

乙型肝炎核心启动子的研究进展

高学松, 成军, 甄真, 郭江, 张黎颖

高学松, 成军, 郭江, 张黎颖, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
甄真, 河北医科大学第三医院感染科 河北省石家庄市 050051
高学松, 男, 1977-11-24 生, 汉族, 医师, 2002 年河北医科大学传染病学专业硕士研究生, 主要从事病毒性肝炎的发病机理与治疗的研究。
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院传染病研究所. cj@qenethrapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2004-12-31 接受日期: 2005-01-03

摘要

乙型肝炎病毒(HBV)核心启动子(CP)与病毒复制、转录及疾病的关系密切, 近年来国内外对核心启动子的结构、功能进行了广泛的研究, 但目前研究的热点集中在核心启动子变异后的生物学活性改变以及与治疗的关系等方面, 本文就其研究进展作一综述。

关键词: 乙型肝炎病毒; 核心启动子

高学松, 成军, 甄真, 郭江, 张黎颖. 乙型肝炎核心启动子的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(8):933-936
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/933.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种严重危害人类健康的致病因子, 能够在肝细胞中持续复制、反复感染. HBV 的感染除引起急慢性乙型肝炎和肝硬化外, 还与肝癌的发生有密切关系^[1]. 核心启动子(CP)及其变异与乙型肝炎病毒致病性以及抗病毒治疗密切相关, 为此国内外学者进行了大量的研究, 并取得了一系列的进展。

1 乙型肝炎病毒核心启动子的基因结构及功能

乙肝病毒核心启动子在 1643-1849 nt, 大约在转录开始处上游 200 bp 内, 结构和功能都十分复杂. CP 与 X 基因的 3' - 末端(-1837 nt)、C 基因前 - 区的 5' - 末端(1814 nt)重叠; 增强子 II(1687-1775 nt)和 DR I(1826-1836 nt)完全在 CP 区域内. CP 调节核心蛋白、前核心蛋白和病毒 DNA 聚合酶的表达^[2]. 核心启动子包括基本核心启动子(BCP)和上游调节区域(URR)两部分, 指导两种长为 3.5 kb mRNA 的转录, 起始位点仅相差 30 nt: 前核心(pre C)mRNA 和前基因组(Pg)RNA. 较长的前核心 RNA 编码产生前核心蛋白, 经信号肽酶和高尔基体中的蛋白酶加工形成成熟的 e 抗原(HBeAg)分泌到细胞外. 较短的前基因组 RNA 翻译产生核心抗原(HBcAg)和 P 蛋白, 同时也是 HBV DNA 复制时的模

板, 被 P 蛋白识别包装入核心颗粒, 经逆转录产生子代 DNA. BCP 在 1742-1849 nt 区段, 包含 DR I 区、前 - C 和 C 基因的 2 种 mRNA 的起点; BCP 区段中没保守的 TATA 盒结构, 但在相应位置含有类似 TATA 盒样的 DNA 序列结构及转录起始元件, 这对于前 C mRNA(1785 nt)和前基因组 - C/P mRNA(1820 nt)转录的精确起始是必须的. 上游调节区域包含负调节元件(NRE)和核心上游调节序列(CURS). CURS 中含 2 个重复序列(1668-1684 nt), 是肝细胞核因子的结合部位, 他由正性调节序列和负性调节序列两部分组成. 前者位于 BCP 的 5' - 端, 通过位置与方向依赖性方式正性调节 BCP, 使 BCP 活性提高 200-2 000 倍, 后者位于 CURS 远端, 按其功能划分为 α 、 γ 、 β 三个亚区, 通过非方向依赖性方式抑制 BCP 的活性. 根据功能不同, CURS 分为 A、B 两区, 二者彼此独立但相互协同调节着 BCP 的功能. 此外, CURS 区域又划分为数个不同的小区域, 分别命名为 α 、 δ 、 γ 、 β 盒, 其中盒 α 、 β 与 HBV 增强子 II 结构与功能密切相关^[2-5].

各种肝内富含的和独有的转录因子的协同相互作用对于 CP 在肝脏的特异性表达是必要的. 如以一种在大多数细胞中都有功能的金属硫蛋白(metallothionein)启动子代替 CP, HBV DNA 即可在一种人的非肝细胞系 HeLa 细胞中表达. Lopez-Cabrera *et al*^[6]指出从老鼠肝细胞核提取物纯化的 CCAAT/增强子结合蛋白(C/enhancer binding protein, C/EBP), 是一个肝脏特异性的核因子, 在 CP 上至少结合了 5 个位点, 而其中的 3 个位点与增强子 II 重叠. C/EBP 在一定程度上激活了 CP 低浓度的表达, 但在高浓度反而抑制其表达. HNF4 在增强子 I/X 基因启动子区有 1 个结合位点, 另 2 个结合位点则位于 CP 区内^[7]. 尽管 HNF4 与前面位点结合, 但其对病毒的转录无明显影响, 而另外两个位于 BCP 的位点都独立介导 HNF4 依赖的转录活性^[8]. Guo *et al*^[9]通过共转染 HeLa 细胞系发现 HNF4 可以与 CURS 作用而激活 CP. 同时却发现, 在 HeLa 细胞中 HNF4 结合位点的上游序列区可以抑制 HNF4 的活化, 而在 HuH-7 肝细胞瘤细胞中却无此作用. 因此认为, CP 的肝细胞特异性是因为至少一种肝细胞富含因子的上调作用与一些存在于非肝细胞内的因子的抑制共同作用的结果. Gilbert *et al*^[10]作 DNA-蛋白结合分析时

发现, CP 包含两个高亲和力的甲胎蛋白转录因子 (FTF) 结合位点, 与其他受体共用的三个低亲和力结合位点, 转染 HepG2、Hep3B、PLC/PRF/5 肝细胞瘤后, 使用带有病毒启动子的氯霉素乙酰基报告酶 (CAT) 分析, 无论是否与增强子 I 连接, FTF 都是 CP 的潜在激活因子, 其活性比 HNF4 α 、HNF3 α 、HNF3 β 、C/EBP α 更强. FTF 结合位点的定点突变提示 FTF 直接激活 CP 和为了在 CP 和增强子 I 之间产生相互作用而应用了两个高亲和力位点. 共表达分析进一步说明对于共激活前基因组 CP, FTF 和 HNF4 α 最有效的方式, 这可以基本上解释 HBV 嗜肝性和感染后早期病毒的复制. 另外, 还有多种转录因子例如 Sp1、TATA 结合蛋白, 以及一些核受体超家族成员 PPAR α 、RXR α 、COUP-TF1 和 ARP1 可以和 CP 结合, 调节前 C RNA 和核心 RNA 的表达^[11].

2 乙型肝炎病毒 CP 的变异的生物学活性

HBV DNA 的复制由前基因组 RNA 中间体反转录为负链 DNA, 由于反转录是利用病毒本身的 DNA 聚合酶进行的, 该酶缺乏校对活性, 发生变异后难以修正, 造成复制过程中反转录失真. HBV 的变异广泛存在于基因组的不同部位, 有些区段高度保守, 是病毒复制十分关键的序列, 这些部位一旦发生变异, 常有重要的生物学活性的改变.

2.1 点突变及其生物学意义 CP 区变异并非独立的突变位点, 常是多位点变异的组合. 变异涉及前-C mRNA (1790 \pm 1 nt) 起始位点上游 28 bp 富含 AT 的 TTAAA 序列 (1758-1762 nt), 而前基因组 RNA 起始位点 (1818 nt) 上游 23 bp 的 ATAAATT 序列 (1789-1795 nt) 仍然完整^[12]. 用于前-C 和前基因组 RNA 合成的启动子元件不同, 是分开调节的. 变异多发生于 HBV 基因组 1750 到 1770 nt 之间, 双变异 1762 nt 的 A \rightarrow T 和 1764 nt 的 G \rightarrow A 是最常见的.

Buckwold *et al*^[13] 研究显示变异株减少了前-C mRNA 的转录和 HBeAg 的合成, 前-C 基因表达的减少却伴随病毒复制的增加, 病毒基因组的复制是原来的两倍, 结果提示 BCP 双变异抑制但不能终止 HBeAg 的表达. Parekh *et al*^[14] 从 A 型 HBV 患者中克隆了 HBV 基因的全序列, 12 例高病毒水平样本的都是野生型 CP, 而 43 例低病毒水平样本中有 37 例存在 CP 变异. 分别转染 HepG2 细胞, 6 例 CP 变异株存在高水平复制, 这 6 例 CP 变异株都出现了 1762/1764 nt 变异和 T1753C、C1766T 变异或二者兼有, 而野生株病毒复制水平较低. 结果提示, 是 CP 的变异而不仅仅是 1762 nt 和 1764 nt 位点的改变导致了病毒复制和 HBeAg 表达的改变. 从中国、日本和希腊^[15-17] 等国暴发性肝炎

(FH) 和肝细胞癌 (HCC) 的患者血清分离物中, 还检测出了与 A1762T/G1764A 变异同时存在的 1753-1757 nt 内的变异. ALT 水平的增高和肝组织病理的改变都表明, 该区的变异与肝脏病变有密切关系, 变异增强了 HBV DNA 的复制能力, 其可能机制为^[18-20]: (1) A1762T/G1764A 及其他 BCP 点突变, 可能改变由 1742-1847 nt 形成的 pgRNA 二级结构, 1753T \rightarrow C/G 变异使 1751-1757 nt 形成的茎环结构松散, 使茎环结构在逆转录中容易打开; (2) 可能改变转录因子 HNF4 和 COUP-TF 结合位点的位置, 可能产生转录因子 HNF1 和 HNF3 结合位点, 上调 pgRNA 转录; (3) 上调核心蛋白的表达和下调前-C 蛋白的表达从而加强衣壳化, 使病毒复制增加. Li *et al*^[21] 在研究双变异抑制前基因组 RNA 转录时发现, 双变异不但改变核受体结合位点, 而且还新增加了一个 HNF1 转录因子结合位点. 进一步转染 Huh7 细胞提示改变核受体结合位点对 HBV RNA 的转录没有影响, X 蛋白上两个密码子的改变抑制前-C 和核心 RNA 的转录, HNF1 转录因子结合位点的出现可以恢复核心 RNA 的水平. 因此认为, 常见的双变异对前-C RNA 转录的特异性抑制是多种因素综合作用的结果.

发生 CP (A1762T/G1764A) 和前-C 区 (1896 G \rightarrow A) 变异的 HBeAg 阴性的患者远多于 HBeAg 阳性的患者. CP 变异的患者更易出现肝脏的失代偿^[21-23]. 由于 BCP 与 X 基因的部分重叠, A1762T/G1764A 导致 X 基因第 130 和 131 的密码子改变, 而这正是肝癌患者经常出现的^[24]. Huy *et al*^[25] 在研究中发现, CP 变异, 特别是 T1762/A1764 双变异, 与肝硬化、肝癌、基因 C 型相关 ($P < 0.05$). Yuen *et al*^[26] 通过多中心研究, CP 变异与肝癌存在相关性, 而与基因 C 型无关. 但对 CP 变异与肝硬化之间的关系还存在不同的观点. Yuen *et al*^[27] 在比较前-C 区、CP 变异、基因分型与乙型肝炎肝硬化相关并发症之间的关系时, 认为以上因素无明显相关性.

2.2 缺失、插入突变及其生物学意义 碱基缺失作为 CP 区内的另一种突变形式常见于慢性乙型肝炎患者、肝细胞癌患者、原位肝移植患者体内. 单独感染该种变异病毒株的患者常表现出较低水平的病毒血症. 考虑这种缺失变异可以减弱或阻止前-核心 mRNA 的起始转录, 从而使 HBeAg 分泌减少或消失. 这是变异是 HBV 在宿主长期的免疫压力下发生的, 其出现可能与慢性肝炎患者体内病毒活动性的增强有关.

在慢性乙型肝炎患者和曾接受原位肝移植患者的 BCP 还可见另一种变异: 插入突变^[28]. 这种变异通常出现在肝衰竭之前或与之同时出现, 发生插入突变的病毒常表现出较高的复制能力. 可能是由于插入片段产生了新的 TATA 结合蛋白的结合位点, 从而导致了重型肝

炎或肝衰竭的发生, 这种推测仍需进一步实验证实。

3 乙型肝炎病毒CP的变异与治疗的关系

在HBeAg阴性的慢性HBV感染患者中经常发现基本启动子(A1762T/G1764A)与前-C区(G1896A)变异。但是, 对于这些变异的临床意义以及与治疗的关系仍存在不同的观点。

Zampino *et al*^[29]治疗14例在化疗中感染HBV的肿瘤患者, 对 α -2 a干扰素产生应答者为6例, 其中有5例患者除A1762T/G1764A外, 还存在T1753C变异, 但是无G1896A变异, 认为干扰素介导的HBeAg血清转换与CP变异相关。Marrone *et al*^[30]使用 α -2 a干扰素治疗HBeAg阳性的CP变异(A1762T/G1764A)的患者, 认为血清HBeAg和HBV DNA的低水平与CP的变异存在相关性, 能干扰素的治疗产生应答, 可以作为干扰素治疗产生应答的一个预测指标。Zhang *et al*^[31]在治疗HBV感染时发现, 17例中的5例A1762T/G1764A变异患者全部产生应答, 而其余只有2例产生应答。另外5例前-C区G1896A变异及2例合并C区107-118氨基酸变异的患者, 有4例对干扰素的治疗无应答。结果说明, CP变异可以作为预测干扰素治疗效果的因素之一。Erhardt *et al*^[32]研究了BCP、CURS、NRE和前-C区与干扰素治疗效果的关系, 对干扰素持续应答率约为30%, HBeAg阳性与阴性之间无显著差异。干扰素应答与BCP变异位点, 特别是1753-1766 nt和1762-1764 nt相关。在HBeAg阳性患者中, 具有A1762T/G1764A变异以及BCP的1753-1766 nt内变异点的数目多时, 对干扰素的反应良好。在HBeAg阴性患者中, 无A1762T/G1764A变异以及BCP的1753-1766 nt内变异点的数目少时, 对干扰素的反应良好。但是Hannoun *et al*^[33]经过对26例HBeAg阳性的患者12 wk的干扰素治疗, 认为CP特异位点的变异或变异的数量与对干扰素治疗应答的效果无相关性。Chen *et al*^[34]在研究使用 α 干扰素治疗对HBV聚合酶、BCP、前-C/C特异性变异的影响时, 没有发现与临床应答或治疗结果相关的变异。同时, 也没有发现与拉米夫定耐药有关的变异, 提示拉米夫定治疗可能对干扰素 α 无应答的患者有效。Suzuki *et al*^[35]发现在使用拉米夫定治疗5 a的患者, 一部分前-C区和CP的变异患者在1 a之内, 野生株重新变为优势株。因此认为, HBeAg缺失的患者对拉米夫定治疗的应答较好。

4 HBV CP研究展望

CP在HBV的复制及致病机理等方面都起着重要作用, 并与抗病毒治疗的疗效有关。但有关CP变异与肝脏病变的关系, 野毒株与变异株的动态变化情况, 不同

变异株之间的相互关系, 以及变异与治疗的关系, 还存在许多不同观点, 有待于进一步研究。

5 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:25-34
- 3 Yuh CH, Chang YL, Ting LP. Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol* 1992;66:4073-4084
- 4 Kramvis A, Kew MC. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 1999;6:415-427
- 5 杨艳杰, 成军, 陈东风, 刘妍, 杨倩, 王建军. 乙型肝炎病毒核心启动子的结构及调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1006-1008
- 6 Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ, Siddiqui A. Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivates the enhancer element II of the hepatitis B virus. *Virology* 1991;183:825-829
- 7 Raney AK, Johnson JL, Palmer CN, McLachlan A. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol* 1997;71:1058-1071
- 8 Yu X, Mertz JE. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoter of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J Virol* 1997;71:9366-9374
- 9 Guo W, Chen M, Yen TS, Ou JH. Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation. *Mol Cell Biol* 1993;13:443-448
- 10 Gilbert S, Galarneau L, Lamontagne A, Roy S, Belanger L. The hepatitis B virus core promoter is strongly activated by the liver nuclear receptor fetoprotein transcription factor or by ectopically expressed steroidogenic factor 1. *J Virol* 2000;74:5032-5039
- 11 Lin WJ, Li J, Lee YF, Yeh SD, Altuwaijri S, Ou JH, Chang C. Suppression of hepatitis b virus core promoter by the nuclear orphan receptor TR4. *J Biol Chem* 2003;278:9353-9360
- 12 Okamoto H, Tsuda F, Akahane Y, Sugai Y, Yoshida M, Moriyama K, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J Virol* 1994;68:8102-8110
- 13 Buckwold VE, Xu Z, Chen M, Yen TS, Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 1996;70:5845-5851
- 14 Parekh S, Zoulim F, Ahn SH, Tsai A, Li J, Kawai S, Khan N, Trepo C, Wands J, Tong S. Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Virol* 2003;77:6601-6612
- 15 Ogata N, Miller RH, Ishak KG, Purcell RH. The complete nucleotide sequence of a pre-core mutant of hepatitis B virus implicated in fulminant hepatitis and its biological characterization in chimpanzees. *Virology* 1993;194:263-276
- 16 Hasegawa K, Huang J, Rogers SA, Blum HE, Liang TJ. Enhanced replication of a hepatitis B virus mutant associated with an epidemic of fulminant hepatitis. *J Virol* 1994;68:1651-1659
- 17 Alexopoulou A, Karayiannis P, Hadziyannis SJ, Hou J, Pickering J, Luo K, Thomas HC. Whole genome analysis of hepatitis B virus from four cases of fulminant hepatitis: genetic variability and its potential role in disease pathogenicity. *J Viral Hepat* 1996;3:173-181
- 18 Gerner P, Lausch E, Friedt M, Tratzmuller R, Spangenberg C, Wirth S. Hepatitis B virus core promoter mutations in children with multiple anti-HBe/HBeAg reactivations result in enhanced promoter activity. *J Med Virol* 1999;59:415-423
- 19 Scaglioni PP, Melegari M, Wands JR. Biologic properties of

- hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology* 1997;233:374-381
- 20 Gunther S, Piwon N, Will H. Wild-type levels of pregenomic RNA and replication but reduced pre-C RNA and e-antigen synthesis of hepatitis B virus with C(1653)→T, A(1762)→T and G(1764)→A mutations in the core promoter. *J Gen Virol* 1998;79:375-380
- 21 Li J, Buckwold VE, Hon MW, Ou JH. Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. *J Virol* 1999;73:1239-1244
- 22 Chu CJ, Keefe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, Carey W, Brown RS Jr, Luketic VA, Terrault N, Lok AS; U. S. HBV Epidemiology Study Group. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepatology* 2003;38:619-628
- 23 Hussain M, Chu CJ, Sablon E, Lok AS. Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus(HBV)genotypes and detection of HBV precore and core promoter variants. *J Clin Microbiol* 2003;41:3699-3705
- 24 Kuang SY, Jackson PE, Wang JB, Lu PX, Munoz A, Qian GS, Kensler TW, Groopman JD. Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3575-3580
- 25 Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Ngoc TT, Hayashi S, Sata T, Abe K. Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. *J Med Virol* 2004;74:228-236
- 26 Yuen MF, Tanaka Y, Mizokami M, Yuen JC, Wong DK, Yuan HJ, Sum SM, Chan AO, Wong BC, Lai CL. Role of hepatitis B virus genotypes Ba and C, core promoter and precore mutations on hepatocellular carcinoma: a case control study. *Carcinogenesis* 2004;25:1593-1598
- 27 Yuen MF, Fung SK, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M, Yuen JC, Wong DK, Yuan HJ, Sum SM, Chan AO, Wong BC, Lai CL. Longitudinal study of hepatitis activity and viral replication before and after HBeAg seroconversion in chronic hepatitis B patients infected with genotypes B and C. *J Clin Microbiol* 2004;42:5036-5040
- 28 Laskus T, Rakela J, Tong MJ, Nowicki MJ, Mosley JW, Persing DH. Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region. *J Hepatol* 1994;20:837-841
- 29 Zampino R, Marrone A, Cirillo G, del Giudice EM, Utili R, Karayiannis P, Liang TJ, Ruggiero G. Sequential analysis of hepatitis B virus core promoter and precore regions in cancer survivor patients with chronic hepatitis B before, during and after interferon treatment. *J Viral Hepat* 2002;9:183-188
- 30 Marrone A, Zampino R, Luongo G, Utili R, Karayiannis P, Ruggiero G. Low HBeAg serum levels correlate with the presence of the double A1762T/G1764A core promoter mutation and a positive response to interferon in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Intervirology* 2003;46:222-226
- 31 Zhang X, Han Y, Lu Z, Gao J, Luo Z, Zhang D. Effect of multiple mutations in the core promoter and pre-core/core region of hepatitis B virus genome on the response to interferon in e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:393-398
- 32 Erhardt A, Reineke U, Blondin D, Gerlich WH, Adams O, Heintges T, Niederau C, Haussinger D. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. *Hepatology* 2000;31:716-725
- 33 Hannoun C, Horal P, Krogsgaard K, Lindh M; INTERPRED Study Group. Mutations in the X region and core promoter are rare and have little impact on response to interferon therapy for chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2002;66:171-178
- 34 Chen RY, Bowden S, Desmond PV, Dean J, Locarnini SA. Effects of interferon alpha therapy on the catalytic domains of the polymerase gene and basal core promoter, precore and core regions of hepatitis B virus. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:630-637
- 35 Suzuki F. Influence of the hepatitis B e antigen/anti-HBe status on the response to lamivudine. *Intervirology* 2003;46:339-343

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 •

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)

肠易激综合征研究现状与展望

蔡淦, 张正利

蔡淦, 张正利, 上海中医药大学附属曙光医院消化科 上海市 200021
蔡淦, 男, 1938-08 生, 上海, 教授, 博士生导师, 上海市名中医, 全国第三批
中医师承制导师, 国家中医药管理局脾胃病重点专科学术带头人, 主编《实
用中医脾胃病学》等论著二十部, 完成国家自然科学基金、国家中医药管理局课
题十项, 获得国家科技进步三等奖等多项奖励。

通讯作者: 蔡淦, 200021, 上海市卢湾区普安路 185 号, 上海中医药大学附
属曙光医院消化科. caiganp@126.com

电话: 021-53821650-263 传真: 53823660

收稿日期: 2004-12-31 接受日期: 2005-01-20

摘要

IBS 是由生理、情绪、认知和行为多因素作用的结果, 脑肠轴及其调节机制是联系并阐释 IBS 发病各因素及各因素相互影响的主要途径。FD 与 IBS 在某些症状和胃肠运动模式中存在有相似表现, 这在临床和基础研究中均应引起注意。在中医药研究中, 认为 IBS 属于“痛泄”“大肠泄”“气秘”病证范畴, 核心病机是“肝郁脾虚”。尽管 20 a 来中医药对本病开展了较多的临床研究, 但在随机化方案、对照病例、诊断标准、疗效判定标准尚未形成统一意见, 从而使研究结论受到局限, 而尚无统一的疗效判定标准的问题在国内尤为迫切和突出, 引进吸收国外合理标准的 IBS 自评量表, 是做好临床研究工作的前提条件之一。由于 IBS 发病涉及脑肠轴通路中的不同环节和不同靶点, 针对单一靶点和病理环节的治疗存在不足, 而中药的复方可能满足这一要求。

关键词: 肠易激综合征; 功能性消化不良; 脑肠轴

蔡淦, 张正利. 肠易激综合征研究现状与展望. 世界华人消化杂志 2005;13
(8):937-939

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/937.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS) 是一常见的功能性肠道疾病, 属于心身疾病范围, 涉及神经内分泌免疫多个系统。目前对本病的认识尚不完全明了, 治疗多从阻断某一局部病理环节入手, 疗效尚不能令人满意, 对生活质量的改善也有限。近年来国内应用中医药治疗 IBS 的报道日益增多, 国外对中药、针灸治疗 IBS 的疗效情况也有报道研究。总结 IBS 研究现状, 有助于提高今后的工作。

1 研究现状概况

1.1 国外研究 一般认为 IBS 属多因素的生理心理疾病。IBS 的病理生理学基础主要是胃肠动力和内脏感知异

常, 而造成这些变化的机制是由多因素形成的, 包括生理、情绪、认知及行为因素。尽管各因素是密切联系的, 但不同因素在 IBS 症状形成的重要性在个体之间存在很大差别。生理因素指在 IBS 症状形成中包括有胃肠道高度敏感性变化、自主神经功能失调、对应激及摄食发生反应的肠动力改变、肠液和电解质的改变、神经内分泌功能失调及睡眠改变。然而, 这些生理参数的改变往往仅在一部分患者中可以看到, 并没有表现出与症状之间的明显联系。认知因素, 如不恰当的应对方式、病态行为及对疾病、营养及药物治疗不正确的观念等, 这些在 IBS 患者中常可见到, 并对临床治疗和治疗结果有着明显影响, 也是促使有 IBS 症状的健康群体向 IBS 患者转化的重要因素。情感因素, 如焦虑和抑郁在 40-60% 的 IBS 患者中可见到, 主要表现为焦虑、抑郁和恐惧。行为因素, 诸如应激和躯体创伤事件, 为多数 IBS 患者证实与症状的始发或症状的发作相关联, 而且严重的应激可以解释 90% 以上的 IBS 症状的改变^[1]。在以上的各个环节中, 神经系统的参与起到了重要的作用。因此, 脑-肠轴调节功能失调以及影响该调节功能的肠道免疫系统的异常在近年研究中受到重视。脑-肠间相互作用日益被看做胃肠功能紊乱疾病的潜在病理机制。中枢神经系统(CNS)和肠神经系统(ENS)间的双向联系在病理和生理中均可见到。在脑肠轴中, 对应激源产生调控作用的过程涉及神经元通路、免疫过程以及内分泌机制, 调控胃肠道的神经元不同水平的紊乱可以影响胃肠道动力、分泌、免疫功能的调节, 也可以影响感觉和情绪对内脏事件的反应。ENS 功能、中枢过程以及自主调节在脑肠对话中扮演者重要角色。应激和情绪反应可以通过脑肠轴触发神经免疫和神经内分泌反应。多种不同部位的神经递质也可对胃肠、内分泌及免疫功能产生影响, 包括人的行为和情绪状态^[2]。生理、情感、认知以及行为构成的 IBS 生物心理学模式被提出, 神经胃肠病学的快速发展, 新的脑图像技术的应用, 有助于我们更好理解脑肠轴, 以及开拓我们新的治疗思路。

值得注意的一个问题是功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)和 IBS 的联系。目前, 功能性消化不良和 IBS 目前被认为是二个独立的疾病, 然而, 二者症状的重叠以及一些共同病理生理特点的证据表

明, FD及IBS可能是同一疾病的不同表现. 1/3到2/3的肠易激综合征患者的症状与FD重叠. 症状分析通常不能将IBS和FD作为两个疾病区分. 对食物的过度动力反应、延迟的胃排空及异常的小肠和结肠转运都可以在一些FD和IBS患者中见到, 二者并不互相排除. 内脏感觉过敏是二者的共同特征, 而且二者似乎均不可能定位. 有证据支持感染后IBS的形成, 但这同样也适宜说明FD. 心理紊乱亦是二者的共同特征, 一些药物对二者均有效. 这些证据表明, 最少一部分FD和IBS反应的是同一疾病的不同表现. 对共同病理生理治疗靶点辨认应该是未来研究的方向^[3].

1.2 国内研究 在国内, 协和医大潘国宗 *et al*^[4]对IBS症状诊断标准进行了探讨; 杨云生 *et al*^[5-6]对IBS患者回盲部肥大细胞增多与IBS发病机制的关系进行了研究; 三军大桂先勇 *et al*^[7]应用寒冷-束缚模型对应激后大鼠结肠后续变化(应用胃肠道压力传感器)及血清、肠黏膜胃肠肽类激素如肠血管活性肽、Betar内啡肽、P物质等变化进行了观察; 这些研究目前代表了国内在本病研究中水平. 随着中华医学会消化分会第一届IBS会议在广州的召开, 目前开展的对IBS动物模型、发病机制的研究正不断走向深入.

在中医研究方面, 根据IBS的临床表现与特征, 认为IBS可以归属到中医“泄泻”“便秘”病证范畴, 与“大肠泄”“气秘”“痛泄”关系最为密切, 与“郁证”也有一定联系^[8]. 国内中医界一般认为, 本病属于“肝脾不和”证型范畴, 治疗多从调和肝脾入手, 痛泻要方、四逆散及半夏泻心汤是治疗常用方剂. 这种认识也为临床资料反馈验证. 通过中国生物医学数据库、中文科技资料光盘及全文检索系统, 对81 a以来中医药治疗IBS文献进行收集分析, 共检索出相关文献254篇, 在其中的80篇临床治疗文献中, 直接言明应用调和肝脾法, 如疏肝健脾、扶脾抑肝、理气健脾的文献有35篇, 而间接应用该法, 如健脾行气化湿、健脾行气温中及调理脾肾中用疏肝健脾药物的文献又有近18篇, 可见围绕肝脾不和治疗本病确是基本治法^[9].

中医在治疗消化系统疾病中具有一定的优势, 但临床上的疗效常缺乏有力的证据, 从而使中医药治疗难以被更广泛接受并得以推广应用. 我们曾对20 a来中医药治疗IBS 80篇临床报道进行分析, 报道中医药治疗IBS的疗程多在20 d-3 mo不等, 治愈率大多报道在35-65%之间, 总有效率在85-100%之间, 平均大于90%, 且复发率低, 各项疗效指标均高于西药治疗组, 说明中医药治疗本病存在较大的优势. 但是, 进一步分析来看, 80篇基本方加减和固定方治疗文献病例总数达4 746例, 但西药对照治疗总病例数只有

345例; 在治疗病例中, 病例样本数最大的文献是300例和226例, 100例到200例的文献有7篇, 只有1篇文献设有对照治疗, 而且, 在80篇文献中, 对照治疗的单篇文献最大样本数只有40例. 符合RCT研究要求的文献很少. 在IBS的研究中, 还有一个值得重视的问题即疗效标准不统一, 研究者自我制定疗效标准较为多见, 还存在不同机构制定的疗效标准. 这些标准缺乏实践调查依据及缺乏验证研究, 缺乏可靠性及合理性的比较说明. 因此, 在这样的背景下轻易得出的一些结论, 无疑会受到统计学和卫生设计调查工作者的质疑^[9-10].

因此, 在目前IBS临床研究中, 亟待严格的随机双盲研究. 尽可能将中医疗效标准和西医疗效标准统一. 中医药治疗IBS的疗效目前需要的是能得到国内外的确认, 而不是简单重复, 这也是中医药发展的前提和必由之路.

2 IBS的疗效判定

IBS发病率很高, 国外目前从多种途径对本病进行药物研制开发, 其中面临的一个重要的问题是, 用什么样的方法和工具验证药物的疗效.

胃肠功能紊乱性疾病如IBS及功能性消化不良, 其病理机制可能涉及胃肠道的各个区域, 包括以下相关性改变: 胃肠平滑肌收缩活动、肌电活动、肠管张力及顺应性、肠转运等异常, 以及胃肠黏膜敏感反应性提高. 但很重要的一点, 胃肠功能紊乱的改变与临床症状之间的联系并不紧密, 而且, 不同类型的患者, 临床表现也不尽一致, 缺乏明显的特征, 另外, 功能性胃肠疾病临床表现并不是局限于消化系统综合征, 此类疾病患者往往有一系列其他系统的综合征, 诸如纤维肌痛、膀胱激惹, 以及机体其他一些功能上的改变. IBS症状表现的多样性、多系统性和不稳定性给临床诊治带来一系列难点, Manning标准和罗马II标准目前虽基本能满足IBS诊断上的要求, 但并不能反应监控IBS病情程度的变化, 不能用于临床疗效的判定和比较.

目前, 国外判断临床疗效主要通过患者自己填写调查表, 不单纯局限于对肠道方面的症状改变的调查, 而且注重治疗对精神心理及整体生活质量方面的影响, 从整体评定疗效. 目前应用的调查表有肠道症状积分(BSQ)、抑郁自评量表(SDS)、心理症状积分(SCL-90)、焦虑自评量表(SAS)、生活质量问卷(IBS-QOL)、肠道尺度表(BSS)以及健康调查简表(SF36)等等. 如IBS-BSS症状尺度表是Francis *et al*^[11]在1997年研制的监控IBS病情变化严重程度的积分系统, 该表包括腹痛、腹痛天数、腹胀、对大便满

意度及 IBS 对生活干扰 5 个问项, 经过了临床流行病学的筛选和临床反馈验证, 专为 IBS 而设定. IBS-QOL 生活质量表就是一项考察 IBS 患者生活质量变化及药物干预情况的工具, 本问卷包括有情绪、精神、睡眠、早起、精力、社会角色、饮食、体力、工作、性生活 10 项内容, 研究表明本问卷对 IBS 有一定的特异性、有效性及可靠性^[12]. SF36 对于 IBS 患者是一有效检测其一般健康状况的方法, 而且对于 IBS 患者的胃肠道改变足够敏感, 也提供了对现有评价 IBS 治疗结果的有效补充^[13]. 这些问卷的出现, 能反应 IBS 病情变化的不同侧面, 能用于 IBS 疗效的判定, 为 IBS 临床研究提供了相对客观依据.

3 IBS 的治疗及中药开发前景

IBS 治疗一般采用对症治疗方法, 对于腹泻型患者予以抗腹泻制剂, 如阿片肽 μ 受体激动剂洛哌丁胺 (loperamide)、苯乙哌啶 (diphenoxylate)、5-HT₃ 受体拮抗剂阿洛司琼 (alosetron); 便秘型 IBS 给予可溶纤维和轻泻剂, 还可用 5-HT₄ 受体激动剂替加色罗 (tegaserod). 腹痛为主者给予平滑肌松弛剂双环维林 (dicyclomine)、美贝维林 (mebeverine), 以及钙离子拮抗剂匹维溴胺 (pinaverium bromide)、奥替溴胺 (otilonium bromide); 对于受到精神情绪因素严重干扰的患者, 给予小剂量三环类药物 (阿米替林、丙咪嗪、多虑平). 更多探索中的治疗方法包括 CCK₁ 受体拮抗剂、CRFR I 拮抗剂、速激肽拮抗剂以及生长抑素衍生制剂等. 但目前尚没有一种药物能够持久有效的治疗 IBS. 因此, 目前国外对本病的进一步治疗研究尚包括中草药、针刺甚至催眠术等.

对于 IBS 的治疗有认识表明^[1], 如果治疗目标只是外周靶器官的话, 试图治疗 IBS 的不同新药很可能影响的只是特定症状. 与之相反, 治疗途径瞄向中枢性改变, 包括认知和行为的方法, 则更可能导致症状的全面改善. 具体来讲, 开发有效的药物治疗合理靶点除了现已开发的或正在开发的肠外周靶点如 5-HT 受体、选择性钙离子受体、平滑肌 M 受体等外, 内脏传入神经 (阿片肽、5-HT) 离子通道及外周终末受体, 脊髓内 (阿片肽、谷氨酸、降钙素基因调节肽、神经激肽-Y) 脊髓背角神经元受体, 以及脑干边缘系统、前脑皮质 (5-HT、儿茶酚胺、多巴胺、乙酰胆

碱) 中的中枢靶点是未来药物开发及治疗策略的重要选择. 但目前, 虽然针对中枢治疗的抗抑郁焦虑药物在改善严重 IBS 患者症状中有一定疗效, 但其副作用及其对患者的长期心理影响也不容忽视.

因此, 我们可以设想, 同时针对“脑”“肠”多个靶点进行治疗, 阻断病理反应环节, 终止病理过程的放大效应, 可能是更好的治疗模式, 但现代化学单分子结构药物很难针对不同部位不同结构多靶点治疗的需求. 而中药及中药复方包含有多种复杂的化学成分, 有可能满足多靶点治疗的需要, 开展中医药治疗 IBS 研究, 是一项现实而有益的工作.

总之, 本病发病率很高, 目前对本病的基础和临床研究工作正处于蓬勃发展之势, 就国内而言, 能否发挥中医药治疗功能性胃肠疾病的优势, 提高 IBS 患者的临床疗效及研究水平, 促进中医药与国外交流, 对我们大家而言, 既是机遇, 也是挑战.

4 参考文献

- 1 Mayer EA, Emerging C. Disease model for functional gastrointestinal disorders. *Am J Med* 1999;107:12-19
- 2 Mulak A, Bonaz B. Irritable bowel syndrome: a model of the brain-gut interactions. *Med Sci Monit* 2004;10:55-62
- 3 Cremonini F, Talley NJ. Review article: the overlap between functional dyspepsia and irritable bowel syndrome—a tale of one or two disorders? *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20 (Suppl 7):40-49
- 4 潘国宗, 鲁素彩, 韩少梅. 肠易激综合征症状学诊断标准的研究. *中华内科杂志* 1999;38:81-84
- 5 杨云生, 冯福才, 潘德寿, 周殿元, 张万岱, 张振书. 肠易激综合征回盲部肥大细胞及结肠黏膜中胃肠激素的研究. *中华消化内镜杂志* 1997;14:149-152
- 6 杨云生, 周殿元, 张万岱, 张振书, 宋于刚. 肠易激综合征回盲部肥大细胞的研究. *中华内科杂志* 1997;36:231-233
- 7 桂先勇, 潘国宗, 柯美云. 寒冷—束缚应激对大鼠结肠运动的后续效应. *基础医学与临床* 1995;15:69
- 8 张正利, 蔡淦. 肠易激综合征中医论治溯源. *中国中医基础医学杂志* 2001;7:48-50
- 9 张正利, 蔡淦. 20 a 来中医药治疗肠易激综合征回顾分析. *中医杂志* 2001;42:373-375
- 10 沈芸, 蔡淦. 中医药治疗肠易激综合征临床随机对照研究文献评价. *中国中西医结合消化杂志* 2003;11:103-104
- 11 Francis CY, Morris J, Whorwell PJ. The irritable bowel severity scoring system: a simple method of monitoring irritable bowel syndrome and its progress. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:395-402
- 12 Bergmann JF, Chassany O. The role of quality of life in functional gastrointestinal disorders: regulatory issues. *Eur J Surg Suppl* 1998;583:87-91
- 13 Bensoussan A, Chang SW, Menzies RG, Talley NJ. Application of the general health status questionnaire SF36 to patients with gastrointestinal dysfunction: initial validation and validation as a measure of change. *Aust N Z J Public Health* 2001;25:71-77

胃癌中医证型 p53 与 nm23 基因蛋白表达性别差异分析

施俊, 许玲, 何金, 孙大志

施俊, 许玲, 孙大志, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科
上海市 200003

何金, 中国人民解放军第二军医大学长征医院病理科 上海市 200003
施俊, 男, 1976-04-03 生, 上海市人, 汉族, 1999 年上海中医药大学中医系
毕业, 2003 年第二军医大学中西医结合在职硕士研究生, 讲师, 主要从事中
西医结合防治消化系统肿瘤的研究。

国家自然科学基金资助项目, NO. 30271626

通讯作者: 许玲, 200003, 上海市黄浦区凤阳路 415 号, 中国人民解放军第
二军医大学长征医院中医科. czzk@smmu.edu.cn

电话: 021-63610109-73406 传真: 021-63520020

收稿日期: 2005-01-21 接受日期: 2005-03-03

Expression of p53 and nm23 gene protein in sex-difference analyzing among gastric carcinoma traditional Chinese medicine classifications of syndrome

Jun Shi, Ling Xu, Jin He, Da-Zhi Sun

Jun Shi, Ling Xu, Da-Zhi Sun, Department of Traditional Chinese
Medicine, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University,
Shanghai 200003, China

Jin He, Department of Pathology, Changzheng Hospital, the Second
Military Medical University, Shanghai 200003, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.
30271626

Correspondence to: Dr. Ling Xu, Department of Traditional Chinese
Medicine, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University,
415 Fengyang Road, Shanghai 200003, China. czzk@smmu.edu.cn

Received: 2005-01-21 Accepted: 2005-03-03

Abstract

AIM: To analyze sex-difference in p53 and nm23 gene protein expression, TNM staging classification, lymph node metastasis, and distance metastasis among different categories of gastric carcinoma according to traditional Chinese medicine (TCM) classification, and to provide scientific basis for probing the relationship between the essence of gastric carcinoma and TCM syndrome classification.

METHODS: We classified gastric carcinoma patients into six groups according to TCM classification of syndrome criteria. Specimens taken after operation were analysed for p53 and nm23 gene protein expression by immunohistochemistry assay. Then TNM staging, lymph node metastasis, and distance metastasis were analyzed.

RESULTS: There is no significant difference among six groups after statistical analysis in TNM staging, lymph node metastasis, and distant metastasis. There is statis-

tical difference between the two TCM classification of syndrome groups of stagnation of phlegm-damp and Yin-insufficiency due to stomach-heat in different sexes ($P < 0.05$). The lymph node metastasis in female patients is more than that in male ones in the group of stagnation of phlegm-damp; while in the group of Yin-insufficiency due to stomach-heat, the result is opposite ($P > 0.05$). p53 gene protein expression in female patients has statistical difference among six TCM Classification of syndrome groups ($P = 0.03$). p53 gene protein expression in male patients is higher than that in female ones ($P = 0.01$). The protein expression of p53 and nm23 in female patients is higher than that in male patients ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The protein expression of p53 (in groups of stagnation of phlegm-damp and Yin-insufficiency due to stomach-heat) and nm23 (in group of Yin-insufficiency due to stomach-heat) has statistical difference between male and female patients. The sex difference in p53 and nm23 expression also has statistical difference in lymph node metastasis and distance metastasis.

Key Words: Gastric cancer; Traditional Chinese medicine classification; p53; nm23

Shi J, Xu L, He J, Sun DZ. Expression of p53 and nm23 gene protein in sex-difference analyzing among gastric carcinoma traditional Chinese medicine classifications of syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):940-944

摘要

目的: 分析男女两性胃癌中医不同证型 p53 与 nm23 基因蛋白表达的差异及其与 TNM 分期、淋巴结转移、远处转移的关系, 为探索胃癌中医证本质提供依据。

方法: 胃癌患者术前按中医辨证分型标准归类成 6 型; 术后标本用免疫组化 Envision 法检测胃癌组织 p53 与 nm23 蛋白表达, 并对不同证型按性别进行比较分析, 包括 TNM 分期、淋巴结转移和远处转移等。

结果: 胃癌患者各证型表达与 TNM 分期无关, 淋巴结与远处转移无差异, 痰湿凝结和胃热伤阴 2 型淋巴结转移男女两性存在差异 ($P < 0.05$), 痰湿凝结型女性淋巴结转移多于男性, 胃热伤阴型则反之, 胃热伤阴型远处转移女性多于男性 ($P < 0.05$)。各证型间及男女两性 p53 与 nm23 表达无显著差异 ($P > 0.05$), 各证型女性患者 p53

表达存在差异($P=0.03$), 痰湿凝结型 p53 表达男性高于女性($P=0.01$), 胃热伤阴型 p53 与 nm23 表达女性高于男性($P<0.05$).

结论: 胃癌特定中医证型男女两性 p53(痰湿凝结和胃热伤阴型)与 nm23(胃热伤阴型)蛋白表达存在差异, 与淋巴结转移、远处转移存在关联.

关键词: 胃癌; 中医证型; p53; nm23

施俊, 许玲, 何金, 孙大志. 胃癌中医证型 p53 与 nm23 基因蛋白表达性别差异分析. 世界华人消化杂志 2005;13(8):940-944
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/940.asp

0 引言

胃癌是常见的恶性肿瘤, 近年来胃癌中医证型及其本质的探索是研究热点. 我们收集胃癌患者 98 例, 检测胃癌组织 p53 与 nm23 基因蛋白表达, 分析不同证型男女性别表达差异及其与 TNM 分期和转移的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-07/2004-05 住院胃癌手术患者 98 例, 均病理证实, 按辨证标准分型归类, 平均年龄 59.9 岁, 男 67 例, 平均年龄 58.6 岁, 女 31 例, 平均年龄 60.8 岁, 小于 40 岁者 6 例, 大于 40 岁者 92 例. 病理类型腺癌 79 例, 黏液腺癌 11 例, 印戒细胞癌 8 例, 胃癌标本石蜡块保存备用.

兔抗人 p53 蛋白一抗, 编号:R-0430, 购自福州迈新生物技术开发公司; 鼠抗人 nm23 蛋白一抗, 编号:M-0421, 购自上海长岛生物技术有限公司. 免疫组化 Envision 试剂盒, 购自 DAKO 公司.

1.2 方法 采用国际抗癌联盟肿瘤 TNM 分期(2002)分为 I、II、III、IV 期^[1].

辨证标准参照 1978 年全国第一届胃癌学术会议北京市胃癌协作组制定的 6 型分法辨证. (1) 肝胃不和型: 主症为胃脘胀满, 时时隐痛, 窜及两胁, 呃逆呕吐, 脉沉或弦细, 舌质淡红, 苔薄白或薄黄; (2) 脾胃虚寒型: 主症为胃脘隐痛, 喜按喜温, 或朝食暮吐, 暮食朝吐, 面色苍白, 肢冷神疲, 便溏浮肿, 舌淡而胖, 苔白滑润, 脉沉缓; (3) 瘀毒内阻型: 主症为胃脘刺痛, 心下痞硬, 吐血便黑, 皮肤甲错, 舌质暗紫, 脉沉细涩; (4) 胃热伤阴型: 主症为胃内灼热, 口干欲饮, 胃脘嘈杂, 食后脘痛, 五心烦热, 大便干燥, 食欲不振, 脉弦细数, 舌红少苔, 或苔黄少津; (5) 痰湿凝结型: 主症为胸闷膈满, 面黄虚肿, 呕吐痰涎, 腹胀便溏, 痰核累累, 舌淡红, 苔滑腻; (6) 气血双亏型: 主症为全身乏力, 心悸气短, 头晕目眩, 面色无华, 虚烦不寐, 自汗盗汗,

甚至阴阳两虚, 脉沉细无力, 舌淡苔薄.

采用免疫组化 Envision 法, 按试剂盒说明书常规操作. 用 DAB 显色, 阳性为棕色, 虽然阳性染色分布不均匀, 强度有差别, 但只要有明确阳性产物即作为阳性细胞. 以任意 5 个高倍镜视野中阳性显色作为评定依据. 浅棕色(+), 棕黄色(++), 深棕色(+++). 按着色反应的强弱, 与细胞表达数共同判断数值. 即免疫组化着色按其强弱分为(-), (+), (++) , (+++) 分别给予分值为 0, 1, 2, 3 分; 细胞表达数 0, 1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100%, 分别给予分值为 0, 1, 2, 3, 4 分; 将每一标本的两个分值相乘, 作为结果.

统计学处理 非正态分布资料用完全随机化设计资料的非参数检验进行数据处理和分析, 两样本率的比较应用 u 检验. 运用 SAS 统计软件包.

2 结果

胃癌瘀毒内阻型 15 例, 肝胃不和、胃热伤阴 2 型各 16 例, 痰湿凝结、气血双亏、脾胃虚寒 4 型各 17 例, 各型男女 TNM 分期比较皆无统计学意义($P>0.05$). 各型淋巴结转移比较无统计学意义($P>0.05$). 男女两性总体、各型男性患者及女性患者比较皆无统计学意义($P>0.05$), 提示总体而言胃癌中医证型及男女性别与淋巴结转移无明显相关性. 同一证型男女两性淋巴结转移率进行差异分析可见痰湿凝结和胃热伤阴 2 型淋巴结转移男女两性存在差异($u = -2.15\ 629$, $P = 0.031\ 061$ 和 $u = 3.05\ 788$, $P = 0.0022\ 291$), 痰湿凝结型女性淋巴结转移多于男性, 胃热伤阴型则反之(表 1). 各型远处转移、男性与女性总体比较无统计学意义 $P>0.05$, 但胃热伤阴型远处转移男女两性存在差异($u = -2.17\ 882$, $P = 0.029\ 345$), 女性远处转移多于男性(表 2).

胃癌 p53 阳性表达率为 64%, 各型及男女两性比较无差异($P>0.05$). 男性各型患者比较无统计学意

表 1 胃癌淋巴结转移与性别的关系

中医证型	n(男/女)	淋巴结转移 n(%)		
		男	女	总计
肝胃不和	16(11/5)	7(63.6)	3(60.0)	10(62.5)
脾胃虚寒	17(12/5)	8(66.7)	1(20.0)	9(52.9)
气血双亏	17(11/6)	7(63.6)	4(66.7)	11(64.7)
痰湿凝结	17(13/4)	5(38.5)	4(100.0) ^a	9(52.9)
胃热伤阴	16(9/7)	9(100.0)	2(28.6) ^a	11(68.8)
瘀毒内阻	15(11/4)	5(45.5)	4(100.0)	9(60.0)

^a $P<0.05$ vs 男.

表2 胃癌中医证型远处转移与性别的关系

中医证型	n(男/女)	远处转移 n(%)		
		男	女	总计
肝胃不和	16(11/5)	3(27.3)	1(20.0)	4(25.0)
脾胃虚寒	17(12/5)	2(16.7)	0(0.0)	2(11.8)
气血双亏	17(11/6)	2(18.2)	1(16.7)	3(17.7)
痰湿凝结	17(13/4)	3(23.1)	0(0.0)	3(17.7)
胃热伤阴	16(9/7)	0(0.0)	3(42.9) ^a	3(18.8)
瘀毒内阻	15(11/4)	2(18.2)	0(0.0)	2(13.3)

^a $P < 0.05$ vs 男.

义, 女性患者各型比较 $\chi^2 = 11.694$, $P = 0.0392$, 有统计学意义, 提示不同证型女性患者 p53 基因蛋白表达存在差异, 以痰湿凝结型为最低, 胃热伤阴型为最高. 各型男女两性分别作统计分析, 痰湿凝结、胃热伤阴 2 型 χ^2 值与 P 值分别为 $\chi^2 = 6.6102$, $P = 0.0101$ 和 $\chi^2 = 4.4506$, $P = 0.0349$, 统计学有意义, 其余 4 型皆 $P > 0.05$, 统计学无意义, 提示胃癌不同证型两性 p53 基因蛋白表达痰湿凝结、胃热伤阴 2 型存在差异, 前者男性高于女性, 后者反之 (表 3).

胃癌 nm23 阳性表达率为 92%, 各型及男女两性无差异 ($P > 0.05$). 男性各型女性各型患者比较无统计学意义. 同一证型男女两性分别作统计分析, 胃热伤阴型 χ^2 值与 P 值分别为 $\chi^2 = 5.0679$, $P = 0.0244$, 统计学有意义, 其余 5 型皆 $P > 0.05$ (表 3).

3 讨论

证是中医特有的一个概念, 其重要性早在唐朝就有所论述^[2], 既是对疾病临床表现的概括, 又是在一定程度上对疾病本质的反映. 《丹溪心法》中说: “欲知其内者, 当以观乎外; 诊于外者, 斯以知其内. 盖有诸内者形诸外”. 不同中医证型其内在的不同生理病理变化, 不同基因表达的差异是探讨中医证

的内涵的关键所在. 胃癌证型研究近年在蛋白基因水平上不断深化. 张万岱 *et al*^[3] 检测胃癌组织 c-myc、p21、p53 阳性表达, 结果提示阳性表达各证型依次为脾胃虚寒 > 胃阴不足 > 肝胃不和 > 寒热夹杂, 提示癌基因及抑癌基因表达与胃癌及癌前病变中医分型有一定关系. 章锐^[4] 研究发现胃癌虚、实证患者其胃癌组织中 PCNA、p53 基因、C-erbB-2 基因表达显著升高 ($P < 0.01$), 虚证更为显著, 不同阶段 PCNA、癌基因、抑癌基因表达不同, 晚期即中医虚证阶段表现更为显著. 周冬枝 *et al*^[5] 检测胃癌组织 p53、bcl-2、bax 蛋白的表达, 发现脾虚组患者 p53、bcl-2 蛋白的阳性表达率及表达水平显著高于非脾虚组 ($P < 0.05$), 脾虚患者症状积分与 p53、bcl-2 蛋白表达水平呈正相关, 提示 p53、bcl-2 基因是脾虚证的物质基础之一. 刘莺 *et al*^[6] 运用基因芯片技术寻找不同胃癌证型组织中的相关基因表达谱表达差异, 结果表明胃癌患者的基因表达有相同表达改变, 不同中医证型的基因谱表达改变不相同, 如 nm23 基因增高. 由此可见在胃癌不同证型中肿瘤转移基因的表达存在部分差异, 我们曾就胃癌不同证型转移相关基因表达进行探索, 发现不同证型不仅在病理类型上存在差异^[7], 而且转移相关基因 E-Cad 上也存在差异, 瘀毒内阻与肝胃不和型患者表达偏低^[8-9]. 我们在 p53 与 nm23 基因上未发现不同证型间差异, 与前人研究结果有异, 此可能与不同研究中证型划分不同有关, 有待于运用循证医学方法对胃癌证型判定确定 “金标准” 后进一步统一标准进行探索与分析. 同时研究提示胃癌不同证型的出现并非是所有癌基因的改变, 可能是一组或特定基因的规律性改变的结果.

胃癌的 TNM 分期对于估计病程和判断预后十分有益. 中医各证型与 TNM 分期有一定相关性, 在 TNM I 期、TNM II 期, 大都辨证属实证, 如肝胃不和、瘀毒内阻等; TNM III 期、TNM IV 期的患者, 大多辨证属虚证, 如脾胃虚寒、胃热伤阴、气血双亏等^[10], 这一结

表3 p53 和 nm23 胃癌中医证型基因表达强度性别差异

证型	n(男/女)	p53		nm23	
		男	女	男	女
肝胃不和	16(11/5)	2.2(24/11)	0.2(1/5)	4.0(44/11)	2.2(11/5)
脾胃虚寒	17(12/5)	3.2(38/12)	3.0(15/5)	3.7(44/12)	4.6(23/5)
气血双亏	17(11/6)	4.3(47/11)	2.0(12/6)	7.4(81/11)	5.2(31/6)
痰湿凝结	17(13/4)	3.6(47/13)	0.0(0/4) ^a	4.2(54/13)	2.8(11/4)
胃热伤阴	16(9/7)	1.7(15/9)	2.7(19/7) ^a	2.6(23/9)	7.7(54/7) ^a
瘀毒内阻	15(11/4)	3.3(36/11)	2.3(9/4)	5.6(61/11)	3.0(12/4)

^a $P < 0.05$ vs 男.

论似乎和中医传统观念近似,即实证多出现在疾病早期,虚证多出现在疾病中晚期.我们未得出相应结果,不论是从证型角度还是从性别角度分析皆未有差异性结果,这可能与肿瘤微转移灶的存在,精确地确定TNM分期十分困难,而且两项研究在病理类型上可能存在差异有关.本组都是手术患者,未将已经失去手术指征的患者纳入观察,也可能是原因之一,有待于进一步研究.

p53基因突变可导致稳定的蛋白质不能完成抑制细胞增殖的作用,使肿瘤侵袭力增加,容易发生转移^[11],p53基因的突变和过表达不仅存在于胃癌各临床分期,而且可发生在胃癌前病变的不同阶段,并随着病变的进展而不断升高^[12].现代研究已经表明男女两性胃癌患者在诸多方面存在差异,女性胃癌具有其特有的发生与发展规律^[13-16].我们曾发现胃热伤阴型以女性居多,与其他证型存在差异^[17],在本研究中进一步观察相应基因蛋白表达差异情况,研究发现胃癌患者各个证型及男女两性p53基因蛋白表达并无差异,但是差异却存在于不同证型女性患者之间,且痰湿凝结、胃热伤阴2型男女性比较具有统计学意义,这提示我们该结果可能与男女两性胃癌患者的发病原因有密切关系.随社会的发展人民生活水平不断提高,相对来说男性应酬较女性为多,饮食不节,进食肥甘厚腻频多,加之嗜烟酒,湿热内蕴,痰湿凝聚,容易形成痰湿体质,日久造成抑癌基因p53突变或过表达,胃癌前病变恶化或直接发为胃癌,痰湿凝结型男性p53表达明显高于女性可能与此有关.反观女性患者,传统观念认为女性具有经带胎产乳等生理特点,皆以阴血为物质基础,加之女性较男性情感丰富,又多见多愁善感,情志不疏,肝气郁结,郁久化火,消灼阴精,所以女性阴血常常不足,同样日久引起p53突变为胃癌,胃热伤阴型女性p53表达高于男性可能与此有关.胃癌证型多样,不同证型性别差异观察还需要进一步扩大样本深入研究.

国内研究表明p53与转移存在密切的关系,其在血行转移过程中起重要作用^[18],p53蛋白阳性率越高远处转移率越高,预后也越差^[19].也有研究表明p53与胃癌淋巴结转移存在相关性,阳性表达淋巴结转移率较阴性表达的为高,差异显著^[20-24].nm23被认为是一种肿瘤转移抑制基因,Kodera^[25]发现有淋巴结转移的胃癌组织中nm23-H1 mRNA水平显著下降,且观察到低mRNA组的生存时间明显缩短.免疫组化表明nm23蛋白与胃癌浸润深度、淋巴结转移和远处转移相关,与淋巴结转移发挥负性调节,对胃癌的转移有抑制作用,对判断预后有一定价值^[26-32].观察p53与nm23同时表达与转移的关系也发现,二者的表达在胃癌淋巴

结转移中可能起协同作用,可作为临床预测转移和估计预后的重要参考指标^[33].在本研究中胃癌各证型在淋巴结及远处转移上虽未见差异,但是特定证型男女比较却显示出了统计学意义,在痰湿凝结和胃热伤阴2型淋巴结转移男女两性存在差异,痰湿凝结型女性淋巴结转移多于男性,胃热伤阴型则反之,胃热伤阴型远处转移男女两性存在差异,女性多于男性.从p53及nm23角度来看,痰湿凝结型p53表达男女两性存在差异,男性表达高于女性,胃热伤阴型p53与nm23则是女性表达高于男性,此结果似与同证型转移情况存在矛盾,我们推测在特定证型中p53与nm23协同作用时,p53与远处转移关系更为密切,而nm23则较多影响淋巴结转移.此种表达对特定证型具有什么意义以及此种推测是否正确值得扩大样本进一步研究.

4 参考文献

- 1 P. 赫尔曼尼克, 杨勇翻译. 国际抗癌联盟肿瘤TNM分期图谱. 第四版. 北京: 科学出版社, 2002:81-92
- 2 唐·孙思邈撰. 鲁兆麟点校. 备急千金要方. 北京: 人民卫生出版社, 1997:470
- 3 张万岱, 王小虎, 曾锦章, 张亚历, 孙勇. 胃癌及癌前病变的中医分型与幽门螺杆菌感染、癌基因表达的关系. 中国中西医结合脾胃杂志 1998;6:5-6
- 4 章锐. 胃癌中医证型与细胞增殖活性及癌基因关系的研究. 临床中老年保健 2001;4:159-161
- 5 周冬枝, 吴苏冬, 刘永惠, 邓景元, 谢宏. 胃癌中医证型与p53、bcl-2、bax基因蛋白表达关系的研究. 北京中医药大学学报 2003;26:56-59
- 6 刘莺, 李俊军, 朱文锋, 刘平. 胃癌中医证型相关基因的表达谱. 世界华人消化杂志 2003;11:1318-1321
- 7 许玲, 孙大志, 何金, 刘龙, 秦志丰, 施俊, 李峻, 魏品康. 胃癌病理分型与辨证分型的关系探讨. 中华实用中西医杂志 2005;18:272-274
- 8 许玲, 刘龙, 孙大志, 魏品康. E-钙粘蛋白与胃癌中医证型关系的研究. 成都中医药大学学报 2004;27:40-43
- 9 许玲, 孙大志, 何金, 刘龙, 魏品康. 胃癌同证型中肿瘤转移相关基因蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004;12:2782-2787
- 10 魏开建. 68例原发性胃癌中医证型与TNM分期的相关分析. 福建中医药 2004;35:5-6
- 11 Shun CT, Wu MS, Lin JT, Chen SY, Wang HP, Lee WJ, Wang TH, Chuang SM. Relationship of p53 and c-erbB-2 expression to histopathological features, *Helicobacter pylori* infection and prognosis in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1997;44:604-609
- 12 胡玲, 劳绍贤. 胃癌前病变p21^{ras}, c-erbB-2, p53表达与中医证候的关系. 世界华人消化杂志 2004;12:262-265
- 13 黎红光, 华永龙, 胡国斌, 徐洪涛. 315例女性胃癌临床胃镜病理分析. 中国综合临床 2001;17:117-118
- 14 许国强, 倪晓莹, 顾秀珍. 1554例胃癌的临床分析. 中国肿瘤临床 2002;29:481-483
- 15 占城, 刘小北, 曾敏, 丁士刚. 67例青年女性胃癌的临床病理分析. 临床肿瘤学杂志 2003;8:176-177
- 16 赵平, 唐令超, 黄蔚, 罗进, 杨玉波. 女性胃癌127例临床分析. 肿瘤防治杂志 2001;8:508-509
- 17 施俊, 许玲, 孙大志. 357例胃癌中医证型性别差异性分析. 山东中医药大学学报 2004;28:429-430
- 18 辛彦, 赵凤凯, 徐蕾, 吴东瑛, 王艳萍. 胃癌细胞DNA倍体和突变型p53基因产物表达与转移扩散的关系. 中国医科大学学报 1997;26:8-11
- 19 王凤军. 胃癌组织中p27、p53与PCNA的表达与转移的关系. 江苏医药 2004;30:57
- 20 刘永源, 张英, 黄应桂, 曹军, 梁启康. 胃癌nm23、p53、CerbB-

- 2 及 PCNA 的表达与淋巴结转移的关系. 中国肿瘤临床与康复 2003;10:127-129
- 21 Xie HL, Su Q, He XS, Liang XQ, Zhou JG, Song Y, Li YQ. Expression of P21^{waf1} and P53 and polymorphism of P21^{waf1} gene in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1125-1131
- 22 廖海涛, 刘立义. P53、P21^{ras} 蛋白和 P-糖蛋白在胃癌中过表达的意义. 广西医学 2003;25:1107-1109
- 23 金锡尊, 焦成斌, 姚海涛, 鲍秀对, 王树卿. 胃癌 p16、p53、C-erbB-2 基因表达与淋巴转移关系的研究. 中国实用外科杂志 2004;24:252
- 24 焦亚莉, 高恒瑞, 杜成林, 李保海, 许永红, 王永峰. 胃癌 p53 等蛋白表达与患者生存期及预后的关系. 中国临床康复 2004;8:3310-3312
- 25 Kodera Y, Isobe K, Yamauchi M, Kondoh K, Kimura N, Akiyama S, Itoh K, Nakashima I, Takagi H. Expression of nm23-H1 RNA levels in human gastric cancer tissues. A negative correlation with nodal metastasis. *Cancer* 1994;73:259-263
- 26 朱新勇, 张同全, 王福春, 方驰华, 马俊勋, 张伟, 曹瑞. p53、bcl-2 和 nm23 基因在胃癌组织中的表达及其临床意义. 中国普外基础与临床杂志 2003;10:589-592
- 27 邵春奎, 朱正纲, 苏祖兰, 王瑞年, 尹浩然, 林言箴. 胃癌组织中 p53、c-erbB-2、EGFR、nm23、E-cadherin 基因表达及预后价值. 癌症 2000;19:666-670
- 28 姬社青, 花亚伟, 庄兢, 高阳, 孔烨, 韩少良, 邵永孚. COX-2、p53、PCNA 和 nm23 异常表达与胃癌生物学行为的关系. 癌症 2002;21:619-624
- 29 尹逊国, 胡祥, 刘晖, 张健, 温伟, 田大字, 刘忠. nm23-H1 与胃癌的分化、浸润转移的关系. 医师进修杂志 2002;26:33-34
- 30 武步强, 陈广斌, 李永国, 肖鹏. p16 和 nm23-H1 在胃癌的表达与淋巴结转移的相关研究. 中华实验外科杂志 2004;21:754
- 31 张景华, 李勇, 王晓玲, 曹月敏, 邱刚, 王力利. 胃癌及区域淋巴结 CD44v6、nm23-H1 表达与其病理特征及预后关系的研究. 中国肿瘤临床 2004;31:256-258
- 32 李勇, 张景华, 邱刚, 杨进强, 赵群, 王晓玲, 焦志凯, 张志栋, 王力利. 胃癌组织及区域淋巴结 MUC1、CD44v6、nm23 表达与胃癌侵袭转移及预后的关系. 癌症 2003;22:985-989
- 33 林孟波, 王清水, 施作霖, 陈小岩. 癌基因 p53、nm23 在胃癌中的表达与预后的意义. 福建医药杂志 2001;23:89-90

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的参考工具书.

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)

慢性乙型肝炎和肝硬化组织中变异肝细胞结节的克隆性

初霞, 苏勤, 巩丽, 张伟, 王淑芳, 朱少君, 李爱宁, 冯英明

初霞, 苏勤, 巩丽, 张伟, 王淑芳, 朱少君, 李爱宁, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科 陕西省西安市 710038
苏勤, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院病理科 北京市 100021
冯英明, 第四军医大学唐都医院肿瘤科 陕西省西安市 710038
初霞, 女, 1979-10-20 生, 河南省洛阳市人, 汉族, 2002 年第四军医大学唐都医院病理科硕士生。
国家自然科学基金资助项目, No. 30171052
通讯作者: 苏勤, 100021, 北京市潘家园南里 17 号, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院病理科. q.su@wjgnet.com
电话: 010-80691052 传真: 010-67713359
收稿日期: 2005-02-17 接受日期: 2005-03-10

Clonality of nodules of altered hepatocytes in livers with chronic hepatitis B and cirrhosis

Xia Chu, Qin Su, Li Gong, Wei Zhang, Shu-Fang Wang, Shao-Jun Zhu, Ai-Ning Li, Ying-Ming Feng

Xia Chu, Qin Su, Li Gong, Wei Zhang, Shu-Fang Wang, Shao-Jun Zhu, Ai-Ning Li, Department of Pathology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Qin Su, Department of Pathology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China
Ying-Ming Feng, Department of Oncology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30171052

Correspondence to: Dr. Qin Su, Department of Pathology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 17 Panjiayuan Nanli, Beijing 100021, China. q.su@wjgnet.com
Received: 2005-02-17 Accepted: 2005-03-10

Abstract

AIM: To elucidate the clonality status of the preneoplastic nodules of altered hepatocytes (NAHs) in cirrhotic liver by clonality assays at the phosphoglycerate kinase and androgen receptor loci based on X chromosomal inactivation mosaicism in female somatic tissues.

METHODS: Female liver tissues with hepatitis B virus (HBV)-associated cirrhosis were collected. The nodular lesions were microdissected on hematoxylin and eosin-stained paraffin sections. Genomic DNA was isolated and pretreated with the methylation-sensitive enzyme *Hpa* II or *Hha* I, and amplified via nested PCR. The products were resolved on agarose gels and denaturing polyacrylamide gels. Hepatocellular carcinoma (HCC) and adenoma (HA) tissues were used as references.

RESULTS: Monoclonality was demonstrated in all of the

five cases of HCC and one case of HA. Totally 6 regular regenerative nodules and 29 NAHs including clear-cell (glycogen-storing) and mixed-cell types were microdissected from 4 cirrhotic liver specimens. Loss of X chromosomal inactivation mosaicism was demonstrated in all of the 5 mixed-cell NAHs with small-cell change (SCC), indicating their neoplastic nature. One of the lesions exhibited similar X chromosomal inactivation pattern as the neighboring HCC nodules, reflecting their common clonal origin. Among the 20 mixed-cell lesions without SCC, 7 (35%) were shown to be monoclonal, while all of the 4 clear-cell lesions and 6 regular regenerative nodules examined were found to be polyclonal.

CONCLUSION: Some NAH lesions in the HBV-associated cirrhosis, particularly those with SCC, are already neoplastic lesions. Occurrence of SCC is a late event during NAH progression, a premalignant morphologic phenotype.

Key Words: Clonality; Nodules of altered hepatocytes; Hepatitis B; Hepatic cirrhosis; Hepatocellular carcinoma; Premalignant lesions

Chu X, Su Q, Gong L, Zhang W, Wang SF, Zhu SJ, Li AN, Feng YM. Clonality of nodules of altered hepatocytes in livers with chronic hepatitis B and cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):945-952

摘要

目的: 利用基于女性体细胞构成组织内 X 染色体失活嵌合性的磷酸甘油酸激酶和雄激素受体位点克隆性检测技术, 探讨肝硬化组织中变异肝细胞结节 (NAH) 的克隆性。

方法: 女性乙型肝炎病毒 (HBV) 相关肝硬化标本石蜡切片, HE 染色后通过显微切割获取肝细胞结节, 提取基因组 DNA, 经甲基化敏感的 *Hpa* II 或 *Hha* I 消化, 巢式 PCR 扩增, 凝胶电泳显示结果。应用肝细胞癌 (HCC) 和肝细胞腺瘤组织作为参照病变。

结果: HCC 5 例和肝细胞腺瘤组织 1 例均为单克隆性。在 4 例可分析的肝硬化组织中共分离出普通再生结节 6 个和 NAH 29 个, 后者包括混合细胞性病变 25 个, 透明细胞性 (糖原储积) 病变 4 个。伴有小细胞性改变 (SCC) 的 5 个混合细胞性 NAH 均显示 X 染色体失活嵌合性丢失, 提示为肿瘤性病变; 其中 1 个取自癌旁的病变与癌组织的灭活带型一致, 证明与 HCC 具有相同的克隆

起源; 20个不伴SCC的混合细胞性NAH中, 7个(35%)为单克隆性病变; 检测的4个透明细胞性NAH和6个普通再生结节均未显示出X染色体失活嵌合性丢失, 提示为多克隆性病变。

结论: HBV相关的肝硬化组织中的部分NAH, 尤其是伴有SCC的病变, 是单克隆性的, 已经属于肿瘤性病变; SCC是NAH病变进展过程中的较晚期改变, 是一种癌前病变。

关键词: 克隆性; 变异肝细胞结节; 乙型肝炎; 肝硬化; 肝细胞癌; 癌前病变

初霞, 苏勤, 巩丽, 张伟, 王淑芳, 朱少君, 李爱宁, 冯英明. 慢性乙型肝炎和肝硬化组织中变异肝细胞结节的克隆性. 世界华人消化杂志 2005;13(8):945-952 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/945.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)常见^[1], 在中国居于男性恶性肿瘤的前3位^[2], 主要为乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)持续感染及其引起的肝硬化^[2], 但对于其发生的分子机制仍所知甚少. 已提出的HCC前期病变包括肝实质的大细胞性改变(large-cell change, LCC)^[3]、小细胞性改变(small-cell change, SCC)^[4]和巨大再生结节^[5]. 多数学者认为肝硬化组织中的再生结节也是HCC的前期病变^[6-7], 但是这一提法并不准确^[8-9]. 近年来的观察表明, 变异肝细胞病灶(foci of altered hepatocytes, FAH)广泛存在于人类慢性肝炎和肝硬化组织中^[10], 并与动物HCC前期病变相似, 与肝癌发生有关^[11]. 具有生长优势的FAH占据一个再生结节的全部或大部分, 并呈膨胀性生长, 这种病变称为变异肝细胞结节(nodules of altered hepatocytes, NAH)^[10]. 伴有SCC的FAH和NAH可能是较晚期的癌前病变^[2, 9-11]. 然而, 还不知道他们的确切性质. 克隆性增生是肿瘤的一个基本特性^[12], 肝细胞肿瘤也是克隆性病变^[13-19], 但对于HCC前期病变的克隆性研究不多, 文献中未见有关人肝脏中NAH或FAH克隆性的报道. 此研究应用基于女性体细胞构成组织内X染色体失活嵌合性和磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)及雄激素受体(androgen receptor, AR)基因多态性的克隆性检测技术, 结合显微切割技术探讨NAH的克隆组成。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-01/2004-06第四军医大学唐都医院和西京医院以及中国医学科学院肿瘤医院病理科女性肝组织9例. 由两位病理医师确定诊断, 按Edmondson分级^[20]和多数认可的肝硬化^[21]、肝细胞腺瘤的形态学标准^[22]诊断. 根据以前的观察^[10]检测FAH和NAH, 后

一种病变体积较大, 多数直径1-5 mm, 常占据肝小叶或再生结节的大部分或全部, 并挤压周围肝实质, 病变内肝板厚度增加至2层. 部分病变主要由透明(糖原储积)肝细胞组成, 称为透明细胞性病变; 较晚期的病变由透明肝细胞和嗜双色肝细胞(amphophilic cell)构成, 称为混合细胞性病变. 根据Anthony *et al*^[3]的标准检测LCC病变; 根据Watanabe *et al*^[4]的描述检测SCC病变. 依据肝细胞的密度、肝板厚度和结构以及核异型, 结合以前的观察^[2, 10, 23]把SCC分为低度和高度病变. SCC低度病变较小, 肝板由2-3层细胞构成, 核密度增加至周围肝实质的1.5-2倍; 高度病变较大, 肝板厚度达3层, 细胞核密度增加至2倍, 其构成的小肝细胞有核异型及结构异常, 但尚不足以诊断恶性病变. 肝细胞不典型增生达到以下程度时即诊断为高分化HCC(Edmondson I级): 细胞核密度增加至其周围肝组织的2倍, 肝板排列紊乱, 厚度超过3层细胞, 可以呈膨胀性或浸润性生长(表1). 显微切割和DNA提取参照朱少君 *et al*^[24]的方法进行. 每例标本制备10 μ m厚切片10张, 经HE染色后, 用甘油覆盖组织, 在显微镜10倍物镜下用4.5号注射器针头将所需的组织剔出(图1), 再用针头收集剔出的组织于装有无水乙醇的1.5 mL Eppendorff管内. 在每个病变的分离过程中, 同时分离病变旁相同面积的增生纤维组织或结构正常的肝组织, 作为以下检测的参照. 经2次无水乙醇洗涤后, 放置37℃烤箱30 min左右, 待组织干燥后, 应用QIAamp DNA提取试剂盒(QIAGEN GmbH, Germany)按照说明书提取基因组DNA.

1.2 方法

1.2.1 AFP和HBV抗原 应用酶联免疫技术测定血清AFP, HBsAg及其抗体, e抗原及其抗体, HBcAg抗体以及HCV抗体. 此外, 还应用免疫组织化学检测了组织AFP和HBV抗原的表达. 切片4 μ m脱蜡入水后分别滴加HBsAg的mAb(M3506, Dako)以及HBcAg(B0586, Dako)和IAFP(A0008, Dako)的多克隆抗体. 参照以前的方法^[10], 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶反应显示抗原-抗体结合, 二氨基联苯胺/过氧化氢溶液显色, 苏木素衬染. 应用已知有相应抗原表达的标本作为阳性对照; 应用相同稀释度的免疫前小鼠或家兔IgG进行阴性对照反应.

1.2.2 克隆性分析 AR和PGK位点的克隆性检测是基于女性体细胞组织的X染色体失活嵌合性, 即所有女性体细胞的2条X染色体中的1条在胚胎发育早期必须通过永久甲基化而随机灭活, 另1条保持遗传活性^[25]. AR基因多态性表现为其第1外显子的CAG串联短重复序列(short-tandem repeat, STR)的长度不同, 即(CAG)_n的重复次数有差别($n = 11-31$), 可以通过变性聚丙烯

表1 女性肝细胞肿瘤和肝硬化患者9例的血清学和组织病理学表现, 克隆性分析结果以及单克隆病变的X染色体失活带型

编号	年龄	血清AFP(μg/L)	血清HBsAg	组织HBsAg	病理学诊断及HCC分级	病变编号	病变数	单克隆病变酶切后带型		
								单克隆数	保留上带	保留下带
1	67	300	+	+	HCC II / III 级, 肝硬化	1T01 ¹	1	1	1	0
						1N01 ²	1	1	1	0
2	66	<20 ³	+	+	HCC I / II 级, 肝硬化	2T01	1	1	1	0
						2N01-18 ⁴	18	5	0	5 ⁵
3	23	775.8	+	+	HCC III 级, 肝硬化	3T01	1	1	0	1
4	50	400	+	+	HCC II 级, 肝硬化	4T01	1	1	1	0
5	56	9.2	+	+	HCC IV 级, 肝硬化	5T01	1	1	0	1
6	33	<20	-	-	肝细胞腺瘤	6T01-03	3	3	0	3
7	50	124	+	+	HCC I 级, 肝硬化	7N01, 02	2	2	2 ^{5,6}	0
8	53	48.3	+	+	肝硬化	8N01-06 ⁷	6	1	0	1
9	50	35	+	-	肝硬化	9N01-08	8	3	1	2 ^{5,8}

¹例1之肿瘤标本01;²例1之结节01;³癌组织AFP免疫染色反应也为阴性;⁴混合细胞性NAH 11个, 透明细胞性NAH 2个, 普通再生结节5个;⁵病变来自同一张切片, 且位置相邻(图6A);⁶2个病变均伴有高度SCC;⁷混合细胞性NAH 4个, 透明细胞性NAH和普通再生结节各1个;⁸2个病变均伴有低度SCC.

烯酰胺凝胶电泳显示出来^[26]. PGK基因多态性表现为在甲基化位点下游有一个可以被 *Bst* XI 识别的单核苷酸多态性位点, 可经琼脂糖凝胶电泳显示出来^[27]. 具有多态性位点的女性个体中正常和多克隆增生的组织显示2条带, 而肿瘤性病变仅显示1条带或以1条带为主^[12]. AR位点克隆性检测参照以前的方法^[28]进行. 所用引物序列如下: AR1A, 5' -GAG GAG CTT TCC AGA ATC TG -3'; AR1B, 5' -CAT GGG CTT GGG GAG A -3'; AR2A, 5' -TCC AGA ATC TGT TCC AGA GC -3'; AR2B, 5'-TGG GGA GAA CCA TCC TCA CC -3'. DNA样品经 *Hha* I 消化后, 通过巢式PCR进行扩增反应. 第1轮反应含有引物对 AR1A/AR1B, 97℃ 7 min 预变性后 94℃变性 40 s, 56℃淬火 50 s, 72℃延长 1 min, 共 25 个循环, 72℃延长 15 min. 反应产物 1:100 稀释后, 取 5 μL 加入第2轮反应体系, 其中含有引物对 AR2A/AR2B, 以相同条件扩增, 琼

脂糖凝胶(20 g/L)电泳评价扩增效果. 将4 μL产物和等体积的上样缓冲液混匀后, 加到厚度为 0.8 mm 的变性聚丙烯酰胺凝胶(100 g/L, 含尿素 8 mol/L), 应用 minivE 电泳系统(Amersham-Pharmacia Biotech, USA) 80 V 泳动 8 h, 取出凝胶后银染. PGK位点克隆性检测参照以前的方法^[29]进行. 所用引物序列如下: PGK1A, 5' -CTG TTC CTG CCC GCG CGG TGT TCC GCA TTC -3'; PGK1B, 5' -ACG CCT GTT ACG TAA GCT CTG CAG GCC TCC -3'; PGK2A, 5' -AGC TGG ACG TTA AAG GGA AGC GGG TCG TTA -3'; PGK2B, 5' -TAC TCC TGA AGT TAA ATC AAC ATC CTC TTG -3'. DNA样品经 *Hpa* II 酶切后, 巢式PCR扩增. 第1轮反应和第2轮反应的引物对分别为 PGK1A/PGK1B和PGK2A/PGK2B, 淬火温度分别为 58℃和为 56℃, 35个循环, 其余反应参数同AR位点的扩增反应. 产物经 *Bst* XI 处理后, 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化

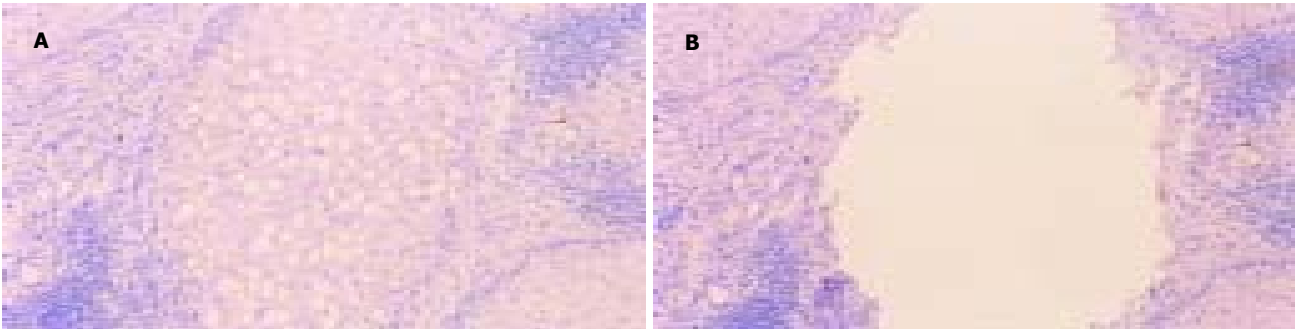


图1 肝硬化组织中一个NAH病变(8N02)经显微切割取出, HE 100. A:前; B:后.

乙锭染色显示结果. 电泳结果观察分别用 UVP 凝胶分析系统(UVP, Cambridge, UK) 和光学照相记录数据, 用相应软件(LabWorks™, UVP) 比较 *Hha* I 或 *Hpa* II 消化前后一对等位基因扩增产物的强度差异, 有明显改变(其中一条带可比强度减弱达 50%)时才被认为有意义(即 X 染色体失活嵌合性丢失).

统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件包进行统计计算. 应用两样本均数的秩和检验比较普通再生结节与 NAH 以及单克隆结节与多克隆结节的大小, $P < 0.05$ 被认为显著性差异.

2 结果

在带有 HCC 的肝组织标本 8 例中, 6 例有 AR 基因 STR 长度多态性, 其中 1 例 AR, PGK 位点均有多态性, 但 PGK 位点未扩增成功, 另外 1 例(例 7)标本因癌组织过少扩增失败, 但癌周肝硬化组织可供 PGK 位点分析. 对这 5 例 HCC 组织进行 AR 位点克隆性分析, *Hha* I 酶切前在 200 bp 与 300 bp DNA 泳动位置间显示 2 条带, 酶切后 1 条带完全消失或明显减弱; 应用癌旁纤维组织作参照, 比较酶切前后 2 条带的强度, 均未显示明显改变(图 2, 3; 表 1). 这些数据证明, HCC 是单克隆

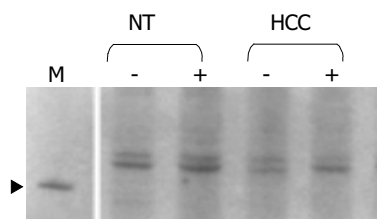


图 2 3 号标本中 HCC 组织 AR 位点检测结果. 参照标本(NT) *Hha* I 酶切前(-)后(+)两条带无明显差别, 而癌组织标本(HCC)酶切后扩增产物上带强度, 减少了 67%. M: 100-bp DNA 分子质量标志, 箭头所指为 200 bp DNA 的泳动位置.

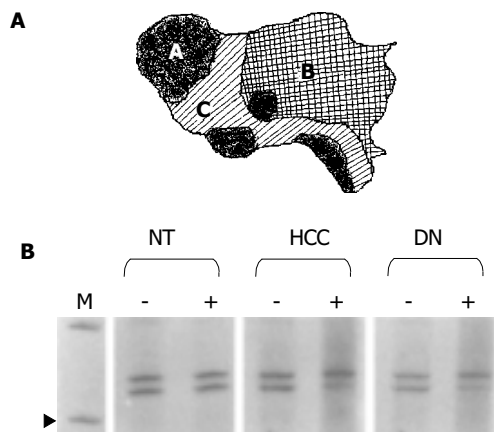


图 3 例 1 肝组织切除标本. A: 示意 HE 切片中 HCC (A) 和伴有 SCC 的 NAH (B) 的位置关系. C 表示纤维组织, 作为检测参照物. B: 纤维组织标本酶切前(-)后(+)两条带强度无明显差别; HCC 和伴有 SCC 的 NAH 标本(DN)酶切后都是下带明显减弱, 可比强度分别减少了 63.0% 和 56.4%. M: DNA 分子质量标志, 箭头所指为 200 bp DNA 的泳动位置.

细胞构成的. 6 号标本是 1 例肝细胞腺瘤, 显微镜下解剖 3 个不同部位瘤组织及相同面积的瘤周肝实质, AR 位点分析发现瘤组织均为上带明显减弱或消失(图 4), 表明肝细胞腺瘤也是单克隆性病变. 这证实了其他作者的研究结果^[13-19]. 自 4 例结节性肝硬化组织中进行显微切割, 每例标本成功检测 1-18 个结节, 共 35 个结节, 其中 6 个为普通再生结节, 29 个为 NAH, 后者包括 25 个混合细胞性病变(图 5A-D) 和 4 个透明细胞性病变. 从分析的病变截面积上比较, NAH (7.7 ± 5.0) mm^2 大于普通再生结节 (4.8 ± 3.9) mm^2 , 但尚未达到统计学上显著差别 ($P = 0.187$). 共检出 SCC 病变 5 个(3 个为高度, 2 个为低度病变), 全部位于混合细胞性 NAH 中(图 5C-D); 6 个普通再生结节中, 3 个有散在 LCC 肝细胞或小灶性 LCC 病变, 3 个有大量 HBsAg 阳性的毛玻璃样肝细胞, 其中 1 个主要由毛玻璃样肝细胞构成, 免疫组织化学检测显示出 HBsAg (图 5E) 和 HBcAg 阳性广泛表达(图 5F), 2 个结节中有小的透明细胞性 FAH (病灶肝细胞数 < 结节内肝细胞总数的 15%); 所有 NAH 中均未查见 LCC 病变, 仅在 5 个结节 (17.2%) 中查见散在的 HBsAg 阳性毛玻璃样肝细胞. AR 和 PGK 位点的检测表明, 12 个 (12/29, 41%) NAH 显示出 X 染色体失活嵌合性丢失, 提示为单克隆性, 而 6 个普通再生结节全为多克隆性(表 1; 图 3, 6). 在 29 个 NAH 中, 伴有 SCC 的病变 (5/5) 全部为单克隆性, 7 个 (7/20, 35%) 不伴 SCC 的混合性细胞性病变显示为单克隆性, 4 个透明肝细胞病变全部显示为多克隆性(图 7). 单克隆性和多克隆性 NAH 病变的截面积分别是 (8.2 ± 5.5) mm^2 和 (7.3 ± 4.8) mm^2 , 二者没有显著差别 ($P = 0.744$).

为了探讨 HCC 与其前期病变之间的关系, 我们分别检查了病例 1 中 HCC (1T01) 及其相邻 NAH (1N01) 的 X 染色体失活类型(图 3A). 该结节伴有高度 SCC, AR 位点检测结果表明此 NAH 已经是肿瘤性病变, 并且与 HCC 病变 *Hha* I 酶切带型相同, 均保留上带(图 3B), 提示他们具有相同的克隆起源. 为了探讨不同 NAH 之间的关系, 我们分析了病例 2 中 5 个单克隆结节

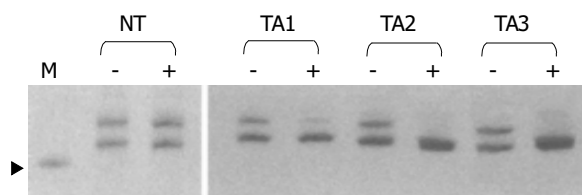


图 4 例 6 的 AR 位点克隆性检测结果. 瘤旁正常肝组织(NT) *Hha* I 酶切前(-)后(+)两条带无明显差别, 肝细胞腺瘤组织酶切后上带明显减弱(TA1, TA3)或消失(TA2). M: DNA 分子质量标志, 箭头所指为 200 bp DNA 的泳动位置.

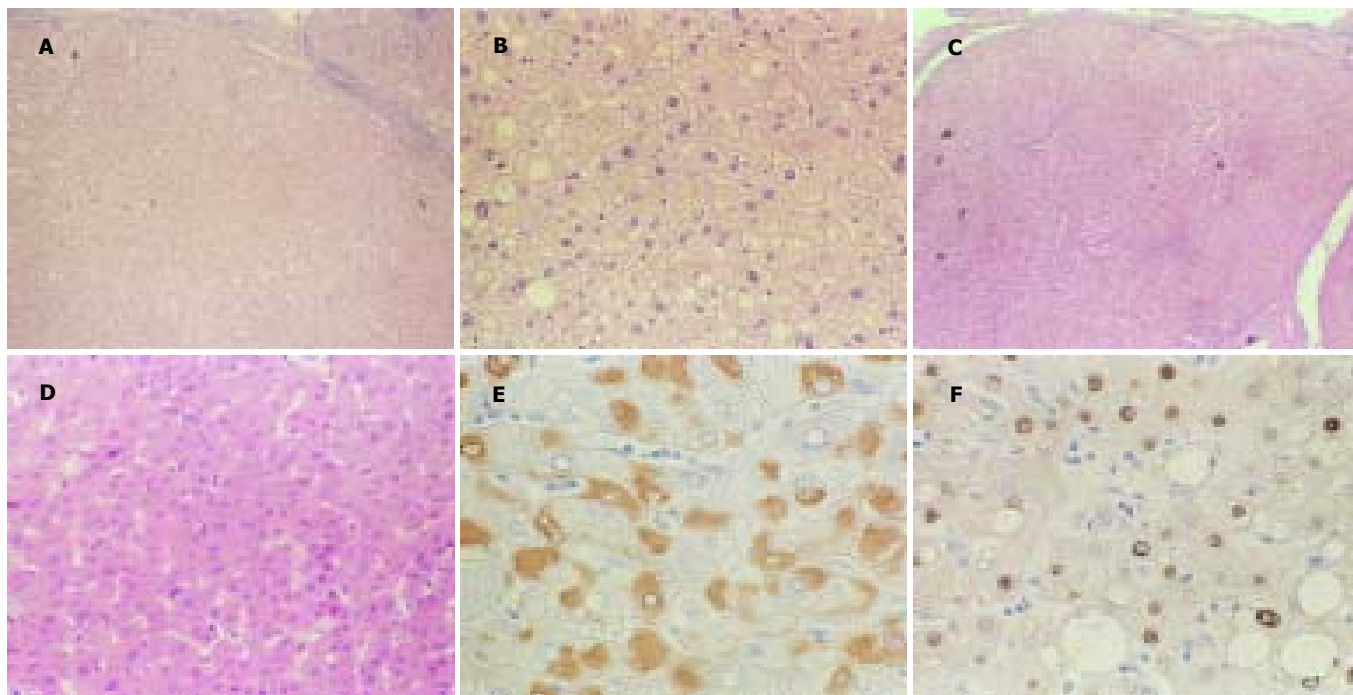


图5 A, B: 混合细胞性结节(2N08), HE 染色; C, D: 混合细胞性结节伴高度 SCC (7N01), HE 染色; E, F: 普通肝细胞结节(8N05), HBsAg (E)和 HBcAg (F)免疫染色反应阳性. A, C $\times 40$; B, D $\times 200$; E, F $\times 400$.

(2N01, 2N04, 2N07, 2N08 和 2N09) 的 X 染色体失活类型. 这 5 个单克隆性病变远离 HCC (距离 >1 cm), 他们都来自同一张切片, 而且位置相邻 (图 6A). PGK 位点检测显示出相同的 X 染色体失活带型, *Hpa* II 酶切后剩下 433 bp 条带 (图 6B), 表明他们具有相同的克隆起源. 此外, 病例 7 中伴有高度 SCC 的 2 个 NAH (7N01 和 7N02) 及病例 9 中伴有低度 SCC 的 2 个 NAH 病变 (9N01 和 9N02) 分别来自同一张切片上的相邻位置, PGK 位点检测显示, 这些相邻的结节也具有相同的 X

染色体失活类型 (表 1), 提示他们分别来源于同一个变异肝细胞克隆.

3 讨论

HCC 前期病变一直是人类肝癌研究的热点之一, 虽然已经提出了几种 HCC 相关病变, 但他们确切性质还远未被搞清. 肝实质的 LCC 在 1973 年由 Anthony *et al*^[3] 描述, 当时称之为肝细胞异性增生 (liver cell dysplasia), 曾长期被认为是癌前病变^[3, 30-36], 但近年研究表明, 他与 HCC 发生关系并不密切, 而是对某些致病因子的反应^[4-5, 9-10, 23, 37-41], 可能是有丝分裂障碍的一种表现^[2, 10, 42]. 此研究仅在部分普通再生结节中观察到 LCC, 在 FAH 和 NAH 中并未发现这种改变, 支持上述结论. 肝实质的小细胞性改变 (SCC) 又称小细胞性异型增生 (small-cell dysplasia), 是

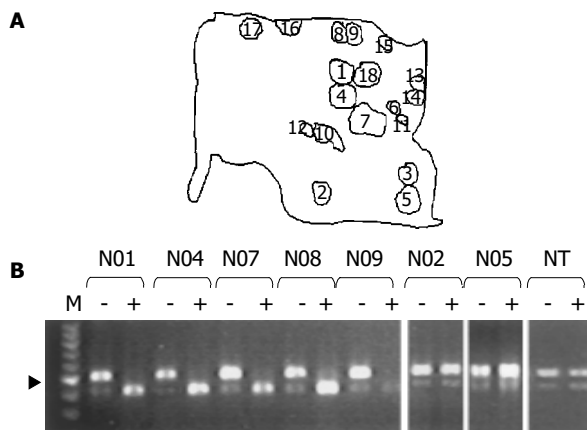


图6 例2肝组织内不同结节 PGK 位点克隆性检测的代表性数据. A: HE 切片示意图, 显示分析过的 18 个不同结节之间的位置关系. 5 个相邻结节均为 NAH 病变 (N01, N04, N07, N08 和 N09), 2 个普通再生结节 (N02 和 N05) 位于切片的下方; B: 克隆性检测结果. 参照组织 (NT) *Hpa* II 酶切前 (-) 后 (+) 两条带强度无明显差别, 5 个相邻的 NAH (N01, N04, N07, N08 和 N09) 酶切后仅剩 433 bp 条带, 而 2 个普通再生结节 (N02 和 N05) 酶切后仍是两条带, 与酶切前相比, 强度无明显改变. M: 100-bp DNA 分子质量标志, 箭头所指为 500 bp DNA 的泳动位置.

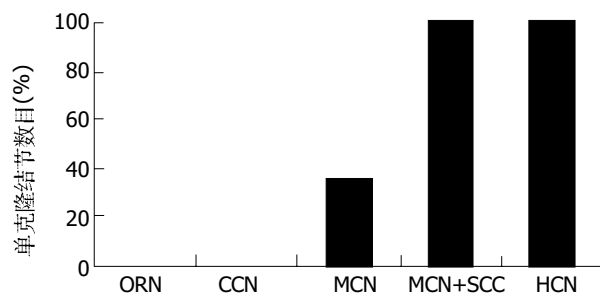


图7 HBV 相关的肝硬化组织中不同结节性病变的克隆性组成. ORN, 普通再生结节; CCN, 透明细胞性 NAH; MCN, 不伴 SCC 的混合细胞性 NAH; MCN+SCC, 伴有 SCC 的 NAH 病变; HCN, 肝细胞肿瘤, 包括 HCC 和肝细胞腺瘤.

Watanabe *et al*^[4] 1983年在HBV相关的肝硬化实质中观察到的一种病变。SCC常见于一部分其他类型的癌前病变内,后者包括FAH, NAH^[10-11]和巨大再生结节病变^[13, 18, 40, 43-49],这种SCC病变是一种真性不典型增生^[10-11]。最近研究显示,伴有SCC的巨大再生结节已经是肿瘤性病变^[45, 48-49],而普通型病变都是为多克隆性^[48],反映了其再生结节本质。此研究显示,发生于NAH内的SCC病变全为克隆性增生,表明他们也已经都是肿瘤性病变。这些数据为我们以前的设想提供了强有力的证据,那就是,发生于肿瘤前期病变内的SCC,尤其是其高度病变,是一种恶性前期的形态学表型^[2, 11]。

FAH是指由细胞学和细胞化学表型明显变异的成熟肝细胞组成的局部病灶,最初发现于接受亚硝胺类致癌剂的大鼠肝实质内^[50-51],后来在化学致癌物、放射线及致癌病毒诱发的肝癌模型早期也发现大量FAH^[52]。Bannasch *et al*^[53]近20 a来应用多种动物模型进行了形态学和组织化学观察,表明肝实质中FAH的出现和进展标志着HCC的发生过程(早期FAH→晚期FAH→肝细胞腺瘤→HCC)。我们对人肝组织的观察表明,FAH也见于人肝硬化及其他慢性肝脏病变的活检组织中,这包括透明细胞性、混合细胞性、嗜碱细胞性病灶(basophilic cell foci)以及嗜双色细胞性和嗜酸细胞性病变(oncocytic lesion)。上述病变中前3种属于肿瘤前期病变,部分伴有SCC的病变增生活跃,可能通过形成NAH或者直接进展为HCC。透明细胞性和混合细胞性FAH的结节性转化的发生率分别为8.5%(26/306)和39.3%(178/453),SCC发生率分别为14.4%(44/306)和28.7%(130/453)^[10]。这些数据说明,与透明细胞性FAH相比,混合细胞性病灶是较晚期、较不稳定的病变。FAH和NAH的性质尚未被阐明。利用嵌合大鼠进行的HCC发生研究提示FAH为克隆性病变^[54]。由于嵌合大鼠技术本身有一定缺陷,这一点尚待更多的证据。此研究应用显微切割和克隆性分析技术对35个肝细胞增生结节进行了分析。结果表明,伴有SCC的所有NAH病变(5/5)和35%(7/20)的不伴SCC的混合性细胞性病变显示出X染色体失活嵌合性丢失,表明为单克隆性;4个透明肝细胞病变和6个普通再生结节全为多克隆性;作为参照标本的5例HCC和1例肝细胞腺瘤全部显示为单克隆性。这些数据表明,所有伴SCC的NAH以及部分不伴SCC的NAH已经成为肿瘤性病变,属于微小肝细胞腺瘤(hepatocytic microadenoma)。这提示,NAH病变的发生和进展伴随着少数病变细胞的寡克隆性乃至单克隆性增生,这一改变早于SCC的发生;后者的出现,尤其是高度病变的出现,预示腺瘤不稳定性增加。此外,我们还分析了1个癌旁NAH病变(伴有高度SCC)的X染

色体灭活带型,发现他与HCC病变Hha I酶切带型相同,均保留上带(图3),表明他们可能具有相同的克隆起源。这一结果提示,伴有SCC的NAH是部分HCC病变的直接前体。

在不伴有肝硬化的动物模型肝脏中,当FAH较大并对周围的肝实质有明显压迫时,即诊断为肝细胞腺瘤^[55]。然而,目前还没有能够在人肝硬化组织中区别微小肝细胞腺瘤和普通再生结节的可靠指标。可能是基于这种技术上的原因,目前肝脏外科病理学的主流观点对于HBV感染引起的肝硬变组织中是否存在肝细胞腺瘤这一问题基本持否定态度^[22]。Aoki *et al*^[56]和Yasui *et al*^[57]通过分析HBV整合位点分析显示,在HBV相关的肝硬化组织中,约31%的所谓“肝硬化结节”(cirrhotic liver nodule)是单克隆性病变。Aihara *et al*^[44]和Ochiai *et al*^[58]应用PGK, AR位点克隆性检测技术对HCV相关肝硬化进行的观察得出了相似的结果,所谓“再生结节”中克隆性增生发生率分别为43%和59%。他们还指出,在形态学上不能区分单克隆与多克隆结节。此研究中,我们借助以前的组织学标准^[10, 59],能够很方便地在HBV相关的肝硬化组织中检出不同类型的FAH和NAH病变,并显示伴有和不伴SCC的混合细胞性NAH以及普通再生结节生物学性质不同,克隆性增生发生率分别为100%, 35%和0(图7)。这些数据显示,HBV和HCV相关的肝硬化组织中存在许多NAH病变,部分已经进展为微小肝细胞腺瘤。以前作者检测到的具有克隆性细胞组成的所谓“肝硬化结节”^[56-57]以及“再生结节”^[44, 58]可能相当于混合细胞性NAH。我们认为,NAH,尤其是伴有SCC的病变,可以作为一种癌前病变而用于HCC发生的监测以及肝癌的二期预防。通过分析X染色体失活带型观察了肝硬化组织中不同的肿瘤性肝细胞结节之间的关系。我们还发现,位于在同一张切片上相邻位置的不同肿瘤性结节可以具有相似的X染色体失活类型,提示他们具有相同的克隆起源。这与我们最近在同源性多结节性子宫平滑肌瘤观察到的情况^[60-61]相似。至于这种腺瘤性结节呈簇状存在是由于一个肿瘤沿联结不同再生结节之间的肝实质^[62]局部侵袭所致,抑或是由于一个病变被纤维组织分隔成两个或多个结节造成,有待于今后的观察。

致谢:付勇大夫协助收集标本,深表谢意!

4 参考文献

- 1 Parkin DM. The global burden of cancer. *Semin Cancer Biol* 1998;8:219-235
- 2 苏勤. 人肝细胞癌的癌前期病变. *诊断病理学杂志* 2003;10:112-115
- 3 Anthony PP, Vogel CL, Barker LF. Liver cell dysplasia: a premalignant condition. *J Clin Pathol* 1973;26:217-223
- 4 Watanabe S, Okita K, Harada T, Kodama T, Numa Y,

- Takemoto T, Takahashi T. Morphologic studies of the liver cell dysplasia. *Cancer* 1983;51:2197-2205
- 5 Nakashima T, Okuda K, Kojiro M, Jimi A, Yamaguchi R, Sakamoto K, Ikari T. Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan, 232 consecutive cases autopsied in ten years. *Cancer* 1983;51:863-877
- 6 Deugnier Y, Turlin B. Other causes of hepatocellular carcinomas. In:Okuda K, Tabor E (eds). *Liver Cancer. New York:Churchill Livingstone* 1997:97-110
- 7 Thung SN, Gerber MA. Cirrhosis and Hepatocellular carcinoma. In:Okuda K, Tabor E (eds). *Liver Cancer. New York:Churchill Livingstone* 1997:155-163
- 8 Theise ND. Cirrhosis and hepatocellular neoplasia:more like cousins than like parent and child. *Gastroenterology* 1996;111:526-528
- 9 苏勤. 病毒性肝炎致癌机制. 刘泽富, 聂青和. 病毒性肝炎的诊断和治疗. 北京: 人民军医出版社, 2001:221-262
- 10 Su Q, Benner A, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Human hepatic preneoplasia:phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Arch* 1997;431:391-406
- 11 Su Q, Bannasch P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2003;31:126-133
- 12 苏勤, 刘茜, 王淑芳. 基于 X 染色体基因多态性的克隆性分析技术及其应用. *中华病理学杂志* 2002;31:162-164
- 13 Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Terada M, Hasegawa H. Clonal origin of atypical adenomatous hyperplasia of the liver and clonal identity with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1988;95:1664-1666
- 14 Hsu HC, Chiou TJ, Chen JY, Lee CS, Lee PH, Peng SY. Clonality and clonal evolution of hepatocellular carcinoma with multiple nodules. *Hepatology* 1991;13:923-928
- 15 Kawai S, Imazeki F, Yokosuka O, Ohto M, Shiina S, Kato N, Omata M. Clonality in hepatocellular carcinoma:analysis of methylation pattern of polymorphic X-chromosome-linked phosphoglycerate kinase gene in females. *Hepatology* 1995;22:112-117
- 16 Ochiai T, Ueda K, Urata Y, Yamano T, Konishi E, Ogino A, Kawai K, Itoi H, Sonoyama T, Yamagishi H, Oka T, Ashihara T. Clonal analysis of hepatocellular carcinoma. *Gan To Kagaku Ryoho* 1996;23(Suppl 2):182-188
- 17 Sheu JC, Huang GT, Chou HC, Lee PH, Wang JT, Lee HS, Chen DS. Multiple hepatocellular carcinomas at the early stage have different clonality. *Gastroenterology* 1993;105:1471-1476
- 18 Okuda T, Wakasa K, Kubo S, Hamada T, Fujita M, Enomoto T, Haba T, Hirohashi K, Kinoshita H. Clonal analysis of hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule by methylation pattern of X-chromosome-linked human androgen receptor gene. *Cancer Lett* 2001;164:91-96
- 19 Paradis V, Benzekri A, Dargere D, Bieche I, Laurendeau I, Vilgrain V, Belghiti J, Vidaud M, Degott C, Bedossa P. Telangiectatic focal nodular hyperplasia:a variant of hepatocellular adenoma. *Gastroenterology* 2004;126:1323-1329
- 20 Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver:a study of 100 cases among 48900 necropsies. *Cancer* 1954;7:462-503
- 21 Crawford JM. Liver cirrhosis. In:MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP(eds). *Pathology of the liver. London: Churchill Livingstone* 2002:575-619
- 22 Anthony PP. Tumors and tumor-like lesions of the liver and biliary tract:etiology, epidemiology and pathology. In:MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP(eds). *Pathology of the liver. London:Churchill Livingstone* 2002:711-775
- 23 苏勤, 张遂祥, 杨淑杰, 刘杰, 刘彦仿. 乙型肝炎、肝硬化中癌前病变的形态学及免疫组织化学观察. *第四军医大学学报* 1995;16:85-88
- 24 朱少君, 苏勤, 王淑芳, 刁小莉, 巩丽, 刘节. 女性外阴尖锐湿疣的克隆性. *诊断病理学杂志* 2003;10:81-84
- 25 Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental pattern in mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1972;47:1-35
- 26 Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of *Hpa* II and *Hha* I sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992;51:1229-1239
- 27 Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders:analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6848-6852
- 28 刁小莉, 苏勤, 王淑芳, 冯英明, 刘节. 非放标 AR 基因多态性分析探讨子宫平滑肌瘤的克隆性. *第四军医大学学报* 2002;23:1969-1973
- 29 Wang SF, Liu Q, Zhang W, Liu J, Su Q. Clonality of uterine leiomyomas, an assay using X chromosome polymorphism at the phosphoglycerate kinase locus. *J Fourth Mil Med Univ* 2001;22:1576-1582
- 30 Anthony PP. Precursor lesions for liver cancer in humans. *Cancer Res* 1976;36(7 Pt 2):2579-2583
- 31 Paterson AC, Kew MC, Duskeiko GM, Isaacson C. Liver cell dysplasia accompanying hepatocellular carcinoma in Southern Africa. Differences between urban and rural populations. *J Hepatol* 1989;8:241-248
- 32 李志尚, 王学春, 罗殿中. 异型增生肝细胞及肝癌细胞核 DNA 含量分析. *中华病理学杂志* 1990;19:215-217
- 33 Borzio M, Bruno S, Roncalli M, Mels GC, Ramella G, Borzio F, Leandro G, Servida E, Podda M. Liver cell dysplasia is a major risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis:a prospective study. *Gastroenterology* 1995;108:812-817
- 34 Ganne-Carrie N, Chastang C, Chapel F, Munz C, Pateron D, Sibony M, Deny P, Trinchet JC, Callard P, Guettier C, Beaugrand M. Predictive score for the development of hepatocellular carcinoma and additional value of liver large cell dysplasia in Western patients with cirrhosis. *Hepatology* 1996;23:1112-1118
- 35 Le Bail B, Bernard PH, Carles J, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Prevalence of liver cell dysplasia and association with HCC in a series of 100 cirrhotic liver explants. *J Hepatol* 1997;27:835-842
- 36 Libbrecht L, Craninx M, Nevens F, Desmet V, Roskams T. Predictive value of liver cell dysplasia for development of hepatocellular carcinoma in patients with non-cirrhotic and cirrhotic chronic viral hepatitis. *Histopathol* 2001;39:66-73
- 37 Henmi A, Uchida T, Shikata T. Karyometric analysis of liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma. Evidence against precancerous nature of liver cell dysplasia. *Cancer* 1985;55:2594-2599
- 38 Cohen C, Berson SD. Liver cell dysplasia in normal, cirrhotic, and hepatocellular carcinoma patients. *Cancer* 1986;57:1535-1538
- 39 Karhunen PJ, Penttil A. Preneoplastic lesions of human liver. *Hepatogastroenterology* 1987;34:10-15
- 40 Hytiroglou P, Theise ND, Schwartz M, Mor E, Miller C, Thung SN. Macroregenerative nodules in a series of adult cirrhotic liver explants: issues of classification and nomenclature. *Hepatology* 1995;21:703-708
- 41 Natarajan S, Theise ND, Thung SW, Antonio L, Paronetto F, Hytiroglou P. Large-cell change of hepatocytes in cirrhosis may represent a reaction to prolonged cholestasis. *Am J Surg Pathol* 1997;21:312-318
- 42 Altmann HW. Pathology of human liver tumors. In:Remmer H, Bolt HM, Bannasch P, Popper H. *Primary Liver Tumors. Lancaster: MTP Press* 1978:53-71
- 43 Ferrel LD, Crawford JM, Dhillon AP, Scheuer PJ, Nakanuma Y. Proposal for standardized criteria for the diagnosis of benign, borderline, and malignant hepatocellular lesions arising in chronic advanced liver disease. *Am J Surg Pathol* 1993;17:1113-1123
- 44 Aihara T, Noguchi S, Sasaki Y, Nakano H, Imaoka S. Clonal analysis of regenerative nodules in hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1994;107:1805-1811

- 45 International Working Party. Terminology of nodular hepato-cellular lesions. *Hepatology* 1995;22:983-993
- 46 Le Bail B, Belleannée G, Bernard PH, Saric J, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Adenomatous hyperplasia in cirrhotic livers: histological evaluation, cellular density, and proliferative activity of 35 macronodular lesions in the cirrhotic explants of 10 adult French patients. *Hum Pathol* 1995;26:897-906
- 47 Aihara T, Noguchi S, Sasaki Y, Nakano H, Monden M, Imaoka S. Clonal analysis of precancerous lesion of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1996;111:455-461
- 48 Piao Z, Park Y N, Kim H, Park C. Clonality of large regenerative nodules in liver cirrhosis. *Liver* 1997;17:251-256
- 49 Paradis V, Laurendeau I, Vidaud M, Bedossa P. Clonal analysis of macronodules in cirrhosis. *Hepatology* 1998;28:953-958
- 50 Bannasch P, Müller HA. Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von N-Nitrosomorpholin auf die Leber von Ratte und Maus. *Arzneimittel Forsch* 1964;14:805-814
- 51 Gössner W, Friedrich-Freksa K. Histochemische Untersuchungen über die glucose-6-phosphatase in der rattenleber während der kanzerisierung durch nitrosamine. *Z Naturforsch* 1964;19b:862-863
- 52 Bannasch P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. II. Preneoplasia in various non-hepatic tissues. *Carcinogenesis* 1986;7:849-852
- 53 Bannasch P, Schröder CH. Tumors and tumor-like lesions of the liver and biliary tract: pathogenesis of primary liver tumors. In: MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP(eds). *Pathology of the liver*. London: Churchill Livingstone 2002:777-825
- 54 Weinberg WC, Ng YK, Iannaccone PM. Clonal analysis of hepatic neoplasms by mosaic pattern. In: Sirica AE(eds). *The role of cell types in hepatocarcinogenesis*. Boca Raton Ann Arbor London Tokyo: CRC Press 1992:29-53
- 55 Goodman DG, Maronpot RR, Newberne PM, Popp JA, Squire RA. Proliferative and selected other lesions of the liver in rats. In: *Guides for toxicologic pathology*. Washington, DC:STP/ARP/AFIP 1994:1-24
- 56 Aoki N, Robinson WS. State of hepatitis B viral genomes in cirrhotic and hepatocellular carcinoma nodules. *Mol Biol Med* 1989;6:395-408
- 57 Yasui H, Hino O, Ohtake K, Machinami R, Kitagawa T. Clonal growth of hepatitis B virus-integrated hepatocytes in cirrhotic liver nodules. *Cancer Res* 1992;52:6810-6814
- 58 Ochiai T, Urata Y, Yamano T, Yamagishi H, Ashihara T. Clonal expansion in evolution of chronic hepatitis to hepatocellular carcinoma as seen at an X-chromosome locus. *Hepatology* 2000;31:615-621
- 59 Su Q, Zerban H, Otto G, Bannasch P. Cytokeratin expression is reduced in glycogenotic clear hepatocytes but increased in ground glass cells in chronic human and woodchuck hepadnaviral infection. *Hepatology* 1998;28:347-359
- 60 王淑芳, 苏勤, 朱少君, 刘节, 胡灵芝, 李东红. 多发性子宫平滑肌瘤的克隆性. *中华病理学杂志* 2002;31:107-111
- 61 刁小莉, 苏勤, 王淑芳, 张伟, 巩丽, 刘节, 冯英明. 子宫平滑肌瘤不同结节X染色体失活类型的研究. *中华病理学杂志* 2003;32:308-313
- 62 Takayashi T. Three-dimensional morphology of the liver in cirrhosis and related disorders. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1978;377:97-110

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 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物, 可作为理工科研究生的教学用书或自学教材, 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍, 介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求. 从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则 - 准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity), 分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写, 举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 结合实例举证, 从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达, 较为详尽地总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。

本书论述缜密、案例丰富. 为方便读者进一步追溯和研读相关资料, 书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次).
编著: 任胜利, 理学博士, 《自然科学进展》责任编辑, 1998 年以来先后在 Science, Nature, Scientometrics, Learned Publishing, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 余篇. 出版: 科学出版社.
定价: 28 元 + 2 元(邮费). 邮购地址: 100085, 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室, 北京市海淀区双清路 83 号. 联系人: 刘俐, 程宇. 联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921. 开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开户名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社, 帐号: 0200010009200062483. (国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)

二甲基亚硝胺所致大鼠肝硬化形成与逆转过程中 Thy1.1 与 OV6 阳性染色细胞比较

朱英, 刘平, 龙爱华, 吴云林, 肖家诚

朱英, 刘平, 龙爱华, 上海中医药大学肝病研究所 上海市 201203
吴云林, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科 上海市 200025
肖家诚, 上海第二医科大学附属瑞金医院病理科 上海市 200025
朱英, 女, 1965-05-02 生, 江苏无锡人, 汉族. 1989 年锦州医学院本科毕业, 2001 年大连医科大学硕士研究生毕业, 副主任医师. 现于上海中医药大学肝病研究所攻读博士学位, 主要研究肝脏纤维化的中西医结合治疗.
国家杰出青年科学基金资助项目, NO. 39825128
通讯作者: 刘平, 201203, 上海市张江蔡伦路 1200 号, 上海中医药大学肝病研究所. liuliver@online.sh.cn
电话: 021-51322059
收稿日期: 2004-12-17 接受日期: 2005-02-16

Comparison of Thy1.1 with OV6 in hepatic oval cell marking during formation and reversion of rat cirrhosis induced by dimethylnitrosamine

Ying Zhu, Ping Liu, Ai-Huan Long, Yun-Lin Wu, Jia-Cheng Xiao

Ying Zhu, Ping Liu, Ai-Huan Long, Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
Yun-Lin Wu, Department of Digestion, Ruijin Hospital, the Second Medical University of Shanghai, Shanghai 200025, China
Jia-Cheng Xiao, Department of Pathology, Ruijin Hospital, the Second Medical University of Shanghai, Shanghai 200025, China
Supported by National Excellent Youth Science Foundation of China, No. 39825128
Correspondence to: Dr. Ping Liu, Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Cailun Road, Zhangjiang, Shanghai 201203, China. liuliver@online.sh.cn
Received: 2004-12-17 Accepted: 2005-02-16

Abstract

AIM: To screen the best marker for hepatic oval cells (HOC) by comparing the dynamic changes of Thy1.1 and OV6 expression in the hepatic tissue during the formation and reversion of dimethylnitrosamine (DMN)-induced cirrhosis in rats.

METHODS: Rat cirrhosis model was induced by DMN treatment (12 times in 4 weeks). The degree of liver fibrosis was determined by collagen staining. The expression of OV6 and Thy1.1 in various hepatic cells were examined by immunohistochemistry. Thy1.1 positive cells were enumerated under light microscope, and the cell protein was quantified by Western blot.

RESULTS: The most typical cirrhosis in the model was observed at the 4th week after DMN injection, which was combined with large area of hemorrhage and putrescence.

These changes started to alleviate at the 6th week with a few incomplete fiber septa. The inflammation was lessened distinctly at the 8th week, mainly manifested as incomplete fiber septa. OV6 positive cells were presented in both HOC and normal cholangial epithelia. There were no Thy1.1 positively stained cells in the normal tissues. Very few Thy1.1 positive cells started to appear on the 3rd day, dispersed at the 2nd week, increased significantly at the 4th week around the fiber septa, reached the peak at the 6th week (i.e. 2 week after stopping DMN injection) which was distributed mainly in the periportal district, and decreased at the 8th week. The results of Western blot and the number of HOC were consistent with each other.

CONCLUSION: During the formation and reversion of the rat cirrhosis, Thy1.1 is superior to OV6 in marking HOC with better specificity and sensitivity.

Key Words: Thy1.1; OV6; Hepatic oval cell; Rats, Liver cirrhosis; Dimethylnitrosamine

Zhu Y, Liu P, Long AH, Wu YL, Xiao JC. Comparison of Thy1.1 with OV6 in hepatic oval cell marking during formation and reversion of rat cirrhosis induced by dimethylnitrosamine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):953-957

摘要

目的: 在二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)致大鼠肝硬化形成与消减过程中, 比较 Thy1.1 与 OV6 标记肝脏卵圆细胞(hepatic oval cells, HOC)的不同变化, 从而选择最佳的 HOC 标记物。

方法: 应用 DMN 腹腔注射(4 wk 12 次)制备大鼠肝硬化模型, 进行胶原组织染色动态观察肝纤维化程度, 免疫组化检测 Thy1.1 和 OV6 的不同阳性染色细胞表达, 光镜下进行 Thy1.1 标记的 HOC 计数, western blot 进行该标记细胞的蛋白定量测定。

结果: DMN 造模 4 wk 大鼠已形成典型的肝硬化;终止造模后 2 wk、即 6 wk 时肝组织病变较 4 wk 时有所减轻出现不完全纤维间隔。8 wk 时炎症明显减轻并以不完全纤维间隔为主。OV6 在各时间点除了卵圆细胞表达外, 也于正常胆管上皮细胞表达。正常大鼠肝组织未见 Thy1.1 阳性染色的细胞, 3 d 时可见卵圆细胞微量。

表达, 2 wk 时呈散在分布, 4 wk 时明显增多, 见于纤维间隔周围, 终止造模后 2 wk、即第 6 wk 时阳性染色显著强于 4 wk, 大量出现于汇管区, 8 wk 时较 6 wk 有所减少, 表达量基本与 4 wk 时相等. Thy1.1 标记的 HOC Western blot 结果与细胞计数一致.

结论: 在 DMN 大鼠肝硬化形成与消减过程中, Thy1.1 标记肝脏卵圆细胞优于 OV6, 具有特异性和敏感性.

关键词: Thy1.1; OV6; 肝脏卵圆细胞; 大鼠; 肝硬化; 二甲基亚硝胺

朱英, 刘平, 龙爱华, 吴云林, 肖家诚. 二甲基亚硝胺所致大鼠肝硬化形成与逆转过程中 Thy1.1 与 OV6 阳性染色细胞比较. 世界华人消化杂志 2005;13(8):953-957

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/953.asp>

0 引言

在肝硬化形成过程中, 干细胞在肝脏损伤的修复过程中具有重要的作用^[1]. 位于胆小管内的肝脏卵圆细胞(HOC)从汇管区向外迁移, 伸入肝小叶并分化形成肝细胞或胆管上皮细胞^[2]. 因此对肝脏干细胞的标记在肝纤维化干细胞机制研究中具有重要的作用. OV6 是该干细胞的特异标记物, 但 Thy1.1 是骨髓造血干细胞标志物, 肝脏卵圆细胞在表达自身特有标志物外, 还表达骨髓造血干细胞标志物. 我们采用 DMN 制备的大鼠肝硬化模型, 动态观察该模型形成与消减过程中 Thy1.1 与 OV6 阳性表达 HOC 的不同变化, 从而选择 HOC 的特异性标记物.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级 Wister 大鼠由中科院上海实验动物中心提供. 小鼠抗人 OV6mAb 由瑞金医院感染科谢青教授惠赠. 小鼠抗大鼠 Thy1.1mAb 购自 Serotec 公司, 羊抗小鼠 IgGmAb 及 DAB 底物显色系统试剂盒购自长岛试剂公司. 二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)为东京化成工业株式会社产品. Wister 大鼠 45 只, 雄性, 体重为 180 ± 20 g. 随机取 15 只作为正常对照组, 30 只用于模型的制备. 参照 Jenkins *et al*^[3]的方法制备 DMN 肝硬化模型. 按 DMN 10 mg/kg(用生理盐水稀释)处理动物 ip, 每周连续 3 d, 每日 1 次, 共 4 wk; 正常对照大鼠 ip 同等量生理盐水; 分别于 DMN ip 造模后 3 d, 2, 4, 6 及 8 wk 随机取模型大鼠 6 只, 正常大鼠 3 只进行动态观察. 大鼠予戊巴比妥钠 40 mg/kg ip 麻醉后, 仰卧位固定, 打开腹腔, 取 0.3-0.4 cm 厚肝组织, OTC 液包埋, 液氮迅速冷冻, 用恒冷切片机在 -20°C 下进行 6 μm 厚连续冰冻切片, 用于免疫组化染色. 取 1.0 cm \times 0.8 cm \times 0.3 cm 大小肝组织, 40 g/L 中性甲醛液固定, 24 h 后逐级酒精脱水, 二甲苯透

明, 56°C 石蜡包埋, 4 μm 厚切片, 用于胶原染色. 取 0.5 g 大小肝组织, 投入液氮中用于抽提总蛋白.

1.2 方法

1.2.1 天狼星红染色 石蜡切片常规脱蜡至水; 加天狼星红后置湿盒 30 min, 纯酒精分化 2 s, 脱水、透明, 中性树胶封片. 胶原纤维增生程度图像分析: 应用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统(HPIAS-1000 型, 同济医大干屏影像工程公司), 在 20×10 放大倍数下, 每个时间点各取 3 只大鼠的肝组织切片, 每张切片随机选 5 个不同视野, 对阳性染色区域进行图像半定量分析, 以 5 个不同视野面积百分比的平均值为每张切片半定量数值.

1.2.2 免疫组织化学 免疫组织化学样本制备采用两步法: 取冰冻肝组织切片, 丙酮固定 10 min, 3 mL/L H_2O_2 室温 30 min, 37°C 温育的小牛血清封闭 30 min, 加抗大鼠 OV6 及 Thy1.1 抗体(1:50 稀释)孵育, 盖好湿盒, 置 37°C 1 h; 加 Two-StepTM Anti-mouse Detection Reagent(HRP), 盖上湿盒, 37°C 30 min. 加 DAB 显色 3-5 min. 苏木精液衬染细胞核 10 s. 中性树胶封片. PBS 替代 I 抗作为空白对照染色. 光镜下(10×10)观察 Thy1.1 免疫组化染色细胞的分布, 并且每个时间点各取 6 只大鼠的肝组织切片, 每张切片随机选择 5 个不同视野, 在 20×10 放大倍数下, 应用计数器对阳性染色细胞进行计数, 以 5 个不同视野计数的平均值为每张切片阳性细胞的计数值.

1.2.3 Western blot 检测 总蛋白提取: 取 100 mg 湿肝用预冷生理盐水中洗净, 置预先加入 0.9 mL 匀浆液试管中(4°C 预冷), 于冰浴中以 5 000 r/min 匀浆 20 s, 将肝组织匀浆液立即移至预先加入 0.1 mL SPMF($10 \times$)的 1.5 mL 离心管中, 低温高速离心机 12 000 g, 离心 10 min, 取其上清液按 Bio-Rad 试剂测定总蛋白量. 蛋白质电泳: 制 SDS 聚丙烯酰胺凝胶, 150 g/L 分离胶、50 g/L 积层胶, 将蛋白样品及标准蛋白与 4 倍样品缓冲液混合后沸水煮 5 min 变性, 每孔上样定量 50 μg 蛋白质. 电泳条件: 电压 80V, 时间 150 min. 蛋白质的电转移与膜的封闭: 电泳后将凝胶取出, 上覆与凝胶同样大小硝酸纤维素膜, 两侧铺垫滤纸及纤维垫, 置于转膜槽中, 凝胶朝向负极. 转膜条件: 电压 100V, 时间 60 min, 温度 4°C . 转移结束后, 取出硝酸纤维素膜, 丽春红染色, 用铅笔标出标准蛋白位置, 水洗脱色后, 以 5% 脱脂奶粉封闭, 室温振荡 1-2 h. 抗原抗体反应: 封闭结束后, 将膜放入塑料皿中, 加入溶有 I 抗 Thy1.1 的封闭液(1:200 稀释), 4°C 过夜. 取出膜, TTBS 洗 4 次, 约 30 min, 除去过量的 I 抗, 然后放入含 II 抗(1:5000)的 50 g/L 脱脂奶粉中, 室温振荡 30-60 min, TTBS 洗 5 次, 约 40 min, 洗去未

结合的 II 抗. ECL 显影和曝光: 取等量 ECL (1、2) ECL 试剂, 混匀, 将膜浸入, 静置 5 min, 取出后以保鲜膜包好放置约 10 min, 移入暗室曝光 3-5 min, 将 X 光胶片显影 2 min, 定影 5 min, 水洗、干燥.

统计学处理 上述胶原纤维半定量及细胞计数数据应用计算机统计软件 SPSS10.0 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析, 并用 LSD 程序进行两两比较, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异.

2 结果

2.1 肝组织胶原纤维增生 肝组织切片天狼星红染色镜

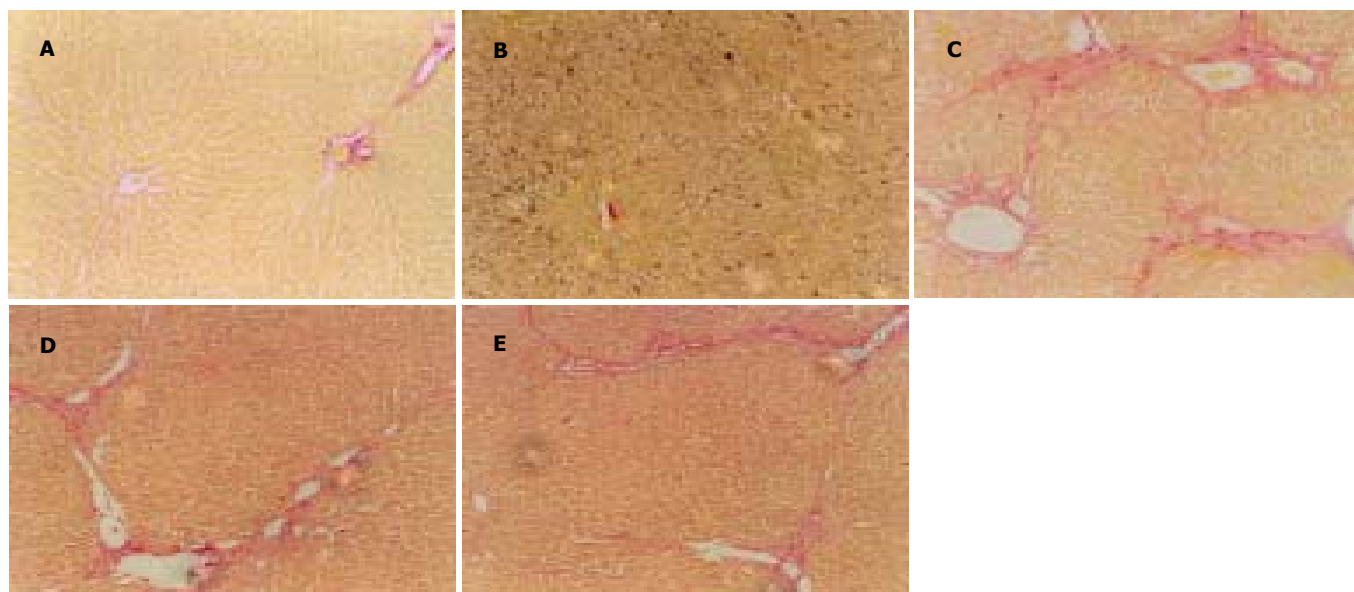


图1 DMN 肝硬化大鼠肝组织胶原纤维增生的动态变化($\times 100$). A: 正常大鼠, 肝组织汇管区见少量胶原纤维; B: DMN 造模 3 d, 可见出现出血坏死灶, 仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维; C: DMN 模型 4 wk, 胶原纤维大量沉积, 成完全间隔包绕肝组织形较多的假小叶; D: 模型 6 wk、即终止 DMN 造模后 2 wk, 肝纤维化略有减轻, 但仍有较多的完全纤维间隔; E: 模型 8 wk, 肝纤维化明显减轻, 呈不完全纤维间隔.

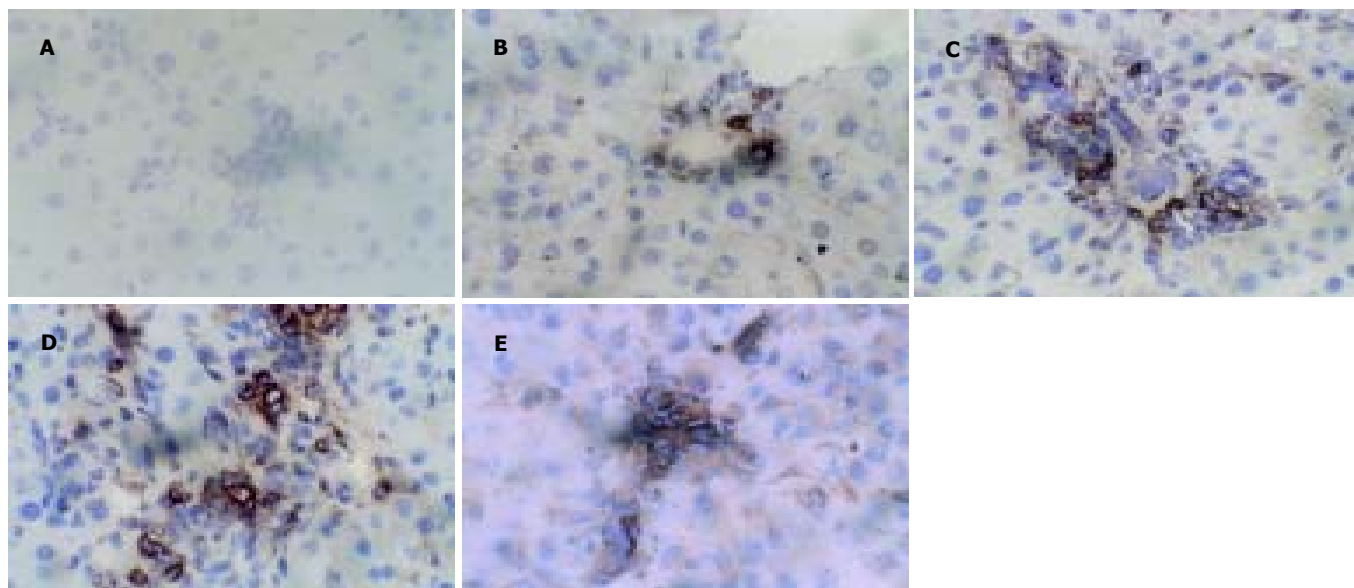


图2 DMN 肝硬化大鼠肝 Thy1.1 免疫组织化学阳性染色的动态变化($\times 400$). A: 正常大鼠, 未见阳性染色; B: DMN 造模 3 d, 微量阳性细胞染色; C: DMN 造模 4 wk, 阳性细胞染色显著增多, 主要出现于纤维间隔周围, 所形成的胆管上皮细胞也有染色; D: 6 wk、即终止 DMN 造模后 2 wk, 汇管区出现大量阳性染色细胞, 形成团簇样并形成胆小管; E: 模型 8 wk, 阳性染色细胞较 6 wk 时减少, 散在分布.

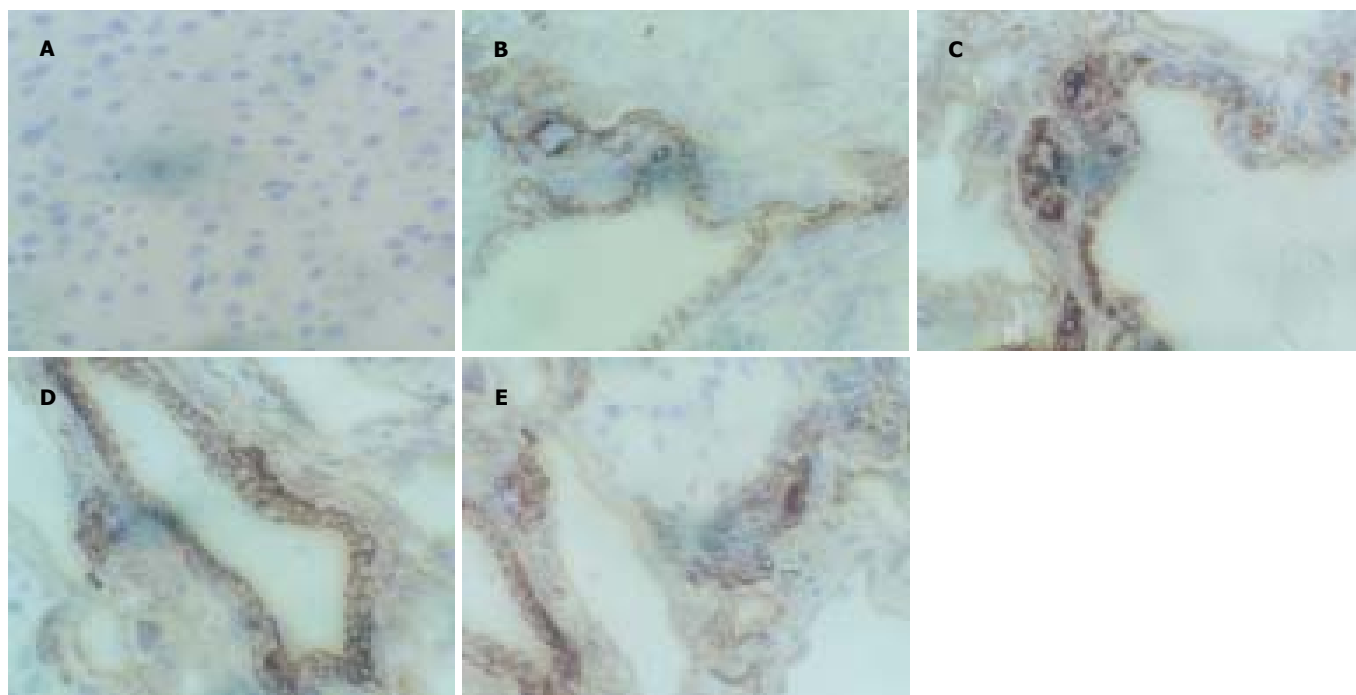


图3 DMN肝硬化大鼠肝OV6免疫组织化学阳性染色的动态变化($\times 400$). A: 阴性对照大鼠, 未见阳性染色; B: DMN造模3 d, 可见正常胆管上皮细胞及少许阳性细胞染色; C: DMN造模4 wk, 除了正常胆管上皮细胞染色之外, 阳性细胞染色显著增多, 主要出现于纤维间隔周围; D: 终止DMN造模后2 wk, 出现大量散在的阳性染色细胞; E: 终止DMN造模后4 wk, 阳性染色细胞减少.

时阳性染色细胞增多, 主要出现于纤维间隔周围, 新生成的胆管上皮细胞也有染色; 终止造模后2 wk, 即6 wk时于汇管区可见大量阳性染色细胞, 呈簇团样, 并且染色的新生成胆管上皮细胞数量明显增多, 8 wk阳性染色细胞较6 wk明显减少, 呈散在分布(图2A-E). 光镜下(10×10)观察免疫组化染色阳性的分布, 并且每个时间点各取6只大鼠的肝组织切片, 每张切片随机选择5个不同视野, 在 20×10 放大倍数下, 应用计数器对阳性染色细胞进行计数, 以5个不同视野计数的平均值为每张切片阳性细胞的计数值阳性染色细胞计数(图6).

2.3 OV6免疫组织化学 正常大鼠可见正常胆管上皮细胞染色, 其他时间点除了胆管上皮细胞染色外, 其余染色同Thy1.1(图3A-E).

2.4 Thy1.1 Western blot分析 与免疫组化计数基本一致, 正常组无表达, 造模3 d开始出现微量表达, 造模2 wk表达量有所增加, 造模4 wk明显增加, 于6 wk达高峰, 8 wk开始下降相当于4 wk水平(图4).

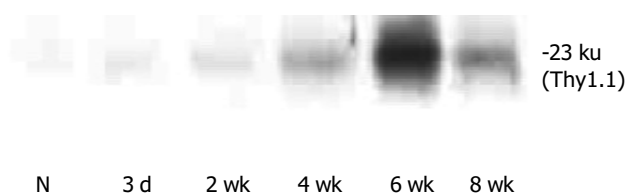


图4 Western blot: 正常组无表达, 3 d微弱表达, 2 wk有所增加, 4 wk明显增加, 6 wk达高峰, 8 wk开始下降至4 wk水平.

3 讨论

DMN制备的肝硬化大鼠模型, 肝脏组织学动态观察结果显示, 在造模4 wk时已形成典型的肝硬化, 在终止DMN造模后其肝组织病理改变有所缓解, 终止造模后2 wk, 肝组织纤维间隔变细, 部分呈现为不完全纤维间隔, 8 wk肝组织纤维化程度已见明显减轻, 以不完全纤维间隔为多见; 这一动态的变化过程为我们提供了分析探讨肝硬化消减的病理生理反应的良好模型. OV-6可识别正常大鼠肝脏的胆管细胞和结节中肝细胞, 但主要识别致癌物处理肝脏中的卵圆细胞, 在人类肝脏由OV-6识别的抗原决定簇的细胞分布比大鼠复杂得多. 在观察人类肝脏生长、分化和损伤中, 他能够鉴别所公认的祖代细胞和所产生的亚群(OC. 2、OC. 3). 并且在即往的很多动物实验研究中也应用该指标作为HOC的鉴别标准.

Thy-1是用来鉴别造血干细胞的种系特异性标志物. Thy-1在CD34阳性细胞中表达最高, 并且当造血干细胞开始表达其分化细胞类型(如CD45RA, CD38, 和CD71)时, 他的表达开始下降^[3]. Thy-1在大鼠造血干细胞的表达强于小鼠和人, 除了造血系统外, 还在大脑、乳房等的上皮细胞表达Thy-1抗体能够刺激细胞内的 Ca^{2+} 释放和胞质蛋白质磷酸化, 参与细胞的识别、黏附和T细胞的激活. Thy-1不在成年肝脏正常表达, 但在胎肝中表达, 而且在被损害肝脏的表达仅限于肝脏中被激活的卵圆细胞. 大鼠实验表明卵圆细胞表达高水平的Thy-1, 同时也表达AFP、GGT、CK-19、

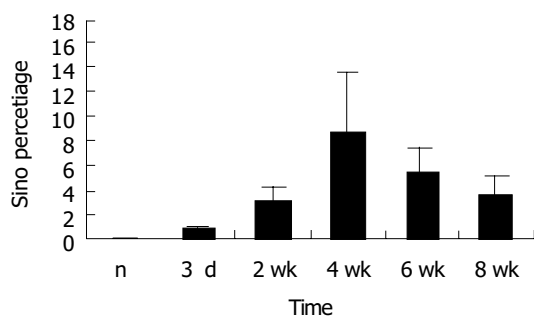


图5 胶原纤维半定量分析: 正常组无胶原存在, 3 d开始胶原量逐渐增加, 于4 wk达高峰, 之后于6 wk和8 wk逐渐下降。

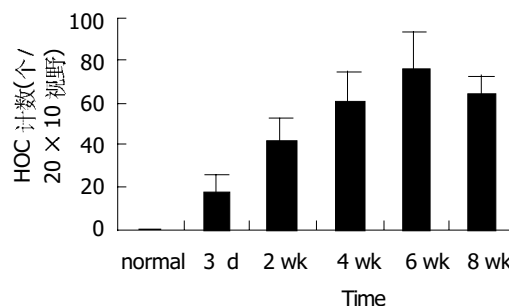


图6 HOC记数: 正常组无该细胞, 3 d时出现少量该细胞, 于2 wk和4 wk逐渐增加, 于6 wk达高峰, 8 wk下降相当于4 wk和6 wk水平。

OC. 2 和 OV-6 等所有已知鉴别卵圆细胞的标志物^[4-5]。

我们应用 OV6 和 Thy1.1 作为 HOC 的标志物进行酶免疫组化的观测结果显示, OV6 在各时间点除了在 HOC 表达外, 在正常胆管上皮细胞也表达。而 Thy1.1 阳性细胞表达量在 DMN 大鼠肝硬化形成与消减的动态演变过程中呈现出随着肝硬化形成而逐渐增加, 肝硬化消减早期表达量剧增的特征性变化。在正常对照大鼠的肝组织内未见到阳性表达, DMN 腹腔注射 3 d 后, 大鼠肝组织内即可见到阳性表达, 其后随着造模时间的延长, 阳性表达逐渐增强, 终止造模因子 DMN 刺激后 2 wk, 其表达量达到高峰, 在终止造模后 4 wk, 又恢复到造模 4 wk 时的水平。这一变化特征不仅在肝组织内阳性染色与阳性细胞计数呈现一致性, 且在 Western blot 分析结果中得到进一步证实。Thy1.1 阳性细胞在肝组织内表达部位, 造模 3 d 时主要位于汇管区, 造模 2 wk 时出现散在的阳性染色细胞, 为胞质染色; 造模 4 wk 时阳性染色细胞增多, 已出现于纤维间隔周围; 6 wk 时于汇管区出现大量阳性染色细胞, 并形成团簇样并形成新的胆小管, 纤维间隔周围染色显著增强; 于 8 wk 时阳性染色细胞开始减少, 呈散

在分布。实验表明应用 Thy-1 抗体作为一种鉴别卵圆细胞新的标志物, 能够获得大量的卵圆细胞, 为 HOC 特异性的标志物时也有研究表明, 应用流式细胞计数法可以分离到 95-97% 的纯 Thy-1 卵圆细胞种群。因此, Thy-1 在将来的体内和体外肝卵圆细胞研究中, 在细胞分类方面将成为有力的工具。

4 参考文献

- 1 Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *PNAS* 2003;100(Suppl 1):11881-11888
- 2 Xiao JC, Jin XL, Ruck P, Adam A, Kaiserling E. Hepatic progenitor cells in human liver cirrhosis: Immunohistochemical, electron microscopic and immunofluorescence confocal microscopic findings. *World J Gastroenterol* 2004;10:1208-1211
- 3 Minguet S, Cortegano I, Gonzalo P, Martínez-Marín JA, de Andrés B, Salas C, Melero D, Gaspar ML, Marcos MAR. A population of c-Kit^{low}(CD45/TER119)-hepatic cell progenitors of 11-day postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J Clin Invest* 2003;112:1152-1163
- 4 Yang LJ, Li SW, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *PNAS* 2002;99:8078-8083
- 5 杨明智, 闵军, 陈积圣, 陈汝福, 彭志海. 体外诱导大鼠骨髓干细胞向肝细胞横向分化. *中华医学杂志* 2003;83:603-604

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

TatPTD 介导 HBV 靶向核糖核酸酶进入肝细胞的研究

丁 劲, 刘 军, 薛采芳, 李英辉, 赵 亚, 陈 俊, 黄豫晓, 刘忠湘

丁劲, 刘军, 薛采芳, 李英辉, 赵亚, 陈俊, 黄豫晓, 刘忠湘, 中国人民解放军第四军医大学病原生物学教研室 陕西省西安市 710032
丁劲, 男, 1976-11-3 生, 内蒙古呼和浩特人, 汉族, 博士生, 主要从事乙型肝炎的治疗研究。

国家自然科学基金资助课题, No. 30100157
全军医药卫生科研基金资助课题, No. 01MA184
第四军医大学创新工程资助课题, No. CX99005

通讯作者: 刘军, 710032, 陕西省西安市长乐西路 169 号, 中国人民解放军第四军医大学病原生物学教研室. etiology@fmmu.edu.cn
电话: 029-83374536 传真: 029-83374594
收稿日期: 2004-09-22 接受日期: 2004-10-20

TatPTD can introduce HBV targeted ribonuclease into hepatocytes

Jin Ding, Jun Liu, Cai-Fang Xue, Ying-Hui Li, Ya Zhao, Jun Chen, Yu-Xiao Huang, Zhong-Xiang Liu

Jin Ding, Jun Liu, Cai-Fang Xue, Ying-Hui Li, Ya Zhao, Jun Chen, Yu-Xiao Huang, Zhong-Xiang Liu, Department of Etiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China No. 30100157, Medical Research Fund of Chinese PLA No.01MA184 and Innovation Project of the Fourth Military Medical University, No. CX99005

Correspondence to: Jun Liu, Department of Etiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. etiology@fmmu.edu.cn

Received: 2004-09-22 Accepted: 2004-10-20

Abstract

AIM: To introduce hepatitis B virus(HBV)targeted ribonuclease into hepatocytes by using human immunodeficiency virus Tat protein transduction domain (HIV-TatPTD).

METHODS: The gene encoding HBV targeted ribonuclease was cloned into prokaryotic expression vector pTAT-HA. Recombinant plasmid was transduced into *E.coli* BL21 (DE3) LysS, and then induced with IPTG. The expression of the fusion protein was analyzed by SDS-PAGE. Tat-TR fusion protein was purified and added to the HepG2 cell culture. The transduction efficiency was evaluated by IFA. MTT assay was performed to investigate the cytotoxicity of Tat-TR. Tat-TR was added into the cultured HepG2.2.15 cells, and the HBV DNA concentration was measured using quantitative PCR. Immunohistochemical staining was performed to identify whether TatPTD could introduce TR into the hepatocytes *in vivo*.

RESULTS: Tat-TR fusion protein was successfully expressed and purified. IFA visualization showed that Tat-TR

was introduced into hepatocytes. MTT assay suggested that Tat-TR did not affect the cell growth and had no cytotoxicity. Quantitative PCR result indicated that Tat-TR inhibited the replication of HBV. Immunohistochemical staining result showed that TatPTD delivered TR into hepatocytes *in vivo*.

CONCLUSION: The Tat-TR fusion protein may be valuable for the therapy of HBV infection.

Key Words: HIV-TatPTD; Hepatocytes; Ribonuclease

Ding J, Liu J, Xue CF, Li YH, Zhao Y, Chen J, Huang YX, Liu ZX. TatPTD can introduce HBV targeted ribonuclease into hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):958-962

摘要

目的: 利用 HIV-Tat 蛋白转导域(protein transduction domain, PTD)高效的跨膜转导特性, 探索将乙型肝炎病毒靶向核糖核酸酶(targeted ribonuclease, TR)导入肝细胞的新途径。

方法: 将 TR 基因克隆入含 TatPTD 的 pTAT 原核表达载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3)LysS 内诱导融合蛋白表达并进行纯化。将纯化的 Tat-TR 加入培养的 HepG2 细胞, 间接免疫荧光法检测其导入 HepG2 细胞的效率, MTT 法检测其对细胞生长代谢的影响。将 Tat-TR 加入培养的 HepG2.2.15 细胞, 定量 PCR 法检测 HBV DNA 水平并以 SPSS 软件进行统计分析。将 Tat-TR 经尾静脉注入小鼠体内 2 h 后, 对小鼠肝组织进行免疫组化染色, 检测 TatPTD 能否在体内介导 TR 进入肝细胞。

结果: 成功地制备了 Tat-TR 融合蛋白, 其纯度为 90%。间接免疫荧光及 MTT 的检测结果显示 Tat-TR 可以跨膜导入 HepG2 细胞且对细胞生长没有影响。SPSS 统计分析显示 Tat-TR 可以抑制 HBV 的复制。免疫组化染色结果显示, TatPTD 在体内也可以介导 TR 进入肝细胞。

结论: Tat-HBV 靶向核糖核酸酶的制备及活性鉴定, 为应用靶向核糖核酸酶治疗乙型肝炎病毒感染的研究奠定了良好的基础。

关键词: HIV-Tat 蛋白转导域; 肝细胞; 核糖核酸酶

丁劲, 刘军, 薛采芳, 李英辉, 赵亚, 陈俊, 黄豫晓, 刘忠湘. TatPTD 介导 HBV 靶向核糖核酸酶进入肝细胞的研究. *世界华人消化杂志* 2005;13(8):958-962
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/958.asp>

0 引言

乙型肝炎是危害人类健康的重要疾病, 治疗乙型肝炎的研究也一直是医学领域的热点问题^[1-3]. 由于HBV的复制过程类似于逆转录病毒, 我室依据核衣壳导向的病毒灭活(capsid-targeted viral inactivation, CATI)原理^[4], 构建了HBV靶向核糖核酸酶融合基因^[5], 靶向分子HBV核心蛋白是HBV包装过程中必需的成分, 效应分子人嗜酸性粒细胞来源的神经毒素是一种人源性的核糖核酸酶. 在HBV复制的过程中, 理论上HBVc可与之融合的hEDN引入核心区, hEDN则可在核心区内与HBV的前基因组RNA(pgRNA)相结合并对其酶解. 在体外研究中, 我们利用TR基因的真核表达载体转染HepG2. 2. 15细胞, 结果显示TR的确可以抑制HBV的复制^[6]. 但是转染的方法存在着效率低下、效果不稳定和难以体内应用的缺点, 这也极大地阻碍了靶向核糖核酸酶作用的发挥. 近年来蛋白质传导结构域(PTD)的发现和功能研究为解决这一问题带来了曙光. PTD是一类在蛋白转导过程中, 能高效穿过生物膜的结构域, 当其与蛋白质、多肽或DNA等分子共价连接时, 可将这些分子高效地转移到细胞内^[7]. 迄今发现的高效PTD有HIV的Tat^[8], HSV的VP22^[9], 以及果蝇的ANTP^[10], 其中Tat蛋白是研究较为深入的一种^[11-12]. 实验证明, 纯化的Tat融合蛋白无需复性即可导入小鼠体内的几乎所有细胞和组织中, 甚至还可以穿过血脑屏障^[13]. Tat融合蛋白系统已被公认是一种很有前途的运载工具, 无论对于基础研究, 还是临床治疗, 都有着非常广泛的应用前景^[14]. 因此, 利用Tat高效的蛋白转导特性, 将与Tat融合的TR导入肝细胞可能成为治疗HBV感染更为有效的途径. 我们将TR基因克隆入含Tat的pTAT原核表达载体, 在大肠杆菌内诱导表达后, 纯化了Tat-TR融合蛋白并对TatPTD介导HBV-TR转入肝细胞的效率和效果进行了检测.

1 材料和方法

1.1 材料 PCR试剂盒、限制性内切酶及连接酶为Takara公司产品. 核酸电泳分子量标准, 低分子量标准蛋白质和IPTG均为华美公司产品. 质粒小量提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒均购自碧云天生物技术研究. Ni-NTA-agarose购自基因公司. PD-10 desalting columns购自Amersham Pharmacia生物技术有限公司. SABC免疫组化检测试剂盒购自博士德公司. pTAT-HA质粒由美国Doudy教授惠赠. 质粒pcDNA3. 1(-)/TR、pUC18及大肠杆菌JM109、BL21(DE3)LysS由本室保存. HepG2. 2. 15细胞由北京解放军302医院程云教授惠赠.

1.2 方法 PCR引物由北京奥科生物技术有限公司合成. Forward:GCGCATGGCCATGGAGGAGC CGCAGTCAGAT(划线处为Nco I 酶切位点). Backward:GCGCGAATTCTCTCAGTC TGAATCAGGCCCTT(划线处为EcoR I酶切位点). 在50 μ L体系中, 以pcDNA3. 1(-)/TR为模板进行PCR. 将PCR产物和pTAT-HA质粒分别用Nco I和EcoR I双酶切, 回收酶切产物, 用T₄DNA连接酶于16℃水浴连接16 h, 转化JM109感受态细胞. 以含Amp的固体培养基(LB)筛选阳性克隆, 小量提取质粒后用Nco I和EcoR I酶切鉴定. 测序由上海基康公司完成. 以pTAT-HA/TR原核表达载体转化大肠杆菌BL21(DE3)LysS, IPTG诱导融合蛋白表达并利用融合蛋白携有的(His)₆标签, 以Ni-NTA-agarose柱进行纯化(具体步骤参见操作手册). 用PD-10 Desalting columns除去蛋白洗脱液中咪唑等小分子杂质. 纯化的Tat-TR融合蛋白经SDS-PAGE分析后, 采用凝胶扫描的方法测定蛋白样品的纯度, BCA法测定融和蛋白的浓度. HepG2细胞是人肝癌细胞株, 常规培养于37℃、50 mL/L CO₂、含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中, 加入青、链霉素至终浓度均为100 mg/L. 每2 d换液一次, 4 d传代.

1.2.1 Tat-TR跨膜转导效率的鉴定 将HepG2细胞以 2×10^8 /L的密度接种于内置爬片的24孔培养板. 待细胞贴壁后(24 h), 在第1组的2个复孔中加入DMEM 20 μ L作为阴性对照. 2-16组(每组2个复孔)均加入Tat-TR融合蛋白至终浓度为200 μ mol/L, 分别在15 min, 30 min, 1 h, 2 h和4 h时, 于冰上吸去培养液, 4℃的PBS(pH8.0)洗涤各孔贴壁细胞10 min, 每孔加入含20 g/L多聚甲醛、1 g/L TritonX-100的PBS溶液1 mL, 置冰上30 min. 再以4℃ PBS洗涤10 min, 加入10 g/L的BSA于42℃放置10 min, 4℃的PBS洗涤10 min, 每孔加入鼠抗His抗体(1:1 000)1 mL, 42℃放置30 min后, 4℃ PBS洗涤15 min, 加入FITC标记的兔抗鼠IgG(1:1 000), 42℃孵育10 min, PBS震洗1 h后以500 mL/L的甘油封片, 荧光显微镜下观察并照相.

1.2.2 MTT试验 将HepG2细胞以 2×10^8 /L的密度接种于96孔培养板, 培养24 h后将其分成2组, 每组4个复孔. 实验组加入Tat-TR融合蛋白至终浓度为200 μ mol/L, 对照组加入DMEM, 继续培养72 h. 相差显微镜下观察细胞形态后, 每孔加入MTT溶液20 μ L(5 g/L), 继续孵育4 h. 每孔加入DMSO150 μ L, 振荡10 min, 使结晶物充分溶解. 选择490 nm波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光度. 以SPSS软件对结果进行统计学分析.

1.2.3 HepG2.2.15细胞的培养 HepG2. 2. 15细胞是在HepG2细胞的基因组中整合了完整的HBV基因组, 能

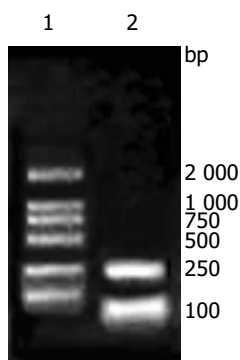


图1 pTAT/TR 重组质粒的酶切鉴定. 1: pTAT/TR(*Nco* I/*Eco*R II); 2: DNA Ladder marker.

持续转录和翻译 HBV 基因, 产生 HBsAg, HBeAg 和 Dane 颗粒, HepG2. 2. 15 细胞在含 150 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 于 37℃, 50 mL/L CO₂ 条件下进行培养, 加入 G418 至终浓度为 200 mg/L. 每 3 d 换液 1 次, 6 d 传代.

1.2.4 Tat-TR 抗病毒效果的检测 将长势良好的 HepG2. 2. 15 细胞以 2×10^5 /L 的密度接种于 12 孔板, 培养 24 h 换液 1 次. 将培养细胞分为 2 组(每组 4 个复孔): 实验组加入 Tat-TR 融合蛋白至终浓度 100 nmol/L, 对照组加入 DMEM 20 μ L. 继续培养 48 h 后, 每孔吸出上清 200 μ L, 由第四军医大学临床分子生物学中心测定 HBV DNA 浓度. 将实验组和各对照组浓度均数按 $\alpha = 0.05$ 的水平, 以 SPSS 软件进行统计学分析.

1.2.5 肝组织切片的免疫组化染色 取 4-6 wk 的 Balb/c 小鼠, 经尾静脉注射 Tat-TR 融合蛋白 200 μ g, 另取小鼠尾静脉注射生理盐水作为对照, 4 h 后均摘眼

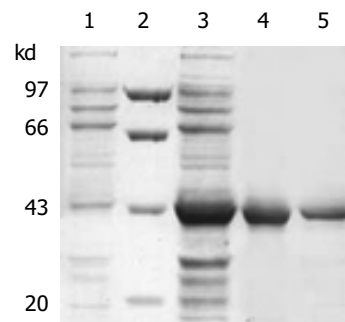


图2 Tat-TR 表达纯化的 SDS-PAGE 分析. 1: pTAT-HA/TR 质粒转化 BL21 未经 IPTG 诱导; 2: Protein marker; 3: pTAT-HA/TR 质粒转化 BL21 经 IPTG 诱导产物; 4: 200 mol/L 咪唑洗脱液; 5: 500 mol/L 咪唑洗脱液.

球放血处死. 取小鼠肝组织于 100 mg/L 甲醛溶液固定, 制作石蜡切片(5 μ m 厚). 将石蜡切片脱蜡水化后, 室温下以 300 mL/L H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶, 加入正常小鼠血清封闭非特异结合位点, 再依次加入鼠抗 his 单抗、正常山羊血清封闭液、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 后, 以 DAB 进行显色. 苏木素轻度复染, 脱水、透明后中性树胶封固, 置显微镜下观察、摄像.

2 结果

2.1 重组质粒 pTAT-HA/TR 的鉴定 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示, 目的片段大小约 1 000 bp, 与 TR 大小相当. 将构建的 pTAT-HA/TR 质粒用 *Nco* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定, 酶切产物的小片段约 1 000 bp (图1). 测序报告显示核苷酸序列无误, 表明 pTAT-HA/TR 原核表达质粒构建正确.

2.2 Tat-TR 融合蛋白原核表达及纯化的 SDS-PAGE

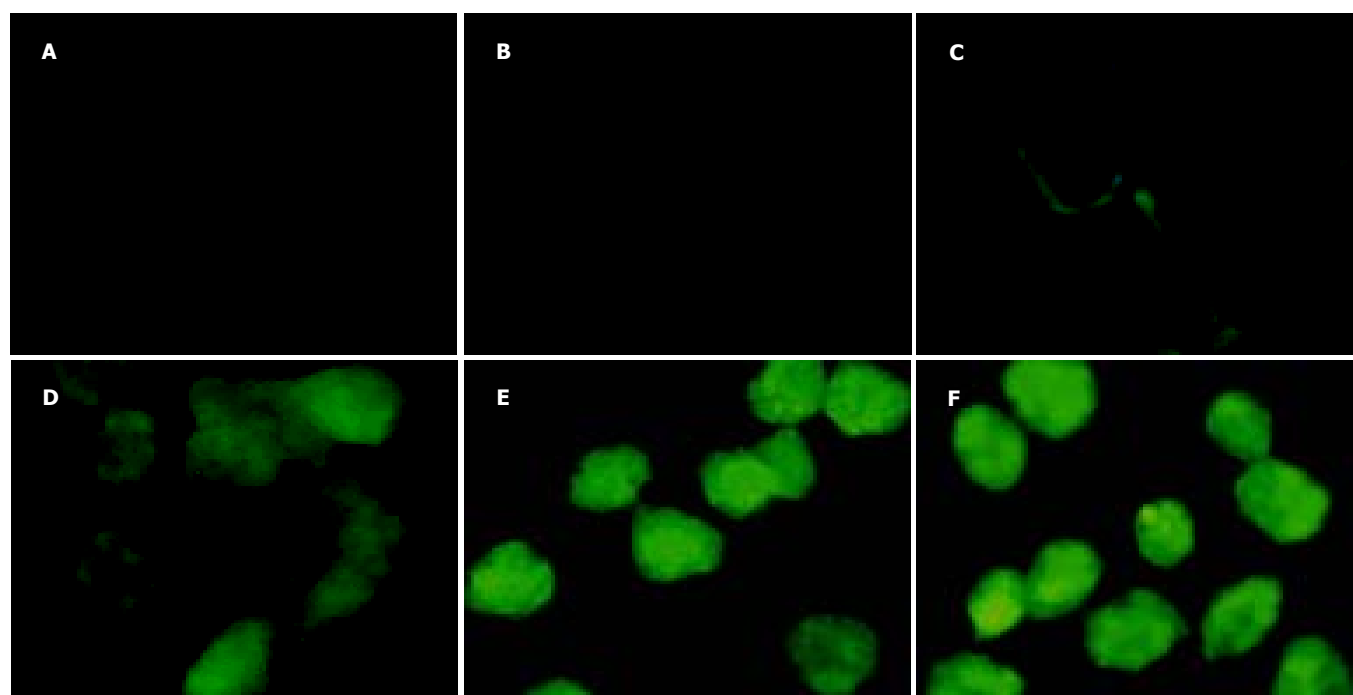


图3 Tat-TR 导入 HepG2 细胞的鉴定. A. DMEM 对照; B. 加入 Tat-TR 15 min; C. 加入 Tat-TR 30 min; D. 加入 Tat-TR 1 h; E. 加入 Tat-TR 2 h; F. 加入 Tat-TR 4 h.

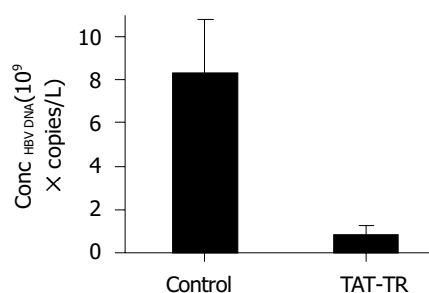


图4 Tat-TR 抑制HBV复制.

分析 用重组原核表达载体pTAT-HA/TR转化大肠杆菌BL21 (DE3) LysS, 经IPTG诱导后与pTAT-HA转化相同菌株的表达产物相比较, 在120 g/L的SDS-PAGE图谱上出现了新的条带, M_r 43 000, 与TR的预计分子量大小相当(图2). Tat-TR融合蛋白纯化产物的SDS-PAGE分析显示, Tat-TR纯化成功(图2). 凝胶扫描测定融合蛋白的纯度为90%. 经定量Tat-TR融合蛋白的浓度为0.8 g/L.

2.3 Tat-TR 跨膜转导的鉴定 加入Tat-TR融合蛋白15 min时荧光显微镜下观察未见荧光, 30 min时可检测到较弱荧光并主要集中在胞膜, 1 h时胞内出现明显的荧光, 2 h时荧光强度达峰值, 4 h时没有增强. 而对照组均没有荧光出现, 这一结果说明Tat PTD可在短时间内将TR高效地导入HepG2细胞(图3).

2.4 MTT 检测结果 加入Tat-TR融合蛋白72 h后, 倒置显微镜下观察细胞形态和生长状况发现, 各组细胞生长状况良好. MTT比色测得 A_{490} (mean \pm SD, $n = 4$) 分别为 0.4875 ± 0.018 和 0.4852 ± 0.050 . SPSS统计分析结果显示: 实验组与对照组之间没有显著性差异($P > 0.05$), 说明Tat-TR融合蛋白对细胞没有毒性, 也不影响细胞的生长代谢.

2.5 Tat-TR 抗病毒作用的鉴定 Tat-TR融合蛋白加入HepG2. 2.15细胞48 h后, 检测上清中HBV DNA浓度(图4). SPSS软件进行方差分析发现, 实验组HBV DNA浓度均数与对照组相比有统计学差异, 并且实验组上清中HBV DNA浓度比对照组平均下降了90.1%.

2.6 Tat-TR 体内转导的鉴定 为了探明Tat PTD在体内能否将TR引入肝细胞, 试验中将Tat-TR融合蛋白及其对照生理盐水, 分别经尾静脉注入小鼠体内, 4 h后取肝组织制备石蜡切片. 免疫组化染色, 注射Tat-TR融合蛋白的小鼠, 肝组织切片免疫组化染色呈阳性(图5), 而注射生理盐水的小鼠, 肝组织切片染色呈阴性. 这一结果说明Tat PTD在体内可以将TR引入肝细胞.

3 讨论

近些年来, 人们发现了一类蛋白质功能结构域, 他们可将与其共价连接的分子高效地导入细胞内, 故名蛋白转导域. 研究发现, 这类分子均由富含碱性氨基酸残基的短肽构成, 也称为细胞穿膜肽(cell penetrate peptide, CPP). 目前, 蛋白转导的机制并不清楚, 推测他是一个不依赖于受体和转运蛋白的过程, 可能直接作用于脂质双层, 这一特点使得所有细胞都可成为被转导的对象. 蛋白质和药物向细胞的导入受制于本身的理化性质, 被动扩散的药物的摄入与其脂溶性直接相关, 极性 or 带电荷的分子只能被有限摄入. 通过与PTD的共价连接, 为化合物、蛋白质、多肽等向靶细胞的传递提供一个崭新途径. 目前已有数十种分子质量在15–120 kD的Tat融合蛋白已被成功导入细胞. 最近的一些研究结果显示, 将荧光素标记的Tat PTD多肽通过会阴注射入小鼠体内, 然后在共聚焦显微镜下检测, 发现荧光素可被导入所有组织中^[14]. 从一些体外转导实验结果来看, 利用蛋白转导的策略将治疗所需的化合物输入患者体内的前景良好.

为了探索应用PTD将TR引入肝细胞治疗乙型肝炎的可行性. 我们构建了Tat-HBV靶向核糖核酸酶融合蛋白原核表达载体, 转化大肠杆菌BL21 (DEIII) 后以IPTG诱导表达, 与本室先前的研究相比, 融合蛋白的表达效率显著提高, 这可能是由于在表达载体上目的基因更接近起始密码子引起的. 利用间接免疫荧光法检测Tat-TR融合蛋白导入肝细胞的效率发现: 在

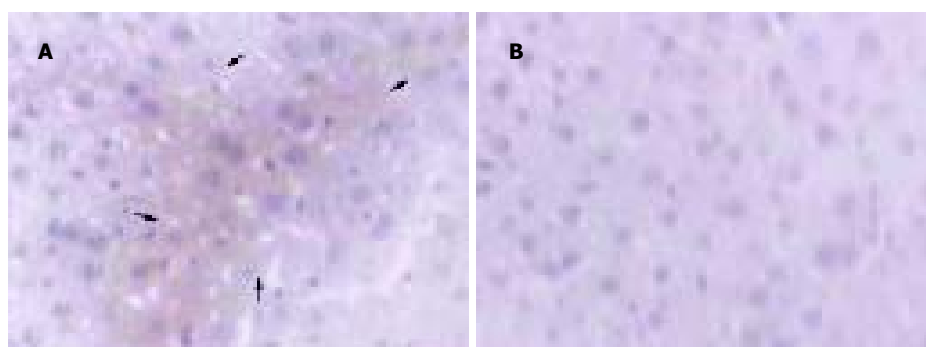


图5 Tat-TR 导入肝细胞的鉴定. A: Tat-TR 组; B: 生理盐水组.

加入 Tat-TR 融合蛋白 30 min 时细胞出现荧光, 此时荧光物质主要集中在胞膜, 这可能是由于 TatPTD 富含碱性氨基酸, 在溶液中带有较强的正电荷, 可与带负电荷的细胞脂膜结合造成的, 这时 Tat 融合蛋白还没有进入到细胞内部, 故胞质没有荧光. 到加入融合蛋白 1 h 时检测, 胞内已经有较强荧光出现, 并且细胞核也着色, 这可能是融合蛋白进入细胞后, 在较短时间内即进入到胞核造成的. 大约 2 h 胞内荧光强度达峰值, 4 h 时没有明显变化, 这就提示蛋白转导可能是以一个浓度依赖的方式进行的, 在 2 h 左右细胞内外蛋白浓度相当, 维持一个动态平衡, 故荧光强度不再变化. MTT 检测结果显示, Tat-TR 融合蛋白对细胞的生长代谢没有影响, 转导过程对靶细胞也没有损害. 与目前常规的脂质体转染相比较发现, Tat PTD 介导的蛋白转导具有明显的优势: (1) 导入细胞的效率大大提高, 融合蛋白几乎可以进入 100% 的培养细胞. (2) 转导过程迅速, 数分钟到几小时内, 就可以看到了融合蛋白进入细胞并在胞内积累. (3) 由于 Tat 融合蛋白以浓度依赖的方式进入细胞, 故每个细胞内的蛋白浓度基本相同, 所以可以相对精确的控制胞内蛋白的浓度. (4) PTD 还具有温度适应性广、携带分子多样及可导入常规方法难以转染的原代细胞等. 本研究采用乙型肝炎体外模型 HepG2. 2. 15 细胞, 进行了 Tat-TR 抗病毒效果的鉴定. 检测指标选用了能客观反映 HBV 负荷及复制情况的 HBV DNA 水平, 检测结果显示 Tat-TR 融合蛋白可以显著抑制乙肝病毒的复制, 抑制率约 90. 1%. 小鼠肝组织的免疫组化染色结果证明, TatPTD 可以在体内将 TR 导入肝细胞, 这就为我们下一步利用 HBV 靶向核糖核酸酶, 抑制乙肝病毒复制的体内试验奠定了良好的基础.

4 参考文献

- 1 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 2 Zhuang L, You J, Tang BZ, Ding SY, Yan KH, Peng D, Zhang YM, Zhang L. Preliminary results of Thymosin- α 1 versus interferon- α -treatment in patient with HBeAg negative and serum HBV DNA positive chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:407-410
- 3 Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
- 4 Natsoulis G, Boeke JD. New antiviral strategy using capsid-nuclease fusion proteins. *Nature* 1991;352:632-635
- 5 丁劲, 刘军, 薛采芳, 李英辉, 宫卫东. TAT-乙型肝炎病毒靶向核糖核酸酶融合蛋白原核载体的构建及表达. *细胞与分子免疫学杂志* 2003;19:49-51
- 6 李英辉, 刘军, 薛采芳, 丁劲, 宫卫东, 赵亚. 靶向核糖核酸酶在体外抑制乙肝病毒复制的研究. *中华微生物学与免疫学杂志* 2003;23:484-488
- 7 Schwarze SR, Dowdy SF. In vivo protein transduction:intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:45-48
- 8 Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsom J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:664-668
- 9 Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 1997;88:223-233
- 10 Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994;269:10444-10450
- 11 Ezhevsky SA, Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Gius DR, Wei MC, Dowdy SF. Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein(pRb)by byclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10699-10704
- 12 Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 1997;272:16010-16017
- 13 Chellaiah MA, Soga N, Swanson S, McAllister S, Alvarez U, Wang D, Dowdy SF, Hruska KA. Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility and bone resorption. *J Biol Chem* 2000;275:11993-12002
- 14 Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction:delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 1999;285:1569-1572

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

补中益气汤中黄芪对脾虚小鼠免疫调节的君药地位

米娜, 陈其御, 吴敏毓, 孙卫民

米娜, 广东医学院微生物与免疫教研室 广东省湛江市 524023
陈其御, 吴敏毓, 皖南医学院微生物与免疫教研室 安徽省芜湖市 241001
孙卫民, 中国人民解放军第二军医大学免疫教研室 上海市 200433
米娜, 女, 1970-02-01 生, 广东省湛江市人, 汉族, 1991 年皖南医学院临床
医学专科毕业, 1997 年皖南医学院硕士研究生毕业, 讲师, 主要从事中药的
免疫研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 3917087
通讯作者: 吴敏毓, 241001, 安徽省芜湖市银湖路 2 号, 皖南医学院微生物
与免疫教研室。
电话: 0553-3813276
收稿日期: 2005-01-21 接受日期: 2005-02-26

Effects of Radix Astragali in Buzhong Yiqi Decoction on immunoregulation in spleen-deficiency mice

Na Mi, Qi-Yu Chen, Min-Yu Wu, Wei-Min Sun

Na Mi, Department of Microbiology and Immunology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, Guangdong Province, China
Qi-Yu Chen, Min-Yu Wu, Department of Microbiology and Immunology, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China
Wei-Min Sun, Department of Immunology, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, Shanghai, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 3917087

Correspondence to: Min-Yu Wu, Department of Microbiology and Immunology, Wannan Medical College, 2 Yinhu Road, Wuhu 241001, Anhui Province, China.

Received: 2005-01-21 Accepted: 2005-02-26

Abstract

AIM: Buzhong Yiqi Decoction (BZYQ), which possesses the effect of *Piwei* regulation, has gained wide clinical applications with increasing limitations. Radix Astragali (Ra) is the *Jun* (predominant) ingredient in the decoction. To reveal the immunoregulative effect of Ra in the recipe, BZYQ with or without Ra was administered in the *spleen-deficiency* mice.

METHODS: 60 healthy mice were randomly divided into five groups, 12 mice in each group. The normal control (NC), *spleen-deficiency* group induced by Reserpine without any treatment (independence recovery group, IR), and groups in which mice were treated with RA, BZYQ with or without RA. The activities of Macrophages (M ϕ), NK cells, LAK cells, T cells, IL-2, the values of Hb, TNF, and the ration of CD4⁺/CD8⁺ cells, were determined in each group.

RESULTS: In the mice of *spleen deficiency*, the Hb level (0.74 \pm 0.19 g/L vs 1.26 \pm 0.21 g/L, $t = 5.84$, $P < 0.01$), the

activities of M ϕ (0.391 \pm 0.079 vs 0.641 \pm 0.087, $t = 6.77$, $P < 0.01$), NK cells (6.8 \pm 2.71 vs 5.3 \pm 6.8, $t = 3.5$, $P < 0.01$), LAK (8.9 \pm 2.61 vs 8.2 \pm 4.8, $t = 5.24$, $P < 0.01$), T cells (0.106 \pm 0.028 vs 0.175 \pm 0.032, $t = 5.15$, $P < 0.01$), the CD4⁺/CD8⁺ ratio (1.3 \pm 0.1 vs 1.6 \pm 0.2, $t = 4.11$, $P < 0.01$) were significantly lower than those in NC mice. The TNF value (39.6 \pm 11.8 vs 15.5 \pm 6.2, $t = 6.08$, $P < 0.01$) was significantly higher than in NC mice. After treatment with RA, the Hb value (1.12 \pm 0.14 g/L vs 0.74 \pm 0.19 g/L, $t = 5.15$, $P < 0.01$), LAK activity (14.1 \pm 4.1% vs 8.9 \pm 2.6%, $t = 3.30$, $P < 0.01$), IL-2 (0.243 \pm 0.037 vs 0.177 \pm 0.030, $t = 4.31$, $P < 0.01$), the CD4⁺/CD8⁺ ratio (1.5 \pm 0.2 vs 1.3 \pm 0.1, $t = 2.73$, $P < 0.05$) were significantly higher than those in IR group. The whole recipe could restore all of the immune parameters tested.

CONCLUSION: RA in the BZYQ decoction mainly elevates Hb and IL-2 levels, LAK activity and CD4⁺/CD8⁺ ratio in the *spleen deficiency* mice. It needs to combine with other ingredients in the recipe to fully exert the immunostimulating effect.

Key Words: Radix Astragali; Buzhong Yiqi Decoction; Killer cell; LAK; Macrophages; Tumor necrosis factor; IL-2; Immunity; T cell

Mi N, Chen QY, Wu MY, Sun WM. Effects of Radix Astragali in Buzhong Yiqi Decoction on immunoregulation in *spleen-deficiency* mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):963-966

摘要

目的: 补中益气汤具有调补脾胃的功效, 临床应用广泛, 本试验目的是通过黄芪与缺黄芪组方对脾虚小鼠的免疫调节作用, 了解方中的君药黄芪在全方中对脾虚小鼠的免疫调节作用中的地位。

方法: 选取健康小鼠 60 只, 随机分为 5 组, 进行试验, 以正常小鼠为正常对照组, 以利血平制备脾虚小鼠后不经治疗而自然恢复为阴性对照, 采用黄芪, 缺黄芪组方, 全方对脾虚小鼠的免疫功能的调节作用进行研究。所有各组均检测 Hb, NK 细胞活性, LAK 细胞活性, M ϕ 吞噬活性, TNF 值, T 细胞增殖活性, T 细胞产生 IL-2 活性及 CD4⁺/CD8⁺ 比值。

结果: IR 组 Hb 值 (0.74 \pm 0.19 g/L) 明显低于 NC (1.26 \pm 0.21 g/L, $t = 5.84$, $P < 0.01$) IR 组 M ϕ 细胞活性 (0.641 \pm 0.087)

明显低于NC(0.641 ± 0.087 , $t = 6.77$, $P < 0.01$), IR组NK细胞活性(6.8 ± 2.7)明显低于NC组(15.3 ± 6.8 , $t = 3.5$, $P < 0.01$), IR组LAK活性(8.9 ± 2.6)均明显低于NC(18.2 ± 4.8 , $t = 5.24$, $P < 0.01$), IR组TNF值(39.6 ± 11.8)明显高于NC(15.5 ± 6.2 , $t = 6.08$, $P < 0.01$), IR组的T细胞增殖活性(0.106 ± 0.028)明显低于NC(0.175 ± 0.032 , $t = 5.15$, $P < 0.01$), IR组IL-2活性(0.177 ± 0.030)明显低于NC(0.247 ± 0.033 , $t = 5.00$, $P < 0.01$), IR组CD4⁺/CD8⁺比值(1.3 ± 0.1)明显低于NC(1.6 ± 0.2 , $t = 4.11$, $P < 0.01$).黄芪组Hb值(1.12 ± 0.14 g/L)明显高于IR组(0.74 ± 0.19 g/L, $t = 5.15$, $P < 0.01$),黄芪组LAK细胞活性($14.1 \pm 4.1\%$)明显高于IR组($8.9 \pm 2.6\%$, $t = 3.30$, $P < 0.01$),黄芪组IL-2活性(0.243 ± 0.037),明显高于IR组(0.177 ± 0.030 , $t = 4.31$, $P < 0.01$),黄芪组CD4⁺/CD8⁺细胞比值为(1.5 ± 0.2)明显高于IR组(1.3 ± 0.1 , $t = 2.73$, $P < 0.05$).全方能明显提高机体免疫功能。

结论: 黄芪是方中主要升高Hb, IL-2活性LAK和CD4⁺/CD8⁺比值的组分.表明补中益气汤中君药黄芪在对脾虚小鼠的免疫调节中并非在所有方面都起主导作用,他需要和其他药物合用才能发挥全面的调节作用,促使我们进一步探索中药组方的奥秘。

关键词: 黄芪; 补中益气汤; 杀伤细胞; LAK细胞; 巨噬细胞; 肿瘤坏死因子; IL-2; 免疫; T细胞

米娜, 陈其御, 吴敏毓, 孙卫民. 补中益气汤中黄芪对脾虚小鼠免疫调节的君药地位. 世界华人消化杂志 2005;13(8):963-966
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/963.asp>

0 引言

补中益气汤是益气升阳, 调补脾胃的古方, 具有调节细胞免疫、体液免疫及神经内分泌功能, 同时还具有抗肿瘤作用. 临床应用十分广泛, 但其组方规律及免疫调节机制尚未完全阐明. 我们根据方中黄芪益气为君药的原则, 着重研究方中黄芪在全方中对脾虚小鼠免疫功能的影响的地位, 以期临床应用提供与现代医学理论相结合的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 昆明种小鼠70只, 8-12周龄, 雌雄各半, 体重(21 ± 2) g, 购自中国药科大学, 经正常喂养3 d后选取60只健康者进行实验. 细胞YAC-1, L929均由第二军医大学免疫研究室惠赠, 取对数生长期细胞分别测定NK, LAK细胞活性及TNF毒性. 内蒙古炙黄芪、炙甘草、潞党参、土炒白术、甘肃当归身、陈皮、升麻、柴胡按质量5:5:3:3:2:2:2:2比例配制, 方中各药物购于本院附属医院药房, 并经鉴定. 全方水煎剂按常规煎制配成500 g/L汤剂. 黄芪水煎剂

只取全方中黄芪, 缺黄芪组方水煎剂取除黄芪外的其他各组分, 制备汤剂, 4℃冰箱内冷藏备用. 各组均按25 mL/kg·d灌胃。

1.2 方法 小鼠被随机分为5组, 每组12只, 除正常对照组外其余各组均采用利血平制备脾虚模型^[1], 每日皮下注射0.15 g/kg·d利血平, 连续12 d, 第13 d起各组小鼠分别灌服不同药物. (1) 正常对照组: (normal control, NC), 蒸馏水; (2) 全方组: (Buzhong Yiqi decoction, BZYQ), 补中益气汤; (3) 黄芪组(Radix astragali, Ra), 黄芪水煎剂; (4) 缺黄芪组: (The portion of BZY except Ra, eRa), 缺黄芪组方水煎剂; (5) 脾虚自然恢复组: (independence recovery, IR), 蒸馏水. 连续7 d, 第20 d进行各项指标测定. (1) Hb测定. (2) 小鼠脾细胞NK细胞活性的测定, 参照文献[2]以YAC-1为靶细胞, MTT法测定. (3) 小鼠脾细胞LAK活性的测定^[3], 用含500 kμ/L的rIL-2为LAK细胞诱导液与制备好的脾细胞混悬液 1×10^{10} /L于24孔细胞培养板, 37℃ 50 mL/L CO₂环境中孵化4 d, 以YAC-1作为LAK细胞细胞毒活性测定的靶细胞, MTT法测定. (4) 腹腔Mφ吞噬活性的测定^[4]: 以A₅₇₀值来反映鼠腹腔Mφ吞噬能力. (5) 腹腔Mφ释放肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)活性测定^[5], 以L929为靶细胞, MTT法测定. (6) 脾脏T细胞增殖活性的测定^[6]: 采用MTT比色法测定, 以A₅₇₀值来反映T细胞增殖活性. (7) 脾脏T细胞产生IL-2活性的测定: 参照文献[6]无菌制备小鼠脾细胞悬液, 配成 5×10^9 /L, 适当培养后, 离心收集上清液为待检IL-2. 以ConA刺激, 制备活化的脾淋巴细胞, 配成 5×10^8 /L细胞悬液, 作为测IL-2的反应细胞, MTT法测定, 以A₅₇₀值来反映IL-2活性. (8) CD4⁺T, CD8⁺T及CD4⁺/CD8⁺比值测定, 参照文献[7]无菌制备小鼠脾细胞悬液, 分离出白细胞, 调细胞数为 2×10^9 /L, 分别加入相应的单克隆抗体, 补体作用后, 10%曲利本蓝染液染色高倍镜计算着染阳性细胞(死细胞)的百分率, 为所测细胞比例。

统计学处理 结果以mean ± SD表示, 两组间差异采用t检验及校正t检验法进行显著性检验。

2 结果

2.1 脾虚小鼠Hb值, Mφ细胞活性, NK及LAK活性 均明显低于正常值, TNF值明显高于正常值, BZYQ可调节相应免疫功能趋于正常. 除NK细胞活性外, 均能恢复正常, 与正常组相比无显著性差异. 黄芪也能使Hb值, LAK活性恢复至正常水平, 而eRa组Hb值, LAK活性与正常组差异明显, 故黄芪是方中提升Hb值, LAK活性的主要组分. 结果(表1)。

2.2 脾虚小鼠的T细胞增殖活性, IL-2 活性及 CD4⁺/CD8⁺ 比值均明显低于正常值, BZYQ 可使低下的相应免疫功能明显提高, 除 CD4⁺/CD8⁺ 比值外均能恢复正常, 与正常组相比无显著性差异, 黄芪能使 IL-2 活性明显升高, CD4⁺/CD8⁺ 比值提高, 而 eRa 组 IL-2 活性, CD4⁺/CD8⁺ 比值与脾虚组无差异, 说明方中黄芪是主要提升脾虚小鼠 IL-2 活性、CD4⁺/CD8⁺ 比值的组分(表2)。

3 讨论

黄芪最早收载于《神农本草经》, 为豆科植物膜荚黄芪和蒙古黄芪的干燥根。性温味甘, 入肺、归脾经, 具有补气升阳, 固表止汗, 利水消肿和生肌等功效, 是临床最常用的补气药物之一, 其作用广泛^[8]。补中益气汤首见于宋金时期李东垣所著《内外伤辨惑论·卷中》, 具有调补脾胃等功效, 临床应用相当广泛, 且应用范围不断扩大。基础实验也证明其具有明确的抗胃溃疡、免疫调节和抗肿瘤作用^[9-14]。黄芪在补中益气汤中为君药, 起着重要的主导作用。资料显示脾虚机体多方面功能紊乱^[1, 15-18], 我们针对脾虚小鼠的几种免疫指标进行检测后发现, 全方对脾虚小鼠对免疫调节作用比较全面, 能普遍提升脾虚小鼠低下的免疫功能, 方中黄芪对试验小鼠的 Hb, NK, LAK 细胞活性, T 细胞增殖活性, IL-2 活性及 CD4⁺/CD8⁺ 均有升高作用, 与相关资料吻合^[6-7, 19], 且能明显升高 Hb 值, LAK 细胞活性, IL-2 活性及 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值, 为方中主要升高 Hb, LAK 细胞活性, IL-2 活

性及 CD4⁺/CD8⁺ 细胞比值的药物, 当与其余药物配伍使用后效果更好。

脾虚小鼠 M ϕ 吞噬活性下降, 而分泌的 TNF 却异常增加, 可能是因为脾虚小鼠的免疫调节功能失调, 导致细胞的保护功能下降, 而致损伤机制加强。TNF 可通过与不同受体的结合促进细胞凋亡或细胞活化, 而发挥调节作用^[20-23], 他的异常增加会使机体的免疫调节功能失常, 又可能使细胞异常分泌, 而形成恶性循环, 因此 TNF 的正常分泌对维持机体免疫功能的稳定非常重要。结果发现黄芪和去黄芪组方, 均不能有效恢复异常的 M ϕ 和 TNF, 但两组方合用后, 却表现为正常的免疫调节作用, 能使异常的 M ϕ 和 TNF 值趋于正常, 说明药物配伍作用并不是简单的相加作用, 这也提示配伍中的相互作用还有深入研究的必要。NK 细胞是机体维持免疫监视功能的主要细胞之一, 具有多种免疫调节作用^[24-30], 有助于机体自身稳定。脾虚小鼠 NK 细胞功能明显下降, 自身稳定遭受严重破坏, 临床实验显示 NK 细胞功能低下的患者易患各系统疾病^[26-30], 也说明了这点。全方能有效提高 NK 细胞活性, 促其发挥强大的第一防线作用, 从而降低机体患病的可能性。而单味黄芪和去黄芪组方均不能使低下的 NK 细胞活性恢复正常, 提示合理配伍的科学性。T 细胞增殖活性是检测 T 细胞活性最常用的手段, 黄芪与缺黄芪组方均能提升 T 细胞增殖活性, 但均未达到正常水平。IL-2 和细胞表面相应受体结合后, 能调节机体 T、B 及其他免疫细胞, 是免疫调节中重要的细胞因子之一^[31-32]。脾虚小鼠 T 细胞增殖活性和 IL-2

表1 小鼠 Hb 值、M ϕ 细胞活性、分泌的 TNF 值、NK 及 LAK 活性

分组	n	Hb(g/L)	M ϕ 吞噬活性(A ₆₇₀)	TNF 值(%)	NK 活性(%)	LAK 活性(%)
NC	12	1.26 ± 0.21 ^d	0.641 ± 0.087 ^d ■	15.5 ± 6.2 ^d	15.3 ± 6.8 ^d	18.2 ± 4.8 ^d
BZYQ	11	1.26 ± 0.19 ^d	0.572 ± 0.098 ^d	11.9 ± 5.4 ^d	11.9 ± 5.4 ^c	16.6 ± 3.8 ^d
Ra	11	1.12 ± 0.14 ^d	0.412 ± 0.059 ^b	31.1 ± 5.7 ^b	9.3 ± 3.7 ^a	14.1 ± 4.1 ^{ad}
eRa	10	1.04 ± 0.21 ^{ad}	0.443 ± 0.063 ^b	33.0 ± 7.4 ^b	9.1 ± 3.9 ^a	9.3 ± 2.8 ^b
IR	9	0.74 ± 0.19 ^b	0.391 ± 0.079 ^b	39.6 ± 11.8 ^b	6.8 ± 2.7 ^b	8.9 ± 2.6 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs NC; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 脾虚组(IR)。

表2 小鼠的 T 细胞增殖活性, IL-2 活性及 CD4⁺/CD8⁺ 比值

组别	n	T 细胞增殖活性(A ₆₇₀)	IL-2 活性(A ₆₇₀)	CD4	CD8	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
NC	12	0.175 ± 0.032 ^d ■	0.247 ± 0.033 ^d ■	25.3 ± 3.2 ^d	16.1 ± 2.9 ^d	1.6 ± 0.2 ^d
BZYQ	11	0.170 ± 0.028 ^d	0.259 ± 0.042 ^d	23.9 ± 3.4 ^d	16.5 ± 2.4 ^d	1.4 ± 0.2 ^c
Ra	11	0.139 ± 0.026 ^{ac}	0.243 ± 0.037 ^d	21.0 ± 2.9 ^{ad}	15.7 ± 2.3 ^d	1.5 ± 0.2 ^c
eRa	10	0.142 ± 0.021 ^{ac}	0.198 ± 0.039 ^b	16.2 ± 3.0 ^b	12.8 ± 2.6 ^b	1.3 ± 0.2 ^b
IR	9	0.106 ± 0.028 ^b	0.177 ± 0.030 ^b	15.8 ± 3.0 ^b	12.9 ± 1.3 ^b	1.3 ± 0.1 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs NC; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 脾虚组(IR)。

活性均明显下降,单味黄芪能使T细胞增殖活性明显增高,但仍未恢复正常,而对IL-2活性,却能使其恢复正常,这可能显示出细胞因子较细胞本身对药物的敏感性高,或因为细胞因子的高效性所致,提示针对细胞因子的药物可能更易在治疗早期发挥作用.淋巴因子活化的杀伤细胞(LAK)是表达IL-2R的NK细胞及所有具有大颗粒淋巴细胞形态特征的T细胞,对IL-2产生反应后获得非特异细胞毒功能的细胞的统称,与静止的NK细胞相比,LAK细胞可杀死新鲜的肿瘤细胞及不同谱系的瘤细胞^[33-34],黄芪能恢复脾虚小鼠低下的LAK细胞活性,这更进一步说明黄芪对细胞因子的促进作用强于对细胞的作用.脾虚小鼠CD4⁺/CD8⁺比例明显低于正常,说明免疫功能低下,补中益气汤全方能提高CD4⁺/CD8⁺比例至正常水平,与资料研究结果一致^[7],单味黄芪与全方同样可提高脾虚小鼠低下的CD4⁺/CD8⁺比例,但未调节至正常水平,而缺黄芪组对CD4⁺/CD8⁺比例无影响,说明黄芪是提升CD4⁺/CD8⁺比例的主要组方.综上所述,方中黄芪是主要升高Hb,IL-2活性,LAK细胞活性和CD4⁺/CD8⁺比例的药物,而对于其他某些指标作用不明显甚至不表现出调节作用,当与其他各药配伍使用时则达到全面调节机体免疫功能作用,这更深刻的体现出补中益气汤中君药黄芪的地位固然重要,但仍需和其他药物合理组合,通过君、臣、佐、使及其他各药物的科学搭配,发挥合理而全面的调节作用,而并非简单的相加作用,这将促使我们进一步探讨中药各组分之间科学配伍的奥秘.

4 参考文献

- 李升刚,杨晓峰,于德志,朱爱民.脾运丹对正常和脾虚小鼠胃肠功能和免疫功能的影响. *海峡药学* 2000;12:27-28
- 韩磊,李学武,刘震.天灸抗小鼠移植性肿瘤作用及对免疫功能的影响. *天津中医* 2001;18:30-31
- 娄海燕,张世玲.胃安康对荷瘤小鼠免疫功能的影响. *山东中医杂志* 2002;21:354-355
- 高梅,王典瑞,陈芬.虎尿对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响. *辽宁中医杂志* 1999;26:88
- 虞冠华,龙娜,施凤霞,许洋裕,丁树标,罗丽华.MTT法快速测定TNF活性. *细胞生物学杂志* 1994;1:48
- 邱世翠,李波清,李海滨,刘金荣.黄芪对小鼠淋巴细胞增殖和IL-2产生的影响. *滨州医学院学报* 2000;23:232-233
- 包牧莹,梁秀宇,关洪全.当归与黄芪不同比例配伍对小鼠T细胞亚群及IL-2的影响. *中国公共卫生* 2000;16:784-785
- 肖正明,宋景贵,徐朝晖,张少燕,姜世明.黄芪水提物对体外培养人肝癌细胞增殖及代谢的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:46-48
- 梅洁.补中益气汤有助于提高人体抵抗力. *国外医学中医中药分册* 2001;23:320
- 吴宗群,解建国.补中益气汤提高机体免疫力的实验研究进展. *中成药* 2002;24:62-64
- 翟佳,周晓红,张雪静.补中益气汤的研究概况. *中华实用中西医杂志* 2004;4:2935-2936
- 熊杰,张果忠摘译.补中益气汤与克拉霉素并用治疗原发性非小细胞肺癌. *国外医学中医中药分册* 2001;23:293-294
- Xu Q, Wang JH, Wang RJ, Liu XQ, Chen ZX, Wu YL, Du Q, Tang HQ. Effect of Buzhong Yiqi decoction on gastrin receptor in gastric parietal cells and its associated mechanisms of invigorating spleen in spleen-deficiency rats. *Chine J Clinical Rehabil* 2004;8:2986-2987
- 怪坤摘译.补中益气汤、济生肾气丸对高血压大鼠神经-内分泌-免疫系统的调节作用. *国外医学中医中药分册* 2004;26:172-173
- 郭华,曲瑞瑶,常延侯,孟阳,李利生,王伟,曾文红,曲柏林.实验性脾虚证大鼠回肠电-机械活动变化与P物质及血管活性肠肽的关系研究. *浙江中医杂志* 2001;36:389-391
- 孟阳,曲瑞瑶,李梦燕,刘学宗.实验性脾虚证结肠动力及胃肠肽和一氧化氮合酶改变. *世界华人消化杂志* 2000;8:933-935
- 陈嘉屿,聂丹丽,张方信,吴红梅.肝郁脾虚大鼠模型胃肠动力障碍的机制. *世界华人消化杂志* 2001;9:106-107
- 任平,黄熙,李月彩,刘芳,张莉,王丽丽,封吉化.脾虚证大鼠组织和血浆中SS, CCK, Mot含量的变化. *世界华人消化杂志* 2000;8:436-438
- 米娜,吴敏毓,孙卫民.拆方研究补中益气汤中黄芪甘草及全方的免疫调节作用. *皖南医学院学报* 2002;21:13-15
- Roach DR, Bean AGD, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 2002;168:4620-4627
- Smith S, Liggitt D, Jeromsky E, Tan X, Skerrett SJ, Wilson CB. Local role for tumor necrosis factor alpha in the pulmonary inflammatory response to mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun* 2002;70:2082-2089
- Bekker LG, Moreira AL, Bergtold A, Freeman S, Ryffel B, Kaplan G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infect Immun* 2000;68:6954-6961
- Mizoguchi E, Mizoguchi A, Takedatsu H, Cario E, de Jong YP, Ooi CJ, Xavier RJ, Terhorst C, Podolsky DK, Bhan AK. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 2002;122:134-144
- 灿华,陈万涛,张志愿.NK细胞抗肿瘤免疫效应机制研究进展. *国外医学肿瘤学分册* 2004;31:486-489
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001;19:197-223
- Jie HB, Sarvetnick N. The role of NK cells and NK cell receptors in autoimmune disease. *Autoimmunity* 2004;37:147-153
- Parolini S, Bottino C, Falco M, Augugliaro R, Giliani S, Franceschini R, Ochs HD, Wolf H, Bonnefoy JY, Biassoni R, Moretta L, Notarangelo LD, Moretta A. X-linked lymphoproliferative disease. B24 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med* 2000;192:337-346
- 田志刚,孙沛, Murphy WJ. NK细胞用于肿瘤免疫治疗的研究进展. *中华微生物学和免疫学杂志* 2001;21:239-240
- 王成龙,谭家麟.直肠癌患者外周血NK细胞和T淋巴细胞亚群数目的变化及其临床意义. *中国普通外科杂志* 2001;10:228-230
- 田中伟,宋向凤,彭振辉.生殖器疱疹患者治疗前后血清IL-2/IFN-γ水平及NK/LAK细胞活性的变化. *细胞与分子免疫学杂志* 2004;20:217-218
- 逯晓辉,张松岩,曲书强,张华,王丽群,张凤蕴.哮喘患儿血白细胞介素-2、10、13检测的临床意义. *实用儿科临床杂志* 2004;19:115-116
- 张赞,韩卫宁,贾卫,曹云新,金伯泉.IL-2、IL-15对NK细胞亚群表型和功能的调节作用. *免疫学杂志* 2004;20:6-9
- 蒋虹,胡宏,魏启欧.双歧杆菌LTA上调ICAM-1表达及其在LAK抗肿瘤中的作用. *免疫学杂志* 2000;16:429-431
- Yannelli JR, Wroblewski JM. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy. *Vaccine* 2004;23:97-113

心理应激对小鼠小肠运动及血浆、小肠组织中生长抑素和 P 物质的影响

曹曙光, 夏宣平, 王文星, 郑君杰, 薛战雄

曹曙光, 夏宣平, 王文星, 郑君杰, 薛战雄, 温州医学院附属第二医院消化科 浙江省温州市 325027

曹曙光, 男, 1975-12-21 生, 汉族, 浙江省瑞安市人, 2004 年皖南医学院硕士, 医师。

通讯作者: 曹曙光, 325027, 浙江省温州市学院西路 109 号, 温州医学院附属第二医院消化科。letous2002@163.com

电话: 0577-88861853

收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-01-20

Effects of psychological stress on small intestinal motility, somatostatin and substance P levels in plasma and small intestine in mice

Shu-Guang Cao, Xuan-Ping Xia, Wen-Xing Wang, Jun-Jie Zheng, Zhan-Xiong Xue

Shu-Guang Cao, Xuan-Ping Xia, Wen-Xing Wang, Jun-Jie Zheng, Zhan-Xiong Xue, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Shu-Guang Cao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China. letous2002@163.com

Received: 2005-01-06 Accepted: 2005-01-20

Abstract

AIM: To investigate the effects of psychological stress on small intestinal motility and the expression of somatostatin (SS) and substance P (SP) in plasma and small intestine, and to explore the relationship between small intestinal motor disorders and gastrointestinal hormones under psychological stress.

METHODS: Thirty-six mice were randomly divided into psychological stress group and control group. An animal model with psychological stress was established by housing the mice with a hungry cat in separate layers of a two-layer cage. A semi-solid colored marker (carbon-ink) was used for monitoring small intestinal transit. SS and SP levels in plasma and small intestine in mice were measured by radioimmunoassay (RIA).

RESULTS: Small intestinal transit was inhibited ($52.2 \pm 19.2\%$ vs $70.2 \pm 17.8\%$, $P < 0.01$) in mice after psychological stress, compared with the controls. Plasma and small intestinal SS levels in psychological stress mice were significantly

higher than those in the control group (128 ± 36 ng/L vs 91 ± 31 ng/L, $P < 0.05$; 203 ± 41 ng/g vs 150 ± 35 ng/g, $P < 0.01$). Small intestinal SP levels in psychological stress mice were significantly lower than those in the control group (1.07 ± 0.29 μ g/g vs 1.45 ± 0.34 μ g/g, $P < 0.01$), whereas plasma SP concentrations were not significantly different between both groups (21.6 ± 7.8 ng/L vs 26.7 ± 8.5 ng/L, $P > 0.05$). There was significantly negative correlation between small intestinal transit and SS level in intestine ($r = -0.664$, $P < 0.05$), but positive correlation between small intestinal transit and SP level in small intestine ($r = 0.764$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Psychological stress inhibits the small intestinal transit, probably by up-regulating SS and down-regulating SP expression in small intestine.

Key Words: Psychological stress; Intestinal motility; Somatostatin; Substance P

Cao SG, Xia XP, Wang WX, Zheng JJ, Xue ZX. Effects of psychological stress on small intestinal motility, somatostatin and substance P levels in plasma and small intestine in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):967-970

摘要

目的: 通过观察心理应激对小鼠小肠推进运动的影响, 同时测定血浆和小肠组织中 P 物质(substance P, SP)和生长抑素(somatostatin, SS)水平的变化, 探讨心理应激后小肠动力紊乱及其机制。

方法: 用猫恐吓鼠的方法制备心理应激模型。用碳素墨水肠道染色法观察小肠运动, 以碳素墨水在小肠中移行距离占整段小肠长度的百分比, 其作为小肠推进百分率来观察小肠推进运动功能。用放射免疫法测定血浆和小肠组织中 SS 及 SP 浓度。

结果: 心理应激后小肠推进运动明显受抑($52.2 \pm 19.2\%$ vs $70.2 \pm 17.8\%$, $P < 0.01$)。应激组小鼠血浆和小肠组织中 SS 浓度较对照组明显升高(128 ± 36 ng/L vs 91 ± 31 ng/L, $P < 0.05$; 203 ± 41 ng/g vs 150 ± 35 ng/g, $P < 0.01$)。应激组小鼠小肠组织中 SP 浓度较对照组明显下降(1.07 ± 0.29 μ g/g vs 1.45 ± 0.34 μ g/g, $P < 0.01$), 而血浆中 SP 浓度二者相比较无显著差异(21.6 ± 7.8 ng/L vs 26.7 ± 8.5 ng/L, $P > 0.05$)。

小鼠小肠推进百分率与小肠组织中 SS 含量呈负相关 ($r = -0.664$, $P < 0.05$), 与小肠组织中 SP 含量呈正相关 ($r = 0.764$, $P < 0.05$).

结论: 心理应激后小肠推进运动延缓, 其改变很可能与小肠组织中 SS 和 SP 含量变化有密切联系.

关键词: 心理应激; 小肠运动; 胃动素; P 物质

曹曙光, 夏宣平, 王文星, 郑君杰, 薛战雄. 心理应激对小鼠小肠运动及血浆、小肠组织中生长抑素和 P 物质的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(8):967-970 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/967.asp>

0 引言

近年来, 随着社会的发展及各方面竞争压力的增加, 来源于社会的精神心理因素的应激对人类健康的影响越来越强烈, 并成为重要的应激原. 精神心理应激可引起胃肠道功能紊乱, 一些胃肠疾病的患者如肠易激综合征、功能性消化不良, 在遭受精神心理应激后能使腹痛、腹胀等胃肠道症状加重^[1-2]. 大量研究表明, 精神心理应激引起胃排空延迟^[3-4]和促进结肠运动^[5-6], 但对小肠运动的影响目前研究尚少. 且目前报道的有关精神心理应激的研究, 如冷应激、束缚应激、电击足底应激、强迫游泳应激等并非真正独立的精神心理应激, 均涉及躯体应激方面^[7-9]. 机体遭受应激后, 通过中枢和周围神经系统影响胃肠激素的释放, 对胃肠道运动进行调节^[10]. 一般认为, 生理状态下, P 物质(SP)促进小肠运动^[11-12], 而生长抑素(SS)抑制小肠运动^[13], 但在精神心理应激状态下, 他们是否参与调节小肠运动及作用如何, 研究较少. 我们通过动物实验了解应激后 SS、SP 的释放量及其与小肠运动变化的可能联系, 进一步探讨胃肠激素在精神心理应激所致小肠动力紊乱中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 雄性小鼠 36 只, 体重 20-30 g, 购于江宁青龙山实验动物所. SP 及 SS 放免试剂盒由北京海科锐生物技术中心提供.

1.2 方法 雄性小鼠 36 只, 随机分为应激组和对照组, 每组 18 只, 两组在相同条件下饲养, 自由饮食. 心理应激模型制备^[14-16]: 将应激组小鼠放入双层笼下层, 同时将一只饥饿的猫放入双层笼的上层, 使猫与鼠无生理性接触 10 min 后取出, 每天 1 次, 持续 10 d. 对照组除不接触猫外, 其他处理程序与应激组相同^[7]. 在造模 10 d, 两组小鼠均禁食 24 h, 禁水 12 h, 每只小鼠给予碳素墨水 0.25 mL 灌胃, 25 min 后, 摘眼球取血放入含 EDTA 二钠 0.3 μ L 和抑肽酶 1 000 kU 的试管中, 并处死动物, 剖腹取出小肠(十二指肠始

端至回盲部), 记录碳素墨水在小肠中移行距离及整段小肠长度, 以碳素墨水在小肠中移行距离及整段小肠长度的百分比值, 其作为小肠推进百分率来评价小肠推进运动情况^[17-18]. 测量后用生理盐水冲净小肠内容物, 用吸水纸吸干水分后放置于干燥小瓶中. 试管中血液标本经混匀, 低温离心 10 min (3 000/min), 分离血浆, -70℃ 保存待测. 小肠组织放入生理盐水中, 煮沸 10 min, 用滤纸尽量吸干组织中水分, 用分析天平称质量后放置玻璃匀浆器内, 按比例加入 1 mol/L 冰醋酸(每 100 g 组织加 1 mol/L 冰醋酸 0.3 mL), 匀浆, 再加等体积 1 mol/L 氢氧化钠中和, 低温离心 30 min (3 000 r/min), 取上清液于 -70℃ 保存待测. 用放射免疫法测定血浆和小肠组织中 SS 及 SP 浓度.

统计学处理 结果用 mean \pm SD 表示, 用 *t* 检验确定结果的显著性 ($P < 0.05$). 并用直线回归分析二者相关性.

2 结果

2.1 小肠推进运动 碳素墨水灌胃 25 min 后, 应激组小肠推进百分率为 52.2 \pm 19.2%, 对照组小鼠为 70.2 \pm 17.8%, 应激组较对照组显著降低, 差异有显著性 ($n = 18$, $P < 0.01$), 提示应激后小鼠小肠推进运动功能明显延缓(表 1).

表1 小鼠应激后小肠推进运动的变化

分组	小肠全长(cm)	推进长度(cm)	小肠推进 %
对照	50.3 \pm 3.3	35.3 \pm 9.4	70.2 \pm 17.8
应激	52.2 \pm 6.2	27.4 \pm 10.1	52.2 \pm 19.2 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

2.2 SS 和 SP 含量 应激组小鼠小肠组织中 SS 含量较对照组小鼠显著升高 ($P < 0.01$); 血浆中 SS 含量较对照组亦明显升高 ($P < 0.05$). 应激组小鼠小肠组织中 SP 含量显著低于对照组小鼠 ($P < 0.05$); 而血浆中 SP 含量与对照组相比无显著差异性 ($P > 0.05$) (表 2).

表2 小鼠应激后小肠组织和血浆中 SS, SP 含量的变化(mean \pm SD)

分组	SS		SP	
	小肠(ng/g)	血浆(ng/L)	小肠(ug/g)	血浆(ng/L)
对照	150 \pm 35	91 \pm 31	1.45 \pm 0.34	26.7 \pm 8.5
应激	203 \pm 41 ^b	128 \pm 36 ^a	1.07 \pm 0.29 ^a	21.6 \pm 7.8

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

2.3 小肠推进与小肠组织 SS, SP 含量的相关性 应激组小鼠小肠推进百分率与小肠组织 SS 含量呈非常显

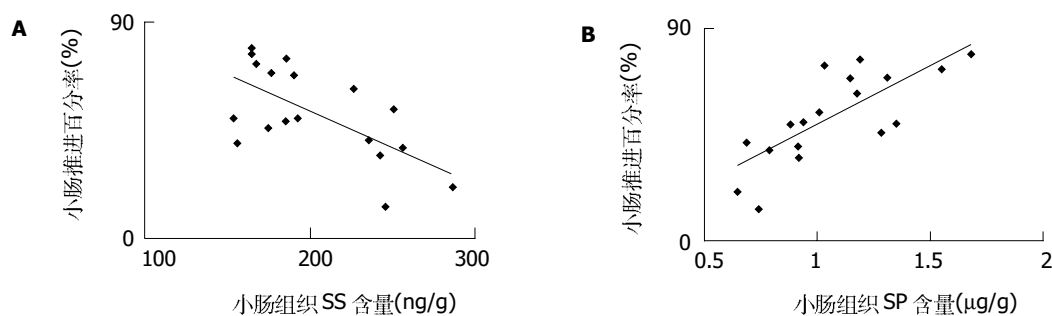


图1 应激组小肠推进百分率与小肠组织 SS 含量(A)和 sp 含量(B)的相关性.

著负相关($r = -0.644$, $P < 0.01$), 说明小肠组织中 SS 含量升高可能是小肠推进运动抑制的因素之一(图1A). 应激组小鼠小肠推进百分率与小肠组织 SP 含量呈非常显著正相关($r = 0.764$, $P < 0.01$), 提示小肠组织中 SP 含量下降可能是应激引起小鼠小肠推进运动延缓的因素之一(图1B).

3 讨论

有关精神心理应激与小肠运动功能的研究, 目前报道呈两种截然不同的结果, 且其中的病理生理学机制尚未完全明了. Ditto *et al*^[19]报道应激加快小肠推进运动, 缩短小肠转运时间. 而 Tsukada *et al*^[20]发现应激抑制小肠推进运动. 本实验研究结果与 Tsukada *et al* 相近, 发现应激状态下, 碳素墨水在小鼠小肠中移行距离较对照组明显缩短, 说明心理应激抑制小肠推进运动. 既往研究显示, 胃肠运动功能障碍性疾病(如肠易激综合征)的患者, 在遭受心理应激后, 可引起腹痛、腹胀等症状^[1], 这可能与应激抑制小肠推进运动功能, 导致肠道内气体不能有效地排出体外而过多在肠道滞留^[21], 而引发一系列临床症状. 本结果显示, 应激后小鼠小肠组织和血浆中 SS 含量较对照组明显升高, 提示 SS 可能参与心理应激后小肠动力紊乱的调节. SS 主要由胰岛、胃、肠黏膜中的 D 细胞分泌, 广泛地分布于胃肠道黏膜和中枢神经系统, 胃幽门区的 SS 浓度最高, 在十二指肠、空肠、胰腺也有很高的浓度, 在内脏神经的肠肌间和黏膜下神经丛含有 SS 阳性的神经元. 其受体在胃肠道内亦广泛分布. 在外周, 该激素为抑制性激素, 可抑制胃固体排空、抑制胃张力性收缩、减小进餐前后胃容量改变、延长小肠和结肠转运时间^[13]. SS 主要通过直接作用于肠道组织中生长抑素受体调节小肠推进运动. SS 还抑制促胃液素、胆囊收缩素、胃动素等胃肠激素的分泌; SS 对胃肠运动的抑制除直接作用外, 还可以抑制胃泌素引起的平滑肌细胞收缩活动^[22]. 综合上述一系列研究结果, 心理应激抑制小肠推进运动的可能机制: 应激状态下, 肠道组织和血浆中 SS 分泌增多, 后者通过血循环以内分泌形式作用于胃肠平滑肌

细胞相应的受体、经胃肠肽能神经释放递质对胃肠运动起调控作用、调节其他胃肠激素的释放, 而对小肠推进运动起抑制作用.

SP 作为一种重要的胃肠肽广泛地分布于肠神经系统和整个胃肠道^[23], 以空肠中含量较高, 既可以激素的形式亦可作为神经递质参与胃肠运动的调控. 大量的实验研究证明 SP 是胃肠运动调节中主要的兴奋性神经递质^[24-25], 对胃肠道的兴奋作用表现为对胃肠纵行肌和环行肌有双重的收缩效应: 包括直接的短时作用和紧随的由胆碱能神经释放 Ach 引起的长时作用. Jun *et al*^[26]发现 SP 通过 NK-1 受体作用于小肠环行肌中 Cajal 细胞, 影响小肠移行性复合运动(MMC)发生频率, 发挥对小肠运动的调节作用. 我们发现, 心理应激后小肠组织中 SP 含量较对照组明显降低, 而血浆中含量二者无显著差异, 说明应激后小肠推进运动的减慢可能与小肠组织中 SP 含量降低有关. Naslund *et al*^[27]亦报道血浆中 SP 含量不随 MMC 各时相发生周期性变化, 而 MMC III 相或 III 相前小肠中 SP 浓度出现峰值, 这与本实验研究结果相一致. 这些实验结果说明, 心理应激后小肠推进运动的改变, 可能与应激影响肠腔内 SP 释放来调节小肠运动有关. 本结果提示, 心理应激后小肠组织中某些胃肠肽的释放, 可能是导致小肠动力紊乱的主要因素之一, 但以下问题尚需进一步研究解决: (1) 应激是怎样影响小肠组织中胃肠肽的释放; (2) 小肠组织中胃肠肽通过什么途径调节应激后小肠动力紊乱.

总之, 心理应激后小肠推进运动的抑制, 与小肠组织中 SP 减少, 血浆和小肠组织中 SS 升高有密切关联, 而血浆中 SP 含量的变化不明显, 其是否参与应激后小肠动力紊乱的调节, 有待更进一步研究.

4 参考文献

- 1 Mayer EA, Naliboff BD, Chang L, Coutinho SV. Stress and irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G519-24
- 2 Mayer EA, Craske M, Naliboff BD. Depression, anxiety, and the gastrointestinal system. *J Clin Psychiatry* 2001;62(Suppl 8):28-36
- 3 Tsukada F, Nagura Y, Abe S, Sato N, Ohkubo Y. Effect of restraint and footshock stress and norepinephrine treatment

- on gastric emptying in rats. *Biol Pharm Bull* 2003;26:368-370
- 4 Mistiaen W, Blockx P, Van Hee R, Bortier H, Harrison F. The effect of stress on gastric emptying rate measured with a radionuclide tracer. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1457-1460
- 5 Martinez V, Tache Y. Role of CRF receptor 1 in central CRF-induced stimulation of colonic propulsion in rats. *Brain Res* 2001;893:29-35
- 6 Maillot C, Million M, Wei JY, Gauthier A, Tache Y. Peripheral corticotropin-releasing factor and stress-stimulated colonic motor activity involve type 1 receptor in rats. *Gastroenterology* 2000;119:1569-1579
- 7 Tsukada F, Sugawara M, Kohno H, Ohkubo Y. Evaluation of the effects of restraint and footshock stress on small intestinal motility by an improved method using a radionuclide, ^{51}Cr , in the rat. *Biol Pharm Bull* 2001;24:488-490
- 8 Dai Y, Liu JX, Li JX, Xu YF. Effect of pinaverium bromide on stress-induced colonic smooth muscle contractility disorder in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:557-561
- 9 颜军, 尹剑春, 孙开宏, 顾晓明. 强迫游泳和冷刺激对大鼠白细胞介素和 β -内啡肽的影响. *中国心理卫生杂志* 2002;16:811-813
- 10 Monnikes H, Tebbe JJ, Hildebrandt M, Arck P, Osmanoglou E, Rose M, Klapp B, Wiedenmann B, Heymann-Monnikes I. Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Dig Dis* 2001;19:201-211
- 11 Li LS, Qu RY, Wang W, Guo H. Significance of changes of gastrointestinal peptides in blood and ileum of experimental spleen deficiency rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:553-556
- 12 Linard C, Marquette C, Strup C, Aigueperse J, Mathe D. Involvement of primary afferent nerves after abdominal irradiation: consequences on ileal contractile activity and inflammatory mediator release in the rat. *Dig Dis Sci* 2003;48:688-697
- 13 Foxx-Orenstein A, Camilleri M, Stephens D, Burton D. Effect of a somatostatin analogue on gastric motor and sensory functions in healthy humans. *Gut* 2003;52:1555-1561
- 14 沈雁, 匡调元, 张伟荣. “恐伤肾”的实验研究. *中国医药学报* 1991;6:13-16
- 15 王米渠, 吴斌, 王刚, 冯刚, 李炜弘, 高泓, 袁世宏. “恐伤肾”模型的深入研究问题. *福建中医药* 2002;33:1-2
- 16 王庆松, 张建华. 捕食应激对大鼠行为及空间学习记忆的影响. *中华精神科杂志* 2001;34:180-183
- 17 王少根, 陈侠英, 王立基, 汪昌荣, 徐凡. 严重烫伤休克期肠道运动功能的改变及意义. *中国中西医结合脾胃杂志* 2000;8:80-82
- 18 孙维峰, 徐伟, 王小春, 韦嵩, 罗晓艳, 肖登岩. 升降汤对小鼠胃肠蠕动及胃肠激素的影响. *安徽中医学院学报* 2002;21:45-47
- 19 Ditto B, Miller SB, Barr RG. A one-hour active coping stressor reduces small bowel transit time in healthy young adults. *Psychosom Med* 1998;60:7-10
- 20 Tsukada F, Sawamura K, Kohno H, Ohkubo Y. Mechanism of inhibition of small intestinal motility by restraint stress. Differs from that with norepinephrine treatment in rats. *Biol Pharm Bull* 2002;25:122-124
- 21 Serra J, Azpiroz F, Malagelada JR. Impaired transit and tolerance of intestinal gas in the irritable bowel syndrome. *Gut* 2001;48:14-19
- 22 Wang L, Zhou L. The signal transduction pathway involved in the effects of brain-gut peptides on gastrointestinal smooth muscle cells. *Jichu Yixue Yu Linchuang* 1999;19:122-125
- 23 Maake C, Kloas W, Szendefi M, Reinecke M. Neurohormonal peptides, serotonin, and nitric oxide synthase in the enteric nervous system and endocrine cells of the gastrointestinal tract of neonatal and thyroid hormone-treated axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Cell Tissue Res* 1999;297:91-101
- 24 Wheatley JM, Hutson JM, Chow CW, Oliver M, Hurley MR. Slow-transit constipation in childhood. *J Pediatr Surg* 1999;34:829-832
- 25 Lordal M, Theodorsson E, Hellstrom PM. Tachykinins influence interdigestive rhythm and contractile strength of human small intestine. *Dig Dis Sci* 1997;42:1940-1949
- 26 Jun JY, Choi S, Yeum CH, Chang IY, You HJ, Park CK, Kim MY, Kong ID, Kim MJ, Lee KP, So I, Kim KW. Substance P induces inward current and regulates pacemaker currents through tachykinin NK1 receptor in cultured interstitial cells of Cajal of murine small intestine. *Eur J Pharmacol* 2004;495:35-42
- 27 Naslund E, Backman L, Theodorsson E, Hellstrom PM. Intraduodenal neuropeptide levels, but not plasma levels, vary in a cyclic fashion with the migrating motor complex. *Acta Physiol Scand* 1998;164:317-323

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年第四次全国幽门螺杆菌学术会议征文通知

本刊讯 由中华医学会消化病学分会主办, 湖南省医学会、湖南省医学会消化病学专业委员会承办的第四次全国幽门螺杆菌学术会议定于2005-10月中旬在湖南省长沙市召开, 现将征文通知公布如下:

1 内容

文章内容包括: 幽门螺杆菌流行病学及其他传播途径、幽门螺杆菌的致病机理及其分子机制、幽门螺杆菌相关性疾病的研究、幽门螺杆菌与胃肠道外疾病、幽门螺杆菌与胃癌的研究进展、幽门螺杆菌诊治进展、幽门螺杆菌耐药研究进展。

2 论文寄送地址

湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院消化科 袁伟健教授 收; 邮编: 410008. 电话: 0731-4327106, 4327282. 请在信封上注明“全国幽门螺杆菌会议征文”。

高胆固醇兔胆管括约肌细胞钙代谢与钙振荡变化关系

马克军, 魏经国, 王亚蓉, 张孝勇, 王春梅, 黄晓峰, 陈 丹

马克军, 魏经国, 王亚蓉, 张孝勇, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科 陕西省西安市 710038
王春梅, 黄晓峰, 陈丹, 中国人民解放军第四军医大学电镜室 陕西省西安市 710032
马克军, 男, 1974-09-13 生, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 汉族. 2002 年第四军医大学硕士研究生, 主要从事胆系疾病的分子病理学研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30470787
通讯作者: 魏经国, 710038, 陕西省西安市霸桥区新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科. konghouyin@yahoo.com.cn
电话: 029-83377584 传真: 029-83377163
收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-03

Relationship between calcium metabolism and calcium oscillation of Oddi's sphincter in hypercholesterolemic rabbits

Ke-Jun Ma, Jing-Guo Wei, Ya-Rong Wang, Xiao-Yong Zhang, Chun-Mei Wang, Xiao-Feng Huang, Dan Chen

Ke-Jun Ma, Jing-Guo Wei, Ya-Rong Wang, Xiao-Yong Zhang, Department of Radiology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shannxi Province, China
Chun-Mei Wang, Xiao-Feng Huang, Dan Chen, Department of Electron Microscope, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30470787
Correspondence to: Jing-Guo Wei, Department of Radiology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shannxi Province, China. konghouyin@yahoo.com.cn
Received: 2005-02-14 Accepted: 2005-03-03

Abstract

AIM: To investigate the effect of hypercholesterolemia on calcium oscillation of acutely separated rabbit Oddi's sphincter muscle cells and to explore its mechanisms.

METHODS: Twenty-four New Zealand female rabbits were divided randomly into control group and HC group (12 rabbits each). Sphincter of Oddi's muscle cells were acutely isolated and cultured. The cells were loaded with Fluo-3/AM, and the changes in calcium oscillation were measured by laser scanning confocal microscopy.

RESULTS: Compared with the control group, the amplitude of the Ca^{2+} oscillation fluorescence intensity was significantly increased in the experimental group (6.11 ± 3.1 vs 3.61 ± 0.94 , $P < 0.05$). When treated with nifedipine and EDTA, Ca^{2+} oscillation amplitude in hypercholesterolemic group was decreased by 64% to 2.24 ± 0.72 . When treated with thapsigargin, it was decreased by 38% to 3.8 ± 1.9 .

CONCLUSION: Calcium metabolic disturbance in Oddi's sphincter muscle cells of hypercholesterolemic rabbits may be caused by the malfunctioned CICR pathway of L-type voltage-dependent calcium channels.

Key Words: Hypercholesterolemia; Sphincter of Oddi; Rabbits; Calcium metabolism; Calcium oscillation;

Ma KJ, Wei JG, Wang YR, Zhang XY, Wang CM, Huang XF, Chen D. Relationship between calcium metabolism and calcium oscillation of Oddi's sphincter in hypercholesterolemic rabbits. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(8):971-974

摘要

目的: 在急性分离的胆管括约肌(sphincter of Oddi, SO)细胞上, 观察高胆固醇血症对 SO 细胞内钙振荡的影响变化及其机制。

方法: 新西兰雌兔 24 只随机分成两组: 对照组和高胆固醇血症模型组各 12 只, 以 fluo-4/AM 荧光指示剂负载急性分离的 SO 细胞, 应用激光共聚焦扫描显微镜检测细胞钙振荡的变化。

结果: 高胆固醇血症组兔的 SO 细胞钙荧光强度振荡的幅度为 6.11 ± 3.1 , 正常组兔为 3.61 ± 0.94 。当加入硝苯地平及 EDTA 后试验组钙荧光强度振荡幅度减小到 2.24 ± 0.72 , 下降了 64%。当加入 thapsigargin 后, 模型组钙荧光强度振荡幅度减小到 3.8 ± 1.9 , 下降了 38%。

结论: 高胆固醇兔 L-型电压依赖钙通道异常开放通过 CICR 途径所致 SO 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 代谢紊乱是钙振荡物理学特征改变的分子生物学基础。

关键词: 高胆固醇; 胆管括约肌; 兔; 钙代谢; 钙振荡

马克军, 魏经国, 王亚蓉, 张孝勇, 王春梅, 黄晓峰, 陈丹. 高胆固醇兔胆管括约肌细胞钙代谢与钙振荡变化关系. 世界华人消化杂志 2005;13(8):971-974
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/971.asp>

0 引言

Oddi 括约肌(sphincter of Oddi, SO)的动力异常在胆系疾病的发生中起着重要的作用^[1-8]。高胆固醇(cholesterol, Ch)血症下 SO 动力受损^[9], 表现为收缩幅度下降, 舒张不良, 呈痉挛样改变^[10-11], 即 SO 功能紊乱(sphincter of Oddi dysfunction, SOD)^[12-14]。

进一步研究发现高Ch血症兔SO细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 呈超载状态. 这表明细胞内钙离子代谢紊乱与SOD有密切关系. 已知细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度变化是钙振荡产生的物质基础, 但是有关细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 超载状态下钙振荡的物理特征有无变化未见报道. 我们运用激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)观测细胞内钙振荡的变化, 探讨高Ch血症所致兔SO细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 超载时SO细胞内钙信号变化特征及其发生机制.

1 材料和方法

1.1 材料 纯种新西兰雌兔24只, 2-3 mo, 体质量2.0-2.5 kg, 第四军医大学实验动物中心提供, 随机分为2组, 每组12只. 对照组给予标准饲料; 实验组给予标准饲料+Ch. Ch(上海化学试剂公司, 分析纯99.8%)每日1 g, 每周喂6 d, 停喂1 d, 共8 wk. 高Ch血症模型判定标准[人类疾病的动物模型1982:120-129]: 兔血清总Ch浓度 <3.0 mmol/L正常, >10 mmol/L达到高Ch血症标准. 实验开始前将血清总Ch >3.0 mmol/L兔剔除. 2 g/L I型胶原酶消化液: I型胶原酶用200 mL/L小牛血清RPMI1640培养液溶解, pH 7.2, 过滤除菌. 小牛血清、RPMI1640、胶原酶I型、硝苯吡啶(nifedipine Nif)、EGTA(美国Sigma公司)、Thapsigargin(Tha)、Fluo-3/AM(美国Molecular Probe)、NaCl、KCl、NaHCO₃、MgCl₂、NaH₂PO₄、葡萄糖二甲基亚砷(DMSO)分析纯(西安化学试剂厂). LSCM为美国BioRad MRC-1024. 电子天平ACA-100型(美国Denver公司); 解剖显微镜PM-6型(日本Olympus公司).

1.2 方法

1.2.1 SO细胞培养及鉴定 耳缘静脉注入空气约10 mL处死, 无菌分离SO段, 切除乳头部及近段, 刮除浆膜及结缔组织, 纵形切开SO段, 刮去黏膜组织, 培养液冲洗2次. 剪成约1-2 mm³左右小块, 移入无菌容器, 加入3-5倍1 g/L I型胶原酶溶液, 37℃消化约10 h, 见组织块变小至几乎看不见, 原澄清液变混悬液, 获得大量梭形平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)后终止消化. 常规法用200 mL/L小牛血清RPMI1640培养液, 制成细胞悬液. 将消化细胞接种在无菌盖玻片(18 mm×18 mm)上, 置于50 mL/L CO₂ 孵箱内约24 h, 待细胞黏附后取出. PBS液冲洗5 min, 95%乙醇固定30 min, 再用PBS冲洗5 min, 晾干, 留做免疫组化染色. α -actin染色, 用Elivision二步法免疫组化试剂盒.

1.2.2 激光扫描共聚焦显微镜观察 将丹麦产50 mm塑料细胞培养皿正中打一直径10 mm圆形孔洞, 用22 mm²盖玻片从外部封严, 消毒, 制备测试皿. 将

细胞悬液按常规方法接种到皿盖玻片上, 置50 mL/L CO₂ 恒温孵箱, 37℃静置培养1-2 d, 待SO细胞黏附. 用二甲基亚砷(DMSO)溶解fluo-3/AM, 浓度885 μ mol/L, D-Hanks液稀释至fluo-3/AM终浓度为8.5 μ mol/L, 制备fluo-3/AM负载液. 将细胞培养液弃去, PBS液冲洗10 min, 在皿中央孔内加入fluo-3/AM负载液约70 μ L, 37℃孵箱负载30 min, PBS液漂洗10 min. 应用Compaq Pentium 90计算机, 围绕单个SMC行X、Y轴扫描, 测量胞内fluo-3/AM荧光强度, 同时在细胞外作背景钙测量. 图像采集物镜镜头为Plan Neofluar 40×油浸镜头, 数值孔径(Numerical Aperture)1.2, 采样速率12帧/min, 像素矩阵512×512, 激发波长506 nm, 发射荧光波长526 nm. 每个标本随机选取8个细胞, 连续观察10 min, 记录细胞内钙离子浓度动态变化.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 进行t检验, $P<0.05$ 为差异显著.

2 结果

2.1 兔SO细胞的钙振荡 对照组共测量12只动物96个细胞, 正常兔SO细胞存在小幅度钙振荡, 细胞基础钙荧光强度为 36.4 ± 6.2 . 细胞钙荧光强度振荡幅度为 3.61 ± 0.94 , 频率为 6 ± 2 次/min(图1). 高胆固醇血症兔SO细胞测量12只动物, 每只动物随机测量8个细胞. 细胞基础钙荧光强度为 44.3 ± 2.05 . 在测量的96个细胞中, 75个细胞钙振荡发生了改变, 占总数的78%. 与正常组相比较, 表现为钙荧光强度振荡的幅度增大, 为 6.11 ± 3.1 , 波形表现为尖峰型($P<0.05$), 振幅大小不均, 频率为 9 ± 2.1 次/min(图2). 另外21个细胞钙振荡没有变化, 占总数的22%, 表现与正常细胞的钙振荡波形相仿.

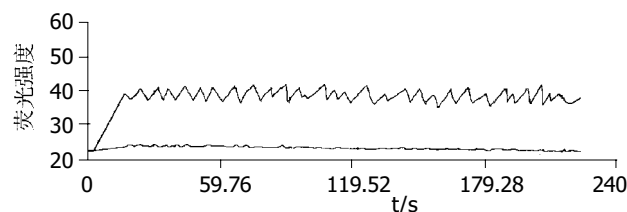


图1 正常兔SO细胞的钙振荡.

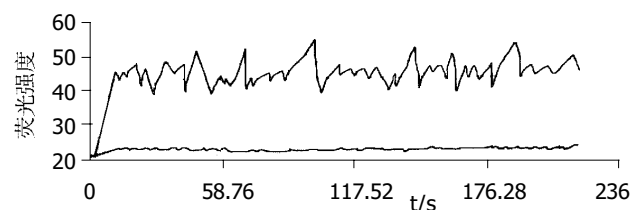


图2 高胆固醇血症兔SO细胞的钙振荡.

2.2 药物干预对兔SO细胞钙振荡的影响 对实验组钙振荡发生改变以2 mmol/L EGTA整合细胞外液

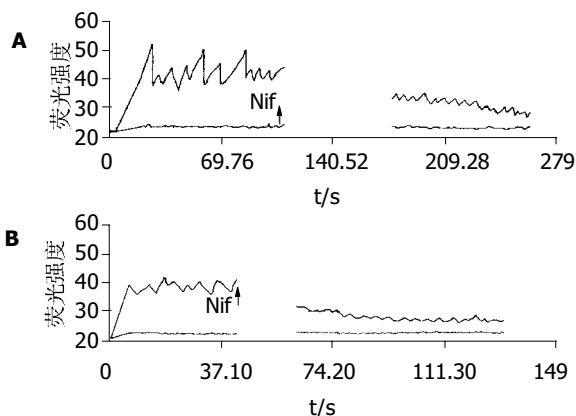


图3 硝苯地平对SO细胞钙振荡的影响. A: 试验组; B: 对照组.

的钙, 并加入硝苯地平(10^{-5} mol/L)后高耸的钙振荡的幅度变小, 由 6.11 ± 3.1 降低到 2.24 ± 0.72 , 下降了64%. 基础钙荧光强度降到35以下. 频率由 9 ± 2.1 次/min下降到 6 ± 1.3 次/min(图3A). 对照组同样以2 mmol/L EGTA 螯合细胞外液的钙, 并加入硝苯地平(10^{-5} mol/L), 发现基础钙荧光强度降到30以下, 钙振荡波近乎消失(图3B). 试验组未加入EDTA仅加入thapsigargin(10^{-7} mol/L)作用细胞, 耗竭细胞内钙库, 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 基础水平升高, 钙振荡幅度下降到 3.8 ± 1.9 , 下降了38%(图4A). 对照组同样仅加入thapsigargin(10^{-7} mol/L)作用细胞后, 亦表现为基础钙浓度的升高. 但是钙振荡的幅度为 3.56 ± 0.74 , 与加药前相比未见明显变化($P < 0.05$, 图4B).

2.3 钙振荡与SO细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的关系 对照组未加任何干扰因素时, SO细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度为 36.4 ± 6.2 . 细胞钙荧光强度振荡幅度为 3.61 ± 0.94 , 频率为 6 ± 2 次/min(图1)当基础钙荧光强度降到30以下, 钙振荡波近乎消失(图3B); 试验组未加干扰因素时, 基础钙荧光强度为 44.3 ± 2.05 , 振荡的幅度 6.11 ± 3.1 , 频率为 9 ± 2.1 次/min(图2), 当基础钙荧光强度降到35以下, 钙振荡的幅度降低到 2.24 ± 0.72 (图3A). 钙振荡的物理特征与SO细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度变化呈正相关($\gamma = 0.847$), 当细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度在40以上时, 钙振荡的物理特征发生明显异常(图2).

3 讨论

平滑肌的收缩和舒张有赖于平滑肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高和降低, 当肌质中 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 激活CaM, Ca^{2+} ·CaM继而与肌球蛋白轻链激酶结合为三元体而使其活化, 平滑肌细胞收缩. 当 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的下降后, CaM失活, 平滑肌细胞舒张. 可见平滑肌组织运动相互协调一致、舒缩有序的功能的调节有赖于钙信号的传递. 钙振荡(calcium oscillation)作为细胞内钙信号

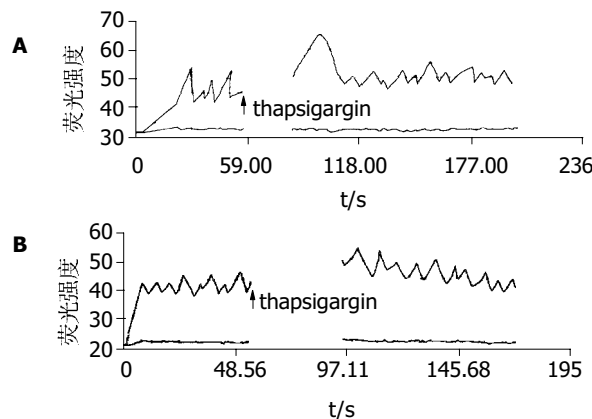


图4 thapsigargin对SO细胞钙振荡的影响. A: 试验组; B: 对照组.

的一种表现方式^[15-17], 是指细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 变化呈周期性波动性升降. 以编码形式反映细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 变化的钙振荡, 可以在细胞间传播^[18]. 已经证实平滑肌钙振荡与平滑肌的周期性舒缩密切相关^[19], 是胃肠道平滑肌产生有节律的活动的重要的调节信使^[20]. 同样血管平滑肌钙振荡也影响血管舒张和收缩, 调节血流和阻力^[21]. 上述研究提示细胞钙振荡是调节平滑肌运动功能重要的信号转导机制之一. 本实验证实, 兔SO细胞也存在有钙振荡现象, 钙振荡的物理特征与细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 基础浓度有关. 无论对照组还是试验组钙振荡的波幅都随SO细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的变化而变化, 且其波动幅度与细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度正相关. 伴随SO细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的下降, 试验组钙振荡波幅不仅降低, 而且振荡频率也减慢. 正常组SO细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度在荧光强度35左右时, 钙振荡波幅呈周期样变化, 表现为在较为恒定的 $[Ca^{2+}]_i$ 基础上产生规律波动的曲线. 而试验组细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 基础钙荧光强度大于40, 其钙振荡则呈现为不规则的高大波幅的波形. 值得注意的是试验组SO细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 基础水平升高, 钙振荡的幅度比正常组的幅度增大, 波形大小不一. 鉴于钙振荡是以编码形式传递细胞钙信号的主要形式, 本组试验结果似提示, 试验组SO细胞内钙振荡所传递的细胞功能的调节信息必然也是紊乱且不规则. 试验组SO细胞内钙振荡波幅的极不规律性与SO功能紊乱的压力曲线十分相似^[10]. 以上变化显然与高胆固醇血症兔SO细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 基础水平异常增高密切相关, SO细胞内钙基础水平升高, 钙振荡的幅度增大, 这可能是SO细胞处于易激惹状态的基础^[22]. 但是随着细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 超载状态的改善, 钙振荡物理特征可恢复正常, 因此从钙信号调控角度分析似乎提示高CH兔SOD是一种可逆性的功能性疾病.

正常细胞钙离子代谢主要通过胞膜L-型电压依赖型钙通道完成, 细胞膜处于去极化状态L-型钙通道则开放, 细胞外 Ca^{2+} 内流, 并由此通过“钙诱导的

钙释放”途径使肌浆网内的 Ca^{2+} 进入胞质, 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度迅即升高. 当细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上升到一定的阈值, 细胞质膜 Kca 通道激活, 细胞内 $[\text{K}^+]_i$ 外流致膜电位处于超极化状态, L-型钙通道失活而关闭, 细胞内钙离子被钙泵泵出胞外和泵入钙库内, 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度下降, 进而产生钙振荡. 但不同组织的平滑肌细胞钙振荡的发生机制并不尽相同. Nakayama *et al*^[20] 研究发现, 胃肠道平滑肌的钙振荡是由细胞内钙释放和外钙内流共同作用产生的, Kannan *et al*^[23] 发现气管平滑肌细胞的乙酰胆碱诱发的钙振荡中内质网通过 RyR 通道释放钙起关键作用. Satoh *et al*^[24] 研究发现钙振荡的幅度在于 L-型钙通道的活性, 通过钙内流增加调节钙振荡. 本研究显示, 当正常组细胞外液内的钙离子去除后, 同时应用钙通道阻断剂, 随着细胞内钙浓度的下降钙振荡消失; 当正常组细胞外液中仅加入 thapsigargin, 阻断内质网钙泵, 耗竭钙库, 细胞内基础钙浓度升高, 钙振荡幅度没有明显变化. 当试验组细胞外液中的钙离子去除后, 同时应用钙通道阻断剂, 结果显示高胆固醇血症兔 S0 细胞的钙振荡的幅度随着基础钙浓度的下降而降低了 64%. 当细胞外液中仅加入 thapsigargin, 阻断内质网钙泵, 耗竭钙库后, 钙振荡的幅度也有减低, 仅为 38%. 由此可知, 高胆固醇血症使细胞膜上 Kca 通道的功能发生异常改变^[25-27], 经 L-型 Ca^{2+} 通道 Ca^{2+} 内流增加, 使细胞钙代谢失衡, 通过 CICR 途径过度激发细胞内钙库钙释放, 破坏 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 稳态^[28-29], 致使 S0 细胞钙振荡物理特征发生变化, 成为导致 SOD 的发生的钙信号调节失衡的分子生物学基础.

4 参考文献

- Wei JG, Du F, Wang YC, Wang W. An experimental study of hypercholesterolemia-induced disorder of Oddi's sphincter. *Chin J Pathophysiol* 2000;16:446-450
- 陈仕珠. 胆道系统运动调节及功能性胆道运动异常的诊治. *世界华人消化杂志* 2003;11:613-618
- Sari R, Palvolgyi A, Rakonczay Z Jr, Takacs T, Lonovics J, Czako L, Szilvassy Z, Hegyi P. Ethanol inhibits the motility of rabbit sphincter of Oddi in vitro. *World J Gastroenterol* 2004;10:3470-3474
- Li GC, Yuan CH, Cheng Y, Liu YF. Oddi sphincter function after canine auto-pancreas transplantation with bladder drainage. *World J Gastroenterol* 2003;9:2849-2852
- 杨春敏, 毛高平, 朱明, 张秀荣, 张映辉. 乙醇对清醒兔 Oddi 括约肌运动功能的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:653-657
- Lai KH. Sphincter of Oddi and acute pancreatitis: a new treatment option. *J Pancreas (online)* 2002;3:83-85
- Lai KH, Lo GH, Cheng JS, Fu MT, Wang EM, Chan HH, Wang YY, Hsu PI, Lin CK. Effect of somatostatin on the sphincter of Oddi in patients with acute non-biliary pancreatitis. *Gut* 2001;49:843-846
- Velosy B, Madacsy L, Szepes A, Pavics L, Csernay L, Lonovics J. The effects of somatostatin and octreotide on the human sphincter of Oddi. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:897-901
- Wang XJ, Wei JG, Wang CM, Wang YC, Wu QZ, Xu JK, Yang XX. Effect of cholesterol liposomes on calcium mobilization in muscle cells from the rabbit sphincter of Oddi. *World J Gastroenterol* 2002;8:144-149
- 杜凡, 魏经国. 高胆固醇血症兔胆道口括约肌动力功能与一氧化氮合酶关系. *第四军医大学学报* 2000;21:148-151
- Fleischhacker E, Esenabhalu VE, Holzmann S, Skrabal F, Koidl B, Kostner GM, Graier WF. In human hypercholesterolemia increased reactivity of vascular smooth muscle cells is due to altered subcellular Ca^{2+} distribution. *Atherosclerosis* 2000;149:33-42
- Wei JG, Wang YC, Du F, Yu HJ. Dynamic and ultrastructural study of sphincter of Oddi in early-stage cholelithiasis in rabbits with hypercholesterolemia. *World J Gastroenterol* 2000;6:102-106
- Menees S, Elta GH. Sphincter of oddi dysfunction. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2005;8:109-115
- Zou D, Xu G, Sun Z, Li Z, Yin N. Endoscopic manometry in the diagnosis of sphincter of oddi dysfunction. *China Natl J New Gastroenterol* 1996;2(Suppl 1):145-146
- Weissberg PL, Little PJ, Bobik A. Spontaneous oscillations in cytoplasmic calcium concentration in vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1989;256(5 Pt 1):C951-C957
- Lee CH, Poburko D, Kuo KH, Seow CY, van Breemen C. Ca^{2+} oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H1571-H1583
- Savineau JP, Marthan R. Cytosolic calcium oscillations in smooth muscle cells. *News Physiol Sci* 2000;15:50-55
- Wilde DW, Massey KD, Walker GK, Vollmer A, Grekin RJ. High-fat diet elevates blood pressure and cerebrovascular muscle Ca^{2+} current. *Hypertension* 2000;35:832-837
- Himpens B, Matthijs G, Somlyo AV, Butler TM, Somlyo AP. Cytoplasmic free calcium, myosin light chain phosphorylation, and force in phasic and tonic smooth muscle. *J Gen Physiol* 1988;92:713-729
- Nakayama S, Ohya S, Imaizumi Y. Investigation into gastrointestinal pacemaker mechanism using cultured cell cluster preparation. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2004;123:149-154
- Oishi H, Schuster A, Lambole M, Stergiopoulos N, Meister JJ, Beny JL. Role of membrane potential in vasomotion of isolated pressurized rat arteries. *Life Sci* 2002;71:2239-2248
- 张孝勇, 魏经国, 马进, 王莎, 马孝武, 马克军, 王亚蓉. 高胆固醇血症兔 Oddi 括约肌张力的变化机制. *世界华人消化杂志* 2004;12:1114-1118
- Kannan MS, Prakash YS, Brenner T, Mickelson JR, Sieck GC. Role of ryanodine receptor channels in Ca^{2+} oscillations of porcine tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* 1997;272(4 Pt 1):L659-664
- Satoh M, Takayanagi I, Koike K. Characteristics of Ca^{2+} oscillations in ileal longitudinal muscle cells of guinea pig. *Jpn J Pharmacol* 2000;82:317-325
- Amberg GC, Santana LF. Downregulation of the BK channel beta subunit in genetic hypertension. *Circ Res* 2003;93:965-971
- Wang YW, Ding JP, Xia XM, Lingle CJ. Consequences of the stoichiometry of slol and auxiliary β subunits on functional properties of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *J Neurosci* 2002;22:1550-1561
- Clarke AL, Petrou S, Walsh JV Jr, Singer JJ. Modulation of BK (Ca) channel activity by fatty acids: structural requirements and mechanism of action. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C1441-1453
- Babychuk EB, Smith RD, Burdya T, Babychuk VS, Wray S, Draeger A. Membrane cholesterol regulates smooth muscle phasic contraction. *J Membr Biol* 2004;198:95-101
- Tulenok TN, Sumner AE, Chen M, Huang Y, Laury-Kleintop L, Ferdinand FD. The smooth muscle cell membrane during atherogenesis: a potential target for amlodipine in atheroprotection. *Am Heart J* 2001;141(2 Suppl):S1-11

可回复性永生化逆转录病毒载体pLNCTIGlox的构建与表达

陈耀凯, 李俊刚, 王宇明

陈耀凯, 李俊刚, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038

陈耀凯, 男, 1966-12-27 生, 河南省固始县人, 汉族. 1998 年华中科技大学工学博士, 副教授, 副主任医师.

国家自然科学基金资助, No. 30100080

通讯作者: 陈耀凯, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 29 号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. yaokaichen@hotmail.com
电话: 023-68754475-8006 传真: 023-65461319

收稿日期: 2005-01-28 接受日期: 2005-02-16

Construction and expression of a retroviral vector pLNCTIGlox for reversible immortalization

Yao-Kai Chen, Jun-Gang Li, Yu-Ming Wang

Yao-Kai Chen, Jun-Gang Li, Yu-Ming Wang, Chinese PLA Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National natural Science Foundation of China, No. 30100080

Correspondence to: Yao-Kai Chen, Chinese PLA Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. yaokaichen@hotmail.com

Received: 2005-01-28 Accepted: 2005-02-16

Abstract

AIM: To construct a retroviral vector carrying selection marker gene NeoR, reporter gene EGFP and recombination site sequence LoxP for hepatocyte reversible immortalization.

METHODS: 2.1 kb SV40T gene was inserted into vector pIRES2-EGFP to obtain a 3.4kb fragment of SV40T-IRES-EGFP by restriction endonuclease digestion. The fragment was further subcloned into retroviral vector pLNCX2 to obtain a new vector pLNCTIG. The linearized pLNCTIG was mixed with double stranded LoxP to construct pLNCTIGlox. Escherichia coli DH5 α was transformed with pLNCTIGlox and positive clones were identified by colony polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease digestion. PT67 cells were transfected with pLNCTIGlox and the expression of green fluorescence protein was observed. The transfected cells were stained immunochemically to detect the expression of SV40 large T antigen.

RESULTS: Among the 19 randomly selected colonies, 3 showed positive DNA bands on electrophoresis gel. One of the three clones was further analyzed by restriction endonuclease digestion and only one 9.5 kb band was

separated electrophoretically, demonstrating that the analyzed clone was the positive recombinant. Twenty-four hours after transfection, PT67 cells emitted green fluorescence under the fluorescence microscope. The nuclei of the transfected cells were positive for immunochemical staining.

CONCLUSION: The retroviral vector pLNCTIGlox for reversible immortalization was successfully constructed and expressed.

Key Words: Reversible immortalization; Hepatocytes; pLNCTIGlox

Chen YK, Li JG, Wang YM. Construction and expression of a retroviral vector pLNCTIGlox for reversible immortalization. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(8):975-978

摘要

目的: 为建立可回复性永生化肝细胞株, 构建带有筛选基因 NeoR、报告基因 EGFP 及重组位点 loxP 的可回复性永生化逆转录病毒载体.

方法: 将 2.1 kb SV40T 亚克隆到 pIRES2-EGFP 的相应位点, 再酶切下 3.4 kb SV40T-IRES-EGFP 片段插入逆转录病毒载体 pLNCX2 的两个相同酶切位点之间, 构成新载体 pLNCTIG. 最后, 将线性化 pLNCTIG 和 loxP 双链片段混合连接. 取连接产物转化高效感受态 DH5 α 细胞. 菌落 PCR 和酶切法鉴定阳性克隆. 转染包装细胞 PT67 并在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达. 扩大培养稳定转染的细胞, 免疫组化染色检测 SV40T 基因的表达.

结果: 随机挑取 19 个克隆, 3 个电泳分离出约 1.1 kb 阳性条带. 取上述阳性克隆进行酶切鉴定, 结果仅出现一条约 9.5 kb 的条带, 证明该克隆为阳性重组体. 转染 PT67 细胞 24 h 后, 荧光显微镜下可见散在多处绿色荧光. 免疫组化染色显示细胞胞核呈阳性染色.

结论: 成功构建并表达可回复性永生化逆转录病毒载体 pLNCTIGlox.

关键词: 可回复性永生化; 肝细胞; pLNCTIGlox

陈耀凯, 李俊刚, 王宇明. 可回复性永生化逆转录病毒载体 pLNCTIGlox 的构建与表达. 世界华人消化杂志 2005;13(8):975-978
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/975.asp>

0 引言

以肝细胞为主要生物成分的生物人工肝、肝细胞移植关键是获得理想的肝细胞材料^[1-2]. 肝细胞永生化是解决肝细胞来源的重要途径之一^[2-5], 但传统肝细胞株存在安全性及特异性功能分化较差的缺点. 可回复性永生化(reversible immortalization)是先将永生化基因SV40T导入原代细胞以获得永生化细胞株, 然后再以特异性位点重组技术切除SV40T基因, 使细胞株回复到永生化前的状态^[1, 6-8]. 我们以永生化载体pLLTSN^[9]为基础进一步构建了新霉素抗性基因NeoR作为筛选基因, 加强型绿色荧光蛋白EGFP作为报道基因, SV40T作为目的基因, loxP作为重组位点的可回复性永生化逆转录病毒载体.

1 材料和方法

1.1 材料 逆转录病毒载体pLLTSN为本组前期研究成果, 该质粒含有SV40T基因序列^[9]; 质粒pIRES2-EGFP和pLNCX2购自美国Clontech公司; 限制性内切酶EcoR I, BamH I等购自英国NEB公司; T4 DNA连接酶为美国Promega公司产品; 大肠杆菌DH5 α 株为本研究所保存菌种; pfu DNA聚合酶购自北京鼎国公司; 2 \times PCR混合液和玻璃珠法DNA胶回收纯化试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; PCR产物纯化试剂盒为德国Roche公司产品. 基因转染试剂Perfectin为美国GTS公司产品. 所有引物均由中国上海生工生物工程有有限公司合成, PAGE纯化后去离子水溶解, 浓度均为50 μ mol/L. 正链引物EgfpPs(EGFP编码序列1-14 nt附加酶切位点)为5'-ATCAGTCGACACCATGGTGAGCAAGGG-3'. loxP片段正链LoxPs为5'-CTAGTGGGAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGCTGC-3'. loxP片段负链LoxPas为5'-CTAGGCAGCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCCCA-3'. 小鼠抗SV40T mAb为美国Santa Cruz产品.

1.2 方法 使用EcoR I和BamH I酶切下pLLTSN载体上的2.1 kb SV40T, 亚克隆到pIRES2-EGFP的相应位点, 构成的新载体称为pCTIG. 再用Xho I和Not I酶切下pCTIG上的约3.4 kb SV40T-IRES-EGFP片段, 插入逆转录病毒载体pLNCX2的两个相同酶切位点之间, 构成新载体pLNCTIG. 最后, 用Xba I酶切线性化pLNCTIG产生两个相同的粘端; 人工合成的loxPs(正链)和loxPas(负链)在PCR缓冲液中等摩尔比混匀, 94 $^{\circ}$ C加热10 min, 置室温缓慢冷却退火, 形成的双链具有两个与Xba I酶切末端相同的4碱基粘端. 将回收的线性化pLNCTIG和loxP双链片段按约1:8的摩尔比混合, 45 $^{\circ}$ C水浴5 min, 再冷却到0 $^{\circ}$ C, 置于冰上, 在10 μ L体系中加入10 \times 反应缓冲液1 μ L和T4 DNA

连接酶1 μ L, 16 $^{\circ}$ C连接过夜. 次日取连接产物2 μ L转化高效感受态DH5 α 细胞. loxP重组阳性克隆pLNCTIGlox的鉴定如下. (1)菌落PCR法 用与载体pLNCTIG序列互补的引物egfpPs和插入片段loxP的负链loxPas配对进行PCR. 在20 μ L反应体系中加入无菌水9.2 μ L, 2 \times PCR混合液10 μ L, EgfpPs和loxPas各0.4 μ L, 以高压灭菌牙签沾取单个菌落少许, 点入反应体系中作为模板. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 然后94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min共30个循环; 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min. 将PCR产物进行8 g/L琼脂糖凝胶电泳, 电泳分离出约1.1 kb条带者为阳性. (2)酶切法 取PCR阳性克隆接种于5 mL含100 kU/L氨苄西林的LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C摇床中250 r/min振荡培养过夜. 碱裂解法提取质粒DNA, 以BamH I和Xba I双酶切后进行8 g/L琼脂糖凝胶电泳分析, 同时以母载体pLNCTIG行相同双酶切作为对照. 阴性对照将电泳分离出约7.8 kb和1.7 kb条带, 阳性克隆因Xba I酶切位点消失而只被BamH I线性化为一条约9.5 kb的条带.

质粒转染前将包装细胞PT67培养至50-70%汇片. 用43 μ L无血清DMEM稀释7 μ L Perfectin, 将2 μ g纯化的pLNCTIGlox质粒DNA稀释于50 μ L DNA稀释液中, 5 min后将二者混合, 置室温5-20 min以形成DNA-脂质体复合物, 再加100 μ L DMEM和终浓度为80 mL/L的胎牛血清, 混匀后用其替换24孔板孔中PT67细胞的培养液. 继续培养24 h后更换新鲜的完全DMEM, 并在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达. 转染后48 h按1:10的比例分散培养细胞, 加入500 mg/L G418, 每2-4 d更换一次培养液, 选择培养10-20 d以使耐药细胞克隆选择生长. 扩大培养稳定转染的细胞, 制备细胞爬片, 以小鼠抗SV40T抗体为第一抗体进行免疫组化染色检测SV40T基因的表达. 细胞爬片PBS漂洗后以4%多聚甲醛溶液固定30 min, 用含0.2 g/L吐温-20的PBS漂洗, 然后200 mL/L正常山羊血清37 $^{\circ}$ C封闭15 min, 然后加1:100稀释的第一抗体4 $^{\circ}$ C过夜; 漂洗后移入PBS中浸泡2 min, 再加生物素标记的第二抗体37 $^{\circ}$ C 45 min; 加结合过氧化物酶链霉亲和素37 $^{\circ}$ C 45 min; 加新鲜配制的DAB, 显微镜下观察5-10 min, 棕黄色染色为阳性信号; 以未转染的包装细胞PT67作为阴性对照.

2 结果

2.1 逆转录病毒载体pLNCTIGlox的鉴定 菌落PCR法转化感受态细胞后平板上形成的克隆有数百个, 随机挑取19个克隆进行菌落PCR鉴定, 直接鉴定loxP是否插入以及插入的方向. 结果有3个菌落电泳分离

出约 1.1 kb 条带(图 1). 从菌落 PCR 鉴定为阳性的 3 个克隆质粒中任取 1 个, 以 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切后进行 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 同时以母载体 pLNCTIG 行相同双酶切作为对照. 结果该克隆只被线性化为一条约 9.5 kb 的条带, 而 pLNCTIG 对照电泳分离出约 7.8 kb 和 1.7 kb 条带(图 2), 证明该克隆为阳性体.

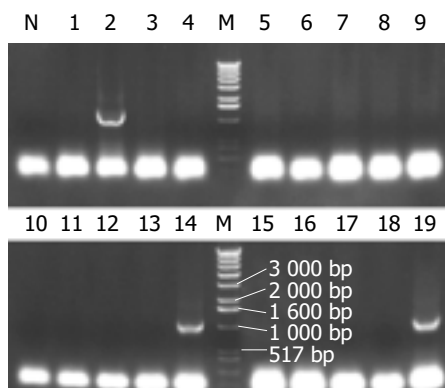


图 1 以 *egfpPa* 和 *loxPas* 为引物, 菌落 PCR 法鉴定 pLNCTIGlox 重组阳性克隆. N: 阴性对照; M: DNA 分子量标准; 1-19: pLNCTIGlox 克隆 1-19 的菌落 PCR 产物, 其中克隆 2, 14 和 19 为阳性.

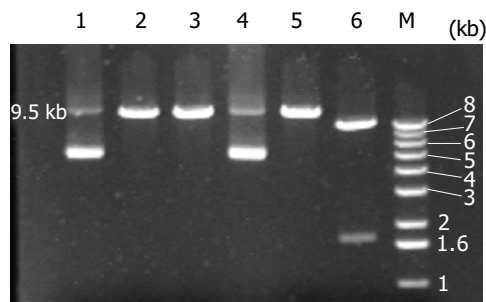


图 2 酶切电泳鉴定 pLNCTIGlox 逆转录病毒载体. 1: 未酶切 pLNCTIGlox 载体质粒; 2: *Bam*H I 单酶切 pLNCTIGlox 质粒; 3: *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切 pLNCTIGlox 质粒; 4: 未酶切 pLNCTIG 质粒; 5: *Bam*H I 单酶切 pLNCTIG 对照; 6: *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切 pLNCTIG 对照; M: DNA 分子量标准.

2.2 EGFP 基因的表达 转染后 24 h 在荧光显微镜下观察, 可见散在多处绿色荧光(图 3).

2.3 SV40 大 T 抗原的免疫组化染色 经扩大培养的转

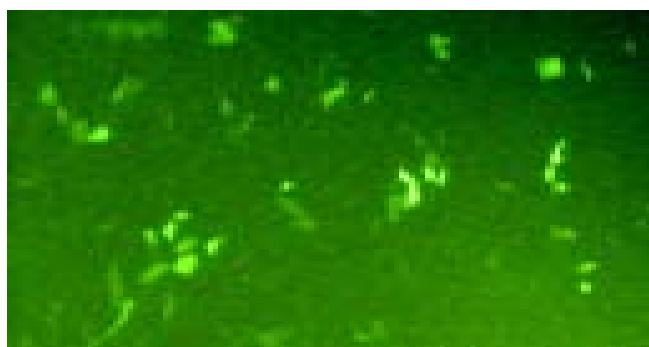


图 3 转染 pLNCTIGlox 载体后 24 h 的 PT67 细胞, IF $\times 100$.

染细胞胞核呈阳性染色(图 4), 而作为阴性对照的未转染细胞则未见阳性反应.

3 讨论

采用两种限制性内切酶消化外源片段和质粒载体后进行连接, 是质粒载体构建过程中最容易、最有效的克隆策略. 我们将 pLLTSN 上的 2.1 kb SV40T 插入到 pIRES2-EGFP 的 *Eco*R I 和 *Bam*H I 位点之间即是采用这一方法. 然而质粒与外源片段的酶切位点之间并非总是能找到“门当户对”的理想搭配关系, 此时必须采取不同的策略. 在本研究中我们拟在逆转录病毒载体 pLNCTIG 的 3' 长末端重复(LTR)序列的 U3 区插入 *loxP* 特异重组位点, 但该处仅有一个 *Xba* I 单酶切位点可供利用, 因此只能采用单酶切连接策略插入 *loxP* 片段. 用 *Xba* I 酶切载体 pLNCTIG 后产生 2 个相同的粘端, 通常要将其 5' 端去磷酸化, 以减少载体自身环化导致较高的非重组体菌落背景. 但若将载体 pLNCTIG 5' 端去磷酸化, 将无法与 *loxP* 双链的匹配末端连接, 原因是 *loxP* 作为合成的 DNA 是缺少 5' 磷酸基团的. 此时有两种选择可以采用: (1) 将载体 pLNCTIG 5' 端去磷酸化, 再使合成的 *loxP* 双链 DNA 5' 端磷酸化, 然后进行连接. 该方式的缺点是会使得 *loxP* 片段在重组质粒中形成串联拷贝, 不利于单拷贝重组体的筛选. (2) 不将载体 pLNCTIG 5' 端去磷酸化, 直接与缺少 5' 磷酸基团的 *loxP* 双链 DNA 进行连接反应, 在此过程中 *loxP* 片段在重组质粒中不会形成串联拷贝, 阳性重组质粒只能是插入单拷贝 *loxP* 序列的克隆. 我们采用第 2 种方式, 为了减少载体自身环化, 我们将载体与外源 *loxP* 片段的摩尔比提高到 1:8, 以减少非重组体菌落背景. 结果成功, 并已筛选出正向插入 *Xba* I 酶切位点的阳性克隆. 由于 *loxP* 双链 DNA 粘端与 *Xba* I 酶切粘端连接后, 改变了原来的酶切位点序列, *Xba* I 酶切位点不复存在, 用 *Xba* I 酶不能切开重组质粒. 用 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切重组质粒和 pLNCTIG, 前者只能被 *Bam*H I 酶切线性化, 而后者可被 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切为约 1.7 kb 和

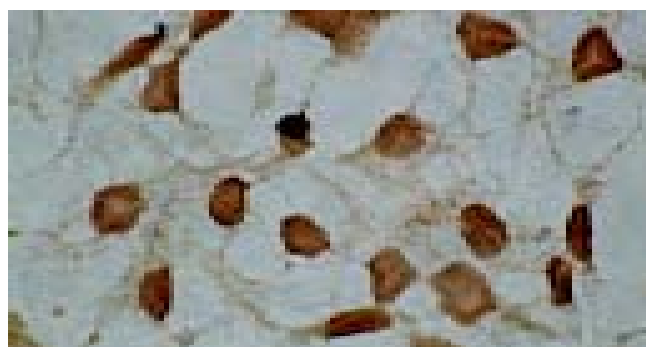


图 4 转染 pLNCTIGlox 载体后的 PT67 细胞核呈阳性反应, SABC $\times 400$.

7.8 kb大小的两个片段. 实际结果与理论预期完全符合.

Cre/LoxP 是最常用的基因位点重组系统, 最早在噬菌体 P1 的研究中被发现^[8]. LoxP 位于噬菌体 P1 染色体交叉部位, 由两个反向重叠序列 (reverted repeat) 和一个 8 bp 间隔区组成. Cre 是催化位点重组的酶, 与反向重叠序列结合, 剪切两个 LoxP 之间的 DNA 序列. 本研究成功构建带有目的基因、筛选基因及 LoxP 重组位点的质粒载体, 并进行蛋白表达与鉴定, 为下一步进行细胞永生化和奠定了良好的基础.

4 参考文献

- 1 Kobayashi N, Okitsu T, Nakaji S, Tanaka N. Hybrid bioartificial liver: establishing a reversibly immortalized human hepatocyte line and developing a bioartificial liver for practical use. *J Artif Organs* 2003;6:236-244
- 2 Kobayashi N, Tanaka N. Engineering of human hepatocyte lines for cell therapies in humans: prospects and remaining hurdles. *Cell Transplant* 2002;11:417-420
- 3 Sato Y, Endo H, Ajiki T, Hakamata Y, Okada T, Murakami T, Kobayashi E. Establishment of Cre/LoxP recombination system in transgenic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 319:1197-1202
- 4 Watanabe N, Odagiri H, Totsuka E, Sasaki M. A new method to immortalize primary cultured rat hepatocytes. *Transplant Proc* 2004;36:2457-2461
- 5 Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, Zern MA. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 2003;124:432-444
- 6 Kobayashi N, Noguchi H, Westerman KA, Watanabe T, Matsumura T, Totsugawa T, Fujiwara T, Leboulch P, Tanaka N. Cre/loxP-based reversible immortalization of human hepatocytes. *Cell Transplant* 2001;10:383-386
- 7 Noguchi H, Kobayashi N, Westerman KA, Sakaguchi M, Okitsu T, Totsugawa T, Watanabe T, Matsumura T, Fujiwara T, Ueda T, Miyazaki M, Tanaka N, Leboulch P. Controlled expansion of human endothelial cell populations by Cre-loxP-based reversible immortalization. *Hum Gene Ther* 2002;13:321-334
- 8 Min KJ, Young CJ, Sun KM, Chang KS. In vivo excision and amplification of large human genomic segments using the Cre/loxP-and large T antigen/SV40 ori-mediated machinery. *J Biotechnol* 2004;110:227-233
- 9 李俊刚, 陈耀凯, 王宇明. SV40T 外显子的拼接及逆转录病毒载体 pLLTSN 的构建. *世界华人消化杂志* 2004;12:1104-1108

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

急性坏死性胰腺炎早期胰腺组织趋化因子基因的表达及氧化苦参碱的影响

李兆申, 许永春, 屠振兴, 施新岗

李兆申, 许永春, 屠振兴, 施新岗, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科 上海市 200433

李兆申, 男, 1956-10-13 生, 河北省宁晋县人, 汉族, 1988 年获第二军医大学硕士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 全国消化内镜学会副主任委员, 上海市消化内镜学会主任委员, 主要从事消化系病及消化内镜临床应用研究, 发表论文 200 篇, 参加编写专著 10 部。

上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养计划基金资助项目, No. 98BR026

通讯作者: 李兆申, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科。zsl@online.sh.cn

电话: 021-25070552

收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-24

Chemokine gene expression in pancreatic tissue and effects of oxymatrine in early acute necrotizing pancreatitis

Zhao-Shen Li, Yong-Chun Xu, Zhen-Xing Tu, Xin-Gang Shi

Zhao-Shen Li, Yong-Chun Xu, Zhen-Xing Tu, Xin-Gang Shi, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Correspondence to: Dr. Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. zsl@online.sh.cn

Received: 2004-08-17 Accepted: 2004-09-24

Abstract

AIM: To investigate the expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) and monocyte chemoattractant protein-1/JE (MCP-1/JE) genes in the pancreas, and to assess the influence of Chinese herb extraction oxymatrine (Oxy) on the expression of CINC and MCP-1/JE genes and the therapeutic effects in early acute necrotizing pancreatitis (ANP).

METHODS: ANP was induced by retrograde infusion of 50 g/L sodium taurocholate into the biliary pancreatic duct of rats. Fifty-six rats were randomly divided into three groups: sham operation (SO) group, ANP 3 h, 6 h, 12 h groups, and Oxy 3 h, 6 h, 12 h groups. The activity of serum amylase (Amy), the serum levels of glutamic-pyruvic transaminase (ALT) and creatinine (Cr) were determined. Pathological changes of the pancreas were observed. The expression of CINC and MCP-1/JE genes in the pancreas was assayed.

RESULTS: Compared with that in SO group, the expression of CINC and MCP-1/JE genes in the pancreas in ANP groups were all increased greatly (0.61 ± 0.08 , 0.76 ± 0.10 , 0.89 ± 0.12 , 0.42 ± 0.06 , 0.65 ± 0.08 , 0.94 ± 0.12 , $P < 0.01$). Following the induction of ANP, the expression of CINC and MCP-1/JE genes was both up-regulated, which was significantly correlated with the pathological changes of the pancreas ($r = 0.89$ and 0.82 , respectively, $P < 0.05$). Oxy attenuated the increase of CINC and MCP-1/JE gene expression (0.34 ± 0.05 , 0.45 ± 0.06 , 0.51 ± 0.06 vs 0.31 ± 0.04 , 0.34 ± 0.04 , 0.36 ± 0.05 , in ANP 3 h, 6 h, 12 h groups and Oxy 3 h, 6 h, 12 h groups, respectively $P < 0.01$). Serum Amy, ALT and Cr levels were reduced, (Amy: 25.39 ± 1.93 μ kat, 37.66 ± 4.27 μ kat, 96.00 ± 9.19 μ kat; ALT: 94.5 ± 58.3 nkat/L, 283.8 ± 115.5 nkat/L, 469.7 ± 157.3 nkat/L; Cr: 81.4 ± 17.7 μ mol/L, 89.1 ± 18.7 μ mol/L, 110.7 ± 12.8 μ mol/L, $P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the pathological changes of pancreas were ameliorated by Oxy.

CONCLUSION: CINC and MCP-1/JE might play important roles in early ANP. The expression of CINC and MCP-1/JE gene in the pancreas can be inhibited by Oxy. Oxy therapy was effective in experimental ANP.

Key Words: Chemokine; Acute necrotizing pancreatitis; Oxymatrine; Rats

Li ZS, Xu YC, Tu ZX, Shi XG. Chemokine gene expression in pancreatic tissue and effects of oxymatrine in early acute necrotizing pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):979-983

摘要

目的: 探讨细胞因子诱导的中性粒细胞趋化因子(CINC)和单核细胞趋化蛋白(MCP-1/JE)在大鼠急性坏死性胰腺炎(ANP)早期胰腺组织中的表达, 观察中药提取物氧化苦参碱(Oxy)对其表达水平的影响以及在ANP中的治疗作用。

方法: 以牛磺胆酸钠逆行胆胰管注射制备大鼠ANP模型, 56只SD大鼠随机分为假手术(SO)组, ANP 3 h, 6 h, 12 h组, Oxy治疗3 h, 6 h, 12 h组, 检测各组血清淀粉酶(Amy), 谷丙转氨酶(ALT)和肌酐(Cr)值, 观察胰腺组织病理学和胰腺组织中CINC及MCP-1/JE基因表达的改变。

结果: 比较SO组, CINC mRNA、MCP-1/JE mRNA在

ANP各组胰腺组织中表达量显著增加(分别为 0.61 ± 0.08 , 0.76 ± 0.10 , 0.89 ± 0.12 , 0.42 ± 0.06 , 0.65 ± 0.08 , 0.94 ± 0.12 , $P < 0.01$), 随诱发ANP时间的进展有不断上调的趋势, 且都与胰腺组织病理学改变呈正相关(分别为 0.89 , 0.82 , $P < 0.05$), 与ANP各组比较, Oxy治疗各组CINC mRNA, MCP-1/JE mRNA表达量有明显下降(0.34 ± 0.05 , 0.45 ± 0.06 , 0.51 ± 0.06 , 0.31 ± 0.04 , 0.34 ± 0.04 , 0.36 ± 0.05 , $P < 0.01$), 血清Amy, ALT和Cr值降低(分别为 $25.39 \pm 1.93 \mu\text{kat}$, $37.66 \pm 4.27 \mu\text{kat}$, $96.00 \pm 9.19 \mu\text{kat}$, $94.5 \pm 58.3 \text{ nkat/L}$, $283.8 \pm 115.5 \text{ nkat/L}$, $469.7 \pm 157.3 \text{ nkat/L}$, $81.4 \pm 17.7 \mu\text{mol/L}$, $89.1 \pm 18.7 \mu\text{mol/L}$, $110.7 \pm 12.8 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 胰腺组织病理学损害改善(5.95 ± 0.17 , 6.53 ± 0.19 , 7.58 ± 0.20 , $P < 0.01$).

结论: CINC和MCP-1/JE是ANP早期重要的炎症反应递质, Oxy能抑制他们在ANP大鼠胰腺组织中的表达, 对ANP有一定的治疗作用.

关键词: 趋化因子; 急性坏死性胰腺炎; 氧化苦参碱; 大鼠

李兆申, 许永春, 屠振兴, 施新岗. 急性坏死性胰腺炎早期胰腺组织趋化因子基因的表达及氧化苦参碱的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(8):979-983 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/979.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)发病后, 腺泡细胞所释放的炎症递质是此后细胞因子级联反应的触发剂, 导致白细胞激活, 并迁移、聚集至局部炎症组织, 释放大量的破坏性炎症细胞因子, 吸收入血液循环后可能诱发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、甚至多脏器功能衰竭(multiple organ failure, MOF), 成为SAP早期重要死因^[1-5], 包括趋化因子在内的多种炎症递质参与了这一过程^[6]. 我们运用大鼠急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)模型, 观察细胞因子诱导的中性粒细胞趋化因子(cytokine-induced neutrophil chemoattractant, CINC)和单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein-1/JE, MCP-1/JE)在胰腺组织中的表达, 并探讨中药提取物氧化苦参碱(oxymatrine, Oxy)对他们的影响及在ANP中的治疗作用.

1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性SD大鼠, 上海第二军医大学实验动物中心提供, 体质量200-250 g;牛磺胆酸钠购自美国Sigma公司;苦参素注射液(含氧化苦参碱980 g/L)100 g/L, 宁夏制药厂生产;宝生物工程(大连)有限公司的一步反应法RT-PCR试剂盒;CINC、MCP-1/JE及内参照 β -actin引物根据GenBank中基因序列自行设

计, 由上海生工生物工程公司合成.

1.2 方法 实验动物56只随机分为假手术(sham operation, S0)组, 急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)3 h, 6 h及12 h组, 氧化苦参碱(oxymatrine, Oxy)治疗3 h, 6 h及12 h组, 每组各8只. Oxy治疗组以Oxy 50 mg/kg稀释后ip, 2次/d, 连续2 d, d3开始实验, 在诱导ANP后1 h以Oxy 50 mg/kg稀释后ip, S0组和ANP各组同法腹腔注入等量生理盐水. ANP模型制作如下:大鼠术前禁食12 h和禁水6 h, 麻醉后进腹, 先用无损伤动脉夹夹闭肝门部胆胰管, 再用导管从十二指肠乳头对侧十二指肠肠壁穿刺入肠腔并插入胆胰管约1 cm, 微量泵以0.1 mL/min速度推注牛磺胆酸钠1 mL/kg, 注射结束后观察10 min拔管, 去除动脉夹, 缝合十二指肠穿刺口并关腹. S0组开腹后逆行胆胰管注射生理盐水1 mL/kg, 其余步骤与上述相同. 按时间点处死大鼠前取血, 采用酶法(麦芽6糖)检测血清(Amy), 化学比色法检测(ALT), 酶法检测(Cr), 按Hitachi 7600型全自动生化分析仪(日本)标准规程操作, 用以评价大鼠胰腺及肝肾功能损伤程度.

1.2.1 胰腺组织病理学评价 大鼠处死后取部分胰腺组织, 40 g/L中性缓冲甲醛固定, 石蜡包埋切片后HE染色制片, 每张切片随机选10个高倍镜视野($\times 400$), 观察胰腺组织病理学变化及白细胞计数, 按下表胰腺组织损伤病理学评分标准评分(表1), 无表中各项病理改变计0分.

1.2.2 表1 胰腺组织中CINC mRNA及MCP-1/JE mRNA的表达 胰腺组织总RNA的抽提, 按Trizol液的说明书进行. RT-PCR反应体系均为50 μL , 50 $^{\circ}\text{C}$ RT反应60 min后PCR反应(表2). 取产物10 μL 用15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下以凝胶图像扫描仪测吸

表1 ANP胰腺组织病理变化评分标准

病理分级	评分	病理改变
水肿	1	小叶间区域性水肿, 叶间裂增宽
	2	小叶间弥漫性水肿, 小叶内间隙增宽
	3	小叶间显著增大, 腺泡肿胀分离
炎细胞浸润	1	白细胞 < 20 个/高倍镜视野
	2	白细胞20-50个/高倍镜视野
	3	白细胞 > 30 个/高倍镜视野或出现微脓肿
出血	1	实质出血 $< 20\%$
	2	实质出血20%-50%
	3	实质出血 $> 50\%$
坏死	1	坏死面积 $< 20\%$
	2	坏死面积20%-50%
	3	坏死面积 $> 50\%$

表2 RT-PCR 目的基因的引物

引物(产物大小)	上游、下游	PCR 反应条件
CINC(304 bp)	5' -GCTCGCTTCTCTGTGCAGC-3' 5' -CCATCGGTGCAATCTATCTTC-3'	95℃变性 5 min;按 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环;72℃延伸 5 min
MCP-1/JE(290 bp)	5' -TTCCTGGCAAGATCCC-3' 5' -TGCTTGAGGTGGTTGTGGAA-3'	95℃变性 5 min;按 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 70℃ 30 s, 35 个循环;72℃延伸 5 min
β-actin(600 bp)	5' -AGGGTGTGATGGTGGGTATG-3' 5' -CATAGCTCTTCTCCAGGGAG-3'	95℃变性 5 min;按 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环;72℃延伸 5 min

表3 大鼠 ANP 各组血清生化指标及胰腺组织病理评分值($n = 8$, mean±SD)

分组	Amy(μkat/L)	ALT(nkat/L)	Cr(μmol/L)	病理评分(分)
SO	17.07 ± 0.85	38.3 ± 5.5	70.3 ± 15.5	0.12 ± 0.05
ANP 3 h	48.56 ± 9.37 ^b	139.5 ± 58.3 ^b	87.4 ± 21.6 ^a	8.75 ± 0.38 ^b
ANP 6 h	97.57 ± 11.34 ^b	353.8 ± 115.5 ^b	94.6 ± 13.3 ^b	9.05 ± 0.53 ^b
ANP12 h	159.13 ± 18.07 ^b	589.7 ± 157.3 ^b	131.7 ± 20.5 ^b	10.15 ± 0.64 ^b
Oxy 3 h	25.39 ± 1.93 ^{bd}	94.5 ± 58.3 ^{bd}	81.4 ± 17.7 ^{bc}	5.95 ± 0.17 ^{bd}
Oxy 6 h	37.66 ± 4.27 ^{bd}	283.8 ± 115.5 ^{bd}	89.1 ± 18.7 ^{bc}	6.53 ± 0.19 ^{bd}
Oxy12 h	96.00 ± 9.19 ^{bd}	469.7 ± 157.3 ^{bd}	110.7 ± 12.8 ^{bd}	7.58 ± 0.20 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs SO; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs ANP.

光度 A 值, 用 β -actin 校正半定量, 计算 CINC mRNA 和 MCP-1/JE mRNA 表达水平.

统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析, 组织学资料用评分积分值, 实验数据均用 mean±SD 表示, 两组间均数比较用单因素方差分析, 两变量间关系用直线相关分析.

2 结果

2.1 血清生化指标 与 SO 组相比, Oxy 和 ANP 各组血清 Amy 随时间延长有显著升高趋势($P < 0.01$), Oxy 各治疗组与 ANP 相应各组比较有明显降低($P < 0.01$). 比较 SO 组, ANP 各组则 ALT, Cr 值显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Oxy 各组血清 ALT, Cr 值升高程度相对较轻, 与 ANP 各组比较有显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 3).

2.2 胰腺组织病理学 SO 组胰腺外观正常; 诱发 ANP 3 h 后大鼠胰腺肿胀明显, 质地尚软; 6 h 后质地变硬, 可见黄色坏死灶, 腹腔有少量血性腹水; 12 h 后胰腺质硬, 见大片黄色坏死灶, 大网膜、肠系膜上见大量皂化斑, 腹腔有中至大量血性腹水; Oxy 各组胰腺肿胀, 质地较硬, 坏死灶少见, 腹腔少至中量血性腹水. 显微镜下, SO 组胰腺组织正常; 诱发 ANP 3 h 后胰腺间质水肿, 小叶间隙增大, 伴少量炎细胞浸润, 腺泡肿胀; 6 h 后胰腺间质水肿, 中量炎细胞浸润, 有胰腺腺泡小叶结构破坏, 胰腺组织可见凝固性或脂肪坏死; 12 h 后胰腺腺泡小叶结构破坏, 胰腺组织大片出血、凝固性坏死及脂肪坏死, 可见血管破裂出

血, 坏死区见大量中性白细胞和单核细胞浸润; Oxy 3 h 组胰腺间质水肿, 伴中等量炎细胞浸润, 胰腺腺泡有少量破坏, 或胰腺腺泡和导管基本正常, 6 h, 12 h 后有胰腺腺泡小叶结构破坏, 胰腺组织坏死少见, 未见血管破裂出血, 坏死区有中量中性白细胞和单核细胞浸润. Oxy 各组胰腺组织病理学改变较 ANP 各组有显著改善($P < 0.01$, 表 3, 图 1A-C).

2.3 CINC mRNA, MCP-1/JE mRNA 的表达 SO 组胰腺组织中 CINC mRNA 和 MCP-1/JE mRNA 表达量少, 相比较 ANP 各组 CINC mRNA 和 MCP-1/JE mRNA 表达量, 均随时间延长呈逐渐升高趋势($P < 0.01$), ANP 12 h 时达高峰; Oxy 各组 CINC mRNA 和 MCP-1/JE mRNA 表达量, 与 SO 组比较也随时间延长呈逐渐升高趋势($P < 0.01$), 比较 ANP 各组则有明显降低($P < 0.01$, 表 4; 图 2A-B).

表4 CINC mRNA 和 MCP-1/JE mRNA 表达($n = 8$ mean±SD, A)

分组	MCP-1/JE	CINC
SO	0.09 ± 0.03	0.15 ± 0.04
ANP 3 h	0.42 ± 0.06 ^b	0.61 ± 0.08 ^b
ANP 6 h	0.65 ± 0.08 ^b	0.76 ± 0.10 ^b
ANP12 h	0.94 ± 0.12 ^b	0.89 ± 0.12 ^b
Oxy 3 h	0.31 ± 0.04 ^{bd}	0.34 ± 0.05 ^{bd}
Oxy 6 h	0.34 ± 0.04 ^{bd}	0.45 ± 0.06 ^{bd}
Oxy12 h	0.36 ± 0.05 ^{bd}	0.51 ± 0.06 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs SO; ^d $P < 0.01$ vs ANP.

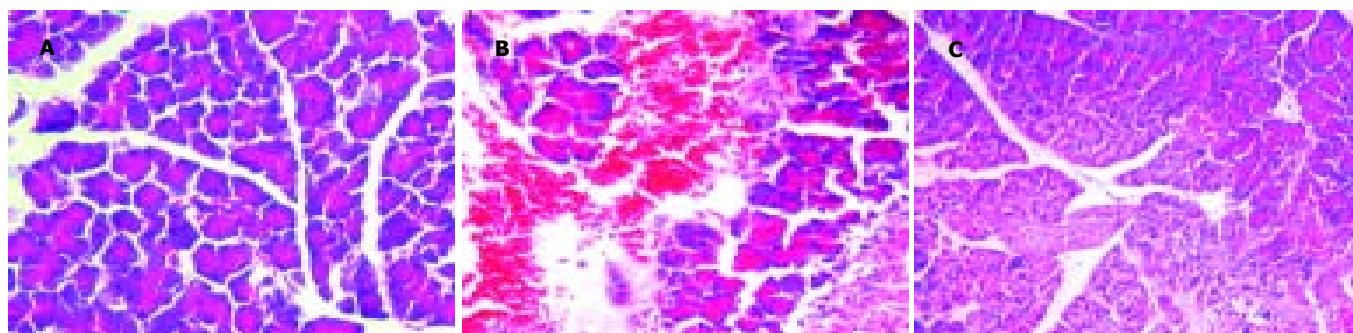


图1 大鼠急性胰腺炎病理改变 HE $\times 400$. A: SO group; B: ANP group; C: Oxy group.

胰腺组织中CINC mRNA和MCP-1/JE mRNA的表达与胰腺组织病理变化呈正相关, 相关系数分别为0.89和0.82 ($P < 0.05$).

3 讨论

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)发病后, 尽管原发的病因可能已停止或去除, 但胰腺局部和全身反应仍可继续发展甚或恶化. 近年研究表明, 被激活的白细胞以及其释放肿瘤坏死因子- α , 白介素家族成员等炎症递质, 是造成胰腺局部损伤和诱发SIRS^[7-8]甚至MOF的重要因素之一^[9-11]. 这一过程有趋化因子等多种炎症递质的参与. 趋化因子分为CC, CXC, CX3C族和C亚族^[12-14]. CINC与人类白介素-8(IL-8)超家族成员GRO- α 同源, 是鼠CXC趋化因子的典型代表^[15], CINC特异性的趋化中性粒细胞, 介导其跨越血管内皮, 激活中性粒细胞的呼吸爆发和脱颗粒, 从而诱导细胞膜表面表达黏附分子CD11b/CD18, 使中性粒细胞结合内皮细胞的能力增加3-10倍^[16]. CINC在AP并发症的发病机制, 以及调节AP严重程度和导致AP相关的急性肺损伤等方面起重要作用. 趋化因子CC亚族中的MCP-1, 在败血症和其他一些炎症反应中起关键作用^[17]. 研究表明, 在AP早期阶段, MCP-1即在腺泡细胞中产生, 同时在血清中水平显著升高, 比较CC亚族成员中的MIP-1 α 、MIP-1 β 等, MCP-1在AP局部并发症和远处脏器损害的发病机制中起关键作用^[18]. MCP-1/JE是人类MCP-1在大鼠中的同源体, 是强有力的单核细胞趋化因子和激活剂^[16]. 本研

究中SO组大鼠胰腺组织中CINC mRNA和MCP-1/JE mRNA表达量很少, 随着ANP的诱发, RT-PCR检测提示, CINC mRNA和MCP-1/JE mRNA在ANP大鼠胰腺组织中的水平有显著增加, 随时间延长呈上调趋势, 并且与胰腺组织病理变化呈正相关. 提示CINC和MCP-1/JE在ANP大鼠胰腺组织中高表达, 促进了中性粒细胞和单核巨噬细胞的聚集, 加重胰腺组织局部的损害, CINC和MCP-1/JE是ANP早期重要的炎症细胞因子.

苦参生物碱是一种具有苦参次碱-15-酮基本结构的化合物, 主要从苦参根及苦豆子中提取的有效成分, 《本草纲目》中记载:苦参, 苦、寒、无毒、主治心腹结气, 症瘕积聚、黄疸、溺有余沥、逐水、补中明目, 养肝胆气, 并具有清热解毒祛风燥湿等功效. 氧化苦参碱是其中一种主要生物碱, 现代研究表明其具有抗菌^[18]、保护肝细胞、抗肝纤维化^[19-22]、抗炎、免疫调节等^[23-25]药理作用, 能抑制TNF- α , IL-1和IL-6等炎症细胞因子的产生. 在抗病毒实验研究中, 运用剂量为100至300 mg/kg的Oxy被发现具有抑制乙型肝炎和丙型肝炎病毒的作用^[19-22], 并且已经在临床中初步用于慢性乙型和慢性丙型肝炎的治疗^[23-25]. 在调节免疫方面, 氧化苦参碱被认为低浓度能刺激免疫反应, 高浓度则抑制免疫反应, 而研究较多集中在其抑制免疫反应方面^[26]. 其抗炎作用机制方面则被认为与抑制细胞因子的产生有关^[27-28]. 目前, 氧化苦参碱应用在AP的治疗以及拮抗AP的全身炎症反应、调节免疫等方面研究报道很少. 本研究表明Oxy能明显抑制ANP大鼠胰腺组织中趋化因子CINC和MCP-1/JE的产

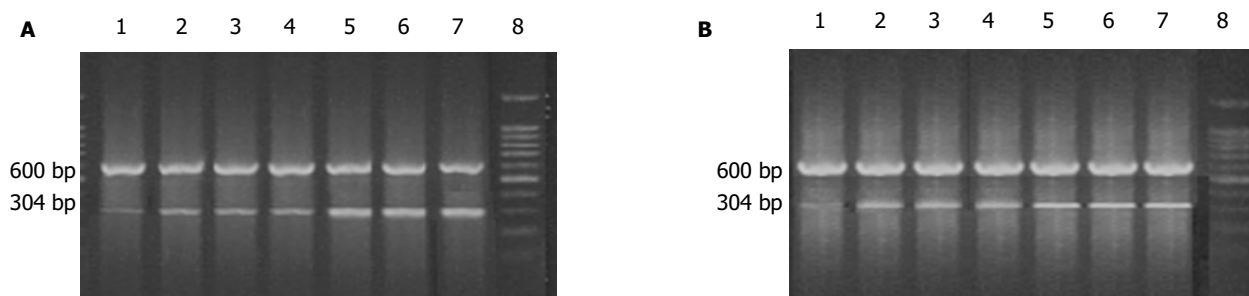


图2 胰腺组织A: CINC mRNA和B: MCP-1/JE mRNA的表达. 1-8:SO组;Oxy3, 6, 12 h组;ANP3, 6, 12 h组;Marker.

生, 明显降低血清 Amy, Cr, ALT 水平, 减轻胰腺组织病理损伤指标, 可能与 Oxy 的抗炎作用、免疫抑制为主的调节作用、细胞膜稳定作用有关, 但将其在临床中运用的价值还有待于进一步研究。

4 参考文献

- Tao J, Wang C, Chen L, Yang Z, Xu Y, Xiong J, Zhou F. Diagnosis and management of severe acute pancreatitis complicated with abdominal compartment syndrome. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003;23:399-402
- Pupelis G, Austrums E, Snippe K. Importance of a clinical protocol in the treatment of severe acute pancreatitis. *Zentralbl Chir* 2002;127:975-981
- Wang H, Li WQ, Zhou W, Li N, Li JS. Clinical effects of continuous high volume hemofiltration on severe acute pancreatitis complicated with multiple organ dysfunction syndrome. *World J Gastroenterol* 2003;9:2096-2099
- Zhu AJ, Shi JS, Sun XJ. Organ failure associated with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2570-2573
- 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
- Bhatia M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1:343-351
- Naskalski JW, Kusnierz-Cabala B, Panek J, Kedra B. Poly-C specific ribonuclease activity correlates with increased concentrations of IL-6, IL-8 and sTNFR55/sTNFR75 in plasma of patients with acute pancreatitis. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54:439-448
- Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S. Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:263-266
- Bentrem DJ, Joehl RJ. Pancreas: healing response in critical illness. *Crit Care Med* 2003;31(8 Suppl):S582-S589
- Bhatia M, Proudfoot AE, Wells TN, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Treatment with Met-RANTES reduces lung injury in caerulein-induced pancreatitis. *Br J Surg* 2003;90:698-704
- Rau B, Baumgart K, Kruger CM, Schilling M, Beger HG. CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. *Intensive Care Med* 2003;29:622-629
- Gomez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, Cassinello N, Camps B, Vina J, Sastre J. Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutic implications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1: 393-403
- Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S. Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:263-266
- Rau B, Baumgart K, Kruger CM, Schilling M, Beger HG. CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. *Intensive Care Med* 2003;29:622-629
- Brady M, Bhatia M, Christmas S, Boyd MT, Neoptolemos JP, Slavin J. Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis. *Pancreas* 2002;25:260-269
- Osman MO, Gesser B, Mortensen JT, Matsushima K, Jensen SL, Larsen CG. Profiles of pro-inflammatory cytokines in the serum of rabbits after experimentally induced acute pancreatitis. *Cytokine* 2002;17:53-59
- Bhatia M, Brady M, Kang YK, Costello E, Newton DJ, Christmas SE, Neoptolemos JP, Slavin J. MCP-1 but not CINC synthesis is increased in rat pancreatic acini in response to cerulein hyperstimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282:G77-85
- Rau B, Baumgart K, Kruger CM, Schilling M, Beger HG. CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. *Intensive Care Med* 2003;29:622-629
- Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Fang JY, Song YL, Shen ZH, Cao AP. Inhibitory effect of oxymatrine on serum hepatitis B virus DNA in HBV transgenic mice. *World J Gastroenterol* 2004;10: 1176-1179
- Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine in vivo. *World J Gastroenterol* 2001; 7:49-52
- Liu J, Manheimer E, Tsutani K, Gluud C. Medicinal herbs for hepatitis C virus infection: a Cochrane hepatobiliary systematic review of randomized trials. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:538-544
- Chen Y, Li J, Zeng M, Lu L, Qu D, Mao Y, Fan Z, Hua J. The inhibitory effect of oxymatrine on hepatitis C virus in vitro. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9(Suppl):12-14
- Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Li JQ, Wan MB, Li CZ, Chen CW, Fu QC, Wang JY, She WM, Cai X, Ye J, Zhou XQ, Wang H, Wu SM, Tang MF, Zhu JS, Chen WX, Zhang HQ. Oxymatrine therapy for chronic hepatitis B: a randomized double-blind and placebo-controlled multi-center trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:2480-2483
- Chen YX, Mao BY, Jiang JH. Relationship between serum load of HBV-DNA and therapeutic effect of oxymatrine in patients with chronic hepatitis B. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2002;22:335-336
- Yu YY, Wang QH, Zhu LM, Zhang QB, Xu DZ, Guo YB, Wang CQ, Guo SH, Zhou XQ, Zhang LX. A clinical research on oxymatrine for the treatment of chronic hepatitis B. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2002;10:280-281
- Dong Y, Xi H, Yu Y, Wang Q, Jiang K, Li L. Effects of oxymatrine on the serum levels of T helper cell 1 and 2 cytokines and the expression of the S gene in hepatitis B virus S gene transgenic mice: a study on the anti-hepatitis B virus mechanism of oxymatrine. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1299-1306
- Xiang X, Wang G, Cai X, Li Y. Effect of oxymatrine on murine fulminant hepatitis and hepatocyte apoptosis. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:593-596
- Yang W, Zeng M, Fan Z, Mao Y, Song Y, Jia Y, Lu L, Chen CW, Peng YS, Zhu HY. Prophylactic and therapeutic effect of oxymatrine on D-galactosamine-induced rat liver fibrosis. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2002;10:193-196

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

氧化苦参碱对肝纤维化大鼠 Smad 基因表达的影响

曾维政, 吴晓玲, 蒋明德

曾维政, 蒋明德, 成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083
吴晓玲, 重庆医科大学附属第一医院消化内科 重庆市 400016
曾维政, 男, 1961-12-20 生, 湖南省邵阳市人, 汉族。主任医师, 教授, 第三军医大学研究生导师。主要从事肝纤维化防治的基础与临床研究。
成都军区“十五”医药科研基金课题, NO. 01A009
通讯作者: 曾维政, 610083, 四川省成都市天回镇, 成都军区总医院消化内科。
zengweizheng@163.com
电话: 028-83577558
收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-03

Effect of oxymatine on Smad gene expression in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats

Wei-Zheng Zeng, Xiao-Ling Wu, Ming-De Jiang

Wei-Zheng Zeng, Ming-De Jiang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China
Xiao-Ling Wu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China
Supported by Medical Scientific Foundation of Chengdu Command, NO.01A009
Correspondence to: Wei-Zheng Zeng, General Hospital of Chinese PLA Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. zengweizheng@163.com
Received: 2005-02-14 Accepted: 2005-03-03

Abstract

AIM: To study the effect of oxymatine in the prevention of experimental hepatic fibrosis in rats induced by chronic administration of CCl₄, to evaluate its effect on gene expression of Smad 4, Smad 7, and to explore its potential anti-fibrotic mechanism.

METHODS: Healthy male SD rats were randomly divided into three groups: the normal group ($n=10$), the oxymatine treatment group ($n=40$) and the fibrosis group ($n=40$). Hepatic fibrosis was induced by subcutaneous injection of CCl₄ (300 mL/L, 3 mL/kg, twice per wk for 8 wks). The rats in the treatment group received celiac injection of oxymatine at 10 mg/kg twice a week. The deposition of collagen was examined with Masson staining. Gene expression of Smad 4 and Smad 7 was detected by *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IH), respectively. The data were analyzed with specific software.

RESULTS: Reduction of collagen deposition and rearrangement of the parenchyma were noted in oxymatine-treated rats. The semi-quantitative histological scores (1.9 ± 0.3 vs

3.6 ± 0.8 , $P < 0.05$) and average area of collagenous fibre [$(94 \pm 37) \mu\text{m}^2$ vs $(691 \pm 189) \mu\text{m}^2$, $P < 0.01$] in treatment group were decreased. The expression of Smad 7 was increased, whereas the expression of Smad 4 was decreased considerably in treated animals. The positive rate of Smad 4 mRNA (0.31 ± 0.12 vs 0.62 ± 0.23 , $P < 0.05$) and Smad 4 protein [$(2.33 \pm 1.64)\%$ vs $(9.56 \pm 1.34)\%$, $P < 0.05$] were lower in treatment group. In contrast, the positive rate of Smad 7 mRNA (0.26 ± 0.11 vs 0.16 ± 0.03 , $P < 0.05$) and Smad 7 protein [$(4.27 \pm 0.43)\%$ vs $(2.86 \pm 0.86)\%$, $P < 0.05$] were increased considerably in treated animals.

CONCLUSION: Oxymatine can promote the gene expression of Smad 7 and inhibit the expression of Smad 4.

Key Words: Oxymatine; Smad; Hepatic fibrosis; CCl₄

Zeng WZ, Wu XL, Jiang MD. Effect of oxymatine on Smad gene expression in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):984-987

摘要

目的: 研究氧化苦参碱(oxymatine, 苦参素)对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠肝组织 Smad 基因表达的影响。

方法: SD 大鼠 90 只分为正常对照组(C 组)、模型组(M 组)和苦参素干预组(T 组)。CCl₄ sc 诱导大鼠肝纤维化, 干预组大鼠在造模的同时给予苦参素注射液 ip, 正常对照组给予液体石蜡 sc 和生理盐水 ip, 8 wk 实验结束时处死动物。HE 和 Masson 染色观察大鼠肝组织病理学变化和胶原沉积, 原位杂交和免疫组化检测 Smad 4, Smad 7 基因表达情况。

结果: 氧化苦参碱干预组大鼠肝半定量组织学积分(1.9 ± 0.3 vs 3.6 ± 0.8 , $P < 0.05$)和胶原面积(94 ± 37 vs $691 \pm 189 \mu\text{m}^2$, $P < 0.05$)明显减少; Smad 7 蛋白表达阳性率增加 [$(5.09 \pm 0.68)\%$ vs $(2.86 \pm 0.86)\%$, $P < 0.05$]; Smad 4 蛋白表达阳性率减少 [$(2.33 \pm 1.64)\%$ vs $(9.56 \pm 1.34)\%$, $P < 0.05$]; Smad 4 mRNA 表达阳性率显著减少 (0.31 ± 0.12 vs 0.62 ± 0.23 , $P < 0.05$); Smad 7 mRNA 的表达则明显增加 (0.26 ± 0.11 vs 0.16 ± 0.03 , $P < 0.05$)。

结论: 氧化苦参碱能抑制 Smad 4 基因表达, 促进 Smad 7 基因表达。

关键词: 氧化苦参碱; Smad; 肝纤维化; 四氯化碳

曾维政, 吴晓玲, 蒋明德. 氧化苦参碱对肝纤维化大鼠 Smad 基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(8):984-987
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/984.asp>

0 引言

氧化苦参碱(苦参素, oxymatrine)是从苦参及同属(豆科槐属)植物如广豆根和苦豆子等植物中提取出来的主要活性成分, 具有保护肝细胞、抗乙型肝炎、调节免疫等多种功效^[1], 还具有良好的抗肝纤维化作用^[2-5], 是肝病用药中极具前途的临床药物. 观察氧化苦参碱对 CC1₄ 诱导纤维化大鼠肝脏 Smad 4, Smad 7 基因表达的影响, 从分子水平探讨氧化苦参碱干预实验性大鼠肝纤维化的分子机制.

1 材料和方法

1.1 材料 质量 150 ± 10 g 健康雄性 SD 大鼠购自华西医科大学实验动物中心. 化学纯 CC1₄ (成都联合化工试剂研究所), 氧化苦参碱注射液(商品名博尔泰力注射液, 100 mg/支, 宁夏绿谷药业有限公司生产), Smad4, Smad7 抗体及免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程公司), Smad4, Smad7 探针及原位杂交试剂盒(上海申能生物工程公司).

1.2 方法 健康雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组(C组)10只, 苦参素干预组(T组)40只, 模型对照组(M组)40只, 各组间暴露因素无差别($P > 0.05$). 用 300 mL/L CC1₄ 石蜡油溶液, 3 mL/kg sc, 每 wk 2 次, 共 8 wk 诱导大鼠肝纤维化模型. 氧化苦参碱干预组在造模的同时给予 50 g/L 注射液, 10 mg/kg, ip, 每 wk 2 次, 共 8 wk, CC1₄ 模型组造模同时予生理盐水 ip, 正常对照组予等量石蜡油 sc 和生理盐水 ip 处理. 各组动物在最后一次 CC1₄ 注射后 48 h 处死, 取肝组织以中性甲醛溶液固定、石蜡包埋, 以多聚赖氨酸涂布的载玻片制作 3 μm 组织切片, 进行 HE 染色和 Masson 三重胶原染色作组织病理学检查; 免疫组织化学(SABC)方法检测 Smad 4, Smad7 蛋白表达水平, 原位杂交(*in situ* hybridization)法检测 Smad 4,

Smad 7 mRNA 表达水平, 检测步骤参考试剂说明书进行. Smad 4 mRNA 探针序列(5' → 3'): Biotin- GGT GGC GTT AGA CTC TGC CGG GGC TAA CAG(1035-1064 bp, GC% = 63.33), Smad 7 mRNA 探针序列(5' → 3'): Biotin-GAG CTG TCC GAG GCA AAA GCC ATT CCC CTG(2 310-2 339 bp, GC% = 60.00), 以生物素标记探针, 碱性磷酸酶搭桥, BCIP/NBT 显色反应, 光学显微镜下观察结果. 胶原纤维染色、Smad 蛋白及其 mRNA 表达结果均使用日本 Nikon TE2000-H 倒置显微镜采集图像, 美国 Image-Pro Plus 专业图像软件分析系统专进行数据采集.

统计学处理 胶原面积、IH, ISH 表达阳性率均以 mean ± SD 表示, Excel 2000 统计软件进行 *t* 检验分析.

2 结果

2.1 肝组织病理学改变 正常肝组织肝小叶结构清晰, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列; 肝纤维化模型大鼠肝细胞呈广泛脂肪变性、坏死, 炎性细胞浸润以汇管区及中央静脉周围为重, 肝小叶结构破坏; Masson 胶原染色见蓝色胶原纤维明显增多, 汇管区-中央静脉区纤维间隔宽大, 包绕分隔肝小叶, 部分形成假小叶, 肝纤维化组织学半定量积分为 3.6 ± 0.8; 苦参素干预性治疗组大鼠肝细胞变性、坏死较轻, 有少量纤维组织增生, 部分向小叶内伸展, 形成纤细的纤维间隔, 肝小叶结构基本完整, 肝纤维化组织学半定量积分为 1.9 ± 0.3; 计算机图像分析正常大鼠肝脏平均胶原面积为 56 ± 21 μm², 模型组大鼠显著增加为 (691 ± 189) μm², 二者差异非常显著($P = 0.008$, $P < 0.01$), 苦参素干预组肝脏胶原面积则减少为 (94 ± 37) μm², 与模型组比较差异显著($P = 0.042$, $P < 0.05$, 图 1 A-B).

2.2 大鼠肝组织 Smad 4 表达 免疫组化检测显示, 正常对照组大鼠肝脏仅有个别间质细胞显示 Smad 4 蛋白阳性染色, 模型组大鼠肝组织 Smad 4 蛋白表达明显增强, 阳性染色信号呈棕黄色颗粒状, 主要位于汇管区的间质细胞胞质, 其平均表达阳性率为 (9.56 ± 1.34)%, 苦

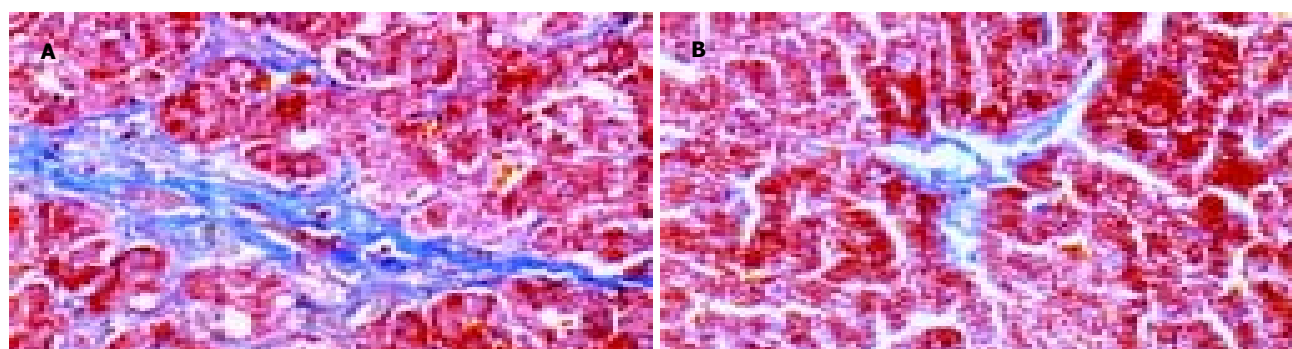


图1 大鼠肝脏胶原染色 Masson × 200. A: 模型组; B: 苦参素组.

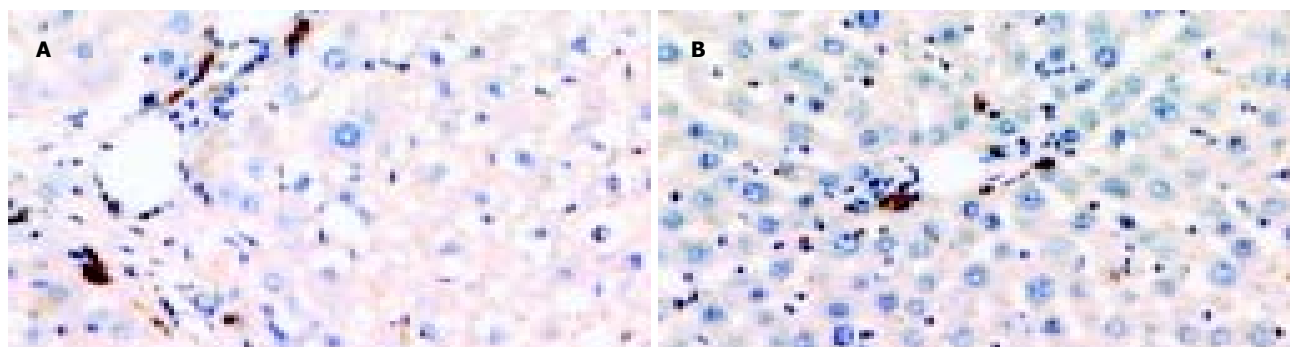


图2 大鼠肝脏 Smad 4 蛋白表达 SABC $\times 200$. A: 模型组; B: 苦参素组.

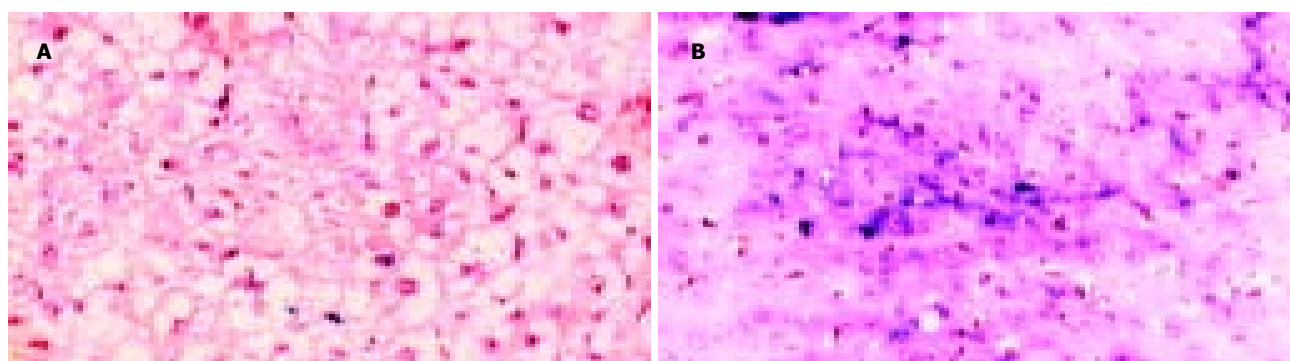


图3 大鼠肝脏 Smad 7 mRNA 表达 ISH $\times 200$. A: 模型组; B: 苦参素组.

参素干预组 Smad 4 表达阳性率减少为 $(2.33 \pm 1.64)\%$ ($P = 0.008$, $P < 0.01$, 图 2 A-B). 原位杂交检测显示, Smad 4 mRNA 在正常对照组大鼠肝组织仅有少数间质细胞显示阳性结果, 为胞质细小的蓝紫色颗粒, 且表达强度微弱; CCl_4 sc 使大鼠肝脏 Smad 4 mRNA 表达强度明显增加, 阳性信号显示为胞质蓝紫色颗粒, 且间质细胞和肝细胞均有表达, 其表达阳性率为 0.62 ± 0.23 , 苦参素注射使其减少为 0.31 ± 0.12 , 二者差异显著 ($P < 0.05$).

2.3 大鼠肝组织 Smad 7 表达 免疫组化法于正常大鼠肝脏未检测出 Smad 7 阳性表达; 模型组大鼠肝脏 Smad 7 蛋白阳性表达稀少, 仅在汇管区见少数间质细胞显示阳性染色, 为胞质棕黄色颗粒, 其平均表达阳性率为 $(3.19 \pm 1.09)\%$, 与正常组无显著差异 ($P = 0.068$, $P > 0.05$, 图 3A). 苦参素干预组 Smad 7 蛋白阳性染色亦位于间质细胞, 其阳性率增加为 $(5.09 \pm 0.68)\%$, 与模型组比较差异显著 ($P = 0.026$, $P < 0.05$, 图 3B). 原位杂交检测显示, CCl_4 诱导的肝纤维化大鼠肝脏 Smad 7 mRNA 表达水平低下, 仅少许间质细胞显示阳性结果, 为胞质内蓝紫色颗粒沉着, 苦参素干预性治疗则使 Smad 7 mRNA 表达阳性率则由 0.16 ± 0.03 增加为 0.26 ± 0.11 , 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$).

3 讨论

TGF β -Smad 信号传导通路是肝纤维化时主要的信号转

导途径^[6-8]. Smads 是将 TGF β 信号传导至细胞内发挥生物效应的关键分子, 目前发现有三个亚类: 受体激活 Smad (R-Smad), 共用 Smad (Co-Smad), 和抑制性 Smad (I-Smad). TGF β 的生物效应非常广泛复杂, 其信号传导过程却比较简单^[9]: TGF β 配体与胞膜表面的 I, II 型受体结合后使 R-Smad (Smad 2, Smad 3) 磷酸化而活化, Smad 2, Smad 3 再和胞质中 Smad 4 (Co-Smad) 结合形成多聚体转位进入胞核, 与一系列转录辅激活蛋白、转录辅阻遏分子和转录因子共同结合于靶基因特定的 CAGAC 序列 (Smad-binding elements, SBEs, Smad 结合元件), 调节特定靶基因的表达. Smad 6, 7 (I-Smad) 则可抑制 Smads 多聚体形成或抑制 R-Smads 磷酸化而阻止该信号转导过程. 目前对 Smad 信号通路的信息传导过程及其关键分子的表达状况研究不断深入^[10-17], 不仅有助于进一步阐明肝纤维化的发病机制, 也为肝纤维化的防治提供了一个新的颇有希望的干预途径. Flanders^[18]认为, TGF β 的大多数促纤维化效应是由 Smad 3 介导的, 因此, 促进抑制性分子 Smad 7 的过度表达或者用小分子物质 halofuginone 抑制 Smad 3 的功能将是非常有效的抗纤维化措施. 梁志清 *et al*^[19] 经门静脉灌注将高滴度的反义 Smad 4 重组腺病毒载体导入大鼠纤维化肝脏, 结果转基因大鼠肝脏内源性 Smad 4 表达降低, 且肝脏 I 型胶原合成减少, 表明抑制 Smad 4 表达有潜在的抗纤维化价值. 目前许多中药研

究也开始关注对 TGF β -Smad 信号传导通路的干预作用, 试图从分子水平探索中药抗肝纤维化的机制, 如张国 *et al*^[20] 研究发现, 中药活血软坚方能够减少肝星状细胞合成 Smad 3; 宋仕玲 *et al*^[21] 则观察到复方金三莪具有促进 Smad 7 表达、抑制 Smad 3 表达的作用. 这些研究表明, 调节关键的 Smad 分子表达水平是行之有效的抗纤维化措施, 也是有用的疗效判定指标.

苦参碱和氧化苦参碱(苦参素)是从苦参及其同属植物苦豆子等中提取、分离出来的主要活性成分, 大量实验表明^[22-25], 苦参碱及氧化苦参碱具有抑制成纤维细胞增生和 III 型前胶原 mRNA 表达作用, 还可通过抗炎、抗病毒、抑制免疫等环节抑制肝纤维化进程. 我们选择苦参素 ip 干预性治疗实验性大鼠肝纤维化, 观察苦参素对肝纤维化大鼠肝组织 Smads 表达的影响, 探讨其抗肝纤维化疗效及可能的分子机制, 结果表明苦参素注射使大鼠肝脏 Smad 4 蛋白表达阳性率由 9.56% 下降为 2.33% ($P < 0.05$), 同时, 原位杂交法检测大鼠肝组织 Smad 4 mRNA 阳性率由 62% 减少为 31% ($P < 0.05$); Smad 7 蛋白表达阳性率由 2.86% 增加为 5.09% ($P < 0.05$), Smad 7 mRNA 阳性率则由 16% 增加为 26% ($P < 0.05$), 肝组织 Smad 蛋白与 mRNA 表达水平变化规律一致. 显示氧化苦参碱干预性治疗能够有效地抑制实验性大鼠肝纤维化 TGF β -Smad 信号转导通路中关键的信息传导分子的基因表达, 抑制 CCl₄ 诱导的肝组织损害和肝脏胶原沉积, 使大鼠肝脏胶原平均面积由 $(691 \pm 189) \mu\text{m}^2$ 减少为 $(94 \pm 37) \mu\text{m}^2$ ($P < 0.01$), 这些作用可能是苦参素有效地抑制实验性大鼠肝纤维化的重要分子机制.

4 参考文献

- 1 吴有莲. 苦参碱抗肝纤维化临床研究. 中药材 2004;27:153-154
- 2 焦建中, 聂青和, 邱英峰, 赵夏夏. 苦参碱抗肝纤维化的临床研究. 肝脏 2004;9:54-55
- 3 沈镭, 陆伦根, 曾民德, 李继强, 茅益民, 贾一韬, 杨文卓. 氧化苦参碱注射液对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化治疗作用. 肝脏 2003;8:35-36
- 4 宋春辉, 万谟彬, 郭品娥, 朱伟. 复方苦参碱注射液对四氯化碳诱导大鼠肝脏纤维化的保护作用研究. 中医药学刊 2003;21:1087-1089
- 5 卢清, 张清波, 张继明, 尹有宽, 郭祥惠. 氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞旁分泌活化途径的抑制作用. 肝脏 2004;9:31-33
- 6 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. TGF β -Smad 信号转导通路与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003;11:1601-1605
- 7 Liu C, Gaca MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor- β (TGF- β) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. J Biol Chem 2003; 278:11721-11728
- 8 Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. Hepatology 2002;35:49-61
- 9 Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. The EMBO J 2000;19:1745-1754
- 10 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. Hepatology 2001;34:89-100
- 11 Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis in vivo and hepatic stellate cell line in vitro. Pathol Int 2003;53:18-26
- 12 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. Gastroenterology 2003;125:178-191
- 13 杨隽, 司书毅, 张月琴. Smad 在 TGF- β 超家族信号通路中的调控作用. 中国生物工程杂志 2003;23:9-12
- 14 吴建新, 孟祥军, 陈源文, 程计林, 李定国, 陆汉明. Smad 7 与转化生长因子 β 1 受体后信息调控. 中华肝脏病杂志 2003;11:315-317
- 15 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. 实验性大鼠肝纤维化 TGF β 1 及其受体 mRNA 与 Smad3, 7 的表达. 世界华人消化杂志 2004;12:676-679
- 16 姚桢, 栾昌海. 肝纤维化的研究现状与进展. 日本医学介绍 2003; 24:88-91
- 17 姜虹, 李定国. TGF- β 1 与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003; 11:326-329
- 18 Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. Int J Exp Pathol 2004;85:47-64
- 19 梁志清, 徐新宝, 何振平. 反义 Smad 4 对大鼠纤维化肝脏金属蛋白酶及其抑制剂的调节. 重庆医学 2004;33:716-717
- 20 张国, 张法灿, 王天才, 梁扩寰. 活血软坚方对肝星状细胞 Smad 信号的影响及意义. 中华肝脏病杂志 2004;12:213-215
- 21 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. 金三莪对肝纤维化大鼠 TGF- β 1 及其 I、II 型受体 mRNA 与 Smad 3、Smad 7 表达的影响. 中医药学刊 2004;22:1044-1047
- 22 施光峰, 李谦, 翁心华, 郭祥惠. 苦参素对大鼠纤维化肝脏金属蛋白酶-1 和 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响. 中华肝脏病杂志 2004;12:56
- 23 蒋忠胜. 苦参碱联合复方鳖甲软肝片抗肝纤维化的疗效观察. 肝脏 2004;9:143
- 24 李谦, 施光峰, 陈澍, 翁心华. 苦参素及联合维生素 E 的抗肝纤维化作用及机制. 中华传染病杂志 2003;21:278-280
- 25 孙永年, 徐斌, 黄祝青, 黄长形. 苦参素治疗对慢乙肝患者 TGF- β 1、TNF- α 、HA、PC III 水平的影响. 中国现代医学杂志 2004;14:41-45

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

抑制 gankyrin 的表达对肝癌细胞系 HepG2 增殖的影响

杨绍旭, 窦科峰, 路凡, 卢兹凡, 赵忠良

杨绍旭, 窦科峰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科
陕西省西安市 710032
路凡, 卢兹凡, 赵忠良, 中国人民解放军第四军医大学基础部分子生物学教研室 陕西省西安市 710032
杨绍旭, 男, 1976-06-27 生, 山东省青岛市人, 汉族, 2002 年第四军医大学外科学硕士, 2002 年西京医院肝胆外科博士生。
通讯作者: 窦科峰, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科。yzxlc@163.com
电话: 029-82500093
收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-03

Effects of suppressing gankyrin expression on proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2

Zhao-Xu Yang, Ke-Feng Dou, Fan Lu, Zi-Fan Lu, Zhong-Liang Zhao

Zhao-Xu Yang, Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China
Fan Lu, Zi-Fan Lu, Zhong-Liang Zhao, Department of Biochemistry and Molecular Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China.
Correspondence to: Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China. yzxlc@163.com
Received: 2005-02-14 Accepted: 2005-03-03

Abstract

AIM: To explore the effect of suppressing gankyrin expression using RNA interference (RNAi) technique on the proliferation and cell cycle of hepatocellular carcinoma cell line HepG2.

METHODS: HepG2 cell line stably expressing shRNA targeted at gankyrin gene was established. The gankyrin expression was assessed by Western blotting analysis. Cell growth was evaluated by cell counting and MTT assay, and cell cycle was analyzed by flow cytometry.

RESULTS: The growth of HepG2 cells was inhibited significantly by suppressing the expression of gankyrin. Compared with the cells transfected with control plasmid, the number of the gankyrin-suppressed cells was much lower (d6: $24.4 \times 10^3 \pm 5.2 \times 10^3$ vs $123.3 \times 10^3 \pm 2.8 \times 10^3$, $P < 0.05$). MTT assay showed cell proliferation was decreased (144 h: 7.53 ± 0.50 vs 16.30 ± 0.38 , $P < 0.05$), flow cytometric analysis demonstrated that the cell cycle was stuck at G1 phase (G1: $71.63 \pm 3.60\%$ vs $52.57 \pm 2.82\%$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Suppression of the expression of gankyrin in HepG2 cells leads to cell proliferation inhibition and cell cycle arrest. RNAi-mediated inhibition of gankyrin may be a useful therapeutic approach for human hepatocellular carcinoma.

Key Words: Gankyrin; RNA interference; Hepatocellular carcinoma

Yang ZX, Dou KF, Lu F, Lu ZF, Zhao ZL. Effects of suppressing gankyrin expression on proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):988-992

摘要

目的: 探索通过 RNA 干扰技术抑制 gankyrin 的表达对肝癌细胞系 HepG2 增殖及细胞周期的影响。

方法: 建立稳定表达靶向 gankyrin 的 shRNA 的 HepG2 细胞系。通过 Western blotting 验证基因表达的抑制效果。采用细胞计数及 MTT 法检测细胞的增殖能力。流式细胞仪分析细胞周期。

结果: 抑制 gankyrin 基因的表达显著抑制了 HepG2 细胞的生长, 与转染阴性对照 shRNA 质粒细胞相比, 细胞计数示细胞数目明显减低(d 6: $24.4 \times 10^3 \pm 5.2 \times 10^3$ vs $123.3 \times 10^3 \pm 2.8 \times 10^3$, $P < 0.05$), MTT 分析显示细胞增殖率明显下降(144 h: 7.53 ± 0.50 vs 16.30 ± 0.38 , $P < 0.05$), 流式细胞分析示细胞周期阻滞在 G1 期(G1: $71.63 \pm 3.60\%$ vs $52.57 \pm 2.82\%$, $P < 0.05$)。

结论: 在 HepG2 细胞中抑制 gankyrin 的表达可有效抑制细胞生长并导致细胞周期的阻滞。利用 RNA 干扰技术抑制 gankyrin 的表达可能会成为一种有效的肝癌基因治疗手段。

关键词: Gankyrin; RNA 干扰; 肝细胞癌

杨绍旭, 窦科峰, 路凡, 卢兹凡, 赵忠良. 抑制 gankyrin 的表达对肝癌细胞系 HepG2 增殖的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(8):988-992
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/988.asp>

0 引言

肝细胞癌(HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一, 与肝炎病毒的感染以及多种肿瘤相关基因的异常表达密切相关。Gankyrin(癌性锚蛋白重复蛋白, GeneBank

NM-02814) 是近年来发现的癌基因^[1], 几乎在所有的肝癌组织中高表达^[1~2], 因此他也为我们对肝癌的基因治疗提供了一个潜在的靶点. 我们通过短发夹状RNA (small hairpin RNA, shRNA) 载体 pGenesil-1 (武汉品赛生物技术公司提供) 携带靶向 gankyrin 的 shRNA 对肝癌细胞系中的 gankyrin 基因进行过 RNA 干扰研究, 发现针对靶序列 (AAGGACCATTATGAGGCTACA, gankyrin cDNA 的第 501-521 个碱基) 的 shRNA 可有效抑制 gankyrin 的表达, 现研究抑制 gankyrin 的表达对 HepG2 细胞增殖及细胞周期的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 重组质粒 pGensil-1-gankyrin (转录靶向 gankyrin 的 shRNA 序列, 简称 PGG) 及阴性对照质粒 pGensil-1-control (转录与所有人鼠基因均不同源的 shRNA 序列, 简称 PGC) 为本室保存. 载体 pGenesil-1 含抗 G418 的耐药基因, 可在 G418 作用下筛选稳定转染的细胞. 同时携带绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因, 可直接在正置荧光显微镜下观察转染效率并挑取成功转染的细胞克隆. 编码 shRNA 的引物序列插入到 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切位点之间, 由 U6 启动了启动转录 (图 1). 阴性对照 PGC 所编码的 shRNA 与所有人鼠基因均不同源 (图 2). Transfast 转染试剂购自 Promega. HepG2 细胞培养于 DMEM (Gibco) 培养基加 100 mL/L 胎牛血清中, 至对数生长期. 将 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板, 从而使细胞在转染时的汇合率达到 80-90%. 24 h 后按每孔 1 μ g 质粒分别将 PGG, PGC 质粒转染细胞 (操作按 Transfast 转染试剂盒说明进行). 48 h 后胰酶消化细胞并均匀铺于 24 孔板内. 按终浓度 500 mg/L 加入 G418, 筛选稳定表达 shRNA 的细胞克隆.

1.2 方法

1.2.1 Western blotting 分析 将筛选的细胞克隆扩大培养. 取 1×10^6 个细胞加入 100 μ L 细胞裂解液 (10 mmol/L Tris-HCL pH7.5, 10 g/L Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA PH8.0, 1 mmol/L EGTA,

5 g/L NP-40, 用前加入 1 mg/L aprotinin, 1 mg/L leupeptin, 1 mg/L pepstatin, 0.2 mmol/L PMSF) 进行裂解. 于冰上裂解 30 min, 所得裂解液, 于 12 000 g, 4℃ 离心 10 min. 蛋白定量按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行. 取上清加入 1/4 体积的 5×SDS 蛋白加样缓冲液, 煮沸 10 min. 所得蛋白样品, 经 120 g/L SDS-PAGE 分离后, 电转至硝酸纤维素膜上, 丽春红染色验证蛋白转移成功. 以 5 g/L 的脱脂奶粉封闭 2 h 后, 依次加入兔抗 gankyrin 抗血清 (室温 2 h, TTBS 洗 4 次), 及山羊抗兔 IgG-AP (室温 1 h, TTBS 洗 3 次, TBS 洗 1 次), 最后加入 NBT/BCIP 底物显色.

1.2.2 细胞增殖状况分析 将稳定转染 PGG, PGC 的 HepG2 细胞按 5×10^3 个细胞每孔接种于 24 孔板, 每 24 h 取 3 孔, 用胰蛋白酶消化后, 分别进行细胞计数, 取平均值. 连续观察 7 d, 绘制生长曲线, 并按以下公式计算群体倍增时间 (population doubling time, PDT) = $[\log 2 / (\log N_t - \log N_0)] \times t$, 其中 N_0 和 N_t 分别代表接种时和培养 t 小时后的细胞数. 分别将上述细胞按 1×10^3 个细胞每孔接种于 96 孔板, 分别于培养 6, 48, 96, 144 h 后, 加入 MTT (5 g/L, Sigma) 20 μ L, 继续培养 4 h, 移除培养液, 加 DMSO 200 μ L, 充分振摇 10 min, 在酶联免疫检测分析仪上测定吸光度 (A_{570nm}). 细胞增殖率 = A_{570nm} (48, 96, 144 h) / A_{570nm} (6 h). 以只加培养液不加细胞的空白对照孔调零. 每一个实验点均设 3 组重复.

1.2.3 细胞周期分析 收集 1×10^6 个细胞, 用 PBS 洗涤, 置于 4℃ 预冷的细胞固定液 (700 mL/L 酒精, 300 mL/L PBS) 中固定并于 4℃ 保存. 测量时去除乙醇用碘化丙啶 (PI) 染色, 于流式细胞仪分析细胞周期.

统计学处理 组间比较用 Student's t 检验, 用 SPSS 10.0 进行分析.

2 结果

2.1 细胞转染 于 G418 筛选培养约 2-3 wk 后, 稳定转染 PGG 及阴性对照 PGC 质粒的细胞克隆形成. 于荧光正置显微镜下观察, 见部分克隆带绿色荧光, 取之进一步扩大培养 (图 3). Western blotting 结果验证在 PGG 细胞内 gankyrin 的表达被有效抑制 (图 4).

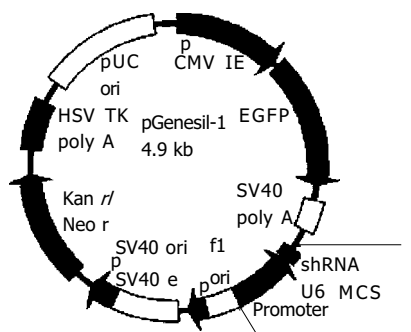
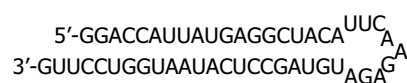


图 1 pGenesil-1 质粒结构. 5' -*Mlu* I -*Sma* I -*Hind* III -*Sph* I -*Pst* I -*Sal* I -*Xba* I -*Bam*H I -U6 promoter-*Eco*R I -*Sal* I -*Xba* I -*Dra* III -3'.

PGG shRNA



PGC shRNA

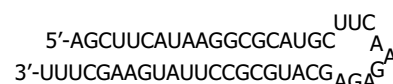


图 2 重组质粒 PGG, PGC 表达的 shRNA.

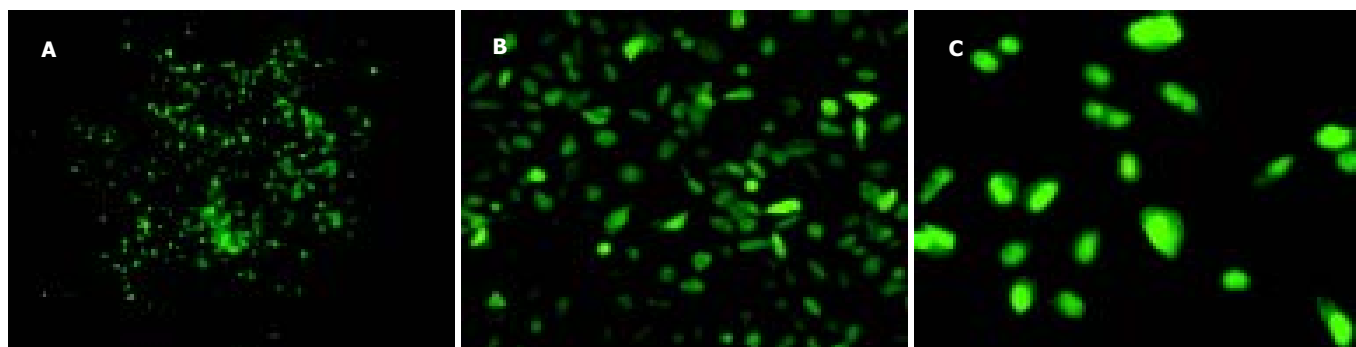


图3 荧光显微镜下观察细胞转染情况. A: 成功转染观察到绿色荧光. $\times 100$; B: 将细胞克隆扩大培养. $\times 200$; C: 将细胞爬片, 倒置荧光显微镜下观察. $\times 400$.

2.2 细胞生长特性 PGG细胞的生长速度明显低于PGC细胞, 所绘制的生长曲线明显向右下移动(图5), 群体倍增时间明显延长(61.05 h *vs* 28.41 h). MTT分析结果显示在各个时间点上, PGC细胞的增值率均明显低于PGG细胞(图6). 二者均提示抑制gankyrin的表达引起HepG2细胞的生长抑制.

2.3 细胞周期的变化 PGG细胞的G1期明显高于PGC细胞($71.63\% \pm 3.60\%$ *vs* $52.57\% \pm 2.82\%$, $P < 0.05$), G2期($4.33\% \pm 1.31\%$ *vs* $16.03\% \pm 1.81\%$, $P < 0.05$)及S期($24.03\% \pm 3.67\%$ *vs* $31.40\% \pm 1.01\%$, $P < 0.05$)均明显低于PGC细胞. 提示更多的PGG细胞被阻滞在G1期(图7).

3 讨论

癌基因的过表达被认为与多种肿瘤的发生发展密切相关, 同时也为肿瘤的治疗提供了一个潜在的靶点^[3].

RNA干涉(RNA interference, RNAi)是近年来发展起来的新技术, 相对于传统的反义核酸技术, 对靶基因的抑制作用强、特异性高^[4]. 而DNA载体介导的shRNA则可以稳定而持久地抑制靶基因的表达^[5-10]. 近年来RNAi在基因功能、抗肿瘤和抗病毒基因治疗方面均有着广泛的应用^[11-16]. 虽然发现肿瘤抑制基因p53及p16^{INK4A}等的失活与肝癌的发生关系密切, 但其机制并不清楚, 且并没有发现在肝癌上普遍激活的癌基因^[1, 17]. 2000年Higashitsuji *et al*^[1]通过比较肝癌组织与正常肝组织的cDNA首次发现在肝癌组织中存在gankyrin的过表达. 并分别有实验调查了34^[1]及64^[2]例肝癌患者, 结果gankyrin在癌组织中的过表达率分别为100%(34/34)及96.9%(62/64), 而在正常的肝组织中则不存在gankyrin的表达^[2]. 而我们也调查了3种肝癌细胞系HepG2, SMMC-7721, HHCC, 结果显示均存在gankyrin的表达. Gankyrin包含6个锚蛋

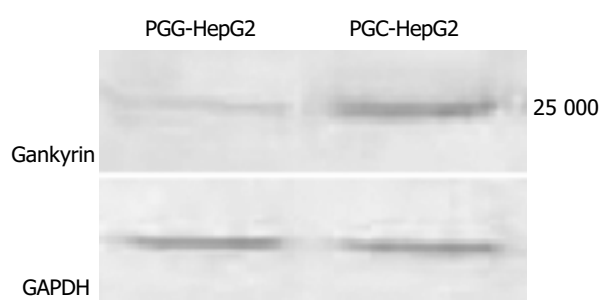


图4 Western blotting分析.

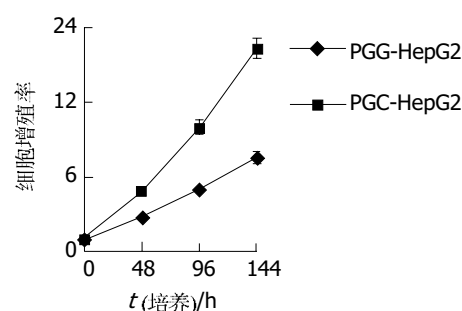


图6 MTT法测定细胞增殖率.

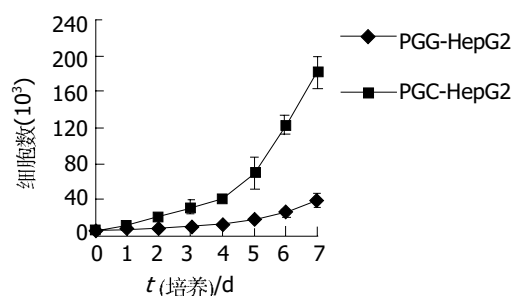


图5 细胞生长曲线.

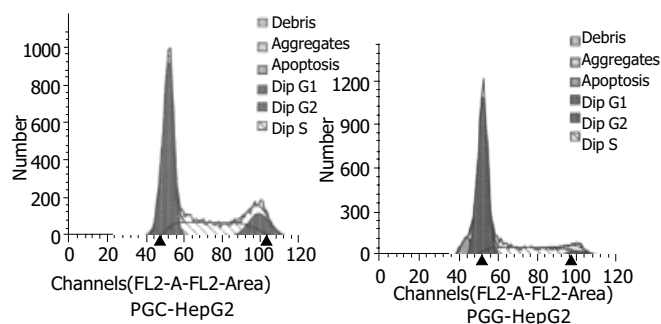


图7 细胞周期分析.

白重复序列, 是一个癌基因, 属于锚蛋白(ankyrin)重复序列家族的成员. 锚蛋白重复序列(ankyrin repeat)是生物体中广泛利用的一种序列模体, 他由数目不等的 ankyrin 串联起来, 形成种类众多但功能各异的 ankyrin 蛋白质分子. 其中 ankyrin 结构域介导蛋白质与蛋白质的相互作用, 他能够和多种配体结合, 实现纷繁复杂的生物功能. Gankyrin 可以与 Rb 蛋白结合, 促使其磷酸化, 降低 Rb 的稳定性, 释放出转录因子 E2F1 的活性, 而 E2F1 则是促使细胞进入增殖周期的重要因子, E2F 与其他一些癌基因共同转染可促进细胞的恶性转变^[1, 17]. Gankyrin 同时可以与 Cdk4 结合, 对抗 p16^{INK4A} 及 p18^{INK4C} 对肿瘤生长的抑制作用^[17-22]. 在一个肝癌形成的动物模型中, 发现从肿瘤发生的最初阶段, 即出现了 gankyrin 的过表达^[23-24]. 而在爆发性肝坏死后的再生过程中, 也存在 gankyrin 的表达^[25-26]. 这些结果表明, 在肝癌的发生过程及肝细胞的生长周期调控中, gankyrin 起着重要的作用, 同时也为肝癌的治疗提供了一个潜在的靶点. 利用新兴的 RNA 干涉技术, 如能有效抑制 gankyrin 的表达, 将有可能起到治疗肝癌的作用.

我们采用 shRNA 抑制 gankyrin 的表达. 由于脂质体转染试剂介导的细胞转染相对于病毒效率较低, 可能会影响基因沉默的效果, 所以我们采用稳定转染挑取细胞克隆. 为了防止自身耐药细胞的繁殖影响试验结果, 我们选择 pGenesil-1 作为 shRNA 载体. PGenesil-1 同时含 G418 耐药基因及绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因, 通过可激发的绿色荧光可以直接在正置荧光显微镜下判断转染效率. 且在使用 G418 的同时, 可在直视下判断所形成的细胞克隆是否是成功转染的细胞. 由于有研究认为 siRNA 本身也具有细胞增殖的抑制作用^[27], 所以我们选择一段与人鼠基因均不同源的 shRNA 序列作为阴性对照.

我们的结果显示, 抑制 gankyrin 的表达将明显抑制 HepG2 细胞的增殖, 细胞生长曲线明显右移, 群体倍增时间显著延长, 细胞增长率明显降低. 流式细胞分析显示更多的 PGG-HepG2 细胞被阻滞在 G1 期, 由于 gankyrin 的过表达可引起 Rb 的磷酸化, 从而释放 E2F1 的活性, 抑制 gankyrin 的表达可能会使 E2F1 重新被抑制, 这可能是细胞周期变化的机制之一, 进一步的实验应测定 Rb 的磷酸化水平及 E2F1 的活性. 总之, 抑制 gankyrin 的表达可能会成为一种有效的肝癌基因治疗手段. 当然, 进一步应进行相应的体内试验以证明其可行性.

4 参考文献

- Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, Dawson S, Nonoguchi K, Kido T, Mayer RJ, Arai S, Fujita J. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med* 2000;6:96-99
- Fu XY, Wang HY, Tan L, Liu SQ, Cao HF, Wu MC. Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:638-643
- Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:222-231
- Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:1000-1004
- Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 2002;20:505-508
- Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5515-5520
- McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-39
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-553
- Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1844-1848
- Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 2003;33:401-406
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002;2:243-247
- Yang ZG, Chen Z, Ni Q, Xu N, Shao JB, Yao HP. Inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by small hairpin RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2005;11:498-502
- Zhang XN, Xiong W, Wang JD, Hu YW, Xiang L, Yuan ZH. SiRNA-mediated inhibition of HBV replication and expression. *World J Gastroenterol* 2004;10:2967-2971
- Ni Q, Chen Z, Yao HP, Yang ZG, Liu KZ, Wu LL. Inhibition of human La protein by RNA interference downregulates hepatitis B virus mRNA in 2. 2. 15 cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:2050-2054
- Cheng SQ, Wang WL, Yan W, Li QL, Wang L, Wang WY. Knockdown of survivin gene expression by RNAi induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *World J Gastroenterol* 2005;11:756-759
- Jiang M, Rubbi CP, Milner J. Gel-based application of siRNA to human epithelial cancer cells induces RNAi-dependent apoptosis. *Oligonucleotides* 2004;14:239-248
- Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, Sakurai T, Dawson S, Mayer RJ, Itoh K, Fujita J. MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* 2003;278:10668-10674
- Dawson S, Apcher S, Mee M, Higashitsuji H, Baker R, Uhle S, Dubiel W, Fujita J, Mayer RJ. Gankyrin is an ankyrin-repeat oncoprotein that interacts with CDK4 kinase and the S6 ATPase of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 2002;277:10893-10902
- Yuan C, Li J, Mahajan A, Poi MJ, Byeon II, Tsai MD. Solution structure of the human oncogenic protein gankyrin containing seven ankyrin repeats and analysis of its structure-function relationship. *Biochemistry* 2004;43:12152-12161
- Krzywdas S, Brzozowski AM, Al-Safty R, Welchman R, Dawson S, Fujita J, Higashitsuji H, Mayer RJ, Wilkinson AJ. Crystallization of gankyrin, an oncoprotein that interacts with CDK4

- and the S6b (rpt3) ATPase of the 19S regulator of the 26S proteasome. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003;59:1294-1295
- 21 Padmanabhan B, Adachi N, Kataoka K, Horikoshi M. Crystal structure of the homolog of the oncoprotein gankyrin, an interactor of Rb and CDK4/6. *J Biol Chem* 2004;279:1546-1552
- 22 Krzywda S, Brzozowski AM, Higashitsuji H, Fujita J, Welchman R, Dawson S, Mayer RJ, Wilkinson AJ. The crystal structure of gankyrin, an oncoprotein found in complexes with cyclin-dependent kinase 4, a 19 S proteasomal ATPase regulator, and the tumor suppressors Rb and p53. *J Biol Chem* 2004;279:1541-1545
- 23 Park TJ, Kim HS, Byun KH, Jang JJ, Lee YS, Lim IK. Sequential changes in hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine plus thioacetamide in Fischer 344 rats: induction of gankyrin expression in liver fibrosis, pRB degradation in cirrhosis, and methylation of p16(INK4A) exon 1 in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2001;30:138-150
- 24 Lim IK. Spectrum of molecular changes during hepatocarcinogenesis induced by DEN and other chemicals in Fisher 344 male rats [Mechanisms of Ageing and Development 123 (2002) 1665-1680]. *Mech Ageing Dev* 2003;124:697-708
- 25 Iwai A, Marusawa H, Kiuchi T, Higashitsuji H, Tanaka K, Fujita J, Chiba T. Role of a novel oncogenic protein, gankyrin, in hepatocyte proliferation. *J Gastroenterol* 2003;38:751-758
- 26 Qin JM, Fu XY, Li SJ, Liu SQ, Zeng JZ, Qiu XH, Wu MC, Wang HY. Gene and protein expressions of p28/GANK in rat with liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2003;9:2523-2527
- 27 Nagy P, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells. *Exp Cell Res* 2003;285:39-49

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 •

WJG 和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传, 于 2003-04-15 开通. WJG 包括: 1995-2004 年 1-12 期及特刊. 世界华人消化杂志包括: 1993-2004 年第 1-5 期及特刊.

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者). 高影响力论文排序: 点击次数, 下载次数, 引用次数. 高影响力论文即特别受同行关注, 影响范围广, 被点击次数、下载次数、引用次数多的论文. 一篇论文如果能进入高影响力论文行列, 其研究成果一般多有创新性, 学术水平较高, 学术价值较大, 因而影响力大. 投稿须知包括: 投稿细则, 述评, 研究原著, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告等要求及书写格式.

2 网址

WJG (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)

世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)

3 论文摘要格式

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004年 5月;12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠.

100101, 北京市, 中国人民解放军第306医院载人航天主着陆场医疗救护队. yuemx@ns.cetin.net.cn

目的: 探讨中国首次载人航天主着陆场区航天员医疗保障及救护的经验体会. 方法: 结合我们参加中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的体会, 8次在直升机上的医疗救护演练经验, 2次突发意外事故乘直升机远距离实施医疗救护的体会, 多次在载人航天医疗救护车上的医疗救护演练体会. 并参考国内外相关资料, 对载人航天航天员意外伤害提出有效的防治预案. 结果: 主要针对首飞载人航天航天员可能发生意外伤害的原因, 创新地把一个高质量的ICU全天候前移至草原上、沙漠里, 载体是载人航天医疗救护直升机及医疗救护车, 可以确保意外情况下航天员的安全. 创造了反应速度第一; 技术装备第一. 使救治规则、卫勤保障原则更趋于合理, 抢救成功率更高. 载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求. 航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应, 立体救护”的理念. 载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用, 他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可着落实施救护. 结论: 返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护, 能保障航天员安全, 圆满完成载人航天任务.

论文目次

目次网页包括: 岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004年 5月;12(5):1009-1014. 功能目次包括: 点击率: 71, 下载率: 9, 引用率: 0, 摘要, 相关文章, 被引用次数, HTML, PDF.

4 全文

全文网页包括: 投稿, 摘要, PDF, 被引用, 点击率: 72, 下载率: 9, 相关文章, 相关评论, 图片及参考文献外链接.

5 投稿查询

投稿查询网页包括: 编号, 刊名, 题目, 作者, E-mail, 收稿, 送审, 审回, 退稿, 接受, 审稿费, 出版费, 彩色图制作费, 黑白图制作费, 英文摘要加工费, 英文全文加工费, 加急费, 其他, 发票编号, 送修, 修回, 重修, 编辑, 入库, 卷号, 期号, 起止页. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

超声、CT 及 MRI 诊断肝硬化的比较

郑荣琴, 黄冬梅, 张波, 苏中振, 工藤正俊, 川崎俊彦

郑荣琴, 黄冬梅, 张波, 苏中振, 中山大学附属第三医院超声科 广东省广州市 510630

工藤正俊, 川崎俊彦, 近畿大学医学部消化器内科 日本大阪

郑荣琴, 女, 1964-02-08 生, 湖北省赤壁市人, 汉族. 2000 年中山医科大学博士毕业, 副教授, 主要从事腹部疾病的超声诊断与介入治疗.

通讯作者: 郑荣琴, 510630, 广东省广州市, 中山大学附属第三医院超声科. ultrasoundzh@sohu.com

电话: 020-88348792 传真: 020-87536401

收稿日期: 2005-01-31 接受日期: 2005-03-10

Comparison of ultrasonography, CT and MRI in the diagnosis of liver cirrhosis

Rong-Qin Zheng, Dong-Mei Huang, Bo Zhang, Zhong-Zhen Su, Masatoshi Kudo, Toshihiko Kawasaki

Rong-Qin Zheng, Dong-Mei Huang, Bo Zhang, Zhong-Zhen Su, Department of Ultrasonography, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Shipai, Guangzhou, 510630, Guangdong Province, China
Masatoshi Kudo, Toshihiko Kawasaki, Department of Gastroenterology and Hepatology, Kinki University School of Medicine, Osaka-Sayama, Japan

Correspondence to: Dr. Rong-Qin Zheng, Department of Ultrasonography, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. ultrasoundzh@sohu.com

Received: 2005-01-31 Accepted: 2005-03-10

Abstract

AIM: To compare ultrasound (US), CT and MRI in the diagnosis of liver cirrhosis, and to select the best predictive signs for the diagnosis of liver cirrhosis by each technique.

METHODS: Imaging findings on US, CT and MRI in 142 patients with hepatocellular carcinoma (<3 cm in diameter) were blindly reviewed by three doctors using a severity scoring system. Imaging findings included irregular or nodular liver surface, blunt liver edge, liver parenchyma abnormalities, liver morphological changes and portal hypertension. Results were compared with pathological results on non-tumor resected specimens.

RESULTS: Blunt liver edge, liver parenchyma abnormalities, and liver morphological changes were the best predictive signs for US diagnosis of liver cirrhosis. Irregular or nodular liver surface, liver parenchyma abnormalities and portal hypertension were the best predictive signs for MRI. Irregular or nodular liver surface, blunt liver edge, liver parenchyma abnormalities and portal hypertension were the best predictive signs for CT. The diagnostic accuracies of

liver cirrhosis by MRI, CT and US were 70.3%, 67.0%, 64.0%, the sensitivities were 86.7%, 84.3%, 52.4%, and the specificities were 53.9%, 52.9%, 73.5%, respectively. MRI and CT were slightly superior to US in the diagnosis of liver cirrhosis; however, there was no significant difference regarding the diagnostic accuracy among them.

CONCLUSION: US, CT and MRI have different predictive signs, different imaging feature and diagnostic superiority. These imaging techniques all play important roles in the evaluation of liver cirrhosis.

Key Words: Liver cirrhosis; Magnetic resonance imaging; Computed tomography; X-ray; Ultrasonography

Zheng RQ, Huang DM, Zhang B, Su ZZ, Kudo M, Kawasaki T. Comparison of ultrasonography, CT and MRI in the diagnosis of liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):993-996

摘要

目的: 比较超声(US)、CT、MRI 诊断肝硬化的异同, 并筛选不同影像学手段评价肝硬化的独立性预测指标。

方法: 慢性肝病并肝细胞癌患者 142 例, 以手术切除标本中非瘤部分进行病理肝纤维化分期及慢性肝炎、肝硬化的诊断。每例患者分别进行 US, CT, MRI 检查并按常规拍片, 由 3 位影像医生各自独立、盲法评价每一患者影像学资料, 影像学表现包括结节性肝表面、肝边缘变钝、肝实质异常、肝形态改变及门静脉高压, 按其有、无及显著程度分为 3 级并评分。同时在分析影像学表现的基础上进行影像诊断, 初步判断有无肝硬化。将影像评价结果与病理对照, 比较各种影像手段诊断肝硬化的效能, 并筛选评价肝硬化的独立性预测指标。

结果: US 诊断肝硬化的独立性预测指标是肝边缘变钝、肝实质异常及肝形态失常; CT 诊断肝硬化的独立性预测指标是结节性肝表面、肝实质异常、门静脉高压及肝边缘变钝; MRI 诊断肝硬化的独立性预测指标是结节性肝表面、肝实质异常、门静脉高压。MRI, CT, US 诊断肝硬化的准确性分别为 70.3%, 67.0%, 64.0%, 敏感性分别为 86.7%, 84.3%, 52.4%, 特异性分别为 53.9%, 52.9%, 73.5%。MRI, CT 诊断肝硬化效能稍优于 US, 但 3 者之间并不存在显著性差异。

结论: US, CT 及 MRI 诊断肝硬化的效能无明显差异, 但各自具有不同独立性预测指标, 具有不同的诊断优势, 在肝硬化的诊断中均发挥着重要作用。

关键词: 肝硬化; 核磁共振; 计算机断层扫描; X线; 超声检查

郑荣琴, 黄冬梅, 张波, 苏中振, 王藤正俊, 川崎俊彦. 超声、CT 及 MRI 诊断肝硬化的比较. 世界华人消化杂志 2005; 13(8):993-996
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/993.asp

0 引言

肝硬化是以肝实质纤维化和再生结节为特征的弥漫性病变, 可继发肝功能障碍、门静脉高压及原发性肝癌, 最终导致肝衰竭、消化道大出血等致命并发症^[1]. 准确的诊断是及时有效治疗的前提. 目前, 临床主要采用的诊断方法有血清学、影像学、病理学等. 经皮肝穿刺活检病理检查具有一定的创伤性, 临床上难以常规开展. 血清学检查尚缺乏特异性的诊断指标. 影像学检查如 MRI, CT, 超声(US)等能较好地反映肝脏的形态、结构的变化, 已成为诊断肝硬化的重要手段. 采用单一影像手段, 如超声或 CT 等研究诊断肝硬化已有大量报道^[2-5], 联合两种影像手段的研究也有少量报道^[6], 但有关评价和比较 MRI, CT, US 3 种影像手段诊断肝硬化的研究目前尚未见报道. 我们评价和比较 MRI, CT, US 诊断肝硬化的价值, 并筛选出评价肝硬化的独立性预测指标.

1 材料和方法

1.1 材料 1997/2000 年因慢性肝病合并原发性肝细胞癌而行手术切除的患者 142 例, 男 104 例, 女 38 例, 年龄 42-82 (平均 64) 岁. 病因诊断为慢性乙型肝炎 23 例, 慢性丙型肝炎 97 例, 酒精性肝炎 4 例, 其他病因 2 例, 病因不明者 16 例. 入选标准: (1) 具有长期肝功能异常的病史, (2) 肝细胞癌瘤灶直径小于 3 cm, 对肝脏形态、肝功能及血流动力学无显著影响.

1.2 方法

1.2.1 影像学检查 MRI 检查 89 例, CT 检查 132 例, US 检查 124 例, 3 种影像均检查 72 例. 3 种影像检查均按常规拍片, 其中超声检查时, 除显示肝内肿块以外, 采用横、纵、斜多切面对左右肝进行常规扫查, 对每一切面进行记录并拍片. 采用双盲法对所得图像的影像学表现进行评分, 并进行影像诊断评分(表1). 影像诊断根据对影像表现的综合分析并参考肝硬化常规影像学诊断标准, 进行判断并评分, 即: 肯定的肝硬化 = 5, 可能的肝硬化 = 4, 不能确定 = 3, 肝硬化可能性不大 = 2, 明确不是肝硬化 = 1. 将影像诊断评分 ≥ 4 者归为肝硬化. 评价方法: 3 位影像医生独立地在不知临床资料和病理结果的情况下, 严格按照上述标准对同一患者的影像资料进行评分, 并各自做出初步诊断, 最后, 将至少 2 位医生一致赞同的结果作为最终的评价结果.

表1 肝硬化影像学表现及其评分标准

影像学表现	评分标准
1 结节性表面	无 = 0, 轻度 = 1, 显著 = 2
2 肝边缘变钝	无 = 0, 轻度 = 1, 显著 = 2
3 肝实质异常	无 = 0, 轻度 = 1, 显著 = 2
4 肝形态改变	
右叶萎缩	无 = 0, 轻度 = 1, 显著 = 2
方叶萎缩	无 = 0, 轻度 = 1, 显著 = 2
左叶肥大	无 = 0, 轻度 = 1, 显著 = 2
尾状叶肥大	无 = 0, 轻度 = 1, 显著 = 2
胆周间隙增宽	无 = 0, 有 = 1
肝门间隙增宽	无 = 0, 有 = 1
5. 门静脉高压	
脾脏增大	无 = 0, 轻度 = 1, 显著 = 2
脾静脉扩张	无 = 0, 轻度 = 1, 显著 = 2
腹水	无 = 0, 轻度 = 1, 显著 = 2
食管胃底静脉曲张	无 = 0, 有 = 1
脐旁静脉重开	无 = 0, 有 = 1
脾肾分流	无 = 0, 有 = 1
其他侧枝循环	无 = 0, 有 = 1

4, 5 两项总分为其各自子项评分之合.

1.2.2 病理诊断 采用手术切除但不含瘤灶的大体标本, 分别进行常规 HE, Masson 和 Azan 染色, 对肝纤维化进行分期诊断. 肝纤维化分期参考日本 New Inuyama 分期标准, 即 F0 为无纤维化; F1 汇管区扩大, 纤维化; F2 门脉—门脉或门脉—小叶中央静脉桥接纤维化; F3 桥接纤维化伴小叶结构紊乱; F4 为肝硬化 (LC). 将 F0-F3 期肝纤维化归为慢性肝炎(图1). 先由 3 位病理医生独立地在不知临床资料和影像检查结果对情况下进行初步诊断, 将至少 2 位医生一致赞同的结果作为最终的诊断结果.

统计学处理 多变量采用 Logistic 回归分析, 筛选 MRI, CT, US 3 种影像手段诊断肝硬化的独立性预测指标; 采用 χ^2 检验评价 3 种影像手段对肝硬化的诊断功效, 包括: 准确性、敏感性和特异性; 采用 ROC 曲线分析比较 3 种影像手段对肝硬化的诊断价值.

2 结果

2.1 病理结果 在 142 例患者中慢性肝炎 54 例, 早期肝硬化 17 例, 肝硬化 71 例. 肝硬化患者 Child-Pugh A 级 65 例, B 级 1 例, C 级 1 例, 4 例因实验室数据缺失而未能定级.

2.2 筛选预测肝硬化的最佳影像学指标 结节性肝表面、肝实质异常、门静脉高压是 MRI 诊断肝硬化的独立性预测指标; 结节性肝表面、肝实质异常、门静



图1 A: 肝癌手术切除标本, 采用无瘤部分进行切片及病理分析. B: 慢性肝炎(肝纤维化分期 F2). C: 肝硬化(肝纤维化分期 F4).

脉高压及肝边缘变钝是 CT 诊断肝硬化的独立性预测指标; 肝边缘变钝、肝实质异常及肝形态失常是 US 诊断肝硬化的独立性预测指标(表 2).

表2 Logistic 回归分析筛选独立性预测指标

独立性预测指标	回归系数	标准差	P 值
US 肝边缘变钝	1.206	0.389	0.002
肝实质异常	0.793	0.325	0.015
肝形态改变	0.464	0.123	0.000
常数	-2.568	0.474	0.000
MRI 结节性肝表面	1.159	0.400	0.004
肝实质异常	1.023	0.307	0.001
门静脉高	0.549	0.180	0.002
常数	-0.737	0.199	0.000
CT 结节性肝表面	2.476	0.495	0.000
肝实质异常	1.480	0.429	0.014
肝边缘变钝	0.636	0.257	0.001
门静脉高压	0.423	0.124	0.001
常数	-1.127	0.211	0.000

2.3 三种影像学方法诊断肝硬化的比较 MRI, CT, US 根据影像评分诊断肝硬化的准确性分别为 70.3%, 67.0%, 64.0%; 敏感性分别为 86.7%, 84.3%, 52.4%; 特异性分别为 53.9%, 52.9%, 73.5%. 卡方检验显示: MRI, CT 诊断肝硬化的敏感性高于 US, 而特异性则低于 US, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 但准确性方面

3 者之间并不存在显著性差异. ROC 曲线分析: MRI, CT 诊断肝硬化稍优于 US, 但 3 者的诊断准确率并不存在显著性差异(图 2).

3 讨论

经皮肝穿刺活检是进行慢性肝炎病理分期和肝硬化诊断的重要手段. 尽管它具有取材成功率高、组织完整性好, 易于操作等优点, 但由于肝实质损伤的不均匀性, 穿刺活检容易出现取样误差, 可造成高达 24%^[7] 的假阴性率及 50%^[8] 的诊断不符合率(不同部位取样). 此外, 当穿刺组织太小或不完整时易影响病理诊断的准确性. 而我们采用了手术切除标本(不含瘤组织)进行病理诊断, 减少了上述不利因素的影响, 将其作为评价影像学诊断的金标准, 提高了分析结果的客观性. 多变量分析结果显示, 肝实质异常是 MRI, CT, US 诊断肝硬化的共同独立性预测指标. 此外, MRI 诊断肝硬化的独立性预测指标还包括结节性肝表面、门静脉高压; CT 还包括结节性肝表面、门静脉高压、肝边缘变钝; US 还包括肝边缘变钝、肝脏形态异常. 尽管不同的影像手段在评价肝硬化方面有其共同之处, 但他们对肝硬化的某些肝内、肝外特征性变化具有不同的显示优势和判别能力, 继而具有不同的临床应用价值. 如 MRI 比 CT, US 更易于显示肝细胞再生结节及其周围的网状纤维^[9], 即显示肝硬化的病理特征, 有利于准确诊断; CT 借助造影更易于显示脐旁静脉重开^[10] 和 US 难于显示的侧枝循环; 而超声虽在显示肝硬化病理改变方面无明显优势, 但因其无辐射、操作方便、检查费用低、患者易接受等优点, 仍然是临床检查肝硬化的首选影像手段, 特别适用于肝硬化的追踪复查, 有利于发现早期肝癌等并发症^[12-13].

本组 US 诊断肝硬化的准确率 64.0% 低于其他相关报道^[11], 且敏感性 52.4% 低于同组的 MRI (86.7%) 和 CT (84.3%), 只是特异性 73.5% 高于 MRI (53.9%) 和 CT (52.9%). 分析其原因可能与以下因素有关: 本组病例大部分为能耐受手术的慢性肝炎或代偿期肝硬化患者, 因而特征性的肝硬化改变不明显, 以至于超声

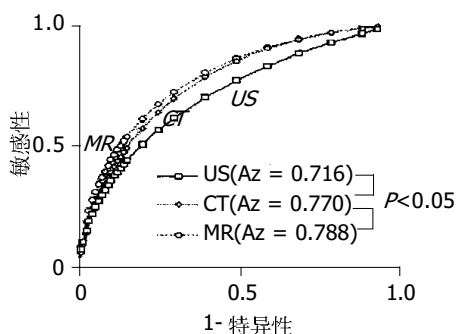


图2 不同影像学手段诊断肝硬化的 ROC 曲线分析. 显示 MRI 及 CT 诊断准确性稍高于超声, 但差异无显著性. Az 表示 ROC 曲线下面积.

检查尚不能敏锐地发现并显示出来;检查US的病例没有保存足够的显示肝脏每个部分及切面的超声图片,供本研究进行回顾性分析.再者,日常的超声诊断基于实时扫描和监视器动态显示,仅凭储存的超声图片做出诊断是相对困难的,得到的诊断也是欠准确的.有必要以超声实时扫描为基础进行双盲法前瞻性研究,以进一步比较不同影像手段诊断肝硬化的价值.

总之,MRI,CT,US诊断肝硬化具有不同的独立性预测指标,显示出不同的诊断优势;MRI,CT诊断肝硬化效能稍优于US,但3者的诊断准确率并无显著性差异,在肝硬化的诊断中均发挥着重要作用.

4 参考文献

- 1 Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997;112:463-472
- 2 Brown JJ, Naylor MJ, Yagan N. Imaging of hepatic cirrhosis. *Radiology* 1997;202:1-16
- 3 Vilgrain V, Lebrech D, Menu Y, Scherrer A, Nahum H. Comparison between ultrasonographic signs and the degree of portal hypertension in patients with cirrhosis. *Gastrointest Radiol* 1990;15:218-222
- 4 Honda H, Onitsuka H, Masuda K, Nishitani H, Nakata H, Watanabe K. Chronic liver disease: value of volumetry of liver and spleen with computed tomography. *Radiat Med* 1990;8: 222-226
- 5 Murakami T, Mochizuki K, Nakamura H. Imaging evaluation of the cirrhotic liver. *Semin Liver Dis* 2001;21:213-224
- 6 Rofsky NM, Fleishaker H. CT and MRI of diffuse liver disease. *Semin Ultrasound CT MR* 1995;16:16-33
- 7 Nord HJ. Biopsy diagnosis of cirrhosis: blind percutaneous versus guided direct vision techniques—a review. *Gastrointest Endosc* 1982;28:102-104
- 8 Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP, Cooppan RM, Naran AD, Pirie D, Pudifin DJ. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet* 1986;1:523-525
- 9 Itai Y, Ohnishi S, Ohtomo K, Kokubo T, Yoshida H, Yoshikawa K, Imawari M. Regenerating nodules of liver cirrhosis: MR imaging. *Radiology* 1987;165:419-423
- 10 McCain AH, Bernardino ME, Sones PJ Jr, Berkman WA, Casarella WJ. Varices from portal hypertension: correlation of CT and angiography. *Radiology* 1985;154:63-69
- 11 Aube C, Oberti F, Korali N, Namour MA, Loisel D, Tanguy JY, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Rifflet H, Maiga MY, Penneau-Fontbonne D, Caron C, Cales P. Ultrasonographic diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *J Hepatol* 1999;30:472-478
- 12 Menu Y. Modern imaging of the liver and biliary tract. In: McIntyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzetto M, Rodes J. editors: Oxford textbook of clinical hepatology, New York: Oxford Medical Publications, 1991:326-343
- 13 Tanaka S, Kitamura T, Nakanishi K, Okuda S, Kojima J, Fujimoto I. Recent advances in ultrasonographic diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1989;63:1313-1317

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 •

第一届胃肠道金属内支架成形术精品课程班

本刊讯 《介入放射学杂志》社邀请在国内外开展胃肠道金属内支架成形术时间较早、经验丰富的韩国宋昊永 (Song HY) 教授、荷兰塞尔塞玛·皮特得克 (Siersema PD) 教授和我国李麟荪教授、欧阳墉教授、杨仁杰教授、程英升副教授、茅爱武主任医师组成第一届胃肠道金属内支架成形术精品课程班主讲老师. 内容涉及食管、胃十二指肠、胆管、近段空肠、结直肠. 学费500元 (含资料费100元); 食宿由课程班统一安排, 费用自理 (住宿费每人120元/天). 参加者可获得国家级继续教育 I 类学分10分.

时间: 2005-05-27 (周五) 8: 00-22: 00 报到, 报到地点在《介入放射学杂志》编辑部, 报到后有专车送到景苑水庄; 2005-05-28/29 (周六、周日) 授课

地点: 上海市景苑水庄 (青浦区朱家角西井街300号)

联系地址: 200050, 上海市华山路1328号,

《介入放射学杂志》编辑部许秀芳同志收

联系电话: 021-62528805-8355; 传真: 021-62409496;

电子邮件: jrfsxzz@163.com

欢迎放射科、消化内科、胸外科、普外科医生、技术人员、护理人员参加.

雷公藤内脂醇对大鼠重症急性胰腺炎的治疗作用

张水军, 翟文龙, 赵永福, 朱长举, 邓中月

张水军, 翟文龙, 赵永福, 朱长举, 邓中月, 郑州大学第一附属医院普外科 河南省郑州市 450052

张水军, 男, 1958-04-06 生, 河南宜阳县人, 汉族, 1982 年河南医科大学本科毕业, 1989 年河南医科大学硕士毕业, 研究方向肝胆胰外科及消化器官移植。

通讯作者: 张水军, 450052, 河南省郑州市建设东路 1 号, 郑州大学第一附属医院普外科。zhangshuijun@zzu.edu.cn

电话: 0371-65066615

收稿日期: 2005-01-17 接受日期: 2005-02-02

Triptolide treatment of severe acute pancreatitis in rats

Shui-Jun Zhang, Wen-Long Zhai, Yong-Fu Zhao, Chang-Ju Zhu, Zhong-Yue Deng

Shui-Jun Zhang, Wen-Long Zhai, Yong-Fu Zhao, Chang-Ju Zhu, Zhong-Yue Deng, Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zheng Zhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Shui-Jun Zhang Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, 1 Jianshe Road, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China. zhangshuijun@zzu.edu.cn
Received: 2005-01-17 Accepted: 2005-02-02

Abstract

AIM: To investigate the role of NF- κ B activation in the development of severe acute pancreatitis (SAP) and the therapeutic effect of triptolide.

METHODS: Ninety Wistar rats were randomly allocated into three groups: sham operation group (group S), pancreatitis group (group P), and triptolide group (group T). There were 30 rats in each group. Rats in group S only received abdomen opening surgery. SAP model was induced by retrograde injection of 5% sodium taurocholate to the pancreatic duct. After model was established, no treatment was given in group P. Triptolide (0.05 mg/mL) was given by intraperitoneal injection at 0.2 mg/kg in group T. Rats were killed 2 h, 6 h, and 12 h (10 rats for each time point). after operation to determine the serum levels of amylase (AMY), TNF- α and IL-6. The pancreas tissues were obtained to examine the changes with microscope. Blood lymphocyte smear and pancreatic tissues were prepared to detect the activity of NF- κ B.

RESULTS: Serum AMY Levels in group P were higher than those in group S after operation (P: 47 961.76 \pm 11 196.41, 48 768.09 \pm 8 699.41, 64 025.30 \pm 10 413.25 nKat/L; S: 11 196.07 \pm 2 363.64, 10 156.20 \pm 1 780.02, 9 987.50 \pm

3 114.79 nKat/L, $P < 0.01$). Serum AMY Levels were significantly lower in group T than those in group P 12 h after operation (64 025.30 \pm 10 413.25 vs 47 196.94 \pm 9 278.36 nKat/L, $P < 0.01$). At the three time points, the levels of TNF- α and IL-6 in group P and T were significantly increased compared to those in group S. In group T, they were significantly decreased compared to those in group P at the three time points (S: 0.63 \pm 0.07, 30.48 \pm 9.16, 0.67 \pm 0.14, 25.71 \pm 5.87, 0.84 \pm 0.12, 36.98 \pm 12.38 pg/L; P: 1.12 \pm 0.14, 69.38 \pm 19.32, 1.34 \pm 0.14, 106.65 \pm 18.97, 1.60 \pm 0.41, 168.40 \pm 43.59 pg/L; T: 0.88 \pm 0.19, 35.64 \pm 11.81, 0.82 \pm 0.20, 69.38 \pm 14.37, 0.92 \pm 0.19, 67.04 \pm 23.21 pg/L, $P < 0.01$). Activity of NF- κ B in pancreatic tissue and blood lymphocyte was increased 2h and 6h after operation in group P and group T. In group T, activity of NF- κ B was significantly decreased compared to that in group P 2 and 6 h after operation (P: 60.73 \pm 3.54, 70.77 \pm 3.56, 70.05 \pm 3.77, 80.03 \pm 3.94%; S: 10.67 \pm 2.84, 10.27 \pm 2.53, 10.90 \pm 2.51, 12.96 \pm 2.53%; T: 31.54 \pm 3.59, 30.57 \pm 3.54, 39.36 \pm 3.43, 40.37 \pm 3.51%, $P < 0.01$). Pancreatic pathological damages were much milder in group T than those in group P under microscope.

CONCLUSION: NF- κ B plays an important role in the development of SAP. Triptolide can inhibit NF- κ B activity, decrease inflammatory mediator levels, and reduce the pathological damage of the pancreas.

Key Words: Severe acute pancreatitis; NF- κ B; Rats; Triptolide

Zhang SJ, Zhai WL, Zhao YF, Zhu CJ, Deng ZY. Triptolide treatment of severe acute pancreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):997-1001

摘要

目的: 探讨 NF- κ B 在重症急性胰腺炎 (SAP) 发病中的作用及雷公藤内脂醇对 SAP 的治疗作用。

方法: Wistar 大鼠 90 只, 随机分为三组: 重症急性胰腺炎组 (P 组), 雷公藤内脂醇治疗组 (T 组), 假手术组 (S 组)。每组 30 只。SAP 模型由 5% 牛磺胆酸钠大鼠胆胰管逆行注射诱发而成。模型成功后, P 组不做处理; T 组立即行雷公藤内脂醇 (0.05 g/L) 腹腔注射 0.2 mg/kg; S 组仅开腹, 不做其他处理。各组于术后 2、6、12 h 三个时间点处死大鼠, 每次 10 只。各时间点测血清淀粉酶

(AMY), TNF- α 、IL-6 水平;取胰腺组织行病理检查并测胰腺组织和血淋巴细胞NF- κ B 活性。

结果: AMYP 组术后各时间点均明显升高(P 组: $47\ 961.76 \pm 11\ 196.41$, $48\ 768.09 \pm 8\ 699.41$, $64\ 025.30 \pm 10\ 413.25$ nKat/L; S 组: $11\ 196.07 \pm 2\ 363.64$, $10\ 156.20 \pm 1\ 780.02$, $9\ 987.50 \pm 3\ 114.79$ nKat/L, $P < 0.01$), 在术后 12 h 点 T 组低于 P 组($64\ 025.30 \pm 10\ 413.25$ vs $47\ 961.94 \pm 9\ 278.36$ nKat/L, $P < 0.01$)血清 TNF- α 、IL-6 水平随 SAP 病情的进展而升高, P 组及 T 组术后各时间点均较 S 组高其水平 T 组低于 P 组(S 组: 0.63 ± 0.07 , 30.48 ± 9.16 , 0.67 ± 0.14 , 25.71 ± 5.87 , 0.84 ± 0.12 , 36.98 ± 12.38 pg/L; P 组: 1.12 ± 0.14 , 69.38 ± 19.32 , 1.34 ± 0.14 , 106.65 ± 18.97 , 1.60 ± 0.41 , 168.40 ± 43.59 pg/L; T 组: 0.88 ± 0.19 , 35.64 ± 11.81 , 0.82 ± 0.20 , 69.38 ± 14.37 , 0.92 ± 0.19 , 67.04 ± 23.21 pg/L, $P < 0.01$);血淋巴细胞及胰腺组织 NF- κ B 活性术后 2、6 h P 组及 T 组均升高(P 组: 60.73 ± 3.54 , 70.77 ± 3.56 , 70.05 ± 3.77 , 80.03 ± 3.94 %; S 组: 10.67 ± 2.84 , 10.27 ± 2.53 , 10.90 ± 2.51 , 12.96 ± 2.53 %; T 组: 31.54 ± 3.59 , 30.57 ± 3.54 , 39.36 ± 3.43 , 40.37 ± 3.51 %, $P < 0.01$);胰腺病理损害光镜及电镜下 T 组明显轻于 P 组。

结论: NF- κ B 可能参与了大鼠 SAP 发病过程;雷公藤内脂醇可以通过抑制 NF- κ B 活性, 减少炎症递质的释放, 从而减轻 SAP 病理损害。

关键词: 重症急性胰腺炎; NF- κ B; 大鼠; 雷公藤内脂醇

张水军, 翟文龙, 赵永福, 朱长举, 邓中月. 雷公藤内脂醇对大鼠重症急性胰腺炎的治疗作用. 世界华人消化杂志 2005;13(8):997-1001
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/997.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种常见的急危重病, 其发病机制尚未完全阐明, 研究表明白细胞过度激活后引起机体炎症递质瀑布样释放, 导致机体免疫紊乱, 可能是 SAP 发病的基本机制之一。同时研究表明核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)是调控机体炎症反应的总源头^[1]。目前有研究认为雷公藤内脂醇可以通过抑制NF- κ B的活性抑制炎症反应。我们通过检测NF- κ B在SAP 大鼠体内的活性及炎症递质的水平变化, 探讨NF- κ B在大鼠 SAP 发病机制中的作用, 并对SAP 大鼠施以雷公藤内脂醇, 观察其治疗作用。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠 90 只, 雌雄不限, 体重 300 ± 30 g, 购自河南省实验动物中心。随机分为三组: SAP 组(P 组)、雷公藤内脂醇治疗组(T 组)、假手术组(S 组)。每组 30 只。P 组与 T 组动物先制成大鼠 SAP 模型。

SAP 模型由 5% 牛磺胆酸钠(Sigma 公司)大鼠胆胰管逆行注射制备而成。模型成功后, P 组不作其他处理; T 组立即行雷公藤内脂醇(福建省医科所植化室, 纯度 $> 99.99\%$)腹腔注射 0.2 mg/kg, 雷公藤内脂醇无菌蒸馏水配制浓度 0.05 g/L。S 组只开腹, 轻揉胰腺, 不作其他处理。术后各组于 2、6、12 h 三个时间点处死大鼠, 每次 10 只。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立(参照 Aho^[2]的方法, 并略有改进) Wistar 大鼠术前 12 h 禁食, 自由饮水。10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后固定于手术台上, 备皮, 消毒, 铺无菌巾, 上腹正中做 2 cm 切口进入腹腔, 提起十二指肠, 显露胆胰管, 肝门部无创血管钳阻断胆管。1 mL 注射器通过十二指肠侧壁, 潜行穿刺入胆胰管, 推注 5% 牛磺胆酸钠 1 mL/kg, 推注速度 0.2 mL/min, 压力约 20 cmH₂O, 拨针后棉签压迫穿刺点 2 min, 以免药液逆流。推注后观察 5 min, 确认大鼠脾胃之间胰腺组织出血、呈暗红色后, 去掉肝门部血管夹。查腹腔无活动出血后关腹。

1.2.2 血清标本的采集与检测 模型成功后, 分别按时间点处死大鼠, 开腹下腔静脉取血 3 mL, 2 mL 离心留置血清于 -30 度冰箱内保存, 1 mL 以各分离血淋巴细胞。自动生化分析仪鉴定血清淀粉酶(AMY); 放免法测血清 TNF- α 、IL-6。(按试剂盒说明进行, 试剂盒购自北京北免东雅生物技术研究所)。

1.2.3 NF- κ B 活性测定 取同一部位胰腺组织, 40 g/L 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片。常规 S-P 法免疫组化染色, 抗 p65 单克隆抗体, 工作浓度 $1:100$ 。PBS 代替一抗为空白对照。NF- κ B 试剂盒, 购自北京中山公司。

1.2.4 血淋巴细胞涂片制备 使用密度梯度离心法, 抽取下腔静脉血 1 mL, 加入 0.5 mL 生理盐水肝素液抗凝, 缓慢加在 2 mL 淋巴细胞分离液(购自北京中山公司)上, $1\ 500$ r/min、梯度水平离心 20 min, 移液器小心移出两液面间的白色絮状物, 置换试管, 以 $1:3$ 比例加入 0.1 mol/L PBS 吹洗均匀, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 反复洗涤 $2-3$ 次, 0.1 mol/L PBS 适量重悬至 3×10^6 , 涂片。涂片后, 冷风快速吹干, 入 40 g/L 多聚甲醛中固定 30 min, 蒸馏水洗冲 5 min $\times 3$ 次, 冷风吹干, 置 -20°C 贮存备检。

1.2.5 血淋巴细胞 SP 法免疫组化操作与组织切片大体相同。

1.2.6 免疫组化结果判定 细胞染色为棕黄色者为阳性, 定位于胞质与胞核, 高倍镜下数 $1\ 000$ 个细胞, 计算其中阳性细胞数, 阳性率 = 阳性细胞数 / 总细胞数。

统计学处理 所有数值变异均采用(mean \pm SD)表示, 应用 SPSS 10.0 分析软件, 采用重复数据方差

表1 血清 AMY 组间变化情况(nKat/L)

组别	n	2 h	6 h	12 h
S 组	10	11 196.07 ± 2 363.64	10 156.20 ± 1 780.02	9 987.50 ± 3 114.79
P 组	10	47 961.76 ± 11 196.41 ^b	48 768.09 ± 8 699.41 ^b	64 025.30 ± 10 413.25 ^b
T 组	10	40 408.08 ± 12 443.49	41 447.95 ± 7 300.29	47 196.94 ± 9 278.36 ^d

^b*P* < 0.01 vs S 组(对应时间点); ^d*P* < 0.01 vs P 组(对应时间点).

表2 血清 TNF-α、IL-6 组间变化情况(pg/L)

组别	n	2 h		6 h		12 h	
		TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6	TNF-α	IL-6
S 组	10	0.63 ± 0.07	30.48 ± 9.16	0.67 ± 0.14	25.71 ± 5.87	0.84 ± 0.12	36.98 ± 12.38
P 组	10	1.12 ± 0.14 ^b	69.38 ± 19.32 ^b	1.34 ± 0.14 ^b	106.65 ± 18.97 ^b	1.60 ± 0.41 ^b	168.40 ± 43.59 ^b
T 组	10	0.88 ± 0.19 ^a	35.64 ± 11.81 ^a	0.82 ± 0.20 ^a	69.38 ± 14.37 ^a	0.92 ± 0.19 ^a	67.04 ± 23.21 ^a

^a*P* < 0.05 vs P 组(对应时间点); ^b*P* < 0.01 vs S 组(对应时间点).

分析、单因素方差分析, 进行统计处理, 显著性检验水准取 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 血清淀粉酶变化 P 组、T 组血清淀粉酶水平随 SAP 病情的进展而升高, 各时间点淀粉酶较 S 组均明显升高, T 组淀粉酶水平在 12 h 点则明显较 P 组降低(表 1).

2.2 血清 TNF-α、IL-6 变化 P 组和 T 组中二者水平在胰腺炎诱导后随 SAP 病情的进展而升高, 各时间点较 S 组均明显升高, T 组各时间点二者水平则明显较 P 组降低(表 2).

2.3 NF-κB 在三组之间的表达 正常胰腺组织和血淋巴细胞中只有少量的 NF-κB 活化, P 组 2 h、6 h 可见大量的 NF-κB 活化, T 组 2 h、6 h NF-κB 活化程度则显著下降(表 3, 图 1A-F).

2.4 胰腺组织病理变化 大体观察: S 组各时间点胰腺组织呈色粉红, 无充血水肿, 腹腔无腹水, 小肠及其系膜正常, 无皂化斑; P 组 2 h 后见胰腺组织水肿、灶状或成片状出血坏死灶, 色黑紫, 与周围有粘连, 胰腺组织高度肿胀. 腹腔内有血性腹水约 2-3 mL. 6 h 时

见胰腺高度水肿、苍白、成片黑紫色坏死灶, 周围粘连, 有脓苔, 肠管胀气, 胃扩张, 肠系膜充血, 肠系膜、胰腺周、肾周及后腹壁见大量灰白色、成片或点状皂化斑, 腹腔内大量混浊血性腹水, 12 h 见与较 6 h 组更严重, 胰腺大部分出血坏死, 周围明显粘连, 脓性分泌物较多, 皂化斑更明显, 腹水变成脓血性. T 组 6、12 h 大体可见病理损害均较相应胰腺炎组减轻, 皂化斑明显减少, 胰腺水肿、坏死均有所减轻. 光镜下: S 组各时间点胰腺结构完整, 小叶无坏死、出血及炎细胞浸润, 腺泡正常; 胰腺炎组光镜下见胰腺水肿、炎细胞浸润、腺泡坏死及脂肪坏死、出血灶, 以模型成功后 6、12 h 明显; T 组相应时间点较 P 组均有所减轻(图 2A-C).

3 讨论

Satoh *et al*^[3]研究显示, 在急性重症胰腺炎的早期, NF-κB 在患者外周血中显著活化, 从而认为 NF-κB 的高表达是一项急性胰腺炎患者合并全身炎症反应综合征的危险因素之一. Altavilla *et al*^[4]利用敲除 NF-κB 基因的小鼠制作成雨蛙肽诱导的胰腺炎小鼠, 发现

表3 胰腺组织和血淋巴细胞中 NF-κB(%)活性阳性率组间比较

组别	n	2 h		6 h		12 h	
		胰腺组织	血淋巴细胞	胰腺组织	血淋巴细胞	胰腺组织	血淋巴细胞
S 组	10	10.67 ± 2.84	10.27 ± 2.53	10.90 ± 2.51	12.96 ± 2.53	12.61 ± 2.08	10.09 ± 1.43
P 组	10	60.73 ± 3.54 ^b	70.77 ± 3.56 ^b	70.05 ± 3.77 ^b	80.03 ± 3.94 ^b	15.27 ± 1.29	12.60 ± 1.33
T 组	10	31.54 ± 3.59 ^d	30.57 ± 3.54 ^d	39.36 ± 3.43 ^d	40.37 ± 3.51 ^d	13.47 ± 1.95	12.50 ± 2.14

^b*P* < 0.01 vs S 组(对应时间点); ^d*P* < 0.01 vs P 组(对应时间点).

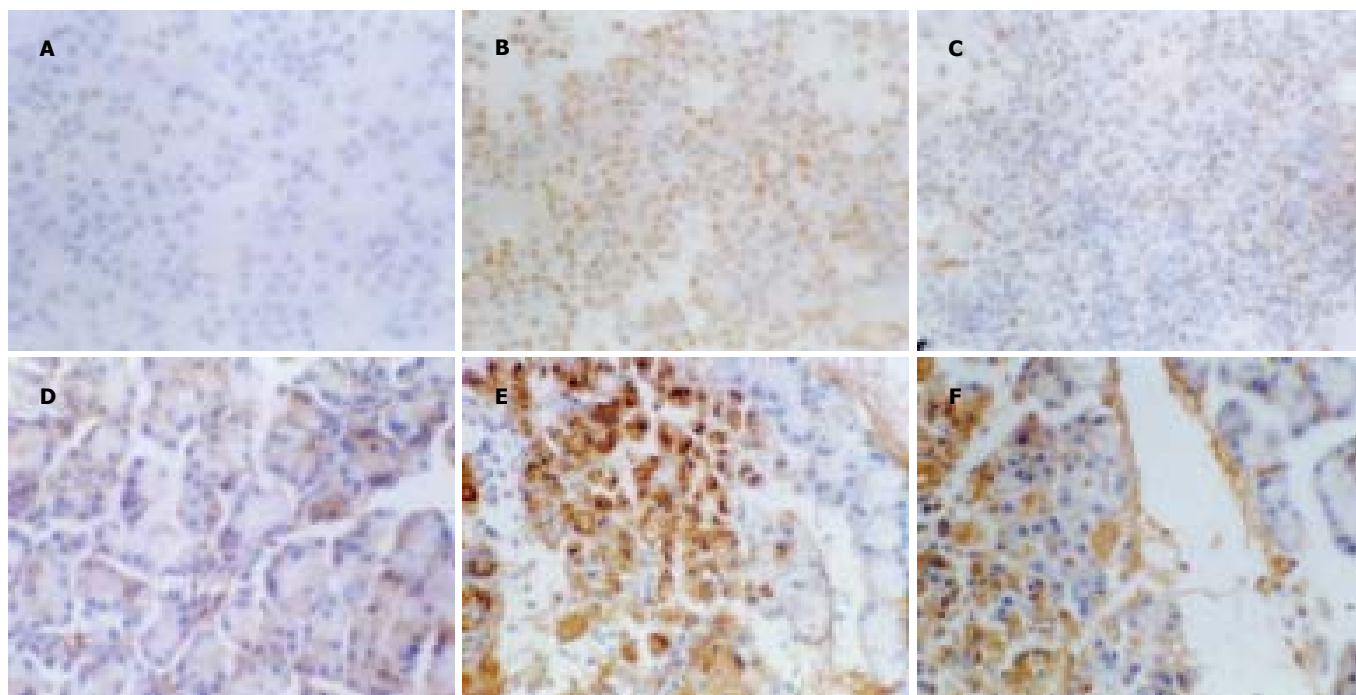


图1 各组6 h NF- κ B 活化程度(S-P 法, $\times 400$). A-C: 血淋巴细胞; D-F: 胰腺组织. A, D: 假手术组, 活化低; B, E: 胰腺炎组, 活化增高; C, F: 治疗组, 活化降低.

基因敲除小鼠与正常小鼠在同样条件诱发胰腺炎时, 其TNF- α 在组织中的含量、胰腺的组织损伤程度明显减轻. 我们发现大鼠SAP诱发后, 血淋巴细胞和胰腺组织中的NF- κ B明显激活, 血清指标TNF- α , IL-6、AMY等亦显著升高, 胰腺组织出现明显损伤, 且随时间变化而渐严重, 与TNF- α , IL-6的水平相一致. 当NF- κ B活化程度降低时, 血清指标TNF- α , IL-6、AMY等亦明显降低, 胰腺组织损伤减轻. 这表明NF- κ B活化程度与SAP时炎症递质、胰腺的功能与形态变化有一致性. 但NF- κ B活化程度与血清TNF- α , IL-6高峰时间不同, 这可能是NF- κ B从胞质进入胞核后, 与特定的DNA片段结合, 导致炎症递质基因水平的转录, 故炎症递质高峰要落后于NF- κ B的活性高峰. 在本实验中, 除血淋巴细胞中NF- κ B的活性明显增强, 胰腺组织中NF- κ B高表达, 表明作为炎症靶器官的胰腺组织在受到刺激后也能大量产生炎症递质. 血中淋巴

细胞及胰腺组织所产生的大量的炎症递质, 通过各种途径引起机体细胞因子网络紊乱, 造成机体损伤, 同时他们再激活机体其他的细胞释放大量的炎症递质, 导致机体炎症递质的瀑布样释放, 使胰腺在原有损伤的基础上导致了更为严重的损害甚至引起多器官功能不全综合征(MODS). 这表明机体NF- κ B可以通过炎症递质参与了SAP时胰腺损害. 血清与胰腺组织当中的炎症递质共同作用使胰腺炎病变向不可逆发展.

雷公藤是雷公藤植物纯化制剂, 抗炎和免疫抑制作用较强, 能够抑制TNF和IL-1、IL-6、IL-8等炎症递质的产生, 抑制吞噬细胞的吞噬功能^[5-9], 金枕 *et al*^[10]观察雷公藤多甙对急性坏死性胰腺炎免疫调节作用的实验中发现, 雷公藤多甙可以减轻急性坏死性胰腺炎血清内毒素、TNF- α , IL-1水平, 胰腺光镜下病理学评分的好转, 电镜下细胞损伤的减轻. 推测可能是雷公藤多甙阻断了炎症递质的级联

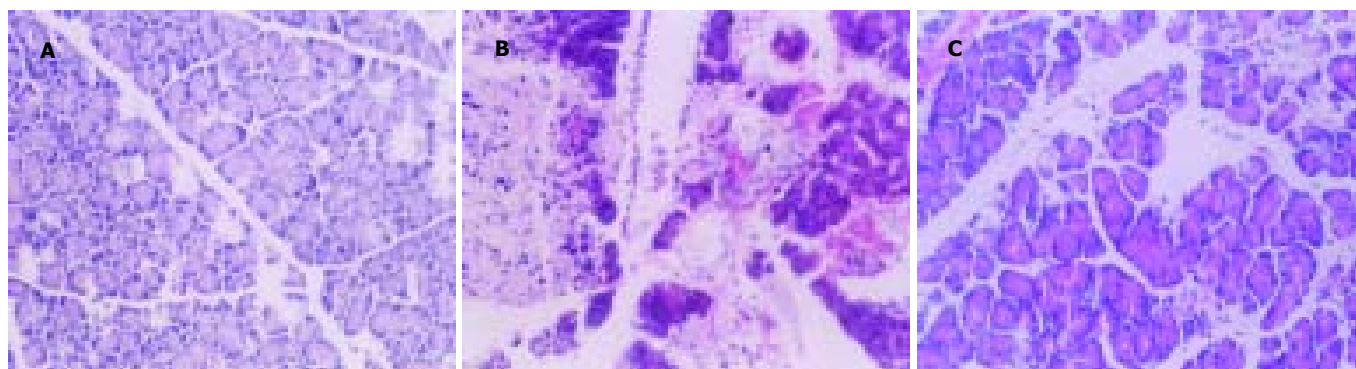


图2 各组12 h 胰腺组织病理变化(H&E $\times 200$). A: 假手术组; B: 胰腺炎组; C: 治疗组.

效应, 阻止了SAP的发生和发展. 王贵明 *et al*^[11] 在另外一项研究中也发现丹参与雷公藤多甙联合治疗急性坏死性胰腺炎时, 可显著降低血清淀粉酶、抑制炎症细胞因子的过度生成, 组织受损程度明显减轻. 雷公藤内脂醇是雷公藤植物主要活性成分之一, 也是雷公藤多甙主要活性成分之一. 后来研究发现雷公藤内脂醇的这些作用与能够抑制细胞内 NF- κ B 的活性有关^[12-15]. 我们应用雷公藤内脂醇后, 胰腺与血淋巴细胞中 NF- κ B 活性及炎症递质如 TNF- α 、IL-6 水平大幅度降低. 这表明, 雷公藤内脂醇在大鼠体内能够抑制 NF- κ B 活化, 阻止 NF- κ B 从胞质进入胞核, 减少 SAP 大鼠体内炎症递质如 TNF- α 、IL-6 等大量释放, 减轻 SAP 的损伤. 说明雷公藤内脂醇对大鼠 SAP 有治疗作用, 其机制可能是通过抑制 NF- κ B 活化, 减少炎症递质释放. 因此雷公藤内脂醇有望成为临床上治疗 SAP 的有效药物之一.

4 参考文献

- Schmid RM, Adler G. NF-kappaB/rel/IkappaB: implications in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 2000;118:1208-1228
- Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980;15:411-416
- Satoh A, Masamune A, Kimura K, Kaneko K, Sakai Y, Yamagiwa T, Satoh M, Kikuta K, Asakura T, Shimosegawa T. Nuclear factor kappa B expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2003;26:350-356
- Altavilla D, Famulari C, Passaniti M, Galeano M, Macri A, Seminara P, Minutoli L, Marini H, Calo M, Venuti FS, Esposito M, Squadrito F. Attenuated cerulein-induced pancreatitis in nuclear factor-kappaB-deficient mice. *Lab Invest* 2003;83:1723-1732
- 张崇璞, 言政, 陈运, 贺存恒, 郑启泰. 雷公藤多甙中环氧二萜内脂化合物研究. *中国药理学杂志* 1994;29:493-495
- 郑家润, 顾克显, 徐兰芳, 高纪伟, 余艳华, 唐美玉. 雷公藤抗炎免疫及抗生育活性成分的筛选 III. 7 个环氧二萜内酯化合物体内抗炎免疫活性的比较. *中国医学科学院学报* 1991;13:391-397
- 曹敏, 孙荣奇, 吴达俊, 沈平耀, 袁雅美. 中药雷公藤的研究进展. *中成药* 1996;18:40-42
- Chang DM, Chang WY, Kuo SY, Chang ML. The effects of traditional antirheumatic herbal medicines on immune response cells. *J Rheumatol* 1997;24:436-441
- Zhao G, Vaszar LT, Qiu D, Shi L, Kao PN. Anti-inflammatory effects of triptolide in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:958-966
- 金忱, 倪泉兴, 张群华, 向阳, 张姐, 张延龄. 雷公藤多甙对急性坏死性胰腺炎免疫调节作用的实验研究. *中华普通外科杂志* 2000;5:283-285
- 王贵明, 鲍民生. 丹参与雷公藤多甙联合治疗急性坏死性胰腺炎的实验研究. *山西医科大学学报* 2004;1:15-17
- Lin N, Sato T, Ito A. Triptolide, a novel diterpenoid triepoxide from *Tripterygium wilfordii* Hook. f., suppresses the production and gene expression of pro-matrix metalloproteinases 1 and 3 and augments those of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2001;44:2193-2200
- 刘浩, 刘志红, 章精, 杨俊伟, 黎磊石. 雷公藤内酯醇降低 T 淋巴细胞核因子- κ B 的活性. *肾脏病与透析肾移植杂志* 1998;7:312-315
- Kim YH, Lee SH, Lee JY, Choi SW, Park JW, Kwon TK. Triptolide inhibits murine- inducible nitric oxide synthase expression by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of nuclear factor-kappa B and c-Jun NH2-terminal kinase. *Eur J Pharmacol* 2004;494:1-9
- Zhang N, Xu YJ, Zhang ZX. Regulatory function of nuclear factor kappa B on lymphocyte proliferation and apoptosis in bronchial asthmatic rats and effect of triptolide on the regulation. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2004;24:435-438

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 •

《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)

乙型肝炎的宿主遗传易感性的研究进展及前景

晏泽辉, 邓国宏, 王宇明

晏泽辉, 邓国宏, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038
国家自然科学基金资助课题, No. 30470964
通讯作者: 王宇明, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. wym417@mail.tmmu.com.cn.
电话: 023-68754141
收稿日期: 2005-01-29 接受日期: 2005-03-03

摘要

乙型肝炎病毒(HBV)感染是世界范围的严重公共卫生问题之一, 宿主对HBV感染的遗传易感性在HBV感染发病和疾病进展方面都发挥重要作用. 研究乙型肝炎的宿主遗传易感性具有十分重要的意义. 本文综述了近年来在乙型肝炎的宿主遗传易感性方面的研究进展, 重点介绍了人类白细胞抗原(HLA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、白介素10(IL-10)、干扰素 γ 诱导的蛋白10(IP-10)、雌激素受体 α (ESR1)、甘露糖结合蛋白(MBP)、维生素D受体(VDR)等基因的多态性与HBV感染的关系. 同时就乙型肝炎的宿主遗传易感性方面的研究前景作一展望.

晏泽辉, 邓国宏, 王宇明. 乙型肝炎的宿主遗传易感性的研究进展及前景. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1002-1007
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1002.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染是世界范围的严重公共卫生问题之一, 全球大约有3.5亿多乙型肝炎病毒慢性携带者, 造成了广泛的疾病谱, 包括无症状的携带者, 潜伏性肝炎、急性肝炎、慢性肝炎、爆发性肝炎, 甚至肝硬化、原发性肝癌^[1]. 一般认为, 造成这种不同的疾病过程和临床结果的原因与三个方面的因素有关^[2]: (1) 环境因素: 包括暴露人群的整体卫生状况、疫苗接种状况等; (2) 病毒因素: 包括病毒数量、病毒基因型、以及病毒本身变异造成的病毒基因组的差异等; (3) 宿主因素: 包括感染者的年龄, 性别, 是否合并HCV、HDV、HIV等感染, 以及宿主的遗传易感性等多个方面. 上个世纪, 病毒学家和临床研究者对乙型肝炎的病毒学因素和免疫学因素进行了大量的研究, 为乙型肝炎发病机制和疾病自然史的阐明做出了突出贡献, 但乙型肝炎病毒宿主遗传易感性的研究依然还处在起步阶段. 随着人类基因组学和蛋白质组学的进展, 大量疾病的相关基因不断被发现和遗传易感性机制被阐明, 国内外对乙型病毒性肝炎宿主遗传易感性的研究成果也不断被报道. 我们系统复习了近年来的相关文献, 对乙型病毒性肝炎宿主遗传易感性的研究现状和发展前景做一综述.

1 HBV感染具有宿主遗传易感性的证据

为什么HBV感染会造成如此广泛的疾病谱, 且这种疾病谱本身及其临床结果又存在高度的变异呢? 单纯的用传染病的环境因素和病原学因素来解释是不足的, 早期的流行病学资料表明感染宿主对感染病原体是有比较强烈的遗传易感性因素的^[3-4]. 但直到今天, 我们仍然没能清楚的找到对HBV持续感染或者与疾病严重程度相关的单一主基因. 不过, 从下列早期研究结果中仍然能够找到许多HBV感染具有宿主遗传易感性的证据.

1.1 同一病毒感染不同患者会造成多种多样的临床结果^[5]. 初次感染HBV的成人, 90-95%能够依靠自身免疫系统成功的清除病毒而表现为自限性肝炎, 只有5-10%的成人会成为慢性HBV携带者. 在慢性感染患者中, 20-30%的患者会发展成为肝硬化, 不到5%的患者会经历漫长的病理过程而发展成为肝癌. 但是对于那些来自于母婴传播或者水平传播的青少年HBV感染者则90%以上的会发展成为慢性感染.

1.2 长期的跟踪研究显示部分对HBV感染具有高危因素(比方说暴露在感染HBV的家庭中)的个体一直不感染HBV. 提示部分人群存在着一种对HBV感染的个体特异性抵抗.

1.3 不同人种的HBV感染的发生率和发病率是不同的. 亚洲和非洲有更高的HBV感染流行; 与白种人比较, 中国人有更高的慢性HBV感染的发生率^[6].

1.4 在临床用干扰素 α 或者拉米夫定或者二者联合应用抗病毒治疗时, 部分患者表现为完全性病毒应答, 部分患者表现为部分病毒应答, 有的患者对抗病毒治疗则完全没有反应.

1.5 健康个体在接种乙肝疫苗后, 大约85%的人会产生保护性抗体HBsAb, 但是部分患者无论你接种多少次, 也不会产生保护性抗体HBsAb.

这些证据提示, HBV感染发病的确存在着遗传易感性的因素, 研究HBV感染的遗传易感性不但能够为我们理解HBV感染种族性差异提供关键线索, 也能够为我们的以后的抗病毒治疗和疾病的预防提供新的思路^[7]. 人类基因组计划已经发现在人类基因组中大约有3万个基因, 其中大部分等位基因具有多态性, 包括位于编码区或非编码区的单核苷酸多态性(SNPs). 据估计, 人类基因组中大约有3 500 000个SNPs存在, 如此大量的SNPs反应了不同种族和个体之间的遗传差异^[8]. 如果某些特定的SNP与HBV感染或者肝脏疾病的良性结果和低危险进展相关的话, 这些基因就有可能被认为是一个“HBV抵

抗”基因;相反如果某些特定的 SNP 与 HBV 感染的快速病情进展或者高风险的严重进展相关的话,这类基因就被称做“HBV 易感性”基因。目前的研究就是集中在筛选和鉴定这些 HBV 感染相关基因。

2 HBV 感染相关性候选基因的选择

现阶段常用的研究与疾病表型相关的遗传标记的方法大体可分为两类。第一类是候选基因的方法,要求研究与疾病相关的基因附近有遗传标志^[20];相反,另外一类的方法是通过与疾病易感或抵抗相关的常染色体区域进行全基因组范围搜索和筛选遗传标志。选择第一种候选基因的方法主要是推测基因可能的功能以及他在 HBV 感染和疾病进展中对宿主的作用,通过分析宿主 HBV 感染的不同反应可以鉴定那些与 HBV 感染进程相关的主基因。宿主 HBV 感染的不同反应包括临床反应、生物学反应(感染的强度)、免疫学反应(抗体、补体的水平以及细胞介导的抗 HBV 反应)^[9]。这些生物学进程提示着那些感兴趣的基因。这些候选基因大体可以分为以下几类:(1)调节病毒进入肝细胞的过程的基因,包括与病毒结合、融合肝细胞膜,转入目的细胞等过程相关的基因;(2)控制和调节对 HBV 感染的免疫反应的基因;(3)参与肝脏组织中病理改变的基因;(4)与 HBV 感染进展为肝硬化或者肝癌相关的基因,包括与 HBV 母婴传播相关的基因;(5)与抗病毒治疗耐药相关的基因^[7, 10]。然而这些研究还处于起步阶段,更大量的依然是在候选基因的研究上,包括序列的阐明、SNPs 的确定、SNPs 功能的评估及与疾病关联的分析上。

3 宿主对 HBV 感染遗传易感性研究进展

近年来,随着分子生物学技术和基因组学的发展,一大批与 HBV 感染相关的基因不断被发现,并且部分 HBV 感染相关的基因得到精确的定位和初步的功能研究。如来自于非洲、欧洲和亚洲的大规模样本的遗传相关性研究证明人类白细胞抗原(HLA)DRBA*1302 等位基因与 HBV 感染的清除机制有关^[5, 11-12]。其他的几项大样本研究也提示,在非人类白细胞抗原结构区,也存在着与 HBV 感染的清除和持续感染机制的 HBV 感染相关性基因,包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)^[13]、干扰素 γ (IFN- γ)^[14]、雌激素受体 α (ESR1)^[15]、甘露糖结合蛋白(MBP)^[16]、维生素 D 受体(VDR)^[17]、干扰素 γ 诱导的蛋白 10(IP-10)^[18] 等基因。

3.1 人类白细胞抗原(HLA) HLA 是人类主要组织相容性复合物(MHC)的基因产物,为目前已知的最复杂的人类基因复合体。由于 MHC 分子在个体的免疫调节中起主要作用,因此其在控制个体对疾病的易感性方面也起到重要的作用。HLA 是首次发现与疾病有明确关系的遗传系统,其与疾病的相关性有多种表现,目前存在的几种解释 HLA 与疾病相关性的假说还没有得到统一的认识。但多数研究资料表明,与免疫因素有关的 HLA 抗原影响了 HBV 感染机体后的不同转归^[19]。

作为宿主免疫反应的基本调节因子,HLA 分子提呈外源性抗原到 CD4+T 淋巴细胞和 CD8+ 细胞毒性 T 淋巴细胞,从而启动体液免疫和细胞免疫。大部分与 HBV 感染相关的遗传学研究都集中在 HLA 上。Thursz *et al*^[2, 11] 对非洲冈比亚地区乙型肝炎患者的大样本研究发现 HLA-DRBA*1302 等位基因与急性乙型肝炎的自限性过程相关。随后, Holer *et al*^[5] 也研究证实了在冈比亚成人患者中 HLA-DRBA*1302 与体内 HBV 感染的清除有关。虽然 Zavaglia *et al*^[20] 在早期的研究中发现 HBV 和 HCV 的清除与宿主 HLA 的表型没有相关性,但 Thio *et al*^[21] 研究了 DQA1*0505、DQB1*0301 和 DQA1-DQB1 的单倍型,发现单倍型簇 DQA1*0505-DQB1*0301-DQB1*1102 与病毒的持续存在显著的相关。近来, Diepolder *et al*^[22] 研究发现慢性 HBV 感染患者中 HLA-DR13 等位基因出现频率比健康对照和自限性乙型肝炎对照组都要低,HLA-DR13 等位基因与急性 HBV 感染的自限性过程有很强的联系,带有 HLA-DR13 者有较强的 CD4+ T 细胞应答,而无 HLA-DR13 者则弱得多。乙型肝炎中 HBV 的清除很可能归功于 HLA-DR13 的存在,在带有这种基因的 HBV 感染者中,很少有快速进展为慢性肝炎的,这说明,在急性 HBV 感染过程中,带有 HLA-DR13 的患者可能对核心抗原具有更强有力的 CD4+T 细胞反应。HLA-DR13 等位基因的存在对 HBV 感染者是有利的。据推测,可能的机制要么是 HLA-DR13 分子本身具有更强和更精确的抗原提呈能力,要么是 HLA-DR13 与其临近的某个免疫调节性基因具有连锁不平衡性。

尽管 HLA-I 分子是介导细胞毒性 T 淋巴细胞引起细胞毒或者非细胞毒性免疫反应机制的重要成分,然而迄今为止,还没有 HLA-I 与 HBV 感染患者的病毒持续存在或者疾病进展相关的报道。下一步研究需要证明究竟是上面的这种基因多态性还是一个仍然未知的免疫调节性基因与这种抗 HBV 感染的强免疫反应相关^[12]。

3.2 细胞因子和趋化因子(cytokine and chemokine) 细胞因子和趋化因子在不同宿主体内的释放量和类型的差别主要是因为基因或基因附近区域的多态性而造成的^[23-24]。有几种炎症细胞因子如 Th1 细胞分泌的细胞因子(包括 IL-2 和 IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 已经被研究证实参加了宿主抗病毒的清除机制和免疫反应。相反, Th2 分泌细胞因子 IL-10 是 Th1 效应细胞的基本抑制因子^[25]。许多证据都表明,某些特殊的免疫调节分子包括细胞因子和趋化因子的基因多态性与 HBV 感染的宿主易感性有关^[8]。

3.2.1 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) TNF- α 是参与非细胞毒性抗病毒机制的一种重要细胞因子^[26]。TNF- α 基因位于 MHC-III 区域,在其启动子区存在着 5 个典型的 SNPs,分别是:-1031T/C、-863C/A、-857C/T、-308G/A 和 -238G/A(前面的负数代表变异位点位于转录起始位点上游的碱基数)^[27-28]。鉴于 TNF- α 在 HBV 感染过程中的复杂而重要的作用, TNF- α 启动子区多态性与 HBV 感染宿主易感性的研究最先受到广大研究者的重视,但研究的结论却是令人困惑的。

早先, Hohler *et al*^[13, 30]发现在TNF- α 启动子区其中两个位点(-308G/A和-238G/A)的多态性与患者的HBV和HCV持续性感染有显著的相关性;他们认为TNF- α 基因启动子区多态性(主要是-308G/A和-238G/A)影响了TNF- α 基因表达TNF- α 的水平,而TNF- α 可以抑制HBV基因的表达,从而有利于病毒的清除和抗病毒免疫反应.然而近年来,Hohler的这一结论却不断受到挑战,甚至许多研究者得出了相反的结论.Miyazoe *et al*^[29]对日本HBV携带者的研究发现,TNF- α 基因的启动子区域多态性与乙型肝炎疾病进展并无关联.Ben *et al*^[14]通过对照分析研究也发现HBV感染患者和对照组之间TNF- α 基因在-308位点的多态性并无统计学上的意义,证实了Miyazoe的结论.

3.2.2 干扰素 γ (IFN- γ)与TNF- α 相似,IFN- γ 也是通过非细胞毒效应来参与对体内的HBV的清除.Hoffmann *et al*^[6]研究发现,亚洲人比非洲人中有更多的IFN- γ 基因型,从而导致了低水平的表达,这就提示亚洲人口对HBV的高度易感可能与低水平的IFN- γ 表达相关.Ben-Ari *et al*^[14]研究发现IFN- γ 基因编码区+874位点存在着T/A的突变,进一步研究发现,IFN- γ 基因等位多态性与直接导致了三种不同水平的IFN- γ 表达量,纯合子T/T基因型与高水平的IFN- γ 表达量有关,而杂合子T/A基因型则表现为中等水平的IFN- γ 表达量,纯合子A/A与低水平的IFN- γ 表达量有关;统计分析发现,HBV慢性感染患者与对照组相比IFN- γ 基因的多态性有显著的统计学意义($P=0.002$),他们推测,IFN- γ 基因的突变导致IFN- γ 的低表达,从而对HBV感染易感.因此,IFN- γ 基因是HBV感染慢性化发展的一个易感基因.

3.2.3 白介素10(IL-10) IL-10主要是由巨噬细胞分泌,他能下调Th1型细胞因子的表达,是一种强有力的免疫抑制因子和协同刺激分子^[31].IL-10基因启动子区存在着三个SNPs,分别是位于转录起始位点上游的-1082A/G、-819T/C和-592A/C,他们可以组成三种不同的单倍型^[32].Miyazoe *et al*^[29]分析了TNF- α 和IL-10启动子SNP在日本HBV感染患者中的分布规律,发现IL-10启动子区-819T/C和-592A/C的野生型在HBV无症状携带者中比慢性进展性肝病患者中显著增多,肝硬化患者中单倍型IL-10-ht2(A-C-C-T)出现频率比无症状携带者显著偏高,提示IL-10启动子单核苷酸多态性与慢性HBV感染的进行性发展有关,可能是因为IL-10启动子-819T和-592A单倍型等位基因造成了IL-10产生水平的下降.后来,Shin *et al*^[33]也报告了相似结论,他们对HBV感染人群进行的遗传相关性研究表明:IL-10-ht2(A-C-C-T)单倍型与HBV感染者进展为肝细胞癌(HCC)的发生率显著相关.HCC患者具有更高的IL-10-ht2易感频率,且IL-10-ht2显著增加了HBV慢性感染患者进展为肝硬化和肝癌的风险,HCC发生的年龄在携带有的慢性IL-10-ht2 HBV感染者中被显著的加速提前了.据此推测,对具有

IL-10-ht2单倍型的HBV感染个体而言,IL-10-ht2调节刺激IL-10的产生,从而抑制了先天性免疫,上调的IL-10加速了慢性HBV感染向肝炎肝硬化,最后向HCC这一预后不好的方向发展.

3.2.4 趋化因子 趋化因子是一大类通过G蛋白偶联受体对黏附在血管内皮细胞的白细胞具有趋化活性的细胞因子家族的总称,在肝脏的炎症和损伤中发挥重要的调节作用^[34].近年来趋化性细胞因子家族中的干扰素 γ 诱导的蛋白10(IFN- γ -Inducible protein 10, IP-10;CXCL10)^[35-36]、CC化学因子受体(CCR)^[37-39]等与慢性肝炎特别是慢性HBV、HCV感染的相关性的也不断可见报道.

Narumi *et al*^[35]发现在慢性病毒性肝炎患者血清中IP-10水平比志愿献血者血清中的水平显著增高,原位杂交显示IP-10 mRNA主要在肝小叶中间的肝细胞的和碎片样坏死区周边的肝脏细胞中,提示IP-10在慢性肝炎的肝细胞坏死的肝小叶的炎症中起特殊的作用.最近Harvey *et al*^[18]在另一项研究中证实了这一结论,并且他们同时还认为IP-10在肝脏细胞的表达水平与慢性病毒性肝炎的组织学严重程度相关.缺失32个碱基对的CCR5(简称CCR5 Δ 32)与HIV感染的遗传相关性早已引起重视^[36].随后,Waitas *et al*^[37]和Promrat *et al*^[38]先后发现CCR特别是CCR5 Δ 32的多态性与肝炎病毒感染的临床结局和治疗反应显著相关.相信随着研究的不但深入,这些及其他潜在的化学因子基因与HBV感染的宿主遗传相关性也将得到更加明确的阐明.

3.3 雌激素受体 α (ESR1) 雌激素受体(ESRs)在其他多基因遗传病中的作用有许多相关的报道,他在HBV感染中的作用也很早就受到遗传学家和病毒学者的关注.事实上,人们很早就发现临床上HBV慢性感染男性患者比女性患者更多见,动物实验中也发现HBsAg在雄性转基因小鼠中的表达水平也比雌性小鼠高.Mizoguchi *et al*^[39-40]研究发现,在无症状HBV携带者和慢性肝炎患者中ESRs在外周血单核细胞胞质中的水平显著低于健康个体中ESRs的水平.而且,当把来自于慢性HBV感染患者的外周血单核细胞与IFN- α 一起孵育时,无论是体外还是体内实验都发现ESRs水平随着IFN- α 浓度的增加而升高.Almog *et al*^[41]把人源肝肿瘤细胞株HepG2转入无胸腺小鼠形成肿瘤后用雌二醇进行治疗,结果发现,雌二醇治疗能够抑制雄性小鼠的HBV的表达,但在雌性小鼠中作用轻微,据此认为雌激素在HBV感染所致的肝病中发挥重要的作用,对肝脏基因的表达和mRNA的稳定有重要的意义.随后,Tur-Kaspa *et al*^[42]发现在HBV基因组靠近3'端帽子结构的341-370区存在着一个特殊的对糖皮质激素受体结合的DNA结合位点,这种糖皮质激素受体结合的DNA序列是HBV基因组下游-730位点的糖皮质激素依赖的活性的增强子的信号系统.据此可以推测,ESRs在持续性HBV感染中发挥重要的调节作用,ESRs基因与乙型肝炎宿主遗传易感性相关;由于HBV携带者ESRs低水平的表达,导致免疫系统对性激

素的反应不足, 从而造成对 HBV 病毒清除不力而更容易引起 HBV 持续性感染。

人 ESRs 可分为两类: 雌激素受体 α (ESR1) 和雌激素受体 β (ESR2), 无论 ESR1 或 ESR2 的遗传变异都会导致雌激素功能的下降, 从而有可能导致对 HBV 感染形成不同类型的宿主遗传易感性。早期的一份对青年男性的研究表明^[43], ESR1 基因有功能意义的突变, 更容易导致雌激素的抵抗, 据此推断雌激素主要是通过 ESR1 结合来发挥其作用的; ESR1 基因才是真正的对 HBV 感染具有宿主遗传易感性的微效基因。最近, Deng *et al*^[15] 通过大样本对 ESR1 基因多态性与慢性持续性 HBV 感染之间的关系做了大量的研究。他们对 27 例不相关的中国人进行 ESR1 基因区单核苷酸多态性再测序; 选择了 2 个单倍型标签 SNP 位点 (T29C 和 A252966G), 对 1277 例持续 HBV 感染者, 748 例自发性康复患者和 293 个核心家系利用 PCR-RFLP 进行分型, 发现 ESR1 29T/T 基因型的个体与至少含一个 29C 等位点的个体相比持续 HBV 感染的易感性显著增加 ($P < 0.001$)。经 293 个核心家系传递不平衡测试 (TDT), 还观察到 29T 等位基因比我们预期更多的从杂合的父母向子女传递, 这与大样本调查结果一致; 连锁不平衡作图分析表明 T29C 多态性包含了位于 ESR1 启动子到内含子 3 的一个连锁不平衡区域, 这表明检测到的 ESR1 T29C 转换来源于 ESR1 本身, 中国人群中 ESR1 基因多态性与 HBV 持续感染显著相关。

3.4 甘露糖结合蛋白 (MBP) MBP 是一种钙离子依赖的调理素, 在先天性免疫过程中的经典补体活化途径和吞噬作用阶段发挥重要的生物学作用^[44]。在 MBP 基因编码区存在着三种确定的基因多态性 (密码子 54、57 和 52), 由于这种调理素的缺乏, 造成血清中 MBP 的浓度下降, 从而引起宿主先天性免疫功能的不足^[45]。Thomas *et al*^[16] 在白种人中的研究发现, 在 HBV 包膜的中分子质量的表面蛋白中包含一个富含甘露糖的寡糖成分, 他是 MBP 结合的位点。27% 的慢性 HBV 感染者存在着 52 位密码子的杂合或者纯合的等位突变, 但是仅仅只有 11% 的急性感染患者和 4% 的对照人群携带有在野生株的等位基因。这说明存在 52 位密码子变异的 MBP 基因与 HBV 的持续感染有关。HBV 感染患者比对照组有更高频率的 52 位密码子变异, 这种变异可能导致了宿主对 HBV 的调理作用和吞噬作用的失败。Yuen *et al*^[46] 分析了中国 HBV 和 HCV 感染人群中的 MBP 水平以及 MBP 基因变异情况, 结果发现慢性 HBV 和 HCV 感染患者体内 MBP 水平较正常人群为低, 统计分析还发现 MBP 密码子 54 的突变与中国人慢性 HBV 感染疾病进展相关。但另外一份来自德国的研究表明, MBP 的多态性与德国的白种人和冈比亚人中的慢性 HBV 感染无关^[47]。

3.5 维生素 D 受体 (VDR) 维生素 D 的活化形式 (1, 25 dihydroxyvitamin D3) 是具有免疫调节作用的类固醇分子, 可抑制 Th1 细胞反应, 活化 Th2 细胞的免疫反应,

他与分布在人单个核细胞表面的 VDR 结合后发挥作用^[48]。Bellamy *et al*^[49] 在非洲对大样本的传染病患者和对照组进行基因多态性分析, 他们研究了 HBV 感染患者中两个已知的 VDR 基因多态性, 发现其中一个多态性的 “T/T” 基因型与病毒的清除有相关性; 在带有 VDR 密码子 352 位的纯合子 (“T/T” 基因型) 的个体比其他基因型的个体感染结核和慢性乙型病毒性感染更少见。

4 乙型肝炎的宿主遗传易感性研究前景展望

迄今为止, 来自于世界各地的不同实验室都相继报道了对乙型肝炎的宿主遗传易感性的研究结果, 但结论却不完全一致, 同一个遗传因素在不同的研究中对 HBV 是有利清除还是有利持续存在有时出现着完全相反的结论。造成这种结论不一致的原因大体有: (1) 病毒与具有多等位基因的宿主之间的作用的复杂性; (2) 不同实验室的研究对象来自于不同的人种和 (或) 民族; (3) 有时研究的基因可能与某个 HLA 等位基因具有连锁不平衡; (4) 遗传易感性机制可能涉及到多个基因位点和单倍体的变异之间的相互作用, 对此迄今还了解甚少。因此, 我们有必要全球范围内多中心合作来收集、分析相关的临床数据和遗传学数据, 鉴定和筛选出更多的与多态性相关的候选基因, 以便早日揭开 HBV 感染遗传易感性和免疫遗传病理机制的神秘面纱^[10]。

遗传作用是复杂的, 所以不可能把 HBV 感染的易感性或者抵抗力归结于某一个单一的等位基因的变异^[50]。但是几个 SNPs 或单倍型的整体改变就会对 HBV 感染产生整合或协同增效作用。近年来, 遗传流行病学策略和高密集全基因组范围搜寻技术不断取得进步, 还有大量有用候选基因及其序列信息迅猛的增长, 所有的这些为鉴定 HBV 感染相关性基因及其功能研究提供了基本的技术平台。我们有理由相信, 乙型肝炎的宿主遗传易感性研究的研究范围和研究模式必将发生巨大的变化。以后必将涉及到遗传因素与其他因素之间的相互作用, 包括遗传因素与病毒表型, 人种特征, 环境因素准确定量等之间的关系也将得到阐明。当前除了应该加紧筛选 HBV 感染或者肝病关联基因外, 也应该加紧研究已经鉴定出的候选基因的功能。我们相信, HBV 感染相关性基因的筛选和功能研究不断的深入, 不仅能为我们更好的阐明 HBV 感染的病理学机制, 也为我们提供了一种探索 HBV 感染诊断和治疗方法的新思路^[9]。

5 参考文献

- 1 Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337: 1733-1745
- 2 Thursz MR. Genetic susceptibility in chronic viral hepatitis. *Antiviral Res* 2001;52:113-116
- 3 Weatherall D, Clegg J, Kwiatkowski D. The role of genomics in studying genetic susceptibility to infectious disease. *Genome Res* 1997;7:967-973
- 4 Kwiatkowski D. Genetic dissection of the molecular patho-

- genesis of severe infection. *Intensive Care Med* 2000;26(Suppl 1):S89-97
- 5 Hohler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, Lohr HF, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997;26:503-507
 - 6 Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Ethnicity greatly influence cytokine gene polymorphism distribution. *Am J Transplant* 2002;2:560-567
 - 7 Knolle PA, Kremp S, Hohler T, Krummenauer F, Schirmacher P, Gerken G. Viral and host factors in the prediction of response to interferon-alpha therapy in chronic hepatitis C after long-term follow-up. *J Viral Hepat* 1998;5:399-406
 - 8 Thio CL, Thomas DL, Carrington M. Chronic viral hepatitis and the human genome. *Hepatology* 2000;31:819-827
 - 9 Dean M, Carrington M, O'Brien SJ. Balanced polymorphism selected by genetic versus infectious human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:263-292
 - 10 Abel L, Dwssein AJ. Genetic epidemiology of infectious diseases in humans: design of population-based studies. *Emerge Infect Dis* 1998;4:593-603
 - 11 Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AV. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995;332:1065-1069
 - 12 Ahn SH, Han KH, Park JY, Lee CK, Kang SW, Chon CY, Kim YS, Park K, Kim DK, Moon YM. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology* 2000;31:1371-1373
 - 13 Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol* 1998;111:579-582
 - 14 Ben-Ari Z, Mor E, Papo O, Kfir B, Sulkes J, Tambur AR, Turkaspa R, Klein T. Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2003;98:144-150
 - 15 Deng G, Zhou G, Zhai Y, Li S, Li X, Li Y, Zhang R, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Wang Y, He F. Association of estrogen receptor α polymorphisms with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004;40:318-326
 - 16 Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW, Summerfield JA. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* 1996;348:1417-1419
 - 17 Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, Hill AV. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 1999;179:721-724
 - 18 Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, French RA, Kumar RK, Marinos G, Lloyd AR. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol* 2003;74:360-369
 - 19 王宇明, 顾长海. 感染病学新进展. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:216-233
 - 20 Zavaglia C, Bortolon C, Ferrioli G, Rho A, Mondazzi L, Bottelli R, Ghesi A, Gelosa F, Iamoni G, Ideo G. HLA typing in chronic B, D and C hepatitis. *J Hepatol* 1996;24:658-665
 - 21 Thio CL, Carrington M, Marti D, O'Brien SJ, Vlahov D, Nelson KE, Astemborski J, Thomas DL. Class II of HLA alleles and hepatitis B virus persistence African Americans. *J Infect Dis* 1999;179:1004-1006
 - 22 Diepolder HM, Jung MC, Keller E, Schraut W, Gerlach JT, Gruner N, Zachoval R, Hoffmann RM, Schirren CA, Scholz S, Pape GR. A vigorous virus-specific CD4⁺ T cell response may contribute to the association of HLA-DR13 with viral clearance in hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1998;113:244-251
 - 23 Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997;349:1912-1913
 - 24 Van Devanter SJ. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. *Intensive Care Med* 2000;26(Suppl 1):S98-102
 - 25 Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991;146:3444-3451
 - 26 Knight JC, Kwiatkowski D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Pro Assoc Am Physicians* 1999;111:290-298
 - 27 Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Micro Res Tech* 2000;50:216-228
 - 28 Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, Itoh K. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998;51:605-612
 - 29 Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Nakao K, Daikoku M, Yatsushashi H, Koga M, Yano M, Eguchi K. Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2086-2092
 - 30 Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism at position 238 is associated with chronic hepatitis B infection. *J Med Virol* 1998;54:173-177
 - 31 Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NR. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 2001;9:86-92
 - 32 Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 1999;30:526-530
 - 33 Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Kim JY, Yoon JH, Kim YJ, Lee HS. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hum Mol Genetic* 2003;12:901-906
 - 34 Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-242
 - 35 Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y, Okanoue T. Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* 1997;158:5536-5544
 - 36 Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382:722-725
 - 37 Woitas RP, Ahlenstiel G, Iwan A, Rockstroh JK, Brackmann HH, Kupfer B, Matz B, Offergeld R, Sauerbruch T, Spengler U. Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1721-1728
 - 38 Promrat K, McDermott DH, Gonzalez CM, Kleiner DE, Koziol DE, Lessie M, Merrell M, Soza A, Heller T, Ghany M, Park Y, Alter HJ, Hoofnagle JH, Murphy PM, Liang TJ. Associations of chemokine system polymorphisms with clinical outcomes and treatment responses of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:352-360
 - 39 Mizoguchi Y, Takeda H, Kobayashi K, Yamamoto S, Morisawa S. Impairment in the response of peripheral blood mononuclear cells from asymptomatic hepatitis B virus carriers to estradiol. *Jpn J Med* 1988;27:183-186
 - 40 Mizoguchi Y, Takeda H, Sakagami Y, Seki S, Kobayashi K, Yamamoto S, Morisawa S. Estradiol receptors in the cytosol of peripheral blood mononuclear cells in hepatitis B virus carriers treated with interferon-alpha. *Gastroenterol Jpn* 1989;

- 24:373-379
- 41 Almog Y, Klein A, Adler R, Laub O, Tur-Kaspa R. Estrogen suppresses hepatitis B virus expression in male athymic mice transplanted with HBV transfected HepG-2 cells. *Antiviral Res* 1992;19:285-293
- 42 Tur-Kaspa R, Shaul Y, Moore DD, Burk RD, Okret S, Poellinger L, Shafritz DA. The glucocorticoid receptor recognizes a specific nucleotide sequence in hepatitis B virus DNA causing increased activity of the HBV enhancer. *Virology* 1988;167:630-633
- 43 Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994;331:1056-1061
- 44 Kuhlman M, Joiner K, Ezekowitz RA. The human mannose binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med* 1989;169:1733-1745
- 45 Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, Turner MW. High frequency in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1992;1:709-715
- 46 Yuen MF, Lau CS, Lau YL, Wong WM, Cheng CC, Lai CL. Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 1999;29:1248-1251
- 47 Hohler T, Wunschel M, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. No association between mannose binding lectin alleles and susceptibility to chronic hepatitis B virus infection in German patients. *Exp Clin Immunogenet* 1998;15:130-133
- 48 Lacey DL, Erdmann JM, Tan HL. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 increases type 1 interleukin-1 receptor expression in a murine T cell line. *J Cell Biochem* 1993;52:159-170
- 49 Bellamy R, Hill AV. Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. *Curr Opin Immunol* 1998;10:483-487
- 50 Griffiths PD. Interactions between viral and human genes. *Rev Med Virol* 2002;12:197-199

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 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%).

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序). 论文排序: 期刊论文数, 点击论文数.

2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. 癌症 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. 方法: 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选; 运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达; 并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. 结果: 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5)的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34)的鼻咽癌活检组织检测到有 EST (N31985)表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 结论: 染色体 3p21 区域 EST(N31985)在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

小肠移植研究新进展

张喜平, 封光华

张喜平, 封光华, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006
杭州市医药卫生科技计划资助项目, NO. 2004BZ005
通讯作者: 封光华, 310006, 浙江省杭州市浣纱路261号, 杭州市第一人民医院普外科.
电话: 0571-87065701-11381
收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-02-26

摘要

由于容易发生排斥反应和感染, 小肠移植一直是临床上难度最大的移植手术之一, 因此其发展远远落后于其他器官和组织移植的发展水平. 自80年代环孢素(CsA)问世以来, 小肠移植的病例逐渐增多. 进入90年代后, 新型的强力免疫抑制剂他克莫司的问世, 使小肠移植成功率大大上升, 目前仍生存的小肠移植患者, 几乎都是因采用了他克莫司而获得成功的. 本文从小肠移植临床新技术、移植小肠保存、排斥反应、术后感染、营养支持五个方面对小肠移植近年来的研究做一归纳和阐述.

张喜平, 封光华. 小肠移植研究新进展. 世界华人消化杂志 2005;13(8): 1008-1010
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1008.asp>

0 引言

长期以来由于容易发生排斥反应和感染, 小肠一直被称作移植术中的“Forbidden Organ”(禁止移植的器官), 因此远远落后于其他器官和组织移植的发展水平. 小肠移植的适应证主要有以下几个方面^[1-2]: (1) 短肠综合征引起的小肠功能衰竭; (2) 肠蠕动失调症; (3) 先天性肠表皮黏膜疾病; (4) 成人疾病, 主要有血管性疾病、肠扭转疾病、外伤等造成小肠坏死, 施行广泛小肠切除而发生的短肠综合征、Gardner 综合征、放射性小肠炎、硬纤维病、Crohn 病、坏死性小肠、结肠炎等^[3]. 临床上将小肠移植分成三种类型, 分别为^[4]: (1) 小肠单独移植; (2) 小肠+肝脏联合移植; (3) 腹腔多器官联合移植. 临床证明, 与余单独移植相比, 后两种, 排斥反应弱, 患者存活时间长^[1]. 1959 年 Lillehei 施行首例犬自体小肠移植, 1964 年 Detterling 施行首例人类小肠移植(母肠给予)^[5]. 此后, 曾有六个单位试验性地开展过人小肠移植, 但均失败, 使这一研究停顿了近 20 a. 1980 年环孢素(CsA)问世, 小肠移植的病例也越来越多, 进入1990年后, 新型的强力免疫抑制剂他克莫司的问世, 使临床小肠移植成功率大大上升, 目前仍生存的小肠移植患者, 几乎都是因采用了他克莫司而获得成功的^[6]. 到2003年为止, 以美国为主的61家医院共实施了包括活体和尸体小肠移植989例(供体923例), 其中484例得以生存, 并且出

现了超过 15 a 以上的长期生存患者. 在国内, 近几年来, 已有天津、南京、武汉、西安、哈尔滨、杭州等多个城市施行小肠移植近 20 例. 第四军医大学西京医院、哈尔滨医科大学附一院、西安交大第一医院等多家医院均成功施行过亲属活体小肠移植, 其中西京医院施行过国内第 1 例亲属活体小肠移植患者至今已存活 5 a 余, 最近的一例报道是在 2004-07-14 由杭州市第一人民医院实行的 1 例小肠移植(尸肠), 但从移植效果看亲属活体小肠移植明显优于尸体小肠移植. 我院实施的 1 例尸肠小肠移植患者在移植前后均采用国内最成熟的治疗方案和免疫抑制药物, 但患者仅存活 34 d, 最终因发生罕见的移植物抗宿主反应(GVHD), 导致多脏器功能衰竭而死亡.

1 小肠移植临床新技术

在小肠移植手术日益成熟的今天, 越来越多的新技术和新方法涌现了出来, 这对于提高临床小肠移植的安全性和成功率有很大的意义. 肠镜检查对判定小肠移植术后是否发生并发症, 其所移植的器官是否完整, 有很大的作用, 但肠镜也有缺点, 例如对于虚弱的患者可能产生不良的后果. de Franchis *et al*^[7]人发明了胶囊肠镜检查(capsule enteroscopy), 这种检查方法比回肠内镜检查更舒适, 而且能检查到回肠镜检查不到的肠黏膜局部细胞的变化. 单独小肠移植的诸多类型中, 活体小肠移植是最佳的选择, 而围手术期处理则是该手术成败的关键. 王为忠 *et al*^[8]报道了我国首例活体部分小肠移植的手术经过和围手术期处理方法, 该手术中围手术期处理方法值得参考, 手术后患者健康生活至今, 移植肠功能恢复良好. Miyauchi *et al*^[9]在2001年便报道了使用短期的他克莫司和供体脾细胞注入受者门静脉(DSPV)的综合疗法, 供者脾细胞作为一种抗原注入受者门静脉内, 可以反射抑制IL-2受体, 耐受因子可以随即引导受者血清产生耐受性, 结合短期的他克莫司联合治疗可以显著降低小肠移植术后的免疫反应. 但对于降低免疫反应潜在的机制是知之甚少的. Mitsuoka *et al*^[10]近期通过检测移植物淋巴细胞浸润(GILs)和外周淋巴细胞(PBLs)内细胞因子的产生, 阐明了上述降低免疫反应的潜在机制. 结果显示供者特殊骨髓细胞经门静脉输注(DSBMI-PV-Tac), 降低了GILs并阻止了Th2型反应, 而以上两项变化均可显著延长小肠移植术患者的存活时间.

2 移植小肠的保存

小肠移植的另一个重要问题便是保存小肠, 由于肠对于

缺血的耐受性差, 小肠的有效保存时间远远短于其他器官, 不能满足临床移植需要, 故解决这一问题显得格外有意义. 小肠保存中最关键的是保存液. 现在普遍认为凡是能保存小肠超过 8 h 的保存液均视为有效, 但没有一个能保存小肠达到 24 h 的. 临床上目前常用的保存液很多, 如乳酸林格 (LR) 液、Euro-Collins (EC) 液、高渗枸橼酸盐嘌呤 (HC-A)、威斯康星大学溶液 (UW 液) 等. 近年的研究也提出了许多改良的保存液, 如为了提高临床上肠低温保存的质量, Tsujimura *et al*^[11] 结合了传统的两种保存方法, 将全氟碳 (PFC) 和一种新的富含氨基酸的苯巴比妥溶液联合使用. 结果显示, 该综合疗法显著提高了小肠的能量和黏膜的功能, 这个新的保存方法可能对成功实现临床上小肠的保存有很大的意义, 目前认为成功地维持小肠细胞的能量与移植小肠的保护有着非常紧密的联系. Salehi *et al*^[12] 使用了一种改进的 UW 液, 向原有的 UW 液中添加了氨基酸缓冲液和碳水化合物的基底物质, 结果显示, 该保存液能使小肠在低温保存时也能产生足够的 ATP, 显著提高其细胞能量. 也有报道称将苯巴比妥与 UW 液连用可以提高人体小肠的保存质量及时间^[13].

3 小肠移植排斥反应

在小肠移植术后, 首要的处理是使用免疫抑制剂, 以防止其发生排斥反应. 临床上多主张联合用药, CsA 或 FK506 并用皮质激素、硫唑嘌呤、前列腺素 E1 的联合用药方式^[14], 但能否治愈的关键在于及时发现这种排斥反应的发生. Ruiz *et al*^[15] 曾报道, 在受者体内血管损伤并伴随局部的体液预先致敏现象, 很可能是一种急性血管排斥反应, 由于该种血管变化在患者中较常见, 故很容易被忽视, 在对高危患者的术后监护中应注意此问题. 经过长期对术后患者的调查发现, Pappas *et al*^[16] 报道血浆瓜氨酸水平可以作为一个检测是否发生排斥反应的信号, 通过检测该信号可以很好地防止排斥反应. Miyauchi *et al*^[17] 通过动物实验证实扑热息痛 (对乙酰氨基酚) 吸附试验可以检查出早期小肠移植排斥反应, 在临床上会有很好的使用前景.

对于排斥反应发生的各方面机制的研究也取得了一些进展, 在小肠同种异体移植术中, 急性排斥是一个严重而且多发的并发症, 小肠活组织检查是鉴别这一形式排斥反应的最佳方法. 2004 年在美国迈阿密召开的国际小肠移植专题讨论会上, 多位知名病理学家将这一检查方法的分类统一了标准^[18]. 为了寻找小肠排斥反应的标志物, 研究排斥反应的分子生物学机制, 罗宇东 *et al*^[19] 报道小肠移植早期 IL-2 受体链编码基因 mRNA 的高度表达是小肠移植排斥反应的主要启动因素和早期标志物, 对所获得 DNA 片断进行的序列测定验证了反应产物的特异性. 小肠移植排斥反应中的基因表达研究对于阐明排斥反应的根本机制也起到了非常积极的作用, IL-2、IFN- γ 、穿孔素和粒细胞酶 B 的转录在小肠移植排斥中发挥了重要作用, 通过检测 IL-2、IFN- γ 、穿孔素和粒细胞酶 B 的表达, 可能为临床小肠移植排斥反应的早期诊断提供了一个特异、敏感的方法,

通过阻断 IL-2、IFN- γ 、穿孔素和粒细胞酶 B 的转录可望达到小肠移植抗排斥或诱导免疫耐受的目的^[6].

4 小肠移植术后感染

目前防止小肠移植是发生排斥反应多用免疫抑制剂, 但这一方法会带来许多并发症, 感染便是其中之一, 这也是限制小肠移植成功的一个主要因素. 据报道, 在失败的小肠移植手术中有 60% 是这个原因^[20], 而且多位混合性感染, 病原复杂, 治疗难度很大. 所以多选用广谱、对需氧和厌氧均有效的抗生素, 如罗氏芬和替硝唑^[21]. 与此同时我们也不能忽视由于抗生素应用而导致霉菌感染机会的增加, 应加用抗霉菌的药物. 此外, 病毒性感染也是移植术后的一个棘手问题, 其中巨细胞病毒 (CMV) 感染和非洲淋巴瘤瘤病毒 (EBV) 最为常见^[20], 而且一旦被感染, 尚无有效的药物治疗, 所以在临床上应对供体进行严密的筛选、对病房进行严格的消毒, 还需应用阿昔洛韦 3-6 mo 预防病毒感染^[21].

5 小肠移植营养支持

由于小肠移植手术本身的复杂性及大量免疫抑制剂的使用会引起患者的生理性改变及并发症, 故对患者进行术前术后的营养支持对顺利手术及术后肠功能的恢复有十分重要的意义. 许多小肠移植患者在手术前由于无法正常接受营养而导致营养不良, 体重轻、常腹泻, 体液电解质失衡, 且多接受了长时间的胃肠外营养 (TNP), 患者转氨酶和碱性磷酸酶均增高, 肝功能损伤大, 这更加重了患者的机体损害, 使其无法耐受手术^[22]. 对于这种体质的患者只有恢复其营养才可进行手术, 由于其胃肠功能丧失, 只能通过全胃肠外营养 (TNP) 来补充营养, 这就要求采用 TNP. 张洪伟 *et al*^[21] 以恢复患者肝功能为主, 采用了无脂肪的 TNP, 并加入了糖的摄入量, 另外运用支链氨基酸, 同时给予维生素 B 及特异性肝细胞生长因子等进行保肝治疗, 效果良好, 使患者成功进行了手术. 对于手术后的营养, 由于抑制排斥反应的甾体类激素及手术应激均可引起氮分解代谢增强, 因此首先需加强蛋白质的补充, 纠正负氮平衡. 其次, 由于移植术及造瘘口会引起维生素、矿物质及超微量元素大量流失, 应给予适当的补充^[23]. 外源性特殊养分的补充对小肠移植物的恢复至关重要, 但由于游离的谷氨酰胺性质不稳定, 易被水解为有毒物质, 故临床上常用谷氨酰胺二肽^[24]. 除此之外, 食物纤维对移植肠管再生有潜在的作用, 其中水不溶性纤维 (例如纤维素) 可通过减少细菌易位防止败血症的发生^[25], 水溶性纤维 (例如果胶) 可促进肠绒毛功能的恢复. 随着小肠移植术的发展, 痊愈的患者也越来越多, 而作为术前体质良好、术后快速康复根本保证的营养支持将会起到举足轻重的作用.

6 参考文献

- 1 Grant D. Intestinal transplantation: 1997 report of the international registry. *Transplantation* 1999;67:1061-1064
- 2 Goulet O, Revillon Y. Intestinal transplantation. *Indian J Pediatr*

- 2003;70:737-742
- 3 夏穗生. 小肠移植的沿革与新进展. 消化外科 2002;1:307-310
- 4 Kato T, Ruiz P, Thompson JF, Eskind LB, Weppler D, Khan FA, Pinna AD, Nery JR, Tzakis AG. Intestinal and multivisceral transplantation. *World J Surg* 2002;26:226-237
- 5 王果. 小肠移植的进展. 中华小儿外科杂志 1999;20:51-52
- 6 Thompson JS. Intestinal transplantation. Experience in the United States. *Eur J Pediatr Surg* 1999;9:271-273
- 7 de Franchis R, Rondonotti E, Abbiati C, Beccari G, Merighi A, Pinna A, Villa E. Capsule enteroscopy in small bowel transplantation. *Dig Liver Dis* 2003;35:728-731
- 8 王为忠, 宋维亮, 吴国生, 凌瑞, 卜建石, 张少华, 杜建军, 陈冬利, 赵京霞, 薛涌嘉, 董光龙, 张宏伟, 李孟彬, 李纪鹏, 刘小南, 李刚, 罗兰. 活体部分小肠移植供受体围手术期的处理. 中华普通外科杂志 2000;15:411-413
- 9 Miyauchi T, Ishikawa M, Tashiro S, Hisaeda H, Himeno K. Experimental study of combined treatment with tacrolimus and donor splenocytes via the portal vein in small bowel transplantation. *J Med Invest* 2001;48:157-165
- 10 Mitsuoka N, Iwagaki H, Ozaki M, Sheng SD, Sadamori H, Matsukawa H, Morimoto Y, Matsuoka J, Tanaka N, Yagi T. The impact of portal infusion with donor-derived bone marrow cells and intracellular cytokine expression of graft-infiltrating lymphocytes on the graft survival in rat small bowel transplant model. *Transpl Immunol* 2004;13:155-160
- 11 Tsujimura T, Salehi P, Walker J, Avila J, Madsen K, Lakey J, Kuroda Y, Churchill TA. Ameliorating small bowel injury using a cavitary two-layer preservation method with perfluorocarbon and a nutrient-rich solution. *Am J Transplant* 2004;4:1421-1428
- 12 Salehi P, Spratlin J, Chong TF, Churchill TA. Beneficial effects of supplemental buffer and substrate on energy metabolism during small bowel storage. *Cryobiology* 2004;48:245-253
- 13 DeRoover A, De Leval L, Gilmaire J, Detry O, Coimbra C, Boniver J, Honore P, Meurisse M. Luminal contact with University of Wisconsin solution improves human small bowel preservation. *Transplant Proc* 2004;36:273-275
- 14 王为忠, 宋维亮, 吴国生, 凌瑞, 李刚, 陈冬利, 李孟彬, 刘小南, 赵京霞. 活体部分小肠移植1例报告. 中华器官移植杂志 2001;22:30-32
- 15 Ruiz P, Garcia M, Pappas P, Berney T, Esquenazi V, Kato T, Mittal N, Weppler D, Levi D, Nishida S, Nery J, Miller J, Tzakis A. Mucosal vascular alterations in isolated small-bowel allografts:relationship to humoral sensitization. *Am J Transplant* 2003;3:43-49
- 16 Pappas PA, Tzakis AG, Saudubray JM, Gaynor JJ, Carreno MR, Huijing F, Kleiner G, Rabier D, Kato T, Levi DM, Nishida S, Gelman B, Thompson JF, Mittal N, Ruiz P. Trends in serum citrulline and acute rejection among recipients of small bowel transplants. *Transplant Proc* 2004;36:345-347
- 17 Miyauchi T, Ishikawa M, Tashiro S. Evaluation of the acetaminophen absorption test for early detection of orthotopic small bowel transplant rejection. *Surg Today* 2001;31:695-700
- 18 Ruiz P, Bagni A, Brown R, Cortina G, Harpaz N, Magid MS, Reyes J. Histological criteria for the identification of acute cellular rejection in human small bowel allografts:results of the pathology workshop at the VIII International Small Bowel Transplant Symposium. *Transplant Proc* 2004;36:335-337
- 19 罗宇东, 梁晓宇, 王浩, 朱理玮, 王鹏志. 小鼠小肠移植术后排斥反应标志物研究. 中国中西医结合外科杂志 2001;7:260-262
- 20 Li Y, Li N, Li J. Intra-graft mRNA expression in small intestinal allograft rejection. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:773-776
- 21 张洪伟, 王为忠, 凌瑞, 李开宗. 临床活体部分小肠移植过程中矛盾现象及处理. 医学与哲学 2001;22:1-3
- 22 Woodward JM, Mayer D. The unique challenge of small intestinal transplantation. *Br J Hosp Med* 1996;56:285-290
- 23 Trohm SL, Koehler AN, Mazariegos GV, Friedman L, Tchang S. Nutrition management in pediatric small bowel transplant. *Nutr Clin Prac* 1999;14:58-68
- 24 王良友, 潘和平. 谷氨酰胺与谷氨酰胺二肽的临床应用前景. 中国营养杂志 2000;8:178-180
- 25 Xu D, Lu Q, Deitch EA. Elemental diet-induced bacterial translocation associated with systemic and intestinal immune suppression. *J Parenter Enteral Nutr* 1998;22:37-41

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号中华医学学会学术会务部 刘亚君；邮编：100710，电话：010-65251575。

过氧化物酶体增殖物激活受体与溃疡性结肠炎

周静平, 邓长生

周静平, 邓长生, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071
通讯作者: 周静平, 430071, 湖北省武汉市武昌东湖路 169 号, 武汉大学中南医院消化内科. jingping714@yahoo.com.cn
电话: 027-87331114
收稿日期: 2005-03-01 接受日期: 2005-03-21

摘要

过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)是新近发现的一类核转录因子, 属 II 型核受体超家族, 被相应的配体激活后调节目的基因转录, 在脂代谢、糖代谢、细胞增殖分化等方面发挥作用. 近年来研究证实, PPARs 参与炎症及免疫反应的调节, 与溃疡性结肠炎关系密切, 其配体有望成为新一代治疗溃疡性结肠炎的药物.

周静平, 邓长生. 过氧化物酶体增殖物激活受体与溃疡性结肠炎. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1011-1013
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1011.asp>

0 引言

过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)是一类配体激活的核转录因子, 属 II 型核受体超家族, 最初因未发现其相应配体而被称为孤儿受体(orphan receptor). 后续研究中证实, 该类受体可被不饱和脂肪酸、某些药物激活, 导致啮齿类动物肝脏过氧化物酶体数量和体积增加, 故而得名. PPARs 与相应配体激活后能调节目的基因转录, 在脂代谢、糖代谢、细胞增殖分化等方面发挥重要作用. 近年来有研究表明, PPARs 也参与炎症、免疫应答调控, 与某些炎症相关疾病如炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)、动脉粥样硬化(atherosclerosis)等发病机制密切相关. 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是原因不明的大肠黏膜慢性炎症和溃疡病变, 是 IBD 的一种独立疾病, 大量实验证明^[1-4], PPARs 参与 UC 的发生发展; PPARs 激活剂可缓解实验动物 IBD 的症状, 显著改善组织学病变. 现就 PPARs 的结构、功能及与 UC 的关系综述如下.

1 PPARs 的分型分布与结构

1.1 分型分布 PPARs 主要存在三种亚型: PPAR α , PPAR β (PPAR δ , NUC-1, FAAR), PPAR γ , 不同的亚型由不同的基因编码并有其独特的表达分布^[5]; PPAR α 主要分布于心、肝、肾和骨骼肌与脂肪酸代谢有关; PPAR γ 由于启动子和拼接方式的不同, 又可分为 PPAR γ_1 、PPAR γ_2 、

PPAR γ_3 , 主要表达于脂肪组织、结肠、单核巨噬细胞、淋巴细胞及动脉粥样硬化斑块, 可促进脂质形成和脂肪细胞分化. PPAR β 分布广泛, 组织表达特异性不明显, 心、脑、结肠、脾及脂肪细胞, 内皮细胞均有表达其功能尚不清楚, 可能参与脂类代谢和少突神经胶质细胞成熟^[6], 还与血管炎症的调控有关.

1.2 结构 同其他核受体相似, PPARs 有四个功能域, 由六个结构域组成: (1) 非配体结合区, A/B 区组成, 包含 AF-1 (activation function 1), 在缺乏配体时发挥激活功能; (2) DNA 结合区 (DNA-binding domain, DBD), 由 C 区组成, PPARs 通过此结构域与靶基因特定 DNA 序列结合以调节其转录. 靶基因这段特定 DNA 序列称为过氧化物酶体增殖物反应元件 (peroxisome proliferator response elements, PPRE); (3) 配体结合区 (ligand binding domain, LBD), E/F 区组成; (4) 铰链区, 由 D 区组成, 联接 DBD 与 LBD, 许多核内因子与该区结合可影响 PPARs 转录活性.

2 PPARs 配体

PPARs 配体来源广泛, 根据来源不同分天然配体和合成配体, 他们在结构上有一个共同点—含羧基功能基团和一个疏水区. 天然配体主要来自饮食中的多不饱和脂肪酸 (亚油酸、亚麻酸)、花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 代谢产物. AA 经脂氧合酶途径的代谢产物如白三烯 (LTB₄) 是 PPAR α 天然配体, 激活 PPAR α 后促进脂类代谢; PPAR γ 天然配体是花生四烯酸经环氧合酶及部分脂氧合酶途径的代谢产物, 如 15-脱氧前列腺素 J₂ (15d-PGJ₂)、13-羟十八碳二烯醇 (13-HODE)、9-羟十八碳二烯醇 (9-HODE). 贝特类 (fibrate) 降脂药是 PPAR α 人工合成配体; 新型抗糖尿病药物噻唑烷酮 (TZD) 类如罗格列酮、曲格列酮被证实是 PPAR γ 的合成配体; 非甾体类抗炎药 (NSAID) 也可通过激活 PPAR γ 发挥抗炎作用^[7-8]. 丁酸盐是肠道细菌分解产生的一种短链脂肪酸, 是结肠上皮细胞的主要能量来源, 近有研究表明, 它是 PPAR γ 另一重要天然配体^[9], 通过激活 PPAR γ 维持结肠上皮细胞正常生理功能.

3 PPARs 与靶基因转录

PPARs 调节基因转录包括与维甲酸受体 (retinoid X receptor, RXR) 形成杂二聚体、被 PPARs 或 / 和 RXR 配体激活及与靶基因 PPRE 结合等系列过程, 辅助因子参与了 PPARs 转录活性的调节. 当无配体时, 核受体与辅

助抑制因子(co-repressor)结合,其转录活性被抑制;当配体与受体结合时,受体空间构象发生改变,与辅助抑制因子解离转而与辅助激活因子(co-activator)结合形成复合物,继而激活基因转录与表达.除了辅助因子影响PPARs的转录活性外,PPARs的化学修饰状态也决定了其转录活性^[10]. PPAR α 磷酸化后转录活性增强,而PPAR γ 磷酸化后其活性降低.

4 PPARs 与炎症及免疫反应

LTB₄、PGJ₂分别是PPAR α 、PPAR γ 天然配体,同时也是重要的炎症递质,提示PPARs不仅在代谢而且在炎症调控方面发挥重要作用.PPAR α 被相应受体激活后可促进脂源性炎症递质降解,限制炎症反应的进展.PPAR α 基因敲除的小鼠与野生型小鼠相比,对LTB₄诱导的炎症反应持续时间延长,可能与LTB₄氧化降解减少有关^[11].大量体内体外实验表明PPAR γ 及其配体在不同细胞、分子水平上调节炎症及免疫应答.罗格列酮^[12-13]可降低脂多糖(LPS)、白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的单核细胞、结肠上皮细胞分泌基质金属蛋白酶-9.单核巨噬细胞分化或激活状态与PPAR γ 表达有关,未受刺激时呈低水平表达,激活后呈高水平表达,被其配体激活后可抑制诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、明胶酶B、清道夫受体等表达.Clark *et al*^[14]首次证实,在小鼠T_H细胞和新鲜分离的脾细胞上表达PPAR γ ,15d-PGJ₂及罗格列酮抑制T细胞分泌白介素-2(IL-2)并显著抑制抗原诱导的免疫应答和抗CD₃抗体介导的细胞增殖.Faveeuw *et al*^[15]证实小鼠树突状细胞也表达PPAR γ ,罗格列酮下调CD₄₀诱导的白介素-12(IL-12)分泌,限制T细胞向T_{H1}细胞分化,调节局部细胞免疫应答.PPAR γ 配体不仅可抑制炎症前递质,还可通过上调抗炎因子发挥免疫调节作用.15-PGJ₂除了抑制佛波醇乙脂(PMA)诱导THP-1细胞分泌白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)、TNF- α ,还上调白介素-1受体拮抗剂(IL-1Ra)水平^[16].动物实验中,PPAR γ 配体还可增加抗炎因子白介素-10(IL-10)表达^[17].

为证实PPAR γ 配体在体内同样具有抑制炎症作用,人们进行大量动物实验研究.小鼠肺炎模型中^[18],罗格列酮表现显著的抗炎效应,缓解局部炎症,炎细胞浸润减少,iNOS、环氧合酶2(COX-2)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及P-选择素表达降低;在缺血-再灌注所致的肠损伤模型中^[19],PPAR γ 激活剂BRL-49653抑制白细胞浸润,缓解肠组织损伤,PPAR γ 缺失杂合子(PPAR γ +/-)小鼠肠黏膜损伤比正常鼠(PPAR γ +/+)更重,表明PPAR γ 对肠黏膜可能有保护作用.最近一项研究表明^[4],PPAR δ 也具有免疫调节作用,激活后可抑制巨噬细胞分泌炎症前递质及致动脉粥样硬化性炎症,对心血管具有保护作用;还可与PPAR γ 共同调节CD₄⁺T细胞功能,维护正常胃肠道免疫功能.

5 PPARs 调节免疫反应机制

关于PPARs抗炎分子机制目前还并不完全清楚.一些研究表明,PPARs激活干扰某些信号转导途径如NF- κ B、STAT和AP-1^[20-21].NF- κ B是细胞内一重要的核转录因子,能调节多种细胞因子、炎症递质、生物活性酶、化学趋化递质、黏附分子等表达,与炎症发生发展密切相关.细胞静息状态下,NF- κ B与I κ B抑制蛋白结合,其转录活性被抑制,当细胞受干扰素- γ (IFN- γ)、IL-1、TNF- α 、氧自由基、细菌、病毒、射线等刺激时,相关激酶被激活,I κ B磷酸化与NF- κ B解离,随后被胞内酶水解;NF- κ B从胞质移位到胞核,与靶基因特定作用元件- κ B序列结合,启动基因转录,细胞因子,炎症递质大量表达.I κ B磷酸化是NF- κ B转录活性增强的重要事件,PPAR γ 配体抑制免疫、炎症反应可能与抑制I κ B磷酸化有关.Su *et al*^[22]用免疫印迹显示,IL-1 β 作用CaCo-2细胞后,I κ B水平迅速降低,NF- κ B活性增强,同时用15-PGJ₂和IL-1 β 作用,PPAR γ 被激活,I κ B不减少,而IL-8产生明显受抑制.

6 PPARs 与溃疡性结肠炎

溃疡性结肠炎(UC)又称慢性非特异性溃疡性结肠炎,系原因不明的大肠黏膜慢性炎症和溃疡性病变,其发生与遗传、环境、免疫及可能存在的微生物感染有关^[22].有研究表明,PPARs可能与该病发病机制有关.UC患者结肠黏膜PPAR γ mRNA和蛋白水平低于正常人,而外周血单核细胞PPAR γ 表达水平与正常人无显著差异.葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎中,PPAR γ 激活剂BRL-49653明显缓解结肠炎症状^[1].另有实验证明^[3]罗格列酮、曲格列酮可减轻三硝基苯磺酸钠(TNBS)诱导的小鼠结肠炎,PPAR γ +/-杂合子小鼠对TNBS诱导的炎症表现更强的易感性,提示PPAR γ 在肠道黏膜免疫中起积极的保护作用.Katayama *et al*^[17]利用基因工程方法重建抗炎途径,将表达PPAR γ 腺病毒载体配以罗格列酮注入DSS诱导过的小鼠体内,不仅显著改善结肠炎症和肠黏膜损伤,而且上调PPAR γ 蛋白表达水平,降低ICAM-1、TNF- α 、COX-2的表达.Saubermann *et al*^[23]认为,PPAR γ 激活有助于下调Th₁细胞因子(INF- γ 、TNF- α),上调Th₂细胞因子(IL-4、IL-10),调节T细胞分化.然而也有学者认为,PPAR γ 配体在炎症反应初期有效,预防急性炎症的进展,而一旦炎症建立,配体效应可能下降^[24].丁酸盐作为结肠上皮细胞主要能量来源,其代谢水平的变化常常影响细胞的生理功能.UC患者常伴有丁酸盐氧化水平下降,细胞能量代谢受阻、功能障碍,黏膜完整性破坏,通透性增加.丁酸盐可上调CaCo-2细胞PPAR γ 表达,激活PPAR γ 后促进细胞分化并降低细胞旁通透性(paracellular permeability)^[9, 25].在二硝基苯磺酸钠(DNBS)诱导的小鼠结肠炎中,PPAR α 基因敲除的小鼠与野生型小鼠相比,便血和体重减轻程度更严重,而外源性PPAR α 配体

可减轻结肠炎症状^[26]. 共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)可同时激活PPAR γ 、PPAR δ , 促进PPAR γ 辅助激活因子表达, 拮抗TNF- α 致炎作用并抑制NF- κ B活性^[4]. 在一项随机对照试验中, 罗格列酮治疗UC患者12 wk后, 27%达到临床缓解, 20%达内镜下缓解, 53%临床症状改善, 提示PPAR γ 配体作为治疗UC的一类新药具有潜在价值.

总之, PPARs不仅是重要的代谢调节因子, 而且在炎症、免疫反应中的重要作用中也受到越来越多的关注. PPAR γ 、PPAR δ 在结肠组织的高表达及其配体在UC中的抗炎效应为临床治疗提供了一条新思路. 尽管对于PPARs已有一定的了解, 但仍有相当的领域有待进一步探索, 比如PPAR γ 在UC患者肠黏膜中的异常表达是由遗传因素决定抑或后天因素造成; PPARs与NF- κ -B等信号转导分子间相互作用有哪些具体环节等. 相信对PPARs及其配体在炎症、免疫反应中作用机制的深入研究, 将有助于理解UC复杂的免疫学发病机理, 给临床治疗带来曙光.

8 参考文献

- Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel JF, Auwerx J, Pettersson S, Desreumaux P. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003;124:1265-1276
- Su CG, Wen XM, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keibaugh SA, Flanagan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR- γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104:383-389
- Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schooljans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of colon inflammation through activators of the Retinoid X Receptor(RXR)/Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ)heterodimer: a basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001;193:827-838
- Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui YZ, Hennighausen L, Gonzalez F, Rohrer J, Benninghoff AU, Hontecillas R. Activation of PPAR γ and δ by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004;127:777-791
- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor- α in human. *Diabetes* 1997;46:1319-1327
- Gelman L, Fruchart LC, Auwerx J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:932-943
- Cipolla G, Crema F, Sacco S, Moro E, De Point F, Frigo G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and inflammatory bowel disease: current perspectives. *Pharmacol Res* 2002;46:1-6
- Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 1999;354:141-148
- Kinoshita M, Suzuki Y, Saito Y. Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPAR γ activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:827-831
- Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85:267-273
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. *Nature* 1996;384:39-43
- Gan XD, Wong B, Wright SD, Cai TQ. Production of matrix metalloproteinase-9 in CaCo-2 cell in response to inflammatory stimuli. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:93-98
- Shu H, Wong B, Zhou G, Li Y, Berger J, Woods JW, Wright SD, Cai TQ. Activation of PPAR α or γ reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:345-349
- Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ. The nuclear receptor PPAR γ and immunoregulation: PPAR γ mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol* 2000;164:1364-1371
- Faveeuw C, Fougerey S, Angeli V, Fontaine J, Chinetti G, Gosset P, Delerive P, Maliszewski C, Capron M, Staels B, Moser M, Trottein F. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. *FEBS Lett* 2000;486:261-266
- Meier CA, Chicheportiche R, Juge-Aubry CE, Dreyer MG, Dayer JM. Regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in THP-1 cells by ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Cytokine* 2002;18:320-328
- Katayama K, Wada K, Nakajima A, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakagawa S, Kadowaki T, Nafai R, Kamisaki Y, Blumaerg RS, Mayumi T. A novel PPAR γ gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 2003;124:1315-1324
- Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NSA, Paola RD, Ialenti A, Genovese T, Chatterjee PK, Rosa MD, Caputi AP, Thiemermann C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ , reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004;483:79-93
- Nakajima A, Wada K, Miki H, Kubota N, Nakajima N, Terauchi Y, Ohnishi S, Saubermann LJ, Kadowaki T, Blumaerg RS, Nagai R, Matsushashi N. Endogenous PPAR γ mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 2001;120:460-469
- Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000;49:497-505
- Auwerx J. Nuclear receptors I. PPAR γ in the gastrointestinal tract: gain or pain? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:581-585
- 邓长生, 夏冰. 炎症性肠病. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 131-145
- Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsushashi N, Nagai R, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:330-339
- Wu GD. Is there a role for PPAR γ in IBD? Yes, no, maybe. *Gastroenterology* 2003;124:1538-1542
- Wachtershauser A, Loitsch SM, Stein J. PPAR- γ is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:380-385
- Cuzzocrea S, Di Paola R, Mazzon E, Genovese T, Muia C, Centorrino T, Caputi AP. Role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferators activated receptors alpha(PPAR- α) in the development of inflammatory bowel disease in mice. *Lab Invest* 2004;84:1643-1654

炎症性肠病炎症过程中 ICAM-1 的表达及作用

马锋振, 马洪升

马锋振, 马洪升, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041
通讯作者: 马锋振, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院消化内科.
locust007@sina.com
电话: 13183878591
收稿日期: 2004-11-12 接受日期: 2004-12-08

摘要

越来越多的研究证明, 无论从分子生物学特征、基因多态性方面还是从病理生理、免疫反应机制方面来说, ICAM-1 高表达是白细胞与内皮细胞黏附力增强的主要分子基础, 他与炎症性肠病的炎症过程相关并在其中起着重要的促进作用, 抗 ICAM-1 抗体能有效地抑制白细胞与上皮细胞的黏附而减轻炎症程度。

马锋振, 马洪升. 炎症性肠病炎症过程中 ICAM-1 的表达及作用. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1014-1016
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1014.asp>

0 引言

细胞黏附分子是指由细胞合成并组装于细胞表面或分泌至细胞外基质间的可促进细胞与细胞或细胞与细胞外基质间黏附的一类糖蛋白, 其中内皮细胞黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 属于免疫球蛋白超家族 (immunoglobulin superfamily, IGSF), 他在炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 发病中的作用近年来受到关注. 本文就此作一综述。

1 ICAM-1 简述

1.1 ICAM-1 的分子生物学特征 细胞黏附分子分布于细胞表面或细胞外基质中, 参与细胞的信号传导与活化、细胞的伸展和移动、细胞的生长及分化、肿瘤转移、创伤愈合等一系列重要生理和病理过程. ICAM-1 是一种糖蛋白, 含有 5 个 Ig 样区, 他广泛分部于各种上皮细胞、血管内皮细胞、网状细胞、成纤维细胞、单核/巨噬细胞和淋巴细胞中. ICAM-1 在各种细胞的表达程度不同. 正常时 ICAM-1 呈现较低的表达, 而在细胞因子如白介素-1 (IL-1)、肿瘤坏死因子 (TNF) 的作用下表达增强。

ICAM-1 是一种具有多种生物功能的跨膜糖蛋白, 能介导细胞黏附、趋化、淋巴细胞归巢等, 参与炎症和免疫反应, 在机体的生理和病理过程中发挥作用. 他通常以配体和受体相结合的方式发挥作用. ICAM-1 可结合淋巴细胞功能相关抗原-1 (lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1)、巨噬细胞分子-1 (macrophage-1, Mac-1)、纤维蛋白原和 CD43. 其中 LFA-1 是主要受体,

Mac-1 与 ICAM-1 的亲合力较低, 且在激活的白细胞表面只有约 10% 的 Mac-1 可介导 ICAM-1 黏附。

1.2 ICAM-1 的基因多态性 人类 ICAM-1 基因是位于 19p13.2-p13.3 上的单拷贝基因, 全长约 15.5 kb, 含 7 个外显子和 6 个内含子. 目前发现的该基因两个多态性位点, 分别位于 241 (G/R) 密码子和 469 (K/E) 密码子. 469 密码子多态性发生在 ICAM-1 基因的第 6 外显子处, 有 KK、KE、EE 三种基因型和 K、E 两个等位基因, 基因产物与结合 LFA-1 有关. 241 密码子多态性有 GG、GR、RR 三种基因型, 位于 ICAM-1 细胞外 Ig 样结构 3 区的第 4 外显子区, 此区 778 位核苷酸的 G-A 置换, 使 241 位氨基酸由甘氨酸变为精氨酸, 即 Gly241Arg. 此位点位于配体结合区, 因此影响 ICAM-1 与配体 Mac-1 相互作用, 并由此影响炎症反应的强度和持续时间^[1-2]. 目前研究已证实 ICAM-1 基因多态性与多种炎症性疾病的易感性相关。

1.3 ICAM-1 基因多态性与 IBD 到目前为止, 很多研究结果表明 ICAM-1 基因的多态性与 IBD 有关. Matsuzawa *et al*^[3] 在对日本的 IBD 患者的研究中发现 K469 等位基因频率及携带率明显增加, K469 携带率在正常对照组为 73.8%, 而在克罗恩病 (CD) 患者达 89% (OR 2.67 95%CI 为 1.24-6.15), 在溃疡性结肠炎 (UC) 患者达 88% (OR 2.45 95%CI 为 1.27-4.86). Low *et al*^[4] 对一组英国高加索地区 IBD 人群研究发现在 CD 患者中仅 3 例有 R241 纯合子, 在 UC 中没有出现 R241, 在对照组 4 人有 R241. G241R 等位基因频率在 CD、UC 和对照组无明显差别. K469 纯合子在 CD 中 [91/137 (39.9%)] 较对照组 [84/202 (29.4%)] OR=1.60 (1.09 to 2.35) 显著升高. E469 在 CD 患者中 [32/196 (14.0%)] 要显著低于对照组 [70/216 (24.5%)] OR = 0.5 (0.31 to 0.82), 但要注意 E469 等位基因频率在 CD 伴有瘘管的患者中是增加的. 对于 UC 来说, G241R 等位基因频率升高更常见于表现为远端肠炎的患者。

2 ICAM-1 在炎症中的作用

白细胞的过度激活是炎症性肠病病理过程中的一个重要环节, 而白细胞停滞并浸润式的血管外渗依赖于炎症部位白细胞和内皮细胞膜表面的黏附分子的表达与功能. ICAM-1 作为免疫调节因子, 通过受配体相互作用, 介导白细胞不同亚群间的接触和黏附, 调节白细胞的功能活性和免疫反应. 中性粒细胞的吞噬作用、T 淋巴细胞的识别抗原及活化、靶细胞的杀伤、T 淋巴细胞对 B 淋巴细胞的激活及诱导分化、抗体形成等过程均与之有关^[5]。

ICAM-1 与中性粒细胞上的 LFA-1 结合可引起其黏附渗出, 而 ICAM-1 功能缺陷可导致中性粒细胞黏附渗出障碍, 有利于减轻炎症反应. ICAM-1 表达增强, 可使流动的白细胞固着, 为接受外来的抗原刺激提供足够的时间和机会, 使抗原提供的信息通过 ICAM-1 及其配体得以传递, 同时亦增加了 ICAM-1 受配体亲和力^[6]. 在 ICAM-1 作用下, 中性粒细胞与内皮细胞牢固黏附, 在他们的界面形成了一个相对稳定的保护性微环境, 使血浆中的抑制物不能进入这个微环境, 而只有黏附于界面的中性粒细胞大量释放的自由基、蛋白溶酶、磷脂酶 A2、白三烯类物质及血小板活化因子等能与内皮细胞反应, 直接损伤内皮或导致内皮功能障碍.

3 ICAM-1 与 IBD

3.1 ICAM-1 在 IBD 炎症中的作用

3.1.1 ICAM-1 与免疫调节异常 IBD 患者肠上皮细胞可表达有功能的细胞因子受体, 如 IL-2 受体 γ 链, 可与 IL-15 反应, 分泌 IL-17, 激活肠黏膜固有层的单核细胞, 产生趋化因子、集落刺激因子 (CSF)、TNF- α 等, 细胞间黏附分子表达增加. IBD 肠道间质组织中成纤维细胞表达大量的表面活化抗原, 可调节白细胞的黏附功能, 结合免疫细胞, 延长 T 细胞的存活寿命. 对 IBD 患者微循环研究发现, 肠腔内皮细胞的损伤可导致凝血系统激活, 增强与白细胞的黏附, 促进炎症反应^[7].

正常肠组织 ICAM-1 通常低水平表达于血管内皮细胞、肠黏膜固有层和淋巴结中的单核巨噬细胞. 在 IBD 肠组织中, ICAM-1 表达和分布明显增加, 且与组织的炎症程度密切相关^[8]. LFA-1⁺ 和 VLA-4⁺ 单核细胞和 Mac-1⁺ 粒细胞在 IBD 肠组织中也大量增加. 促炎性细胞因子激活后毛细血管内皮导致血管定址素上调与白细胞 (淋巴细胞、多形核 [PMN] 细胞) 和单核细胞通过一系列位于内皮与补充细胞之间的反应, 向固有层补充. 已活化的白细胞与单核细胞的输入导致炎性递质的产生. 这些炎性递质促进了炎症反应并造成组织损伤. 已有研究报道了与肠上皮完整性相关的激活过程^[9].

细胞黏附分子 (CAMs) 由免疫细胞、内皮细胞表达, 而内皮细胞释放的黏附分子在肠黏膜局部发挥作用. 循环 CAMs 又包括可溶性细胞间 CAMs (sICAM-1, CD54) 和血管 CAMs (sVCAM-1, CD44) 等^[10]. sICAM-1 与 ICAM-1 相比, 缺少跨膜区和胞质段, 其总体结构与膜型 ICAM-1 的胞外段相似. sICAM-1 保留了 ICAM-1 的生物学特性, 能与 ICAM-1 竞争性结合白细胞表面的 LFA-1 及 Mac-1, 从而抑制了 ICAM-1/LFA-1 依赖性的非 MHC 限制性淋巴细胞的杀伤作用. IBD 患者炎性肠黏膜中 sICAM-1 增多, 且与血液中 sICAM-1 浓度相关^[11]. 但因 CAMs 量在 IBD 与正常对照组, 溃疡性结肠炎和克罗恩病, IBD 活动及缓解期之间均有很大重叠, 且测量方法较复杂, 故 CAMs 作为 IBD 活动性的分子标志物的应用受限^[12].

3.1.2 ICAM-1 与炎症和组织损伤 免疫反应增强、效应细胞活化及细胞因子分泌增加的结果, 最终导致炎症、组织损伤和纤维化, 并且炎症在循环免疫细胞和各种细胞因子的相互作用下进一步发展. IL-1 β 、TNF- α 可增强黏附分子及其配体在内皮细胞和免疫细胞中的表达.

一般认为, 在炎症性肠病发病中有以下过程: 起初, 选择素介导白细胞与内皮细胞间的微弱黏附. 在组织损伤后数分钟内, 内皮细胞 P 和 E-选择素与白细胞相应配体结合, 使血管内快速流动的白细胞运动减慢. 然后, 白细胞与内皮细胞之间稳定黏附. 由于白细胞沿内皮做滚动运动, 可诱导内皮细胞上其他黏附分子的表达, 如 CD31 和 CD44 等. 他们与白细胞相应受体结合, 从而使白细胞与内皮细胞互为配体-受体的其他黏附分子相互结合, 如 LFA-1/ICAM-1、LFA-2/ICAM-2、Mac-1/ICAM-1、VLA-4/VCAM-1 等. 这样导致白细胞与内皮细胞的稳定黏附, 致使特定的细胞亚群定位于此处. 最后, 由免疫球蛋白超家族成员血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) 介导白细胞穿过内皮向炎症部位移行^[8].

当然, IBD 的发病机制为一系列诱导、持续和加重过程的组合引起非特异性炎症反应和免疫调节紊乱, 最终经共同途径而导致组织损伤. 其发病的病理生理机制如下图 1 所示^[7].

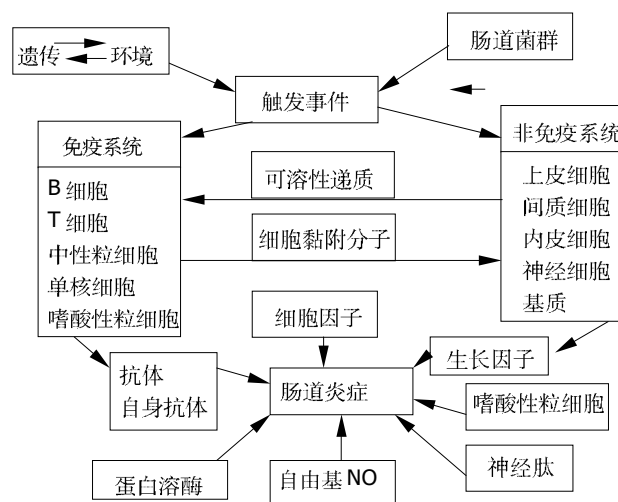


图1 IBD 的病理生理机制.

3.2 ICAM-1 与 UC ICAM-1 在 UC 的黏膜和外周血循环中表达增加, 且与组织炎症程度密切相关. 有学者发现 ICAM-1 单抗对实验性 UC 具有治疗作用^[13]. 研究中发现 UC 模型组大鼠脾脏和结肠组织 ICAM-1 mRNA 表达上升, 与正常组和其他治疗组之间存在一定的差异, 提示其在 UC 的发病机制中可能起重要作用. 经治疗后 ICAM-1 mRNA 表达明显下调, 表明治疗可能通过减少由黏附分子所介导的炎症细胞的浸润, 从而达到改善 UC 局部组织炎症损伤的目的^[14]. 有报道^[15]在 DSS 模型组大鼠的远端结肠中, ICAM-1

表达位于血管内皮细胞和巨噬细胞,毛细血管和小静脉的阳性率比小动脉高,最多见于黏膜和黏膜下层;结肠黏膜糜烂、浅溃疡及其附近阳性率较高,从距肛门口3 cm以上起,阳性率随炎症病变的减轻而逐渐减低;黏膜层隐窝上皮细胞染色阴性,淋巴细胞染色阴性。观察到正常对照组大鼠远端结肠中仅少数血管内皮细胞ICAM-1表达阳性。与对照组比较,DSS模型组大鼠结肠黏膜的ICAM-1表达显著增高。ICAM-1在白细胞的跨内皮迁移和免疫细胞激活方面发挥重要作用,可介导DSS诱导的结肠炎的炎症损伤。Bendjelloul *et al*^[16]报道,在ICAM-1基因缺陷的实验性结肠炎小鼠中,结肠黏膜ICAM-1表达呈阴性或弱阳性,而野生型小鼠的ICAM-1表达阳性率很高。内皮细胞ICAM-1表达下调后,与白细胞的相互作用减弱,从而使炎症活动性减低^[17]。用抗ICAM-1单克隆抗体预防性治疗可减轻DSS诱导的结肠炎模型的症状^[18]。

近年来对基因调控的深入研究证实,肿瘤的发生是由众多基因参与的信号传导过程,其中细胞黏附分子介导的细胞间相互作用对于肿瘤的形成和转移至关重要。恶性肿瘤细胞表达不同的黏附分子,黏附机制的失调在肿瘤的发生和转移中起重要的作用^[19]。UC的恶变可能与此机制有关。黏附分子的主要作用是促进异源细胞间的相互黏附,使得不同细胞间的相互效应得以实现,形成肿瘤浸润和转移^[20]。

另外,UC活动期受累组织细胞中sVCAM-1水平明显增高,缓解期其水平降低,但仍高于正常人^[21]。正常组织中和外周血淋巴细胞中sVCAM-1含量接近,但UC伴重度不典型增生者的组织中sVCAM-1含量明显高于血液含量,提示UC的恶变可能与此有关。

3.3 ICAM-1与CD 朗罕氏细胞向Th1细胞提呈抗原需要黏附分子,向Th2细胞提呈抗原无需黏附分子参与。目前认为克罗恩患者的发生与Th1细胞介导的局部炎症免疫应答反应有关,UC与Th2细胞有关。

4 抗细胞黏附分子单克隆抗体在炎症性肠病临床应用中的研究

抗ICAM-1抗体能有效地抑制白细胞与上皮细胞的黏附,从而减轻炎症程度。Wong *et al*对乙酸诱发的IBD小鼠给予抗ICAM-1抗体。7 d后,小鼠肠上皮组织破坏程度减轻,白细胞浸润减少,远端结肠与全身体重之比下降,髓过氧化物酶活性降低2倍,超氧化物减少将近85%。抗ICAM-1抗体可用于治疗炎症、变态反应、移植排斥等疾病,其抗炎机理主要为阻止抗原呈递和T细胞活化,阻断淋巴细胞和中性粒细胞的内迁。

总之,白细胞和内皮细胞之间的黏附作用所导致的组织损伤是细菌和细胞因子等引发的炎症性肠病的共同通路之一,而ICAM-1高表达是白细胞与内皮细胞黏附力增强的主要分子基础。阻断IBD发病机制中的黏附过程,减缓疾病的发生、发展,已经成为临床预防和治疗的一个有效手段。

5 参考文献

- 1 鲁继荣, 勒英丽, 何晶, 付文永, 周亮. 细胞间黏附分子-1基因Gly241Arg多态性与儿童哮喘关系探讨. 中国实用儿科杂志 2004; 19:687-688
- 2 王银娜, 李荣芬. 细胞间黏附分子-1基因多态性与疾病易感性. 国外医学遗传学分册 2004;27:165-167
- 3 Matsuzawa J, Sugimura K, Matsuda Y, Takazoe M, Ishizuka K, Mochizuki T, Seki S S, Yoneyama O, Bannnai H, Suzuki K, Honma T, Asakura H. Association between K469E allele of intercellular adhesion molecule 1 gene and inflammatory bowel disease in a Japanese population. *Gut* 2003;52:75-78
- 4 Low JH, Williams FA, Yang XS, Cullen S, Colley J, Ling KL, Armuzzi A, Ahmad T, Neville MJ, Dechairo BM, Walton R, Lench NJ, Jewell DP. Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10:173-181
- 5 Gemmell E, Walsh LJ, Savage NW, Seymour GJ. Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *J Periodontal Res* 1994;29:46-53
- 6 闫萍, 乐进秋, 江汉. 细胞黏附分子ICAM-1在慢性牙周炎牙龈组织中白细胞的表达. 广东牙病防治 2003;11:18-19
- 7 王兴鹏. 现代胃肠病学高级进修教程. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2001:61-62
- 8 费保莹, 邓长生, 朱尤庆. 细胞黏附分子与炎症性肠病. 国外医学消化系疾病分册 1999;19:15-17
- 9 Blumbetg RS, Strober W. 炎症性肠病研究的展望. 美国医学会杂志: 中文版 2002;21:72
- 10 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
- 11 Sans M, Panes J, Ardite E, Elizalde JJ, Arce Y, Elena M, Palacin A, Fernandez-Checa JC, Anderson DC, Lobb R, Pique JM. VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 1999;116: 874-883
- 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 Hamamoto N, Maemura K, Hirata I, Murano M, Sasaki S, Katsu K. Inhibition of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by intracolonicly administered antibodies against adhesion molecules. *Clin Exp Immunol* 1999;117:462-468
- 14 施茵, 刘慧荣, 龚烨靓, 李双, 施征. 针药结合对大鼠溃疡性结肠炎TNF- α 、ICAM-1基因表达的影响. 实用中西医结合临床 2003;3:1-3
- 15 牛凤丽, 郑萍, 刘文忠, 施尧. 葡聚糖硫酸钠诱导大鼠结肠炎发病机制的研究. 胃肠病学 2003;8:283-286
- 16 Bendjelloul F, Rossmann P, Maly P, Mandys V, Jirkovska M, Prokesova L, Tlaskalova-Hogenova H. Detection of ICAM-1-deficient and wild-type mice: an immunohistochemical study. *Histochem J* 2000;32:703-709
- 17 Bendjelloul F, Maly P, Mandys V, Jirkovska M, Prokesova L, Tuckova L, Tlaskalova-Hogenova H. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) deficiency protects mice against severe forms of experimentally induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2000;119:57-63
- 18 Taniguchi T, Tsukada H, Nakamura H, Kodama M, Fukuda K, Saito T, Miyasaka M, Seino Y. Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:945-949
- 19 徐斌, 居小萍, 胡先贵, 周颖奇, 夏放. 细胞黏附分子与胃癌发生及转移关系的实验研究. 中华胃肠外科杂志 2001;4:251-253
- 20 Duenne AA, Werner JA. Functional anatomy of lymphatic vessels under the aspect of tumor invasion. *Recent Results Cancer Res* 2000;157:82-89
- 21 Hogaboam CM, Snider DP, Collins SM. Activation of T lymphocytes by syngeneic murine intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1996;110:1456-1466

白介素 13 在溃疡性结肠炎中的作用

李国栋, 欧阳钦

李国栋, 欧阳钦, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041
通讯作者: 欧阳钦, 610041, 四川省成都市外南国学巷 37 号, 四川大学华西
医院消化内科. qin_ouyang@tom.com
电话: 028-85442385
收稿日期: 2005-01-11 接受日期: 2005-03-16

摘要

IL-13 是一种重要的抗炎性细胞因子, 与 IL-4 和 IL-10 具有类似的特征. 在溃疡性结肠炎(UC)中通过多种途径产生抗炎作用, 限制炎症的发生和发展. 但 IL-13 在 UC 中还有另外的作用, 这种作用与 NK T 细胞有关, 引起与 UC 类似的结肠炎症.

李国栋, 欧阳钦. 白介素 13 在溃疡性结肠炎中的作用. 世界华人消化杂志
2005;13(8):1017-1020
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1017.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(UC)是炎症性肠病(IBD)的一个重要类型, 是一种慢性复发性炎症. 其发病机制复杂, 近几年研究取得巨大进步. 现在我们知道 UC 涉及环境、遗传、微生物、免疫等多个因素^[1], 其中免疫因素一直都是人们关注的焦点. 研究发现免疫反应表现为 T 细胞的异常激活, 促炎因子和抗炎因子的失衡, 其中促炎因子和抗炎因子之间的失衡被视为 IBD 特别是 UC 的一个重要的发病机制^[2], 促炎因子主要包括 IL-1、TNF、IFN- γ 、IL-12 等, IL-13 与 IL-4 及 IL-10 等被成为抗炎因子.

人们根据 CD4⁺T 细胞分泌细胞因子和介导免疫功能的不同, 将其分为 Th1 和 Th2 两型^[3], Th1 细胞以分泌 IFN- γ 和 IL-12 等为主, Th2 细胞以分泌 IL-4、IL-10 及 IL-13 等为主. Th1/Th2 细胞亚群的失衡一直被认为是 IBD 的发病机制之一^[4-5], 对克罗恩病(CD)而言, 考虑主要是 Th1 型疾病. 对于 UC, 研究者的意见不一: 有人认为 UC 与 Th2 细胞关系密切, 但最近也有研究认为是 Th1 和 Th2 细胞共同作用的结果. 因此不论如何, UC 与 Th2 细胞是有关系的, 其中的一个桥梁就是 IL-13.

目前 IL-13 与 UC 的关系日益受到重视. 人们最初对 IL-13 的认识是从其对 B 细胞和单核细胞的作用, 调节 MHC-II 类分子的表达、促进 Ig-E 的类别转换以及抗炎细胞因子的表达^[6], 认为 IL-13 和 IL-4 具有类似的作用, 抑制炎症的发生和发展, 对 UC 有利. 近年来的研究显示 IL-13 具有区别于 IL-4 的独特的生物学作用^[4], 并且有研究证实 IL-13 对肠上皮细胞具有毒性作用, 可以导致结肠炎的发生, 类似 oxazolone 结肠炎的改变^[7-8]. 这一反

一正的作用引起了人们极大的兴趣, 本文从两个方面综述 IL-13 与 UC 的关系.

1 IL-13 的抑制炎症或免疫调节作用

1.1 IL-13 的发现及生物学特性 IL-13 最初被称为 P600 蛋白, 在 1993 年 KEYSTONE 细胞因子会议上被正式命名为 IL-13^[9]. 人 IL-13(hIL-13)的基因定位于 5q23-31, hIL-13 基因位于其他细胞因子(如 IL-13、GM-CSF、IL-5 和 IL-4 等, 被称之为 IL-4 家族^[10])附近, 提示他们来自同一基因进化^[11]. IL-13 受体(IL-13R)属于细胞因子受体超家族中的 IL-2R 亚家族, 研究发现 IL-13 受体为异二聚体 IL-13 受体, α 链为 IL-13R 和 IL-4R 的共用链, 说明 IL-13 与 IL-4 有共同的信号传导通路^[12].

IL-13 必须与受体结合才可以发挥作用. IL-13 与其结合受体寡聚化, 通过 STAT6^[10] 信号传导通路发挥生物学功能: 使与其结合的 JAK 发生磷酸化, STAT6 作为 JAK 的底物因 JAK 的磷酸化而活化, 活化的两个 STAT 形成同源或异源的二聚体进入核内, 作用于靶基因的特异性反应元件, 调节基因表达, 从而影响单核细胞和 B 细胞的功能, 这是一系列的级联反应^[13].

1.2 IL-13 对单核细胞的作用 IL-13 可以使单核-巨噬细胞的形态发生改变, 促进单核-巨噬细胞融合形成含外源性吞噬体的多核巨细胞(FBGC)^[14]. IL-13 可增强人单核细胞表面 CD23(Ig-E 的低亲和力受体 Fc γ)、主要组织相容性复合体(MHC) II 类分子(HLA-DP、HLA-DQ、HLA-DR)、巨噬细胞甘露糖受体(MMR)的表达^[15-16]. 有人利用 Northern 印迹杂交法及细胞特异性酶联免疫吸附试验(ELISA)^[14]等方法已经证实 IL-13 可影响单核-巨噬细胞分泌细胞因子, 抑制脂多糖(LPS)激活的单核细胞释放促炎细胞因子、趋化因子和造血生长因子的作用, 这种活性与 IL-4 及 IL-10 极为相似^[6]. 这些促炎细胞因子包括 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)以及巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α). 许多资料已经证明这些细胞因子在 UC 的发生与发展过程中发挥着重要的不可替代的作用^[17-18]. IL-13 还增强 LPS 激活的单核细胞产生 IL-1 受体拮抗剂(IL-1receptor antagonist, IL-1RA), 诱导人外周血多形核细胞(PMNC) IL-1RA 的基因表达和蛋白质合成, 其作用机制可能与 IL-13 显著增强 IL-1RA 基因转录的稳定性有关. IL-1RA 是 IL-1 α 和 IL-1 β 与 I 型和 II 型 IL-1R 结合的竞争性抑制剂^[10]. IL-1RA 通过抑制 IL-1 的活性在急、慢性炎症反应中发挥抗炎作用, IL-

1RA 在 UC 中是一种抗炎性递质, 可以拮抗 IL-1 的促炎症作用, 在动物试验中也可以减轻免疫性肠道反应. Mansfield *et al* 还发现 IL-1RA 等位基因 2 与 UC 相关, 但后来未被证实. 上述资料表明 IL-13 可直接或间接地在 UC 中发挥抗炎作用, 与 IL-4、IL-10 的作用相似.

IL-13 从转录水平对粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 产生抑制作用. G-CSF 能调节中性粒细胞的存活、增生和分化, 并且增强成熟中性粒细胞功能, 不仅在抗感染的非特异性细胞免疫中起重要作用, 而且与整个机体的免疫功能密切相关. UC 病情与 G-CSF 的血清水平相关, 随病情的加重血清中 G-CSF 的水平有增高趋势, 重度明显高于轻、中度, 中度又明显高于轻度. 所以把 G-CSF 作为反映 UC 病情的一个指标, 有助于病情判断和疗效观察. IL-12 是重要的炎症性细胞因子, 由 35 ku 和 40 ku 的多肽组成. IL-12 单独或与 IL-2 协同发挥作用, 调节 T 细胞由 Th0 细胞向 Th1 细胞的转化, 激活 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ 等细胞因子, 提高其细胞毒作用. IL-12 与 IL-15 及 IL-7 协同作用于结肠黏膜, 放大 IFN- γ 的黏膜损害作用. 动物试验表明阻断 IL-12 可以有效的减少肠道炎症. IL-13 能够抑制由 LPS 激活的单核细胞 IL-12P35 和 IL-12P40 mRNA 的表达, 这和 IL-4 及 IL-10 的作用相同. IL-13 通过抑制 IL-12 的合成影响 Th1 细胞和 Th2 细胞的交叉调节功能, 即分泌的多种细胞因子对不同类型细胞的促进和抑制的作用, 如 IFN- γ 和 IL-12 直接调节 Th1 细胞的分化, 而对 Th2 细胞的分化则有抑制作用.

1.3 IL-13 对细胞内细菌的天然免疫作用 大多数 IBD 的病因学说都包括微生物因素, 理论之一是: IBD 是特定病原菌感染所致. 随着检测微生物 DNA 的分子技术的广泛应用, 人们又希望找到特定的病原^[1]. 单核细胞增多性李斯特菌就是其中之一, 这种细菌属于细胞内菌, 抵抗细胞内菌感染需要很强的细胞免疫, IL-13 在此时发挥重要的作用^[6]. MMR 在天然免疫过程中具有重要作用, 可以识别和吞噬细胞表面具有甘露糖或者岩藻糖及 N-乙酰氨基葡萄糖的微生物^[16]. 有报道称前列腺素 E₂ 和 Th2 型细胞因子 (主要是 IL-13 和 IL-4) 可以上调 MMR 的表达. Coste *et al*^[16] 证明 IL-13 和 IL-4 是通过核因子 PPAR γ 途径促进 MMR 的表达上调的, 这一过程依赖胞质磷脂酶 A2 (cPLA2), 从而发挥抗单核细胞增多性李斯特菌的作用, 无疑有利于 UC 患者.

1.4 IL-13 对一氧化氮 (NO) 的作用 虽然 NO 在 CD 中的作用尚未清楚, 但是有证据显示 NO 作为一种促炎细胞因子参与了 UC 的发病过程. UC 患者的肠黏膜的 iNOS 的表达及活性增加; 血清氮增多和肠腔中的 NO 生成增多都证明上述观点^[19]. 动物试验中, 在炎症进展期 NO 的生成也是增加的^[20]. 最近国内外有人证实 IL-13 可通过抑制 NO 的生成来抑制炎症的发生和发展, 他可以阻断炎症性细胞因子或 LPS 刺激的 NO 的产生, 以及抑制 iNOS 的活性和 mRNA 的表达. Kolios *et al*^[21] 用 IL-1 α /IFN- γ /TNF- α 与 HT-

29 细胞共育, 生成大量的 NO, 且 iNOS 的活性升高, 加入 IL-13 和 / 或 IL-4 后, NO 明显减少并且 iNOS 的活性下降、mRNA 的表达减少. 国内周宇 *et al*^[22] 发现 UC 患者的血浆 IL-13 和血清 NO 浓度呈负相关. 上述说明 IL-13 抑制 NO 产生, 进而在 UC 中发挥抗炎的作用.

1.5 IL-13 对 PPAR γ 的作用 过氧化物酶体增生物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ) 属于核受体超家族成员, 被其配体激活后, 与所调节基因上游的过氧化物酶体增生体 DNA 反应元件 (PPRE) 结合调控基因的表达, 参与脂肪细胞分化、糖脂代谢、动脉粥样硬化的形成及炎症反应^[23-24]. 近几年的研究发现 PPAR γ 在 UC 黏膜局部炎症的发生发展中有重要的调节作用, 他通过抑制 NF- κ B 活化, 减少促炎症性细胞因子的转录及表达, 从而下调过度的免疫反应, 避免组织损伤. 国内张燕 *et al*^[25] 发现 UC 患者的受累黏膜及病变旁黏膜 PPAR γ 低于正常对照组, UC 的症状与 PPAR γ 的表达呈负相关. 国外有报道证明 PPAR γ 在肠道细胞分化和维持胃肠道稳态方面具有重要作用, 并且证明其参与了调节细胞生长周期、诱导细胞尤其是巨噬细胞的凋亡及抑制树突状细胞的活性. 有证据证明 IL-13 可以激活磷脂酶 A2 (cPLA2), 而后者可以通过脂氧合酶或者环氧合酶的途径合成 PPAR γ 的内源性配体^[16], 主要是 15d-PGJ2. 配体产生后可以与 PPAR γ 结合, PPAR γ 活化参与各种生理和病理过程, 其中包括炎症反应中抑制 NF- κ B 的活化, 产生抑制炎症的作用.

1.6 IL-13 对 NF- κ B 和凋亡的作用 有试验^[26] 证明 IL-13 可以抑制 TNF、LPS、IL-1、神经酰胺和 H₂O₂ 等诱导的 NF- κ B 活化以及细胞凋亡.

NF- κ B 与 UC 作用密切^[27-29] 已经得到公认, 众多资料显示, UC 患者肠黏膜组织活检中 NF- κ B P65 亚单位表达明显上调^[30-31]. NF- κ B 可以促进多种炎症性细胞因子如 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- α 等的基因转录^[32-33]. 在 UC 复杂的细胞因子网络失调中, NF- κ B 可能是一中心环节. 有试验证明 UC 中 NF- κ B 活性增高的同时伴有各种炎症性细胞因子的水平上升^[34], NF- κ B 通过这种作用使炎症得到放大和持续, NF- κ B 正逐渐成为 UC 生物治疗药物和措施的靶标. IL-13 则可以抑制几乎所有刺激物对 NF- κ B 的活化作用在 UC 中发挥作用.

UC 结肠镜下主要表现为结肠黏膜广泛充血水肿, 表浅的糜烂和溃疡, 许多研究^[34-35] 表明这种糜烂和溃疡的改变与上皮细胞的过度凋亡有关. IL-13 对凋亡的抑制作用可以阻止 UC 过程中炎症的发展.

1.7 IL-13 抑制炎症作用 以上从几个不同的方面综述了 IL-13 的免疫调节或者抑制炎症的作用, 可以看出 IL-13 在免疫反应尤其是 Th2 型细胞因子介导的免疫反应中起中心调节作用^[6]. 有大量证据证明 UC 也是一种 Th2 型细胞因子介导的免疫反应^[8], 不论从动物试验还是临床都有很多证据, 所以认为 IL-13 和 IL-4 及 IL-10 一样作为一种抗炎

性细胞因子对 UC 有保护作用, 就这一点来说也有证据证明. 但是在另外一些动物试验中 IL-13 却有致炎作用^[7-8].

2 IL-13 致炎作用的证据

Heller *et al*^[7]利用 oxazolone 结肠炎动物模型证明在炎症初期产生大量 IL-4 和 IL-5, 但很快就被 IL-13 代替, 并且炎症过程也可被 IL-13 的抑制剂所终止, 例如 IL-13R α 2-Fc. 进一步研究发现是 NK T 细胞而不是 CD4⁺T 细胞介导产生 oxazolone 结肠炎, 更重要的正是这种 NK T 细胞分泌大量的 IL-13^[8, 36]. 由于 oxazolone 结肠炎和 UC 无论在病理过程还是镜下组织学表现都十分的相似, 所以推测在人类 UC 也可能存在同样的病理发展过程, Ivan *et al*^[7]做了深入的研究, 发现 UC 患者比对照组分泌了更多的 IL-13, 差别具有统计学意义. 并且证明 IL-13 来源于黏膜固有层的淋巴细胞, 更精确的说就是非经典的 NK T 细胞, 而不是人们认为的 CD4⁺T 细胞. 更有意义的是发现这种细胞对上皮具有细胞毒性作用. 可以使肠上皮细胞溶解脱落, 而 IL-13 则可以大大增强这种毒性作用: 据此他们推测 UC 的发病最初是肠腔脂类抗原激活黏膜固有层的 NK T 细胞, 而后的毒性作用使肠上皮细胞受损. 上皮细胞溶解脱落造成肠上皮屏障的破坏, IL-13 通过增强 NK T 细胞的毒性作用参与了炎症的发生和发展^[8], IL-13 在这个过程中具体作用机制还不是很清楚, 是单纯作用还是联合作用? 多数人倾向后者, 即 IL-13 在 NK T 细胞的毒性的基础上发挥作用. 上皮屏障的缺陷则是打开进而放大炎症瀑布的关键一步, 这一点作为引起 UC 的一种重要机制或者前提条件已经被很多学者接受. 这些让人们想起了在上世纪 60 到 80 年代的一些学者的观点: 认为 UC 与一些对肠上皮细胞有毒性作用的细胞有关系. 但是当时由于条件的限制, 人们没有找到更多的证据来证明这一点.

越来越多的证据表明 UC 的免疫学发病机制中细胞免疫占有重要的地位. 体外试验 T 细胞活化可以引起人类肠道类似的症状和表现. 在 UC 患者黏膜固有层内发现大量的 T 细胞, 其中主要是 CD4⁺T 细胞. 而代表体液免疫的 B 细胞在 UC 活动期、非活动期、对照组的黏膜固有层中的数量没有大的差异, 可能是因为在 B 细胞在增生、分化、产生浆细胞过程中失去了表面标志. Rodrigue *et al* 的试验证明 B 细胞与 UC 相关, 可能是抗原抗体引起的免疫反应使肠黏膜或者其他部位产生损害. 国内外报道抗中性粒细胞抗体 (ANCA) 在 UC 的检出率较高, 认为其可以作为 UC 的一种血清学标志. 抗内皮细胞抗体 (AECA) 是血管壁免疫性和/或炎症性损伤的标志, 国外学者^[37]证明在 UC 中可以检出 AECA, 认为 AECA 可以和 ANCA 一样作为 UC 的一种血清学标志. 虽然仍存在争论, 但是说明了 B 细胞在 UC 中存在作用. IL-13 促进经过 CD40 或抗 CD40 激活的人扁桃体 B 细胞的 DNA 的合成, 引起细胞增生. 诱导 B 细胞表达 CD23, 并且上调 MHC-I 类抗原、SIgM 和 CD72 等

的表达, 诱导 B 细胞合成分泌 IgM、IgG4、IgE, 最终 IL-13 促进人 B 细胞增生分化和分泌免疫球蛋白^[10].

虽然 IL-13 在 UC 中的致炎作用的证据还不是很充分, 并且具体的作用机制还不是很明确, 如 IL-13 对 NK T 细胞的细胞毒作用的促进作用的真正机制. 但是 IL-13 在 UC 中的作用不能用抑制炎症一方面来代表.

3 展望

越来越多的证据提示 IL-13 与 UC 关系密切, 他在 UC 的发病机制中究竟是抑炎作用还是致炎作用引起了人们很大兴趣, 并且 IL-13 具体的作用机制尚不十分清楚, 如 IL-13 活化的信号传导过程, IL-13 在免疫网络中的中心调节作用也有待进一步阐明. 有理由相信, 随着对 IL-13 作用机制的深入探讨, 可以为阐明 UC 的发病机制及 UC 的临床治疗带来新的希望.

4 参考文献

- Farrell RJ, LaMont JT. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:41-62
- Podolsky DK. Inflammation bowel disease. *N Engl Med* 2002;347:417-429
- Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002;8:567-573
- Van Damme N, De Keyser F, Demetter P, Baeten D, Mielants H, Verbruggen G, Cuvelier C, Veys EM, De Vos M. The proportion of Th1 cells, which prevail in gut mucosa, is decreased in inflammatory bowel syndrome. *Clin Exp Immunol* 2001;125:383-390
- MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000;51:2-9
- Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003;21:421-456
- Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002;17:629-638
- Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK-T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004;113:1490-1497
- 戴胜兰, 白文元. 白介素 13 的生物学特性与肝纤维化. 国外医学内科学分册 2003;30:427-430
- Boulay JL, Paul WE. The interleukin-4-related lymphokines and their binding to hematopoietin receptors. *J Biol Chem* 1992;267:20525-20528
- McKenzie AN, Li X, Largaespada DA, Sato A, Kaneda A, Zurawski SM, Doyle EL, Milatovich A, Francke U, Copeland NG. Structure comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. *J Immunol* 1993;150:5436-5444
- Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:677-690
- Kawakami K, Taguchi J, Murata T, Puri RK. The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood* 2001;97:2673-2679
- Gauchat JF, Schlagenhauf E, Feng NP, Moser R, Yamage M, Jeannin P, Alouani S, Elson G, Notarangelo LD, Wells T, Eugster HP, Bonnefoy JY. A novel 4-kb interleukin-13 recep-

- tor alpha mRNA expressed in human B, T and endothelial cells encoding an alternate type-II interleukin-4/interleukin-13 receptor. *Eur J Immune* 1997;27:971-980
- 15 Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE. Interleukin-13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3730-3736
- 16 Coste A, Dubourdeau M, Linas MD, Cassaing S, Lepert JC, Balard P, Chalmeton S, Bernad J, Orfila C, Seguela JP, Pipy B. PPAR γ promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity* 2003;19:329-339
- 17 Ashwood P, Harvey R, Verjee T, Wolstencroft R, Thompson RP, Powell JJ. Functional interactions between mucosal IL-1, IL-ra and TGF-beta in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2004;53: 53-59
- 18 Kurtovic J, Segal I. Recent advances in biological therapy for inflammation bowel disease. *Trop Gastroenterol* 2004;25:9-14
- 19 Linehan JD, Kolios G, Valatas V, Robertson DA, Westwick J. Effect of corticosteroids on nitric oxide production in inflammatory bowel disease: are leukocytes the site of action? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G261-267
- 20 Menchen L, Colon AL, Madrigal JL, Beltran L, Botella S, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Menchen P, Cos E, Lorenzo P. Activity of inducible and neuronal nitric oxide synthases in colonic mucosa predicts progression of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1756-1764
- 21 Kolios G, Rooney N, Murphy CT, Robertson DA, Westwick J. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut* 1998;43:56-63
- 22 周宇, 叶文桃, 麦海妍, 郭汉城, 王翠霞. 白介素 13 和一氧化氮在溃疡性结肠炎的作用及意义. *胃肠病学和肝病杂志* 2004;13: 319-321
- 23 Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 2004;5:104-112
- 24 Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui Y, Hennighausen L, Gonzalez F, Rohrer J, Benninghoff AU, Hontecillas R. Activation of PPAR-gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammation bowel disease. *Gastroenterology* 2004;127:777-791
- 25 张燕, 欧阳钦, 陈岱云. PPAR- γ 在溃疡性结肠炎黏膜中的表达. *中华消化内镜杂志* 2002;19:81-83
- 26 Manna SK, Aggarwal BB. IL-13 suppresses TNF-induced activation of nuclear factor-kappa B, activation protein-1, and apoptosis. *J Immunol* 1998;161:2863-2872
- 27 Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-536
- 28 Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, Silverberg MS, Duerr RH, Cho JH, Gregersen PK, Wu Y, Achkar JP, Dassopoulos T, Mezey E, Bayless TM, Novet FJ, Brant SR. Functional annotation of a novel NF- κ B1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 2004;13:35-45
- 29 Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J* 2004;18:1550-1552
- 30 Tang HF, Chen XX, Ye HY, Ou BY. Expression of tumor necrosis factor-alpha and nuclear factor-kappa B in childhood ulcerative colitis. *Zhonghua Erke Zazhi* 2003;41:743-746
- 31 Wang QY, Chen CL, Wang JD, Lai ZS, Ma Q, Zhang YL. Expression of pro-inflammation cytokines and activation of nuclear factor kappaB in the intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis. *Diyi Junyi Daxue Xuebao* 2003;23:1202-1205
- 32 Gan H, Ouyang Q, Jia D, Xia Q. Activation of nuclear factor-kappaB and its relationship with cytokine gene expression in colonic mucosa of ulcerative colitis patients. *Chung-Hua Nei Ke Tsa Chih Chine J Internal Med* 2002;41:252-255
- 33 Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107:7-11
- 34 Mikami T, Yoshida T, Akino F, Motoori T, Yajima M, Okayasu I. Apoptosis regulation differs between ulcerative colitis-associated and sporadic colonic tumors. Association with survivin and bcl-2. *Am J Clin Pathol* 2003;119:723-730
- 35 Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53:1556-1558
- 36 Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammation bowel disease. *Nature Reviews* 2003;3:521-533
- 37 Aldebert D, Notteghem B, Reumaux D, Lassalle P, Lion G, Desreumaux P, Duthilleul P, Colombel JF. Anti-endothelial cell antibodies in sera from patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin Biol* 1995;19:867-870

干扰素- α 对人肝癌细胞增殖及侵袭的抑制作用

乔世峰, 王季堃

乔世峰, 北京世纪坛医院普外科 北京市 100038

王季堃, 锦州医学院附属第一医院肿瘤诊治中心 辽宁省锦州市 121000

通讯作者: 乔世峰, 100038, 北京市海淀区羊坊店 10 号, 北京世纪坛医院.
qiaoshf@tom.com

电话: 010-80647613

收稿日期: 2005-01-29 接受日期: 2005-04-01

摘要

目的: 研究人干扰素- α 对人肝癌细胞系 BEL-7402 细胞增殖及侵袭的抑制作用。

方法: 常规培养的 BEL-7402 细胞加入人干扰素- α (1×10^6 U/L) 共同孵育 24 h 后, 以 MTT 法检测干扰素- α 对肿瘤细胞增殖的影响; Boyden 小室法检测肝癌细胞侵袭能力的变化; 明胶酶谱法检测肝癌细胞基质金属蛋白酶的变化; 免疫组化法检测肿瘤细胞增殖核抗原的表达; TUNEL 法检测肿瘤细胞的凋亡。

结果: 人干扰素- α 可以明显抑制体外 BEL-7402 细胞的增殖(抑制率为 20.2%); 干扰素- α 作用后在 Boyden 小室穿膜的肿瘤细胞数明显减少(抑制率为 23.9%); 肝癌细胞基质金属蛋白酶的分泌没有明显变化; 干扰素- α 组肿瘤细胞增殖核抗原的表达明显下降, 凋亡细胞数明显增加。

结论: 低剂量的干扰素- α 可以直接抑制肝癌细胞株 BEL-7402 的增殖, 对 BEL-7402 细胞的侵袭有明显的抑制作用; 可以抑制肿瘤细胞增殖核抗原的表达并诱导细胞凋亡。

乔世峰, 王季堃. 干扰素- α 对人肝癌细胞增殖及侵袭的抑制作用. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1021-1023

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1021.asp>

0 引言

干扰素(interferon, IFN)是一类具有抗病毒、抗增殖及免疫调节作用的细胞因子。根据 IFN 产生的来源、理化性质及结构的不同分为 I、II 型干扰素。I 型干扰素包括干扰素- α 、 α 和 ω , 他们共用相同的细胞表面受体, I 型干扰素之间分子的同源性很高, 但抗原性完全不同。自干扰素被发现以来, 大量的临床研究表明, 干扰素对抗病毒性疾病和恶性肿瘤以及增强机体免疫调节能力有明显效果, 作为一种肿瘤的治疗佐剂国内外已有相关报道^[1-2]。肝细胞癌是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 而干扰素- α 对实验性大鼠肝癌及临床在肝细胞癌根治性切除术后的转移复发有抑制作用^[3-4], 但干扰素抗肿瘤的机制还不十分清楚。我们利用人肝癌细胞株 BEL-7402 研究干扰素- α 对肝癌细胞的增殖及侵袭的影响, 并初步探讨了其

抗肿瘤的机制, 为干扰素- α 对于肝癌的临床治疗应用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株 BEL-7402 购自北京大学肿瘤研究所; 干扰素- $\alpha 2\beta$ 购自北京远策药业有限责任公司; Boyden 小室及人工基膜(Matrigel) 由北京大学医学部细胞学系提供; 细胞增殖核抗原(PCNA) 免疫组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司; TUNEL 凋亡检测试剂盒(美国 Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 BEL-7402 细胞经消化后计数, 以 1.5×10^5 /L 接种 96 孔板, 每孔 200 μ L, 50 mL/L 小牛血清的 RPMI-1640 培养基, 实验组加入 IFN- α 10^6 U/L, 对照组加入相同体积的 PBS, 50 mL/L CO_2 、37℃ 孵箱中培养 24 h。

1.2.2 MTT 法检测 BEL-7402 细胞的增殖 培养细胞加入 MTT (5 g/L) 50 μ L/孔, 继续孵育 4 h, 加入 DMSO 100 μ L/孔, 轻摇 10 min 后检测波长 490 nm 的吸光度, 每组设 3 复孔。细胞增殖的抑制率按照以下公式计算: $(1 - IFN - \alpha$ 培养孔细胞上清的 A_{490} / 对照组培养孔细胞上清的 A_{490}) $\times 100\%$

1.2.3 Boyden 小室检测细胞侵袭实验 参照 Albin *et al*^[5] 的体外侵袭实验方法。每张膜随机选取 5 个高倍视野, 计数穿过聚碳酸酯膜的细胞数, 每组细胞设 3 个复孔。穿膜的肿瘤细胞数目多少作为评价肿瘤细胞迁徙、浸润能力强弱的指标。

1.2.4 明胶酶谱分析(zymography) 正常传代培养的细胞, 以无血清培养液培养 24 h 后细胞计数并收集培养液, 离心取上清, PBS 透析按细胞数调整体积后进行 SDS-PAGE 电泳, 其中分离胶含 0.1% 明胶, 将蛋白样品与 $2 \times$ zymography 上样缓冲液(0.16 mol/L Tris-HCl (pH 6.8), 20 mL/L SDS, 80 mL/L 甘油, 0.3 g/L 溴酚蓝)等量混合后上样, 10 mA 恒流电泳。电泳结束后, 将胶置于 2.5% Triton X-100 液中室温摇动 1 h, 将胶取出浸于酶孵育液(50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L $CaCl_2$) 中, 37℃ 摇 18 h。再将胶置于考马斯亮蓝染色液中摇动染色 3 h; 脱色液 I (300 mL/L 甲醇, 100 mL/L 冰乙酸) 脱色至蓝色背景下的透明条带显出。将胶浸泡于脱色液 II (40 g/L 甲醇, 50 mL/L 冰乙酸) 中, 拍照记录。

1.2.5 免疫细胞化学法检测BEL-7402细胞PCNA的表达参照文献[6]进行。

1.2.6 TUNEL法检测肿瘤组织细胞的凋亡 具体实验步骤按说明书进行。光镜下($\times 400$)观察结果。所见细胞核有棕黄色颗粒者为阳性细胞,每个样品至少计数100个细胞中的阳性细胞数,重复计数3次,取平均值。

统计学处理 所有数值均以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,组间差异比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为具有显著性差异, $P < 0.01$ 为具有极显著性差异。

2 结果

2.1 细胞增殖 IFN- α 组与 PBS 组比较 BEL-7402 细胞的生长明显受到抑制 ($P < 0.01$), 细胞生长的抑制率为 20.2% (图 1)。

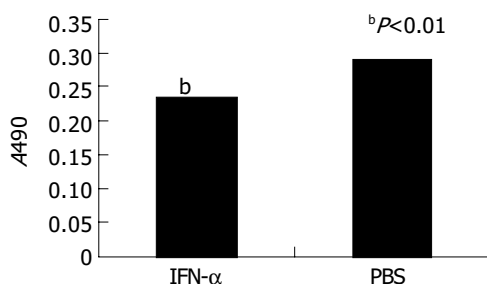


图1 MTT法检测IFN- α 对BEL-7402细胞增殖的影响。

2.2 Boyden 小室检测的细胞体外侵袭的结果表明,作用 24 h 后 IFN- α 组 BEL-7402 细胞穿过 Matrigel 发生侵袭的细胞数分别为每高倍视野 101.2 ± 5.8 个, PBS 组为 131.8 ± 9.5 个, 抑制率为 23.9%, 二者比较有显著性差异 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.3 IFN- α 对 BEL-7402 细胞 MMPs 分泌的影响 经 IFN- α 作用后, BEL-7402 细胞分泌的 MMPs 种类和数量都没有变化。

2.4 BEL-7402 细胞 PCNA 的表达 人肝癌细胞系 BEL-7402 细胞与 PCNA 单抗染色后, 阳性细胞染色为棕色, 染色部位在细胞核; 同一反应条件下 IFN- α 组 PCNA 染色与对照组比较显色明显减弱。

2.5 肿瘤组织细胞的凋亡 细胞核呈棕褐色着色者即为凋亡细

胞, IFN- α 组每 100 个细胞中阳性细胞数为 19.53 ± 3.18 个, 对照组阳性细胞数为 11.36 ± 0.55 , IFN- α 组与对照组比较凋亡细胞明显增多 ($P < 0.01$)。

3 讨论

IFN- α 是一种糖蛋白, 属于 I 型干扰素, 具有抗病毒、抗肿瘤及免疫调节等多种生物学功能, 许多体内和体外试验都充分证明, IFN 不仅可以抑制肿瘤病毒诱发的肿瘤的生长, 而且可以抑制移植性肿瘤和由化学致癌物诱发的肿瘤的生长, 已经被广泛应用在多种领域及多种疾病的治疗中^[7]。但 IFN 的抗肿瘤机制尚不十分清楚。

肝细胞肝癌是我国常见恶性肿瘤之一, 死亡率较高。手术切除仍是首选的治疗方案, 但常有复发的危险。有报道在肝细胞癌切除术后应用 IFN- α 治疗可以降低肝细胞癌的复发^[4], 我们利用肝癌细胞系 BEL-7402 进行实验, 以不同剂量 (10^5 – 10^7 U/L) 的 IFN- $\alpha 2\beta$ 进行增殖的抑制作用筛选, 发现低剂量 IFN- $\alpha 2\beta$ (5×10^5 U/mL) 既有抗肝癌细胞增殖的效果, IFN- α 对 BEL-7402 细胞的增殖有明显的抑制作用, 也证明了 IFN- α 对肿瘤细胞可能有直接的抑制作用。

转移是引起癌症死亡的主要原因, 在研究 IFN 对肿瘤细胞转移作用的细胞侵袭实验中我们利用了 Boyden chambers 的实验模型, 结果发现 IFN- α 作用后 BEL-7402 细胞的侵袭能力明显受到抑制, 穿膜细胞数明显减少, 说明 IFN- α 可以抑制细胞对 Matrigel 胶的侵袭。在转移的过程中, 肿瘤细胞的侵袭依赖于细胞的迁移和细胞外基质蛋白的水解。基质金属蛋白酶 (MMPs) 是一种存在于人类许多组织并发挥重要功能的金属蛋白酶, 是降解细胞外基质的主要酶类, 为 Zn^{2+} 依赖性内切酶, 参与了肿瘤转移过程中的多个步骤^[8]。通过明胶酶谱法检测 MMPs 的分泌发现, IFN- α 作用的 BEL-7402 细胞培养上清中分泌 MMPs 的质和量都没有发生变化, 分析 IFN- α 在体外不能阻止 BEL-7402 细胞 MMPs 的分泌, IFN- α 对细胞侵袭的抑制作用可能是通过其他渠道实现的。

增殖细胞核抗原 (PCNA) 是一种无种属和组织特异性的、广泛存在于增殖活跃细胞中的细胞周期蛋白^[9]。作为 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白, PCNA 直接参与 DNA 合成。在细胞周期 G1 晚期开始增加, S 期达高峰, G2 期明显下

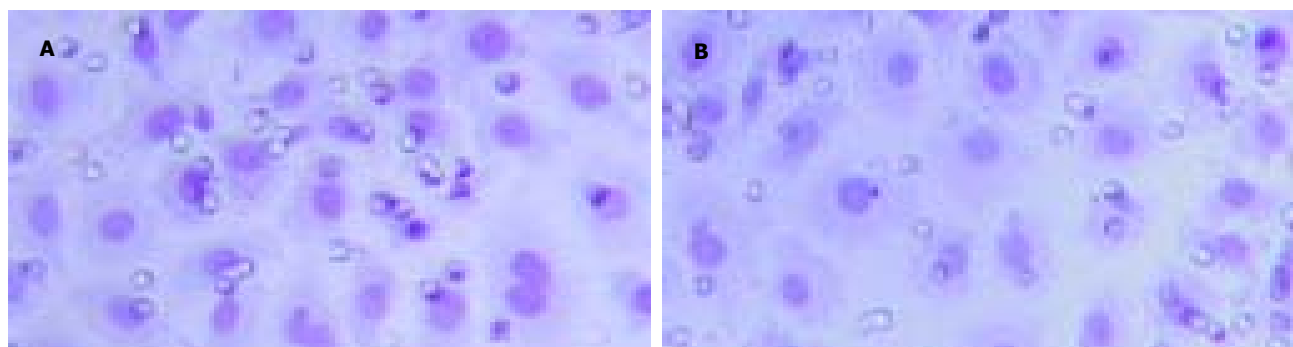


图2 Boyden小室检测BEL-7402穿膜细胞。A: PBS; B: IFN- α 组。

降,凡进入增殖周期的细胞均为阳性,而处在G0/G1期细胞则基本不表达,他可作为细胞增殖的一个指标^[10],肿瘤组织中PCNA阳性细胞数可反映肿瘤组织增殖的速度^[11].我们的实验中IFN- α 组BEL-7402细胞PCNA的表达明显低于对照组,表明IFN- α 可以影响BEL-7402细胞PCNA的表达,其机制可能与肿瘤生长的抑制相关.细胞凋亡(apoptosis)与肿瘤的关系仍是目前研究的热点.我们应用TUNEL法检测发现,IFN- α 可以明显使BEL-7402细胞凋亡的阳性细胞数量增加,诱导肝癌细胞的凋亡.细胞凋亡对肿瘤起着负调控作用^[12],肿瘤的发生发展不仅是由于细胞增殖速率升高,而且与细胞死亡速率下降有关,细胞凋亡对评估肿瘤预后有一定意义.

总之,IFN- α 作为一种细胞因子,他既可用于全身治疗,也可用于局部治疗.他的作用机制是非常复杂的,而他的抗肿瘤作用是我们不能忽视的.目前将各种干扰素、干扰素与其他抗肿瘤药物以及干扰素与其他抗癌疗法联合应用的联合疗法是目前的发展趋势.

4 参考文献

- 1 Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sondak VK, Richards J, Flaherty LE, Ernstoff MS, Smith TJ, Rao U, Steele M, Blum RH. High- and low-dose interferon- α -2 β in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190. *J Clin Oncol* 2000;18:2444-58
- 2 Wakabayashi T, Hatano N, Kajita Y, Yoshida T, Mizuno M, Taniguchi K, Ohno T, Nagasaka T, Yoshida J. Initial and maintenance combination treatment with interferon-beta, MCNU (Ranimustine), and radiotherapy for patients with previously untreated malignant glioma. *J Neurooncol* 2000;49:57-62
- 3 王鲁, 汤钊猷, 薛琼, 孙惠川, 陈军, 高冬梅, 赵燕, 陈洁, 孙瑞霞, 刘银坤, 叶胜龙. α 干扰素对肝癌切除术后转移复发干预作用的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2001;9:154-156
- 4 Lin SM, Lin CJ, Hsu CW, Tai DI, Sheen IS, Lin DY, Liaw YF. Prospective randomized controlled study of interferon-alpha in preventing hepatocellular carcinoma recurrence after medical ablation therapy for primary tumors. *Cancer* 2004;100:376-382
- 5 Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 1987;47:3239-3245
- 6 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术. 第1版. 湖北: 湖北科学技术出版社, 1998:162-168
- 7 杨吉成, 李丽娥, 盛伟华, 董宁征, 徐伦. 基因工程IFN α 2 α 和IFN α 2 β 对肿瘤细胞生长的抑制作用. *实用癌症杂志* 1999;14:164-166
- 8 Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516
- 9 Pizem J, Marolt VF, Luzar B, Cor A. Proliferative and apoptotic activity in hepatocellular carcinoma and surrounding non neoplastic liver tissue. *Pflugers Arch* 2001;442(Suppl 1):R174-176
- 10 Kim YH, Lee JH, Chun H, Nam SJ, Lee WY, Song SY, Kwon OJ, Hyun JG, Sung IK, Son HJ, Rhee PL, Kim JJ, Paik SW, Rhee JC, Choi KW. Apoptosis and its correlation with proliferative activity in rectal cancer. *J Surg Oncol* 2002;79:236-242
- 11 Sever-Chroneos Z, Angus SP, Fribourg AF, Wan H, Todorov I, Knudsen KE, Knudsen ES. Retinoblastoma tumor suppressor protein signals through inhibition of cyclin-dependent kinase 2 activity to disrupt PCNA function in S phase. *Mol Cell Biol* 2001;21:4032-4045
- 12 Matturri L, Colombo B, Lavezzi AM. Evidence for apoptosis in non-small cell lung carcinoma. Relationship with cell kinetics and prognosis. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:240-244

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 •

慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞 IFNAR2 mRNA 的表达

刘宁, 李颖, 刘沛

刘宁, 李颖, 刘沛, 中国医科大学附属第二医院感染科
辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 刘沛, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院感染科. syliupeir2003@yahoo.com.cn

电话: 024-83956962 传真: 024-83956451

收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-10

摘要

目的: 探讨慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞(PBMCs)干扰素- α/β 受体(IFNAR2)mRNA的表达, 及其与干扰素(IFN)抗病毒疗效的关系.

方法: 密度梯度离心法分离26例慢性丙型肝炎患者PBMCs, RT-PCR法扩增IFNAR2 mRNA, 计算其表达水平.

结果: 慢性丙型肝炎患者PBMCs IFNAR2 mRNA表达显著高于健康对照者;其表达与血清病毒载量、病毒基因型及PBMCs HCV-RNA无关;干扰素治疗完全应答组PBMCs IFNAR2 mRNA表达显著高于部分应答及无应答组.

结论: PBMCs IFNAR2 mRNA表达与干扰素疗效相关, 可作为一个独立因素, 用于预测慢性丙型肝炎患者干扰素疗效.

刘宁, 李颖, 刘沛. 慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞 IFNAR2 mRNA 的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1023-1026
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1023.asp>

0 引言

干扰素 (IFN) 是目前用于慢性丙型肝炎抗病毒治疗的首选药物, 能抑制病毒复制, 降低血清 ALT 水平, 减轻肝组织炎症及纤维化程度^[1-2]. 但 IFN 治疗慢性丙型肝炎的有效率仅为 30-50%, 且有一定副作用. 因此, 临床上选择能预测 IFN 疗效的指标极为重要. 已有报道 HCV 感染者肝组织内有 I 型干扰素受体的表达, 且其表达水平与干扰素疗效呈正相关^[3-6]. 同时, 慢性丙型肝炎患者肝组织与外周血单个核细胞 (PBMCs) 中 IFNAR2 mRNA 的表达情况呈正相关^[7]. 我们应用 RT-PCR 方法检测了 26 例慢性丙型肝炎患者 PBMCs IFNAR2 mRNA 的表达, 进一步分析了 IFNAR2 mRNA 表达与干扰素疗效的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 26 例慢性丙型肝炎患者, 年龄 11-60 岁 (平均 43.5), 男 20 例, 女 6 例. 治疗前丙氨酸转氨酶 (ALT) 为正常值的 1.5 倍以上, 血清抗-HCV 阳性, HCV RNA 阳性, 无同性恋者、静脉药瘾者, 无甲、乙、丁、戊型肝炎病毒及 HIV 感染标志者、无抗核抗体阳性者, 排除近 3 mo 应用糖皮质激素、干扰素等影响免疫功能药物者. 诊断符合 2000-09 中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学分会联合修订的病毒性肝炎防治方案^[8]. 另取 15 名无肝炎病毒感染的健康志愿者做正常对照. 所有患者接受 IFN β -1 a 治疗, 用法为 44 mg 隔日皮下注射, 疗程为 24 wk. 治疗结束时血清 ALT 正常, HCV RNA 阴性者为完全应答 (CR); 血清 ALT 正常, 而 HCV RNA 阳性者为部分应答 (PR); 血清 ALT 未降至正常, HCV RNA 阳性者为无应答 (NR). Trizol RNA 提取试剂 (美国 GibcoBrl 公司); AMV Reverse Transcriptase (美国 Promega 公司); Taq DNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂、PCR 应用试剂及丙肝病毒 PCR 检测试剂盒 (华美生物工程公司).

1.2 方法

1.2.1 引物 引物设计参照文献^[9], 序列如下: IFNAR2 mRNA: 上游引物: 5' -GCTTTTGAGCCAGAATGCCT -3' (nt329-348); 下游引物: 5' -CCCTCTGACTGTTCTTCAATG-3' (nt833-853). 产物预测长度 525 bp; G3PDH mRNA: 上游引物: 5' -ATTCAAGGCACCGTCAAGG -3' (nt166-185); 下游引物: 5' -GGGCCATCGATAGTCTTCTG-3' (nt554-573). 产物预测长度 408 bp.

1.2.2 PBMCs IFNAR2 mRNA 检测 采 4 mL 肝素抗凝血, 密度梯度离心法分离 PBMCs, -70℃ 保存. Trizol RNA 提取试剂提取总 RNA, -30℃ 保存备用. RT-PCR 方法检测 IFNAR2 mRNA 表达, 以 G3PDH mRNA 表达作为内参照. 30 μ L 反应体系包括: 10 \times Buffer 3 μ L (500 mmol/L

KCl, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 1.0% Triton X-100, 15 mmol/L MgCl₂, 各 0.2 μ mol/L 3-磷酸脱氧核苷 (dNTP), AMV Reverse Transcriptase 3 U, Taq DNA 聚合酶 2 U, RNA 酶抑制剂 20 U, 上、下游引物各 1 μ L (20 pmol/L), RNA 模板 3 μ L. 反应条件: 37℃ 逆转录 30 min, 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环, 72℃ 末延伸 7 min. 将 PCR 扩增产物置于 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果置于凝胶成像分析系统上分析. 408 bp 条带为 G3PDH mRNA 扩增产物, 525 bp 条带为 IFNAR2 mRNA 扩增产物. IFNAR2 mRNA 表达水平 = IFNAR2 mRNA 光强度值 / 各自 G3PDH mRNA 光强度值.

1.2.3 PBMCs HCV-RNA 检测 总 RNA 同时进行 HCR-RNA 的检测. 检测方法按照丙肝病毒 PCR 检测试剂盒说明书中的操作步骤进行.

1.2.4 HCV-RNA 定量及 HCV 基因分型检测 采患者治疗前血清 100 μ L, 分别用于 HCV RNA 定量及 HCV 基因分型的检测. HCV RNA 定量应用 Bayer HCV kits; HCV 基因分型应用 Bayer Lipa assay.

统计学处理 应用 SPSS 软件. 应用 χ^2 检验、方差分析、Pearson 相关分析和多因素 Logistic 回归分析进行统计分析.

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 PBMCs IFNAR2 mRNA 结果 (图 1) 26 例慢性丙型肝炎患者中, PBMCs IFNAR2 mRNA 阳性者 25 例 (96.2%); 15 例对照组中 PBMCs IFNAR2 mRNA 阳性者 5 例 (33.3%), 丙型肝炎组阳性率显著高于对照组. 26 例患者中男性、女性 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达值分别为 0.7979 ± 0.3763 、 0.8575 ± 0.2405 , 无显著性差异.

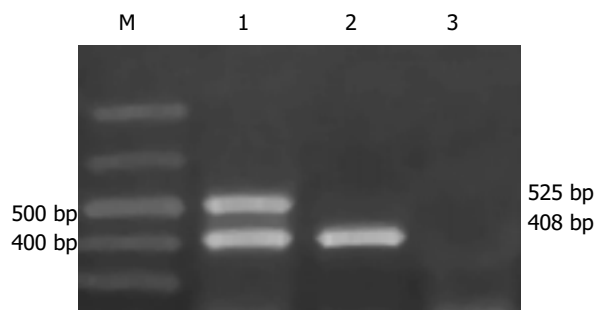


图1 PBMCs IFNAR2 mRNA 电泳结果. 525 bp 为 IFNAR2 mRNA 扩增产物, 408 bp 为 G3PDH mRNA 扩增产物. 1: 阳性; 2: 阴性; 3: 空白对照.

2.2 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达与 PBMCs HCV RNA 26 例慢性丙型肝炎患者中 PBMCs HCV RNA 阳性者 21 例, 阴性者 5 例, IFNAR2 mRNA 表达值分别为 0.784804 ± 0.2934 、 0.8572 ± 0.2142 , 无显著性差异.

2.3 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达与血清病毒定量和基因

分型 血清 HCV-RNA 载量取自然对数, 与 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达值进行相关性分析, 结果是二者间无显著相关性 ($r = 0.133$, $P = 0.637$). 根据对干扰素疗效的不同影响, 将慢性丙型肝炎患者分为 1 型基因型组 14 例与非 1 型基因型组 12 例, 其 IFNAR2 mRNA 表达值分别为 0.8049 ± 0.1999 、 0.7799 ± 0.1896 , 无显著性差异.

2.4 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达与干扰素疗效 治疗结束时完全应答 (CR) 者 10 例, PBMCs IFNAR2 mRNA 表达值为 1.0624 ± 0.1633 ; 部分应答 (PR) 者 7 例, 表达值为 0.7977 ± 0.1549 ; 非应答 (NR) 者 9 例, 表达值为 0.6055 ± 0.2581 . 完全应答组 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达值显著高于部分应答组和非应答组 ($P < 0.05$), 而部分应答组和非应答组表达值无显著性差异 ($P = 0.069$).

2.5 对治疗前血清 HCV RNA 水平、病毒基因型、PBMCs HCV RNA 及 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达值 4 项因素与 IFN 疗效间进行 Logistic 回归分析, 结果显示 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达值对疗效影响较大, 可视为一个独立预测因素.

3 讨论

干扰素受体可分为 I 型受体和 II 型受体. I 型受体包括 IFN- α 、IFN- β 和 IFN- ω 受体; II 型受体是指 IFN- γ 受体. 临床上常用 IFN- α 和 IFN- β 治疗慢性丙型肝炎, I 型干扰素受体是 IFN- α 和 IFN- β 共用受体^[10], 至少由两个亚单位组成, IFNAR1 (IFN- α 受体) 和 IFNAR2 (IFN- α / β 受体), 其结构和机能已经很明确了^[11-12]. 就 IFNAR1 和 / 或 IFNAR2 mRNA 在肝脏中的表达情况, 很多学者进行了临床试验研究, 结果显示 IFNAR1 和 / 或 IFNAR2 mRNA 的表达与患者临床表现及病毒基因分型无关, 而与 IFN 治疗疗效相关. 但人们对肝组织外干扰素受体的表达还知之甚少, 哪些细胞或组织中干扰素受体的表达与肝组织一致, 可以代替肝活检用以推测肝组织内干扰素受体的表达情况呢? PBMCs 首先引起了人们的注意, 因为 PBMCs 是丙型肝炎病毒肝外增殖的重要部位. 已有研究表明慢性丙型肝炎患者肝组织与 PBMCs IFNAR2 mRNA 的表达情况正相关, 我们进一步证实了 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达与 IFN 疗效的关系.

本组 26 例慢性丙型肝炎患者 PBMCs IFNAR2 mRNA 的表达水平明显高于正常人. Yatsushashi *et al*^[13] 在同时检测急性甲型肝炎、慢性乙型肝炎及非病毒性肝病 (脂肪肝) 患者肝组织内 IFNAR2 mRNA 表达时, 发现肝炎病毒感染均能上调 IFNAR2 基因在肝组织内的表达, 这种上调可以解释为机体对病毒感染的一种反应, 参与机体清除病毒的免疫应答: 机体通过上调 IFNAR2 mRNA 的表达来提高与内源性或外源性 IFN 的结合, 从而加强对病毒的清除. PBMCs 是丙型肝炎病毒肝外复制的一个重要场所, 故推测 HCV 感染也能够上调 IFNAR2 mRNA 在 PBMCs 内的表达, 与我们的研究结果一致. PBMCs 中 IFNAR2 mRNA 表达增加的机制尚不十分清楚, 可能与某些细胞因子有关. 慢性肝

炎患者血清中 IFN- γ 水平上升^[14], 有报告 IFN- γ 能够调节 IFN 受体的表达^[15]. 本组 PBMCs HCV-RNA 定性 “+” 及 “-” 者, IFNAR2 mRNA 表达值无显著性差异, 提示 IFNAR2 mRNA 的表达与 PBMCs HCV-RNA 无关, 其表达情况可能不依赖于 PBMCs 中是否有 HCV 的持续感染, 而受宿主自身的免疫状况的影响, 这与 IFN 抗病毒作用机制一致.

IFN 分子本身并不具备抗病毒功能, 必须与细胞表面相应受体相结合, 并经过一系列细胞内信号传导, 最终产生抗病毒蛋白而发挥作用, 故与特异性受体相结合是 IFN 发挥抗病毒作用的第一步^[16-17]. IFN 发挥生物学效应与其靶细胞上特异性受体的水平有关. 我们检测了 26 例慢性丙型肝炎患者 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达与 IFN 抗病毒疗效间的关系, 结果显示完全应答组表达值显著高于部分应答组和非应答组. 这说明 IFN 抗病毒疗效与 PBMCs IFNAR2 表达水平密切相关, IFN 疗效差—不应答或不能完全应答, 可能与其受体表达不足有关, 进一步推测 PBMCs IFNAR2 mRNA 表达情况是影响 IFN 疗效的宿主方面因素. 丙型肝炎病毒基因型^[18] 及治疗前血清 HCV RNA 载量^[19] 是目前公认的影响 IFN 应答的病毒因素, 而 PBMCs 中 HCV-RNA 也被认为是 IFN 疗效的预测因子^[20]. 本实验中, PBMCs IFNAR2 mRNA 表达与治疗前血清病毒载量、病毒基因型及 PBMCs HCV-RNA 无关, 故可作为一个独立因素用于预测 IFN 的疗效. Logistic 回归分析进一步证明了这一结论.

4 参考文献

- 1 Davis GL, Balart LA, Schiff ER, Lindsay K, Bodenheimer HC Jr, Perrillo RP, Carey W, Jacobson IM, Payne J, Dienstag JL. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1989;321:1501-1506
- 2 Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, Lisker-Melman M, Murray L, Waggoner J, Goodman Z, Banks SM, Hoofnagle JH. Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 1989;321:1506-1510
- 3 Fukuda R, Ishimura N, Kushiya Y, Moriyama N, Ishihara S, Nagasawa S, Miyake T, Niigaki M, Satoh S, Sakai S, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S. Effectiveness of interferon-alpha therapy in chronic hepatitis C is associated with the amount of interferon-alpha receptor mRNA in the liver. *J Hepatol* 1997;26:455-461
- 4 Mathai J, Shimoda K, Banner BF, Mori M, Bonkovsky HL, Barnard GF. IFN- α receptor mRNA expression in a United States sample with predominantly genotype 1a/I chronic hepatitis C liver biopsies correlates with response to IFN therapy. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:1011-1018
- 5 Mizukoshi E, Kaneko S, Yanagi M, Ohno H, Kaji K, Terasaki S, Shimoda A, Matsushita E, Kobayashi K. Expression of interferon alpha/beta receptor in the liver of chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 1998;56:217-223
- 6 Ishimura N, Fukuda R, Fumoto S. Relationship between the intrahepatic expression of interferon- α receptor mRNA and the histological progress of hepatitis C virus-associated chronic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:712-717
- 7 Yamaguchi Y, Hino K, Fujiwara D, Ren F, Katoh Y, Satoh Y, Okita K. Expression of type 1 interferon receptor in liver and peripheral blood mononuclear cells in chronic hepatitis C

- patients. *Dig Dis Sci* 2002;47:1611-1617
- 8 中华医学会传染病与寄生虫病分会、肝病分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001;19:56-62
- 9 Morita K, Tananka K, Saito S, Kitamura T, Kondo M, Sakaguchi T, Morimoto M, Sekihara H. Expression of interferon receptor genes (IFNAR1 and IFNAR2 mRNA) in the liver may predict outcome after interferon therapy in patients with chronic genotype 2a or 2b hepatitis C virus infection. *J Clin Gastroenterol* 1998;26:135-140
- 10 Pestka S. The interferon receptor. *Semin Oncol* 1997;24(3Suppl 9):s9-18
- 11 Uze G, Lutfalla G, Gresser I. Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell* 1990;60:225-234
- 12 Novic D, Cohen B, Rubinstein M. The human interferon α/β receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 1994;77:391-400
- 13 Yatsushashi H, Fujino T, Matsumoto T, Inoue O, Koga M, Yano M. Immunohistochemical analysis of hepatic interferon alphas-beta receptor level: relationship between receptor expression and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatology* 1999;30:995-1003
- 14 Chu CM, Sheen IS, Yeh CT, Hsieh SY, Tsai SL, Liaw YF. Serum levels of interferon-alpha and -gamma in acute and chronic hepatitis B virus infection. *Dig Dis Sci* 1995;40:2107-2112
- 15 Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: Pre- and posttreatment with interferon alfa. *Hepatology* 1996;24:6-9
- 16 Cohen B, Novick D, Barak S, Rubinstein M. Ligand-Induced association of type I interferon receptor components. *Mol Cell Biol* 1995;15:4208-4214
- 17 Domanski P, Witte M, Kellum M, Rubinstien M, Hackett R, Pitha P, Colamonici OR. Cloning and expression of a long form of the β subunit of the interferon α/β receptor that is required for signaling. *J Biol Chem* 1995;270:21606-21611
- 18 Tsubota A, Chayama K, Ikeda K, Yasuji A, Koida I, Saitoh S, Hashimoto M, Iwasaki S, Kobayashi M, Hiromitsu K. Factors predictive of response to interferon-alpha therapy in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1994;19:1088-1094
- 19 Lau JY, Davis GL, Kniffen J, Qian KP, Urdea MS, Chan CS, Mizokami M, Neuwald PD, Wilber JC. Significance of serum hepatitis C virus RNA levels in chronic hepatitis C. *Lancet* 1993;341:1501-1504
- 20 徐道振, 李正钦, 谢尧. 外周血单个核细胞内 HCV RNA 是慢性丙型肝炎干扰素治疗效果的预测因子. *中华肝病杂志* 2004;12:76-78

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

• 研究快报 •

大肠癌组织 KISS-1, hOT7T175 基因表达与转移的关系

陈海金, 黄宗海, 吴爱国, 高毅, 范应方

陈海金, 黄宗海, 吴爱国, 高毅, 范应方, 南方医科大学附属珠江医院普通外科 广东省广州市 510280

通讯作者: 陈海金, 510280, 广东省广州市, 南方医科大学附属珠江医院普通外科. chenhaijin@sina.com

电话: 020-31396133

收稿日期: 2005-01-11 接受日期: 2005-01-20

摘要

目的: 研究 KISS-1, hOT7T175 基因在大肠癌组织表达及其与转移的关系。

方法: 大肠癌组织 60 例, 采用逆转录聚合酶链式扩增反应对 KISS-1, hOT7T175 mRNA 的表达进行检测。

结果: 大肠癌组织和周缘正常组织 KISS-1, hOT7T175 阳性表达例数相比有显著差异($P=0.000$ 和 $P=0.037$)。肿瘤 I - II 期和 III - IV 期 KISS-1 阳性表达例数对比有显著差异($P=0.020$)。

结论: KISS-1, hOT7T175 有可能成为预计大肠癌恶性程度的一个指标。

陈海金, 黄宗海, 吴爱国, 高毅, 范应方. 大肠癌组织 KISS-1, hOT7T175 基因表达与转移的关系. *世界华人消化杂志* 2005;13(8):1026-1028

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1026.asp>

0 引言

近来, KISS-1 基因编码产物(被命名为 metastin 或 Kisspetin-54)和他的同源性G-蛋白偶联受体(被命名为 hOT7T175)的发现, 为 KISS-1 基因如何抑制肿瘤转移提供了一个新的研究线索和途径. KISS-1 基因的编码产物通过与 hOT7T175 结合后, 抑制了肿瘤细胞的侵袭, 转移和趋化性. 我们检测60例已确诊大肠癌外科手术切除后组织中 KISS-1, hOT7T175 mRNA 的表达, 探讨 KISS-1, hOT7T175 基因是否可以作为一个预测大肠癌恶性潜能的新的生物学标记物。

1 材料和方法

1.1 材料 南方医科大学附属珠江医院普外科 2003-08/

2004-08 已行手术切除的大肠癌新鲜标本 60 例, 男 33 例, 女 27 例. 年龄 31-69 (中位 51) 岁. 临床资料完整. 大肠癌分期、分型分别参照国际抗癌联盟 TNM 分期和 Dukes 分期. 临床分期中 I - II 期 30 例, III - IV 期 30 例. 组织离体后 5 min 癌组织和距肿瘤至少 5 cm 的切缘组织 (均经术后病理证实, 切缘无癌细胞), 液氮速冻后置 -80℃ 冰箱保存, 备 RNA 抽提.

1.2 方法 组织总 RNA 抽提采用 TRIZOL (美国 Invitrogen 公司) 一步法, 按说明书操作. 琼脂糖凝胶 (西班牙 Biowest 公司) 电泳检测 RNA 有无降解, 并测 RNA 样品的 A260/A280 比值和水平. KISS-1 引物参照 GenBank 中发表的 NM_002256 基因序列合成^[1]. 扩增长度为 302 bp. hOT7T175 引物参照 GenBank 中发表的 AB051065 基因序列合成^[2]. 扩增长度为 102 bp (表 1). 反转录试剂盒 (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR), DNA 多聚酶 (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity) 和 10 mmol/L dNTPs 购自 Invitrogen 公司. 在无 RNA 酶的 0.5 mL EP 管中加入提取的总 RNA 5 μL, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, Oligo (dT) 1 μL, DEPC 水补足 10 μL, 65℃ 5 min, 冰浴 1 min, 加入 2 μL 10× 反转录缓冲液, 4 μL 25 mmol/L MgCl₂, 2 μL 0.1 mol/L DTT 和 4 μL 无 RNA 酶的重组 RNA 酶抑制物, 混匀离心后 42℃ 水浴 2 min, 加入 SuperScript II 反转录酶 1 μL, 混匀后 42℃ 水浴 50 min, 70℃ 水浴 15 min, 4℃ 10 000 g 离心 1 min, 在做 PCR 反应前加入 RNaseH 1 μL 后置 37℃ 水浴 20 min, 将 cDNA 链与 RNA 链分离. 同时做阴性对照. KISS-1 基因 PCR 反应条件: 94℃ (3 min), 94℃ (30 s), 61.2℃ (30 s), 72℃ (40 s), 72℃ (6 min) 35 轮; hOT7T175 基因反应条件: 94℃ (3 min), 94℃ (30 s), 59.4℃ (30 s), 72℃ (40 s), 72℃ (6 min) 35 轮; 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定. 阳性表达情况 (图 1).

表 1 Primers for KISS-1, hOT7T175

Gene	Function	Sequence
KISS-1	Forward	CTCTGTGCCACCCACTTTG
	Reverse	TGTAGTCGGCAGGTCCTTCT
hOT7T175	Forward	CCTGGCTCGTGCCGCTCTTCTT
	Reverse	ACGGTCCGCATCGGCTTG

统计学处理 阳性表达例数经 χ^2 检验, 所有数据通过 SPSS10.0 统计软件处理.

2 结果

大肠癌组织阳性 KISS-1 表达 17 例 (28%), 周缘正常组织 37 例 (62%), 二者对比有显著差异 ($P = 0.000$). 大肠癌组织阳性 hOT7T175 表达 19 例 (32%)、周缘正常组织 35 例 (58%), 二者对比有显著差异 ($P = 0.037$). 并且在

同一标本, 无论是癌组织还是周缘组织, KISS-1 的表达往往伴随着 hOT7T175 表达 (14 vs 33), 说明 KISS-1 的表达与 hOT7T175 表达有明显的相关. 在大肠癌组织中, 肿瘤分期位于 I 期和 II 期 KISS-1 阳性表达例数为 13 例, III 期和 IV 期的 4 例, 对比 I - II 期和 III - IV 期阳性表达例数, 有显著差异 ($P = 0.020$).

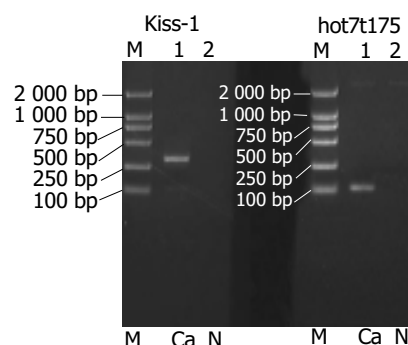


图 1 KISS-1、hOT7T175 基因表达图.

3 讨论

1996 年, Lee *et al*^[3] 通过把完整的第 6 号染色体转移进入 C8161 和 MelJuSo 黑色素瘤细胞系, 观察到他们的转移能力 95% 被抑制, 但没有影响肿瘤形成. 然后, 用递减杂交技术对比非转移细胞 (neo6/C8161 或 neo6/MelJuSo) 和父系转移细胞 (C8161 或 MelJuSo) mRNA 的表达, 结果发现了一个新的有抑制转移作用的基因, 并命名为 KISS-1. Ohtaki *et al*^[4] 在从事 G 蛋白偶联受体配体研究中, 发现了 KISS-1 基因编码的 54 个氨基酸的羧基末端酰胺化的肽, 并命名为 metastin. Kotani *et al*^[5] 预测了这个肽是来源于前激素切割酶对 KISS-1 蛋白的水解. Horikoshi *et al*^[6] 报告 metastin 在孕妇的血清含量非常高, 认为 metastin 可能是来源于胎盘的激素. 但是, 低水平的 metastin 也存在于非孕妇的血清中, 这提示在非孕妇体内, metastin 可能从非胎盘组织释放并有一种内激素样的功能. metastin 被证实是 G 蛋白偶联受体 (被命名为 hOT7T175^[4], GPR54^[5], AXOR12^[7]) 的配体. Ohtaki *et al* 发现 metastin 通过激活 hOT7T175, 导致激活 G 蛋白的磷酸化酶 C 的激活, 引起了细胞内钙的增长. Sanchez-Carbayo *et al*^[8] 报道在膀胱癌, KISS-1 的表达是与肿瘤的组织病理分期紧密的联系在一起的, 在转移性的膀胱癌 KISS-1 是完全缺失的, KISS-1 的表达率提供了患者的预后信息. 提示可以通过 KISS-1 的表达水平来预测患者的预后. Ikeguchi *et al*^[9] 报道虽然在肝癌组织没有发现 KISS-1 缺失, 而且 KISS-1/GAPDH 的比值在肝癌组织和非肝癌组织没有明显差异, 但 hOT7T175/GAPDH 比值却从非肝癌组织的 0.8 增加到肝癌组织 0.48, 并在 6 个晚期肝癌发现 KISS-1. hOT7T175 过份表达. 提示 KISS-1. hOT7T175 过份表达是和肝细胞肝癌的进展有密切的关系, 有可能 KISS-1 和 hOT7T175 过份表达是介导生长信号进入癌细胞. Lee *et al*^[10] 把转

染了KiSS-1的克隆注入无胸腺鼠乳腺脂肪组织中,发现KiSS-1的表达显著抑制了肿瘤的转移,但没有影响肿瘤的形成.何进^{et al}^[11]报告KiSS-1可能是影响胃癌转移的基因之一.乔宠^{et al}^[12]报道KiSS1基因在滋养细胞表达随孕周增长而增加,提示该基因在调控早孕滋养细胞的浸润行为中起重要作用.本实验中,KiSS-1、hOT7T175基因在大肠癌周缘正常组织的表达率明显高于癌组织,预示着肿瘤的发生与KiSS-1基因的缺失有关,并且在同一标本,无论是癌组织还是周缘组织,KiSS-1的表达往往伴随着hOT7T175表达,说明KiSS-1的表达与hOT7T175表达有明显的相关,且在肿瘤分期中,位于I-II期表达率也明显高于III-IV期的,提示KiSS-1编码产物与hOT7T175的结合,抑制了肿瘤的侵袭和转移.本课题运用RT-PCR方法,通过检测大肠癌组织中KiSS-1基因、hOT7T175基因RNA表达情况及相互间表达的内在关系,表明了KiSS-1可能是影响大肠癌转移的众多基因之一,并初步探讨KiSS-1基因、hOT7T175基因与大肠癌临床病理特征及转移的关系,预示KiSS-1、hOT7T175基因可能成为预测大肠癌恶性潜能的新的生物学标记物,通过恢复和提高体内KiSS-1表达有望为结直肠癌基因治疗开辟新的途径.

4 参考文献

- 1 Homo sapiens KiSS-1 metastasis-suppressor(KiSS1), mRNA gi|29571103|ref|NM_002256.2|[29571103]. Available from: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=29571103>
- 2 Homo sapiens hot7t175 mRNA for G protein-coupled receptor, complete cds gi|14041797|dbj|AB051065.1|[14041797]. Available from:URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=14041797>
- 3 Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1731-1737
- 4 Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001;411:613-617
- 5 Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001;276:34631-34636
- 6 Horikoshi Y, Matsumoto H, Takatsu Y, Ohtaki T, Kitada C, Usuki S, Fujino M. Dramatic elevation of plasma metastatin concentrations in human pregnancy: metastatin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:914-919
- 7 Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 2001;276:28969-28975
- 8 Sanchez-Carbajo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Am J Pathol* 2003;162:609-617
- 9 Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis for KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:531-535
- 10 Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, kiss. *Cancer Res* 1997;57:2384-2387
- 11 何进, 秦新裕, 周络, 刘康达. 人胃癌组织 KiSS-1 基因表达水平的检测. *实用癌症杂志* 1999;14:101-102
- 12 乔宠, 林其德. KiSS-1 基因在孕早期绒毛组织中表达的初步研究. *中国实用妇产科杂志* 2003;19:289-290

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

• 研究快报 •

胃癌细胞中 P-糖蛋白和 P53 蛋白检测的意义

王翠莲, 李宗铉

王翠莲, 长治医学院病理教研室 山西省长治市 046000
李宗铉, 中国医科大学病理教研室 辽宁省沈阳市 110001
山西省教委基金资助项目, No. 199751
通讯作者: 王翠莲, 046000, 山西省长治市延安南路46号, 长治医学院病理教研室.
电话: 0355-3128112
收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2003-12-08

摘要

目的: 检测多药耐药基因产物 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)和 P53 蛋白在胃癌细胞中的表达及其临床意义.

方法: 采用免疫组化法, 对 66 例胃癌标本进行检测.

结果: 在未接受化疗胃癌患者的癌组织, P-gp 和 P53 表达分别为 34.5% 和 40.1%, P-gp 表达与癌细胞分化程度有关 ($P<0.05$), P53 表达与淋巴结转移有关 ($P<0.01$). P-gp 和 P53 共同表达阳性者 18 例, 共同表达阴性者 24 例, 呈协同表达, 二者间有显著差异 ($P<0.05$).

结论: 对胃癌术后标本进行 P-gp 和 P53 蛋白检测, 揭示患

者原发性耐药, 指导临床治疗方案的制定, 从而使化疗个体化。

王翠莲, 李宗铨. 胃癌细胞中P-糖蛋白和P53蛋白检测的意义. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1028-1029

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1028.asp>

0 引言

肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性直接影响化疗的疗效. 如何克服耐药成功地进行肿瘤化疗, 是提高生存率的有效手段. 因此, 探讨耐药基因机制有着重要的实际意义及价值。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院胃癌的切除标本66例(术前未经化疗的胃癌组织)。

1.2 方法 标本经中性甲醛固定后, 石蜡包埋, 切片厚

度为4 μm . P-gp, P53蛋白(鼠抗人抗体, 福州迈新生物技术开发公司), 采用S-P免疫组化法. P-gp阳性定位于胞膜及胞质, 呈棕黄色, 阳性细胞表达 $<10\%$ 为阴性. (数100个细胞其阳性细胞数少于10个者为阴性)P53蛋白阳性定位于细胞核, 呈棕黄色, 阳性细胞数 $<5\%$ 为阴性。

统计学处理 采用 χ^2 检验。

2 结果

P-gp在胃癌中阳性表达为34.5%(23/66), 其阳性表达与胃癌浸润及淋巴结转移无关($P>0.05$), 与胃癌分化程度有关($P<0.05$, 表1), P53阳性表达为40.1%(27/66), 其表达与癌细胞浸润无关($P>0.05$), 与淋巴结转移有明显差异($P<0.01$, 表1). 在双重染色中P-gp和P53表达共同为阳性者为18例, 共同为阴性者为24例, 说明二者有一致性($P<0.05$, 表2)。

表1 P-gp和P53蛋白在胃癌中表达

P-gp	n	分化程度			P53	n	淋巴结转移		P	P53	浸润深度			P
		高	中	低			有	无			黏膜层	肌层	浆膜层	
+	23	3 ^a	6	14	+	27	23	4	<0.01	+	1	2	24	>0.05
-	43	25	12 ^b	6	-	39	14	25		-	1	6	32	

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

表2 P-gp和P53在胃癌细胞中的表达关系

P-gp	P53+	P53-	(n)/P
+	18	15	
-	9	24	<0.05

3 讨论

多药抗药性(MDR)形成机制复杂, 其中途径之一是:通过P-糖蛋白的过度表达. P-糖蛋白位于细胞膜, 是一种能量依赖性药物排除泵(energy-dependent drug efflux pump), 他既可与一些抗肿瘤药物结合, 又有与ATP结合位点, P-糖蛋白一旦与抗肿瘤药物结合, 就可通过ATP分解提供能量, 将癌细胞内药物泵出胞外, 使肿瘤药物在胞内的浓度不断下降, 其细胞毒作用因而减弱甚至完全消失, 从而产生耐药, 导致化疗失败. 因此, 如果能准确地检测MDR, P-gp表达水平, 用于指导临床治疗方案的选定, 将会有效地促进肿瘤消退、抑制复发与转移, 延长患者无瘤存活期和生存率. 有研究表明胃癌细胞P-gp高表达患者其化疗效果差, 恶性度高, 比P-gp蛋白阴性的胃癌患者生存期短, 预后差^[1-2] P-gp的阳性表达率各家报道不一, 有报道高达85%, 本研究P-gp蛋白阳性表达率为34.5%, 可能与用不同克隆的P-gp抗体和病例数量有关^[5]. 本研究P-gp蛋白阳性表达率为34.5%, 其阳性表达与癌细胞的浸润及转移无关($P<0.01$), 故认为P-gp阳性表达有可能作为胃癌患者预后判断的一个独立指

标, 但尚有待于进一步证实. 关于胃癌与浸润、转移及分化程度的关系有报道与三者均无关^[3].

P53蛋白基因包括野生型及突变型两种, 其中突变型P53具有抑制癌细胞凋亡和促进癌细胞增殖的作用. 本研究P53蛋白阳性表达为40.1% 其与肿瘤细胞浸润、分化程度无关, 但与淋巴结转移有明显关系($P<0.01$), 与文献报道相符, 提示P53过表达促进癌细胞增殖及癌细胞转移, 故对判断患者预后有一定临床意义. P-gp与P53蛋白表达呈正相关, 说明二者之间有协同表达作用, 有研究表明, 突变型P53蛋白能增加MDR基因表达^[3], 同时通过抗细胞凋亡机制使肿瘤细胞产生耐药. 故认为P53蛋白高表达可为判断胃癌较差的一个指标^[4-5].

4 参考文献

- 1 陈春燕, 朱兆华. 胃癌P-糖蛋白表达与化疗效果相关. 世界华人消化杂志 2003;11:36-38
- 2 Chen GK, Lacayo NJ, Duran GE, Wang Y, Bangs CD, Rea S, Kovacs M, Cherry AM, Brown JM, Sikic BI. Preferential expression of a mutant allele of the amplified MDR1(ABCB1) gene in drug-resistant variants of a human sarcoma. *Br J Cancer* 2002;86:1578-1585
- 3 李建党, 施作霖, 黄良祥. 胃肠道腺癌P-糖蛋白和P53蛋白表达的关系. 中华普通外科杂志 2000;15:85-87
- 4 赵行远, 夏传生, 吴建平, 侯伟, 刘运芳. MDR1产物P-gp在结肠肿瘤中表达的意义. 世界华人消化杂志 1999;7:991
- 5 Ni CR. Expression significance of GST-p, P-gp, Top-II and nm23H1 in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:897-901

抗原表位特异性CTL在慢性HBV感染肝损伤和抗病毒中的作用研究

王洪, 周吉军, 夏杰, 王宇明

王洪, 周吉军, 夏杰, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院传染科 重庆市 400038

国家自然科学基金资助项目, No. 30200242

通讯作者: 周吉军, 400038, 重庆市高滩岩, 中国人民解放军第三军医大学附属西南医院传染科. zjcrk@mail.tmmu.edu.cn

电话: 023-68754475

收稿日期: 2004-09-10 接受日期: 2004-12-28

摘要

目的: 探讨抗原表位特异性CTL在肝炎发作中的抗病毒和肝损害作用。

方法: 用四个HBV抗原表位肽四聚体对外周血中抗原特异性CTL进行检测, (HBV抗原表位肽分别为HBeAg18-27, 序列为FLPSDFFPSV(C18), HBsAg183-191序列为WLSLLVPFV(E183), HBeAg335-343序列为FLLTRILTI(E335), 多聚酶P的575-583序列为FLLSLGIHL(P575))检测慢性乙型肝炎患者肝炎发作时病毒抗原表位特异性CTL出现频率, 统计分析抗原表位特异性CTL频率与病毒载量和血清ALT水平的相关关系。将所有检测的病例按照血清ALT水平高低重新分组进行对比, 分析各组间抗原表位特异性CTL频率的差异。

结果: 36例慢性HBV感染患者抗原表位特异性CTL检测阳性33例(91.7%), HBeAg183-191表位特异性CTL频率高于其他三个($P<0.05$)。统计分析抗原表位特异性CTL频率与病毒载量和血清ALT水平相关性不显著; 分组对比发现血清ALT升高5-10倍组多个抗原表位特异性CTL水平高于其他组($P<0.05$)。

结论: 慢性HBV感染患者外周血中存在抗原表位特异性CTL, 但特异性CTL的存在并不能代表保护性免疫。认为慢性HBV感染肝炎发作时抗原表位特异性CTL反应增强, 抗原表位特异性CTL在肝炎发作过程中具有抗病毒和肝组织损害双重作用, 肝组织损害可能比较轻微, 严重的肝损害可能是非特异性细胞造成。

王洪, 周吉军, 夏杰, 王宇明. 抗原表位特异性CTL在慢性HBV感染肝损伤和抗病毒中的作用研究. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1030-1033
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1030.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus HBV)是一种非直接致细胞病变的病毒, 免疫反应是HBV感染发病的主要原因。在HBV感染发病免疫发病因素中, 细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocyte CTL)是非常重要的部分, 是清除胞内病毒的主要力量。有资料显示CTL主要以非细

胞毒机制清除病毒, 在清除病毒过程中不损伤感染肝细胞的^[1];但也有研究认为CTL在清除细胞内病毒的同时也不可避免地造成感染肝细胞的损伤^[2-3], 而且在炎症的初始阶段CTL可能是造成肝损伤的主要原因。

慢性HBV感染患者常出现肝功能转氨酶(ALT)的反复波动, 慢性乙型肝炎的自然史就是肝炎发作(hepatitis flares)和炎症消退(remissions)反复交替, 向前发展的过程。肝炎发作后往往伴随HBeAg血清转换(HBeAg)和HBVDNA的清除, 大量研究表明慢性乙型肝炎炎症发作强度与HBeAg血清转换(HBeAg)和HBVDNA的清除率相关^[4], 因此认为肝炎发作是机体免疫增强的结果。对慢性肝炎消退期和肝炎发作期抗原表位特异性CTL的研究有利于正确认识特异性CTL在乙型肝炎发病过程中的作用。我们采用全新的MHC/肽四聚体复合物(tetramer)技术对慢性HBV感染患者外周血抗原表位特异性CTL进行准确定量, 通过与肝功能, 血清病毒载量等临床指标的综合分析, 对特异性CTL在慢性乙型肝炎发作过程中的作用进行初步的评价, 为进一步认识特异性CTL在HBV感染发病中的作用提供资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例 我科2003-08/2004-06门诊和住院HBV感染患者75例, 男52例, 女23例, 18-50岁, 平均年龄26.5岁。所有患者HBsAg持续阳性半年以上, HBeAg或HBV DNA阳性, 诊断符合2000年第十次全国传染病寄生虫病学术会议讨论修订标准, 排除HAV、HCV、HDV、HEV、HIV病毒感染(相应抗体阴性)。参照2001年AASLD肝炎防治指导方案, 将慢性肝炎(按ALT水平)分为慢性肝炎静止期($ALT \leq 1 \times ULN$, upper limit of normal)和慢性肝炎发作期($ALT \geq 1 \times ULN$), 并将慢性肝炎发作分为轻型($ALT \geq 1, < 5 \times ULN$), 中型($ALT \geq 5, < 10 \times ULN$), 重型($ALT \geq 10 \times ULN$)。HLA-A2-慢性活动性乙肝患者7例及HLA-A2+健康献血员6名为对照组。

1.1.2 试剂及来源 R-PE标记的rMHC tetramer:HLA-A*0201/FLPSDFFPSV(Tc18-27), HLA-A*0201/FLLTRILTI(Te183-191), HLA-A*0201/WLSLLVPFV(Te335-343), HLA-A*0201/FLLSLGIHL(Tp575-583)购自英国Proimmune公司;R-PE标记的亲合素购自美国Sigma公司;Cy-Chrome™标记的鼠抗人CD8mAb购自美国BD-PharMingen公司;Cy-Chrome™标记的鼠IgG1mAb同型对照购自美国BD-PharMingen公司;10×

红细胞裂解液购自美国BD-PharMingen公司;FACS洗涤液(含1 g/LBSA, 0.1 g/L叠氮钠的PBS);FITC标记的鼠抗人HLA-A2mAb购自Serotec公司;TGL-16B台式离心机(上海);FACstarPlus流式细胞仪/FCM(Becton-Dickinson);定量PCR仪(LightCycler, 敏感度为 10^3);7150全自动生化分析仪。

1.2 方法 血清转氨酶水平测定采用7020全自动生化分析仪;HAV、HBV、HCVA、HDV、HEV抗原抗体系统检测采用ELISA方法(上海科华公司),血清HBV DNA定量检测(定量PCR, 深圳匹基公司)按说明书进行。抗原特异性CTL的检测:采集肝素抗凝的外周静脉血2 mL,用FITC标记的鼠抗人HLA-A2mAb直接进行免疫荧光染色流式细胞仪检测HLA-A2表型。Tetramer染色参照Proimmune公司说明书,采用新鲜全血染色方案:抗凝新鲜外周静脉血100 μ L加入tetramer 2 μ L, 20 μ L PE-Cy5(或FITC)标记的CD8抗体混匀,避光冰上孵育30 min后,加2 mL $1 \times$ FACS裂解液室温10 min;待细胞悬液变成真性溶液后,PBA液(含5 g/L牛血清白蛋白,0.5 g/L叠氮钠,0.01 mol/L PBS)洗涤2次;10 g/L多聚甲醛固定FACstarPlus流式细胞仪检测, BD FACS专用CELLQuestTM软件分析。

统计学处理 依ALT水平进行分组,对Tetramer阳性率(%)进行计量统计,以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,分析各样本平均数间的差异,采用T检验;对病毒载量(以病毒拷贝数表示,依对数值计算)和血清转氨酶水平进行相关性分析,整个统计过程用SPSS12.0统计软件进行, $P < 0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 ALT水平与病毒载量的关系 在本组研究中75例慢性乙肝患者,血清ALT从383.4-3 200.6 nkat/L,平均 $3\ 324.0 \pm 3\ 550.7$ nkat/L;血清病毒拷贝数 $0-8.8 \times 10^8$ copies/L,平均 5.6×10^5 copies/L。经统计分析二者之间无显著相关性($P > 0.05$)。

2.2 在75例慢性乙肝患者有36例为HLA-A2⁺,经流式细胞仪检测HLA-A2⁺的平均荧光强度大于90%,对HLA-A2⁺HBV感染患者的tetramer染色,以CD8⁺细胞设门计算tetramer⁺细胞频率,在慢性乙肝患者中,HLA-A2⁺组和HLA-A2⁻组之间有显著性差异($P < 0.05$),但HLA-

A2⁻组和正常健康HLA-A2⁺组无明显差异($P > 0.05$)。

2.3 表位特异性CTL的表达频率 HLA-A2⁺正常健康组及HLA-A2⁻慢性乙肝患者组tetramer⁺细胞 $\leq 0.02\%$ 。所有HLA-A2⁺患者的tetramer⁺细胞频率以 $>0.02\%$ 为阳性,33例HLA-A2⁺乙肝患者外周血中存在tetramer⁺细胞,阳性率92%,仅仅有3例患者外周血中四种全部 $\leq 0.02\%$ 。30例Tc18-27tetramer⁺性细胞,存在频率为0.03-0.92%;Te183-191在30例患者的阳性频率为0.03-2.41%;Te335-343在26例患者的阳性频率为0.03-1.37%;Tp575-583在26例患者中阳性表达频率为0.03-0.6%。在4种表位特异性CTL中,Te183-191显著高于其他三种($P < 0.05$),其他之间无明显差异($P > 0.05$)。但4种表位特异性CTL和病毒载量相关性无显著意义($P > 0.05$),以血清转氨酶水平为因变量,Tc18-27、Te183-191、Te335-343、Tp575-583为自变量进行逐步回归分析得出的回归方程无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 慢性乙肝肝炎发作抗原表位特异性CTL的表达频率 36例HLA-A2⁺慢性HBV感染患者按照血清ALT的高低分为ALT正常组,ALT升高1-5倍(1-5ULN),ALT升高5-10倍(5-10ULN),ALT升高大于10倍(>10 ULN)。各组病例分别为9例、7例,11例和9例。其外周血tetramer⁺细胞频率见图1。

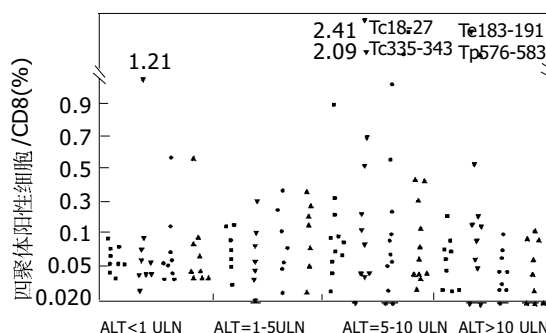


图1 36例慢性HBV感染患者外周血中抗原表位特异性CTL检测结果。

在慢性HBV肝炎患者中,ALT正常组和ALT >10 ULN组抗原特异性较低,Te335-343和Tp575-583在ALT正常组高于ALT >10 ULN组,但和两组之间经统计学分析无差异。在ALT处于5-10ULN组,Tc18-27、Te335-343和Tp575-583明显高于其他两组,统计分析相差显著(表1)。

表1 HBV感染患者外周血抗原特异性CTL频数(mean \pm SD, %)

病例分组	Tc18-27	Te183-191	Te335-343	Tp575-583
ALT正常组	0.06 \pm 0.03	0.24 \pm 0.48	0.13 \pm 0.24	0.14 \pm 0.24
ALT=1-5ULN组	0.06 \pm 0.04	0.08 \pm 0.06	0.09 \pm 0.13	0.10 \pm 0.11
ALT=5-10ULN组	0.16 \pm 0.27 ^{ac}	0.50 \pm 0.94 ^{ac}	0.19 \pm 0.31	0.21 \pm 0.36 ^{ac}
ALT >10 ULN组	0.06 \pm 0.04	0.22 \pm 0.22	0.06 \pm 0.08	0.07 \pm 0.07

^a $P < 0.05$ vs 1-5ULN组, ^c $P < 0.05$ vs ALT >10 ULN组。

3 讨论

HBV 作为嗜肝细胞病毒, 病毒本身及其在体内的复制过程并不引起宿主肝细胞的损伤, HBV 感染发病通常被认为是宿主细胞免疫的结果, 宿主免疫不仅具有抗病毒的作用而且也造成肝损害^[5-8]. 抗原特异性CTL的重要的免疫成分, 在HBV感染发病中具有重要作用; 但其在抗病毒和肝细胞损伤中的作用仍不十分清楚, 主要原因是HBV感染, 特别是慢性HBV感染, 抗原特异性CTL数很少, 研究特异性CTL的传统方法很难检测到^[8], 研究工作非常困难. 慢性乙型肝炎的自然发展过程并不是一成不变的, 在其自然过程中, 大约20%慢性携带者或非活动肝炎患者出现肝炎发作, 而且可以伴有血清HBeAg的转换和(或)病毒的清除, 提示肝炎发作过程中, 机体免疫功能是不断变化的. 对慢性乙肝肝炎发作期抗原表位特异性CTL的研究有助与阐明特异性细胞免疫在肝炎发作中的作用.

MHC/肽四聚体复合物检测抗原特异性CTL具有高效、敏感的特点, 我们曾对MHC/肽四聚体复合物与细胞内细胞因子染色检测抗原特异性CTL进行对比, MHC/肽四聚体复合物检出率明显高于细胞因子染色(此部分未公布). 目前公认MHC/肽四聚体复合物技术为定量检测表位特异性CTL的金标准^[9-10], MHC/肽四聚体复合物技术给表位特异性CTL的研究提供了有效的手段, 也为进一步了解表位特异性CTL与病毒复制及肝脏损害之间的相关关系提供了可能性.

我们发现慢性活动性乙肝患者病毒载量与血清转氨酶水平无明显相关性, 支持既往关于病毒本身并不引起肝细胞损害的观点. 几乎所有慢性HBV感染患者外周血中都不存在tetramer⁺细胞, 阳性率91.7%, 表明在慢性HBV感染时, 患者体内抗原特异性CTL与HBV并存, 特异性CTL的存在并不能代表机体的保护性反应. 本研究发现慢性HBV感染患者体内抗原特异性CTL数量在2.5%以下, 比文献报道的其他病毒感染低^[11-13], 其可能的原因在多个文献中都有分析. 本实验中Te183-191平均频率高于其他三种, 其原因可能是HBV不同抗原具有不同的免疫原性和耐受原性^[14]. 比如:HBeAg的抗原性最强, 机体最容易产生抗-HBe^[15]; 而慢性HBV感染患者, HBeAg特异性CTL往往很低, 可能是因为过强的免疫原造成T细胞的过度激活, 出现激活诱导性细胞死亡(activation-induced cell death, AICD). Te183-191平均频率高的原因可能与此正好相反. 在其他研究中也发现, 慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞在HBeAg183-191的刺激下更容易产生细胞因子^[16], 但Te183-191升高的临床意义仍不清楚.

对慢性HBV感染肝炎发作时抗原表位特异性CTL的研究发现, 在ALT升高5-10倍时间, 表位特异性CTL频率明显升高, 提示肝炎发作时特异性细胞免疫增强. T细胞反应低下被认为是HBV感染慢性化的一个重要原因, 慢性肝炎发作是常见的临床现象^[17], 肝炎发作容易出现HBVDNA复制的终止和HBeAg血清学转换(抗病毒治疗和

自然发生), 而且其发生率与ALT水平相关. 有研究发现慢性HBV感染肝炎发作患者, 血清转氨酶(ALT)的升高与核心抗原18-27的特异性CTL(Tc18-27)的增殖密切相关, 并且在急性发作时Tc18-27细胞表面HLA-DR和CCR5高表达; 而在静止期则为低表达^[18]. 在本研究中也发现多个抗原表位特异性CTL数量在急性发作时升高, 提示肝炎发作时, 抗原特异性细胞免疫增强, 肝炎发作时机体处于免疫激活状态. 因此, 抗原表位特异性CTL在肝炎发作过程中具有抗病毒和肝组织损害两方面的作用, 四个抗原表位中在抗病毒和肝组织损害中的作用是否存在差异还有待于进一步的研究. 在本研究中抗原表位特异性CTL频率与病毒载量和血清ALT水平之间相关不显著, 可能是因为观察病例数少, 观察时间不够(肝炎发作后发生HBeAg血清学转换的时间在6 mo-5 a).

大量研究显示慢性乙肝发生肝炎发作时, ALT水平的高低与发生HBV DNA复制终止和HBeAg血清学转换(HBeAg消失和抗-HBe的出现)的几率平行, 肝炎发作不仅有利于拉米扶定的治疗, 而且还减少YMDD变异株的产生^[19], 提示机体免疫反应与ALT水平直接相关, ALT越高, 机体免疫反应越强. 在本研究中, 重度肝炎发作(ALT>10×ULN)患者四聚体阳性细胞比ALT升高5-10倍患者低. 可能有两方面的原因, (1)抗原特异性CTL更多的隐藏在肝脏内, 因而外周血中数量少. (2)在重度肝炎发作时, 造成肝损伤的主要效应细胞不是抗原特异性CTL, 有资料也显示, 在发生肝炎发作时, 肝脏中存在大量非抗原特异性CTL, 非抗原特异性CTL是造成损伤的主要效应细胞. 目前认为CTL可通过非细胞毒机制发挥控制和清除HBV病毒的作用, 如果HBV特异性效应CD8⁺T细胞应答不能控制病毒复制则会直接或通过吸引其他非病毒抗原特异性T细胞聚集而造成肝病理损害^[20], 而且有研究表明通过阻滞趋化因子的作用可减少抗原非特异性细胞(中性粒细胞)在肝细胞的浸润可以降低肝细胞的损害程度^[21]. 我们通过对慢性HBV感染不同临床表现患者外周血中抗原表位特异性CTL数量的检测, 分析肝炎发作时抗原表位特异性CTL频率与血清ALT和病毒载量的关系, 认为慢性HBV感染肝炎发作时抗原表位特异性CTL反应增强, 抗原表位特异性CTL在肝炎发作过程中具有抗病毒和肝组织损害双重作用, 但由抗原表位特异性CTL造成的肝组织损害可能比较轻微, 严重的肝损害可能是非特异性细胞造成.

4 参考文献

- 1 Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91
- 2 Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:395-403
- 3 Guidotti LG. The role of cytotoxic T cells and cytokines in the control of hepatitis B virus infection. *Vaccine* 2002;20(Suppl 4):A80-A82

- 4 Perrillo RP, Lai CL, Liaw YF, Dienstag JL, Schiff ER, Schalm SW, Heathcote EJ, Brown NA, Atkins M, Woessner M, Gardner SD. Predictors of HBeAg loss after lamivudine treatment for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002;36:186-194
- 5 Liaw YF. Hepatitis flares and hepatitis B e antigen seroconversion: implication in anti-hepatitis B virus therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:246-252
- 6 Tang TJ, Kwekkeboom J, Laman JD, Niesters HG, Zondervan PE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. The role of intrahepatic immune effector cells in inflammatory liver injury and viral control during chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2003;10:159-167
- 7 Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8(+)T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003;77:68-76
- 8 Wieland SF, Spangenberg HC, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2129-2134
- 9 Tsai SL, Lee TH, Chien RN, Liao SK, Lin CL, Kuo GC, Liaw YF. A method to increase tetramer staining efficiency of CD8+ T cells with MHC-peptide complexes: therapeutic applications in monitoring cytotoxic T lymphocyte activity during hepatitis B and C treatment. *J Immunol Methods* 2004;285:71-87
- 10 Appay V, Rowland-Jones SL. The assessment of antigen-specific CD8+ T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining. *J Immunol Methods* 2002;268:9-19
- 11 Callan MF, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JD, O'Callaghan CA, Steven N, McMichael AJ, Rickinson AB. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* 1998;187:1395-1402
- 12 Belz GT, Xie W, Doherty PC. Diversity of epitope and cytokine profiles for primary and secondary influenza A virus-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol* 2001;166:4627-4633
- 13 Chen G, Shankar P, Lange C, Valdez H, Skolnik PR, Wu L, Manjunath N, Lieberman J. CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* 2001;98:156-164
- 14 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002;76:8609-8620
- 15 Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39(Suppl 1):S36-S42
- 16 Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002;195:1089-1101
- 17 Lok AS, McMahon BJ; Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34:1225-1241
- 18 Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ, Terada R, Hakoda T, Shimomura H, Hata H, Nakayama E, Shiratori Y. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. *J Clin Immunol* 2003;23:223-232
- 19 Tsubota A, Arase Y, Suzuki F, Kobayashi M, Matsuda M, Sato J, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Severe acute exacerbation of liver disease may reduce or delay emergence of YMDD motif mutants in long-term lamivudine therapy for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2004;73:7-12
- 20 Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertoletti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-1280
- 21 Sitia G, Isogawa M, Kakimi K, Wieland SF, Chisari FV, Guidotti LG. Depletion of neutrophils blocks the recruitment of antigen-nonspecific cells into the liver without affecting the antiviral activity of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13717-13722

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 •

《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。

根据晋新出报刊发[2005]5 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。

剑突下穿刺胆管造影术

邵永胜, 全卓勇, 彭开勤, 张应天

邵永胜, 全卓勇, 彭开勤, 张应天, 江汉大学附属医院普通外科 湖北省武汉市 430015
通讯作者: 邵永胜, 430015, 湖北省武汉市香港路168号, 江汉大学附属医院普通外科. shaoyongsheng1211@medmail.com.cn
电话: 027-62108133 传真: 027-82426502
收稿日期: 2005-01-28 接受日期: 2005-02-26

摘要

目的: 报告剑突下穿刺胆管造影术的方法和临床应用经验.

方法: 在B超定位下, 于剑突下经皮肤经肝脏穿刺左胆管行胆管造影术, 拔针后压迫穿刺点5-10 min. 如穿刺失败, 改行右侧径路穿刺或经皮肝穿刺胆管造影术.

结果: 189例行剑突下穿刺胆管造影术, 177例穿刺成功, 成功率94%, 无出血和胆漏并发症; 12例中转右侧径路穿刺胆管造影术, 其中9例成功, 术中发现不同程度的出血和胆漏. 总成功率98%.

结论: 剑突下穿刺胆管造影术可作为经皮肝穿刺胆管造影术的首选方法.

邵永胜, 全卓勇, 彭开勤, 张应天. 剑突下穿刺胆管造影术. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1034-1036
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1034.asp>

0 引言

经皮肝穿刺胆管造影术(percutaneous transhepatic cholangiography, PTC)是外科黄疸定位、定性诊断和黄疸鉴别诊断的重要方法之一. 传统PTC均经右侧径路穿刺右肝管, 因严重黄疸、凝血酶原时间延长和胆管内高压等原因, 穿刺后常有出血和胆漏发生, 甚至有被迫急诊剖腹手术. 因此, 外科临床上将严重黄疸和凝血酶原时间明显延长列为PTC的相对禁忌证^[1]. 鉴于此, 我们改用在B超引导下, 于剑突下定向穿刺左胆管行胆管造影术, 试图避免传统右侧径路PTC并发症较多的不足. 现将此方法的应用经验总结报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例选择标准 (1) 外科黄疸患者, B超检查发现肝内胆管扩张和/或肝外胆管扩张, PTC可判断胆管阻塞部位和性质; (2) 黄疸患者, B超检查报告肝内、外胆管不扩张, 但因血清碱性磷酸酶(AKP) 升高, 提示阻塞性黄疸, PTC可鉴别是外科黄疸或内科黄疸.

1.1.2 禁忌证 (1) 急性胆囊炎和急性胆管炎; (2) 对碘过敏

者, 或静脉碘过敏试验阳性; (3) 全身情况差, 或生命器官功能不全; (4) 穿刺部位皮肤、软组织感染. 严重黄疸、凝血酶原时间明显延长或腹水等不列为禁忌证.

1.1.3 一般资料 按上述标准, 我科1999-03/2004-12共施行剑突下穿刺胆管造影术189例. 其中男性83例, 女性106例; 年龄17-78岁, 平均55岁. 血清总胆红素28-559.4 $\mu\text{mol/L}$, 平均219.64 \pm 80.43 $\mu\text{mol/L}$; 血清碱性磷酸酶666.80-6 134.56 $\eta\text{kat/L}$, 平均3 508.20 \pm 1 207.74 $\eta\text{kat/L}$; 凝血酶原时间延长1-7 s, 平均延长4.38 \pm 0.76 s. 189例中36例经B超或手术证实有不同程度腹水. 189例原发病诊断见表1.

表1 本组189例原发病诊断

诊断	n
胆管结石	86
肝门部胆管癌	32
胰头癌	21
胆总管癌	13
慢性胰腺炎	10
胆囊癌	8
胆总管下端狭窄	6
胆肠吻合口狭窄	6
胃癌淋巴转移	4
胆总管囊肿	3

1.2 方法

1.2.1 术前准备 禁饮食4-6 h. 检查前30-60 min 静脉注射预防性抗生素, 肌注咪唑安定2.5-5 mg 和维生素K₁20 mg. 患者在B超室取仰卧位, 于平静呼吸的吸气末屏气状态, 用3.5MHz的B超探头在剑突下垂直于体表皮肤确定左肝管位置. 左肝管位置多在剑突下2 cm 偏右或偏左侧, 距体表3.5-6.5 cm. 做好体表定点标记, 将患者移至放射科X线室, 在X线电视透视下穿刺.

1.2.2 手术 患者仍取仰卧位. 常规消毒、铺巾, 在局部麻醉下, 于吸气末屏气时用7号穿刺针垂直穿刺. 进针深度为B超测得的左肝管距体表距离加1 cm. 穿刺针进入预定深度后拔出针芯, 边抽吸边缓慢退针. 抽得胆汁时停止退针, 缓慢注入20-30%胆影葡胺或泛影葡胺20-40 mL, 观察胆道显影情况. 拔针后, 立即压迫穿刺点5-10 min. 电视透视拍片. 如垂直方向穿刺失败, 可在矢状面调整进针方向, 稍向头侧或足侧偏斜再穿刺. 调整方向穿刺不得超过6次, 否则改行右侧径路穿刺或经皮肝穿刺胆管造影术.

1.2.3 术后处理 穿刺后回病房卧床休息, 禁饮食. 密切观察生命体征、腹部症状和体征; 持续静脉输液, 应用抗生素和止血药物. 如有危及生命的严重并发症, 及时急诊手术.

2 结果

本组 189 例行剑突下穿刺胆管造影术, 其中 177 例穿刺成功, 成功率 94%. 177 例剑突下穿刺成功后, 169 例肝内、外胆管均显影; 7 例左侧肝内胆管显影, 右侧肝内胆管及肝外胆管未显影, 加行右侧径路 PTC 后右侧肝内胆管部分显影, 肝外胆管仍未显影, 经手术证实为 6 例肝门部胆管癌 (Bismuth III 型或 IV 型) 和 1 例胆囊癌; 1 例左侧肝内胆管及肝外胆管显影, 而右侧肝内管未显影, 加行右侧径路 PTC 后右侧肝内胆管部分显影, 经手术证实为胆囊癌. 12 例剑突下穿刺不成功, 其中 3 例 B 超检查肝内胆管内径 ≥ 0.3 cm, 改行传统右侧径路 PTC 皆成功, 肝内、外胆管均显影; 9 例 B 超检查肝内胆管内径 < 0.3 cm, 改行右侧径路 PTC 后, 6 例穿刺成功, 3 例穿刺失败.

全组 189 例穿刺总成功率 98%, 其中剑突下穿刺 177 例, 右侧穿刺 20 例 (含双侧穿刺 8 例). 穿刺成功率与肝内胆管内径明显相关 (表 2).

表 2 不同路径穿刺成功率的比较

穿刺路径	肝内胆管内径 ≥ 0.3 cm	肝内胆管内径 < 0.3 cm
剑突下穿刺	98% (167/170) ^b	53% (10/19) ^b
右侧穿刺	100% (11/11)	67% (6/9)

^b $P < 0.01$.

本组 189 例均接受手术治疗, 无胆道感染及死亡病例. 177 例剑突下穿刺患者择期手术前无出血和胆漏症状、体征, 开腹手术中左肝叶穿刺点未见出血和胆漏. 12 例中转右侧径路 PTC 患者, 1 例因出血和急性弥漫性腹膜炎急诊手术, 2 例择期手术前存在局限性腹膜炎体征, 经禁饮食、抗感染、止血治疗 48 h 后缓解; 并发症发生率 25%, 严重并发症发生率 8%.

3 讨论

自 1937 年 Huard 和 Doxuan 创用经皮肝穿刺胆管造影术 (PTC) 之后, PTC 技术日益成熟, 成为肝胆外科重要的诊断方法之一, 并成为胆道检查的“金标准”^[2]. 传统 PTC 经右侧径路穿刺, 因进针路线长、肝右叶血管丰富, 再加上胸廓的阻挡而无法在局部压迫穿刺点, 穿刺后常有出血和胆漏并发症发生; 尤其是严重黄疸和凝血酶原时间延长时, 穿刺并发症发生率更高^[1]. 而肝胆外科需行 PTC 检查的患者多有黄疸和凝血酶原时间延长, 致使外科医生对 PTC 心存疑虑.

近年来, 因为检查方便、结果准确和无创等原因,

磁共振胰胆管造影 (MRCP) 和磁共振胆管造影 (MRC) 在肝胆外科的应用日益增多^[3-4]. 但是, 磁共振检查较为昂贵、难以广泛应用, 而且磁共振胆管造影显影尚无 PTC 显影清晰; 再加之 PTC 后还可以行经皮肝穿刺胆管引流术 (PTCD) 等介入治疗^[1, 5-7]. 因此, 美国介入放射学协会 2003 年公布的临床指南提出, PTC 仍然是肝胆外科有效、可行的检查方法^[1].

鉴于左、右肝管的解剖特点不一, 我们选择经剑突下穿刺左肝管行胆管造影术. 原因是肝左叶血管分布少, 穿刺针进针路线短; 穿刺点在腹壁上而非胸壁上, 穿刺后可以压迫穿刺点, 能有效防止出血和胆漏. 本组 189 例中 177 例行剑突下穿刺成功, 后经手术证实肝左叶穿刺点无出血和胆漏, 充分显示剑突下穿刺技术的优点.

肝内胆管扩张与否会影响 PTC 穿刺成功率. 美国介入放射学协会报告, 肝内胆管扩张患者的穿刺成功率为 95%, 肝内胆管不扩张患者的成功率仅为 65%^[1]. 本组行剑突下穿刺胆管造影术的总体成功率为 94%, 接近文献报告水平; 无论肝内胆管扩张与否, 右侧径路穿刺虽然可提高穿刺成功率, 但与剑突下穿刺成功率的差异无显著性 (表 2), 说明剑突下穿刺的方法是可行的. 从表 2 结果还可以看出, 肝内胆管内径 ≥ 0.3 cm 患者行剑突下穿刺胆管造影术的成功率较高, 而肝内胆管内径 < 0.3 cm 患者的成功率明显低于文献报告水平, 二者之间的差异有高度显著性 ($P < 0.01$); 而肝内胆管内径 ≥ 0.3 cm 与肝内胆管内径 < 0.3 cm 患者行右侧径路穿刺的成功率差异无显著性. 说明剑突下穿刺存在一定的局限性, 不能完全替代传统右侧径路 PTC; 推测可能是因为肝左叶胆管分布少, 穿刺成功率受肝内胆管内径影响明显, 而肝右叶胆管较多, 穿刺成功率受肝内胆管内径影响不明显.

对于肝门部胆管阻塞患者, 剑突下穿刺 PTC 不能完全明确病变部位和范围, 因而必须加行右侧径路 PTC. 本组有 8 例剑突下穿刺后左侧肝内胆管显影, 右侧肝内胆管或肝外胆管未显影, 加行右侧径路 PTC 后明确梗阻范围, 经手术证实 6 例肝门部胆管癌 (Bismuth III 型或 IV 型) 和 2 例胆囊癌. 在临床上, 我们发现 PTC 是肝门部胆管癌诊断和分型的重要方法, 但无论是剑突下穿刺抑或右侧径路穿刺, 单侧 PTC 不能满足肝门部胆管癌分型诊断的要求; 尤其是 Bismuth III 型、IV 型和部分 II 型肝门部胆管癌患者, 必须行双侧穿刺 PTC 检查方可明确诊断.

本组 12 例剑突下穿刺未成功, 中转右侧径路穿刺 PTC, 总体成功率由 94% 升至 98%, 但并发症发生率亦随之上升. 因此, 我们提出: 剑突下穿刺胆管造影术可作为 PTC 的首选方法, 其目的在于减少出血和胆漏并发症的发生, 而并非完全取代传统右侧径路的穿刺方法; 如穿刺成功后右侧肝内胆管或肝外胆管未显影, 必须加行右侧径路 PTC; 如剑突下穿刺不成功, 可改行右侧径路 PTC、经皮肝穿刺胆管造影术、ERCP 或 MRCP 检查等.

4 参考文献

- 1 Burke DR, Lewis CA, Cardella JF, Citron SJ, Drooz AT, Haskal ZJ, Husted JW, McCowan TC, Van Moore A, Oglevie SB, Sacks D, Spies JB, Towbin RB, Bakal CW. Society of interventional radiology standards of practice committee. quality improvement guidelines for percutaneous transhepatic cholangiography and biliary drainage. *J Vasc Interv Radiol* 2003; 14(9 Pt 2):S243-S246
- 2 Filippone A, Ambrosini R, Fuschi M, Marinelli T, Pinto D, Maggiale A. Clinical impact of MR cholangiopancreatography in patients with biliary disease. *Radiol Med* 2003;105: 27-35
- 3 Taylor AC, Little AF, Hennessy OF, Banting SW, Smith PJ, Desmond PV. Prospective assessment of magnetic resonance cholangiopancreatography for noninvasive imaging of the biliary tree. *Gastrointest Endosc* 2002;55:17-22
- 4 Chaudhary A, Negi SS, Puri SK, Narang P. Comparison of magnetic resonance cholangiography and percutaneous transhepatic cholangiography in the evaluation of bile duct strictures after cholecystectomy. *Br J Surg* 2002;89:433-436
- 5 Liu H, Tong W, Hu W, Li H, Wen Z, Wang J, Huang W, Liu X. Percutaneous expandable metallic stent biliary endoprotheses used in malignant and benign obstructive jaundice. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):51
- 6 Qin LX, Tang ZY. Hepatocellular carcinoma with obstructive jaundice: diagnosis, treatment and prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:385-391
- 7 Misra S, Melton GB, Geschwind JF, Venbrux AC, Cameron JL, Lillemoe KD. Percutaneous management of bile duct strictures and injuries associated with laparoscopic cholecystectomy: a decade of experience. *J Am Coll Surg* 2004;198:218-226

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 •

改良腹水采集法自体回输治疗肝硬化难治性腹水 51 例

肖绍树, 边湘艳, 贺降福, 陈红

肖绍树, 边湘艳, 贺降福, 陈红, 黄石市五医院消化内科
湖北省黄石市 435005通讯作者: 肖绍树, 435005, 湖北省黄石市新下陆, 黄石市五医院消化内科.
电话: 0714-5333920

收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-16

摘要

目的: 改良腹水采集法自体回输治疗肝硬化难治性腹水的方法及价值.

方法: 从腹腔穿刺针送入硅管引流腹水直接回输治疗肝硬化难治性腹水 51 例.

结果: 51 例肝硬化难治性腹水经腹水直接回输治疗, 显效者 15 例, 占 29.4%, 有效者 27 例占 53.7%, 无效者 9 例, 占 16.9%, 本组有效率为 83.1%.

结论: 改良腹水采集法自体腹水回输治疗肝硬化难治性腹水疗效满意, 方法简便, 经济实用.

肖绍树, 边湘艳, 贺降福, 陈红. 改良腹水采集法自体回输治疗肝硬化难治性腹水 51 例. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1036-1037
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1036.asp>

0 引言

对肝硬化腹水的治疗如卧床休息, 限制钠和水的摄取, 补充白蛋白、积极护肝, 除去诱发因素同时加用利尿

剂, 大多数肝硬化患者腹水能消退, 但仍有 5-10% 的肝硬化患者在无肾功能不全的情况下, 对大剂量的利尿剂和限制钠摄入几乎无治疗反应, 这些肝硬化腹水被定义为难治性腹水. 腹水直接回输是治疗难治性腹水的一种方法. 目前国内外采集腹水的方法是行腹腔穿刺成功后, 将针头固定在腹壁上, 放腹水于无菌瓶中. 我科对 51 例肝硬化难治性腹水, 行腹腔穿刺成功后, 从穿刺针孔内送一根硅胶管达腹腔, 拔出穿刺针, 留置硅胶管于腹腔, 持续性排放腹水, 供直接回输治疗肝硬化难治性腹水, 疗效满意, 方法简便, 经济实用, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 肝硬化难治性腹水 51 例, 男 38 例, 女 13 例. 年龄 28-61 岁, 平均 45 ± 5.5 岁, 腹水出现时间 2-7 (平均 3.5) a, 并胸水 12 例. 诊断依据病史, 临床体检、B 超、CT 和实验室检查符合肝硬化难治性腹水, 排除感染性腹水、癌性腹水、严重肝功能损害、重度黄疸及凝血机制障碍者; 严重心肺功能不全、肝昏迷或近期有食管静脉曲张破裂出血者.

1.1.2 器械 (1) 穿刺用 20 号针头 1-2 个. (2) 备长 30-40 cm 内径 1.0-1.2 mm 硅胶管一根, 前端剪成与穿刺针头斜面相吻合, 斜面距入腹腔先端 3-6 cm 间平面上剪 2-3 个

小孔,另端接短臂注射针头。(3)引流皮管一根长约1 m,一端接腹腔穿刺引流短臂针头,另一端接腹水瓶,全密封。(4)备弯盘一个,治疗巾一块,血管钳2把,纱布若干块,一并打包高压灭菌。

1.2 方法

1.2.1 患者术前排空小便,取仰卧位,于侧下腹为穿刺点,常规消毒,局麻后穿刺,穿刺成功后,通过穿刺针头把引流管送入腹腔15-18 cm深后,拔出穿刺针头,保留硅胶管并固定在腹壁上,另端接腹水胶管流入空瓶内。用调控器控制腹水流速,灌满第1瓶后即开始回输,开始20-30滴/min,半小时后,如无不良反应,则逐渐调至50-60滴/min。在输入第1瓶腹水中加入地塞米松10 mg,庆大霉素8万单位。第2瓶再加入庆大霉素8万单位。排放腹水与回输腹水同步进行,其速度基本一致。当腹水回输2 000-3 000 mL后尚不见尿量增多,加用20-40 mg速尿入瓶,以加速利尿效果,出现利尿后应补钾。腹水回输时间一般不超过72 h。间断1-2 wk可再次回输。拔管后穿刺点用消毒的橡皮盖压迫,防止外漏,然后盖上敷料并包扎多头腹带。

1.2.2 疗效标准 (1)显效:腹水消退,不用利尿剂,可自发利尿,腹水不再起,肝功能基本恢复正常,能参加一般劳动,随诊半年以上病情稳定。(2)有效:腹水消退或基本消退,对利尿剂重新敏感,间歇或小剂量利尿剂配服可巩固疗效并能正常生活6 mo以上。(3)无效:经腹水回输消退后又较快积聚,症状、体征、肝功能改善不显,随访3-6 mo或因并发症死亡。

2 结果

本组51例经腹水直接回输治疗1次者35例,2次者11例,3次者5例。一次回输总量最少为5 000 mL,最多为20 000 mL,平均为8 500 mL。按本文拟定的标准显效者15例,占29.4%,有效者27例占53.7%,无效者9例占16.9%,本组有效率为83.1%。

3 讨论

肝硬化腹水的发生十分复杂,泛滥学说与有效血容量不足学说各持己见,均有一定依据^[1]。但晚期肝硬化腹水患者,其主要原因是有效血容量减少,重要脏器尤其是肾脏处于灌注不足状态,肾交感神经活动亢进,有多种活性物质分布异常,如腹水中有一种“类洋地黄物质”^[2],他与肾性钠潴留有关,为Na⁺、K⁺-ATP酶抑制剂;心钠素又称心房肽^[3],是心血管释放的含钠多肽,具有抑制醛固酮释放,扩张血管,增加肾血流量和肾小球滤过率的功能;内皮素是目前已知最强的内源性缩血管活性肽^[4],在肝硬化腹水时具有利钠效应。腹水回输使腹水中的以上血

管活性物质进入体循环,经过肾脏等器官调节,使其紊乱状态得以改善,有利于恢复其正常生理功能。本组难治性肝硬化腹水患者腹水回输前均表现为纳差、口干、尿少、皮肤干燥、血压偏低,腹水回输治疗后均有不同程度得以改善。此外,张力性腹水可导致下肢血液回流障碍及肾脏淤血,膈肌抬高压迫心脏可起到类似缩窄性心包炎的作用,使血流动力学方面失调进一步恶化。此时如再继续采取限水与强烈利尿的治疗方法,不但难于奏效,而且会促使肝肾综合征的发生。本组中有3例因限水,应用大剂量利尿剂,出现肝肾综合征,经自体腹水回输后出现自发性利尿作用。因此,在重症肝硬化腹水病例中,医源性肾衰的问题不容忽视。总之,在对待肝硬化难治性腹水的治疗,必须强调扩容以纠正有效血容量不足与改善肾脏血流灌注,从而发挥肾脏的调节作用。而自体腹水回输治疗肝硬化难治性腹水既不同于单纯排放腹水那样对症治疗,也不同于输注蛋白制剂,提高胶体渗透压减少腹水形成和应用利尿剂,而是同时遵循了清除腹水和扩容两大治疗原则,又使腹水和血管活性物质进入体循环可逆转了发生腹水的某些病理生理环节,不仅在理论上是合理的,实际疗效是可靠的。本组有效率为83.1%。目前国内采集腹水的方法是^[5-6],用无菌静脉输液管的16号针头按常规行腹腔穿刺,穿刺成功后,将针头固定在腹壁上,另一端接无菌盐水瓶,待腹水引流到一定量后,进行回输。本改良法采取腹水是采用20号穿刺针头,穿刺成功后,从穿刺针孔内送入一根硅胶管达腹腔,见腹水排出后,拔出穿刺针,将硅胶管固定在腹壁上,进行持续性引流腹水。本方法具有以下优点:(1)无金属穿刺针固定在腹壁上,避免了留置针头对肠管的损伤作用。(2)排放腹水与回输腹水同步进行,用调节器控制其速度,符合生理要求,避免了先一次或快速排出大量腹水后回输容易引起有效血容量骤减导致心排出量和肾血流量急剧下降,可发生肾功能衰竭,也避免了快速回输容易诱发食管胃底静脉曲张破裂出血和心衰及肺水肿。(3)若停止回输,可堵塞引流管,患者可暂时休息,也能下床活动,恢复回输,即可打开引流,不需再次穿刺,也减少腹腔感染。

总之,腹水直接回输治疗肝硬化难治性腹水疗效可靠,本改良法采取腹水,操作简便,经济实用,值得推广。

4 参考文献

- 1 王家龙. 重视肝硬化腹水的临床研究. 中华消化杂志 2004;4:193
- 2 戴新新. 肝硬化腹水回输后的利钠作用. 中华消化杂志 1989;9:11
- 3 姜慧卿, 姚希贤, 刘宏群. 自身腹水回输对肝硬化患者血浆心钠素和肾素的影响. 中华内科杂志 1991;30:622-623
- 4 吕晓峰. 自体腹水回输治疗顽固性肝硬化腹水64例. 中西医结合肝病杂志 2004;14:51-52
- 5 叶维法. 肝病治疗学. 天津: 天津科学技术出版社. 1990:416-417
- 6 漆德芳. 肝硬化. 北京: 北京科学技术出版社. 2000:507-508

重症急性胰腺炎术后感染的再手术探讨

孙 备, 姜洪池, 孟庆辉, 王 刚, 许 军, 赵金朋, 刘 昶

孙备, 姜洪池, 孟庆辉, 王刚, 许军, 赵金朋, 刘昶, 哈尔滨医科大学附属第一医院普外二科, 黑龙江省哈尔滨市 150001

通讯作者: 孙备, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院普外二科. sunbei70@tom.com

电话: 13603656935

收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-10

摘要

目的: 探讨重症急性胰腺炎(SAP)手术后感染致再次手术的原因、指征、时机及技术要点。

方法: 分析总结我院1992-07/2004-12期间收治的34例SAP手术后感染致再次手术患者。

结果: 早期手术后致继发感染14例(41.2%), 中转手术后致残余感染20例(58.8%)。再次手术距首次手术4-45 d, 平均22 d。再次手术均行清创、置管引流加灌洗。再次手术死亡6例(17.6%), 原因为多器官功能衰竭4例, 脓毒败血症2例。

结论: 外科医师应正确掌握SAP术后感染的再次手术指征, 适时地把握好手术时机, 做好充分的术前准备, 再手术宜早, 术式宜个体化, 灵活运用, 简捷实效。

孙备, 姜洪池, 孟庆辉, 王刚, 许军, 赵金朋, 刘昶. 重症急性胰腺炎术后感染的再手术探讨. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1038-1040
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1038.asp>

0 引言

在重症急性胰腺炎(SAP)的综合治疗手段中, 外科手术仍然具有不容忽视的作用^[1]。然而, 由于SAP自身的病理特点, 术后许多病例导致继发感染或残余感染, 常常需要再次手术清创、引流^[2]。如何有效地把握SAP术后感染再手术的时机、指征及手术要点, 是提高SAP治愈率的关键环节。我们结合近年来治疗SAP的体会, 提出对SAP术后感染致再手术治疗的一些看法。

1 材料和方法

1.1 材料 1992-07/2004-12 我院收治SAP患者246例, 均符合全国统一的SAP诊断标准^[3], 其中手术治疗128例。SAP术后感染致再次手术34例(26.6%): 男20例, 女14例, 年龄22-72岁, 平均48.3岁。34例再次手术中, 2次20例, 3次8例, 4次4例, 5次2例。其中首次手术为外院转入8例。

1.2 方法 首次手术术式: 经腹腔镜减压、引流、灌洗2例; 胰被膜切开加胰周腹腔多管引流、腹腔灌洗8例; 胰被膜切开加胰腺坏死组织清除16例; 胰被膜切开加胆道引流4例; 胰被膜切开加胰周腹腔多管引流联合经后腰部

腹膜后引流4例。

2 结果

SAP术后感染再次手术的原因: 早期手术后致继发感染14例(41.2%), 中转手术后致残余感染20例(58.8%)。再次手术距首次手术4-45 d, 平均22 d。再次手术均行清创、置管引流加灌洗。再次手术死亡6例(17.6%), 原因为多器官功能衰竭4例, 脓毒败血症2例(合并真菌感染)。

3 讨论

3.1 SAP术后感染的原因

3.1.1 SAP早期手术后致继发感染 SAP行早期手术引流, 由于手术操作、引流或术后换药, 医源性带入细菌或增加细菌感染几率, 导致继发感染。目前早期手术的病例主要有四类: (1) 极少数医院仍坚持过去的观点: “一旦确诊为SAP后, 即行早期手术, 以充分对胰腺实质减压, 清除坏死组织, 从而达到改善和缓解胰腺病理进程为目的”。本组5例, 均在外院实施首次手术。(2) 术前难以排除其他原因急腹症的患者(胃肠道穿孔、肠系膜血管病变及肠扭转等), 术中才发现系SAP(本组1例)。(3) 暴发性胰腺炎(FAP)早期虽经非手术治疗, 但脏器功能仍出现进行性损害或腹内高压及腹腔间室综合征难以缓解, 行急诊手术缓解腹内高压。本组4例, 其中2例为经腹腔镜置管减压。(4) 胆源性胰腺炎有胆道梗阻者行急诊手术解除胆道梗阻(本组4例)。

3.1.2 SAP中转手术后致残余感染 SAP继发感染或胰周脓肿行中转手术引流后, 因引流不畅或胰腺继续坏死感染导致残余感染(本组20例), 其原因有: (1) 首次手术引流时, 尽管术中尽可能清除坏死组织, 但由于坏死组织界线不清, 已经软化、化脓的部分便于清除, 但硬结或尚未软化的组织不易清除, 同时胰腺外观并不一定反映出实质深处的病变, 故首次手术时很难达到彻底清除坏死组织的目的; 而且术后的多管引流并不能排出多量、硬质的坏死组织, 导致残余感染的发生。(2) 首次探查引流不充分, 胰尾脾门处、横结肠系膜根部及腹膜后的坏死组织及脓肿常会漏诊, 或因引流不畅, 导致感染扩大或长期残留感染。(3) SAP的病理特性是渐进性、多层次、复杂多变的, 个体差异较大, 胰腺坏死可以引发感染, 感染亦可加重坏死或继续坏死, 因此个别SAP可表现为病变广泛、弥漫, 反反复复以至病变迁延, 难以仅经历一次手术即治愈。

3.2 SAP术后感染的再手术

3.2.1 手术指征 SAP术后感染的再手术指征为: 术后体温

持续发热不退或退而复升,脉快,白细胞计数增高,核左移;胃肠胀气、肠鸣音减弱不见缓解;引流管或伤口持续有脓液排出,虽经反复冲洗不见改善;B超或CT提示有残余感染或脓肿存在。

3.2.2 手术时机 一旦确认为具备SAP术后感染的再手术指征,即要考虑手术时机的选择。有学者认为,再手术的时机应尽量把握晚些,使腹内残余感染病灶局限化,便于一次性彻底清除坏死组织、充分引流^[4]。但我们的观点是,具备手术指征应及时、果断手术,宁早勿晚,力争恰到好处地掌握手术时机,不要存在侥幸心理,以致延长病程,出现腹腔内出血、肠瘘及全身脓毒败血症等严重并发症。本组4例死于多器官功能衰竭的患者,主要原因是未适时地把握住再次手术时机,酿成难以挽回的后果:2例首次手术后引流管持续性排出脓汁(每日量>500 mL),伴发热及白细胞计数升高,拖延至6 wk后方手术,术中发现肠瘘及腹腔内出血;2例为首次手术后引流液减少直至消失,但仍呈腹胀、间歇性发热及寒战,延误至8 wk后方手术,发现腹腔内存在多发残余脓肿。可见,一味地拖延再手术,一等再等,很容易错失最佳手术时机。

3.2.3 充分的术前准备 (1)窦道造影。为了进一步了解残余感染的范围,首先必须作一次有效的造影。有引流管者暂拔除引流管,用注射器直接顶住窦道口加压推注造影剂,造影剂中可加入美蓝以便于再手术时示踪,将残腔及各窦道分支均显示清楚,行正侧位摄片。造影时,手术医师一定要亲自参加,以了解残腔的立体解剖及其与邻近脏器的关系,或是否存在胰瘘或胃肠瘘的情况。(2)CT及B超检查。如腹壁已无窦道口,则必须要有近期的CT摄片,以便从CT上明确残腔及坏死组织的部位和范围。这是指导再手术清除坏死组织、引流残腔的重要依据。B超对确定残余感染、脓肿的部位和范围亦很有帮助。(3)纠正内环境紊乱,调整术前营养状态。此时的患者经历一次手术后,往往残留单个或多个窦道口长期不愈,加之低热、腹胀等慢性消耗,患者常合并离子紊乱、酸碱代谢失衡及贫血、低蛋白、负氮平衡、毒血症或多脏器功能损害,需要积极予以纠正。(4)加强真菌感染的防治。此阶段的患者极易合并真菌感染,因为此时广谱抗生素使用已近1 mo,患者的免疫力已明显下降。深部真菌感染的治疗关键是诊断问题,因为血培养阳性的机会很少,所以首先要了解深部真菌感染的临床症状。早期为精神状态改变,开始为烦躁或抑郁,后来为昏迷。其次,若痰、尿、粪、胆汁、腹腔渗液中有三处涂片或培养显示真菌阳性,且属同一菌种,即使血培养阴性,也应作为深部真菌感染进行治疗。2例死亡病例,血培养均见G⁻菌及真菌培养阳性,由此可见细菌合并真菌感染之致命性。现在我们从发病后第3 wk开始就使用大扶康作为真菌感染预防用药,取得显著效果。

3.2.4 再手术要点 再手术的原则是简捷有效、创伤小,

以达到扩创、充分引流残腔和彻底清除坏死组织目的为准,不要企图大范围清扫;充分借助首次手术的切口、窦道或引流途径,因势利导,不能采取强硬方法。(1)切口位置的确定:根据窦道造影摄片或CT摄片,确定残余感染存在的部位和范围。对有腹壁窦道口者,可沿着窦道中美蓝的行踪逐步扩大切开,找到坏死组织或感染病灶的部位^[5]。如没有腹壁窦道口,则根据CT所示的残余病灶部位、结合临床体征设计切口,切口越接近残余病灶处越好,不要拘泥于正规的切口类型。再手术常见的切口(很多情况下是在原切口的基础上扩大)有:(1)经前入路和左后上腰联合引流:适用于胰周坏死组织感染伴左结肠后区积液积脓的病例(本组6例);(2)经前入路和右后上腰联合引流:适用于胰周坏死组织感染伴右结肠后区积液积脓的病例(本组8例);(3)经前入路和左、右后上腰联合引流:适用于胰周坏死组织感染伴左、右结肠后区积液积脓的病例(本组12例);(4)经前入路和左或右的“大麦氏切口”联合引流:适用于胰周坏死组织感染伴左、右结肠旁沟下部积液积脓的病例(本组8例)。多切口联合引流的优点在于:便于从高到低、从前到后、从上到下“对吻”冲洗、引流;便于引流“捷径”、“低位”引出的原则。切口的大小以可容术者一手拳为宜,便于手指触摸探查。(2)探查处理残腔:(a)经腹部切口者打开腹腔后或沿原切口入腹,首先设法进入小网膜腔,然后根据预先设计的部位及方向,用手指对薄弱的部位进行分离探查。分离和探查时动作一定要轻柔。延长切口时,千万不能如同其他普通手术一样贸然经皮肤向深面切开,稍有不慎,极易损伤粘连的空腔脏器,一定要沿着在腹腔中探查的手指逐步逐层切开。如联合左后上腰引流,必须离断脾结肠韧带和部分左结肠旁沟的后腹膜方能达到左结肠后区。(b)找到残腔后,用卵圆钳清除残余的坏死组织,特别是分叉的小腔隙中的坏死组织,如有遗留,将会再次产生残余感染的症状。但要注意,若有部分坏死组织分界不清,取出有困难时,不要硬拉,否则容易出血。在残腔内若有大出血,处理很困难,仅能依靠速即纱或纱布填塞压迫止血。由于炎性组织都承受不起钳夹或缝合,应用软硬结合的力量,将能分开的尽量取出,不能勉强。吸引器的吸力不要太大,也不要紧贴炎性的坏死组织来吸,以免引发出血。(c)取出主要残腔的坏死组织后,必须将分隔的小残腔用钝性方法逐一敞开,不留“死角”,取尽残余感染的坏死组织,然后放置有效的引流管。每个切口至少要放置2枚软质、粗口径的乳胶管,以保证术后能持续冲洗及吸引。如前入路和左后上腰联合引流,即要将前入路和左后上腰切口在腹内形成“会师”,并将从前入路置入的引流管从左后上腰部切口引出。切口要部分畅开,不要全部缝闭,以便于术后继续取出残留组织及换药。(d)如发现残余感染腔与肠腔等相通,有时在术前造影时也证实与肠腔相通,则需按肠瘘要求进行恰当处理。发现瘘口后,最好在

距离瘘口最近处另放置引流管(以黎氏引流管为佳),既有利于瘘口自行愈合,又可将瘘口与大的感染创口分割开,避免相互影响。

SAP术后继发感染或残余感染是临床中较为常见的外科问题,其处理并不十分困难,关键在于没有得到外科医师真正重视,以致一拖再拖,使感染病灶向周围组织扩展,甚至累及邻近器官、导致严重并发症。因此,外科医师应适时地把握好SAP术后感染再次手术的时机,再手术宜早,术式宜个体化,灵活运用,简捷实效。

4 参考文献

- 1 孙备,姜洪池,许军,朴大勋,赵金朋.重症急性胰腺炎手术治疗的经验.中华肝胆外科杂志 2001;7:536-539
- 2 封光华,夏金声,徐铨.坏死性胰腺炎再手术的探讨.中国普通外科杂志 1997;16:101-102
- 3 姜洪池,孙备,张伟辉,许军,乔海泉,赵金朋.重症急性胰腺炎手术时机及手术指征的探讨(附172例报告).中华肝胆外科杂志 2000;6:127-128
- 4 严律南,刘续宝.急性胰腺炎继发感染的再次手术.现代手术学杂志 1998;3:6-7
- 5 袁祖荣,张圣道.急性坏死性胰腺炎术后残余感染的处理.中国普通外科基础与临床杂志 1998;5:360

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 •

原发性肝癌自发破裂的诊治 16 例

熊肇明,蒋 逊,贺 健,张 逊,叶世会

熊肇明,蒋逊,贺健,张逊,叶世会,同济大学附属第十人民医院普外科上海市 200072

通讯作者:熊肇明,200072,上海市闸北区延长中路301号,同济大学附属第十人民医院普外科. xiongzhao ming@citiz.net

电话:021-66300588-3650 传真:021-56657557

收稿日期:2004-12-10 接受日期:2004-12-21

摘要

目的:探讨原发性肝癌自发破裂的诊治。

方法:回顾性总结了1986-05/2004-08收治的原发性肝癌自发破裂16例临床资料。

结果:6例保守治疗,10例手术治疗。保守治疗患者5例在1 mo内死亡,1例存活3 mo;手术治疗患者9例为单个癌灶,平均直径8.16 cm,1例为两个癌灶,直径分别为7 cm、2 cm,且为原发性肝细胞癌并横纹肌肉瘤,2例误诊为急性阑尾炎,1例误诊为消化道穿孔。10例手术治疗者中位生存期10 mo,最长已5 a,仍存活,2例已8 mo,仍健在。

结论:急腹症患者应行腹腔穿刺、急诊B超或CT等,对肝脏有多发肿瘤,应考虑有同时性多原发癌可能,对原发性肝癌自发破裂若有切除可能均以手术切除为宜。

熊肇明,蒋逊,贺健,张逊,叶世会.原发性肝癌自发破裂的诊治16例.世界华人消化杂志 2005;13(8):1040-1041

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1040.asp>

0 引言

自发性破裂是肝癌严重并发症之一,其发生率为2.5-

20%^[1-2]。由于本病发病突然、急剧,且常伴休克,故其治疗困难,预后较差。现就我院1986-05/2004-08诊治原发性肝癌自发破裂进行回顾性分析。

1 材料和方法

1.1 材料 1986-05/2004-08诊治的原发性肝癌自发破裂16例病例。

1.2 方法 对16例原发性肝癌自发破裂的临床资料进行总结分析。

2 结果

本组16例,男15例、女1例,平均年龄55.3岁。6例保守治疗,男5例,女1例,平均年龄64岁;10例手术切除,均为男性,年龄36-72岁,平均年龄50.9岁。9例为急腹症入院,均为单发,直径3.5-15 cm,平均8.16 cm,中位直径6 cm,1例腹部平片提示左膈下可疑游离气体,误诊为“消化道穿孔”,2例误诊为“急性阑尾炎”,余6例均为出血性休克。另外1例为术中发现2个肿瘤,一处破裂直径7 cm,另一处包膜完整,直径2 cm,术后病理示:肝横纹肌肉瘤、肝细胞性肝癌。所有患者均为HBsAg(+),术中出血量1 000-4 000 mL,平均出血2 700 mL。有2例手术死亡,余8例生存2-61 mo,平均16.5 mo,中位生存期10 mo。2例因腹腔种植转移再次手术切除,生存均在3 a以上,其中1例已5 a,仍存活,另有2例已8 mo,仍健在。

3 讨论

3.1 肝癌破裂的发生机制 肝癌破裂多见于结节型及块状型肝癌, 尤其合并有肝硬化者, 弥漫型肝癌少见. 本组9例手术患者均为块状型, 肿瘤直径平均8.16 cm, 1例为同时性多原发癌. 其破裂发生主要是肿瘤快速生长造成瘤体缺血坏死和液化并可继发感染, 肿瘤在发展中还可侵犯周围血管及形成癌栓堵塞肝静脉造成输出道梗阻等, 都可使瘤体内的压力急剧增高导致结节自发破裂, 或者受外力作用, 甚至腹内压改变均可发生破裂出血. 发生破裂出血的癌结节多位于肝脏表面的外生性结节, 不完全取决于肿瘤的大小. 本组有3例癌结节直径小于5 cm发生自发破裂, 但有报道^[3]破裂组的肿瘤直径显著大于非破裂组(中位直径10.5 cm vs 6.0 cm, $P<0.05$). 朱立新 *et al*^[3]通过试验认为乙肝病毒感染所造成的抗原抗体复合物沉积及小动脉炎的损伤可能与肝癌自发性破裂的病因有关. 其抗原抗体复合物沉积的原因尚有待于进一步研究.

3.2 肝癌破裂的诊断 大多数肝癌破裂患者急诊就诊时就出现腹痛、休克表现, 经腹壁穿刺、急诊B超、CT检查常可确诊. 但由于肝破裂出血可沿横结肠与升结肠旁沟流至右下腹, 再沿小肠系膜根部扩散及全腹, 同时出现转移性右下腹痛, 临床易误诊为急性阑尾炎. 又肿瘤坏死液化感染而破溃, 尤以产气杆菌感染破溃可出现膈下游离气体而误诊为消化道穿孔. 本组有2例误诊为“急性阑尾炎”, 1例为“消化道溃疡穿孔”, 究其原因可能与患者就诊时尚未出现休克, 接诊医生考虑不周未做进一步检查有关. 因此, 对急腹症患者进行腹腔穿刺、急诊B超、CT检查实属必要. 另外, 对B超及CT提示肝脏多发占位病变的患者不要误以为是肝癌肝内转移, 要考虑有同时性多原发癌的可能. 本组有1例为肝脏多原发恶性肿瘤, 提示今后临床应引起重视.

3.3 肝癌破裂的治疗 传统观点认为, 肝癌破裂腹腔出血

有癌细胞腹腔种植播散倾向, 属肝癌晚期表现, 加上患者常合并出血休克, 情况比较紧急但不一定有肝外科医生一起参加, 临床往往采用姑息性治疗措施, 如出血处缝扎或纱布压迫止血等. 但姑息性治疗预后较差^[1]. 近年来亦有肝动脉化疗栓塞(TACE)治疗的报道^[4-6], 但肝动脉化疗栓塞对明显外生长型肝癌疗效很有限, 他尚有诱发肿瘤缺血坏死再出血的可能^[5]. 即使肝动脉化疗栓塞使破裂的肝癌达到止血的目的, 可残留在腹腔之大量血液是否会引起相应并发症, 未见报道, 尚须进一步探讨. 我们认为对单个肝癌破裂无论是小肝癌还是大肝癌均应手术切除, 若多个肝癌如局限在一段、一叶、左半或右半肝, 应首选手术切除. 术中除吸除腹腔内积血外, 若用42℃左右蒸馏水浸泡腹腔15 min以上, 还可减少腹腔种植转移机会. 确无切除可能, 肝动脉化疗栓塞是一种控制出血延长生命的较好方法.

3.4 肝癌破裂的预后 从本组病例来看, 保守治疗6例, 5例在1 mo内死亡, 仅1例存活3 mo, 而10例手术切除患者中位生存期10 mo, 有2例因腹腔种植转移再次手术切除, 生存均在3 a以上, 其中1例已5 a, 仍存活. 因此若能手术切除可为今后再次治疗(如肝动脉化疗栓塞、复发癌手术切除等)打下基础, 以达到延长患者生存期之目的.

4 参考文献

- 1 郑起, 阎均. 肝癌破裂出血急诊治疗策略. 肿瘤 2003;23:414-416
- 2 汤钊猷, 余业勤. 原发性肝癌. 第二版. 上海: 上海科学技术出版社, 1999:334
- 3 朱立新, 耿小平, 范上达. 肝癌自发性破裂与抗原抗体复合物的血管沉积. 中华肝胆外科杂志 2001;7:647-676
- 4 王颖勃, 徐忠立. 原发性肝癌自发性破裂出血. 肝胆外科杂志 2002;10:36-38
- 5 张将, 王素珍. 原发性肝癌破裂出血栓塞治疗6例. 华人消化杂志 1998;3:262
- 6 王海波, 王天玉, 刘一强, 王霞, 刘俊忠. 肝动脉化疗栓塞术治疗肝癌破裂出血. 中国微创外科杂志 2004;4:324-325

编辑 张海宁

诱导型一氧化氮合酶在人食管鳞癌中的表达

张林西, 金春亭, 齐凤英, 左连富, 刘江惠, 石卫东, 李海军, 李玉珍

张林西, 金春亭, 李海军, 李玉珍, 河北北方学院病理学教研室
河北省张家口市 075029
齐凤英, 左连富, 刘江惠, 河北医科大学病理教研室
河北省石家庄市 050017
石卫东, 河北省人民医院病理科 河北省石家庄市 050051
河北省自然科学基金课题, No. 301351
通讯作者: 齐凤英, 050017, 河北省石家庄市中山东路361号, 河北医科大学病理学教研室. qifengying1945@yahoo.com.cn
电话: 0311-6265734
收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-03

摘要

目的: 研究 iNOS 基因在我国食管鳞癌中的表达特点及 iNOS 基因表达与 PCNA 表达的关系, 探讨 iNOS 基因在食管癌变中的可能作用。

方法: 应用原位杂交、流式细胞术对 81 例食管鳞癌中 iNOS 及 PCNA 基因的表达进行检测, 并应用图像分析技术对原位杂交结果进行定量分析。

结果: iNOS mRNA 在正常食管鳞状上皮几乎无表达, 在异型增生上皮近基底细胞有少量表达, 而在鳞癌细胞中有明显阳性表达, 癌细胞胞质呈棕黄色颗粒状。原位杂交定量分析及流式细胞术结果都显示: iNOS 在正常食管上皮表达微量, 在异型增生上皮明显增高, 而在不同分化鳞癌中表达都较高, 在低分化鳞癌中表达最高, 组间差异非常显著 ($F = 14.001, P < 0.01$)。PCNA 表达也是随分化程度的降低而明显增高, 组间差异显著 ($F = 20.393, P < 0.01$)。且 iNOS 与 PCNA 表达呈显著正相关 ($r = 0.292, P = 0.009$)。

结论: 在食管鳞癌中 iNOS 基因表达显著增高, iNOS 基因表达异常与食管上皮癌变密切相关。

张林西, 金春亭, 齐凤英, 左连富, 刘江惠, 石卫东, 李海军, 李玉珍. 诱导型一氧化氮合酶在人食管鳞癌中的表达. 世界华人消化杂志. 2005;13(8):1042-1044
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1042.asp>

0 引言

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 并且有局部地区高发的特点, 严重威胁着我国高发区人民的生命和健康。食管癌的发生可能是多种因素综合作用的结果^[1]。长期慢性炎症可能是恶变的一个重要原因^[2]。iNOS (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 是重要的炎症诱导酶。近年研究发现, NOS 尤其是 iNOS 与肿瘤的发生有关^[3-8]。目前关于 iNOS 基因在食管鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) 中的表达状况及其可能的作用, iNOS 基因表达与细胞增殖基因 PCNA 表达关系的报道还较少见。因此, 我们运用原位杂交 (*in situ* hybridization,

ISH)、流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 等方法, 对食管癌手术切除标本中 iNOS 基因的表达状况进行了研究, 以探讨其在我国食管 SCC 中的表达特点及其可能的作用, iNOS 基因表达与细胞增殖基因表达的关系, 为食管癌的化学预防及临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例 河北医科大学第四医院 2001-08/2001-11 食管癌患者手术切除标本共计 81 例。男 50 例, 女 31 例, 年龄 30-71 岁, 平均年龄 55 ± 0.6 岁。其中高分化鳞癌 39 例, 中分化鳞癌 18 例, 低分化鳞癌 24 例。同时取切端正常食管黏膜 5 例, 癌旁组织 10 例。术后立即取材, 以 40 g/L 多聚甲醛/0.1 mol/L PBS (pH 7.2) (内含 0.1% 焦碳酸二乙酯) 固定约 3 h, 常规脱水、浸蜡、包埋, 并进行连续切片, HE 染色, 由二位富有经验的病理医师分别进行病理组织学分级诊断。同时在相同部位取材, 以 700 mL/L 冷乙醇固定, 进行流式细胞仪检测。癌旁上皮经组织学证实都有明显的不典型增生。患者术前未经放疗或化疗。

1.1.2 试剂 iNOS mRNA 原位杂交试剂盒购自博士德生物工程公司。探针序列为 5' -GTGGC GTAAA GTATG TGTCT GCAGA TATGC TGGAA-3'; 5' -GAAGC CATGA CCTTC CGCAT TAGCA CAGAA GCAAA-3'; 5' -TCTTC GGGCT TCAGG TTATT GATCC AAGTG CTGCA-3'。抗 iNOS 抗体为兔抗人多克隆抗体, 抗 PCNA 抗体为小鼠抗人单克隆抗体, 均为 Santa Cruz 产品; 羊抗兔 FITC-IgG、羊抗鼠 FITC-IgG 为 Jackson Immunoresearch 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 iNOS mRNA 原位杂交 石蜡切片常规脱蜡、水化, 双氧水处理封闭内源性过氧化物酶。继以按原位杂交试剂盒说明书进行检测, 个别步骤反应时间加以调整。以已知阳性切片作为阳性对照, 以反应中不滴加 mRNA 探针作为阴性对照。显微镜下观察, 阳性对照片充分显色后立即终止反应。

1.2.2 iNOS 及 PCNA 基因蛋白流式细胞仪检测 具体方法按文献[9]进行。

1.2.3 原位杂交结果定量分析 对原位杂交染色结果利用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统进行灰度测量分析, 将原位杂交染色结果转化为灰度值进行定量分析。每张原位杂交切片以组织间质空白处入射光的值作为定标。每张切片测定 5 个视野 (10×20), 分别测定间质灰度及癌巢 (或上皮) 灰度, 取平均值, 以净灰度值做为本例切片的测定值。

测定值 = 间质灰度值 - 癌巢(或上皮)灰度值。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件进行统计分析。对于原位杂交及FCM检测结果,各组间显著性检验采用单因素方差分析(ANOVA),组间多重比较采用Scheffe法。基因表达之间的相关分析采用Pearson法。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 iNOS基因在食管鳞癌及异型增生上皮细胞中的表达 ISH检测可见, iNOS mRNA在正常食管上皮无明显表达,癌旁异型增生上皮近基底细胞有少量表达,在不同分化的SCC癌细胞中都有明显的阳性表达,在癌细胞胞质中呈棕黄色颗粒状。对iNOS mRNA表达进行灰度测量分析,其表达在癌细胞浸润至黏膜层最高,浸润至外膜层时最低,随浸润深度的增加其表达呈递减趋势,但与癌细胞浸润深度无显著相关性($F = 1.076$, $P = 0.375$)。iNOS mRNA表达与分化程度显著相关($F = 10.011$, $P < 0.01$)。在正常上皮其表达很低(6.40 ± 2.70),在异型增生上皮表达稍高(15.30 ± 3.47),而在不同分化的SCC中表达都较高(表1),且随分化程度的降低其表达逐渐增高,在低分化SCC中表达最高。低分化组分别与正常、异型增生及高分化组间差异显著($P < 0.05$)。

FCM检测显示, iNOS表达在癌细胞浸润至黏膜层较高,而随着浸润深度的增加,其表达含量明显减少,在浅肌层、深肌层及外膜层很接近。组间差异无显著性($P > 0.05$)。iNOS在正常食管上皮表达微量,在异型增生上皮中表达明显增高,而在不同分化的SCC中表达都较高(表1),且分化程度越低,其表达含量越高,组间差异非常显著($F = 14.001$, $P < 0.01$)。特别是正常和异型增生组分别与不同分化SCC间差异显著($P < 0.05$)。

表1 iNOS和PCNA基因在食管鳞癌中表达的FCM及ISH检测(means \pm SD)

分组	n	FCM		ISH iNOS
		iNOS FI	PCNA FI	
(A)正常鳞状上皮	5	1.00 ± 0.03^a	1.00 ± 0.11^a	6.40 ± 2.70
(B)异型增生上皮	10	1.13 ± 0.14^c	1.02 ± 0.13^c	15.30 ± 3.47
(C)高分化鳞癌	39	1.44 ± 0.22	1.41 ± 0.20	27.11 ± 16.22
(D)中分化鳞癌	18	1.59 ± 0.28	1.48 ± 0.29	29.47 ± 10.16
(E)低分化鳞癌	24	1.65 ± 0.28	1.66 ± 0.20	41.54 ± 18.59^d

^a $P < 0.05$ vs C、D和E组;^c $P < 0.05$ vs C、D和E组;^d $P < 0.05$ vs A、B和C组。

2.2 PCNA在食管鳞癌及异型增生上皮细胞中的表达 FCM检测显示, PCNA表达与分化程度有关。在正常上皮及异型增生上皮中表达都较低,而在不同分化SCC中的表达都较高,且随分化程度的降低其表达明显增高(表1),组间差异非常显著($F = 20.393$, $P < 0.01$)。尤其是正常及异型

增生组分别与不同分化SCC各组间差异显著($P < 0.05$)。

2.3 基因表达的相关性分析 对FCM检测结果进行的相关性分析显示, iNOS与PCNA基因表达呈显著性正相关($r = 0.292$, $P = 0.009$)。

3 讨论

癌症是一个长期的多步骤、多因素变化过程,机体的某些遗传不足加上长期的某些环境因素可能改变宿主的遗传易感性。最近,有学者提出长期慢性炎症与癌变有关^[2,10-11]。体内某些部位长期慢性炎症可能为其发生癌变提供一个良好的环境。长期的慢性致癌源的刺激可使原癌基因激活和/或抑癌基因失活,二者可通过参与细胞周期的调控、信号传导、细胞分化及凋亡等事件,引起肿瘤的发生和发展。

NOS作为一氧化氮(nitric oxide, NO)合成的关键限速酶,其表达直接影响NO的合成。NO是细胞间信息传递的重要调节因子,生理状态下他在心血管、神经及免疫系统中具有重要作用。组织中NO产生异常与多种疾病的发生、发展有关^[12-16]。多项研究表明,慢性炎症中NOS过度表达可产生致突变的基因毒作用^[17]。在慢性炎症中iNOS被持续诱导激活^[18],产生一定量的NO,继而可产生多种有活性的中间产物,可能造成DNA损伤或DNA修复受阻,从而具有癌变潜能。

已在一些肿瘤组织中检测到iNOS表达上调^[19-23]。对于iNOS在食管SCC中的表达及其作用很少有报道。我们发现, iNOS在癌细胞仅限于黏膜层时表达最高,而癌细胞浸润至外膜层时最低。Tanaka *et al*^[24]研究也发现在非癌的食管鳞状上皮细胞层仅有微弱iNOS表达,在早期癌中iNOS的表达显著增加。提示iNOS表达增高参与食管早期癌的形成,可能是一早期事件。Wilson *et al*^[25]对Barrett食管及相关腺癌进行研究后认为, iNOS和COX-2参与Barrett's相关肿瘤的早期形成及进展。亚硝酸盐是形成食管癌的主要因素之一,最近,在亚硝酸盐诱导的大鼠食管肿瘤形成模型中证实,食管上皮iNOS的产生与食管肿瘤形成有关^[26]。iNOS表达在异型增生上皮中明显增高,而在不同分化的SCC中表达都较高,且分化程度越低,其表达越高。提示iNOS表达异常与癌细胞的生物学行为有关。有研究认为,合适浓度的NO环境可促进肿瘤的发生及转移^[19, 27]。Kagoura *et al*^[28]对皮肤癌研究发现, iNOS表达可能反映肿瘤细胞的增殖状态。本研究中iNOS表达与PCNA表达呈正相关,提示iNOS过度表达可促进食管癌细胞的增殖活性。

PCNA是DNA聚合酶的 δ 亚基,在细胞周期的G₁后期和S早期诱导合成,对细胞周期调控有重要作用。通过检测PCNA表达可客观估计肿瘤细胞增殖活性和判断预后^[29]。本研究中PCNA在正常上皮及异型增生上皮中表达较低,在不同分化的SCC中表达都较高,且分化程度越低,PCNA表达越高。说明SCC恶性程度越高,其增殖活性越

强. iNOS 的表达与 PCNA 表达呈正相关, 提示二者之间可能以某种方式相互作用, 促进细胞的分裂增殖.

有学者提出^[30], iNOS 和 COX-2 是对结肠癌进行化学预防的良好靶点. 动物实验已证实, 应用 NOS 选择性抑制剂可通过降低 NO 的产生显著抑制致癌剂诱导的大鼠食管肿瘤的形成及进展^[31]. iNOS 在食管 SCC 中过度表达且与 PCNA 表达有明显的协同作用. 因此, 有可能应用 iNOS 抑制剂对食管癌进行化学预防及辅助治疗. 中国食管癌的发生具有明显地域特征, 这也为应用 iNOS 抑制剂在高发区进行化学预防奠定了良好基础.

4 参考文献

- 1 王东旭, 李伟. 食管癌病因学进展. 世界华人消化杂志 2000;8:1029-1030
- 2 O'Byrne KJ, Dalglish AG. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br J Cancer* 2001;85:473-483
- 3 Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:2232-2240
- 4 Li HL, Sun BZ, Ma FC. Expression of COX-2, iNOS, p53 and Ki-67 in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1862-1866
- 5 Song ZY, Wen SQ, Peng JP, Huang X, Qian KD. Significance of vascular endothelial growth factor expression and its correlation with inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:1250-1255
- 6 Kasper HU, Wolf H, Drebbler U, Wolf HK, Kern MA. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in pancreatic adenocarcinoma: correlation with microvessel density. *World J Gastroenterol* 2004;10:1918-1922
- 7 Puhakka A, Kinnula V, Napankangas U, Saily M, Koistinen P, Paakko P, Soini Y. High expression of nitric oxide synthases is a favorable prognostic sign in non-small cell lung carcinoma. *APMIS* 2003;111:1137-1146
- 8 Niu XJ, Wang ZR, Wu SL, Geng ZM, Zhang YF, Qing XL. Relationship between inducible nitric oxide synthase expression and angiogenesis in primary gallbladder carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2004;10:725-728
- 9 齐凤英, 张林西, 韩彩丽, 左连富, 林培中, 郭建文. 食管上皮癌变过程中环氧合酶-2 表达上调. 世界华人消化杂志 2003;11:508-511
- 10 Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Huntingt)* 2002;16:217-226
- 11 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-867
- 12 陈玺华, 李正中, 鲍民生, 郑绘霞. 一氧化氮在大鼠肝缺血再灌注损伤中的作用. 世界华人消化杂志 1999;7:295-297
- 13 黄颖秋, 王昕, 李骢, 刘丽. 糖尿病患者一氧化氮水平与食管内 pH 值及食管动力变化的临床意义. 世界华人消化杂志 2000;8:374-376
- 14 郭津生, 古永亮, 王吉耀, 曹之宪. 结构型与诱导型一氧化氮合酶在大鼠胃窦癌模型中的表达和活性变化. 世界华人消化杂志 2001;9:288-292
- 15 Zhou JF, Cai D, Zhu YG, Yang JL, Peng CH, Yu YH. A study on relationship of nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation with chronic chole-cystitis. *World J Gastroenterol* 2000;6:501-507
- 16 王玉梅, 冯国和, 赵桂珍, 乔光彦. 肿瘤坏死因子- α 及一氧化氮对暴发性肝衰竭肝损伤的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:646-649
- 17 Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, Uchiyama A, Matsunari Y, Mibu R, Tanake M. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J Surg Oncol* 1999;70:222-229
- 18 Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol* 2001;2:149-156
- 19 Kawamori T, Takahashi M, Watanabe K, Ohta T, Nakatsugi S, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci by a nitric oxide synthase inhibitor. *Cancer Lett* 2000;148:33-37
- 20 Marrogi A, Pass HI, Khan M, Metheny-Barlow LJ, Harris CC, Gerwin BI. Human mesothelioma samples overexpress both cyclooxygenase-2(COX-2) and inducible nitric oxide synthase (NOS2): in vitro antiproliferative effects of a COX-2 inhibitor. *Cancer Res* 2000;60:3696-3700
- 21 Rajnakova A, Mochhala S, Goh PM, Ngoi S. Expression of nitric oxide synthase, cyclooxygenase, and p53 in different stages of human gastric cancer. *Cancer Lett* 2001;172:177-185
- 22 Liu CY, Wang CH, Chen TC, Lin HC, Yu CT, Kuo HP. Increased level of exhaled nitric oxide and up-regulation of inducible nitric oxide synthase in patients with primary lung cancer. *Br J Cancer* 1998;78:534-541
- 23 Son HJ, Kim YH, Park DI, Kim JJ. Interaction between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:383-388
- 24 Tanaka H, Kijima H, Tokunaga T, Tajima T, Himeno S, Kenmochi T, Oshiba G, Kise Y, Nishi T, Chino O, Shimada H, Machimura T, Tanaka M, Makuuchi H. Frequent expression of inducible nitric oxide synthase in esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 1999;14:1069-1073
- 25 Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998;58:2929-2934
- 26 Chen T, Stoner GD. Inducible nitric oxide synthase expression in N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced rat esophageal tumorigenesis. *Mol Carcinog* 2004;40:232-240
- 27 Brennan PA. The actions and interactions of nitric oxide in solid tumors. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:434-437
- 28 Kagoura M, Matsui C, Toyoda M, Morohashi M. Immunohistochemical study of inducible nitric oxide synthase in skin cancers. *J Cutan Pathol* 2001;28:476-481
- 29 Yu CC, Filipe MI. Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications. *Histochem J* 1993;25:843-853
- 30 Watanabe K, Kawamori T, Nakatsugi S, Wakabayashi K. COX-2 and iNOS, good targets for chemoprevention of colon cancer. *Biofactors* 2000;12:129-133
- 31 Chen T, Nines RG, Peschke SM, Kresty LA, Stoner GD. Chemopreventive effects of a selective nitric oxide synthase inhibitor on carcinogen-induced rat esophageal tumorigenesis. *Cancer Res* 2004;64:3714-3717

编辑 张海宁

拉米夫定对慢性乙型肝炎患者血清透明质酸水平的影响

韩群英, 刘正稳, 张妮, 朱凤群

韩群英, 刘正稳, 张妮, 朱凤群, 西安交通大学第一医院传染科
陕西省西安市 710061
陕西省科技攻关项目, No. 2000K14-G16
通讯作者: 刘正稳, 710061, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第一附属
医院传染科, zhengwenl@sohu.com
电话: 029-85324066 传真: 029-85226360
收稿日期: 2005-03-01 接受日期: 2005-03-22

摘要

目的: 探讨拉米夫定治疗慢性乙型肝炎对血清透明质酸水平的影响及其变化的临床意义。

方法: 6 mo 内未用过任何抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者 47 例, 用拉米夫定治疗 12 mo, 分别于治疗前、治疗的 3 mo、6 mo 和 12 mo 测定肝功能、乙型肝炎病毒(HBV)血清标记物、HBV DNA 和血清透明质酸水平。

结果: 拉米夫定可降低慢性乙型肝炎患者的血清透明质酸水平。在拉米夫定治疗过程中, 血清透明质酸水平随着肝功能的好转同步下降。在 12 mo 末, HBV DNA 水平阴转组与未阴转组治疗前的血清透明质酸水平无显著性差异, 但阴转组的血清透明质酸水平较未阴转组下降较早。HBeAg 阴转组治疗前的血清透明质酸水平明显高于 HBeAg 未阴转组($t = 2.380$, $P = 0.022$), HBeAb 阳转组($t = 2.767$, $P = 0.008$)治疗前的血清透明质酸水平也明显高于 HBeAb 未阳转组。HBeAg 阴转和 HBeAb 阳转的患者, 在治疗过程中血清透明质酸水平下降较早, 即在治疗的第 3 mo 即有明显下降。治疗期末 HBeAg 阴转与否($P = 0.022$)和 HBeAb 阳转与否($P = 0.045$)均与血清透明质酸水平有关。

结论: 治疗前的血清透明质酸水平和治疗过程中的血清透明质酸水平下降的早晚与拉米夫定的疗效有关, 血清透明质酸水平对拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的应答有预测意义。

韩群英, 刘正稳, 张妮, 朱凤群. 拉米夫定对慢性乙型肝炎患者血清透明质酸水平的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(8):1045-1047
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1045.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎病毒(HBV)是世界范围内引起肝脏疾病的主要原因之一。目前有效的慢性乙型肝炎抗病毒药物主要有 α -干扰素(INF- α)和拉米夫定。研究显示, 拉米夫定可改善肝脏纤维化。国外有研究发现, 血清透明质酸水平对 HCV 感染后肝硬化的严重合并症具有预测意义^[1], 并且可作为了解 INF- α 治疗慢性丙型肝炎长期疗效的一项有意义指标^[2]。我们对拉米夫定治疗慢性乙型肝炎中血清透明质酸水平的动态变化及其临床意义进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 慢性病毒性乙型肝炎患者 47 例, 均符合 2000 年病毒性肝炎防治方案的临床分型和诊断标准^[3], 所有患者病原学检测均 HBV 表面抗原(HBsAg)阳性、HBeAg 阳性、HBV DNA 水平 $>10^7$ copies/L, 肝功能检测 ALT >666.8 nkat/L 超过 6 mo, 且在 6 mo 内每次至少间隔 1 mo, 3 次检测 ALT 水平 >666.8 nkat/L, 所有患者在治疗前 6 mo 均未用过任何抗病毒治疗。47 例患者中, 男性 34 例, 女性 13 例, 年龄 13-59 岁, 平均 28.71 ± 9.93 岁。排除有肾功能损害者、人免疫缺陷病毒(HIV)感染以及合并其他慢性肝脏疾病(甲型、丙型、丁型、戊型病毒性肝炎, 药物性肝炎, 酒精性肝炎, 自身免疫性肝炎, Wilson's 病)的患者, 还排除嗜酒者、静脉药瘾者及在 6 mo 内服用肝毒性药物和免疫抑制剂药物的患者。所有患者在治疗前末梢血白细胞计数 $>4\ 000/\text{mm}^3$, 血小板 $>8\ 000/\text{mm}^3$ 。患者口服拉米夫定 100 mg, 1 次/d, 疗程至少 12 mo, 期间不采用其他抗病毒、抗纤维化及降酶治疗。

1.2 方法 患者分别于治疗前、治疗后 3 mo、6 mo 和 12 mo 时, 禁食一夜后, 清晨空腹抽血, 离心分离血清, -20°C 冷冻保存待检。血清 HBV DNA 水平用荧光定量聚合酶链反应诊断试剂盒(中山大学深圳达因有限公司提供)检测。透明质酸水平用放射免疫诊断试剂盒(中国人民解放军总医院东亚免疫技术研究所提供)检测。生化肝功用全自动生化分析仪(日本日立株式会社, 7170A)检测。乙肝病毒标志物用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测。

统计学处理 用 SPSS11.0 统计软件分析处理。计量资料用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 组间均数比较采用 t 检验, 参数间相关性检验采用多元逐步回归分析和多元相关分析。

2 结果

2.1 治疗过程中血清透明质酸水平的变化 在治疗 6 mo 内, 血清透明质酸水平随着 ALT 和 AST 水平的下降而持续下降, 治疗 3 mo 血清透明质酸水平 $[(71.78 \pm 34.91)\mu\text{g/L}]$ 较治疗前水平 $[(111.82 \pm 103.06)\mu\text{g/L}]$ 明显下降($P = 0.005$), 治疗 6 mo 血清透明质酸水平 $[(62.65 \pm 33.57)\mu\text{g/L}]$ 较治疗 3 mo 亦明显下降($P = 0.017$), 治疗 12 mo 时血清透明质酸水平 $[(74.17 \pm 41.87)\mu\text{g/L}]$ 虽有所升高, 但仍维持在较低水平, 与治疗 6 mo 时无显著性差别($P = 0.052$)。

2.2 血清透明质酸水平与治疗期末病毒学应答的关系 在 12 mo 的治疗期末, 23 例(47.9%)患者血中的 HBV DNA 不能检出, 治疗期末 HBV DNA 阴转组与未阴转组之间的

表1 治疗期末HBV DNA 阴转组与未阴转组在治疗不同时期的血清透明质酸水平($\mu\text{g/L}$)

组别	<i>n</i>	治疗前	3 mo	6 mo	12 mo
HBV DNA(+)组	24	90.90 \pm 73.64	74.42 \pm 42.90 ^a	67.26 \pm 46.77 ^a	77.32 \pm 38.92
HBV DNA(-)组	23	130.99 \pm 122.58	69.73 \pm 26.33 ^b	58.44 \pm 13.25 ^b	72.18 \pm 44.96

^a $P < 0.05$ vs 治疗前; ^b $P < 0.01$ vs 治疗3 mo.

血清透明质酸在治疗前水平($P = 0.183$)、治疗3 mo($P = 0.727$)、治疗6 mo($P = 0.436$)和治疗期末($P = 0.680$)均无显著性差异(表1). 对阴转组与未阴转组的不同治疗时期血清透明质酸水平进行比较, 结果显示HBV DNA 阴转组治疗3 mo后较治疗前($t = 2.623$, $P = 0.015$)以及治疗6 mo后较治疗3 mo($t = 2.891$, $P = 0.008$)均有显著性差别, 而未阴转组治疗3 mo后较治疗前($t = 1.465$, $P = 0.158$)以及治疗6 mo后较治疗3 mo($t = 0.982$, $P = 0.337$)均无显著性差别(表1); 阴转组和未阴转组治疗期末较治疗6 mo均无显著性差别(阴转组: $t = 1.913$, $P = 0.069$; 未阴转组 $t = 0.957$, $P = 0.349$).

2.3 血清透明质酸水平与血清学应答的关系 在12 mo的治疗期末, 17例(36.2%)患者HBeAg 阴转; 治疗期末HBeAg阴转组与未阴转组的血清透明质酸水平在治疗前具有显著性差别($t = 2.380$, $P = 0.022$), 在治疗期的不同时间无显著差别(表2). 对HBeAg阴转组与未阴转组的不同时期治疗前后血清透明质酸进行纵向比较显示, 阴转组治疗3 mo后较治疗前有显著性差别($t = 2.474$, $P = 0.026$), 此后, 一直维持在较低的水平; 而未阴转组治疗3 mo较治疗前无显著差别($t = 1.752$, $P = 0.091$)(表2), 至治疗6 mo时血清甘胆酸水平才明显降低(较基线: $t = 2.868$, $P = 0.008$; 较治疗3 mo后: $t = 2.072$, $P = 0.048$).

在12 mo的治疗期末, 15例(31.9%)患者HBeAb 阳

转; 治疗期末HBeAb阳转组与未阳转组的血清透明质酸在治疗前水平有显著性差异($t = 2.767$, $P = 0.008$)(表3), 在治疗的不同时间无显著差别(表3). 对阳转组与未阳转组的不同时期治疗前后血清透明质酸水平进行比较显示, 阳转组治疗3 mo后较治疗前显著降低($t = 2.429$, $P = 0.030$), 此后, 维持在较低水平; 未阳转组治疗3 mo较治疗前无显著差别($t = 1.887$, $P = 0.069$)(表3), 到治疗期末时, 血清透明质酸水平又有所升高, 与治疗前($t = 0.779$, $P = 0.442$)和治疗3 mo时($t = 1.187$, $P = 0.245$)相比, 无显著性差异.

2.4 血清学应答的相关因素分析 以HBeAg是否阴转作为应变变量, 年龄、性别、HBV DNA水平、ALT、AST、铁蛋白、甘胆酸、透明质酸(HA)、层粘蛋白和IV型胶原为自变量进行多元线性逐步回归分析, 结果透明质酸入选, 总的回归方程为 $y = 0.00159 \text{ HA} - 1.823$, 复相关系数 $r = 0.341$, 显示HBeAg是否阴转与透明质酸正相关($P = 0.022$), 与年龄、性别、HBV DNA水平、ALT、AST、铁蛋白、甘胆酸、层粘蛋白、IV型胶原无相关性.

以HBeAb是否阳转作为应变变量, 年龄、性别、HBV DNA水平、ALT、AST、铁蛋白、甘胆酸、透明质酸、层粘蛋白和IV型胶原为自变量进行多元线性逐步回归分析, 结果透明质酸入选, 总的回归方程为 $y = 0.00141 \text{ HA} + 1.094$, 复相关系数 $r = 0.332$, 显示HBeAb是否阳转与透明质酸正相关($P = 0.045$), 与年龄、性别、

表2 治疗期末HBeAg 阴转组与阳性组在治疗不同时期的血清透明质酸水平($\mu\text{g/L}$)

组别	<i>n</i>	治疗前	治疗后		
			3 mo	6 mo	12 mo
HBeAg(+)组	30	86.26 \pm 57.21	69.41 \pm 29.04	58.68 \pm 15.58	78.39 \pm 48.80
HBeAg(-)组	17	159.68 \pm 148.35	76.04 \pm 43.99 ^a	68.95 \pm 50.65	68.96 \pm 24.89

^a $P < 0.05$ vs 治疗前.

表3 治疗期末HBeAb 阳转组与未阳转组在治疗不同时期的血清透明质酸水平($\mu\text{g/L}$)

组别	<i>n</i>	治疗前	治疗后		
			3 mo	6 mo	12 mo
HBeAb(+)组	15	171.95 \pm 154.95	79.15 \pm 46.08 ^a	71.48 \pm 53.61	70.96 \pm 25.87
HBeAb(-)组	32	85.45 \pm 55.70	68.33 \pm 28.38	58.08 \pm 15.18	76.86 \pm 47.59

^a $P < 0.05$ vs 治疗前.

HBV DNA水平、ALT、AST、铁蛋白、甘胆酸、层粘连蛋白、IV型胶原无相关性。

3 讨论

透明质酸是一种高分子质量的蛋白多糖,由细胞间质合成,通过淋巴进入血液循环,在肝脏内由肝窦内皮细胞摄取,在肝窦内皮细胞内,通过透明质酸酶的降解作用,使之被清除。当肝脏发生病理损伤时,肝脏的正常结构和功能受到影响,导致肝脏对透明质酸的摄取和分解受阻,从而出现血中透明质酸水平升高。

HBV在肝细胞内复制引起肝细胞损伤,启动肝细胞外基质的过度增生和沉积,导致肝纤维化的形成。拉米夫定有改善肝功能和抑制肝纤维化的作用^[4],可以降低慢性乙型肝炎、肝纤维化或肝硬化患者发生肝脏失代偿和肝癌的危险性^[5]。大量的研究显示血清透明质酸的水平与肝纤维化等级和肝脏的组织学变化有关^[6-10]。血清透明质酸与肝脏病理活检的炎症坏死分级、纤维化分期和慢性肝炎的程度有相关性^[11]。透明质酸与慢性丙型肝炎治疗前后肝纤维化的严重程度密切相关,经INF- α 治疗后透明质酸水平随着肝纤维化的好转降低^[8],而肝纤维化的好转又与组织学炎坏死的好转有关,血清透明质酸水平,与肝脏炎症反应程度同步增高,与AST有相关性^[12]。本研究也显示,慢性乙型肝炎患者经拉米夫定治疗后,血清透明质酸水平随着肝功能(ALT、AST)的好转而有明显下降。

我们根据疗效进行分组分析显示,HBV DNA水平阴转组与未阴转组在治疗前的血清透明质酸水平无显著性差异,提示治疗前的血清透明质酸水平对治疗后HBV DNA水平的阴转无预测意义。但我们发现,HBV DNA阴转组在治疗过程中血清透明质酸水平明显下降较早而且这种下降发生较早,而未阴转组则无明显下降,提示治疗过程中血清透明质酸水平的明显降可能对抗病毒治疗后HBV DNA水平的阴转有一定的预测意义。

HBeAg是一项病毒复制的指标,在抗病毒治疗过程中,HBeAg阴转和HBeAb阳转患者较那些HBeAg未阴转患者的肝纤维化并发症的危险性小,并有更长的存活期^[13-14]。我们对治疗后HBeAg阴转与否和HBeAb阳转与否进行的分组分析显示,在治疗前的基线血清透明质酸水平有显著性差异,HBeAg阴转组和HBeAb阳转组治疗前的血清透明质酸水平较高,且在治疗3 mo时即明显下降,而HBeAg未阴转组和HBeAb未阳转组到治疗6 mo时始有下降,提示治疗前有较高的血清透明质酸水平以及治疗过程中血清透明质酸水平下降早的患者可能更容易发生HBeAg阴转和HBeAb阳转。我们对治疗期末HBeAg阴转与否和HBeAb阳转与否的相关因素分析显示,二者均与血清透明质酸水平有关。这些均提示治疗前的透明质酸水平及其在治疗过程中的变化对拉米夫定治疗能否诱导HBeAg阴转和HBeAb

阳转可能有预测意义。

总之,我们对慢性乙型肝炎患者拉米夫定抗病毒治疗过程中血清透明质酸水平变化的监测和观察提示,治疗前较高的血清透明质酸水平及其在治疗过程中的早期下降与患者的生化应答有相似的变化,并且与病毒学和血清学应答相关,提示拉米夫定治疗慢性乙型肝炎有缓解肝脏纤维化的作用,检测血清透明质酸水平及其在治疗过程中的动态变化有助于拉米夫定治疗的疗效预测和观察。

4 参考文献

- 1 Guechot J, Serfaty L, Bonnand AM, Chazouilleres O, Poupon RE, Poupon R. Prognostic value of serum hyaluronan in patients with compensated HCV cirrhosis. *J Hepatol* 2000;32:447-452
- 2 Kojima H, Hongo Y, Harada H, Inoue T, Miyaji K, Kashiwagi M, Momose T, Arisaka Y, Fukui H, Murai S, Tokita H, Kamitsukasa H, Yagura M, Katsu K. Long-term histological prognosis and serum fibrosis markers in chronic hepatitis C patients treated with interferon. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1015-1021
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝病杂志* 2000;8:324-329
- 4 Suzuki Y, Kumada H, Ikeda K, Chayama K, Arase Y, Saitoh S, Tsubota A, Kobayashi M, Koike M, Ogawa N, Tanikawa K. Histological changes in liver biopsies after one year of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 1999;30:743-748
- 5 Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, Tanwandee T, Tao QM, Shue K, Keene ON, Dixon JS, Gray DF, Sabbat J; Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Group. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004;351:1521-1531
- 6 Kweon YO, Goodman ZD, Dienstag JL, Schiff ER, Brown NA, Burchardt E, Schoonhoven R, Brenner DA, Fried MW. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001;35:749-755
- 7 Patel K, Lajoie A, Heaton S, Pianko S, Behling CA, Bylund D, Pockros PJ, Blatt LM, Conrad A, McHutchison JG. Clinical use of hyaluronic acid as a predictor of fibrosis change in hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:253-257
- 8 Guechot J, Loria A, Serfaty L, Giral P, Giboudeau J, Poupon R. Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C: effect of alpha-interferon therapy. *J Hepatol* 1995;22:22-26
- 9 Hashimoto O, Ueno T, Sata M, Uchimura Y, Tanikawa K. Long-term improvement of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C treated with interferon- α . *Hepatol Res* 1998;10:200-216
- 10 Chen YP, Feng XR, Dai L, Zhang L, Hou JL. Non-invasive diagnostic screening of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:1109-1112
- 11 Zheng M, Cai W, Weng H, Liu R. Determination of serum fibrosis indexes in patients with chronic hepatitis and its significance. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:346-349
- 12 Pares A, Deulofeu R, Gimenez A, Caballeria L, Bruguera M, Caballeria J, Ballesta AM, Rodes J. Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis. *Hepatology* 1996;24:1399-1403
- 13 Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet* 2003;362:2089-2094
- 14 Niederau C, Heintges T, Lange S, Goldmann G, Niederau CM, Mohr L, Haussinger D. Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1996;334:1422-1427