妥善保存资料。调查路径在患者入院后或首次门诊时, 在征得患者同意后, 即进行问卷调查。所有正式调查的对象采用调查员面对患者进行, 也可以由患者独自完成。资料的完整性好, 没有缺项, 可靠性强。调查表分为两大部分: 第一部分包括一般资料、生存质量表。一般资料包括: (1)姓名、性别、年龄、婚姻、职业、教育程度、居住地、身高、体重; (2)吸烟史、饮酒史、肝病家族史; (3)门诊号、住院号; (4)初诊日期、调查日期; (5)诊断。第二部分包括可能影响慢性乙型肝炎生命质量的量表(SIP)。SIP包括136个项目, 共12类来评价疾病的功能障碍。其中属于“身体方面”(SD-I)的有3类: 行走(Ambulation, A)、灵活性(Mobility, M)、躯体运动(Body care & movement, BCM);属于“社会心理方面”(SD-II)的有4类: 即社会关系(Social Interaction, SI)、交流(Communication, C)、情感行为(Emotional behaviour, EB)、警觉行为(Alertness behaviour, AB);其他5类还包括睡

眠(Sleep & Rest, SR)、工作(Work, W)、家务管理(Home Management, HM)、娱乐与消遣(Recreation & Pastime, RP)和饮食(Eating, E). 整个量表的总分, 体力和社会心理方面, 以及12类得分都是从0-100分, 其得分是根据每项功能障碍的相对严重性的估计, 由美国华盛顿大学卫生服务系组织400余名各方面专家, 事先决定权数来计算的. 得分愈高, 表示功能障碍愈严重, QOL水平就愈低.

**统计学处理** 由于观察因素有定量和定性两大类. 对于计量的指标可直接取原始记录, 对于定性的指标采取数量化的方法将其编码. 数据处理用SPSS统计软件包完成所有的统计分析.

## 2 结果

被调查对象300例, 男202例, 占67.3%, 女98例, 占32.7%, 男女比例2.06:1; 有肝炎家族史者85例, 占28.4%; 有饮酒史者44例, 占14.7%; 有吸烟史者65例, 占21.7%; 有既往史者18例, 占6.0%; 年龄17-70岁, 平均年龄39.2岁; 平均身高168 cm, 平均体重63.7 kg. 患者职业情况发生比例从高到低依次为工人71例(57.3%), 公司职员49例, 服务行业18例, 学生14例, 教师11例, 失业11例, 工程师9例, 农民8例, 金融行业5例, 军人4例, 其他人员98例. 患者受教育程度发生比例从高到低依次为中学172例, 大学98例, 小学24例, 研究生6例. 通过计算慢性乙型肝炎患者的QOL, 得到各类功能损失分总和、各类功能损失分总和均值和各类功能分均值(表1). 各方面的功能障碍影响依次为SI, RP, SR, AB, HM, BM, E, EB, BCM, W, A, C. 功能障碍愈严重, 表示生命质量水平愈低. 计算慢性乙型肝炎患者的QOL各个方面的平均得分、标准差、偏度、峰度和正态检验(表2). 从逐步回归模型(表3), 可得出影响所调查的慢性乙型肝炎患者生命质量的因素, 按其重要性依次为: 身高, 性别, 婚姻, 吸烟史, 既往史.

表1 慢性乙型肝炎患者 QOL 功能得分

	损失分总和	损失分均值	功能分均值
SR	3 694.2	12.31	24.67
EB	2 415.7	8.05	11.42
BCM	971.2	3.23	1.61
HM	3 489.1	11.63	17.41
BM	3 344.2	11.14	15.50
SI	10 032.3	33.44	23.06
A	892.6	2.97	3.53
AB	3 605.5	12.01	15.46
C	373.8	1.24	1.71
W	961.6	3.20	6.22
RP	5 275.9	17.58	41.67
E	2 567.6	8.55	12.13
SD- I			5.02
SD- II			14.97
SIP			12.50

表2 慢性乙型肝炎患者 QOL 功能得分分布

	均数	标准差	偏度	峰度	KS 检验
SR	12.31	12.52	1.339	1.303	3.467
EB	8.05	12.79	1.978	4.004	5.233
BCM	3.24	10.82	7.929	89.250	7.464
HM	11.63	17.85	1.647	1.809	4.722
M	11.15	14.46	1.417	1.431	4.150
SI	33.441	26.782	1.110	2.250	1.834
A	2.98	8.39	5.739	44.555	6.961
AB	12.02	18.44	1.663	1.923	5.069
C	1.25	4.76	5.187	30.920	8.775
W	3.21	9.94	4.970	29.437	7.502
Rp	17.586	15.039	0.358	-0.717	2.867
E	8.56	12.48	3.957	29.731	4.270

表3 影响 SIP 得分的逐步回归结果

	bi	Sbi	STD(bi)	t	P
身高	-37.605	11.168	-0.277	-3.367	0.001
性别	-4.731	1.766	-0.225	-2.679	0.008
既往史	5.185	2.376	0.122	2.182	0.030
婚姻	3.040	1.303	0.133	2.334	0.020
吸烟史	-3.050	1.418	-0.128	-2.151	0.032

## 3 讨论

慢性乙型肝炎是一种常见的慢性病, 疾病迁延时间较长, 不适合以治愈率、好转率等急性病的指标进行疗效评价, 也不适合以生存分析等肿瘤患者的疗效标准来衡量, 这些患者除了生存时间外, 生存质量更为重要. 本研究提示, 慢性乙型肝炎患者 QOL 各个方面的功能都有下降, 主要包括社会关系(SI)、娱乐与消遣(RP)、睡眠与休息(SR)、警觉行为(AB)、家务管理(HM)、灵活性(M)、饮食(E)、情感行为(EB)功能障碍值得重视, 躯体运动(BCM)、工作(W)、行走移动(A)、交流(C)功能障碍也值得重视. 现行的慢性乙型肝炎的疗效只重视身体方面, 忽视了社会心理、娱乐、工作等的功能障碍影响. SD- I, SD- II, SIP 能够很好地反映慢性乙型肝炎的 QOL.

## 4 参考文献

- McSweeney JA, Grant I, Heaton RK, Adams KM, Timms RM. Life quality of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 1982;142:473-478
- Mackenzie CR, Charlson ME, Digioia D, Kelley K. Can the sickness impact profile measure change? An example of scale assessment. *J Chron Dis* 1986;39:429-438
- Mitchell BD, Stern MP, Haffner SM, Hazuda HP, Patterson JK. Functional impairment in Mexican Americans and non-Hispanic whites with diabetes. *J Clin Epidemiol* 1990;43:319-327

# 磁共振胆胰管成像在肝内胆管结石外科治疗中的价值

巨邦律, 方驰华, 钟洪才, 颜政, 张刚庆, 涂玉亮

巨邦律, 方驰华, 钟洪才, 颜政, 张刚庆, 涂玉亮, 南方医科大学附属珠江医院肝胆外科 广东省广州市 510282

项目负责人: 方驰华, 510282, 广东省广州市海珠区工业大道中253号, 南方医科大学附属珠江医院肝胆外科, fch58520@sina.com

电话: 020-61643211

收稿日期: 2004-12-27 接受日期: 2005-01-13

## 摘要

**目的:** 探讨磁共振胰胆管造影(MRCP)在肝内胆管结石外科诊断治疗中的价值。

**方法:** 对36例肝内胆管结石患者, 术前行MRCP检查, 与术中、术后结果对比, 回顾性评价术前MRCP的价值。

**结果:** 对肝内胆管结石部位显示率为94.4%;对显示结石引起的胆管扩张及狭窄部位、范围准确率达到100%, 术后残余结石率为13.9%。

**结论:** MRCP可准确反应术前结石引起的胆管解剖变化, 可提高术前对肝内胆管结石诊断的正确性和结石取净率, 减少残余结石。

巨邦律, 方驰华, 钟洪才, 颜政, 张刚庆, 涂玉亮. 磁共振胆胰管成像在肝内胆管结石外科治疗中的价值. 世界华人消化杂志 2005;13(5):690-691  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/690.asp>

## 0 引言

肝内胆管由于解剖部位特殊, 胆管树多变, 病理改变复杂而且严重, 术中取净结石难度大, 因而术后胆石残留率高. 术前对肝内胆管结石准确定位及胆管树全貌的掌握直接影响着外科治疗的方法与疗效. 磁共振胰胆管造影(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)为临床提供准确的结石定位、胆管树三维全貌, 对肝内胆管结石的外科治疗具有重要价值. 我们对本院近年来36例肝内胆管结石患者进行了MRCP检查进行了回顾总结, 现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院于1998-04/2004-05月共收治肝内胆管结石并行MRCP检查患者36例, 男19例, 女17例, 年龄32-48岁, 平均年龄为 $38.5 \pm 5.2$ 岁, 主要临床表现为反复右上腹部持续性胀痛, 并常放射至背、肩部, 病史6 mo-30 a不等, 少伴有发热、寒战病史. 部分患者皮肤及巩膜黄染, 肝区叩击痛及压痛不明显. 实验室检查总胆红素大部分正常, 在 $13.4-34.2 \text{ mmol/L}$ 之间, 合并有肝外胆管结石的患者总胆红素增高明显, 在 $71.2-342.1 \text{ mmol/L}$ 之间, 以直接胆红素增高最为显

著,  $51.9-193.4 \text{ mmol/L}$ 不等. 甲胎蛋白及癌胚抗原均正常, 少部分患者有不同程度的肝功能损害。

**1.2 方法** 使用美国GE公司Signa Horizon LX 1.5T超导型磁共振仪进行检查, 扫描前8 h禁食、禁水. 根据董家鸿提出的方法<sup>[1]</sup>将肝内胆管结石患者分为I型(局限型)、II型(区域型)、III a型(弥漫型不伴区域性毁损)、III b型(弥漫型伴区域性毁损)、IV型(弥漫型伴胆汁性肝硬变). 结合术前MRCP检查结果, 以显示肝内胆管结石的部位和数量分布、肝内胆管扩张与狭窄的部位、胆管树三维结构等来决定手术方式。

## 2 结果

本组全部36例肝内胆管结石患者MRCP检查均1次成功, 36例(100%)图像质量均达到诊断要求. 患者中I型(3例)、II型(2例)肝内胆管结石均采用规则切除含结石的肝段或肝叶; III a(17例)型肝内胆管结石, 单纯行以Roux-en-Y术式加T管引流术为基本术式的胆肠引流术. 胆肠引流术的术式繁多, 如高位胆管空肠侧侧大口吻合术、肝总管空肠侧(或端侧)吻合术、皮下盲袢术等, 行胆肠Roux-en-Y手术必须将胆管空肠吻合口建立在胆管狭窄环的上游. 对于III b(16例)型肝内胆管结石切除含区域性毁损的肝段或肝叶为基本术式, 同时(合并有胆管狭窄者, 先将狭窄段胆管切开整形)行以Roux-en-Y术式加T管引流术为基本术式的胆肠引流术. 根据患者结石类型、结石术者经验和医院的具体条件决定术式, 如肝内胆管结石同时伴有肝外胆管显著扩张、曾作Oddi括约肌成形术、Oddi括约肌松弛等者行肝外胆管横断的胆肠引流术, 以减少术后反流性胆管炎的发生. 本组36例肝内胆管结石中无IV型患者, 术中同时用取石钳和纤维胆道镜尽量将结石取净. 本组36例定性诊断正确, MRCP对肝内胆管结石引起的胆管扩张及狭窄部位、范围及是否伴有胰管扩张, 以及结石部位均可直观的显示(图1A-B). 2例肝内广泛泥沙样结石, 肝内胆管无扩张, 未能完全正确诊断, 术中用胆道镜证实为多处肝内胆管结石, 定位诊断准确率达94.4%(34/36). 所有患者术后均予T管造影检查, 36例患者中5例有结石残留, 残石率为13.9%(5/36). 2例出现术后并发症, 其中胆道出血1例, 肺部感染1例, 经治疗后均痊愈出院, 无死亡。

## 3 讨论

肝内胆管结石外科治疗存在的最大问题仍然是术后残石率高, 再次手术率高, 复发率高. 术前缺乏对结石的数量、部位的准确定位, 是其主要原因之一. 术前明确肝

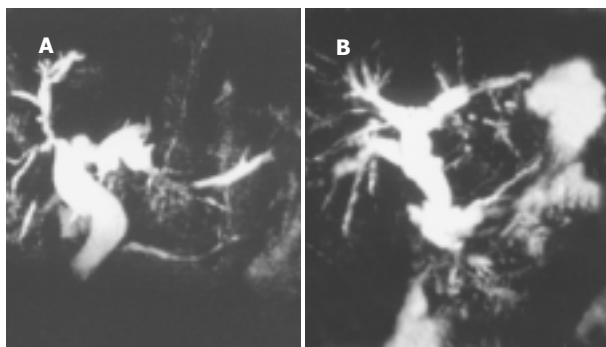


图1 肝内外胆管结石 MRCP. A: 示肝右叶呈枯枝状改变, 左叶胆管扩张明显, 多呈囊状改变, 胆总管明显扩张, 下端截断. B: 可见残留胆囊颈, 左肝管扩张, 并可见泥沙样结石负影, 胆总管下端可见直径约 0.5 cm 充盈缺损, 余肝内外胆管分支未见异常扩张.

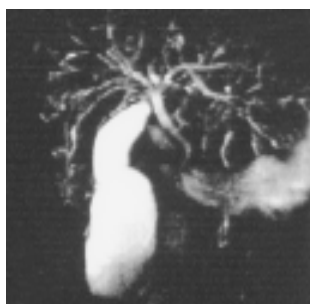


图2 肝吸虫病1例 MRCP: 众多周围胆管扩张, 胆总管轻度扩张, 胆囊扩大呈“葫芦”状, 中间有分隔.

内胆管三维空间分布状况、肝内胆管结石部位与数量及狭窄的位置, 对手术方案的制订至关重要, 这是手术成败的关键之一. 目前用于检查肝内胆管结石的方法有 CT、PTC、US 等, 但上述方法对肝内胆管结石患者术前的客观评估仍有一定难度. 肝内胆管结石患者大部分往往合并有肝外胆管结石, 况且肝内胆管的解剖较复杂, 其在解剖上的变异和引流胆汁的范围变异较多, 雷若庆 *et al*<sup>[2]</sup> 报道肝内胆管变异可达 22% 以上. 虽然肝内胆管变异并不少见, 亦有一定的规律性<sup>[3]</sup>, 但不能客观地反应每一患者胆管的解剖结构, MRCP 可以弥补其他胆胰系影像学检查方法 (CT、PTC、US、ERCP 等) 的某些不足<sup>[4]</sup>, 甚或在显示胆胰系的先天性变异和管腔内外结构方面优于其他检查方法.

MRCP 是一种对胆汁输送异常具有高度敏感和特异性的无创性检查手段, 对胆道结石的敏感度达 92%, 特异性达 98%<sup>[5]</sup>, 明显优于文献<sup>[6]</sup>报道的 B 超、CT 对胆道结石的诊断. 与经皮肝穿胆道造影 (PTC) 比较, MRCP 在肝内胆管结石和肝内胆管狭窄显影的诊断上更具有优越性<sup>[7]</sup>. MRCP 具有无创伤性、安全简便、不需 X 线照射, 三维重建图像类似于直接胆胰管造影片, 并可多方位旋转、多角度观察等优点, 已被应用于各种胆道梗阻病变的临床诊断. MRCP 可清晰显示胆管各级分支及扩张程度, 梗阻的位置、形态及性质, 尤其可显示 ERCP 不能显示的胆道梗阻远端胆管.

MRCP 是一种无创性的胆道胰管成像技术, 他可详尽地显示胆胰管的全貌、阻塞部位和范围等<sup>[8]</sup>, 为胆系疾病的影像学检查开辟了一条新的途径.

MRCP 可进行多平面成像及重建, 能直观显示胰胆管的整体观和连续性, 可同时显示近端胆管扩张程度和远端非扩张胆管所提供的丰富的形态学信息, 从冠状面转至矢状面, 任意角度观察, 可消除重叠的结构, 是 US 无法比拟的, 并可明确梗阻的部位、范围及异常胰胆管的特征. 近来由于经腹腔镜行胆道手术的增多, 术中胆管损伤时有发生. 术者术前对胆管变异了解不清, 手术操作时稍有不慎, 可致胆管损伤, 胆漏. 术前行 MRCP 可获得清晰的胆道树全像和结石数目及部位, 熟悉胆管变异的类型, 掌握一定的方法和操作技巧, 可极大提高取石的准确性, 缩短手术时间和减少因盲目取石而可能造成的损伤.

由于胆管结石常常合并胆管炎, 肝内胆管结石对胆管壁的机械性、感染性病损, 导致胆管壁黏膜坏死, 溃烂, 最终导致胆管壁纤维瘢痕增生、缩窄, 故肝内细小胆管因管壁炎性增厚、僵直而不均匀扩张. MRCP 显示 3-4 级胆管呈枯枝状、残根状或粗细不均, 整个胆道系统扩张不成比例, 分布不均. 虽然肝吸虫可以导致 4-5 级肝内小胆管扩张, 但 2-3 级胆管一般扩张不明显或较轻 (图 2), 与肝内胆管结石引起的胆管扩张明显不同.

我们认为术前 MRCP 检查对肝内胆管结石手术治疗中术式的选择具有重要的指导价值, 可对病情作出更加符合实际的评估, 能为术前制定具体的手术方案提供可靠的资料, 对提高肝内胆管结石患者手术的疗效具有重要意义. 当然, 肝内胆管结石大多为胆色素性结石, 形态多为泥沙样结石, 易被胆汁高信号掩盖从而影响诊断, 因此 MRCP 技术需不断地总结和完善的.

#### 4 参考文献

- 董家鸿. 肝胆管结石的临床病理类型与手术方式的选择. 外科理论与实践 2003;8:99
- 雷若庆, 胡滨成, 张圣道. 肝胆管外科入路的应用解剖. 中华普通外科杂志 1999;14:11-14
- 黄志强. 黄志强胆道外科. 济南:山东科学技术出版社, 1999:18-19
- 徐庆云. MRCP 的诊断价值. 浙江临床医学 2000;2:580-581
- Romagnuolo J, Bardou M, Rahme E, Joseph L, Reinhold C, Barkun AN. Magnetic resonance cholangiopancreatography: a meta-analysis of test performance in suspected biliary disease. *Ann Intern Med* 2003;139:547-557
- Kim MJ, Mitchell DG, Ito K, Outwater EK. Biliary dilatation: differentiation of benign from malignant causes-value of adding conventional MR imaging to MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2000;214:173-181
- Park do H, Kim MH, Lee SS, Kim SY, Kim JH, Kim HJ, Bae JS, Seo DW, Lee SK, Kim AY, Kim TK, Min YI. Usefulness and limitation of magnetic resonance cholangiopancreatography in patients with hepatolithiasis. *Korean J Gastroenterol* 2003;42:423-430
- 周雁玲, 蒋杰. MRCP 单次激发快速自旋回波成像的临床价值. 中国医学影像学杂志 2001;9:387

## 中药汤剂联合UDCA治疗非酒精性脂肪肝

白洁, 史美媛, 白云驰, 闫素珍, 赵利

白洁, 史美媛, 白云驰, 闫素珍, 赵利, 华北煤炭医学院开滦医院  
河北省唐山市 063000

项目负责人: 白洁, 063000, 河北省唐山市新华东道57号, 华北煤炭医学院  
开滦医院中西医结合肝胆病科。

电话: 0315-3025921

收稿日期: 2004-12-08 接受日期: 2005-01-13

### 摘要

**目的:** 采用中西医结合方法治疗非酒精性脂肪肝, 观察临床疗效。

**方法:** 选择106例非酒精性脂肪肝患者, 按每日就诊先后顺序随机分为中药汤剂组(C组)、中药汤剂加熊去氧胆酸组(C+U组)和护肝片组(H组)。C组以清热利湿、活血解郁为治则, 予自拟中药方剂“保肝降脂汤”口服, C+U组予同样中药方剂加熊去氧胆酸口服, H组予护肝片口服, 疗程均为3 mo。分别于治疗前后检测患者的肝功能、血脂, 并行肝脏的B超、CT影像学检查, 分析、比较三种治疗方案的临床效果。

**结果:** 治疗后, C+U组肝功能血清酶水平明显低于另两组(ALT:  $622.29 \pm 13.17$  nkat/L vs  $728.98 \pm 15.17$  nkat/L 和  $622.29 \pm 13.17$  nkat/L vs  $693.97 \pm 15.17$  nkat/L; AST:  $511.77 \pm 12.00$  nkat/L vs  $650.13 \pm 11.50$  nkat/L 和  $511.77 \pm 12.00$  nkat/L vs  $667.80 \pm 12.34$  nkat/L; ALP:  $777.99 \pm 11.84$  nkat/L vs  $1563.31 \pm 16.00$  nkat/L 和  $777.99 \pm 11.84$  nkat/L vs  $1605.32 \pm 20.1$  nkat/L;  $\gamma$ -GGT:  $1605.32 \pm 20.17$  nkat/L vs  $731.81 \pm 15.00$  nkat/L 和  $1605.32 \pm 20.17$  nkat/L vs  $756.32 \pm 14.17$  nkat/L;  $P < 0.01$ ), C组与H组比较, 各血清酶水平相近(ALT:  $728.98 \pm 15.17$  nkat/L vs  $693.97 \pm 15.17$  nkat/L; AST:  $650.13 \pm 11.50$  nkat/L vs  $667.80 \pm 12.34$  nkat/L; ALP:  $1563.31 \pm 16.00$  nkat/L vs  $1605.32 \pm 20.17$ ;  $\gamma$ -GGT:  $731.81 \pm 15.00$  nkat/L vs  $756.32 \pm 14.17$  nkat/L;  $P > 0.05$ ); C+U组、C组的总胆固醇(TC)、甘油三脂(TG)较治疗前均明显下降(C+U组治疗前后 TC:  $7.85 \pm 0.08$  mmol/L vs  $2.47 \pm 0.06$  mmol/L, TG:  $4.47 \pm 0.05$  mmol/L vs  $0.79 \pm 0.02$  mmol/L; C组治疗前后 TC:  $7.92 \pm 0.06$  mmol/L vs  $4.37 \pm 0.07$  mmol/L, TG:  $4.34 \pm 0.05$  mmol/L vs  $2.46 \pm 0.05$  mmol/L;  $P < 0.01$ ), C+U组下降较C组更为显著( $2.47 \pm 0.06$  mmol/L vs  $4.37 \pm 0.07$  mmol/L 和  $0.79 \pm 0.02$  mmol/L vs  $2.46 \pm 0.05$  mmol/L,  $P < 0.01$ ); 影像学的改善为 C+U组优于C组, C组优于H组, 三组脂肪肝消除率分别为 41.7%、27.5% 和 6.67% ( $P < 0.05$ ); 三组治疗方法的综合疗效显示, C+U组、C组的治愈率和总有效率均高于H组, (治愈率: 30.6% vs 3.3% 和 20.0% vs 3.3%; 总有效率: 94.4% vs 56.7% 和 82.5% vs 56.7%;  $P < 0.01$ ); C+U组的治愈率和总有效率高于C组, 但无统计学意义。

**结论:** “保肝降脂汤”治疗非酒精性脂肪肝, 在改善肝功

能的同时, 能有效地降低血脂, 消除或减轻脂肪肝; 该方剂与熊去氧胆酸合用, 则更能显著地降低肝功能血清酶和血脂水平, 肝脏的影像学改变也更加明显减轻, 从而进一步提高疗效。

白洁, 史美媛, 白云驰, 闫素珍, 赵利. 中药汤剂联合 UDCA 治疗非酒精性脂肪肝. 世界华人消化杂志 2005;13(5):682-685

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/682.asp>

### 0 引言

脂肪肝是由多种疾病和病因引起的肝脏脂肪性病变。近年来, 随着人们生活水平的提高, 脂肪肝的发病人数日趋增多, 且已成为肝纤维化和肝硬化重要的前期病变之一。本研究选择非酒精性脂肪肝患者 106 例, 随机分成三组, 分别采用自拟中药方剂“保肝降脂汤”、中药方剂加熊去氧胆酸(UDCA)和护肝片三种方法治疗, 观察临床效果, 以探讨非酒精性脂肪肝的最佳治疗方案。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择非酒精性脂肪肝患者 106 例, 诊断均符合 2001 年中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学会制定的非酒精性脂肪肝诊断标准<sup>[1]</sup>。患者按每日就诊先后顺序随机分为中药汤剂组(C组)、中药汤剂加熊去氧胆酸组(C+U组)和护肝片组(H组)。C组 40 例, 其中男性 17 例, 女性 23 例; 年龄 21-73 岁, 平均 51 岁; 其中单纯性脂肪肝 11 例, 非酒精性脂肪性肝炎 23 例, 脂肪性肝纤维化或肝硬化 6 例; 合并高血压、糖尿病、高脂血症、胆囊结石病等 28 例。C+U 组 36 例, 其中男性 15 例, 女性 21 例; 年龄 19-76 岁, 平均 52 岁; 其中单纯性脂肪肝 10 例, 非酒精性脂肪性肝炎 21 例, 脂肪性肝纤维化或肝硬化 5 例; 合并高血压、糖尿病、高脂血症、胆囊结石病等 26 例。H 组 30 例, 其中男性 13 例, 女性 17 例; 年龄 16-71 岁, 平均 50 岁; 其中单纯性脂肪肝 8 例, 非酒精性脂肪性肝炎 18 例, 脂肪性肝纤维化或肝硬化 4 例; 合并高血压、糖尿病、高脂血症、胆囊结石病等 22 例。各组患者在性别、年龄、临床分型及并发症等方面差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。

**1.2 方法** C 组以清热利湿、活血解郁为治则, 予自拟中药方剂“保肝降脂汤”(主要成分为柴胡、茵陈、双花、泽泻、黄芩、草决明、大黄、山楂、虎杖、丹参等, 随证加减)口服, 100 mL/次(含干药 65 g), 2 次/d; C+U 组予同样中药方剂加 UDCA 口服, UDCA 150 mg/次, 3 次/d; H 组予护肝片(由黑龙江葵花药业股份有限公司生产, 批号: 国药准字 Z20003336)口服, 4 片/次, 3 次/d。疗程均为 3 mo。

表1 各组治疗前后肝功能变化(mean  $\pm$  SD, nkat/L)

组别		ALT	AST	ALP	$\gamma$ -GGT
C组(n=40)	治疗前	1 242.75 $\pm$ 23.17	1 108.89 $\pm$ 16.67	2 946.09 $\pm$ 17.00	1 421.95 $\pm$ 12.50
	治疗后	728.98 $\pm$ 15.17 <sup>bd</sup>	650.13 $\pm$ 11.50 <sup>bd</sup>	1 563.31 $\pm$ 16.00 <sup>bd</sup>	731.81 $\pm$ 15.00 <sup>bd</sup>
C+U组(n=36)	治疗前	1 255.42 $\pm$ 14.50	1 098.05 $\pm$ 17.67	3 000.60 $\pm$ 17.84	1 436.29 $\pm$ 14.84
	治疗后	622.29 $\pm$ 13.17 <sup>bcdh</sup>	511.77 $\pm$ 12.00 <sup>bcdh</sup>	667.80 $\pm$ 12.34 <sup>bcdh</sup>	1 605.32 $\pm$ 20.17 <sup>bcdh</sup>
H组(n=30)	治疗前	1 239.75 $\pm$ 14.00	1 065.55 $\pm$ 15.67	2 969.43 $\pm$ 16.67	1 414.28 $\pm$ 15.50
	治疗后	693.97 $\pm$ 15.17 <sup>bd</sup>	667.80 $\pm$ 12.34 <sup>bd</sup>	1 605.32 $\pm$ 20.17 <sup>bd</sup>	756.32 $\pm$ 14.17 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 本组治疗前; <sup>d</sup> $P < 0.01$ , 治疗后三组间比较; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 治疗后H组; <sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 治疗后C组。

1.2.1 血清学检测 于清晨采取空腹血, 盲法检测患者的肝功能、血脂。检测方法采用生化分光法, 试剂盒购自德国利德曼公司。

1.2.2 影像学检查 治疗前后, 行肝脏的B超、CT检查, 观察肝脏的影像学改变。

1.2.3 疗效判定标准 综合疗效判定: (1)痊愈: 血生化指标(肝功能、血脂)和B超、CT影像学表现均转为正常。(2)好转: 血生化指标(肝功能、血脂)仍高于正常值但较治疗前降低, B超、CT影像学仍有异常改变, 但较治疗前好转, 肝CT值有所升高; 或血生化指标(肝功能、血脂)和B超、CT影像学改变中有一项以上(包括一项)未转为正常而其他指标转为正常。(3)无效: 血生化指标(肝功能、血脂)和B超、CT影像学改变与治疗前相比无改善或加重。影像学诊断结合B超和CT结果, 以CT值作为判断病变程度的主要依据。根据B超特征判断病变程度<sup>[2]</sup>: (1)轻度脂肪肝: 光点细密, 近场回声增强, 远场回声轻度衰减, 血管结构清晰。(2)中度脂肪肝: 光点细密, 前场回声增强, 远场衰减明显, 血管结构不清晰。(3)重度脂肪肝: 光点细密, 前场回声显著增强, 远场回声显著衰减, 血管结构不能辨认。根据CT表现判断病变程度<sup>[1]</sup>: (1)轻度: 肝脏密度降低, CT值稍低于脾脏, 肝/脾CT比值 $\leq 1.0$ 。(2)肝/脾CT比值 $\leq 0.7$ , 肝内血管显示不清。(3)肝脏密度显著降低甚至呈负值, 肝/脾CT比值 $\leq 0.5$ , 肝内血管清晰可见。

**统计学处理** 所有检查项目均采用盲法检测并由专职统计人员进行统计学处理。治疗前后肝功能、血脂的比较用配对 $t$ 检验; 治疗前三组间肝功能、血脂的比较用方差分析; 治疗后三组间肝功能、血脂的比较用方差分析及 $q$ 检验; 治疗前后三组间影像学变化的比较用 $\chi^2$ 检验; 综合疗效的比较用秩和检验。

## 2 结果

2.1 肝功能变化 疗程结束后, C组、C+U组和H组患者的肝功能血清酶水平均有不同程度下降, 统计学分析有显著性差异( $P < 0.01$ ); 治疗后C+U组各血清酶水平明显低于另两组, 统计学分析有显著性差异( $P < 0.01$ ); 治疗后C组各血清酶水平与H组相近, 统计学分析无显著性差异( $P > 0.05$ )。(表1)

表2 各组治疗前后血脂变化(mean  $\pm$  SD, mmol/L)

组别		TC	TG
C组(n=40)	治疗前	7.92 $\pm$ 0.06	4.34 $\pm$ 0.05
	治疗后	4.37 $\pm$ 0.07 <sup>bdf</sup>	2.46 $\pm$ 0.05 <sup>bdf</sup>
C+U组(n=36)	治疗前	7.85 $\pm$ 0.08 <sup>h</sup>	4.47 $\pm$ 0.05 <sup>h</sup>
	治疗后	2.47 $\pm$ 0.06 <sup>bdf</sup>	0.79 $\pm$ 0.02 <sup>bdf</sup>
H组(n=30)	治疗前	7.78 $\pm$ 0.07	4.34 $\pm$ 0.03
	治疗后	7.72 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	4.30 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 本组治疗前; <sup>d</sup> $P < 0.01$ , 治疗后三组间比较; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 治疗后H组; <sup>h</sup> $P < 0.01$  vs 治疗后C组。

表3 各组治疗前后影像学变化

组别		重度	中度	轻度	正常
C组(n=40)	治疗前	10	16	14	
	治疗后	4	14	11	11
C+U组(n=36)	治疗前	9	14	13	
	治疗后	2	7	12	15
H组(n=30)	治疗前	6	12	12	
	治疗后	6	11	11	2

$\chi^2 = 13.36$ ,  $P < 0.05$ , 治疗后三组间比较。

2.2 血脂变化 疗程结束后, C组、C+U组TC、TG水平均明显下降, 统计学分析有显著性差异( $P < 0.01$ ); C+U组TC、TG水平较C组更低, 统计学分析有显著性差异( $P < 0.01$ ); H组TC、TG水平较治疗前稍有下降, 统计学分析无显著性差异( $P > 0.05$ )。(表2)

2.3 影像学变化 疗程结束后, 结合B超和CT结果判断肝脏的影像学变化, 以肝/脾CT比值 $> 1.0$ 作为脂肪肝消除标准。C+U组脂肪肝消除15/36例, 消除率为41.7%; C组脂肪肝消除11/40例, 消除率为27.5%; H组脂肪肝消除2/30例, 消除率为6.67%。影像学的改善情况为: C+U组优于C组, C组优于H组, 统计学分析有显著性差异( $P < 0.05$ )。(表3)

2.4 综合疗效 C组治愈率20.0%, 好转率62.5%, 总有效率82.5%; C+U组治愈率30.6%, 好转率63.9%, 总

表4 ■ 三组治疗方法疗效比较 (n, %)

组别	n	疗效			总有效 n
		痊愈	好转	无效	
C组	40	8(20.0)	25(62.5)	7(17.5)	33(82.5) <sup>b</sup>
C+U组	36	11(30.6)	23(63.9)	2(5.6)	34(94.4) <sup>b</sup>
H组	30	1(3.3)	16(53.3)	13(43.3)	17(56.7)

<sup>b</sup>P<0.01 vs H组.

有效率94.4%;H组治愈率3.3%,好转率53.3%,总有效率56.7%。两两比较,C+U组、C组的治愈率和总有效率均高于H组,经统计学分析,差异有显著性( $P<0.01$ );C+U组的治愈率和总有效率高于C组,但无统计学意义( $P>0.05$ )。(表4)

### 3 讨论

脂肪肝是由多种疾病和病因引起的肝脏脂肪性病变,可能主要与脂肪代谢异常、氧应激及脂质过氧化损伤、免疫反应、缺氧和肝微循环障碍等有关<sup>[3-4]</sup>。过去曾认为非酒精性脂肪肝是一种良性可逆性病变,但随着对其研究的深入,目前已认为不再是良性病变,他也可以发展为肝纤维化、肝硬化而导致一系列严重并发症<sup>[5]</sup>。因此,早期治疗脂肪肝以控制其病情进展,已成为我们当前面临的重要课题。

非酒精性脂肪肝的药物治疗目前尚不理想,由于大多降脂药物本身具有一定的肝损作用,因而限制了其在脂肪肝治疗中的应用<sup>[6]</sup>。目前常用的有各种抗氧化剂、胆碱、多价不饱和卵磷脂及熊去氧胆酸(UDCA)等,以及中药中的丹参、川芎、泽泻、大黄、枸杞和黄芩等<sup>[5]</sup>。

中医理论认为,脂肪肝以痰湿内停,淤阻气滞为主要病机。治疗慢性肝炎的常用中药制剂护肝片(主要成分为柴胡、茵陈、五味子等)因能疏肝解郁、清热利湿,故能减退黄疸,降低血清转氨酶,抑制肝细胞脂肪性变,促进肝细胞的修复和再生,对非酒精性脂肪肝具有一定的治疗作用<sup>[7]</sup>。

为了探讨非酒精性脂肪肝的最佳治疗方法,提高疗效,我们以清热利湿、活血解郁为治则,并结合中药的现代药理研究和脂质的生化代谢途径选择药物,自拟中药方剂“保肝降脂汤”,主要成分为:柴胡、茵陈、双花、黄芩、泽泻、草决明、大黄、山楂、虎杖、丹参等。根据中医药理,方剂中的柴胡以疏肝解郁为主,茵陈可清热利湿,并长于利胆褪黄疏肝,此二药与双花、黄芩、泽泻、草决明等药配伍,充分发挥疏肝解郁、清热利湿的功效,并兼益肾阴。方中伍以大黄,可泻下攻积,活血祛瘀;伍以山楂,消食化积,活血散瘀。而虎杖不但清热利湿,并与丹参共同发挥活血化瘀软坚之功效。根据现代药理研究和脂质的生化代谢研究,这些药物可从降低血清胆固醇、甘油三酯以及 $\beta$ 脂蛋白的含量,促进脂类在肝脏内的氧化,抑制肝脏胆固醇的合成,减轻脂质在肝脏内的沉积,以及减少其他途径如肠道对胆固醇的吸收等多方面协同作用,

达到降脂目的,同时发挥了利胆保肝作用,促进受损肝细胞的修复与再生,抑制肝脏的纤维化<sup>[8-13]</sup>。治疗结果显示,该方剂在改善患者肝功能的同时,确实能明显降低血脂总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)水平,改善肝脏的影像学表现,从而提高了临床治愈率和有效率。

我们又将目前脂肪肝治疗用药中最有希望的药物UDCA与“保肝降脂汤”联合应用,观察临床效果。结果显示,UDCA明显提高了“保肝降脂汤”对非酒精性脂肪肝的疗效,在改善肝功能、降低血脂、减轻影像学改变等方面均优于单独用“保肝降脂汤”组,使临床疗效得到了进一步提高。

UDCA作为治疗脂肪肝较有希望的药物,他发挥作用的可能机制是:(1)有类似胆固醇树脂消胆胺的作用,可降低血脂。(2)具有利胆作用,可促进胆汁分泌,减轻胆汁淤积,改善肝功能<sup>[14-15]</sup>。(3)抑制脂质过氧化反应,稳定肝细胞膜,保护线粒体<sup>[16-18]</sup>。(4)调节免疫反应,抑制单核细胞产生细胞因子<sup>[19-20]</sup>。(5)还可通过抑制转化生长因子TGF- $\beta_1$ ,从而抗肝细胞凋亡<sup>[21]</sup>。UDCA与“保肝降脂汤”联合应用可能通过以上途径促进了脂肪性病变的肝组织的修复。

总之,以清热利湿、活血解郁为治则的中药组方“保肝降脂汤”治疗非酒精性脂肪肝,在改善肝功能的同时,能有效地降低血脂,消除或减轻脂肪肝;该方剂与熊去氧胆酸(UDCA)合用,则更能显著地降低肝功能血清酶和血脂水平,肝脏的影像学改变也明显减轻,从而进一步提高了临床疗效。该研究结果提示,采用中西医结合的方法治疗非酒精性脂肪肝是一条比较理想的途径。

由于非酒精性脂肪肝是一种多病因引起的疾病,常伴发其他全身性疾病,所以对高血压、糖尿病、高脂血症、胆囊结石病等这些相关性疾病的控制程度直接影响非酒精性脂肪肝的治疗效果。另外,饮食调整和体育运动在非酒精性脂肪肝的治疗中亦不容忽视。以上两点可能是本研究部分病例不能获得明显效果甚至无效的主要原因。我们也可从此得到启示,在考虑非酒精性脂肪肝的治疗方案时,应有整体的观点,重视病因的祛除、伴发病的控制和饮食、运动治疗的配合。这样,非酒精性脂肪肝的疗效将会得到进一步提高。

### 4 参考文献

- 1 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组.非酒精性脂肪肝诊断标准(草案).中华肝脏病杂志 2001;9:325

- 2 李继强. 脂肪肝的影像学诊断. 范建高, 曾民德:脂肪肝. 上海: 上海医科大学出版社, 2000:187-190
- 3 曾民德. 脂肪肝. 中华消化杂志 1999;19:120-122
- 4 范建高, 曾民德, 王国良. 脂肪肝的发病机制. 世界华人消化杂志 1999;7:75-76
- 5 钟岚, 王国良, 范建高. 非酒精性脂肪性肝炎的研究进展. 肝脏 1999;4:177
- 6 曾民德. 降血脂药物在脂肪肝治疗中的应用. 中华肝脏病杂志 2000;8:116-117
- 7 张学武, 周敏, 胡国启. 熊去氧胆酸联合护肝片治疗非酒精性脂肪性肝炎. 中西医结合肝病杂志 2003;13:8-9
- 8 刘燕玲, 陈玉华. 浅谈脂肪肝的中医药治疗. 北京中医药大学学报 1995;18:54-55
- 9 殷国健, 朱向前, 徐力. 中西医结合治疗高脂血症脂肪肝疗效观察. 实用中西医结合杂志 1994;7:104-105
- 10 王浴生, 邓文龙, 薛春生. 中药药理与应用. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1998:70-77
- 11 罗国钧, 罗海琪. 脂肪肝的诊治思路及临床研究进展. 山西中医 1999;15:51-53
- 12 汪萌, 鞠传兰. 中医药治疗脂肪肝近况. 山东中医杂志 1999;18:239-240
- 13 于英春(译). 高脂血症与汉方. 国外医学·中医中药分册 1986;2:19
- 14 钟岚, 范建高, 王国良. 熊去氧胆酸在慢性肝病中的应用及机制. 国外医学·消化系疾病分册 1999;19:91-94
- 15 Elsing C, Sagesser H, Reichen J. Ursodeoxycholate-induced hypercholesterolemia in cirrhotic rats; Further evidence for cholehepatic shunting. *Hepatology* 1994;20:1048-1054
- 16 Rodrigues CMP, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998;101:2790-2799
- 17 Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprecht E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001;33:616-626
- 18 Guldiituna S, Zimmer G, Imhof M, Bhatti S, You T, Leuschner U. Molecular aspects of membrane stabilization by ursodeoxycholate. *Gastroenterology* 1993;104:1736-1744
- 19 Calmas Y, Gane P, Rouger P, Poupon R. Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis: Effect of ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 1990;11:12-15
- 20 Yoshikawa M, Tsujii T, Matsumura K, Yamao J, Matsumura Y, Kubo R, Fukui H, Ishizaka S. Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune response. *Hepatology* 1992;16:358-364
- 21 Keith BD. Ursodeoxycholic acid to inhibit the growth of hepatic metastases. *Med Hypotheses* 2000;55:379-382

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## *H pylori* iceA 基因与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌的关系

张彩凤, 林志辉, 吴芳, 陈明红, 王辛, 付丹, 潘秀珍, 彭孝纬

张彩凤, 林志辉, 吴芳, 陈明红, 王辛, 付丹, 潘秀珍, 彭孝纬, 福建医科大学福建省立临床医院消化内科 福建省福州市 350001  
福建省卫生厅科研基金项目, No. 200022

项目负责人: 林志辉, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建医科大学福建省立临床医院消化内科.

电话: 0591-87699780

收稿日期: 2004-11-12 接受日期: 2004-11-29

### 摘要

**目的:** 研究幽门螺杆菌(*H pylori*)的 iceA 基因与慢性胃炎、消化性溃疡和胃癌的关系。

**方法:** 从胃十二指肠疾病的患者胃镜活检标本中分离培养 *H pylori*, PCR 扩增检测 *H pylori* 的 iceA 基因共 138 例, 其中慢性浅表性胃炎 47 例、慢性萎缩性胃炎 22 例、消化性溃疡 49 例和胃癌 20 例。

**结果:** 138 例中 iceA1 基因、iceA2 基因总的阳性率分别为 47.1% 和 47.8%, 其中 36 例(26.1%)为 iceA1 和 iceA2 均阳性, 43 例(31.2%)为 iceA1 和 iceA2 均阴性。iceA1 在慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、消化性溃疡及胃癌患者 *H pylori* 中的

阳性率分别为 44.7%、40.1%、59.2%、30.0%, iceA2 基因的阳性率分别为 53.2%、31.8%、65.3%、10.0%, iceA1 和 iceA2 在消化性溃疡中的检出率明显高于其他疾病组。

**结论:** *H pylori* 的 iceA1 和 iceA2 基因与消化性溃疡的发病相关。

张彩凤, 林志辉, 吴芳, 陈明红, 王辛, 付丹, 潘秀珍, 彭孝纬. *H pylori* iceA 基因与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(5): 685-687

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/685.asp>

### 0 引言

iceA 基因是 *H pylori* 与胃黏膜细胞接触后诱导表达的基因, 包括 iceA1、iceA2 两个等位基因, 分别存在于不同的 *H pylori* 菌株中, 被认为可能是 *H pylori* 的又一致病因子. iceA 基因能不能作为 *H pylori* 致病性和毒力的流行病学标志, 其等位基因的类型及意义有待于进一步研究确定. 我们分析福建地区临床分离的 *H pylori* 菌株的 iceA 基因类型, 探讨其与胃十二指肠疾病关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 分离的 *H. pylori* 菌株来自 2003-2004 年在我院接受内镜检查的 138 例患者, 其中慢性浅表性胃炎 47 例, 慢性萎缩性胃炎 22 例, 消化性溃疡 49 例和胃癌 20 例. 疾病的诊断依据胃镜和病理学检查.

**1.2 方法** 胃窦黏膜活检标本接种于选择性琼脂培养基上 (含 75 mL/L 羊血及抗生素), 于 37℃ 微需氧环境中培养 3-5 d, 分离菌落, 经菌落形态、涂片染色以及生化反应 (尿素酶、过氧化氢酶、氧化酶) 证实, 冻存于 -70℃ 备用. 用一次性 DNA 抽提试剂盒提取冻存 *H. pylori* 菌株的基因组 DNA, 保存于 -70℃ 备用. *iceA* 基因 PCR 引物设计由博亚生物有限公司合成 (表 1). PCR 反应总体积为 25 μL. *iceA* 的反应条件为 10× 反应缓冲液 2.5 μL, dNTP 0.5 μL, 引物 1 引物 2 各 0.5 μL, TaqE1U, 模板 DNA 4 μL. *iceA* 的扩增条件为 94℃ 40 s, 54℃ 40 s, 72℃ 1 min, 共 35 个循环. PCR 扩增产物经 20 g/l 的琼脂糖凝胶电泳, 电脑图像分析仪观察、分析和摄像记录结果.

**统计学处理** 采用  $\chi^2$  检验和 Fisher 精确检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性.

## 2 结果

在 138 株 *H. pylori* 临床菌株中, *iceA1* 和 *iceA2* 的总检出率分别为 47.1% 和 47.8%, 其中 36 例 (26.1%) 为 *iceA1* 和 *iceA2* 均阳性, 43 例 (31.2%) 为 *iceA1* 和 *iceA2* 均阴性. 图 1 为 *iceA1* 和 *iceA2* 基因片段扩增结果. *iceA1* 和 *iceA2* 基因消化性溃疡组 (59.2%, 65.3%) 的检出率显著高于慢性胃炎 (43.5%, 46.4%) 和胃癌 (30%, 10%) 组 ( $P < 0.05$ ), 其他疾病组之间的 *iceA1* 和 *iceA2* 的检出率无显著性差异 ( $P > 0.05$ ). *iceA1* 基因和 *iceA2* 基因同时阳性的菌株有 36 例, 其中慢性浅表性胃炎有 12 (33.3%) 例, 慢性萎缩性胃炎有 4 例 (11.1%), 消化性溃疡有 20 例 (55.6%), 没有发现胃癌患者中有混合感染. *iceA2* 基因表现为 229 bp 和 334 bp 的片段, 部分菌株可同时具有 229 bp 和 334 bp 的基因片段. *iceA2* 的基因片段扩增结果在不同疾病的检出率有差别 (表 2).

表 1 *iceA* 基因 PCR 引物

目的基因	引物序列	产物的大小
<i>iceA1F</i>	5' GTGTTTTTAACCAAAGTATC3'	246 bp
<i>iceA1R</i>	5' CTATAGCCAGTCTCTTTGCA3'	
<i>iceA2F</i>	5' GTTGGGTATATCACAATTTAT3'	
<i>iceA2R</i>	5' TTGCCCTATTTTCTAGTAGGT3'	229 bp 334bp

表 2 *iceA2* 基因片段在不同疾病中的检出  $n(\%)$

诊断	229 bp	334 bp	229 bp+334 bp	合计
慢性浅表性胃炎	9(36.0)	7(28.0)	9(36.0)	25(37.9)
慢性萎缩性胃炎	2(28.0)	4(57.1)	1(14.3)	7(10.6)
消化性溃疡	7(21.9)	13(40.6)	12(37.5)	32(48.5)
胃癌	1(50.0)	1(50.0)	0(0.0)	2(3.0)

## 3 讨论

*iceA* 基因是 *H. pylori* 与胃黏膜细胞接触后诱导表达的基因, 包括 *iceA1*、*iceA2* 两个等位基因, 分别存在于不同的 *H. pylori* 菌株中. 其中 *iceA2* 基因变异较大, 可表现为 229 bp、334 bp、549 bp 不同长度基因片段. *iceA1* 被认为与十二指肠球部溃疡的发生密切相关, 而具有 *iceA2* 的 *H. pylori* 菌株与慢性胃炎的发生相关, 也有学者认为 *iceA2* 基因与消化性溃疡相关, 因此被认为是 *H. pylori* 的又一致病基因<sup>[4-9]</sup>. *iceA1* 与编码乳糖奈瑟菌的核酸内切酶基因 *nla III R* 同源, 但在蛋白水平的同源性仅有 52%, *iceA2* 基因的变异较大, 基因库中尚未见其有同源序列的存在<sup>[11-15]</sup>. 由于文献所报告的结果差异较大, *iceA* 基因能不能作为 *H. pylori* 致病性和毒力的流行病学标志, 其等位基因类型的相关研究的意义有待于进一步研究确定. 不同国家的学者报告的 *iceA1*、*iceA2* 检出率及其与消化系统疾病的关系也不尽相同. 在巴西<sup>[1]</sup> *iceA2* 型 *H. pylori* 菌株的检出率为 90.1%, 与消化性溃疡关系密切. Van Doorn *et al*<sup>[2]</sup> 报道 *iceA1* 基因的检出率为 56.4%, *iceA2* 基因的检出率为 26.6%, *iceA1* 基因和 *iceA2* 基因都为阳性的检出率为 14.9%, 提示部分患者可能存在 *iceA1* 和 *iceA2* 阳性的混合感染情况. *iceA1* 基因和消化性溃疡相关. *iceA1*、*iceA2* 何者与消化性溃疡有关, 或二者都有关, 有待进一步研究. 国内 *iceA* 基因的研究较少, 有限的文献认为 *iceA* 基因与消化系统疾病没有关系<sup>[3]</sup>.

迄今为止, 关于 *H. pylori iceA* 基因与胃十二指肠疾病关系有大量截然相反的研究报道, 这些相反结果可能与下列因素有关: (1) 不同地区的 *H. pylori* 菌株的 *iceA* 基因表达与否及表达类型不同; (2) *iceA* 基因可能

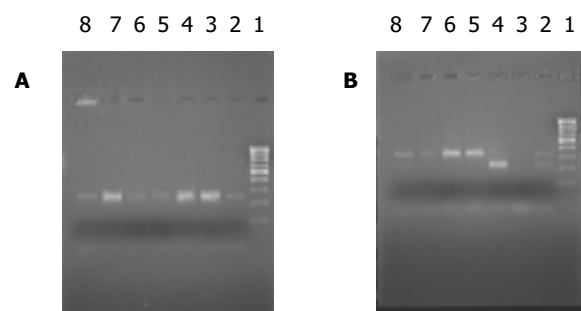


图 1 基因片段的扩增结果. A: *iceA1*: 1 为 100 bp 标志, 2-8 *iceA1* 扩增片段; B: *iceA2*: 1 为 100 bp 标志, 2、8 为同时有 229 bp 和 334 bp, 3 为 *iceA2* 阴性, 4 为 229 bp, 5-7 为 334 bp.

和 *H. pylori* 菌株的其他基因存在协同作用. 或存在更重要的毒力基因; (3) *H. pylori* 感染个体的宿主因素、环境因素等相互作用的相互作用的结果. 本结果显示在福建地区人群中, *iceA1* 基因总的阳性率为 47.1%, *iceA2* 基因总的阳性率为 47.8%. 慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、消化性溃疡和胃癌患者中分离的 *H. pylori* 菌株中, 消化性溃疡患者感染的 *H. pylori* 菌株 *iceA1* 基因和 *iceA2* 基因的阳性率均明显高于其他组. 对 *iceA2* 基因进行扩增时, 只出现了 229 bp 和 334 bp, 而没有发现文献中所报道的 549 bp 片段<sup>[2]</sup>, 日本分离的 *H. pylori* 也不具有 549 bp 的 *iceA2* 基因片段<sup>[4]</sup>. 我们发现 26.1% 患者同时存在 *iceA1*+ 和 *iceA2*+ 菌株混合性感染<sup>[10]</sup>, 高于多数文献报道情况<sup>[2]</sup>. 其原因除地域差异外, 尚需进一步研究分析. 我们认为 *iceA* 基因(包括 *iceA1*, *iceA2*) 在消化性溃疡的发病中起着重要作用, *iceA1*, *iceA2* 阳性的 *H. pylori* 菌株感染者将更有可能发生消化性溃疡. *iceA1*, *iceA2* 阳性的 *H. pylori* 菌株可以在同一患者中出现, 因此在 *H. pylori* 的防治中也应重视混合感染的存在.

#### 4 参考文献

- 1 Ashour AA, Collares GB, Mendes EN, de Gusmao VR, Queiroz DM, Magalhaes PP, de Carvalho AS, de Oliveira CA, Nogueira AM, Rocha GA, Rocha AM. *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol* 2001;39:1746-1750
- 2 Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P, Ng EK, Atherton JC, Blaser MJ, Quint WG. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* *vacA*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2597-2603
- 3 Perng CL, Lin HJ, Lo WC, Tseng GY, Sun IC, Ou YH. Genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer bleeding. *World J Gastroenterol* 2004;10:602-605
- 4 Yamaoka Y, Malaty HM, Osato MS, Graham DY. Conservation of *Helicobacter pylori* genotypes in different ethnic groups in houston, texas. *J Infect Dis* 2000;181:2083-2086
- 5 Ryan KA, van Doorn LJ, Moran AP, Glennon M, Smith T, Maher M. Evaluation of clarithromycin resistance and *cagA* and *vacA* genotyping of *Helicobacter pylori* strains from the west of Ireland using line probe assays. *J Clin Microbiol* 2001;39:1978-1980
- 6 Warburton-Timms VJ, Charlett A, Valori RM, Uff JS, Shepherd NA, Barr H, McNulty CA. The significance of *cagA*(+) *Helicobacter pylori* in reflux oesophagitis. *Gut* 2001;49:341-346
- 7 Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Conservation of the *cag* pathogenicity island is associated with *vacA* alleles and gastroduodenal disease in South African *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 2001;49:11-17
- 8 Tombola F, Pagliaccia C, Campello S, Telford JL, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. How the loop and middle regions influence the properties of *Helicobacter pylori* *VacA* channels. *Biophys J* 2001;81:3204-3215
- 9 Gonzalez-Valencia G, Atherton JC, Munoz O, Dehesa M, la Garza AM, Torres J. *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. *J Infect Dis* 2000;182:1450-1454
- 10 Kidd M, Peek RM, Lastovica AJ, Israel DA, Kummer AF, Louw JA. Analysis of *iceA* genotypes in South African *Helicobacter pylori* strains and relationship to clinically significant disease. *Gut* 2001;49:629-635
- 11 Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, van Der Ende A, van Der Hulst RW, Wirth HP, Hook-Nikanne J, Thompson SA, Blaser MJ. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *J Infect Dis* 2000;181:273-282
- 12 Netzer P, Gut A, Brundler R, Gaia C, Halter F, Inauen W. Influence of pantoprazole on oesophageal motility, and bile and acid reflux in patients with oesophagitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1375-1384
- 13 Zheng PY, Hua J, Yeoh KG, Ho B. Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not *cagA*, *iceA*, and *vacA* in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population. *Gut* 2000;47:18-22
- 14 Gottke MU, Fallone CA, Barkun AN, Vogt K, Loo V, Trautmann M, Tong JZ, Nguyen TN, Fainsilber T, Hahn HH, Korber J, Lowe A, Beech RN. Genetic variability determinants of *Helicobacter pylori*: influence of clinical background and geographic origin of isolates. *J Infect Dis* 2000;181:1674-1681
- 15 Tombola F, Del Giudice G, Papini E, Zoratti M. Blockers of *VacA* provide insights into the structure of the pore. *Biophys J* 2000;79:863-873

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

## 慢性乙型肝炎300例的生命质量评价

李洁, 史美育, 王剑, 张文彤, 赵晓东, 张虹, 邸若虹

李洁, 史美育, 王剑, 赵晓东, 张虹, 邸若虹, 上海中医药大学上海市中医药循证医学研究中心 上海市 201203  
张文彤, 复旦大学公共卫生学院 上海市 200032  
上海市科学技术委员会生物医药资助项目, No. 014319366  
项目负责人: 李洁, 201203, 上海浦东新区蔡伦路1200号, 上海中医药大学上海市中医药循证医学研究中心, ljtcn@163.com  
电话: 021-51322636 传真: 021-51322635  
收稿日期: 2005-01-11 接受日期: 2005-01-20

### 摘要

**目的:** 通过对300例慢性乙型肝炎患者生命质量(QOL)的统计分析, 探讨影响慢性乙型肝炎患者QOL的各种影响因素, 提供改善慢性乙型肝炎患者QOL的依据;探讨QOL作为疗效评价的可行性, 针对以往QOL研究中存在的统计问题进行探讨。

**方法:** 通过对300例慢性乙型肝炎患者生命质量进行临床流行病学调查, SIP量表包括一般资料和生存质量表两部分。对于观察因素从定量和定性两大类进行统计分析, 数据处理用SPSS统计软件包进行统计分析。

**结果:** 慢性乙型肝炎患者生命质量水平下降表现为社会关系(SI)、娱乐与消遣(RP)、睡眠与休息(SR)、警觉行为(AB)、家务管理(HM)、灵活性(M)、饮食(E)、情感行为(EB)等功能障碍较为明显。影响慢性乙型肝炎患者QOL主要因素按其重要性依次为身高、性别、婚姻、吸烟史和既往史。

**结论:** 用SIP量表进行生命质量测定能较全面地评价慢性乙型肝炎患者的疗效, 具有可行性。

李洁, 史美育, 王剑, 张文彤, 赵晓东, 张虹, 邸若虹. 慢性乙型肝炎300例的生命质量评价. 世界华人消化杂志 2005;13(5):688-689  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/688.asp>

### 0 引言

全世界乙型肝炎病毒(HBV)携带者约3.5亿。根据国内1992/1994年全国血清流行病学调查, HBsAg携带率9.75%, 约1.2亿。慢性乙型肝炎患者约为3000万人, 其中10-20%可发展为肝硬化, 1-5%可演变为肝癌。HBV携带者的母亲可以通过垂直传播给婴儿, 婴儿时期感染HBV者, 90%以上感染者成为慢性HBsAg携带者, 影响下一代的健康。当今医学模式已从单纯的生物医学模式转变为生物-心理-社会医学模式, 人们认识到医学研究的对象-人, 除了要考虑其生物性外, 还必须考虑其心理因素和社会因素, 即从生物学上的人扩展到社会上的人, 要把治病扩展到治患者。人们对于生活的概念也从单纯地活着转变为如何活着, 强调的是生活质量而不仅是生存时间。生命质量(quality of life, QOL)是在WHO提倡

的健康新概念。McSweeney *et al*<sup>[1]</sup>则采用了MMPI(minnesota multiphasic personality inventory), POMS(the profile of mood status), SIP(the sickness impact profile)和KAS(the katz adjustment scale)进行生命质量研究, 并进行了比较, 认为SIP较好。Mackenzie *et al*认为该量表经过多方使用, 是一种有效的功能状态测量工具<sup>[2]</sup>。Mitchell *et al*<sup>[3]</sup>认为SIP各类得分 $\geq 2$ , 即存在功能损失。我们分析了影响慢性乙型肝炎患者QOL的各种影响因素, 以提供改善慢性乙型肝炎患者QOL的依据;探讨QOL作为疗效评价的可行性, 针对以往QOL研究中存在的统计问题进行探讨。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 上海市传染病医院、上海中医药大学附属曙光医院、上海中医药大学附属龙华医院、上海市中医医院、上海中医药大学附属岳阳医院慢性乙型肝炎患者。符合中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订(中华肝病杂志2000;8(6))病毒性肝炎防治方案的慢性乙型肝炎的诊断标准。年龄18-70岁之间, 性别不限。乙肝病毒感染病史明确, 病程 $>6$  mo。无严重的心、脑、肾、肺功能障碍及重症糖尿病, 并发肝性脑病II度以上患者, 严重的自发性细菌性腹膜炎、上消化道出血、肝肾综合征。

**1.2 方法** 正式调查之前进行调查员(医生)培训, 调查员必须具备必要的流行病学知识, 充分了解调查的目的和要求, 熟悉调查方法和调查项目的意义, 熟练掌握慢性乙型肝炎相关的基础知识。同时, 调查员必须具有实事求是的科学态度。在调查时调查员应注意把握技巧, 避免对调查对象的诱导暗示性提问。填写调查表时字迹要清楚, 并且妥善保存资料。调查路径在患者入院后或首次门诊时, 在征得患者同意后, 即进行问卷调查。所有正式调查的对象采用调查员面对患者进行, 也可以由患者独自完成。资料的完整性好, 没有缺项, 可靠性强。调查表分为两大部分: 第一部分包括一般资料、生存质量表。一般资料包括: (1)姓名、性别、年龄、婚姻、职业、教育程度、居住地、身高、体重; (2)吸烟史、饮酒史、肝病家族史; (3)门诊号、住院号; (4)初诊日期、调查日期; (5)诊断。第二部分包括可能影响慢性乙型肝炎生命质量的量表(SIP)。SIP包括136个项目, 共12类来评价疾病的功能障碍。其中属于“身体方面”(SD-I)的有3类: 行走(Ambulation, A)、灵活性(Mobility, M)、躯体运动(Body care & movement, BCM); 属于“社会心理方面”(SD-II)的有4类: 即社会关系(Social Interaction, SI)、交流(Communication, C)、情感行为(Emotional behaviour, EB)、警觉行为(Alertness behaviour, AB); 其他5类还包括睡

眠(Sleep & Rest, SR)、工作(Work, W)、家务管理(Home Management, HM)、娱乐与消遣(Recreation & Pastime, RP)和饮食(Eating, E). 整个量表的总分, 体力和社会心理方面, 以及12类得分都是从0-100分, 其得分是根据每项功能障碍的相对严重性的估计, 由美国华盛顿大学卫生服务系组织400余名各方面专家, 事先决定权数来计算的. 得分愈高, 表示功能障碍愈严重, QOL水平就愈低.

**统计学处理** 由于观察因素有定量和定性两大类. 对于计量的指标可直接取原始记录, 对于定性的指标采取数量化的方法将其编码. 数据处理用SPSS统计软件包完成所有的统计分析.

## 2 结果

被调查对象300例, 男202例, 占67.3%, 女98例, 占32.7%, 男女比例2.06:1; 有肝炎家族史者85例, 占28.4%; 有饮酒史者44例, 占14.7%; 有吸烟史者65例, 占21.7%; 有既往史者18例, 占6.0%; 年龄17-70岁, 平均年龄39.2岁; 平均身高168 cm, 平均体重63.7 kg. 患者职业情况发生比例从高到低依次为工人71例(57.3%), 公司职员49例, 服务行业18例, 学生14例, 教师11例, 失业11例, 工程师9例, 农民8例, 金融行业5例, 军人4例, 其他人员98例. 患者受教育程度发生比例从高到低依次为中学172例, 大学98例, 小学24例, 研究生6例. 通过计算慢性乙型肝炎患者的QOL, 得到各类功能损失分总和、各类功能损失分总和均值和各类功能分均值(表1). 各方面的功能障碍影响依次为SI, RP, SR, AB, HM, BM, E, EB, BCM, W, A, C. 功能障碍愈严重, 表示生命质量水平愈低. 计算慢性乙型肝炎患者的QOL各个方面的平均得分、标准差、偏度、峰度和正态检验(表2). 从逐步回归模型(表3), 可得出影响所调查的慢性乙型肝炎患者生命质量的因素, 按其重要性依次为: 身高, 性别, 婚姻, 吸烟史, 既往史.

表1 慢性乙型肝炎患者 QOL 功能得分

	损失分总和	损失分均值	功能分均值
SR	3 694.2	12.31	24.67
EB	2 415.7	8.05	11.42
BCM	971.2	3.23	1.61
HM	3 489.1	11.63	17.41
BM	3 344.2	11.14	15.50
SI	10 032.3	33.44	23.06
A	892.6	2.97	3.53
AB	3 605.5	12.01	15.46
C	373.8	1.24	1.71
W	961.6	3.20	6.22
RP	5 275.9	17.58	41.67
E	2 567.6	8.55	12.13
SD- I			5.02
SD- II			14.97
SIP			12.50

表2 慢性乙型肝炎患者 QOL 功能得分分布

	均数	标准差	偏度	峰度	KS 检验
SR	12.31	12.52	1.339	1.303	3.467
EB	8.05	12.79	1.978	4.004	5.233
BCM	3.24	10.82	7.929	89.250	7.464
HM	11.63	17.85	1.647	1.809	4.722
M	11.15	14.46	1.417	1.431	4.150
SI	33.441	26.782	1.110	2.250	1.834
A	2.98	8.39	5.739	44.555	6.961
AB	12.02	18.44	1.663	1.923	5.069
C	1.25	4.76	5.187	30.920	8.775
W	3.21	9.94	4.970	29.437	7.502
Rp	17.586	15.039	0.358	-0.717	2.867
E	8.56	12.48	3.957	29.731	4.270

表3 影响 SIP 得分的逐步回归结果

	bi	Sbi	STD(bi)	t	P
身高	-37.605	11.168	-0.277	-3.367	0.001
性别	-4.731	1.766	-0.225	-2.679	0.008
既往史	5.185	2.376	0.122	2.182	0.030
婚姻	3.040	1.303	0.133	2.334	0.020
吸烟史	-3.050	1.418	-0.128	-2.151	0.032

## 3 讨论

慢性乙型肝炎是一种常见的慢性病, 疾病迁延时间较长, 不适合以治愈率、好转率等急性病的指标进行疗效评价, 也不适合以生存分析等肿瘤患者的疗效标准来衡量, 这些患者除了生存时间外, 生存质量更为重要. 本研究提示, 慢性乙型肝炎患者 QOL 各个方面的功能都有下降, 主要包括社会关系(SI)、娱乐与消遣(RP)、睡眠与休息(SR)、警觉行为(AB)、家务管理(HM)、灵活性(M)、饮食(E)、情感行为(EB)功能障碍值得重视, 躯体运动(BCM)、工作(W)、行走移动(A)、交流(C)功能障碍也值得重视. 现行的慢性乙型肝炎的疗效只重视身体方面, 忽视了社会心理、娱乐、工作等的功能障碍影响. SD- I, SD- II, SIP 能够很好地反映慢性乙型肝炎的 QOL.

## 4 参考文献

- McSweeney JA, Grant I, Heaton RK, Adams KM, Timms RM. Life quality of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 1982;142:473-478
- Mackenzie CR, Charlson ME, Digioia D, Kelley K. Can the sickness impact profile measure change? An example of scale assessment. *J Chron Dis* 1986;39:429-438
- Mitchell BD, Stern MP, Haffner SM, Hazuda HP, Patterson JK. Functional impairment in Mexican Americans and non-Hispanic whites with diabetes. *J Clin Epidemiol* 1990;43:319-327

# 磁共振胆胰管成像在肝内胆管结石外科治疗中的价值

巨邦律, 方驰华, 钟洪才, 颜政, 张刚庆, 涂玉亮

巨邦律, 方驰华, 钟洪才, 颜政, 张刚庆, 涂玉亮, 南方医科大学附属珠江医院肝胆外科 广东省广州市 510282

项目负责人: 方驰华, 510282, 广东省广州市海珠区工业大道中253号, 南方医科大学附属珠江医院肝胆外科, fch58520@sina.com

电话: 020-61643211

收稿日期: 2004-12-27 接受日期: 2005-01-13

## 摘要

**目的:** 探讨磁共振胰胆管造影(MRCP)在肝内胆管结石外科诊断治疗中的价值。

**方法:** 对36例肝内胆管结石患者, 术前行MRCP检查, 与术中、术后结果对比, 回顾性评价术前MRCP的价值。

**结果:** 对肝内胆管结石部位显示率为94.4%;对显示结石引起的胆管扩张及狭窄部位、范围准确率达到100%, 术后残余结石率为13.9%。

**结论:** MRCP可准确反应术前结石引起的胆管解剖变化, 可提高术前对肝内胆管结石诊断的正确性和结石取净率, 减少残余结石。

巨邦律, 方驰华, 钟洪才, 颜政, 张刚庆, 涂玉亮. 磁共振胆胰管成像在肝内胆管结石外科治疗中的价值. 世界华人消化杂志 2005;13(5):690-691  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/690.asp>

## 0 引言

肝内胆管由于解剖部位特殊, 胆管树多变, 病理改变复杂而且严重, 术中取净结石难度大, 因而术后胆石残留率高. 术前对肝内胆管结石准确定位及胆管树全貌的掌握直接影响着外科治疗的方法与疗效. 磁共振胰胆管造影(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)为临床提供准确的结石定位、胆管树三维全貌, 对肝内胆管结石的外科治疗具有重要价值. 我们对本院近年来36例肝内胆管结石患者进行了MRCP检查进行了回顾总结, 现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院于1998-04/2004-05月共收治肝内胆管结石并行MRCP检查患者36例, 男19例, 女17例, 年龄32-48岁, 平均年龄为 $38.5 \pm 5.2$ 岁, 主要临床表现为反复右上腹部持续性胀痛, 并常放射至背、肩部, 病史6 mo-30 a不等, 少伴有发热、寒战病史. 部分患者皮肤及巩膜黄染, 肝区叩击痛及压痛不明显. 实验室检查总胆红素大部分正常, 在 $13.4-34.2 \text{ mmol/L}$ 之间, 合并有肝外胆管结石的患者总胆红素增高明显, 在 $71.2-342.1 \text{ mmol/L}$ 之间, 以直接胆红素增高最为显

著,  $51.9-193.4 \text{ mmol/L}$ 不等. 甲胎蛋白及癌胚抗原均正常, 少部分患者有不同程度的肝功能损害。

**1.2 方法** 使用美国GE公司Signa Horizon LX 1.5T超导型磁共振仪进行检查, 扫描前8 h禁食、禁水. 根据董家鸿提出的方法<sup>[1]</sup>将肝内胆管结石患者分为I型(局限型)、II型(区域型)、III a型(弥漫型不伴区域性毁损)、III b型(弥漫型伴区域性毁损)、IV型(弥漫型伴胆汁性肝硬变). 结合术前MRCP检查结果, 以显示肝内胆管结石的部位和数量分布、肝内胆管扩张与狭窄的部位、胆管树三维结构等来决定手术方式。

## 2 结果

本组全部36例肝内胆管结石患者MRCP检查均1次成功, 36例(100%)图像质量均达到诊断要求. 患者中I型(3例)、II型(2例)肝内胆管结石均采用规则切除含结石的肝段或肝叶; III a(17例)型肝内胆管结石, 单纯行以Roux-en-Y术式加T管引流术为基本术式的胆肠引流术. 胆肠引流术的术式繁多, 如高位胆管空肠侧侧大口吻合术、肝总管空肠侧(或端侧)吻合术、皮下盲袢术等, 行胆肠Roux-en-Y手术必须将胆管空肠吻合口建立在胆管狭窄环的上游. 对于III b(16例)型肝内胆管结石切除含区域性毁损的肝段或肝叶为基本术式, 同时(合并有胆管狭窄者, 先将狭窄段胆管切开整形)行以Roux-en-Y术式加T管引流术为基本术式的胆肠引流术. 根据患者结石类型、结石术者经验和医院的具体条件决定术式, 如肝内胆管结石同时伴有肝外胆管显著扩张、曾作Oddi括约肌成形术、Oddi括约肌松弛等者行肝外胆管横断的胆肠引流术, 以减少术后反流性胆管炎的发生. 本组36例肝内胆管结石中无IV型患者, 术中同时用取石钳和纤维胆道镜尽量将结石取净. 本组36例定性诊断正确, MRCP对肝内胆管结石引起的胆管扩张及狭窄部位、范围及是否伴有胰管扩张, 以及结石部位均可直观的显示(图1A-B). 2例肝内广泛泥沙样结石, 肝内胆管无扩张, 未能完全正确诊断, 术中用胆道镜证实为多处肝内胆管结石, 定位诊断准确率达94.4%(34/36). 所有患者术后均予T管造影检查, 36例患者中5例有结石残留, 残石率为13.9%(5/36). 2例出现术后并发症, 其中胆道出血1例, 肺部感染1例, 经治疗后均痊愈出院, 无死亡。

## 3 讨论

肝内胆管结石外科治疗存在的最大问题仍然是术后残石率高, 再次手术率高, 复发率高. 术前缺乏对结石的数量、部位的准确定位, 是其主要原因之一. 术前明确肝

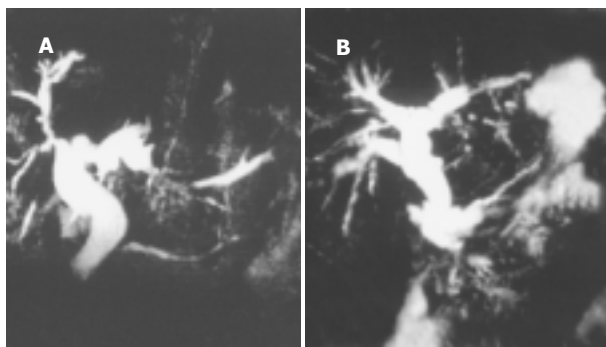


图1 肝内外胆管结石 MRCP. A: 示肝右叶呈枯枝状改变, 左叶胆管扩张明显, 多呈囊状改变, 胆总管明显扩张, 下端截断. B: 可见残留胆囊颈, 左肝管扩张, 并可见泥沙样结石负影, 胆总管下端可见直径约 0.5 cm 充盈缺损, 余肝内外胆管分支未见异常扩张.



图2 肝吸虫病1例 MRCP: 众多周围胆管扩张, 胆总管轻度扩张, 胆囊扩大呈“葫芦”状, 中间有分隔.

内胆管三维空间分布状况、肝内胆管结石部位与数量及狭窄的位置, 对手术方案的制订至关重要, 这是手术成败的关键之一. 目前用于检查肝内胆管结石的方法有 CT、PTC、US 等, 但上述方法对肝内胆管结石患者术前的客观评估仍有一定难度. 肝内胆管结石患者大部分往往合并有肝外胆管结石, 况且肝内胆管的解剖较复杂, 其在解剖上的变异和引流胆汁的范围变异较多, 雷若庆 *et al*<sup>[2]</sup> 报道肝内胆管变异可达 22% 以上. 虽然肝内胆管变异并不少见, 亦有一定的规律性<sup>[3]</sup>, 但不能客观地反应每一患者胆管的解剖结构, MRCP 可以弥补其他胆胰系影像学检查方法 (CT、PTC、US、ERCP 等) 的某些不足<sup>[4]</sup>, 甚或在显示胆胰系的先天性变异和管腔内外结构方面优于其他检查方法.

MRCP 是一种对胆汁输送异常具有高度敏感和特异性的无创性检查手段, 对胆道结石的敏感度达 92%, 特异性达 98%<sup>[5]</sup>, 明显优于文献<sup>[6]</sup>报道的 B 超、CT 对胆道结石的诊断. 与经皮肝穿胆道造影 (PTC) 比较, MRCP 在肝内胆管结石和肝内胆管狭窄显影的诊断上更具有优越性<sup>[7]</sup>. MRCP 具有无创伤性、安全简便、不需 X 线照射, 三维重建图像类似于直接胆胰管造影片, 并可多方位旋转、多角度观察等优点, 已被应用于各种胆道梗阻病变的临床诊断. MRCP 可清晰显示胆管各级分支及扩张程度, 梗阻的位置、形态及性质, 尤其可显示 ERCP 不能显示的胆道梗阻远端胆管.

MRCP 是一种无创性的胆道胰管成像技术, 他可详尽地显示胆胰管的全貌、阻塞部位和范围等<sup>[8]</sup>, 为胆系疾病的影像学检查开辟了一条新的途径.

MRCP 可进行多平面成像及重建, 能直观显示胰胆管的整体观和连续性, 可同时显示近端胆管扩张程度和远端非扩张胆管所提供的丰富的形态学信息, 从冠状面转至矢状面, 任意角度观察, 可消除重叠的结构, 是 US 无法比拟的, 并可明确梗阻的部位、范围及异常胰胆管的特征. 近来由于经腹腔镜行胆道手术的增多, 术中胆管损伤时有发生. 术者术前对胆管变异了解不清, 手术操作时稍有不慎, 可致胆管损伤, 胆漏. 术前行 MRCP 可获得清晰的胆道树全像和结石数目及部位, 熟悉胆管变异的类型, 掌握一定的方法和操作技巧, 可极大提高取石的准确性, 缩短手术时间和减少因盲目取石而可能造成的损伤.

由于胆管结石常常合并胆管炎, 肝内胆管结石对胆管壁的机械性、感染性病损, 导致胆管壁黏膜坏死, 溃烂, 最终导致胆管壁纤维瘢痕增生、缩窄, 故肝内细小胆管因管壁炎性增厚、僵直而不均匀扩张. MRCP 显示 3-4 级胆管呈枯枝状、残根状或粗细不均, 整个胆道系统扩张不成比例, 分布不均. 虽然肝吸虫可以导致 4-5 级肝内小胆管扩张, 但 2-3 级胆管一般扩张不明显或较轻 (图 2), 与肝内胆管结石引起的胆管扩张明显不同.

我们认为术前 MRCP 检查对肝内胆管结石手术治疗中术式的选择具有重要的指导价值, 可对病情作出更加符合实际的评估, 能为术前制定具体的手术方案提供可靠的资料, 对提高肝内胆管结石患者手术的疗效具有重要意义. 当然, 肝内胆管结石大多为胆色素性结石, 形态多为泥沙样结石, 易被胆汁高信号掩盖从而影响诊断, 因此 MRCP 技术需不断地总结和完善的.

#### 4 参考文献

- 董家鸿. 肝胆管结石的临床病理类型与手术方式的选择. 外科理论与实践 2003;8:99
- 雷若庆, 胡滨成, 张圣道. 肝胆管外科入路的应用解剖. 中华普通外科杂志 1999;14:11-14
- 黄志强. 黄志强胆道外科. 济南:山东科学技术出版社, 1999:18-19
- 徐庆云. MRCP 的诊断价值. 浙江临床医学 2000;2:580-581
- Romagnuolo J, Bardou M, Rahme E, Joseph L, Reinhold C, Barkun AN. Magnetic resonance cholangiopancreatography: a meta-analysis of test performance in suspected biliary disease. *Ann Intern Med* 2003;139:547-557
- Kim MJ, Mitchell DG, Ito K, Outwater EK. Biliary dilatation: differentiation of benign from malignant causes-value of adding conventional MR imaging to MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2000;214:173-181
- Park do H, Kim MH, Lee SS, Kim SY, Kim JH, Kim HJ, Bae JS, Seo DW, Lee SK, Kim AY, Kim TK, Min YI. Usefulness and limitation of magnetic resonance cholangiopancreatography in patients with hepatolithiasis. *Korean J Gastroenterol* 2003;42:423-430
- 周雁玲, 蒋杰. MRCP 单次激发快速自旋回波成像的临床价值. 中国医学影像学杂志 2001;9:387

# 溃疡性结肠炎患者血栓前状态分子标志物的变化意义

姜忠信, 刘成玉, 何 宏

姜忠信, 刘成玉, 青岛大学医学院诊断学教研室 山东省青岛市 266021  
何宏, 青岛大学医学院附属医院检验科 山东省青岛市 266003  
项目负责人: 姜忠信, 266021, 山东省青岛市登州路38号, 青岛大学医学院  
诊断学教研室, jzx99@163.com  
电话: 0532-2911511  
收稿日期: 2004-12-27 接受日期: 2005-01-13

## 摘要

**目的:** 探讨溃疡性结肠炎(UC)患者血栓前状态分子标志物水平的变化。

**方法:** 采用ELISA法检测32例活动期UC患者, 20例缓解期UC患者及45名健康对照组的小血小板颗粒膜蛋白-140(GMP-140), 血管性假性血友病因子(vWF:Ag), 血栓调节蛋白(TM), D-二聚体(DD), 凝血酶-抗-凝血酶复合物(TAT)含量并进行分析。

**结果:** 活动期UC患者GMP-140, vWF:Ag, TM, D-D, TAT含量均明显高于缓解期患者及对照组( $P<0.01$ ), 缓解期UC患者血栓前状态分子标志物水平明显高于对照组( $P<0.05$ 或 $0.01$ ), 不同病变部位的活动期UC患者指标由高到低的顺序是:全结肠炎组, 左半结肠炎组, 直乙结肠炎组, 直结肠炎组, 各组之间比较差异有显著性( $P<0.05$ 或 $0.01$ ), 活动期和缓解期UC患者各指标之间呈显著正相关( $P<0.01$ )。

**结论:** UC患者处于明显的血栓前状态, 血栓前状态分子标志物水平与病变活动性及病变范围有关, 血栓前状态分子标志物水平的监测可作为监测UC患者活动性及判断疗效的指标。

姜忠信, 刘成玉, 何宏. 溃疡性结肠炎患者血栓前状态分子标志物的变化意义. 世界华人消化杂志 2005;13(5):692-694  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/692.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种免疫相关性炎症性肠病, 病情的活动性与严重性的评估对指导临床治疗具有十分重要的意义. UC患者常伴有肠外表现, 其中血栓栓塞最为常见, 是导致病情恶化的重要原因之一<sup>[1-3]</sup>. 本研究对52例UC患者的血栓前状态分子标志物水平进行

检测, 旨在探讨UC患者血栓形成的发病机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 病例组UC患者52例, 符合2000年全国炎症性肠病会议修改的对炎症性肠病诊治规范建议的诊断标准<sup>[4]</sup>, 排除心、肝、肾、肺、脑血管疾病等高凝状态患者, 就诊前4 wk未服用影响凝血、纤溶系统的药物. 其中活动期UC患者32例, 男18例, 女14例, 年龄23-58(平均 $40.3 \pm 9.5$ )岁, 根据病变部位不同分为全结肠炎、左半结肠炎、直乙结肠炎、直结肠炎; 缓解期UC患者20例, 男11例, 女9例, 年龄22-55(平均 $38.1 \pm 9.3$ )岁. 对照组为青岛市中心血站健康献血者45名, 男25名, 女20名, 年龄20-55(平均 $36.8 \pm 9.6$ )岁, 试验前4 wk未服用过抗凝药物. 两组年龄、性别差异无显著性。

**1.2 方法** 晨起空腹采静脉血0.0 018 L注入含0.0 002 L 20 g/LEDTA- $\text{Na}_2$ 塑料管中, 1 h内3 000 r/min离心10 min, 取血浆分装于EP管内,  $-30^\circ\text{C}$ 保存, 30 d内用于检测血浆GMP-140, vWF, DD, TAT, TM的水平. GMP-140, vWF, TAT试剂盒由上海太阳生物技术有限公司提供, TM试剂盒由上海贝特生物技术有限公司提供, DD试剂盒由上海捷门生物公司提供, 操作严格按照试剂盒说明书进行。

**统计学处理** 检测结果以(mean $\pm$ SD)的方式表示, 采用SPSS11.0统计软件进行 $t$ 检验, Pearson相关性检验。

## 2 结果

活动期UC患者GMP-140, vWF, DD, TAT, TM水平显著升高, 与缓解期患者及对照组比较差异有显著性( $t = 7.282-54.079$ ,  $P<0.01$ ), 而缓解期UC患者各指标与对照组比较差异也有显著性( $t = 12.999-25.280$ ,  $P<0.05-0.01$ , 表1). 活动期UC患者GMP-140, vWF, DD, TAT, TM水平由高到低的顺序是:全结肠炎、左半结肠炎、直结肠炎、直结肠炎, 各组之间比较差异均有显著性( $t = 3.15-19.15$ ,  $P<0.05-0.01$ ), 其中全结肠炎各指标水平增高尤其显著( $t = 17.40-3.15$ ,  $P<0.05-0.01$ , 表2)。

表1 UC患者血浆GMP-140, vWF, DD, TAT, TM含量(mean $\pm$ SD)

分组	<i>n</i>	TAT( $\mu\text{g/L}$ )	GMP-140( $\mu\text{g/L}$ )	vWF:Ag(%)	D-D(mg/L)	TM( $\mu\text{g/L}$ )
活动期UC	32	14.2 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	20.6 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	192.9 $\pm$ 8.6 <sup>b</sup>	0.86 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	47.2 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
缓解期UC	20	7.7 $\pm$ 0.50 <sup>ba</sup>	14.0 $\pm$ 1.0 <sup>ba</sup>	137.2 $\pm$ 3.6 <sup>ba</sup>	0.45 $\pm$ 0.06 <sup>ba</sup>	35.0 $\pm$ 5.1 <sup>ba</sup>
对照组	45	4.6 $\pm$ 0.40	9.8 $\pm$ 1.5	123.8 $\pm$ 5.9	0.35 $\pm$ 0.03	26.5 $\pm$ 1.4

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 活动期UC, <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 对照组.

表2 UC病变部位与血浆GMP-140, vWF, DD, TAT, TM含量(mean±SD)

分组	n	TAT(μg/L)	GMP-140(μg/L)	vWF:Ag(%)	D-D(mg/L)	TM(μg/L)
全结肠炎	7	15.8 ± 0.7 <sup>ab</sup>	23.2 ± 0.6 <sup>ab</sup>	204.3 ± 8.4 <sup>ab</sup>	1.0 ± 0.03 <sup>ab</sup>	48.7 ± 0.2 <sup>ab</sup>
左半结肠炎	9	14.5 ± 0.06 <sup>b</sup>	21.4 ± 0.5 <sup>b</sup>	195.1 ± 2.4 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.02 <sup>b</sup>	47.7 ± 0.5 <sup>b</sup>
直乙结肠炎	10	13.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	19.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	188.9 ± 2.1 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.04 <sup>b</sup>	46.7 ± 0.3 <sup>b</sup>
直肠炎	6	13.0 ± 0.1	18.22 ± 0.40	183.0 ± 2.5	0.7 ± 0.04	45.3 ± 0.5

<sup>a</sup>P<0.05 vs左半结肠炎, 直乙结肠炎; <sup>b</sup>P<0.01 vs直肠炎.

表3 UC患者各指标之间相关系数比较(*r*)

	GMP-140	TM	VWF:Ag	DD	TAT
GMP-140	—	0.788 <sup>b</sup>	0.837 <sup>b</sup>	0.840 <sup>b</sup>	0.858 <sup>b</sup>
TM	0.788	—	0.856 <sup>b</sup>	0.790 <sup>b</sup>	0.855 <sup>b</sup>
VWF:Ag	0.837	0.856	—	0.831 <sup>b</sup>	0.962 <sup>b</sup>
DD	0.840	0.790	0.831	—	0.819 <sup>b</sup>
TAT	0.858	0.855	0.962	0.819	—

<sup>b</sup>P<0.01.

活动期UC患者GMP-140, vWF, DD, TAT, TM水平之间呈明显的正相关性( $r = 0.788-0.962$ ,  $P<0.01$ , 表3).

### 3 讨论

溃疡性结肠炎是一种主要累及结肠黏膜的慢性非特异性炎症<sup>[5]</sup>, 病程迁延, 反复发作<sup>[6]</sup>, 病因和发病机制还不十分明确<sup>[7-9]</sup>. UC患者炎症发生时可能直接或间接地造成组织损伤, 肠系膜血管可出现多灶性的微梗死, 发生血小板栓塞性疾病的概率比正常人要高, 这可能与患者体内血小板处于活化状态密切相关<sup>[10]</sup>, 表明UC患者处于明显的血栓前状态<sup>[11]</sup>, 这种高凝状态及血栓形成以常规检测指标很难检测到<sup>[12]</sup>, 通过检测凝血激活的某些微量分子标志物可反映UC患者体内高凝状态的形成<sup>[13-16]</sup>. 我们检测UC患者凝血、抗凝血及纤溶系统激活的分子标志物显示, 活动期UC患者的血浆GMP-140, vWF, DD, TAT, TM明显高于缓解期UC患者及对照组, 其中以全结肠炎患者各指标升高尤为显著, 提示活动期UC患者处于明显的血栓前状态, 且血栓前状态分子标志物水平与病变范围有密切关系.

vWF及TM作为血管内皮细胞受损的敏感指标, 在内皮细胞损伤时, vWF及TM可升高. vWF及TM的增高有利于血小板在受损内皮细胞局部黏附、聚集, 从而有利于血栓的形成. 本结果显示, 活动期UC患者vWF及TM水平均明显升高, 且病变范围越广泛, 血浆vWF及TM水平增高越明显, 表明内皮细胞损伤在这类患者的凝血系统激活中有重要作用, 且与病变部位大小密切相关. 因此, UC患者处于明显的高凝状态, 对这些患者不应全身应用止血敏, 止血环酸等加重高凝状态和微血栓形成的药

物, 而应用抗凝药物, 可改善患者的病情<sup>[13, 17]</sup>.

近年来的研究表明, 血小板活化与UC的发病机制密切相关<sup>[18-20]</sup>, GMP-140作为P选择素家族的重要成员之一, 是体内血小板活化的敏感指标, 与多种炎性细胞的活化和浸润密切相关, 在炎症反应中起重要作用<sup>[21]</sup>. 本文结果显示, 活动期UC患者GMP-140水平明显高于缓解期UC患者及对照组, 而在不同病变范围的UC患者中, 随着病变范围的增大, GMP-140的水平也随着增高, 表明活动期UC患者体内血小板异常活化, 而应用P选择素单抗及改善炎症反应的药物对UC具有治疗作用<sup>[21-23]</sup>. 血小板活化可释放多种炎性因子, 一方面直接参与炎症反应, 另一方面可活化其他的炎性细胞, 参与炎症反应, 最终导致肠黏膜的损伤<sup>[24]</sup>, 而损伤范围越广的患者, 这种情况越明显, 研究表明对这类患者进行抗凝治疗更有效<sup>[13, 17, 25]</sup>. TAT复合物是凝血酶已生成的指标, 在血栓前状态时TAT含量增高<sup>[26]</sup>. 本研究提示血浆TAT水平在活动期UC患者明显高于缓解期患者及对照组, 表明活动期UC患者凝血系统被明显激活, 这可能与UC患者肠系膜微血栓形成密切相关.

DD作为交联纤维蛋白的降解产物, 其水平增高反映凝血酶生成增高和继发性纤溶活性增强. 本结果显示活动期UC患者血浆DD水平明显高于缓解期UC患者及对照组, 且与病变范围呈正相关, 表明活动期UC患者存在继发性纤溶功能亢进的病理生理改变, 这与文献<sup>[27]</sup>报道相一致. 作为血管内皮细胞损伤的指标vWF及TM, 凝血酶生成的指标TAT、血小板活化的指标GMP-140以及纤溶系统被激活的指标DD, 在活动期UC患者中均明显高于对照组及缓解期UC患者, 且病变范围越广, 指标升高越明显, 各指标在活动期UC患者中呈正相关, 表明UC患者凝血、抗凝及纤溶系统均被激活, 各指标相互作用引

起肠系膜局部血栓形成. 因此, 有学者认为对活动期 UC 患者进行肝素抗凝治疗很有必要性, 而且没有明显的副作用<sup>[27-29]</sup>; 而缓解期 UC 患者各指标也是增高的, 但没有活动期 UC 患者明显, 表明凝血, 纤溶指标升高程度可反映 UC 患者病情的活动程度, 经治疗缓解后, 炎症反应虽然得到一定控制, 但仍高于对照组, 表明对 UC 患者进行维持治疗的重要性<sup>[30-31]</sup>. 因此, 检测 UC 患者血栓前状态分子标志物水平不仅对 UC 发病机制的探讨有一定临床意义, 而且对病情的活动程度及疗效评价均有一定参考价值.

#### 4 参考文献

- 1 贺国斌, 欧阳钦, 陈岱云, 李俸媛. 溃疡性结肠炎结肠组织微血栓形成的研究. 中国内镜杂志 2003;9:34-35
- 2 江学良, 秦成勇, 李国庆. 溃疡性结肠炎的其他治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:341-342
- 3 Larsen TB, Nielsen JN, Fredholm L, Lund ED, Brandslund I, Munkholm P, Hey H. Platelets and anticoagulant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:92-96
- 4 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. 中华内科杂志 2001;40:138-141
- 5 Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults. american college of gastroenterology, practice parameters committee. *Am J Gastroenterol* 1997;92:204-211
- 6 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:158-161
- 7 Wu HG, Zhou LB, Shi DR, Liu SM, Liu HR, Zhang BM, Chen HP, Zhang LS. Morphological study on colonic pathology in ulcerative colitis treated by moxibustion. *World J Gastroenterol* 2000;6:861-865
- 8 Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Plasma matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as biomarkers of ulcerative colitis activity. *World J Gastroenterol* 2003;9:2843-2845
- 9 周婷, 林平, 潘慧, 梅林. 溃疡性结肠炎发病机制及其研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1782-1786
- 10 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 尚瑞莲, 齐凤. 抗栓灵含片治疗伴有血小板活化的难治性溃疡性结肠炎. 世界华人消化杂志 2003;11:1214-1218
- 11 赵金满, 杜绍荣, 傅宝玉. 平均血小板体积与炎症性肠病活动性的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:1360-1361
- 12 罗燕军, 于皆平. 炎症性肠病活动性的分子标志物. 世界华人消化杂志 2001;9:698-701
- 13 Jiang XL, Quan QZ, Liu T, Dong XC. Recent advances in research of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:216-218
- 14 Xia B. Etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:245-250
- 15 Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-184
- 16 Kapsoritakis AN, Koukourakis MI, Sfiridaki A, Potamianos SP, Kosmadaki MG, Koutroubakis IE, Kouroumalis EA. Mean platelet volume: a useful marker of inflammatory bowel disease activity. *Am J Gastroenterol* 2001;96:776-781
- 17 王青, 许琳. 溃疡性结肠炎的实验室检查和活动性评估. 世界华人消化杂志 2000;8:336-337
- 18 Dong WG, Liu SP, Zhu HH, Luo HS, Yu JP. Abnormal function of platelets and role of angelica sinensis in patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2004;10:606-609
- 19 Van Bodegraven AA, Schoorl M, Baak JP, Linskens RK, Bartels PC, Tuynman HA. Hemostatic imbalance in active and quiescent ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:487-493
- 20 郭洁, 沈志祥, 谭诗云. 炎症性肠病的活动性指标. 世界华人消化杂志 2001;9:1431-1434
- 21 陈维雄, 陈金联, 达炜, 陈尼维, 朱金水. P 选择素和 ICAM-1 对小鼠溃疡性结肠炎的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:722-724
- 22 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 齐凤. 溃疡性结肠炎患者黏附分子的变化意义. 华人消化杂志 1998;6:54-55
- 23 Das KM, Farag SA. Current medical therapy of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2000;6:483-489
- 24 Fagerstam JP, Whiss PA, Strom M, Andersson RG. Expression of platelet P-selectin and detection of soluble P-selectin, NYP and RANTES in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* 2000;49:466-472
- 25 江学良. 重视溃疡性结肠炎的诊断和个体化规范化治疗. 世界华人消化杂志 2003;11:1081-1082
- 26 吴方, 王学锋, 曾晓颖, 何清, 璩斌, 焦洁茹, 黄霞萍, 王鸿利. 高凝状态患者止凝血分子标志物的检测及其临床意义. 上海医学检验杂志 2000;15:180-182
- 27 贺国斌, 欧阳钦. 溃疡性结肠炎的血栓前状态与肝素治疗. 国外医学内科学分册 2000;27:238-241
- 28 Rampton DS. Management of difficult inflammatory bowel disease: where are we now? *World J Gastroenterol* 2000;6:315-323
- 29 韩英, 李世荣. 溃疡性结肠炎治疗的新进展及新策略. 世界华人消化杂志 2000;8:1273-1275
- 30 江学良. 重视溃疡性结肠炎的维持治疗. 世界华人消化杂志 2005;13:1-5
- 31 陈治水, 危北海, 张万岱. 溃疡性结肠炎中西医结合诊治方案. 世界华人消化杂志 2004;12:2690-2693

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 十二指肠溃疡患者 *H pylori* 根治前后 NO、TNF $\alpha$ 含量和 NOS 表达的变化及意义

冯丽英, 冯志杰, 姚希贤

冯丽英, 冯志杰, 姚希贤, 河北医科大学第二医院消化内科  
河北省石家庄市 050000  
项目负责人: 冯丽英, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化内科. ffly513@sohu.com  
电话: 0311-7222301  
收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2005-01-26

## 摘要

**目的:** 观察 *H pylori* 感染对十二指肠溃疡(DU)患者 NOS、NO 和 TNF $\alpha$  的影响, 探讨 *H pylori* 感染、NO 和 TNF $\alpha$  在 DU 中的作用和意义。

**方法:** 随机选择经电子胃镜和病理检查确诊的 *H pylori* 阳性 DU 患者 60 例, 采用快速尿素酶试验、组织涂片 Gram 染色和 Warthin-Starry 银染色进行 *H pylori* 检测。用兰索拉唑 + 阿莫西林 + 克拉霉素治疗 7 d, 于 *H pylori* 根治前后检测血清 NO、TNF $\alpha$  的含量、免疫组化法检测胃窦黏膜 eNOS 和 iNOS 蛋白的表达, 并与内镜和病理检查证实胃黏膜大致正常 *H pylori* 阴性的 15 名健康志愿者作对照观察。

**结果:** *H pylori* 根治率为 82.14%(46/56), 溃疡愈合率 89.28%(50/56)。正常人胃黏膜以 eNOS 表达为主, iNOS 表达很少, NO、TNF $\alpha$  含量少, *H pylori* 感染后胃黏膜 eNOS、iNOS 表达和 NO、TNF $\alpha$  含量较正常对照增加( $3568.78 \pm 624.34$ ,  $238.43 \pm 72.92$  与  $2448.27 \pm 723.31$ ,  $138.53 \pm 59.65$ ;  $P < 0.001$ ), iNOS 表达更显著。*H pylori* 根除后, eNOS、iNOS 的表达以及 NO 和 TNF $\alpha$  含量( $2908.74 \pm 717.58$ ,  $142.43 \pm 58.63$ )均低于治疗前( $P < 0.001$ ), 但 iNOS 和 NO 仍高于正常对照组( $P < 0.05$ )。

**结论:** iNOS 过度表达和 NO、TNF $\alpha$  含量增加可能在消化性溃疡的发病机制中发挥一定作用, 有可能是 *H pylori* 感染导致消化性溃疡的发病机制之一。NO 在溃疡的愈合中也起一定作用。

冯丽英, 冯志杰, 姚希贤. 十二指肠溃疡患者 *H pylori* 根治前后 NO、TNF $\alpha$  含量和 NOS 表达的变化及意义. 世界华人消化杂志 2005;13(5):695-697  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/695.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌 (*H pylori*) 是消化性溃疡 (PU) 的主要致病因子, 根除 *H pylori* 可促进溃疡愈合, 降低溃疡复发。至今为止 *H pylori* 的致 PU 机制并未完全阐明, 由一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化 L-精氨酸生成的一氧化氮 (NO) 是机体的一种重要的调节递质, 其参与胃黏膜的损伤、修复和炎症反应<sup>[1]</sup>。我们观察十二指肠溃

疡 (DU) 患者在根治 *H pylori* 前后体内 NO、诱生型一氧化氮合酶 (iNOS)、内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 含量的变化, 以探讨 *H pylori* 感染对 NO、TNF $\alpha$  的影响以及上述因素在 DU 发病及愈合中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 随机选择经电子胃镜 (Olympus GIF-XQ10; Olympus Optical Co; Tokyo, Japan) 和病理检查确诊的 *H pylori* 阳性 DU 患者 60 例 (男 50 例, 女 10 例, 年龄 22 岁-70 岁, 平均 43.5 岁) 和经胃镜和病理检查证实胃黏膜大致正常 *H pylori* 阴性的健康志愿者 15 名 (男 12 名, 女 3 名, 年龄 20-65 岁, 平均 42.6 岁) 为研究对象。除外严重心、肝、肾功能损害, 以及孕妇、酗酒和药物过敏者。

**1.2 方法** 对所有 *H pylori* 阳性的 DU 患者给与兰索拉唑 30 mg 早餐前 30 min 口服 + 阿莫西林 0.5 bid + 克拉霉素 0.25 bid, 连用 7 d。治疗结束后 4 wk 复查胃镜。

**1.3 *H pylori* 检测** 胃镜直视下于距幽门口 3 cm 以内的胃窦小弯、前壁、大弯处各取活检组织 1 块, 分别用于快速尿素酶试验、组织涂片 Gram 染色和 Warthin-Starry 银染色进行 *H pylori* 检测。上述方法 2 项或以上阳性者, 定为 *H pylori* 阳性; 停药后 4 wk 上述 3 项试验均阴性者, 定为 *H pylori* 根除。

**1.4 NO 测定** 治疗前及治疗后 4 wk 取空腹静脉血 2 mL, 室温静置析出血清后, 离心 10 min, 分离血清, -70℃ 保存待测, 采用高效液相法同批检测, 以血清中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 总量间接显示体内 NO 的生成量。

**1.5 NOS 测定** 治疗前及停药后 4 wk 钳取胃窦黏膜组织各 1 块, 16g/L 甲醛溶液固定、脱水、包埋, 采用 SABC 法染色。eNOS 和 iNOS 抗体 (一抗为兔抗大鼠 IgG) 购自美国 Santa Cruz 公司, 即用型 SABC 试剂盒, 购自武汉博士德生物工程公司。结果判定: 细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性, 综合染色强度及阳性细胞数, 从两方面进行半定量分析, 分别评为 0-3 分。染色强度判定: 阴性 (0 分); 染色弱但明显强于阴性对照 (1 分); 染色清晰 (2 分); 染色强 (3 分)。阳性细胞数判定:  $\leq 10\%$  (0 分); 11-25% (1 分); 26-50% (2 分);  $\geq 50\%$  (3 分)。根据两项指标的积分分为四级: 0-1 分为“-”; 2 分为“+”; 3-4 分为“++”; 5-6 分为“+++”。

**1.6 TNF $\alpha$  测定** 治疗前及治疗后 4 wk 取空腹静脉血 2 mL, 用 EDTA 抗凝, 高速离心取上清液, 置 -20℃ 冰箱保存待测。TNF $\alpha$  测定用酶联免疫黏附法 (ELISA), 以 ng/L 为单位表示血清含量。

**统计学处理** 计量资料用  $F$  检验和配对  $t$  检验, 计数资料用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为有显著差异性。

## 2 结果

有 75 例患者进入观察研究, 其中 *H. pylori* 感染组 4 例患者因拒绝内镜复查退出试验, 完成本研究共 71 例 (*H. pylori* 感染组 56 例, 对照组 15 例), 各组年龄、性别等一般情况具有可比性 ( $P > 0.05$ )。 *H. pylori* 根治率为 82.1% (46/56), 溃疡愈合率 89.3% (50/56)。

**2.1 DU 患者 *H. pylori* 根治前后血清 NO 和 TNF $\alpha$  含量的变化** DU 患者在 *H. pylori* 感染时 NO 和 TNF $\alpha$  含量均明显高于正常人 ( $F = 14.4$  和  $16.1$ ), 根除 *H. pylori* 后二者含量明显降低。如果 *H. pylori* 根治失败, NO 和 TNF $\alpha$  的含量较治疗前有继续增高的趋势, 但无统计学意义。NO 含量在 *H. pylori* 根治后低于治疗前, 但仍高于正常人, TNF $\alpha$  含量在 *H. pylori* 根治后含量降低接近正常人 (表 1)。

表 1 *H. pylori* 根治前后 NO 和 TNF $\alpha$  含量及与正常对照组的比较 (mean  $\pm$  SD)

	<i>n</i>	NO ( $\mu$ g/L)	TNF $\alpha$ (ng/L)
<i>H. pylori</i> 根治前	46	3568.8 $\pm$ 624.3 <sup>d</sup>	238.4 $\pm$ 72.9 <sup>d</sup>
<i>H. pylori</i> 根治后	46	2908.7 $\pm$ 717.6 <sup>bc</sup>	142.4 $\pm$ 58.6 <sup>b</sup>
<i>H. pylori</i> 根治失败	10	3998.1 $\pm$ 628.3 <sup>d</sup>	273.4 $\pm$ 79.4 <sup>d</sup>
正常对照组	15	2448.3 $\pm$ 723.3	138.5 $\pm$ 59.7

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 治疗前; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.001$  vs 正常对照组。

**2.2 *H. pylori* 根治前后胃黏膜 eNOS 和 iNOS 的表达** 正常人胃黏膜可见 eNOS 呈弱阳性, iNOS 表达很少。 *H. pylori* 感染的患者胃黏膜 eNOS 和 iNOS 表达量均明显高于正常人 ( $P < 0.001$ ), 但后者表达更显著。根治 *H. pylori* 后, eNOS 和 iNOS 表达显著低于治疗前, iNOS 仍较正常对照组表达增多 (表 2)。

## 3 讨论

NO 在消化系统有两种产生机制<sup>[1-2]</sup>: 生理状态下, 结构型一氧化氮合酶 (cNOS) 在胃内主要存在于内皮细胞<sup>[3]</sup>, 称 eNOS; iNOS 不表达或很少表达, NO 主要来源于 cNOS, 产生量少, 具有调节胃肠黏膜局部血循环, 抑制胃酸分泌, 清除氧自由基, 抑制血小板聚集, 改善胃肠蠕

动, 保护胃肠黏膜的作用; 而在感染炎症等病理刺激时, NO 主要由中性粒细胞、巨噬细胞等中的 iNOS 在细胞因子白介素 (IL-1、IL-2)、TNF 及细菌脂多糖等激活下产生, 该机制在提高机体抵抗外来微生物能力的同时, 又可对机体正常组织造成损伤。本研究结果显示, 正常对照组胃黏膜主要表达 eNOS, iNOS 表达很少, 产生少量 NO, *H. pylori* 感染患者的胃黏膜组织内 eNOS 和 iNOS 表达均增多 ( $P < 0.001$ ), 但 iNOS 表达更显著。NO 含量明显高于正常对照组 ( $P < 0.001$ ), *H. pylori* 根治后 NOS 表达和 NO 含量均较治疗前下降, eNOS 表达接近正常对照组, 而 iNOS 的表达仍高于正常对照 ( $P < 0.05$ ); 如果 *H. pylori* 根治失败则 NOS 表达和 NO 含量均持续升高。表明 *H. pylori* 感染不但诱导胃黏膜 iNOS 表达增多, 也使 eNOS 表达增多, 二者均参与了 *H. pylori* 相关 DU 的发病机制<sup>[1]</sup>, 可能 iNOS 作用更强<sup>[4]</sup>。血清 NO 含量变化曲线与 NOS 表达曲线相同, 说明 *H. pylori* 感染不但促进 NOS 的表达, 而且增强 NOS 的活性, NO 的产生主要来源于 iNOS。随着 *H. pylori* 的根除和溃疡的愈合, eNOS 的表达恢复正常, 但 iNOS 的表达和 NO 含量仍高于正常 ( $P < 0.05$ ), 提示 NO 可能不仅参与了 *H. pylori* 相关 PU 的发病机制, 还参与了溃疡的愈合过程。有研究报道<sup>[5-7]</sup>, *H. pylori* 感染可能通过激活 NF- $\kappa$ B 因子, 进而促进 COX-2、iNOS mRNA 的表达, NO 的产生的量与 *H. pylori* 的感染程度呈正相关, *H. pylori* 可通过 NO 途径引起十二指肠黏膜上皮细胞损伤, 认为过量生成的 NO 可直接引起细胞毒作用或通过氧自由基氧化生成毒性更大的过氧硝基阴离子和羟自由基, 导致组织细胞氧化损伤和坏死, 形成溃疡。另有研究表明 NO 不仅参加炎症的损伤过程, 而且在炎症和溃疡愈合中也起到重要促进作用<sup>[8]</sup>。Tatemichi *et al*<sup>[9]</sup> 研究发现溃疡愈合中, iNOS 不影响溃疡愈合处的细胞再生和血管形成, 但在 iNOS 基因缺陷鼠, 可引起巨大胃溃疡且炎症反应严重。NO 可通过调节细胞的增生与分化、胶原的沉积与血管再生, 促进损伤愈合<sup>[10]</sup>。本研究 DU 患者在根除 *H. pylori* 后, iNOS 和 NO 仍增高的原因, 可能与胃黏膜的慢性炎症的存在、治疗时间短、溃疡愈合质量不佳以及 NO 继续参与溃疡的修复过程有关, 这也许是其有益的一方面。

TNF $\alpha$  是由巨噬细胞和活化的 T 细胞产生, 对机体具有免疫防护和病理损伤双重的生物学作用。本研究 DU 患者在

表 2 *H. pylori* 根治前后胃黏膜 eNOS 和 iNOS 的表达 (例)

	<i>n</i>	eNOS				iNOS			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
<i>H. pylori</i> 根治前	46	0	13	27	6 <sup>d</sup>	0	4	29	13 <sup>d</sup>
<i>H. pylori</i> 根治后	46	6	34	6	0 <sup>b</sup>	10	20	14	2 <sup>bc</sup>
正常对照组	15	3	10	2	0	10	4	0	0

<sup>b</sup> $P < 0.001$  vs 治疗前; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.001$  vs 正常对照组。

*H. pylori*感染状态下,血清TNF $\alpha$ 含量增高,*H. pylori*根治后,其含量下降接近正常对照组,*H. pylori*根治失败者TNF $\alpha$ 含量继续升高,并且TNF $\alpha$ 的动态曲线与NO、NOS大致相同,提示*H. pylori*感染可导致TNF $\alpha$ 产生增多,TNF $\alpha$ 又可刺激iNOS活性增强产生过量的NO,从而参与PU的病理生理过程.此结果与国内外报道一致<sup>[11-12]</sup>.过量产生的TNF $\alpha$ 除了通过NO途径参与溃疡形成外,本身可促使胃窦G细胞合成或释放胃泌素增加,胃酸分泌增高<sup>[13]</sup>,并通过活化NF- $\kappa$ B介导胃溃疡形成<sup>[14]</sup>,用TNF $\alpha$ 抗体可明显抑制胃泌素的释放和溃疡的形成<sup>[14-16]</sup>.说明*H. pylori*感染引起的TNF $\alpha$ 过量释放,也是*H. pylori*感染导致溃疡形成的一个重要环节.

#### 4 参考文献

- 1 Martin MJ, Jimenez MD, Motilva V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* 2001;7:881-908
- 2 李子俊,陈颜芳,林秋雄,王启仪,刘婉薇,符永恒,詹德娟.幽门螺杆菌阳性胃炎患者胃黏膜一氧化氮合酶活力变化的意义. *中华消化内镜杂志* 2000;17:175-177
- 3 Fischer H, Becker JC, Boknik P, Huber V, Luss H, Neumann J, Schmitz W, Domschke W, Stachura J, Konturek JW. Expression of constitutive nitric oxide synthase in rat and human gastrointestinal tract. *Biochim Biophys Acta* 1999;1450:414-422
- 4 Kaise M, Miwa J, Iihara K, Suzuki N, Oda Y, Ohta Y. *Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase in diverse topographical patterns in various gastroduodenal disorders. *Dig Dis Sci* 2003;48:636-643
- 5 Zhang X, Ruiz B, Correa P, Miller MJ. Cellular dissociation of NF-kappaB and inducible nitric oxide synthase in *Helicobacter pylori* infection. *Free Radic Biol Med* 2000;29:730-735
- 6 王德荣,陈健,李君曼,张振国.慢性胃炎及消化性溃疡诱生型一氧化氮合酶表达和Hp感染的意义. *华人消化杂志* 1998;6:597-599
- 7 Lamarque D, Kiss J, Tankovic J, Flejou JF, Delchier JC, Whittle BJ. Induction of nitric oxide synthase in vivo and cell injury in rat duodenal epithelium by a water soluble extract of *Helicobacter pylori*. *Br J Pharmacol* 1998;123:1073-1078
- 8 曾锦章,张万岱,刘晓霞,张振书,张亚历,周殿元.蛋白酪氨酸激酶与一氧化氮合酶活性的变化在胃黏膜损伤修复中的作用和意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:354-355
- 9 Tatemichi M, Ogura T, Sakurazawa N, Nagata H, Sugita M, Esumi H. Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers. *Int J Exp Pathol* 2003;84:213-220
- 10 Schwentker A, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair. *Surg Clin North Am* 2003;83:521-530
- 11 Mehmet N, Refik M, Harputluoglu M, Ersoy Y, Aydin NE, Yildirim B. Serum and gastric fluid levels of cytokines and nitrates in gastric diseases infected with *Helicobacter pylori*. *New Microbiol* 2004;27:139-148
- 12 Klausz G, Tiszai A, Tiszlavicz L, Gyulai Z, Lenart Z, Lonovics J, Mandi Y. Local and peripheral cytokine response and CagA status of *Helicobacter pylori*-positive patients with duodenal ulcer. *Eur Cytokine Netw* 2003;14:143-148
- 13 张国安,刘小鹏,张信,施水兰,陈紫榕.肿瘤坏死因子对幽门螺杆菌感染者胃泌素产生的影响. *中国人兽共患病杂志* 2000;16:68-69
- 14 Takeuchi T, Miura S, Wang L, Uehara K, Mizumori M, Kishikawa H, Hokari R, Higuchi H, Adachi M, Nakamizo H, Ishii H. Nuclear factor-kappaB and TNF-alpha mediate gastric ulceration induced by phorbol myristate acetate. *Dig Dis Sci* 2002;47:2070-2078
- 15 Hopman WP, de Jong DJ, Naber AH, Jansen JB. Tumour necrosis factor alpha antibody affects gastrin release in Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:522-525
- 16 Beales IL. Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha reduces hypergastrinemia in *Helicobacter pylori* infection. *Am J Med* 2001;111:77-78

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

## 单孔无气腹腔镜的研制

杜运生,周志祥,李东坤,徐占兴,郭振武

杜运生,李东坤,郭振武,唐山市开滦总医院肝胆外科  
河北省唐山市 063000  
周志祥,唐山市人民医院肝胆外科 河北省唐山市 063000  
徐占兴,唐山市医学情报研究所 河北省唐山市 063000  
项目负责人:杜运生,063000,河北省唐山市新华东道开滦总医院肝胆外科.  
duyunsheng1958@163.com  
电话:0315-2850699 传真:0315-2850615  
收稿日期:2005-01-06 接受日期:2005-01-20

### 摘要

目的:综合腹腔镜技术、传统开腹手术和小切口手术的优点,

研制单孔无气腹腔镜器械,达到简化手术设备、提高微创手术质量的目的。

方法:简化纤维冷光源腹腔镜,把新型无影冷光源元件配在侧视摄像头和悬吊拉钩上与深部电动打结器等配合,在直视和监视器放大画面结合下,无气腹条件完成腹部手术,通过家兔10只,狗4只,猪3头的动物实验验证。

结果:该器械是2 cm 单孔无气腹腔镜,可以顺利安全

完成如胆囊切除术手术.该手术器械动物实验全部安全顺利完成,术后动物全部存活.

**结论:**单孔无气腹腹腔镜简化了腹腔镜器械设备,价格低易于普及,兼容腹腔镜、剖腹手术和小切口手术的优点,克服其各自不足,是腹部微创手术的重大创新.

杜运生,周志祥,李东坤,徐占兴,郭振武.单孔无气腹腹腔镜的研制.世界华人消化杂志 2005;13(5):697-699

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/697.asp>

## 0 引言

为了克服腹腔镜和传统开放手术的不足,并取腹腔镜的局部放大、有足够的观察视野、切口小的优点和传统开放手术的优点,我们设计了一种“单孔无气腹腹腔镜”.经过5 a试制、改进、动物实验,使手术达到:(1)1个2 cm左右切口;(2)无气腹;(3)结扎缝合方便;(4)在直视和监视器放大画面结合下完成腹部微创手术.现报告如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 自制“单孔无气腹腹腔镜”一套,包括:直径3 mm导杆带无影冷光源摄像头和4 mm带无影冷光源摄像头拉钩,“悬吊式冷光源拉钩”,深部电动打结器,S型L型血管钳,专用持针器、剪、电刀、组织牵开器、吸引器,电源、显示器,录像编辑、DVD刻录系统.动物:7 Kg家兔10只,20 Kg狗4只,70 Kg猪3头.

**1.1.1 悬吊式冷光源拉钩** 拉钩配有数十个微型冷光源灯泡,可解决直视下无影照明.悬吊腹壁便于手术野显露,创造腹腔良好操作空间(图1).

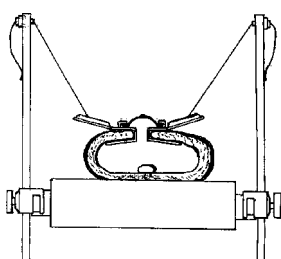


图1 悬吊式冷光源拉钩.

**1.1.2 单孔无气腹腹腔镜** 有两种,一种带有拉钩的冷光源摄像头,用于腹腔脏器较复杂的手术,他把需要手术的部位边拉开边观察;一种是细杆冷光源摄像头,用于腹腔暴露较好的手术,空间小,使用灵活(图2).

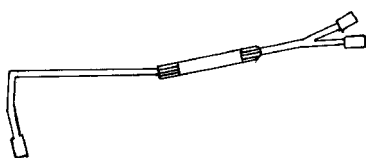


图2 单孔无气腹腹腔镜.

**1.1.3 深部电动打结器** 深部电动打结器的杆为4 mm,可对缝合的组织结扎或单纯结扎;靠近手术区切口缝合结扎、切取组织方便(图3).

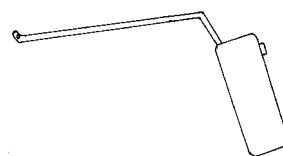


图3 深部电动打结器.

**1.2 方法** 使用时腹壁切1个2 cm左右切口,放入“悬吊式冷光源拉钩”,紧拉钩吊丝,吊起腹壁,产生良好操作空间,便于手术野显露,拉钩上的冷光源,直视下无影.单孔无气腹腹腔镜把需要手术的部位边拉开边观察.深部电动打结器,自带线卷,可对缝合的组织结扎或单纯结扎;用S和L形血管钳、分离钩便于单孔操作,直视与监视器放大画面观察相结合下手术,熟练的外科医生经过一段时间训练,可产生立体感,提高术者的准确定位和操作安全性.(1)家兔动物实验:家兔10只,分别取仰卧位,耳缘静脉麻醉后,腹壁正中2 cm切口开切腹壁,放入悬吊式拉钩,放入3 mm杆冷光源摄像头,头高位,三叶拉钩把肠下拉,暴露胆囊,分离出胆囊管、胆囊动脉,用深部电动打结器1号线结扎,结扎下端、上端各一次,两结之间剪断,由胆囊底逆行电烧切胆囊,取出胆囊.其中3例同时胃切开,吸出胃液,荷包缝合切口,结扎,模拟胃修补术;2例肝缝合结扎,缝线外剪除肝叶,肝断面用网膜覆盖缝合、结扎,缝合腹壁,模拟肝切除.(2)狗动物实验:4只20 kg家犬,麻醉后,腹壁消毒,铺无菌巾,右上腹2 cm切口放入悬吊式冷光源拉钩,伸入3 mm杆状冷光源摄像头,胆囊位于分叶肝内,牵拉一侧肝,用电烧分离胆囊,再分离胆囊另一侧肝达到胆囊管区,用4 mm S型杆状直角钳分离出胆囊管和胆囊动脉,用深部电动打结器4号线结扎.同样方法结扎3次,留2个结扎线,剪断胆囊管、胆囊血管,电烧胆囊床止血,缝合腹壁.(3)猪实验:3只猪,分别70 kg、65 kg、72 kg.肌注氯胺酮1支,静脉麻醉后,取头高仰卧位固定,腹壁消毒,铺无菌巾,正中腹壁2 cm切口进腹腔,放入悬吊式冷光源拉钩,伸入4 mm杆冷光源拉钩摄像头,用3 mm杆钳夹住胆囊颈,剪开浆膜,用S型杆状直角钳分离出胆囊管和胆囊动脉,用深部电动打结器送4号线结扎.同样方法结扎3次,留2个结扎线,剪断胆囊管和胆囊血管,再牵拉一侧肝,用电烧分离切胆囊,电烧胆囊床止血,缝合腹壁.

## 2 结果

**2.1 兔实验** 胆囊切除10个,结扎30次,无胆汁漏及出血.胃破裂修补3个,缝合结扎18次,修补术后均无出血,漏液.2例肝切除缝合结扎12次,无出血;术后家兔均存活.

2.2 狗实验 在胆囊切除中无肝损伤及明显出血, 4个胆囊切除顺利, 无胆汁漏, 胆管血管结扎可靠. 4只狗全部存活.

2.3 猪实验 3头猪胆囊切除无胆管损伤、出血、胆汁漏. 血管结扎加压实验, 高于正常人收缩2倍, 无漏液及脱结, 证实血管结扎可靠. 实验动物全部存活.

实验操作在直视和监视器观察下完成, 其胆囊切除时间平均20 min.

### 3 讨论

3.1 单孔无气腹腹腔镜是腹部微创手术的创新 1960年欧洲妇科正式使用腹腔镜进行妇科手术, 1983年英国Wickham首次提出微创外科的概念, 1987年法国Mouret在腹腔镜妇科手术技术上应用于腹腔镜胆囊切除术, 到1989年腹腔镜胆囊切除术在世界范围推广. 但至今腹腔镜CO<sub>2</sub>气腹并发症<sup>[1-2]</sup>、结扎缝合困难、用金属夹的弊病<sup>[3]</sup>问题一直没有解决, 使频繁结扎缝合的手术难以进行<sup>[4]</sup>, 腹腔镜的严重并发症发生率远大于常规开腹<sup>[4-5]</sup>. 为了微创和克服腹腔镜的不足, 一些外科医生选择适当病例开展小切口手术(3-5 cm), 但视野小、术区暴露差、照明差、器械操作不便, 使许多手术受到很大限制<sup>[6]</sup>. 传统开放手术切口大, 组织损伤大, 但由于有直视观察操作、暴露好、用丝线结扎缝合、操作方便的优点, 故至今仍广泛使用. 到目前为止, 微创手术仍处于不断改进之中<sup>[7-8]</sup>. 我们为了克服腹腔镜和传统开放手术的不足, 取腹腔镜的局部放大、有足够的观察视野、切口小的优点和传统开放手术的优点, 设计并自制了单孔无气腹腹腔镜. 单孔无气腹腹腔镜的创新表现在: (1) 简化纤维冷光源腹腔镜, 把新型无影冷光源元件配在侧视单孔镜头和悬吊拉钩上, 成本降低, 是最新技术应用互补的创新. (2) 把腹部套管改为悬吊式冷光源拉钩, 既便于手术野显露和腹腔内无影照明, 又做到了无气腹的腹腔良好操作空间, 是技术组合的创新. (3) 深部电动打结器用丝线结扎缝合, 代替了腹腔镜的金属夹, 是结扎缝合技术的创新. (4) 单孔无气腹腹腔镜在直视和监视器放大画面结合下, 无气腹条件完成腹部手术, 是开腹手术、小切口手术和腹腔镜技术结合的创新. 单孔

无气腹腹腔镜从器械设计制造到动物实验的完成, 既科学严谨, 又富有创新.

3.2 单孔无气腹腹腔镜研制的临床意义 单孔无气腹腹腔镜结构简单、价格低, 易于推广. 目前的腹腔镜仍是十几年前的技术, 设备费用昂贵<sup>[5]</sup>. 单孔无气腹腹腔镜省去目前腹腔镜的气腹机及其设备, 省去光导纤维及其冷光源机, 省去各种套管、金属夹器械, 成本大大下降. 在我国腹腔镜主要靠进口, 在许多二三级医院腹腔镜未能得到推广应用, 单孔无气腹腹腔镜价格低, 使用方便, 易于广大城乡医院推广.

单孔无气腹腹腔镜综合目前腹腔镜、小切口手术和传统开放手术的优点, 是真正的微创. 与现有腹腔镜相比有以下优点: (1) 切口少, 仅需一个. (2) 不需要人工气腹及气腹设备, 减少了CO<sub>2</sub>气腹并发症. (3) 切口靠近操作部位, 可直视定位, 直视与侧视监视器放大相结合, 手术操作方便、准确, 减少因视觉误区造成的不必要的组织损伤. (4) 深部电动打结器用丝线而不用金属夹, 解决了以往腹腔镜结扎缝合的难题. 单孔无气腹腹腔镜与单纯小切口手术器械相比, 局部放大, 有足够的观察视野, 切口更小, 更符合微创手术要求.

总之, 单孔无气腹腹腔镜较之一般腹腔镜操作更准确、方便、安全, 且价格低, 可广泛应用于各级医院肝胆、普外、妇科、胸外科手术. 这项腹腔镜技术的创新为微创外科的发展提供了一条新的途径, 有广阔的推广前景.

### 4 参考文献

- 1 刘鹏, 陈训如, 罗丁, 毛静熙, 吴辉, 王跃力. CO<sub>2</sub>气腹对肝硬化大鼠门脉血流影响的实验研究. 中国微创外科杂志 2002;2:56-57
- 2 郭振武. 胆道外科危重症学疑难. 天津科技翻译出版公司 2002: 257-258
- 3 谢金敏, 高毅, 师龙生, 唐增杰. 腹腔镜胆囊切除术严重并发症的原因分析及预防. 广东医学 2004;25:153-154
- 4 谭家驹. 微创外科手术与麻醉. 北京: 科学技术文献出版社, 2003: 8-11
- 5 安军礼, 周积德, 马建军, 郭金城. 小切口胆囊切除术3000例报告. 中国普通外科杂志 2004;13:43-44
- 6 李峰. 小切口胆囊切除效果评价. 临床军医杂志 2001;29:71-72
- 7 彭耀庆. 浅谈微创设备与微创外科用. 务实的心态审视“微创”. 中国微创外科杂志 2003;3:540-543
- 8 印慨. 微创外科在腹部手术中的应用. 辽宁医学杂志 2002;16: 173-174

编辑 潘伯荣 审读 张海宁