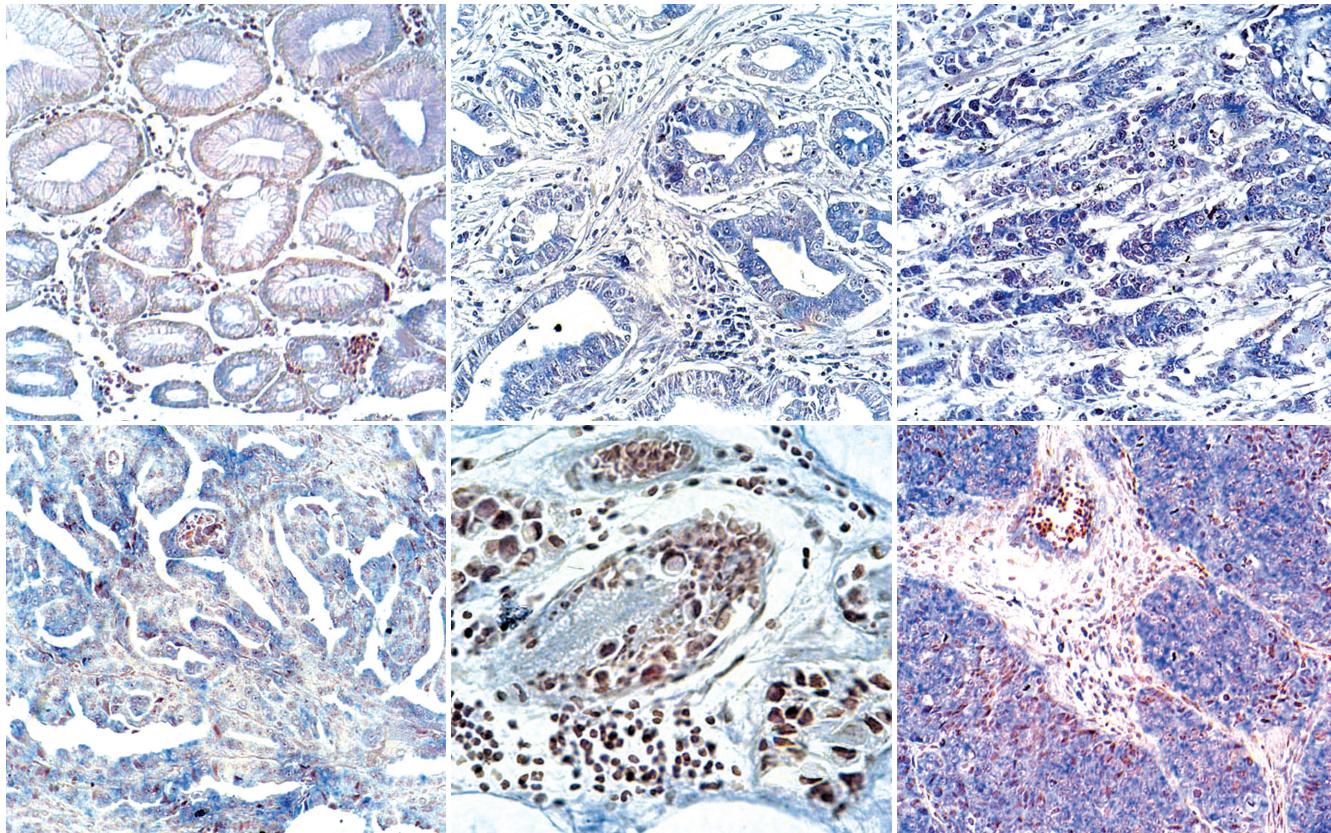


世界华人消化杂志[®]

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006年7月8日 第14卷 第19期 (Volume 14 Number 19)



19 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志[®]

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

北京
天津
北京
武汉
北京
北京
上海
福州
广州

陈海龙教授
陈红松副研究员
陈积圣教授
陈建荣副教授
陈立波副教授
陈凛教授
陈其奎教授
陈强谱教授
陈仕珠主任医师
陈卫昌教授
陈耀凯副教授
陈贻胜教授
陈知水教授
陈治水主任医师
陈祖林副教授
程爱国教授
程红岩教授
程树群副教授
迟宝荣教授
崔云甫教授
代文杰教授
戴冬秋教授
党双锁副教授
邓长生教授
董蕾教授
杜群副研究员
樊红副教授
范建高教授
范志宁主任医师
房静远教授
傅春彬主任医师
高成新教授
高春芳研究员
高峰教授
高润平教授
戈之铮教授
龚国忠教授
龚建平教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
关玉盘教授
管冬元副教授
郭克建教授
郭晓钟教授
郭新宇教授
韩天权教授
郝春秋副教授
郝俊鸣副主任医师
何超教授
何裕隆教授

大连
北京
广州
南通
武汉
北京
广州
滨州
西安
苏州
重庆
福州
武汉
哈尔滨
重庆
唐山
上海
上海
长春
哈尔滨
哈尔滨
沈阳
西安
武汉
西安
广州
南京
上海
上海
南京
苏州
重庆
福州
武汉
哈尔滨
长沙
重庆
大连
北京
北京
上海

何振平教授
洪天配教授
侯晓华教授
黄恒青主任医师
黄金华副教授
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
黄志勇副教授
季国忠副教授
季加孚教授
姜慧卿教授
蒋龙元副教授
金瑞教授
匡安仁教授
兰平教授
蓝宇教授
劳绍贤教授
李定国教授
李东辉教授
李方儒教授
李国威教授
李继强教授
李靖副教授
李军祥教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛主治医师
李晓宇主任医师
李旭副教授
李延青教授
李永哲副研究员
李瑷教授
李玉民教授
李增山副教授
李兆申教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁建教授
林胜璋副教授
林勇讲师
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘冰熔教授
刘成海研究员
刘平教授
刘杞教授
刘铁夫教授
刘颖斌副教授
刘占举教授

重庆
北京
武汉
福州
广州
武汉
本溪
西安
武汉
南京
北京
石家庄
广州
北京
成都
广州
北京
广州
北京
广州
上海
厦门
天津
西安
上海
重庆
北京
广州
北京
济南
北京
北京
广州
济南
北京
北京
广州
济南
北京
北京
兰州
西安
上海
北京
广州
温州市
上海
南京
上海
哈尔滨
上海
上海
重庆
哈尔滨
杭州
郑州

名誉总编辑

潘伯荣教授

西安

社长/总编辑

马连生教授

北京

副总编辑

陈士葆教授
房殿春教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

上海
重庆
哈尔滨
天津
上海
广州
吉林
石家庄
北京
广州
沈阳

常务编委

程英升副教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和副教授
王小众教授

上海
广州
上海
沈阳
哈尔滨
杭州
武汉
西安
福州

编委

白爱平主治医师
别平教授
白文元教授
白玉贤教授
蔡淦教授
蔡开琳副教授
曹洁副教授
曹志成院士

广州
重庆
石家庄
哈尔滨
上海
武汉
上海
香港

世界华人消化杂志[®]

编辑委员会

刘正稳教授	西安	孙学英教授	哈尔滨	许文燮教授	上海
刘作金副教授	重庆	邵升副教授	哈尔滨	许亚平副教授	镇江
龙致贤教授	北京	谭学瑞教授	汕头	闫惠平研究员	北京
鲁华玉研究员	北京	唐采白副教授	徐州	严律南教授	成都
陆才德教授	宁波	唐芙蓉教授	郑州	阎晓初副教授	重庆
陆伦根教授	上海	唐霓副教授	重庆	杨冬华教授	广州
陆云飞教授	南宁	唐文富主治医师	成都	杨广顺教授	上海
禄韶英主治医师	西安	唐文皓副主任医师	上海	杨建勇教授	广州
吕明德教授	广州	唐旭东主任医师	北京	杨林副研究员	广州
吕宁主任医师	北京	汤展宏副教授	南宁	杨维良教授	哈尔滨
吕云福教授	海口	唐志鹏副研究员	上海	杨希山教授	广州
马大烈教授	上海	田素礼教授	哈尔滨	杨云生教授	北京
茅爱武主任医师	上海	屠红副研究员	上海	姚登福教授	南通
梅林教授	北京	万军教授	北京	姚树坤教授	石家庄
孟庆华教授	北京	汪波副主任医师	北京	伊力亚尔·夏合丁教授	乌鲁木齐
宁琴教授	武汉	汪思应教授	合肥	阴赪宏研究员	北京
牛建昭教授	北京	王承党副教授	福州	于红刚副教授	武汉
欧希龙副教授	南京	王春友教授	武汉	余宏宇教授	上海
潘林娜教授	哈尔滨	王广义教授	长春	于健春教授	北京
潘兴华副主任医师	昆明	王吉耀教授	上海	于颖彦教授	上海
潘秀珍教授	福州	王健生副教授	西安	郁宝铭教授	上海
彭波副教授	西安	王鲁副教授	上海	喻荣彬副教授	南京
彭吉润主任医师	北京	王效民教授	厦门	张柏和教授	上海
彭曦副研究员	重庆	王晓艳副教授	长沙	张方信主任医师	兰州
彭心宇教授	石河子	王新月教授	北京	张吉翔教授	南昌
彭志海教授	上海	王学美研究员	北京	张锦生教授	上海
秦波教授	重庆	王正康教授	北京	张军教授	西安
秦成勇教授	济南	王志刚副主任医师	上海	张青云研究员	北京
秦环龙教授	上海	王忠裕教授	大连	张群华教授	上海
钱建民教授	上海	卫洪波教授	广州	张水军教授	郑州
秦仁义教授	武汉	魏经国教授	西安	张绪清副教授	重庆
卿三华教授	广州	魏来教授	北京	张学教授	北京
邱双健副教授	上海	闻勤生教授	西安	张宗明教授	北京
邱伟华副主任医师	上海	吴德全教授	哈尔滨	赵桂珍教授	沈阳
任超世研究员	天津	吴建国教授	武汉	赵景民教授	北京
任建安教授	南京	吴君主任医师	贵阳	赵连三教授	成都
任建林教授	厦门	吴萍主任医师	徐州	赵平副教授	上海
邵成浩讲师	上海	吴志勇教授	上海	郑民华教授	上海
邵先玉教授	泰安	席启主任医师	大同	智发朝教授	广州
邵永孚教授	北京	夏建川研究员	广州	周伯平教授	深圳
沈洪教授	南京	向德兵讲师	重庆	周丁华主任医师	北京
沈琳副教授	北京	肖恩华教授	长沙	周国雄主任医师	南通
沈薇教授	重庆	谢晓华副教授	广州	周士胜教授	大连
施诚仁教授	上海	徐爱民副教授	上海	周霞秋教授	上海
施瑞华教授	南京	徐迎新研究员	北京	周晓东研究员	广州
石统东副教授	重庆	许春舫主任医师	苏州	庄林主任医师	昆明
宋世兵主任医师	北京	徐存栓教授	新乡	朱传武副主任医师	苏州
宋振顺教授	西安	徐大华副主任医师	北京	朱春兰主任医师	哈尔滨
孙诚信教授	贵阳	徐德忠教授	西安	朱立元教授	深圳
孙殿兴主任医师	石家庄	徐列明教授	上海	朱人敏教授	南京
孙家邦教授	北京	徐小元教授	北京	邹小明教授	哈尔滨
孙秀发教授	武汉	许玲副教授	上海	左国营副主任药师	昆明

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2006年7月8日 第14卷 第19期 (总第171期)

述 评	1853 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎耐药性的基础与临床研究 聂青和, 张久聪
基础研究	1859 亚砷酸诱导人食管癌细胞株EC109细胞p15 ^{INK4B} 基因的表达 张学彦, 刘铁夫, 刘伟, 崔希威 1864 HBV抗原基因修饰树突状细胞疫苗体外抗HBV的作用 黄呈辉, 欧阳玲, 黄建国, 黎淦平, 江鹏飞, 姚集鲁 1870 嗜酸性乳杆菌培养上清液对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的影响 罗学娅, 伦永志, 高卫, 胡海北, 王强, 刘莹, 尹建石, 姜苏娟 1874 Tec酪氨酸蛋白激酶的大鼠组织分布及参与的信号途径 钟明贵, 李菲菲, 郑红, 倪芳, 余科科, 汪思应 1878 大鼠肝肠联合移植后肝对小肠的免疫保护作用 肇毅, 陆森, 成峰, 华一兵, 吴文溪, 王学浩
临床研究	1884 常规和快速乙肝免疫接种效果比较 陈仕珠, 张晋红, 张增平, 任菊香, 温风玲, 韩永战, 任雪莲, 陈鹰军 1889 草酸铂及羟基喜树碱联合亚叶酸钙和氟尿嘧啶治疗进展期结直肠癌的比较 孙元珏, 赵晖, 郭跃武, 林峰, 蔡讯, 唐晓春, 汤丽娜, 姚阳
文献综述	1895 食管癌染色体畸变及其研究方法进展 陈玲, 李锋 1900 急性胰腺炎合并肺损伤时炎性介质的作用 张喜平, 李志军 1906 GABA在摄食和味觉机制中的作用 雷琦, 闫剑群, 施京红, 杨雪娟
研究快报	1912 中药复方肝癌宁对肝癌细胞生长和AFP分泌的抑制作用 袁冬生, 王新华, 刘东辉, 朱彩平, 石磊 1916 雷帕霉素抑制JAK/STAT通路对急性肝损伤大鼠肝组织HMGB1表达的影响 张芸, 赵中夫, 韩德五, 王锋, 许瑞龄, 刘明社
临床经验	1921 前C区基因变异对慢性重型乙型肝炎免疫应答的影响 黄利华, 蒋跃明, 戴亚新 1924 三联疗法对非糜烂性反流病合并 <i>H pylori</i> 感染患者预后的影响 朱金水, 宋明全, 朱励, 王龙, 陈金联, 达炜, 孙群, 王如华 1928 术前合理营养支持对胃癌及结直肠癌患者术后恢复的影响 姜英俊, 孔心涓, 程广, 田宇彬 1933 大肠多原发癌临床分析42例 顾国利, 王石林, 魏学明, 周晓武, 黄蓉蓉 1937 两种膜分离器对血浆置换后血细胞数及血生化影响的比较 罗玲, 袁春兰 1940 内镜下扩张治疗食管贲门癌术后吻合口狭窄43例 王章流, 刘爱琴
病例报告	1942 以Schwartz-Bartter综合征为主要临床表现的胰腺肿瘤1例 王旭, 马向涛

附录	1945 世界华人消化杂志投稿须知
致谢	1950 致谢世界华人消化杂志编委
消息	<p>1858 技法与经验 1869 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知 1877 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 1883 《世界华人消化杂志》简介 1899 2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告 1911 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会 1915 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛通知 1920 《世界华人消化杂志》、《世界胃肠病学杂志》2004年度的影响因子分别位居1608种中国科技论文统计源期刊中第14位和4位 1932 第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会第二轮通知 1936 更正与说明专栏、专家门诊 1944 第八届中西医结合实验医学研讨会</p>
封面故事	<p>Xiao-Li Ma, Hai-Ji Sun, Yun-Shan Wang, Shu-Hong Huang, Jing-Wu Xie, Hong-Wei Zhang. Study of Sonic hedgehog signaling pathway related molecules in gastric carcinoma. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(25): 3965-3969 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/3965.asp</p>
国际会议	<p>7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference</p> <p>71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006</p> <p>XXX pan-american congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx</p>

<p>世界华人消化杂志 Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊) 创刊 1993-01-15 改刊 1998-01-25 出版 2006-07-08 原刊名 新消化病学杂志 荣誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁 电子编辑 张敏 李琪 本期审读 王瑾晖</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</p> <p>印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</p>	<p>《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</p> <p>2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有</p>
---	--	---

ISSN 1009-3079
 CN 14-1260/R

邮发代号 82-262
 国外代号 M 4481

国内定价 每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

July 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 19

EDITORIAL	1853 Basic and clinical research on lamivudine in treatment of chronic hepatitis B drug-resistance <i>Nie QH, Zhang JC</i>
BASIC RESEARCH	1859 Expression of p15 ^{INK4B} gene induced by arsenic trioxide in esophageal cancer cell line EC109 <i>Zhang XY, Liu TF, Liu W, Cui XW</i> 1864 Induction of specific cytotoxic T lymphocyte responses against hepatitis B virus by hepatitis B virus antigen gene-modified dendritic cells <i>Huang CH, Ou-Yang L, Huang JG, Li GP, Jiang PF, Yao JL</i> 1870 Effects of spent culture supernatant of <i>Lactobacillus acidophilus</i> on intestinal flora in mice with antibiotic-associated diarrhoea <i>Luo XY, Lun YZ, Gao W, Hu HB, Wang Q, Liu Y, Yin JS, Jiang SJ</i> 1874 Tissue distribution and signal transduction of Tec tyrosine kinase in rats <i>Zhong MG, Li FF, Zheng H, Ni F, Yu KK, Wang SY</i> 1878 Immuno-protective effect of liver on small bowel in combined transplantation of liver and small bowel <i>Zhao Y, Lu S, Cheng F, Hua YB, Wu WX, Wang XH</i>
CLINICAL RESEARCH	1884 A comparative study on standard and accelerated immunization schedules for rapid protection against hepatitis B <i>Chen SZ, Zhang JH, Zhang ZP, Ren JX, Wen FL, Han YZ, Ren XL, Chen YJ</i> 1889 Clinical study on combined chemotherapy of oxaliplatin or hydroxycamptothecine plus 5-fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer <i>Sun YJ, Zhao H, Guo YW, Lin F, Cai X, Tang XC, Tang LN, Yao Y</i>
REVIEW	1895 Chromosome aberration in esophageal carcinoma and its progress of research methods <i>Chen L, Li F</i> 1900 Roles of inflammatory mediators in acute pancreatitis complicated with lung injury <i>Zhang XP, Li ZJ</i> 1906 Roles of gamma-aminobutyric acid in modulation of food intake and taste <i>Lei Q, Yan JQ, Shi JH, Yang XJ</i>
RAPID COMMUNICATION	1912 Inhibitory effect of composite <i>Gan'aining</i> on growth and alpha-fetoprotein secretion of human hepatoma cells <i>Yuan DS, Wang XH, Liu DH, Zhu CP, Shi L</i> 1916 Rapamycin-induced inhibition of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway affects expression of high-mobility group box 1 in rats with acute liver injury <i>Zhang Y, Zhao ZF, Han DW, Wang F, Xu RL, Liu MS</i>
CLINICAL PRACTICE	1921 Influence of mutation in hepatitis B virus precore region on immune response of patients with chronic severe hepatitis B <i>Huang LH, Jiang YM, Dai YX</i> 1924 Efficacy of triple therapy and its effect on prognosis of <i>H pylori</i> infected patients with non-erosive reflux disease <i>Zhu JS, Song MQ, Zhu L, Wang L, Chen JL, Da W, Sun Q, Wang RH</i>

	<p>1928 Effects of reasonable pre-operative nutrition on recoveries of gastrointestinal cancer patients <i>Jiang YJ, Kong XJ, Chen G, Tian ZB</i></p> <p>1933 Multiple primary colorectal carcinomas: an analysis of 42 cases <i>Gu GL, Wang SL, Wei XM, Zhou XW, Huang RR</i></p> <p>1937 Comparative analysis of blood cell count and blood biochemistry after plasmapheresis with two kinds of membranous plasma separator <i>Luo L, Yuan CL</i></p> <p>1940 Endoscopic dilatation in treatment of post-operative anastomotic stricture in esophageal and gastric cardial carcinoma: an analysis of 43 cases <i>Wang ZL, Liu AQ</i></p>
CASE REPORT	1942 One case analysis of pancreatic neoplasm mainly manifested as Schwartz-Bartter syndrome <i>Wang X, Ma XT</i>
APPENDIX	1945 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology
ACKNOWLEDGMENT	1950 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Ma XL, Sun HJ, Wang YS, Huang SH, Xie JW, Zhang HW.</i></p> <p>Study of Sonic hedgehog signaling pathway related molecules in gastric carcinoma.</p> <p><i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(25): 3965-3969</p> <p>http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/3965.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association</p> <p>September 3-7, 2006</p> <p>convention@edinburgh.org</p> <p>www.edinburgh.org/conference</p> <p>71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course</p> <p>October 20-25, 2006</p> <p>XXX pan-american congress of digestive diseases</p> <p>XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas</p> <p>November 25-December 1, 2006</p> <p>amg@gastro.org.mx</p> <p>www.gastro.org.mx</p>

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date July 8, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjcd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press



拉米夫定治疗慢性乙型肝炎耐药性的基础与临床研究

聂青和, 张久聪

聂青和, 张久聪, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染病科, 全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038
聂青和, 1983年青海医学院医学系五年制本科毕业。1990年军医进修学院传染病中心、解放军传染病研究所(北京解放军302医院)硕士毕业, 获医学硕士学位。1995年第三军医大学西南医院全军传染病专科中心博士毕业, 获医学博士学位。随后到第四军医大学临床医学博士后流动站从事博士后研究, 出站后留校工作。现为第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心、传染病科副主任, 第四军医大学传染病学教研室副主任、研究生导师。主要学术研究方向为传染病学临床与实验研究, 以第一作者发表论文及综述150余篇, 获军队科技进步二等奖1项, 三等奖2项。主编学术专著3部、副主编专著1部; 主编多媒体光盘《SARS影像学图谱》; 参加23部学术专著编写, 以第一申请者获国家自然科学基金、中国博士后科学基金和陕西省科技攻关项目资助各1项。现任《中国实用内科杂志》、《肝脏》、《胃肠病学和肝病学杂志》、《中国感染控制杂志》、《继续医学教育》、《寄生虫病与感染性疾病》编委、《世界华人消化杂志》常务编委、《实用肝脏病杂志》副主编。《中华传染病杂志》、《中华消化杂志》特邀审稿人。国家自然科学基金委员会评审专家、总后全军医疗成果奖评审专家。陕西省康复医学会肝病专业委员会副主任委员。中华医学会陕西省医学会传染病学分会常委。

通讯作者: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路1号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染病科, 全军感染病诊疗中心。
nieqinghe@hotmail.com

电话: 029-84777852 传真: 029-83537377

收稿日期: 2006-04-20 接受日期: 2006-06-16

摘要

拉米夫定(lamivudine)是核苷类似物, 对乙型肝炎病毒(HBV)的复制有很好的抑制作用。其主要抗病毒机制是抑制HBV多聚酶的逆转录酶活性, 有效阻止病毒核酸的复制合成。拉米夫定因其具有迅速抑制HBV复制, 降低病毒载量, 促进HBeAg血清转换, 改善肝组织炎症坏死病变, 延缓肝纤维化进程作用, 以及良好的耐受性、安全性和服用方便等特点, 已广泛应用于临床。虽然总体上不良反应发生率较低, 但是在临床继续应用的几年后遇到了越来越多的治疗问题, 尤其是拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的耐药性问题。现对拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的作用机制、耐药性产生及发生机制、HBV产生耐药性的分子病毒学基础、YMDD变异株的生物学特性及YMDD变异对病情的影响等作了系统全面的阐述, 并就预防和处理耐药性问题提出了应对策略, 对拉米夫定联合用药等问题作了回顾与展望。

关键词: 慢性乙型病毒性肝炎; 拉米夫定; 耐药性; YMDD/YIDD变异; 对策

聂青和, 张久聪. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎耐药性的基础与临

床研究. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1853-1858
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1853.asp>

0 引言

1995年Dienstag *et al*^[1]发现, 拉米夫定(lamivudine)对HBV DNA的抑制作用以来, 世界各地先后进行了拉米夫定治疗乙型肝炎的II期和III期临床试验。拉米夫定作为第一个获美国食品药品管理局(FDA)批准的口服抗乙型肝炎病毒(HBV)药物, 其问世推动了慢性乙型病毒性肝炎(CHB)治疗的进程^[2]。拉米夫定因其具有迅速抑制HBV复制, 降低病毒载量, 促进HBeAg血清转换, 改善肝组织炎症坏死病变, 延缓肝纤维化进程作用, 以及良好的耐受性、安全性和服用方便等特点, 已广泛应用于临床^[3]。虽然总体上不良反应发生率较低, 但是在临床继续应用的几年后遇到了越来越多的治疗问题, 尤其是拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的耐药性问题^[4]。拉米夫定(lamivudine, 化学名称: 2', 3'-二脱氧-3'-硫代胞嘧啶, 简称LAM, 3TC)为双脱氧核苷类似物, 口服吸收快(平均吸收时间1.32 h), 绝对生物利用度达86%-88%, 平均半衰期8.41-9.11 h, 药物清除率22.61/h。拉米夫定在体内转化为三磷酸拉米夫定后对HBV有更强的抑制作用。拉米夫定最后大部分以原形由肾脏排泄, 可通过胎盘及血脑屏障。拉米夫定是逆转录酶抑制剂, 最初用于治疗HIV感染, 以后发现对于HBV复制具有抑制作用。HBV侵入肝细胞后, 在HBV DNA多聚酶(DNAP)作用下, 先形成共价闭合环状DNA(cccDNA), 然后以cccDNA为模板转录病毒前基因组, 再借助HBV DNAP以前基因组为模板合成负链, 继而合成正链。cccDNA存在于感染细胞核内, 是HBV DNA复制的模板, 不受药物的影响。拉米夫定的作用靶点是HBV的RNA指导的DNA聚合酶(RDDP)。该药可与DNA合成所需的底物三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)竞争RT上的结合位点, 结合到DNA链上起到链终止作用, 在体内选择性抑制HBV DNAP活性, 竞争性抑制病毒

■背景资料

拉米夫定是在全球被批准的第一个治疗慢性乙型肝炎的口服药。1996年该药在我国启动I至III期临床试验, 1998-12被我国国家药品监督管理局批准为一类新药, 1999年投放市场。拉米夫定可有效抑制HBV多聚酶的逆转录活性, 使血清HBV DNA水平明显降低, 提高血清HBeAg/HBeAb转换率, 改善肝功能, 具有较强的抗HBV作用。但近年发现长期应用可诱导HBV发生YMDD变异, 发生变异后常可导致HBV耐药及病情的加重、复发。因此, 寻找拉米夫定耐药性产生的机制, 做出相应防治措施, 对于提高慢性乙型肝炎患者的临床疗效, 改善预后等具有重要的意义, 因而成为近年来国内外学者们关注的重要课题。

■创新盘点

本文与其他相关文章的不同之处在于客观地从拉米夫定的作用机制、耐药性的发生机制、HBV产生耐药性的分子病毒学基础、YMDD变异株的生物学特性及变异对病情的影响等多方面综合、全面地介绍了应用拉米夫定治疗CHB产生耐药突变的情况，并且提出了相应的防治策略，具有较强的临床指导意义。

的逆转录过程，从而抑制病毒复制^[5]。但是由于他不能清除肝细胞内病毒的cccDNA，未达到血清转换，停药后HBV DNA又可再度复制。

1 拉米夫定耐药性及发生机制

1.1 耐药性发生率 目前的研究证实，HBV拉米夫定耐药变异常发生在治疗0.5 a以后，并且随着时间的延长不断增多^[6]。临床研究数据显示，拉米夫定治疗1, 2, 4 a时，变异发生率分别为15%^[7]，38%^[8]和67%^[9]。随着治疗时间的延长，耐药率明显增加。近已观察到有些拉米夫定再治疗患者发生耐药突变的时间相对提前。因变异株复制能力明显低于原型株，变异时HBV DNA水平仍低于治疗前，但可伴暂时性ALT升高，临床上有轻度乏力、恶心等表现。Atkins *et al*^[10]用拉米夫定治疗时16%-32%有YMDD变异，变异最早可发生于治疗36 wk时，但80%可消失。变异者的HBV DNA可持续阳性，其中24%的患者ALT升高达3倍以上，但组织学仍有改善，表明继续治疗仍有效。当停止治疗3-4 mo后变异株可被原株取代，从而出现HBV DNA“阳转”现象。治疗前HBV DNA水平高，HBeAg阳性者易有“阳转”的趋势，HBV DNA“阳转”时可伴ALT升高。再次用拉米夫定治疗仍可有效，但变异会再次更快地产生^[11]。

1.2 发生机制 拉米夫定单用治疗CHB可以诱导体内病毒学和生化反应血清的复常，肝组织学的改善，但同时也导致了拉米夫定耐药突变的产生，超过50%的患者治疗3 a内会出现拉米夫定耐药突变。早期研究认为耐药的HBV突变引起的是病毒复制的减弱，从而致病性也随之减弱，但随后的研究表明不完全受抑制的HBV复制否定了原先的假设。耐药突变的病毒通过适应选择出逐步复制活跃的致病性较强的病毒种类，并且赋予了HBV以复杂的免疫应答反应，而临床发现这样的突变确实带来较强的致病性：拉米夫定的耐药性导致了HBeAg阳性患者体内产生低血清转换率，低度的病毒学和生化反应，不显著的组织学改变等，突变株对拉米夫定敏感性降低，病情出现反复，甚至失效^[12]。目前认为，HBV对核苷类似物耐药性的产生与HBV P基因变异有关，并且HBV P基因变异是多位点的，以C区YMDD基序的变异最为重要。拉米夫定耐药突变定位于HBV DNA多聚酶逆转录酶结构域上酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)模序上的突变^[13]。YMDD位于C区第

549-552aa(即Y549M550D551D552)，YMDD中蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)替代，变成YVDD或YIDD^[14]。使用新的命名法，拉米夫定相关的HBV耐药株的变异位置和类型为rtM204I/V(C区)±rtL180M(B区)。最近，还发现一种新的变异类型，即YSDD变异或rtM204S变异(以往报告的基本是YVDD或YIDD变异)，这种变异株是从1例接受拉米夫定治疗18 mo的患者的血清中发现的，体外转染研究也证实了这种YSDD变异株对拉米夫定耐药。HBV YMDD基序变异引起对拉米夫定耐药的机制：YMDD变异可引起HBV DNAP空间构象发生改变，进而引起其与拉米夫定之间的作用发生改变，与dNTP或拉米夫定的结合力下降。根据HBV野毒株和YMDD变异株聚合酶的酶学分析和模拟的HBV聚合酶晶体结构特点，发现YMDD是HBV DNAP的催化位点，当M变为I或V时可导致氨基酸侧链的柔性减低，并在HBV DNAP和拉米夫定三磷酸盐之间形成空间位阻，与拉米夫定三磷酸盐的结合力下降^[15]。拉米夫定治疗表现出机体CD4⁺和CD8⁺T细胞针对HBV抗原的反应的加强。Lin *et al*^[16]认为一个CD8⁺T细胞针对拉米夫定耐药多聚酶抗原表位的反应影响了机体对拉米夫定的反应。他们解释了特异性T细胞的功能和表现型并表明功能性的抗-YMDD细胞毒性T淋巴细胞(CTL)与之反应和结果相关，并强调了HBV DNAP催化部位非多肽YMDDVVLGA(氨基酸序列203-211)中逆转录酶结构域中的YMDD模序是一个限制性的CTL抗原表位。

1.3 分子病毒学基础 大多数生物能够通过复杂的机制来维持其遗传信息的稳定性，而病毒却相反，他们处于快速和持续的基因变异之中。HBV在复制过程中尽管产生大量的子病毒，但并不直接杀伤被其感染的肝细胞。由于HBV的复制所需的HBV DNA多聚酶是一种逆转录酶，缺乏校正的功能，因此HBV变异率高于其他DNA病毒10倍左右，变异的频率约为(1.4-3.2)×10⁻⁵核苷酸替换/位点/a。从理论上讲，对于任何核苷类HBV药物，HBV均有耐药株的可能性，所不同的是出现时间早晚的差异。变异病毒的复制必须有可用的复制空间，变异株是通过占据原来野毒株的位置而获得复制空间的，此过程的前提是原来野毒株的消失，而原来野毒株能否消失又受其本身的复制适应性、肝细胞的更新、增殖等影响。所以只有在拥有新的复制空间的前提下，HBV耐药株在肝内的数量才会增加。在所施加的药物选

择压力撤销后(如停用拉米夫定), 原来的野毒株是否重新出现、出现的时间以及能否成为优势株, 同样取决于是否还存在野生株及其所占复制空间的大小^[17]. 同时HBV存在若干个血清型, 根据表面抗原具有两对相互排斥的抗原决定簇d, y, w, r, 以及表面抗原的共同抗原决定簇a, 可将HBV分出9个基本血清型, 常见的有adw, adr, ayw和ayr. 但研究表明, 血清型的划分不能完全反映其核酸变异程度. 根据HBV全基因核苷酸序列异源性≥8%或者S基因区核苷酸序列异源性≥4%, 将不同病毒株分为不同的基因型^[18]. 迄今为止HBV可以分为8个基因型^[19-20], 即A, B, C, D, E, F, G和H. B基因型和C基因型之间还可能发生重组^[21]. 但HBV基因型与拉米夫定疗效间的关系目前尚未有明确定论, Kao *et al*^[22]发现, B基因型的HBeAg血清转换率高于C基因型, Zollner *et al*^[23]研究了26例CHB患者对LAM的应答, 发现在adw亚型(主要为基因型B)的患者中, LAM耐药的发生率是其他亚型的20倍, Chien *et al*^[24]发现, 基因型C的HBeAg复发率显著高于基因型B. 而Chan *et al*^[25]却认为, CHB患者接受拉米夫定治疗后HBeAg的血清转换率与HBV基因型无关.

2 YMDD变异株

2.1 生物学特性 过去认为和野毒株相比, YMDD变异株的复制能力显著降低. 体外YMDD变异株不能像野生型HBV那样有效复制, 复制能力明显下降. 临幊上也发现, 发生YMDD变异者在停用拉米夫定之后, 患者体内的变异株常常很快被野毒株所取代, 提示YMDD变异株存在复制缺陷^[26]. Liu *et al*^[17]认为, 拉米夫定治疗后, HBV DNA载量显著下降, 能容纳新的HBV cccDNA的肝细胞增加, 当与野生株密切相关的YMDD变异株出现(自然存在或拉米夫定治疗后出现的少量变异株)由于不存在药物的选择压力而在肝细胞中迅速复制, 从而引起HBV DNA突变. 近年来, 随着对YMDD变异株研究的进一步深入, 发现并不是所有YMDD变异株均存在复制缺陷, HBV YMDD变异株的复制能力并非均减弱^[27]. 最近发现YMDD变异伴“a”决定簇内变异时, 患者可出现病情恶化, 体外研究结果显示, 这种联合变异可使病毒的复制能力明显增强, 与以往的研究结果不一致. 还有研究也提示, HBV DNA多聚酶rtLI80M(B区)变异可补偿HBV YMDD变异株的复制缺陷, 使HBV的复制增强. 其他学者的研究也证实, YMDD基序之外的变异

可补偿YMDD变异株的复制缺陷. 临幊研究也发现某些YMDD变异株可能具有较强的复制能力. 有人报道, 在临幊上已发现YMDD变异株引起的急性HBV感染. 并且对YMDD变异株的消长状态进行监测发现, 停用拉米夫定之后, 体内的YMDD变异株可存在数月之久. YMDD变异株借助YMDD基序之外的变异补偿HBV复制缺陷的假设, 可以解释临幊上有些患者出现变异后高于治疗前水平的HBV DNA滴度. 这也可能是某些YMDD变异者病情加重的原因之一.

2.2 对病情的影响 YMDD突变后患者的临幊表现形式多样, 最初表现为血清HBV DNA水平下降或阴转后继续治疗时阳转或明显上升, 部分患者可无临床症状、ALT正常, 类似免疫耐受; 也有部分患者出现肝炎发作, ALT水平升高. 对临幊表现轻微的患者继续拉米夫定治疗, 大多数仍可获益. 但也有少数患者, 特别是肝脏储备下降的患者如肝硬化及肝功能失代偿者, 在继续拉米夫定治疗后病情急性加重^[28-29], 应引起临幊重视. 拉米夫定相关变异株引起病情急性加重的机制尚不清楚, 肝病变基础和肝功能的代偿能力可能是重要的影响因素, 应进一步加强对临幊表现及治疗的研究^[30]. 关于突变株出现后患者肝功能的改变, 目前的结论不尽相同. 有学者认为, 出现YMDD基序的变异, 伴有对拉米夫定耐药, 表现为HBV DNA滴度升高, 伴有肝酶升高, 但升高的水平低于治疗前的水平, 肝组织病理结果与变异株出现前没有恶化, 与没有抗药性的患者的组织学表现相似^[31]. 目前认为, 发生YMDD变异患者继续使用拉米夫定治疗, 其肝组织学的改善优于安慰剂组. 所以, 变异株出现后仍可继续治疗. 因为停止治疗后, 野毒株将重新成为优势株, 而变异株的DNA复制水平低于野毒株, 肝功能的损害也较野毒株轻^[32-33]. 体外研究指出, YMDD变异株并不像野毒株那样有效地进行复制.

3 预防和处理

3.1 严格拉米夫定治疗的适应证 拉米夫定不能滥用, 必须选择适应证. 基础病毒水平过高或免疫耐受的患者常需长期应用拉米夫定, 耐药变异的发生率很高^[34]. 选用拉米夫定治疗6 mo后, 需密切观察, 定期检测YMDD和病毒定量. 目前认可的拉米夫定治疗的适应证为: (1)ALT≥2×正常值上限(ULN), 并持续增高至少1 mo, 或6 mo以内反复增高, 建议实施治疗; (2)ALT水平

■同行评价
本文从拉米夫定的作用机制、耐药性的发生机制、HBV产生耐药性的分子病毒学基础、YMDD变异株的生物学特性及变异对病情的影响等多方面进行了全面述评, 讨论了拉米夫定治疗慢性乙型肝炎产生耐药突变的情况, 并且提出了相应的防治策略, 具有较强的理论和临床指导意义. 文章行文流畅, 重点突出, 层次分明.

在1-2×ULN之间,建议根据患者具体情况(如肝活检结果等),权衡利弊,决定是否实施治疗;(3)可以应用于失代偿期肝硬化合并HBV DNA阳性或/和HBeAg阳性的患者;(4)有抗病毒指征的慢性乙型肝炎患者,疗程至少1 a;(5)针对不同的患者应该采用个体化疗法.YMDD发生变异后仍继续用拉米夫定治疗的患者,如发现血清病毒水平明显增高和/或血清转氨酶增高,应停药改用其他治疗.发现YMDD后停药的患者,需密切观察,警惕停药后病情急性加重.出现耐药突变后伴有病情加重时,建议在加强综合治疗措施同时,采取积极有效的方法,如改用或联合阿德福韦治疗^[35].3 mo后开始检测,如野毒株转换,可再用拉米夫定治疗,但可能再次变异,且发生较早.一般发现耐药变异后需换用其他抗病毒药物.野毒株转换后重新用拉米夫定,最好与其他药物联合治疗^[36].

3.2 拉米夫定联合用药的问题 由于目前抗HBV的药物疗效有限,联合治疗和个体化治疗一直是大家关注的问题,很多学者都认为今后的发展方向为联合治疗,但目前美国、欧洲、亚太肝病专家3个国际会议的共识建议中均未提到联合治疗的方案,主要由于目前临床研究资料还不够充分.目前较多报道为干扰素和拉米夫定联合应用,尚未获得肯定结论.尽管现有资料尚不能反映联合治疗的优势,但不同作用机制的药物联合治疗仍是今后研究的方向.为何抗HBV的药物联合治疗不像其他疾病那样获得良好疗效?也是日后研究的重点^[37].个体化治疗将是决定治疗效果的关键,包括不同基因型对干扰素治疗应答有差异,免疫状态和治疗的关系等.拉米夫定联合其他作用位点不同的核苷类似物^[38]、免疫调节剂^[39]、干扰素^[40]等的治疗方案尚在探索之中.理论上联合用药能降低耐药性产生,有更高的反应率,能使体内病毒量下降更多,但实际作用还有待广泛的临床研究证实.Leung *et al*^[41]联合拉米夫定、泛昔洛韦、胸腺素治疗CHB,1 a内64%的患者HBeAg阴转,ALT复常率100%,治疗后所有患者血清HBV DNA均阴转.值得指出的是,体外实验中,2',3'-二脱氧胞苷、脱氧胞苷以及2',3'-二脱氢-2',3'-二脱氧胸苷可明显抑制拉米夫定的磷酸化过程^[42],故联合应用核苷类似物时应考虑到药物间的相互作用.Rigopoulou *et al*^[43]应用拉米夫定联合IL-12治疗,观察患者体内病毒学反应和免疫应答也收到了良好的效果.我们在相关的研究中发现免疫调

节剂胸腺肽α1能够改善患者的免疫功能,其与拉米夫定、干扰素或其他抗病毒药物的联合使用都表现出良好的治疗效果^[44].

总之,遗传和变异是生物界普遍现象,病毒结构简单和增殖速度较快使其更易变异,这种变异可自发或诱导,对外界压力干预产生反抗,结果是耐药生存.因此,拉米夫定治疗CHB出现耐药性是完全符合客观规律的.最近有研究表明,在15%-25%未曾用过拉米夫定治疗的CHB患者的血液中存在YMDD变异株,实际上YMDD变异出现并非应用拉米夫定所特有^[45].拉米夫定自上市以来虽然其耐药性成为其继续推广应用的一个问题,但这个问题正在不断地得到解决.拉米夫定治疗CHB的疗效和HBV变异株的出现是目前临床关注的热点^[46].拉米夫定长期治疗耐药毒株产生几率增加和短期治疗大多数患者回复到治疗前状态,是难以解决的矛盾.YMDD变异对病毒复制、ALT反跳和临床症状的影响,报道结果不尽相同,其原因可能与人体免疫功能状态及病毒复制水平相关.而停药后出现的病情急性加重也提示,应加强对拉米夫定治疗的审慎选择.总之,拉米夫定是CHB的重要治疗措施,但也存在YMDD变异致耐药性的产生.治疗中采用其他药物替代或联合其他药物治疗,可避免耐药突变的产生,但迄今尚无确切有效的HBV耐药性变异株的治疗方法^[47-48].有关拉米夫定耐药性的分子生物学研究和应用拉米夫定的联合治疗方案及疗效尚待进一步探索.

4 参考文献

- 1 Dienstag JL, Perrillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C, Rubin M. A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1995; 333: 1657-1661
- 2 Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999; 341: 1256-1263
- 3 聂青和. 拉米夫定应用中的问题及处理. 中国实用内科杂志 2004; 24: 457-459
- 4 Leung N. Lamivudine for chronic hepatitis B. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2: 173-180
- 5 Lau DT, Khokhar MF, Doo E, Ghany MG, Herion D, Park Y, Kleiner DE, Schmid P, Condreay LD, Gauthier J, Kuhns MC, Liang TJ, Hoofnagle JH. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology* 2000; 32: 828-834
- 6 Leung NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, Lim SG, Wu PC, Dent JC, Edmundson S, Condreay LD, Chien RN. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B

- enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001; 33: 1527-1532
- 7 Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL, Gray DF. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 61-68
- 8 Liaw YF, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Chien RN, Dent J, Roman L, Edmundson S, Lai CL. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *Gastroenterology* 2000; 119: 172-180
- 9 Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology* 1999; 30: 567-572
- 10 Atkins M, Hunt CM, Brown N, Gray F, Sanathanan L, Woessner M, Lai CL, Dusheiko G, Dienstag J, Wright T, Barnard J, Bourne E, Condreay L. Clinic significance of YMDD mutant hepatitis B virus(HBV) in a large cohort of lamivudine-treated hepatitis B patients. *Hepatology* 1998; 28: 319A
- 11 Liaw YF. The current management of HBV drug resistance. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S143-146
- 12 Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Matsuda M, Sato J, Suzuki Y, Sezaki H, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Virological and biochemical relapse after discontinuation of lamivudine monotherapy for chronic hepatitis B in Japan: comparison with breakthrough hepatitis during long-term treatment. *Intervirology* 2005; 48: 174-182
- 13 Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996; 24: 711-713
- 14 Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998; 27: 1670-1677
- 15 Shin YM, Heo J, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, Yang US, Kim CM, Park HK, Jang HJ. Natural YMDD motif mutations of HBV polymerase in the chronic hepatitis B virus infected patients. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003; 9: 1-9
- 16 Lin CL, Tsai SL, Lee TH, Chien RN, Liao SK, Liaw YF. High frequency of functional anti-YMDD and -mutant cytotoxic T lymphocytes after *in vitro* expansion correlates with successful response to lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *Gut* 2005; 54: 152-161
- 17 Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, Kao JH, Chen DS. Hepatitis B virus variants in patients receiving lamivudine treatment with breakthrough hepatitis evaluated by serial viral loads and full-length viral sequences. *Hepatology* 2001; 34: 583-589
- 18 Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 2003; 46: 329-338
- 19 Akuta N, Kumada H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 139-142
- 20 Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. *J Hepatol* 2003; 38: 315-321
- 21 Idrees M, Khan S, Riazuddin S. Common genotypes of hepatitis B virus. *J Coll Physicians Surg Pak* 2004; 14: 344-347
- 22 Kao JH, Liu CJ, Chen DS. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J Hepatol* 2002; 36: 303-304
- 23 Zollner B, Petersen J, Schroter M, Laufs R, Schoder V, Feucht HH. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *Lancet* 2001; 357: 934-935
- 24 Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM, Liaw YF. Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2003; 38: 1267-1273
- 25 Chan HL, Wong ML, Hui AY, Chim AM, Tse AM, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B virus genotype has no impact on hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2695-2697
- 26 Liaw YF. Impact of YMDD mutations during lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Chem Chemother* 2001; 12 Suppl 1: 67-71
- 27 Paik YH, Chung HY, Ryu WS, Lee KS, Lee JS, Kim JH, Lee CK, Chon CY, Moon YM, Han KH. Emergence of YMDD motif mutant of hepatitis B virus during short-term lamivudine therapy in South Korea. *J Hepatol* 2001; 35: 92-98
- 28 Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology* 1999; 30: 567-572
- 29 Honkoop P, de Man RA, Niesters HG, Zondervan PE, Schalm SW. Acute exacerbation of chronic hepatitis B virus infection after withdrawal of lamivudine therapy. *Hepatology* 2000; 32: 635-639
- 30 Akuta N, Tsubota A, Suzuki F, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Long-term prognosis by lamivudine monotherapy for severe acute exacerbation in chronic hepatitis B infection: emergence of YMDD motif mutant and risk of breakthrough hepatitis - an open-cohort study. *J Hepatol* 2003; 38: 91-97
- 31 Yuen MF, Chow DH, Tsui K, Wong BC, Yuen JC, Wong DK, Lai CL. Liver histology of Asian patients with chronic hepatitis B on prolonged lamivudine therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 841-849
- 32 Dienstag JL, Cianciara J, Karayalcin S, Kowdley KV, Willems B, Plisek S, Woessner M, Gardner S, Schiff E. Durability of serologic response after lamivudine treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2003; 37: 748-755
- 33 Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C, Brown N, Woessner M, Boehme R, Condreay L. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 687-696
- 34 Owens DK, Black M. Assessing the benefits and costs of new therapies for hepatitis B virus infection. *Ann Intern Med* 2005; 142: 863-864
- 35 Peters MG, Hann HW H, Martin P, Heathcote EJ, Buggisch P, Rubin R, Bourliere M, Kowdley K, Trepo C, Gray DF D, Sullivan M, Kleber K, Ebrahim

- R, Xiong S, Brosgart CL. Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2004; 126: 91-101
- 36 Shaw T, Bowden S, Locarnini S. Rescue therapy for drug resistant hepatitis B: another argument for combination chemotherapy? *Gastroenterology* 2004; 126: 343-347
- 37 聂青和. 慢性乙型肝炎抗病毒治疗进展回顾. 实用肝脏病杂志 2005; 8: 148-150
- 38 Colledge D, Locarnini S, Shaw T. Synergistic inhibition of hepadnaviral replication by lamivudine in combination with penciclovir *in vitro*. *Hepatology* 1997; 26: 216-225
- 39 聂青和, 张久聪. 胸腺肽α1单用治疗慢性乙型肝炎的临床荟萃分析. 中国实用内科杂志 2006; 26: 382-386
- 40 Schalm SW, Heathcote J, Cianciara J, Farrell G, Sherman M, Willems B, Dhillon A, Moorat A, Barber J, Gray DF. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial. *Gut* 2000; 46: 562-568
- 41 Leung N. Chronic hepatitis B-treatment with nucleoside analogues. *Med J Malaysia* 2005; 60 Suppl B: 22-27
- 42 Kewn S, Veal GJ, Hoggard PG, Barry MG, Back DJ. Lamivudine (3TC) phosphorylation and drug interactions *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 589-595
- 43 Rigopoulou EI, Suri D, Chokshi S, Mullerova I, Rice S, Tedder RS, Williams R, Naoumov NV. Lamivudine plus interleukin-12 combination therapy in chronic hepatitis B: antiviral and immunological activity. *Hepatology* 2005; 42: 1028-1036
- 44 段国荣, 聂青和, 周永兴, 王全楚, 田长印, 刘拉羊, 薛红安. 胸腺肽α1对慢性乙型肝炎患者免疫系统的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 701-704
- 45 Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001; 34: 584-586
- 46 Feld J, Lee JY, Locarnini S. New targets and possible new therapeutic approaches in the chemotherapy of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2003; 38: 545-553
- 47 Delaney WE 4th, Locarnini S, Shaw T. Resistance of hepatitis B virus to antiviral drugs: current aspects and directions for future investigation. *Antivir Chem Chemother* 2001; 12: 1-35
- 48 Lo GH, Lai KH. Is it meaningful to pursue the safety of long-term lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B? *Gastroenterology* 2004; 126: 1932-1933

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

技法与经验

本刊讯 《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏, 及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验。我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿, 免费刊登照片。写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法: 1.1 原理; 1.2 适应证; 1.3 器材准备; 1.4 步骤; 1.5 实例

2 结果

3 讨论: 3.1 并发症; 3.2 优点和缺点; 3.3 经验与技巧

4 参考文献



亚砷酸诱导人食管癌细胞株EC109细胞p15^{INK4B}基因的表达

张学彦, 刘铁夫, 刘伟, 崔希威

张学彦, 哈尔滨医科大学附属二院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150086

刘铁夫, 哈尔滨医科大学附属四院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150000

刘伟, 哈尔滨医科大学附属二院分子实验中心 黑龙江省哈尔滨市 150086

崔希威, 哈尔滨医科大学附属二院计算机中心 黑龙江省哈尔滨市 150086

张学彦, 1996年哈尔滨医科大学学士, 2001年哈尔滨医科大学硕士, 2003年哈尔滨医科大学博士生, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的防治研究。

黑龙江省科技计划攻关重点项目基金资助, No. GB05C401-09

黑龙江省卫生厅科研基金资助项目, No. 2004-117

通讯作者: 张学彦, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路246号, 哈尔滨医科大学附属二院消化科, zxycxw@sina.com

电话: 0451-86605143 传真: 0451-86695879

收稿日期: 2006-04-13 接受日期: 2006-05-17

Expression of p15^{INK4B} gene induced by arsenic trioxide in esophageal cancer cell line EC109

Xue-Yan Zhang, Tie-Fu Liu, Wei Liu, Xi-Wei Cui

Xue-Yan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Tie-Fu Liu, Department of Gastroenterology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China

Wei Liu, Center of Molecular Biology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Xi-Wei Cui, Center of Computers, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by the Key Programs of Science and Technology Foundation of Heilongjiang Province, No. GB05C401-09, and the Scientific Research Foundation from Sanitation Office of Heilongjiang Province, No. 2004-117

Correspondence to: Dr. Xue-Yan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zxycxw@sina.com

Received: 2006-04-13 Accepted: 2006-05-17

Abstract

AIM: To investigate the effects of arsenic trioxide (As_2O_3) on the expression of cyclin dependent kinase inhibitor p15^{INK4B} (p15) gene in esophageal cancer cell line EC109.

METHODS: As_2O_3 was added to EC109 cells

for succedent experiments (final concentration 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$). Methylation of p15 gene in EC109 cells was detected by polymerase chain reaction (PCR) using a methylation specific primer (MSP), and the expression of p15 gene was detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) and Western blot at the mRNA and protein level.

RESULTS: p15 gene failed to express in EC109 cells due to hypermethylation. As_2O_3 (2 $\mu\text{mol}/\text{L}$) significantly down-regulate the methylation of p15 gene at DNA level, and the difference between As_2O_3 action 72, 48, 24 h and no drug groups had statistical significance (37.11 ± 3.62 vs 50.92 ± 5.47 vs 72.07 ± 7.53 vs 97.23 ± 9.80 , $P < 0.05$). After As_2O_3 action 24 h, p15 mRNA expression appeared. Along with the continuance of As_2O_3 action, the p15 mRNA expression became stronger. Except between no drug group and As_2O_3 action 24 h group as well as between As_2O_3 action 24 and 48 h group, the difference between all groups had statistical significance (0.72 ± 0.07 , 0.58 ± 0.06 , 0.48 ± 0.07 vs 0.41 ± 0.08 , $P < 0.05$). After As_2O_3 action 24 h, the expression of p15 protein appeared. Along with the continuance of As_2O_3 action, the p15 protein expression became stronger. The differences between all the groups were significant (0.51 ± 0.02 vs 0.21 ± 0.01 vs 0.16 ± 0.02 vs 0.06 ± 0.01 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: As_2O_3 can activate the expression of the p15 gene by demethylation and inhibit the cell cycle progress of esophageal cancer cell line.

Key Words: Arsenic trioxide; p15^{INK4B} gene; Methylation; Esophageal cancer

Zhang XY, Liu TF, Liu W, Cui XW. Expression of p15^{INK4B} gene induced by arsenic trioxide in esophageal cancer cell line EC109. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1859-1863

摘要

目的: 研究亚砷酸(As_2O_3)对人食管癌EC109细胞株细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子p15^{INK4B}(p15)基因表达的影响。

■背景资料

我国是世界上食管癌发病率和死亡率最高的国家, 对人们健康构成极大威胁。近年来学者对食管癌进行了大量的基础研究, 我们进一步研究了 As_2O_3 对p15基因表达的影响和意义。

■研发前沿

*p15*基因的失活存在于大多数肿瘤中,它的失活机制包括缺失和甲基化等,近年来对甲基化引起*p15*基因失活的研究已经日益受到重视。 As_2O_3 用于治疗白血病获得成功以来,人们将 As_2O_3 用于实体肿瘤,并取得显著疗效,但其抗肿瘤作用机制尚待深入研究。

方法: 终浓度2 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 加入食管癌EC109细胞系,采用甲基化特异PCR (MSP)检测食管癌EC109细胞系中*p15*基因甲基化,采用RT-PCR和Western blot方法检测 As_2O_3 处理前后*p15*的mRNA和蛋白质水平的表达情况。用Scion Image软件测量条带灰度值,*P15*蛋白与ACTB条带的灰度比进行半定量分析。

结果: EC109细胞*p15*基因发生高甲基化,*p15*基因不表达。 As_2O_3 作用后*p15*基因甲基化程度明显下降, As_2O_3 作用72, 48, 24 h组和未加药组之间差异均有统计学意义($37.11 \pm 3.62, 50.92 \pm 5.47, 72.07 \pm 7.53$ vs $97.23 \pm 9.80, P < 0.05$)。 As_2O_3 作用24 h后出现*p15* mRNA表达,随 As_2O_3 作用时间延长*p15* mRNA表达逐渐增强,各个时间组之间比较,除了未加药组和加药24 h组之间及加药24 h组和加药48 h组之间差异无统计学意义外,其余各个时间组之间差异有统计学意义(0.72 ± 0.07 vs 0.58 ± 0.06 vs 0.48 ± 0.07 vs $0.41 \pm 0.08, P < 0.05$)。 As_2O_3 作用24 h后*P15*蛋白出现表达,2 $\mu\text{mol/L}$ 作用24-72 h中*P15*蛋白条带灰度逐渐增强, As_2O_3 作用72, 48, 24 h组和未加药组之间差异均有统计学意义(0.51 ± 0.02 vs 0.21 ± 0.01 vs 0.16 ± 0.02 vs $0.06 \pm 0.01, P < 0.05$),说明其表达随 As_2O_3 作用时间延长而逐渐增强。

结论: As_2O_3 可使食管癌EC109细胞*p15*基因去甲基化,使*p15*基因表达上调,从而抑制细胞周期进程。

关键词: 亚砷酸;*p15^{INK4B}*; 甲基化; 食管癌

张学彦, 刘铁夫, 刘伟, 崔希威. 亚砷酸诱导人食管癌细胞株EC109细胞*p15^{INK4B}*基因的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1859-1863

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1859.asp>

0 引言

亚砷酸(As_2O_3)用于治疗白血病获得成功以来,人们将 As_2O_3 用于实体肿瘤,并取得显著疗效^[1-7],但全面认识其抗肿瘤作用机制尚待深入研究。我们以人食管癌EC109细胞株作为研究对象,在发现其细胞周期负性调控因子*p15^{INK4B}*(简称*p15*)失活由高甲基化引起后,采用 As_2O_3 对EC109细胞进行处理,进一步研究 As_2O_3 对*p15*表达的影响,以期从分子水平探讨 As_2O_3 对人实体瘤的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 EC109细胞株购自中科院上海细胞所。

1 g/L的亚砷酸溶液由哈尔滨伊达公司生产,用生理盐水配成1 mmol/L的贮存液,使用前用完全培养基稀释至所需浓度。Trizol试剂盒是Gibco公司产品,Taq酶为上海生工公司产品,逆转录试剂盒是Promega公司产品,DNA Marker DL2000为宝生物公司产品。预染蛋白标准是纽英伦公司产品。*p15*小鼠抗人单克隆IgG是Neo Markers公司产品, β -actin (ACTB)抗体和Western blotting发光试剂是Santa Cruz公司产品,辣根酶标记山羊抗小鼠IgG为北京中杉公司产品。引物由上海生工公司合成(表1)。

1.2 方法 人食管癌EC109细胞株在37°C, 50 mL/L CO_2 饱和湿度条件下,用含100 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基培养。取对数生长期细胞,加入亚砷酸,终浓度为2 $\mu\text{mol/L}$,培养3 d,以不加药的同期培养的细胞作为阴性对照,常规酚/氯仿法提取细胞基因组DNA。

1.2.1 PCR检测*p15*外显子有无缺失 *p15*共有2个外显子,以基因组DNA为模板分别用其引物进行PCR扩增。PCR总体积25 μL ,含引物各0.4 $\mu\text{mol/L}$, dNTP各0.5 mmol/L, Taq DNA合成酶2 U, Mg^{2+} 2.5 mmol/L, 1×PCR缓冲液,基因组DNA 100 ng。PCR反应条件: 95°C 预变性2 min, 95°C 变性30 s, 退火1 min, 70°C 延伸1 min, 共35个循环, 70°C 延伸10 min, 反应产物15 g/L琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2 甲基化PCR (MSP) 参考Herman *et al*^[8]的实验方法并加以改进。取DNA 10 μg 溶于40 μL 去离子水中,加入1 mol/L NaOH 10 μL , 37°C水浴10 min,加入新鲜配制的10 mmol/L氢醌30 μL 和3 mol/L NaHSO₃ 520 μL ,液体石蜡覆盖,55°C反应16 h后,用Wizard DNA Clean up System除盐,洗脱在100 μL 去离子水中,加入1 mol/L NaOH 50 μL ,室温放置5 min,无水乙醇沉淀,750 mL/L的乙醇洗涤,DNA溶于20 μL 去离子水中,-20°C保存。PCR反应条件为: 95°C 预变性5 min, 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 共40个循环, 72°C 延伸10 min, 反应产物行20 g/L琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3 RNA抽提和RT-PCR RNA抽提用Trizol试剂盒提取细胞总RNA后测定其浓度和纯度, RT反应。逆转录cDNA第1链合成: 反应体系20 μL ,含随机引物0.5 μg ,逆转录酶200 U, RNA 1.0 μg , dNTP 0.5 mmol/L, Rnasin 20 U, 37°C 反应60 min, 95°C 灭活逆转录酶5 min。PCR反应: 反应体系25 μL ,含 Mg^{2+} 2.5 mmol/L,

表 1 引物序列、产物长度及退火温度

引物	引物序列		产物长度 (bp)	退火温度 (°C)
<i>p15</i> 甲基化引物 (<i>p15M</i>)	sense	5'-GCGTTCGTATTTGCGGTT-3'	148	60
	antisense	5'-CGTACAATAACCGAACGACCGA-3'		
<i>p15</i> 非甲基化引物 (<i>p15U</i>)	sense	5'-TGTGATGTGTTGTATTTGTGGTT-3'	154	60
	antisense	5'-CCATACAATAACCAACAAACCAA-3'		
<i>p15</i> 外显子1引物	sense	5'-CCAGAACAACTCCAGGCGCG-3'	532	59
	antisense	5'-AATGCACACCTCGCCAACG-3'		
<i>p15</i> 外显子2引物	sense	5'-CCTAAATGGCTCCACCTGC-3'	434	58
	antisense	5'-CGTTGGCAGCCTCATCG-3'		
<i>p15</i> RT-PCR引物	sense	5'-CCAGAACAACTCCAGGCGCG-3'	753	58
	antisense	5'-CGTTGGCAGCCTCATCG-3'		
β -actin引物	sense	5'-TCCTCCTGAGCGCAAGTAC-3'	301	57
	antisense	5'-GTCACCTCACCGTTCCAG-3'		

dNTP 0.5 mmol/L, cDNA 2 μ L, 上下游引物各 0.4 μ mol/L, Taq DNA合成酶2 U, 反应35个循环, 产物经12 g/L琼脂糖凝胶电泳, 以表达*p15*的HeLa细胞为阳性对照, 以目的基因与 β -actin的灰度比进行半定量分析.

1.2.4 Western blot 提取As₂O₃细胞处理前后的蛋白, 用Bradford法定量. 50 g/L积层胶, 120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 进行一抗、二抗孵育和显色, 并照相. 以表达P15蛋白的HeLa细胞为阳性对照, 以目的蛋白与ACTB的灰度比进行半定量分析.

统计学处理 应用SPSS 11.0统计软件, 采用单因素方差分析, 多个均数之间两两比较 q 检验.

2 结果

2.1 EC109细胞*p15*基因表达情况 *p15*基因共有2个外显子, 分别为外显子1和外显子2, 经PCR检测EC109细胞中*p15*的2个外显子均无缺失, 和阳性对照正常人白细胞基因组DNA均可扩增出目的条带(图1). RT-PCR发现EC109细胞*p15*基因mRNA无表达, 而阳性对照HeLa细胞有*p15*mRNA表达(图3). 由此推断EC109细胞*p15*基因不表达可能因为启动子区发生高甲基化, 于是进行甲基化检测.

2.2 As₂O₃对EC109细胞*p15*基因甲基化状态的影响 甲基化特异PCR (MSP)检测发现(图2), EC109细胞*p15*基因为高甲基化状态, 呈MSP阳性(*p15M*阳性, *p15U*阴性), 对照HeLa细胞MSP阴性(*p15M*阴性, *p15U*阳性). 2 μ mol/L As₂O₃作用的24-72 h内, 随作用时间延长, 条带灰度减弱, 说明甲基化程度逐渐降低, 至72 h已检测不出甲基化. 以As₂O₃作用72, 48, 24 h组和未加药组

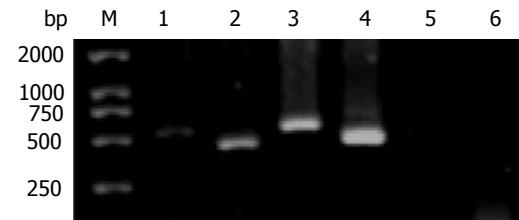


图 1 EC109细胞*p15*基因外显子1, 2的PCR分析. M: Marker; 1, 2: EC109外显子1, 2; 3, 4: 正常人白细胞外显子1, 2; 5, 6: 外显子1, 2阴性对照.

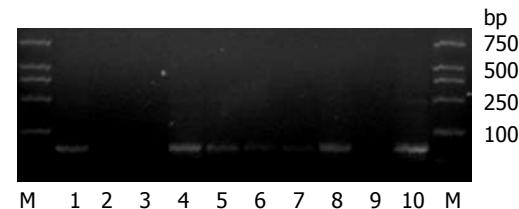


图 2 2 μ mol/L As₂O₃作用EC109细胞*p15*基因甲基化及去甲基化分析. M: Marker; 1, 2: 未加药EC109甲基化和非甲基化引物; 3, 4: HeLa甲基化和非甲基化引物; 5, 6: As₂O₃作用24 h甲基化和非甲基化引物; 7, 8: As₂O₃作用48 h甲基化和非甲基化引物; 9, 10: As₂O₃作用72 h甲基化和非甲基化引物.

之间差异均有统计学意义(37.11 ± 3.62 vs 50.92 ± 5.47 vs 72.07 ± 7.53 vs 97.23 ± 9.80 , $P < 0.05$). 2 μ mol/L As₂O₃作用EC109细胞24 h后, 非甲基化引物可以扩增出目的条带, 随时间延长, 条带灰度增强. 以As₂O₃作用72, 48, 24 h组和未加药组之间差异均有统计学意义(117.97 ± 18.15 vs 87.93 ± 8.50 vs 53.68 ± 4.50 vs 31.55 ± 2.96 , $P < 0.05$).

2.3 As₂O₃对EC109细胞*p15*基因mRNA表达的影响 RT-PCR检测发现EC109细胞*p15*基因mRNA无表达, 2 μ mol/L As₂O₃作用24 h后可见*p15*

■创新点

本实验在既往研究的基础上首次证实As₂O₃对实体瘤高甲基化的*p15*基因有去甲基化作用, 首次报道As₂O₃使实体瘤高甲基化的*p15*在mRNA和蛋白水平表达均有上调, 在国内外未见报道.

■应用要点

本实验提示可用去甲基化药物治疗实体肿瘤, 揭示了As₂O₃对实体瘤的分子水平的一个药理作用, 对今后的研究有一定借鉴意义.

■名词解释

DNA甲基化常发生在抑癌基因的启动子区，可以在转录水平抑制基因表达。CpG岛的异常甲基化是指DNA基因启动子区CG重复50%区域，在甲基化转移酶的作用下，使DNA上的胞嘧啶转变为5-甲基胞嘧啶，引起基因表达降低，而DNA序列不变，是导致基因组不稳定而引发肿瘤的重要机制。

基因目的条带，说明*p15*基因mRNA出现表达，As₂O₃作用24-72 h中*p15*基因目的条带灰度逐渐增强，说明*p15*基因mRNA表达随As₂O₃作用时间延长而逐渐增强(图3)，用Scion Image软件测量条带灰度值，以目的基因与β-actin条带的灰度比进行半定量分析，各个时间组之间比较显示，除了未加药组和加药24 h组之间及加药24 h组和加药48 h组之间差异无统计学意义外，其余各个时间组之间差异有统计学意义(0.72 ± 0.07 vs 0.58 ± 0.06 vs 0.48 ± 0.07 vs 0.41 ± 0.08 , $P < 0.05$)。

2.4 As₂O₃诱导P15蛋白表达 经Western blot检测证实，EC109细胞无P15蛋白表达，2 μmol/L As₂O₃作用24 h后出现P15蛋白目的条带，说明P15蛋白出现表达，作用24-72 h中P15蛋白条带灰度逐渐增强，说明其表达随As₂O₃作用时间延长而逐渐增强(图4)，用Scion Image软件测量条带灰度值，以P15蛋白与ACTB条带的灰度比进行半定量分析，As₂O₃作用72, 48, 24 h组和未加药组之间差异均有统计学意义(0.51 ± 0.02 vs 0.21 ± 0.01 vs 0.16 ± 0.02 vs 0.06 ± 0.01 , $P < 0.05$)。

3 讨论

食管癌在我国占恶性肿瘤发病的第4位^[9-10]，预后较差。As₂O₃是一种有广阔应用前景的抗癌中药，探寻其对食管癌的抑制效应具有重要意义，并有助于揭示As₂O₃对实体瘤的作用机制。随着对肿瘤发病机制的研究，人们认识到，肿瘤是一类细胞周期异常性疾病^[11]。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI)作用丧失，可使G₁/S调控点出现异常，导致肿瘤发生和发展。*p15*是近年来发现的一类CKI分子，被认为是除了*p53*, *Rb*等之外的重要抑癌基因^[12]，能特异地与cyclinD/CDK4或cyclinD/CDK6结合并阻抑他们的活性，控制细胞G₁/S期的转移，负调控细胞周期。DNA甲基化是肿瘤发生的重要机制，抑癌基因失活与其启动子区CpG岛高甲基化状态直接相关^[13-14]。多种肿瘤细胞中都有*p15*基因启动子区CpG岛异常高甲基化^[15-22]。*p15*基因启动子区CpG岛高甲基化是导致该基因失活的重要方式。食管鳞癌中*p15*基因高甲基化发生率约为12.5%^[23]。我们发现，食管癌EC109细胞*p15*高甲基化，故以之为模型，研究As₂O₃对实体瘤*p15*基因去甲基化和诱导其表达的作用。

MSP检测时，我们在亚硫酸氢盐处理DNA前将基因组DNA进行定量，PCR反应体系加入相同量的纯化DNA，以达到实验结果的可比性。

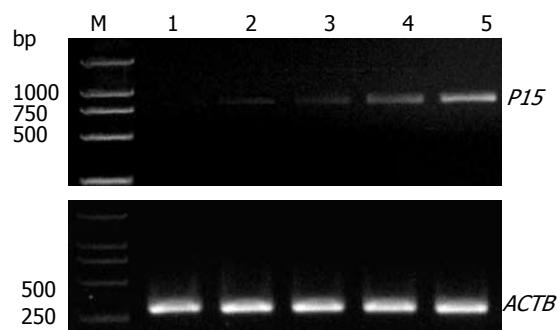


图3 2 μmol/L As₂O₃作用EC109细胞*p15* mRNA表达。M: Marker; 1: 未加药; 2-4: As₂O₃作用24, 48, 72 h; 5: 阳性对照HeLa细胞。

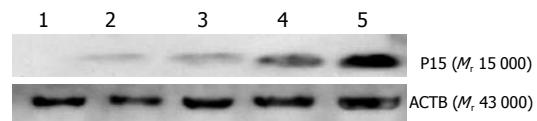


图4 2 μmol/L As₂O₃作用EC109细胞P15蛋白表达。1: 未加药EC109; 2-4: As₂O₃作用24, 48, 72 h; 5: 阳性对照HeLa细胞。

结果发现EC109细胞存在*p15*基因高甲基化，经2 μmol/L的As₂O₃作用24 h后该细胞甲基化程度明显降低，至72 h后甲基化基本消失，已检测不出。临幊上以10 mg/d的As₂O₃治疗肿瘤的血药浓度峰值约是5 μmol/L, 2 μmol/L的体外实验剂量是根据临幊用药量推算而来。童迎凯 et al^[12]发现，*p15*基因的表达可引起*c-myc*表达降低而产生细胞周期抑制。邓友平 et al^[24]发现，2 μmol/L As₂O₃作用2 d可使EC109细胞出现凋亡特征，并伴随*c-myc*表达的降调节，这与本研究相吻合，As₂O₃治疗剂量使*p15*基因去甲基化，并在mRNA和蛋白质水平上调*p15*基因的表达，抑制细胞周期进程并引起*c-myc*表达降低。佟红艳 et al^[25]和金哈斯 et al^[26]报道，使用As₂O₃可诱导非实体瘤骨髓增生异常综合征细胞株MUTZ1细胞和急性淋巴细胞白血病细胞株Molt4细胞*p15*基因去甲基化，使此二细胞株*p15* mRNA表达。我们首次证实，As₂O₃对实体瘤EC109细胞*p15* DNA有去甲基化作用，在mRNA水平诱导*p15*表达，并首次证实在蛋白质水平亦诱导*p15*表达，从而揭示了As₂O₃对实体瘤的一个分子水平的药理作用。

甲基化是由DNMTs催化完成的，迄今发现有3种与DNA甲基化相关的酶，分别是DNMT1, DNMT3a和DNMT3b。As₂O₃干扰DNMT的催化反应。As₂O₃以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体^[27]，消耗S-腺苷蛋氨酸，产生一甲基腺酸和二甲基腺酸，而DNMT催化甲基化过程也以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体^[28]，DNA甲基化的可逆性特征为

临床抗肿瘤治疗提供一种新途径。As₂O₃可能导致DNMT催化甲基化过程中甲基供体的相对或绝对不足。砷是巯基酶抑制剂，DNMT3a和DNMT3b羧基端催化域都含有丰富的半胱氨酸巯基^[29]，As₂O₃可能直接抑制DNMT3a和DNMT3b的活性。As₂O₃代谢产生的S-腺苷同型半胱氨酸是DNMT的抑制物^[30]，因而，As₂O₃使因高甲基化而不能表达的p15去甲基化而表达。佟红艳 et al^[25]发现，骨髓增生异常综合征细胞株MUTZ1细胞3种甲基转移酶的表达均明显增高，As₂O₃能在mRNA水平下调DNMT3a和DNMT3b的表达并呈剂量依赖性，推测As₂O₃在实体瘤食管癌中可能有类似作用。

总之，As₂O₃对EC109细胞抑癌基因p15的去甲基化作用为我们提供了用去甲基化药物治疗实体肿瘤的一种新思路，并提示As₂O₃用于实体瘤的治疗的药理作用机制之一，是对p15的去甲基化效应所引起的细胞周期阻滞。

4 参考文献

- 1 吴顺华, 郑玉建, 成军, 刘妍, 张跃新, 刘开泰, 钟彦伟, 吴煜. 低剂量三氧化二砷对HepG2细胞基因表达谱调节的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 100-104
- 2 唐印华, 田永刚, 刘铁夫, 徐洪雨, 庄丽维, 梁桃, 姜爱民. 三氧化二砷抑制小鼠体内肝癌细胞增殖的实验研究. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2074-2077
- 3 吴顺华, 成军, 郑玉建. 三氧化二砷治疗肝癌的分子机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1737-1743
- 4 刘静冰, 秦叔達, 李进. 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1713-1716
- 5 吴顺华, 成军, 郑玉建, 张跃新, 刘妍, 郭江, 张黎颖, 王国荃. 应用抑制性消减杂交技术筛选三氧化二砷对肝细胞调节的差异表达基因. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1535-1539
- 6 刘琳, 邱少敏, 赵伟, 夏海鸣, 秦叔達, 陈惠英. 三氧化二砷诱导人类大肠癌细胞凋亡的分子机制. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1550-1554
- 7 华海清, 秦叔達, 王锦鸿, 陈惠英. 三氧化二砷抗肿瘤血管形成研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 27-31
- 8 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9821-9826
- 9 张逊. 食管癌TNM分期的现状及发展趋势. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 641-644
- 10 曹志成. 中西医理论治疗食管癌进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 709-713
- 11 张学彦, 刘铁夫, 于旸, 刘伟, 崔希威. p15^{INK4B}基因转染对人食管鳞癌细胞EC109增殖的抑制作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1945-1950
- 12 童迎凯, 刘军, 柳惠图. CKI p15^{INK4B}高表达对人黑色素瘤细胞cyclinD1和c-myc表达的影响及生长特性的改变. 中国生物化学与分子生物学报 2000; 16: 514-519
- 13 Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349-352
- 14 Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21: 163-167
- 15 Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res* 1996; 56: 722-727
- 16 Aggerholm A, Holm MS, Guldberg P, Olesen LH, Hokland P. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol* 2006; 76: 23-32
- 17 Fukai K, Yokosuka O, Imazeki F, Tada M, Mikata R, Miyazaki M, Ochiai T, Saisho H. Methylation status of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005; 25: 1209-1216
- 18 Liu Z, Wang LE, Wang L, Lu KH, Mills GB, Bondy ML, Wei Q. Methylation and messenger RNA expression of p15INK4b but not p16INK4a are independent risk factors for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4968-4976
- 19 Shimamoto T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Methylation of p15(INK4b) and E-cadherin genes is independently correlated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2005; 29: 653-659
- 20 Furonaka O, Takeshima Y, Awaya H, Ishida H, Kohno N, Inai K. Aberrant methylation of p14(ARF), p15(INK4b) and p16(INK4a) genes and location of the primary site in pulmonary squamous cell carcinoma. *Pathol Int* 2004; 54: 549-555
- 21 Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2003; 163: 1101-1107
- 22 Wong TS, Man MW, Lam AK, Wei WI, Kwong YL, Yuen AP. The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1881-1887
- 23 Nie Y, Liao J, Zhao X, Song Y, Yang GY, Wang LD, Yang CS. Detection of multiple gene hypermethylation in the development of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1713-1720
- 24 邓友平, 林晨, 张雪艳, 陈德权, 肖培根, 吴旻. 三氧化二砷诱导人食管癌Ec109细胞凋亡伴随c-myc基因的降调节. 中国医学科学院学报 2000; 22: 67-70
- 25 佟红艳, 林茂芳. 三氧化二砷诱导人骨髓增生异常综合征细胞株MUTZ-1细胞p15INK4B基因表达的研究. 中华血液学杂志 2002; 23: 638-641
- 26 金哈斯, 楼方定, 于力. As₂O₃诱导急性淋巴细胞白血病细胞系Molt4细胞p15基因表达的研究. 中华血液学杂志 2001; 22: 24-26
- 27 Vahter M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 2002; 181-182: 211-217
- 28 Gonzalez-Fraile MI, Garcia-Sanz R, Mateos MV, Balanzategui A, Gonzalez M, Vaquez L, San Miguel JF. Methylenetetrahydrofolate reductase genotype does not play a role in multiple myeloma pathogenesis. *Br J Haematol* 2002; 117: 890-892
- 29 Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 1999; 236: 87-95
- 30 James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nutr* 2002; 132: 2361S-2366S

■同行评价

本文研究目的明确，实验设计合理，研究方法和实验证据可靠，有创新性，能较好地反映我国食管癌基础研究的水平，具有较好的学术参考价值。



HBV抗原基因修饰树突状细胞疫苗体外抗HBV的作用

黄呈辉, 欧阳玲, 黄建国, 黎淦平, 江鹏飞, 姚集鲁

■背景资料

HBV感染常导致慢性持续感染, 有研究表明, 慢性乙型肝炎产生免疫耐受的原因之一是患者体内抗原提呈细胞, 尤其是树突状细胞(DCs)数量减少和功能存在缺陷, 不能将抗原信号有效呈递给机体的免疫系统而发挥免疫清除效应。通过提高DCs的抗原提呈功能, 诱导出更加强有力的特异性免疫应答反应, 已成为抗病毒和抗肿瘤免疫治疗的新途径。

黄呈辉, 欧阳玲, 黄建国, 黎淦平, 深圳市宝安区中心血站研究室 深圳市 518101
江鹏飞, 深圳市龙华人民医院内科 深圳市 518109
姚集鲁, 中山大学附属第三医院感染科 广东省广州市 510630
黄呈辉, 1990年江西医学院学士, 1997年首都医科大学硕士, 2003年中山大学中山医学院博士, 副主任医师, 主要从事病毒性肝炎研究工作。
深圳市科技计划资助课题, No. 200204157和2005157
通讯作者: 黄呈辉, 518101, 深圳市宝安区新城龙井路16区, 深圳市宝安区中心血站研究室, chuih67@163.com
电话: 0755-27751196 传真: 0755-27751196
收稿日期: 2006-04-03 接受日期: 2006-04-24

Induction of specific cytotoxic T lymphocyte responses against hepatitis B virus by hepatitis B virus antigen gene-modified dendritic cells

Cheng-Hui Huang, Ling Ou-Yang, Jian-Guo Huang, Gan-Ping Li, Peng-Fei Jiang, Ji-Lu Yao

Cheng-Hui Huang, Ling Ou-Yang, Jian-Guo Huang, Gan-Ping Li, Shenzhen Baoan Blood Center, Shenzhen 518101, China

Peng-Fei Jiang, Department of Internal Medicine, Shenzhen Longhua People's Hospital, Shenzhen 518109, China
Ji-Lu Yao, Department of Infectious Diseases, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China
Supported by the Science and Technology Foundation of Shenzhen City, No. 200204157 and 2005157

Correspondence to: Dr. Cheng-Hui Huang, Shenzhen Baoan Blood Center, Shenzhen 518101, China. chuih67@163.com
Received: 2006-04-03 Accepted: 2006-04-24

Abstract

AIM: To explore whether hepatitis B virus (HBV) antigen gene-modified dendritic cells (DCs) are able to induce a specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response.

METHODS: Three recombinant adenoviruses, Ad-HBs, Ad-HBe and Ad-HBc (carrying HBsAg, HBeAg and HBcAg genes respectively), were prepared and transfected into DCs generated from cord blood. The efficacy of transfection was observed through the expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in DCs and the expression of HBV antigen were detected by

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HBV antigen gene-modified DCs were co-cultured with T lymphocytes from cord blood and the proliferation of T cells were detected using mixed lymphocyte reaction (MLR). Lactate dehydrogenase (LDH) release assay was carried out to assess the killing ability of CTL cells against HepG₂22.1.5 cells.

RESULTS: HBV antigen genes were expressed in DCs with a high efficacy by recombinant adenoviral vector. EGFP were observed in 90% transfected DCs and DCs kept their typical forms after transfection. The titers (absorbance) of HBsAg and HBeAg were 0.919 and 0.328, respectively, in the culture supernatant 72 h after transfection. The result of MLR showed that HBV gene-modified DCs effectively stimulated naive T lymphocytes to proliferate. There was no significant difference among Ad-HBs, Ad-HBe, Ad-HBc transfection group and normal group ($F = 1.194$, $P = 0.389$). The specific CTL cells generated by HBV antigen gene-modified DCs had obvious cytotoxicity against HepG₂22.1.5 cells, and the cytotoxicity in Ad-HBs, Ad-HBe, Ad-HBc transfection group was significantly higher than that in normal group (all $P < 0.001$). The cytotoxicity in Ad-HBc transfected group was the strongest.

CONCLUSION: HBV gene-modified DCs are able to effectively stimulate naive T lymphocytes to proliferate and enhance the specific CTL response at the same time, showing its promising future for developing anti-viral vaccine.

Key Words: Hepatitis B virus; Antigen; Dendritic cells; T lymphocytes; Cytotoxicity; Adenovirus vector

Huang CH, Ou-Yang L, Huang JG, Li GP, Jiang PF, Yao JL. Induction of specific cytotoxic T lymphocyte responses against hepatitis B virus by hepatitis B virus antigen gene-modified dendritic cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1864-1869

摘要

目的: 探讨腺病毒载体介导HBV抗原基因修饰的树突状细胞(DCs)诱导抗HBV特异性CTL

反应。

方法: 制备携带HBsAg、HBeAg和HBcAg基因的3种重组腺病毒Ad-HBs, Ad-HBe, Ad-HBc, 分别转染自脐带血体外诱导培养的DCs, 观察腺病毒转染DCs效率和DCs中HBV抗原的表达; 混合淋巴细胞反应(MLR)测定HBV抗原基因修饰DCs刺激同种异体T淋巴细胞增殖能力; 乳酸脱氢酶释放法检测特异性CTL细胞对HepG₂22.1.5靶细胞的杀伤能力。

结果: 腺病毒载体能够高效介导HBV三个抗原基因在DCs中表达, 90%以上DCs表达示踪基因EGFP, 且DCs细胞形态完整; 感染后72 h HBsAg和HBeAg含量分别为0.919和0.328(吸光度A值)。MLR实验显示, HBV抗原基因修饰DCs仍然具有刺激同种异体T细胞的增殖能力, Ad-HBs转染DCs组、Ad-HBe转染DCs组、Ad-HBc转染DCs组和未转染DCs组之间刺激T细胞的增殖水平无明显差异($F = 1.194$, $P = 0.389$); 在E:T比例为2:1, 10:1和25:1时, Ad-HBs转染DC组、Ad-HBe转染DCs组和Ad-HBc转染DCs组对HepG₂22.1.5细胞的杀伤率均明显高于未转染DCs组($P < 0.001$); 以Ad-HBc转染DC组对HepG₂22.1.5细胞杀伤率最高。

结论: HBV抗原基因修饰DCs疫苗具有刺激同种异体T细胞增殖能力, 同时能增强抗HBV特异性CTL反应的能力, 可能发展为一种新型抗病毒疫苗。

关键词: 乙型肝炎病毒; 抗原; 树突状细胞; T淋巴细胞; 细胞毒性; 腺病毒载体

黄呈辉, 欧阳玲, 黄建国, 黎淦平, 江鹏飞, 姚集鲁. HBV抗原基因修饰树突状细胞疫苗体外抗HBV的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1864–1869

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1864.asp>

0 引言

在HBV感染中, 由于机体不能产生有效的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应, 常导致HBV慢性持续感染。有研究表明, 慢性乙型肝炎产生免疫耐受的原因之一是患者体内抗原提呈细胞, 尤其是树突状细胞(DCs)数量减少和功能存在缺陷, 不能将抗原信号有效提呈给机体的免疫系统而发挥免疫清除效应^[1-6]。通过提高DCs的抗原提呈功能, 诱导出更强有力的特异性免疫应答反应, 已成为抗病毒和抗肿瘤免疫治疗的一种新途径^[7-10]。我们利用整合HBV基因组的HepG₂22.1.5

为细胞模型, 通过携带有编码HBV抗原基因的重组腺病毒载体的介导, 探讨腺病毒介导的HBV抗原基因修饰的DCs能否诱导产生特异性抗感染免疫反应, 为以DCs为基础肝炎病毒免疫治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 携带HBsAg, HBeAg和HBcAg基因的复制缺陷型重组腺病毒Ad-HBs, Ad-HBe, Ad-HBc由本室构建^[11]; 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组人白介素-4(rhIL-4)、重组人白介素-2(rhIL-2)和重组人肿瘤坏死因子(rhTNF- α)购自德国ReliaTech公司; 丝裂霉素C(mitomycin C)、G418和四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自Sigma公司; Cytotox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay试剂盒(乳酸脱氢酶法)购自Promega公司; 细胞因子IL-12、IL-10和IFN- γ ELISA检测试剂盒购自深圳晶美生物公司; HBsAg ELISA检测试剂购于荷兰欧嘉隆公司, HBeAg ELISA检测试剂购于厦门新创公司; HepG₂22.1.5细胞系由第一军医大学附属南方医院感染科骆抗先教授惠赠。脐带血树突状细胞的体外培养和鉴定参见文献[12]。于培养第12天, 收集悬浮细胞, 进行电镜观察, 并在流式细胞仪上进行DC表面分子检测。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒介导HBV抗原基因转染DCs 收集12 d的DCs, PBS液洗2次, 细胞计数, 调整至 2.5×10^6 /孔于24孔培养板上, 分别加入重组腺病毒Ad-HBs, Ad-HBe和Ad-HBc感染DCs (MOI值为80), 50 mL/L CO₂, 37°C孵箱中孵育1 h后加完全RPMI 1640培养液继续培养, 同时设1孔未转染Ad的DCs作对照。6 h后, 收集并洗涤2次, 去除多余的病毒, 再加含细胞因子的完全RPMI 1640培养液继续培养48-72 h, 于荧光显微镜下观察DCs中EGFP表达, ELISA检测培养上清中HBsAg和HBeAg的含量。

1.2.2 同种混合淋巴细胞反应(MLR) 取脐带血20 mL, 经淋巴细胞分离液密度梯度离心后分离获得单个核细胞, 加完全RPMI 1640培养液, 50 mL/L CO₂, 37°C孵箱中孵育2 h后去除贴壁的单核巨噬细胞, 收集未贴壁细胞, 用免疫磁珠负选法去除B淋巴细胞, 收集获得T淋巴细胞即反应细胞。取3种腺病毒介导HBV抗原基因修饰的DCs, 加入丝裂霉素C, 终浓度为50 mg/L, 于50 mL/L CO₂, 37°C孵箱中孵育45 min, PBS洗

■研究前沿

DCs抗HBV感染已经成为抗病毒免疫治疗的研究新热点, 但目前多使用多肽抗原刺激DCs以提高抗原提呈能力, 但多肽存在严格的MHC限制性, 且抗原多肽的半衰期仅为2-10 h, 要诱导出高水平的持久的抗病毒免疫效应, 则需要反复多次回输抗原多肽体外致敏的DCs。

■创新盘点

本实验制备3种分别携带HBV抗原基因和绿色荧光蛋白(GFP)的重组非复制型腺病毒,采用脐带血来源分离诱导培养DCs,并用腺病毒介导HBV抗原转染DCs,成功制备脐带血来源的DCs治疗性疫苗,目前国内外文献还未见报道。

2次,完全RPMI 1640培养液悬浮,作为刺激细胞。分别以 2×10^5 , 4×10^4 , 2×10^4 细胞/孔加入96孔平底培养板中,每组设3个复孔,每组再加入 2×10^5 孔的上述制备的T淋巴细胞,总体积为200 μL , 50 mL/L CO₂, 37°C孵育箱培养96 h。另取PBMC作为DC阴性对照组。采用MTT法检测T淋巴细胞增殖能力,方法:培养结束前6 h,吸去孔中的培养液,加入新鲜培养液100 μL ,再加入5 g/mL的MTT 25 μL ,轻轻混匀各孔,50 mL/L CO₂, 37°C孵育箱继续孵育4-6 h。吸去孔中培养液,使体积小于50 μL ,加入DMSO 150 μL ,振荡混匀10 min,于620 nm检测吸光度(A值)。计算刺激指数(stimulating index, SI)=(实验组A值-本底A值)/(对照组A值-本底A值),结果以3孔的均值表示。另收集混合淋巴细胞反应培养96 h后的上清,用ELISA试剂盒检测上清中的细胞因子IL-12, IL-10和IFN- γ 含量。

1.2.3 CTL细胞体外杀伤活性的检测 采用乳酸脱氢酶释放法^[13]。在24孔培养板中加入培养成熟的DCs(12 d),分别以MOI=80的重组腺病毒液Ad-HBs, Ad-HBe, Ad-HBc转染,48 h后按 2×10^6 /孔加入分离的T淋巴细胞,加入含rhIL-25 kU/L, rhGM-CSF 50 $\mu\text{g}/\text{L}$, rhIL-4 25 $\mu\text{g}/\text{L}$, rhTNF- α 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 完全RPMI 1640培养液,50 mL/L CO₂, 37°C孵箱培养,隔天半量换液,继续培养至第8天,离心收集细胞作为效应细胞。用胰酶消化传代HepG2.2.1.5细胞(靶细胞),按 5×10^3 /孔加入96孔培养板中,添加培养液至体积200 μL ,培养过夜。按效应细胞:靶细胞比例分别为2:1,10:1和25:1加入效应细胞于上述制备的靶细胞中,每组设3个复孔。同时设4个对照:靶细胞最大释放组、体积校正对照组、背景对照组和自然释放组。于50 mL/L CO₂, 37°C孵育箱孵育4 h,在孵育结束前45 min,靶细胞最大释放组和体积校正对照组中加入裂解液10 μL 。之后每孔吸取上清50 μL 于另一96孔酶标板中,再加入底物混合液50 μL ,室温反应30 min,加入50 μL 终止液,混匀后于490 nm测定A值。计算靶细胞杀伤率(%)=(实验组释放-效应细胞自发释放-靶细胞自发释放)/(靶细胞最大释放-靶细胞自发释放)×100%。

统计学处理 数据用SYSTAT统计软件进行处理,组间比较采用双因素方差分析F检验。

2 结果

2.1 重组腺病毒介导的HBV抗原基因转染DCs

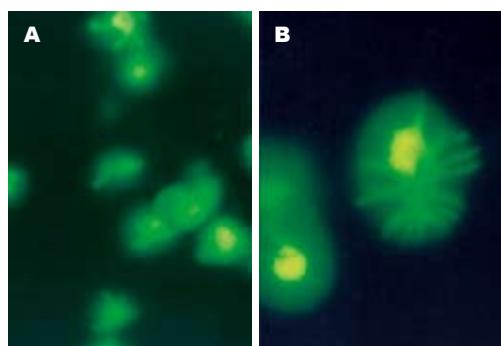


图1 重组腺病毒Ad-HBs转染DCs后EGFP表达和形态。A: Ad-HBs转染DCs的效率($\times 400$); B: DCs转染后的细胞形态($\times 600$)。

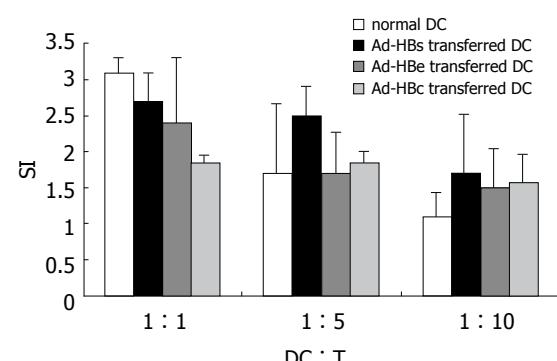


图2 DCs刺激同种异体T淋巴细胞增殖。

通过倒置荧光显微镜下观察显示,3个重组腺病毒Ad-HBs, Ad-HBe和Ad-HBc感染DCs后48 h,约90%以上DCs表达示踪基因EGFP,且形态正常,具有典型树突样突起(图1)。用MOI=80的Ad-HBs和Ad-HBe重组腺病毒液感染 2.5×10^6 的DCs,用ELISA检测培养液上清HBV抗原基因表达的HBsAg和HBeAg的分泌,结果于感染后48 h HBsAg和HBeAg含量分别为0.719和0.161(A值),72 h上升为0.919和0.328。表明重组腺病毒已经有效介导HBV抗原在DCs中表达。为观察重组腺病毒介导HBV抗原基因修饰的DCs抗原提呈能力的变化,我们进行同种混合淋巴细胞反应试验,结果显示,在DCs:T比例为1:1,1:5和1:10时,HBV 3种抗原基因修饰DCs仍然具有很强的刺激同种异体T细胞的增殖能力。经双因素方差统计分析,Ad-HBs转染DCs组、Ad-HBe转染DCs组、Ad-HBc转染DCs组和未转染DCs组之间刺激T细胞的增殖水平无明显差异($F = 1.194$, $P = 0.389 > 0.05$, 图2)。

2.2 细胞因子的检测 MLR反应上清中IL-12产量以Ad-HBc转染DCs组最高,为 115 ± 16.1 ng/L,未转染DCs组、Ad-HBs转染DCs组和Ad-HBe转

染DCs组IL-12产量差异不明显。IFN- γ 分泌量在上述4组之间差异也不明显; IL-10产量以未转染DCs组最高, 为 120 ± 21.4 ng/L, 而Ad-HBc转染DCs组最低, 为 80 ± 20.7 ng/L(表1)。

2.3 HBV抗原基因修饰DCs诱导特异性CTL活性 HBV抗原基因修饰DCs诱导的CTL对靶细胞HepG₂22.1.5具有明显的杀伤活性(图3)。Ad-HBs转染DCs组、Ad-HBe转染DCs组和Ad-HBc转染DCs组对HepG₂22.1.5细胞的杀伤率明显高于未转染DCs组($P < 0.001$); 除Ad-HBs转染DCs组和Ad-HBe转染组之间对HepG₂22.1.5细胞杀伤率无明显差异($F = 0.534$, $P = 0.493 > 0.05$)外, 其他各组之间均有明显差异($P < 0.01$), 以Ad-HBc转染DCs组杀伤HepG₂22.1.5细胞率最高。

3 讨论

树突状细胞是目前所知的功能最强的专职抗原提呈细胞, 也是唯一能够激活初始T淋巴细胞的抗原提呈细胞。近年来体外大量扩增DCs的方法日益成熟, 使DCs用于抗感染免疫和抗肿瘤免疫治疗受到重视。通过在体外扩增DCs的同时采用肿瘤或病毒抗原冲击致敏DCs, 提高DCs的抗原提呈能力, 诱导抗原特异性免疫反应来清除肿瘤细胞或病毒感染。如何使成熟DCs负载肿瘤或病毒抗原, 是能否诱导特异性CTL产生的关键所在。现已经有的方法有: 抗原蛋白或多肽片段与DCs共培养^[14-16], 病毒载体(腺病毒、逆转录病毒、痘苗病毒等)介导^[17-18], 裸DNA通过化学或物理方法转染^[19]。DCs是一种终末期细胞, 用化学和物理方法转染外源基因的效率低; 逆转录病毒载体能携带外源基因整合进靶细胞的基因组内, 使目的基因长期稳定表达。但是, 由于外源基因的插入有导致基因突变的危险, 因此存在潜在的遗传毒性。此外, 逆转录病毒只能感染分裂增殖期的细胞, 且繁殖滴度低, 用逆转录病毒载体介导目的基因转染DCs, 效率较低^[20]。腺病毒具有转染宿主细胞广泛、能够感染静止期细胞的特点, 采用腺病毒载体介导基因修饰DCs, 已经成为转染DCs的首选病毒载体^[18-19,21-22]。我们用腺病毒E1, E3缺陷型重组腺病毒介导HBV抗原基因转染成熟DCs, 在MOI为80时, 90%以上的DCs能够表达HBV抗原蛋白, 说明腺病毒载体能够高效介导目的基因转染DCs, 转染前后DCs形态无明显改变, 也无明显毒副作用。同时, 转染后成熟DCs仍然具有较强的刺激同种异体T淋巴细胞增殖能力和分泌细胞因子

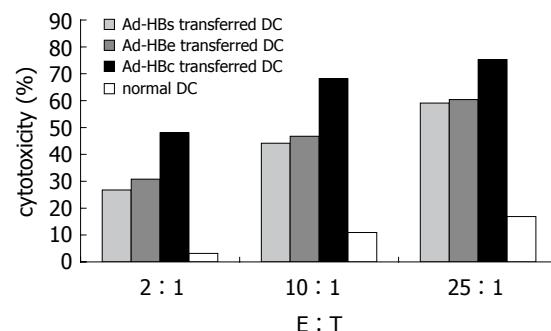


图3 HBV抗原基因修饰DCs诱导CTL的细胞杀伤活性。

■应用要点
用重组腺病毒介导HBV抗原基因修饰DCs, 体外成功诱导特异性CTL反应, 为DCs预防的抗HBV慢性感染的临床治疗提供了实验基础, 也为HBV治疗提供一种新的治疗手段和思路, 将造福千千万万的HBV感染者。

表1 ELISA检测MLR中细胞因子IL-12、IFN- γ 和IL-10含量
(mean \pm SD)

DC	IL-10	IL-12 ^b	IFN- γ
Normal	120.2 ± 21.4	30.5 ± 4.6	62.5 ± 6.4
Ad-HBs transferred	105.7 ± 30.8	40.3 ± 8.5	50.5 ± 10.6
Ad-HBe transferred	95.4 ± 13.6	46.0 ± 2.3	60.2 ± 6.2
Ad-HBc transferred	80.6 ± 20.7	115.8 ± 16.1	65.6 ± 11.2

^b $P < 0.01$ 。

IL-12的能力, 说明重组腺病毒不影响DCs的各种功能。提示腺病毒载体是介导目的基因转染DCs效率最高、较理想的载体。

在体外培养的条件下, 经过HBV多肽抗原或蛋白质等抗原激活DCs, 制备特异的DCs疫苗在体内外能诱导特异的抗体和CTL效应^[23-25]。但多肽存在严格的MHC限制性, 且抗原多肽的半衰期仅为2-10 h, 若要诱导出高水平的持久的抗病毒免疫效应, 则需要反复多次回输抗原多肽体外致敏的DCs。将病毒抗原基因导入DCs, 可不受MHC限制, 能够提供更有效的抗原表位, 使DCs持续表达抗原基因产物, 从而诱导特异性CTL反应。在DCs疫苗抗肿瘤治疗研究中发现, 利用基因转导方法, 以编码肿瘤抗原基因载体对DCs骨髓前体细胞进行转导, 再辅以GM-CSF和IL-4培养, 能产生大量表达TAA或TSA的DCs^[26]。这种DCs在动物模型中能诱导抗原特异的CTL反应, 减少肿瘤肺转移率, 延长生存期。HBV的3个抗原都具有很强的免疫原性, 具有潜在T淋巴细胞激活表位, 能介导CTL细胞发挥抗HBV作用。我们通过腺病毒介导HBsAg、HBeAg和HBcAg基因于DCs中, 显示三者均可以诱导产生特异性CTL反应, 高于未用HBV抗原

■名词解释

基因修饰: 将外来基因通过基因转导技术导入细胞, 从而使细胞获得新的基因性状。

基因刺激DCs的对照组。在介导CTL反应中, 以HBcAg组作用最强, HBsAg、HBeAg次之, 与文献报道相近似^[27-28]。造成诱导的CTL反应强弱不等的原因, 一是在HBV抗原系统中, 以HBcAg具有最强的T淋巴细胞刺激表位, T淋巴细胞免疫原性最强; 另外, 我们选择HepG₂22.1.5细胞作为攻击的靶细胞, 经ELISA检测发现, 该细胞株HBsAg的表达较弱, 而HBeAg和HBcAg的表达较强。检测MLR和诱导CTL生成上清液中IL-12、IFN-γ分泌水平也显示, Ad-HBc组刺激T淋巴细胞分泌IL-12水平最高, 因而其介导的特异性细胞免疫反应最强。本研究结果初步显示, 用携带HBV抗原基因的腺病毒作为载体转染DCs, 不但可以使DCs得到高效转染, 而且可持续表达该抗原, 使抗原在DCs内得到有效加工处理, 以多个抗原表位提呈给T淋巴细胞, 可以产生特异性抗HBV感染免疫反应, 表明DCs疫苗可能发展成为一种新型抗HBV感染的治疗性疫苗。

4 参考文献

- 1 Beckebaum S, Cincinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response *in vitro*: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495
- 2 Hasebe A, Akbar SM, Furukawa S, Horiike N, Onji M. Impaired functional capacities of liver dendritic cells from murine hepatitis B virus (HBV) carriers: relevance to low HBV-specific immune responses. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 35-42
- 3 Duan XZ, Wang M, Li HW, Zhuang H, Xu D, Wang FS. Decreased frequency and function of circulating plasmacytoid dendritic cells (pDC) in hepatitis B virus infected humans. *J Clin Immunol* 2004; 24: 637-646
- 4 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 537-541
- 5 Wong YQ, Qiu SJ, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Fan J, Sun RX, Zhao Y. Changes in the immune function of dendritic cells (DC) derived from HBV-related hepatocellular carcinoma (HCC) patient's peripheral blood monocytes (PBMC) pulsed with tumor antigen. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2005; 13: 339-342
- 6 Duan XZ, Zhuang H, Wang M, Li HW, Liu JC, Wang FS. Decreased numbers and impaired function of circulating dendritic cell subsets in patients with chronic hepatitis B infection (R2). *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 234-242
- 7 Oh ST, Kim CH, Park MY, Won EH, Sohn HJ, Cho HI, Kang WK, Hong YK, Kim TG. Dendritic cells transduced with recombinant adenoviruses induce more efficient anti-tumor immunity than dendritic cells pulsed with peptide. *Vaccine* 2006; 24: 2860-2868
- 8 Yamanaka R, Honma J, Tsuchiya N, Yajima N, Kobayashi T, Tanaka R. Tumor lysate and IL-18 loaded dendritic cells elicits Th1 response, tumor-specific CD8+ cytotoxic T cells in patients with malignant glioma. *J Neurooncol* 2005; 72: 107-113
- 9 Nakamura M, Iwashashi M, Nakamori M, Ueda K, Ojima T, Naka T, Ishida K, Yamaue H. Dendritic cells transduced with tumor-associated antigen gene elicit potent therapeutic antitumor immunity: comparison with immunodominant peptide-pulsed DCs. *Oncology* 2005; 68: 163-170
- 10 Chen M, Li YG, Zhang DZ, Wang ZY, Zeng WQ, Shi XF, Guo Y, Guo SH, Ren H. Therapeutic effect of autologous dendritic cell vaccine on patients with chronic hepatitis B: a clinical study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1806-1808
- 11 黄呈辉, 欧阳玲, 马会慧, 汤正好, 李刚, 姚集鲁. 细菌内同源重组法构建HBV S区和C区基因非复制型腺病毒载体及其体外表达. 世界华人消化杂志 2003; 11: 438-441
- 12 欧阳玲, 黄呈辉, 黄建国, 姚集鲁. 脐带血中衍生树突状细胞及其生物学特性的研究. 现代临床医学生物工程学杂志 2004; 10: 103-108
- 13 Jackson M, Smith B, Bevitt DJ, Steward M, Toms GL, Bassendine MF, Diamond AG. Comparison of cytotoxic T-lymphocyte responses to hepatitis C virus core protein in uninfected and infected individuals. *J Med Virol* 1999; 58: 239-246
- 14 Furukawa S, Akbar SM, Hasebe A, Horiike N, Onji M. Production of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells from immunosuppressed murine hepatitis B virus carrier: evaluation of immunogenicity of antigen-pulsed dendritic cells *in vivo*. *Immunobiology* 2004; 209: 551-557
- 15 Xing LH, Wang FS, Zhu CL. Antiviral effect of human CTLs activated by HBsAg stimulated dendritic cells *in vitro*. *Zhonghua Shiyan He Linchuangbingduxue Zazhi* 2003; 17: 365-368
- 16 Fazle Akbar SM, Furukawa S, Onji M, Murata Y, Niya T, Kanno S, Murakami H, Horiike N. Safety and efficacy of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells in human volunteers. *Hepatol Res* 2004; 29: 136-141
- 17 Ding CL, Yao K, Zhang TT, Zhou F, Xu L, Xu JY. Generation of cytotoxic T cell against HBcAg using retrovirally transduced dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1512-1515
- 18 Qiu SJ, Lu L, Qiao C, Wang L, Wang Z, Xiao X, Qian S, Fung JJ, Ye SL, Bonham CA. Induction of tumor immunity and cytotoxic t lymphocyte responses using dendritic cells transduced by adenoviral vectors encoding HBsAg: comparison to protein immunization. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 429-438
- 19 Dietz AB, Vuk-Pavlovic S. High efficiency adenovirus-mediated gene transfer to human dendritic cells. *Blood* 1998; 91: 392-398
- 20 Lin CM, Wang FH. Selective modification of antigen-specific CD4(+) T cells by retroviral-mediated gene transfer and in vitro sensitization with dendritic cells. *Clin Immunol* 2002; 104: 58-66
- 21 Lei CL, Huang CH, Yang Z, Tang XP. Expression of HBV preS2/S gene in mammalian cells transferred with adenoviral vector. *Zhonghua Shiyan He Linchuangbingduxue Zazhi* 2005; 19: 55-57
- 22 Huang Y, Chen Z, Jia H, Wu W, Zhong S, Zhou C. Induction of Tc1 response and enhanced cytotoxic

- T lymphocyte activity in mice by dendritic cells transduced with adenovirus expressing HBsAg. *Clin Immunol* 2006; 119: 280-290
- 23 Shimizu Y, Guidotti LG, Fowler P, Chisari FV. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 1998; 161: 4520-4529
- 24 Zhang HH, He Y, Zhao H, Piao WH, Liu MC, Xi HL, Yu M, Wang GQ. The effect of stimulation of dendritic cell on HBV-epitopic cytotoxic T-lymphocyte. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 1171-1176
- 25 Li RB, Chen HS, Xie Y, Fei R, Cong X, Jiang D, Wang SX, Wei L, Wang Y. Dendritic cells from chronic hepatitis B patients can induce HBV antigen-specific T cell responses. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1578-1582
- 26 Tuting T, Storkus WJ, Lotze MT. Gene-based strategies for the immunotherapy of cancer. *J Mol Med* 1997; 75: 478-491
- 27 You Z, Huang XF, Hester J, Rollins L, Rooney C, Chen SY. Induction of vigorous helper and cytotoxic T cell as well as B cell responses by dendritic cells expressing a modified antigen targeting receptor-mediated internalization pathway. *J Immunol* 2000; 165: 4581-4591
- 28 Qian S, Shi M, Zhang H, Zhang B, Xu DP, Wang FS. Phenotype and function of myeloid dendritic cells pulsed with hepatitis B virus antigens in patients with HBV-associated hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 248-252

■同行评价

本文作者在体外构建了携带HBsAg、HBeAg和HBcAg基因的3种重组腺病毒, 分别转染来自脐带血的经培养树突状细胞, 结果显示具有80%的转染率。在此基础上作者研究了树突状细胞表达HBV抗原能力及经HBV抗原基因修饰DCs刺激同种异体T淋巴细胞增殖能力和乳酸脱氢酶释放法检测特异性CTL细胞对HepG₂.1.5靶细胞的杀伤能力。试验设计合理, 结果较理想, 为以HBV抗原基因修饰DCs疫苗发展提供了试验依据和理论基础, 具有创新性和实用性。

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知

本刊讯 为了进一步推动华北地区(北京、天津、河北、山西和内蒙)的消化学术交流与发展、帮助广大消化专业工作者全面了解国内外消化基础和临床研究进展, 提高消化疾病诊治和研究水平。第十二届华北地区消化学术会议, 将于2006-10-27/29在河北省石家庄举办。会议由北京、天津、河北、山西和内蒙医学会消化病学分会联合主办, 河北省医学会消化病学分会承办。本次会议将就近年来国内外消化领域的研究进展、诊断和治疗方面的新技术、新方法进行广泛的学术交流, 大会将邀请国内著名消化病学专家作专题学术报告。欢迎消化界各位专家和同仁积极投稿参会, 参会者可获得国家级I类继续教育学分。

1 征文内容

会议征集的论文内容包括: (1)消化系统疾病流行病学、发病机制、诊断和治疗的研究进展; (2)消化系统肿瘤的发病机制、诊断和治疗以及预防的进展; (3)消化内镜的应用现状及内镜下诊断和治疗的操作表演; (4)慢性肝病及肝癌近年来的发病情况治疗研究进展; (5)当前医源性疾病在消化疾病方面的表现与现状; (6)消化疾病在当前临床研究中热点、难点, 需要解决的问题。

2 征稿要求

来稿要求是未在国内外刊物上公开发表过的论文, 800字摘要一份, 摘要应包括: 目的、材料和方法、结果和结论4个部分。来稿一律使用A4纸打印、WORD格式, 并附软盘或发电子邮件至: huabeixiaohua@yahoo.com.cn。

截稿日期: 2006-08-30, 以当地邮戳为准。请务必在信封右上角注明“华北区消化会议”字样。

会议地址: 河北医科大学第二医院图书馆楼三楼会议室。

联系人: 河北省医学会学术会务部(邮政编码050011) 徐辉 电话: 0311-85988457; 河北医科大学第二医院(邮政编码050000)蒋树林 电话: 0311-87222301; 0311-87222951。



嗜酸性乳杆菌培养上清液对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的影响

罗学娅, 伦永志, 高卫, 胡海北, 王强, 刘莹, 尹建石, 姜苏娟

■背景资料

益生菌的研发是当前国内外热点研究问题。但目前研制的用于临床的微生态制剂多以活菌制剂为主, 其培养上清液往往被忽略。由于活菌制剂保质期短、活性下降快, 因此对其培养上清液进行深入研究, 找出其中活性成分, 对益生菌的开发与应用具有重要意义。

罗学娅, 伦永志, 高卫, 大连大学医学院、辽宁省教育厅生物有机化学重点实验室 辽宁省大连市 116622

胡海北, 王强, 刘莹, 尹建石, 姜苏娟, 大连大学医学院临床医学2002级 辽宁省大连市 116622

罗学娅, 1989年贵阳医学院硕士, 教授, 主要从事天然药物研制与开发研究。

大连大学科技发展基金资助项目, No. 050016

通讯作者: 罗学娅, 116622, 辽宁省大连市开发区, 大连大学医学院药理学教研室 xxyluo@sina.com

电话: 0411-87402375 传真: 0411-87402053

收稿日期: 2006-04-17 接受日期: 2006-05-11

(kg•d) for 3 d. Then the mice in normal control group and model group were killed, while the mice in the other groups were administered (ig) with the corresponding drugs or normal saline (30 mL/kg per day, the adopted concentration of living bacteria was 3×10^9 CFU/kg per day) for another 3 d. At the end of the 3rd day, all the mice were killed and the floras in the contents of the caecum were analyzed.

RESULTS: Intestinal flora imbalance occurred in the mice administered with ampicillin and the numbers (lgCFU/L) of four main intestinal floras changed obviously. In comparison with those in normal control group, the numbers of *Escherichia coli* and *Enterococcus* were significantly increased (10.13 ± 0.10 vs 9.03 ± 0.11 , $P < 0.01$; 10.52 ± 0.11 vs 9.11 ± 0.09 , $P < 0.01$), while the numbers of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were remarkably decreased (10.51 ± 0.07 vs 11.88 ± 0.10 , $P < 0.01$; 10.38 ± 0.31 vs 11.61 ± 0.13 , $P < 0.05$). After the mice were administered with SCS, living bacteria and SCS plus living bacteria, the numbers (compared with those in spontaneous recovery group) of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were remarkably increased (*Lactobacillus*: 11.53 ± 0.17 vs 9.74 ± 0.37 , $P < 0.01$; 11.54 ± 0.05 , 11.45 ± 0.07 vs 9.74 ± 0.37 , $P < 0.05$; *Bifidobacterium*: 11.54 ± 0.22 , 11.30 ± 0.99 vs 9.51 ± 0.52 , $P < 0.05$; 11.13 ± 0.16 vs 9.51 ± 0.52 , $P < 0.01$), while the numbers of *Escherichia coli* and *Enterococcus* were significantly decreased again (*Escherichia coli*: 9.42 ± 0.22 , 9.50 ± 0.06 , 9.22 ± 0.39 vs 9.97 ± 0.61 , $P < 0.05$; *Enterococcus*: 9.48 ± 0.20 , 9.45 ± 0.16 , 9.37 ± 0.21 vs 9.89 ± 0.43 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Both living bacteria and SCS of *Lactobacillus acidophilus* can regulate the intestinal flora imbalance in mice with antibiotic-associated diarrhoea, and help to recover the numbers of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the intestinal tract.

Key Words: *Lactobacillus acidophilus*; Spent culture supernatant; Antibiotic-associated diarrhoea; Intestinal flora

Effects of spent culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* on intestinal flora in mice with antibiotic-associated diarrhoea

Xue-Ya Luo, Yong-Zhi Lun, Wei Gao, Hai-Bei Hu, Qiang Wang, Ying Liu, Jian-Shi Yin, Su-Juan Jiang

Xue-Ya Luo, Yong-Zhi Lun, Wei Gao, Medical College of Dalian University; Bio-organic Chemistry Key Laboratory of Education Department of Liaoning Province, Dalian 116622, Liaoning Province, China

Hai-Bei Hu, Qiang Wang, Ying Liu, Jian-Shi Yin, Su-Juan Jiang, Grade 2002 of Clinical Medicine, Medical College of Dalian University, Dalian 116622, Liaoning Province, China

Supported by the Science and Technology Development Foundation of Dalian University, No. 050016

Correspondence to: Professor Xue-Ya Luo, Department of Pharmacology, Medical College of Dalian University, Dalian Economic and Technical Development Zone, Dalian 116622, Liaoning Province, China. xxyluo@sina.com

Received: 2006-04-17 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To study the effects of the spent culture supernatant (SCS) of *Lactobacillus acidophilus* strain LA14 on the intestinal flora in mice with antibiotic-associated diarrhoea.

METHODS: Sixty mice were randomly and averagely divided into 6 groups: normal control group, model group, SCS group, living bacteria group, SCS plus living bacteria group, and spontaneous recovery group. The animal model of the intestinal flora imbalance was made by intraperitoneal administration of ampicillin 2000 mg/

Luo XY, Lun YZ, Gao W, Hu HB, Wang Q, Liu Y, Yin JS, Jiang SJ. Effects of spent culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* on intestinal flora in mice with antibiotic-associated diarrhoea. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(19):1870-1873

摘要

目的: 研究嗜酸性乳杆菌LA14菌株耗尽培养上清液(spent culture supernatant, SCS)对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的影响。

方法: 小鼠60只, 随机分为正常组、模型组、SCS组、活菌组、SCS+活菌组及自然恢复组(每组n = 10)。采用ip氨基青霉素2000 mg/(kg·d), 连续3 d造成肠道菌群失调性腹泻动物模型。正常组和模型组小鼠于造模后即处死, 取盲肠内容物进行肠道菌群分析。其余各组小鼠分别灌胃受试药物或生理盐水30 mL/(kg·d)[含菌组中活菌数量为 3×10^9 CFU/(kg·d)], 3 d后处死, 取盲肠内容物进行肠道菌群分析。

结果: 小鼠ip氨基青霉素造成肠道菌群失调, 肠道内4种主导菌群的数量(lgCFU/L)明显改变, 与正常组比较肠杆菌和肠球菌数量显著上升(10.13 ± 0.10 vs 9.03 ± 0.11 , 10.52 ± 0.11 vs 9.11 ± 0.09 , $P < 0.01$), 乳杆菌和双歧杆菌数量明显下降(10.51 ± 0.07 vs 11.88 ± 0.10 , $P < 0.01$; 10.38 ± 0.31 vs 11.61 ± 0.13 , $P < 0.05$)。而灌胃给予SCS、活菌、SCS加活菌后, 与自然恢复组比较肠道乳杆菌和双歧杆菌数量明显回升(乳杆菌: 11.53 ± 0.17 vs 9.74 ± 0.37 , $P < 0.01$; 11.54 ± 0.05 , 11.45 ± 0.07 vs 9.74 ± 0.37 , $P < 0.05$; 双歧杆菌: 11.54 ± 0.22 , 11.30 ± 0.99 vs 9.51 ± 0.52 , $P < 0.05$; 11.13 ± 0.16 vs 9.51 ± 0.52 , $P < 0.01$), 肠杆菌和肠球菌数量下降(肠杆菌: 9.42 ± 0.22 , 9.50 ± 0.06 , 9.22 ± 0.39 vs 9.97 ± 0.61 , $P < 0.05$; 肠球菌: 9.48 ± 0.20 , 9.45 ± 0.16 , 9.37 ± 0.21 vs 9.89 ± 0.43 , $P < 0.05$)。

结论: 嗜酸性乳杆菌活菌和SCS均能调整抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群失调, 对乳杆菌和双歧杆菌有显著扶持作用。

关键词: 嗜酸性乳杆菌; 耗尽培养上清液; 抗生素相关性腹泻; 肠道菌群

罗学娅, 伦永志, 高卫, 胡海北, 王强, 刘莹, 尹建石, 姜苏娟. 嗜酸性乳杆菌培养上清液对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1870-1873
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1870.asp>

0 引言

腹泻是多种病因引起的多种肠道疾病的一种常见症状, 在临幊上一般将其分为感染性腹泻和非感染性腹泻2种, 其中感染性腹泻约占80%。对于感染性腹泻, 人们习惯于使用抗生素进行治疗。然而由于抗生素的大量盲目使用, 使肠道中有益菌被抑制, 肠道的微生态平衡被打破, 导致菌群失调。此时肠上皮细胞的代谢调节水平和生理功能发生紊乱, 使腹泻进一步加重, 即产生抗生素相关性腹泻^[1-4], 针对这种现象人们开始尝试着对感染性腹泻实行非抗菌药物治疗。随着人们对肠道微生态的充分认识, 发现微生态制剂能很好地改善肠道功能紊乱, 且安全、毒副作用小^[5-8], 治疗效果显著。

嗜酸性乳杆菌是目前国内外开发应用的微生态制剂的主要菌种, 是人和动物肠道内的一种重要的益生菌, 他广泛分布在人和动物的消化道、阴道以及乳制品和发酵的动植物制品中。他是乳酸菌家族中受到极为重视研发的益生菌之一。据报道嗜酸性乳杆菌微生态制剂对婴幼儿及成年人急性腹泻、肠道炎症性疾病等均有良好疗效^[9-13]。我们以人们常常忽略的培养上清液作为研究对象, 探讨其调节抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的作用, 旨在为嗜酸性乳杆菌的进一步开发利用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 嗜酸性乳杆菌LA14菌株, 白色粉末状, 由Danisco中国有限公司惠赠。昆明种小鼠60只, 雌雄各半, 体质量20±2 g, 由大连大学实验动物中心提供。注射用氨基青霉素钠(山东瑞阳制药有限公司生产, 0.5 g/瓶), 临用前用9 g/L的生理盐水配制成为浓度为100 g/L的氨基青霉素钠溶液备用。乳酸杆菌选择性培养基(LBS), 双歧杆菌选择性培养基(BS), 肠杆菌选择性培养基(EMB), 肠球菌选择性培养基(EC)。嗜酸性乳杆菌耗尽培养上清液(spent culture supernatant, SCS)的制备^[14]。将活化的嗜酸性乳杆菌LA14菌株接种至LBS培养液中, 37℃厌氧培养72 h。将菌悬液离心, 4000 r/min, 10 min, 分离得到SCS。将菌沉淀, 分别用9 g/L的生理盐水、SCS重悬后制成活菌菌液、SCS加活菌菌液, 菌悬液中活菌数量达到 1×10^{11} CFU/L。上述各液在动物实验开始之前配制, 每天实验结束后置于4℃保存。

1.2 方法 抗生素相关性腹泻小鼠模型的制备^[15-17]。参照文献略加改动, 将60只小鼠随机分

■研发前沿

近年来, 发达国家对益生菌的研究非常活跃, 但关于其作用机制的探讨也大都处于研究阶段。而我国仅在双歧杆菌及其相关的益生菌方面有所研究, 对嗜酸性乳杆菌单一菌种的研究还很少。因而对嗜酸性乳杆菌进行深入研究非常必要。

■创新要点

本文研究结果证实,嗜酸性乳杆菌耗尽培养上清液,能调整抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群失调,对乳酸杆菌和双歧杆菌具有显著扶持作用,提示在耗尽培养上清液中存在着活性代谢产物,这为进一步提取、分离其中有有效成分提供依据。

为正常组、模型组、SCS组、活菌组、SCS+活菌组、自然恢复组。将模型组、SCS组、活菌组、SCS+活菌组和自然恢复组分别ip 100 g/L 氨苄青霉素钠溶液2000 mg/(kg·d),连续3 d,造成抗生素相关性腹泻小鼠模型,正常组小鼠ip 等容积生理盐水。正常组和模型组小鼠于造模后即处死,取盲肠内容物进行肠道菌群分析。SCS组、活菌组、SCS+活菌组小鼠则从第4天开始分别灌胃相应的受试药物,剂量为30 mL/(kg·d)[含菌组中活菌数量为 3×10^9 CFU/(kg·d)],自然恢复组给予等容积生理盐水,连续3 d,然后处死小鼠,取盲肠内容物进行肠道菌群分析。盲肠内容物标本的处理及菌群检测: 小鼠颈椎脱臼处死,在无菌条件下进行剖解,取近回盲部盲肠1 cm放于含生理盐水0.8 mL的小瓶中,振荡洗涤,使肠内容物充分稀释,然后连续10倍稀释,取 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 各稀释匀浆液0.01 mL,分别滴入LBS, BS培养基中; 取 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 各稀释匀浆液0.01 mL,分别滴入EC, EMB培养基中,每种菌做2个平行平皿。LBS和BS置37°C厌氧培养48 h; EC和EMB置37°C培养18 h,然后观察结果,计算菌落数,折合成每升盲肠内容物稀释液中肠杆菌、肠球菌、乳杆菌和双歧杆菌的菌落数,并以常用对数表示。

统计学处理 各组实验数据经整理后用mean \pm SD表示,采用SPSS 12.0统计学软件对实验数据进行两样本均数t检验分析。

2 结果

2.1 氨苄青霉素对小鼠肠道正常菌群的影响 用氨苄青霉素造模后,肠道内4种主导菌群的数量明显改变,其中肠杆菌、肠球菌数量明显增加,乳杆菌、双歧杆菌数量减少,模型组与正常组小鼠肠道菌群之间存在着显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$,表1)。

2.2 SCS治疗抗生素相关性腹泻的效果 用氨苄青霉素造成小鼠肠道菌群失调后,每天给小鼠分别灌胃各受试药物,3 d后可见SCS组、活菌组、SCS+活菌组小鼠肠道内乳杆菌和双歧杆菌数量明显回升,肠杆菌和肠球菌数量下降,上述各治疗组与自然恢复组小鼠肠道菌群之间存在着显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各治疗组小鼠肠道菌群之间、各治疗组与正常组小鼠肠道菌群之间差异性不显著($P>0.05$,表2)。

3 讨论

腹泻是常见的临床症状,全球每年因腹泻就有

表1 抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群 (mean \pm SD, lgCFU/L, n = 10)

分组	肠杆菌	肠球菌	乳杆菌	双歧杆菌
正常	9.03 \pm 0.11	9.11 \pm 0.09	11.88 \pm 0.10	11.61 \pm 0.13
模型	10.13 \pm 0.10 ^b	10.52 \pm 0.11 ^b	10.51 \pm 0.07 ^b	10.38 \pm 0.31 ^a

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 正常组。

约200万人丧生。对于腹泻的治疗,原则上要针对病因,但目前在治疗中,对于许多引起腹泻的疾病过程并不能得到满意控制,也缺乏特异性治疗方法,因而饮食疗法、药物疗法、微生态疗法等支持疗法和对症治疗就成为必不可少的治疗措施,其中尤其值得关注的是微生态疗法^[18-21]。微生态疗法使用的是微生态制剂,微生态制剂是根据微生态学基本机制研制的,他是利用肠道正常菌群成员或其促进物质制备而成。目前国内外开发应用的微生态制剂的菌种主要有乳酸菌(包括乳酸杆菌、乳酸球菌、双歧杆菌等)、链球菌和各种真菌等,其中又以乳杆菌和双歧杆菌居多^[22]。乳酸杆菌特别是嗜酸性乳杆菌抵抗胃酸和胆碱的能力较强,能顺利通过胃肠环境而广泛定植于胃肠中,在消化道内能很好地存活,因而是微生态制剂常用的主要菌种之一。然而目前研制的用于临床治疗的微生态制剂多以活菌制剂为主,培养上清液往往被忽略,但活菌保存具有存活率低、保质期短、活性不稳定等缺点。我们即以此为切入点,从以往人们忽略的培养上清液入手,探讨其对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的影响。从实验结果可见,当使用氨苄青霉素破坏了肠道内正常菌群的平衡,造成了小鼠肠道菌群失调后,肠道内4种主导菌群的数量出现明显改变,其中肠杆菌和肠球菌数量显著上升,而乳杆菌和双歧杆菌数量明显下降。灌胃使用SCS和活菌等治疗药物后,肠道乳杆菌和双歧杆菌数量明显回升,肠杆菌和肠球菌数量下降,表明SCS等治疗药物对小鼠肠道生理菌群有明显的调节作用。研究结果提示,嗜酸性乳杆菌SCS具有与活菌相同的明显调节小鼠肠道生理菌群的作用,并对乳杆菌和双歧杆菌表现出明显地扶持作用。另一方面,由于在实验中采用的是耗尽培养上清液,这样就排除了培养液中的蛋白胨、牛肉浸膏、酵母浸膏等多种成分对实验结果的影响,这也提示了在耗尽培养上清液中应该存在着具有相似功效的

■应用要点

对嗜酸性乳杆菌耗尽培养上清液进行活性跟踪、分离纯化,找出其中有效成分,为开发新型稳定无毒的消化疾病临床药物奠定基础。

表 2 SCS¹治疗抗生素相关性腹泻的效果 (mean ± SD, lgCFU/L, n = 10)

分组	肠杆菌	肠球菌	乳酸杆菌	双歧杆菌
SCS ¹	9.42 ± 0.22 ^a	9.48 ± 0.20 ^a	11.53 ± 0.17 ^b	11.54 ± 0.22 ^a
活菌	9.50 ± 0.06 ^a	9.45 ± 0.16 ^a	11.54 ± 0.05 ^a	11.30 ± 0.99 ^a
SCS ¹ +活菌	9.22 ± 0.39 ^a	9.37 ± 0.21 ^a	11.45 ± 0.07 ^a	11.13 ± 0.16 ^b
自然恢复	9.97 ± 0.61	9.89 ± 0.43	9.74 ± 0.37	9.51 ± 0.52

SCS¹: 嗜酸性乳杆菌耗尽培养上清液; ^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 自然恢复组.

活性代谢产物. 在以往的报道中, 有作者已提出在嗜酸性乳杆菌、双歧杆菌的培养上清液中存在着细菌素、黏附素等成分^[23-26], 而我们的研究结果也证实了SCS调节小鼠肠道生理菌群的作用. 因而是否可以认为在SCS中存在着多种具有活性作用的代谢成分? 相关的研究尚在进一步深入.

4 参考文献

- 1 Yasar N, Sener A, Karaca B, Yucesoy M, Tarakci H, Cakir N, Yuce A. Antibiotic-associated diarrhea in a Turkish outpatient population: investigation of 288 cases. *J Chemother* 2005; 17: 77-81
- 2 Cote GA, Buchman AL. Antibiotic-associated diarrhoea. *Expert Opin Drug Saf* 2006; 5: 361-372
- 3 Kotowska M, Albrecht P, Szajewska H. Saccharomyces boulardii in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 583-590
- 4 Schroder O, Gerhard R, Stein J. Antibiotic-associated diarrhea. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 193-204
- 5 Hawrelak JA, Whitten DL, Myers SP. Is Lactobacillus rhamnosus GG effective in preventing the onset of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review. *Digestion* 2005; 72: 51-56
- 6 Snelling AM. Effects of probiotics on the gastrointestinal tract. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18: 420-426
- 7 Sullivan A, Nord CE. The place of probiotics in human intestinal infections. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 20: 313-319
- 8 Sartor RB. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 44-50
- 9 肖忠革. 微生态制剂—嗜酸性乳杆菌治疗腹泻的作用机制及临床应用. 中国新药与临床杂志 2001; 20: 313-314
- 10 Chen CC, Louie S, Shi HN, Walker WA. Preinoculation with the probiotic Lactobacillus acidophilus early in life effectively inhibits murine Citrobacter rodentium colitis. *Pediatr Res* 2005; 58: 1185-1191
- 11 Shamir R, Makhoul IR, Etzioni A, Shehadeh N. Evaluation of a diet containing probiotics and zinc for the treatment of mild diarrheal illness in children younger than one year of age. *J Am Coll Nutr* 2005; 24: 370-375
- 12 Gaon D, Garcia H, Winter L, Rodriguez N, Quintas R, Gonzalez SN, Oliver G. Effect of Lactobacillus strains and Saccharomyces boulardii on persistent
- 13 Saran S, Gopalan S, Krishna TP. Use of fermented foods to combat stunting and failure to thrive. *Nutrition* 2002; 18: 393-396
- 14 伦永志, 黄敏, 袁杰利, 康白. 灭活双歧杆菌调整小鼠抗生素相关性菌群失调. 中国微生态学杂志 2002; 14: 8-9
- 15 林远夫, 汤家铭, 杨幼明, 仲伟鉴, 沈正鸣. 抗生素诱发的小鼠肠道菌群失调. 上海实验动物科学 1998; 18: 39-41
- 16 伦永志, 胡捷, 李忠朋, 张永轻, 周本正, 刘亚力. 灭活的双歧杆菌治疗菌群失调致小鼠肠源性感染. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2877-2879
- 17 高云, 梁尚栋, 穆松牛, 张玉珍, 许宝华, 刘征宇, 姜建梅. 调节肠道菌群动物模型和预防肠道菌群失调动物模型探讨. 江西医学院学报 2004; 44: 15-17
- 18 Sullivan A, Nord CE. Probiotics and gastrointestinal diseases. *J Intern Med* 2005; 257: 78-92
- 19 Jirapinyo P, Densupsoontorn N, Thamonsiri N, Wongarn R. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants by probiotics. *J Med Assoc Thai* 2002; 85 Suppl 2: S739-S742
- 20 Szymanski H, Pejcz J, Jawien M, Chmielarczyk A, Strus M, Hezcko PB. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three Lactobacillus rhamnosus strains--a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 247-253
- 21 Wang MF, Lin HC, Wang YY, Hsu CH. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15: 152-158
- 22 Madsen KL. The use of probiotics in gastrointestinal disease. *Can J Gastroenterol* 2001; 15: 817-822
- 23 Chumchalova J, Stiles J, Josephsen J, Plockova M. Characterization and purification of acidocin CH5, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus CH5. *J Appl Microbiol* 2004; 96: 1082-1089
- 24 Deraz SF, Karlsson EN, Hedstrom M, Andersson MM, Mattiasson B. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus DSM 20079. *J Biotechnol* 2005; 117: 343-354
- 25 De Vuyst L, Avonts L, Neysens P, Hoste B, Vancanneyt M, Swings J, Callewaert R. The lactobin A and amylovorin L471 encoding genes are identical, and their distribution seems to be restricted to the species *Lactobacillus amylovorus* that is of interest for cereal fermentations. *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 93-106
- 26 郑跃杰, 潘令嘉, 王立生, 周殿元, 郭立安, 闫哲. 双歧杆菌黏附素的提纯及鉴定. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1149-1151

■名词解释

耗尽培养上清液(spent culture supernatant, SCS): 在适宜条件下, 将细菌在液体培养基中培养72 h, 使其中的多种营养成分基本消耗殆尽。经离心后分离得到。

■同行评价

该研究发现嗜酸性乳杆菌与活菌具有相同作用, 对乳杆菌和双歧杆菌表现出明显地扶持作用, 为嗜酸性乳杆菌的进一步开发利用奠定了实验基础, 研究设计合理, 方法准确, 结果可靠, 有一定科学性、创新性和可读性。

电编 张敏 编辑 潘伯荣

Tec酪氨酸蛋白激酶的大鼠组织分布及参与的信号途径

钟明贵, 李菲菲, 郑红, 倪芳, 余科科, 汪思应

■背景资料

Tec是1990年Mano等在研究肝癌时,从小鼠肝脏的cDNA文库中用v-fps激酶结构域作为探针,在肝癌组织中筛选到的、起重要作用的一种酪氨酸蛋白激酶基因。Tec基因主要在肝脏与造血组织中表达,尤其在人类肝细胞肝癌(HCC)中表达异常高,这是首次报道与肝细胞增殖有关的特异酪氨酸蛋白激酶。通过与多种蛋白质的相互作用,Tec参与对血细胞尤其是B淋巴细胞和T淋巴细胞的生长和分化的信号调控。大鼠Tec是本文课题组在2001年首先发现的。他们利用表达差异显示分析(RDA)技术研究大鼠2/3肝切除后1 h再生肝选择性基因表达时,发现一株Tec同源序列存在于差减产物中, RNA杂交证实为差异表达基因。这提示Tec是一种与肝再生密切相关的早期反应基因,他可能参与肝再生的早期信号启动。

钟明贵, 郑红, 倪芳, 余科科, 汪思应, 安徽医科大学基础医学院病理生理教研室 安徽省合肥市 230032
李菲菲, 淮北市矿工总医院普外科 安徽省淮北市 235000
钟明贵, 2003年安徽大学硕士研究生, 副主任医师, 主要从事肝再生分子调控的研究。
国家自然科学基金资助, No. 30572206
安徽省自然科学基金, No. 00044202, No. 01043709
安徽省人才开发基金, No. 2002Z035
通讯作者: 汪思应, 230032, 安徽省合肥市, 安徽医科大学基础医学院病理生理教研室. sywang@ahmu.edu.cn
电话: 0551-5161129 传真: 0551-5167706
收稿日期: 2006-05-09 接受日期: 2006-05-17

Tissue distribution and signal transduction of Tec tyrosine kinase in rats

Ming-Gui Zhong, Fei-Fei Li, Hong Zheng, Fang Ni, Ke-Ke Yu, Si-Ying Wang

Ming-Gui Zhong, Hong Zheng, Fang Ni, Ke-Ke Yu, Si-Ying Wang, Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China
Fei-Fei Li, Huabei Miner Hospital, Huabei 235000, Anhui Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30572206; the Natural Science Foundation of Anhui Province, No. 00044202 and No. 01043709; and Human Resource Fund of Anhui Province, No. 2002Z035

Correspondence to: Dr. Si-Ying Wang, Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China. sywang@ahmu.edu.cn

Received: 2006-05-09 Accepted: 2006-05-17

Abstract

AIM: To detect the tissue distribution of Tec tyrosine kinase in rats, and to investigate the possible signal transduction pathways in which Tec is involved.

METHODS: The total RNA was extracted from the tissues of rat heart, liver, spleen, lung, brain, thymus gland and muscle. Northern blot was used to detect the expression of Tec RNA. Reporting gene plasmids and Tec expression vector were co-transfected into WBF-344 cells, and post-transfection cells were stimulated by hepatic growth factor (HGF). Then cells were lysed and the luciferase activity was measured.

RESULTS: Northern blot suggested that Tec tyrosine kinase was highly expressed in the tis-

sues of rat liver and kidney. Report gene assay showed the Elk luciferase activity was increased about 2-3 folds in comparison with that of the controls, while other signaling pathways had no obviously changes.

CONCLUSION: Tec tyrosine kinase is involved in Erk/mitogen-activated protein kinase signal pathway mediated by HGF. Tec probably plays an important role in the proliferation of liver cells.

Key Words: Tec tyrosine kinase; Liver regeneration; Signal transduction

Zhong MG, Li FF, Zheng H, Ni F, Yu KK, Wang SY. Tissue distribution and signal transduction of Tec tyrosine kinase in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1874-1877

摘要

目的: 研究Tec在大鼠组织中分布特异性, 以及在大鼠肝细胞中Tec可能参与的信号途径。

方法: 从大鼠心、肝、脾、肺、脑、胸腺和肌肉组织中提取RNA, 用Northern blot方法检测Tec在大鼠中的组织分布, 在WBF-344细胞中共转染Tec-pSRα真核表达载体与荧光素酶报告基因, 再用HGF刺激细胞, 用微量发光检测仪检测发光值。

结果: Tec在大鼠肝脏与肾脏组织中特异性高表达, 在肝干细胞中对HGF介导下的Elk信号分子活化的报告质粒中荧光素酶的表达有明显增强(2-3倍)作用。

结论: Tec在大鼠肝脏高表达, Tec可能参与HGF介导Erk途径, 可能与肝细胞增殖的信号调控有关。

关键词: Tec酪氨酸蛋白激酶; 肝再生; 信号转导

钟明贵, 李菲菲, 郑红, 倪芳, 余科科, 汪思应. Tec酪氨酸蛋白激酶的大鼠组织分布及参与的信号途径. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1874-1877
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1874.asp>

0 引言

Tec (tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma, Tec)是一种重要的非受体型酪氨酸激酶, 小鼠Tec最早由Mano *et al*^[1]从肝癌组织中克隆。前期的研究认为Tec有肝组织与造血组织分布特异性, 主要与Epo, EGF, IL-6, GM-CSF等细胞因子介导的信号转导途径密切相关, 参与调控造血细胞尤其是淋巴细胞的增殖与分化^[2-3]。我们在寻找肝再生相关基因时, 发现了大鼠Tec的序列, 并在GenBank注册(AF285881)^[4]。为进一步探讨Tec与肝细胞生长的关系, 我们进一步在大鼠中检测Tec的组织分布; 再通过荧光素酶报告基因系统, 在肝干细胞WB F-344中瞬时转染Tec真核表达载体及不同信号途径报道载体, 以探讨Tec在何种信号途径活化过程中起作用, 以初步了解Tec参与肝细胞生长的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 鼠重组肝细胞生长因子(HGF)购于Sigma (Saint Louis, MO, USA)。TrizolTM试剂盒购于Promega。DMEM、胰酶为Gibco公司产品, 胎牛血清为Life Technologies公司产品, 荧光素酶报道系统PathDetect *in vivo* reporting system购于Stratagene (La Jolla, CA, USA), 包括C-Jun, Elk1, CREB, CHOP 4个系统, Reporting lysis buffer购于Sigma, 微量荧光检测仪。Wistar大鼠购于军事医学科学院, 肝干细胞WB F-344, 为中国医学科学院药理所韩锐教授赠送。培养条件: 高糖DMEM, 100 mL/L胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 37°C, 50 mL/L CO₂孵箱培养。

1.2 方法 各组织总RNA提取使用TrizolTM试剂盒。取各组织, 剪碎后研磨、过滤、收集细胞。1 mL Trizol裂解1×10⁷个细胞, 然后加入氯仿200 mL 抽提1次, 12 000 g离心15 min, 取上清, 用无水乙醇0.5 mL沉淀, 750 mL/L乙醇洗2次, 干燥后用DEPC处理的无菌去离子水溶解RNA。紫外分光光度仪测定其浓度, -20°C保存。总RNA 30 μg 进行10 mL/L甲醛变性凝胶电泳, 转膜, 膜在65°C预杂交1 h, 再加入³²P标记的探针杂交过夜。50°C, 0.5×SSC, 5 mL/L SDS洗膜2次, 压X光片, 于-70°C放射自显影后洗片。

取对数生长期的WB F-344细胞接种于24孔板(8×10⁴/孔), 待贴壁后按表1不同组分转染WB F-344细胞, 转染后12 h用PBS洗3遍, 再继续用含10 mL/L FBS的DMEM培养12 h后其中一组用HGF (20 g/L)(Promega公司)刺激8-10 h, 对照组

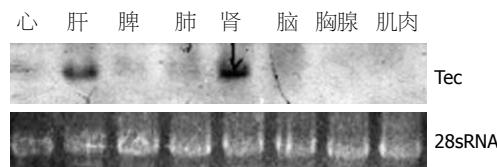


图1 Tec在大鼠中的组织分布.

表1 报道基因转染分组(ng)

	A	B	C	D	E
pcDNA-Tec	428	428	428		
pcDNA3.1			428	428	
Luciferase reporter vector	4	428		428	428
EIK1 or c-Jun or CREB or CHOP		21	21	21	21
Dbd				21	
MEK1 or MEKK or PKA or MEK3					21
PMD-18 T vector					407

C、D: 阴性对照; E: 阳性对照。

不加刺激。转染过的细胞用PBS洗3遍, 加入1×Reporting Lysis Buffer 100 μL/孔, -80°C 20 min, 37°C 10 min, 60 μL, 4°C, 12 000 g离心3 min, 取上清20 μL于反应杯中, 加Luciferase(荧光素酶)反应底物100 μL, 10 s内检测荧光强度以反映Luciferase的活性(Promega试剂盒)。每组3复孔, 实验重复3次。

2 结果

2.1 Tec的组织分布 从大鼠心、肝、脾、肺、脑、胸腺和肌肉中提取总RNA, Northern杂交。结果清楚的显示(与小鼠不同^[5]), 在大鼠中Tec不仅在肝脏中高表达, 而且在肾脏中也高表达(图1)。

2.2 Tec使Elk活性升高 HGF与其细胞表面的受体c-Met结合后, 引起细胞内一系列蛋白酪氨酸磷酸化, 激活多种细胞内信号转导途径, 包括MAPK、PI3K和NF-κB途径等。为了解Tec是否参与了HGF介导下的某种途径, 我们应用Path-Detect *in vivo* Reporting System, 用代表4条主要信号途径的报道激活质粒pFA-CREB, pFA-ELK, pFA-CHOP, pFA-c-Jun进行普查(图1, 对照组结果未列出), 这些质粒都能编码一种融合蛋白, 该蛋白由酵母GAL4 DNA结合区域和自身激活区域组成, 把他们和Tec以及报道质粒pFR-luc共转入WB F-344中, 假如Tec在HGF刺激下能激活某

■研发前沿

Tec在造血组织和肝组织高表达。目前, 很多研究已证实他在造血细胞中发挥了多种重要作用, 尤其是B淋巴细胞和T淋巴细胞的生长和分化起了重要作用。国内外学者的研究主要集中在Tec在造血细胞中的生物学功能方面, 目前研究的热点和重点主要是其参与的信号转导途径及其相互作用的蛋白质的筛选。

■创新盘点

尽管Mano *et al*^[1]首先报道Tec在肝等组织中表达,可能与肝细胞增殖、肝癌发生有关,但在2/3肝切除后,Tec的表达未见明显变化,因而认为该酪氨酸蛋白激酶可能与肝细胞增殖无关。其原因可能是与他们选择术后Tec的检测时间有关(没有选择术后2 h以内检测)。而本文研究是围绕Tec在肝组织中的功能开展的,发现了在肝大部分切除后1 h其表达水平上调,并且在肝细胞中参与了HGF信号途径,体现了一定创新性。

条途径,就能与相应的激活质粒相作用,从而引起pFR-luc激活而转录表达荧光素酶。我们发现Tec在HGF刺激下能使Elk报道质粒的活性增强2-3倍,而对另3条途径作用不明显。空载体对照对4条途径都无明显改变。重复对Elk的激活作用,该途径阳性对照质粒pFA-MEK1,与pFA-Elk, pFR-luc共转能激活该途径,以其为内对照,了解转染效率(图2)。

3 讨论

Tec酪氨酸蛋白激酶最早从肝组织中发现,但随后的研究主要认为他与肝再生关系不明确,因而集中在调控淋巴细胞增殖分化上,至今关于Tec激酶与肝组织生理病理过程相关的报道很少。我们在过去的研究中,发现了2/3肝部分切除后1 h, Tec mRNA再生呈现瞬间表达增加,其表达水平较其基础水平增高25倍,4 h后即基本恢复正常;我们随后筛选胚胎大鼠肝cDNA文库,获取了大鼠Tec的全长cDNA克隆,在GenBank注册(AF285881);在原代培养的大鼠肝细胞体系中,EGF可以迅速诱导Tec基因表达,且不被蛋白合成抑制剂阻断。这些结果表明Tec是一种与肝再生调控密切相关的早期反应基因,他可能参与肝再生的早期信号启动^[6]。尽管Mano *et al*^[1-3]首先报道Tec在肝等组织中表达,可能与肝细胞增殖、肝癌发生有关,但在2/3肝切除后72 h,Tec的表达未见明显变化,因而认为该酪氨酸蛋白激酶可能与肝细胞增殖无关,其原因可能是与他们选择术后Tec的检测时间有关(没有选择术后2 h以内检测)。随后关于该基因的功能研究主要集中在造血系统^[7]。研究表明Tec与多种蛋白能直接或间接结合,在造血系统中发挥了多种重要作用:如在T细胞中参与调节有丝分裂^[8];诱导Bcl-xL表达、抑制FAS凋亡蛋白从而调节细胞凋亡^[9];调节Ras家族小G蛋白Rho^[10]。总之,通过与多种蛋白质的相互作用,Tec参与对血细胞尤其是B淋巴细胞和T淋巴细胞的生长和分化的信号调控^[11]。而本室的研究却提示Tec为肝再生早期相关基因。

肝细胞增殖受很多分子参与精确调控,目前几乎不了解Tec如何参与肝细胞的信号调控。我们的另一些研究表明在HGF的诱导或肝大部分切除的刺激下,Tec与Stat3发生同时活化,提示Tec可能与HGF介导的某些信号途径相关^[12]。HGF是一种多功能的细胞活性因子,他与胚胎的发育、细胞分化增殖、细胞移动、抗凋亡等

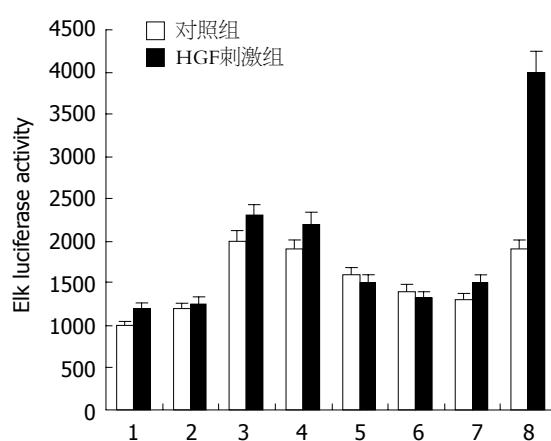


图 2 Tec在HGF刺激下使Elk活性提高。1: Vector+pFA-CREB; 2: Tec+pFA-CREB; 3: Vector+pFA-CHOP; 4: Tec+pFA-CREB; 5: Vector+pFA-c-Jun; 6: Tec+pFA-c-Jun; 7: Vector+pFA-Elk; 8: Tec+pFA-Elk。

过程密切相关,是目前公认的最重要的肝再生启动因子之一。因此,我们采用了Stratagene公司PathDetect Trans-reporting Systems(信号途径检测报告基因系统,包括c-Jun, Elk1, CREB, CHOP 4个系统),对Tec参与的细胞信号途径进行了初步检测。Tec真核表达载体瞬时转染肝干细胞WB F-344后,在HGF的诱导下,使得MAPK(mitogen-activated protein kinase)途径中重要的信号分子Elk活化水平明显升高。提示Tec很可能参与了HGF介导的Ras-MAPK-ERK1/2信号转导途径。HGF与其细胞表面的受体c-Met结合后,引起细胞内一系列蛋白酪氨酸磷酸化,激活多种细胞内信号转导途径,包括MAPK、PI3K和NF-κB途径等^[13]。其中MAPK途径是与细胞有丝分裂活动关系最密切的一条重要途径,其中包括3条通路: ERK pathway, p38 pathway与JNK pathway。MAPK的激活可能对决定细胞的命运起重要作用^[14],最终导致细胞分裂增殖、分化及离散等变化。

目前很多研究表明HGF介导下的MAPK途径能明显提高肝细胞增殖和分化的能力,一些实验还表明造血系统可能是肝干细胞的肝外来源,典型的造血细胞标志,包括Thy-1, c-kit和CD34,均表达在肝卵圆细胞的表面^[15-17]。因此我们有理由猜想,犹如Tec在造血组织中的重要作用一样,Tec可能通过参与Ras-MAPK-ERK1/2途径而最终对肝细胞的增殖和分化起重要的调节作用,但其精确调控机制有待我们继续深入的研究。

■应用要点

本文属于基础研究,旨在探讨肝组织中Tec的生物学功能,将来可能对肝再生和肝细胞增殖的机制起到一定补充作用。

4 参考文献

- 1 Mano H, Ishikawa F, Nishida J, Hirai H, Takaku F. A novel protein-tyrosine kinase, tec, is preferentially expressed in liver. *Oncogene* 1990; 5: 1781-1786
- 2 Mano H. Tec family of protein-tyrosine kinases: an overview of their structure and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10: 267-280
- 3 Mano H, Yamashita Y, Sato K, Yazaki Y, Hirai H. Tec protein-tyrosine kinase is involved in interleukin-3 signaling pathway. *Blood* 1995; 85: 343-350
- 4 Xu W, Wang S, Wang G, Wei H, He F, Yang X. Identification and characterization of differentially expressed genes in the early response phase during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 318-325
- 5 Sato K, Mano H, Ariyama T, Inazawa J, Yazaki Y, Hirai H. Molecular cloning and analysis of the human Tec protein-tyrosine kinase. *Leukemia* 1994; 8: 1663-1672
- 6 汪思应, 王阁, 许望翔, 魏汉东, 杨晓明. TEC酪氨酸激酶基因是一种与肝再生调控相关的早期反应基因. 中国生物化学与分子生物学报 2001; 17: 325-328
- 7 Lucas JA, Miller AT, Atherly LO, Berg LJ. The role of Tec family kinases in T cell development and function. *Immunol Rev* 2003; 191: 119-138
- 8 Mayer BJ, Hirai H, Sakai R. Evidence that SH2 domains promote processive phosphorylation by protein-tyrosine kinases. *Curr Biol* 1995; 5: 296-305
- 9 Yokohari K, Yamashita Y, Okada S, Ohya K, Oda S, Hatano M, Mano H, Hirasawa H, Tokuhisa T. Isoform-dependent interaction of BRDG1 with Tec kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 414-420
- 10 Altman A, Kaminski S, Busuttil V, Droin N, Hu J, Tadevosyan Y, Hipskind RA, Villalba M. Positive feedback regulation of PLCgamma1/Ca(2+) signaling by PKCtheta in restimulated T cells via a Tec kinase-dependent pathway. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2001-2011
- 11 Pillai S, Moran ST. Tec kinase pathways in lymphocyte development and transformation. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602: 162-167
- 12 李菲菲, 郑红, 许望翔, 杨晓明, 汪思应. 肝大部分切除或HGF刺激可以引起STAT3和TEC的同时激活. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2809-2812
- 13 Gohda E. Function and regulation of production of hepatocyte growth factor (HGF). *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2002; 119: 287-294, 309
- 14 Yang GH, Jarvis BB, Chung YJ, Pestka JJ. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 164: 149-160
- 15 Matsusaka S, Tsujimura T, Toyosaka A, Nakasho K, Sugihara A, Okamoto E, Uematsu K, Terada N. Role of c-kit receptor tyrosine kinase in development of oval cells in the rat 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model. *Hepatology* 1999; 29: 670-676
- 16 Omori N, Omori M, Evarts RP, Teramoto T, Miller MJ, Hoang TN, Thorgeirsson SS. Partial cloning of rat CD34 cDNA and expression during stem cell-dependent liver regeneration in the adult rat. *Hepatology* 1997; 26: 720-727
- 17 Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* 1998; 27: 433-445

■同行评价

本文创新性较强, 基本阐明了Tec在大鼠体内的分布和可能的信号途径, 起点较高。不足之处是对Tec信号通路的研究较为单薄。

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊, 《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教研究人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wjcd@wjnet.com; 网址: www.wjnet.com。

大鼠肝肠联合移植后肝对小肠的免疫保护作用

肇毅, 陆森, 成峰, 华一兵, 吴文溪, 王学浩

■背景资料

短肠综合征合并终末期肝病常常需要进行肝肠联合移植, 而对于肝肠联合移植时移植肝是否对移植小肠具有免疫保护作用目前仍存在争论。

肇毅, 华一兵, 吴文溪, 南京医科大学第一附属医院胃肠外科 江苏省南京市 210029
陆森, 成峰, 王学浩, 南京医科大学第一附属医院肝移植中心 江苏省南京市 210029
肇毅, 2004年南京医科大学博士研究生毕业, 讲师, 主治医师, 主要从事小肠移植和肝小肠联合移植的研究。
通讯作者: 吴文溪, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院胃肠外科. wuwenxi99@163.com
电话: 025-83718836-6863
收稿日期: 2006-04-12 接受日期: 2006-05-11

Immuno-protective effect of liver on small bowel in combined transplantation of liver and small bowel

Yi Zhao, Sen Lu, Feng Cheng, Yi-Bing Hua, Wen-Xi Wu, Xue-Hao Wang

Yi Zhao, Yi-Bing Hua, Wen-Xi Wu, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Sen Lu, Feng Cheng, Xue-Hao Wang, Center of Liver Transplantation, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Wen-Xi Wu, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. wuwenxi99@163.com

Received: 2006-04-12 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To develop a new combined transplantation model of liver and small bowel in rats, and to investigate the protective effect of transplanted liver on transplanted small bowel.

METHODS: Closed colony Sprague Dawley rats and inbred Wistar rats were included in this study. Five groups were designed: isogene small bowel transplant group (A), isogene liver transplant group (B), xenogene small bowel transplant group (C), xenogene liver transplant group (D), combined transplant of liver and small bowel group (E). Only Wistar rats were used in group A and B, while SD and Wistar rats were used as donors and recipients respectively in group C, D and E. During the combined transplantation of liver and small bowel (CTLS) for

the donors, inferior vena cava in chest was cut to construct a muff in the lateral wall of portal vein and cuff was placed. During the operation for the recipients, portal veins of the donors and recipients were connected using cuff technique, and re-arterialization was completed by anastomosing the superior mesenteric artery of graft with the right kidney artery of the recipients. Randomly selected 4 rats from each group were sacrificed on postoperative days (POD) 5, 7 and 14, and grafts were sampled. The rejection of graft was investigated through histopathological analysis, and the apoptosis of the cells of graft were evaluated by TUNEL.

RESULTS: The survival rate of CTLS was 73.3% (22/30). The pathological changes of ischemia and reperfusion injury were observed in group A and B, and the numbers of apoptotic cells in the grafts were decreased with the prolonging of time. However, acute rejection after transplantation appeared in group C and D, and there were more apoptotic cells in the grafts. Mild, moderate and severe acute rejection occurred on POD 5, 7 and 14, respectively in group C, while only mild or severe acute rejection appeared in group E. Furthermore, the number of apoptotic cells in the grafts of group E was markedly decreased on POD 14 in comparison with that of group C (16.9 ± 4.3 vs 20.5 ± 6.3 , $P < 0.05$). The degrees of acute rejection after transplantation and cell apoptosis of the grafts were not significantly different between group D and E.

CONCLUSION: The technique used in this study is feasible for establishment of CTLS model, and the transplanted liver can protect the transplanted intestinal graft from rejection in CTLS.

Key Words: Model; Rats; Combined transplantation of liver and small bowel; Immuno-protection; Apoptosis

Zhao Y, Lu S, Cheng F, Hua YB, Wu WX, Wang XH. Immuno-protective effect of liver on small bowel in combined transplantation of liver and small bowel. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1878-1883

摘要

目的: 建立大鼠肝肠联合整体移植模型, 研究移植肝是否对移植小肠具有免疫保护作用.

方法: 选用封闭群SD大鼠和近交系Wistar大鼠. 实验分5组: 同基因小肠移植组、同基因肝移植组、异基因小肠移植组、异基因肝移植组、肝肠联合移植组. 同基因移植供受体均为Wistar大鼠, 异基因小肠移植、肝移植和肝肠联合移植供受体分别选用SD和Wistar大鼠. 肝肠联合移植在切取移植物后, 利用供体胸段下腔静脉在门静脉侧壁建立一袖套, 并安置套管. 受体手术时, 将此门静脉侧壁袖套与受体门静脉残端套管法吻合. 供体肠系膜上动脉与受体右肾动脉吻合. 免疫保护作用通过术后5, 7, 14 d从各组随机取出4只大鼠的移植植物普通病理检查及细胞凋亡检测评估.

结果: 肝肠联合移植模型建立手术成功率73.3% (22/30). 同基因移植组术后仅表现为缺血-再灌注损伤所致的轻度组织损伤及炎症反应, 移植物细胞凋亡数逐渐减少. 异基因移植术后均出现急性排斥, 移植物细胞凋亡数递增, 并且较同基因移植多, 差别有显著性. 小肠移植术后5, 7, 14 d分别表现为轻度、中度和重度排斥. 而肝肠联合移植的小肠移植植物术后5, 7, 14 d分别表现为轻度、轻度和中度排斥, 且14 d时小肠细胞凋亡数较异基因小肠移植组少, 差别具有显著性(16.9 ± 4.3 vs 20.5 ± 6.3 , $P < 0.05$). 术后各时间点异基因肝移植和肝肠联合移植的移植肝排斥反应严重程度相同, 细胞凋亡数比较无显著差异.

结论: 此法建立大鼠肝肠联合移植模型可行. 肝肠联合移植时肝对小肠具有免疫保护作用.

关键词: 模型; 大鼠; 肝肠联合移植; 免疫保护; 凋亡

肇毅, 陆森, 成峰, 华一兵, 吴文溪, 王学浩. 大鼠肝肠联合移植后肝对小肠的免疫保护作用. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1878-1883

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1878.asp>

0 引言

短肠综合征合并终末期肝病常需进行肝肠联合移植, 但由于有限的临床病例数, 导致肝肠联合移植在临床应用过程中仍存在着许多不足之处, 尚有许多疑问有待于进一步研究^[1-6], 所以成功建立动物模型并进行相关的机制研究非常重要. 我们利用供体下腔静脉在供体门静脉侧壁上预置袖套的方法建立大鼠肝肠联合整体移植

模型, 通过组织病理学观察大鼠移植小肠及移植肝排斥反应发生情况, 并通过原位末端标记法(TUNEL)检测移植肝和移植小肠的细胞凋亡情况, 以了解大鼠肝肠联合整体移植后, 肝对小肠是否具有免疫保护作用.

■研究前沿

肝肠联合移植手术方式的优化, 肝肠联合移植时移植肝诱导对移植小肠免疫耐受的机制, 仍然是当前研究热点.

1 材料和方法

1.1 材料 封闭群SD大鼠(南京医科大学提供)和近交系Wistar大鼠(河南医科大学提供), 体质量250-280 g. TUNEL试剂盒购自Promega公司. 实验分5组: 同基因小肠移植组: Wistar→Wistar; 同基因肝移植组: Wistar→Wistar; 异基因小肠移植组: SD→Wistar; 异基因肝移植组: SD→Wistar; 异基因肝肠联合移植组: SD→Wistar. 同基因移植组每组各20对大鼠, 异基因移植组每组各30对大鼠. 所有大鼠术前禁食12 h. 清洁手术, 显微外科操作, 麻醉采用氯胺酮ip (100 mg/kg).

1.2 方法

1.2.1 小肠移植模型及肝移植模型的建立 小肠异位移植, 肠系膜上动脉和肾下腹主动脉端侧吻合, 门静脉和受体下腔静脉端侧吻合, 供肠两端腹壁造口. 肝移植模型的建立采用Kamada的标准双套管法^[7]. 术后经阴茎静脉输注动脉血2-3 mL(由Wistar大鼠提供)和生理盐水2 mL, 禁食12 h后恢复正常饮食. 术后应用抗生素3 d, 各组均不用免疫抑制剂.

1.2.2 肝肠联合整体移植模型的建立 供体手术: 游离肠系膜上动、静脉, 门静脉, 肝下下腔静脉. 分离肝周各韧带, 游离胆管并插管, 结扎切断肝动脉. 全身肝素化后阻断肠系膜上动脉开口近侧腹主动脉, 从肾下腹主动脉插管灌注. 灌注结束后, 打开胸腔, 剪取约1 cm长的下腔静脉胸段. 在门静脉左前壁幽门静脉水平将胸段下腔静脉和门静脉行端侧吻合(9-0尼龙线, 连续缝合), 吻合后预置自制聚乙烯套管, 预置肝下下腔静脉套管. 在靠近腹主动脉处剪断肠系膜上动脉, 选定灌注效果好的空肠段约8 cm, 两端离断, 肠腔冲洗后将移植植物放在4℃乳酸钠林格液中保存(图1). 受体手术: 切除右肾, 并游离右肾动脉. 离断肝周韧带, 切除肝脏. 将供肝按Kamada双套管法原位置入(肝上下腔静脉采用对端缝合, 肝下下腔静脉以及供受体门静脉套管法吻合). 暂时阻断套管远端的供体肠系膜上静脉以防血液返流入供肠. 恢复肝血流, 结束无肝期. 供体肠系膜上动脉和受体右肾动脉端端吻合, 开放血流后见供肠迅速变红, 肠系膜血管搏动有力, 将胆管插管

■相关报道

德国学者Meyer采用与本文类似的方法建立肝肠联合整体移植大鼠模型, 即供受体门静脉缝合法吻合, 肠系膜上动脉和受体肾下腹主动脉端侧吻合。

插入受体胆总管, 丝线结扎固定。供肠处理同前述小肠移植, 术后处理同前。

1.2.3 大鼠移植肝及移植小肠术后组织病理学检查于术后5, 7, 14 d从存活的各组大鼠中随机取出4只处死, 并切取小肠和肝脏进行组织病理学检查(HE染色)。依据Schmid *et al*^[8]介绍的病理诊断标准判定大鼠小肠移植排斥反应的程度: 轻度: 肠黏膜绒毛轻度畸形, 间质有少量炎症细胞浸润; 中度: 肠绒毛畸形更加明显, 黏膜上皮开始有脱落, 细胞浸润加重; 重度: 肠绒毛结构消失, 上皮脱落, 肠壁变薄并有坏死, 间质大量炎细胞浸润, 血管炎明显。依据Williams *et al*^[9]介绍的病理诊断标准判定大鼠肝移植排斥反应的程度: 0级: 无排斥证据; I级: 轻度排斥, 轻度汇管区单核细胞浸润及血管内皮炎。II级: 中度排斥, 汇管区较重单核细胞浸润伴肝细胞局灶坏死, 但无桥接坏死。III级: 严重排斥, 汇管区显著单核细胞浸润, 肝实质桥接坏死。

1.2.4 TUNEL法检测移植肝和移植小肠细胞凋亡标本用40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋; 切片经二甲苯脱蜡, 逐级在乙醇中水化; 切片加TdT和DIG-dUTP, 置样品于湿盒中, 37℃孵育3 h; TBS洗涤3次后, 加封闭液50 μL/片, 室温30 min, 甩掉封闭液, 不洗; 用封闭液1:100稀释生物素化地高辛抗体, 加至标本上, 置样品于湿盒中, 37℃反应30 min; TBS洗涤3次, 每次2 min; 加SABC至切片, 37℃反应30 min; TBS洗涤5次, 每次2 min; 显色10-30 min, 水洗, DAB显色; 苏木素轻度复染, 蒸馏水洗涤; 脱水, 透明, 甘油明胶封闭, 显微镜观察。阳性结果判断: 凋亡细胞染色定位于细胞核, 呈黄褐色。凋亡细胞计数: 每片10个高倍视野下计凋亡细胞数, 取平均值, 根据细胞形态学特征计算移植物细胞凋亡数。

统计学处理术后3 d内死亡列为技术性并发症, 术后存活3 d以上者为手术成功, 纳入手术成功率的计算。各组数据以mean±SD表示, 采用t检验, 用统计软件包SPSS 12.0处理。

2 结果

2.1 手术情况及手术成功率 小肠移植总手术时间约90 min, 其中供体手术时间约38 min, 受体手术时间约52 min。肝移植总手术时间约96 min, 其中供体手术时间约42 min, 受体手术时间约54 min, 其中无肝期17 min。肝肠联合移植总手术时间平均165 min, 供体平均手术时间90 min, 受体平均手术时间75 min, 其中无肝



图1 移植物.

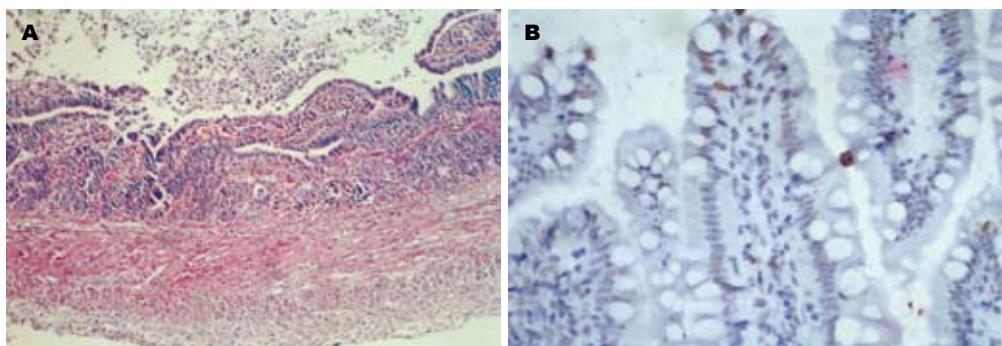
表1 移植术后各组大鼠移植物排斥反应情况

分组	5 d	7 d	14 d
同基因小肠移植	无	无	无
同基因肝移植	无	无	无
异基因小肠移植	轻度	中度	重度
异基因肝移植	轻度	轻度	中度
肝肠联合移植(肠)	轻度	轻度	中度
肝肠联合移植(肝)	轻度	轻度	中度

期平均17 min。同基因小肠移植组、同基因肝移植组、异基因小肠移植组、异基因肝移植组及肝肠联合移植组的手术成功率分别为90.0% (18/20), 85.0% (17/20), 83.3% (25/30), 80.0% (24/30)及73.3% (22/30)。常见死亡原因包括: 失血性休克、静脉血栓形成及不明原因。

2.2 移植物组织病理检查 依据Schmid *et al*^[8]介绍的判定大鼠小肠移植排斥反应(图2A)程度病理诊断标准以及Williams *et al*^[9]介绍的判定大鼠肝移植排斥反应程度病理诊断标准, 各组移植物排斥反应的程度不一(表1)。

2.3 移植肝和移植小肠细胞凋亡 同基因、异基因肝移植组及肝肠联合移植组, 术后均出现肝细胞凋亡。同基因肝移植组细胞凋亡数随时间推移而逐渐减少, 异基因肝移植组及肝肠联合移植组术后凋亡细胞数随时间推移而呈上升趋势。术后各时间点, 肝肠联合移植组、异基因肝移植组与同基因肝移植组在肝细胞凋亡方面比较均有显著差异($P<0.05$), 而肝肠联合移植组与异基因肝移植组之间比较无显著差异(表2)。同基因、异基因小肠移植组及肝肠联合移植组的小肠移植物术后均出现小肠黏膜上皮细胞凋亡(图2B)。同基因小肠移植组小肠黏膜上皮细胞凋亡数随术后时间的延长而逐渐减少, 异基因小



■创新点
本文首次采用在供体门静脉侧壁上预置袖套的方法建立大鼠肝肠联合移植模型，在国内外未见报道。

图 2 移植小肠组织病理和细胞凋亡. A: 移植小肠排斥反应(HE $\times 100$); B: 移植小肠黏膜上皮细胞凋亡(TUNEL).

表 2 各组移植术后肝细胞和小肠黏膜上皮细胞凋亡数(个/HP)

分组	肝细胞凋亡数			小肠黏膜上皮细胞凋亡数		
	5 d	7 d	14 d	5 d	7 d	14 d
同基因移植	18.9 \pm 4.9	13.2 \pm 10.8	12.7 \pm 3.7	5.3 \pm 2.3	3.4 \pm 2.3	2.9 \pm 2.5
异基因移植	25.2 \pm 8.2 ^b	30.8 \pm 8.3 ^b	31.4 \pm 8.7 ^b	10.2 \pm 3.8 ^b	15.2 \pm 4.9 ^b	20.5 \pm 6.3 ^b
肝肠联合移植	24.1 \pm 7.7 ^a	33.4 \pm 8.7 ^b	34.3 \pm 9.3 ^b	11.3 \pm 4.1 ^b	13.7 \pm 5.2 ^b	16.9 \pm 4.3 ^{bc}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 同基因组; ^cP<0.05 vs 异基因组.

肠移植组、肝肠联合移植组小肠黏膜上皮细胞凋亡数随术后时间的延长而递增，且术后各时间点小肠黏膜上皮细胞凋亡数均多于同基因小肠移植组，差别有显著性($P<0.01$)。肝肠联合移植组及异基因小肠移植组术后5, 7 d，肠黏膜上皮细胞凋亡数两组无显著差异；术后14 d，肝肠联合移植组小肠黏膜上皮细胞凋亡数显著低于异基因小肠移植组($P<0.05$, 表2)。

3 讨论

提高肝肠联合移植模型手术成功率的关键是尽量缩短无肝期，尽量减轻对血流动力学的影响^[10-16]，本研究中模型的构建法正是顺应了该要求。我们事先利用胸段下腔静脉预置门静脉侧壁袖套并安置套管，这样门静脉吻合时只要将套管插入受体门静脉并结扎即可，无疑会比缝合法节省时间(约7-8 min)，缩短无肝期使之与Kamada的标准“双套管法”大鼠原位肝移植无肝期相同，这种方法文献中尚未见报道。利用胸段下腔静脉有以下几个优点：(1)该段血管本身就是游离的，不需分离；(2)长度足够，口径适当；(3)无血管侧枝。动脉重建采用建立小肠移植模型的动脉吻合方式^[17]，即切除一侧肾脏，将肠系膜上动脉和肾动脉端端吻合，这样不需阻断腹主动脉，减轻了对血流动力学的影响。既往研究提示肝移植常可诱导特异性免疫耐受。单独肝

脏移植与其他单独器官移植相比，肝移植可通过直接产生免疫耐受而更易被受体接受；另一方面，肝与其他器官联合移植时常可使其他移植植物免受排斥或减轻排斥反应^[18-21]。为了进一步探讨肝肠整体移植后，肝对小肠是否具有免疫保护作用，本研究将同基因单独小肠、肝移植作为对照以排除缺血-再灌注损伤的影响，以异基因单独小肠、肝移植为对照，研究了肝肠联合移植术后移植小肠和移植肝的组织病理学改变及细胞凋亡情况。

组织病理检查是判断移植术后排斥反应是否发生及其严重程度的最客观的指标之一。本研究中同基因单独小肠、肝移植组织学检查一直未出现排斥反应，仅表现为缺血-再灌注损伤所致的轻度组织损伤及炎症反应。异基因肝移植组及肝肠联合移植组的肝脏术后排斥反应出现的时间及严重程度类似，提示肝肠联合移植并未增加对移植肝的免疫排斥。与异基因小肠移植组相比，肝肠联合移植组虽然手术成功率略低于前者(主要考虑与多脏器移植创伤较大相关)，但术后发生排斥反应的程度则显著降低：异基因小肠移植术后5 d呈轻度排斥，7 d呈中度，14 d出现重度排斥反应，而肝肠联合移植术后5, 7 d表现为轻度排斥反应，14 d时仅表现为中度排斥，提示肝肠联合移植术后，移植肝可减轻对移植肠的排斥或延缓排斥反应出现的时间。

■应用要点

本文提供了一种理想的建立肝小肠联合整体移植大鼠模型的方法,为肝肠联合移植的基础研究提供了一种理想模型。

器官移植后,免疫系统常可通过多种途径导致移植细胞凋亡,从而进一步导致移植后排斥反应的发生^[22-27]。在本研究中同基因单独小肠、肝移植中细胞凋亡考虑与一过性的缺血-再灌注损伤相关,随着损伤的迅速缓解,细胞凋亡数亦相应减少。与同基因移植组相比,术后5, 7, 14 d异基因单独小肠、肝移植组及肝肠联合移植组细胞凋亡数均明显高于前者,提示此时细胞凋亡的发生除因缺血-再灌注损伤所致外,主要应与术后排斥反应的发生相关。与异基因小肠移植组相比,肝肠联合移植组术后14 d细胞凋亡数显著低于前者,这进一步提示移植肝可减轻机体对移植肠的排斥或延缓排斥反应出现的时间。和组织病理学结果类似,本研究中肝肠联合移植组与异基因肝移植组相比,术后细胞凋亡数无显著性差异,提示肝肠联合移植术后肝对小肠发挥免疫保护作用的同时,其自身免疫原性并没有增加。

总之,采用此预置门静脉侧壁袖套的方法建立大鼠肝肠联合移植模型是可行的,肝肠联合移植时肝对小肠具有免疫保护作用。

4 参考文献

- 1 Kelly DA. Intestinal failure-associated liver disease: what do we know today? *Gastroenterology* 2006; 130: S70-S77
- 2 Testa G, Holterman M, John E, Kecskes S, Abcarian H, Benedetti E. Combined living donor liver/small bowel transplantation. *Transplantation* 2005; 79: 1401-1404
- 3 Grant D, Abu-Elmagd K, Reyes J, Tzakis A, Langnas A, Fishbein T, Goulet O, Farmer D. 2003 report of the intestine transplant registry: a new era has dawned. *Ann Surg* 2005; 241: 607-613
- 4 Horslen SP, Sudan DL, Iyer KR, Kaufman SS, Iverson AK, Fox IJ, Shaw BW, Langnas AN. Isolated liver transplantation in infants with end-stage liver disease associated with short bowel syndrome. *Ann Surg* 2002; 235: 435-439
- 5 Herlenius G, Friman S, Backman L, Krantz M, Saalman R, Ascher H, Nilsson O, Mjornstedt L, Ostraat O, Lindner P, Cahlin C, Gustafson B, Rizell M, Wramner L, Olausson M. Initial experience with multivisceral, cluster, and combined liver and small bowel transplantation in Sweden. *Transplant Proc* 2002; 34: 865
- 6 Nishida S, Levi D, Kato T, Nery JR, Mittal N, Hadjis N, Madariaga J, Tzakis AG. Ninety-five cases of intestinal transplantation at the University of Miami. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 233-239
- 7 Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983; 93: 64-69
- 8 Schmid T, Oberhuber G, Korozi G, Klima G, Margreiter R. Histologic pattern of small bowel allograft rejection in the rat. *Mucosal biopsies do not provide sufficient information.* *Gastroenterology* 1989; 96: 1529-1532
- 9 Williams JW, Peters TG, Vera SR, Britt LG, van Voorst SJ, Haggitt RC. Biopsy-directed immunosuppression following hepatic transplantation in man. *Transplantation* 1985; 39: 589-596
- 10 Gao W, Lemasters JJ, Thurman RG. Development of a new method for hepatic rearterialization in rat orthotopic liver transplantation. Reduction of liver injury and improvement of surgical outcome by arterialization. *Transplantation* 1993; 56: 19-24
- 11 Yin ZY, Ni XD, Jiang F, Li N, Li YS, Wang XM, Li JS. Auxiliary en-bloc liver-small bowel transplantation with partial pancreas preservation in pigs. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1499-1503
- 12 Jiang F, Yin ZY, Ni XD, Li YS, Li N, Li JS. Modifications in combined liver-small bowel transplantation in pigs. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2125-2127
- 13 Yin ZY, Ni XD, Jiang F, Li N, Li YS, Li JS. Modified technique for combined liver-small bowel transplantation in pigs. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1625-1628
- 14 Sudan DL, Iyer KR, Deroover A, Chinnakotla S, Fox IJ Jr, Shaw BW Jr, Langnas AN. A new technique for combined liver/small intestinal transplantation. *Transplantation* 2001; 72: 1846-1848
- 15 Chen YX, Sato M, Watanabe Y, Kashu Y, Kikkawa H, Suzuki H, Kohtani T, Miyauchi K, Kito K, Kawachi K. Surgical technique for combined intestine-auxiliary liver transplantation in rats: development of a new microsurgical model. *Microsurgery* 2001; 21: 1-5
- 16 Gondolesi GE, Rodriguez-Davalos M, Soltys K, Florman S, Kaufman S, Fishbein T. End-to-end portacaval shunt for venous drainage of the native foregut in combined liver-intestinal transplantation. *Pediatr Transplant* 2006; 10: 98-100
- 17 Wallander J, Holtz A, Larsson E, Gerdin B, Lackgren G, Tufveson G. Small-bowel transplantation in the rat with a nonsuture cuff technique. Technical and immunological considerations. *Transpl Int* 1988; 1: 135-139
- 18 Zhang WJ, Liu DG, Ye QF, Sha B, Zhen FJ, Guo H, Xia SS. Combined small bowel and reduced auxiliary liver transplantation: case report. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 956-960
- 19 Jugie M, Canioni D, Le Bihan C, Sarnacki S, Revillon Y, Jan D, Lacaille F, Cerf-Bensussan N, Goulet O, Brousse N, Damotte D. Study of the impact of liver transplantation on the outcome of intestinal grafts in children. *Transplantation* 2006; 81: 992-997
- 20 Buchman AL, Iyer K, Fryer J. Parenteral nutrition-associated liver disease and the role for isolated intestine and intestine/liver transplantation. *Hepatology* 2006; 43: 9-19
- 21 Goulet O, Damotte D, Sarnacki S. Liver-induced immune tolerance in recipients of combined liver-intestine transplants. *Transplant Proc* 2005; 37: 1689-1690
- 22 Fayyazi A, Schlemminger R, Gieseler R, Peters JH, Radzun HJ. Apoptosis in the small intestinal allograft of the rat. *Transplantation* 1997; 63: 947-951
- 23 Meyer D, Baumgardt S, Loeffeler S, Czub S, Otto C, Gassel HJ, Timmermann W, Thiede A, Ulrichs K. Apoptosis of T lymphocytes in liver and/or small bowel allografts during tolerance induction.

- Transplantation 1998; 66: 1530-1536
- 24 Meyer D, Baumgardt S, Loeffler S, Gassel HJ, Czub S, Ulrichs K, Thiede A. Apoptosis in combined liver/small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30: 2588
- 25 Caillier JF, Laplante P, Hebert MJ. Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *Am J Transplant* 2006; 6: 247-253
- 26 Gomez L, Raisky O, Chalabreysse L, Verschelde C, Bonnefoy-Berard N, Ovize M. Link between immune cell infiltration and mitochondria-induced cardiomyocyte death during acute cardiac graft rejection. *Am J Transplant* 2006; 6: 487-495
- 27 Zhang Y, Kirken RA, Furian L, Janczewski S, Qu X, Hancock WW, Wang M, Tejpal N, Kerman R, Kahan BD, Stepkowski SM. Allograft rejection requires STAT5a/b-regulated antiapoptotic activity in T cells but not B cells. *J Immunol* 2006; 176: 128-137

■同行评价

本文通过技术改进成功建立大鼠肝肠联合整体移植模型, 并研究移植肝是否对移植小肠具有免疫保护作用, 有一定的新颖性和可读性。

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的大型综合性消化病学类学术期刊。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号。《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展。从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文。《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能。

常规和快速乙肝免疫接种效果比较

陈仕珠, 张晋红, 张增平, 任菊香, 温风玲, 韩永战, 任雪莲, 陈鹰军

■背景资料

预防乙肝最好的方法是及时而成功地接种乙肝疫苗, 然而应用近20 a的常规接种方案间隔时间太长, 不便于接种者和操作者掌握, 亦无群体化区分, 致及时接种率和全程接种完成率低, 乙肝疫苗免疫覆盖率低。接种后抗-HBs阳转率较低, 对需快速或紧急乙肝免疫的高危和特殊人群该方案显然不适用, 不利于乙肝疫苗计划免疫的成功实施。为使各类人群乙肝疫苗计划免疫得以顺利而成功地实施, 本文研究了适用于所有人群、目前最快速的乙肝免疫接种方案/程序的效果。

陈仕珠, 张晋红, 张增平, 任菊香, 温风玲, 韩永战, 任雪莲, 陈鹰军, 中国人民解放军451医院内五科 陕西省西安市710054

陈仕珠, 主任医师, 主要从事消化系统疾病临床诊治工作。

通讯作者: 陈仕珠, 710054, 陕西省西安市友谊东路269号, 解放军451医院内五科. chensizhu34419@126.com

电话: 029-84734111

收稿日期: 2006-03-20 接受日期: 2006-04-13

A comparative study on standard and accelerated immunization schedules for rapid protection against hepatitis B

Shi-Zhu Chen, Jin-Hong Zhang, Zeng-Ping Zhang, Ju-Xiang Ren, Feng-Ling Wen, Yong-Zhan Han, Xue-Lian Ren, Ying-Jun Chen

Shi-Zhu Chen, Jin-Hong Zhang, Zeng-Ping Zhang, Ju-Xiang Ren, Feng-Ling Wen, Yong-Zhan Han, Xue-Lian Ren, Ying-Jun Chen, the Fifth Department of Internal Medicine, Chinese PLA 451 Hospital, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Shi-Zhu Chen, the Fifth Department of Internal Medicine, Chinese PLA 451 Hospital, 269 Youyi East Road, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China. chensizhu34419@126.com

Received: 2006-03-20 Accepted: 2006-04-13

Abstract

AIM: To study the accelerated immunization schedule for rapid protection against hepatitis B.

METHODS: Healthy subjects were consecutively collected and divided into four groups according to occupation risk of getting hepatitis B virus (HBV) infection. Group A contained students and teachers (432 male and 53 female) from military academy with a mean age of 27.1 (16-58) years old. Group B contained interns and nurses (171 female and 63 male) aged 21.6 (18-24) years old. Group C were mixed populations (170 male and 132 female) aged 29.8 (3-69) years old. 383 students and other subjects (205 male and 178 female) aged 25.8 (2-59) years old served as controls. Group A, B and C were vaccinated intradermally with 20 µg (10 µg for the individuals less than 12 years old) recombinant hepatitis B (rHB) vaccine by the accelerated sched-

ule (immunized on day 0, 7 and 14), and group D was immunized by the standard schedule (on mo 0, 1 and 6). HBV markers and anti-HBs titers were tested 1, 3, 7, 12, 24 and 36 month after the first vaccination.

RESULTS: The completion rate for the accelerated schedule (group A: 97.7%; group B: 97.4%; group C: 95.0%) was markedly higher than that for the standard schedule (66.3%, $P < 0.001$). The individuals without completion of vaccination covered a percentage of 43.3%. The seroconversion rate (anti-HBs $>$ or = 2.1 IU/L) was significant higher 1 and 3 mo after the first vaccination in group A, B and C than in the controls (1 mo: 66.9%, 67.4%, 58.2% vs 21.1%, $P < 0.001$; 3 mo: 96.9%, 97.3%, 94.0% vs 41.1%, $P < 0.001$). The seroconversion rate was still higher in group B than in control group ($P < 0.05$) at 7 mo. A higher protection rate (anti-HBs $>$ or = 10 IU/L) was found 1 and 3 month after the first dose in group A, B and C (63.0%, 65.2%, 53.0% and 94.5%, 96.0%, 93.6%, respectively) than that in the controls (1 mo: 63.0%, 65.2%, 53.0% vs 7.8%; 3 mo: 94.5%, 96.0%, 93.6% vs 30.9%, $P < 0.001$). The protection rate was higher in control group than that in group B ($P < 0.05$) 7 and 12 mo after the first dose, and there was also notable difference between group B and C. A significantly higher geometric mean titer (GMT) of anti-HBs was found 1 and 3 mo after first dose for the accelerated schedule (122.7%, 125.6%, 118.8% and 131.5%, 132.1%, 119.3% for group A, B and C, respectively) than that for the standard schedule (21.3% and 41.5%, $P < 0.001$). However, the level of GMT was higher in the controls than that in group A, B and C ($P < 0.05-0.01$) at 7, 12, 24 and 36 mo. The seroconversion rate of anti-HBs was also markedly elevated by the accelerated schedule (73.1%) in the subjects who had no response to the standard schedule (11.0%, $P < 0.001$).

CONCLUSION: The accelerated schedule is simple and effective, with a higher completion rate than the standard schedule. The seroconversion of anti-HBs and peak GMT appear earlier in the individuals immunized with the accelerated schedule, which is suitable for most popula-

tions, especially for those susceptible to HBV and needing rapid protection against hepatitis B. For those who have no response to the standard schedule, it is also effective.

Key Words: Hepatitis B; Hepatitis vaccine; Immunization; High risk population

Chen SZ, Zhang JH, Zhang ZP, Ren JX, Wen FL, Han YZ, Ren XL, Chen YJ. A comparative study on standard and accelerated immunization schedules for rapid protection against hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1884-1888

摘要

目的: 研究d 0, 7, 14接种程序的乙肝免疫效果。

方法: 无HBV感染和无抗-HBs健康受试者分为组1: 军校学员和教师485名, 男432女53名; 平均年龄27.1 (16-58)岁。组2: 实习医生和护士234名, 男63女171名; 平均年龄21.6 (18-24)岁。组3: 混合人群302名, 男170女132; 平均年龄29.8 (3-69)岁。对照组: 高校学生和其他人员383名, 男205女178名; 平均年龄25.8 (2-59)岁。前3组按d 0, 7, 14程序, 对照组按mo 0, 1, 6程序三角肌内接种乙肝疫苗20 μg(<12岁者10 μg)。于首针接种后1, 3, 7, 12, 24和36 mo查HBV五项标志、抗-HBs滴度及肝功等。

结果: 全程接种完成率组1(97.7%)、组2(97.4%)、组3(95.0%)均明显高于对照组(66.3%)($P<0.001$)。对照组中非团体接种171名, 43.3%未完成全程接种。首针接种后1, 3 mo d 0, 7, 14程序组血清抗-HBs阳转率分别为66.9%, 67.4%, 58.2%和96.9%, 97.3%, 94.0%, 明显高于对照组的21.1%和43.1% ($P<0.001$); 7 mo时组2仍高于对照组($P<0.05$)。1, 3 mo d 0, 7, 14程序组血清抗-HBs有效保护率分别为63.0%, 65.2%, 53.0%和94.5%, 96.0%, 93.6%, 显著高于对照组的7.8%和30.9% ($P<0.001$); 7和12 mo时对照组高于组3($P<0.05$), 组2亦高于组3($P<0.05$)。1, 3 mo时d 0, 7, 14程序组血清抗-HBs几何平均滴度(GMT)分别为122.7%, 125.6%, 118.8%和131.5%, 132.1%, 119.3%, 显著高于对照组的21.3%和41.5% ($P<0.001$); 但7, 12, 24和36 mo时对照组均高于其他3组($P<0.05-0.01$)。对mo 0, 1, 6程序无反应者予d 0, 7, 14 (73.1%)方案接种后血清抗-HBs阳转率亦明显高于重复mo 0, 1, 6 (11.0%)方案者($P<0.001$)。

结论: d 0, 7, 14方案操作方便、全程接种完成率高、抗-HBs阳转率和GMT峰值出现早,

适用于各类人群, 尤需紧急免疫的高危或特殊人群; 对0, 1, 6 mo程序无反应者亦有良好效果。

关键词: 乙型肝炎; 乙肝疫苗; 免疫; 高危人群

陈仕珠, 张晋红, 张增平, 任菊香, 温风玲, 韩永战, 任雪莲, 陈鹰军. 常规和快速乙肝免疫接种效果比较. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1884-1888

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1884.asp>

■研发前沿
欲提高乙肝疫苗及时接种率、全程接种完成率和免疫覆盖率, 在具体操作上改善接种方案/程序是重要途径之一。本文依据机体对抗原免疫反应的特点和不同人群乙肝免疫实际需要确定本乙肝疫苗接种程序(d 0, 7, 14), 使之既适用于各类人群, 又能确保及早出现几何平均滴度(GMT)高的抗-HBs, 本文设计涵盖了除新生儿外的重点、高危、普通和部分需紧急免疫的特殊人群(军人等)以观察本方案适用人群范围。

0 引言

自乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)疫苗纳入免疫接种以来, 世界范围内的新生儿和儿童群体总体HBV携带率和慢乙肝发病率均已明显下降^[1-4], 但在其他人群乙肝疫苗接种覆盖率仍较低, 而HBV感染率^[5-6]、携带率及慢乙肝发病率则下降不明显^[7]。在其他人群特别是高危人群、执行特殊任务的军人/武警等人员尚存在乙肝疫苗接种盲区, 且因标准(mo 0, 1, 6)接种程序间隔时间太长而未完成全程接种者不在少数^[8]。此外, 在混合人群中, 常规免疫后约10%-25%的人无反应^[9], 重复标准方案接种时间长且效果不理想。为寻找更快捷方便的乙肝疫苗接种方案, 提高各类人员乙肝疫苗全程接种率、抗-HBs阳性率, 我们前瞻性地研究了d 0, 7, 14方案对不同人群, 尤其是高危人群和需紧急乙肝免疫的特殊人群乙肝免疫的效果和随访结果。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-09/2005-08接种乙肝疫苗者, 按不同职业等分3组及对照组。组1为部分军校学员、教员及部分执行特殊任务的部队/武警官兵485名, 男432名, 女53名, 年龄16-58(平均27.1)岁。组2为同期陕西地区医学院校在我院实习的医生92名, 护士142名, 共234名, 男63名, 女171名; 年龄18-24(平均21.6)岁。组3为普通混合人群302名, 男170名, 女132名, 年龄3-69(平均29.8)岁。对照组为同期接种乙肝疫苗的部分西安市高校学员和其他人员383名, 男205名, 女178名, 年龄2-59(平均25.8)岁。所有受试者营养、健康状况良好, 均无免疫性疾病或应用免疫抑制剂的其他急慢性疾病, 肝功能正常, 甲-戊型肝炎病毒标志均阴性。其中此前按标准方案接种1次以上未检出抗-HBs者4组分别为38、26、34和59名。家族中有HBV携带或乙肝患者分别为17、17、22及29名。所有受试者均接种北京华尔盾生物技术公司生产的重组CHO细胞乙肝疫苗(批号为

■创新盘点

本乙肝疫苗接种程序/方案为目前世界范围最快速便捷, 适用人群最广的方案。不同人群按本方案接种后抗-HBs出现早, 阳转率高, GMT高, 全程接种完成率均明显优于常规接种程序/方案。尤其对高危、需紧急免疫的特殊人群及住所不定的游动人群, 本方案能达到常规方案无法达到的快速免疫、快速保护的目的。对象我国这样乙肝高流行区、乙肝免疫地区差别大、流动人口多的国家的乙肝免疫, 本方案将起积极作用。

表1 首针接种后不同接种程序各时间段血清抗-HBs阳转率

组别	1 mo		3 mo		7 mo		12 mo		24 mo		36 mo	
	n/n	%	n/n	%	n/n	%	n/n	%	n/n	%	n/n	%
组1	320/478	66.9 ^b	441/455	96.9 ^b	423/445	95.1	398/437	91.1	282/381	74.0	189/302	62.6
组2	155/230	67.4 ^b	218/224	97.3 ^b	204/212	96.2	191/203	94.1 ^a	115/152	75.7	71/109	65.1
组3	167/287	58.2 ^b	235/250	94.0 ^b	225/244	92.2	211/240	87.9	127/183	69.4	84/141	59.6
对照组	62/294	21.1	113/262	43.1	229/247	92.7	207/241	86.7	128/176	72.7	78/122	63.9

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组。

表2 首针接种后不同接种程序各时间段血清抗-HBs保护率(≥ 10 IU/L)

组别	1 mo		3 mo		7 mo		12 mo		24 mo		36 mo	
	n/n	%	n/n	%	n/n	%	n/n	%	n/n	%	n/n	%
组1	301/478	63.0 ^b	430/455	94.5 ^b	420/445	94.4	368/437	84.2	278/381	73.0	199/302	65.9
组2	150/230	65.2 ^b	215/224	96.0 ^b	197/212	92.9	20/175	86.2 ^c	113/152	74.3	75/109	68.8 ^c
组3	152/287	53.0 ^b	234/250	93.6 ^b	219/244	89.8	191/240	79.6	131/183	71.6	87/141	61.7
对照组	23/294	7.8	81/262	30.9	237/247	96.0 ^c	212/241	88.0 ^c	126/176	71.6	82/122	62.2

^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05 vs 组3。

S19990072, 每支10 μg, 1 mL)。

1.2 方法 组1, 2, 3按d 0, 7, 14程序上臂三角肌内接种乙肝疫苗, 每针20 μg(<12岁者10 μg)。对照组按mo 0, 1, 6程序接种乙肝疫苗, 方法、剂量同上。于首针接种后1, 3, 7, 12, 24和36 mo分别取静脉血查抗-HBs滴度等。同时记录接种后的不良反应和完成全程接种情况, 未完成接种者不列入分析。各时间段人数按实际复查人数计算。对对照组3针接种结束后1 mo无反应者按d 0, 7, 14程序重复接种, 组1, 2, 3接种后未出现阳转(无反应者, 按mo 0, 1, 6重复接种, 剂量及接种部位同前。对用d 0, 7, 14程序重复接种后仍未阳转者, 予胸腺因子α₁ 1.6 mg于腋淋巴结附近sc, 每周2次, 共4次, 同时按d 0, 7, 14接种乙肝疫苗, 剂量方法同上。接种前血清HBV等标志物用ELISA检测(试剂由上海科华生物有限公司生产); 免疫后血清抗-HBs滴度用北京生物制品研究所生产的固相放射免疫测定试剂盒检测, 具体按说明书进行。抗-HBs滴度<2 IU/L为阴性, ≥2.1 IU/L为阳性, ≥10 IU/L为有保护阳性。

统计学处理 抗-HBs阳性率等比较用χ²检验。各组抗-HBs GMT值比较用方差分析。

2 结果

除个别受试者出现接种部位轻度疼痛及/或胀感

外未出现其他明显不良反应。

2.1 全程接种完成率 组1, 2, 3分别有12(2.3%), 6(2.6%)和15(5.0%)名受试者未完成全程接种。3组平均未完成全程接种率为(33/1021)3.2%。对照组未完成全程接种者129(33.7%)名, 差异非常显著(P<0.001)。对照组中由单位组织的团体接种者中35/212(16.5%)名未完成全程接种, 而171名个人接种者中, 67/171(43.3%)未完成接种, 差异显著(P<0.001)。

2.2 血清抗-HBs阳转率和抗-HBs血清保护阳性率 不同免疫方案首针接种后1, 3 mo血清抗-HBs阳转率和抗-HBs血清保护阳性率组1, 2, 3均明显高于对照组(表1, 表2)。

2.3 血清抗-HBs GMT(表3)和对常规免疫方案接种无反应者的免疫效果 组1, 2, 3受试者中此前按标准方案接种后未产生抗-HBs者按d 0, 7, 14程序接种后血清抗-HBs阳转率分别为71.1%(27/38), 73.1%(19/26), 70.6%(24/34)。抗-HBs GMT(IU/L)1, 3, 7, 12, 24和36 mo分别为68.3, 82.6, 66.7, 50.2, 27.1和13.6 IU/L。对照组此前未出现抗-HBs阳转者重复标准方案接种后血清抗-HBs阳转率仅11.0%(6/59); GMT与标准方案接近; 其中于36 mo复查的5名复种者抗-HBs均消失。组1, 2, 3家族中有HBV携带或乙肝患者的56名首针接种后7 mo复查者54名, 其中

表 3 首针接种后不同接种程序各时间段血清抗-HBs GMT (IU/L)

组别	1		3		7		12		24		36 mo	
	n	GMT	n	GMT	n	GMT	n	GMT	n	GMT	n	GMT
组1	420	122.7 ^b	455	131.5 ^b	445	86.4 ^b	437	67.9 ^a	381	40.4 ^a	302	17.8 ^a
组2	214	125.6 ^b	224	132.1 ^b	212	90.6 ^{cb}	203	72.1 ^c	152	43.5	109	19.3
组3	287	118.8 ^b	250	119.3 ^b	244	82.2 ^b	240	64.6 ^a	183	40.2 ^a	141	15.5 ^a
对照组	294	21.3	262	41.5	247	115.9	241	82.8	176	49.3	122	24.9

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05 vs 组3.

19名(33.9%)血清抗-HBs阳转, 对照组58名中21名(36.2%)抗-HBs阳转, 两者接近($P>0.05$); 均明显低于无乙肝家族史者($P<0.01$). 对标准方案和d 0, 7, 14方案全程接种后7 mo仍无反应者重复d 0, 7, 14程序, 每针20 μg接种, 同时应用胸腺因子α₁(国产迈普欣)1.6 mg, 4针后, 29/45(64.4%)名血清抗-HBs阳转. 完成随访的无反应者家族中除有乙肝家族史外, 另有6名其配偶为HBV携带/患者.

3 讨论

防治乃至最终征服乙肝是人类的共同任务, 与防治其他传染病一样, 要控制乙肝的传播和发病, 目前最有效的方法是接种乙肝疫苗. 由于新生儿乙肝传播已得到有效控制, 因此, 庄辉院士呼吁关注新生儿以外人群特别是重点及高危人群的乙肝免疫^[1], 国内外条件具备的地区(包括发展中国家)亦已实施对新生儿以外人群的免疫接种^[10]. 但由于常规免疫程序间隔时间太长而影响免疫效果^[8]. 本资料表明, 常规免疫程序接种乙肝疫苗者中, 未完成全程接种率为d 0, 7, 14程序的近10倍, 尤以非集体组织的个体接种者为著, 其中因间隔时间长忘记接种时间者占60%以上. 而d 0, 7, 14免疫程序时间短, 便于记忆, 易于接种者掌握. 这在国内外文献尚未见有与本接种间隔时间相同的方案报道. 而常规接种方案(0, 1, 6 mo)为世界卫生组织(WHO)早期推荐的主要是用于新生儿乙肝免疫接种的方案. 但对一些需快速或紧急免疫的高危人群如医务人员、将进入临床的医学生、执行特殊任务(维和等)很快即将出发且集体生活的团体如军人(武警)以及大量的流动人员等, 常规接种方案在时间上显然不适用. 本研究对象人员组成中, 组1与对照组接近(大部为军/高校学员), 与组2(实习医师、护士)亦接近, 故具可比性. 组3为混合人

群, 主要观察本方案对不同人群的免疫效果. 这些受试者中除普通、重点和高危人群外, 尚包括兼有而又不同于前述人群特点的需要快速免疫的特殊人群, 按常规方案不能使他们及时完成免疫. Chowdhury *et al*^[11]及Wang *et al*^[12]采用d 0, 30, 60方案接种乙肝疫苗, 结果血清抗-HBs阳转时间明显早于标准方案, GMT与标准方案接近. 认为d 0, 30, 60方案接种乙肝疫苗安全、效佳而实用. 而Nothdurft *et al*^[13]采用更快的免疫接种程序联合接种甲、乙肝疫苗, 结果亦表明, 快速程序接种乙肝疫苗后不但血清抗-HBs阳转出现早, 而且抗-HBs阳转率、有效保护率及GMT均不低于甚至略高于按标准方案接种的对照组. 认为该方案适用于紧急(last minute immunisation)免疫接种. Wright *et al*^[8]对无家可归的孤儿按该方案接种后收到同样效果, 而完成全程接种率约为标准方案的7倍. 表明不同的接种方案具有相同的免疫效果. 根据上述研究结果及免疫记忆和每次出现免疫反应的时间与再次接触抗原间隔时间越短相对越明显、越强烈的免疫特点, 结合本研究中部分人员即将执行特殊任务及新医学生即将进入临床等, 我们对其采用目前最快速的免疫方案紧急接种乙肝疫苗. 结果表明, 该程序无论对普通人群还是特殊人群(高危和重点人群)均表明为方便快捷, 总体效果好, 安全而实用的免疫方案, 更适合高危和那些住所不定、需紧急免疫的人群, 因而更贴近紧急免疫接种. 首针接种后12 mo血清阳转率组2高于组3和对照组, 24和36 mo组2仍较另3组为高, 可能与组2受试者整体年龄较其他组为轻, 反应更强有关. 而7和12 mo时段有效保护率对照组均高于另3组, 明显高于组3, 可能与组3中部分受试者年龄较大反应降低有关. 首针接种后除1, 3 mo外7-36 mo各时段血清抗-HBs GMT对照组均高于或明显高于另3组, 其差值与

■应用要点
本方案/程序接种乙肝疫苗剂量为20 μg(<12岁者10 μg), 因其方便快捷, 便于记忆, 将明显提高乙肝疫苗免疫覆盖率、全程接种完成率. 对我国乃至全人类乙肝免疫计划的实施和最终控制乙肝均有重要意义.

■名词解释

接种乙肝疫苗的标准/常规方案/程序：是WHO早年推荐的应用于新生儿乙肝免疫接种的初始方案，即mo 0, 1, 6方案。由于该方案间隔时间太长，近年来相继有学者推出较短程序的接种方案，如mo 0, 1, 4；mo 0, 1, 3和mo 0, 1, 2等方案，随接种间隔时间缩短而适用人群增多，亦更接近群体化。

两种方案接种的时间差相一致，表明d 0, 7, 14方案不仅保护性抗-HBs出现早，而且有效保护时间不短甚至稍长于标准方案。对此前按标准方案接种后无反应者该方案亦获得超过70%的血清抗-HBs阳转率，明显优于重复标准方案接种后11%的阳转率。按该方案免疫接种以来尚未发现明显不良反应或其他异常或意外，故可推荐作为大范围各类人群的常规免疫方案。鉴于d 0, 7, 14方案的总体优越性，有理由相信其应可取代标准方案。

目前在对大宗人群乙肝免疫中，各种免疫方案均可出现免疫失败。虽然d 0, 7, 14程序可使70%以上的无反应者出现血清抗-HBs阳转，但仍有约4%的受试者无反应，可能与个体对乙肝疫苗免疫应答差异有关。影响机体免疫应答的因素较多，除有某些(如免疫性)疾病患者外，即便在健康人群中，性别、年龄、个体组织相关抗原(HLA)复合体等位基因单体型差异^[9]及T辅助淋巴细胞功能^[14]等不同对接种后免疫应答均有一定影响。体外因素中，疫苗的种类^[15]、佐剂^[16]或免疫调节剂^[17]的应用、疫苗剂量、接种方法和程序^[11]等则有明显影响。此外，本资料还表明，家族中有/或配偶为HBV携带或乙肝患者对乙肝疫苗应答低下，尤其前者，其本人虽未感染HBV，但因其受遗传因素等影响，亦可能存在免疫功能异常^[18]，故需具体或特殊对待。

4 参考文献

- 1 庄辉. 加强对新生儿以外人群乙型肝炎疫苗免疫. 中华流行病学杂志 2004; 25: 376
- 2 Jacobs RJ, Meyerhoff AS. Effect of middle school entry requirements on hepatitis B vaccination coverage. *J Adolesc Health* 2004; 34: 420-423
- 3 Barata RB, de Moraes JC, Antonio PR, Dominguez M. Immunization coverage survey: empirical assessment of the cluster sampling method proposed by the World Health Organization. *Rev Panam Salud Publica* 2005; 17: 184-190
- 4 Skifte TB. Childcare immunization programme--to what extent are children covered by vaccinations in Greenland? *Int J Circumpolar Health* 2004; 63 Suppl 2: 252-255
- 5 白红英, 李建君, 宁德清. 2004年莱芜市高中新生HBV感染状况调查. 预防医学论坛 2005; 11: 441-442
- 6 Edstam JS, Dulmaa N, Nymadawa P, Rinchin A, Khulan J, Kimball AM. Comparison of hepatitis B vaccine coverage and effectiveness among urban and rural Mongolian 2-year-olds. *Prev Med* 2002; 34: 207-214
- 7 王镜泉, 郑能雄, 陈杨伟, 陈杨, 黄玲. 福州市1993-2003年病毒性肝炎发病趋势分析. 职业与健康 2004; 20: 97-98
- 8 Wright NM, Campbell TL, Tompkins CN. Comparison of conventional and accelerated hepatitis B immunisation schedules for homeless drug users. *Commun Dis Public Health* 2002; 5: 324-326
- 9 Das K, Gupta RK, Kumar V, Singh S, Kar P. Association of HLA phenotype with primary non-response to recombinant hepatitis B vaccine: a study from north India. *Trop Gastroenterol* 2004; 25: 113-115
- 10 Ghabouli MJ, Sabouri AH, Shoeibi N, Bajestan SN, Baradaran H. High seroprotection rate induced by intradermal administration of a recombinant hepatitis B vaccine in young healthy adults: comparison with standard intramuscular vaccination. *Eur J Epidemiol* 2004; 19: 871-875
- 11 Chowdhury A, Santra A, Habibullah CM, Khan AA, Karunakaramaiah J, Kishore TS, Raju AV, Lahiri S. Immune response to an indigenously developed r-hepatitis B vaccine in mixed population: study of an accelerated vaccination schedule. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1037-1039
- 12 Wang RX, Boland G, Guo Y, Lei SP, Yang CH, Chen J, Tian J, Wen JY, Du KH, van Hattum J, de Gast GC. Is a low dose of hepatitis B vaccine enough for a rapid vaccination scheme? *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2353-2355
- 13 Nothdurft HD, Dietrich M, Zuckerman JN, Knobloch J, Kern P, Vollmar J, Sanger R. A new accelerated vaccination schedule for rapid protection against hepatitis A and B. *Vaccine* 2002; 20: 1157-1162
- 14 Elias F, Flo J, Rodriguez JM, De Nichilo A, Lopez RA, Zorzopoulos J, Nagle C, Lahoz M, Montaner A. PyNTTTTG prototype oligonucleotide IMT504 is a potent adjuvant for the recombinant hepatitis B vaccine that enhances the Th1 response. *Vaccine* 2005; 23: 3597-3603
- 15 Guan XJ, Guan XJ, Wu YZ, Jia ZC, Shi TD, Tang Y. Construction and characterization of an experimental ISCOMS-based hepatitis B polypeptide vaccine. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 294-297
- 16 Boland G, Beran J, Lievens M, Sasadeusz J, Dentico P, Nothdurft H, Zuckerman JN, Genton B, Steffen R, Loutan L, Van Hattum J, Stoffel M. Safety and immunogenicity profile of an experimental hepatitis B vaccine adjuvanted with AS04. *Vaccine* 2004; 23: 316-320
- 17 Wang KX, Zhang LH, Peng JL, Liang Y, Wang XF, Zhi H, Wang XX, Geng HX. Effect of liniment levamisole on cellular immune functions of patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7208-7210
- 18 Wang KX, Peng JL, Wang XF, Tian Y, Wang J, Li CP. Detection of T lymphocyte subsets and mIL-2R on surface of PBMC in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2017-2020

电编 张敏 编辑 潘伯荣

草酸铂及羟基喜树碱联合亚叶酸钙和氟尿嘧啶治疗进展期结直肠癌的比较

孙元珏, 赵晖, 郭跃武, 林峰, 蔡讯, 唐晓春, 汤丽娜, 姚阳

孙元珏, 赵晖, 郭跃武, 林峰, 蔡讯, 唐晓春, 汤丽娜, 姚阳, 上海交通大学附属第六人民医院肿瘤内科 上海市 200233

孙元珏, 1998年上海医科大学本科毕业, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤的内科治疗研究。

通讯作者: 姚阳, 200233, 上海市徐汇区宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院肿瘤内科. yangyao_6@hotmail.com

电话: 021-64369181-8850

收稿日期: 2006-03-09 接受日期: 2006-04-30

Clinical study on combined chemotherapy of oxaliplatin or hydroxycamptothecine plus 5-fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer

Yuan-Jue Sun, Hui Zhao, Yao-Wu Guo, Feng Lin, Xun Cai, Xiao-Chun Tang, Li-Na Tang, Yang Yao

Yuan-Jue Sun, Hui Zhao, Yao-Wu Guo, Feng Lin, Xun Cai, Xiao-Chun Tang, Li-Na Tang, Yang Yao, Department of Medical Oncology, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Dr. Yang Yao, Department of Medical Oncology, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. yangyao_6@hotmail.com

Received: 2006-03-09 Accepted: 2006-04-30

Abstract

AIM: To evaluate the short-time efficacy, side effects, survival of combined chemotherapy of oxaliplatin or hydroxycamptothecine plus 5-fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer.

METHODS: Sixty patients with advanced colorectal cancer confirmed by pathology were included in this study. The patients in group A ($n = 40$) received oxaliplatin plus 5-fluorouracil and leucovorin, and those in group B ($n = 20$) were treated with hydroxycamptothecine plus 5-fluorouracil and leucovorin. Both regimens had 21-day cycle, i.e., the treatment was repeated once every 3 wk and the side effects were evaluated. The efficacy was estimated two or three cycles after chemotherapy.

RESULTS: The efficacy rates were 30.0% (12/40) and 25.0% (5/20) in group A and B, respectively,

and there was no significant difference between them ($\chi^2 = 0.531, P = 0.811$). The 1-year survival rates (34.09% vs 38.55%, $u = 0.3275, P > 0.05$), median progression-free survival time (6.4 mo vs 7.3 mo, $u = 1.5088, P > 0.05$), and median overall survival time (10.2 mo vs 10.8 mo, $u = 0.3487, P > 0.05$) were not markedly different between group A and B, neither. The major side effects of grade III and IV in both groups were myelosuppression and gastrointestinal reactions, and the incidence rate of diarrhea was significantly higher in group B than that in group A ($\chi^2 = 7.876, P = 0.044$).

CONCLUSION: The efficacy is almost equal between combined chemotherapy of oxaliplatin or hydroxycamptothecine plus 5-fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer. Peripheral neuropathy appears more as the former is used, while diarrhea has a higher frequency as the latter is used.

Key Words: Oxaliplatin; Hydroxycamptothecine; 5-fluorouracil; Colorectal cancer

Sun YJ, Zhao H, Guo YW, Lin F, Cai X, Tang XC, Tang LN, Yao Y. Clinical study on combined chemotherapy of oxaliplatin or hydroxycamptothecine plus 5-fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1889-1894

摘要

目的: 比较草酸铂及羟基喜树碱联合亚叶酸钙、氟尿嘧啶治疗进展期结直肠癌的近期疗效、不良反应和生存期。

方法: 经病理证实的进展期结直肠癌病例60例, 40例(OLF组)采用草酸铂联合亚叶酸钙和氟尿嘧啶方案化疗92个周期, 20例(HLF组)采用羟基喜树碱联合亚叶酸钙和氟尿嘧啶方案化疗40个周期, 观察化疗不良反应, 2-3周期后评价疗效, 随访观察无疾病进展生存期、总生存期, 统计1 a生存率。

结果: OLF和HLF组近期有效率分别为

■背景资料

目前, 结直肠癌以FOLFOX或FOLFIRI作为一线化疗方案, 寻找安全、有效、符合我国国情的二线方案是摆在每个临床医师面前的一大课题。羟基喜树碱是我国自主研发的一种有效抗癌药物, 与伊立替康同为拓扑异构酶I(TOPO I)抑制剂, 但伊立替康非医保用药, 价格昂贵, 故如何充分发挥羟基喜树碱的作用在我国更有现实意义。拓扑异构酶I是抗肿瘤药物作用的新靶点, 文献报道羟基喜树碱对结直肠癌细胞有抗肿瘤活性, 促进肿瘤细胞凋亡, 抑制血管生成, 下调PCNA、上调野生型p53的表达, 其与5-FU合用对结直肠癌细胞有协同抑制作用, 可能会提高结直肠癌化疗疗效。故含羟基喜树碱的化疗方案目前已广泛应用于包括消化道肿瘤在内的许多常见肿瘤的治疗。

■同行评价

本文比较草酸铂及羟基喜树碱联合亚叶酸钙、氟尿嘧啶治疗进展期结直肠癌的近期疗效、不良反应和生存期,发现OLF和HLF两方案治疗进展期结直肠癌疗效相似,前者外周神经毒性较常见,后者腹泻更常见。文中针对铂类药物化疗引起的周围神经毒性提出了自己的预防手段,具有一定的意义。

30.0%(12/40)和25.0%(5/20),无统计学差异($\chi^2 = 0.531, P = 0.811$);中位无疾病进展生存期分别为6.4和7.3 mo,无统计学差异($u = 1.5088, P > 0.05$);中位总生存期分别为10.2和10.8 mo,无统计学差异($u = 0.3487, P > 0.05$);1 a生存率分别为34.09%和38.55%,无统计学差异($u = 0.3275, P > 0.05$)。两组间Ⅲ、Ⅳ度不良反应均以骨髓抑制和消化道反应为主,其中腹泻发生率HLF组高于OLF组,有统计学差异($\chi^2 = 7.876, P = 0.044$)。

结论: OLF和HLF两方案治疗进展期结直肠癌疗效相似,前者外周神经毒性较常见,后者腹泻更常见。

关键词: 草酸铂; 羟基喜树碱; 5-氟尿嘧啶; 结直肠癌

孙元珏,赵晖,郭跃武,林峰,蔡讯,唐晓春,汤丽娜,姚阳.草酸铂及羟基喜树碱联合亚叶酸钙和氟尿嘧啶治疗进展期结直肠癌的比较.世界华人消化杂志 2006;14(19):1889-1894
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1889.asp>

0 引言

结直肠癌的发病率占欧美国家恶性肿瘤发病率第1-2位,在我国占第4-6位,并呈逐年上升的趋势,约50%患者术后5 a内复发^[1]。对于进展期结直肠癌患者,化疗是其延长生存期、缓解并发症最有效的手段。目前,结直肠癌以FOLFOX或FOLFIRI作为一线化疗方案,而作为二线方案治疗进展期结直肠癌,有效率仅分别为21.1%和14.1%^[2-3]。羟基喜树碱是我国研发的一种有效治疗结直肠癌的药物,与伊立替康同为拓扑异构酶 I (topoisomerase I, TOPO I)抑制剂。2002-01/2005-05,我们应用草酸铂及羟基喜树碱联合亚叶酸钙和氟尿嘧啶分别治疗进展期结直肠癌40例和20例,对其近期疗效、主要不良反应进行评价,并进行了生存分析,如下。

1 材料和方法

1.1 材料 病理学检查证实为结直肠癌,治疗前血象、肝肾功能及心电图均正常,无心、脑及周围神经系统疾病, KPS评分≥60分,预计生存期≥3 mo,入组前1 mo以上未进行任何抗肿瘤治疗的患者60例。OLF组40例,男15例,女25例,年龄36-78(平均55.0,中位55.9)岁。结肠癌25例,直肠癌15例,病理均为腺癌。初治15例,复治25例,初治者确诊时均已出现远处转移,复治者均为手术、辅助化疗后出现病情进展。局部复发11例,远处转移29例,其中肝转移15例,肺转

表 1 OLF和HLF两组病例临床特点比较

临床特点	OLF (n = 40)	HLF (n = 20)
性别		
男	15	9
女	25	11
中位年龄 (岁)	55.00	58.50
结直肠癌		
结肠	25	12
直肠	15	8
临床分类		
局部复发	11	6
远处转移	29	14
既往治疗		
初治	15	6
复治	25	14
转移部位		
肝	15	5
肺	8	4
骨	2	-
肾上腺	-	1
盆腔	3	1
后腹膜淋巴结	5	1
肝+肺	-	1
肝+后腹膜淋巴结	-	1
KPS 90	4	3
80	8	5
70	23	8
60	5	4

移8例,骨转移2例,盆腔转移3例,后腹膜淋巴结转移5例(表1)。40例患者治疗前KPS 90分4例,80分8例,70分23例,60分5例。25例复治患者既往接受化疗2-8个周期不等,所有复治病例均接受过以5-FU为基础的化疗,主要有DDP+CF+5-FU方案6例,17周期;Vp-16+DDP+CF+5-FU方案9例,25周期;MMC+DDP+CF+5-FU方案16例,48周期;HCPT+CF+5-FU方案12例,32周期;HCPT+DDP+CF+5-FU方案15例,38周期;FOLFIRI方案9例,23周期。HLF组20例,男9例,女11例,年龄42-77(平均58.5,中位58.5)岁。结肠癌12例,直肠癌8例,病理均为腺癌。初治6例,复治14例。局部复发6例,远处转移14例,其中肝转移5例,肺转移4例,肾上腺、盆腔、后腹膜淋巴结、肝合并肺、肝合并后腹膜淋巴结转移均为1例。20例患者治疗前KPS 90分3例,80分5例,70分8例,60分4例(表1)。14例复治患者既往接受化疗3-9个周期,所有复治病例均接受过以5-FU为基础的化疗,主要有DDP+CF+5-FU方案

4例, 12周期; Vp-16+DDP+CF+5-FU方案3例, 9周期; MMC+DDP+CF+5-FU方案11例, 30周期; FOLFOX方案9例, 24周期。草酸铂(商品名: 艾恒)由江苏连云港恒瑞医药股份有限公司生产, 羟基喜树碱(商品名: 拓信)由广东深圳万乐药业有限公司生产, 亚叶酸钙(商品名: 法益宁)由美国辉瑞药厂生产。

1.2 方法 草酸铂 $130 \text{ mg}/\text{m}^2$ +葡萄糖水 500 mL , 滴注2 h, 第1天; 羟基喜树碱 $6 \text{ mg}/\text{m}^2$ +生理盐水 250 mL , 静脉滴注2 h, 第1-4天; 亚叶酸钙 300 mg +生理盐水 250 mL , 滴注2 h, 第1-5天, 每天1次, 首次于草酸铂后给药; 5-氟尿嘧啶 500 mg +生理盐水 500 mL , 连续滴注6-8 h, 第1-5天, 每天1次, 每次均于亚叶酸钙后给药。在使用草酸铂前1 d及当天, 预防性静脉滴注葡萄糖酸钙、硫酸镁各1 g, 以减轻神经毒性。化疗方案21 d后重复应用, 如前一周期化疗出现III度或以上毒性反应, 下周期草酸铂剂量减至 $100 \text{ mg}/\text{m}^2$ 第1天, 羟基喜树碱和5-氟尿嘧啶化疗时间缩短1 d。按照WHO实体瘤近期疗效评价标准, 分为完全缓解(CR), 部分缓解(PR), 稳定(SD), 进展(PD); 按WHO抗肿瘤药物毒性反应(0-IV度)评定不良反应^[4]。第1周期化疗前1 wk以内及第2周期化疗结束后均行CT检查, 分别测量并记录各病灶的大小, 评价为CR和PR者4 wk后用相同方法确认。同时进行KPS评分比较, 比较治疗对体力状况的影响, 评定标准为KPS增加 ≥ 20 分为显著改善, 增加 ≥ 10 分为改善, 无增减者为稳定, 减少 ≥ 10 分为减退。每例每个化疗周期后均评定不良反应。

统计学处理 使用SPSS 13.0统计软件进行分析。计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 近期疗效 OLF组40例患者共化疗92个周期, 28例化疗2周期, 12例化疗3周期后进行疗效评价。40例患者近期总有效率为30.0%, 初治与复治病例有效率分别为53.3%和16.0%, 疗效比较有统计学差异($\chi^2 = 6.492, P = 0.038$)(表2); 局部复发与远处转移病例有效率分别为54.5%和20.7%, 疗效比较无统计学差异($\chi^2 = 4.401, P = 0.096$)(表2)。KPS显著改善5例(12.5%)、改善11例(27.5%)、稳定18例(45.0%)、减退6例(15.0%)。16例患者合并腹痛或/和骨痛, 化疗后疼痛不同程度减轻11例(68.8%); 肠梗阻者7例, 症状改善5例(71.4%), 疗效均维持4 wk以上。

表 2 OLF和HLF两组组内治疗疗效比较

	Total	CR	PR	SD	PD	CR+PR(%)	χ^2	P
OLF	局部复发	11	0	6	3	2	54.5	4.401 0.096
	远处转移	29	0	6	17	6	20.7	
	初治	15	0	8	6	1	53.3	
	复治	25	0	4	14	7	16.0	
HLF	局部复发	6	0	1	4	1	16.7	0.553 1.000
	远处转移	14	0	4	8	2	28.6	
	初治	6	0	3	3	0	50.0	
	复治	14	0	2	9	3	14.3	

表 3 OLF和HLF两组组间治疗疗效比较

	Total	CR	PR	SD	PD	CR+PR(%)	χ^2	P
总体	OLF	40	0	12	20	8	30.0	0.531 0.811
	HLF	20	0	5	12	3	25.0	
局部	OLF	11	0	6	3	2	54.5	2.768 0.432
	HLF	6	0	1	4	1	16.7	
复发	OLF	29	0	6	17	6	20.7	0.540 0.822
	HLF	14	0	4	8	2	28.6	
初治	OLF	15	0	8	6	1	53.3	0.682 1.000
	HLF	6	0	3	3	0	50.0	
复治	OLF	25	0	4	14	7	16.0	0.352 0.897
	HLF	14	0	2	9	3	14.3	

表 4 OLF和HLF两组KPS变化比较

KPS	总数	显著改善	改善	稳定	减退	χ^2	P
OLF	40	5(12.5)	11(27.5)	18(45.0)	6(15.0)	0.452 0.957	
HLF	20	2(10.0)	5(25.0)	9(45.0)	4(20.0)		

HLF组20例患者共化疗40个周期, 均化疗2周期后进行疗效评价。20例患者近期总有效率为25.0%, 初治与复治病例有效率分别为50.0%和14.3%, 局部复发与远处转移病例有效率分别为16.7%和28.6%, 疗效比较均无统计学差异(表2)。KPS显著改善2例(10.0%)、改善5例(25.0%)、稳定9例(45.0%)、减退4例(20.0%)。11例患者合并腹痛, 化疗后疼痛不同程度减轻7例(63.6%); 肠梗阻者3例, 症状改善2例(66.7%), 疗效均维持4 wk以上。在总有效率、初治与复治、局部复发与远处转移、KPS改变方面, OLF组和HLF组之间经 χ^2 检验均无统计学差异(表3-4)。

2.2 不良反应 OLF组40例患者共进行92个周期化疗, 主要不良反应为骨髓抑制和消化道反应(表5)。出现白细胞下降最早和最迟分别是化疗

表 5 OLF和HLF两组不良反应比较

	OLF (92cycles)						HLF (40cycles)						χ^2	P
	0	I	II	III	IV	III + IV (%)	0	I	II	III	IV	III + IV (%)		
粒细胞减少	31	32	15	8	6	14(23.0)	10	13	9	6	2	8(26.7)	1.520	0.847
贫血	66	16	10	0	0	0(0)	28	8	4	0	0	0(0)	0.170	0.954
血小板下降	79	8	5	0	0	0(0)	32	5	3	0	0	0(0)	0.468	0.798
恶心、呕吐	27	33	20	12	0	12(18.5)	6	18	10	6	0	6(17.6)	0.338	0.977
腹泻	57	16	11	8	0	8(22.9)	12	14	9	5	0	5(17.9)	7.876	0.044
外周神经毒性	73	14	5	0	0	0(0)	0	0	0	0	0	0(0)	-	-

结束后1和5 d, 最低点时间最早出现于化疗结束后3 d, 最迟在10 d, 71.6%的患者白细胞降至最低点时间于化疗结束后8 d. 出现II度及以上骨髓抑制者, 均以予粒细胞集落刺激因子治疗. 恶心、呕吐以I、II度不良反应为主, 出现时间最早和最迟分别是化疗开始当天和4 d. 腹泻最早和最迟分别出现于化疗开始后3 d和8 d. 腹泻患者合并白细胞下降27周期, 占77.1% (27/35), 其中I-II度骨髓抑制15个周期, III-IV度为12个周期. 8个III度腹泻周期中有3个周期(37.5%)合并III度骨髓抑制, 4个周期(50.0%)合并IV度骨髓抑制. 5个和3个化疗周期分别出现了一过性肝或肾功能异常, 19个周期出现周围神经不良反应, 不良反应均为I-II度. HLF 20例患者共化疗40个周期, 主要不良反应也为骨髓抑制和消化道反应(表5). 出现白细胞下降最早和最迟分别是化疗结束后1 d和4 d, 最低点时间最早出现于化疗结束后2 d, 最迟在8 d, 73.4%的患者白细胞降至最低点时间于化疗结束后6 d. 出现II度及以上骨髓抑制者, 均以予粒细胞集落刺激因子治疗. 恶心、呕吐以I, II度不良反应为主, 出现时间最早和最迟分别是化疗开始2 d和6 d. 腹泻最早和最迟分别出现于化疗开始后2 d和10 d. 腹泻患者合并白细胞下降22周期, 占78.6% (22/28), 其中I-II度骨髓抑制13个周期, III-IV度为6个周期. 5个III度腹泻周期中有3个周期(60.0%)合并III度骨髓抑制, 2个周期(40.0%)合并IV度骨髓抑制. 11个和2个化疗周期分别出现了一过性肝或肾功能异常, 无病例出现周围神经毒性反应. OLF和HLF两组病例腹泻发生率分别为38.0%和70.0%, 经 χ^2 检验 $P<0.05$, 有统计学差异, 其他化疗不良反应均无统计学差异(表5).

2.3 生存分析 OLF组40个可评价疗效的病例中, 随访38人, 失访2人; HLF组20个可评价疗效的病

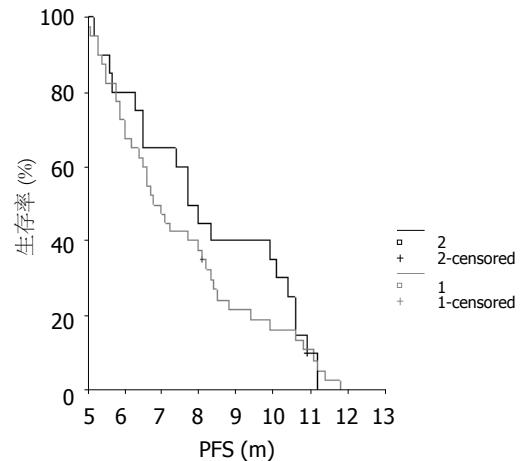


图 1 OLF和HLF两组PFS. 1: OLF组; 2: HLF组.

例中, 随访19人, 失访1人(图1-2). OLF和HLF两组病例PFS, OS经Log-Rank检验(表6), 平均PFS, 中位PFS, 平均OS, 中位OS以及1 a生存率经 μ 检验^[5], 均无统计学差异(表7).

3 讨论

L-OHP是第三代铂类药物, 与DNA结合后形成的N-Pt-N结合物可导致DNA立体障碍和扭曲, 从而能更有效地阻止DNA合成和修复, 导致细胞死亡. 与前二代铂类药物相比, L-OHP与DNA结合速率较顺铂快10倍以上, 亦无完全交叉耐药^[6]. L-OHP的剂量与转移性结直肠癌化疗有效率和PFS显著相关^[7]. TOPO I是细胞增殖过程中必不可少的酶, 也是抗肿瘤药物作用的新靶点. 结直肠癌对HCPT原发耐药达32.4%, 并易产生获得性耐药, 可能与肠癌组织中拓扑异构酶高表达有关. HCPT与TOPO I及切口的DNA结合形成三联复合物, 在DNA复制时导致双链断裂, 复制停止. 由于HCPT的作用机制与其他抗肿瘤药物不同, 不易形成交叉耐药, 理论上对耐药的肿瘤细胞有效^[8-9]. 文献报道喜树碱类药

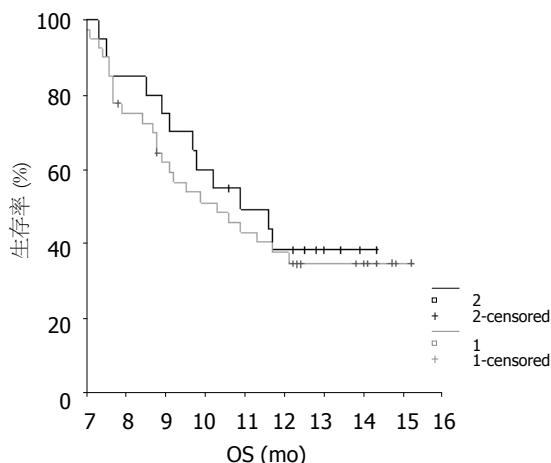


图 2 OLF和HLF两组OS. 1: OLF组; 2: HLF组.

物对结直肠癌细胞有抗肿瘤活性^[10], HCPT通过抑制TOPO I 促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤生长^[11], HCPT可抑制血管生成^[12], HCPT通过下调PCNA、上调野生型P53的表达对人肝癌HepG2细胞产生诱导分化作用^[9]. 结直肠癌细胞对HCPT单药或与5-FU合用的敏感性与P-糖蛋白表达无明显相关性^[13]. HCPT与5-FU合用对结直肠癌细胞有协同抑制作用^[14-15], 可能会提高结直肠癌化疗疗效.

目前, Tournigand *et al*^[15-16]用FOLFOX和FOLFIRI方案一线治疗结直肠癌, 有效率分别为54%和56%, 二线治疗有效率分别为15%和4%, CPT-11治疗失败后FOLFOX是可行的二线化疗方案^[17]. 国内张开芳^[18]用OLF方案治疗30例晚期大肠癌, 总有效率为36.7%, 初复治病例有效率分别为45.5%和31.6%. 陆建伟 *et al*^[19]用HLF方案治疗晚期大肠癌有效率为36.8%. 杨家梅 *et al*^[20]对21例用5-FU/CF方案化疗疗效未达到PR的病例加用HCPT后, 有效率仍有14%. 赵雷 *et al*^[21]用OLF和HLF方案各治疗30例晚期大肠癌, 总有效率分别为36.7%和13.3%, 差异有统计学意义. 我们应用OLF和HLF方案分别治疗40和20例进展期结直肠癌病例, 总有效率分别为30.0%和25.0%, 与上述报道相比, OLF方案疗效略低, HLF方案疗效较好, 二组总有效率以及初复治有效率均相似, 差异无统计学意义. 我们分析上述差异可能与同种药物选择的生产厂家以及初复治患者所占比例不同, 部分存在多器官转移等因素有关. 两化疔方案总体疗效和生存期相似, 均无统计学差异. 此外, 两化疔方案对KPS和晚期大肠癌临床症状、并发症的改善均有帮助, 提高了患者的生活质量. 两组病例主

表 6 OLF和HLF两组PFS、OS Log-Rank检验比较

生存期	组别	范围	Log-Rank Test	P
PFS (m)	OLF	4.6–11.4	0.533	0.465
	HLF	4.8–10.8		
OS (m)	OLF	6.9–15.1	0.250	0.615
	HLF	7.2–14.2		

表 7 OLF和HLF两组PFS、OS u检验比较

生存期	OLF	HLF	u	P
PFS (m)	平均	7.1	7.9	1.2248 >0.05
	95%CI	6.5–7.8	6.9–8.8	
	中位	6.4	7.3	1.5088 >0.05
OS (m)	平均	11.0	11.2	0.2561 >0.05
	95%CI	10.0–12.1	10.1–12.4	
	中位	10.2	10.8	0.3487 >0.05
1 a生存率	95%CI	8.2–12.2	8.0–13.6	
		34.09%	38.55%	0.3275 >0.05

要不良反应是血液学毒性和胃肠道反应. OLF组白细胞数下降发生率为66.3% (61/92周期), 其中III-IV度下降占23.0% (14/61周期); 恶心、呕吐发生率为70.7% (65/92周期), 其中III-IV度不良反应占18.5% (12/65周期); 腹泻发生率38.0% (35/92周期), 其中III-IV度不良反应占22.9% (8/35周期), 均高于赵雷 *et al*^[21]报道的结果; 外周神经毒性发生率20.7% (19/92周期), 无III-IV度不良反应, 低于张开芳^[18]和赵雷 *et al*^[21]报道的结果, 可能与我们在使用草酸铂前1 d及当天, 预防性静脉滴注葡萄糖酸钙、硫酸镁各1 g, 以减轻神经毒性有关^[22]. HLF组白细胞数下降发生率为75.0% (30/40周期), 其中III-IV度下降占26.7% (8/30周期); 恶心、呕吐发生率为85.0% (34/40周期), 其中III-IV度不良反应占17.6% (6/34周期); 腹泻发生率70.0% (28/40周期), 其中III-IV度不良反应占17.9% (5/28周期), 均高于杨家梅 *et al*^[20]和赵雷 *et al*^[21]报道的结果, 无外周神经毒性发生. 我们分析可能与我们选用的HCPT为粉针剂, 纯度较水针剂高, 其单位标示量中所含HCPT较高有关^[23]. 两组病例白细胞下降最低点出现在化疗后2-10 d, 我们建议对基础血象偏低、年龄偏大、前一化疗周期出现II度及II度以上白细胞下降的患者, 化疗结束后1 d开始隔日复查血象, 若发现白细胞出现下降趋势, 应及

时予G-CSF升白治疗。如化疗期间出现腹泻，便次每日超过3次，应暂停化疗，难以控制的III度及以上腹泻应终止化疗，及时采取止泻、抗感染、防治水、电解质和酸碱平衡紊乱治疗。应该注意的是，两组出现腹泻病例中合并骨髓抑制率均大于70.0%，腹泻的原因虽与肠黏膜受损有关，但是重度白细胞下降常常紧随其后。我们建议一旦出现III度及以上腹泻，除采用常规治疗措施外，年老体弱患者可预防性应用G-CSF。

总之，OLF和HLF两方案对进展期结直肠癌疗效肯定，疗效无统计学差异，并有助于改善患者的生活质量。可作为含DDP, 5-FU, MMC, Vp-16等药物的联合方案化疗失败的二线补救治疗措施，也可分别选作FOLFIRI和FOLFOX方案化疗后疾病进展的后续治疗。OLF方案外周神经毒性较常见，预防性补充钙、镁后未见严重不良反应，HLF方案腹泻更常见，血液学毒性二者相似。严格掌握化疗适应证，积极防治化疗后骨髓抑制和腹泻是保证医疗安全的关键。

4 参考文献

- 1 姚阳. 恶性肿瘤的诊断与综合治疗. 上海: 复旦大学出版社, 2005: 316
- 2 Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, Berlin JD, Marshall JL, Ramanathan RK, Hart LL, Gupta S, Garay CA, Burger BG, Le Bail N, Haller DG. Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2059-2069
- 3 Rougier P, Lepille D, Bennouna J, Marre A, Ducreux M, Mignot L, Hua A, Mery-Mignard D. Antitumour activity of three second-line treatment combinations in patients with metastatic colorectal cancer after optimal 5-FU regimen failure: a randomised, multicentre phase II study. *Ann Oncol* 2002; 13: 1558-1567
- 4 Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981; 47: 207-214
- 5 项永兵. 肿瘤登记资料的统计分析. 中国肿瘤 2001; 10: 255-257
- 6 O'Dwyer PJ, Johnson SW. Current status of oxaliplatin in colorectal cancer. *Semin Oncol* 2003; 30: 78-87
- 7 Maindrault-Goebel F, de Gramont A, Louvet C, Andre T, Carola E, Gilles V, Lotz JP, Tournigand C, Mabro M, Molitor JL, Artru P, Izrael V, Krulik M. Evaluation of oxaliplatin dose intensity in bimonthly leucovorin and 48-hour 5-fluorouracil continuous infusion regimens (FOLFOX) in pretreated metastatic colorectal cancer. *Oncology Multidisciplinary Research Group (GERCOR). Ann Oncol* 2000; 11: 1477-1483
- 8 Zhang R, Li Y, Cai Q, Liu T, Sun H, Chambliss B. Preclinical pharmacology of the natural product anticancer agent 10-hydroxycamptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 41: 257-267
- 9 Zhang XW, Jiang JF, Xu B. Differentiation-inducing action of 10-hydroxycamptothecin on human hepatoma Hep G2 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21: 364-368
- 10 Driver RW, Yang LX. Synthesis and pharmacology of new camptothecin drugs. *Mini Rev Med Chem* 2005; 5: 425-439
- 11 Cho YS, Cho-Chung YS. Antisense protein kinase A RIalpha acts synergistically with hydroxycamptothecin to inhibit growth and induce apoptosis in human cancer cells: molecular basis for combinatorial therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1171-1178
- 12 Xiao D, Tan W, Li M, Ding J. Antiangiogenic potential of 10-hydroxycamptothecin. *Life Sci* 2001; 69: 1619-1628
- 13 刘细平, 王严庆, 汤为学. 大肠癌对顺铂、5-氟尿嘧啶、羟基喜树碱的敏感性与P-糖蛋白表达的研究. 重庆医学 2003; 32: 152-154
- 14 刘键, 胥彬. 羟基喜树碱类药物作用机制及在合并治疗中机理的研究. 中国肿瘤临床 1998; 25: 389-392
- 15 Tournigand C, Louvet C, Quinaux E, Andre T, Lledo G, Flesch M, Ganem G, Landi B, Colin P, Denet C, Mery-Mignard D, Risso ML, Buyse M, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX Versus FOLFOX Followed by FOLFIRI in Metastatic Colorectal Cancer (MCRC): Final Results of a Phase III Study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 124a
- 16 Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 229-237
- 17 Park SH, Sung JY, Han SH, Baek JH, Oh JH, Bang SM, Cho EK, Shin DB, Lee JH. Oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (FOLFOX-4) combination chemotherapy as second-line treatment in advanced colorectal cancer patients with irinotecan failure: a Korean single-center experience. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 531-535
- 18 张开芳. 草酸铂联合亚叶酸钙及5-氟尿嘧啶治疗晚期大肠癌30例临床观察. 河南肿瘤学杂志 2003; 16: 436-437
- 19 陆建伟, 黄富麟, 郑秀立, 冯继峰. 含羟基喜树碱联合治疗方案治疗晚期胃肠道癌临床观察. 中国肿瘤临床 1998; 25: 232-235
- 20 杨家梅, 李苏宜, 李英昭, 李海峰, 刘萍. 难治性晚期大肠癌加用羟基喜树碱治疗21例疗效及毒性分析. 中国肿瘤临床 1999; 26: 853-855
- 21 赵雷, 钟立松, 陈兆红. 以奥沙利铂和以羟基喜树碱为主方案治疗晚期大肠癌的疗效观察. 华西医学 2003; 18: 551
- 22 杨润祥, 马飞. 奥沙利铂的神经毒性及其防治. 中国医学文摘·肿瘤学 2005; 19: 248-249
- 23 黄慧强, 姜文奇, 胡晓桦, 林旭滨, 刘魁凤, 李宇红, 林忠, 申维玺, 陈强, 何友兼, 管忠震. 羟基喜树碱冻干粉针(拓倍)单药治疗晚期恶性肿瘤临床研究的初步报告. 癌症 2003; 22: 1334-1338



食管癌染色体畸变及其研究方法进展

陈玲, 李锋

陈玲, 李锋, 石河子大学医学院病理教研室, 石河子大学新疆地方与民族高发病省部共建教育部重点实验室 新疆维吾尔自治区石河子市 832002
科技部973重大基础研究前期研究专项, No. 2005CCA03700
教育部科学技术研究重点项目, No.206167
通讯作者: 李锋, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆石河子大学医学院病理教研室. Lifeng7855@yahoo.com.cn
电话: 0993-2057125
收稿日期: 2006-03-27 接受日期: 2006-04-17

摘要

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 主要有食管鳞癌和食管腺癌两种形式。细胞遗传学研究表明食管癌可出现多种多样的染色体异常, 但迄今为止还未发现特征性的染色体改变。食管癌染色体异常包括数目异常和易位、扩增、缺失及环状染色体等结构异常。研究食管癌染色体畸变的方法主要有常规细胞遗传学、FISH、CGH等。现就食管癌的染色体畸变及其相关的研究方法予以综述。

关键词: 食管癌; 染色体畸变; 研究方法

陈玲, 李锋. 食管癌染色体畸变及其研究方法进展. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1895-1899
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1895.asp>

0 引言

食管癌是人类最常见的消化道恶性肿瘤之一, 以食管鳞癌和食管腺癌两种病理类型为主。东方人群以食管鳞癌为主, 而西方人群则以食管腺癌多见。在我国, 食管鳞癌占食管恶性肿瘤的89%。近年来对食管癌病因、发病机制等方面的大研究表明, 其发生具有家族聚集性、种族差异性、性别差异性等特点, 提示遗传因素在食管癌中发挥着重要作用。但和其他实体瘤一样, 食管癌的发生仍然是一个多因素、多阶段、多基因参与的复杂过程^[1]。多项研究表明, 食管癌的发生和演变涉及多种染色体的异常, 对食管癌染色体畸变的研究将为其易感基因筛选提供定位资料, 同时有助于肿瘤的早期诊断及预后判断。近年来, 对食管癌染色体的研究, 不管是在常规的核型分析上, 还是在分子遗传学新技术的应用上, 都有了长足的发展。

1 食管癌细胞的染色体畸变

1.1 食管癌细胞染色体数目异常 1914年, Boveri提出了细胞内染色质含量不平衡是癌变过程中最原始的变化。现在看来这种观点并非完全正确, 但染色体畸变在肿瘤癌变过程中确实起了很重要的作用, 某些畸变甚至起决定性的作用。国内外有关食管癌染色体方面的研究显示, 几乎所有食管癌的发生都有染色体数目的改变, 而且变化范围大^[2], 多在超二倍体和近四倍体之间。其中以Y染色体丢失最为多见, 无论是对食管鳞癌还是对食管腺癌的研究中均有发现。Hunter *et al*^[3]用Y染色体探针在各种实体瘤的石蜡包埋组织切片上进行原位杂交, 也发现食管癌中Y染色体丢失率很高, 其中腺癌占93%, 鳞癌占62%。然而, 有关Y染色体丢失与食管癌关系的报道结论不一。目前认为Y染色体主要含有重复序列的异染色质, 只携带少数基因, 如性别决定因子基因或睾丸决定因子、Y连锁的组织相容性抗原基因等。因此有研究者认为Y染色体丢失与体外培养有关^[4]; 但另有观点认为Y染色体的丢失与食管鳞状上皮的生物学行为无关, 而与其恶性表型有关^[5]。

1.2 食管癌细胞染色体结构异常 食管癌染色体的结构畸变极为复杂。对食管癌旁黏膜原代培养的研究发现, 食管上皮癌变早期的细胞染色体就存在易位、倒位、缺失、断裂及衍生染色体和均染区等现象。对食管癌SLMT1细胞系的研究^[6]发现, 除了在数目上表现为非整倍体外, 结构畸变主要集中在1, 3, 5, 8, 9, 10和14号染色体上, 此外亦可见到等臂染色体。其中5p扩增在食管癌中最为常见^[7-9]。有研究者用多变点量分析提示: 5p15扩增可以作为判断食管癌不良预后的独立指标^[10], 这一区域包含的候选基因有cyclinA, 前列腺素受体(PTGER2)。在对3个食管癌细胞系(HKESC-1, 2, 3)^[11-12]的研究中发现染色体1p32, 3p14, 6q16, 6q21, 7q22, 7q34, 8p21, 9q34, 13q32, 17q25和20q13出现频繁的断点, 而这些断点可能涉及到食管癌相关的癌基因或抑癌基因。对细胞系的研究, 虽然能反应一些癌细

■背景资料

染色体畸变可以反映肿瘤在基因组水平的改变, 运用细胞和分子遗传学方法对食管癌染色体畸变进行研究将有助于阐明其发病机制, 也为易感基因筛选提供定位资料, 同时有助于肿瘤的早期诊断及预后判断。

■研发前沿

在肿瘤研究中, FISH, CGH等分子细胞遗传学技术可用于分析肿瘤细胞中复杂的染色体组成, 定位癌基因和抑癌基因, 这些技术已被用于寻找特异的染色体畸变、筛选肿瘤易感基因及应用于肿瘤的临床诊断和预后判断等。

胞染色体特征性变化, 但在食管癌的培养过程中往往会出现一些继发性的染色体改变。因此食管癌细胞系的染色体变化不能完全代表食管癌的原始染色体改变。由于染色体标本制备困难, 关于原发性食管癌细胞遗传学研究方面的资料很少。Xiao *et al*在5例原代食管癌细胞中发现, 最常见的染色体改变涉及1, 3, 12号染色体, 尤其是12p缺失在所有的病例中都存在, 提示12号染色体可能含有食管癌特异遗传学改变。有趣的是, 另有研究却发现12p的扩增意味着食管癌切除术后生存率降低^[13]。对原发性食管癌进行研究^[14]发现, 其中4例的详细核型分析中总共有92个断点, 涉及到所有的染色体, 其中占优势的有1p11-q11, 3p10-p11, 5p11-q11, 8q10, 11q13, 14p11-q11以及21q10, 反复出现的结构畸变包括染色体均染区(Hsr)、等臂染色体和环状染色体。其中4例中有3例Hsr位于不同的染色体区域, 进一步用荧光原位杂交(FISH)研究发现其中有2例来源于11号染色体, 细胞周期素1(CCND1)可能就是11q13扩增的目的基因, 提示这一基因可能在食管癌变过程中起关键作用。另有研究表明染色体11q13扩增是食管癌变中最频繁的扩增位点^[15]。对河南原发性食管癌的比较基因组杂交研究发现, 染色体3q和8q扩增的频率最高, 3p丢失的频率最高^[16], 这与Wei *et al*^[17]对中国北部25例原发性食管癌患者的比较基因组杂交技术(CGH)结果一致。在中国食管癌杂合性缺失的研究表明, 3p的缺失可能与地理因素相关。

1.3 与病理分期和转移相关的染色体异常 研究表明, 染色体异常与临床病理分期有一定的关系。研究发现3pq, 5p, 1q, 11q13-14的染色体基因组扩增和4pq, 13q染色体基因组丢失与食管癌临床病理分期相关^[18-19], 其中3pq扩增常发生于食管癌的早期和晚期阶段, 提示3pq扩增可能在食管癌发生中起重要作用。在对食管癌淋巴结转移的研究中^[20]发现, 3p25, 6q21, 9q22.3-q31, 11q22-pter, 13q12-13, 18q23.3和19q的缺失以及8q23-pter, 20q的扩增与淋巴结转移相关, 其中河南林县转移性食管癌肿瘤细胞染色体畸变以6p, 20p的增加和10p, 10q的丢失为著。用CGH和FISH技术进一步证实, 20p和1q的扩增以及8p的丢失可能与食管癌转移及预后有关^[21-22]。另外, 5p15和14q21扩增与术后远处器官转移有关, 如位于5p远端的hTERT基因的表达与肺癌的预后不良密切相关^[23], 而其与食管癌预后的关系有待于进一步研究探讨。由于肿瘤染色体畸变复杂

多样, 不同研究者的研究结果通常不一致, 而且目前原发性染色体研究方面的报道还比较少, 所以要想确定其规律性染色体, 尚需进行大量的原发性食管癌的细胞遗传学研究。

2 检测食管癌染色体畸变的主要方法

2.1 食管癌的常规细胞遗传学 细胞遗传学方法在肿瘤等多种疾病的研究中发挥了很大的作用。经典细胞遗传学技术需具备足够的细胞分裂数和良好的中期染色体形态, 对血液肿瘤的诊断、判断预后和治疗效果起了重要的作用^[24], 但在实体瘤研究中的作用却相对有限^[25], 可能因为实体瘤组织培养, 染色体制备方面存在一定困难以及核型复杂, 继发性染色体变化多, 分析有一定难度。有不少肿瘤标本在核型分析中只见到正常分裂相, 而且还不确定这些正常的核型是否属于肿瘤细胞^[26]。迄今为止, 通过显带技术分析原发性食管癌染色体畸变的资料甚少, 胡楠 *et al*最早用G显带技术研究了30例食管癌患者外周血淋巴细胞染色体脆性部位, 显示fra9 (3p14), fra (16q22)和fra (8q22)的检出率最高。之后又陆续有人用该技术对食管癌细胞系和原发性食管癌的核型进行了一些分析。虽然G显带技术能从全基因组层面筛选畸变染色体, 但此技术检测到异常染色体实际上只是核型的部分, 许多染色体畸变仍无法鉴定。

2.2 FISH方法在食管癌中的应用 虽然常规细胞遗传学分析方法简单易行, 但仍有部分来源不明的标志染色体和复杂的染色体易位不易被诊断, 而FISH则提供了这样一个技术平台。FISH创建于1986年, 建立在荧光标记的DNA探针与肿瘤间期核或中期染色体杂交的基础上, 具有探针稳定、操作安全、可以快速多色显示多个不同探针的杂交信号等优点。根据所使用的探针类型不同, 可以将FISH技术分为着丝粒FISH (centromere-FISH)、端粒FISH、染色体涂染FISH (painting-FISH)、区带特异性FISH (locuspecific-FISH)以及结合显微切割技术发展起来的反义涂染FISH (reverse painting-FISH)等。其中着丝粒FISH主要用探针分析标本中间期核染色体数目的变化, 而端粒FISH则用于确定特定染色体数目和末端变化。涂染FISH中, 探针可以识别整条染色体或部分染色体(染色体臂或条带), 从而检测染色体数目改变或结构重排。区带特异性FISH则可检测复杂或隐匿的染色体变化。近十多年来, 荧光原位杂交技术不断发展, 在其基础

■相关报道

和血液系统肿瘤相比, 目前关于食管癌染色体畸变的相关报道还很少, 而且大多数报道都是用CGH的方法进行研究的。

上, 又发展了许多新技术, 包括多色荧光原位杂交(光谱染色体核型分析、多元荧光原位杂交、组合比率荧光原位杂交、着丝粒多元荧光原位杂交), 交叉物种彩色显带等。这些技术现在已成为了极其重要的研究染色体的方法^[27]。目前, FISH技术已广泛应用于肿瘤生物学, 核组成, 基因定位, 基因扩增等领域^[28-29]。Nakakuki *et al*^[30]用FISH检测食管癌细胞系, 发现18p存在Hsr方式的显著扩增, 进一步的筛选分析认为, YES1, HEC, TYMS, TGIF可能是18p11.3扩增的候选基因。另有研究者则通过FISH检测到DIS414至DIS2860间有一段最小的共同扩增区^[31], Southern和Northern印迹杂交表明, 定位于该区域的ATF3与CENPF基因有异常的改变。

2.3 CGH分析在食管癌中的应用 FISH技术的不足在于不能扫描整个基因组的染色体异常, 特别是在不能获得高质量的中期染色体时。由Kallioniemi *et al*^[32]首先报道的比较基因组杂交技术则突破了FISH的局限性, 只需抽提肿瘤组织和正常组织少量的基因组DNA, 分别用不同荧光染料标记后作为探针与正常人中期染色体杂交即可进行检测。该技术可以全面迅速地检测整个基因组DNA序列拷贝数的变化, 除了适用于新鲜组织, 对石蜡包埋的组织标本也同样可以进行分析。因而, CGH最适合于检测实体瘤和淋巴瘤等不易获得高质量染色体标本的疾病。关于食管癌比较基因组杂交的研究较多^[33-39]。研究发现, 在染色体3p, 5p, 7p, 8q和20q多见扩增, 而缺失则多发生于3p, 4p, 9q13和18p, 这些一致性的研究结果提示了食管癌癌变过程必须涉及的基因或染色体区域。不同实验组之间的差异可能反映了选择人群的差异性, 如北美人群中染色体缺失的频率明显高于扩增, 而日本、台湾等亚洲人群的扩增明显高于缺失。CGH技术虽有其独到之处, 但也有其缺陷, 只有当扩增的片段大于2 Mb, 缺失片段大于10 Mb才能被检测到, 难于确定扩增或缺失的基因。此外, CGH通常不能够提供DNA拷贝数的精确量, 研究的结果需要细致的解释。最近, 传统的CGH得到了全新的发展——array CGH^[40]。在array CGH中, 杂交靶点是DNA克隆, 因此阵列杂交显著提高了CGH的分辨率。

2.4 其他分子生物学方法 染色体异常改变的检测还常联合使用一些其他的分子生物学技术, 例如杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)^[41]和微阵列技术等。以上方法的联合使用能够更精

细的检测食管癌染色体的遗传学改变。

总之, 对食管癌染色体的研究中, 虽然已经认识到一些复杂的核型, 但其染色体突变致癌机制研究尚在起步之中。常规的细胞遗传学研究表明, 频繁丢失的出现说明该处可能存在与食管癌密切相关的抑癌基因, 对食管癌的产生起基础性的启动作用。就方法学而言, 常规的显带技术能够在单细胞水平对染色体的组成进行分析, 但由于实体瘤细胞的体外培养没有突破性的进展, 这就意味着不可能像研究血液系统肿瘤一样把他作为一种常规检测方法。因此, 传统的显带技术和一些新技术联合应用就显得尤为重要^[42]。M-FISH可以判断染色体易位和重排的来源, 间期核FISH和CGH可以检测肿瘤的遗传不平衡性, 以上技术的联合使用可以取长补短, 更深入的探寻食管癌染色体和癌基因的规律, 从而为食管癌的早期诊断、治疗和预后判断提供新的依据。

3 参考文献

- 1 Lehrbach DM, Nita ME, Cecconello I. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. *Arq Gastroenterol* 2003; 40: 256-261
- 2 Beuzen F, Dubois S, Flejou JF. Chromosomal numerical aberrations are frequent in oesophageal and gastric adenocarcinomas: a study using *in-situ* hybridization. *Histopathology* 2000; 37: 241-249
- 3 Hunter S, Gramlich T, Abbott K, Varma V. Y chromosome loss in esophageal carcinoma: an *in situ* hybridization study. *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 8: 172-177
- 4 Wang X, Xiao F, Wang M. Establishment of two human esophageal carcinoma cell lines and their cytogenetic analysis. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1998; 20: 5-8
- 5 Yamaki H, Sasano H, Ohashi Y, Shizawa S, Shineha R, Satomi S, Nagura H. Alteration of X and Y chromosomes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001; 21: 985-990
- 6 Tang JC, Wan TS, Wong N, Pang E, Lam KY, Law SY, Chow LM, Ma ES, Chan LC, Wong J, Srivastava G. Establishment and characterization of a new xenograft-derived human esophageal squamous cell carcinoma cell line SLMT-1 of Chinese origin. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 124: 36-41
- 7 Su M, Chin SF, Li XY, Fitzgerald RC. Comparative genomic hybridization of esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma cell lines. *Dis Esophagus* 2006; 19: 10-14
- 8 Xiao F, Wang X, Wang M, Guan X, Wu M. Molecular cytogenetic study on four human esophageal cancer cell lines. *Zhonghua Yixueyichuanxue Zazhi* 1998; 15: 75-77
- 9 Han Y, Wei F, Xu X, Cai Y, Chen B, Wang J, Xia S, Hu H, Huang X, Han Y, Wu M, Wang M. Establishment and comparative genomic hybridization analysis of human esophageal carcinomas cell line EC9706. *Zhonghua Yixueyichuanxue Zazhi* 2002; 19:

■创新盘点

本文系统的介绍了食管癌的染色体畸变及其相关的研究方法, 并对该领域的研究成果进行了归纳总结。

■应用要点

运用细胞和分子遗传学方法对食管癌染色体畸变进行研究将有助于阐明其发病机制,也为易感基因筛选提供定位资料,同时有助于肿瘤的早期诊断及预后判断。

- 455-457
10 Ueno T, Tangoku A, Yoshino S, Abe T, Toshimitsu H, Furuya T, Kawauchi S, Oga A, Oka M, Sasaki K. Gain of 5p15 detected by comparative genomic hybridization as an independent marker of poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 526-533
- 11 Hu Y, Lam KY, Wan TS, Fang W, Ma ES, Chan LC, Srivastava G. Establishment and characterization of HKESC-1, a new cancer cell line from human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 118: 112-120
- 12 Hu YC, Lam KY, Law SY, Wan TS, Ma ES, Kwong YL, Chan LC, Wong J, Srivastava G. Establishment, characterization, karyotyping, and comparative genomic hybridization analysis of HKESC-2 and HKESC-3: two newly established human esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 135: 120-127
- 13 Kwong D, Lam A, Guan X, Law S, Tai A, Wong J, Sham J. Chromosomal aberrations in esophageal squamous cell carcinoma among Chinese: gain of 12p predicts poor prognosis after surgery. *Hum Pathol* 2004; 35: 309-316
- 14 Jin Y, Jin C, Law S, Chu KM, Zhang H, Strombeck B, Yuen AP, Kwong YL. Cytogenetic and fluorescence *in situ* hybridization characterization of clonal chromosomal aberrations and CCND1 amplification in esophageal carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 148: 21-28
- 15 Ishizuka T, Tanabe C, Sakamoto H, Aoyagi K, Maekawa M, Matsukura N, Tokunaga A, Tajiri T, Yoshida T, Terada M, Sasaki H. Gene amplification profiling of esophageal squamous cell carcinomas by DNA array CGH. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 152-155
- 16 Qin YR, Wang LD, Kwong D, Guan XY, Zhuang ZH, Fan ZM, An JY, Tsao G. Comparative genomic hybridization of esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardia adenocarcinoma in high-incidence region of esophageal carcinoma, Linzhou Henan. *Zhonghua Yixueyuanxue Zazhi* 2004; 21: 625-628
- 17 Wei F, Ni J, Wu SS, Liu H, Xu X, Han YL, Cai Y, Zhang JW, Chen XJ, Pang H, Lu N, Ji L, Wu M, Wang MR. Cytogenetic studies of esophageal squamous cell carcinomas in the northern Chinese population by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 138: 38-43
- 18 Qin YR, Wang LD, Kwong D, Gao SS, Guan XY, Zhuang ZH, Fan ZM, Deng W, Hu L. Comparative genomic hybridization: the profile of chromosomal imbalances in esophageal squamous cell carcinoma. *Zhonghua Bingliuxue Zazhi* 2005; 34: 80-83
- 19 Noguchi T, Kimura Y, Takeno S, Chujo M, Uchida Y, Mueller W, Gabbert HE. Chromosomal imbalance in esophageal squamous cell carcinoma: 3q gain correlates with tumor progression but not prognostic significance. *Oncol Rep* 2003; 10: 1393-1400
- 20 Qin YR, Wang LD, Dora K, Guan XY, Zhuang ZH, Fan ZM, Deng W, Cao SH. Genomic changes in primary lesion and lymph node metastases of esophageal squamous cell carcinoma. *Aizheng* 2005; 24: 1048-1053
- 21 Fujita Y, Sakakura C, Shimomura K, Nakanishi M, Yasuoka R, Aragane H, Hagiwara A, Abe T, Inazawa J, Yamagishi H. Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in esophageal squamous cell carcinoma, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence *in situ* hybridization. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1857-1863
- 22 van Dekken H, Wink JC, Vissers KJ, van Marion R, Koppert LB, Tilanus HW, Siersema PD, Tanke HJ, Szuhai K, Hop WC. Genomic analysis of early adenocarcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction: tumor progression is associated with alteration of 1q and 8p sequences. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 516-525
- 23 Wang L, Soria JC, Kemp BL, Liu DD, Mao L, Khuri FR. hTERT expression is a prognostic factor of survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2883-2889
- 24 Terpos E, Eleutherakis-Papaikovou V, Dimopoulos MA. Clinical implications of chromosomal abnormalities in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 803-814
- 25 Varella-Garcia M. Molecular cytogenetics in solid tumors: laboratorial tool for diagnosis, prognosis, and therapy. *Oncologist* 2003; 8: 45-58
- 26 Mitelman F, Johansson B, Mandahl N, Mertens F. Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 95: 1-8
- 27 Doak SH, Saidely D, Jenkins GJ, Parry EM, Griffiths AP, Baxter JN, Parry JM. Generation of locus-specific probes for interphase fluorescence *in situ* hybridisation-application in Barrett's esophagus. *Exp Mol Pathol* 2004; 77: 26-33
- 28 Murthy SK, Demetrick DJ. New approaches to fluorescence *in situ* hybridization. *Methods Mol Biol* 2006; 319: 237-259
- 29 Oliveira AM, French CA. Applications of fluorescence *in situ* hybridization in cytopathology: a review. *Acta Cytol* 2005; 49: 587-594
- 30 Nakakuki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Shimada Y, Imamura M, Amagasa T, Inazawa J. Novel targets for the 18p11.3 amplification frequently observed in esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2002; 23: 19-24
- 31 Pimkhaokham A, Shimada Y, Fukuda Y, Kurihara N, Imoto I, Yang ZQ, Imamura M, Nakamura Y, Amagasa T, Inazawa J. Nonrandom chromosomal imbalances in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: possible involvement of the ATF3 and CENPF genes in the 1q32 amplicon. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 1126-1133
- 32 Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821
- 33 Du Plessis L, Dietzsch E, Van Gele M, Van Roy N, Van Helden P, Parker MI, Mugwanya DK, De Groot M, Marx MP, Kotze MJ, Speleman F. Mapping of novel regions of DNA gain and loss by comparative genomic hybridization in esophageal carcinoma in the Black and Colored populations of South Africa. *Cancer Res* 1999; 59: 1877-1883
- 34 Pack SD, Karkera JD, Zhuang Z, Pak ED, Balan KV, Hwu P, Park WS, Pham T, Ault DO, Glaser M, Liotta L, Detera-Wadleigh SD, Wadleigh RG. Molecular cytogenetic fingerprinting of esophageal squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridization reveals a consistent pattern of chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25: 160-168

■名词解释

染色体畸变:又称染色体突变,包括染色体结构和数目的改变,染色体结构的改变导致了染色体的重排,染色体数目的改变包括整套染色体的改变和单条或多条染色体的增减。

- 35 Shinomiya T, Mori T, Ariyama Y, Sakabe T, Fukuda Y, Murakami Y, Nakamura Y, Inazawa J. Comparative genomic hybridization of squamous cell carcinoma of the esophagus: the possible involvement of the DPL gene in the 13q34 amplicon. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 24: 337-344
- 36 Tada K, Oka M, Tangoku A, Hayashi H, Oga A, Sasaki K. Gains of 8q23-qter and 20q and loss of 11q22-qter in esophageal squamous cell carcinoma associated with lymph node metastasis. *Cancer* 2000; 88: 268-273
- 37 Tada K, Oka M, Hayashi H, Tangoku A, Oga A, Sasaki K. Cytogenetic analysis of esophageal squamous cell carcinoma cell lines by comparative genomic hybridization: relationship of cytogenetic aberrations to *in vitro* cell growth. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 117: 108-112
- 38 Yen CC, Chen YJ, Chen JT, Hsia JY, Chen PM, Liu JH, Fan FS, Chiou TJ, Wang WS, Lin CH. Comparative genomic hybridization of esophageal squamous cell carcinoma: correlations between chromosomal aberrations and disease progression/prognosis. *Cancer* 2001; 92: 2769-2777
- 39 Oka M. Comparative genomic hybridization analysis for esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 10: 275-276
- 40 van Dekken H, Vissers K, Tilanus HW, Kuo WL, Tanke HJ, Rosenberg C, Ijszenga M, Szuhai K. Genomic array and expression analysis of frequent high-level amplifications in adenocarcinomas of the gastro-esophageal junction. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 166: 157-162
- 41 Li XD, Huang XP, Zhao CX, Li QJ, Xu X, Cai Y, Han YL, Rong TH, Wang MR. Identification of a minimal deletion region on chromosome 5q in Chinese esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2004; 215: 221-228
- 42 Siffroi JP, Chantot-Bastaraud S. The future of cytogenetics after the sequencing of the human genome. *Morphologie* 2004; 88: 19-23

■同行评价

本文系统、简明的综述了食管癌的染色体畸变及其相关的研究方法,有一定指导意义,但引用文献不够新。

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告

本刊讯 由上海市胃肠肿瘤重点学科、日本早期胃癌检诊协会、上海交通大学瑞金医院消化肿瘤学科群共同主办“2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会”将于2006-11-09/11在上海召开。

1会议内容

由日本及香港专家主讲: 功能性消化不良和早期胃癌的临床识别; 根除*H pylori*预防胃癌研究; 内镜诊断早期胃癌的深度及组织学类型; 早期胃癌EMR、ESD及外科手术治疗; 早期胃癌和大肠癌标本处理及病理检查规范及国际共识意见; 大肠锯齿状腺瘤、大肠癌及新生癌的诊断, 外科手术及综合治疗。

由中国专家主讲: 放大内镜诊断早期胃癌; 中国早期胃癌临床现状及前景; 胃肠肿瘤腹腔镜治疗; 大肠侧向生长型肿瘤诊治; 大肠癌早期诊断及筛查; 胶囊内镜、双气囊小肠镜及小肠超声内镜诊断小肠肿瘤及临床评估。

2 征文

征文内容包括胃癌、大肠癌、小肠肿瘤基础研究、流行病学调查, 早期胃肠癌诊断及治疗。论文(电子版)按中华消化杂志格式书写附500字以内中文摘要, 欢迎网上投稿。截止日期: 2006-08-10。来稿寄至: 上海市瑞金二路197号上海瑞金医院消化科 汤美萍(请写明2006胃肠肿瘤大会稿件), 邮政编码: 200025。联系电话: 021-64370045-665246, E-mail: wuyunlin1951@163.com。

会议将授予国家继续教育I类学分8分。

急性胰腺炎合并肺损伤时炎性介质的作用

张喜平, 李志军

■背景资料

急性胰腺炎(acute pan-creatitis, AP)是外科常见的急腹症之一, 发病迅速, 病情凶险。他不仅能引起胰腺本身病变, 还引起胰外器官受累, 导致多器官损害, 肺脏是最常受累的胰外器官之一。炎性介质在急性胰腺炎合并肺损伤时起着非常重要的作用。

张喜平, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006
李志军, 浙江中医院针灸科 浙江省杭州市 310053
浙江省中医药卫生科计划项目, No. 2003C130、No. 2004C142
杭州市重大科技发展计划项目, No. 2003123B19
杭州市医药卫生重点项目, No. 2004Z006
浙江省医药卫生科技计划项目, No. 2003B134
杭州市科技计划项目, No. 2005224
杭州市医药卫生科技项目, No. 2003A004
通讯作者: 张喜平, 310006, 浙江省杭州市第一人民医院普外科.
zxp99688@vip.163.com
电话: 0571-87065701
收稿日期: 2006-04-14 接受日期: 2006-05-11

摘要

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急腹症之一, 并发症多, 死亡率较高。除了导致胰腺病变外, 肺是最早受累器官之一, 从低氧血症到急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory depress syndrome, ARDS)均可出现。目前, 国内外学者对于AP合并急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的发病机制进行了许多实验及临床研究, 现就AP合并肺损伤时炎性介质的作用作一综述。

关键词: 急性胰腺炎; 肺损伤; 炎性介质

张喜平, 李志军. 急性胰腺炎合并肺损伤时炎性介质的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1900-1905

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1900.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)不仅引起胰腺本身病变, 并且常累及肝、肺、肾、肠、胃等器官^[1-5], 导致多器官损害^[6], 而肺脏是最常受累的胰外器官之一^[7]。据各种资料统计表明, 在发病2 w内死亡的患者, 有80%的患者同ARDS直接相关^[8], 目前对于AP合并肺损伤(acute lung injury, ALI)的机制目前仍不确切, 但许多研究表明多种促炎细胞因子介导的全身反应综合征有关^[9], 如中性粒细胞的“滚动效应”、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)、核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B)、白细胞介素等炎性介质在肺组织的积聚、活化, 是AP并发ALI的一个重要病理机制^[10-11], 现从炎

性介质方面探讨AP合并ALI的发病机制。

1 炎性介质

1.1 一氧化氮(NO)具有多种生物学功能, 能影响组织微循环的血流灌注量。近年来许多学者研究发现NO在AP的发病机制中有重要的作用。绝大多数研究提示NO能明显减轻胰、肺的病变, 对AP并发ALI具有一定的治疗作用^[12-17]。可能与以下机制有关: 一方面NO能扩张血管、调节局部血流、抑制血小板聚集及白细胞黏附、降低血液黏稠度、改善微循环障碍、从而调节胰肺血流^[18-20]; 另一方面NO具有清除氧自由基(oxygen free radical, OFR)的能力, 抑制炎性细胞因子生成, 减少胰酶释放, 减少TNF- α 的生成^[21], 减轻肺脏的损伤。但同时也有学者提出相反的结论, 认为在AP合并ALI过程中, 由于NO大量产生会加重肺损伤^[22], 已有实验证明给予NO抑制剂能减轻肺损伤的发生及发展^[23], 其具体机制如下: (1)NO释放过多, 可引起毛细血管麻痹性扩张, 血液淤滞, 造成局部充血, 使肺组织缺血^[24]; (2)高水平的NO可致大量的自由基和过氧化亚硝酸盐激活, 进而损伤线粒体电子传递系, 引发蛋白质降解, 脂质过氧化, 导致ALI^[14]; (3)NO的大量产生还可增强核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)活性, 从而增加前炎症细胞因子的产生, 促进内皮细胞和平滑肌细胞黏附因子的表达, 扩大炎症反应^[25-26]; (4)在病理状态下, 高浓度NO可抑制三羧酸循环和DNA复制中的关键酶, 造成能量代谢障碍和DNA损伤, 从而加重肺损伤的进展。从目前的研究结果来看, NO尤如一把双刃剑, 少量时可以减轻AP时各脏器的损伤程度, 大量又可以加重胰腺及肺损伤^[27-28], NO在AP合并肺损伤中的作用机制仍有待于进一步研究。

1.2 肿瘤坏死因子(TNF- α)主要分为由活化T细胞产生的TNF- β 和活化单核细胞产生的TNF- α , 后者是参与炎症反应的重要因子。TNF- α 是一类重要的炎症、免疫调节因子, 具有双重作用, 适量释放可提高白细胞对病原体清除能力, 促进组织的修复, 但过量释放对机体具有强烈的毒性作

用。AP时TNF- α 升高与AP的发展及ALI密切相关^[29]。研究表明AP早期肺组织有TNF- α mRNA的高度表达^[30-31], 导致TNF- α 的过量产生, 引起和加重ALI, 是ALI的发病机制之一^[32-34]。主要有以下几方面: (1)损伤肺内皮细胞屏障功能, 使细胞间隙增大, 从而引起毛细血管通透性显著增加, 导致肺微循环障碍; (2)诱导中性粒细胞在肺毛细血管中黏附、积聚、滞留; (3)可促进中性粒细胞和溶酶体酶释放, 产生氧自由基, 导致肺组织和血管内皮损伤; (4)促进细胞间黏连分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达^[35]; (5)TNF- α 及微血栓可刺激内皮细胞产生内皮素(ET), 引起肺动脉高压^[36]; (6)血循环中增多的内毒素、TNF- α 以及肺脏局部合成的TNF- α , 能够延缓肺内浸润的中性粒细胞凋亡^[37]; (7)在TNF- α 合成释放后能引起其他细胞因子和炎性介质的瀑布式释放, 从而导致胰腺及胰外多脏器的损伤^[38]。早期检测TNF- α 不仅可以反映AP的严重程度, 同时有助于预测肺损伤发生及其严重程度, 作出及时准确的治疗^[39]。

1.3 血小板活化因子(PAF) 是迄今发现的最强的血小板聚集剂及最强的血管活性脂类递质, PAF主要由病灶局部或全身内皮细胞、巨噬细胞等分泌, 肿瘤坏死因子、血栓素、白三烯、氧自由基和缓激肽等也可刺激PAF产生。PAF具有重要的生物学效应, 在AP时全身炎症反应中被作为关键性炎症递质^[40-41]。近年来, PAF在AP合并ALI的发病中的作用已受到极大的关注^[42]。实验证明, PAF参与AP时ALI的发展^[43]。在AP合并ALI的发病过程中, 肺血管内皮细胞是合成和释放PAF的主要细胞, 胰源性炎性介质释放入血直接损伤肺血管内皮细胞, 可能是导致PAF在胰腺炎性肺损伤中大量释放的启动因子。其机制有以下几点: (1)PAF通过活化血小板, 促进血小板聚集, 使血液黏稠度增加, 血流速度减慢, 血栓形成, 引起毛细血管通透性增加, 而造成肺微循环障碍^[44-46]; (2)对血管的直接损伤作用、致休克作用, 已证实外源性PAF可直接损害心肌收缩力, 使心输出量降低, 造成肺组织低灌注, 引起肺缺血; (3)激活中性粒细胞, 促进OFR释放; (4)抑制肺组织气管黏膜抗氧化还原系统, 加重肺损伤; (5)PAF引起PMN、弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)和磷脂酶A₂(phospholipase A₂, PLA₂)在肺脏积聚, 损伤肺组织^[47]。

1.4 细胞间黏连分子(ICAM-1) 是一种由内皮细胞表达的蛋白质, 正常情况下在大多数组织不

表达或低表达, 当其表达升高时, 可与粒细胞表面的整合素相互作用, 是白细胞黏附于内皮细胞的关键所在, 由此促使白细胞通过血管内皮屏障迁移至炎性区域, 引起组织的炎症反应^[48]。有实验证明AP时大鼠肺组织ICAM-1基因过度表达, 且与ALI严重程度相关^[49]。AP时生成大量的炎性因子和炎症递质刺激肺血管内皮表达ICAM-1等黏附分子, 促进中性粒细胞浸润, 造成肺组织损伤^[50-51]。一方面ICAM-1的高表达可以通过引起内皮细胞-白细胞相互间反应造成白细胞的浸润, 并不断加重肺损伤; 另一方面ICAM-1高表达可诱导PMN在肺脏聚集, 导致肺损伤^[52]; ICAM-1可显著减少胰腺和肺毛细血管血流量, 导致白细胞黏附, 增加毛细血管通透性, 降低毛细血管血流速度, 引起胰腺和肺脏微循环障碍^[53], 造成肺组织缺血缺氧。

1.5 核因子- κ B (NF- κ B) 是一个多功能核转录因子, 主要参与机体免疫和炎症分子表达的调控^[54]。NF- κ B 最先发现在B淋巴细胞中, NF- κ B具有广泛的生物学活性, 正常生理情况下, NF- κ B以无活性的形式存在于其他细胞的胞质中, 激活后促进多种细胞因子的基因转录, 在细胞因子介导的感染、炎症反应、氧化应激、细胞增生、细胞凋亡等过程中起重要作用, 在炎症反应复杂的细胞因子网络中, NF- κ B的活化可能是一个中心环节^[55-58]。研究表明NF- κ B通过调控炎症因子表达参与了AP合并ALI的进展^[59]。NF- κ B引起ALI主要通过以下机制: (1)肺组织NF- κ B活化并通过促进TNF- α 、IL-6、IL-8、ICAM-1 mRNA的表达而参与ALI的发生^[60]; (2)NF- κ B通过调节iNOS的表达进而显著影响NO生成的量, NO产生过多可导致肺损伤^[61]。临幊上应用NF- κ B活化抑制剂PDTC抑制NF- κ B活化及iNOS mRNA过度表达, 从而改善肺脏损害^[62-64]。但是, 对于抑制NF- κ B活化, 不同学者有不同的看法, 有的认为完全抑制NF- κ B时, 会加重组织损伤; 当部分抑制时, 对组织有保护作用^[65]。

1.6 中性粒细胞(PMN) 激活并聚集于肺组织, 是导致急性坏死型胰腺炎(ANP)早期合并肺损伤的重要因素^[66-69]。ANP并发ALI时, 肺脏总有大量的PMN聚集^[70], 组织中的髓过氧化酶活性(MPO)可以反映PMN在肺组织中滞留的数量^[71]。研究表明AP合并肺损伤时肺组织中MPO活性显著升高^[72]。PMN引起肺损伤的机制有以下几个方面: (1)直接释放大量细胞毒性物质如弹性蛋白酶、胶原酶、蛋白水解酶、活性氧代谢产物、PAF

■应用要点

本文系统介绍了急性胰腺炎合并肺损伤时多种重要的炎性介质, 覆盖面广, 可以为临床和实验研究提供思路。

■同行评价

本文探讨了急性胰腺炎时炎性介质在肺损伤中的作用，具有较好的临床和实验意义。

及促炎细胞因子，发挥细胞毒性作用，使肺内皮细胞损伤、变性、血管通透性增加，肺间质水肿，氧交换障碍，从而导致肺损伤^[73-74]；(2)聚集的中性粒细胞机械堵塞毛细血管致肺组织微循环障碍；(3)中性粒细胞和内皮细胞还可以产生PAF、TXA₂，两者均是强有力的缩血管物质，使肺血管收缩，导致通气/血流比例失调，低氧血症，加重肺损伤^[75]。目前，也有研究者发现用干扰中性粒细胞迁移的方法，能减轻AP大鼠的胰腺及肺损害的严重程度，证明了PMN参与了肺损害，或许可以为临床治疗提供思路^[76]。

1.7 内皮素(ET) 内源性ET是由血管内皮细胞分泌释放的一种血管生物活性肽，体外实验证明ET几乎能够引起所有动脉和静脉收缩^[77]。实验证明，ET参与了AP合并ALI的发生^[78]，其作用机制为：(1)ET通过内皮素受体，增加毛细血管通透性，增加血浆渗出，血流速度缓慢，导致肺微循环障碍^[79]；(2)ET可引起肺血管及支气管强烈收缩，并具有类内毒素作用，损伤肺脏；(3)ET可以引起冠脉收缩，影响心肌血供，减少心输出量，引起肺脏缺血；(4)ET血症能通过诱导机体内TNF- α 等炎症因子的过度生成，导致肺脏损害^[80]。

1.8 氧自由基(OFR) 大量实验研究表明，在AP早期胰腺细胞受损后，会释放大量的OFR^[82]。OFR与AP的严重程度相关^[81]，也是胰腺与其他器官损害的重要调节因子^[83-84]。OFR可以促进内源性ICAM-1的表达，损伤血管内皮细胞，使毛细血管通透性增加，导致肺脏微循环障碍；同时OFR也可以破坏多不饱和脂肪酸、蛋白质、黏多糖等重要的生物分子，并且过多的OFR还可引发再灌注损伤。

1.9 白介素(IL) IL-6主要由单核细胞在IL-1、TNF等诱导下产生，也可由激活的巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞等产生。IL-6的水平可以反映AP的严重度^[85]，它有强烈致炎活性，可直接作用于血管内皮细胞，使其通透性增加，导致大量炎性渗出。亦可与TNF- α 等协同，构成炎性介质网络，促使炎症的扩展，并使中性粒细胞的弹力酶及产生的氧自由基损伤内皮细胞，引起血管内皮肿胀、血流淤滞，致肺脏血液循环障碍。AP时大量的IL-8产生，通过趋化、激活中性粒细胞，表达ICAM-1等黏附分子，释放蛋白水解酶及产生活性氧代谢产物而导致胰腺及肺脏的损害^[86]。IL-10主要来源于单核细胞^[87]，能通过增加胰腺及肺脏毛细血管血流量，改善肺脏微循环损伤^[88-89]，抑制内毒素介导的促凝反应，阻

断活化的巨噬细胞释放OFR及NO^[90]，因此IL-10具有保护肺脏的作用。此外，林栋栋 *et al*^[91]研究发现，IL-8和IL-10为一对促炎和抗炎因子，在AP的发展过程中，两者之间的平衡失调可以引起及加重肺损伤。

1.10 磷脂酶A₂(PLA₂) 是调控花生四烯酸代谢和PAF生成的限速酶，在生理情况下是以无活性的前体形式存在。PLA₂还是一个强有力的炎性介质，AP时有活性的PLA₂释放明显增加，调控多种炎性细胞的活化，是介导AP后胰腺组织和肺脏等胰腺外器官的重要介质^[92]。一方面AP期间PLA₂又可导致合成和释放PAF的细胞释放大量PAF，同时伴有花生四烯酸产物的释放，加重肺组织损伤^[93]。另一方面PLA₂可以通过激活NF- κ B，上调多种炎症因子的表达而产生肺损伤^[94]。临幊上通过阻断PLA₂可以有效降低AP时肺损伤程度。

2 其他

也有学者提出肺血管内皮细胞凋亡所引起的微循环障碍是引起肺损伤的重要原因之一^[48]。潘玉明 *et al*^[95]发现P选择素通过介导PMN在肺脏积聚、沉积，参与肺损伤的发生。

总之，AP病情凶险，容易损伤胰腺及合并胰外器官损害，导致多脏器功能衰竭，肺脏是首先受累脏器之一。AP合并ALI发病机制比较复杂，虽然许多临幊及实验研究都从炎性介质出发寻找ALI的病因，取得了不小的成就。但目前仍存在一些问题，而且对于肺损伤机制的探索能否为临幊所用，从而减轻肺损害，降低死亡率，还要进一步探讨。

3 参考文献

- Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol* 2001; 128: 13-16
- Lubianskii VG, Nasonov SV. Acute pancreatitis after resection of stomach for low duodenal ulcer. *Khirurgija (Mosk)* 2001; 3: 8-11
- Akhtar M, Yashpal, Jetley V, Dham SK. Renal failure in acute pancreatitis. *J Assoc Physicians India* 1995; 43: 176-178
- Rahman SH, Ammori BJ, Holmfeld J, Larvin M, McMahon MJ. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 26-35; discussion 35-36
- Hagry O, Coosemans W, De Leyn P, Nafteux P, Van Raemdonck D, Van Cutsem E, Hausterman K, Lerut T. Effects of preoperative chemoradiotherapy on postsurgical morbidity and mortality in cT3-4 +/- cM1lymph cancer of the oesophagus and gastro-oesophageal junction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003; 24: 179-86; discussion 186
- Foitzik T, Eibl G, Hotz B, Hotz H, Kahrau S, Kasten

- C, Schneider P, Buhr HJ. Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: experimental findings and clinical implications. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 130-138
- 7 Ma M, Geng ZQ, He XY. Improving the prognosis of severe acute pancreatitis by using dexamethasone inhibiting inflammatory mediators. *J Fourth MilMed Univ* 2002; 23: 932-934
- 8 Liu XM, Pan CE, Liu QG, Wang ZF. The diagnosis and treatment of lung injury following severe acute pancreatitis. *Chin J Hepatobil Surg* 2002; 8: 116-117
- 9 Yang J, Denham W, Carter G, Tracey KJ, Norman J. Macrophage pacification reduces rodent pancreatitis-induced hepatocellular injury through down-regulation of hepatic tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta. *Hepatology* 1998; 28: 1282-1288
- 10 陆月明, 孙波. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征临床流行病学研究进展. 中华急诊医学杂志 2003; 12: 65-66
- 11 巫协宁. 重症胰腺炎的发病机制. 中华消化杂志 1999; 19: 335-337
- 12 陈哲京, 陈祥建, 陈必成, 张启瑜. L-精氨酸在重症胰腺炎并发急性肺损伤中的作用. 肝胆胰外科杂志 1999; 11: 79-80
- 13 Jaworek J, Jachimczak B, Tomaszecka R, Konturek PC, Pawlik WW, Sendur R, Hahn EG, Stachura J, Konturek SJ. Protective action of lipopolysaccharides rat caerulein-induced pancreatitis: role of nitric oxide. *Digestion* 2000; 62: 1-13
- 14 Dobosz M, Wajda Z, Hac S, Mysliwska J, Bryl E, Mionskowska L, Roszkiewicz A, Mysliwski A. Nitric oxide, heparin and procaine treatment in experimental ceruleine-induced acute pancreatitis in rats. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1999; 47: 155-160
- 15 Jaworek J, Jachimczak B, Bonior J, Kot M, Tomaszecka R, Karczewska E, Stachura J, Pawlik W, Konturek SJ. Protective role of endogenous nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide-induced pancreatic damage (a new experimental model of acute pancreatitis). *J Physiol Pharmacol* 2000; 51: 85-102
- 16 Jaworek J, Jachimczak B, Tomaszecka R, Konturek PC, Pawlik WW, Sendur R, Hahn EG, Stachura J, Konturek SJ. Protective action of lipopolysaccharides rat caerulein-induced pancreatitis: role of nitric oxide. *Digestion* 2000; 62: 1-13
- 17 Andrzejewska A, Jurkowska G. Nitric oxide protects the ultrastructure of pancreatic acinar cells in the course of caerulein-induced acute pancreatitis. *Int J Exp Pathol* 1999; 80: 317-324
- 18 Endlich K, Muller C, Barthelmebs M, Helwig JJ. Role of shear stress in nitric oxide-dependent modulation of renal angiotensin II vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1929-1935
- 19 Olszanecki R, Chlopicki S. Endotoxaemia in rats: role of NO, PAF and TXA2 in pulmonary neutrophil sequestration and hyperlactataemia. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 443-454
- 20 Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Heliadis N, Herodotou A, Hatjopoulou E, Petridou E, Sarris K. The implication of nitric oxide in the process of bacterial translocation. *Int Surg* 2000; 85: 23-26
- 21 秦咏梅, 孙屹峰, 杨云生. 急性重症胰腺炎合并急性肺损伤的临床分析. 中国综合临床 2004; 20: 700-701
- 22 Andican G, Gelisgen R, Unal E, Tortum OB, Dervisoglu S, Karahasanoglu T, Burcak G. Oxidative stress and nitric oxide in rats with alcohol-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2340-2345
- 23 程石, 赵军, 何三光, 宋茂民, 李志宏, 张越巍. 一氧化氮在急性坏死性胰腺炎大鼠肺损伤中的作用. 中华外科杂志 2003; 41: 336-339
- 24 赵秋玲, 黄承钰, 黄英, 王俊芳, 刘静. L-精氨酸诱导急性胰腺炎小鼠肺损伤的实验研究. 四川大学学报(医学版) 2004; 35: 839-842
- 25 Denham W, Yang J, Wang H, Botchkina G, Tracey KJ, Norman J. Inhibition of p38 mitogen activate kinase attenuates the severity of pancreatitis-induced adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2000; 28: 2567-2572
- 26 Mohr S, Hallak H, de Boite A, Lapetina EG, Brune B. Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1999; 274: 9427-9430
- 27 任晓葆, 何振平, 文亮. 一氧化氮在急性出血坏死性胰腺炎大鼠胰肾损伤中的作用. 第三军医大学学报 2001; 23: 1081-1083
- 28 Al-Mufti RA, Williamson RC, Mathie RT. Increased nitric oxide activity in a rat model of acute pancreatitis. *Gut* 1998; 43: 564-570
- 29 谷俊朝, 秦兆寅, 纪宗正, 黎一鸣, 康亚安, 王西京. TNF- α 和大鼠ANP合并肺损伤之间关系的初步探讨. 中国普通外科杂志 1997; 6: 211-221
- 30 张刚, 杨训, 刘洲, 周晓辉, 李德华, 张肇达, 陈晓理. 内毒素血症在急性胰腺炎肺损伤中的作用机制. 中国现代医学杂志 2000; 10: 40-41
- 31 徐军, 张梅, 刘学民, 潘承恩, 刘青光. TNF- α 基因表达在大鼠急性重症胰腺炎肺损伤中的作用. 西安交通大学学报(医学版) 2004; 25: 387-392
- 32 程石, 宋茂民, 何三光. 肿瘤坏死因子- α 对大鼠坏死性胰腺炎肺损伤的影响. 中华实验外科杂志 2003; 20: 593-594
- 33 张姐, 倪泉兴, 张群华, 向阳, 张延龄. 炎症介质与急性坏死性胰腺炎大鼠的肺损伤. 中华普通外科杂志 2001; 16: 172-173
- 34 张刚, 张肇达, 刘续宝, 田伯乐, 胡伟明, 蒋俊明. 急性胰腺炎大鼠肺内TNF- α 基因表达与肺损伤的关系. 世界华人消化杂志 2000; 8: 142
- 35 Hunninghake GW, Kalica AR. Approaches to the treatment of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 915-918
- 36 肖雪明, 邹声泉. 急性出血坏死性胰腺炎大鼠肺脏TNF- α mRNA表达的实验研究. 外科理论与实践 1998; 3: 69
- 37 张刚, 修瑞龄, 刘洲, 杨训, 童文森, 张肇达, 乔安亿. 实验性急性胰腺炎肺内细胞凋亡状况及其意义的初步探讨. 中国现代医学杂志 2003; 13: 10-13
- 38 周明, 王学敏, 江伟, 赵刚, 杭燕南. 急性胰腺炎早期肺组织与炎症反应的实验研究. 上海第二医科大学学报 2004; 11: 885-887
- 39 Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr Opin Investig Drugs* 2001; 2: 496-501
- 40 Howard KM, Olson MS. The expression and localization of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in endotoxemic rats. *J Biol Chem* 2000; 275: 19891-19896
- 41 Asai Y, Nomura T, Murahashi N, Iwamoto K. Characterization of the physicochemical properties of the micelles of platelet-activating factor (C18:0). *Drug Dev Ind Pharm* 2000; 26: 671-674
- 42 Johnson CD, Kingsnorth AN, Imrie CW, McMahon MJ, Neoptolemos JP, McKay C, Toh SK, Skaife P, Leeder PC, Wilson P, Larvin M, Curtis LD. Double blind, randomised, placebo controlled study of a

- platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis. *Gut* 2001; 48: 62-69
- 43 王兴鹏, 徐家裕, 袁耀宗. 血小板活化因子在急性胰腺炎大鼠肺损伤发病中作用. 中国病理生理杂志 1994; 10: 614-617
- 44 Hofbauer B, Saluja AK, Bhatia M, Frossard JL, Lee HS, Bhagat L, Steer ML. Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1998; 115: 1238-1247
- 45 Bhatia M, Brady M, Shokuh S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000; 190: 117-125
- 46 Wang H, Tan X, Chang H, Gonzalez-Crussi F, Remick DG, Hsueh W. Regulation of platelet-activating factor receptor gene expression *in vivo* by endotoxin, platelet-activating factor and endogenous tumour necrosis factor. *Biochem J* 1997; 322 (Pt 2): 603-608
- 47 屠伟峰, 黎介寿, 朱维铭, 邱晓萍, 冯根宝, 吴瑞萍, 徐建国. 血小板活化因子拮抗剂对猪急性重症胰腺炎后肺和气管黏膜损伤的影响. 中华结核和呼吸杂志 2000; 23: 595-598
- 48 刘学民, 刘青光, 潘承恩, 徐高峰, 张涛, 黄建勇, 张梅. 血管内皮凋亡对大鼠重症急性胰腺炎肺损伤的影响. 第四军医大学学报 2003; 24: 1677-1679
- 49 朱斌, 孙家邦, 张淑文, 李非, 刘爽, 崔叶青, 孙海晨. 黏附分子基因表达在大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤中的作用. 中华普通外科杂志 2003; 18: 20-22
- 50 Lundberg AH, Granger DN, Russell J, Sabek O, Henry J, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Quantitative measurement of P- and E-selectin adhesion molecules in acute pancreatitis: correlation with distant organ injury. *Ann Surg* 2000; 231: 213-222
- 51 Folch E, Prats N, Hotter G, Lopez S, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Closa D. P-selectin expression and Kupffer cell activation in rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1535-1544
- 52 罗昆仑, 何振平, 李昆, 段恒春. 坏死性胰腺炎时某些黏附分子表达对中性粒细胞在肺脏聚集的影响. 中华消化杂志 1999; 16: 182-184
- 53 Foitzik T, Eibl G, Buhr HJ. Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: comparison of delayed therapy with ICAM-1 antibodies and a specific endothelin A receptor antagonist. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 240-246; discussion 247
- 54 Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1998; 275: G1402-G1414
- 55 Suk K, Yeou Kim S, Kim H. Regulation of IL-18 production by IFN gamma and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF-kB pathway in the regulatory processes. *Immunol Lett* 2001; 77: 79-85
- 56 Izumi T, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Li Y, Takemura G, Fujiwara H, Garbers DL, Mochizuki S, Nakao K. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF-kappaB activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2001; 108: 203-213
- 57 Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su GL. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999; 30: 934-943
- 58 Abraham E. NF-kappaB activation. *Crit Care Med* 2000; 28: N100-N104
- 59 徐婉, 孙士其, 张振玉, 樊克武. 重症急性胰腺炎核因子- κ B及炎症介质与肺损伤的实验研究. 医学临床研究 2003; 20: 84-87
- 60 Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 1999; 116: 694-701
- 61 栾正刚, 龙锦, 郭仁宣. 核因子- κ B活化在急性胰腺炎肺损伤的作用. 中华实验外科杂志 2003; 20: 1147
- 62 左伟, 刘江, 龙锦, 栾正刚, 郭仁宣. 核因子- κ B活化在大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤的作用. 中华外科杂志 2003; 41: 631
- 63 Grady T, Liang P, Ernst SA, Logsdon CD. Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1997; 113: 1966-1975
- 64 朱斌, 孙家邦, 张淑文, 李非, 刘爽, 崔叶青, 刘海晨. NF- κ B活化及iNOS基因表达在急性胰腺炎肺损伤的作用. 中华肝胆外科杂志 2004; 10: 248-251
- 65 Bohrer H, Nawroth PP. Nuclear factor kappaB-a new therapeutic approach? *Intensive Care Med* 1998; 24: 1129-1130
- 66 Takeda K. Role of increase in permeability and circulatory failure in the development of organ dysfunction in severe acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 1999-2004
- 67 Lundberg AH, Fukatsu K, Gaber L, Callicutt S, Kotb M, Wilcox H, Kudsk K, Gaber AO. Blocking pulmonary ICAM-1 expression ameliorates lung injury in established diet-induced pancreatitis. *Ann Surg* 2001; 233: 213-220
- 68 Maa J, Grady EF, Yoshimi SK, Drasin TE, Kim EH, Hutter MM, Burnett NW, Kirkwood KS. Substance P is a determinant of lethality in diet-induced hemorrhagic pancreatitis in mice. *Surgery* 2000; 128: 232-239
- 69 Kyriakides C, Jasleen J, Wang Y, Moore FD Jr, Ashley SW, Hechtman HB. Neutrophils, not complement, mediate the mortality of experimental hemorrhagic pancreatitis. *Pancreas* 2001; 22: 40-46
- 70 Tanaka N, Murata A, Uda K, Toda H, Kato T, Hayashida H, Matsuura N, Mori T. Interleukin-1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by acute necrotizing pancreatitis in a rat experimental model. *Crit Care Med* 1995; 23: 901-908
- 71 Tang WW, Yi ES, Remick DG, Wittwer A, Yin S, Qi M, Ulich TR. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. IX. Contribution of CD11a/ICAM-1 to neutrophil emigration. *Am J Physiol* 1995; 269: L653-L659
- 72 罗昆仑, 何振平, 李昆, 段恒春, 马宽生. 急性出血坏死性胰腺炎时大鼠肺细胞间黏附分子-1的表达及TNF- α 单抗对其影响. 第三军医大学学报 1998; 20: 426-429
- 73 Ahn BO, Kim KH, Lee G, Lee HS, Kim CD, Kim YS, Son MW, Kim WB, Oh TY, Hyun JH. Effects of taurine on cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Pharmacology* 2001; 63: 1-7
- 74 Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Legros F, Louis H, Le Moine O, Deviere J. N-acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice.

- Pancreas 2000; 20: 161-169
- 75 Bhatia M, Brady M, Shokuh S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000; 190: 117-125
- 76 Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, Lee HS, Frossard JL, Steer ML. The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasive model of acute pancreatitis-associated lung injury. *Int J Pancreatol* 1998; 24: 77-83
- 77 王兴鹏, 王国良, 巫协宁, 袁耀宗, 徐家裕. 急性胰腺炎血循环障碍的意义. 世界华人消化杂志 1997; 5: 55-56
- 78 赵雪峰, 李勇, 广钢, 赵群, 范立桥, 郭明, 王晓玲. 急性重症胰腺炎并发肺损伤时内皮素和一氧化氮变化的实验研究. 河北医科大学学报 2003; 24: 4-6
- 79 Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery* 2000; 128: 399-407
- 80 胡伟明, 张肇达, 张刚. 实验性急性胰腺炎肺损伤与内毒素血症的关系. 现代中西医结合杂志 2002; 11: 1877-1878
- 81 Czako L, Takacs T, Varga IS, Tiszlavicz L, Hai DQ, Hegyi P, Matkovics B, Lonovics J. Involvement of oxygen-derived free radicals in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1770-1777
- 82 Park BK, Chung JB, Lee JH, Suh JH, Park SW, Song SY, Kim H, Kim KH, Kang JK. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2266-2269
- 83 Rau B, Poch B, Gansauge F, Bauer A, Nussler AK, Nevalainen T, Schoenberg MH, Beger HG. Pathophysiological role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? *Ann Surg* 2000; 231: 352-360
- 84 Poch B, Gansauge F, Rau B, Wittel U, Gansauge S, Nussler AK, Schoenberg MH, Beger HG. The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation. *FEBS Lett* 1999; 461: 268-272
- 85 Inagaki T, Hoshino M, Hayakawa T, Ohara H, Yamada T, Yamada H, Iida M, Nakazawa T, Ogasawara T, Uchida A, Hasegawa C, Miyaji M, Takeuchi T. Interleukin-6 is a useful marker for early prediction of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas* 1997; 14: 1-8
- 86 Osman MO, Kristensen JU, Jacobsen NO, Lausten SB, Deleuran B, Deleuran M, Gesser B, Matsushima K, Larsen CG, Jensen SL. A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotising pancreatitis in rabbits. *Gut* 1998; 43: 232-239
- 87 Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Degraef C, Delhaye M, Geerts A, Deviere J. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G1105-G1112
- 88 Menger MD, Pluszyk T, Vollmar B. Microcirculatory derangements in acute pancreatitis. *J Hepatobilary Pancreat Surg* 2001; 8: 187-194
- 89 Warzecha Z, Dembinski A, Konturek PC, Ceranowicz P, Konturek SJ, Tomaszewska R, Schuppan D, Stachura J, Nakamura T. Hepatocyte growth factor attenuates pancreatic damage in caerulein-induced pancreatitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 430: 113-121
- 90 Pradier O, Gerard C, Delvaux A, Lybin M, Abramowicz D, Capel P, Velu T, Goldman M. Interleukin-10 inhibits the induction of monocyte procoagulant activity by bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2700-2703
- 91 林栋栋, 孙家邦, 李非, 张淑文, 崔叶青, 刘大川, 朱斌, 孙海晨, 刘爽. IL-8、IL-10在大鼠急性胰腺炎并发肺损伤中的作用. 首都医科大学学报 2005; 26: 193-196
- 92 张红, 李永渝. 磷脂酶A₂在大鼠急性胰腺炎并发肺损伤中的作用及维拉帕米的治疗效应. 中国危重病急救医学 2003; 15: 418-421
- 93 陈熹, 姚烜, 纪宗正, 吴涛. 磷脂酶A₂对急性胰腺炎大鼠肺损伤的作用. 第四军医大学学报 2003; 24: 988-989
- 94 刘洪斌, 崔乃强, 李东华, 王倩. 磷脂酶A₂与NF-κB的活化在大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤的作用. 中国中西医结合外科杂志 2005; 11: 115-119
- 95 潘玉明, 黄烨, 黄绍光, 邓伟吾. 血浆可溶性P选择素在急性出血坏死型胰腺炎并发肺损伤中作用. 中国危重急救医学 1998; 10: 142-144

电编 李琪 编辑 潘伯荣



GABA在摄食和味觉机制中的作用

雷琦, 闫剑群, 施京红, 杨雪娟

■背景资料

GABA是一种抑制性神经递质, 在哺乳动物中枢神经系统中广泛存在。近年来发现在摄食与味觉中枢均有GABA及其受体分布, 并发现GABA在调节动物摄食行为和味觉感知与调制中发挥作用。

雷琦, 闫剑群, 施京红, 杨雪娟, 西安交通大学医学院生理与病理生理学系 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金资助课题, No. 30270454; No. 30300111
通讯作者: 闫剑群, 710061, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院生理与病理生理学系, jqyan@mail.xjtu.edu.cn
电话: 029-82655199 传真: 029-82655199
收稿日期: 2005-11-15 接受日期: 2005-12-17

摘要

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是哺乳动物中广泛分布的一种抑制性神经递质, GABA及其受体在下丘脑、杏仁核、孤束核等摄食和味觉中枢均有分布。GABA具有A、B和C三种受体, 其中A和B受体参与对摄食行为和味觉感知。在不同脑区应用GABA选择性受体拮抗剂可不同程度的促进或抑制摄食, 并对味觉的喜好和厌恶发生改变。另外, GABA与调节摄食和味觉的有关物质具有相互作用, 他们共同参与摄食和味觉的调控。本文就GABA在摄食和味觉感受与调制中的研究进展进行了回顾。

关键词: γ -氨基丁酸(GABA); 传导通路; 摄食; 味觉

雷琦, 闫剑群, 施京红, 杨雪娟. GABA在摄食和味觉机制中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1906-1911
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1906.asp>

0 引言

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是哺乳动物中枢神经系统中广泛分布的一种抑制性神经递质, 近年来发现在摄食与味觉中枢均有GABA及其受体分布, 在脑内的含量很高, 约为单胺递质的1000倍以上, 分布以黑质、苍白球最高, 下丘脑次之, 并证实GABA参与中枢对摄食和味觉的调节。GABA是由谷氨酸在谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)的作用下脱羧后形成, 如GABA合成过多也可负反馈抑制GAD的合成。GABA脑内存在的形式有游离的、疏松结合的和牢固结合的3种类型。GABA经突触前膜释放入间隙后与突触后膜的受体结合产生抑制性作用。GABA的释放是 Ca^{2+} 依赖的释放形式, 新合成的优先释放; GABA的摄取是

Na^+ 和 Cl^- 依赖的耗能过程。生物体内突触间隙GABA含量的维持主要依赖于 γ -氨基丁酸转氨酶(GABA-T)。约50%的中枢突触部位以GABA作为传导递质, 通过其特异受体(GABAA、B、C受体)的介导在控制神经元兴奋性方面发挥着重要作用。A受体和C受体属于氯离子受体门控通道超家族, B受体属G蛋白耦联受体超家族。(1)GABAA受体是GABA受体中最重要的一种, 属氯离子受体门控通道, 是中枢神经系统内主要的抑制性受体。迄今为止, 已在哺乳类动物大脑中发现20个GABAA受体亚基, 依据氨基酸序列相似程度将亚基系列分为8个亚基族, 分别命名为 $\alpha 1-6$, $\beta 1-4$, $\gamma 1-3$, $\rho 1-3$, $\delta 1$, $\varepsilon 1$, $\pi 1$ 和 $\theta 1$ ^[1]。A受体广泛分布于中枢神经系统, 不同的亚型分布有所不同, $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ 组成的受体亚型在脑内含量最高, 尤其是在海马和大脑皮质最丰富, 占全部GABA受体的43%。其次是 $\alpha 2\beta 2\gamma 2$ 和 $\alpha 3\beta 2\gamma 2$ 亚型的占35%, 广泛分布于前脑尤其是海马和纹状体, 也存在于脊髓运动神经元。A受体除拥有苯二氮卓、巴比妥酸盐、神经甾醇等结合位点之外^[2], 还可被荷包牡丹碱(bicuculline)竞争性抑制或被印防己毒素(picrotoxinin)非竞争性抑制^[3]。A受体是许多临幊上广泛使用的神经药物靶标, 如镇静剂安定类、抑制剂巴比妥类、痉挛剂印防己毒素和麻醉剂神经固醇类等, 这些药物与A受体上的相应位点结合, 通过改变受体的构象来增强GABA对受体的作用, 参与镇静效应、抗惊厥效应、抗焦虑效应、失忆效应和肌肉松弛效应等。A受体的激动剂有完全激动剂、部分激动剂和反向激动剂。完全激动剂包含两种类型, 一类与绝大多数的A受体亚型结合产生最大的促GABA作用效应, 如muscimol作用近似于GABA, 但比GABA强10倍; 还有临幊常用的苯二氮卓药, 安定、硝基安定等均可与BD位点高亲和力地、稳定地结合。另一类选择性地对部分GABAA亚型产生这种效应, 故又称为选择激动剂, 包括唑吡坦(zolpidem)、阿吡坦(alpidem)和氟硝基安定(flunitrazepam)等。bicuculline为GABAA受体特异性拮抗剂; 印防己

毒素为不可逆的阻断剂。(2)GABAB受体主要分布在脑神经元和脊髓的初级神经元以及交感神经突触前末梢。在大脑皮层、海马都有A、B受体,但在不同部位他们的密度不同;同一神经元不同部位A、B受体分布不同。电生理研究提示存在突触前和突触后两种不同的受体,并且他们似乎都与G-蛋白耦联。与A受体不同,B受体不受bicuculine, picrotaxin, 苯二氮卓和巴比妥的影响,低浓度三硝基甲苯和鸟苷酸可降低B受体的亲和力。Heck *et al*^[4]发现,GABA能突触形成前,在孤束核(nucleus of solitary tract, NST)有大量的GABA,并发现突触发育前B受体弥散分布,当突触形成后变为丛集分布。随着发育过程,突触外标记的B受体减少,但突触内标记增多。氯苯氨丁酸(baclofen)为B受体的选择性激动剂,法克罗芬(phaclofen)是B受体的竞争性拮抗剂,5-高香草酸(5-HVA)为非竞争性拮抗剂。(3)GABAC受体结构与A受体相似,也是一种氯离子受体门控通道,主要存在于视网膜和视觉通路参与视觉功能调节。

1 GABA对摄食行为的调节

GABA在调节动物摄食的中枢机制中发挥作用。GABAA和B受体共同表达于脑的许多部位,这两种受体配基产生许多相同的生物功能。刺激GABAA或B受体,在许多动物增加摄食,如:猪、大鼠等^[5-8]。A受体存在于LH,给大鼠下丘脑中间区注射GABAA受体激动剂musimol促进摄食,给下丘脑外侧区注射抑制摄食;但是应用A受体竞争性拮抗剂bicuculine这种对摄食的影响作用减轻,提示下丘脑的GABAA受体参与食欲调节^[9-13]。杏仁核存在低到高密度的GABA细胞神经纤维、A受体和大量的GABA中间酶GAD,电刺激或损毁杏仁核通过与下丘脑有关部分的突触联系影响摄食和饮水行为^[14-15]。Minano *et al*^[16]发现,给饱食和饥饿大鼠杏仁中央核注射GABAA选择性受体激动剂musimol,产生剂量和时间依赖性摄食减少;双侧注射的作用在前2 h大于单侧注射的作用,但是总的影响是相同的;杏仁中央核注射GABAA受体的拮抗剂bicuculine显著阻断musimol的抑食作用,这一发现支持杏仁核参与摄食调控。另外该研究组给杏仁中央核注射GABAB受体的激动剂baclofen后,摄食无改变,他们认为B受体不参与摄食行为的调控。但也有研究认为应用低剂量GABAB激动剂baclofen可能通过降低有关饱感信号而增

加摄食^[17]。另外,Patel *et al*^[18]应用GABAB受体拮抗剂降低摄食行为,如腹腔注射CG35348,在高剂量时才能阻断GABAB受体,降低摄食;低剂量则无该作用。最新的研究发现^[19],B受体在削弱迷走神经引起的摄食机制中发挥作用。单独应用B受体激动剂baclofen,摄食和体质量无明显改变,但联合迷走神经刺激,迷走神经的作用显著降低,同时leptin和血糖水平降低,推测刺激迷走神经可能通过增加迷走神经传出活动而引起摄食行为改变和降低夜间摄食而降低体质量,这种作用可能部分被baclofen减弱,提示GABAB受体在削弱刺激迷走神经引起的摄食中发挥作用。GABAA和B受体激动剂注射入伏核和腹侧被盖区刺激摄食的作用可被拮抗剂选择性阻断,同时拮抗剂也不同程度改变opioid引起的摄食效应。研究发现在伏核和腹侧被盖区调节禁食后短期的摄食反应,而且强烈参与调节脂质和糖蛋白的摄入^[20]。大鼠轻度低蛋白饮食,LHA的GABA和谷氨酸释放降低,推测可能通过降低血中NO含量,来快速增加摄食和体质量^[21]。

雌雄大鼠腹腔注射musimol产生剂量依赖性水摄入减少,该作用可被预先应用bicuculine阻断。在双瓶条件性厌恶实验中,musimol不产生厌恶,这提示musimol对摄水的抑制不是由用药产生的不适引起的,可能是通过GABA受体介导的,而且这种作用与动物的性别无关^[22]。GABAA受体有复杂的苯二氮卓异构体结合位点,苯二氮卓通过A受体作用影响GABA。有趣的是,前已述及musimol抑制摄水,而苯二氮卓类安定和去甲羟安定增加禁水大鼠的摄水^[23-24],这可能是由于musimol和苯二氮卓类激活不同的A受体,而引起对水的消耗的不同。但也有证据表明苯二氮卓不依赖于A受体发挥作用^[25]。另外,A受体的功能也被类固醇类调节^[2,26]。应用B受体激动剂baclofen可抑制饮水。另外,有研究提示A和B受体有相互作用,内源性GABA可能是通过其受体亚型协同作用影响饮水^[27]。Soderpalm *et al*^[28]给大鼠伏隔核壳部双侧注射GABAA激动剂muscimol和吗啡均明显增加摄食,但是相同部位注射安定和速眠宁对摄食无影响。推论GABA和阿片均可通过作用于伏隔核壳部促进摄食,而苯二氮卓类则可能通过作用于脑的其他部位增加摄食。

下丘脑体质量调节系统在大鼠出生后的发育关键期可根据当时的营养状态发生可塑性改变。早期的营养过量导致成年后易诱发体质量超重和饮食过量。研究发现,室旁核的中小细胞被

■研发前沿

GABAA, B受体共同表达于脑的许多部位,给大鼠不同脑区注射GABAA, B选择性受体激动剂和拮抗剂对摄食行为产生促进和抑制,对味觉的感知也产生影响,但是GABA具体是如何影响摄食和味觉,其具体机制如何,有待进一步研究。

■相关报道

已发现GABA及其受体在与摄食和味觉相关的脑区均有分布,应用其激动剂和拮抗剂可一定程度的影响摄食行为和味觉感知,同时GABA也和其他一些摄食有关递质发生相互作用。

■创新盘点

本文首次对GABA在摄食调控和味觉感知与调制中的作用及其与相关递质的相互作用进行了广泛深入的综述。

肥胖信号leptin和insulin显著活跃,这些神经元活跃后跟随的是能量消耗的增加。应用GABAA受体拮抗剂后leptin和insulin促进中小细胞活跃的作用被减弱。在超质量大鼠神经元对肥胖信号的反应显著改变,活跃的影响下降而抑制的影响升高。研究提示GABA中间神经元可能在持续降低幼年过食大鼠肥胖信号的负反馈作用中发挥影响^[29]。

2 GABA与调节摄食的有关物质的相互作用

2.1 NPY GABA为公认的NPY(neuropipetide Y, NPY)作用增强剂, Coppola *et al*^[30]给成年♂大鼠下丘脑室旁核单独注射NPY和musimol以及二者联合应用,均增加大鼠摄食。联合用药的作用大于单独应用,提示GABA和NPY在促进摄食方面有协同作用;老年大鼠对NPY引起的增加摄食的反应降低,musimol的促食作用也不明显,而且二者联合应用的作用不大于单独应用NPY,这可能与老年大鼠机体功能退化有关。

2.2 阿片肽 伏隔核的内源性阿片肽介导摄食的欣快感,尤其是脂肪和糖摄入的调节。伏隔核应用μ激动剂DAMGO强烈促进脂肪饮食摄入,该反应可被杏仁中央核和基底外侧核应用musimol所完全阻断^[31]。给伏隔核注射GABA, B受体激动剂显著增加摄食,而这种作用可被其拮抗剂选择性阻断。阿片受体拮抗剂纳络酮可降低伏隔核应用musimol、腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)应用baclofen所引起的摄食作用,但不影响baclofen在壳部的作用。μ、κ或δ拮抗剂在VTA和伏隔核壳部对GABA和B受体激动剂所引起的摄食作用影响不同,提示不同阿片受体亚型拮抗剂介导GABA受体亚型激动剂在VTA和伏隔核壳部引起的摄食作用^[32]。另外有研究发现B受体和阿片受体在VTA的共同表达,这作为免疫细胞化学的证据支持他们对摄食行为的共同调节作用^[33]。

2.3 Hypocretin 是下丘脑的神经肽,脑室应用后可增加摄食,已证实这种作用是通过GABA环路起作用的,其通过增加GABA的释放而实现的^[34]。

2.4 Orexin 为增食欲素, orexin神经元上存在GABAα3受体亚型,他们可能共同在调节摄食中发挥功能^[35-36]。

2.5 α-MSH 是下丘脑强烈的抑制摄食和能量平衡的因子,系统应用后产生厌食和焦虑。形态上发现GABA能神经末稍与α-MSH有联系,事先应用GABA可反转α-MSH的抑制摄食作用。应用

bicuculine则增加α-MSH的作用,这提示α-MSH引起焦虑和厌食是由于他在GABA能系统的负性影响^[5]。

2.6 AgRP 可刺激摄食和促进体质量增加, AgRP神经元也表达为GABA和NPY阳性,他们共同调节摄食^[37]。

3 GABA在味觉感受与调制中的作用

GABA是参与味觉调制的代表性神经递质^[38],几乎在所有的中间神经元表达^[39,40],其通过A, B受体调节味觉^[41]。GABA和谷氨酸均存在于支配味蕾的神经纤维,味觉新皮层脑片释放GABA和谷氨酸,目前认为二者是味觉新皮层的神经递质,参与调节摄食行为,并提出GABA的释放可能部分为Ca依赖的^[42]。Obata *et al*^[38]利用免疫印迹分析GABA 3个转运体亚型GAT1、GAT2和GAT3,发现在舌部可见GAT2和GAT3的免疫反应带,GAT3仅见于含大量味蕾的轮状乳头上,GAT3和GABA免疫反应均呈阳性只见于味蕾。结果显示味蕾存在GABA摄取系统,GABA通过GAT3摄取GABA进入味觉细胞参与味觉感受。在中枢神经系统GAT1与重摄取位点有高的亲和力,调节GABA的转运。GAT1(-/-)小鼠降低对酒精的厌恶和喜爱,增加对奎宁的回避;GAT1(+/-)则显著增加对酒精和糖精的摄入,增加对酒精的奖赏和喜好作用,增加对酒精性饮料兴奋性的敏感性^[43]。越来越多的免疫光镜和电镜研究资料表明,GABA能神经元广泛存在于整个孤束核吻端(rostral of nucleus of solitary tract, rNST)^[44,46]和臂旁核^[47],他们形态基本一致,多为具有Golgi中间神经元典型特征的小的卵圆形细胞。1999年,Leonard *et al*^[48]提出rNST内存在GABA能抑制性网络。Smith *et al*^[49]通过在体电生理研究发现rNST内微注射GABA可导致rNST味觉神经元的自发活动及诱发活动减弱,且这种减弱与微注射GABA间存在剂量依赖性关系;而注射拮抗剂bicuculine增加rNST味觉神经元的反应性,还可消除电刺激或化学刺激同侧脑岛皮层后对NST味觉神经元的抑制^[50-51]。他们进一步证实味觉皮层兴奋通过GABA抑制NST味觉传入活动、抑制NST味觉细胞的自发和诱发活动。大鼠离体脑片全细胞记录也观察到bicuculine可使NST味觉细胞活动增强^[52]。由此推断rNST内存在一个紧张性GABA能抑制网络,NST味觉细胞持续处于紧张性GABA能抑制状态,并且这一GABA能调制过程可能涉及A受体和B受体,而A受体介导

的GABA能抑制可能起主导作用. GABAB受体参与调节机体钙稳态和哺乳动物T1R味觉受体活动^[53].

伏隔核壳部的吻端注射musimol促进摄食行为, 增加对正性条件和糖的的喜爱; 相反, 给尾端注射则引起对负性刺激和糖、奎宁味觉刺激的强烈躲避反应和厌恶反应, 提示GABA能神经递质在伏隔核局部神经回路中调节摄食行为及味觉^[54]. GABA在腹侧苍白球参与摄入欣快的正性味觉刺激, 在禁水大鼠, 腹侧苍白球注射GABA拮抗剂bicuculine选择性增加糖精溶液的摄入^[55]. 大鼠脑片记录发现应用GABA拮抗剂bicuculine可部分或全部阻断PBN神经元对GABA的反应, 推论GABA主要通过A受体作为抑制性神经递质在PBN味觉和内脏区发挥作用, B受体可能也参与一定的反应^[56]. Kang *et al*^[57]发现杏仁中央核注射A受体拮抗剂bicuculine, 味觉神经元的自发反应及对4种基本味觉刺激溶液的诱发反应均较前显著增高, 表明在正常情况下臂旁核的这两种反应被杏仁中央核的下行投射所抑制, 可能通过释放的内源性的GABA作用于相应受体上改变动物对味觉刺激的鉴别能力. CBM3神经元参与对不同味觉刺激拒绝摄食的过程, 免疫化学实验证实CBM3神经元表现为GABA免疫反应阳性, GABA可能在其中发挥着重要作用^[58]. GAD65在中枢合成GABA中起重要作用, 用目标敲除GAD65基因, 基因敲除小鼠和野生型小鼠对4种基本味觉溶液的喜爱和厌恶无明显差别, 但基因敲除小鼠较野生型小鼠消耗较少的蔗糖和奎宁混合物; 注射miadzdam(苯二氮卓激动剂)增加野生型小鼠对100 mmol/L蔗糖的饮用, 但是基因敲除小鼠无这种反应. 结果提示GAD65产生的GABA不涉及基本味觉功能, 如简单的味觉察觉和区分, 但是更复杂的味觉信息处理过程, 如味觉混合物可口性可能由GAD65介导合成的GABA来修正^[59]. Abecarnil(苯二氮卓受体激动剂)也能通过GABA介导药物对消化行为的影响, 选择性增加味觉可口性^[60]. Midazolam(镇静药)能显著增加对钠溶液的舔食次数^[61]. 行为学实验强有力地证实地西洋的一个主要作用是增强机体对正性欣快味觉和食物刺激的评估, 从而表现为摄食增加^[62]. 由GABA A受体作用的苯二氮卓类通过增加对酒精的味觉欣快性促进酒精摄入^[63]. GABA A受体 α 1无效突变降低酒精和糖精的消耗, 增加对酒精的厌恶, β 2无效突变降低糖精、奎宁消耗, 对酒精无影

响^[64].

总之, 可以看出GABA在调制摄食和味觉方面发挥着重要的作用, 这种作用依中枢结构或部位的不同而有所不同, 这可能涉及更为复杂的机制. 另外, 目前尚不清楚GABA各类受体激动剂和拮抗剂的确切作用部位及各类受体间的相互作用, 这些都是值得深入研究的问题.

4 参考文献

- Rudolph U, Crestani F, Mohler H. GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 188-194
- Simmonds MA. A site for the potentiation of GABA-mediated responses by benzodiazepines. *Nature* 1980; 284: 558-560
- Kumamoto E. The pharmacology of amino-acid responses in septal neurons. *Prog Neurobiol* 1997; 52: 197-259
- Heck WL, Renahan WE, Schweitzer L. Redistribution and increased specificity of GABA(B) receptors during development of the rostral nucleus of the solitary tract. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19: 503-515
- Baldwin BA, Ebenezer IS, De La Riva C. Effects of intracerebroventricular injection of muscimol or GABA on operant feeding in pigs. *Physiol Behav* 1990; 48: 417-421
- Ebenezer IS, Baldwin BA. Effect of intracerebroventricular administration of the GABA-B-receptor agonist baclofen on operant feeding in satiated pigs. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 559-562
- Ebenezer IS, Pringle AK. The effect of systemic administration of baclofen on food intake in rats. *Neuropharmacology* 1992; 31: 39-42
- Seoane JR, Dumont F, Girard CL, Bedard L, Matte JJ. Effects of intraventricular injections of gamma-aminobutyric acid and related substances on feeding behavior in satiated sheep. *Can J Physiol Pharmacol* 1984; 62: 1296-1299
- Kelly J, Rothstein J, Grossman SP. GABA and hypothalamic feeding systems. I. Topographic analysis of the effects of microinjections of muscimol. *Physiol Behav* 1979; 23: 1123-1134
- Rao TL, Kokare DM, Sarkar S, Khisti RT, Chopde CT, Subhedar N. GABAergic agents prevent alpha-melanocyte stimulating hormone induced anxiety and anorexia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 76: 417-423
- Bowery NG, Hudson AL, Price GW. GABA A and GABA B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1987; 20: 365-383
- Kelly J, Grossman SP. GABA and hypothalamic feeding systems. II. A comparison of GABA, glycine and acetylcholine agonists and their antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* 1979; 11: 647-652
- Tsujii S, Bray GA. GABA-related feeding control in genetically obese rats. *Brain Res* 1991; 540: 48-54
- Alheid GF, Heimer L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 1988; 27: 1-39
- Sutin J, McBride RL, Thalmann RH, Van Atta EL. Organization of some brainstem and limbic connections of the hypothalamus. *Pharmacol Biochem*

■名词解释

1 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA): 是一种抑制性神经递质, 广泛存在于哺乳动物中枢神经系统中.

2 荷包牡丹碱(bicuculline): γ -氨基丁酸A受体特异性竞争性拮抗剂.

3 musimol: γ -氨基丁酸选择性A受体激动剂.

■同行评价

本文对GABA的一般情况及其在摄食和味觉的调制作用进行了详细的综述，全文文笔流畅，内容新颖，有一定的科学性和创新性和可读性，对医学基础研究工作有一定的指导作用。

- Behav 1975; 3: 49-59
- 16 Minano FJ, Meneres Sancho MS, Sancibrian M, Salinas P, Myers RD. GABAA receptors in the amygdala: role in feeding in fasted and sated rats. *Brain Res* 1992; 586: 104-110
- 17 Higgs S, Barber DJ. Effects of baclofen on feeding behaviour examined in the runway. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28: 405-408
- 18 Patel SM, Ebenezer IS. The effects of intraperitoneal and intracerebroventricular administration of the GABAB receptor antagonist CGP 35348 on food intake in rats. *Eur J Pharmacol* 2004; 503: 89-93
- 19 Krolczyk G, Laskiewicz J, Sobocki J, Matyja A, Kolasinska-Kloch W, Thor PJ. The effects of baclofen on the feeding behaviour and body weight of vagally stimulated rats. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 121-131
- 20 Kandov Y, Israel Y, Kest A, Dostova I, Verasammy J, Bernal SY, Kasselman L, Bodnar RJ. GABA receptor subtype antagonists in the nucleus accumbens shell and ventral tegmental area differentially alter feeding responses induced by deprivation, glucoprivation and lipoprivation in rats. *Brain Res* 2006; 1082: 86-97
- 21 White BD, Du F, Higginbotham DA. Low dietary protein is associated with an increase in food intake and a decrease in the *in vitro* release of radiolabeled glutamate and GABA from the lateral hypothalamus. *Nutr Neurosci* 2003; 6: 361-367
- 22 Houston AJ, Wong JC, Ebenezer IS. Effects of subcutaneous administration of the gamma-aminobutyric acid(A) receptor agonist muscimol on water intake in water-deprived rats. *Physiol Behav* 2002; 77: 445-450
- 23 Cooper SJ, Estall LB. Behavioural pharmacology of food, water and salt intake in relation to drug actions at benzodiazepine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 1985; 9: 5-19
- 24 Cooper SJ. Benzodiazepine mechanisms and drinking in the water-deprived rat. *Neuropharmacology* 1982; 21: 775-780
- 25 Tallman JF. Agonist and antagonist interactions at benzodiazepine receptors. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1983; 38: 21-27
- 26 Ebenezer IS, Houston AJ, Crook TJ. Systemic administration of baclofen inhibits water intake in rats. *Gen Pharmacol* 1992; 23: 375-379
- 27 Hammond DL. GABA(B) receptors: new tricks by an old dog. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 26-30
- 28 Soderpalm AH, Berridge KC. Food intake after diazepam, morphine or muscimol: microinjections in the nucleus accumbens shell. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 66: 429-434
- 29 Davidowa H, Ziska T, Plagemann A. GABA receptor antagonists prevent abnormalities in leptin, insulin and amylin actions on paraventricular hypothalamic neurons of overweight rats. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 1248-1254
- 30 Coppola JD, Horwitz BA, Hamilton J, Blevins JE, McDonald RB. Reduced feeding response to muscimol and neuropeptide Y in senescent F344 rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R1492-1498
- 31 Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE. The amygdala is critical for opioid-mediated binge eating of fat. *Neuroreport* 2004; 15: 1857-1860
- 32 Khaimova E, Kandov Y, Israel Y, Cataldo G, Hadjimarkou MM, Bodnar RJ. Opioid receptor subtype antagonists differentially alter GABA agonist-induced feeding elicited from either the nucleus accumbens shell or ventral tegmental area regions in rats. *Brain Res* 2004; 1026: 284-294
- 33 Echo JA, Lamonte N, Ackerman TF, Bodnar RJ. Alterations in food intake elicited by GABA and opioid agonists and antagonists administered into the ventral tegmental area region of rats. *Physiol Behav* 2002; 76: 107-116
- 34 Viggiano A, Monda M, Viggiano A, Fuccio F, De Luca B. Extracellular GABA in the medial hypothalamus is increased following hypocretin-1 administration. *Acta Physiol Scand* 2004; 182: 89-94
- 35 Backberg M, Ultenius C, Fritschy JM, Meister B. Cellular localization of GABA receptor alpha subunit immunoreactivity in the rat hypothalamus: relationship with neurones containing orexigenic or anorexigenic peptides. *J Neuroendocrinol* 2004; 16: 589-604
- 36 Harthoorn LF, Sane A, Nethe M, Van Heerikhuize JJ. Multi-transcriptional profiling of melanin-concentrating hormone and orexin-containing neurons. *Cell Mol Neurobiol* 2005; 25: 1209-1223
- 37 Flier JS. AgRP in energy balance: Will the real AgRP please stand up? *Cell Metab* 2006; 3: 83-85
- 38 Obata H, Shimada K, Sakai N, Saito N. GABAergic neurotransmission in rat taste buds: immunocytochemical study for GABA and GABA transporter subtypes. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 49: 29-36
- 39 Python F, Stocker RF. Immunoreactivity against choline acetyltransferase, gamma-aminobutyric acid, histamine, octopamine, and serotonin in the larval chemosensory system of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 2002; 453: 157-167
- 40 Yamamoto T, Nagai T, Shimura T, Yasoshima Y. Roles of chemical mediators in the taste system. *Jpn J Pharmacol* 1998; 76: 325-348
- 41 Sharp AA, Finger TE. GABAergic modulation of primary gustatory afferent synaptic efficacy. *J Neurobiol* 2002; 52: 133-143
- 42 Lopez-Garcia JC, Bermudez-Rattoni F, Tapia R. Release of acetylcholine, gamma-aminobutyrate, dopamine and glutamate, and activity of some related enzymes, in rat gustatory neocortex. *Brain Res* 1990; 523: 100-104
- 43 Cai YQ, Cai GQ, Liu GX, Cai Q, Shi JH, Shi J, Ma SK, Sun X, Sheng ZJ, Mei ZT, Cui D, Guo L, Wang Z, Fei J. Mice with genetically altered GABA transporter subtype I (GAT1) expression show altered behavioral responses to ethanol. *J Neurosci Res* 2006
- 44 King MS. Distribution of immunoreactive GABA and glutamate receptors in the gustatory portion of the nucleus of the solitary tract in rat. *Brain Res Bull* 2003; 60: 241-254
- 45 Heck WL, Basaraba AM, Slusarczyk A, Schweitzer L. Early GABA(A) receptor clustering during the development of the rostral nucleus of the solitary tract. *J Anat* 2003; 202: 387-396
- 46 Brown M, Renehan WE, Schweitzer L. Changes in GABA-immunoreactivity during development of the rostral subdivision of the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience* 2000; 100: 849-859
- 47 Lasiter PS, Kachele DL. Organization of GABA and GABA-transaminase containing neurons in the gustatory zone of the nucleus of the solitary tract.

- 48 *Brain Res Bull* 1988; 21: 623-636
- 48 Leonard NL, Renehan WE, Schweitzer L. Structure and function of gustatory neurons in the nucleus of the solitary tract. IV. The morphology and synaptology of GABA-immunoreactive terminals. *Neuroscience* 1999; 92: 151-162
- 49 Smith DV, Li CS. GABA-mediated corticofugal inhibition of taste-responsive neurons in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res* 2000; 858: 408-415
- 50 Smith DV, Li CS. Tonic GABAergic inhibition of taste-responsive neurons in the nucleus of the solitary tract. *Chem Senses* 1998; 23: 159-169
- 51 Smith DV, Liu H, Vogt MB. Neural coding of aversive and appetitive gustatory stimuli: interactions in the hamster brain stem. *Physiol Behav* 1994; 56: 1189-1196
- 52 Wang L, Bradley RM. Influence of GABA on neurons of the gustatory zone of the rat nucleus of the solitary tract. *Brain Res* 1993; 616: 144-153
- 53 Wang M, Yao Y, Kuang D, Hampson DR. Activation of family C G-protein-coupled receptors by the tripeptide glutathione. *J Biol Chem* 2006; 281: 8864-8870
- 54 Reynolds SM, Berridge KC. Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste "liking"/"disliking" reactions, place preference/avoidance, and fear. *J Neurosci* 2002; 22: 7308-7320
- 55 Shimura T, Imaoka H, Yamamoto T. Neurochemical modulation of ingestive behavior in the ventral pallidum. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 1596-1604
- 56 Kobashi M, Bradley RM. Effects of GABA on neurons of the gustatory and visceral zones of the parabrachial nucleus in rats. *Brain Res* 1998; 799: 323-328
- 57 Kang Y, Yan J, Huang T. Microinjection of bicuculline into the central nucleus of the amygdala alters gustatory responses of the rat parabrachial nucleus. *Brain Res* 2004; 1028: 39-47
- 58 Narusuye K, Kinugawa A, Nagahama T. Responses of cerebral GABA-containing CBM neuron to taste stimulation with seaweed extracts in Aplysia kurodai. *J Neurobiol* 2005; 65: 146-156
- 59 Shimura T, Watanabe U, Yanagawa Y, Yamamoto T. Altered taste function in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamate decarboxylase. *Neurosci Lett* 2004; 356: 171-174
- 60 Cooper SJ, Ridley ET. Abecarnil and palatability: taste reactivity in normal ingestion in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 81: 517-523
- 61 Cooper SJ, Higgs S. Benzodiazepine effects on licking responses for sodium chloride solutions in water-deprived male rats. *Physiol Behav* 2005; 85: 252-258
- 62 Cooper SJ. Palatability-dependent appetite and benzodiazepines: new directions from the pharmacology of GABA(A) receptor subtypes. *Appetite* 2005; 44: 133-150
- 63 Soderpalm AH, Hansen S. Benzodiazepines enhance the consumption and palatability of alcohol in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1998; 137: 215-222
- 64 Blednov YA, Walker D, Alva H, Creech K, Findlay G, Harris RA. GABA_A receptor alpha 1 and beta 2 subunit null mutant mice: behavioral responses to ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 854-863

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会

本刊讯 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会将于2006年秋季在重庆举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文及摘要800字(附软盘), 2006-07-15截稿.

2 联系方式

重庆市第三军医大学西南医院消化科赵晶京收(邮编: 400038); E-mail: zhaojingjing-1@sina.com.

中药复方肝癌宁对肝癌细胞生长和AFP分泌的抑制作用

袁冬生, 王新华, 刘东辉, 朱彩平, 石磊

■背景资料
肿瘤细胞的无限增殖造成人体的损伤。甲胎蛋白(AFP)是肝癌的主要血清学标志物。因此, 观察中药抗肝癌活性时, 检测药物的抑瘤作用以及对肝癌细胞分泌AFP的抑制作用, 是肝脏肿瘤的基础和临床研究中的重要研究方法。

袁冬生, 刘东辉, 广州中医药大学职业技术学院 广东省广州市 510405
王新华, 广州中医药大学校长办公室 广东省广州市 510405
朱彩平, 石磊, 广州中医药大学05级硕士生 广东省广州市 510405
广东省科技厅科技计划资助项目, No. 2005B33001032
通讯作者: 袁冬生, 510405, 广东省广州市, 广州中医药大学职业技术学院, ydshy@21cn.com
电话: 020-36585519 传真: 020-36585521
收稿日期: 2006-02-22 接受日期: 2006-03-07

Inhibitory effect of composite Gan'aining on growth and alpha-fetoprotein secretion of human hepatoma cells

Dong-Sheng Yuan, Xin-Hua Wang, Dong-Hui Liu,
Cai-Ping Zhu, Lei Shi

Dong-Sheng Yuan, Dong-Hui Liu, Professional Technology College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Xin-Hua Wang, Headmaster's Office, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Cai-Ping Zhu, Lei Shi, Postgraduate of Grade 2005, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Supported by the Science and Technology Programs of Guangdong Province, No. 2005B33001032

Correspondence to: Dong-Sheng Yuan, Professional Technology College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 10405, Guangdong Province, China. ydshy@21cn.com
Received: 2006-02-22 Accepted: 2006-03-07

Abstract

AIM: To investigate the effects of composite Gan'aining (CGN) on the growth and alpha-fetoprotein (AFP) secretion of human hepatoma cells.

METHODS: Mice bearing human hepatoma were treated with CGN (10, 5, and 2.5 g/kg per day), and the tumor growth was observed. *In vitro* inhibitory effect of CGN (45 g/L) was detected by MTT assay, and the secretion of AFP was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: CGN inhibited the growth of the transplanted hepatoma in a dose-dependent

manner ($r = 10, P < 0.01$), and the tumor inhibition rate was 54.5% ($P < 0.01$) when 10 g/kg CGN was used. In comparison with that in the controls, the growth of HepG₂ cells was significantly inhibited at 4, 5 and 6 d (7.0 ± 1.3 vs $10.3 \pm 0.9, P < 0.05$; 12.1 ± 0.4 vs $21.3 \pm 0.9, P < 0.01$; 15.2 ± 0.3 vs $45.6 \pm 0.6, P < 0.01$), and the secretion of AFP was decreased (39.6 ± 1 vs 54.5 ± 3 ; 20.8 ± 2 vs 45.6 ± 4 ; 18.5 ± 2 vs 40.2 ± 3 ; all $P < 0.01$).

CONCLUSION: CGN can inhibit the growth of hepatoma cells HepG₂ *in vitro* and *in vivo*, and also decrease AFP secretion of HepG₂ cells.

Key Words: Composite Gan'aining; Liver cancer; Alpha-fetoprotein

Yuan DS, Wang XH, Liu DH, Zhu CP, Shi L. Inhibitory effect of composite Gan'aining on growth and alpha-fetoprotein secretion of human hepatoma cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1912-1915

摘要

目的: 研究中药复方肝癌宁对人肝癌细胞体内、外生长及其对甲胎蛋白(AFP)分泌的影响。

方法: 以小鼠移植人肝癌模型观察药物(每天10, 5, 2.5 g/kg)的体内抗肝癌作用。以MTT法测定复方肝癌宁(45 g/L)的体外抗肝癌活性, 以ELISA检测AFP分泌量。

结果: 10 g/kg对小鼠移植人肝癌HepG₂移植瘤的生长有明显抑制作用, 抑瘤率为54.5% ($P < 0.01$), 且呈量效关系($r = 10, P < 0.01$)。与空白对照组相比, 复方肝癌宁45 g/L作用4, 5, 6 d时体外培养的人肝癌HepG₂细胞株的生长明显抑制(7.0 ± 1.3 vs $10.3 \pm 0.9, P < 0.05$; 12.1 ± 0.4 vs $21.3 \pm 0.9, P < 0.01$; 15.2 ± 0.3 vs $45.6 \pm 0.6, P < 0.01$), AFP分泌量也明显减少(39.6 ± 1 vs 54.5 ± 3 ; 20.8 ± 2 vs 45.6 ± 4 ; 18.5 ± 2 vs 40.2 ± 3 ; 均 $P < 0.01$)。

结论: 中药复方肝癌宁能明显的抑制肝癌 HepG₂细胞生长及AFP分泌水平。

关键词: 复方肝癌宁; 肝肿瘤; 甲胎蛋白

袁冬生, 王新华, 刘东辉, 朱彩平, 石磊. 中药复方肝癌宁对肝癌细胞生长和AFP分泌的抑制作用. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1912-1915
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1912.asp>

0 引言

中药复方肝癌宁临幊上应用于治疗肝癌, 对抑制肿瘤生长, 延缓肿瘤患者生命有很好的疗效. 体外实验研究表明, 复方肝癌宁具有很好的抑制HBsAg、HBeAg分泌和显著的抗HBV作用^[1]. 我们从复方肝癌宁体内对小鼠肝癌HepG₂移植瘤的抑制作用以及体外抑制人肝癌HepG₂细胞生长、降低AFP分泌水平方面再作进一步研究.

1 材料和方法

1.1 材料 分别称取叶下珠50 g、青蒿50 g、云芝40 g、广豆根20 g、莪术20 g、菟丝子40 g. 上述药材使用地道药材, 从本地医药公司购买, 经本校中药鉴定教研室鉴定. 实验用水煎剂, 将叶下珠、青蒿、云芝、广豆根、莪术、菟丝子按上述药量置陶器内加水1 L浸泡1 h后煎煮, 沸后1 h取出药液, 药渣再加水1 L煎煮1 h, 将2次药液混合后浓缩成1000 g/L浓度(即溶液内含生药1 g)的药液, 用双层纱布过滤后4℃冰箱保存备用, 实验时稀释成所需浓度. 环磷酰胺(CTX), 上海华联制药有限公司生产; DMEM, Hanms F12培养基干粉, 美国Giaco公司产品; 小牛血清, MTT, Sigma产品; AFP酶联免疫测定试剂盒, 华美公司产品. 选用NIH小鼠, 4-5周龄, 体质量18-22 g, 雌雄各半, 由本校实验动物中心提供. 小鼠肝癌HepG₂细胞株由中山大学肿瘤研究所引进, 具有很强的分泌AFP的生物学特性^[2].

1.2 方法

1.2.1 复方肝癌宁对小鼠肝癌HepG₂移植瘤的作用 取HepG₂瘤性腹水传代, 以Hanks液1:3稀释, 细胞计数, 约含 3×10^9 个细胞/L, 每只小鼠腋下接种0.2 mL. 将50只小鼠随机分成5组, 每组10只: 药物高剂量组、药物中剂量组、药物低剂量组、空白对照组、环磷酰胺组. 均行腋下接种HepG₂瘤性腹水液, 24 h后, 药物组按每日10 g, 5, 2.5 g/kg三组灌胃中药复方制剂, 环磷酰胺组75 mg/kg, 对照组生理盐水灌胃. 连续给药7 d, 停药后24 h处死小鼠取瘤, 测量鼠质量和瘤体质量, 计算平均值, 并计算肿瘤抑制率.

1.2.2 复方肝癌宁对肿瘤细胞生长的影响 细胞株置在无菌及含150 mL/L小牛血清的DMEM培

养液中, 2 d更换1次培养液; 当细胞长到茂密时, 用2.5 g/L胰酶消化传代. 设空白对照组和复方肝癌宁组, 观察不同浓度复方肝癌宁对HepG₂细胞生长的影响.

1.2.3 复方肝癌宁对HepG₂细胞AFP分泌量的影响 AFP含量采用ELISA方法检测. 接种 1×10^7 /L细胞于24孔培养板中, 设空白对照组和复方肝癌宁组(药物浓度为45 g/L). 培养液每24 h更换1次, 每天收集细胞上清液, 测定细胞24 h的AFP分泌量, 结果换算成 $\mu\text{g}/\text{细胞单位}$. 具体步骤按照试剂盒说明书操作.

统计学处理 肿瘤抑制率采用方差分析、t检验进行比较分析; MTT法和ELISA法统计采用两组标本计量资料的t检验方法.

2 结果

2.1 对小鼠HepG₂肝癌移植瘤的抑制作用 复方肝癌宁对人肝癌细胞移植瘤的抑制率(54.5%)不及环磷酰胺(69.8%), 但复方肝癌宁高、中、低剂量组实验动物体质量增加(9.5%), 环磷酰胺组实验动物体质量减少(9%); 复方肝癌宁高、中、低剂量组与抑制率呈量效关系(表1).

2.2 体外对人肝癌细胞生长的影响 应用不同浓度的复方肝癌宁作用于人肝癌HepG₂细胞, 发现当浓度为45 g/L时, 对肝癌细胞生长产生明显的抑制作用. 在接种后第6天, 用药组细胞为对照组的1/3(表2).

2.3 复方肝癌宁对人肝癌细胞AFP分泌量的影响 复方肝癌宁在45 g/L对人肝癌HepG₂细胞生长产生明显的抑制作用, 但细胞形态的改变不明显, 因此选择此浓度观察对人肝癌HepG₂细胞AFP分泌的影响(表2).

3 讨论

目前, 关于中药复方治疗肝癌的实验研究, 主要从直接抑制肝癌细胞增长^[3-6]、调节免疫功能^[7-10]、诱导肝癌细胞凋亡和分化^[11-15]、对肝癌基因的表达^[16-17]以及抑制肝癌前病变^[18-21]等几方面进行. 复方肝癌宁为纯中药复方制剂, 由叶下珠、青蒿、云芝、广豆根、莪术、菟丝子等组成. 研究表明该复方药物青蒿^[22-23]、莪术^[24-25]、叶下珠^[26]、广豆根^[27-31]、云芝^[32]等均有较好的抗肝癌作用. 前期研究表明, 我们发现复方肝癌宁在浓度为10 g/kg时对人肝癌HepG₂移植瘤的抑制率为54.5%, 且呈量效关系. AFP是肝癌细胞分泌的最具特征性的癌胚抗原, 在临幊上作为

■创新盘点

目前, 关于中药复方治疗肝癌的实验研究, 主要从直接抑制肝癌细胞生长、调节免疫功能、诱导肝癌细胞凋亡和分化、对肝癌基因的表达以及抑制肝癌前病变等几方面进行. AFP是肝癌细胞分泌的最具特征性的癌胚抗原 AFP对人肝癌HepG₂细胞亦有促生长作用. 本研究从观察药物对肝癌HepG₂细胞分泌AFP的抑制作用着手, 为中药复方肝癌宁的抗肝癌活性的机制和进一步临幊治疗奠定了基础.

■应用要点

AFP在临幊上作为原发性肝癌诊断的重要生化指标,也被视为评价抗癌疗效的一项重要标准。

表1 复方肝癌宁对小鼠HepG₂肝癌移植瘤的抑制作用

分组	剂量(g/(kg·d))	治疗前鼠质量(g)	治疗后鼠质量(g)	瘤质量(mean ± SD, g)	抑瘤率(%)
生理盐水	0.2 mL	20.2	22.0	2.336 ± 0.434	
CTX	0.075	20.5	18.5	0.706 ± 0.387 ^a	69.8
药物高	10	21.0	22.0	1.064 ± 0.523 ^a	54.5
药物中	5	21.7	22.4	1.584 ± 0.502 ^a	32.2
药物低	2.5	20.5	21.6	1.968 ± 0.387 ^b	15.8

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 生理盐水组.

表2 复方肝癌宁(45 g/L)对人肝癌HepG₂细胞生长的影响 (mean ± SD)

药物作用天数	肝癌HepG ₂ 细胞生长		AFP分泌量	
	空白对照组	复方肝癌宁	空白对照组	复方肝癌宁
1	2.2 ± 0.6	1.9 ± 0.4	58.6 ± 2	51.2 ± 2
2	1.5 ± 0.5	1.7 ± 0.3	96.4 ± 1	40.1 ± 1 ^b
3	5.5 ± 2.3	3.2 ± 1.5	51.5 ± 1	38.3 ± 2 ^b
4	10.3 ± 0.9	7.0 ± 1.3 ^a	54.5 ± 3	39.6 ± 1 ^b
5	21.3 ± 0.9	12.1 ± 0.4 ^b	45.6 ± 4	20.8 ± 2 ^b
6	45.6 ± 0.6	15.2 ± 0.3 ^b	40.2 ± 3	18.5 ± 2 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组.

原发性肝癌诊断的重要生化指标. AFP对人肝癌 HepG₂细胞亦有促生长作用^[33], 能明显促进小鼠肝癌H22细胞及艾氏腹水瘤(EAC)细胞在体外的生长^[34], 复方肝癌宁在体外具有抗肝癌活性, 抑制肝癌细胞生长, 与其对AFP的选择性抑制作用以及诱导细胞凋亡^[35]有关; 在体内具有较强的抗肝癌活性, 除与降低AFP分泌水平有关外, 还与其全身作用有关. 至于是否与抑制AFP基因表达, 拮抗AFP对人肝癌HepG₂细胞的促进作用, 有待进一步研究.

4 参考文献

- 袁冬生, 王新华, 李常青, 肖会泉. 复方肝癌宁抗乙型肝炎病毒的体外实验研究. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1292-1294
- Darlington GJ, Kelly JH, Buffone GJ. Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; 23: 349-354
- 杨书兰, 邝幸华, 朱宇同. 叶下珠复方制剂对小鼠肝癌的抑制作用的实验研究. 癌症 2000; 19: 837-838
- 朱梅菊, 郭振球, 唐发清. 新制抗癌方对肝癌荷瘤鼠的治疗作用. 中医药研究 2000; 16: 36-37
- 高俊峰, 王长进, 徐德新, 刘今方, 郝宏党. 中药消结灵抗小鼠肝癌细胞机理的实验研究. 中国医科大学学报 1997; 26: 126-129
- 刘长利, 吴苏冬, 王慧川, 鲍德虎. 中药复方“参白胶囊”对肝癌细胞抑制作用的实验研究. 肿瘤研究与临
床 2002; 14: 147-151
7 李秀娟, 刘福英, 张焕玲, 王俊霞. 复肝春6号对H₂₂荷瘤小鼠的抑瘤及免疫的调节作用. 中国老年学杂志 2006; 26: 92-93
8 周淑英, 卢振初, 王俊先, 元寿海, 陈惠英, 刘文虎. 黄芪多糖(APS)抗肿瘤作用的实验研究. 药物生物技术 1995; 2: 22-25
9 王宇环, 王俊先, 邓衍增, 卞美广. 扶正抑瘤冲剂扶正抗癌作用实验研究. 时珍国医国药 2000; 11: 1065-1066
10 张天娥, 骆永珍, 闫智勇, 王宇. 克癌临对荷肝癌(H₂₂)小鼠IL-2和NK细胞活性的影响. 华西医学 2000; 15: 477-478
11 陈涛, 陈龙飞, 金国琴, 李丹. 珠子参体外诱导人肝癌细胞凋亡效应及机制研究. 肿瘤 2006; 26: 144-147
12 晏雪生, 李瀚旻, 彭亚琴, 明安萍. 苦药甙诱导人肝癌细胞系HepG2凋亡的研究. 中西医结合肝病杂志 2006; 16: 18-20
13 韩克起, 黄传继. 扶正抗癌方对大鼠移植性肝癌病理形态及超微结构的影响. 中西医结合肝病杂志 1999; 9: 25-26
14 林礼务, 何以救, 高上达, 杨发端, 叶真, 薛恩生. 复方中药经皮瘤内注射诱导肝细胞癌凋亡. 中国医学影像技术 2002; 18: 6-8
15 吴雄志, 陈丹, 陆重琳. 中药诱导肝癌细胞分化研究纂要. 中医药学刊 2005; 23: 285-286
16 袁淑兰, 黄韧敏, 王修杰, 宋毅, 黄光琦. 丹参酮对人肝癌细胞某些表型的逆转作用. 肿瘤 1997; 17: 268-270
17 王昌俊, 陈伟, 钱伯文. 中药复方AC₉₆₀对人肝癌细胞p21^{ras}、bcl-2、P⁵³基因表达调控作用的研究. 中国中医药科技 2000; 7: 10-12
18 王晓素, 刘成, 刘平, 徐列明, 胡义扬, 朱剑亮, 梁新敏, 李风华. 养阴方对实验性肝癌诱癌过程的影响. 中西

- 医结合肝病杂志 1995; 5: 25-27
 19 吴万琨, 于尔辛, 钱耕耘. 健脾理气合剂对HBV转基因小鼠肝脏AFB₁解毒活力变化的影响. 新中医 1998; 30: 27-29
- 管冬元, 方肇勤, 李海燕. 抑癌方与喃氟啶对DEN所致大鼠肝癌抑制作用的比较. 中西医结合肝病杂志 1999; 9: 19-21
 20 曹承楼, 王育群, 季光, 张玮. 人参鳖甲丸对肝硬变大鼠肝细胞异常增殖的影响. 中西医结合肝病杂志 1999; 9: 22-24
 21 陈绍芳, 徐亦益, 刘祥麟, 马洁羽, 于晓宏, 贾旭玲, 朱家光. 青蒿琥酯对小鼠Heps肝癌的抑瘤作用. 中国肿瘤 2004; 13: 375-378
 22 叶启翔, 陆羨. 青蒿素类药物抗肿瘤作用研究进展. 实用医学杂志 2006; 22: 600-601
 23 王娟, 王顺启, 倪虹, 陈力, 宋文芹. 药术挥发油抑制人肝癌细胞株SMMC-7721生长的实验研究. 天津中医药 2003; 20: 48-51
 24 丁玉玲, 徐爱秀. 药术油及其有效组分抗肿瘤研究. 中药材 2005; 28: 152-156
 25 张建军, 黄育华, 晏雪生, 张赤志, 盛国光, 王伯祥. 叶下珠药物血清对人肝癌细胞株的诱导分化作用的实验研究. 中国中医药科技 2002; 9: 289-291
 26 马玲娣, 张彦, 文世宏, 何於娟, 康格非, 蒋纪恺. 苦参碱对小鼠H₂₂细胞抗肿瘤作用的实验研究. 重庆医科大学学报 2005; 30: 178-182
 27 左国庆, 何松, 张燕, 汤为学. 苦参素改变端粒酶活性对人肝癌细胞株HepG2、QGY体外增殖影响的研究. 肿瘤学杂志 2005; 11: 126-129
 28 陈坚. 苦参防治肝癌实验研究进展. 上海中医药杂志 2006; 40: 60-61
 29 王云, 龙发. 苦参抗肿瘤机制的研究进展. 现代肿瘤医学 2005; 13: 280-282
 30 林明华, 高艳华, 姚海涛, 王抒, 卢凤美, 赵晓莲, 杨利敏. 苦参素对大鼠肝星状细胞形态的影响. 黑龙江医药科学 2003; 26: 22-23
 31 潘伟光, 陈小君, 洪励坚, 潘启超. 云芝提取液的抗癌作用. 癌症 1997; 16: 425-427
 32 Semenkova LN, Dudich EI, Dudich IV. Induction of apoptosis in human hepatoma cells by alpha-fetoprotein. *Tumour Biol* 1997; 18: 261-273
 33 Wang XW, Xu B. Stimulation of tumor-cell growth by alpha-fetoprotein. *Int J Cancer* 1998; 75: 596-599
 34 袁冬生, 王新华, 李常青, 刘妮. 复方肝癌宁含药血清诱导肝癌HepG₂细胞凋亡的实验研究. 世界华人消化杂志 2006; 14: 522-525

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会 暨第三届全国普通外科主任论坛通知

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行.

在各方面的大力支持下, 国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会已于2004-12在武汉成功举办, 与会代表一千余人, 中国人大副委员长吴阶平院士、国际肝胆胰前主席刘允怡教授、Jim Tooli教授, 国际肝胆胰协会候任主席Büechler教授和欧洲肝胆胰协会主席Broelsch教授等亲自到会. 会议受到国内外专家及到会代表的一致赞赏, 并受到国际肝胆胰协会的通报好评, 会议取得巨大成功.

第二届会议将邀请国外和国内著名专家做专题讲座, 针对国际国内肝胆胰外科进展及近年来的热点、难点问题进行讨论; 并交流诊治经验, 推广新理论、新技术、新方法, 了解国内外肝胆胰疾病诊断、治疗发展趋势; 同时放映手术录像. 大会热烈欢迎全国各地肝胆胰领域的内科、外科、影像科各级医师以及科研人员积极投稿和报名参加.

会议同时召开第三届全国普外科主任论坛, 因此也欢迎从事医疗卫生管理的各级医院正、副院长及正、副主任积极投稿和报名参加.

本次会议已列入2006年国家级继续医学教育项目, 参会代表均授予国家级继续医学教育学分10分.

来稿要求: 寄全文及500-800字论文摘要, 同时寄论文的软盘一份或发电子邮件. 以附件的形式发送至chenxp@medmail.com.cn, 也可将稿件打印后寄至: 武汉市解放大道1095号, 武汉华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所张志伟、黄志勇副教授(收), 邮编: 430030; 联系电话: 027-83662599.

雷帕霉素抑制JAK/STAT通路对急性肝损伤大鼠肝组织HMGB1表达的影响

张芸, 赵中夫, 韩德五, 王锋, 许瑞龄, 刘明社

■背景资料

近年的研究发现, 内毒素和细胞因子等刺激巨噬细胞时, HMGB1这种能对DNA重组、修复、复制和基因转录起重要作用的核内结构蛋白会被释放到胞外, 介导炎症反应。JAK/STAT通路是多种细胞因子发挥作用的重要信号通路。HMGB1是否通过JAK/STAT通路参与急性肝损伤病理过程目前尚不完全清楚。

张芸, 赵中夫, 刘明社, 山西长治医学院肝病研究所 山西省长治市 046000
韩德五, 王锋, 许瑞龄, 山西医科大学肝病研究所 山西省太原市 030001

通讯作者: 赵中夫, 046000, 山西省长治市解放东街161号, 长治医学院肝病研究所. zhaozf_1226@163.com
电话: 0355-3012335 传真: 0355-3034065
收稿日期: 2006-03-20 接受日期: 2006-05-08

Rapamycin-induced inhibition of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway affects expression of high-mobility group box 1 in rats with acute liver injury

Yun Zhang, Zhong-Fu Zhao, De-Wu Han, Feng Wang, Rei-Ling Xu, Ming-She Liu

Yun Zhang, Zhong-Fu Zhao, Ming-She Liu, Institute of Hepatology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi Province, China

De-Wu Han, Feng Wang, Rei-Ling Xu, Institute of Hepatology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Correspondence to: Professor Zhong-Fu Zhao, Institute of Hepatology, Changzhi Medical College, 161 Jiefang East Road, Changzhi 046000, Shanxi Province, China. zhaozf_1226@163.com

Received: 2006-03-20 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of rapamycin (RPM) on the expression of high-mobility group box 1 (HMGB1) in rats with acute liver injury (ALI) by inhibiting Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway.

METHODS: Wistar rats were randomly divided into normal control group ($n = 30$), ALI group ($n = 30$) and RPM treatment group ($n = 30$). ALI was induced by intraperitoneal administration of D-Galactosamine/lipopolysaccharide (D-Galn/LPS). The animals in each group were sacrificed at different time points to collect the blood and hepatic tissue samples for the detec-

tion of alanine aminotransferase (ALT) level and HMGB1 expression, respectively.

RESULTS: In comparison with that in the normal controls (1.00 ± 0.02), HMGB1 expression was significantly increased in liver tissues 24, 48 and 72 h after ALI (3.12 ± 0.06 , 3.9 ± 0.08 , 2.83 ± 0.04 , respectively, $t = 16.01$, 3.86 , 10.46 , all $P < 0.01$), and serum ALT levels were markedly elevated. The expression of HMGB1 in liver tissues was dramatically inhibited 24, 48 and 72 h after RPM treatment as compared with that in ALI group (1.67 ± 0.05 vs 3.12 ± 0.06 ; 1.93 ± 0.06 vs 3.9 ± 0.08 ; 1.47 ± 0.04 vs 2.83 ± 0.04 ; $t = 20.11$, 41.90 , 26.02 , all $P < 0.01$). In addition, serum ALT levels were also markedly reduced during 24-72 h after RPM treatment ($P < 0.01$). HMGB1 expression was positively correlated with ALT level ($r = 0.741$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The activation of JAK/STAT pathway may be involved in the up-regulation of HMGB1 expression in ALI. RPM treatment can markedly down-regulates HMGB1 expression and attenuates ALI.

Key Words: High-mobility group box 1; JAK/STAT; Acute Liver Injury; Rapamycin

Zhang Y, Zhao ZF, Han DW, Wang F, Xu RL, Liu MS. Rapamycin-induced inhibition of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway affects expression of high-mobility group box 1 in rats with acute liver injury. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1916-1920

摘要

目的: 探讨雷帕霉素抑制JAK/STAT通路对急性肝损伤大鼠肝组织HMGB1表达的影响。

方法: 采用D-Galn/LPS复制急性肝损伤(ALI)模型。大鼠随机分为正常对照组($n = 30$)、ALI组($n = 30$)、STAT抑制剂雷帕霉素(RPM)处理组($n = 30$)。用Western blot方法测定肝组织HMGB1蛋白, 全自动生化分析仪测定肝功能

指标.

结果: 与正常对照组HMGB1表达水平(1.00±0.02)相比, ALI组24-72 h HMGB1表达显著升高(3.12±0.06, 3.9±0.08, 2.83±0.04, *t*值分别为16.01, 3.86, 10.46, 均*P*<0.01), 血清丙氨酸转氨酶(ALT)6和24 h有两个峰值, 且24 h峰值高于6 h. 与ALI组相比, RPM预处理组24-72 h HMGB1蛋白表达均显著抑制(1.67±0.05 vs 3.12±0.06; 1.93±0.06 vs 3.9±0.08; 1.47±0.04 vs 2.83±0.04; *t*值分别为20.11, 41.90, 26.02, 均*P*<0.01), ALT在24, 48, 72 h也均有不同程度下降(*P*<0.01). ALT与HMGB1呈正相关(*r*=0.741, *P*<0.01).

结论: 抑制JAK/STAT可明显下调肝组织中HMGB1蛋白表达, 并有助于减轻D-Galn/LPS所致的急性肝损伤.

关键词: 高迁移率族蛋白B1; JAK/STAT; 急性肝损伤; 雷帕霉素

张芸, 赵中夫, 韩德五, 王峰, 许瑞龄, 刘明社. 雷帕霉素抑制JAK/STAT通路对急性肝损伤大鼠肝组织HMGB1表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1916-1920

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1916.asp>

0 引言

高迁移率族蛋白B1(HMGB1)细胞外释放可作为炎症介质参与炎症反应和组织损伤过程^[1-4]. 研究表明, 虽然HMGB1与多种细胞膜上的RAGE受体有较高的亲和力^[5], 但也可以通过TLR2, TLR4等受体通路参与对炎症因子转录和表达^[6-7]. Li *et al*^[8]与Wang *et al*^[9]发现, 在严重烧伤、烫伤后并发金黄色葡萄球菌感染和腹腔感染所致的大鼠肝脏等器官损伤时, HMGB1可以在转录水平上调. 并证明了Janus激酶/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)通路与肝组织HMGB1 mRNA 上调有关. Tsung *et al*^[10]在研究肝组织缺血/再灌注时发现肝组织HMGB1表达增强, 但原发性肝损伤动物HMGB1蛋白表达水平及JAK/STAT通路的作用尚不清楚. 我们观察D-Galn/LPS介导的大鼠急性肝损伤时, HMGB1在蛋白表达水平的变化以及JAK/STAT抑制剂——雷帕霉素(RPM)对HMGB1表达和肝损伤的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 雌雄各半的清洁级Wistar大鼠90只, 180-220 g(山西医科大学动物实验中心提供),

随机分为3组: (1)急性肝损伤组(ALI组, *n*=30): 动物在禁食12 h后同时ip 700 mg/kg D-氨基半乳糖(重庆医科大学生物化学工程学院)和5 μg/kg 内毒素(Sigma公司); (2)STAT3抑制剂——雷帕霉素(天津新美科技开发有限公司)干预组(RPM组, *n*=30): 于建模前1 h sc雷帕霉素溶液0.6 mg/kg (1 mL); (3)正常组(N组, *n*=30): 在相应建模时间点ip等量生理盐水. 各组动物分别于3, 6, 12, 24, 48, 72 h随机取5只动物, 10 g/L的戊巴比妥钠麻醉后, 腹主动脉采血, 加入抑肽酶1 mU/L, 离心将血清分装保存-70℃待检测, 并留取肝组织. 一部分肝组织用40 g/L甲醛固定做HE染色, 另一部分冻存在-70℃用于肝组织HMGB1的检测.

1.2 方法

1.2.1 肝组织HMGB1含量检测 Western blot检测按参考文献[11]操作, 称取各时间点的肝组织100 mg, 于全细胞裂解液中匀浆, 超声处理提取肝组织中的总蛋白, 并测定蛋白浓度, 每个样品取50 mg蛋白以2×上样缓冲液煮沸5 min. 将样品以120 g/L的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并电转移至硝酸纤维素膜上. 50 g/L脱脂奶粉封闭过夜后, 加入1:1000稀释的小鼠抗人HMGB1 mAb(英国Abcam公司), 4℃过夜, TBS洗膜后, 加入1:1000稀释的碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠抗体(美国Sigma公司), 室温孵育2 h, TBS洗膜后, BCIP/NBT显色. *M*_r 30 000处显色条带强弱, 用Image-Pro Plus 5.0凝胶成像分析系统半定量分析, 以显色条带总光密度值(integrated optical density, IOD)表示HMGB1含量.

1.2.2 肝组织病理检查和血浆ALT测定 使用7170自动生化分析仪测定各实验组血清丙氨酸转氨酶(ALT)水平. 将组织于40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μm切片, HE染色, 光镜下观察组织形态学变化.

统计学处理 采用SPSS 13.0软件包分析, 所有实验数据均采用mean±SD表示, *P*<0.05为差异有显著性.

2 结果

2.1 肝组织病理学变化 正常动物肝组织HE染色显示肝小叶结构完整, 无肝细胞变性坏死. ALI组: 6 h后有炎细胞浸润和小片状坏死; 24 h后有大片状肝细胞坏死和肝窦内大量充血, 肝细胞边界模糊; 48 h后肝细胞坏死更加明显, 弥漫性炎细胞浸润; 72 h后肝组织发生大块状坏死, 纤

■研发前沿
目前研究已证实HMGB1是一种重要的晚期细胞因子, HMGB1与炎症关系密切, 有可能成为炎症病情预测的重要指标及临床治疗的重要靶点. 炎症时, 抑制HMGB1的表达可减轻组织的炎症反应, 提高动物的生存率. 因此有关调节HMGB1表达的信号通路及阻断药物是国内外学者关注的热点.

■创新盘点

本实验研究了HMGB1在急性肝损伤模型(ALI)肝组织中的动态变化，并用JAK/STAT抑制剂雷帕霉素减少了ALI动物肝组织HMGB1的表达，减轻了肝损伤。说明HMGB1参与了ALI的病理生理过程，而且HMGB1表达可通过JAK/STAT信号通路进行调节。

表1 ALI大鼠血清ALT水平变化 (mean \pm SD, nkat/L, n = 5)

分组	3	6	12	24	48	72
正常	340 \pm 77	356 \pm 79	346 \pm 78	387 \pm 85	356 \pm 71	393 \pm 71
ALI	1962 \pm 228 ^b	14 312 \pm 760 ^b	4371 \pm 397 ^b	42 890 \pm 1025 ^b	20 306 \pm 873 ^b	14 114 \pm 794 ^b
RPM	1689 \pm 168	7499 \pm 504 ^d	3485 \pm 301 ^d	3078 \pm 159 ^d	697 \pm 79 ^d	4853 \pm 442 ^d

^bP<0.01 vs 正常; ^dP<0.01 vs ALI.

维网状支架塌陷。RPM组：48 h肝细胞发生明显的气球样变，弥漫性炎细胞浸润；72 h肝组织病变也比相应ALI组减轻。

2.2 血清丙氨酸转氨酶水平 正常组各时间点的ALT值无显著性差别。ALI组大鼠ALT在3 h开始升高，6和24 h出现2个高峰，24 h出现的峰值明显高于6 h的峰值($P<0.05$, $P<0.01$)，直到72 h ALT水平仍处于高水平。RPM组大鼠ALT在3-24 h之间总的变化趋势与ALI组一致，但24-72 h ALT水平显著下降，明显低于ALI组($P<0.01$ ，表1)。

2.3 肝组织HMGB1时相变化 Western blot检测结果成像分析，因正常大鼠肝组织中可检测到一定量的HMGB1，所以检测样本HMGB1蛋白相对表达量按如下公式计算：HMGB1蛋白相对表达量 = 各时间点HMGB1带的IOD值 / 正常组HMGB1带IOD值。ALI组大鼠肝组织HMGB1水平在建模后6, 12 h与正常组比较差异无显著性($P>0.05$)；与RPM组比较也无统计学差异($P>0.05$)。建模24 h后，ALI组大鼠肝组织HMGB1表达量明显升高(3.12 ± 0.06)，至48, 72 h仍维持较高水平(3.9 ± 0.08 , 2.83 ± 0.04)，显著高于正常水平($P<0.01$)。而RPM组大鼠肝组织的HMGB1含量24, 48, 72 h明显低于ALI组(1.67 ± 0.05 , 1.93 ± 0.06 , 1.47 ± 0.04 , $P<0.01$ ，图1)。对6只72 h正常组以及ALI组和RPM组各时间点的动物标本的ALT和HMGB1相对含量进行相关性分析(图2)。结果表明，ALT与HMGB1呈正相关($r = 0.741$, $P<0.01$)。

3 讨论

既往认为，早期炎症因子是引起机体失控性炎症反应、组织损伤的关键介质，但早期炎症因子在体内持续时间很短，因此人们推测在这些细胞因子下游可能还存在其他细胞因子参与炎症反应。近期研究表明，细胞外的HMGB1是内毒素血症和脓毒症时的一种晚期炎症因子^[12-13]，

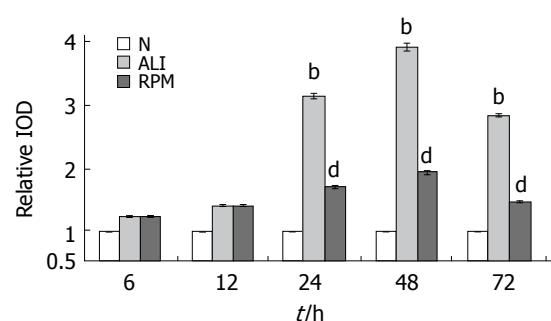


图1 肝组织HMGB1时相变化比较。^bP<0.01 vs N; ^dP<0.01 vs ALI.

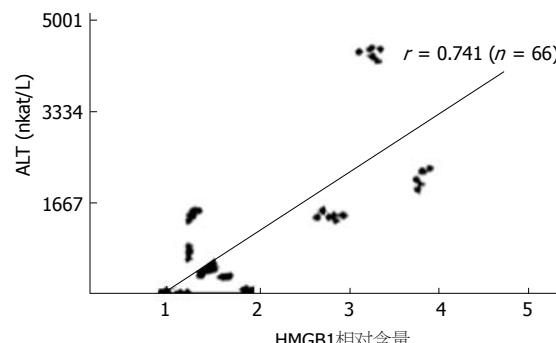


图2 ALT和HMGB1相对含量进行相关性分析。

也是细胞受损、细胞死亡过程中诱导免疫应答的关键信号^[14]。HMGB1特异性抗体或拮抗物对内毒素血症和脓毒症动物具有明显的保护作用^[15-17]。然而，HMGB1是否在急性肝损伤中起作用尚不清楚。我们的研究发现，在Galn/LPS诱导的急性肝损伤时，肝组织中HMGB1蛋白表达明显增强，并且与肝损伤程度一致，提示HMGB1在Galn/LPS所致的急性肝损伤病理生理过程中发挥作用。实验结果还表明，预先给实验动物sc STAT3抑制剂——雷帕霉素(RPM)，可以明显抑制实验动物在24, 48, 72 h HMGB1蛋白的表达($P<0.01$)，并相应的减轻肝组织损伤，明显降低血清ALT水平($P<0.01$)。ALT与HMGB1的相关性分析表明两者呈正相关($r = 0.741$, $P<0.01$)。进一步证明，HMGB1作为炎症级联反

■应用要点

HMGB1是一种晚期炎症介质，他在炎症中具有出现晚、持续时间长的特点。以HMGB1为靶点的抗肝损伤治疗扩大了治疗窗口期；阻断JAK/STAT通路的药物研究为抗炎治疗提供新的思路。

应(inflammatory cascade)的下游细胞因子在介导进一步肝损伤中的作用。

JAK/STAT信号通路激活不仅广泛参与细胞应激、生长、分化、凋亡等多种生物学过程, 而且参与了多种重要致炎/抗炎因子的信号转导及调控过程。JAK有4个成员, STAT主要有7个成员, 其中STAT3与炎症因子IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-4关系密切^[18-20]。而HMGB1又与TNF- α , IFN- γ 等早期细胞因子可以相互诱发^[21-22]。RPM是一种大环内酯类抗生素和免疫抑制剂, 其结构与FK-506相似, 能通过阻断STAT3 727位丝氨酸的磷酸化, 从而抑制STAT3活化和核转位, 进一步下调细胞因子的诱发及病理生理效应^[23]。因此, 本实验中应用的RPM至少可能通过以下途径发挥对GnL/LPS诱导的大鼠急性肝损伤的保护作用: (1)通过抑制JAK/STAT通路, 下调HMGB1蛋白的过度表达^[24], 从而减轻其毒性及致炎作用; (2)通过抑制STAT3的活化, 降低TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6等炎症因子的合成与释放^[25], 从而减轻肝组织炎症反应和损伤, 其进一步的机制尚不清楚。

HMGB1作为一种晚期炎症介质具有与TNF- α 等重要炎症介质同等重要的促炎作用^[26-28]。但值得指出的是, HMGB1与早期促炎细胞因子相比具有出现晚, 且持续时间长的特点。因此, HMGB1拮抗物以及抑制其表达和释放药物能扩大抗炎治疗的窗口期, 为有效阻断炎症级联反应(inflammatory cascade)和有效缓解炎症反应提供了靶点和时机。另外, HMGB1可以通过两种途径释放到细胞外。肝组织中存在大量可表达HMGB1的巨噬细胞、内皮细胞、中性粒细胞等, 在急性肝损伤时, 既可以由坏死的肝细胞释放HMGB1, 也可以由激活的炎细胞等释放。GnL/LPS介导的急性肝损伤实验动物肝组织HMGB1蛋白表达增加, 是以炎细胞激活主动分泌增加为主, 还是有坏死细胞被动释放为主有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Sun NK, Chao CC. The cytokine activity of HMGB1-extracellular escape of the nuclear protein. *Chang Gung Med J* 2005; 28: 673-682
- 2 Kim JY, Park JS, Strassheim D, Douglas I, Diaz del Valle F, Asehnoune K, Mitra S, Kwak SH, Yamada S, Maruyama I, Ishizaka A, Abraham E. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L958-965
- 3 Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, Amaya F, Kitamura Y, Tanaka M, Kobayashi A, Maruyama I, Yamada S, Hasegawa N, Soejima J, Koh H, Ishizaka A. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1310-1316
- 4 Li W, Sama AE, Wang H. Role of HMGB1 in cardiovascular diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 130-135
- 5 Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, Nawroth P, Andersson U, Harris RA, Harris HE. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol* 2005; 61: 1-9
- 6 Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaitė D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C917-924
- 7 Park JS, Svetkauskaitė D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 7370-7377
- 8 Li HY, Yao YM, Yao S, Dong N, Yu Y, Sheng ZY. Potential role of JAK/STAT in regulating Toll-like receptor 2 gene expression in rats with postburn *Staphylococcus aureus* sepsis. *Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue* 2003; 15: 139-142
- 9 Wang SB, Yao YM, Dong N, Yu Y, Tao GC. Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in mediating mRNA expression of high mobility group box1 protein in the liver in septic rats. *Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue* 2003; 15: 147-149
- 10 Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005; 201: 1135-1143
- 11 Zi X, Grasso AW, Kung HJ, Agarwal R. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cancer Res* 1998; 58: 1920-1929
- 12 Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248-251
- 13 Sundelin-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, Rauvala H, Herman G, Tracey KJ, Lee ML, Andersson J, Tokics L, Treutiger CJ. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2005; 33: 564-573
- 14 Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191-195
- 15 Mantell LL, Parrish WR, Ulloa L. Hmgb-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. *Shock* 2006; 25: 4-11
- 16 Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger AC, Palmlad K, Yang H, Tracey KJ, Andersson U,

■名词解释

JAK/STAT: Janus 激酶/信号转导和转录激活因子, 是近年发现的在细胞因子信号转导中起重要作用的信号通路。目前已发现的JAK激酶家族成员有4个, STAT家族成员有6个。与其他已发现的信号通路相比, 该通路所涉及的激酶较少, 环节简单, 且普遍存在于各型细胞内, 他参与了机体许多病理和生理反应过程。

■同行评价

本文采用JAK/STAT抑制剂-雷帕霉素(RPM)抑制JAK/STAT通路对急性肝损伤大鼠肝组织HMGB1表达,选题热门、新颖,具有创新性,有一定的学术和实际应用价值。

- Harris HE. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2052-2058
- 17 Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, Czura CJ, Fink MP, Tracey KJ. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12351-12356
- 18 Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines. *Drug News Perspect* 2005; 18: 243-249
- 19 Kissileva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; 285: 1-24
- 20 Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 2002; 17: 83-90
- 21 Rendon-Mitchell B, Ochani M, Li J, Han J, Wang H, Yang H, Susarla S, Czura C, Mitchell RA, Chen G, Sama AE, Tracey KJ, Wang H. IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 170: 3890-3897
- 22 Czura CJ, Yang H, Tracey KJ. High mobility group box-1 as a therapeutic target downstream of tumor necrosis factor. *J Infect Dis* 2003; 187 Suppl 2: S391-396
- 23 Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol* 2000; 10: 47-50
- 24 Liu H, Yao YM, Dong YQ, Yu Y, Sheng ZY. The role of Janus kinase-signal transducer and transcription activator pathway in the regulation of synthesis and release of lipopolysaccharide-induced high mobility group box-1 protein. *Zhonghua Shaoshang Zazhi* 2005; 21: 414-417
- 25 Liu H, Yao YM, Yu Y, Sheng ZY. Effect of inhibitors of signal transducer and activator of transcription-1/3 on expression of tumor necrosis factor-alpha induced by high mobility group box-1 protein inflammatory response in rat peritoneal macrophages. *Zhonghua Waike Zazhi* 2006; 44: 193-197
- 26 Park JS, Arcaroli J, Yum HK, Yang H, Wang H, Yang KY, Choe KH, Strassheim D, Pitts TM, Tracey KJ, Abraham E. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C870-879
- 27 Fiuzza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, Suffredini AF. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2003; 101: 2652-2660
- 28 Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepantalo M, Carpen O, Parkkinen J, Rauvala H. Regulation of monocyte migration by amphotericin (HMGB1). *Blood* 2004; 104: 1174-1182

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006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》 2004年度的影响因子分别位居1608种中国科技 论文统计源期刊中第14位和4位

根据由中国科学技术信息研究所完成的“2004年度中国科技论文统计与分析结果”,在收录的1608种中国科技论文统计源期刊中,总被引频次平均值433.61次/刊,影响因子平均值0.386。

《世界华人消化杂志》的总被引频次为3353,位居1608种中国科技论文统计源期刊的第8位,内科医学类,28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769,位居1608种中国科技论文统计源期刊的第14位,内科医学类,28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211,他引总引比0.30,地区分布数28,基金论文比0.43,国际论文比0.01。

《World Journal of Gastroenterology (世界胃肠病学杂志)》的总被引频次为4127,位居1608种中国科技论文统计源期刊的第3位,内科医学类,28种期刊的第1位。《World Journal of Gastroenterology (世界胃肠病学杂志)》的影响因子为2.654,位居1608种中国科技论文统计源期刊的第4位,内科医学类,28种期刊的第1位。《World Journal of Gastroenterology (世界胃肠病学杂志)》的即年指标0.399,他引总引比0.58,地区分布数27,基金论文比0.52,国际论文比0.26。



前C区基因变异对慢性重型乙型肝炎免疫应答的影响

黄利华, 蒋跃明, 戴亚新

黄利华, 蒋跃明, 戴亚新, 无锡市传染病医院 江苏省无锡市214005
江苏省科技计划项目, No. BS2003615
无锡市自然科学基金资助, No. CK030013
通讯作者: 黄利华, 214005, 江苏省无锡市兴源路88号, 无锡市传染病医院. huanglihua1964@sina.com
电话: 0510-82307555-6205 传真: 0510-82717162
收稿日期: 2006-02-22 接受日期: 2006-03-11

Influence of mutation in hepatitis B virus precore region on immune response of patients with chronic severe hepatitis B

Li-Hua Huang, Yue-Ming Jiang, Ya-Xin Dai

Li-Hua Huang, Yue-Ming Jiang, Ya-Xin Dai, Hospital of Infectious Disease, Wuxi 214005, Jiangsu Province, China
Supported by the Science and Technology Program of Jiangsu Province, No. BS2003615, and the Natural Science Foundation of Wuxi City, No. CK030013
Correspondence to: Li-Hua Huang, Hospital of Infectious Disease, 88 Xingyuan Road, Wuxi 214005, Jiangsu Province, China. huanglihua1964@sina.com
Received: 2006-02-22 Accepted: 2006-03-11

Abstract

AIM: To investigate the role of mutation at site 1896 in hepatitis B virus (HBV) precore region in the pathogenesis of chronic severe hepatitis B and its influence on the immune response of patients.

METHODS: The production of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) by Th1/Th2 and Tc1/Tc2 cells in the peripheral blood from 31 patients with chronic heavy hepatitis were assessed by flow cytometry. The serum concentration of IL-4 and IFN- γ were examined by solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HBV DNA was amplified by nested polymerase chain reaction and the precore/core fragment was directly sequenced.

RESULTS: The mutation at site 1896 in HBV precore region appeared in 8 of 31 (25.8%) patients with chronic severe hepatitis. Of the 8 patients, 4 (50%) were confirmed with the mutation

at site 1913. However, of the 23 patients without the mutation at site 1896, 1 case was detected with the mutation at site 1913. The level of Tc1 was significantly higher in the patients with G1896A mutation than that in those without G1896A mutation ($t = 2.407, P = 0.023$). The levels of serum IFN- γ and IL-4 were not markedly different between the patients with and without G1896A mutation ($P > 0.05$). The mortality rate was also similar between the two groups.

CONCLUSION: Tc1 level is significantly enhanced due to G1896A mutation and plays an important role in the pathogenesis of chronic severe hepatitis B.

Key Words: Precore gene; Mutation; Chronic severe hepatitis B; Immune response

Huang LH, Jiang YM, Dai YX. Influence of mutation in hepatitis B virus precore region on immune response of patients with chronic severe hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1921-1923

摘要

目的: 分析乙型肝炎病毒(HBV)前C区G1896A变异对慢性重型乙型肝炎(慢重肝)发病及免疫应答的影响。

方法: 流式细胞仪检测31例慢重肝患者外周血细胞胞内细胞因子IFN- γ , IL-4的百分率; 测定Th1, Th2, Tc1, Tc2; 固相夹心法酶联免疫吸附试验检测其血清IL-4, IFN- γ 的水平; 套式聚合酶链反应扩增HBV DNA前C/C基因并作序列分析。

结果: 在31例患者中8例(25.8%)发生G1896A变异, 8例G1896A变异株中4例(50%)出现1913位联合变异, 而23例野毒株仅1例(4.3%)出现C1913A变异; G1896A变异株Tc1水平显著高于野毒株($P = 0.023, t = 2.407$); G1896A变异株与野毒株相比IL-4, IFN- γ 水平无显著性差异($P > 0.05$); 变异株与野毒株2组死亡率无显著性差异($P > 0.05$)。

结论: G1896A变异能显著增强Tc1水平, 后者

■背景资料

国内外对乙型重型肝炎肝细胞损伤机制的研究主要集中在HBV基因变异及机体免疫异常两方面。基因变异的乙型肝炎病毒可能通过各种途径刺激机体的免疫系统, 使免疫细胞活化, 并释放细胞因子, 导致肝细胞损伤, 与重型肝炎的发生密切相关。

■研发前沿

重型肝炎病毒热点变异主要集中在前C区1896位的终止变异。目前研究热点为: 1896位的终止变异与重型肝炎的关系, 基因变异加重肝脏损害的机制, 病毒基因其他位点的变异, 重型肝炎的不同阶段机体细胞免疫的特点以及细胞因子的表达程度及基因和免疫治疗的策略。

■应用要点

本研究深化了我国慢性乙型重型肝炎发病机制的研究,从重型肝炎的不同阶段探索机体细胞免疫的特点以及细胞因子的表达特点,为今后重型肝炎预防、治疗尤其是根据Th1/Th2型细胞因子在重型肝损害中的变化而实施的生物治疗、预后预测提供理论依据,同时对重型肝炎病毒基因变异理论和以后的基因治疗提供了帮助。

在慢重肝发病中起重要作用。

关键词: 前C基因; 变异; 慢性重型乙型肝炎; 免疫应答

黄利华, 蒋跃明, 戴亚新. 前C区基因变异对慢性重型乙型肝炎免疫应答的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1921-1923
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1921.asp>

0 引言

HBV前C区基因变异最常见于nt 1896位。发生G1896A变异后, HBeAg表达终止, 但HBV仍可继续复制, 形成持续的病毒血症。有研究提示, G1896A终止变异与重型乙型肝炎的发生有关^[1-3]。为此, 我们就G1896A变异对慢重肝发病及免疫应答的影响作研究如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-11/2003-12住院的慢重肝患者31例, 女7例, 男24例, 平均年龄45.9±10.9岁。诊断符合2000年全国第十次病毒性肝炎修订的诊断标准。标本采清晨空腹肘静脉血10 mL, 2 h内分离血清待检。CD₃/CD₄/CD₈、鼠抗人IFN-γ/IL-4、溶血剂、破膜剂由法国Immunotech提供, 流式细胞仪系Benkman Coulter 3XL。IL-4和IFN-γ检测试剂盒购自法国Diaclone research公司, 用奥地利TECAN公司的全自动酶标分析仪分析。dNTP和Taq酶由Promega公司提供, 末段荧光标记测序试剂盒系PE公司提供, QIAquick纯化柱系德国Qiagen公司提供, 所有试剂均委托上海生工生物有限公司购买。ASAP测序软件由美国Biotronics公司提供。

1.2 方法

1.2.1 Th1/Th2/Tc1/Tc2检测 静脉血2 mL, 肝素抗凝, 取100 μL按1:1加入1640培养基, 混匀, 加入刺激剂PMA和Ionomycin, 使其终浓度分别为25 μg/L和1 mg/L, 同时加入终浓度为10 mg/L的抑制剂Monensin; 未刺激对照则只加Monensin, 不加刺激剂, 混匀后在37°C 50 mL/L CO₂培养箱中培养4 h, 以CD₃, CD₄, CD₈, IFN-γ, IL-4标记细胞膜表面抗原和细胞内细胞因子, 流式细胞仪检测胞内细胞因子IFN-γ, IL-4百分率并进行数据分析, 检测方法见文献[4]。

1.2.2 IL-4和IFN-γ检测 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验检测, 用奥地利TECAN公司的全自动酶标分析仪读取450 nm值, 并根据标准曲线计算IL-4, IFN-γ浓度(ng/L), 具体步骤按说明书

严格操作。

1.2.3 HBV DNA PreC/C基因测序 采用套式聚合酶链反应作基因序列测定。将血清100 μL用经典酚氯仿法常规提取HBV DNA作模板, 取提纯的HBV DNA 3 μL为模板, 双蒸水9.6 μL, 10×Buffer 2 μL, MgCl₂ 1.6 μL (2 mmol/L), dNTP 1.6 μL (160 μmol/L), Taq酶0.2 μL (1 U), 引物P1, P2各1 μL (0.5 μmol/L)组成PCR反应体系20 μL, 经94°C预变性3 min后, 按94°C 45 s, 58°C 45 s, 72°C 45 s, 循环25次, 最后72°C 5 min, 取该产物3 μL作第2次PCR扩增的模板, 双蒸水9.6 μL, 10×Buffer 2 μL, MgCl₂ 1.6 μL, dNTP 1.6 μL, Taq酶0.2 μL, 再加入引物P3, P4各1 μL进行第2次PCR扩增: 94°C预变性2 min, 94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 45 s, 循环35次, 最后72°C 5 min。取部分产物于20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭显色后在紫外灯下观察DNA条带, 鉴定后QIAquick纯化柱纯化。纯化产物及P₃引物加入测序试剂盒进行测序反应, 置CEQ8000型DNA测序仪进行序列测定。

统计学处理 Th1, Th2, Tc1, Tc2比较用SPSS 10.0统计软件进行数据t检验, $P<0.05$ 或 $P<0.01$, 差异有统计学意义。变异率, 死亡率的比较以小样本四格表统计意义检验便查表^[5]分析, 按表格区间得出 P 值, $P<0.05$ 或 $P<0.01$, 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 前C区基因序列的检测结果 在31例患者中8例(25.8%)发生G1896A变异, 其中1例(3.2%)是变异株和野毒株混合感染。8例G1896A变异株中4例(50%)出现1913位联合变异, 即C1913A及C1913G变异各2例, 而23例野毒株仅1例(4.3%)出现C1913A变异, 经小样本四格表统计意义检验便查表证实G1896A与1913联合变异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 HBV G1896A变异的意义 变异株Tc1水平显著高于野毒株($P = 0.023$, $t = 2.407$, 表1)。2组间细胞因子无显著性差异($P>0.05$, 表1)。31例慢重肝患者死亡率45.2%(14/31), G1896A变异株死亡率50.0%(4/8), 野毒株死亡率43.5%(10/23), 按四格表精确检验法, $P>0.05$, 两组死亡率无显著性差异。

3 讨论

重型肝炎肝细胞损伤涉及病毒与机体反应两方

表 1 G1896A变异与T细胞免疫细胞因子 (mean ± SD)

分组	n	Th1%	Th2%	Tc1%	Tc2%	IL-4 (ng/L)	IFN- γ (ng/L)
变异株	8	28.8 ± 4.3	4.1 ± 3.0	52.1 ± 10.7 ^a	3.2 ± 0.9	83.6 ± 14.9	47.6 ± 17.9
野毒株	23	26.6 ± 4.8	3.4 ± 2.8	40.7 ± 11.9	3.0 ± 1.8	77.9 ± 10.2	44.9 ± 22.9

$t = 2.407$, $^a P < 0.05$ vs 野毒株.

面, 我国已有研究提示, 重型肝炎与G1896A终止变异有密切关系, 变异发生率报道不一^[6-8]. 我们的结果发现无锡地区慢性重型肝炎G1896A变异发生率25.8%, 并出现核苷酸1913位联合变异, 且显著关联. 提示, 慢重肝患者中的确存在G1896A变异, 但变异发生率并不很高, 因此对慢重肝而言变异仅是影响临床病情的一个方面, 而G1896A与1913位的联合变异又有何临床意义值得进一步探讨. 我们曾报道过, 慢重肝患者存在明显的T细胞免疫紊乱^[4]. Th1, Tc1细胞主要分泌IFN- γ 等I型细胞因子, 介导细胞毒效应; Th2, Tc2主要分泌IL-4等细胞因子, 参与体液免疫应答, 通常所说的CTL即为Tc1^[9-10]. 国外报道HBeAg可以耗竭Th1, 从而抑制他们发动CTL攻击感染肝细胞的能力, 一旦HBV发生基因变异, 不能表达HBeAg, 则这种抑制被打破而导致重型肝炎的发生^[11], 我们发现, 慢重肝G1896A变异株Tc1显著升高, 表现出明显增强的细胞免疫应答, 导致肝细胞损伤, 甚至肝衰竭.

IL-4, IFN- γ 与慢性重型肝炎发生有关^[12-14], 但G1896A变异株与野毒株相比血液中细胞因子IL-4, IFN- γ 并无显著性增高, 分析有以下原因: (1)重型肝炎时肝细胞对IFN- γ 的细胞毒效应更加敏感, IFN- γ 轻微升高即可引起严重反应; (2)局部产生的肿瘤坏死因子及IFN- γ 是导致肝细胞坏死的基础^[15], 他们可以干扰细胞生长、诱导肝细胞凋亡、促进免疫细胞活化及浸润. 因此, Tc1在慢性重型肝炎中起重要作用, G1896A变异对Tc1影响更为明显.

4 参考文献

- Inoue K, Ogawa O, Yamada M, Watanabe T, Okamoto H, Yoshida M. Possible association of vigorous hepatitis B virus replication with the development of fulminant hepatitis. *J Gastroenterol* 2000; 165: 956-961

■同行评价

重型肝炎肝细胞损伤涉及病毒与机体反应两方面, 我国已有研究提示重型肝炎与G1896A终止变异有密切关系, 本文以此角度分析乙型肝炎病毒G1896A终止变异对重型肝炎发病及免疫应答的影响, 选题新颖, 方法可行, 设计严谨, 结论可靠.

- Rezende RE, Fonseca BA, Ramalho LN, Zucoloto S, Pinho JR, Bertolini DA, Martinelli AL. The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2005; 32: 53-59
- 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
- 黄利华, 王娟华, 刘志辉. 慢性乙型重型肝炎患者外周血Th1/Th2, Tc1/Tc2的表达. *临床肝胆病杂志* 2005; 21: 91-92
- 金丕煥. 医用统计方法. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 1995: 460-469
- 王静艳, 穆桂玲, 刘沛, 谷秋红. 乙型重型肝炎基因变异与免疫异常的关系. *中华传染病杂志* 2001; 19: 73-76
- 林裕龙, 侯金林, 王战会, 孙剑, 阎丽, 骆抗先. e抗原阴性重症乙型肝炎患者HBV前C区热点变异研究. *第一军医大学学报* 2001; 21: 852-854
- Wu W, Chen Y, Ruan B, Li LJ. Gene heterogeneity of hepatitis B virus isolates from patients with severe hepatitis B. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 530-534
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146
- 朱迅. 免疫学新进展. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 98-99
- Hou J, Lin Y, Waters J, Wang Z, Min J, Liao H, Jiang J, Chen J, Luo K, Karayannidis P. Detection and significance of a G1862T variant of hepatitis B virus in Chinese patients with fulminant hepatitis. *J Gen Virol* 2002; 83: 2291-2298
- 黄利华, 蒋跃明, 谢志萍, 蒋祥虎. 慢性乙型重型肝炎患者外周血白细胞介素18、白细胞介素4、 γ 干扰素的变化. *临床荟萃* 2005; 20: 436-437
- 唐宝璋, 陈皋, 陈红英, 陈一晖, 张艳梅. 重型肝炎患者血清内毒素、白细胞介素(IL)-4、IL-18水平的研究. *中华内科杂志* 2004; 43: 137-138
- 陈湖光, 余春艳, 孟雪芹, 冯玉凤, 马亦林, 刘克洲. 病毒性肝炎患者血清白细胞介素-4、12及干扰素- γ 水平的观察. *中华传染病杂志* 2000; 18: 195-196
- Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Koda T, Nishimura S, Iwakura Y, Sekikawa K, Nishimura T. Indispensable role for TNF-alpha and IFN-gamma at the effector phase of liver injury mediated by Th1 cells specific to hepatitis B virus surface antigen. *J Immunol* 2000; 165: 956-961

电编 张敏 编辑 潘伯荣

三联疗法对非糜烂性反流病合并H pylori感染患者预后的影响

朱金水, 宋明全, 朱励, 王龙, 陈金联, 达炜, 孙群, 王如华

■背景资料

非糜烂性反流病的病理机制尚不清楚, 本文作者通过大量临床病例初步认为其与机体内脏高敏感性有关, 尤其对高糖及高脂饮食的高敏感性有一定关系; 而H pylori根除对非糜烂性反流病合并H pylori感染的影响尚存争论。

朱金水, 宋明全, 朱励, 王龙, 陈金联, 达炜, 孙群, 王如华, 上海交通大学附属第六人民医院消化科 上海市 200233
通讯作者: 朱金水, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院消化科. zhujs1803@hotmail.com
电话: 021-64369181-8969 传真: 021-64837019
收稿日期: 2006-03-20 接受日期: 2006-05-08

Efficacy of triple therapy and its effect on prognosis of H pylori infected patients with non-erosive reflux disease

Jin-Shui Zhu, Ming-Quan Song, Li Zhu, Long Wang, Jin-Lian Chen, Wei Da, Qun Sun, Ru-Hua Wang

Jin-Shui Zhu, Ming-Quan Song, Li Zhu, Long Wang, Jin-Lian Chen, Wei Da, Qun Sun, Ru-Hua Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. zhujs1803@hotmail.com

Received: 2006-03-20 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of triple therapy and the effect of H pylori eradication on the prognosis of patients with non-erosive reflux disease (NERD).

METHODS: One-hundred and twenty H pylori infected patients with NERD were randomly and averagely divided into group A and B. The patients in group A received triple therapy (20 mg Losec plus 500 mg Clarithromycin plus 500 mg Amoxicillin, twice a day) for 1 wk, and the ones in group B served as the controls (treated with 20 mg Losec twice a day). From week 2, the patients, whose symptoms of non-erosive reflux disease were alleviated, in both groups were orally treated only with 20 mg Losec once a day until the end of week 3. Gastric endoscopy and ¹³C breath test were performed at the end of 12 mo.

RESULTS: ¹³C breath test showed that the rate

of H pylori eradication was significantly higher in group A than that in group B (95% vs 8.3%, $P < 0.01$). The degrees of corpus atrophy and intestinal metaplasia were also markedly alleviated in group A ($P < 0.01$). However, the scores for the symptoms such as heartburn or swallow abnormality had no significant difference between the two groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Triple therapy is effective in the eradication of H pylori and treatment of intestinal metaplasia and corpus atrophy, but not in the improvement of heartburn or swallow abnormality.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Non-erosive reflux disease; Prognosis; Efficacy

Zhu JS, Song MQ, Zhu L, Wang L, Chen JL, Da W, Sun Q, Wang RH. Efficacy of triple therapy and its effect on prognosis of H pylori infected patients with non-erosive reflux disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1924-1927

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(H pylori)根除对非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)合并H pylori感染患者疗效及预后。

方法: 120例非糜烂性反流病合并H pylori感染患者随机分为: 对照组60例, 仅口服洛赛克(20 mg, 2次/d)1 wk; 三联疗法组60例: 口服洛赛克(20 mg)和克拉霉素(500 mg)及阿莫西林(500 mg), 均每天2次, 连续1 wk, 1 wk后非糜烂性症状缓解患者, 开始口服洛赛克20 mg/d的维持治疗阶段至3 wk; 试验结束后6 mo均行胃镜复查及¹³C呼气试验。

结果: 试验结束后三联疗法组57例患者H pylori阴性(95.0%), 对照组5例转阴(8.3%), 两组H pylori根除率差异显著($P < 0.01$); 对照组患者残胃萎缩及残胃肠化较H pylori根除组明显增多($P < 0.05$), 三联疗法但对反流症状烧灼感及进食后梗阻或异物感的改善不明显。

($P>0.05$).

结论: 三联疗法根除*H pylori*后对非糜烂性反流病合并*H pylori*感染患者的胃窦部的肠化生及不典型增生有防治疗效, 但对反流症状烧灼感及进食后梗阻或异物感的改善不明显.

关键词: 三联疗法; *H pylori*根除; 非糜烂性反流病; 疗效

朱金水, 宋明全, 朱励, 王龙, 陈金联, 达炜, 孙群, 王如华. 三联疗法对非糜烂性反流病合并*H pylori*感染患者预后的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1924-1927

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1924.asp>

0 引言

非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)是指存在典型的胃食管反流症状, 如烧心、反酸、胸骨后疼痛或食道内异物感等症状, 但缺乏内镜下食管黏膜损害的依据. 合并*H pylori*感染患者行内镜检查可有*H pylori*阳性发现, 内镜检查阴性者则称为内镜阴性非糜烂性反流病合并*H pylori*感染或非糜烂性反流病合并*H pylori*感染. 目前统计表明该类患者占胃食管反流病的65%-70%, 同时抑酸药可缓解症状, 质子泵抑制剂在非糜烂性反流病合并*H pylori*感染治疗可能起重要作用^[1-2]. 近年来*H pylori*感染在非糜烂性反流病合并*H pylori*感染患者中的作用研究尚少, 本文为评估*H pylori*根除对质子泵抑制剂治疗非糜烂性反流病合并*H pylori*感染患者的近期疗效及预后作一探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 本院住院经确诊为胃大部切除非糜烂性反流病合并*H pylori*感染患者120例, 均至少在过去1 a中每周存在反酸、烧心或食管内异物感、腹胀症状, 结合病史不符合下列排除标准之一: (1)妊娠; (2)既往接受抗*H pylori*治疗或使用过非甾体类消炎药(NASID); (3)4 wk内服用过PPI类药物. 所有患者均经胃镜证实(Olympus XQ-240)检查以除外消化性溃疡, 胃黏膜组织病理检查及¹³C呼气试验均显示*H pylori*阳性.

1.2 方法

1.2.1 临床内镜及病理学评估 内镜下采用改良的Savary-Miller分类法评估非糜烂性反流病合并*H pylori*感染: 1级, 在一个黏膜皱襞中单个或数个非融合性糜烂; 2级, 多个黏膜皱襞上糜烂, 可伴或不伴融合, 但尚未累及食管全周; 3级, 全

胃广泛散在分布糜烂, 渗出性病变; 4级, 出现溃疡或狭窄等. 从胃窦与残胃取两块标本, 由同一病理科医生行病理检查, 按照最新悉尼分类法对中性粒细胞及单核细胞浸润程度、肠腺化生及萎缩程度分别计分(均为0-3分), 中性粒细胞积分作为炎症积分(0-6分)以评估胃炎活动程度. 症状评估: 分组前记录反酸或胸骨后烧心感及食道内异物感症状持续时间, 症状严重程度评估采用四分法: 0分, 无症状; 1分, 轻度, 经提醒可意识症状存在, 不影响日常活动; 2分, 中度, 症状持续存在, 不影响日常活动; 3分, 严重影响日常活动. 腹胀和反酸症状不一致, 则取相对高的症状计分.

1.2.2 分组治疗 采用随机抽信封方法将患者分成2组, *H pylori*根除组行*H pylori*根除疗法(洛赛克20 mg, 阿莫西林500 mg, 克拉霉素500 mg, 均2次/d); 对照组仅予洛赛克20 mg, 2次/d, 两组治疗时间均为1 wk, 且初始的2 wk治疗采取禁糖及低脂饮食, 2组患者在年龄、性别、吸烟、饮酒、体质指数、胃病的严重度等方面均无可比性($P>0.10$, 表1). 初始治疗: 药物治疗1 wk后, 两组患者均服用洛赛克20 mg/d, 共3 wk, 疗程结束时除每个症状单独计分外, 试验前后对非糜烂性食管炎的患者行胃镜活检复查以了解食管炎及胃窦炎症及病理分级(炎症分级 ≥ 1)或症状持续存在(症状计分 ≥ 1 分)为失效.

1.2.3 维持治疗 症状完全缓解与食管炎完全愈合的患者继续服用洛赛克10 mg/d, 直至试验3 wk, 1, 2及3 wk时患者随访以评估症状及依从性, 反酸或胸骨后烧心感及食管内异物感症状复发及试验3 wk均行胃镜复查(包括组织病理及尿素酶试验), 试验时所有患者停用洛赛克, 并于4 wk后行¹⁴C呼气试验以评估*H pylori*情况. 维持阶段反流症状或食管炎复发(症状计分 ≥ 1 分和/(或)炎症分级 ≥ 1)为失效.

统计学处理 等级资料采用中位数(变化区间)表示, 采用秩和检验, 两组*H pylori*根除率及失效率比较采用 χ^2 检验, 所有统计学处理均在SPSS 11.5软件包完成, $P<0.05$ (双侧)表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 临床及*H pylori*根除 两组患者治疗前后反酸或胸骨后烧心感及食道内异物感症状分别为49.4% (29/60)及43.3% (26/60), 两组无统计学差异($P>0.05$).

■研发前沿

NERD占胃食管反流病的65%-70%, 评估*H pylori*根除对质子泵抑制剂治疗非糜烂性反流病合并*H pylori*感染疗效及预后研究为热点之一.

■相关报道

*H pylori*感染患者接受长期PPI治疗, 易使非糜烂性反流病合并*H pylori*感染患者出现萎缩性胃炎伴不典型增生.

■创新盘点

根除*H pylori*对缓解NERD患者食管反流症状不明显，但可抵消抑酸剂维持治疗的疗效，防治胃窦部的肠化生及不典型增生。

12 mo时依据¹³C呼吸试验，*H pylori*根除组*H pylori*根除率为95.0% (57例)，而对照组仅为8.3% (5例)，两组患者*H pylori*根除率差异显著($P<0.01$)。两组患者依从性均达80%以上，*H pylori*根除组16例治疗失败(起始阶段6例，维持阶段10例)，起始阶段有4例症状未完全缓解，2例患者症状持续存在，在维持阶段症状复发的10例患者中，4例同时有症状与食管炎的复发；对照组有7例患者失效，均发生在维持阶段，全部为症状复发，两组患者试验期间失效率差异显著($P<0.05$)。

2.2 胃黏膜病理变化 试验前两组食管炎程度相近，绝大多数患者为中至重度食管炎。对照组在根除*H pylori*后，胃窦与食管的炎症程度均有明显降低($P<0.01$)；而在对照组，胃炎从以胃窦为主变为残胃为主，1 a的PPI治疗后，胃窦部胃炎活动度无明显变化($P>0.05$)，而非糜烂性反流病合并*H pylori*感染的炎症积分明显升高($P<0.01$)。试验前两组患者胃萎缩及肠化生程度相似，*H pylori*根除组患者在治疗12 mo后食管炎症程度明显减轻，而胃萎缩及肠化生程度变化均不明显，而对照组在洛赛克治疗12 mo后胃窦部的腺体萎缩及肠腺化生程度均加重(表2)。

3 讨论

非糜烂性反流病的病理机制尚不清楚，作者通过本文研究初步认为内脏高敏感性，尤其对高糖及高脂饮食的高敏感性有一定关系；而*H pylori*根除对非糜烂性反流病合并*H pylori*感染的影响尚存争论，我们成功起始PPI全量治疗后采用递减法维持治疗，研究结果显示根除*H pylori*可导致以后的非糜烂性反流病合并*H pylori*感染治疗失败的风险增加。对于*H pylori*根除后，反流性疾病治疗难度增加可能有多方面的原因。首先，持续*H pylori*感染可使产氨增加，而氨可以加强药物的抑酸效果^[7]，更重要的是，抑酸治疗可加重残胃部炎症程度，继而进一步抑制胃酸分泌^[3-4]，其次，停用洛赛克后早期可观察到胃酸高分泌，而这种现象在*H pylori*感染时减轻^[5]，根除*H pylori*的患者在减少PPI剂量后，酸分泌的反跳可导致非糜烂性反流病合并*H pylori*感染的复发。我们研究发现三联疗法在治疗组根除了*H pylori*，但其食管反流症状如胸骨后的烧灼感及食道内异物感的缓解率与对照组比，并未明显降低，但治疗组同时采取禁糖及低脂饮食后，上述症状的缓解率显著低于对照组。这

表1 治疗前后两组NERD患者的临床资料 n (%)

参数	<i>H pylori</i> 根除组 (n = 60)	对照组 (n = 60)
年龄(岁)	54.0 ± 13.5	53.0 ± 15.2
男性(%)	36 (60)	33 (55.0)
吸烟人数(%)	9 (15.0)	10 (16.7)
饮酒人数(%)	12 (20.0)	11 (18.3)
体质质量指数	24.5 ± 3.4	23.8 ± 3.7
食管炎分级(%)		
0	57 (95.0)	56 (93.3)
1	3 (5.0)	4 (6.7)
既往服用过PPI(%)	4 (8.2)	5 (10.2)
症状计分(%)		
1	16 (26.7)	17 (28.3)
2	29 (48.3)	27 (45.0)
3	15 (25.0)	16 (26.7)
症状持续时间(%)		
1 a	15 (25.0)	17 (28.3)
>1-5 a	29 (48.3)	27 (45.0)
>5-10 a	16 (26.7)	16 (26.7)

表2 两组患者治疗前后食管及胃黏膜的组织病理学变化

项目	<i>H pylori</i> 根除组 (n = 60)		对照组 (n = 60)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
NERD炎症	4 (1-6)	1 (0-4) ^b	4 (1-6)	3 (1-6)
症状缓解率	/	49.4%	/	43.3%
胃窦炎症	3 (0-6)	1 (0-4) ^b	3 (0-6)	4 (0-6) ^b
胃窦萎缩	0 (0-2)	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-3)
胃窦肠化	0 (0-2)	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-3)

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

表明NERD伴*H pylori*感染患者的治疗疗效与饮食中糖及脂肪含量有关。故*H pylori*根除可提高未接受抑酸维持治疗患者食管酸暴露时间，这有利于食管炎及胃窦炎症的缓解及胃酸分泌的恢复，可抵消抑酸剂维持治疗的疗效^[6-10]。

长期PPI治疗对非糜烂性反流病合并*H pylori*感染的影响也引起医学界的争论^[11-18]，有研究显示*H pylori*感染患者接受长期PPI治疗与接受抗反流手术治疗相比，更易使非糜烂性反流病合并*H pylori*感染患者出现萎缩性胃炎伴不典型增生^[12-14]，虽然这一病理学差异未得到随机临床研究的证实，但这一担忧不能完全消除，有学者随机研究发现：如果*H pylori*未根除而长期PPI治疗，非糜烂性反流病合并*H pylori*感染患者的胃窦胃炎可进一步发展，而在*H pylori*根除后非糜烂性反流病合并*H pylori*感染患者的胃炎可

逆转^[15-26], 所以, 非糜烂性反流病合并H pylori感染患者在决定长期PPI治疗前, 特别在胃癌高发人群中^[21,26], 建议先行根除H pylori感染, 以避免非糜烂性反流病合并H pylori感染患者的食管炎及胃窦炎症、胃窦腺体萎缩、肠化生及不典型增生的进展, 但对非糜烂性反流病症状改善不显著, 其机制尚需进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Kern M, Hofmann C, Hyde J, Shaker R. Characterization of the cerebral cortical representation of heartburn in GERD patients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G174-G181
- 2 Bercik P, Verdu EF, Armstrong D, Idstrom JP, Cederberg C, Markert M, Crabtree JE, Stolte M, Blum AL. The effect of ammonia on omeprazole-induced reduction of gastric acidity in subjects with *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 947-955
- 3 Moayyedi P, Wason C, Peacock R, Walan A, Bardhan K, Axon AT, Dixon MF. Changing patterns of *Helicobacter pylori* gastritis in long-standing acid suppression. *Helicobacter* 2000; 5: 206-214
- 4 Gillen D, Wirz AA, Neithercut WD, Ardill JE, McColl KE. *Helicobacter pylori* infection potentiates the inhibition of gastric acid secretion by omeprazole. *Gut* 1999; 44: 468-475
- 5 Gillen D, Wirz AA, Ardill JE, McColl KE. Rebound hypersecretion after omeprazole and its relation to on-treatment acid suppression and *Helicobacter pylori* status. *Gastroenterology* 1999; 116: 239-247
- 6 Koike T, Ohara S, Sekine H, Iijima K, Kato K, Shimosegawa T, Toyota T. *Helicobacter pylori* infection inhibits reflux esophagitis by inducing atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3468-3472
- 7 Kuipers EJ, Nelis GF, Klinkenberg-Knol EC, Snel P, Goldfain D, Kolkman JJ, Festen HP, Dent J, Zeitoun P, Havu N, Lamm M, Walan A. Cure of *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux oesophagitis treated with long term omeprazole reverses gastritis without exacerbation of reflux disease: results of a randomised controlled trial. *Gut* 2004; 53: 12-20
- 8 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 167-180
- 9 沈波, 朱金水, 朱祖明, 陈金联, 陈国强, 朱冬琴. 血管生成抑制剂对胃癌生长抑制作用的实验研究. 中华消化杂志 2005; 25: 406-408
- 10 Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T. Association between CagA+ *Helicobacter pylori* infection and p53, bax and transforming growth factor-beta-RII gene mutations in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 2001; 91: 481-485
- 11 Meyer-ter-Vehn T, Covacci A, Kist M, Pahl HL. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem* 2000; 275: 16064-16072
- 12 Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1263-1268
- 13 Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, Tsubokawa M, Tohyama Y, Maeda S, Omata M, Suzuki T, Sasakawa C. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* 2000; 191: 593-602
- 14 Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; 287: 1497-1500
- 15 Lazowska I, Trzeciak L, Godlewska R, Hennig E, Jaguszyn-Krynicka K, Popowski J, Regula J, Ostrowski J. In search of immunogenic *Helicobacter pylori* proteins by screening of expression library. *Digestion* 2000; 61: 14-21
- 16 Kimmel B, Bosserhoff A, Frank R, Gross R, Goebel W, Beier D. Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. *Infect Immun* 2000; 68: 915-920
- 17 Hassan-Alin M, Andersson T, Bredberg E, Rohss K. Pharmacokinetics of esomeprazole after oral and intravenous administration of single and repeated doses to healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56: 665-670
- 18 Junghard O, Hassan-Alin M, Hasselgren G. The effect of the area under the plasma concentration vs time curve and the maximum plasma concentration of esomeprazole on intragastric pH. *Eur J Clin Pharmacol* 2002; 58: 453-458
- 19 Satoh K. Does eradication of *Helicobacter pylori* reverse atrophic gastritis or intestinal metaplasia? Data from Japan. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 829-835
- 20 王静, 王铁武, 张燕萍, 李又平. 耐信阿莫西林特灵三联法治疗HP阳性十二指肠球溃疡的疗效观察. 宁夏医学杂志 2003; 25: 689
- 21 朱金水, 周信达. 现代消化系肿瘤临床治疗学. 第1版. 上海: 上海中医药大学出版社, 2005: 156-165
- 22 Dheer S, Levine MS, Redfern RO, Metz DC, Rubesin SE, Laufer I. Radiographically diagnosed antral gastritis: findings in patients with and without *Helicobacter pylori* infection. *Br J Radiol* 2002; 75: 805-811
- 23 Lahner E, Vaira D, Figura N, Pilozzi E, Pasquali A, Severi C, Perna F, Delle Fave G, Annibale B. Role of noninvasive tests (C-urea breath test and stool antigen test) as additional tools in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with atrophic body gastritis. *Helicobacter* 2004; 9: 436-442
- 24 Faraji EI, Frank BB. Multifocal atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 499-516
- 25 Koskenpalo J, Farkkila M, Sipponen P. *Helicobacter pylori* eradication and standardized 3-month omeprazole therapy in functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2866-2872
- 26 Lui YW, Balthazar EJ. Gastroduodenal mucosal prolapse: diagnosis using conventional abdominal radiographs. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 178: 1292-1293

■同行评价

长期PPI治疗对非糜烂性反流病合并H pylori感染患者预后的影响是当今医学界争论的热点问题, 本文通过大样本, 长期观察结果发现: 根除H pylori后对非糜烂性反流病合并H pylori感染患者的胃窦部的肠化生及不典型增生有防治疗效, 但对改善症状无明显差异, 立意新颖, 体现当今的热点问题。

术前合理营养支持对胃癌及结直肠癌患者术后恢复的影响

姜英俊, 孔心涓, 程广, 田字彬

■背景资料

患者的营养状态是决定患者能否进行治疗性手术的关键因素。本研究探讨术前合理的营养支持对患者恢复的影响, 肠内肠外相结合的营养支持方式可以维持肠黏膜的完整性, 降低细菌异位和感染率, 对需手术治疗的消化道肿瘤患者更有意义。

姜英俊, 程广, 青岛大学医学院附属医院急诊普外科 山东省青岛市 266003
孔心涓, 田字彬, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003
通讯作者: 田字彬, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科, tianzb@qdumh.qd.sd.cn
电话: 0532-82911304 传真: 0532-82911111
收稿日期: 2006-04-24 接受日期: 2006-05-11

Effects of reasonable pre-operative nutrition on recoveries of gastrointestinal cancer patients

Ying-Jun Jiang, Xin-Juan Kong, Guang Cheng, Zi-Bin Tian

Ying-Jun Jiang, Guang Cheng, Department of Emergency General Surgery, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Xin-Juan Kong, Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tianzb@qdumh.qd.sd.cn

Received: 2006-04-24 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To investigate the effects of pre-operative enteral and parenteral nutrition (EN-PN) on the malnourished gastrointestinal cancer patients.

METHODS: Sixty-nine malnourished patients with gastrointestinal cancer were randomly divided into 3 groups: EN-PN group ($n = 23$), parenteral nutrition group (PN, $n = 24$) and non-nutrition group (NN, $n = 22$). EN-PN and PN group were received nutritional support of the same nitrogen and calorie 7 d before operation. Each group received the same nutritional support (EN-PN) 24 h after operation. The levels of serum albumin (ALB), pre-albumin (PA), transferrin (TFN), endotoxin (ET), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected 7 d before and after operation. The levels of serum IgA, IgG and IgM, the activity of natural killer (NK) cells and the ratio of CD4 to CD8 (CD4/

CD8) were measured to evaluate the immune function of the patients. The incidence rate of complications and mean hospitalized time were compared between the three groups.

RESULTS: After operation, the levels of serum PA (0.27 ± 0.06 g/L), TFN (2.81 ± 0.65 g/L) and IgG (10.43 ± 0.86 g/L), the activity of NK cells ($18.04\% \pm 4.56\%$) and the value of CD4/CD8 (4.98 ± 1.21) were significantly higher in EN-PN group than those in PN (0.19 ± 0.04 , 2.01 ± 0.32 , 8.76 ± 0.65 g/L, $11.01\% \pm 3.01\%$, 2.11 ± 0.65 , respectively, $P < 0.05$) and NN group (0.15 ± 0.03 , 1.32 ± 0.27 , 9.05 ± 0.79 g/L, $6.45\% \pm 2.23\%$, 1.22 ± 0.79 , respectively, $P < 0.05$), but the levels of serum ET (4.23 ± 2.01 ng/L), IL-6 (40.22 ± 7.43 ng/L) and TNF- α (33.04 ± 4.56 ng/L) markedly lower than those in PN (8.23 ± 3.65 , 55.21 ± 9.32 , 47.22 ± 8.45 ng/L, respectively, $P < 0.01$) and NN group (10.66 ± 5.23 , 67.01 ± 10.21 , 56.43 ± 9.67 ng/L, respectively, $P < 0.01$). In comparison with those in PN and NN group, the incidence rate of complications ($11.3\% vs 16.4\%, 21.6\%$) and mean hospitalized time (7.0 ± 1.4 d vs 11.0 ± 2.4 , 13.0 ± 2.8 d) were also notably decreased ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Pre-operative EN-PN is safe and effective in the malnourished patients with gastrointestinal cancer, and it can accelerate the recoveries of post-operative patients.

Key Words: Enteral nutrition; Parenteral nutrition; Gastrointestinal cancer; Pre-operation

Jiang YJ, Kong XJ, Chen G, Tian ZB. Effects of reasonable pre-operative nutrition on recoveries of gastrointestinal cancer patients. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1928-1932

摘要

目的: 探讨术前合理的营养支持对胃癌及结直肠癌患者术后恢复的影响。

方法: 消化道恶性肿瘤手术并存在营养不良的患者69例, 分为肠外营养组(PN组, 24例)、肠内肠外营养结合组(EN-PN组, 23例)和常规治疗组(NN组, 22例), PN组和EN-PN组均于

术前7 d开始营养治疗,3组患者均于术后24 h开始肠内和肠外相结合的营养方式。分别于术前7 d和术后7 d测定血清白蛋白(ALB)、前白蛋白(PA)、转铁蛋白(TFN)、血清内毒素水平及细胞因子IL-6、TNF α ,测定血清IgA、IgG、IgM, NK细胞活性及CD4/CD8值评价免疫功能,比较3组患者并发症的发生率及平均住院时间。

结果: EN-PN组在术后7 d血清内毒素水平(4.23 ± 2.01 ng/L)、IL-6(40.22 ± 7.43 ng/L)及TNF- α (33.04 ± 4.56 ng/L)均明显低于PN(分别为 8.23 ± 3.65 , 55.21 ± 9.32 , 47.22 ± 8.45 ng/L, $P < 0.01$)和NN组(10.66 ± 5.23 , 67.01 ± 10.21 , 56.43 ± 9.67 , ng/L $P < 0.01$)。而EN-PN组在术后7 d PA(0.27 ± 0.06 g/L), TFN(2.81 ± 0.65 g/L), IgG(10.43 ± 0.86 g/L), NK细胞活性($18.04\% \pm 4.56\%$)及CD4/CD8值(4.98 ± 1.21)明显高于PN组(分别为 0.19 ± 0.04 , 2.01 ± 0.32 , 8.76 ± 0.65 g/L, $11.01\% \pm 3.01\%$, 2.11 ± 0.65 , $P < 0.05$)和NN组(分别为 0.15 ± 0.03 , 1.32 ± 0.27 , 9.05 ± 0.79 g/L, $6.45\% \pm 2.23\%$, 1.22 ± 0.79 , $P < 0.05$)。与PN和NN组相比,患者并发症发生率($11.3\% vs 16.4\%, 21.6\%$)和住院时间(7.0 ± 1.4 d $vs 11.0 \pm 2.4$, 13.0 ± 2.8 d)EN-PN组亦明显降低($P < 0.01$)。

结论: 存在营养不良的消化道恶性肿瘤患者术前应用肠内和肠外营养相结合的营养方式是安全有效的,可促进患者恢复。

关键词: 肠内营养; 肠外营养; 消化道肿瘤; 术前

姜英俊,孔心涓,程广,田宇彬.术前合理营养支持对胃癌及结直肠患者术后恢复的影响.世界华人消化杂志2006;14(19):1928-1932

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1928.asp>

0 引言

消化道恶性肿瘤患者是营养不良的高发人群,多数患者存在蛋白质-热能营养不良,特别是应用手术治疗,使他们的免疫系统遭受更大打击时更是如此,营养不良可以增加术后并发症的发生率和死亡率,因此对消化道恶性肿瘤患者进行围手术期营养支持尤为重要^[1-2]。我们探讨消化道恶性肿瘤术前肠内营养与肠外营养相结合的营养支持方式的合理性,及对患者术后恢复的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-04/2005-07择期行胃癌及结直肠癌

手术的患者69例,男46例,女23例,年龄29-81(平均 49.3 ± 12.8)岁。胃癌行胃大部切除术40例,结直肠癌行根治术29例。所有患者术前均存在中重度的营养不良(体质下降5%-10%),但肝肾功能正常,无糖尿病、甲状腺机能亢进等内分泌代谢性疾病。患者随机分成3组:EN-PN组($n = 24$)、PN组($n = 23$)和NN组($n = 22$),3组患者的年龄、性别、手术方式和手术时间无显著差别,3组患者术前后均未输血及应用血液制品。

1.2 方法 PN组按能量 $120 \text{ kJ}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 供给,氮摄入量 $0.15 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,非蛋白热卡:氮(NPC:N)= $150:1$ 。氮源为8.5%乐凡命(平衡型氨基酸注射液,华瑞制药有限公司),非蛋白热卡由葡萄糖和脂肪乳(力能MCT,华瑞制药有限公司)双能源供给,糖脂比为1:1,并补充适量的电解质、维生素和微量元素。各种营养液混合于3 L输液袋中,经外周或中心静脉途径输注,10 h内输完。EN-PN组:按与PN组等能量等氮量供给,肠内营养支持选用瑞能(supportan,华瑞制药有限公司)持续鼻胃管滴入,随着患者的适应,EN量逐渐增加,输注量从400 mL/d逐渐增加至1 400 mL/d,不足的营养由肠外营养提供。每100 mL瑞能含能量543 kJ,蛋白质5.85 g,脂肪7.2 g,碳水化合物10.4 g,糖3.6 g, ω -3脂肪酸0.3 g,膳食纤维1.3 g及各种矿物质,微量元素和维生素等。NN组:术前仅以50-100 g/L葡萄糖行常规输液,能量总量约250-300 kJ/d,无外源性氮输入。3组患者均于术后24 h开始肠外和肠内营养相结合的营养方式,肠内营养支持选用瑞能,经鼻空肠管滴入,随着患者的恢复,EN量逐渐增加,输注量从200 mL/d(20 mL/h)逐渐增加至术后7 d 1 400 mL/d(60 mL/h),同时静脉营养逐渐减量直至7 d过渡到全胃肠营养。分别于术前7 d和术后7 d测定血清白蛋白(ALB)、前白蛋白(PA)和转铁蛋白(TFN),血清内毒素水平(鲎试验)及血清IgA、IgG、IgM;应用ELISA试剂盒(晶美生物工程有限公司)检测细胞因子IL-6及TNF α ;分离外周血淋巴细胞应用流式细胞仪检测CD4、CD8、CD4/CD8值及NK细胞活性(CD3阴性而CD16和CD56阳性为NK细胞);比较3组患者术后感染等并发症的发生率、术后住院时间、拆线时间及胃肠功能恢复时间(术后首次肛门排气时间)。

统计学处理 所有数据应用SPSS10.0统计软件进行相关统计学分析,数据采用mean \pm SD表示,组内比较应用t检验,组间比较应用单因素方

■研发前沿
对营养不良的消化道肿瘤患者术前早期进行营养支持已得到很多学者的认同,但对术前营养支持研究较少。对存在营养不良的恶性肿瘤患者术前是否进行营养支持,营养支持对患者术后恢复影响如何,正引起人们越来越多的关注。

■创新盘点

本文的初步研究结果证实,术前肠内肠外相结合的营养支持方式安全有效,可促进患者恢复,优于完全肠外营养支持和常规治疗。

表1 患者术前后血清IL-6、TNF α 、内毒素水平、免疫功能及营养指标

指标	术前7 d			术后7 d		
	EN-PN	PN	NN	EN-PN	PN	NN
Endotoxin (pg/mL)	2.30 ± 0.90	2.87 ± 1.23	3.04 ± 1.34	4.23 ± 2.01 ^b	8.23 ± 3.65	10.66 ± 5.23
TNF (pg/mL)	32.03 ± 5.34	31.99 ± 4.45	30.44 ± 5.65	33.04 ± 4.56 ^b	47.22 ± 8.45	56.43 ± 9.67
IL-6 (pg/mL)	41.44 ± 7.65	41.65 ± 6.39	40.66 ± 7.12	40.22 ± 7.43 ^b	55.21 ± 9.32	67.01 ± 10.21
IgA (g/L)	3.07 ± 0.12	2.76 ± 0.08	2.87 ± 0.07	3.87 ± 0.21	4.01 ± 0.25	3.03 ± 0.07
IgM (g/L)	1.34 ± 0.09	2.01 ± 0.12	1.98 ± 0.11	3.21 ± 0.21	2.65 ± 0.19	3.01 ± 0.26
IgG (g/L)	8.56 ± 0.76	8.01 ± 0.45	9.02 ± 0.79	10.43 ± 0.86 ^a	8.76 ± 0.65	9.05 ± 0.79
CD4/CD8	1.29 ± 0.61	1.35 ± 0.69	1.59 ± 0.74	4.98 ± 1.21 ^a	2.11 ± 0.65	1.22 ± 0.79
NK (%)	12.65 ± 3.76	13.01 ± 4.34	12.12 ± 3.32	18.04 ± 4.56 ^a	11.01 ± 3.01	6.45 ± 2.23
ALB (g/L)	37.54 ± 4.12	40.21 ± 4.13	39.31 ± 4.01	35.32 ± 3.64	35.34 ± 3.87	36.77 ± 4.12
TFN (g/L)	2.75 ± 0.23	2.65 ± 0.43	2.43 ± 0.51	2.81 ± 0.65 ^a	2.01 ± 0.32	1.32 ± 0.27
PA (g/L)	0.24 ± 0.06	0.25 ± 0.05	0.26 ± 0.04	0.27 ± 0.06 ^a	0.19 ± 0.04	0.15 ± 0.03

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 术后PN, NN组.

差分析, P<0.05为差异有显著性.

2 结果

2.1 血清细胞因子、内毒素水平、免疫功能及营养相关指标 术前7 d 3组IL-6, TNF α 及血清内毒素水平无明显差别($P>0.05$), 术后7 d, EN-PN组IL-6, TNF α 及血清内毒素水平较PN和NN组明显降低($P<0.01$). 术后7 d, IgA和IgM在3组间均无明显差别($P>0.05$), EN-PN组IgG、NK细胞活性及CD4/CD8在术后7 d显著高于PN和NN组($P<0.05$). 术后7 d血清白蛋白在3组之间无显著性差异($P>0.05$), 但EN-PN组转铁蛋白及前白蛋白在术后7 d明显高于PN组和NN组($P<0.05$), PN和NN组相比无显著性差异($P>0.05$)(表1).

2.2 感染率、体重变化及术后住院时间 术后并发症主要有静脉炎, 切口感染、切口不愈合或切口延迟愈合、腹泻、吻合口瘘及肠梗阻等, EN-PN组术后并发症明显降低, 与PN, NN组比较有显著性差异($P<0.01$), PN组的并发症发生率与NN组比较亦明显降低($P<0.05$). EN-PN组术后平均住院时间及体重下降值与PN、NN组比较有显著性差异($P<0.01$), 拆线时间EN-PN与PN组比较无显著性差异($P>0.05$), 但和NN组比较拆线时间有所缩短, 但无统计学差异($P>0.05$), 胃肠功能恢复时间EN-PN和PN、NN组相比有显著性差异($P<0.01$)(表2).

3 讨论

消化道恶性肿瘤患者多存在明显的厌食, 食物摄入严重不足, 是营养不良的高发人群, 特别是手术治疗后, 使他们的免疫系统遭受更大打击时更是如此, 营养不良可增加术后并发症, 延长

表2 患者术后感染率、体质量变化和平均住院时间

	EN-PN组	PN组	NN组
术后并发症发生率(%)	11.3 ^b	16.4	21.6
体质量下降值(kg)	2.4 ± 0.2 ^b	5.7 ± 0.7	6.3 ± 1.3
术后平均住院时间(d)	7.0 ± 1.4 ^b	11.0 ± 2.4	13.0 ± 2.8
拆线时间(d)	6.0 ± 1.0	6.0 ± 1.32	9.0 ± 2.3
胃肠功能恢复时间(h)	45.2 ± 11.4 ^a	61.0 ± 15.7	68.0 ± 13.5

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 术后PN、NN组.

住院时间, 增加死亡率, 因此对消化道恶性肿瘤患者进行围手术期营养支持至关重要. 对营养不良的消化道恶性肿瘤患者术后早期进行营养支持的观点已日益受到重视, 多选用肠内肠外营养相结合的营养支持^[1-6]. 我们3组患者均于术后24 h经鼻空肠开始肠内肠外营养相结合的营养支持, 耐受良好. 术后营养支持得到肯定, 但术前营养支持研究较少^[7]. 以往的营养治疗侧重于完全性肠外营养, 但肠外营养易出现感染及代谢并发症, 长期的肠外营养还可导致肠黏膜的萎缩, 继而导致肠屏障功能削弱, 引起肠道菌群易位(enteric bacterial translocation), 易诱发肠源性感染, 而肠源性感染是危重患者多脏器功能衰竭的重要原因^[8-9]. 从营养补充的有效性的角度看, 肠外营养与肠内营养同样有效, 但对于免疫能力低下的患者, 维持肠黏膜的完整性可以降低细菌异位和感染发生的危险, 使用肠内营养对于这类患者的临床意义更为重大^[10]. 多种细胞因子均可引起肠黏膜通透性增高, 其中包括内毒素、TNF和IL-6^[11], 本研究结果提示EN-PN组在术后7d血清内毒素、IL-6及TNF α 均明显降低, 表明肠内营养可抑制炎症介质的过量释放, 减少肠黏膜通透性. 和PN组

相比, EN-PN组术后感染并发症显著降低, 住院时间缩短, 提示肠内和肠外营养联合在提高患者抗感染能力方面优于单纯肠外营养。术后7 d EN-PN组的血清前白蛋白和转铁蛋白水平明显高于PN组, 提示肠内营养和肠外营养联合的营养方式更有利于促进蛋白质的合成, 对比观察中血清白蛋白的变化不明显, 白蛋白水平代表内脏蛋白的合成, 有平稳的合成速度, 白蛋白水平的下降与术后并发症和死亡率的上升有关, 但白蛋白半衰期相对较长(20 d), 不能反映急性营养改变, 而前白蛋白和转铁蛋白的生物半衰期相对较短(分别为1.9和8.9 d), 对营养的缺乏相对敏感。

进展期消化道恶性肿瘤患者除营养不良外, 还可以同时伴有免疫功能低下, 表现在细胞免疫功能缺陷, 机体对癌细胞的杀伤能力减退, 同时手术可削弱机体的免疫应答能力^[12-14]。NK细胞是机体天然免疫系统的主要成员, 具有早期识别和清除肿瘤的作用, 若去除NK细胞或NK细胞活性丢失, 则肿瘤细胞继续生长, CD8阳性细胞依赖的肿瘤排斥也需要NK细胞的参与。本研究提示肠内营养能增强NK细胞活性, 提高Th和Th/Ts细胞比例, EN-PN组在术后7 d IgG及CD4/CD8值亦显著升高, 提示肠内营养可提高免疫尤其是细胞免疫功能。我们选用的肠内营养制剂对患者的免疫功能也可能有影响, 瑞能是肿瘤专用型肠内免疫营养制剂, 富含免疫增强剂ω-3脂肪酸和抗氧化维生素A、C、E, 可产生免疫促进作用, 防止肿瘤及手术所导致的免疫抑制。我们研究选用瑞能作为肠内营养制剂, 在治疗过程中2例患者发生腹泻, 均经对症治疗后好转。但本文未和其他的肠内营养制剂进行比较, 是否瑞能可直接提高患者免疫功能还需进一步研究。

本组患者术前均存在不同程度的营养不良, 对营养不良的消化道肿瘤患者术前进行肠内和肠外联合营养支持是有益的, 但理论上营养素的供给可能刺激肿瘤的生长和转移, 尤其有些肿瘤特别是血液供应较差的肿瘤, 可能利用葡萄糖作为主要的能量来源。所以对肿瘤患者进行营养支持应适度, 对非营养不良患者要慎重给予营养支持^[15-18]。目前仅有极少数的研究支持营养支持可提高患者的生存率, 肠内营养支持可改善患者的营养状态, 但对改善患者的生存质量作用不大, 而且营养支持可以增加患者的医疗费用, 应充分评估营养支持的负担

与可能获得的益处, 对肿瘤患者进行适度的营养支持^[19-21]。

4 参考文献

- 1 Takamura H, Tani T, Kitagawa H, Kayahara M, Ohta T. Post-operative digestive function and nutrition in pancreas cancer. *Nippon Rinsho* 2006; 64 Suppl 1: 316-320
- 2 Okabayashi T, Kobayashi M, Nishimori I, Sugimoto T, Akimori T, Namikawa T, Okamoto K, Onishi S, Araki K. Benefits of early postoperative jejunal feeding in patients undergoing duodenal hemipancrectomy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 89-93
- 3 Braga M, Gianotti L, Gentilini O, Parisi V, Salis C, Di Carlo V. Early postoperative enteral nutrition improves gut oxygenation and reduces costs compared with total parenteral nutrition. *Crit Care Med* 2001; 29: 242-248
- 4 Vander KA. The early enteral feeding in patients after the surgical treatment of duodenal ulcer. *Lik Sprava* 2005: 42-45
- 5 Mangiante G, Carluccio S, Casaril A, Rossi M, Ciola M. Perioperative enteral nutrition. *Chir Ital* 2005; 57: 293-299
- 6 Gabor S, Renner H, Matzi V, Ratzenhofer B, Lindenmann J, Sankin O, Pinter H, Maier A, Smolle J, Smolle-Juttner FM. Early enteral feeding compared with parenteral nutrition after oesophageal or oesophagogastric resection and reconstruction. *Br J Nutr* 2005; 93: 509-513
- 7 Wu GH, Liu ZH, Wu ZH, Wu ZG. Perioperative artificial nutrition in malnourished gastrointestinal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2441-2444
- 8 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 4: 417-421
- 9 Braunschweig CL, Levy P, Sheean PM, Wang X. Enteral compared with parenteral nutrition: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2001; 74: 534-542
- 10 Tappenden KA. Mechanisms of enteral nutrient-enhanced intestinal adaptation. *Gastroenterology* 2006; 130: S93-S99
- 11 Lin MT, Kung SP, Yeh SL, Liaw KY, Wang MY, Kuo ML, Lee PH, Chen WJ. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition attenuates plasma interleukin-6 in surgical patients with lower disease severity. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6197-6201
- 12 Santacroce L, Leone D, Valenzano A, Luperto P, Bottalico L, Losacco T. Nutritional problems in the surgical patients with head and neck tumours. Literature review and personal experience. *Clin Ter* 2005; 156: 227-230
- 13 Mangiante G, Carluccio S, Casaril A, Rossi M, Ciola M. Perioperative enteral nutrition. *Chir Ital* 2005; 57: 293-299
- 14 Zaloga GP. Parenteral nutrition in adult inpatients with functioning gastrointestinal tracts: assessment of outcomes. *Lancet* 2006; 367: 1101-1111
- 15 Bozzetti F, Braga M, Gianotti L, Gavazzi C, Mariani L. Postoperative enteral versus parenteral nutrition in malnourished patients with gastrointestinal cancer: a randomised multicentre trial. *Lancet* 2001; 358: 1487-1492
- 16 Doig GS, Simpson F. Early enteral nutrition in the

■应用要点

营养支持可改善消化道肿瘤患者的营养状态, 但对改善患者的生存质量及远期预后作用影响尚无大规模研究, 目前仅有极少数的研究支持营养支持可提高患者的生存率, 而且营养支持可以增加患者的医疗费用, 应充分评估营养支持的负担与可能获得的益处, 对肿瘤患者进行适度的营养支持。

■同行评价

术前营养状态对患者的恢复影响较大,本文的研究有一定的科学意义和临床实用价值。

- critically ill: do we need more evidence or better evidence? *Curr Opin Crit Care* 2006; 12: 126-130
- 17 Gramlich L, Kichian K, Pinilla J, Rodych NJ, Dhaliwal R, Heyland DK. Does enteral nutrition compared to parenteral nutrition result in better outcomes in critically ill adult patients? A systematic review of the literature. *Nutrition* 2004; 20: 843-848
- 18 Mercadante S. Parenteral versus enteral nutrition in cancer patients: indications and practice. *Support Care Cancer* 1998; 6: 85-93
- 19 Shang E, Weiss C, Post S, Kaehler G. The influence of early supplementation of parenteral nutrition on quality of life and body composition in patients with advanced cancer. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 222-230
- 20 Elia M, Van Bokhorst-de van der Schueren MA, Garvey J, Goedhart A, Lundholm K, Nitenberg G, Stratton RJ. Enteral (oral or tube administration) nutritional support and eicosapentaenoic acid in patients with cancer: a systematic review. *Int J Oncol* 2006; 28: 5-23
- 21 Dormann AJ. Endoscopic palliation and nutritional support in advanced gastric cancer. *Dig Dis* 2004; 22: 351-359

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会第二轮通知

本刊讯 第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会于2006-09-15/18在浙江省杭州市举行。本届会议由上海同人医院和浙江省中医院联合主办,中华放射学杂志、中华消化内镜杂志、世界华人消化杂志和介入放射学杂志共同协办。会议将邀请众多著名专家围绕消化疾病介入诊治新热点及消化道内支架治疗的热门技术和疑难问题进行专题演讲和实例操作,并就消化道支架治疗中的疑难病例和出现问题以沙龙形式深入研讨。参会代表可获国家级继续教育I类学分12分。

1 会议主要议题

消化疾病诊治进展、消化内镜治疗新技术应用、化疗药物应用新进展、上消化道吻合口梗阻和瘘的综合治疗、胸腔胃穿瘘的支架封堵技术、肠道支架临床应用、肝门部胆道梗阻的内支架治疗、食管及胃肠道支架难点研讨以及其他介入新技术应用等。

2 征文内容

征集消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等方面的论著、文献综述、临床经验、个案报告等稿件。欢迎消化、介入放射、肿瘤、普外、胸外及肝胆外科等相关学科医师投稿参会。

3 投稿要求

专题讲座由组委会约稿。论著需1000字以内的标准论文摘要,包括目的、方法、结果与结论四要素。经验交流、短篇报道等全文限1000字以内。所有稿件一律要求电脑打印用E-mail投稿,邮寄者需附WORD格式软盘(请自留稿底,恕不退稿)。

4 报名地址及要求

联系地址: 杭州市邮电路54号(浙江省中医院)吕宾 收, 邮编: 310006, 电话: 0571-87032028, 手机: 13906515409, E-mail: lvin@medmail.com.cn; 上海市愚园路786号(上海同人医院)茅爱武 收, 邮编: 200050, 电话: 021-62524259-3397, 手机: 13371936559, E-mail: maoaw@sohu.com. 会议收费800元, 提前注册收费700元, 截稿日期: 2006-08-15.

大肠多原发癌临床分析42例

顾国利, 王石林, 魏学明, 周晓武, 黄蓉蓉

顾国利, 王石林, 魏学明, 周晓武, 黄蓉蓉, 空军总医院普通外科 北京市 100036
通讯作者: 顾国利, 100036, 北京市海淀区阜成路30号, 空军总医院普通外科. kzggl@163.com
电话: 010-68410099-6302
收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-05-24

Multiple primary colorectal carcinomas: an analysis of 42 cases

Guo-Li Gu, Shi-Lin Wang, Xue-Ming Wei, Xiao-Wu Zhou, Rong-Rong Huang

Guo-Li Gu, Shi-Lin Wang, Xue-Ming Wei, Xiao-Wu Zhou, Rong-Rong Huang, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air force, Beijing 100036, China

Correspondence to: Guo-Li Gu, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA Air force, Beijing 100036, China. kzggl@163.com

Received: 2006-05-08 Accepted: 2006-05-24

Abstract

AIM: To conclude the clinical characteristics of multiple primary colorectal carcinoma (MPCC).

METHODS: The clinical data of 42 patients with MPCC out of 1354 primary colorectal cancer cases, who were treated in our hospital from 1980 to 2005, were retrospectively analyzed.

RESULTS: The percentage of patients with MPCC was 3.10% (synchronous: 0.96%; metachronous: 2.14%). Of the 42 cases, 20 (1.48%) were accompanied by carcinoma of other organs. Adenocarcinoma was the most common cancer, locating at the right colon (46.3%) and rectum (31.3%). The tumors of other organs were mainly located at stomach, small intestine, breast, ovary and uterus. The data of 12 cases (12/42, 28.6%) were in accordance with Amsterdam criteria II for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), and the data of 16 cases (16/42, 37.2%) were in accordance with the Chinese criteria for HNPCC. Colon fiberscopy was helpful in the diagnosis of MPC.

CONCLUSION: MPCC, with a high incidence

rate, has particular epidemic, clinical and pathological characteristics. Colon fiberscopy is important in the diagnosis of MPC, and postoperative following up should be strengthened for the diagnosis of HNPCC.

Key Words: Colorectal neoplasm; Multiple primary colorectal carcinoma; Clinical characteristics; Hereditary nonpolyposis colorectal cancer

Gu GL, Wang SL, Wei XM, Zhou XW, Huang RR. Multiple primary colorectal carcinomas: an analysis of 42 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1933-1936

摘要

目的: 探讨大肠多原发癌及其肠外器官恶性肿瘤的流行病学、临床病理特点及诊治方法。

方法: 对我院1980-2005年收治的42例大肠多原发癌及其肠外恶性肿瘤的临床、病理及随访资料进行回顾性分析。

结果: 本组病例占我院同期收治的所有大肠癌的3.10%(42/1354), 其中同时性大肠多原发癌13例(0.96%); 异时性大肠多原发癌29例(2.14%); 合并肠外器官恶性肿瘤的有20例(1.48%)。大肠癌灶以右半结肠和直肠为多, 肠外癌灶以胃、小肠、乳腺、卵巢、子宫为多; 病理均以腺癌为主。共有12例(28.6%)符合遗传性非息肉病性大肠癌(HNPCC)阿姆斯特丹标准II, 16例(37.2%)符合中国人HNPCC诊断标准。结肠纤维镜检查有助于多原发癌的检出。

结论: 大肠多原发癌的发病率较高, 其流行病学和临床病理特点突出。应注意重视结肠纤维镜检查, 术中应仔细全面探查, 加强术后随访有助于HNPCC的发现和诊断, 以避免误诊漏诊。

关键词: 结肠直肠肿瘤; 大肠多原发癌; 临床特点; 遗传性非息肉病性大肠癌

顾国利, 王石林, 魏学明, 周晓武, 黄蓉蓉. 大肠多原发癌临床分析42例. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1933-1936

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1933.asp>

■背景资料

大肠MPC中HNPCC的比例较高, HNPCC是目前大肠癌研究的一个热点。关于HNPCC的临床诊断标准较多, 其中一个重要分歧就是HNPCC相关肠外癌的类型。我国大肠癌家系伴发胃癌的比例较高; 2003年杭州会议提出的所谓中国人HNPCC诊断标准中加入了胃癌这一肠外癌, 但还未得到同道的广泛接受。

■应用要点

大肠MPC的发病率较高, 临床病理特点突出, 如不重视随访和复查极易被误诊漏诊。本文试图通过对所经治MPC病例的临床资料的总结和国内同行文献的学习, 归纳出大肠MPC的流行病学和临床病理特点, 以期临床医生在一线工作中提高对该病的认识和诊治技能, 加强随访和复查工作, 避免误诊误治。

0 引言

多原发癌(multiple primary carcinoma, MPC)是指同一个体的单个或多个器官同时或先后发生两个或两个以上互相独立的原发性恶性肿瘤^[1]。其中大肠MPC因其发生率较高、临床病理特点突出而日益受到普外临床的广泛重视。通过病案检索我院1980-2005年共收治大肠癌1354例, 其中MPC 42例(3.10%)。现就其临床病理特点分析讨论如下。

1 材料和方法

1.1 材料 采用通用的MPC诊断标准^[2]: (1)每个肿瘤均经组织学检查证实为恶性, 且除外侵犯、转移和复发; (2)肿瘤发生在不相连续的不同部位; 大肠两癌灶间有≥5 cm正常黏膜; (3)每个癌有各自独特的病理学形态和特有的转移途径; (4)所有癌肿同时或6 mo内获得诊断者称为同时性MPC(synchronous carcinoma, SC), 在首发癌肿发现后6 mo以上获得诊断者称为异时性MPC(metachronous carcinoma, MC); (5)排除家族性结肠息肉病和溃疡性结肠炎造成的MPC。按上述标准, 病案检索我院1980-2005年共收治大肠癌1354例; 其中MPC 42例(占3.1%), 男25例, 女17例, 男女比例1.47:1。第一癌发病年龄27-79(中位53±13)岁。SC 13例(0.96%), 占31.0%; MC 29例(2.14%), 占69.0%。合并大肠外器官恶性肿瘤者20例(1.48%)。29例MC癌间隔时间7-197(中位63±40)mo, 其中<36 mo者10例(34.5%), >96 mo者4例(13.8%)。本组二原癌36例, 三原癌6例。共有癌灶90个, 其中大肠癌灶67个(盲肠升结肠段31个, 横结肠段5个, 降结肠乙状结肠段10个, 直肠段21个); 大肠外恶性肿瘤23个(胃6个, 小肠4个, 乳腺3个, 卵巢2个, 子宫、食管、阑尾、膀胱、肺、喉、脑、血液各1个)。67个大肠癌灶中有乳头状腺癌3个(4.5%); 管状腺癌52个(77.6%)[其中高分化20个(29.8%), 中分化27个(40.3%), 低分化5个(7.5%)]; 黏液腺癌11个(16.4%); 印戒细胞癌1个(1.5%)。首发大肠癌的Dukes分期: A期1例(2.4%), B期18例(42.9%), C期20例(47.6%), D期3例(7.1%)。再发癌的Dukes分期: A期5例(22.7%), B期12例(54.5%), C期4例(18.2%), D期1例(4.5%)。23个肠外恶性肿瘤中有腺癌13个(56.5%), 鳞癌、导管浸润癌各3个(各占13.0%), 印戒细胞癌、移行细胞癌、星形胶质细胞瘤、淋巴细胞性白血病各1个(各占4.4%)。

1.2 方法 本组13例SC中行全结肠切除2例, 结肠

表 1 本组病例临床病理资料

项目	n(个)
病灶部位:	
盲肠升结肠段	31 ^a
横结肠段	5
降结肠乙状结肠段	10
直肠段	21 ^a
病理类型:	
乳头状腺癌	3
管状腺癌	
高分化	20 ^a
中分化	27 ^a
低分化	5
黏液腺癌	11 ^a
印戒细胞癌	1
首发癌Dukes分期:	
A	1
B	18
C	20 ^a
D	3
再发癌Dukes分期:	
A	5 ^a
B	12
C	4
D	1

^aP<0.05。

次全切除3例, 分别行根治性手术或肠段联合切除者8例; 有5例造口, 1例行回肠肛管吻合。29例MC初发癌均行相应根治性手术, 二次癌行根治性切除19例次, 姑息性切除8例次, 造口4例次。3例三次癌中2例行根治性切除, 1例行姑息性手术。

统计学处理 数据用mean±SD表示, 各组资料分析应用计数资料的χ²检验, P<0.05有统计学意义。

2 结果

MS间隔时间多在36-96 mo(15/29, 占51.7%), 大肠癌灶以盲肠升结肠段和直肠段最多(表1), 病理类型以管状腺癌(特别是中分化)和黏液腺癌最多见(表1), 首发癌以Dukes B、C期为多, 再发癌以B期多见, 但A期比例较首发癌明显提高(表1)。以上结果统计学差异显著。全部病例采用电话、信访或门诊检查的方式进行随访。4例在术后1 a内失访(9.5%), 3例随访中分别死于肺炎、心肌梗塞和化疗并发症。完成5 a随访者18例, 最长1例随访17 a。首次手术后的5 a生存率为51.4%。主要死亡原因是肝转移、腹腔播散转移和肺转移。

3 讨论

随着结肠镜检查在临幊上广泛普及、大肠癌发病率的升高以及综合治疗使肿瘤患者生存期的

延长, MPC的发病率呈上升趋势^[3-4]; 目前虽无精确统计, 但多数报告为0.6%-10.7%^[1,3,5-7], 本组发病率为3.1%, 与文献报道相近。本组患者平均发病年龄为53岁, 较文献报道^[8]遗传性非息肉病性大肠癌(HNPCC)平均发病年龄45岁为大, 但与散发性大肠癌平均发病年龄65岁相比明显年轻; 原因: 本组中HNPCC和散发性大肠癌相混杂且HNPCC所占比例较高。本组患者性别比例与散发性大肠癌相仿。目前认为^[3,6,9], MPC的高危因素有宿主因素(包括易感性、免疫状态、内分泌及胚胎发育等)、手术因素、放化疗因素、疾病因素和遗传因素等。本组42例大肠癌均行化疗, 部分直肠癌患者行放射治疗。放化疗、肿瘤易感性及宿主免疫状态等因素可能在其发生中起重要作用。另外, 遗传因素在本组的作用明显, 经随访及家系调查发现本组中有12例(28.6%)符合HNPCC的Amsterdam标准Ⅱ^[10]。有16例(37.2%)符合中国人HNPCC诊断标准(在Amsterdam标准Ⅱ的肠外癌中加入了胃癌)。较文献报道^[11-12]的HNPCC的MPC发病率11%-12.5%明显偏高。分析原因除与较早认识HNPCC有关外, 也与注意加强了对患者及其一级亲属的宣教和复查、随访工作有关。本组MPC大肠癌和肠外恶性肿瘤均以腺癌为主, 大肠癌灶多见于右半结肠, 其次为直肠段, 但总的左右半结肠的分布无明显差异。首发大肠癌以Dukes B、C期为多, 再发癌仍以B期最多, 但A期比例明显增加, 统计学差异明显。原因: 患者在首次手术后健康观念增强以及加强了结肠镜复查的结果。

本组中仅有4例是在我院开展结肠镜检查前获得诊断, 其余病例均经结肠镜检查确诊, 胃癌均是通过胃镜确诊, 且在MC中再发癌的A期患者比例明显增加。因此, 内镜检查是发现MPC的重要手段。本组X线造影检查漏诊3例, 分析原因: X线造影是依靠肿瘤在造影剂中充盈缺损等间接表现来获取诊断, 对肠道清洁度要求较高。临床工作中除了注意针对结直肠的检查外, 还有认识到MPC肠外癌的特点, 注意加强对肠外癌的好发部位作针对性辅助检查, 以避免漏诊。本组预后较好, 5 a生存率达51.9%, 与国内文献^[13]结果相似。因此对大肠MPC应采取积极的治疗。但本组符合HNPCC诊断标准的病例仅有1例行结肠次全切除, 其余均行肠段的根治性手术。其中2例在5 a内先后行4次手术, 结果是“屡发屡做, 屢做屡发, 越做越难”, 最终因术后腹腔广泛黏连而放弃手术, 最终死于肿瘤的腹腔

内复发、转移。原因: 除了与在早期没有认识HNPCC有关以外, 也与无法尽早确诊HNPCC、不接受过大手术、拒绝造口以及回肠肛管吻合术后控便效果不确切等因素有关。另外由于针对HNPCC的基因检测尚存在结果不稳定、费用昂贵等缺点, 因此目前还无法将MMR的检测应用于临床和用于人群普查筛选^[14]。本组显示MC在MPC中占69.05%, 且多数间隔在36-96(平均63) mo, 这与国内学者报道^[11,15]的MC平均间隔66 mo相似。因此加强随访对于MPC的诊断具有非常重要的意义。除了常规针对患者的随访以外, 我们也要注意对于HNPCC可疑病例的一级亲属的随访, 加强宣教工作, 在无法进行针对性基因检测时应尽量督促其一级亲属定期进行结肠镜检查, 以期尽量早发现、早治疗。

4 参考文献

- 王宏志, 黄信孚, 王怡, 季加孚, 顾晋. 多原发大肠癌37例临床分析. 中华普通外科杂志 2003; 18: 588-590
- Fante R, Roncucci L, Di Gregorio C, Tamassia MG, Losi L, Benatti P, Pedroni M, Percesepe A, De Pietri S, Ponz de Leon M. Frequency and clinical features of multiple tumors of the large bowel in the general population and in patients with hereditary colorectal carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 2013-2021
- 张常华, 何裕隆, 詹文华, 蔡世荣, 黄美近, 汪建平, 彭建军. 结直肠多原发癌患者的临床分析. 中华胃肠外科杂志 2005; 8: 38-40
- Almendingen K, Hofstad B, Vatn MH. Does a family history of cancer increase the risk of occurrence, growth, and recurrence of colorectal adenomas? *Gut* 2003; 52: 747-751
- Fajobi O, Yiu CY, Sen-Gupta SB, Boulos PB. Metachronous colorectal cancers. *Br J Surg* 1998; 85: 897-901
- 刘晓平, 易辛, 龙光辉, 韦伟, 于鼎, 李天石, 任明明, 朱立元. 结直肠多原发癌的诊治. 中国基层医药杂志 2005; 12: 406-407
- 屠世良, 邹寿椿, 王辉, 邓高里, 刘放, 董全进, 郭杰, 王仁华. 结直肠多原发癌和结直肠癌合并其他器官恶性肿瘤临床分析. 中华胃肠外科杂志 2002; 5: 49-52
- 王石林, 顾国利, 丁映钦, 欧阳芑玺, 魏学明. 青年人大肠癌的预后与家族遗传背景的影响. 中国普通外科杂志 2004; 13: 249-252
- 饶旭光, 段明科, 杨伟, 万协存. 同时性上消化道多原发癌20例. 河北医学杂志 2004; 10: 312-314
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116: 1453-1456
- 金黑鹰, 崔龙, 孟荣贵, 喻德洪, 阎于悌, 徐洪莲, 刘飞. 遗传性非息肉病性大肠癌家族多原发癌的特点. 中华胃肠外科杂志 2001; 4: 165-166
- Peel DJ, Ziogas A, Fox EA, Gildea M, Laham B, Clements E, Kolodner RD, Anton-Culver H. Characterization of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from a population-

■名词解释

1 多原发癌(MPC): 是指同一个体的单个或多个器官同时或先后发生两个或两个以上互相独立的原发性恶性肿瘤。其主要特点是两个以上的恶性肿瘤同时或异时独立发生在不同部位, 每个癌有其独特的病理形态和转移途径。大肠MPC应保证两癌灶相距5 cm且排除FAP和UC造成的MPC。

2 HNPCC是一种常染色体显性遗传病, 约占结直肠癌的5%, 错配修复基因(MMR)的种系突变是该病的遗传学基础。Amsterdam标准Ⅱ:(1)家系中至少有3例HNPCC相关的癌, 包括大肠癌、子宫内膜癌、小肠癌、输尿管或肾盂癌等。(2)至少连续2代发病。(3)至少1例在50岁之前被诊断。

- based series of cases. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1517-1522
- 13 余丹, 姚宏亮, 李铁钢, 赵华, 刘国清, 冯大作, 皮执民. 同时性大肠多原发癌的诊治(附34例报告). 中国现代医学杂志 2005; 15: 1681-1685
- 14 王石林, 顾国利, 丁映钦, 欧阳营奎, 魏学明. 遗传性非息肉病性大肠癌的临床病理特点及手术方式选择-11个家系回顾性分析. 肿瘤防治研究杂志 2004; 22: 129
- 15 Tomoda H, Baba H, Taketomi A, Kohnoe S, Seo Y, Saito T. Second primary extracolonic cancers in Japanese hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Oncol Rep* 1998; 5: 143-145

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

更正与说明专栏

本刊讯 《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道, 特设“更正与说明”固定专栏, 包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目, 不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明, 而且针对文章的学术水平等进行讨论. 在此, 我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》, 给更正与说明栏目投稿.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信), 免收出版费, 写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间



两种膜分离器对血浆置换后血细胞数及血生化影响的比较

罗玲, 袁春兰

罗玲, 袁春兰, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 重庆市 400010
通讯作者: 罗玲, 400010, 重庆市, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所. luo_l8888@163.com
电话: 023-63784323 传真: 023-63703790
收稿日期: 2006-04-20 接受日期: 2006-06-06

Comparative analysis of blood cell count and blood biochemistry after plasmapheresis with two kinds of membranous plasma separator

Ling Luo, Chun-Lan Yuan

Ling Luo, Chun-Lan Yuan, Institute of Viral Hepatitis, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400010, China

Correspondence to: Ling Luo, Institute of Viral Hepatitis, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400010, China. luo_l8888@163.com

Received: 2006-04-20 Accepted: 2006-06-06

Abstract

AIM: To compare the differences in blood cell count, renal function and blood biochemistry after plasmapheresis with PS-06 and Evacure-4A membranous plasma separators.

METHODS: One hundred and twelve patients were treated with plasmapheresis besides comprehensive treatment, through KM-8800 plasma exchange device (Kuraray) and PS-06 (group A, $n = 54$) or Evacure-4A (group B, $n = 58$) membranous plasma separator.

RESULTS: The decreased rates (post-treatment/pre-treatment) in platelet (PLT), hemoglobin (Hb) and blood NH₃ were significantly different between group A and B (PLT: $92.2\% \pm 14.8\%$ vs $99.8\% \pm 22.4\%$, $P < 0.05$; Hb: $88.1\% \pm 9.7\%$ vs $94.8\% \pm 3.8\%$, $P < 0.01$; NH₃: $81.2\% \pm 22.7\%$ vs $66.6\% \pm 13.7\%$, $P < 0.01$). However, the changes of other indexes were not significantly different between the two groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: During the plasmapheresis, Evacure-4A membranous plasma separator has no significant effect on platelets level, little effect on Hb level and significant effect on blood NH₃, which is superior to PS-06 plasma separator.

Key Words: Plasmapheresis; Blood cells; Blood biochemistry; Membranous plasma separator

Luo L, Yuan CL. Comparative analysis of blood cell count and blood biochemistry after plasmapheresis with two kinds of membranous plasma separators. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(19):1937-1939

摘要

目的: 比较两种不同材料制备的膜型血浆分离器PS-06与Evacure-4A在人工肝血浆置换治疗后对患者血细胞数、肾功能、血电解质及血氨的影响。

方法: 在内科综合治疗基础上联合人工肝血浆置换治疗患者112例,应用KM-8800型血浆置换装置(Kuraray)和PS-06、Evacure-4A两种膜型血浆分离器,其中应用PS-06膜型血浆分离器(A组)54例,应用Evacure-4A膜型血浆分离器(B组)58例,检测治疗前后的血常规、肾功能、血电解质及血氨。

结果: 患者术后各项指标的增减百分率比较,其中血小板(PLT)、血红蛋白(Hb)、血氨(NH₃)下降率(治疗后/治疗前)A组与B组间有显著性差异(PLT: $92.2\% \pm 14.8\%$ vs $99.8\% \pm 22.4\%$, $P < 0.05$; Hb: $88.1\% \pm 9.7\%$ vs $94.8\% \pm 3.8\%$, $P < 0.01$; NH₃: $81.2\% \pm 22.7\%$ vs $66.6\% \pm 13.7\%$, $P < 0.01$),其他各项指标增减百分率无统计学意义($P > 0.05$)。

结论: 人工肝血浆置换治疗中Evacure-4A膜型血浆分离器对血小板无明显影响,对血红蛋白影响较小,并能更有效地清除患者体内尿素氮、肌酐及血氨等毒性代谢产物,明显优于PS-06膜型血浆分离器。

■背景资料

人工肝血浆置换现普遍应用于临床,给晚期肝病患者的治疗提供了新的手段,明显提高了患者抢救成功率,提高生活质量,但也存在一些不良反应及并发症。

■研发前沿

晚期肝病治疗是临床工作中的一大难题,如何提高患者的生存率,降低死亡率,减少危及患者生命的并发症的发生,是目前研究的重点。

■相关报道

目前人工肝的使用过程中报道过的并发症有：出血、感染、血浆过敏反应，跨膜压过高等。

关键词：血浆置换；血细胞数；血生化；膜型血浆分离器

罗玲,袁春兰.两种膜分离器对血浆置换后血细胞数及血生化影响的比较.世界华人消化杂志 2006;14(19):1937-1939
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1937.asp>

0 引言

人工肝支持治疗系统(*artificial liver support system, ALSS*)已成功应用于临床治疗重型肝炎,其中以单纯血浆置换治疗最常用^[1]. 其主要作用是为患者提供暂时的代谢支持,降低血中胆红素和血液中的内毒素、致炎因子等. 其原理是将患者的血液引出,通过膜型血浆分离器将血液的有型成分(血细胞)和血浆分离,分离出的血浆按20%-30%的比例丢弃,再补充等量正常人的新鲜血浆并和患者的血细胞混合后由静脉输入,形成循环回路. 不同材料制备的膜型血浆分离器由于膜面积和孔径存在差异,治疗效果存在差异^[2],对血细胞数及血液生化的影响亦不尽相同. 我们比较了应用由聚乙烯黄基制备的PS-06膜型血浆分离器和由乙烯、乙烯醇共聚物制备的Evacure-4A膜型血浆分离器进行血浆置换治疗对血细胞数及血生化的影响如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-05/2005-06在我院住院行人工肝血浆置换治疗患者112例共400次. 男88例,女24例,年龄25-71(平均38.9)岁,其中慢性重型肝炎94例,慢性乙型肝炎重度13例,急性重型肝炎3例,亚急性重型肝炎1例,原发性肝癌介入术后肝衰竭1例. 诊断标准符合2000年全国病毒性肝炎会议修订的临床诊断标准^[3].

1.2 方法 患者入院后均进行常规治疗,给予促肝细胞生长素、甘利欣、还原型谷胱甘肽、血浆、白蛋白等综合保肝支持治疗,同时给予ALSS治疗,ALSS选用KM-8800型血浆置换装置(*Kuraray*),采用单纯血浆置换法,按常规方法进行操作,每次置换血浆量为3000 mL. 应用PS-06膜型血浆分离器(A组)54例,应用Evacure-4A膜型血浆分离器(B组)58例,每人进行血浆置换1-9次,治疗中密切观察患者病情变化、跨膜压、动静脉压等参数,每次治疗前后检查血常规、肝肾功能、血电解质及血氨等.

统计学处理 应用SPSS 10.0统计软件进行配对样本t检验.

2 结果

A组患者使用PS-06膜型血浆分离器行人工肝血浆置换治疗后WBC、RBC、PLT、Hb、Cl⁻、NH₃均下降明显($P<0.01$),而BUN、Cr、K⁺、Na⁺变化不明显,统计学处理无显著性差异($P>0.05$,表1). B组患者使用Evacure-4A膜型血浆分离器进行人工肝血浆置换治疗后WBC、RBC、Hb、BUN、Cr、Cl⁻、NH₃明显下降($P<0.05$);而治疗后PLT、K⁺、Na⁺水平变化不明显($P>0.05$,表1). A、B两组治疗后比较PLT、Hb、NH₃下降百分率有显著性差异($P<0.05$),而其他各项指标增减百分率无显著性差异($P>0.05$,表1).

3 讨论

众所周知,重型肝炎患者由于肝功能衰竭,体内代谢毒物蓄积,内毒素增高,严重阻碍肝细胞再生,并可引起多脏器功能衰竭,是促使病情不可逆进展的重要原因. 近年来临幊上多在内科综合治疗基础上联合ALSS治疗,可清除患者血液中过多的胆红素、内毒素、致炎因子等,维持内环境的稳定,为肝细胞再生创造条件^[4-5]. 经过近年来越来越多的临床应用,目前证明ALSS治疗已经成为内科治疗重型肝炎的一个重要手段^[6];但和绝大多数的治疗手段一样,ALSS也存在多种不良反应和风险,如血浆过敏反应、出血、跨膜压增高、低血压等^[7]. 重型肝炎患者由于基础疾病重,肝脏合成凝血因子的功能降低,血小板明显减少,可能引起内脏自发性出血等严重并发症. 如果治疗过程中再出现进一步严重的医源性血细胞损坏,其发生出血等风险的可能性必然会进一步加大,甚至造成不可弥补的严重后果. 成功的ALSS治疗应该尽量减少对患者可能的医源性损害,因此不断拓展本领域的研究,寻找更好的膜型血浆分离器等血液净化产品,一直是大家努力的重要方向. 我们发现,PS-06膜型血浆分离器组与Evacure-4A膜型血浆分离器组患者治疗后WBC、RBC、Hb、Cl⁻及NH₃均明显下降($P<0.01$),但其测定值仍在正常范围内,患者的耐受性均较好,没有引起明显的临床症状;PS-06膜型血浆分离器组引起患者PLT明显减少,但其测定值也在正常范围内,其中有2例(3.6%)患者ALSS治疗后有明显的牙龈出血表现,有无临床意义值得临幊进一步扩大病例观察;Evacure-4A膜型血浆分离器组患者治疗后血液中BUN、Cr下降明显. 两组患者治疗后血细胞数及血生化增减百分率比较,PS-06膜型血浆分离器组Hb下降

■创新盘点

对人工血浆置换方面有较多文献报道,对不同膜型血浆分离器引起的不良反应还无相关报道,本文从两种不同膜型血浆分离器对患者血细胞、血生化、肾功能、血氨的影响方面进行了比较.

表 1 A、B组患者治疗前后的血细胞数、肾功能、电解质及血氨变化 (mean ± SD)

指标	A组			B组		
	治疗前	治疗后	增减%	治疗前	治疗后	增减%
WBC ($\times 10^9/L$)	8.2 ± 4.2	6.1 ± 3.3 ^b	74.8 ± 17.0	7.1 ± 2.8	5.7 ± 2.6 ^b	80.3 ± 15.4
RBC ($\times 10^{12}/L$)	3.5 ± 0.8	3.2 ± 0.8 ^b	93.7 ± 7.5	3.8 ± 0.8	3.6 ± 0.9 ^b	93.8 ± 3.3
PLT ($\times 10^9/L$)	78.2 ± 38.4	71.3 ± 35.2 ^b	92.2 ± 14.8	79.5 ± 38.7	76.3 ± 34.1	99.8 ± 22.4 ^c
Hb (g/L)	112.8 ± 24.3	99.2 ± 21.9 ^b	88.1 ± 9.7	117.5 ± 21.2	111.0 ± 19.5 ^b	94.8 ± 3.8 ^d
BUN (mmol/L)	5.0 ± 3.2	5.0 ± 3.1	93.0 ± 12.3	7.5 ± 5.7	6.7 ± 4.2 ^a	99.5 ± 25.8
Cr (μmol/L)	94.9 ± 53.3	91.2 ± 48.6 ^b	92.0 ± 14.5	115.5 ± 50.2	92.5 ± 40.9 ^a	90.8 ± 43.1
K ⁺ (mmol/L)	3.4 ± 0.5	3.4 ± 0.6	99.9 ± 13.2	3.8 ± 0.9	3.8 ± 0.9	101.2 ± 15.4
Na ⁺ (mmol/L)	132.3 ± 5.7	131.5 ± 6.9	100.0 ± 3.1	129.3 ± 8.8	129.2 ± 9.1	100.0 ± 2.7
Cl ⁻ (mmol/L)	102.7 ± 7.2	98.0 ± 7.2 ^b	95.5 ± 4.9	98.6 ± 9.3	96.0 ± 10.3 ^b	97.4 ± 3.8
NH ₃ (mmol/L)	126.0 ± 65.4	97.6 ± 51.9 ^b	81.2 ± 22.7	128.9 ± 54.5	80.9 ± 22.6 ^b	66.6 ± 13.7 ^d

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 治疗前; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs A组.

较Evacure-4A膜型血浆分离器组明显, 但尚未引起明显临床症状; Evacure-4A膜型血浆分离器组BUN, NH₃下降较PS-06膜型血浆分离器组明显, 说明前者清除体内BUN, NH₃等代谢产物作用强于后者。另外, 在ALSS治疗前后, 血细胞数及Cl⁻, NH₃的减少程度与血浆置换的次数无明显相关性, 并且其减少多呈一过性, 一般持续4-7 d后无需特殊处理即可恢复至治疗前水平。

引起血细胞数及血生化改变的原因与血浆分离过程有关, 而其中起直接作用的是膜型血浆分离器。我们所用的两种膜型血浆分离器对血细胞数及血生化都有一定影响, 但影响程度存在一定差异, 可能与膜型血浆分离器的材质及孔径有关。应用PS-06膜型血浆分离器可引起全血细胞数下降, 而应用Evacure-4A膜型血浆分离器虽然可引起WBC, RBC和Hb下降, 但对PLT计数无明显影响, 从而可能在某种程度上降低了患者出血的风险; 同时应用Evacure-4A膜型血浆分离器能较大幅度地清除患者体内BUN, Cr, NH₃等代谢产物, 可为肝细胞再生创造有利条件; 也能有助于提高患者血清白蛋白水平, 从而减少血浆及蛋白质的输入^[8]。我们在临床应用中还发现Evacure-4A膜型血浆分离器能耐受更高的跨膜压, 不易因跨膜压增高而引起血细胞

的破坏。因此, 重型肝炎人工肝血浆置换治疗中, Evacure-4A膜型血浆分离器似明显优于PS-06膜型血浆分离器, 值得临床进一步扩大应用和进行深入研究。

4 参考文献

- Agishi T, Nakagawa Y, Teraoka S, Kubo K, Nakazato S, Ota K. Plasma exchange as a rescue strategy for hepatic failure. ASAIO J 1994; 40: 77-79
- Sueoka A. Present status of apheresis technologies: Part 1. Membrane plasma separator. Ther Apher 1997; 1: 42-48
- 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. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- Suh KS, Lilja H, Kamohara Y, Eguchi S, Arkadopoulos N, Neuman T, Demetriou AA, Rozga J. Bioartificial liver treatment in rats with fulminant hepatic failure: effect on DNA-binding activity of liver-enriched and growth-associated transcription factors. J Surg Res 1999; 85: 243-250
- 秦波, 郑春花, 张大志, 赵有蓉, 郭树华, 王志毅, 周智. 人工肝支持系统对慢性重型肝炎患者血清细胞因子影响的动态研究. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 293-295
- 秦波, 郑春花, 张大志, 赵有蓉, 郭树华. 人工肝支持系统治疗慢性重型肝炎临床研究. 中国血液净化 2004; 3: 211-213
- LePage EB, Lane R, McKay D, Rozga J, Demetriou AA. Plasma separation for artificial liver support. J Clin Apher 1995; 10: 70-75
- 张大志, 赵有蓉, 张全海, 王志毅, 秦波, 何华, 周智, 郭树华. 两种膜型血浆分离器治疗重型肝炎的疗效比较. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 208-209

■应用要点

此研究为人工肝膜型分离器的改良提供了基础, 对临床医生选择适合于患者的膜型分离器有指导意义。

■同行评价

本文材料真实, 结果可靠, 分析论理较充分, 对临床使用有一定的指导性, 具有一定的先进性和实用性, 有一定的学术价值。

电编 张敏 编辑 潘伯荣



内镜下扩张治疗食管贲门癌术后吻合口狭窄43例

王章流, 刘爱琴

■背景资料

胃镜下探条扩张术已成为手术后食管胃、食道空肠吻合口狭窄治疗的主要方法, 近期疗效满意。如连续4-7次间隔7-10 d的规则扩张可减少狭窄的复发, 十二指肠造影管和切开刀的使用有助于扩张术的成功; 建议扩张术后常规行局部病理活检以完全排除肿瘤的复发。有文献报道异烟肼具有抑制赖氨酸氧化酶而导致胶原合成障碍的作用, 能抑制食道疤痕的胶原合成, 术中狭窄口局部注射及术后口服也可减少狭窄的复发, 故可常规应用。对扩张效果欠佳者可放置食道带膜抗反流支架。

王章流, 刘爱琴, 浙江省丽水市中心医院消化科 浙江省丽水市 323000
通讯作者: 王章流, 323000, 浙江省丽水市括苍路289号, 浙江省丽水市中心医院消化科. wangzhangliu@medmail.com.cn
电话: 0578-2681223
收稿日期: 2006-03-17 接受日期: 2006-05-30

摘要

目的: 总结食管-胃-空肠吻合口狭窄内镜下扩张治疗的疗效及经验。

方法: 对43例食管癌贲门癌术后食管胃和食管空肠吻合口狭窄患者行国产Savary-Gilliard探条扩张器胃镜下扩张术, 术后进行局部活检, 其中5例置放了食管支架。

结果: 所有病例扩张术后吞咽困难Stooler分级明显提高, 吞咽困难解除, 近期有效率100%, 扩张术后活检病理证实3例复发。12例行4-7次扩张, 2例吻合口狭窄仍复发。

结论: 胃镜下探条扩张器治疗食管胃空肠吻合口狭窄安全有效, 少部分经多次连续规则扩张仍狭窄再发者可置放食管支架, 扩张术后应常规活检以排除局部癌症复发。

关键词: 吻合口; 狹窄; 扩张; 活检

王章流, 刘爱琴. 内镜下扩张治疗食管贲门癌术后吻合口狭窄43例. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1940-1941
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1940.asp>

0 引言

吻合口狭窄是食管贲门癌术后常见现象, 导致进食困难, 影响患者的生活质量甚至影响生命, 患者多难以接受或不能耐受再次手术。我院1999-2005年对43例食管贲门癌术后吻合口狭窄患者采用胃镜下扩张治疗, 取得明显疗效, 报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例 所有病例为我院住院或门诊患者, 以术后吞咽困难就诊。男32例, 女11例, 年龄40-83

岁, 平均62.9岁。其中食管癌术后19例, 采取弓上吻合11例, 弓下吻合8例; 贲门癌术后24例, 食道空肠吻合10例, 食道胃吻合14例; 用吻合器吻合8例, 其余为手工吻合。术后狭窄发生时间3 wk到15 a, 以2 mo到1 a内发生为多, 平均为12 mo。吻合口直径1-5 mm 29例, 5-7 mm 14例; 吞咽困难按Stooler分级: 0级(能进各种食物)0例, I级(能进软食)0例, II级(能进半流食)6例, III级(能进流食)30例, IV级(不能进食)7例。

1.1.2 器械 Olympus140、富士能400电子胃镜, 国产Savary-Gilliard探条扩张器(探条直径5, 7, 9, 12.8, 15 mm), 导丝以及钛记忆合金带膜抗反流支架(南京微创医学科技有限公司)。

1.2 方法 术前常规食管造影, 了解病变部位及狭窄程度, 并行胃镜检查予以吻合口活检排除局部复发。胃镜直视下置入导丝过吻合口至少10 cm以上后退镜, 患者头后仰, 将探条扩张器在导丝引导下从与吻合口直径相应的细径开始, 逐级进行, 手感可感觉探条通过狭窄口后退出, 扩至15 mm后留置3 min后退出探条, 再次插入胃镜, 观察吻合口及残胃空肠情况, 吻合口局部再行活检。吻合口1-2 mm者用切开刀稍作切开后再行扩张, 食管支架置放术在胃镜直视下进行。术后禁食4 h。

2 结果

43例共扩张96例次, 31例扩张1次, 12例扩张4-7次, 有2例先行切开后再扩张, 所有病例均顺利进行, 扩张成功, 见吻合口局部黏膜撕裂扩开, 少许渗血自止, 未见大出血及穿孔病例; 3例扩张后活检发现局部复发, 1例见残胃癌; 43例患者扩张术后1-2 wk吞咽困难均消失, 吞咽困难分级0级17例, 占39.5%, I级26例, 占60.5%, 近期有效率100%; 3例局部复发者及1例进食过多导致肠梗阻转外科手术治疗; 多次扩张者中5例间隔7-10 d连续扩张4次, 7例于再次出现吞咽困难时反复进行(间隔1-3 mo不等)。距末次狭窄扩张术后3 mo随访: 1次扩张术后25例均能进软食(Stooler分级I级), 多次扩张者中10例Stooler分

级Ⅰ-Ⅱ级, 2例吻合口狭窄仍再现, 占5.4%, 总有效率为94.6%.

5例行食管支架置放术, 其中食管胃吻合口狭窄3例有2例行扩张1次1 mo后吞咽困难再发, 患者要求置放, 1例伴吻合口溃疡, 间隔2-4 mo反复扩张6次后置放; 2例食道空肠吻合, 1例经多次扩张, 另1例患者惧怕再次扩张强烈要求置放, 但又不能适应1 wk后取出. 4例随访6-12 mo进食良好, 1例曾出现食物堵塞支架入口取出异物后吞咽困难消失, 1例支架上端又见溃疡.

3 讨论

食管癌、贲门癌术后食管残胃、食管空肠吻合口狭窄是常见并发症, 其发生率约为0.3%-9.5%^[1], 导致其发生的主要原因有术中吻合技术不高、吻合口瘘、吻合器使用不当、反流性食道炎、吻合口癌肿复发、疤痕体质等. 机械吻合器吻合的吻合口狭窄与吻合器对合不全密切相关^[2], 本组8例均可见吻合钉外露于吻合口. 本组资料表明吻合口狭窄多在术后1 a内出现, 最早为术后3 wk.

术后出现吻合口狭窄的患者限于体质差、经济条件等原因往往不愿接受再次手术, 除非吻合口局部肿瘤复发而无他处转移; 由疤痕体质、吻合口溃疡等导致狭窄者, 再次手术后仍然会出现狭窄, 本组即有1例食管残胃吻合口溃疡狭窄者虽经抗溃疡治疗及扩张、再次手术后狭窄仍再发, 再行扩张仍不能完全解决, 放置食道支架后上缘溃疡再次出现.

内镜下治疗吻合口狭窄与手术相比具痛苦少、经济、安全等优点, 易被患者所接受. 目前对吻合口狭窄内镜下治疗有探条扩张术、气囊扩张术、食道金属支架置放术等. 本组使用国产Savary-Gilliard探条扩张器对吻合口狭窄扩张疗效满意. 我们体会狭窄扩张术操作的关键是置入导丝时, 需将导丝置入吻合口下方至少10 cm以上, 若导丝难以插入时用十二指肠造影

管探路或改变体位可提高成功率, 对食管空肠吻合者内镜辅以X线透视下进行手术有助于术者了解导丝的走向及探条的插入情况, 减少并发症的发生. 对吻合口小于3 mm最细的探条不能进入者, 用十二指肠乳头切开刀局部向心性稍切开后探条可顺利通过吻合口, 自细到粗依手感逐根扩张到1.5 cm. 本组病例无穿孔及大出血等并发症出现.

一般情况下扩张后到再次出现吞咽困难间隔时间为3-4 wk, 组织损伤后的修复以2 wk为最明显, 抑制组织的修复和向心性回缩是提高远期疗效的关键, 对狭窄型、弯曲变性型、机械吻合型、疤痕狭窄型的吻合口狭窄往往需要扩张多次才能取得满意的远期疗效^[3], 每次间隔时间以7-10 d为宜, 连续4-7次有助于提高远期疗效, 但仍有部分病例狭窄再发, 本组有2例占5.4%. 术中狭窄口局部注射及术后口服异烟肼可减少狭窄的再发^[4].

本组有3例患者扩张术后活检病理报告为肿瘤复发, 而术前活检未能发现, 考虑与部分肿瘤的生长方向有关, 为完全排除肿瘤复发的可能, 扩张术后应常规进行活检. 总之, 表明食道癌贲门癌术后吻合口狭窄内镜下探条扩张器治疗疗效满意^[1,5], 对少部分经多次连续规则扩张后吞咽困难症状仍再发者, 建议放置食道带膜抗反流支架.

4 参考文献

- 王厚峋, 库尔班, 方公贤, 余养生, 张铸, 严宏. 纤维内窥镜扩张治疗食道胃吻合口狭窄66例经验. 中华胸心血管外科杂志 1997; 13: 101-102
- 侯夏宝, 李单青, 贾涛, 谭颖, 余国校. 食管和贲门癌切除器械吻合术270例分析. 肿瘤防治杂志 2005; 12: 309-310
- 许国铭, 李兆申. 上消化道内镜学. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 311-314
- 许孝新, 王善政, 杨国涛, 田辉. 内镜下扩张联合异烟肼治疗食管胃吻合口狭窄. 中国内镜杂志 2005; 11: 141-143
- 李冰, 王文光, 秦子敏. 食管胃吻合口狭窄的扩张术. 临床医学 2005; 25: 61-62

电编 张敏 编辑 张海宁

以Schwartz-Bartter综合征为主要临床表现的胰腺肿瘤1例

王旭, 马向涛

■背景资料

在临床工作中, 抗生素过敏史受到大家的普遍重视。对常用药物的过敏情况往往容易被忽视。复方制剂常被使用, 但临床医生对其组成成分有时了解不够。本例提示, 应重视常用药物的过敏情况, 在使用复方制剂前要清楚其组成成分, 以免出现过敏反应。

王旭, 北京市海淀医院神经内科 北京市 100080
马向涛, 北京市海淀医院外科 北京市 100080
通讯作者: 马向涛, 100080, 北京市海淀区中关村大街29号, 北京市海淀医院外科. xiangtao_ma@pku.org.cn
电话: 010-62583013 传真: 010-62653601
收稿日期: 2006-04-28 接受日期: 2006-05-11

摘要

胰腺肿瘤患者1例, 表现为顽固性低钠低氯血症(Schwartz-Bartter综合征), 临床医生应该提高警惕。

关键词: 胰腺肿瘤; 抗利尿激素分泌异常综合征

王旭, 马向涛. 以Schwartz-Bartter综合征为主要临床表现的胰腺肿瘤1例. 世界华人消化杂志 2006;14(19):1942-1944
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1942.asp>

0 引言

Schwartz^[1]于1957年首次报道1例男性支气管肺癌患者合并抗利尿激素分泌异常综合征(SIADH)后, 陆续发现80余种疾病可以伴发SIADH, 而胰腺肿瘤合并Schwartz-Bartter综合征的病例尚属罕见, 自1981年以来英文文献共报道了8例^[2-3]。我院收治1例以Schwartz-Bartter综合征为主要临床表现的胰腺肿瘤患者, 现报告如下。

1 病例报告

男, 75岁, 因上腹痛伴腹胀4 wk, 加重伴少尿2 wk, 于2005-09-10入院。此次入院前4 wk无明显诱因出现上腹疼痛伴腹胀, 近2 wk患者症状加重, 出现少尿, 尿量由1000 mL/d减少至400 mL/d。患者否认肿瘤家族史。查体: T 36.7°C, BP 16/10 kPa。皮肤巩膜苍白, 无黄染, 腹软无压痛, 肝脾肋下未及, 腹部未扪及肿物, 双下肢无可凹性水肿。血白细胞7.8×10⁹/L, 中性粒细胞0.77, 红细胞4.85×10¹²/L, 血红蛋白146 g/L, 血小板215×10⁹/L。血钾3.6 mmol/L, 钠117 mmol/L, 氯79 mmol/L。总蛋白59 g/L, 白蛋白30 g/L。CEA 1.61 μg/L(正常值0-3.4 μg/L), CA19-9 440.33 kU/L(正常值0-39 kU/L), AFP 2.62 kU/L(正常值<5.8 kU/L), CA125 15.69 kU/L(正

常值0-35 kU/L)。血浆渗透压230 mmol/L。抗利尿激素(ADH)1.61 ng/L(参考值1.0-1.5 ng/L), 24 h尿钠385 mmol(参考值130-260 mmol)。尿渗透压364 mmol/L。尿比重1.020 g/mL。胸片: 双肺未见异常。腹部彩超: 肠系膜上动脉血流通畅, 流速稍高; 门脉静脉壁上局部附壁小血栓形成; 胰腺后方脾静脉未见血流信号。腹部CT: 胰头占位, 慢性胰腺炎, 胰体尾部胰管扩张。MRCP: 胰腺头体交界部占位性病变, 远端胰管扩张, 脾静脉闭塞, 侧支循环形成。胃镜: 慢性浅表性胃炎。结合病史及实验室检查考虑患者顽固性低钠低氯血症为继发于胰腺肿瘤的抗利尿激素分泌不当综合征(SIADH), 给与静脉补液纠正患者低钠低氯血症, 血钠维持于125-135 mmol/L之间, 血氯维持于86-94 mmol/L之间, 因患者身体条件不能耐受手术治疗, 现仍在随访中。

2 讨论

抗利尿激素分泌异常综合征(syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone, SIADH)是指多种病因引起体内抗利尿激素(ADH)分泌过多, 导致体内水分潴留, 尿钠排除增多, 血钠与血浆渗透压降低而导致相应症状的临床征候群^[4-6]。迄今发现可以引起SIADH的病因有80余种, 包括炎症、药物、肿瘤、艾滋病等多种病因。肿瘤包括: 肺癌、头颈部鳞状细胞癌、白血病、卵巢肿瘤及前列腺癌等^[7-11], 由胰腺肿瘤引发的SIADH尚属罕见, 可能与胰腺肿瘤分泌ADH有关。SIADH的基本病理生理改变是低血浆渗透压时机体抑制ADH分泌能力不足及ADH分泌过多, 导致肾小管对水分重吸收增加, 尿量减少, 尿渗透压升高, 尿钠排除增多, 血钠下降, 血浆渗透压降低等一系列临床表现, 严重者可以导致脑水肿与循环衰竭。SIADH的临床表现变化复杂, 与疾病进展快慢有关。患者在疾病初期可无任何症状, 随血钠下降症状逐渐显现。表现为食欲不振、恶心呕吐, 由于低钠血症及血浆渗透压降低, 可使有效循环血量降低甚至出现休克。如果中枢神经系统受累, 可表现为头痛、易激惹、

反应迟钝甚至昏迷^[12-13]. 本患者起病过程较缓慢, 虽然血钠下降至117 mmol/L, 但是患者并无明显神经精神症状.

SIADH的诊断标准包括^[14-15]: (1)血钠<130 mmol/L; (2)血浆渗透压<280 mmol/L, 同时尿渗透压比其血浆渗透压高100 mmol/L以上; (3)无低血容量表现; (4)尿钠排出增多, 尿钠浓度>20 mmol/L, 24 h尿钠>80 mmol; (5)肾功能正常, 无甲状腺及肾上腺功能低下表现. SIADH主要同脑性盐耗综合征(CSWS)鉴别^[16-18]. CSWS为低血容量性低钠血症, 患者除有低血钠的表现外还有体质量下降, 血容量不足, 红细胞压积和血红蛋白偏高等血液浓缩的表现. 临幊上可通过检查中心静脉压或试验性治疗确诊. 应用等渗盐水静脉滴注, 如果患者症状改善则为CSWS, 如无改善则为SIADH. 尽管CSWS也表现为低血钠和高尿钠, 但是脱水症状不明显, 血钾下降, 红细胞压积升高, 高尿比重明显, 部分血浆渗透压升高、中心静脉压下降, 临幊上需仔细鉴别. 尿崩症也表现为多尿, 尿比重下降, 但很少伴有低血钠和高尿钠.

治疗: (1)限水: 由于SIADH血浆渗透压浓度调节异常, 导致体内水分潴留, 细胞外液水容量的扩张, 尿排钠增多, 引起的稀释性低钠血症, 故应限水解除对醛固酮分泌的抑制, 每日进水量在1000 mL以内^[19-20]. 对于急性严重病例, 血钠<120 mmol/L, 伴有意识障碍与抽搐等神经症状时应补充30 mL/L高渗盐水, 但应注意纠正血钠浓度不可过高, 先将血钠浓度提高到120-125 mmol/L为宜; (2)利尿: 对于单限水不能控制的患者, 可根据情况加用呋噻米10 mg, 不仅可以减少细胞外液量, 同时也能减轻低渗引起的细胞水肿; (3)激素治疗: SIADH是由于ACTH分泌绝对或相对不足, 给予ACTH治疗调整ACTH/ADH比例失调, 当血钠正常后, ACTH减量至完全停止. 如果加用ADH达到反馈抑制ADH的分泌的作用, 更有助于恢复ACTH/ADH的平衡^[21-22]; (4)适当补钠: 由于SIADH患者体内并不低钠, 仅是稀释性低钠, 故补钠并不能从根本上纠正低钠血症^[23-24]. 但是, 当患者出现严重的低钠时, 不论何种病因, 都应首先给予纠正; (5)其他: 可用碳酸锂与去甲金霉素钠治疗SIADH. 去甲金霉素钠或锂剂有拮抗ADH作用于肾小管上皮细胞受体cAMP的作用, 使肾脏对ADH的反应减弱而引起利尿, 但此类药物发挥作用缓

慢^[25-27].

由肿瘤引发的SIADH具有复杂性与多样性, 临幊表现变化很大, 容易被误诊, 理论上只有去除原发肿瘤才有可能控制SIADH引发的一系列症状, 但是目前临幊上报道的病例多为进展期肿瘤, 治疗上只能取得姑息效果^[28-30].

3 参考文献

- Schwartz WB, Bennett W, Curelop S, Bartter FC. A syndrome of renal sodium loss and hyponatremia probably resulting from inappropriate secretion of antidiuretic hormone. 1957. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2860-2870
- Nagashima Y, Iino K, Oki Y, Ozawa M, Iwabuchi M, Tominaga T, Kawasaki T, Suzuki M, Miyaji T, Yoshimi T. A rare case of ectopic antidiuretic hormone-producing pancreatic adenocarcinoma: new diagnostic approach. *Intern Med* 1996; 35: 280-284
- Kleibeuker JH, Doorenbos H. Endocrine pancreatic carcinoma and syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 284: 1230-1231
- Baylis PH. The syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 1495-1499
- Lin M, Liu SJ, Lim IT. Disorders of water imbalance. *Emerg Med Clin North Am* 2005; 23: 749-770
- Adrogue HJ. Consequences of inadequate management of hyponatremia. *Am J Nephrol* 2005; 25: 240-249
- Nakazato Y, Imai K, Abe T, Tamura N, Shimazu K. Unpleasant sweet taste: a symptom of SIADH caused by lung cancer. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 405-406
- Danielides V, Milionis HJ, Karavasilis V, Briassoulis E, Elisaf MS. Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion due to recurrent oral cancer. *B-ENT* 2005; 1: 151-153
- Vinzio S, Lioure B, Enescu I, Schlienger JL, Goichot B. Severe abdominal pain and inappropriate antidiuretic hormone secretion preceding varicella-zoster virus reactivation 10 months after autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 525-527
- Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H. Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone following carboplatin-paclitaxel administration in a patient with recurrent ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26: 531-532
- Kawai S, Hiroshima K, Tsukamoto Y, Tobe T, Suzuki H, Ito H, Ohwada H, Ito H. Small cell carcinoma of the prostate expressing prostate-specific antigen and showing syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone: an autopsy case report. *Pathol Int* 2003; 53: 892-896
- Taguchi Y, Takashima S, Sasahara E, Kato Y, Orihara T, Inoue Y, Inoue H. Inappropriate secretion of antidiuretic hormone in a patient with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Intern Med* 2005; 44: 65-67
- Olchovsky D, Ezra D, Vered I, Hadani M, Shimon I. Symptomatic hyponatremia as a presenting sign of hypothalamic-pituitary disease: a syndrome of

■同行评价

抗利尿激素综合症是异位ADH异常分泌引起的内分泌疾病, 能引起异位ADH分泌的肿瘤, 最多见为肺癌(约占40%), 其他有胸腺、胰、十二指肠、食管和乳腺的恶性肿瘤. 目前国内对于来源于胰腺肿瘤的SIADH报道很少, 因而作者这一病例报导包括其诊断与治疗还是很有临床指导意义.

- inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH)-like glucocorticosteroid responsive condition. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 151-156
- 14 Wong LL, Verbalis JG. Systemic diseases associated with disorders of water homeostasis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2002; 31: 121-140
- 15 Verbalis JG. Disorders of body water homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17: 471-503
- 16 Rabinstein AA, Wijdicks EF. Hyponatremia in critically ill neurological patients. *Neurologist* 2003; 9: 290-300
- 17 Harrigan MR. Cerebral salt wasting syndrome. *Crit Care Clin* 2001; 17: 125-138
- 18 Betjes MG. Hyponatremia in acute brain disease: the cerebral salt wasting syndrome. *Eur J Intern Med* 2002; 13: 9-14
- 19 Goh KP. Management of hyponatremia. *Am Fam Physician* 2004; 69: 2387-2394
- 20 Nguyen MK, Kurtz I. An analysis of current quantitative approaches to the treatment of severe symptomatic SIADH with intravenous saline therapy. *Clin Exp Nephrol* 2005; 9: 1-4
- 21 Arvanitis ML, Pasquale JL. External causes of metabolic disorders. *Emerg Med Clin North Am* 2005; 23: 827-841
- 22 Palmer BF. Hyponatremia in patients with central nervous system disease: SIADH versus CSW. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 182-187
- 23 Janicic N, Verbalis JG. Evaluation and management of hypo-osmolality in hospitalized patients. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003; 32: 459-481
- 24 Musch W, Hedesi A, Decaux G. Low sodium excretion in SIADH patients with low diuresis. *Nephron Physiol* 2004; 96: P11-P18
- 25 Cole CD, Gottfried ON, Liu JK, Couldwell WT. Hyponatremia in the neurosurgical patient: diagnosis and management. *Neurosurg Focus* 2004; 16: E9
- 26 Kusuki M, Iguchi H, Nakamura A, Nishiura H, Kanazawa A, Yamane H. The syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion associated with chemotherapy for hypopharyngeal cancer. *Acta Otolaryngol Suppl* 2004; : 74-77
- 27 Casulari LA, Costa KN, Albuquerque RC, Naves LA, Suzuki K, Domingues L. Differential diagnosis and treatment of hyponatremia following pituitary surgery. *J Neurosurg Sci* 2004; 48: 11-18
- 28 Arinzon Z, Feldman J, Peisakh A, Zuta A, Berner Y. Water and sodium disturbances predict prognosis of acute disease in long term cared frail elderly. *Arch Gerontol Geriatr* 2005; 40: 317-326
- 29 Lam CM, Yu VS. SIADH associated with ovarian immature teratoma: a case report. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25: 107-108
- 30 Seute T, Leffers P, ten Velde GP, Twijnstra A. Neuropathology disorders in 432 consecutive patients with small cell lung carcinoma. *Cancer* 2004; 100: 801-806

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第八届中西医结合实验医学研讨会

本刊讯 第八届中西医结合实验医学研讨会将于2006-10在南京举行, 现将征文通知公布如下:

1 截稿日期

2006-08-31截稿.

2 联系方式

南京中山东路305号南京军区总医院 齐名; 邮编: 210002; 电话: 025-52926620.

世界华人消化杂志投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志[®], 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综

述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713《科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

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

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

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

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊。世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 E-mail: wcj@wjnet.com http://www.wjnet.com.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为M_r 30 000或30kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即Ar(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, *t*=28.4±0.2°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1

N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10³ g与5×10⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区别, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*v*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01; 第三套为^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字，如 $1\ 000\text{--}1\ 500\text{ kg}$, $3.5\pm 0.5\text{ mmol/L}$ 等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度，例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字，只允许最后一位有误差，前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差，一般以SD的1/3来定位数，例如 $3\ 614.5\pm 420.8\text{ g}$, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数，故应写成 $3.6\pm 0.4\text{ kg}$, 过多的位数并无意义。又如 $8.4\pm 0.27\text{ cm}$, 其SD/ $3=0.09\text{ cm}$, 达小数点后第2位，故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的，应该舍。末尾数字，小于5则舍，大于5则进，如恰等于5，则前一位数逢奇则进，逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成，不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点，则应成23，而不应该 $23.48\rightarrow 23.5\rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法，请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日，可写作1985-04-12；1985年4月，写作1985-04；从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止，写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00；从1985年4月12日起至1985年6月15日止，写作1985-04-12/06-16，上午8时写作08:00，下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定：分母 ≤ 100 ，百分数到个位； $101\leq \text{分母}\leq 1\ 000$ ，百分数到小数点后1位；余类推。小数点前后的阿拉伯数字，每3位间空1/4阿拉伯数字距离，如1 486 800.475 65。完整的阿拉伯数字不移行！

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

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容，鲜明而有特色，阿拉伯数字不宜开头，不用副题名，一般20个字左右，最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多，一般不超过8人，主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者，对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列，多作者时姓名间用逗号，如是单名，则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与，包括：(1)酝酿和设计实验；(2)采集数据；(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写，包括：(1)起草文章；(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持，包括：(1)统计分析；(2)获取研究经费；(3)行政、技术或材料支持；(4)指导；(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条，才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码。格式如：张旭晨，梅立新，承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如：张旭晨，男，1966-02-26生，河北省定县人，汉族。1994年北京中医药大学硕士，讲师。主要从事消化系统疾病的病理研究。

3.5 基金资助项目 格式如：国家自然科学基金资助项目，No.30224801

3.6 通讯作者 格式如：通讯作者：马连生，030001，山西省太原市双塔西街77号，太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话：0351-4078656 传真：0351-4086337

收稿日期： 接受日期：

3.7 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅，方便检索，英文题名以不超过10个实词为宜，应与中文题名一致。

作者 署名一般不超过8人。作者姓名汉语拼音拼写法规定为：先名，后姓；首字母大写，双名之间用半字线“-”分开，多作者时姓名间加逗号。格式如：“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者，后写单位的全称及省市邮政编码。例如：Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如：Supported by National

World Journal of Gastroenterology
自2005-01-01起
为周刊发行，每月
7、14、21、28日
出版。北京报刊发
行局发行，邮发代
号：82-261。WJG
出版的模式为开
放存取+印刷版。
免费通过http://
www.wjgnet.
com/1007-9327/
index.jsp获取，即：
阅读、下载、复
制、打印和检索
论文的全文。

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行,每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号:82-262。《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版,免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文全文。

Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致。格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhu-anwan on gastric precancerous lesions 300 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征。如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准。如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨,高瑞丰,李炳庆,马连生,梅立新,吴玉珍,刘凤芹,廖振林.胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例.世界华人消化杂志 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写,后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相

关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短,但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述,以前发表过的方法引用参考文献即可,有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示,在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明,应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述,也不应是大量文献的回顾。

图表 图表的数量要精选。表应有表序和表题,并有足够的具有自明性的信息,使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头,表内非公知通用缩写应在表注中说明,表格一律使用三线表(不用竖线),在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注,以使其容易被读者理解,所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图,统一用一个注解分别叙述。如:图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: $^aP<0.05$, $^bP<0.01(P>0.05$ 不注),如同一表中另有一套 P 值,则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$;第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字,如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等,注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字,共同的计量单位符号应注在表的右上方,表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测,“-”代表阴性未发现,不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(mol/L)$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ C$ 表达。黑白图请附黑白照片,并考入磁盘内;彩色图请提供冲洗的彩色照片,请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$,必须使用双面胶条黏贴在正文内,不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang et al”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣 et al^[2-5]认为……;

PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准,引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达,请附引用文献网上摘要打印件,包括PMID编号(摘要的左下方)。按顺序编号装订,并考入磁盘内。在引用参考文献页码末尾注明PMID编号;无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者,请附首页复印件)。期刊:序号,作者(列出全体作者)。文题,刊名,年,卷,起页-止页,PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。参考文献格式如下:

- 1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gastroenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]
- 2 马连生,潘伯荣,马景云.世界胃肠病学杂志英文版的现状.世界华人消化杂志 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. Ulcer disease: investigation and basis for therapy. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中,陈九如.胃肠道造影原理与诊断.第1版.上海:上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿件件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括:(1)保证无重复发表或一稿多投;(2)是否有经济利益或其他关系造成利益冲突;(3)所有作者均审读过该文并同意发表,所有作者均符合作者条件,所有作者均同意该文代表其真实研究成果,保证文责自负;(4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件;通讯作者应负责与其他作者联系,修改并最终审核复核稿;(5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名;(6)来稿应附有作者工作单位的推荐信,保证无泄密,如果是几个单位合作的论文,则需要提供所有参与单位的推荐信;(7)愿将印刷版和电子版出版版权转让给本刊编辑部,所有来稿均需接受同行审阅。

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审,所有审稿人的姓名对作者通常是保密的。

投稿时,作者可以提出要求回避的同行专家名单,也可以推荐2位非本单位的审稿人,尤其是本刊编委会成员。审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审,将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理。录用稿件作者需交纳发表费,发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删节时,本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改。当原稿退还作者修改时,作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部;逾期寄回的,作重新投稿处理。

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

4.6 投稿清单 (1)投稿函;(2)第1部分为题名及作者,作者及单位,第1作者简介,基金资助项目,通讯作者Email,电话,传真,收稿日期,接受日期;(3)第2部分英文摘要;(4)第3部分中文摘要;(5)第4部分为引言,1材料和方法,1.1材料,1.2方法,统计学处理,2结果,3讨论,致谢,4参考文献。

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>。邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄):请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单,各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。

World Journal of Gastroenterology 创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95)225号批准国内外公开发行。1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号。

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿),我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力,提高了《世界华人消化杂志》的学术质量,在此表示衷心感谢!

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

谭学瑞 教授
汕大医学院第一附属医院 院长室

陈耀凯 副教授
第三军医大学西南医院全军感染病研究所

唐文富 主治医师
四川大学华西医院中西医结合科

戴冬秋 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

王春友 教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心

范志宁 主任医师
南京医科大学第二附属医院内镜中心

王正康 教授
北京中日友好医院普外科

高春芳 研究员
第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

吴君 主任医师
贵州省贵阳市贵阳医学院附属医院感染科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

夏建川 研究员
中山大学肿瘤防治中心生物治疗研究室

谷俊朝 主任医师
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

徐爱民 副教授
第二军医大学附属肝胆外科医院 放射诊疗科

郭新宁 教授
宁夏医学院附属医院消化科

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

何超 教授
浙江大学医学院附属邵逸夫医院

杨林 副研究员
中山大学附属第三医院感染病科

李奇林 教授
南方医科大学附属珠江医院急诊部

姚树坤 教授
河北医科大学第四医院消化内科

梅林 教授
北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室

伊力亚尔·夏合丁 教授
新疆医科大学第一附属医院胸外科

聂青和 副教授
第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心、传染病科

张军 教授
西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

周士胜 教授
大连大学医学院 医学研究中心

彭曦 副研究员
重庆市西南医院烧伤研究所

周学文 教授
辽宁中医药学院附属医院消化内科

秦环龙 教授
上海交通大学附属第六人民医院外科

朱金水 教授
上海交通大学附属第六人民医院消化科