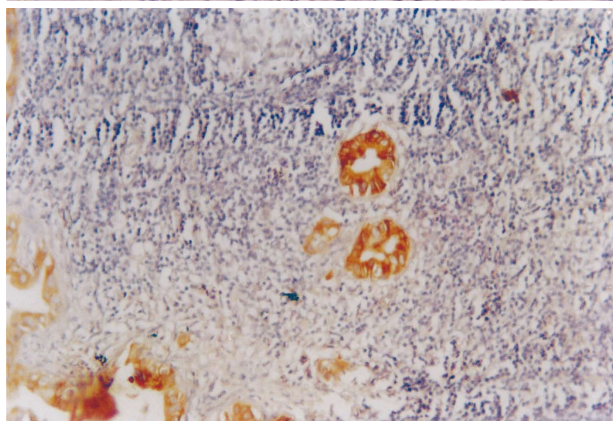
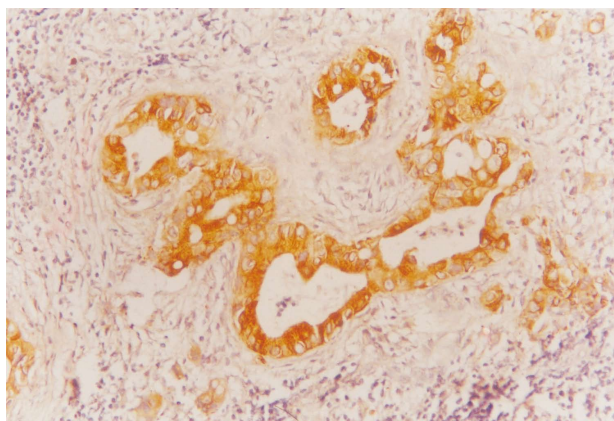
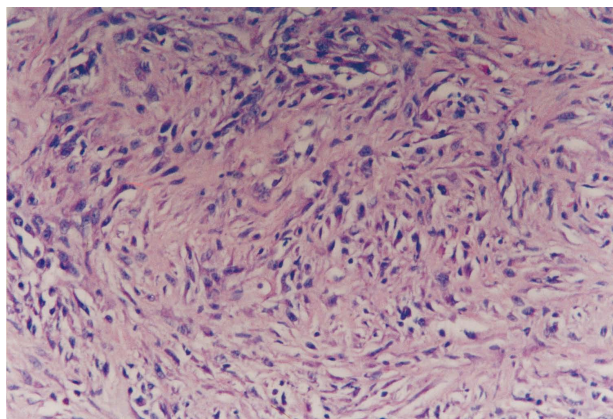
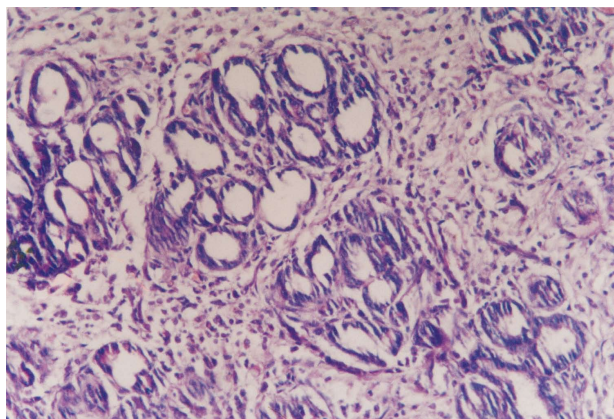


# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 9 月 28 日 第 13 卷 第 18 期 (Volume 13 Number 18)



**18/2005**

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评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

2003-01-15/2005-12-15

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

陈可冀教授  
樊代明教授  
黄象谦教授  
黄志强教授  
刘耕陶教授  
刘锴教授  
裘法祖教授  
汤钊猷教授  
王宝恩教授  
危北海教授  
吴孟超教授  
吴咸中教授  
杨春波教授  
张金哲教授  
张学庸教授  
赵东海教授  
周殿元教授

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

陈士葆教授  
房殿春教授  
纪小龙教授  
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  
张万岱教授  
周学文教授

### 编委

蔡淦教授  
蔡威教授  
陈海龙教授  
陈红松副研究员  
陈家春教授  
陈立波副教授  
陈仕珠主任医师  
陈蔚文教授  
陈耀凯副教授  
陈祖林副教授  
程明亮教授

程英升副主任医师

崔云甫教授

戴冬秋教授

旦增副主任医师

董蕾教授

房静远教授

冯志华副教授

高春芳教授

高毅教授

谷俊朝副教授

郭新宁教授

韩天权教授

韩泽广研究员

郝俊鸣副主任医师

何振娟副主任医师

和水祥副教授

洪天配教授

侯晓华教授

胡以平教授

黄恒青副主任医师

冀振华副主任医师

江学良副主任医师

匡安仁教授

来茂德教授

兰林副教授

劳绍贤教授

冷希圣教授

李伯安教授

李朝品教授

李定国教授

李东辉副研究员

李恩民副教授

李国威教授

李靖副教授

李兰娟教授

李岩教授

李增山副教授

李兆申教授

李宗芳教授

梁萍教授

林菊生教授

林勇讲师

刘军讲师

刘莉讲师

刘连新教授

刘平教授

刘杞教授

刘银坤教授

刘正稳教授

龙致贤教授

卢绮萍主任医师

陆才德教授

吕宾主任医师

吕宁主任医师

吕毅教授

罗和生教授

马春红副教授

茅爱武主任医师

梅林教授

南极星副教授

聂青和副教授

宁琴教授

牛建昭教授

潘林娜教授

潘兴华副主任医师

潘秀珍教授

彭吉润副教授

彭淑牖教授

彭心宇教授

戚中田教授

钱会南副教授

钱建民教授

秦环龙副教授

秦仁义教授

邱赛红研究员

邱双健副教授

任建林副教授

邵成浩讲师

石统东副教授

石雪迎讲师

司富春教授

宋振顺教授

苏鲁主任医师

孙秀发教授

孙志伟副研究员

谭学瑞主任医师

唐承薇教授

屠红副研究员

王吉耀教授

王鲁副主任医师

王明荣教授

王庆国教授

王维教授

王小众教授

王兴鹏教授

王学浩教授

王振军教授

魏来教授

沃健儿副研究员

吴开春教授

吴梧桐教授

吴育连教授

向德兵讲师

邢金良讲师

徐存拴教授

徐德忠教授

徐列明教授

徐小元教授

许洪卫教授

许玲副教授

许文燮教授

严律南教授

杨刚毅副教授

杨建勇教授

杨希山教授

杨旭教导

杨云生教授

姚树坤教授

姚云清副教授

叶胜龙教授

伊力亚尔·夏合丁副教授

于聪慧副主任医师

于皆平教授

于颖彦教授

余龙教授

喻荣彬副教授

袁耀宗教授

袁正宏研究员

岳茂兴教授

臧伟进教授

詹林盛研究员

张吉翔教授

张锦生教授

张青云研究员

张学教授

张亚力教授

张宗明教授

赵平讲师

赵新泰研究员

钟鸣研究员

周丁华副教授

周晓东研究员

周智副教授

周总光教授

庄贵华副教授

周士胜教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2005 年 9 月 28 日

第 13 卷

第 18 期

(总第146期)

## 述 评

- 2173 临床试验刍议 谭学瑞, 张学中  
2179 RNA 干扰在肝病治疗中的研究进展 韩苏夏, 马瑾璐

## 基 础 研 究

- 2183 甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达  
王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山  
2188 改良聚合酶链反应检测 HBV 共价闭合环状 DNA 汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞  
2193 肝癌细胞 BEL7402 中神经元特异性烯醇化酶的表达  
朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽  
2197 肝移植前受体亚低温对急性肝衰大鼠移植肝脏的保护作用  
王志东, 韩德恩, 崔云甫, 姜明山, 张新宇, 曾兆林  
2201 慢性丙型肝炎患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞表达增加 杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄  
2205 草苈蓉乙醇提取物对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的治疗作用 朴熙绪, 黄红果, 朴东明  
2210 树突状细胞在黏膜免疫模型鼠体内的分布及趋化因子的表达  
谢遵江, 贺业春, 贾立敏, 刘颖, 刘丽  
2213 塞来昔布对胃癌细胞生长及 ERK2 表达的影响  
张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏  
2217 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞的凋亡  
李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生  
2222 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、细胞间黏附分子-1与扑热息痛肝损害  
田丰, 王颖, 吴作艳, 王学清, 李岩  
2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达  
杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰

## 文 献 综 述

- 2231 乳酸杆菌作为一种新型活疫苗抗原递送载体 庾庆华, 杨倩  
2235 一氧化氮和一氧化氮合酶与肿瘤放疗敏感性的关系 江春平, 丁义涛  
2238 Id 基因家族对消化系统实体瘤作用的研究进展  
杨海彦, 刘连新, 曲志博, 刘改云, 陈炜, 郭化鑫, 陈曦  
2243 影响拉米夫定相关乙型肝炎病毒 YMDD 变异的因素 陆德云, 王甦, 赵连三  
2246 成人间活体肝移植中小肝综合征的预防策略 马跃峰, 李相成  
2251 肝细胞癌生物标志物的研究进展 王嘉信, 刘连新  
2257 肠黏膜免疫调节紊乱介导炎症性肠病的发生 王旭丹, 袁学勤

## 研 究 快 报

- 2263 sp600125 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响 唐文, 蒋明德, 李小安  
2266 血小板活化因子对幼鼠肠道免疫屏障功能的影响 王丽杰, 刘冬妍, 孙梅, 赵恂

## 临 床 经 验

- 2269 肝硬化患者食管静脉曲张的相关因素分析 501 例  
崔春吉, 金永日, 朴熙绪, 裴风郁  
2272 中晚期肝门部胆管癌诊治15例  
张宗明, 邢海林, 李刚, 刘凯, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星  
2275 肝病患者 IgA 和 sIgA 含量变化的临床意义 刘冬妍, 刘沛  
2278 全直肠系膜切除术切缘血管内皮生长因子检测的临床意义 战学雷, 田素礼  
2281 善宁对急性胰腺炎患者血小板参数变化的影响 黄坚, 陆士奇, 陈建荣

## 病 例 报 告

- 2284 肝肾联合移植术治疗移植肾慢性失功伴肝硬化 1 例  
朱建平, 张宗明, 管德林, 李刚, 黄庆荣, 宿砚明, 陈以安, 刘辉  
2287 丙型肝炎肝硬化患者骨髓和血液同时分离出鼠伤寒沙门菌 1 例  
郭微媛, 齐桂云, 多丽波, 闫立昕, 孙琪, 张和光



致 谢	2288 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2187 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知 2200 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第一轮通知 2209 首届北京地坛感染病学术会议 2221 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2226 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2234 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2237 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊 2250 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2256 2006年即将召开的国际会议 2262 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2286 中国生物医学基金论文摘要注册方法
封面故事	2227 SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达 杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰 世界华人消化杂志 2005;13(18):2227-2230 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2227.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2227.asp</a>
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005  American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005  ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in isgcon2005.com  Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education  II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv  2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm  10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名  
陈可冀 题写版权刊名  
(半月刊)

创 刊 1993-01-15  
改 刊 1998-01-25  
出 版 2005-09-28  
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生

编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会  
030001, 山西省太原市双塔西街77号

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

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内: 北京报刊发行局

国外: 中国国际图书贸易总公司

(100044, 北京市399信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界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

世界华人消化杂志被评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。

## 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。

2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有

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576.00元

广告经营许可证

1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# World Chinese Journal of Digestology

September 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 18

## EDITORIAL

Meager opinions on clinical experimentation

Tan XR, Zhang XZ 2173

Advancement of RNA intervention in the treatment of hepatic diseases

Han SX, Ma JL 2179

## BASIC RESEARCH

Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Wang QX, Cheng J, Guo J, Li WF, Wei HS 2183

Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction

Tang B, Wang YM, Liu J, Zhang R 2188

Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402

Zhu AP, Zhang QY, Wang YM, Xu JJ, Sun L 2193

Moderate hypothermia therapy for acute liver failure in rats before liver transplantation

Wang ZD, Han DE, Cui YF, Jiang MS, Zhang XY, Zeng ZL 2197

Increase of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C

Yang JH, Zhang YX, Su CH, Sun NX 2201

Therapeutic role of ethanolic extract of *Boschniakia Rossica* in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Piao XX, Huang HG, Piao DM 2205

Distribution of dendritic cells and expression of chemokines in mouse models of mucosal immune *in vivo*

Xie ZJ, He YC, Jiao LM, Liu Y, Liu L 2210

Effects of celecoxib on cell proliferation and ERK2 expression of ERK2 in gastric cancer cells

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Xiong BJ, Weng M 2213

Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu* decoction

Li DT, Shun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Ling HS 2217

Association of tumor necrosis factor- $\alpha$  and intercellular adhesion molecule-1 with acetaminophen-induced liver damages

Tian F, Wang Y, Wu ZY, Wang XQ, Li Y 2222

Expression of nerve growth factor messenger RNA in pancreatic cancer tissues in Sprague Dawley rats

Yang ZL, Deng XH, Yang LP, Li QL, Fan WT, Liang S, Miao XY 2227

## REVIEW

*Lactobacillus* as a new living vaccine carrier in delivery of antigen

Yu QH, Yang Q 2231

Influence of nitric oxide and nitric oxide synthase on tumor radiotherapy sensitivity

Jiang CP, Ding YT 2235

Advance in effect of Id family gene on solid tumor in digestive system

Yang HY, Liu LX, Qu ZB, Liu GY, Chen W, Guo HX, Chen X 2238

Influential factors of Lamivudine associated YMDD variations of hepatic B virus

Lu DY, Wang S, Zhao LS 2243

Preventive methods for small-for-size liver syndrome in adult-to-adult living-donor liver transplantation

Ma YF, Li XC 2246

Advance in research of biological markers of hepato-cellular carcinoma

Wang JB, Liu LX 2251

Occurrence of inflammatory intestinal disease mediated by intestinal mucosal immunoregulation disturbance

Wang XD, Yuan XQ 2257

## BRIEF REPORT

Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats

Tang W, Jiang MD, Li XA 2263

Effect of platelet activating factor on intestinal immunological barrier in young rat

Wang LJ, Liu DY, Sun M, Zhao X 2266

## CLINICAL PRACTICE

Correlative factors of esophageal varices in patients with hepatocirrhosis: an analysis of 501 cases

Cui CJ, Jin YR, Piao XX, Pei FY 2269

Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases

Zhang ZM, Xing HL, Li G, Liu K, Li G, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX 2272

Changes of IgA and sIgA and its clinical significant in hepatic diseases

Liu DY, Liu P 2275

Clinical significance of detection for vascular endothelial growth factor in resection margin following total mesorectal excision

Zhan XL, Tian SL 2278

Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis

Huang J, Lu SQ, Chen JR 2281

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology Monthly

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date September 28, 2005

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: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

# 临床试验刍议

谭学瑞, 张学中

谭学瑞, 汕头大学医学院第一附属医院 广东省汕头市 515041  
张学中, 北京高血压联盟研究所 北京市 100039  
谭学瑞, 男, 1964-08-04生, 山东省聊城市人, 汉族. 医学博士后, 工学博士, 主任医师, 研究员, 博士后合作导师. 主要从事内科学、灰色系统理论、医学统计学研究.  
国家自然科学基金资助, No.30271158  
通讯作者: 谭学瑞, 515041, 广东省汕头市长平路57号, 汕头大学医学院第一附属医院. tanxuerui@vip.sina.com  
电话: 0754-8258290-3455 传真: 0754-8611690  
收稿日期: 2004-12-17 接受日期: 2004-12-31

## 摘要

本文诠释了一些易混淆的统计学概念: 效应与响应, 平衡与均衡, 区组与分层, 研究总体与目标总体. 讨论了不确定原则和治疗意向原则这两个临床试验的重要原则. 对简单随机的局限性提出了改进意见. 还提出了临床试验灰关联方法的两个模型: 评估模型和对比模型.

**关键词:** 随机化临床试验; 统计学概念; 不确定原则; 治疗意向原则; 灰关联分析

谭学瑞, 张学中. 临床试验刍议. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2173-2178  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2173.asp>

## 0 引言

国际协调会议(ICH)制定了《ICH临床试验的统计学指导原则》ICH-E9<sup>[1]</sup>. 由于我国是协调三方之外的国家, 为了与国际接轨、掌握并实际应用这些指导原则, 有必要对其中一些常见的名词作较为详细的解释, 以澄清一些理解上的歧义. 为了更科学地设计随机化临床试验, 应当掌握不确定原则和治疗意向原则这两个重要的临床试验原则. 简单随机有其局限性, 即可能产生不平衡, 但可采用适当的技术加以改进. 随机化临床试验特别是大规模、多中心的临床试验存在一些不足, 临床试验的灰关联方法有望弥补. 本文对这些问题进行评述.

## 1 容易混淆的概念

**1.1 效应和响应** 在数理统计和医学统计学领域中, effect一词宜按多数人习惯, 译为“效应”较妥, 而非“响应”(response). “响应”是试验所观测到的结果, 是在受试对象那里所实测到的指标. 而效应常常不是直接观测到的, 是从一定数量的响应中分析出来的. 效应一般分为三类<sup>[2]</sup>: 处理效应, 区组效应和误

差效应. 处理效应是指当处理因素改变时引起响应的变化; 区组效应是为了对误差进行控制, 把试验的非处理因素产生的效应分解出来; 误差效应一般是随机的, 服从正态分布的. 效应按其性质可分为固定效应和随机效应. 为定量描述二者关系所假设的数学模型自然就有固定效应模型、随机效应模型和混合效应模型三类. ICH-E9的原文中还提到“效应大小”(effect size), 文献[3]中有专门条目解释这一词组: “效应大小指由于因素引起的差别”. 有作者<sup>[4-6]</sup>把 effect size译作“样本含量”, 从ICH-E9的上下文看, 似乎不可能是sample size之误, 在“样本含量”一节提到“效应大小”, 是指主要变量引起的响应差别除以相应的标准差, 这一相对量对估算样本含量是重要的.

**1.2 平衡与均衡** 平衡(balance)一词在统计学中也是专业术语, 指可比较的两组或多组中各受试对象数或所作的处理数目相等; 或者说, 在不同的因素-水平组合的实验单元(cell)中各受试对象数目相同, 则称为平衡. 而均衡(homogeneity)是指一个试验组内的受试对象按照所研究的性质而言在统计上是均匀的, 一致的.

例如, 随机区组设计(randomized block design), 或称随机化完全区组设计(randomized complete block design, RCB): 12只小鼠按质量的不同分为4个区组, 每个区组有3只, 随机分配喂以3种不同饲料. 这里每个区组内的小鼠从质量看是一致的, 称为均衡; 4个区组每个都有3种饲料, 称为完全, 本例也是平衡的; 每种饲料都喂以4种不同质量的小鼠, 称为配伍. 如果饲料多于3种, 比方说是4种, 每个区组只能安排其中的3种, 所有区组喂每种饲料的小鼠数也相同, 可以看出这里平衡有两种意义, 其一是指每区组都3只小鼠, 其二是指整个试验每种饲料都喂4只小鼠, 因此称为平衡的不完全区组设计(balanced incomplete randomized block design, BIB). 如果12只小鼠的质量是均衡的, 可以完全随机地分配喂以不同饲料, 称完全随机设计(completely randomized design). 这里完全随机, 是简单随机, 有别于RCB或BIB中的区组随机; 后二者中“完全”和“不完全”是针对所有处理而言的, 同一区组内不同对象接受了所有处理, 谓之“完全”,



不同区组是平衡的。

方差齐性(homogeneity of variances)意味着方差是一致的,并不翻译成“方差均衡”。方差齐性不满足(heterogeneity of variances)也不翻译成“方差不均衡”。对一个分布而言,均衡分布(homogeneity of distribution)是指其变异来自随机误差,不均衡分布(heterogeneity of distribution)是指其变异还来自系统误差<sup>[7]</sup>。

1.3 研究总体和目标总体 国内目前出版的几十本医学统计学书籍,几乎都认为总体(population)是“同质观察单位的全体”。国外有关专著在说明此概念时的用语互相有很大差别,却没有见到用过“同质”、“均衡”、“均匀”一类的词。现把文献[8]中的定义翻译如下:“总体是特定时间内所关注的观察单位最大的集合。如果用某一变量的数值作为观测总体中个体的尺度,于是产生变量数值的总体。”

一个实际的总体常常既有同质的一面,又有不同质的一面,一个总体一般都可分为不同的次级总体。从研究总体(study population)得出统计结论,能否或怎样推广到以后所关注的总体(目标总体)呢?ICH-E9用很大篇幅回答了这一问题。可惜有学者<sup>[4,5]</sup>把目标总体(target population)略去不译,把推广(generalization)有时译成“推论”,有时译成“广义性”。对ICH-E9的理解不仅需要把译文与原文对照,还需研究有关参考书。

1.4 区组和分层 文献[9]介绍了与这两个概念有关的内容,概括如下:区组(blocking)是将受试对象作为样本所进行的分组或划分;分层(stratifying)是将受试对象所在总体按某(些)特征分割为次级总体。分组的原则一般是使一区组内处理数平衡,有时区组内各处理数之比是个常数。区组大小(size)或区组长度(length)是指一个区组包含多少个接受不同处理的受试单元。预后因素(prognostic factor)是临床试验研究中有实际意义的协变量,它可作为分层的依据。这里需要强调的是,在目前通用的统计学书籍中,往往在受试对象存在不均衡的情况下才将其划分成不同的区组,用以分解出“区组效应”,从而降低随机误差,或者说是使随机误差更接近实际情况。该文作者扩展了区组的概念和用法,标以不同区组的受试对象可以是均衡的,即实际上并不存在区组因素,这时还要分成区组,是为了平衡处理因素,详见该文的有关例子。

## 2 随机化临床试验应注意的问题

2.1 两个重要的临床试验原则 不确定原则和治疗意向原则在一些临床试验教材中被忽略了。在临床试验的实践中,这两个重要原则几乎在随机化临床试验的

全过程都起作用。在入选受试者和分析试验结果时,能避免一些偏倚;此外,治疗意向原则遵循Helsinki宣言,自始至终保护受试者的权宜,消除受试者和参加研究的医生们的种种误解和顾虑,以保障研究数据的真实和完整。因而应在临床试验的全过程中坚持这两条原则。

2.1.1 不确定原则 当且仅当以下情况才能将一特定患者随机选入临床试验:经治医生基本上不能确定试验所涉及的几个治疗组哪一个对该患者最适当。

如果因为医学的或非医学的理由,经治医生或患者自己经过认真比较后能够确定,试验所涉及的几个治疗中的一种安排对他(她)是不适当的,则该患者不应入选。这里的比较可以是空白对照,也可以是本试验范围内或范围外的某种治疗。每一项临床试验的实施过程中,都有录选受试者这一重要阶段。从研究人员方面,要有明确的适宜性标准(eligibility criteria)它包括入选标准(inclusion criteria)和排除标准(exclusion criteria),不能用一个适宜性标准来代替后二者,因为它们互相关联。受试者签署了知情同意书(informed consent)后,才能进入试验。有些试验在正式入选前还有一个筛选期(run-in)。

受试者面对临床试验所设计的几个治疗方案,常常要求随机地分配给其中的一个,随之而来的问题是:为什么不从几个可能的方案中选最好的一个?问题在于就目前的认识水平而言,无法确定对该受试者的最优方案。这就是不确定原则<sup>[10]</sup>。

从上述严格数学定义的不确定原则可以看出,它也是受试者的适宜性标准,在录选受试者和签署知情同意书并进行随机时,这一原则是其前提和依据。随机和设盲是两个最常用的避免偏倚的技术方法,但它只有在坚持这一原则时才可行和有效,否则一位患者或医生已经认为哪个方案更有效,却让他(她)随机成另外的方案,势必引入偏倚。

2.1.2 治疗意向原则 “治疗意向原则”(intention-to-treat principle)主张,对一个治疗方案的效果的最好评估,应当基于对任一对象的治疗意向(即所计划的治疗方案)的评价,而不是评估实际所给予的治疗。该原则首先由卸任的英国皇家统计协会主席Austin Bradford Hill提出。该原则的推论是,分到任一治疗组中的各对象都应当作为该组成员始终被随访、评估和分析,不要受治疗计划执行过程中他们是否遵从的干扰。患者被分到处理组或对照组以后在试验过程中,会出现出组情况,这种出组是临床试验的特定情况,各组之间例数常常是不平衡的,这种差别影响到它们之间作比较的合理性。

例如将肝癌患者随机分到肝切除和介入治疗组

中去. 在手术时发现有可能完成手术的病例, 只好因不能手术而出组; 但在介入治疗组则没有这种情况. 除非出组情况非常少而无关紧要, 我们不可避免只好把患者保留在原来的各组中进行比较, 要比较和观测的是治疗的意向而不是实际的治疗. 通过此例不难看出, 肝癌患者只有在开刀以后发现病情过重者才不能完成手术, 如果从该组排除, 不仅在数目上与介入治疗组不平衡, 而且要比较的两组在病情构成上也因此改变了, 显然只有仍按原来的随机分组进行分析才合理. 这就是治疗意向原则<sup>[11]</sup>.

由于不了解或不理解治疗意向原则, 在临床试验的随机和随访中会出现一些不适当的做法和误解. 且举数例.

治疗组一出现不良反应, 立即做出组处理并停止继续随访. 在告知候选对象时, 常因“一旦随机并且签署知情同意后书后, 就不得退出研究”之类的语言吓走了候选对象. 须知, ITT原则是为研究者避免偏倚的, 而不是使受试者失去自主权、少报漏报不良反应, 也不是对试验分组、治疗和分析进行随意或不必要的变动, 改变本来相同的初始条件.

## 2.2 简单随机的局限及其改进

2.2.1 简单随机的局限 简单随机(simple randomization)亦称完全随机, 是指靠抛硬币或随机数表, 或计算机随机函数进行随机化, 不加限制和干预. 这是很简单的分组和分配治疗方案的方法, 但它的局限性是可能产生不平衡.

$N$ 个受试对象, 按照简单随机分配到A和B两个处理组, 每个对象可能到任一组内的概率为 $P = 0.5$ . 分配完成后, 两组数目可能不等, 如此随机安排, 刚好两组数目相等的概率为

$$P_{x(x=N/2)} = \binom{N}{N/2} \left(\frac{1}{2}\right)^N \quad (1)$$

它可能很小. 例如, 当 $N = 100$ , 每组刚好50个受试对象的概率仅约为8%. 估价等于或大于某个特定大小的不平衡情况的概率是包含很多信息的. 利用二项分布的特性, 分到两组中每一组的期望数目为

$$E\{N_A\} = \{N_B\} = NP$$

这一数目的方差为

$$\text{Var}\{N_A\} = \text{Var}\{N_B\} = NP(1-P) \quad (2)$$

当 $N = 100$ 和 $P = 1/2$ 时的方差为25, 近似95%分组数目置信带(bound)为

$$N_A \pm 1.95 \times \sqrt{25} \approx N_A \pm 10$$

这样一来, 我们就会期望比60或40更为不平衡而有利于A(或B)的情况占简单随机的5%.

当我们必须考虑有影响的预后因素时, 不平衡

的问题更加值得注意, 甚至当处理分配的数目是平衡的, 预后因素的分布也是不平衡的. 例如, 假定有 $K$ 个独立的二值预后变量, 每个有0.5的概率是“阳性”. 比较时I型错误取5%, 任何一个变量是平衡的概率则是0.95, 所有 $k$ 个因素都平衡的概率是 $0.95^K$ . 因而, 至少发现有一个因素不平衡概率为 $1 - 0.95^K$ , 当 $K = 5$ , 至少有一个因素在统计上显著不平衡的概率为0.23.

2.2.2 用区组改进简单随机的平衡 区组随机, 是将随机加以约束, 使各处理的分配更加平衡, 满足研究要求. 在一个区组内包含一个预定的处理分组数目和比例. 一个区组的大小必须是处理组数的整数倍. 一区组系列是由随机数字表安排构成的, 每一区组内各处理的次序是随机安排的, 但是是平衡的. 考虑两个处理组, A和B, 实现区组大小为 $N_A + N_B$ 的有约束随机分配处理A的概率:

$$Pr[A] = \frac{N_A - n_A}{N_A + N_B - n_A - n_B} \quad (3)$$

当在一个区组内实现了 $N_A$ 次分配,  $n_A = N_A$ , 于是再取A的概率为零, 当 $N_B$ 次分配完成, 则再取A的概率为1, 这是计算机产生区组安排的实用方法, 为做出每一新安排, 我们比较一随机数 $u$ 与概率 $Pr[A]$ , 如果 $u \leq Pr[A]$ 就安排A, 否则安排B,  $u$ 在 $(0, 1)$ 内均匀分布.

如果处理数为2, A和B, 采用大小为4的区组, 则可能共有6种不同的分配(表1). 试验分配处理的方案是由随机产生的一系列区组构成. 如果我们的试验以一个区组的一半停止, 恰巧这一半是两个A, 那么就会出现不平衡: 多出两个A来. 这说明区组引起的不平衡所产生的情况可能是区组大小的一半.

在小区组内可能包含的处理的排列数不大. 假设有2个处理, 区组大小是 $2b$ , 那么, 在区组内就有 $\binom{2b}{2}$ 种不同的分配. 如果试验严格是在一个区组的一半, 多余的分配数不超过 $b$ . 多于2个处理时用多项式系数算得可能的配置数.

实际随机化分组时, 所有区组不一定有相同的大小. 随机改变区组的长度, 两处理用2, 4, 6, ...; 三处理用3, 6, 9, ....

如果是用随机数字表, 对于表1实际上是这样把

表1 4区组2处理时可能的分配

区组	处理的分配序列号					
	1	2	3	4	5	6
1	A	A	A	B	B	B
2	A	B	B	B	A	A
3	B	A	B	A	B	A
4	B	B	A	A	A	B



随机的数字与区组的处理挂钩的:

随机数字	1	2	3	4	5	6	0, 7-9
区组内的 处理	AABB	ABAB	ABBA	BBAA	BABA	BAAB	不用 处理

这样一来, 随机数字如为0, 5, 2, 7, 8, 4, 3, 7...对患者安排处理: -, BABA, ABAB, -, -, BBAA, ABBA, -, ...

**2.2.3 用区组和分层改进简单随机** 为了更好分析在临床上有重要意义的预后因素, 可以同时用区组和分层两种技术进行随机化. 预后因素每个组合构成一个分立的层, 每一层内再进行区组化. 在每一层内, 所分配的各处理是平衡的; 在每一处理组内, 各预后因素也是平衡的.

每个患者接受下一个处理安排是从一个特定层配置中找到的, 适合某层的她(他)入选, 各层不必以同一速率填满. 在一个有区组又分层随机方案中, 可能所有各层都填了一半, 即都有A(或B)待填. 每个处理中有b个分配, 区组大小为2b, 层数为k, 最大不平衡数为kb. 换句话说, 每层都可能多出b个分配, 对2个处理, 4层, 区组大小为4, 如表2的例子, 最大不平衡数为8, 以不平衡数为8而有利一种处理或另一种处理的机会为

$$uv = 2 \times (1/4)^4 \times \binom{4}{2} = 6.03 \times 10^{-6}$$

而不平衡数少的机会就要大些.

u, v的意义: u为每层仅停于一半的机会; v为所有k个区组具有同一分配的机会:

$$u = \left(\frac{1}{2b}\right)^k \quad v = \left(\frac{2b}{b}\right)^k$$

如果每一个患者都是在有许多预后变量而属于特有的一层, 其结果就相当于简单随机. 这时就要少分几层, 与处理的数目要相当. 换言之, 大多数区组应该填满, 因为未填满都带来分配的不平衡. 区组太大, 就会抵消区组的平衡效果, 以一个大区组进行处理分配实质是简单随机, 除非到区组的终了附近. 例如对公式(3), 当 $N_A$ 和 $N_B$ 都很大时, 对所有分配好的情况而言,  $Pr[A] \approx 1/2$ . 区组可用于不等的分配, 例如:  $N_A : N_B : 2 : 1$ , 这时区组大小应为3的倍数, 2/3分配给处理A.

每一患者进入临床研究, 须认定属于哪一层, 从相应的随机数表中得到随机的处理安排. 当有多个层时, 区组宜小一些. 虽然实际问题都可以有多个协变量, 但应抓住主要矛盾, 最好只有一个分层因素.

**2.2.4 区组和分层随机的简化实例** 乳腺癌治疗研究中, 有两个预后因素较重要: 阳性淋巴结数和年龄. 年龄的重要性在于年长者其生存时间短, 这与本病无关, 而且辅助化疗也可能与年龄有关. 患者这两

个预后因素作为协变量, 一般是连续变量, 但在我们这个实际情况下, 每个变量都可归结为两个值:

年龄: <50岁,  $\geq 50$ 岁,

阳性淋巴结数: 1-3个, 4个,

因此, 可以把乳腺癌患者按协变量分为四层:

年龄<50岁和阳性淋巴结数1-3个,

年龄<50岁和阳性淋巴结数 $\geq 4$ 个,

年龄 $\geq 50$ 岁和阳性淋巴结数1-3个,

年龄 $\geq 50$ 岁和阳性淋巴结数 $\geq 4$ 个.

在试验开始前, 准备四份互相独立的随机数字表, 每层一个, 分别按有约束随机区组安排各层, “有约束随机区组安排”与前面的叙述是一样的. 如果区组大小为4, 两个处理分别是A = L-Pam和B = placebo, 所得安排如表2.

表2 乳腺癌临床试验分层时的随机区组分配序列

区组	阳性腋窝淋巴结数 年龄	1-3		4	
		<50	$\geq 50$	<50	$\geq 50$
1		B	B	A	B
		A	B	A	A
		B	A	B	A
		A	A	B	B
2		A	A	B	A
		B	A	A	B
		A	B	B	B
		B	B	A	A
3		A	B	B	B
		B	A	A	B
		B	A	B	A
		A	B	A	A
4		B	A	B	A
		B	B	A	B
		A	B	A	A
		A	A	B	B

### 3 临床试验的灰关联方法

循证医学概念的提出使大规模、多中心临床试验进入了鼎盛时期. 但大样本随机对照试验有如下缺点<sup>[12-14]</sup>: 前瞻性工作耗时长, 组织协调工作量大, 协作单位多, 质量控制难度大, 患者多, 入选标准掌握不统一, 混杂因素多, 要求随机严格, 否则可能出现偏差, 且往往是临床试验终点的单指标或少指标的评价, 忽略了综合效益的重要性, 此外还要求有足够的经费支持. 盲法安慰剂对照试验存在伦理道德问题, 它可能使受安慰剂治疗的患者延误治疗, 甚至增加不必要的死亡. 荟萃分析资料来源于数个不同的临床试验, 试验背景及质控标准易出现偏差, 而且荟萃分析是回顾性的, 它所分析的资料是历史性的, 可靠性较差, 误差往往较大. 序贯试验仅适用于单指标观察. 灰关联理论<sup>[15-17]</sup>与临床试验的实际要求相结合, 建立(1)系统多指标综合评估的临床试验设计与分析理论

方法: 把既往临床试验常用的指标间对比评价发展为包含有多种内涵的“多指标系统”间的对比, 可提高对临床试验资料分析评价的效度. (2) 不需要设安慰剂对照组的临床试验的灰关联方法: 把安慰剂对照改变为“理想组”对照, “理想组”是在各试验组中抽取“相对理想值”构成的, “理想组”是虚拟的, 但却来源于“临床试验的现实资料”, 又是实际的, 具有可比性. 这种设计的优越性在于: 受试者避免因使用安慰剂而延误治疗, 符合伦理学要求; 作为“标准”的对照组总是最优的“理想组”, 较之与没有作用的安慰剂比较, 灰关联方法希望试验方案向最优逼近, 从评价态度上更积极; 又因为“理想组”随试验背景、试验条件、受试样本等不确定因素而改变, 不可能呈现完美无缺, 所以, “理想组”作为对照的“标准”又是最现实的. (3) 小样本临床试验资料的灰关联分析方法: 可在综合了多指标的基础上, 通过提高试验资料的利用效度, 达到大样本临床试验的分析效果, 从而简化试验条件, 节约人力、财力和时间等试验资源的投入. (4) 评价个体化疗效的临床试验的灰关联方法: 使临床上有试验依据而不是仅仅凭经验进行个体化治疗成为可能.

把系统科学引入临床试验领域, 对个体患者的治疗效果进行评价, 临床试验结果的“非唯一解”可提供不同背景下的多种选择, 把安慰剂对照改变为“理想组”对照, 成组评价与个体化评价并举, 既考虑到临床试验结果的普遍意义, 又不偏废某些个体化的特殊问题, 这些都赋予临床试验方法学以辩证法新思想和方法论新内容. 本文以临床试验的灰关联评估模型和对比模型为例加以说明.

### 3.1 临床试验的灰关联评估模型

#### 3.1.1 方法<sup>[17,18]</sup>

①若有规定的参考效果指标集 $X$ ,  $X_i(k) \in X$ 为规定的参考效果指标序列,  $i$ =效果级别, 如: 显效、有效……无效.  $K$ =指标数, 那么, 对于某个指标( $k$ ), 将有 $i$ 个规定的效果级别的值;

②受试对象中观察到的效果指标集表示为 $Y$ ,  $y_j(k) \in Y$ 为第 $j$ 个受试对象的观察效果指标值,  $k$ =指标数, 那么

$$\gamma(X_i(k), y_j(k)) = \frac{\min_i \min_k |x_i(k) - y_j(k)| + \xi \max_i \max_k |x_i(k) - y_j(k)|}{|x_i(k) - y_j(k)| + \xi \max_i \max_k |x_i(k) - y_j(k)|} \quad (4)$$

和

$$r(x_i, y_j) = 1/n \sum_{k=1}^n \gamma(x_i(k), y_j(k)) \quad (5)$$

为效果阈值个体评估的关联度

若有一组 $m$ 例受试对象, 则在效果级 $i$ 上的效果阈值成组评估的关联度为:

$$r(x_i, y_j) = 1/(m \cdot n) \sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n \gamma(x_i(k), y_j(k)) \quad (6)$$

③对应于观察效果指标 $y_j$ 的参考效果指标为 $x_{ij}$ , 则:

$$\gamma(x_{ij}(k), y_j(k)) = \frac{\min_i \min_j \min_k |x_{ij}(k) - y_j(k)| + \xi \max_i \max_j \max_k |x_{ij}(k) - y_j(k)|}{|x_{ij}(k) - y_j(k)| + \xi \max_i \max_j \max_k |x_{ij}(k) - y_j(k)|} \quad (7)$$

$$r(x_{ij}, y_j) = 1/n \sum_{k=1}^n \gamma(x_{ij}(k), y_j(k)) \quad (8)$$

为应变效果个体评估的关联度.

若有一组 $m$ 例受试对象, 则在效果级 $i$ 上的应变效果成组

评估的关联度为:

$$r(x_i, y_j) = 1/(m \cdot n) \sum_{i=1}^m \sum_{k=1}^n \gamma(x_{ij}(k), y_j(k)) \quad (9)$$

④按公式(10)和(11)对指标 $k$ 进行评估:

$$r_k = 1/(e \cdot m) \sum_{i=1}^e \sum_{j=1}^m \gamma(x_i(k), y_j(k)) \quad (10)$$

$$r_k = 1/(e \cdot m) \sum_{i=1}^e \sum_{j=1}^m \gamma(x_{ij}(k), y_j(k)) \quad (11)$$

⑤效果阈值个体评估矩阵为:

$$R_{XY} = \begin{pmatrix} r(x_{11}, y_1) & r(x_{21}, y_1) & \cdots & r(x_{e1}, y_1) \\ r(x_{11}, y_2) & r(x_{21}, y_2) & \cdots & r(x_{e1}, y_2) \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ r(x_{11}, y_m) & r(x_{21}, y_m) & \cdots & r(x_{e1}, y_m) \end{pmatrix} \quad (12)$$

⑥应变效果评估矩阵为:

$$R_{XY} = \begin{pmatrix} r(x_{11}, y_1) & r(x_{21}, y_1) & \cdots & r(x_{e1}, y_1) \\ r(x_{12}, y_2) & r(x_{22}, y_2) & \cdots & r(x_{e2}, y_2) \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ r(x_{1m}, y_m) & r(x_{2m}, y_m) & \cdots & r(x_{em}, y_m) \end{pmatrix} \quad (13)$$

⑦对关联度的差异性进行显著性检验, 得出结论.

### 3.2 临床试验的灰关联对比模型

#### 3.2.1 方法<sup>[18,19]</sup>

令  $X_i \in X$ ,  $X_i = (X_i(1), X_i(2), \cdots, X_i(n))$  为第 $i$ 组/ $i$ 例的观察指标试验效果序列,  $i \in I$ ,  $I=1, 2, \cdots, m$ ;  $m \geq 2$ 为试验组或受试对象数;  $k \in K$ ,  $K=1, 2, \cdots, n$ ;  $n \geq 3$ 为观察指标数.

$\chi_0 = (\chi_0(1), \chi_0(2), \cdots, \chi_0(n))$ ,  $k \in K$ ,  $K=1, 2, \cdots, n$ ;  $n \geq 3$ 为观察指标的理想效果序列.

若 $i \in I$ ,  $I=1, 2, \cdots, m$ ;  $m \geq 2$ 为 $m$ 种治疗方案所对应的试验组或受试对象数, 则为 $m$ 种治疗方案的对比.

若 $i \in I$ ,  $I=1, 2, \cdots, m$ ;  $m \geq 2$ 为单一治疗方案在 $m$ 种不同品质的试验组或受试对象数, 则为单一治疗方案在 $m$ 种不同品质的试验组或受试对象中的对比.

若 $i \in I$ ,  $I=1, 2, \cdots, m$ ;  $m \geq 2$ 为一组 $m$ 例某病受

试对象数;若令 $\chi_{ig} \in \chi_i$ 为其临床试验亚组序列,  $g \in G, G=1, 2, \dots, 1; 1 \geq 2$ 为亚组数, 则为一组 $m$ 例该病受试对象个体间对比, 并可进行亚组间综合对比。

理想效果序列中, 第 $\kappa$ 个指标的值 $\chi_0(\kappa)$ 一般为遍历 $i$ 的最佳效果指标值, 也可为规定的理想值。

单一治疗方案对比时, 本模型尚可根据 $r_k$ 作指标间对比, 但比较的结果仅是数据上的, 要结合意义分析结果; 本模型也可做个体间比较。

按公式(14)计算灰关联度, 对试验效果序列与理想效果序列进行对比分析

$$\gamma(\chi_i(k), y_i(k)) = \frac{\min_i \min_k |x_i(k) - y_i(k)| + \zeta \max_i \max_k |x_i(k) - y_i(k)|}{|x_i(k) - y_i(k)| + \zeta \max_i \max_k |x_i(k) - y_i(k)|} \quad (14)$$

对关联度的差异性进行显著性检验, 得出结论。

#### 4 结语

准确理解临床试验的统计学概念, 有利于把握试验设计意图, 正确评价试验结果。掌握并运用好不确定原则和治疗意向原则可避免一些偏倚; 简单随机的方法有产生不平衡的局限性, 这种局限可用区组随机和分层随机的技术加以解决。随机化临床试验特别是大规模、多中心的临床试验存在一些不足, 临床试验的灰关联方法可在不设安慰剂对照时进行多指标的比较或评估, 可在小样本基础上得到较精确的结果或结论, 还可能评价个体化治疗的效果。总之, 临床试验面临的是一大类不确定性问题, 应在一套严格的规则之下进行操作, 并不断完善其方法技术体系。

#### 5 参考文献

- 1 Anonymous. E9. Statistical Principles for Clinical Trials, September 16, 1998
- 2 Klaus Hinkelmann, Oscar Kempthorne. Design and Analysis of Experiments, Volume I, New York: John Wiley & Sons, Inc. 1994:36
- 3 Curtis L Meinert. Clinical Trials Dictionary Terminology and Usage Recommendations *The Johns Hopkins Center for Clinical Trials* 1996:84
- 4 高晨燕, 冯毅, 陈峰. ICH 临床试验的统计学指导(I). 中国临床药理学杂志 1999;15:228-235
- 5 郑筱萸. 药品临床试验管理规范. 北京: 中国医药科技出版社 2000;318-345, 607-644
- 6 周海钧主译. 药品注册的国际技术要求-临床部分. 人民卫生出版社 2001;261-314
- 7 Grimm & PR Yarnold. Reading and Understanding Multivariate Statistics. *The American Psychological Association* 1995;350
- 8 Wayne W Daniel. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences 6<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1995:5
- 9 张学中. 区组和分层改进简单随机. 中国新药杂志 2000;9:383-386
- 10 Hennekens CH. Clinical Trials in Cardiovascular Disease. *W.B. Saunders Company* 1999:24-30
- 11 Hill AB. Principles of Medical Statistics, seventh edition 1961:258
- 12 Lecoutre B, Mahika B, Derzko G. Assessment and monitoring in clinical trials when survival curves have distinct shapes: a Bayesian approach with Weibull modeling. *Stat Med* 2002; 21:663
- 13 Sylvester R, Van Glabbeke M, Collette L, Suci S, Baron B, Legrand C, Gorlia T, Collins G, Coens C, Declerck L, Therasse P. Statistical methodology of phase III cancer clinical trials: advances and future perspectives. *Eur J Cancer* 2002;38: s162-s168
- 14 Taylor DA. Cellular cardiomyoplasty with autologous skeletal myoblasts for ischemic heart disease and heart failure. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2001;2:208-210
- 15 Tan Xuerui, Li Yuguang. Using grey relational analysis to analyze the medical data. *Kybernetes* 2004;9:355
- 16 谭学瑞, 李玉光, 陈明哲, 朱金秀, 杨虎生. 小剂量氯沙坦与氢氯噻嗪联合固定配方(海捷亚) 治疗高血压的近期疗效. 高血压杂志 2004;3:221-222
- 17 Tan Xuerui, Yang Yuhua, Deng Julong. Grey relational analysis factors in hypertensives with cardiac insufficiency. *J Grey System* 1998;10:75
- 18 Xu Yuchun, Tan Xuerui. Grey relational analysis on trial of trental vs anti-aggregants. *J Grey System* 1997;9:365

电编 张勇 编辑 张海宁



# RNA 干扰在肝病治疗中的研究进展

韩苏夏, 马瑾璐

韩苏夏, 马瑾璐, 西安交通大学肿瘤研究中心 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤科 陕西省西安市 710061; 西北大学生命科学学院 陕西省西安市 710068  
韩苏夏, 男, 1968-03-14生, 陕西省富平县人, 汉族, 主治医师, 在读博士(西北大学生命科学学院), 主要从事肿瘤预防和综合治疗的基础与临床研究, 作为第一作者共发表论文10余篇, 曾负责或参与科研项目6项, 先后获陕西省政府、西安市政府、陕西省教育厅科技进步奖3项。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30300300  
西安交通大学自然科学基金资助项目, No. 2003-12  
陕西省科学技术研究发展计划项目, No. 2004K13-G10  
通讯作者: 韩苏夏, 710061, 陕西省西安市雁塔区健康路1号, 西安交通大学肿瘤研究中心, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤科。  
hansuxia22099@sohu.com  
电话: 029-85323249  
收稿日期: 2005-08-10 接受日期: 2005-08-26

## 摘要

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)引发的转录后基因静默机制, 它是真核生物中普遍存在的抵抗病毒入侵、抑制转座子活动、调控基因表达的监控机制, RNA干扰在细胞分裂过程中发挥了至关重要的控制作用, 对引导细胞形成某种特定类型的组织产生深远的影响。《科学》把这一令人激动的发现当作2002年最重大的科学突破来欢呼, 这些发现将使生物学家们重新审度细胞及其演化过程。目前已成功用于基因功能和信号转导系统上下游分子相互关系的研究, RNA干扰有可能成为包括病毒感染在内的许多肝病的一种有效治疗手段, 并有可能为肿瘤基因治疗提供新策略。

**关键词:** RNA干扰; 肝病治疗; 研究进展

韩苏夏, 马瑾璐. RNA干扰在肝病治疗中的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2179-2182  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2179.asp>

## 0 引言

RNA干扰(RNA interference, RNAi)最早发现在线虫类秀丽隐杆线虫, 反应于双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA), 使目标mRNA以序列特异性的退化, 是一种具有序列特异性的RNA依赖性转录后基因沉默现象(posttranscriptional gene silencing, PTGS)<sup>[1]</sup>。RNAi广泛存在于从真菌到植物, 从无脊椎动物到哺乳动物的各种生物中。RNAi的表现形式是多种多样的, 除动物中的RNAi外, 还包括在植物中的PTGS、共抑制(cosuppression)及RNA介导的病毒抗性, 真菌的抑制(quelling)现象等。

RNAi最核心的生物学功能在于它能监控异常的或外源的遗传物质在机体内的水平, 调控基因的表达。利用

dsRNA可以特异性地降解与之有同源序列的mRNA, 从而特异性的阻断相应基因的表达。因此, RNAi被认为是真核生物的遗传监视器<sup>[2]</sup>和基因组水平的免疫系统<sup>[3]</sup>。目前, RNAi技术已被广泛用于新基因筛选、基因功能鉴定、信号传导研究及基因治疗<sup>[4-5]</sup>等方面, 显示了非常广阔的应用前景。

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)所导致的慢性肝炎、肝癌是严重危害人类健康的疾病。目前, 慢性乙型肝炎的治疗主要是用干扰素(IFN)和拉米夫定, 治疗丙型肝炎感染的主要是干扰素和利巴韦林联用, 其效果均不很理想。肝癌作为一种恶性肿瘤更是缺乏有效的治疗方法。siRNA技术经研究发现可用于肝病抗病毒和肿瘤的治疗<sup>[6-11]</sup>, 以下就近期的研究进展进行综述。

## 1 RNAi的作用的机制

RNAi作用过程可分为启动过程和效应过程。启动过程中, 外源性dsRNA被Dicer(RNase III家族中的dsRNA2特异性核糖核酸酶)以一种ATP依赖的方式降解为19-21 bp的双链siRNAs, 后者被称为“向导RNA”。效应过程中, siRNAs结合siRNA2核糖核蛋白复合体(siRNP)形成RNA诱导的沉默复合体(RISC)<sup>[12]</sup>。活化的RISC遵循碱基配对原则靶向性与同源mRNA结合并导致其降解, 从而使得内源基因不能表达, 导致内源基因的沉默<sup>[4, 13, 14]</sup>。切断后的mRNA或者被核酸外切酶降解, 或者可能成为异常RNA, 在RNA依赖多聚酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRP)的作用下又形成了新的dsRNA进一步作用于另外的靶向mRNA。这种不断被放大的瀑布式作用形成大量新的siRNA, 使RNAi在短时间内达到迅速, 有效地抑制mRNA翻译形成蛋白或多肽, 从而有效地抑制靶向基因蛋白质或多肽的形成。

## 2 RNAi的作用特征

RNAi的作用特征主要有: (1)RNAi具有高度的特异性。单个碱基改变就可能使RNAi失效, RNAi只能特异地降解与之序列相应的单个内源基因的mRNA, 而其他mRNA的表达则不受影响<sup>[15]</sup>。(2)RNAi存在放大效应: 1)长的dsRNA被Dicer酶裂解成的每个初级siRNA, 都具有结合一个同源mRNA的能力, 此步放大效应约10-20倍。2)RISC复合物中, 在RdRP酶的作用下, 经类PCR合成的mRNA互补链也形成了dsRNA, 再被酶裂解成次

级siRNA. 这样细胞内的siRNA数量大大增加, 显著增强干扰作用. 3) 以上生成的siRNA可多次重复应用, 进一步提高了其放大作用<sup>[4, 15]</sup>, 这表明dsRNA介导的RNA干扰是一个以催化放大的方式进行的. (3) RNAi效应具有高效性. 无论是在体内还是体外实验中, 仅需少量的dsRNA(几个数量级浓度)就能有效的抑制靶基因表达, 抑制的效率在低等动物中>90%<sup>[16]</sup>. 且siRNA作为RNAi的中介分子, 通过序列互补配对法则特异性降解目的基因<sup>[17-18]</sup>. (4) RNAi需要ATP参与其效应. 在去除ATP的样品中RNA干扰现象降低或消失显示RNA干扰是一个ATP依赖的过程, 可能是Dicer和RISC的酶切反应是必须由ATP提供能量<sup>[19]</sup>. (5) RNAi作用广泛并可遗传. 基因表达的效应可以跨越细胞界限, 在不同细胞甚至生物体间长距离传递和维持, 并可传递给子一代.

### 3 RNAi的生物学功能

随着对RNAi的大量深入研究, 人们逐步认识到RNAi与获得性免疫反应一样具有特异性、多样性、记忆性、可遗传性等特征. 目前认为RNAi的本质是一种由RNA介导的序列特异性的获得性免疫反应, 是一种原始的基因组对抗外来基因表达的保护机制, 是生物体在基因组水平上的免疫系统<sup>[20]</sup>. RNAi的核心功能是抗病毒感染免疫, 维持基因组中转座子的稳定性, 清除异常RNA, 同时参与基因表达的调控.

### 4 RNAi在肝病治疗中的应用

siRNA的这种生物学作用使它具有潜在的临床应用价值, 可发展为高度特异的性的基因封闭治疗手段, 具有极诱人的前景. siRNA正在被用于包括肝癌的多种疾病的广泛研究, 并初步取得成果.

**4.1 RNAi对HBV的抑制** 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)属于肝DNA病毒属家族. 虽然在有些时候疫苗对于肝炎的治疗和预防是有效的, 但是据调查, 全世界约有一百万的人死于HBV相关疾病. 许多慢性转染HBV病毒的患者随后发展为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)<sup>[21]</sup>. 现在, 已知的至少有两种针对慢性肝炎的抗病毒疗法, 一种是 $\alpha$ -干扰素, 另一种为包括拉米夫定(3TC 3-硫胞苷), 阿德福韦, 恩替卡韦的核苷类似物. 虽然这些方法成功的减少了病毒的载量但是效果不令人满意. 用RNA干扰技术就成了一个吸引人的选择. 在以下的最近各项研究中证明了它对HBV表达的有效抑制.

Qian *et al*<sup>[22]</sup>, 在体外构成包括t7和tac启动子的表达载体. 目的cDNA片断被克隆到该载体相对的启动子之间. 在大肠杆菌中dsRNA被载体表达, 并通过亲和色普法纯化. 然后在含锰离子的缓冲溶液中被核糖核酸酶III降解, 后用15%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电

泳法分离, siRNA(大约25 bp)便可以得到. siRNA通过克隆, 发酵, 消化, 提纯, 与靶基因表达质粒共转染入人细胞系. 结果表明siRNA特异性的与乙肝病毒聚合酶部分相对应, 并特异性的抑制病毒蛋白的表达. HBsAg表达水平下降了10%. 对HBsAg和HBeAg表达抑制的剂量依赖效应于HepG2细胞被观察到. 在转染7.5 nmol/L si HBV p后的6 d抑制率持续于70%左右的最高水平. Moore *et al*<sup>[23]</sup>, 在体外试验中首先鉴别出有效抑制乙肝表面抗原的RNA干扰序列, 并证明它是由聚合酶III表达盒表达. 该表达盒被插入不同的两个载体, 原型的泡沫状病毒(PFV)和腺伴随病毒(AAV). 它们的共同点是都是非致病的, 并且有整合入细胞DNA的能力. 包含HBV目的RNA干扰分子的载体被引入293 t(一种稳定表达乙肝表面抗原的细胞), 载体也被在HepG2. 2. 15细胞(一种分泌有传染性的HBV病毒粒子的细胞)中评估. 7 d后HBVAg的敲低率与对照相比高达90%. Chen *et al*<sup>[24]</sup>的该试验表明合成的siRNA作用于HBV的c基因和s基因, 可以有有效的特异的抑制乙肝病毒和抗原的表达. HBsAg和HBeAg以及HBV的表达可以被siRNA被抑制呈剂量反应关系. 此外, 该试验表明在相同终浓度的情况下siRNA的联合体作用于多个区域, 抑制HBV表达的效果优于单个siRNA. 在siRNA处理后未观察到细胞凋亡的变化. 得出试验结论为, 在细胞体外培养中, siRNA有明显的抑制HBV和抗原表达的作用, 而且siRNA作用于不同的区域展现了其潜力. Yang *et al*<sup>[25]</sup>用荧光激活细胞分选术. 发现siRNA作用于HBsAg减少了绿色荧光蛋白信号56%与对照组相比. 实时PCR表明乙型肝炎表明绿色荧光蛋白mRNA提取于与pAVU6+27共转染的HepG2细胞, 并且与空的媒介防除相比乙型肝炎表明绿色荧光蛋白质粒的表达减少了90%. HBsAg和HBeAg的表达同样被分别抑制了43%和64%. 从而得出试验结论siRNA表达载体可以抑制HBsAg的表达并且提供了新的有效途径筛选siRNA. Uprichard *et al*<sup>[26]</sup>该试验通过腺病毒重组体在HBV转基因小鼠的肝脏表达HBV特异siRNA, 抑制预成HBV基因的表达和复制在至少26 d. Zhu *et al*<sup>[27]</sup>用HepG2. 2. 15作为靶细胞, 质粒和微脂体共转染入培养细胞, HBV DNA经过PCR检测, HBV c-mRNA被半定量PCR检测到. 试验表明质粒成功的表达了siRNA, 两个构建的siRNA有效的抑制了HBV的表达, 并且它对HBV的抑制作用存在反应关系.

**4.2 RNAi对HCV的抑制** HCV为单股正链RNA病毒, 在肝细胞中直径为37-40 nm. 现今没有有效治疗HCV的疫苗. 现在流行的受人们欢迎的治疗HCV感染的方法是peg干扰素联合病毒唑. 最近经限制性临床试验证明ns3蛋白酶的小分子抑制子比peg干扰素和病毒唑的效果更好. 但是现在将其用于标准疗法治疗HCV感染还为时过早. 因为HCV病毒是RNA病毒, 既能当作病毒mRNA进行蛋白翻译, 又可作为模板经性病毒复制, 因此成为RNA干



扰研究的理想模型.

Takigawa *et al*<sup>[28]</sup>在此试验中用了两种方法表达siRNA, 一个是表达质粒(Pavu6+27), 另一个是包含Pavu6+27衍生表达盒的慢病毒重组体. Gomez *et al*<sup>[29]</sup>在试验中观察了HCV RNA基因组的三性从基本序列到三级结构, 它说明了RNA为基础治疗的限制和可能性. 并描述了一些以RNA为基础的抗HCV的方法. 虽然5'-utr曾经被认为是最适合治疗性siRNA或siRNA的区域, 因为它是极端保守的序列. 他们观察到经过siRNA对5'-utr的抑制, HCV亚基因组的表达只有微弱的抑制. 在质粒和慢病毒介导的表达系统中, siRNA通过对ns3-1和ns5b的抑制使其在没有抑制宿主细胞基因的情况下, 更为有效的抑制HCV的表达. 合成的siRNA通过对ns3-1的作用也可以有效的抑制HCV的表达, 并存在剂量反应关系. Randall *et al*<sup>[30]</sup>的实验中证明了siRNA治疗HCV的潜在可能性, 但是仍然存在不确定性. Kronke *et al*<sup>[31]</sup>认为以siRNA为基础的基因治疗的最大困难是HCV有许多高度不同的基因型并且快速出现新的种型. 为了这个原因, 他们用可选择的策略克服它. 在一种方法中, 使用核糖核酸内切酶修饰过的siRNA(esiRNA)同时多位点处理病毒基因组. 在该实验中他们发现esiRNA直接抑制除5'非编码区(5' ntr)的HCV编码序列的多个区域, 从而有效的抑制了HCV基因组和亚基因组的表达. 在另一可供选择的方法中, 利用逆转录病毒的产生的假模标本编码小发卡结构RNA(siRNA). Seong *et al*<sup>[32]</sup>认为prk2是NS5B磷酸化和HCV表达所必须的, 所以用siRNA敲低prk2的表达便可干扰HCV RNA的表达. Jong *et al*<sup>[33]</sup>在体内实验和体外实验的数据强有力的指出NSAP1蛋白增加HCV ires依赖翻译通过在HCV Mrna编码区预acr相互作用. Wilson *et al*<sup>[20]</sup>通过电穿孔(electroporation)基因转移方法将被设计成靶向HCV基因组的双链小干扰RNA(siRNA)分子导入含有HCV亚基因组复制子的人肝细胞瘤细胞系(huh7)细胞中, 显示两种siRNA均可明显降低病毒特异性蛋白的表达和RNA合成, 其水平较未用siRNA处理的细胞低90%, 这两种siRNA还能保护原始的huh7细胞免受HCV复制子RNA的实验感染. Randal *et al*<sup>[34]</sup>发现siRNA对HCV RNAs封闭为剂量依赖性和序列依赖性. 靶序列内有3 nt不同的2细胞株HCV变异只能被各自同源序列的siRNA所封闭, 这种序列特异性证实HCV抗原表达的下降不是双链siRNA非特异性激活ifn系统所致, 而且经siRNA治疗后HCV RNA水平下降, 转染后4 d HCV RNA水平降低了80倍, 导入siRNA后是受HCV RNA感染的细胞数降低了98%以上.

4.3 RNAi在肝癌治疗中的应用 肝细胞癌(HCC)的发生与一些致癌基因的过度表达有关. 在70%的

HCCs中c-myc呈过度表达. Cheng *et al*<sup>[35]</sup>的实验中通过真核生物生存素基因rna干扰表达载体和与生存素基因结合的重组质粒(pSuNeo-SV), pSuperssorNeo(pSuNeo)被消化酶Xba I和Sa I及特异的双链RNAi引物处理. 大鼠肝癌细胞系SMMC-7721辅助细胞模型在用siRNA处理后用大鼠肝癌细胞系SMMC-7721转染细胞处理. 用免疫组化染色法和逆转录酶PCR检测大鼠肝癌细胞系细胞表面生存素基因. 流式细胞计量术用于细胞周期的分析. 透射电子显微术检测是否有RNAi处理细胞编程性死亡. 结果发现通过siRNA的处理几乎未检测到生存素基因在SMMC-7721细胞表面的表达. 凋亡指数上升了15.6%. 并且细胞数量在G2/M期减少, 细胞生长被抑制. 从而得出结论siRNA可以敲低生存素基因的表达, 诱导凋亡和抑制肝癌细胞的生长. Xu *et al*<sup>[36]</sup>在实验中发现细胞被psilencer-c-myc转染后c-myc Mrna和蛋白的表达被抑制且与模拟转染细胞相比抑制率高达67%. 在被转染的HepG2细胞中可以检测到细胞的凋亡. 从而得出结论c-myc在转录子的表达和在siRNA转染的HepG2细胞中的翻译水平明显被抑制. Liu *et al*<sup>[37]</sup>在哺乳动物中siRNA表达载体被成功构建, 并且与对照组相比, 表达siRNA的pUC18U6 HBV抗HBV减少HBsAg的浓度值得注目的减少了44%( $P<0.05$ ).

## 5 结语

siRNA在体外(细胞培养)和体内(小鼠模型)实验性抗病毒感染, 调节机体基因表达的研究中已取得了迅速进展. 虽然这些研究还相当初步, 但明显提示siRNA有可能成为包括病毒感染在内的许多肝病的一种有效治疗手段. 同时, siRNA也有助于我们重新认识慢性病毒感染的机制. 相信随着siRNA研究的进展和对其认识的提高, 必将对肝病的防治产生巨大的影响.

## 6 参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811
- 2 Boshier JM, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol* 2000;2:E31-36
- 3 Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 2002;296:1263-1265
- 4 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-251
- 5 McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 2002;3:737-747
- 6 Klein C, Bock CT, Wedemeyer H, Wustefeld T, Locarnini S, Dienes HP, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA. *Gastroenterology* 2003;125:9-18
- 7 Konishi M, Wu CH, Wu GY. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line. *Hepatology* 2003;38:842-850
- 8 McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus



- in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003;21:639-644
- 9 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003;37:764-770
- 10 Wu J, Nandamuri KM. Inhibition of hepatitis viral replication by siRNA. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1649-1659
- 11 Zhang XN, Xiong W, Wang JD, Hu YW, Xiang L, Yuan ZH. siRNA-mediated inhibition of HBV replication and expression. *World J Gastroenterol* 2004;10:2967-2971
- 12 Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:657-685
- 13 Cerutti H. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions. *Trends Genet* 2003;19:39-46
- 14 Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA, Vaucheret H. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 2000;101:533-542
- 15 Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002;26:199-213
- 16 Davenport RJ. Gene silencing. A faster way to shut down genes. *Science* 2001;292:1469-1471
- 17 Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101:25-33
- 18 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188-200
- 19 Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001;107:309-321
- 20 Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatons S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2783-2788
- 21 Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* 1987;56:651-693
- 22 Qian ZK, Xuan BQ, Min TS, Xu JF, Li L, Huang WD. Cost-effective method of siRNA preparation and its application to inhibit hepatitis B virus replication in HepG2 cells. *World J Gastroenterol* 2005;11:1297-1302
- 23 Moore MD, McGarvey MJ, Russell RA, Cullen BR, McClure MO. Stable inhibition of hepatitis B virus proteins by small interfering RNA expressed from viral vectors. *J Gene Med* 2005;7:918-925
- 24 Chen Z, Xu ZF, Ye JJ, Yao HP, Zheng S, Ding JY. Combination of small interfering RNAs mediates greater inhibition of human hepatitis B virus replication and antigen expression. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005;6:236-241
- 25 Yang ZG, Chen Z, Ni Q, Xu N, Shao JB, Yao HP. Inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by small hairpin RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2005;11:498-502
- 26 Uprichard SL, Boyd B, Althage A, Chisari FV. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:773-778
- 27 Zhu C, Fan XG, Li N, Ying RS. Inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference in vitro. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:522-525
- 28 Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Hidajat R, Tanaka M, Mizuta H, Hotta H. Suppression of hepatitis C virus replicon by RNA interference directed against the NS3 and NS5B regions of the viral genome. *Microbiol Immunol* 2004;48:591-598
- 29 Gomez J, Nadal A, Sabariego R, Beguiristain N, Martell M, Piron M. Three properties of the hepatitis C virus RNA genome related to antiviral strategies based on RNA-therapeutics: variability, structural conformation and tRNA mimicry. *Curr Pharm Des* 2004;10:3741-3756
- 30 Randall G, Rice CM. Interfering with hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res* 2004;102:19-25
- 31 Kronke J, Kittler R, Buchholz F, Windisch MP, Pietschmann T, Bartenschlager R, Frese M. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* 2004;78:3436-3446
- 32 Kim SJ, Kim JH, Kim YG, Lim HS, Oh JW. Protein kinase C-related kinase 2 regulates hepatitis C virus RNA polymerase function by phosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279:50031-50041
- 33 Kim JH, Paek KY, Ha SH, Cho S, Choi K, Kim CS, Ryu SH, Jang SK. A Cellular RNA-Binding Protein Enhances Internal Ribosomal Entry Site-Dependent Translation through an Interaction Downstream of the Hepatitis C Virus Polyprotein Initiation Codon. *Mol Cell Biol* 2004;24:7878-7890
- 34 Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100: 235-240
- 35 Cheng SQ, Wang WL, Yan W, Li QL, Wang L, Wang WY. Knock-down of survivin gene expression by RNAi induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *World J Gastroenterol* 2005;11:756-759
- 36 Xu Y, Wang YH, Gao JD, Ye J, Zhu HX, Xu NZ, Wang XY, Sun ZT. Suppression of c-myc expression by interference RNA in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2004;26:458-460
- 37 Liu J, Guo Y, Xue CF, Li YH, Huang YX, Ding J, Gong WD, Zhao Y. Effect of vector-expressed siRNA on HBV replication in hepatoblastoma cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1898-1901

电编 李琪 编辑 张海宁

# 甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达

王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山

王巧侠, 兰州大学临床医学院 甘肃省兰州市 730000  
成军, 郭江, 魏红山, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011  
李文凡, 甘肃省人民医院消化科 甘肃省兰州市 730000  
王巧侠, 女, 1975-03-29生, 陕西省西安市人, 汉族, 住院医师, 兰州大学2003级传染病学硕士研究生, 主要从事慢性肝脏疾病发病机制的研究。  
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689  
军队九五科技攻关项目, No. 98D063  
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038  
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138  
军队十五科技攻关面上项目, No. 01MB135  
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. cj@genetherapy.com.cn  
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540  
收稿日期: 2005-07-05 接受日期: 2005-07-08

## Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1

Qiao-Xia Wang, Jun Cheng, Jiang Guo, Wen-Fan Li, Hong-Shan Wei

Qiao-Xia Wang, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China  
Jun Cheng, Jiang Guo, Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Diseases, Ditan Hospital, Beijing 100011, China  
Wen-Fan Li, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, Gansu Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation, No. C03011402, No. C30070689; Returned Scholarship of General Logistics Department of Chinese PLA, No. 98H038; the Key Technology Research and Development Program of Chinese PLA during the 9<sup>th</sup> Five-Year Plan Period, No. 98D063; the Key Technology Research and Development Program of Chinese PLA for Distinguished Young Scholars during the 10<sup>th</sup> Five-Year Plan Period, No. 01Q138; and the Scientific Research Program of Chinese PLA during the 10<sup>th</sup> Five-Year Plan Period, No. 01MB135  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Anwai Street, Dongcheng District, Institute of Infectious Diseases, 13 Ditan Park, Ditan Hospital, Beijing 100011, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2005-07-05 Accepted: 2005-07-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the regulatory effect of glycyrrhizin on the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expression and to explore its anti-fibrosis mechanism.

**METHODS:** The TIMP-1 promoter was amplified by polymerase chain reaction (PCR), and the product was named TIMP-1P. The TIMP-1P was cloned into pGEM-Teasy vector to obtain pGEM-Teasy-TIMP-1P, and then the product and pCAT3-basic vector were digested by *NheI* and *XhoI* to construct pCAT3-TIMP-1P. Then pCAT3-TIMP-1P was transfected into HepG2 cells and

the cells were treated with 0.1 mmol glycyrrhizin for 48 h. The HepG2 cells transfected with pCAT3-basic were used as negative controls. The expression level of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) in HepG2 cells was detected by enzyme-linked immunoassay (ELISA).

**RESULTS:** The expressive vector pCAT3-TIMP-1P was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The optical density (OD) of the cells transfected with pCAT3-TIMP-1P was significantly higher than that with pCAT3-basic ( $2.329 \pm 0.685$  vs  $0.004 \pm 0.002$ ,  $F = 26.075$ ,  $P < 0.05$ ). After treatment with glycyrrhizin, the expression of CAT in the HepG2 cells transfected with pCAT3-TIMP-1P was notably decreased as compared with that in the same cells without glycyrrhizin treatment ( $OD: 0.268 \pm 0.009$  vs  $0.490 \pm 0.153$ ,  $F = 35.775$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Glycyrrhizin can down-regulate the activity of TIMP-1 gene promoter as well as inhibit the expression of TIMP-1.

**Key Words:** Glycyrrhizin; Tissue inhibitor of metalloproteinases-1; Anti-fibrosis

Wang QX, Cheng J, Guo J, Li WF, Wei HS. Glycyrrhizin down-regulates expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Shijie Huaren Xiaohuan Zazhi* 2005;13(18):2183-2187

## 摘要

**目的:** 了解甘草甜素对基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因启动子活性的调节作用, 探讨甘草甜素的抗纤维化机制。

**方法:** 应用聚合酶链反应 (PCR) 扩增基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因启动子, 命名为TIMP-1P, 以T-A克隆法, 将TIMP-1P基因片段连入载体pGEM-Teasy。将获得的质粒pGEMTeasy-TIMP-1P, 与报告质粒pCAT3-basic分别用*NheI*和*XhoI*双酶切后构建TIMP-1启动子报告基因表达载体pCAT3-TIMP-1P, 以重组表达质粒pCAT3-TIMP-1P瞬时转染HepG2细胞, 4 h后以0.1 mmol甘草甜素刺激, 48 h后收获细胞。同时以转染pCAT3-basic的HepG2细胞

为阴性对照, 每组设复孔对照, 用酶联免疫吸附法(ELISA)检测标本在415 nm波长的吸光度值, 其数值反映细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达水平.

**结果:** 构建的报告基因表达载体pCAT3-TIMP-1P经过序列分析和酶切鉴定正确. 瞬时转染HepG2细胞后, pCAT3-basic的吸光度值为 $0.004 \pm 0.002$ , pCAT3-TIMP-1P为 $2.329 \pm 0.685$ , 经方差分析两者差异有统计学意义( $F = 26.075$ ,  $P < 0.05$ ), pCAT3-TIMP-1在HepG2细胞中能够启动CAT的表达. 转染HepG2细胞的pCAT3-TIMP-1P经0.1 mmol甘草甜素刺激后, 其吸光度值为 $0.268 \pm 0.009$ , 同期未经甘草甜素刺激的pCAT3-TIMP-1P吸光度值为 $0.490 \pm 0.153$ , 方差分析两者差异有统计学意义( $F = 35.775$ ,  $P < 0.05$ ).

**结论:** 甘草甜素可下调TIMP-1启动子的转录活性, 抑制TIMP-1的基因表达.

**关键词:** 甘草甜素; 基质金属蛋白酶组织抑制因子-1; 抗纤维化

王巧侠, 成军, 郭江, 李文凡, 魏红山. 甘草甜素下调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1基因的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2183-2187  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2183.asp>

## 0 引言

甘草甜素(glycyrrhizin, GL)药理作用广泛, 能抑制肝脏炎症反应, 强有力地保护肝细胞膜, 增强肝脏的解毒功能, 减轻肝脏的病理性损害, 提高肝细胞对化学伤害的抵抗力, 促进胆红素代谢, 降低转氨酶, 逆转肝纤维化, 并抑制多种病毒的复制<sup>[1, 2]</sup>. 肝星状细胞的活化和增殖是肝纤维化、肝硬化发病机制的重要环节, 肝星状细胞表达产生的胶原和非胶原糖蛋白在肝脏中沉积, 逐渐发展为肝纤维化、肝硬化<sup>[3-5]</sup>. 另外, 肝脏中的胶原和非胶原糖蛋白的降解速度也是决定肝纤维化发生发展的重要因素<sup>[6, 7]</sup>. 研究表明, 基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)在肝脏中的细胞外基质降解调节过程中具有决定性的意义<sup>[8]</sup>. 临床观察和实验研究已经发现GL具有显著的抗肝纤维化作用<sup>[9-12]</sup>, 但是GL是否是通过调节TIMP-1基因表达的调节达到抗纤维化的目的还不十分清楚. 我们通过观察GL对TIMP-1基因表达的影响, 探讨其抗肝纤维化的作用机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝肿瘤细胞系HepG2细胞及大肠杆菌DH 5 $\alpha$ 菌株为本室保存. Tag DNA聚合酶、T4 DNA连接酶及限制性内切酶均购自Takara公司. 质粒DNA提取试剂盒, 中间载体pGEM-Teasy及报告质粒pCAT3-basic均购自Promega公司; CAT-ELISA检测试剂盒及质粒DNA转染试剂盒购自

Roche公司. 玻璃奶纯化试剂盒购自博大公司, 其它生化试剂购自Sigma公司.

**1.2 方法** 根据文献[13]合成引物, 上游引物P1: 5' -GCT AGC AGA ACC GGT ACC CAT CTC AG-3'. 下游引物P2: 5' -CTC GAG CTG TAC CTC TGG TGT CTC TC-3', 在上下游引物的5' -端分别引入Nhe I和Xho I单一酶切位点, 引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成. 以HepG2细胞基因组DNA为模板, PCR扩增TIMP-1基因启动子800 bp的DNA片段, PCR产物经9 g/L琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 玻璃奶法回收纯化. 以T-A克隆法, 用T4 DNA连接酶将TIMP-1基因片段连入载体pGEM-Teasy, 转化大肠杆菌DH 5 $\alpha$ 感受态细胞, 筛选在选择平皿(Amp, X-gal/IPTG)生长的白色菌落提取质粒, 酶切(Nhe I/Xho I)及DNA测序鉴定, DNA测序由上海华诺生物科技有限公司完成. 将获得的质粒pGEMTeasy-TIMP-1 P 和报告质粒pCAT3-basic分别用Nhe I和Xho I双酶切后用T4 DNA连接酶进行定向连接, 产物转化大肠杆菌DH 5 $\alpha$ 感受态细胞, 筛选抗氨苄青霉素阳性菌落; 碱裂解法提取质粒, 再次双酶切(Nhe I/Xho I)及PCR鉴定正向插入克隆, 命名为pCAT3-TIMP-1P, 磁珠法提取质粒以备转染. HepG2细胞在含100 mL/L小牛血清的DMEM中培养. 于35 mm平皿中生长至50-80%融合时采用脂质体转染法, 转染方法参照FuGENE6 Transfection Reagent说明书进行. pCAT3-TIMP-1P转染剂量为1  $\mu$ g, 设置pCAT3-basic 1  $\mu$ g为阴性对照, pCAT3-control 1  $\mu$ g为阳性对照, 每组设复孔对照. 转染48 h后收获细胞, 收集细胞裂解液, 用于CAT活性检测以验证克隆的DNA片段具有启动子活性. 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至50-80%融合时转染pCAT3-TIMP-1P 1  $\mu$ g, 于转染后4 h换液时加入GL使终浓度为0.1 mmol, 同时以转染pCAT3-Basic的HepG2细胞作阴性对照, 以转染pCAT3-control的HepG2细胞为阳性对照. 转染48 h后, 收集细胞裂解液, 用于CAT表达水平检测. 检测方法按照试剂盒说明书进行. 取1.0  $\mu$ g/L的CAT标准品(试剂盒提供)及细胞裂解液200  $\mu$ L加入已包被抗体的96孔板中, 37 $^{\circ}$ C温育1 h, 再依次加入一抗(地高辛标记的抗-CAT)、二抗(偶联有过氧化物酶的地高辛抗体anti-Dig-Pod)各200  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C温育1 h后, 加入过氧化物酶的底物室温显色10-30 min. 用酶标仪检测标本在415 nm波长的吸光度值, 其数值反映细胞提取物中的CAT表达水平. 以未作转染的细胞裂解液平行实验作空白对照.

**统计学处理** 数据以mean $\pm$ SD表示, 用SPSS11.0统计学软件进行方差分析.

## 2 结果

成功扩增出TIMP-1基因的启动子序列, 经9 g/L琼脂



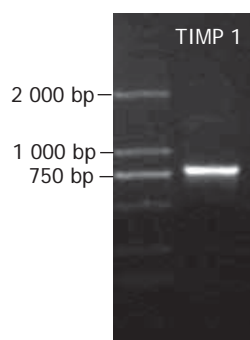


图1 以HepG2基因组DNA为模板, PCR扩增TIMP-1启动子序列

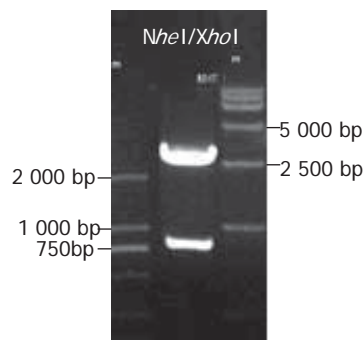


图2 pGEM-Teasy-TIMP-1p双酶切鉴定 (NheI/XhoI)

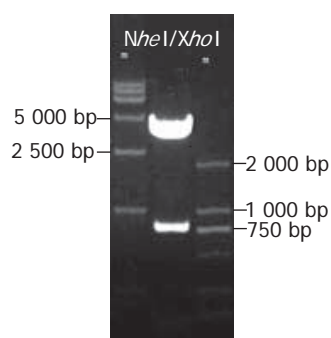


图3 pCAT3-TIMP-1p双酶切鉴定 (NheI/XhoI)

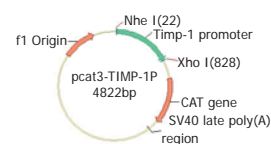


图4 pCAT3-TIMP-1p双酶切鉴定 (NheI/XhoI)

糖凝胶电泳分析显示扩增片段约800 bp, 与预期片段符合(图1). 构建的中间载体pGEM-Teasy-TIMP-1p以NheI/XhoI双酶切鉴定, 9 g/L琼脂糖凝胶电泳分析显示两条带(3015bp的pGEM-Teasy载体和800 bp的TIMP-1启动子DNA片段), 与预期一致(图2). DNA测序证实重组质粒含有800 bp的目的基因, 读码框架正确. 将双酶切产物与pCAT3-basic载体连接, 以NheI/XhoI双酶切鉴定, 9 g/L琼脂糖凝胶电泳分析显示两条带(4022bp的pCAT3-basic载体和800 bp的TIMP-1启动子DNA片段)(图3), 说明重组质粒pCAT3-TIMP-1p构建正确(图4). 将重组质粒pCAT3-TIMP-1p转染HepG2

细胞, CAT ELISA检测吸光度, 空载体对照组pCAT3-Basic的吸光度为 $0.004 \pm 0.002$ , 阳性对照组为pCAT3-control为 $2.029 \pm 0.650$ , pCAT3-TIMP-1p为 $2.329 \pm 0.685$ (图5),  $F = 26.075$  ( $P < 0.05$ ) 差异有统计学意义(表1), 表明pCAT3-TIMP-1p具有很强的启动子活性. 以GL刺激转染了pCAT3-TIMP-1p的HepG2细胞, 当pCAT3-TIMP-1p单独转染时, 其吸光度值为 $0.490 \pm 0.153$ , 加入 $0.1 \text{ mmol/L}$  GL刺激后吸光度值为 $0.268 \pm 0.009$ , 空载体对照组pCAT3-basic的吸光度值为 $0.003 \pm 0.002$ , GL刺激转染pCAT3-TIMP-1p的CAT吸光度值表达明显降低,  $F = 35.775$  ( $P < 0.05$ ) 差异有统计学意义

表1 质粒转染HepG2的CAT吸光度值

组别	$A_{415 \text{ nm}}$
pCAT3-basic	$0.004 \pm 0.002$
pCAT3-control	$2.029 \pm 0.650^a$
pCAT3-TIMP-1p	$2.329 \pm 0.685^a$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,  $F = 26.075$  vs pCAT3-basic.

表2 GL刺激pCAT3-TIMP-1p的CAT吸光度值

组别	$A_{415 \text{ nm}}$
pCAT3-basic	$0.003 \pm 0.002$
pCAT3-control	$1.058 \pm 0.313^a$
pCAT3-TIMP-1p	$0.490 \pm 0.153^a$
GL + pCAT3-TIMP-1p	$0.268 \pm 0.009^b$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs pCAT3-basic; <sup>b</sup> $P < 0.05$ ,  $F = 35.775$  vs pCAT3-TIMP-1p.

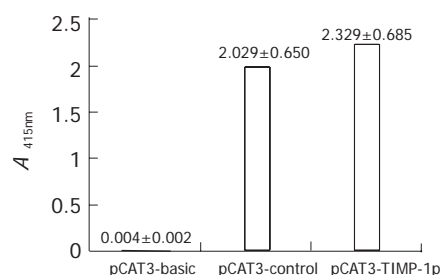


图5 pCAT3-TIMP-1p转染HepG2细胞 CAT表达.

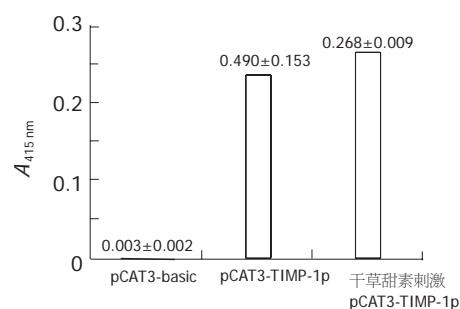


图6 甘草甜素刺激pCAT3-TIMP-1p后CAT表达.

(表2),说明GL对TIMP-1p基因启动子有下调作用(图6)。

### 3 讨论

正常情况下,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成与降解通过基质金属蛋白酶(MMP)及其抑制剂(TIM P)的相互作用而维持一个平衡的状态,并得到十分精确的调控<sup>[14, 15]</sup>。在各种病因造成的肝损伤过程中,ECM合成与降解之间的平衡被打破,以胶原为主的ECM各成分过多沉积在肝内引起纤维化,如果进一步发展造成肝小叶重建,假小叶和结节形成,则进入肝硬化<sup>[16]</sup>。许多实验研究表明,在肝损伤早期,MMP一度升高,但随着肝纤维化及肝硬化的发展,TIMP活性持续增高,抑制了MMP的活性,因而学者们认为TIMP是肝纤维化发生过程中的一个非常重要的促发因素<sup>[17-19]</sup>。TIMP是一组抑制基质金属蛋白酶活性的多功能因子家族,目前已发现TIMP1, 2, 3, 4 四个成员,TIMP-1是调节肝内ECM沉积的重要因素,主要通过抑制MMP对ECM的降解使ECM在肝脏内沉积增加,也可通过抑制已活化的星状细胞的凋亡使得星状细胞持续活化,而加剧肝内的ECM形成和堆积,促进了肝硬化的形成<sup>[20-26]</sup>。GL是从中药甘草中提取的有效成分,该药抗纤维化的机制不清楚。近年来有学者发现GL有减少纤维化动物I型胶原含量,抑制培养细胞I, III型前胶原mRNA的表达的作用<sup>[27]</sup>。并且多项研究提示该药可能通过抗细胞毒性作用、免疫调节以及影响多种因子的信号转导而发挥抗肝纤维化作用<sup>[28-31]</sup>。采用基因重组技术构建pCAT3-TIMP-1P报告基因载体,瞬时转染人肝肿瘤细胞系HepG2细胞后以0.1 mmol GL刺激,用酶联免疫吸附法(ELISA)测得下游CAT基因的表达降低,证明GL可下调TIMP-1启动子活性,进而抑制TIMP-1基因的表达。说明人和动物应用GL后,通过对TIMP-1表达的直接抑制从而达到其抗纤维化作用。这些结果为深入了解GL的抗纤维化机制提供了新的理论依据。

### 4 参考文献

- Ohtake N, Nakai Y, Yamamoto M, Sakakibara I, Takeda S, Amagaya S, Aburada M. Separation and isolation methods for analysis of the active principles of Sho-saiko-to (SST) oriental medicine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;812:135-148
- Miyazawa N, Takahashi H, Yoshiike Y, Ogura T, Watanuki Y, Sato M, Kakemizu N, Yamakawa Y, U CH, Goto H, Odagiri S. Effect of glycyrrhizin on anti-tuberculosis drug-induced hepatitis. *Kekkaku* 2003;78:15-19
- 饶慧琪, 魏来. 肝星状细胞的生物学特性及活化调控机制. *世界华人消化杂志* 2005;13:671-674
- 黄瑾, 张锦生. 肝星状细胞活化的启动、维持和调控. *国外医学消化性疾病分册* 2002;22:227-230
- 周俊英, 甄真, 姚树坤. 肝星状细胞凋亡与肝纤维化逆转. *国外医学内科学分册* 2004;31:403-406
- Jia JD. Recent advances in the pathogenesis, diagnosis and treatment of hepatic fibrosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:257-258
- 徐斌, 张振华, 黄祝青. 血清基质金属蛋白酶及其组织抑制因子与肝纤维化. *实用肝脏病杂志* 2004;7:56-58
- 郑伟达, 王小众, 张莉娟, 史美娜, 陈治新, 陈运新, 黄月红. TIMP-1表达在实验性大鼠肝纤维化发病中的作用. *胃肠病学和肝病学杂志* 2004;13:475-478
- Zhang QS, Yuan RH, Zhang J, Tian GY. Targeted glycyrrhetic acid to receptors of hepatic stellate cells for the treatment of rat liver fibrosis: a pilot study. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:512
- Zhang YF, Wang LL, Yin WH. Clinical observation on the anti-liver fibrosis treatment by diammonion glycyrrhizinate injection combined with saliva. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2002;22:538-539
- Kumada H. Long-term treatment of chronic hepatitis C with glycyrrhizin [stronger neo-minophagen C (SNMC)] for preventing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002;62 Suppl 1:94-100
- Chen MH, Chen JC, Tsai CC, Wang WC, Chang DC, Lin CC, Hsieh HY. Sho-saiko-to prevents liver fibrosis induced by bile duct ligation in rats. *Am J Chin Med* 2004;32:195-207
- Lee M, Song SU, Ryu JK, Suh JK. Sp1-dependent regulation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter. *J Cell Biochem* 2004;91:1260-1268
- Lichtinghagen R, Bahr MJ, Wehmeier M, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Flemming P, Manns MP, Boeker KH. Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2003;105:373-382
- 高春芳. 胶原基因转录调控与纤维化. *世界华人消化杂志* 2005;13:166-171
- 郑伟达, 王小众. 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2004;12:428-431
- 张洁, 陈晓宇, 彭延申, 李继强. 大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝组织MMP-13及TIMP-1表达变化与肝纤维化的关系. *世界华人消化杂志* 2005;13:512-515
- 李保森, 游绍莉, 赵志海, 辛绍杰, 赵景民, 王松山. 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:483-485
- Zhu YK, Wang BE, Shen FJ, Wang AM, Jia JD, Ma H. Dynamic evolution of MMP-13, TIMP-1, type I and III collagen and their interaction in experimental liver fibrosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:612-615
- Herrmann J, Arias M, Van De Leur E, Gressner AM, Weiskirchen R. CSRP2, TIMP-1, and SM22alpha promoter fragments direct hepatic stellate cell-specific transgene expression in vitro, but not in vivo. *Liver Int* 2004;24:69-79
- Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 2002;36:850-860
- Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;277:11069-11076
- Murphy F, Waung J, Collins J, Arthur MJ, Nagase H, Mann D, Benyon RC, Iredale JP. N-Cadherin cleavage during activated hepatic stellate cell apoptosis is inhibited by tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Comp Hepatol* 2004;14;3 Suppl 1:S8
- 聂青和, 谢玉梅, 周永兴, 程勇前, 罗红, 罗新栋. 正常及实验性肝纤维化大鼠肝脏中的金属蛋白酶组织抑制因子-1. *世界华人消化杂志* 2003;11:204-208
- Flisiak R, Maxwell P, Prokopowicz D, Timms PM, Panasiuk A. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and transforming growth factor beta 1-possible non-invasive biomarkers of hepatic fibrosis in patients with chronic B and C hepatitis. *Hepatology* 2002;49:1369-1372

- 26 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:86-90
- 27 Zhang Q, Wang J, Hu M. Effects of glycyrrhelic acid and IFN- $\alpha$  on HSCs collagen metabolism in rat fibrotic liver of varying stages. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2002;10:72-73
- 28 Kinjo J, Hirakawa T, Tsuchihashi R, Nagao T, Okawa M, No-hara T, Okabe H. Hepatoprotective Constituents in Plants 14. Effects of Soyasapogenol B, Sophoradiol, and Their Glucuronides on the Cytotoxicity of tert-Butyl Hydroperoxide to HepG2 Cells. *Biol Pharm Bull* 2003;26:1357-1360
- 29 Cai Y, Shen XZ, Wang JY. Effects of glycyrrhizin on genes expression during the process of liver fibrosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003;83:1122-1125
- 30 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军, 纪冬, 王春花, 党晓燕, 徐志强. 应用基因表达谱芯片技术克隆甘草甜素诱导Jurkat细胞后的差异表达基因. *世界华人消化杂志* 2004;12:70-73
- 31 王建军, 李宝伟, 成军, 刘妍, 徐志强, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 王春花. 表达谱基因芯片技术研究甘草甜素上调白细胞介素-18基因的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12:855-858

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

## •消息•

### 2006 年第 5 届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知

**本刊讯** 为了加快国内肝病学术交流、促进我国肝病学科的发展,由中华医学会肝病学会、中华肝脏病杂志编辑委员会主办的“第 5 届全国肝脏疾病学术研讨会”定于 2006-05 在辽宁省大连市召开。届时国内知名肝病专家将就国内外肝病研究的进展及热点问题继续进行继续教育讲座,并授予参会代表国家级继续教育 I 类学分。现将征文通知公布如下:

#### 1 征文内容

(1) 病毒性肝炎发病机制的研究进展;(2) 病毒性肝炎的治疗策略;(3) 乙型病毒性肝炎的长期治疗;(4) 丙型肝炎的抗病毒治疗;(5) 肝纤维化发病机制研究进展;(6) 肝纤维化的防治;(7) 肝硬化的规范化治疗;(8) 肝细胞癌的病因学研究进展;(9) 肝癌的发病机制研究进展;(10) 肝癌的早期诊断;(11) 肝癌的手术治疗及方案选择;(12) 肝癌的非手术治疗;(13) 肝癌的生物治疗;(14) 自身免疫性肝病的发病机制;(15) 自身免疫性肝病的诊断和治疗;(16) 肝移植后肝炎复发的诊断预防和治疗;(17) 生物人工肝的应用及进展;(18) 小儿自身免疫性肝病;(19) 肝肾综合征;(20) 肝功能衰竭;(21) 肝干细胞的研究进展及临床应用;(22) 脂肪肝及酒精性肝病;(23) 非酒精性脂肪性肝病。

#### 2 征稿要求

参加会议论文要求全文(中文)及 500 字(词)左右中文摘要各一份,应包括目的、材料与方法、结果、讨论,并写清单位、作者姓名及邮编(请自留底稿,恕不退稿)。凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文,不再受理。

#### 3 论文寄送地址

400010, 重庆市渝中区临江路 74 号, 中华肝脏病杂志编辑部收。请在信封左下角注明“会议征文”。欢迎用软盘和电子邮件方式投稿。电子邮件地址: zhgz@vip.163.com。征文截稿日期: 2006-02-28(以邮戳为准)。



# 改良聚合酶链反应检测 HBV 共价闭环环状 DNA

汤 勃, 王宇明, 刘 俊, 张 瑞

汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038

汤勃, 男, 1973-04-16生, 安徽省宣城市人, 汉族, 2003年第三军医大学博士, 主治医师, 主要从事肝炎病毒分子生物学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30230320

通讯作者: 汤勃, 400038, 重庆市沙坪坝区西南医院感染科。

botang@mail.tmmu.com.cn

电话: 023-65461189-8044

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-07-28

## Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction

Bo Tang, Yu-Ming Wang, Jun Liu, Rui Zhang

Bo Tang, Yu-Ming Wang, Jun Liu, Rui Zhang, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30230320

Correspondence to: Bo Tang, Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, 400038, Chongqing, China. tobei@163.com

Received: 2005-07-19 Accepted: 2005-07-28

## Abstract

**AIM:** To establish a simple and fast hepatitis B virus covalently closed circular DNA(cccDNA) detecting method based on polymerase chain reaction(PCR) with satisfactory sensitivity and specificity.

**METHODS:** The cccDNA and the relaxed circular DNA (rcDNA) were extracted from HepG2.2.15 cells and supernatant, respectively, and then purified. Two pairs of specific PCR primes were designed to cover the single strand area of rcDNA. And two pairs of non-specific PCR primes were designed to cover the double strand area of rcDNA. Before and after digested by single-strand-specific mung bean nuclease(MBN), cccDNA and rcDNA samples were amplified by specific primes and non-specific primes. Whether the digested cccDNA can be amplified by specific primes, without amplifying the digested rcDNA, was observed. The PCR parameters such as substrate amount and circulation times were changed during amplification. The HBV genome plasmid was used as control; and the HBV samples from patient with hepatitis B was used for practical test.

**RESULTS:** Different amounts of rcDNA template were

amplified by specific and non-specific primes. More than  $10^4$  and  $10^2$  rcDNA template molecules were amplified by two pairs of specific and non-specific primes, respectively. The specific primes could not discriminate between rcDNA and cccDNA when the template molecules were overabundant. Before and after the digestion by MBN, different amounts of cccDNA were amplified by specific and non-specific primes; and after the digestion, rcDNA templates were amplified by non-specific primes, but not by specific primes. With this strategy, we found the virus samples from the serum of the patient with chronic hepatitis B contained mainly rcDNA and a small quantity of cccDNA, while the samples from hepatocytes contained mainly cccDNA.

**CONCLUSION:** The combination of MBN selective digestion and specific PCR amplification of the cccDNA is a simple, fast, sensitive and specific method for the detection of HBV cccDNA.

**Key Words:** Hepatitis B virus; Covalently closed circular DNA; Polymerase chain reaction; Mung bean nuclease

Tang B, Wang YM, Liu J, Zhang R. Detection of hepatitis B virus cccDNA with modified polymerase chain reaction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2188-2192

## 摘要

**目的:** 建立一种基于聚合酶链反应(PCR) 的简便快速、具有较高敏感性和特异性的检测乙型肝炎病毒(HBV)共价闭环环状DNA(cccDNA)的方法。

**方法:** 分别提取HepG2.2.15细胞内的cccDNA及培养上清中的松弛环DNA(rcDNA)样品, 试剂盒纯化; 设计2对特异性引物, 其扩增区域跨越rcDNA单链区; 设计2对非特异性引物, 扩增区域位于rcDNA双链区。经单链特异性绿豆芽核酸酶(MBN)分别消化cccDNA及rcDNA样品; 以特异性引物和非特异性引物对消化前后的两种样品分别进行PCR扩增, 并改变PCR扩增参数如底物数量、循环次数等, 观察特异性引物能否顺利扩增消化后的cccDNA, 同时又不扩增消化后的rcDNA。HBV基因组质粒样品作为对照。此外还采用实际乙型肝炎患者体内病毒样本检验此策略的实用性。

**结果:** 分别以非特异性引物和特异性引物扩增不同模

板数的HBV rcDNA样品, 2对非特异性引物可扩增出模板数在 $10^2$ 以上的HBV rcDNA样品, 2对cccDNA特异性引物也可以扩增出模板数在 $10^4$ 以上的样品. 特异性引物在PCR反应模板数较多时将不能区分消化前的rcDNA和cccDNA. 不同数量HBV cccDNA和rcDNA模板在MBN消化前后, 分别应用非特异性引物和特异性引物进行PCR扩增, 发现不同数量的cccDNA模板分子经过MBN消化后, 仍可用特异性引物和非特异性引物扩增出相应条带; rcDNA样品经过MBN消化后, 非特异性引物可扩增出产物条带, 而特异性引物无法扩增出条带. 采用此种策略, 我们发现慢性乙型肝炎血清HBV核酸样品主要成份为rcDNA, 并带有少量cccDNA, 而肝细胞内HBV核酸样品富含cccDNA, 与实际情况一致.

**结论:** 联合应用MBN选择性消化和cccDNA特异性引物的PCR检测法简便快速, 敏感性和特异性均较满意.

**关键词:** 肝炎病毒, 乙型; 共价闭合环状DNA; 聚合酶链反应; 绿豆芽核酸酶

汤勃, 王宇明, 刘俊, 张瑞. 改良聚合酶链反应检测HBV共价闭合环状DNA. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2188-2192  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2188.asp>

## 0 引言

HBV感染肝细胞的标志是HBV复制中间体, 包括共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)、单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA)以及HBV mRNA<sup>[1]</sup>. 通常cccDNA检测方法为Southern印迹杂交, 步骤繁琐, 检测周期长达3-4 d; 放射性标记探针可能造成环境污染和健康损伤, 而非放射性标记探针敏感性又较差. 因此1996年Kock *et al*<sup>[2]</sup>设计特异性引物, 以PCR方法检测cccDNA取得成功, 并被广泛应用<sup>[3-5]</sup>. 然而, 正如作者所提到的那样, 这种方法在PCR反应模板较多的情况下, 其特异性难以保证. 绿豆芽核酸酶(mung bean nuclease, MBN; 也称曲霉核酸酶S1)以内切酶形式非特异性地降解核酸为核苷酸<sup>[6]</sup>, 其中对于单链核酸的水解活性较双链核酸高30 000倍. 因此在合适的浓度和时间下, MBN可以切断HBV rcDNA而同时保持cccDNA的完整性. 根据上述原理, 我们改良了Kock *et al*的方法, 加入了MBN消化步骤, 提高了PCR反应的特异性.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** PCR试剂盒、绿豆芽核酸酶为美国Promega公司产品; 荧光定量PCR仪为德国Roche LightCycler, HBV核酸定量检测试剂盒为深圳匹基公司产品; 病毒核酸提取试剂盒、PCR产物纯化试剂盒为美国

Clontech公司产品; 肝细胞分离系列试剂为美国Gibco公司产品. HBV全基因组质粒为全军感染病研究所自行构建. HepG2. 2. 15细胞为第三军医大学免疫教研室提供, 乙型肝炎患者肝组织来源于肝移植受体肝脏, 由第三军医大学第一附属医院肝胆外科提供.

**1.2 方法**<sup>[7-9]</sup> 以胰酶消化培养HepG2.2.15细胞10 min, 收集细胞, 200 r/min离心3 min, 弃上清. PBS重悬, 彻底洗涤6次. Hirt法提取染色体外DNA: 加入细胞裂解液[5 g/L SDS, 10 mmol/L Tris.Cl (pH8.0), 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA] 200  $\mu$ L, 振荡混合30 s, 37℃水浴过夜, 加入5 mol/L NaCl(终浓度1 mol/L) 50  $\mu$ L, 4℃静置12 h, 28 000 g、4℃离心50 min, 弃沉淀(含细胞染色体), 以PCR产物纯化试剂盒从上清中浓缩HBV cccDNA, 按试剂盒说明书进行, 核酸样品溶解于去离子水100  $\mu$ L. 以荧光定量PCR法检测样品5  $\mu$ L, 计算出HBV核酸样品总拷贝数. 在50 mL高速离心管中加入300 g/L蔗糖溶液25 mL; 收集HepG2. 2. 15细胞培养上清, 0.22  $\mu$ m过滤去除死亡细胞及残片, 取过滤液15 mL缓慢加在蔗糖溶液垫上, 230 000 g、4℃离心18 h, 弃上清, DNA酶I(DNase I)反应缓冲液200  $\mu$ L溶解沉淀, 加入DNase I 10U消化60 min(完全降解死亡细胞释出的cccDNA), 以病毒核酸提取试剂盒提取HBV颗粒内部未被消化的rcDNA, 按试剂盒说明书进行, 核酸样品溶解于去离子水100  $\mu$ L中. 以荧光定量PCR法检测样品5  $\mu$ L, 计算出HBV核酸样品总拷贝数. 收集1位慢性乙型肝炎患者血清, 荧光定量PCR法确定含有高拷贝数的HBV DNA后, 使用病毒核酸提取试剂盒提取HBV核酸, 按试剂盒说明书进行, 核酸样品溶解于去离子水100  $\mu$ L中; 肝细胞内HBV核酸样品: 以两步灌流法从肝移植后受体肝组织(约1 g)中分离肝细胞, PBS重悬, 彻底洗涤6次, 此后步骤同HBV cccDNA样品制备. HBV基因组从第1821核苷酸位截断后插入质粒, 常规提取纯化, 溶解于去离子水100  $\mu$ L中. 以荧光定量PCR法检测样品5  $\mu$ L, 计算出HBV核酸样品总拷贝数. 取10 $\times$ 缓冲液1  $\mu$ L, 分别加入数量不等的HBV核酸模板及0.5U MBN, 去离子水补足体积至10  $\mu$ L, 置于PCR仪内37℃孵育5 min, 立即置于冰水浴中, 加入1 mol/L Tris(pH8.0)2  $\mu$ L中止反应. 所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成, PAGE纯化. cccDNA特异性引物包括2对引物: CCC1A(正链引物)5'-CCTCTGCGGATCCATCTGCGGAAC-3' (1255-1279, 25 bp), CCC1B(负链引物)5'-CTGCGAGGCGAGGGAGTTCTTCTTC-3' (2376-2400, 25 bp); 反应条件为95℃ 40 s, 72℃ 3 min, 35个循环, 72℃延伸5 min. CCC2A(正链引物)5'-CTGAATCCCGCGGACGACCC-3' (1441-1460, 21 bp), CCC2B(负链引物)5'-ACCCAAGGCACAGCTTGAGG-3'

(1867-1889, 23 bp); 反应条件为95℃ 40 s, 67℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35个循环, 72℃延伸5 min. HBV DNA非特异性引物包括2对引物: RC1A(正链引物)5' -TGTGTCTGCGGCGTTTATC-3' (378-397, 20 bp), RC1B(负链引物)5' -GTTTAAATGTATACCCAGAGAC-3' (816-837, 22 bp); 反应条件为95℃ 45 s, 54℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35个循环, 72℃延伸5 min; RC2A(正链引物)5' -ACTGTTCAAGCCTCCAAGCT-3' (1859-1878, 20 bp), RC2B(负链引物)5' -AGTGCGAATCCACACTC-3' (2268-2284, 17 bp), 反应条件为95℃ 45 s, 51℃ 40 s, 72℃ 1 min, 35个循环, 72℃延伸5 min. 2对cccDNA特异性引物跨越HBV基因组(rcDNA)单链区和3链区(这两区均对MBN的消化作用敏感), 如果被切开, 则特异性引物将不能扩增此种线性模板; 2对非特异性引物则分别处于P区和前C/C区, 无论完整的cccDNA、rcDNA或是被切开的rcDNA均可顺利扩增. 各引物位置及MBN作用位点见图1 A, B.

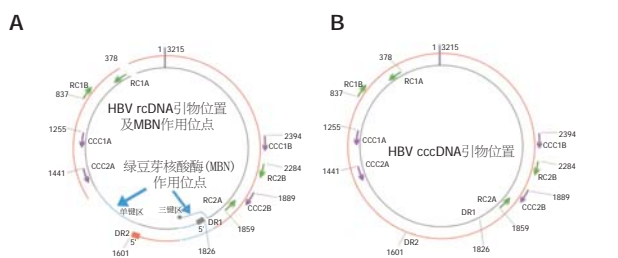


图1 HBV rcDNA、cccDNA、引物位置及MBN作用位点. A: HBV rcDNA正链为不完整外环, 负链为完整内环 B: HBV cccDNA内外环均完整, 无MBN作用位点. MBN切割位点单链区和三链区以粗箭头和虚线表示; cccDNA特异性引物为单箭头, CCC1A/CCC1B和CCC2A/CCC2B分别为2对引物; 非特异性引物为双箭头, RC1A/RC1B和RC2A/RC2B分别为2对引物. DR1: 直接重复序列1; DR2: 直接重复序列2.

## 2 结果

2对非特异性引物可扩增出模板数在 $10^2$ 以上的HBV rcDNA样品(图2); 而对于同样的rcDNA模板, 2对cccDNA特异性引物也可以扩增出模板数在 $10^4$ 以上的样品(图3). 由此可知, 特异性引物的“特异性”是相对的, 在PCR反应模板数较多时将不能区分rcDNA和

cccDNA. 此结果和Kock *et al*的一致. HBV全基因组质粒是在第1 821核苷酸位切开后插入质粒, 因此P区引物RC1A/RC1B可以扩增出模板数在 $10^2$ 以上的样品, 而2对特异性引物在任何模板数下均不能扩增出目标条带(图2, 3). 不同数量HBV cccDNA和rcDNA模板在MBN消化前后, 分别应用非特异性引物RC1A/RC1B和特异性引物CCC1A/CCC1B进行PCR扩增, 从 $10^5$ - $10^2$ 不同数量的cccDNA模板分子经过MBN消化后, 仍可用特异性引物CCC1A/CCC1B和非特异性引物RC1A/RC1B扩增出相应条带, 惟亮度较未经消化的模板有不同程度的降低, 表明过量的MBN降解了部分cccDNA分子. 见图4垂直虚线左半部分. 而rcDNA样品经过MBN消化后, 如果模板数 $>10^3$ , 则非特异性引物RC1A / RC1B可扩增出产物条带, 亮度较未经消化的模板为低; 对于cccDNA特异性引物CCC1A/CCC1B, 模板数即使为 $10^5$ , 经MBN消化后亦无法扩增任何相应条带. 见图4垂直虚线右半部分.

将血清和肝细胞内HBV核酸样品分别按1:1, 1:10, 1:100去离子水稀释, 各取5  $\mu$ L进行MBN消化和PCR扩增. 血清HBV核酸样品不稀释时, MBN消化前后均可扩增出cccDNA特异性条带; 10倍稀释样品消化前可见条带, 消化后无特异性条带; 100倍稀释样品无论是否消化, 均不能扩增出相应条带. 提示血清HBV核酸样品主要成份为rcDNA, 并带有少量cccDNA. 而富含cccDNA的肝细胞内HBV核酸样品即使在100倍稀释后, MBN消化也未能完全阻止PCR阳性条带的出现.

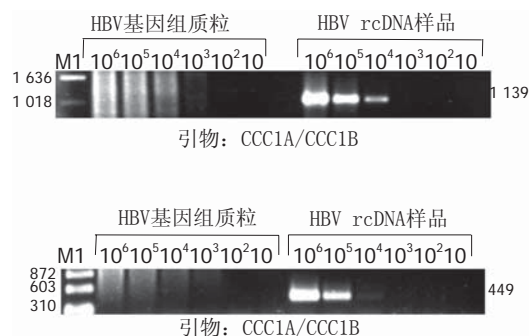


图3 特异性引物CCC1A/CCC1B和CCC2A/CCC2B分别扩增不同数量的HBV rcDNA及HBV基因组质粒模板电泳图. M1: 1kb DNA ladder; M2:  $\Phi$ X174 DNA/HAE III相对分子质量标准;  $10^6$ - $10^1$ : PCR体系中分别加入 $10^6$ - $10^1$ 个模板分子板分子.

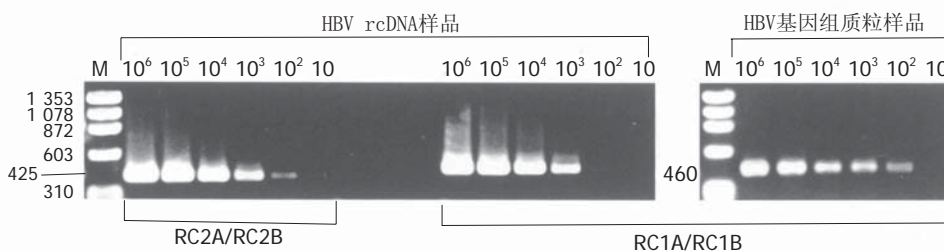


图2 非特异性引物RC2A/RC2B和RC1A/RC1B分别扩增不同数量的HBV rcDNA及HBV基因组质粒模板电泳图. M:  $\Phi$ X174 DNA/Hae III相对分子质量标准;  $10^6$ - $10^1$ : PCR体系中分别加入 $10^6$ - $10^1$ 个模板分子.



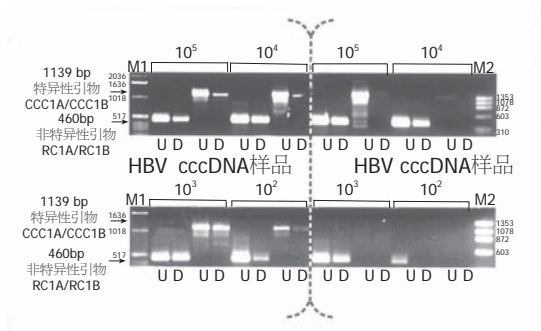


图4 不同数量HBV cccDNA和rcDNA模板经MBN消化后以非特异性引物RC1A/RC1B和特异性引物CCC1A/CCC1B进行PCR扩增后电泳图. 垂直黑色虚线左半部分为HBV cccDNA模板样品, 数量为 $10^5$ – $10^2$ ; 垂直黑色虚线右半部分为HBV rcDNA模板样品, 数量为 $10^5$ – $10^2$ . M1: 1kb DNA ladder; M2:  $\Phi$ X174 DNA/HAE III相对分子质量标准; U: 未经MBN消化的样品; D: 经过MBN消化的样品.

### 3 讨论

HBV入侵靶细胞后, 其病毒复制周期的第一步即为松弛环型基因组(rcDNA)转变为共价闭合环状形式(cccDNA), 然后以此为模板转录出数种HBV mRNA<sup>[10]</sup>. 同时cccDNA继续在细胞核内累积, 形成一个稳定的cccDNA池. cccDNA的存在和数量不仅是HBV感染靶细胞的特征性标志, 也是抗HBV药物疗效的重要指标<sup>[11–16]</sup>. 近年来国内外研究者试图以PCR法代替传统Southern杂交检测cccDNA, 主要原理均为利用rcDNA为不完整双环, 设计跨越单链区和三链区的引物而达到只扩增完整cccDNA的目的<sup>[17–20]</sup>(图1). 然而, 正如Kock *et al*和我们的实验结果表明的那样, 单纯使用此种引物, 在PCR模板数量超过 $10^4$ 时, 其扩增的选择性即不存在(图2, 3), 主要原因可能是负链引物引导的新生链有时能够克服三链区及末端蛋白的阻碍而继续延伸<sup>[2]</sup>. 故若能切断rcDNA的单链区而保持cccDNA的完整, 则可以保证特异性引物选择性扩增的可靠性<sup>[21, 22]</sup>.

MBN是单链核酸水解酶, 可利用MBN切断HBV rcDNA单链区和(或)三链区, 使rcDNA线性化, 从而不能被跨越此区域的特异性引物所扩增. 相反, cccDNA则可以抵抗MBN的消化而保持完整双环, 继续作为PCR模板而被选择性扩增. 实验中我们发现,  $10^5$ 个rcDNA分子经MBN处理后, 特异性引物不能扩增任何产物. 本科室构建的HBV基因组质粒是在HBV基因组第1821位核苷酸切开后单拷贝插入质粒, 因此理论上同样不能被cccDNA特异性引物扩增出相应条带, 图3显示的实验结果表明的确如此. 而另一方面, 低至100个cccDNA分子则因抵抗了MBN消化, 得以通过特异性引物扩增(图4).

一般认为, 慢性乙型肝炎患者血清内HBV核酸主要为Dane颗粒中的rcDNA, 同时可能包含少量由于肝细胞坏死释放的cccDNA; 而乙型肝炎患者肝细胞内的HBV核酸主要为cccDNA<sup>[23–25]</sup>, 我们提取这两种来源的核酸, 系列稀释后进行MBN消化前后的特异性引物PCR扩增, 验证本方法的临床实用性<sup>[26, 27]</sup>. 结果表

明, 不加稀释的血清HBV核酸样品经消化、PCR扩增后可见cccDNA条带, 同样处理的10倍或者100倍稀释样品后则不可见cccDNA条带. 相反, 肝细胞内来源的HBV核酸即使稀释100倍, 仍可以抵抗MBN消化而出现cccDNA特异性条带. 这一结果符合理论预测和临床实际<sup>[28]</sup>. 实验所用的HBV rcDNA和cccDNA样品分别提取自HepG2. 2. 15细胞株培养上清和细胞内. rcDNA样品提取过程中, 先过滤、纯化HBV Dane颗粒, 再以过量的DNase I完全降解Dane颗粒外可能存在的DNA, 最后提取Dane颗粒内的HBV基因组核酸应为较纯净的rcDNA<sup>[27]</sup>. cccDNA样品的纯净则得益于如下措施: 胰酶化促使黏附于细胞表面的HBV颗粒脱离; PBS洗涤6次; 裂解细胞时没有按常规加入蛋白酶K, 使rcDNA保持在核衣壳内而没有随细胞染色体外HBV cccDNA一道被提取. MBN消化反应条件的优化极为重要. 虽然MBN对于单链核酸的活性较双链核酸高约30 000倍, 若酶的浓度 $>14$  MU/g模板DNA, MBN同样可以在双链DNA上造成缺口并降解. 用于MBN消化的HBV核酸分子均为pg数量级(1 pg HBV核酸 $\approx 10^5$ 个HBV基因组分子)<sup>[17, 29, 30]</sup>, 因此即使每次消化反应使用0.5 U的MBN也是绝对过量的, 正如实验中所看到的那样, 各种数量的样品经MBN消化后, 所有引物扩增的PCR条带亮度均有不同程度的降低, 提示模板数量减少. 我们经过多次实验, 确定 $10 \mu\text{L}$ 消化体系内加入0.5 U酶、孵育5 min后立即中止反应可以避免cccDNA分子的完全降解.

总之, 我们改良的这种HBV cccDNA PCR检测法简便易行, 从样品提取到获得电泳照片只需6 h, 同时联合了PCR法的敏感性和MBN消化的选择性, 敏感性和特异性均较好. 主要缺点在于各公司出品的MBN之间不完全一致, MBN消化不当所致的假阴性率和PCR反应的假阳性率较高, 需要预先优化反应条件. 若用我们已反复优化的方法, 可望获得较满意效果.

### 4 参考文献

- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51–68
- Kock J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. *Hepatology* 1996;23:405–413
- Kock J, Baumert TF, Delaney WE, Blum HE, von, Weizsacker F. Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes. *Hepatology* 2003;38:1410–1418
- Pancholi P, Lee DH, Liu Q, Tackney C, Taylor P, Perkus M, Andrus L, Brotman B, Prince, A. M. DNA prime/canarypox boost-based immunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in a chimpanzee. *Hepatology* 2001;33:448–454
- De, Meyer S, Gong ZJ, Hertogs K, Depla E, van Pelt, J. F, Roskams T, Maertens G, Yap SH. Influence of the administration of human annexin V on in vitro binding of small hepatitis B surface antigen to human and to rat hepatocytes and on in vitro hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2000;7:104–114
- de Castro, C. S, Souza de JR, Junior CB. The binding of zinc (II)

- to a double-stranded oligodeoxyribonucleotide. A voltammetric study. *Biophys Chem* 2004;112:59-67
- 7 Sells MA, Zelent AZ, Shvartsman M, Acs G. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J Virol* 1988;62:2836-2844
- 8 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:1005-1009
- 9 Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 1967;26:365-369
- 10 Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004;106:199-209
- 11 Hewlett G, Hallenberger S, Rubsamen-Waigmann H. Antivirals against DNA viruses (hepatitis B and the herpes viruses). *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:453-464
- 12 Sung JJ, Wong ML, Bowden S, Liew CT, Hui AY, Wong VW, Leung NW, Locarnini S, Chan HL. Intrahepatic hepatitis B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy. *Gastroenterology* 2005;128:1890-1897
- 13 Maynard M, Parvaz P, Durantel S, Chevallier M, Chevallier P, Lot M, Trepo C, Zoulim F. Sustained HBs seroconversion during lamivudine and adefovir dipivoxil combination therapy for lamivudine failure. *J Hepatol* 2005;42:279-281
- 14 Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, Trepo C, Marcellin P, Goodman Z, Delaney WE, Xiong S, Brosgart CL, Chen SS, Gibbs CS, Zoulim F. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004;126:1750-1758
- 15 Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. 2004;10:82-85
- 16 Zoulim F, Berthillon P, Guerhier FL, Seigneres B, Germon S, Pichoud C, Cheng YC, Trepo C. Animal models for the study of HBV infection and the evaluation of new anti-HBV strategies. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17 Suppl:S460-S463
- 17 Bowden S, Jackson K, Littlejohn M, Locarnini S. Quantification of HBV covalently closed circular DNA from liver tissue by real-time PCR. *Methods Mol Med* 2004;95:41-50
- 18 Liu MC, Yu M, Zhang NL, Gong WB, Wang Y, Piao WH, Wang QH, Wang GQ. Dynamic analysis of hepatitis B virus DNA and its antigens in 2.2.15 cells. *J Viral Hepat* 2004;11:124-129
- 19 Zhang YY, Zhang BH, Theele D, Litwin S, Toll E, Summers J. Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12372-12377
- 20 Jun-Bin S, Zhi C, Wei-Qin N, Jun FA. quantitative method to detect HBV cccDNA by chimeric primer and real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2003;112:45-52
- 21 He ML, Wu J, Chen Y, Lin MC, Lau GK, Kung HF. A new and sensitive method for the quantification of HBV cccDNA by real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:1102-1107
- 22 Addison WR, Wong WW, Fischer KP, Tyrrell DL. A quantitative competitive PCR assay for the covalently closed circular form of the duck hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2000;48:27-37
- 23 Ling R, and Harrison TJ. Production of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in transfected cells is independent of surface antigen synthesis. *J Gen Virol* 1997;78:1463-1467
- 24 Leung N. Treatment of chronic hepatitis B: case selection and duration of therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:409-414
- 25 Thermet A, Rollier C, Zoulim F, Trepo C, Cova L. Progress in DNA vaccine for prophylaxis and therapy of hepatitis B. *Vaccine* 2003;21:659-662
- 26 Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Tse E, Ng IO, Yuan HJ, Siu, C.W, Sander TJ, Bourne EJ, Hall JG, Condreay LD, Lai CL. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology* 2004;39:1694-1701
- 27 Wieland SF, Spangenberg HC, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2129-2134
- 28 Spangenberg HC, Thimme R, Blum HE. Tracking cccDNA in chronic HBV infection. *Hepatology* 2004;39:1736-1738
- 29 Wong DK, Yuen MF, Yuan H, Sum SS, Hui CK, Hall J, Lai CL. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 2004;40:727-737
- 30 Yuen MF, Wong DK, Sum SS, Yuan HJ, Yuen JC, Chan AO, Wong BC, Lai CL. Effect of lamivudine therapy on the serum covalently closed-circular (ccc) DNA of chronic hepatitis B infection. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1099-1103

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 肝癌细胞BEL7402中神经元特异性烯醇化酶的表达

朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽

朱爱萍, 山西医科大学第二医院检验科, 山西省太原市 030001  
张青云, 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所免疫研究室  
北京肿瘤医院检验科 北京市 100036  
王雅明, 徐建军, 孙丽, 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所免疫研究室 北京市 100036  
朱爱萍, 女, 1965-01-01生, 山西省太原市人, 汉族, 2004年山西医科大学免疫学硕士生, 副主任医师, 主要从事肿瘤相关酶类的研究。  
北京市肿瘤分子生物学高技术实验室基金资助项目, No. 953850500  
国家重点基础研究发展计划(973), No. 2004CB518708分题  
通讯作者: 张青云, 100036, 北京市, 北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院检验科, 北京市肿瘤防治研究所免疫研究室. qingyuzhang@btamail.net.cn  
电话: 010-88115736  
收稿日期: 2005-07-28 接受日期: 2005-08-03

## Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402

Ai-Ping Zhu, Qing-Yun Zhang, Ya-Ming Wang, Jian-Jun Xu, Li Sun

Ai-Ping Zhu, Department of Medical Laboratory, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
Qing-Yun Zhang, Department of Medical Laboratory, Beijing Cancer Hospital, Peking University, Beijing 100036, China  
Qing-Yun Zhang, Department of Immunology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100036, China  
Qing-Yun Zhang, Ya-Ming Wang, Jian-Jun Xu, Li Sun, the School of Oncology, Peking University, Beijing 100036, China  
Correspondence to: Dr. Qing-Yun Zhang, Department of Immunology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100036, China. qingyuzhang@btamail.net.cn  
Received: 2005-07-28 Accepted: 2005-08-03

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of neuron-specific enolase(NSE) in hepatocellular cancer cells BEL7402 at the levels of transcription, protein and cells.

**METHODS:** The fragment of NSE gene was amplified from human hepatocellular cancer cell strain BEL7402 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with NSE specific primers. The NSE expression was detected in the BEL7402 cells by Western blot and immunocytochemical (ICC) staining.

**RESULTS:** NSE product with a length of 1 305 bp was obtained by RT-PCR. Western blot confirmed that Mr 50 000 NSE protein was expressed in BEL7402 cells. Positive reaction of BEL7402 with anti-NSE monoclonal antibody was observed by immunocytochemistry. The expression of NSE existed in BEL7402 cells at the levels of transcription, protein and cells.

**CONCLUSION:** The NSE can be expressed and transcribed in hepatocellular carcinoma cells BEL7402.

**Key Words:** Neuron-specific enolase; Hepatocellular carcinoma; BEL7402 cells

Zhu AP, Zhang QY, Wang YM, Xu JJ, Sun L. Expression of human neuron-specific enolase gene in human hepatocellular cancer cells BEL7402. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2193-2196

## 摘要

**目的:** 分别从转录水平、蛋白水平及细胞水平检测人神经元特异性烯醇化酶(NSE)在肝癌细胞BEL7402中的表达情况。

**方法:** 利用NSE特异引物, 通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)从人肝癌细胞BEL7402中扩增人NSE基因的转录产物, 采用免疫印迹(Western blot)、免疫细胞化学(ICC)染色技术检测NSE在肝癌细胞中的表达。

**结果:** 通过RT-PCR方法可以从BEL7402中扩增1 305 bp的NSE产物; Western blot方法证实BEL7402细胞可以表达Mr 50 000的NSE蛋白; 免疫细胞化学染色显示BEL7402与抗NSE单抗呈阳性反应, 这说明从转录水平、蛋白水平及细胞水平均检测到了NSE在肝癌细胞BEL7402中的表达。

**结论:** NSE可在肝癌细胞BEL7402转录和表达。

**关键词:** 神经元特异性烯醇化酶; 肝癌细胞; BEL7402细胞

朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军, 孙丽. 肝癌细胞BEL7402中神经元特异性烯醇化酶的表达. *世界华人消化杂志* 2005;13(18):2193-2196  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2193.asp>

## 0 引言

神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)广泛分布于人类及各种动物的成熟神经元、周围神经的神经内分泌细胞和一些感觉细胞中<sup>[1-4]</sup>。它在正常人脑组织含量最高, 起源于神经内分泌细胞的肿瘤组织也有异常表达。常见于神经母细胞瘤、小细胞肺癌、胰腺癌、前列腺癌<sup>[5]</sup>、嗜铬细胞瘤等。目前在临床上, NSE可作为神经元损伤的标志酶<sup>[6-11]</sup>; 也是小细胞肺癌首选的肿瘤标志物<sup>[12-14]</sup>, 可用于对SCLC的



鉴别诊断,放化疗效果、预后、恶变情况等监测<sup>[15-20]</sup>. 我们应用PCR, Western-blot和免疫细胞化学方法在不同的水平上,发现NSE可在肝癌细胞中表达,报告如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞BEL 7402及肺癌细胞A549由北京市肿瘤防治研究所免疫208研究室保存;鼠抗人NSE mAb由北京市肿瘤防治研究所免疫研究室208室研制<sup>[21]</sup>;羊抗鼠-HRP二抗由北京市肿瘤防治研究所生化202研究室惠赠;胎牛血清为天津市川页生化制品有限公司产品;RPMI 1640培养基、DMEM为GIBCO公司产品;Trizol为Sigma公司产品;RNA酶抑制剂、M-MLV逆转录酶、5×M-MLV Buffer、dNTPs、Taq DNA Polymerase为Promega公司产品;EnVision 试剂盒购自Dako公司;硝酸纤维素膜购自Amersham 公司;DAB、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺为北京鼎国生物技术公司产品;甘氨酸、甲醇、十二烷基磺酸钠、三羟甲基氨基甲烷(Tris碱)等为北京化学试剂公司产品.

**1.2 方法** 肝癌细胞BEL7402和人肺癌细胞A549在含120 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基,5 mL/L CO<sub>2</sub>, 37℃温箱中培养. Trizol法提取细胞总RNA(按说明书操作). 逆转录合成cDNA, 逆转录(RT)反应体系为:细胞总RNA 5 μL、Oligo dT(0.5 g/L)1 μL、DEPC H<sub>2</sub>O 6 μL,在70℃孵育10 min.再加RNasin(50 MU/L)1 μL、5×M-MLV Buffer 4 μL, dNTP(10 mmol/L)2 μL, M-MLV(200 MU/L)1 μL,反应总体积20 μL, 37℃ 1 h后,立刻放入冰中,即为逆转录后的NSE-cDNA. 随后进行PCR反应扩增NSE基因片断. 上、下游引物分别为5'-GAATTCATGTCCATAGAGAAGATCTG-3'和5'-TCTAGAAGAGGAATCACAGCACACTG-3',及通用β-actin引物(均由上海申友生物技术公司合成并测序). PCR条件为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 64℃ 30 s, 72℃ 30 s, 扩增30个循环; 72℃延长反应10 min. 10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定.

**1.2.1 Western blot检测肿瘤细胞中NSE 的表达** 将BEL 7402, A549细胞用0.2 g/L EDTA消化后,细胞计数,1 000 r/min离心5 min. 加入PBS洗1次,取2×10<sup>6</sup>细胞加入PBS 100 μL、PMSF 2 μL,液氮冷冻,37℃溶化反复3次,混匀后与2×SDS凝胶加样缓冲液等量混合,煮沸5 min,100 g/L SDS-PAGE电泳. 120 mA, 10℃条件下电转移硝酸纤维素膜,105 min. 取出NC膜,用1'丽春红S染色液染色2-3 min,用蒸馏水洗净染料. 50 g/L脱脂奶粉37℃ 2 h封闭NC膜, TBST洗3次. 加入NSE mAb作为一抗,4℃过夜,0.5 g/L TBST洗3次. 加入羊抗鼠-HRP(1:1000),室温孵育1 h. 0.5 g/L TBST 洗3

次,再用TBS洗1次. 加入10 mL DAB染液染色至有条带出现, PBS终止显色. 晾干,室温保存.

**1.2.2 细胞化学方法检测肿瘤细胞中NSE的表达** 0.2 g/L的EDTA消化细胞,加培养液调整细胞浓度为1-1.5×10<sup>9</sup>个/L,滴于干净的玻片上,37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中孵育4-6 h. 冷丙酮/甲醇(1:1)固定5-7 min,自来水冲洗3遍,晾干后-20℃保存. 从-20℃取出固定好的片子,在30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS中浸泡10 min以去除内源性的过氧化物酶, PBS浸洗3次,100 mL/L 马血/PBS 37℃封闭60 min,加入抗NSE mAb 30 μL 37℃ 1 h, PBS浸洗3次,加EnVision工作液30-50 μL,室温放置60 min, PBS浸洗3次; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-DAB显色,苏木精复染13 h, 10 mL/L 盐酸/酒精分色30 s. 将复染后的细胞片脱水后用树脂胶封片,镜下观察.

## 2 结果

**2.1 NSE- cDNA PCR 结果** 以逆转录的NSE cDNA为模板进行PCR扩增,扩增产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析,可见在1375 bp附近出现一特异条带,与NSE片断的1 305 bp分子大小相符,300-400 bp之间有一条带与β-actin看家基因扩增片段大小相符(图1).

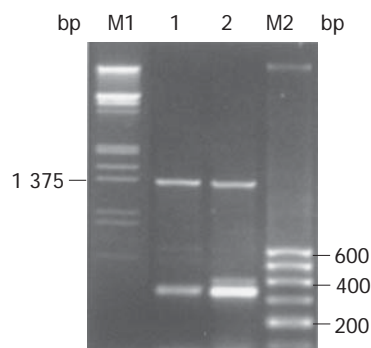


图1 NSE片段的PCR扩增. M1: DNA 分子质量标准: Lambda DNA/EcoRI+HindIII; M2: 100 bp DNA 分子质量标准. 1: RT-PCR扩增A549细胞中NSE产物; 2: RT-PCR扩增BEL 7402细胞中NSE产物.

**2.2 Western blot检测肿瘤细胞中NSE 的表达** MS2-NSE融合蛋白在约M<sub>r</sub>57 000处有一特异性条带(图2A第1道),肝癌BEL7402及肺癌A549细胞蛋白在约M<sub>r</sub>50 000之间有一条较强的杂交带(图2A第3, 4道),其分子质量大小与NSE的分子质量相符(图2). 虽然在聚丙烯酰胺凝胶电泳可以见到无关蛋白MS2-GRP呈M<sub>r</sub>18 000的蛋白带(图2B第2道),但在Western blot反应中因为与NSE mAb不相关而不能呈现特异反应带(图2A第2道).

**2.3 免疫细胞化学方法检测肿瘤细胞中NSE的表达** NSE在以上两种肿瘤细胞中经细胞免疫化学染色均呈棕黄色阳性反应,着色部位主要位于胞质(图3A, B). 而在使用正常鼠血清作一抗对人肝癌细胞BEL7402染色的阴性对照中则呈阴性反应(图3C).

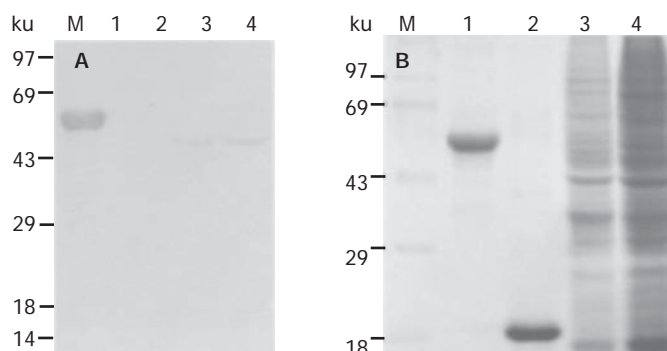


图2 抗NSE单抗Western blot蛋白印迹. A: 和聚丙烯酰胺凝胶电泳. B: 结果. M: 蛋白分子质量标准; 1: 融合蛋白 MS2-NSE; 2: 融合蛋白MS2-GRP; 3: A549细胞裂解总蛋白; 4: BEL7402细胞裂解总蛋白.

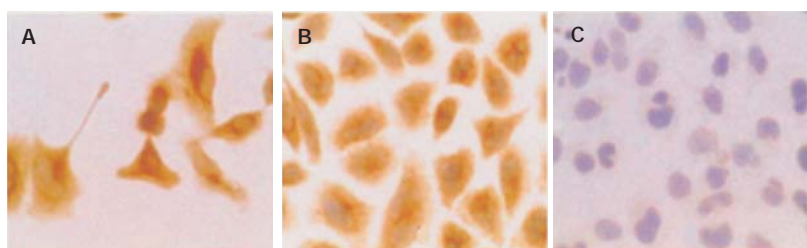


图3 肝癌BEL7402和肺癌A549细胞中NSE的表达(EnVision × 400). A: 肺癌细胞A549; B: 肝癌细胞BEL7402; C: 肝癌细胞BEL7402 (阴性对照).

### 3 讨论

从人肝癌细胞BEL7402及A549肺癌细胞中提取总RNA, RT-PCR得到NSE cDNA. 用特异性引物、Taq DNA聚合酶扩增了NSE基因片段, 长度为1 305 bp. 从人BEL7402肝癌细胞及A549肺癌细胞系中都能扩增出NSE和 $\beta$ -actin cDNA, 表明这两种细胞都有NSE的转录. BEL7402细胞和A549细胞表达的蛋白在 $M_r$ 50 000处有一特异性条带, MS2-NSE融合蛋白在57 000处有一特异性条带, GRP融合蛋白则没有任何条带, 这与预测结果完全一致. 我们克隆的NSE编码序列可编码434个氨基酸, 分子量约为 $M_r$ 50 000. MS2蛋白 $M_r$ 9 000, MS2-NSE融合蛋白为 $M_r$ 57 000. A549细胞和BEL7402细胞都能特异性表达NSE蛋白. NSE在人肝癌细胞BEL7402及肺癌细胞A549中均呈阳性反应, 着色部位主要位于胞质. 这与PCR, Western blot检测结果完全一致. 说明从转录水平、蛋白水平及细胞水平都能检测到NSE的表达.

烯醇酶是参与糖酵解的关键酶, 由 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 三种亚基以二聚体的形式组成 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$ 、 $\alpha\gamma$ 、 $\alpha\beta$ 五种同工酶. 其中 $\gamma\gamma$ 型特异性存在于神经元和神经内分泌细胞中, 称神经元特异性烯醇化酶(NSE), 约占脑内可溶性蛋白的1.5%, 最初NSE用于神经母细胞瘤及小细胞肺癌(神经内分泌瘤)的诊断, 但近年来一些研究证实急性脑血管病、癫痫、急性脑外伤、新生儿缺氧性脑病、心源性缺氧性脑损伤等多种中枢神经系统疾病中血清NSE均有明显改变<sup>[22-29]</sup>, 并提出NSE可作为诊断中枢神经系统疾病及脑损伤的一个有价值的指标.

如肝硬化时NSE的变化可特异反映毒性物质对中枢的影响情况, 可能作为亚临床期肝性脑病的临床判断指标<sup>[30]</sup>. 但未见NSE在肝癌细胞中表达的报道, 且肝癌并不是起源于神经内分泌细胞的肿瘤. NSE在肝癌中表达可能(1)由于NSE为涉及能量代谢的酶, 肿瘤组织糖酵解加强, 细胞增殖周期加快, 细胞内的NSE释放进入血液增多, 导致此酶在血清内含量增高; (2)NSE存在于细胞质内, 在细胞被破坏时释放出来进入血液循环. 因此NSE在肝癌细胞中表达的机制及在肝癌中的表达和意义还有待进一步研究, 以便为肝癌的发生预测和早期诊断寻求新的指标, 为肝癌的预防和早期治疗开辟新的途径. 此外, 本研究是一种定性实验, 若能从转录水平、蛋白水平及细胞水平定量分析肝癌细胞中NSE的表达水平将会有助于研究NSE在肝癌的临床诊断及预后判断中的意义.

### 4 参考文献

- 1 Ingebrigtsen T, Romner B. Biochemical Serum Markers of Traumatic Brain Injury. *J Trauma* 2002;52:798-808
- 2 Orlino EN Jr, Olmstead CE, Lazareff JA, Peacock WJ, Fisher RS, Fluharty AL. An enzyme immunoassay for neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid. *Biochem Mol Med* 1997;60:41-46
- 3 Tracy MR, Hedges SB. Evolutionary history of the enolase gene family. *Gene* 2000;259:129-138
- 4 Marangos PJ, Schmechel DE. Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci* 1987;10:269-295
- 5 Kamiya N, Akakura K, Suzuki H, Isshiki S, Komiya A, Ueda T, Ito H. Pretreatment Serum Level of Neuron Specific Enolase(NSE) as a Prognostic Factor in Metastatic Prostate Cancer Patients Treated with endocrine therapy. *Eur Urol*

- 2003;44:309-314
- 6 Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Goertler M, Jost S, Herrmann M. Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 1999;30:1190-1195
- 7 Herrmann M, Jost S, Kutz S, Ebert AD, Kratz T, Wunderlich MT, Synowitz H. Temporal profile of release of neurobiochemical markers of brain damage after traumatic brain injury is associated with intracranial pathology as demonstrated in cranial computerized tomography. *J Neurotrauma* 2000;17:113-122
- 8 Woertgen C, Rothoerl RD, Brawanski A. Neuron-specific enolase serum levels after controlled impact injury in the rat. *J Neurotrauma* 2001;18:569-573
- 9 Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock* 2001;16:165-177
- 10 Selakovic V, Raicevic R, Radenovic L. The increase of neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and plasma as a marker of neuronal damage in patients with acute brain infarction. *J Clin Neurosci* 2005;12:542-547
- 11 Herrmann M, Curio N, Jost S, Grubich C, Ebert AD, Fork ML, Synowitz H. Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:95-100
- 12 Schneider J, Velcovsky HG, Morr H, Morr H, Katz N, Neu K, Eigenbrodt E. Comparison of the tumor markers tumor M2-PK, CEA, CYFRA 21-1, NSE and SCC in the diagnosis of lung cancer. *AntiCancer Res* 2000;20:5053-5058
- 13 Hatzakis KD, Froudarakis ME, Bouros D, Tzanakis N, Karkavitsas N, Siafakas NM. Prognostic value of serum tumor markers in patients with lung cancer. *Respiration* 2002;69:25-29
- 14 Hoogenboom HR, de Beuine AP, Hufton SE, Hoet Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 1998;4:1-20
- 15 Kulpa J, Wojcik E, Reinfuss M, Kolodziejewski L. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. *Clin Chem* 2002;48:1931-1937
- 16 Shibayama T, Ueoka H, Nishii K, Kiura K, Tabata M, Miyatake K, Kitajima T, Harada M. Complementary roles of pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) and neuron specific enolase (NSE) in diagnosis and prognosis of small-cell lung cancer (SCLC). *Lung Cancer* 2001;32:61-69
- 17 Niho S, Nishiwaki Y, Goto K, Ohmatsu H, Matsumoto T, Hojo F, Ohe Y, Kakinuma R, Kodama T. Significance of serum pro-gastrin-releasing peptide as a predictor of relapse of small cell lung cancer: comparative evaluation with neuron-specific enolase and carcinoembryonic antigen. *Lung Cancer* 2000;27:159-167
- 18 Ferrigno D, Buccheri G, Giordano C. Neuron-specific enolase is an effective tumour marker in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2003;41:311-320
- 19 Muley T, Ebert W, Stieber P, Raith H, Holdenrieder S, Nagel D, Furst H, Roth HJ, Luthe H, Blijenberg BG, Gurr E, Uhl W, von Pawel J, Drings P. Technical performance and diagnostic utility of the new Elecsys neuron-specific enolase enzyme immunoassay. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:95-103
- 20 Satoh H, Ishikawa H, Kurishima K, Yamashita YT, Ohtsuka M, Sekizawa K. Cut-off levels of NSE to differentiate SCLC from NSCLC. *Oncol Rep* 2002;9:581-583
- 21 朱爱萍, 张青云, 王雅明, 徐建军. 人神经元特异烯醇化酶基因克隆及单克隆抗体的制备与鉴定. *中华检验医学杂志* 2005;28:197-199
- 22 Fridriksson T, Kini N, Walsh-Kelly C, Hennes H. Serum neuron-specific enolase as a predictor of intracranial lesions in children with head trauma: a pilot study. *Acad Emerg Med* 2000;7:816-820
- 23 Fujii EY, Kozuki M, Mu J, Ino Y, Ushioda N, Tomimatsu T, Fukuda H, Kanzaki T, Nakayama M, Murata Y. Correlation of neuron-specific enolase and S100B with histological cerebral damage in fetal sheep after severe asphyxia. *Brain Res* 2004;1018:136-140
- 24 abinowicz AL, Correale J, Boutros RB, Couldwell WT, Henderson CW, DeGiorgio CM. Neuron-specific enolase is increased after single seizures during inpatient video/EEG monitoring. *Epilepsia* 1996;37:122-125
- 25 Anand N, Stead LG. Neuron-Specific Enolase as a Marker for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review. *Cerebrovasc Dis* 2005;20:213-219
- 26 Ert AD, Fork ML, Synowitz H. Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg psychiatry* 2001;70:95-100
- 27 Berger RP, Adelson PD, Pierce MC, Dulani T, Cassidy LD, Kochanek PM. Serum neuron-specific enolase, S100B, and myelin basic protein concentrations after inflicted and noninflicted traumatic brain injury in children. *J Neurosurg* 2005;103:61-68
- 28 Herrmann M, Ebert AD, Tober D, Hann J, Huth C. A contrastive analysis of release patterns of biochemical markers of brain damage after CABG and VR and their association with the neurobehavioral outcome after cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:513-518
- 29 Selakovic V, Raicevic R, Radenovic L. The increase of neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and plasma as a marker of neuronal damage in patients with acute brain infarction. *J Clin Neurosci* 2005;12:542-547
- 30 Strauss GI, Christiansen M, Moller K, Clemmesen JO, Larsen FS, Knudsen GM. S-100b and neuron-specific enolase in patients with fulminant hepatic failure. *Liver Transpl* 2001;7:964-970



# 肝移植前受体亚低温对急性肝衰大鼠移植肝脏的保护作用

王志东, 韩德恩, 崔云甫, 姜明山, 张新宇, 曾兆林

王志东, 韩德恩, 崔云甫, 姜明山, 张新宇, 曾兆林, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆外科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
王志东, 男, 1975-04-28生, 黑龙江省兰西县人, 汉族, 2005年哈尔滨医科大学博士, 主治医师, 主要从事急性肝衰竭肝移植的临床与实验研究工作。

黑龙江省科技攻关资助项目, No.GB02C142-02

通讯作者: 王志东, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院肝胆外科. wzd98y2@sohu.com

电话: 0451-86605117

收稿日期: 2005-07-28 接受日期: 2005-08-03

## Moderate hypothermia therapy for acute liver failure in rats before liver transplantation

Zhi-Dong Wang, De-En Han, Yun-Fu Cui,  
Ming-Shan Jiang, Xin-Yu Zhang, Zhao-Lin Zeng

Zhi-Dong Wang, De-En Han, Yun-Fu Cui, Ming-Shan Jiang, Xin-Yu Zhang, Zhao-Lin Zeng, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. wzd98y2@sohu.com

Received: 2005-07-28 Accepted: 2005-08-03

## Abstract

**AIM:** To observe the effect of moderate hypothermia on the donated livers in rats with acute liver failure (ALF) before liver transplantation.

**METHODS:** ALF rats model were established by hepatectomy and hepatic devascularization. In situ liver transplantations were carried out for hypothermia treated group (35.0°C) and the control group (37.5°C) 12 h after the transplantation. Blood and tissue samples were collected just before and 6 or 24 h after transplantation. The concentrations of TNF- $\alpha$  were compared before and after the transplantation. The content of malondialdehyde (MDA) and the apoptotic rate of hepatic cells after the transplantation were observed. The apoptotic rate and MDA contents in donated liver were also assayed. The morphological changes of liver tissues were observed under microscope.

**RESULTS:** In the hypothermia treated group, the concentrations of TNF- $\alpha$  before and after the transplantation were significantly lower than those in the control

group ( $19.3 \pm 5.9$  vs  $43.4 \pm 9.0$   $\mu\text{g/L}$ ,  $t = 5.008$ ,  $P = 0.007$ ; 6 h,  $97.7 \pm 18.3$  vs  $137.1 \pm 23.3$   $\mu\text{g/L}$ ,  $t = 9.471$ ,  $P = 0.001$ ); the MDA contents and apoptotic rate after transplantation were also significantly lower than those in the control group ( $407.1 \pm 49.4$  vs  $598.2 \pm 61.8$  nmol/L,  $t = 34.46$ ,  $P = 0.001$ ;  $18.3 \pm 3.9\%$  vs  $23.6 \pm 4.3\%$ ,  $t = 29.63$ ,  $P = 0.001$ ).

**CONCLUSION:** Moderate hypothermia can decrease TNF- $\alpha$  level and relieve the damages of the donated liver in rats with ALF.

**Key Words:** Acute liver failure; Moderate hypothermia; Liver transplantation; Rats

Wang ZD, Han DE, Cui YF, Jiang MS, Zhang XY, Zeng ZL. Moderate hypothermia therapy for acute liver failure in rats before liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(18):2197-2200

## 摘要

**目的:** 观察肝移植术前应用亚低温对急性肝衰竭大鼠移植肝脏的影响。

**方法:** 采用肝大部分切除加部分缺血建立大鼠急性肝衰竭模型。术后12 h分别对亚低温处理组(35.0°C)和常温组(37.5°C)衰竭大鼠施行原位肝移植, 比较移植前后TNF- $\alpha$ 浓度变化、移植后供肝凋亡和再灌注损伤情况。

**结果:** 亚低温组移植前后血清TNF- $\alpha$ 浓度明显低于对照组( $19.3 \pm 5.9$  vs  $43.4 \pm 9.0$   $\mu\text{g/L}$ ,  $t = 5.008$ ,  $P = 0.007$ ,  $97.7 \pm 18.3$  vs  $137.1 \pm 23.3$   $\mu\text{g/L}$ ,  $t = 9.471$ ,  $P = 0.001$ ), 移植后供肝过氧化损伤(MDA)( $407.1 \pm 49.4$  vs  $598.2 \pm 61.8$  nmol/L,  $t = 34.46$ ,  $P = 0.0009$ )和凋亡指标( $18.3 \pm 3.9\%$  vs  $23.6 \pm 4.3\%$ ,  $t = 29.63$ ,  $P = 0.0007$ )均明显优于常温组。

**结论:** 肝移植前应用亚低温能够降低急性肝衰竭大鼠血清TNF- $\alpha$ 浓度并减轻移植后供体肝脏的再灌注损伤程度。

**关键词:** 急性肝衰竭; 亚低温; 肝移植; 大鼠

王志东, 韩德恩, 崔云甫, 姜明山, 张新宇, 曾兆林. 肝移植术前亚低温对急性肝衰竭大鼠移植肝脏的保护作用. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2197-2200

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2197.asp>

## 0 引言

原位肝移植是挽救重症急性肝衰竭的最有效措施<sup>[1-4]</sup>. 近年来有人将亚低温应用于急性肝衰竭治疗, 取得良好效果<sup>[5-12]</sup>. 目前, 亚低温用于急性肝衰竭治疗尚处于研究阶段, 其对随后肝移植的影响更少见报道. 我们利用改进的大鼠急性肝衰竭模型观察亚低温对衰竭大鼠肝移植后移植肝脏的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 供受体均为雄性Wistar大鼠, 由哈尔滨医科大学动物实验中心提供, 受体质量 $300 \pm 20$  g, 供体质量 $270 \pm 20$  g. 将大鼠随机分成3组: A组为亚低温衰竭移植组, B组为常温衰竭移植组, C组为假手术移植对照组, 每组16只. 急性肝衰竭模型采用肝脏大部切除加部分缺血模型. 乙醚麻醉后正中切口开腹, 游离并结扎通往右肝叶和两个前叶的管道系统, 按照Higgins and Anderson方法<sup>[13]</sup>切除两个前叶. 原位肝移植采用改良的Kamada二袖套法<sup>[14]</sup>, 未重建肝动脉. 灌洗液和保存液使用乳酸林格液(大冢制药有限公司). 供肝冷保存时间控制在40 min, 门静脉阻断时间控制在18-20 min, 受体手术时间 $40 \pm 5$  min. 根据前述方法将A, B组大鼠制成急性肝衰竭模型, 模型完成后, 通过置入直肠内的温度传感器(灵敏度为 $0.1^{\circ}\text{C}$ , 上海仪表有限公司XMTD-2001E)和自制温度控制装置(图1)自动控制大鼠体温在设定范围内. 控温期间禁食, 为防止出现脱水和低血糖, 每4 h生理盐水和50 g/L葡萄糖SC各5 mL<sup>[15]</sup>. A组体温控制在 $35^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ , B组体温控制在 $37.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ , C组按照A, B组手术步骤, 但只游离不结扎和切除肝叶, 体温控制在 $37.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ .

**1.2 方法** 三组大鼠第1次手术后12 h分别接受原位肝移植手术, 术前股静脉采血0.5 mL. 移植后6 h每组随机选择5只大鼠, 股静脉采血0.5 mL. ELISA法检测血清TNF- $\alpha$ 浓度(上海森雄科技实业有限公司试剂盒BS6002). 移植后6 h每组随机选择5只大鼠, 开腹取肝脏左外叶组织, 制备成100 g/L组织匀浆, 按照南京建成生物技术有限公司试剂盒说明书用比色法测定MDA浓度. 移植后24 h处死所有大鼠, 取肝脏组织做

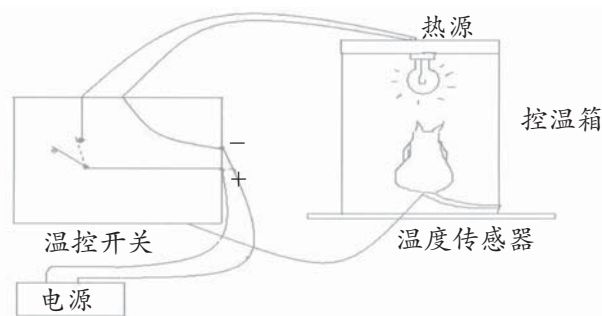


图1 温度控制装置示意图.

病理检查和凋亡检测. 肝脏组织切片常规染色. 脱氧核苷酸末端转移酶介导缺口末端标记法(TUNEL)检测凋亡. 肝脏组织常规石蜡包埋, 切取厚5  $\mu\text{m}$ 切片, 按照Boehringer Mannheim公司TUNEL试剂盒说明书操作, 最后用苏木素复染. 细胞核被染成棕黄色者并有凋亡特征者为阳性细胞. 400倍光镜下随机选取4个视野, 计算平均阳性细胞百分率, 即凋亡指数(AI).

**统计学处理** 实验数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 来表示, 两两均数间比较用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 有显著性差异.

## 2 结果

**2.1 移植肝脏24 h HE染色显示** 3组供肝组织结构均发生明显病理改变: 对照组肝细胞水肿明显, 汇管区少量炎性细胞浸润, 部分肝细胞发生嗜酸性变(图2A); 常温组可见大片肝细胞坏死, 汇管区炎性细胞浸润明显(图2B-C); 低温组汇管区炎性细胞浸润少于常温组, 可见点灶状坏死(图2D).

**2.2 血清TNF- $\alpha$ 水平** 低温组移植0 h血清TNF- $\alpha$ 水平低于常温组( $P < 0.05$ ), 移植后6 h血清TNF- $\alpha$ 水平仍明显低于常温组( $P < 0.05$ , 表1).

**2.3 肝组织MDA检测** 低温组肝移植后6 h肝组织MDA水平明显低于常温组( $P < 0.05$ , 表1).

**2.4 肝细胞凋亡情况** 移植后24 h对照组肝内散在分布凋亡细胞(图3A); 常温组肝内凋亡细胞多见, 广泛均匀分布(图3B), 二者差异显著( $P < 0.05$ ); 低温组肝内凋亡细胞明显少于常温组( $P < 0.05$ ) (图3C). 三组凋亡率见表1.

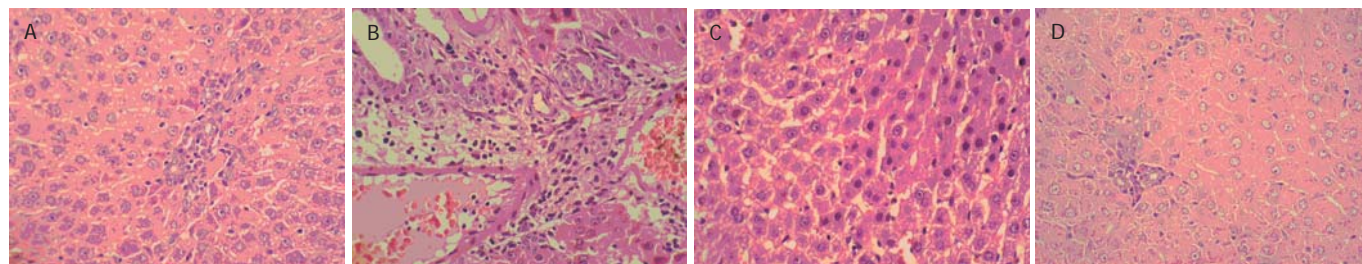


图2 移植肝组织学 HE  $\times 400$ . A: 假手术移植对照组; B: 常温移植组; C: 常温移植组; D: 亚低温组.



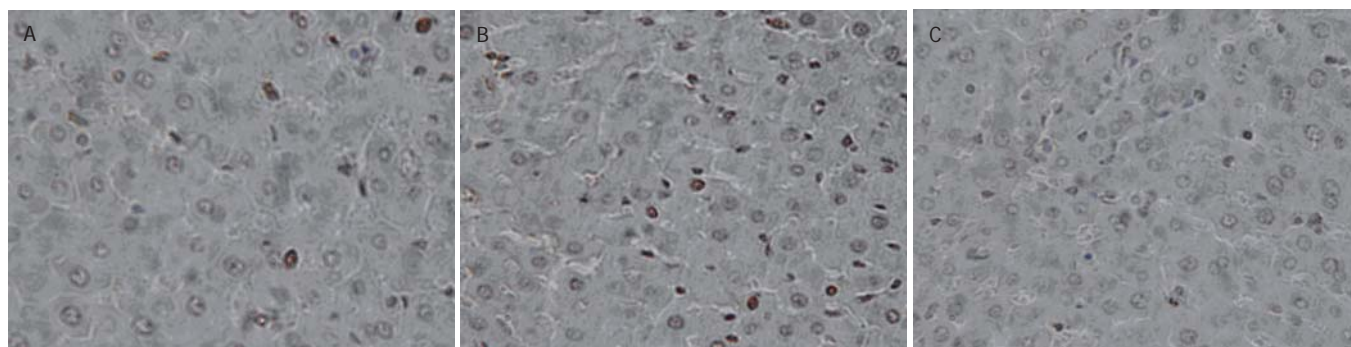


图3 移植肝细胞凋亡 (TUNEL  $\times 400$ )。A: 亚低温移植组; B: 常温衰竭移植对照; C: 健康移植对照。

表1 肝移植前亚低温处理对移植大鼠血清TNF- $\alpha$ 、肝脏MDA和肝脏凋亡指数(AI)的影响 (mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ )。

	0 h TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)	6 h TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)	6 h MDA (nmol/L)	24 h AI (%)
低温组	19.3 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	97.7 $\pm$ 18.3 <sup>a</sup>	407.1 $\pm$ 49.4 <sup>a</sup>	18.3 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>
常温组	43.4 $\pm$ 9.0	137.1 $\pm$ 23.3	598.2 $\pm$ 61.8	23.6 $\pm$ 4.3
对照组	5.1 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	89.3 $\pm$ 15.7 <sup>a</sup>	376.7 $\pm$ 42.6 <sup>a</sup>	8.8 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 常温组。

### 3 讨论

受体循环当中可能影响供体肝脏的因素很多, 如多种促炎症因子和炎性介质、胆红素等毒性代谢产物、内毒素的直接损害等等<sup>[16-18]</sup>。考虑到TNF- $\alpha$ 在再灌注损伤中的重要作用和亚低温对TNF- $\alpha$ 的影响<sup>[19-23]</sup>, 本部分实验重点观察了受体术前、术后循环中TNF- $\alpha$ 水平的变化和供体肝脏损伤的情况。本结果表明, 移植后6 h移植肝脏的过氧化损伤程度存在差别: 常温组损伤程度最重, 对照组损伤最轻, 亚低温组损伤介于两者之间, 与常温组有显著差异。这表明受体移植前内环境差别对移植肝脏的再灌注损伤有影响, 而移植前亚低温处理能够减轻受体因素对移植肝脏的损害。本实验移植0 h和移植6 h血清TNF- $\alpha$ 水平检测结果显示亚低温处理组TNF- $\alpha$ 水平明显低于常温移植对照组。同时, 移植后6 h供肝MDA水平和24 h供肝凋亡指数都明显低于常温移植对照组。这说明受体移植前循环中高TNF- $\alpha$ 可能是影响移植肝脏损伤的受体因素之一<sup>[24-26]</sup>。术前亚低温处理可能是通过降低循环中TNF- $\alpha$ 水平减轻随后移植的供体肝脏的再灌注损伤<sup>[27]</sup>。

由于灌注液和保存液不够理想, 移植后24 h肝脏HE染色显示所有三组大鼠肝脏组织损伤都很严重, 但是常温组供肝肝细胞坏死和汇管区炎性细胞浸润明显重于其他两组, 显示肝实质损伤较重。本实验结果表明肝移植前对急性肝衰竭受体大鼠进行亚低温处理能够减轻随后移植供体肝脏的再灌注损伤, 提示亚低温在急性肝衰竭围手术期的应用不仅有利于脑水肿的防治, 对减轻移植肝脏损伤也可能有效<sup>[28, 29]</sup>。本实验中还有很多问题需要进一步研究: 亚低温对肝脏再生能

力的影响如何; 术前受体高炎症因子血症加重供体肝脏缺血再灌注损伤的机制如何; 肝脏再灌注损伤相关基因的表达情况以及亚低温对抑制炎症反应因子, 如IL-10的影响如何<sup>[30]</sup>。

### 4 参考文献

- Farmer DG, Anselmo DM, Ghobrial RM, Yersiz H, McDiamid SV, Cao C, Weaver M, Figueroa J, Khan K, Vargas J, Saab S, Han S, Durazo F, Goldstein L, Holt C, Busuttil RW. Liver transplantation for fulminant hepatic failure: experience with more than 200 patients over a 17-year period. *Ann of surg* 2003;237:666-676
- O'Grady JG. Acute liver failure. *Postgrad Med J* 2005; 81:148-154
- Bernal W. Changing patterns of causation and the use of transplantation in the United kingdom. *Semin Liver Dis* 2003; 23:227-237
- Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L, Crippin JS, Blei AT, Samuel G, Reisch J, Lee WM. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 2002;137:947-954.
- Jalan R, Rose C. Hypothermia in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 2004;19:215-221
- Zwingmann C, Chatauret N, Rose C, Leibfritz D, Butterworth RF. Selective alterations of brain osmolytes in acute liver failure: protective effect of mild hypothermia. *Brain Res* 2004;999:118-123
- Jalan R. Intracranial hypertension in acute liver failure: pathophysiological basis of rational management. *Semin Liver Dis* 2003;23:271-282
- Blei AT. The pathophysiology of brain edema in acute liver failure. *Neurochem Int* 2005;47:71-77
- Jalan R. Pathophysiological basis of therapy of raised intracranial pressure in acute liver failure. *Neurochem Int* 2005;47:78-83
- Belanger M, Desjardins P, Chatauret N, Rose C, Butterworth RF. Mild hypothermia prevents brain edema and attenuates up-regulation of the astrocytic benzodiazepine receptor in experimental acute liver failure. *J Hepatol* 2005;42:694-699
- Vaquero J, Blei AT. Mild hypothermia for acute liver failure: a review of mechanisms of action. *J Clin Gastroenterol* 2005;39: S147-S157
- Jalan R, Rose C. Hypothermia in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 2004;19:215-221
- Higgins GM, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *AMA Arch Pathol* 1931;12:186-202
- Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979;28:47-50



- 15 Chatauret N, Rose C, Therrien G, Butterworth RF. Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate accumulation in acute liver failure. *Metab Brain Dis* 2001; 16:95-102
- 16 Banga NR, Homer-Vanniasinkam S, Graham A, Al-Mukhtar A, White SA, Prasad KR. Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg* 2005;92:528-538
- 17 Puhl G, Schaser KD, Pust D, Kohler K, Vollmar B, Menger MD, Neuhaus P, Settmacher U. Initial hepatic microcirculation correlates with early graft function in human orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 2005;11:555-563
- 18 Kwon AH, Tsuchiya H, Qiu Z, Yanagimoto H, Kaibori M. Fibronectin protects endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy in rats. *Transplant Proc* 2004;36:1985-1987
- 19 Hildebrand F, van Griensven M, Giannoudis P, Luerig A, Harwood P, Harms O, Fehr M, Krettek C, Pape HC. Effects of hypothermia and re-warming on the inflammatory response in a murine multiple hit model of trauma. *Cytokine* 2005; 31:382-393
- 20 王玉梅, 冯国和, 赵桂珍, 乔光彦. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  及一氧化氮对暴发性肝衰竭肝损伤的作用. *世界华人消化杂志* 2002; 6:646-671
- 21 Wang X, Jiang W, Zhao G, Du D, Zhou M, Hang Y, Tong C. Mild hypothermia protects against sodium taurocholate (NaTc)-induced acute pancreatitis in rats with adverse effects on serum cytokines. *Pancreas* 2005;30:e80-e86
- 22 Steiner AA, Dogan MD, Ivanov AI, Patel S, Rudaya AY, Jennings DH, Orchinik M, Pace TW, O'connor KA, Watkins LR, Romanovsky AA. A new function of the leptin receptor: mediation of the recovery from lipopolysaccharide-induced hypothermia. *FASEB J* 2004;18:1949-1951
- 23 Frohlich D, Wittmann S, Rothe G, Sessler DI, Vogel P, Taeger K. Mild hyperthermia down-regulates receptor-dependent neutrophil function. *Anesth Analg* 2004;99:284-292
- 24 Lim CM, Kim EK, Koh Y, Kim WS, Kim DS, Kim WD. Hypothermia inhibits cytokine release of alveolar macrophage and activation of nuclear factor kappaB in endotoxemic lung. *Intensive Care Med* 2004;30:1638-1644
- 25 Fairchild KD, Singh IS, Patel S, Drysdale BE, Viscardi RM, Hester L, Lazusky HM, Hasday JD. Hypothermia prolongs activation of NF-kappaB and augments generation of inflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287: C422-C431
- 26 Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 1994;57:253-258
- 27 Wolf D, Hallmann R, Sass G, Sixt M, Kusters S, Fregien B, Trautwein C, Tiegs G. TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1-relevance for concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 2001;166:1300-1307
- 28 Belanger M, Desjardins P, Chatauret N, Rose C, Butterworth RF. Mild hypothermia prevents brain edema and attenuates up-regulation of the astrocytic benzodiazepine receptor in experimental acute liver failure. *J Hepatol* 2005;42:694-699
- 29 Jalan R, Olde Damink SW, Deutz NE, Hayes PC, Lee A. Moderate hypothermia in patients with acute liver failure and uncontrolled intracranial hypertension. *Gastroenterology* 2004;127:1338-1346
- 30 Matsui T, Ishikawa T, Takeuchi H, Tsukahara M, Maekawa T. Mild hypothermia inhibits IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004; 48:205-210

电编 张勇 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

## • 消息 •

# 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第一轮通知

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。大会热烈欢迎各位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。(世界胃肠病学杂志社 2005-09-15)

# 慢性丙型肝炎患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性T细胞表达增加

杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄

杨江华, 张永祥, 孙南雄, 南京医科大学第一附属医院感染科 江苏省南京市 210029

苏川, 南京医科大学病原生物学系 江苏省南京市 210029

杨江华, 男, 1972-11-28 生, 安徽省铜陵市人, 汉族, 2003年南京医科大学博士研究生, 主要从事丙型肝炎慢性化机制研究。

江苏省现代病原生物学重点实验室开放课题, No. XDBY04002

通讯作者: 苏川, 江苏省南京市汉中140号, 南京医科大学病原生物学系。chuansu@njmu.edu.cn

电话: 025-86662773 传真: 025-86661318

共同通讯作者: 孙南雄, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院感染科。sun9876@126.com

电话: 025-83986144 传真: 025-83190852

收稿日期: 2005-05-30 接受日期: 2005-06-13

## Increase of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C

Jiang-Hua Yang, Yong-Xiang Zhang, Chuan Su, Nan-Xiong Sun

Jiang-Hua Yang, Yong-Xiang Zhang, Nan-Xiong Sun, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Chuan Su, Department of Pathogenic Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by the Open Project from Pathogenic Biology Laboratory of Jiangsu Province, No. XDBY04002

Correspondence to: Chuan Su, Department of Pathogenic Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. chuansu@njmu.edu.cn

Co-correspondence to: Nan-Xiong Sun, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. sun9876@126.com.

Received: 2005-05-30 Accepted: 2005-06-13

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the immune responses of patients with chronic hepatitis C.

**METHODS:** The number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the peripheral blood of chronic HC patients was detected by flow cytometry. Then the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells were co-cultured with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells, and their inhibitory effect was analyzed. Flow cytometry was also used to examine the effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells on the synthesis of Interferon- $\gamma$  and Interleukin-4 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. The expression of Foxp3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** The percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory

T cells in the peripheral CD4<sup>+</sup> T cells of the chronic HC patients was significantly higher than that of the healthy controls ( $14.1 \pm 1.6\%$  vs  $5.3 \pm 0.8\%$ ,  $P < 0.01$ ). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells significantly inhibited the proliferation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells ( $P = 0.002$ ) and the synthesis of IFN- $\gamma$ . Foxp3 was highly expressed in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells.

**CONCLUSION:** The level of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells increases in patients with chronic hepatitis C virus infection, which can specifically inhibit the response of Th1 cells.

**Key Words:** Hepatitis C virus; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells; CD4<sup>+</sup> T cell; Foxp3

Yang JH, Zhang YX, Su C, Sun NX. Increase of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2201-2204

## 摘要

**目的:** 探讨CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T(Treg)细胞在慢性丙型肝炎患者免疫下调中的意义。

**方法:** 流式细胞仪检测慢性丙型肝炎患者外周血中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞的数量;与CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞共同培养,检测其抑制功能;流式细胞仪检测其对CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞合成IFN- $\gamma$ 和IL-4的影响;RT-PCR检测CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞中Foxp3的mRNA表达。

**结果:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞约占慢性丙型肝炎患者外周血中CD4<sup>+</sup>T细胞的14.1  $\pm$  1.6%,显著高于正常对照5.3  $\pm$  0.8%( $P < 0.01$ ),显著抑制CD4<sup>+</sup>T细胞的增殖( $P = 0.002$ ),以及合成IFN- $\gamma$ 。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞高表达Foxp3。

**结论:** 持续性HCV感染患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞表达增加,特异性抑制Th1细胞反应。

**关键词:** HCV; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞; CD4<sup>+</sup>T细胞; Foxp3

杨江华, 张永祥, 苏川, 孙南雄. 慢性丙型肝炎患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞表达增加. *世界华人消化杂志* 2005;13(18):2201-2204  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2201.asp>

## 0 引言

HCV感染的显著临床特点是,80%以上的急性患者可

转变为慢性持续性感染,而慢性HCV感染又是肝硬化和原发性肝细胞癌的重要病因<sup>[1]</sup>.研究急性自限性HCV感染的患者和猩猩表明有效控制HCV感染需要一个持久、广泛的CD4<sup>+</sup>Th1细胞反应.而慢性丙型肝炎患者表现为HCV特异性CD4<sup>+</sup>Th细胞数量减少,对抗原刺激的增生能力显著降低,主要分泌Th2型细胞因子(IL-4、IL-6和IL-10),而分泌Th1型细胞因子能力减弱(IFN- $\gamma$ )<sup>[1-5]</sup>.近来研究显示,在多种病原体的慢性感染中,如疟原虫<sup>[6]</sup>、利什曼原虫<sup>[7]</sup>和HIV<sup>[8]</sup>等,能够诱导宿主上调表达一群具有免疫抑制功能的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cell)细胞,分泌的IL-10和TGF- $\beta$ 能够抑制抗原特异性CD4<sup>+</sup>T细胞反应,下调Th1的功能.而去除CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞能够显著降低这些病原体的感染率.现就CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞在慢性丙型肝炎患者中的数量,功能以及发病中的意义进行了探讨.

## 1 材料和方法

1.1 材料 慢性丙型肝炎患者18例,男11例,女7例,年龄14-60(平均48)岁.诊断符合2004年丙型肝炎防治指南的诊断标准.所有病例6 mo内均未使用免疫调节药物和抗病毒治疗,不合并HBV感染以及其它病毒性肝炎.正常对照15例,男10例,女5例.

细胞培养在RPMI1640中,含有2.05 mmol/L谷氨酰胺;10<sup>5</sup> U/L青霉素和链霉素(Hyclone),以及100 mL/L人AB血清,于96孔U型培养板(Costar).流式抗体有PE-Cy5标记的CD4, PE标记的CD25, FITC标记的CD45RO(BD PharMingen), PE标记的IFN- $\gamma$ 抗体和IL-4抗体(eBioscience),同型对照抗体为PE标记的大鼠IgG1和小鼠IgG1(eBioscience).以及红细胞裂解液与抗CD3抗体(BD PharMingen).阳性分选CD8<sup>+</sup>T细胞磁珠(Dynal),分选CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的免疫磁珠(Miltenyi).RNA纯化试剂盒与RT-PCR试剂盒(QIAGEN).

### 1.2 方法

1.2.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞计数 取全血100  $\mu$ L,分别加入PE-Cy5标记的CD4, PE标记的CD25, FITC标记的CD45RO各10  $\mu$ L于标本管中,室温孵育20-30 min.再加红细胞裂解液,并振荡混匀.洗涤一次,重新悬浮细胞,上流式细胞仪检测.对于已分离的细胞用直接抗体标记后,即可检测.

1.2.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的分离与培养 采患者或正常人静脉血,用密度梯度离心法分离单个核细胞.然后用Dynabeads阳性分选去除单个核细胞中的CD8<sup>+</sup>T细胞;再使用Miltenyi磁珠阴性分选CD4<sup>+</sup>T细胞.将这种去除T细胞(CD8<sup>+</sup>T和CD4<sup>+</sup>T细胞)的剩余细胞,用Co-60照射(30 Gy),作为APC.对总CD4<sup>+</sup>T细胞再通过抗CD25的磁珠阳性分选,将CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞与

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞分开.

分别取CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞,或两者按1:1混合,以及APC各1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞,共同培养,同时加入10 mg/L抗HCV抗原肽(包括C区、NS3区、NS4a区和NS5a区)共同培养5 d,在培养结束前16 h加入<sup>3</sup>H-TdR,收集细胞,在液闪计数仪上测每分钟脉冲数.

1.2.3 细胞内因子检测 检测细胞内因子IL-4和IFN- $\gamma$ ,取CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞,或与CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞相混合,加入20 mg/L HCV抗原合成肽,37 $^{\circ}$ C,50 mL/L CO<sub>2</sub>培养6 h.培养开始1 h后,每孔加入0.7 mg/L BFA.收集培养细胞,经Fix&Perm固定通透细胞后,加入PE标记的IFN- $\gamma$ 抗体和IL-4抗体,阴性对照管加PE标记的大鼠IgG1和小鼠IgG1同型抗体对照,4 $^{\circ}$ C避光放置30 min;洗涤后,重悬于500  $\mu$ L PBS中,经FACSCalibur流式细胞仪检测.

1.2.4 Foxp3的mRNA检测 采用RT-PCR检测Foxp3的mRNA的表达.取1 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞,用柱分离法抽提RNA,用DEPC处理过的水将RNA稀释为1 mg/L. FoxP3引物为: forward, 5'-TCACCTACGCCACGTCAT, reverse, 5'-ACTCAGGTTGTGGCGGATGG.反应条件:逆转录50 $^{\circ}$ C 30 min; 95 $^{\circ}$ C 15 min灭活逆转录酶;PCR循环条件为,95 $^{\circ}$ C 60 s, 53 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s; 72 $^{\circ}$ C 10 min终延伸.同时设 $\beta$ -actin作为内参照.

统计学处理 采用SPSS 10.1软件通过Mann-Whitney *U*检验分析比较丙型肝炎患者和正常对照CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞的数量差异,其中两组之间的关系采用非参数Speaman相关性分析.

## 2 结果

2.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞的数量和功能 丙型肝炎患者外周血中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T细胞约占CD4<sup>+</sup>T细胞14.1 $\pm$ 1.6%,明显高于正常人外周血中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T细胞约占CD4<sup>+</sup>T细胞的(5.3 $\pm$ 0.8)% ( $P = 0.004 < 0.01$ ) (图1A).同时慢性丙型肝炎患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞,后者的数量与HCV RNA滴度之间呈正相关性( $R = 0.575$ ,  $P = 0.016 < 0.05$ ) (图1B).CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞表达一种转录因子Foxp3,并可作为其一种较为特异性的分子标记<sup>[9]</sup>.我们的研究证实,用RT-PCR扩增Foxp3 mRNA后,当循环次数降到30时,仅见CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞表达Foxp3,并且丙肝患者较正常对照表达增高(图1C).

2.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞抑制CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞的增殖 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞具有免疫低反应性,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞不发生增殖,增殖能力显著低于CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞.经HCV抗原活化后,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞对CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T细胞的增殖功能具有显著的抑制效应( $P = 0.002 < 0.01$ ) (图2).



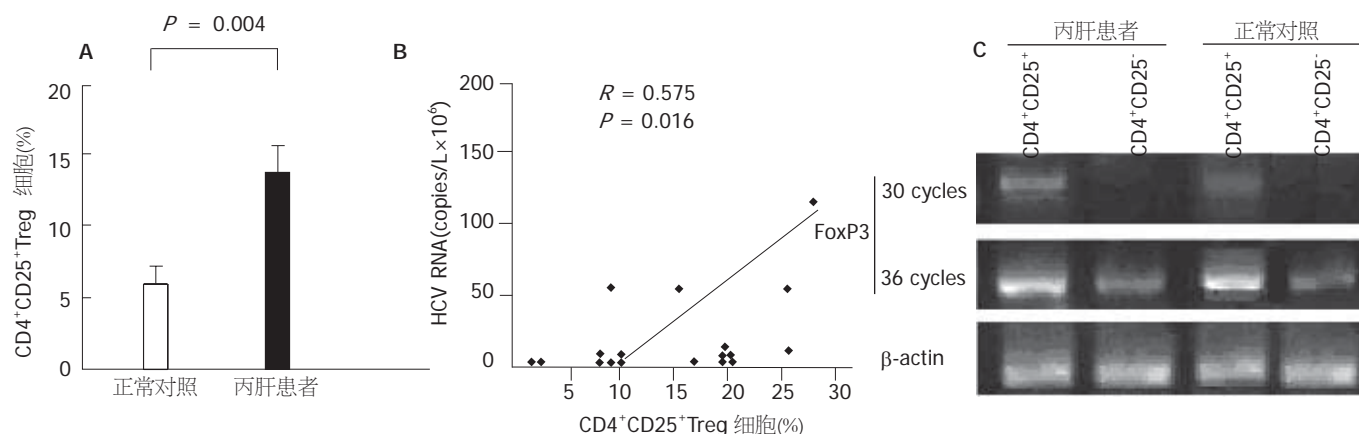


图1 慢性丙型肝炎患者外周血中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T细胞占CD4<sup>+</sup>T细胞的比例. A: 与正常对照相比慢性丙型肝炎患者CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T细胞占CD4<sup>+</sup>T细胞的比例增加( $P = 0.004$ ); B: 慢性丙型肝炎患者HCV RNA滴度与CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞之间的相关性分析( $R = 0.575$ ,  $P = 0.016$ ); C: RT-PCR检测Foxp3的mRNA的表达.

2.3 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞抑制CD4<sup>+</sup>T细胞合成细胞因子  
取CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞或CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞与CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞相混合, 用HCV抗原刺激培养. 在加入CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的一组合成IFN- $\gamma$ 的CD4<sup>+</sup>T细胞显著减少, 而对IL-4数量影响并不明显(图3). 由此提示, 在持续性HCV感染过程中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞主要抑制HCV特异性Th1细胞反应.

### 3 讨论

在持续性HCV感染患者外周血中一群具有免疫抑制功能的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞表达上调, 不仅数量增加, 而且功能也较正常人CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞增强, 并显著抑制CD4<sup>+</sup>T细胞的增殖, 以及HCV特异性CD4<sup>+</sup>T细胞合成IFN- $\gamma$ . 由此提示, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞介导的免疫抑制作用在持续性HCV感染过程中起着重要作用. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞是一类具有免疫抑制功能抑制性T细胞群, 特征性地表达IL-2的 $\alpha$ 链(CD25). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞主要分泌细胞因子IL-10和TGF- $\beta$ , 活化后的细胞表面分子CTLA-4表达增加, 表达转录因子Foxp3<sup>[10]</sup>. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞具有免疫低反应性,

多表现为记忆细胞表型(CD45RO<sup>+</sup>). 经多克隆激活剂或特异性抗原激活后, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞能够通过依赖细胞接触的方式抑制CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的增生、分化, 以及分泌细胞因子<sup>[11]</sup>. 已有研究表明, 在多种病原体的慢性感染中, 都能够诱导宿主上调表达CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞, 抑制抗原特异性CD4<sup>+</sup>T细胞反应, 而去除CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞能够显著降低这些病原体的感染率<sup>[6-8]</sup>. Sugimoto *et al*<sup>[12]</sup>研究指出, 在慢性HCV感染患者体内CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞的数量明显高于恢复患者(7.3% *vs* 2.5%,  $P = 0.002$ ), 而正常对照则为3.6%( $P = 0.017$ ). 体外研究显示, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞能够抑制HCV特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的增殖. 以及最近研究报道, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞能够调节持续性HCV中的细胞免疫反应<sup>[13]</sup>. 多项研究表明, HCV特异性Th1细胞在控制急性HCV感染中起着重要作用, 慢性患者多表现为HCV特异性CD4<sup>+</sup>T细胞数量减少、增殖功能减弱, 以及分泌Th1型细胞因子(IFN- $\gamma$ )功能降低等<sup>[3, 14-17]</sup>, 但尚未阐明其发生机制. 本组研究数据表明, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞不仅抑制慢性丙型肝炎患者

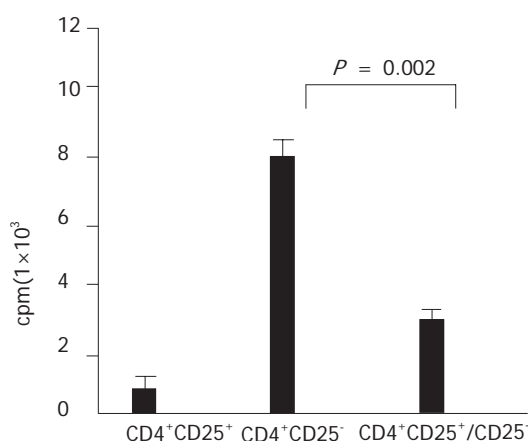


图2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞抑制HCV特异性CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞的增殖( $P = 0.002$ ).

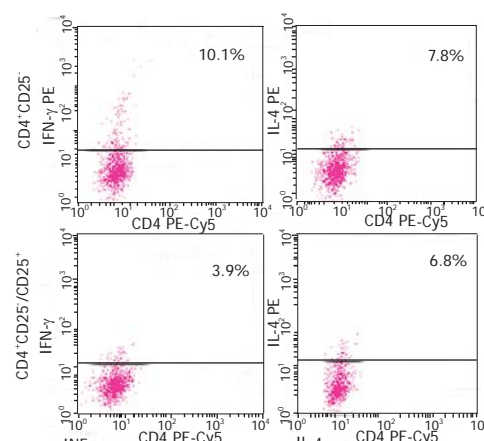


图3 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞抑制HCV特异性CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞合成细胞因子.

CD4<sup>+</sup>T细胞的增殖,并显著抑制HCV特异性Th1细胞反应(IFN- $\gamma$ ),对Th2细胞反应(IL-4)的抑制作用不明显.或许这将有助于解释为什么在慢性HCV感染以及其它慢性病原体感染中存在Th细胞极化异常现象.

当机体感染病原体时,多种微生物的分子及其代谢产物都能够作用静止APC上的TLR(Toll-like receptors),如作用后的APC不能分化成熟,则诱导初始CD4<sup>+</sup>T细胞表达转录因子Foxp3,分化为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞,从而抑制效应T细胞的应答<sup>[18]</sup>.本研究也表明,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞高表达Foxp3,可作为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞一种特异性标记.总之,持续性HCV感染患者外周血中一群具有免疫抑制功能的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞数量增加,显著抑制CD4<sup>+</sup>T细胞的增殖,以及HCV特异性Th1细胞反应.因而提示,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞在丙型肝炎慢性化过程中起着免疫调节作用.这为进一步研究在持续性HCV感染中如何调控CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞的功能奠定了基础.

#### 4 参考文献

- 1 Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, El Khoby T, Abdel-Wahab Y, Aly Ohn ES, Anwar W, Sallam I. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet* 2000;355:887-891
- 2 Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003;7:89-105
- 3 Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, Hoffmann R, Schirren CA, Santantonio T, Pape GR. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999;117:933-941
- 4 Tsai SL, Liaw YF, Chen MH, Huang CY, Kuo GC. Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology* 1997;25:449-458
- 5 MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M, Mills KH. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* 2002;185:720-727
- 6 Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, Tsukumo S, Yasutomo K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Med* 2004;10:29-30
- 7 Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 2004;200:201-210
- 8 Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 2004;78:2454-2459
- 9 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336
- 10 Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-1253
- 11 Asseman C, von Herrath M. About CD4pos CD25pos regulatory cells. *Autoimmun Rev* 2002;1:190-197
- 12 Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1437-1448
- 13 Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004;40:1062-1071
- 14 Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, Jung MC, Schirren CA, Schraut W, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;37:1189-1198
- 15 Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad AJ, Bakke A, Bouwer HG, Hinrichs DJ. Frequencies of HCV-specific effector CD4<sup>+</sup> T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology* 2002;35:190-198
- 16 Kantzanou M, Lucas M, Barnes E, Komatsu H, Dusheiko G, Ward S, Harcourt G, Klenerman P. Viral escape and T cell exhaustion in hepatitis C virus infection analysed using Class I peptide tetramers. *Immunol Lett* 2003;85:165-171
- 17 Nascimbeni M, Mizukoshi E, Bosmann M, Major ME, Mihalik K, Rice CM, Feinstone SM, Rehermann B. Kinetics of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> memory T-cell responses during hepatitis C virus rechallenge of previously recovered chimpanzees. *J Virol* 2003;77:4781-4793
- 18 Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 草苺蓉乙醇提取物对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的治疗作用

朴熙绪, 黄红果, 朴东明

朴熙绪, 黄红果, 延边大学医学院附属医院消化内科 吉林省延吉市 133000

朴东明, 延边大学医学院附属医院病理科 吉林省延吉市 133000

朴熙绪, 男, 1951-10-25生, 吉林省双阳县人, 朝鲜族, 1978年白求恩医科大学本科毕业, 1984年延边大学医学院硕士研究生, 主任医师, 主要从事肝脏疾病的基础与临床研究, 发表论文60余篇。

吉林省卫生厅医学科研基金资助项目, No.114

通讯作者: 朴熙绪, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学医学院消化内科. piaoxixu1951@yahoo.com.cn.

电话: 0433-2660061 传真: 0433-2513610

收稿日期: 2005-07-15 接受日期: 2005-08-03

## Therapeutic role of ethanolic extract of *Boschniakia Rossica* in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Xi-Xu Piao, Hong-Guo Huang, Dong-Ming Piao

Xi-Xu Piao, Hong-Guo Huang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Dong-Ming Piao, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Medical College of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China  
Supported by the Fund from Medical Scientific Research of Health Department of Jilin Province, No. 114

Correspondence to: Xi-Xu Piao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Yanbian University, 119 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. piaoxixu1951@yahoo.com

Received: 2005-07-15 Accepted: 2005-08-03

## Abstract

**AIM:** To study the effect of *Boschniakia Rossica* ethanolic extract (BREE) in rat liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine (DMN).

**METHODS:** Hepatic fibrosis was induced by DMN administration intraperitoneally. Thirty-five male Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control group (GA,  $n = 10$ ), hepatic fibrosis model group (GB,  $n = 15$ ) and BREE treatment group (GC,  $n = 10$ ). From the 1<sup>st</sup> to 3<sup>rd</sup> wk, rats in GB and GC were treated with DMN (10 g/L) intraperitoneally in the first three days of each week, while rats in GA were treated with normal saline. From the 4<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup> wk, rats in GC were treated with 50 g/L BREE (10 mL/kg) intragastrically each day, while rats in GA and GB were treated with normal saline. At the 1<sup>st</sup> d of the 8<sup>th</sup> wk, all the rats were sacrificed and the activity of superoxide

dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX), the contents of malondialdehyde (MDA), hyaluronic acid (HA), type III procollagen (PC III), type IV collagen (IV.C) in serum were examined. The expression of alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in liver was also analyzed.

**RESULTS:** The activity of SOD ( $98.58 \pm 17.36$  kNU/L,  $9.99 \pm 1.69$  kNU/L) and GSH-PX ( $117.37 \pm 45.24$  U,  $12.43 \pm 2.99$  U) in serum and liver tissue in GB was significantly lower than those in GA (SOD:  $129.05 \pm 18.55$  kNU/L,  $19.94 \pm 5.87$  kNU/L; GSH-PX:  $173.79 \pm 25.76$  U,  $22.66 \pm 6.99$  U) ( $P < 0.01$ ), while the contents of MDA in GB ( $10.87 \pm 1.23$   $\mu$ mol/L,  $1.38 \pm 0.37$   $\mu$ mol/L) were higher than those in GA ( $6.63 \pm 1.05$   $\mu$ mol/L,  $0.91 \pm 0.25$   $\mu$ mol/L) ( $P < 0.01$ ). The concentrations of serum HA ( $394.83 \pm 103.28$   $\mu$ g/L), PC III ( $13.30 \pm 1.88$  mg/L) and IV.C ( $2.43 \pm 1.32$  mg/L) in GB were markedly higher than those in GA ( $186.54 \pm 39.87$   $\mu$ g/L,  $6.99 \pm 1.55$  mg/L,  $1.18 \pm 0.79$  mg/L,  $P < 0.01$ ). The concentrations of serum HA ( $115.87 \pm 13.96$   $\mu$ g/L), PC III ( $6.67 \pm 1.86$  mg/L) and IV.C ( $1.62 \pm 0.50$  mg/L) in GC were significantly lower than those in GB ( $P < 0.05$ ), while the activity of SOD ( $134.29 \pm 21.93$  kNU/L,  $18.99 \pm 6.86$  kNU/L) and GSH-PX ( $171.82 \pm 37.50$  U,  $23.57 \pm 7.19$  U) in serum and liver tissue increased significantly ( $P < 0.01$ ). The contents of MDA in serum and tissue in GC ( $8.68 \pm 2.32$   $\mu$ mol/L,  $0.97 \pm 0.22$   $\mu$ mol/L) was lower than those in GB ( $10.87 \pm 1.23$ ,  $1.38 \pm 0.37$   $\mu$ mol/L) ( $P < 0.01$ ). The fibrosis index and  $\alpha$ -SMA expression in liver decreased in GC too.

**CONCLUSION:** BREE plays an anti-fibrogenic role in the DMN-induced liver fibrosis of rat by its anti-oxidative effect and inhibition on hepatic stellate cells activation.

**Key Words:** *Boschniakia Rossica*; Dimethylnitrosamine; Liver fibrosis

Piao XX, Huang HG, Piao DM. Therapeutic role of ethanolic extract of *Boschniakia Rossica* in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2205-2209

## 摘要

**目的:** 探讨草苺蓉乙醇提取物对二甲基亚硝胺(DMN)



诱导大鼠肝纤维化的治疗作用及其机制。

**方法：**将健康♂Wistar大鼠35只随机分为空白对照组(A组)10只，模型组(B组)15只，草苳蓉组(C组)10只。B、C组每周1-3 d腹腔内注射1% DMN 1 mL/kg体重，A组用相同剂量生理盐水代替DMN，4-7 d休息，共3 wk。造模结束后A组及B组生理盐水10 mL/kg体重，C组50 g/L草苳蓉乙醇提取物10 mL/kg体重，每日一次灌胃，共4 wk(实验4-7 wk)。实验第八周第一天从全部实验大鼠采血，取肝组织，分别检测血清SOD、GSH-PX活性、MDA、HA、PCⅢ、Ⅳ.C含量，肝组织SOD、GSH-PX活性及MDA含量，并做肝脏组织病理学检查及 $\alpha$ -SMA的表达的检测。

**结果：**模型组的血清及肝组织SOD( $98.58 \pm 17.36$  kNU/L,  $9.99 \pm 1.69$  kNU/L)、GSH-PX活性( $117.37 \pm 45.24$  U,  $12.43 \pm 2.99$  U)显著低于对照组( $129.05 \pm 18.55$  kNU/L,  $19.94 \pm 5.87$  kNU/L和 $173.79 \pm 25.76$  U,  $22.66 \pm 6.99$  U,  $P < 0.01$ )，MDA含量( $10.87 \pm 1.23$   $\mu$ mol/L,  $1.38 \pm 0.37$   $\mu$ mol/L)高于对照组( $6.63 \pm 1.05$   $\mu$ mol/L,  $0.91 \pm 0.25$   $\mu$ mol/L,  $P < 0.01$ )。模型组血清HA( $394.83 \pm 103.28$   $\mu$ g/L)、PCⅢ( $13.30 \pm 1.88$  mg/L)、Ⅳ.C的含量( $2.43 \pm 1.32$  mg/L)也显著高于对照组( $186.54 \pm 39.87$   $\mu$ g/L,  $6.99 \pm 1.55$  mg/L,  $1.18 \pm 0.79$  mg/L,  $P < 0.01$ )。草苳蓉组的血清和肝组织SOD( $134.29 \pm 21.93$  kNU/L,  $18.99 \pm 6.86$  kNU/L)，GSH-PX活性( $171.82 \pm 37.50$  U,  $23.57 \pm 7.19$  U)显著高于模型组( $P < 0.01$ )，MDA含量( $8.68 \pm 2.32$   $\mu$ mol/L,  $0.97 \pm 0.22$   $\mu$ mol/L)则低于模型组( $10.87 \pm 1.23$ ,  $1.38 \pm 0.37$   $\mu$ mol/L)( $P < 0.01$ )。草苳蓉组血清HA( $115.87 \pm 13.96$   $\mu$ g/L)、PCⅢ( $6.67 \pm 1.86$   $\mu$ g/L)、Ⅳ.C的含量( $1.62 \pm 0.50$  mg/L)也低于模型组( $P < 0.05$ )。与模型组比较草苳蓉组的肝纤维化分期程度明显减轻( $P < 0.01$ )，肝组织 $\alpha$ -SMA的表达降低。

**结论：**草苳蓉对DMN所致大鼠肝纤维化有治疗作用，其机制可能与抗脂质过氧化物作用和抑制肝星状细胞的激活有关。

**关键词：**草苳蓉；二甲基亚硝胺；肝纤维化

林熙绪, 黄红果, 朴东明. 草苳蓉乙醇提取物对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的治疗作用. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2205-2209  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2205.asp>

## 0 引言

近年研究表明，草苳蓉具有清除自由基、抗脂质过氧化、抗肿瘤、抗炎、增强四氯化碳所致损伤肝枯否细胞的免疫活性等作用，并对大鼠实验性急性肝损伤有保护作用<sup>[1-3]</sup>，但其对肝纤维化有无治疗作用尚未见研究报告。本实验采用腹腔内注射二甲基亚硝胺的

方法建立大鼠实验性肝纤维化模型，探讨了草苳蓉乙醇提取物灌胃对大鼠肝纤维化的治疗作用。

## 1 材料和方法

**1.1 动物模型制备及分组** 健康Wistar大鼠35只，♂，体重180-220 g(延边大学医学院实验动物科提供)，随机分为3组，空白对照组(A组)10只，模型组(B组)15只，草苳蓉组(C组)10只。B、C组每周1-3 d腹腔内注射1% DMN 1 mL/kg体重，A组用相同剂量生理盐水代替DMN，4-7 d休息，共3 wk。造模结束后A组及B组生理盐水10 mL/kg体重，C组5%草苳蓉乙醇提取物10 mL/kg体重，每日一次灌胃<sup>[2,3]</sup>，共4 wk(实验4-7 wk)。

**1.2 检测指标及方法** 实验第8周第一天将所有大鼠用乙醚麻醉后心脏采血，分离血清，待测SOD、GSH-PX活性、MDA、HA、PCⅢ、Ⅳ.C含量。采血完毕后立即处死动物，取肝脏左叶用40 g/L福尔马林固定，做病理组织学检查及图象分析，其余肝组织留做检测肝匀浆中SOD、GSH-PX活性及MDA含量。检测血清及肝组织SOD、GSH-PX及MDA生化试剂盒由南京建成生物工程研究所生产；血清HA、PCⅢ、Ⅳ.C放免试剂盒均由上海海研医学生物技术中心生产，在DFM-96型10管放射免疫 $\gamma$ 计数器(日本产)检测。肝组织平滑肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)试剂盒由北京中山生物技术有限公司生产，用免疫组化法检测。肝组织常规石蜡包埋切片，HE染色，光镜下观察肝脏组织病理改变。用0.1%天狼猩红苦味酸饱和溶液染色，参照文献[4]确定肝纤维化分期。

**统计学处理** 计量资料用方差分析，两样本均数之间比较用 $q$ 检验，计数资料用Kruskal-Wallis检验。

## 2 结果

**2.1 各组动物一般情况** 实验过程中，B组大鼠死亡7只，存活的小鼠体质量较A组明显减轻，毛质粗糙，日进食量明显减少，精神萎靡，动作迟钝。C组大鼠体质量增长，毛质光滑，进食良好，活泼好动，与A组相比无明显差别。

**2.2 各组动物血清和肝组织SOD、GSH-PX活性及MDA含量检测结果** 如表1所示，模型组的血清SOD、GSH-PX活性显著低于对照组，MDA含量高于对照组；但草苳蓉组的血清SOD和GSH-PX活性则显著高于模型组，MDA含量低于模型组。如表2所示，模型组的肝组织SOD、GSH-PX活性显著低于对照组，MDA含量高于对照组；但草苳蓉组的肝组织SOD和GSH-PX活性则显著高于模型组，MDA含量低于模型组。

**2.3 各组大鼠血清HA、PCⅢ及Ⅳ.C含量检测结果** 如

表 1 各组大鼠血清SOD、GSH-PX活性及MDA含量检测结果 (mean ± SD)

组别	<i>n</i>	SOD (kNU/L)	GSH-PX (活力单位/mg蛋白)	MDA (μmol/L)
A组	10	129.05 ± 18.55	173.79 ± 25.76	6.63 ± 1.05
B组	8	98.58 ± 17.36 <sup>a</sup>	117.37 ± 45.24 <sup>a</sup>	10.87 ± 1.23 <sup>a</sup>
C组	10	134.29 ± 21.93 <sup>b</sup>	171.82 ± 37.50 <sup>b</sup>	8.68 ± 2.32 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.01 vs 正常对照组; <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 模型组. A组(空白对照组), B组(模型组), C组(草苈蓉组).

表3所示, 模型组血清HA、PCIII、IV.C的含量显著高于对照组, 而草苈蓉组血清HA、PCIII、IV.C的含量则低于模型组.

2.4 各组大鼠肝脏组织病理学变化 (1)HE染色: 光镜下正常对照组大鼠未见肝细胞变性坏死, 门脉区不增宽, 未见胶原纤维增生. 模型组大鼠可见大量肝细胞变性、坏死, 大量胶原纤维增生, 伸入到肝实质中, 汇管区周围大量炎症细胞浸润, 可见含铁血黄素颗粒. 草苈蓉组大鼠肝细胞变性坏死, 胶原纤维增生及炎症细胞浸润程度较模型组明显减轻; (2)天狼猩红染色: 各组肝纤维化分期如表4所示, 草苈蓉组的肝纤维化程度比模型组明显减轻 (*P*<0.01); (3)α-SMA免疫组化染色结果: 空白对照组肝中央静脉, 小血管壁上可见少量阳性反应, 汇管区、胆囊壁周围及肝实质内为阴性反应(图A). 模型组纤维间隔及汇管区可见大量的α-SMA阳性细胞, 肝实质内也有较多阳性反应(图B). 草苈蓉组仅在汇管区及纤细的纤维间隔处仅见少量α-SMA阳性细胞, 明显少于模型组(图C).

表 3 各组大鼠血清HA、PCIII及IV.c含量检测结果 (mean ± SD)

组别	<i>n</i>	HA (μg/L)	PC III (mg/L)	IV.C (mg/L)
A组	10	186.54 ± 39.87	6.99 ± 1.55	1.18 ± 0.79
B组	8	394.83 ± 103.28 <sup>a</sup>	13.30 ± 1.88 <sup>a</sup>	2.43 ± 1.32 <sup>a</sup>
C组	10	115.87 ± 13.96 <sup>b</sup>	6.67 ± 1.86 <sup>b</sup>	1.62 ± 0.50 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.01 vs 正常对照组; <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 模型组. A组(空白对照组), B组(模型组), C组(草苈蓉组).

表 2 各组大鼠肝匀浆SOD、GSH-PX活性及MDA含量检测结果 (mean ± SD)

组别	<i>n</i>	SOD (kNU/L)	GSH-PX (活力单位/mg蛋白)	MDA (μmol/L)
A组	10	19.94 ± 5.87	22.66 ± 6.99	0.91 ± 0.25
B组	8	9.99 ± 1.69 <sup>a</sup>	12.43 ± 2.99 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.37 <sup>a</sup>
C组	10	18.99 ± 6.86 <sup>b</sup>	23.57 ± 7.19 <sup>b</sup>	0.97 ± 0.22 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.01 vs 正常对照组; <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 模型组. A组(空白对照组), B组(模型组), C组(草苈蓉组).

3 讨论

肝纤维化是各种急慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段, 是肝损伤持续存在, 组织发生修复反应时细胞外基质合成, 降解与沉积不平衡而引起的动态病理过程. 阻止这一病理过程的发生和发展对于改善各种病因的急慢性肝病的预后具有重要意义. 因此, 开发毒副作用少, 高效的抗肝纤维化药物是肝病临床研究领域的重大课题.

近年来中药抗肝纤维化的疗效及机制研究令人瞩目, 并已展示良好的应用前景<sup>[3-9]</sup>. 已有的研究提示, 天然中药草苈蓉具有清除自由基、抗脂质过氧化、抗肿瘤、抗炎、增强四氯化碳所致损伤肝枯否细胞的免疫活性等作用, 并对实验动物的急性肝损伤有治疗作用<sup>[1-3]</sup>. 本实验通过二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化模型研究表明, 草苈蓉组的肝纤维化分期明显低于模型组, 两组间差异有统计学意义 (*P*<0.01), 说明草苈蓉对DMN诱导的实验大鼠肝纤维化确有治疗作用.

表 4 各组大鼠肝纤维化分期

组别	<i>n</i>	纤维化分期				
		0	1	2	3	4
A组	10	10	0	0	0	0
B组	0	2	8	2	3	1
C组	1	10	7	1	1	0

Kruskal-Wallis检验, <sup>a</sup>*P*<0.01 vs 模型组. A组(空白对照组), B组(模型组), C组(草苈蓉组).

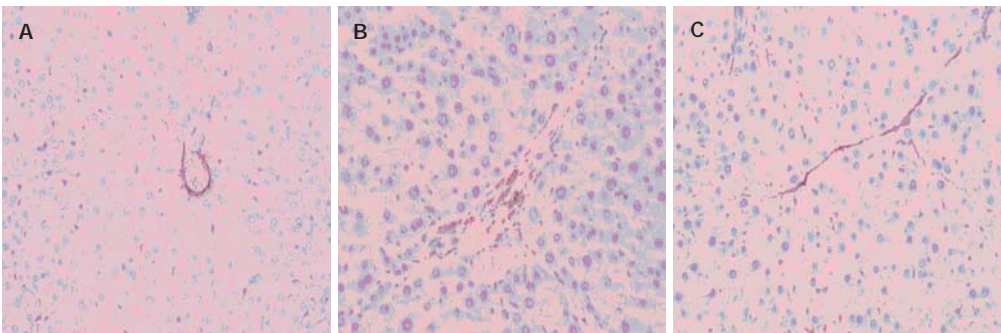


图 1 各组α-SMA免疫组化染色结果(×200). A: 空白对照组; B: 模型组; C: 草苈蓉组.



迄今研究的肝纤维化的血清标记物种类较多,其中HA、PCIII及IV.C的检测是比较常用方法<sup>[10-14]</sup>.本实验中DMN诱导的肝纤维化模型组血清HA、PCIII及IV.C含量显著升高,而草苈蓉组的HA、PCIII及IV.C的含量则显著低于模型组,从一个侧面提示草苈蓉对DMN诱导的实验大鼠肝纤维化有抑制作用.

肝细胞受损伤时,通过不同途径使肝星状细胞激活并转化为肌成纤维样细胞和成纤维细胞,合成大量的胶原等细胞外基质,并沉积于肝脏而形成肝纤维化.因此,肝星状细胞的激活是肝纤维化发生、发展的核心环节.激活的肝星状细胞的特点之一是表达 $\alpha$ -SMA,后者常作为肝星状细胞激活的标记物<sup>[15-29]</sup>.本研究中, $\alpha$ -SMA免疫组织化学染色结果显示模型组大鼠肝组织纤维间隔、汇管区及肝实质内可见大量的 $\alpha$ -SMA阳性细胞,而草苈蓉组大鼠肝组织内 $\alpha$ -SMA的表达明显减少,提示草苈蓉具有抑制肝星状细胞激活的作用.

研究表明,氧化应激可能是诱导肝星状细胞激活的重要因素之一<sup>[30-40]</sup>.本实验结果显示草苈蓉治疗组血清和肝组织SOD, GXH-PX活性明显高于模型组,MDA含量则明显低于模型组,提示草苈蓉的抗肝纤维化作用机制可能还有赖于其抗脂质过氧化物作用,从而抑制肝星状细胞的激活及胶原的增生.

肝纤维化的发生机制错综复杂,草苈蓉抗肝纤维化的机制尚不完全清楚,有必要从分子生物学水平进行更深入的研究.

#### 4 参考文献

- Piao L, Zhang XW, Jin XZ, Li SH. Effect of Boschniakia rossica extract on free radicals in brain of D-galactose induced senile rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2003;1:125-127
- Yin ZZ, Jin HL, Yin XZ, Li TZ, Quan JS, Jin ZN. Effect of Boschniakia rossica on expression of GST-P, p53 and p21 (ras) proteins in early stage of chemical hepatocarcinogenesis and its anti-inflammatory activities in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:812-818
- 李永宇, 朴熙绪, 尹宗柱, 金永日. 草苈蓉乙醇提取物对D-氨基半乳糖中毒大鼠急性肝损伤的保护作用. *延边大学医学学报* 2001;24:90-94
- 中华肝脏病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识. *中华肝脏病杂志* 2002;10:327-328
- Pan NS, Li ST, Wang Y, Li MF, Han Z. Therapeutic effect of "anti-hepatic-fibrosis 268" on hepatic fibrosis in rats. *Sichuan DaXue XueBao YiXueBan* 2004;35:528-531
- Yao L, Yao ZM, Weng H, Zhao GP, Zhou YJ, Yu T. Effect of rat serum containing Biejiajian oral liquid on proliferation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1911-1913
- Dang SS, Jia XL, Cheng YA, Chen YR, Liu EQ, Li ZF. Inhibitory effect of Huangqi Zhechong decoction on liver fibrosis in rat. *World J Gastroenterol* 2004;10:2295-2298
- Guo SG, Zhang W, Jiang T, Dai M, Zhang LF, Meng YC, Zhao LY, Niu JZ. Influence of serum collected from rat perfused with compound Biejiajuangan drug on hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1487-1494
- He YT, Liu DW, Ding LY, Li Q, Xiao YH. Therapeutic effects and molecular mechanisms of anti-fibrosis herbs and selenium on rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:703-706
- Kojima H, Hongo Y, Harada H, Inoue T, Miyaji K, Kashiwagi M, Momose T, Arisaka Y, Fukui H, Murai S, Tokita H, Kamatsukasa H, Yagura M, Katsu K. Long-term histological prognosis and serum fibrosis markers in chronic hepatitis C patients treated with interferon. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1015-1021
- Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska ME, Bauer M, Kaczmarek M, Voelker M, Schuppan D. Serum fibrosis markers as predictors of an antifibrotic effect of interferon alfa in children with chronic hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:843-848
- Serejo F, Costa A, Oliveira AG, Ramalho F, Batista A, De Moura MC. Alpha- interferon improves liver fibrosis in chronic hepatitis C: clinical significance of the serum N-terminal propeptide of procollagen type III. *Dig Dis Sci* 2001;46:1684-1689
- Deng L, Zhou Y, Peng X, Deng H, Deng Y, Yao J. Serum markers and pathological evaluation in hepatitis fibrosis of chronic hepatitis B treated with interferon alpha. *Zhonghua GanZangBing ZaZhi* 2001;9:66-67
- Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:42-48
- Khan MA, Poulos JE, Brunt EM, Li L, Solomon H, Britton RS, Bacon BR, Di Bisceglie AM. Hepatic alpha-smooth muscle actin expression in hepatitis C patients before and after interferon therapy. *Hepatogastroenterology* 2001;48:212-215
- Reynaert H, Rombouts K, Jia Y, Urbain D, Chatterjee N, Uyama N, Geerts A. Somatostatin at nanomolar concentration reduces collagen I and III synthesis by, but not proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 2005;146:77-88
- Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005;166:1655-1669
- Chen YW, Wu JX, Chen YW, Li DG, Lu HM. Tetrandrine inhibits activation of rat hepatic stellate cells in vitro via transforming growth factor-beta signaling. *World J Gastroenterol* 2005;11:2922-2926
- Miyazaki T, Karube M, Matsuzaki Y, Ikegami T, Doy M, Tanaka N, Bouscarel B. Taurine inhibits oxidative damage and prevents fibrosis in carbon tetrachloride- induced hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2005;43:117-125
- Hsu YC, Lin YL, Chiu YT, Shiao MS, Lee CY, Huang YT. Antifibrotic effects of Salvia miltiorrhiza on dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2005;12:185-195
- Chang XM, Chang Y, Jia A. Effects of interferon-alpha on expression of hepatic stellate cell and transforming growth factor-beta1 and alpha-smooth muscle actin in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005;11:2634-2636
- Yao XX, Jiang SL, Tang YW, Yao DM, Yao X. Efficacy of Chinese medicine Yi-gan-kang granule in prophylaxis and treatment of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:2583-2590
- Li T, Leng XS, Qin ZZ, Song SH, Zhao L, Xiong LF, Peng JR. Regulation of hepatic stellate cell activation by interleukin-10/platelet derived growth factor/mitogen-activated protein kinase pathway. *Zhonghua GanZangBing ZaZhi* 2005;13:35-37
- Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Ikenaka Y, Yoshii J, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Masaki T, Fukui H. Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G907-913
- Fiorucci S, Antonelli E, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pellicciari R, Morelli A. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004;127:1497-1512
- Wang X, Tang X, Gong X, Albanis E, Friedman SL, Mao Z. Regulation of hepatic stellate cell activation and growth by transcription factor myocyte enhancer factor 2. *Gastroenterology* 2004;127:1174-1188



- 27 Parsons CJ, Bradford BU, Pan CQ, Cheung E, Schauer M, Knorr A, Krebs B, Kraft S, Zahn S, Brocks B, Feirt N, Mei B, Cho MS, Ramamoorthi R, Roldan G, Ng P, Lum P, Hirth-Dietrich C, Tomkinson A, Brenner DA. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. *Hepatology* 2004;40:1106-1115
- 28 Jiang HQ, Zhang XL, Liu L, Yang CC. Relationship between focal adhesion kinase and hepatic stellate cell proliferation during rat hepatic fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 2004;10:3001-3005
- 29 Liu QH, Li DG, Huang X, Zong CH, Xu QF, Lu HM. Suppressive effects of 17beta-estradiol on hepatic fibrosis in CCl4-induced rat model. *World J Gastroenterol* 2004;10:1315-1320
- 30 Lee KS, Lee SJ, Park HJ, Chung JP, Han KH, Chon CY, Lee SI, Moon YM. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. *Yonsei Med J* 2001;42:1-8
- 31 Dai K, Qi JY, Tian DY. Leptin administration exacerbates thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *World J Gastroenterol* 2005;11:4822-4826
- 32 Zhang X, Ma C, Guan L, Quan Y. Experimental study on Sorbaria sorbifolia extract against chronic liver damage in rats. *ZhongYao Cai* 2004;27:751-753
- 33 Salem TA, El-Refaei MF, Badra GA. Study of antioxidant enzymes level and phagocytic activity in chronic liver disease patients. *Egypt J Immunol* 2003;10:37-45
- 34 Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Ferlazzo AM, Calatroni A. The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis. *Chem Biol Interact* 2004;148:125-138
- 35 Refik Mas M, Comert B, Oncu K, Vural SA, Akay C, Tasci I, Ozkomur E, Serdar M, Mas N, Alcigir G, Yener N. The effect of taurine treatment on oxidative stress in experimental liver fibrosis. *Hepato Res* 2004;28:207-215
- 36 Chari S, Gupta M. Status of blood antioxidant enzymes in alcoholic cirrhosis. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003;47:343-346
- 37 Zhao YY, Liu FZ, Yang XP. Experimental study on the anti-liver fibrosis effect of guzhang tablet in rats. *Zhongguo ZhongXiYi JieHe ZaZhi* 2003;23:922-925
- 38 Shi GF, Li Q. Effects of oxymatrine on experimental hepatic fibrosis and its mechanism in vivo. *World J Gastroenterol* 2005;11:268-271
- 39 Lu G, Shimizu I, Cui X, Itonaga M, Tamaki K, Fukuno H, Inoue H, Honda H, Ito S. Antioxidant and antiapoptotic activities of idoxifene and estradiol in hepatic fibrosis in rats. *Life Sci* 2004;74:897-907
- 40 Guo MZ, Li XS, Shen DM, Guan XQ, Xu HR, Gao J. Effect of Rhein on the development of hepatic fibrosis in rats. *Zhonghua GanZangBing ZaZhi* 2003;11:26-29

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 消息 •

## 首届北京地坛感染病学术会议

**本刊讯** 为庆祝建院 60 周年, 北京地坛医院决定于 2006-03-02/04 在北京召开全国性的“首届北京地坛感染病学术会议”, 预计全国的同行 500 人参加这次重要的会议。会议邀请了 40 余位我国德高望重、年富力强的感染病专家作专题学术讲演。

### 1 会议征稿内容

这次感染病学术会议征文的内容包括病毒性肝炎、HIV/AIDS、各种传染性疾病和感染性疾病, 抗生素的合理使用, 也包括新发/复燃的传染病。论文全文和摘要请发到电子信箱: [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn); 或 [hy@genetherapy.com.cn](mailto:hy@genetherapy.com.cn)。

### 2 与会专家名单

首届北京地坛感染病学术会议邀请的专题报告专家(按照汉语拼音排序)有: 白雪帆, 陈智, 陈志海, 成军, 段钟平, 窦晓光, 范小玲, 高志良, 郭利民, 侯金林, 贾继东, 郎振为, 李长青, 李兰娟, 李太生, 李兴旺, 刘沛, 刘庄, 伦文辉, 毛羽, 缪晓辉, 穆毅, 宁琴, 牛俊奇, 任红, 施光峰, 斯崇文, 谭德明, 唐红, 唐小平, 万谟彬, 王风水, 王福生, 王贵强, 王磊, 王玲, 王宇明, 王宪波, 魏红山, 魏来, 翁心华, 谢青, 谢雯, 谢尧, 邢卉春, 徐道振, 杨东亮, 杨钧, 袁正宏, 赵红心, 庄辉

### 3 联系方式

首届北京地坛感染病学术会议组织委员会主席为成军教授。地址: 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 邮编: 100011; 电话: 010-64481639; 传真: 010-64481639。Email: [cj@genetherapy.com.cn](mailto:cj@genetherapy.com.cn)

欢迎全国感染病学界的各位专家和同仁来北京参加这次盛会。

# 树突状细胞在黏膜免疫模型鼠体内的分布及趋化因子的表达

谢遵江, 贺业春, 贾立敏, 刘颖, 刘丽

谢遵江, 贺业春, 贾立敏, 刘颖, 刘丽, 哈尔滨医科大学解剖学教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086

谢遵江, 男, 1964-02-19生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 2004年人体解剖学博士, 教授, 主要从事肠道黏膜免疫研究。

黑龙江省自然科学基金资助项目, No. D0234

通讯作者: 谢遵江, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学解剖学教研室: xiejz555@hotmail.com

电话: 0451-86674508-8001

收稿日期: 2005-07-28 接受日期: 2005-08-03

## Distribution of dendritic cells and expression of chemokines in mouse models of mucosal immune *in vivo*

Zun-Jiang Xie, Ye-Chun He, Li-Min Jia, Ying Liu, Li Liu

Zun-Jiang Xie, Ye-Chun He, Li-Min Jia, Ying Liu, Li Liu, Department of Anatomy, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D0234

Correspondence to: Zun-Jiang Xie, Department of Anatomy, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. xiejz555@hotmail.com

Received: 2005-07-28 Accepted: 2005-08-03

## Abstract

**AIM:** To investigate the migration, distribution and morphological characteristics of dendritic cells (DCs) and the expression of chemokines in the mouse models of mucosal immune.

**METHODS:** The distribution and morphological characteristics of DCs in the mouse models were observed by light microscopy, immunohistochemical method, and in situ hybridization staining. The expression of S-100 protein, monocyte chemotactic protein-1(MCP-1), regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted chemokine (Rantes), macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ (MIP-1 $\beta$ ) mRNA and C-C chemokine receptor 7(CCR7) mRNA were analyzed.

**RESULTS:** The *in vivo* DCs were mainly located in the mesenteric lymph node(MLN), Peyer's Patch(PP), and tissues of gut in the mouse model of mucosal immune. The number of DCs was significantly larger in the model group than that in the controls( $35.32 \pm 3.17$  vs  $15.03 \pm 1.81$ ,  $29.14 \pm 2.03$  vs  $11.35 \pm 0.97$ ,  $27.96 \pm 1.97$  vs  $9.86 \pm 0.82$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of MCP-1, Rantes, MIP-1 $\beta$ mRNA and CCR7 mRNA in the muco-

sal immune mice were significantly increased, and their number and area densities were markedly higher than those the controls.

**CONCLUSION:** The *in vivo* DCs can migrate and gather to the MLN, PP and gut in the mucosal immune mice, and the expression of MCP-1, Rantes, MIP-1 $\beta$ mRNA and CCR7 mRNA are significantly elevated.

**Key Words:** Dendritic cells; Chemokine; Mucosal immune mouse model

Xie ZJ, He YC, Jiao LM, Liu Y, Liu L. Distribution of dendritic cells and expression of chemokines in mouse models of mucosal immune *in vivo*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(18):2210-2212

## 摘要

**目的:** 研究小鼠树突状细胞(DC)在体内的迁移、分布、形态特征及趋化因子的表达情况, 探讨趋化因子在黏膜免疫模型鼠体内的表达及其在DC迁移过程中的调控作用。

**方法:** 采用光镜、免疫组织化学和原位杂交染色方法, 观察肿瘤模型鼠中DC的分布和形态学特征; 分析S-100蛋白、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、T细胞特异性趋化因子(Rantes)、巨噬细胞炎性蛋白-1 $\beta$ (MIP-1 $\beta$ )和趋化因子受体7 (CCR7)的表达情况, 并与对照组进行比较。

**结果:** 在黏膜免疫模型小鼠体内的DC主要分布于肠系膜淋巴结(MLN)、集合淋巴小结(PP)和胃肠(GUT), 与对照组数量比较有显著差异, ( $35.32 \pm 3.17$  vs  $15.03 \pm 1.81$ ,  $29.14 \pm 2.03$  vs  $11.35 \pm 0.97$ ,  $27.96 \pm 1.97$  vs  $9.86 \pm 0.82$ ,  $P < 0.01$ ) 其MCP-1, Rantes, MIP-1 $\beta$ 和CCR7表达明显增高, 分别与对照组数密度和面密度比较有显著差异。

**结论:** 在黏膜免疫模型小鼠体内的DC可向肠系膜淋巴结、集合淋巴小结和胃肠等器官迁移和聚集; MCP-1, Rantes, MIP-1 $\beta$ 和CCR7表达均明显升高。

**关键词:** 树突状细胞; 趋化因子; 黏膜免疫鼠模型

谢遵江, 贺业春, 贾立敏, 刘颖, 刘丽. 树突状细胞在黏膜免疫模型鼠体内的分布及趋化因子表达的研究. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2210-2212  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2210.asp>

## 0 引言

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前已知功能最强的专职性抗原递呈细胞, 已成为近年来免疫学研究的热点<sup>[1-3]</sup>. 我们通过观察体内DC在黏膜免疫状态下的分布和形态学特征, 以及趋化因子的表达与DC在体内迁移过程中的调控关系, 从而为进一步研究DC的功能提供形态学基础, 为揭示肠黏膜免疫机制提供理论依据, 从而为经口免疫疫苗和新药的研制和开发提供广阔前景.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 兔抗小鼠S-100蛋白一抗, 兔抗小鼠Rantes一抗, 兔抗小鼠MCP-1一抗, 羊抗兔SABC免疫组化试剂盒, MIP-1 $\beta$ 原位杂交检测试剂盒及CCR7原位杂交检测试剂盒, 均购自博士德生物工程有限公司. BALB/c小鼠35只, 雌雄各半, 体质量18-22 g, 周龄6-8 wk, 无菌环境饲养, 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供. 伤寒杆菌(TH)活菌悬液由哈尔滨医科大学微生物学教研室提供.

**1.2 方法** 经适应性无菌饲养3 d后进行第1次免疫, 实验组30只小鼠经口灌入 $10^{11}$ 个菌/L伤寒杆菌悬液0.0 004 L, 经无菌饲养7 d后, 进行第2次灌注, 剂量和方法与第1次相同. 对照组(5只)小鼠经口灌入无菌生理盐水0.0 004 L. 第2次灌服后7 d的小鼠即为黏膜免疫模型鼠<sup>[5]</sup>. 第2次灌服后7 d的30只实验组小鼠和正常对照组5只小鼠经脱颈椎全部处死, 分别取肠系膜淋巴结、集合淋巴小结、胃和空回肠, 经40 g/L多聚甲醛固定, 常规免疫组织化学染色, 一抗采用兔抗小鼠S-100蛋白, 兔抗小鼠Rantes, 兔抗小鼠MCP-1. 对S-100蛋白免疫组织化学染色切片进行观察, 选择阳性细胞最多处, 在5个高倍视野( $\times 132$ )进行阳性细胞计数, 计算出平均值和标准差. 另常规原位杂交染色, 按MIP-1 $\beta$ 原位杂交检测试剂盒和CCR7原位杂交检测试剂盒说明书操作. 对MCP-1和Rantes免疫组织化学染色切片和MIP-1 $\beta$ 和CCR7原位杂交染色切片进行观察, 分别随机各抽取20张切片, 每张切片随机取2个高倍视野( $\times 132$ ), 输入图像分析软件处理系统(北航图像中心), 在显示器的图片中分别统计其数量分布(数密度)和所占的面积(面密度), 分别计算数密度和面密度平均值和标准差.

**统计学处理** 经 $t$ 检验统计学处理.

## 2 结果

**2.1 黏膜免疫模型鼠体内DC的分布** 经S-100蛋白免疫组织化学染色, 可见被染成棕黄色的DC在肠系膜淋巴结(MLN)内主要分布于髓窦和副皮质区, DC的胞质和突起着色明显, 细胞似圆形, 细胞表面可见刺状突

起. DC在集合淋巴小结(PP)内散在于淋巴小结中, DC的胞质和突起被染成棕黄色. 在胃肠(GUT)内DC主要存在于黏膜层和黏膜下层. 黏膜层内可见散在分布的胞体较小的DC. 在实验组S-100蛋白表达数量明显增多, 分别与对照组比较, 有显著差异( $P < 0.01$ , 表1).

**2.2 MCP-1的表达免疫组织化学染色显示** MCP-1主要表达于DC、淋巴细胞和巨噬细胞. 在肠系膜淋巴结(MLN), MCP-1主要分布于副皮质区和髓窦内, 阳性

表1 黏膜免疫模型鼠体内DC的数量比较 (mean  $\pm$  SD)

分组	PP	GUT
实验组 <sup>a</sup>	35.32 $\pm$ 3.17 <sup>b</sup>	27.96 $\pm$ 1.97 <sup>b</sup>
对照组	11.351 $\pm$ 0.0397	19.886 $\pm$ 0.82

<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

表达细胞被染成棕黄色, 数量较多; 在集合淋巴小结(PP), 分布于圆顶区, 阳性表达细胞散在于圆顶区上皮细胞之间; 在胃肠, 主要分布于黏膜层和黏膜下层, 于黏膜层和黏膜固有层可见阳性表达细胞. 黏膜免疫状态下, MCP-1表达明显增高, 分别与对照组比较, 分布数密度(面密度)有显著差异( $P < 0.01$ , 表2).

**2.3 Rantes的表达免疫组织化学染色显示** Rantes主要表达于DC、淋巴细胞和巨噬细胞. 在肠系膜淋巴结(MLN), Rantes主要分布于副皮质区和髓窦内. 阳性表达细胞散在分布于淋巴结内, 数量较多; 在集合淋巴小结(PP), 分布于圆顶区. 阳性反应细胞主要分布于上皮细胞之间, 呈星形; 在胃肠(GUT), 主要分布在黏膜层和黏膜下层. 阳性反应细胞散在分布于黏膜层上皮细胞之间. Rantes在实验组MLN、PP和GUT中表达明显增高, 在对照组极少表达, 二者分别比较, 分布数密度(面密度)有显著差异( $P < 0.01$ , 表2).

**2.4 MIP-1 $\beta$ mRNA的表达原位杂交染色显示** MIP-1 $\beta$ mRNA主要表达于DC、淋巴细胞和巨噬细胞. 在肠系膜淋巴结(MLN), MIP-1 $\beta$ mRNA主要分布于副皮质区和髓窦内. 阳性表达细胞数量较多, 较广泛地分布于淋巴结内; 在集合淋巴小结(PP), 阳性反应细胞存在于圆顶区; 在胃肠(GUT), 主要分布于黏膜层和黏膜下层. 于黏膜下层可见数量较多的阳性表达细胞. MIP-1 $\beta$ mRNA在黏膜免疫状态下表达明显增高, 分别与对照组比较, 分布数密度(面密度)有显著差异( $P < 0.01$ , 表2).

**2.5 CCR7mRNA的表达原位杂交染色显示** CCR7mRNA主要表达于DC、淋巴细胞和巨噬细胞. 在肠系膜淋巴结(MLN), CCR7mRNA主要分布于副皮质区和髓窦. 在副皮质区内有数量较多的散在分布的阳性反应细胞; 在集合淋巴小结(PP), 存在于淋巴小结和圆顶区. 阳性反应细胞散在于淋巴小结内及血管周围, 数量较多; 在胃肠(GUT), 阳性反应细胞主要分布于黏膜层和黏膜下层, 数量多, 分布广泛. CCR7mRNA在黏



表 2 黏膜免疫模型鼠MCP-1, Rantes, MIP-1 $\beta$ , CCR7表达数密度(面密度)(mean  $\pm$  SD)

分 组		MLN	PP	GUT
MCP-1	实验组	2.57 $\pm$ 0.37 (2.13 $\pm$ 0.25) <sup>b</sup>	1.89 $\pm$ 0.83 (1.58 $\pm$ 0.79) <sup>b</sup>	3.10 $\pm$ 0.47 (1.71 $\pm$ 0.81) <sup>b</sup>
	对照组	0.51 $\pm$ 0.19 (0.37 $\pm$ 0.06)	0.41 $\pm$ 0.16 (0.27 $\pm$ 0.05)	0.74 $\pm$ 0.19 (0.41 $\pm$ 0.07)
Rantes	实验组	2.19 $\pm$ 0.26 (1.92 $\pm$ 0.88) <sup>b</sup>	1.01 $\pm$ 0.49 (0.78 $\pm$ 0.21) <sup>b</sup>	1.29 $\pm$ 0.51 (0.77 $\pm$ 0.23) <sup>b</sup>
	对照组	0.38 $\pm$ 0.07 (0.29 $\pm$ 0.06)	0.13 $\pm$ 0.04 (0.08 $\pm$ 0.07)	0.27 $\pm$ 0.05 (0.07 $\pm$ 0.03)
MIP-1 $\beta$	实验组	2.03 $\pm$ 0.31 (1.66 $\pm$ 0.71) <sup>b</sup>	0.98 $\pm$ 0.18 (0.76 $\pm$ 0.21) <sup>b</sup>	3.48 $\pm$ 0.53 (3.17 $\pm$ 0.49) <sup>b</sup>
	对照组	0.53 $\pm$ 0.29 (0.28 $\pm$ 0.07)	0.19 $\pm$ 0.06 (0.08 $\pm$ 0.01)	0.81 $\pm$ 0.22 (0.74 $\pm$ 0.17)
CCR7	实验组	5.81 $\pm$ 2.01 (4.63 $\pm$ 0.82) <sup>b</sup>	3.79 $\pm$ 0.66 (3.64 $\pm$ 0.63) <sup>b</sup>	2.78 $\pm$ 0.44 (2.17 $\pm$ 0.41) <sup>b</sup>
	对照组	1.01 $\pm$ 0.27 (0.92 $\pm$ 0.21)	0.73 $\pm$ 0.11 (0.64 $\pm$ 0.13)	0.50 $\pm$ 0.07 (0.49 $\pm$ 0.19)

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

膜免疫状态下于实验组MLN、PP和GUT中强阳性表达, 对照组表达较弱, 两者比较, 分布数密度(面密度)有显著差异( $P < 0.01$ , 表2).

### 3 讨论

DC是一组形态、结构和功能异质性的专职的抗原递呈细胞, 广泛分布于血液、肝脏、脾脏、淋巴结及其他非淋巴组织<sup>[4]</sup>. 谢遵江 *et al*<sup>[5-7]</sup>在成功建立黏膜免疫鼠模型的基础上, 对上皮内、黏膜固有层、集合淋巴小结和肠系膜淋巴结内淋巴细胞进行研究, 提出在抗原诱导下, 淋巴细胞可向上皮内、黏膜固有层、集合淋巴小结和肠系膜淋巴结内迁移. Henderson *et al*<sup>[8]</sup>报道细菌感染可激活DC并使DC成熟, 这种激活作用明显有利于DC的迁移和抗原的递呈<sup>[9-12]</sup>. 我们通过S-100蛋白免疫组织化学染色, 观察到实验组肠系膜淋巴结、集合淋巴小结和胃肠内DC的数量比对照组明显增多( $P < 0.01$ ), 因此证明了在抗原刺激诱导下, 体内的DC有向淋巴组织和非淋巴组织迁移和聚集特性的结论. 趋化因子和趋化因子受体在树突状细胞迁移和集聚中起着关键性作用. 在炎症介质诱导下, MIP-1 $\beta$ , MCP-1和Rantes表达上调. MIP-1 $\beta$ 和Rantes在趋化成熟DC进入淋巴器官T细胞区的关键作用, 在SLC缺陷鼠中进一步得到证实<sup>[13]</sup>, 在这种模型鼠中, DC经皮下注射和接触致敏均不能在淋巴器官聚集, 因而提示MIP-1 $\beta$ 和Rantes有趋化DC迁移和聚集的作用<sup>[14, 15]</sup>. 我们观察到趋化因子MIP-1 $\beta$ , MCP-1, Rantes和CCR7在黏膜免疫模型鼠中表达明显增高, 与对照组比较有显著差异( $P < 0.01$ ). 提示这些趋化因子有趋化DC向淋巴组织和非淋巴组织迁移和集聚的作用, 同时也表明, DC在成熟和迁移过程中, 这些趋化因子的表达上调.

总之, 在DC迁移过程中, MIP-1 $\beta$ , MCP-1, Rantes和CCR7表达增高, 提示这些相关因子在DC迁移过程中, 起关键性的调控作用. 因此, 促进MIP-1 $\beta$ ,

MCP-1, Rantes特别是CCR7的高表达, 将为树突状细胞抗感染治疗提供一个新的方向, 同时也为开发新的疫苗和免疫因子治疗提供依据.

### 4 参考文献

- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137:1142-1162
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252
- 冯志华, 李军. 树突状细胞与丙型肝炎病毒感染研究. *世界华人消化杂志* 2005;13:588-591
- Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 1999;399:789-793
- 谢遵江, 刘文庆, 方传龙, 贺业春, 张湛波. 伤寒杆菌和柯萨奇病毒诱导小鼠肠道黏膜免疫应答的实验研究. *解剖科学进展* 2001;7: 122-125
- 谢遵江, 刘文庆, 贺业春, 张湛波, 赵英. 小鼠肠上皮内淋巴细胞在黏膜免疫应答中的形态学研究. *解剖学报* 1997;28:309-314
- 谢遵江, 刘文庆, 方传龙, 刘颖, 张湛波, 贺业春. 小鼠回肠集合淋巴小结在黏膜免疫应答中的形态学研究. *哈尔滨医科大学学报* 2001;35:339-341
- Henderson RA, Watkins SC, and Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1997;159:635-643
- Austrup F, Vestweber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Herz U. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 1997;385:81-83
- Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999;5:405-411
- Sallusto F, Mackay CR, and Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000;18:593-620
- McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* 1994;179:1331-1336
- Forster R, Schubel A, Breitfeld D. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999;99:23-33
- Zernecke A, Weber KS, Erwig LP. Combinatorial model of chemokine involvement in glomerular monocyte recruitment: role of CXC chemokine receptor 2 infiltration during nephrotoxic nephritis. *J Immunol* 2001;166:5755-5762
- Banas B, Wornle M, Berger T. Role of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for esangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis. *J Immunol* 2002;168:4301-4307

## 塞来昔布对胃癌细胞生长及 ERK2 表达的影响

张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏

张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083

张勇, 男, 1967-12-13生, 重庆市璧山县人, 汉族, 1995年第三军医大学硕士, 副主任医师. 发表文章30篇, 主要从事功能性胃肠疾病及胃癌的基础与临床研究.

通讯作者: 张勇, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科. zhangyo@163.com  
电话: 028-86570349

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-07-28

### Effects of celecoxib on cell proliferation and ERK2 expression of ERK2 in gastric cancer cells

Yong Zhang, Ming-De Jiang, Wei-Zheng Zeng, Hui-Xu, Bi-Jun Xiong, Min-Weng

Yong Zhang, Ming-De Jiang, Wei-Zheng Zeng, Hui-Xu, Bi-Jun Xiong, Min-Weng, Department of Gastroenterology, General Hospital, Chengdu Military Command of Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Correspondence to: Yong-Zhang, Department of Gastroenterology, General Hospital, Chengdu Military Command of Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. zhangyo@163.com

Received: 2005-07-19 Accepted: 2005-07-28

### Abstract

**AIM:** To explore the role of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, in the proliferation of human gastric carcinoma cells SGC7901, and to investigate the relationship between cell proliferation and the expression of extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2).

**METHODS:** The cell proliferation of SGC7901 cells was measured by MTT assay, and the apoptotic rate of the cells was examined by TUNEL staining method and flow cytometry. The expression of phosphorylated ERK2 was detected by immunohistochemistry and quantified measured by image analysis systems.

**RESULTS:** Celecoxib inhibited the proliferation of SGC7901 gastric carcinoma cells and the expression of phosphorylated ERK2, as well as induced the apoptosis of the SGC-7901 cells in a dose-dependent manner. The growth inhibitory rates of SGC-7901 cells treated with 10, 20, 40, 80 and, 160  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib for 48 h were 9.8%, 30%, 58.9%, 76.3%, and 88.3%, respectively. The SGC7901 cells presented typical morphological features of apoptosis by TUNEL staining. By

flow cytometry, the apoptotic rates of SGC-7901 cells ( $4.23 \pm 0.81\%$ ,  $15.50 \pm 2.10\%$ ,  $24.35 \pm 2.32\%$ ,  $31.52 \pm 3.64\%$ , and  $45.82 \pm 5.92\%$  for 10, 20, 40, 80 and 160  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib, respectively) were significantly higher than those of the control group ( $1.85 \pm 0.31\%$ ,  $P < 0.01$ ). The optical density value of ERK2 of SGC7901 cells (10, 20, 40, 80 and 160  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib:  $2.96 \pm 0.24$ ,  $P > 0.05$ ;  $2.56 \pm 0.24$ ,  $P < 0.05$ ;  $2.04 \pm 0.20$ ,  $P < 0.01$ ;  $1.68 \pm 0.16$ ,  $P < 0.01$ ;  $1.52 \pm 0.09$ ,  $P < 0.01$ ) were significantly lower than that of the control group ( $3.32 \pm 0.28$ ).

**CONCLUSION:** Celecoxib can inhibit the growth and induce the apoptosis of SGC7901 cells, and its mechanism may and induce the cell apoptosis. This effect may relate to the inhibition of ERK2 kinase signaling pathway.

**Key Words:** Celecoxib; Extracellular signal-regulated kinase 2; Gastric adenocarcinoma cells SGC7901

Zhang Y, Jiang MD, Zeng WZ, Xu H, Xiong BJ, Weng M. Effects of celecoxib on cell proliferation and ERK2 expression of ERK2 in gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2213-2216

### 摘要

**目的:** 观察选择性环氧合酶-2抑制剂塞来昔布对胃癌细胞株SGC7901增殖的影响, 及细胞增殖与细胞外信号调节激酶2 (ERK2) 表达的关系。

**方法:** MTT法检测塞来昔布对胃癌细胞生长的影响; TUNEL法及流式细胞仪检测细胞凋亡率; 免疫组化(SP法)检测细胞磷酸化ERK2表达, 图像分析系统计量。

**结果:** 塞来昔布呈剂量依赖方式抑制胃癌细胞的生长, 诱导细胞凋亡, 抑制胃癌细胞磷酸化ERK2表达。塞来昔布10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{mol/L}$ 作用48 h后其胃癌细胞生长抑制率分别为9.8%, 30%, 58.9%, 76.3%, 88.3%; TUNEL染色显示胃癌细胞具有典型的凋亡细胞形态学特征; 流式细胞仪显示胃癌细胞凋亡率( $4.23 \pm 0.81\%$ ,  $15.5 \pm 2.1\%$ ,  $24.35 \pm 2.32\%$ ,  $31.52 \pm 3.64\%$ ,  $45.82 \pm 5.92\%$ )显著高于对照组( $1.85 \pm$

0.31%,  $P < 0.01$ ); 其磷酸化ERK2平均吸光度( $2.96 \pm 0.24$ ,  $P > 0.05$ ;  $2.56 \pm 0.24$ ,  $P < 0.05$ ;  $2.04 \pm 0.20$ ,  $P < 0.01$ ;  $1.68 \pm 0.16$ ,  $P < 0.01$ ;  $1.52 \pm 0.09$ ,  $P < 0.01$ )显著低于对照组( $3.32 \pm 0.28$ )。

**结论:** 塞来昔布抑制胃癌细胞增殖并诱导细胞凋亡, 这可能与抑制ERK2信号传导通路有关。

**关键词:** 塞来昔布; 细胞外信号调节激酶2; 胃癌细胞株SGC790

张勇, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 熊碧君, 翁敏. 塞来昔布对胃癌细胞生长及ERK2表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2213-2216  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2213.asp>

## 0 引言

非甾体类抗炎药(NSAID)可降低胃肠道肿瘤的发生率<sup>[1]</sup>. NSAID抗肿瘤作用的机制除了与其抑制环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)活性有关外, 还通过其它途径发挥抗肿瘤作用<sup>[2-5]</sup>. 细胞外刺激引起细胞反应是通过细胞内信号传导途径来实现的, 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK) 信号传导通路家族成员之一, 参与细胞外信号传递至细胞核的过程, 与细胞的增殖、分化及肿瘤的发生有关. 关于NSAID对胃癌细胞ERK信号传导通路的影响目前报道很少. 为此, 我们观察了选择性COX-2抑制剂塞来昔布(celecoxib)对人胃癌细胞株SGC7901的增殖、凋亡作用及其对磷酸化ERK2表达的影响如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胃腺癌细胞株SGC7901由第三军医大学西南医院消化实验室惠赠. RPMI1640培养液、SP试剂盒购自北京华美公司; 小牛血清, MTT购自Gibco公司, 二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司, 塞来昔布购自安徽合肥森瑞公司, TUNEL试剂盒购自武汉博士德公司, 美国Image-Pro Plus专业图像软件分析系统. 胃癌细胞株SGC7901常规培养于含100 mL/L小牛血清,  $1 \times 10^5$  U/L青霉素及链霉素的RPMI1640培养液中, 置于37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱内培养。

**1.2 方法** 取对数生长期的SGC7901细胞按每孔 $4 \times 10^3$ 个细胞接种于96孔板中, 24 h后换液, 加入不同浓度的塞来昔布, 终浓度分别为10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{mol/L}$ ; 继续培养48 h, 每一浓度点重复3孔, 每孔加入5 g/L MTT液20  $\mu\text{L}$ , 37℃孵育4 h后弃去上清液, 每孔加入DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 轻轻振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 在570 nm波长酶联免疫检测仪上测定各孔吸光

度A值, 并计算细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组平均A值/对照组平均A值)×100%. 设只加等体积溶剂DMSO的对照组. 另取对数生长期细胞以 $1 \times 10^8/\text{L}$ 密度接种于6孔板中, 培养24 h后加入不同浓度塞来昔布(剂量同MTT法), 48 h后按TUNEL试剂盒说明操作. 凋亡指数计算方法: 在高倍视野(400×)下, 随机选5个视野, 分别计数200个细胞及其中的凋亡细胞数. 凋亡指数=凋亡细胞数/总细胞数×100%. 以上试验重复3次. 再取不同浓度塞来昔布作用SGC7901细胞48 h后的各组细胞, 用700 mL/L冷乙醇1.5 mL固定1 h, PBS漂洗混匀细胞, 加入含RNA酶A的碘化吡啶染料, 避光1 h, 上机检测细胞周期. 以上实验重复3次, 取其平均值. 再取不同浓度塞来昔布作用SGC7901细胞48 h后的各组细胞(细胞数 $\geq 1 \times 10^6$ )细胞爬片, PBS洗后950 mL/L乙醇固定30 min, 采用常规SP法, 细胞爬片依次用5 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/甲醇 30 min, 正常羊血清室温封闭15 min, 滴加一抗, 37℃孵育2 h, 滴加生物素化二抗37℃孵育15 min, 滴加SP复合物37℃ 15 min, DAB显色, 苏木精复染、脱水、透明、封片, 光镜下观察, 图像分析仪分析, 用平均吸光度表示P-ERK相对表达量. 以上实验重复3次, 取其均值。

**统计学处理** 实验数据采用SPSS10.0统计分析软件进行t检验, 所有数值以mean±SD表示,  $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MTT结果** 塞来昔布能明显抑制胃癌细胞增殖, 呈剂量依赖性. 0, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布对胃癌细胞的抑制率分别为0%, 9.8%, 30%, 58.9%, 76.3%, 88.3%。

**2.2 塞来昔布对胃癌细胞凋亡的影响** TUNEL染色显示塞来昔布作用于胃癌细胞48 h后, 见典型的凋亡细胞, 现为细胞体积缩小、核固缩深染、凋亡小体形成(图1). 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布作用48 h后胃癌细胞凋亡指数分别为( $3.2 \pm 0.8$ )%, ( $13.0 \pm 2.1$ )%, ( $21.5 \pm 2.2$ )%, ( $29.2 \pm 3.8$ )%, ( $45.8 \pm 4.7$ )%, 较对照组( $0.5 \pm 0.3$ )%显著增加( $P < 0.01$ ), 提示塞来昔布呈剂量依赖方式诱导胃癌细胞SGC7901凋亡。

**2.3 胃癌细胞周期** 随药物剂量的增加, 细胞凋亡率明显增加, 与TUNEL染色结果相近; 对细胞周期分布的表现为G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例增高, S期细胞比例降低(表1)。

**2.4 胃癌细胞磷酸化ERK2** 胃癌细胞磷酸化ERK2表达主要定位于细胞核内, 细胞质有少量表达, 染成棕黄色(图2). 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布作用48 h后其胃癌细胞磷酸化ERK2的平均吸光度分别为 $2.96 \pm 0.24$  ( $P > 0.05$ ),  $2.56 \pm 0.24$  ( $P < 0.05$ ),  $2.04 \pm 0.20$  ( $P < 0.01$ ),  $1.68 \pm 0.16$  ( $P < 0.01$ ),  $1.52 \pm 0.09$  ( $P < 0.01$ ), 显著



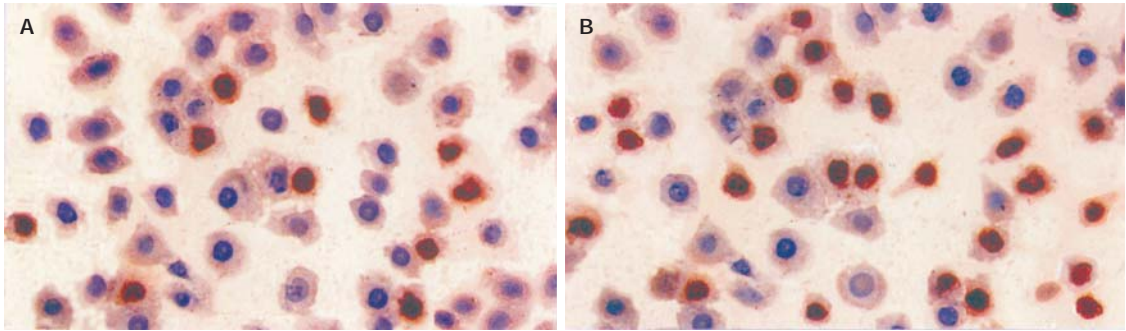


图1 塞来昔布组胃癌细胞凋亡 (TUNEL X400) A: 40 μmol/L B: 160 μmol/L.

表1 塞来昔布对胃癌细胞周期及凋亡的影响

μmol/L		凋亡率	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	1.85 ± 0.31	45.43 ± 2.81	43.51 ± 5.35	11.06 ± 1.02	
10	4.23 ± 0.81 <sup>b</sup>	48.53 ± 2.79	41.56 ± 4.76	9.91 ± 0.95	
20	15.50 ± 2.10 <sup>b</sup>	56.68 ± 3.84 <sup>a</sup>	35.48 ± 3.96	7.84 ± 1.01	
40	24.35 ± 2.32 <sup>b</sup>	65.40 ± 5.53 <sup>b</sup>	28.23 ± 3.67 <sup>a</sup>	6.37 ± 0.89	
80	31.52 ± 3.64 <sup>b</sup>	70.98 ± 5.58 <sup>b</sup>	24.16 ± 2.45 <sup>b</sup>	4.86 ± 0.75	
160	45.82 ± 5.92 <sup>b</sup>	74.90 ± 6.65 <sup>b</sup>	21.95 ± 1.82 <sup>b</sup>	3.15 ± 0.82	

<sup>b</sup>*P*<0.01, <sup>a</sup>*P*<0.05 vs 0 mmol/L.

低于对照组 $3.32 \pm 0.28$ , 随着塞来昔布剂量增加, 其核内磷酸化ERK2表达逐渐减少. 说明塞来昔布能抑制胃癌细胞ERK2磷酸化, 阻止其向核内移位.

3 讨论

NSAID能使结肠癌的发生率降低40~50%<sup>[1]</sup>. NSAID的作用靶点—COX-2在胃癌有较高表达<sup>[6-10]</sup>, NSAID能抑制体外培养的胃癌细胞COX-2的表达及细胞增殖<sup>[11, 12]</sup>, 抑制裸鼠胃癌原位移植瘤的生长<sup>[13, 14]</sup>, 对化学致癌剂诱导的大鼠胃癌具有化学预防作用<sup>[15, 16]</sup>. NSAID可能通过抑制COX-2活性的途径发挥抗肿瘤作用. 塞来昔布是一种高选择性COX-2抑制剂. NSAID抑制胃癌细胞生长与其诱导细胞凋亡有关<sup>[17-20]</sup>. 我们首先用TUNEL法显示塞来昔布作用胃癌细胞后可见大量凋亡细胞出现, 流式细胞仪分析显示塞来昔布可将细胞阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 并诱导细胞凋亡, 10, 20, 40, 80, 160 μmol/L塞来

昔布作用于胃癌细胞24 h后, 凋亡率分别为4.23%, 15.50%, 24.35%, 31.52%, 45.82%, 呈剂量依赖性. 因此, 塞来昔布对胃癌细胞的抑制作用可能与其诱导细胞凋亡有关. 郑文斌 *et al*<sup>[21]</sup>还发现高浓度塞来昔布对胃癌多药耐药细胞亦有明显抑制生长的作用.

然而NSAID类药物可以在完全缺乏COX活性的细胞中发挥抗增殖作用, 说明NSAID尚有独立于环氧合酶的其它途径参与对胃癌细胞的抑制作用<sup>[22, 23]</sup>. ERK位于胞质, 激活后发生磷酸化转位至胞核<sup>[24, 25]</sup>, 调节转录因子如NF-κB, AP-1的活性, 产生细胞效应. ERK通路上调与胃黏膜细胞的增殖和转化有关, 与胃癌的发生、TMN分期、淋巴结转移相关<sup>[26-29]</sup>. NSAID抑制胃癌细胞生长作用是否与ERK途径有关的问题值得探讨. 我们采用免疫组化方法显示磷酸化ERK2主要分布在细胞核内, 胞质有少量表达. 定量分析显示塞来昔布能使胃癌细胞磷酸化ERK2表达减少, 呈剂量依赖性. 提

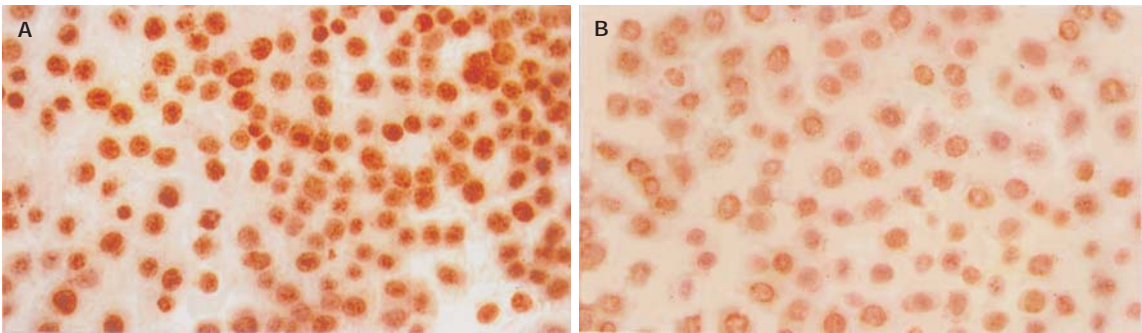


图2 胃癌细胞磷酸化ERK2表达 (SP X400) A: 对照组; B: 80 μmol/L塞来昔布.

示塞来昔布能阻断ERK2磷酸化,从而阻断细胞外信号向细胞内传递,达到抑制胃癌细胞增殖的作用。Husain *et al*<sup>[30]</sup>发现两类NSAID都明显抑制ERK2活化。因此我们认为塞来昔布可能通过抑制MAPK(ERK2)途径来抑制人胃癌细胞株SGC7901的增殖和生长,发挥其防癌、抗癌作用。陈波 *et al*<sup>[31]</sup>发现PD098059可能通过抑制MAPK的活性,抑制胃癌细胞增殖,对长春新碱诱导MGC803细胞的凋亡具有协同作用。因此,MAPK(ERK)可能成为胃癌治疗的一个新的靶点,塞来昔布对COX-2有很高的选择性,其COX-1 IC<sub>50</sub>与COX-2 IC<sub>50</sub>的比值为375,在临床应用有较高的安全性。塞来昔布于2000年被美国食品药品监督管理局首次批准用于家族性息肉病的治疗。国内已有塞来昔布用于预防胃癌的实验研究报道<sup>[15-16]</sup>。进一步深入研究COX-2抑制剂抗肿瘤机制,可为临床开辟新的抗癌手段提供理论依据。

#### 4 参考文献

- Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Saibil F, van Stolk RU. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2003;348:891-899
- Soh JW, Mao Y, Kim MG, Pamukcu R, Li H, Piazza GA, Thompson WJ, Weinstein IB. Cyclic GMP mediates apoptosis induced by Sulindac derivatives via activation of c-Jun NH2 Terminal kinase 1. *Clin Cancer Res* 2000;6:4136-4141
- Sanchez-Alcazar JA, Bradbury DA, Pang L, Knox AJ. cyclooxygenase (COX) inhibitors induce apoptosis in non-small cell lung cancer through cyclooxygenase independent pathways. *Lung Cancer* 2003;40:33-44
- Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 2001;15:2742-2744
- Nagatsuka I, Yamada N, Shimizu S, Ohira M, Nishino H, Seki S, Hirakawa K. Inhibitory effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on liver metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 2002;100:515-519
- Lim HY, Joo HJ, Choi JH, Yi JW, Yang MS, Cho DY, Kim HS, Nam DK, Lee KB, Kim HC. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:519-525
- Yamagata R, Shimoyama T, Fukuda S, Yoshimura T, Tanaka M, Munakata A. Cyclooxygenase-2 expression is increased in early intestinal-type gastric cancer and gastric mucosa with intestinal metaplasia. *Eur J Gastroenterol hepatol* 2002;14:359-363
- Wang BC, Guo CQ, Sun C, Sun QL, Liu GY, Li DG. Mechanism and clinical significance of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:3240-3244
- Koga T, Shibahara K, Kabashima A, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Takahashi I, Kakeji Y, Maehara Y. Overexpression of cyclooxygenase-2 and tumor angiogenesis in human gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1626-1630
- Saukkanen K, Nieminen O, van Rees B, Vilkkilä S, Harkonen M, Juhola M, Mecklin JP, Sipponen P, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1923-1931
- 李建英, 于皆平, 罗和生, 余保平, 黄杰安. 非甾体类抗炎药对胃癌SGC7901细胞增殖及环氧合酶活性的影响. *世界华人消化杂志* 2002;9:262-265
- 孙波, 吴云林, 张学军, 王升年, 贺恒益, 乔敏敏, 章永平, 钟捷. 舒林酸抑制人胃腺癌细胞增殖及诱导凋亡. *世界华人消化杂志* 2001;9:997-1002
- 付峻林, 吴云林, 章永平, 乔敏敏, 陈颖, 孙波. 环氧合酶-2抑制剂抗胃癌作用的实验观察及其抑制血管生成的研究. *中华消化杂志* 2004;24:608-611
- 刘纯伦, 唐承薇, 万学红. 选择性环氧合酶-2抑制剂对胃癌细胞生长的影响. *四川大学学报(医学版)* 2003;34:480-483
- 兰春慧, 房殿春, 向德兵, 贺志高, 陈东风, 樊丽琳. 环氧合酶-2抑制剂celecoxib抑制胃癌生长的实验研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2005;14:134-136
- 唐保东, 胡品津, 曾志荣, 林汉良, 何瑶. 特异性环氧合酶-2抑制剂预防胃癌的实验研究. *中华消化杂志* 2004;24:158-161
- Uefuji K, Ichikura T, Shinomiya N, Mochizuki H. Induction of apoptosis by JTE-522, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, in human gastric cancer cell lines. *Anticancer Res* 2000;20:4279-4284
- 谯敏, 高青, 王丕龙, 张俊文. 尼美舒利对人胃癌细胞株SGC-7901增殖和凋亡的影响. *重庆医科大学学报* 2004;29:654-656
- Ma L, Xie YL, Yu Y, Zhang QN. Apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 cells induced by mitomycin combined with sulindac. *World J Gastroenterol* 2005;11:1829-1832
- 樊晓明, 郑发寿, 刘红燕, 马元华, 王振宇. 环氧合酶-2特异抑制剂诱导胃癌细胞凋亡的机制研究. *中华肿瘤杂志* 2005;27:145-147
- 郑文斌, 王春晖, 强鸥, 唐承薇. 塞来昔布联合奥曲肽对人胃癌多药耐药细胞生长的影响. *癌症* 2004;23:1628-1632
- 李建生, 张金平, 刘升云. 环氧合酶-2抑制剂对人胃癌细胞株的作用及机制探讨. *中华消化杂志* 2005;25:119-121
- Honjo S, Osaki M, Ardyanto TD, Hiramatsu T, Maeta N, Ito H. COX-2 inhibitor, NS398, enhances Fas-mediated apoptosis via modulation of the PTEN-Akt pathway in human gastric carcinoma cell lines. *DNA Cell Biol* 2005;24:141-147
- Aplin AE, Stewart SA, Assoian RK, Juliano RL. Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol* 2001;153:273-282
- Cyert MS. Regulation of nuclear localization during signaling. *J Biol Chem* 2001;276:20805-20850
- 褚传莲, 李延青, 张燕, 李文婕, 赵宪邨. 细胞外信号调节激酶在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:481-482
- 褚传莲, 李延青, 李文婕, 张燕, 赵宪邨. ERK1、ERK2在胃癌中的表达及临床意义. *山东医药* 2002;42:5-7
- Liang B, Wang S, Zhu XG, Yu YX, Cui ZR, Yu YZ. Increased expression of mitogen-activated protein kinase and its upstream regulating signal in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:623-628
- Shin EY, Ma EK, Kim CK, Kwak SJ, Kim EG. Src/ERK but not phospholipase D is involved in keratinocyte growth factor-stimulated secretion of matrix metalloproteinase-9 and urokinase-type plasminogen activator in SNU-16 human stomach cancer cell. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:596-602
- Husain SS, Szabo IL, Pai R, Soreghan B, Jones MK, Tarnawski AS. MAPK (ERK2) kinase-a key target for NSAID-induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth. *Life Sci* 2001;69:3045-3054
- 陈波, 杨军, 卢香兰, 王平平, 金锋, 刘兴鹏, 王舒宝. PD 098059对长春新碱诱导胃癌细胞MGC803凋亡的调节作用. *中国医科大学学报* 2003;32:140-142

# 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系 Bel-7402 细胞的凋亡

李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生

李东涛, 第二军医大学附属长海医院中医科上海市 200433  
孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生, 中国中医研究院广安门医院  
肿瘤科北京市 100053  
李东涛, 1966-06-12生, 山东省汶上县人, 汉族, 2003年中国中医研究院博士, 主治医师, 现在第二军医大学从事博士后工作, 主要研究方向中西医结合治疗肝癌的基础与临床, 中医核心理论及虚弱体质研究工作。  
通讯作者: 孙桂芝, 100053, 北京市宣武区北线阁5号, 中国中医研究院广安门医院肿瘤科. whongzhong@263.net.  
电话: 010-88001630  
收稿日期: 2004-12-31 接受日期: 2005-01-08

Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu decoction*

Dong-Tao Li, Gui-Zhi Sun, Ying-Xia Pei, Xin Qi, Jie Li, Hong-Sheng Ling

Dong-Tao Li, Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Gui Zhi-Sun, Ying-Xia Pei, Xin Qi, Jie Li, Hong-Sheng Ling, Guannanmen Hospital, China Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053, China  
Correspondence to: Gui Zhi-Sun, Guannanmen Hospital, China Institute of Traditional Chinese Medicine, 5 Beixiang, Xuanwu District, Beijing 100053, China. whongzhong@263.net  
Received: 2004-12-31 Accepted: 2005-01-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the growth inhibitory and apoptosis inducing effects on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu decoction*(YHRJ decoction).

**METHODS:** Serum was collected from New Zealand rabbits fed with *YHRJ decoction*, and used for Bel-7402 cell culture. Cell growth inhibition was assayed by MTT method. Invert, fluorescence, and laser microscopes were applied to examine cell morphology. Cell cycle and apoptosis were detected by annexinV and propidium iodide (PI) double staining and flow cytometry.

**RESULTS:** Serum from *YHRJ*-fed rabbits suppressed Bel-7402 cell growth. The inhibitory rate was 49.1%, when 20% serum was added to the culture. Typical apoptosis of morphological changes were also observed

in *YHRJ* serum treated cells. The G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest and apoptosis peak were shown by flow cytometry. Early, medium/late-term apoptosis was detected by annexinV-PI double staining.

**CONCLUSION:** *YHRJ decoction* containing serum can inhibit growth and induce apoptosis of Bel-7402 cells.

**Key Words:** *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu decoction*; Hepatocellular carcinoma; Bel-7402 cells

Li DT, Shun GZ, Pei YX, Qi X, Li J, Ling HS. Growth inhibitory and apoptosis inducing effect on hepatocellular carcinoma Bel-7402 cell line by serum from rabbit fed with *Yiqi Huoxue Ruanjian Jiedu decoction*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2217-2221

## 摘要

**目的:** 研究益气活血软坚解毒(YHRJ)含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402生长抑制及诱导凋亡作用。

**方法:** 将YHRJ含药血清作用于人肝癌细胞系Bel-7402细胞, 应用MTT检测对肝癌细胞生长抑制作用, 倒置显微镜、荧光显微镜、激光共聚焦扫描显微镜等影像学方法观察细胞形态学变化, 以及PI染色单染、AnnexinV-PI双染后, 流式细胞术检测对细胞周期影响及诱导细胞凋亡程度。

**结果:** MTT法检测结果显示: YHRJ含药血清具有抑制Bel-7402肿瘤细胞生长作用(其中20%YHRJ等效剂量抑制率49.1%,与NS比,  $P<0.01$ ); 荧光显微镜及激光共聚焦显微镜可观察到典型的凋亡形态学变化。流式细胞术检测结果, 细胞周期出现G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻滞, 并出现典型的凋亡峰, AnnexinV-PI双染法检测到早期及中晚期细胞凋亡。

**结论:** YHRJ含药血清有抑制人肝癌细胞系Bel-7402细胞生长并有诱导细胞凋亡作用。

**关键词:** 益气活血软坚解毒; 肝癌; Bel-7402细胞

李东涛, 孙桂芝, 裴迎霞, 祁鑫, 李杰, 林洪生. 益气活血软坚解毒含药血清诱导人肝癌细胞系Bel-7402细胞的凋亡. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2217-2221  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2217.asp>



## 0 引言

益气活血软坚解毒法是导师孙桂芝教授在临床上治疗原发性肝癌的重要治则治法,以往相关的研究表明,该法具有抑制荷H22瘤小鼠肿瘤生长及促进人肝癌细胞系Bel-7402细胞凋亡作用<sup>[1,2]</sup>。为了深入研究其作用机制,我们拟从体外培养细胞的血清药理学实验方面,从细胞分子水平研究其作用特点。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 新西兰大白兔12只,♀,体重2.45-2.7 kg,购于中国药品及生物制品检定所,对数生长期的Bel-7402细胞,由中国中医研究院广安门医院提供。益气活血软坚解毒(YHRJ)方水煎剂:组方为生黄芪、炒白术、田三七、水红花子、藤梨根、凌霄花、炮山甲、白花舌蛇草、半枝莲,常规水提取,生药浓度3.4 kg/L,4℃保存备用。YHRJ含药血清的制备。健康新西兰大白兔12只,随机分为NS、YHRJ等效剂量(约为人用量的5倍)、YHRJ高剂(约为人用量的10倍)3组,每组4只,8:00、14:00点各给药1次,中药每只每次稀释成10 mL灌喂,重复给药5次,末次给药前12 h禁食不禁水,末次给药后1-1.5 h之内分别从耳中央动脉无菌采血10 mL,室温静置2 h,冷冻离心机1500 r/min离心10 min,吸取血清,56℃30 min灭活,22 μm针式微孔滤膜过滤,-20℃冰箱保存备用。顺氯氨铂(DDP):山东齐鲁制药厂产品。RPMI1640完全培养液:RPMI培养干粉(GIBCO)内含2 mmol/L谷氨酰胺,青霉素100 kU/L、链霉素100 mg/L,应用时加入100 mL/L灭活的小牛血清。四甲基偶氮唑盐(MTT)、碘化丙啶(PI)、RNase酶、吖啶橙(AO):美国Sigma公司产品。AnnexinV-FITC试剂盒:北京宝赛生物技术有限公司生产。全自动酶标仪(Microplate AUTO Reader)EL311:美国BioTek公司产品。BH2-RFC落射式荧光显微镜:Olympus公司产品。激光共聚焦扫描显微镜(Radiance2000):美国BioRad公司产品。FACSort流式细胞仪(FCM):美国Becton-Dicknson公司生产。

### 1.2 方法

**1.2.1 YHRJ含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402生长抑制作用(MTT法)的表达** 处于对数生长期的人肝癌细胞Bel-7402经2.5 g/L胰酶消化后,接种于96孔板中,每孔100 μL( $1 \times 10^5$ /L),孵育24 h,分组为NSD、NSG、YHRJDD、YHRJDG、YHRJGD、YHRJGG、DDP 7组,分别加入生理盐水兔血清至终浓度为100 mL/L、200 mL/L、YHRJ等效剂量兔血清至终浓度为100 mL/L、200 mL/L、YHRJ高剂量兔血清至终浓度为100 mL/L、200 mL/L、DDP 2 mg/L,另设对照组单纯加入培养液100 μL、设培养液空白孔,每组复孔为6个,置于37℃,50 mL/L湿化的CO<sub>2</sub>培养箱中孵育72 h后,

沿培养孔边缘轻轻吸出上清100 μL,加入MTT储液10 μL 1(5 g/L),继续培养4 h,加入二甲基亚砷(DMSO)100 μL,震荡器轻微震荡后,用EL311型全自动酶标仪测其A值,测定波长570 nm,参考波长630 nm,计算对细胞的抑制率(%)={ (对照组平均A值-空白组平均A值)-(药物平均A值-空白组平均A值)}÷(对照组的平均A值-空白组平均A值)×100%。

**1.2.2 影像学观察方法<sup>[3,4]</sup>** 处于对数生长期的人肝癌细胞Bel-7402细胞,经2.5 g/L胰酶消化后,分瓶,传代细胞处于对数生长期时分组为NSD、NSD+DDP、YHRJDD、YHRJDD+DDP、YHRJGD、YHRJGD+DDP 6组,加血清如1.2.1,加DDP各组DDP终浓度为4.5 mg/L,50 mL/L湿化的CO<sub>2</sub>培养箱中孵育。PBS液离心洗涤1次,取少量细胞涂片,速入950 mL/L冷乙醇固定10-15 min,稍干;10 g/L醋酸酸化30 S,0.1 g/L AO染色8 min;PBS液(pH4.8)洗涤1 min后,0.01 mol/L CaCl<sub>2</sub>分化2 min,再入3个含PBS液(pH4.8)的染色缸洗3次,每次数秒;PBS液临时封固,置荧光显微镜观察,蓝光激发,照相。另染色方法同AO染色,置激光共聚焦扫描显微镜观察<sup>[5]</sup>,蓝光激发(B,488 nm),阻挡滤片530/30 Bp,630/30 Bp,发射波长515 nm(DNA,绿光)、630 nm(RNA,红光);采用该仪器的双染色样品扫描分析软件分析,照相。

**1.2.3 YHRJ含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402细胞周期影响及凋亡诱导<sup>[6]</sup>** 传代细胞处于对数生长期时分组为NSD、NSG、YHRJDD、YHRJDG、YHRJGD、YHRJGG 6组,加血清如1.2.1,分别于孵育12,24,48,72 h时处理细胞,0.1 mol/L PBS液离心洗涤(1 000 r/min,5 min)2次后,加入700 mL/L冷乙醇4 mL,40℃固定24 h。检测前弃去乙醇,PBS液离心洗涤2次,加入RNA A酶(20 mg/L)及PI(50 mg/L)混合染液1 mL,4℃避光染色30 min。350目尼龙筛网过滤,调整瘤细胞浓度 $1 \times 10^5$ /L,FACSort流式细胞仪检测,计算出DNA含量,得出细胞周期(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>,S,G<sub>2</sub>+M)的百分比和凋亡细胞的比例。处理细胞同1.2.2,于孵育24h时处理细胞。将培养液倒入5 mL离心管,加入2.5 g/L的胰酶消化,加入原培养液,混合后,1 000 r/min 4℃离心10 min,弃上清。加入冷PBS 1 mL,轻轻震荡使细胞悬浮。1 000 r/min 4℃离心10 min,弃上清,重复上述步骤两次。将细胞重悬于200 μL Binding Buffer。加入AnnexinV-FITC 10 μL和PI 5 μL,轻轻混匀,避光室温反应15 min或4℃反应30 min。加入Binding Buffer 300 μL,立即流式细胞仪分析。

## 2 结果

**2.1 YHRJ含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402生长抑**

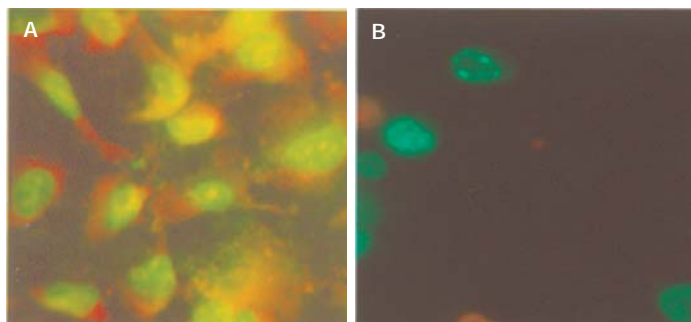


图1 AO染色, 荧光显微镜下观察细胞形态变化. A: NSD组 B: YHRJDD组.

制作用 YHRJ含药血清均有不同程度抑制肿瘤生长作用, 以20%YHRJ等效剂量组含药血清作用显著, 与NS组比较, 差异显著( $P<0.01$ ), 但与化疗药物DDP相比, 还有一定差距(表1).

表1 MTT法测定YHRJ含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402体外生长抑制

分组	药物剂量	A值	抑制率(%)
空白对照	100 mL/L 胎牛血清	$0.0955 \pm 0.0072$	
对照	100 mL/L 胎牛血清	$0.4548 \pm 0.123$	
NSD	100 mL/L NS 兔血清	$0.3803 \pm 0.0848$	20.73
NSG	100 mL/L NS 兔血清	$0.3795 \pm 0.1276$	16.56
YHRJDD	100 mL/L YHRJ 等效剂量兔血清	$0.3510 \pm 0.1322$	22.82
YHRJGD	200 mL/L YHRJ 等效剂量兔血清	$0.2317 \pm 0.0592$	49.06 <sup>b</sup>
YHRJGD	100 mL/L YHRJ 高剂量兔血清	$0.2028 \pm 0.0189$	19.86
YHRJGG	200 mL/L YHRJ 剂量兔血清	$0.2270 \pm 0.0509$	28.51
DDP	100 mL/L 胎牛血清+DDP	$0.1402 \pm 0.0084$	69.18 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs NSD组.

2.2 影像学观察结果 荧光显微镜下AO染色除NS组外, 各用药组均可发现明显的凋亡细胞, 核染色质浓缩, 早期染色质聚集于核周边部而呈新月形, 晚期细胞核浓缩, 并碎裂成大小不等的片段, 晚期凋亡细胞进一步碎裂形成由质膜包绕的含有多少不等的核碎片的凋亡小体, 细胞的细胞核染色质形成明亮的凝聚块, 以各加DDP组最为明显(图1). 激光共聚焦扫描显微镜下细胞的形态变化NS组细胞大小相对均匀, 为圆形, 无缺损或破坏, DNA荧光强度分布地形图显示细胞分布

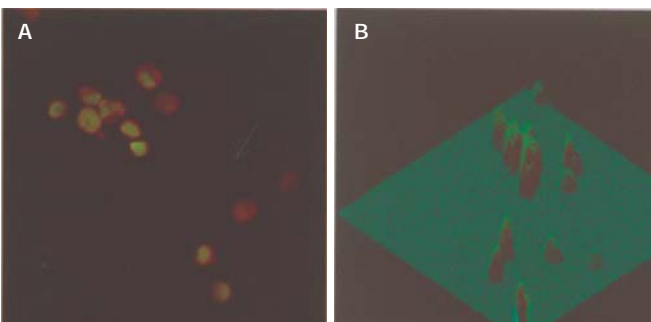


图2 YHRJGD组激光共聚焦扫描显微镜下细胞的形态变化. A: 平面图 B: 地形图.

茂密, 整个结构形态充满, 自核边缘至核中央荧光强度逐次递强, 完整无损. 各加药组细胞形态不规则, 荧光强度分布不均, 大面积出现荧光强度减低, 各组均能发现细胞凋亡表现, 以各加DDP组最为明显, 单纯中药组以YHRJGD最为明显(图2).

2.3 YHRJ含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402细胞周期影响及凋亡诱导 在12 h点上, 与NS组相比, 各加药组出现 $G_0/G_1$ 期阻滞, 以YHRJDD最为明显, 未出现细胞凋亡现象. 在24 h点上, 各中药组均出现不同程度的细胞凋亡现象, 以YHRJGD最为明显, 为16.18%, 并出现明显 $G_0/G_1$ 期阻滞. 在48 h点上, 各加药组仍有一定数量凋亡细胞, 以YHRJGG最高, 为15.54%, 但总体趋势减低. 在72 h点上, 凋亡细胞数量明显减少, 但仍有 $G_0/G_1$ 阻滞现象, 由于此时出现细胞饥饿现象, NSD开始出现部份细胞凋亡(表2, 图3). YHRJDD及YHRJGD组24 h点早期凋亡率并不高, 但中晚期凋亡数量较高, 因此凋亡总数比NS组高, 有显著差异( $P<0.001$ ). 另外, 中药加DDP比单纯用DDP凋亡总数明显增高, 差异显著( $P<0.001$ ), 显示中药与DDP的协同作用(表3, 图4).

### 3 讨论

细胞凋亡是中药作用机制研究的热门课题, 也是中药抗癌的主要作用机理<sup>[7,8]</sup>. 李杰 *et al*<sup>[2]</sup>研究发现, 以益气活血软坚解毒为组方的肝康冲剂可阻止肝癌细胞系Bel-7402细胞 $G_0/G_1$ 期进入S期, 24 h即有细胞分

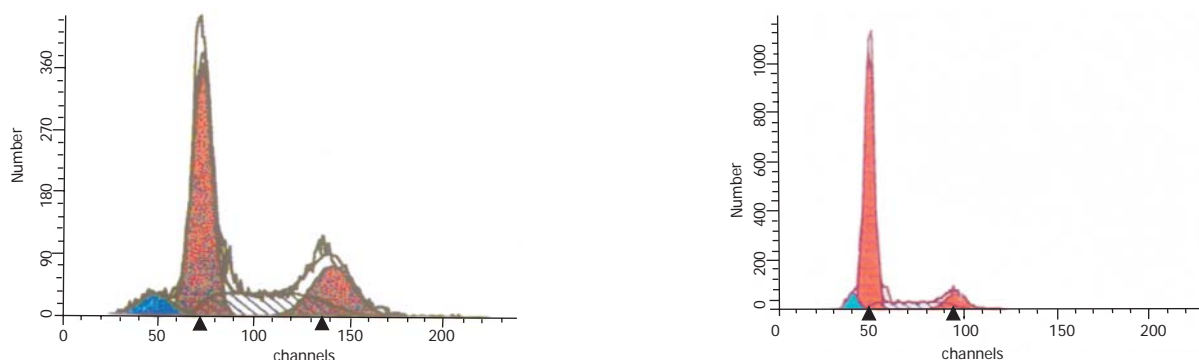


图3 PI染色FCM测定含药血清对Bel-7402细胞周期影响及细胞凋亡的诱导. A: YHRJDD, 24 h B: YHRJGD, 48 h

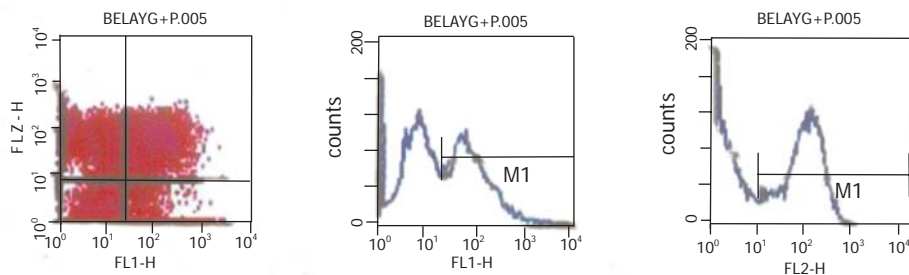


图4 AnnexinV-PI染色测定含药血清对人肝癌细胞系Bel-7402早期凋亡诱导, YHRJGD+DDP组.

表2 PI染色FCM测定含药血清对BEL-7402细胞1万个周期影响及细胞凋亡的诱导(%)

分组	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> -M	APO
12 h NSD	40.0	48.8	11.2	0
NSG	40.1	48.0	11.9	0
YHRJDD	61.4	21.4	17.2	0
YHRJDG	52.6	30.6	16.8	0
YHRJGD	59.5	18.1	22.4	0
YHRJGG	44.8	41.7	13.5	0
24 h NSD	74.0	8.2	17.8	0
NSG	59.3	17.7	23.0	0
YHRJDD	53.9	24.8	21.3	7.1
YHRJDG	63.0	9.2	17.8	4.2
YHRJGD	75.6	14.2	10.2	16.2
YHRJGG	67.3	21.0	11.8	1.7
48 h NSD	73.5	10.9	15.6	0
NSG	59.1	18.9	22.0	0
YHRJDD	62.1	19.7	18.2	2.9
YHRJDG	43.4	35.8	21.1	5.4
YHRJGD	76.6	14.5	8.9	5.1
YHRJGG	76.0	13.5	10.5	15.5
72 h NSD	67.4	10.0	22.7	2.3
NSG	50.4	7.4	32.2	0
YHRJDD	72.7	3.8	23.5	0
YHRJDG	70.5	6.7	22.8	1.1
YHRJGD	79.9	2.7	17.4	0
YHRJGG	75.6	17.8	6.6	1.3

裂出凋亡小体. 陈瑜 *et al* 补肾及健脾复方对皮质酮大鼠T细胞凋亡信号相关基因群具有调控作用<sup>[9]</sup>. 孟志强 *et al*<sup>[10]</sup> 研究发现, 健脾理气药对肝癌细胞株 SMMC-7721 具一定的诱导凋亡及抑制肝癌细胞效应, 能上调P53, P21WAF1/CIP1基因的表达, 且对肿瘤细胞端粒酶活性有抑制作用. 杨雁 *et al*<sup>[11]</sup> 研究发现黄芪总甙具有诱导肝癌细胞株HepG2细胞和Bel-7402细胞凋亡的作用, 能上调肝癌细胞的wt p53表达. 王三龙 *et al*<sup>[12]</sup> 研究发现中药苏木提取物诱导K562细胞凋亡的研究. 我们的结果显示, 益气活血软坚解毒法有抑制人肝癌系Bel-7402细胞生长作用, 影像学提示有诱导细胞凋亡作用, 说明诱导细胞凋亡是中药抑制肿瘤的主要作用机理.

引起细胞凋亡典型形态学变化的机制在于Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>依赖性核酸内切酶的激活导致染色质DNA在核小

表3 YHRJ含药血清对Bel-7402细胞1万个早期凋亡的诱导(AnnexinV,PI双染,%)

分组	正常	早期凋亡	中晚期凋亡	死亡	凋亡总
24h NSD	94.0	1.38	3.7	0.9	5.2
NSD+DDP	39.1	8.1	39.1	13.3	47.5 <sup>b</sup>
YHRJDD	89.8	1.2	5.4	3.6	6.6 <sup>b</sup>
YHRJDD+DDP	31.6	35.4	23.8	9.9	59.2 <sup>b</sup>
YHRJGD	89.2	1.1	6.6	2.8	8.0 <sup>b</sup>
YHRJGD+DDP	10.8	13.7	47.4	28.0	61.1 <sup>b</sup>

$P < 0.001$  vs NSD组.

体连接部位断裂, 形成以180-200 bp为最小单位的单体或寡聚体片段. 流式细胞仪PI染色法可以检测DNA降解, 在正常的G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>峰之前出现的一亚二倍体峰为凋亡峰. 我们的研究结果显示, 在药物作用24 h后, 能出现明显的凋亡峰. 近年来, 通过对细胞凋亡的进一步研究发现: 各种细胞受到诱导后产生凋亡的初期, 均会出现膜内外层面磷脂酰丝氨酸(PS)重新分布, 即膜内表面的PS发生不可逆转的外露, 其明显早于核内DNA固缩、变性、裂解<sup>[13]</sup>, 检测外表面的PS, 可了解凋亡的早期状况. AnnexinV与PS有较强的亲和力, 具有钙依赖性. 由于坏死细胞的PS也有外露现象<sup>[14]</sup>, 因此, AnnexinV和能够进入破损细胞膜内与降解DNA结合的PI法联合应用才可以区分凋亡和坏死<sup>[15,16]</sup>. 我们采用AnnexinV/PI法双染色法观察了用药24 h后早、中、晚期凋亡细胞分布, 结果显示, YHRJ中药组中、晚期凋亡细胞较多, 说明早期凋亡发生于24 h之前. 以上说明, 诱导肝癌细胞凋亡是益气活血软坚解毒法抑制肿瘤生长的重要作用机制.

#### 4 参考文献

- 1 李杰, 孙桂芝, 朴炳奎, 陈长怀, 刘玉琴, 顾蓓, 薛克勋, 高进, 苑景春, 李江, 陆丽珠. 肝康冲剂抑瘤作用观察及机理探讨. 中国实验方剂杂志 1998;5:32-35
- 2 李杰, 孙桂芝, 朴炳奎, 刘玉琴, 顾蓓, 薛克勋, 高进. 中药肝康冲剂提取诱导人肝癌细胞系BEL-7402细胞凋亡的实验研究. 中国肿瘤生物治疗杂志 1997;4:234
- 3 潘耀谦, 于艳, 夏志平. 检测细胞凋亡的常用方法. 动物医学进展 2001;2:32-36
- 4 王莉, 李健, 张健, 段相林. 细胞凋亡机制与方法学研究进展. 解剖科学进展 2002;8:170-174
- 5 刘畅, 顾玲. 激光扫描共聚焦显微镜在细胞凋亡研究中的应用. 医



- 学综述 2001;7:583-584
- 6 Benderitter M, Vincent-Genod L, Berroud A, Voisin P. Simultaneous analysis of radio-induced membrane alteration and cell viability by flow cytometry. *Cytometry* 2000;39:151-177
- 7 陈坚. 中药诱导肝癌细胞凋亡的实验研究进展. 中西医结合学报 2004;2:301-303
- 8 程卫东, 徐瑞峰, 赵健雄. 中药诱导肝癌细胞凋亡的研究进展. 甘肃中医 2004;4:44-47
- 9 陈瑜, 沈自尹, 陈伟华. 补肾及健脾复方对皮质酮大鼠T细胞凋亡信号相关基因群调控模式的对比研究. 中西医结合学报 2004;2:346-349
- 10 孟志强, 郭伟剑, 于尔辛, 宋明志, 黄雯霞. 健脾理气方药物血清对肝癌细胞端粒酶活性及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:879-882
- 11 杨雁, 陈敏珠. 黄芪总甙对肝癌细胞凋亡及wtp53基因表达的影响. 中国药理学通报 2001;17:447-451
- 12 王三龙, 蔡兵, 崔承彬, 张华凤, 姚新生, 曲戈霞. 中药苏木提取物诱导K562细胞凋亡的研究. 癌症 2001;20:1376-1379
- 13 Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* 1997;89:1121-1132
- 14 Peng L, Liu JJ. A novel method for quantitative analysis of apoptosis. *Lab Invest* 1997;77:547-555
- 15 胡庆柳, 朴英杰, 周美娟. 一种检测早期凋亡的细胞的方法. 细胞生物学杂志 2000;22:155-157
- 16 彭黎明. 用Annexin法定量分析淋巴瘤细胞凋亡与坏死. 中华医学检验杂志 1999;22:49

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》欢迎投稿

本刊讯 《世界华人消化杂志》2006 年重点报道消化内科, 肝、胆、胰、胃肠外科, 介入、中医、中西医结合治疗, 内镜, 护理, 医学影像, 检验, 预防医学, 误诊误治, 康复, 微创, 肿瘤等相关内容的文章. 欢迎各位踊跃投稿, 促进我国消化临床研究的快速发展. 为适应我国消化病学研究领域的飞速发展, 从 2006-01-01 起《世界华人消化杂志》改为旬刊出版发行, 160 页, 每月 8、18、28 出版.

2006 年,《世界华人消化杂志》在线办公系统将正式开通 (<http://www.wjgnet.com/wjg/index.jsp>), 从投稿到出版所有环节一律在网上实现, 将会大大缩短从投稿到出版的时间.

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 我们对所有来稿均进行同行评议. 采用匿名方式, 通常每篇文章邀请 3 位专家进行同行评议. 至少二位同行评议人通过为录用, 否则为退稿. 每期的最后一页致谢本期所有的同行评议人 (包括退稿). 每期在印刷版和电子版固定位置刊登全体《世界华人消化杂志》的同行评议专家的名单.

据中国科技期刊引证报告 (潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 1-289) 统计,《世界华人消化杂志》2003 年发表文章 594 篇, 地区分布 25 个, 机构分布 191 个, 基金论文比 31%, 总被引频次 5249 次, 影响因子 2.924, 即年指标 0.529, 引用期刊数 260 种, 被引半衰期 3.06. 中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的 10 个科学计量指标, 并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊.《世界华人消化杂志》获得 2001 年和 2003 年中国百种杰出学术期刊.

据《中文核心期刊要目总览 2004 年版》(戴龙基, 蔡蓉华主编. 北京: 北京大学出版社, 2004: 1-678), 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库有 51 种, 统计到的文献数量共计 9435301 篇次, 涉及期刊 39893 种次. 参加核心期刊评审的学科专家达 1873 位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从中国正在出版的近 1 万 2 千种中文期刊中评选出 1800 种核心期刊.《世界华人消化杂志》入选中文核心期刊要目总览.

《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. 2005 年,《世界华人消化杂志》正式向 The National Library of Medicine for MEDLINE 递交申请, 计划在 2006 年初进入 MEDLINE, 以进一步实现国际索引.

总之,《世界华人消化杂志》将始终贯彻质量第一的方针, 满足广大作者和读者的需求. 在此, 我们热烈欢迎再次投稿.

# 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、细胞间黏附分子-1与扑热息痛肝损害

田丰, 王颖, 吴作艳, 王学清, 李岩

田丰, 王颖, 吴作艳, 王学清, 李岩, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)消化科 辽宁省沈阳市 110004

田丰, 男, 1972-01-06生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 2000年中国医科大学硕士研究生, 博士在读, 讲师, 主治医师, 主要从事肝脏疾病研究。

通讯作者: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)消化科. liyan99@medmail.com.cn.

电话: 024-83956416

收稿日期: 2005-08-05 接受日期: 2005-08-26

## Association of tumor necrosis factor- $\alpha$ and intercellular adhesion molecule-1 with acetaminophen-induced liver damages

Feng Tian, Ying Wang, Zuo-Yan Wu, Xue-Qing Wang, YAN Li

Feng Tian, Ying Wang, Zuo-Yan Wu, Xue-Qing Wang, Yan Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chinese Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Yan Li, Department of Gastroenterology, the second Affiliated Hospital of Chinese Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. liyan99@medmail.com.cn

Received: 2005-08-05 Accepted: 2005-08-26

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on the acetaminophen-induced liver damages.

**METHODS:** The Sprague Dawley (SD) rat model of acetaminophen-induced liver damages was established using acetaminophen (AAP). The rats were killed at 3, 6, 12, and 24 h after the administration, respectively. The activity of serum alanine aminotransferase (ALT) was detected in the rats, and the pathological changes of the liver were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining under light microscope. The level of serum TNF- $\alpha$  was examined by radioimmunoassay, and the expression of ICAM-1 mRNA in the liver tissues was measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** Twenty four hours after AAP administration, the level of serum TNF- $\alpha$  in AAP group was significantly higher than that in the controls ( $5.69 \pm 0.46 \mu\text{g/L}$  vs  $2.64 \pm 0.27 \mu\text{g/L}$ ,  $P < 0.01$ ), and it was positively related to the level of serum ALT ( $r = 0.773$ ,  $P < 0.01$ ).

The expression of ICAM-1 mRNA in the hepatic tissues in AAP group were significantly higher than those in the controls at 3, 6, 12, and 24 h ( $1.58 \pm 0.21$  vs  $0.62 \pm 0.05$ ,  $1.24 \pm 0.09$  vs  $0.63 \pm 0.04$ ,  $0.88 \pm 0.08$  vs  $0.32 \pm 0.06$ ,  $0.55 \pm 0.14$  vs  $0.28 \pm 0.03$ , all  $P < 0.01$ ), and it reached the peak value at 3 h. Meanwhile, the activities of serum ALT (nkat/L) progressively increased as compared with those in the controls ( $166.90 \pm 151.03$  vs  $586.78 \pm 89.35$ ,  $2153.84 \pm 254.55$  vs  $573.45 \pm 75.18$ ,  $4220.84 \pm 928.52$  vs  $750.15 \pm 81.68$ ,  $13202.64 \pm 1392.78$  vs  $780.16 \pm 161.37$ ,  $P < 0.01$ , for 3, 6, 12, 24 h, respectively), and the hepatic pathological injury aggravated progressively, which reached the peak at 24 h.

**CONCLUSION:** TNF- $\alpha$  and ICAM-1 play key roles in the occurrence and development of acetaminophen-induced liver damages.

**Key Words:** Acetaminophen; Liver damages; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Intercellular adhesion molecule-1

Tian F, Wang Y, Wu ZY, Wang XQ, Li Y. Association of tumor necrosis factor- $\alpha$  and intercellular adhesion molecule-1 with acetaminophen-induced liver damages. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2222-2226

### 摘要

**目的:** 探讨肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 在扑热息痛肝损害中的作用。

**方法:** 应用扑热息痛 (AAP) 建立 Sprague Dawley (SD) 大鼠肝损害模型; 分别于给药后 3、6、12、24 h 处死大鼠, AAP 组和对照组分别测定 ALT 水平, HE 染色光镜下观察肝脏病理的改变, 放射免疫分析法测定血清 TNF- $\alpha$  水平、RT-PCR 方法检测肝组织 ICAM-1 mRNA 的表达。

**结果:** AAP 组给药后 24 h 血清 TNF- $\alpha$  ( $\mu\text{g/L}$ ) 水平显著高于对照组 ( $5.69 \pm 0.46$  vs  $2.64 \pm 0.27$ ,  $P < 0.01$ ), 且与血清 ALT 水平呈显著的正相关 ( $r = 0.773$ ,  $P < 0.01$ ), 肝组织 ICAM-1 mRNA 表达在各时间点均显著高于对照组 (3、6、12、24 h 的值分别为:  $1.58 \pm 0.21$  vs  $0.62 \pm 0.05$ ,  $1.24 \pm 0.09$  vs  $0.63 \pm 0.04$ ,  $0.88 \pm 0.08$  vs  $0.32 \pm 0.06$ ,  $0.55 \pm 0.14$  vs  $0.28 \pm 0.03$ ,  $P < 0.01$ ), 于 3 h 达

高峰, 24 h时仍高于正常水平, 同时血清ALT(nkat/L)进行性升高(3、6、12、24 h的值分别为:  $1166.90 \pm 151.03$  vs  $586.78 \pm 89.35$ ,  $2153.84 \pm 254.55$  vs  $573.45 \pm 75.18$ ,  $4220.84 \pm 928.52$  vs  $750.15 \pm 81.68$ ,  $13202.64 \pm 1392.78$  vs  $780.16 \pm 161.37$ ,  $P < 0.01$ )和肝脏病理损伤进行性加剧, 于24 h达高峰。

**结论:** TNF- $\alpha$ 、ICAM-1在扑热息痛肝损害的发生、发展过程中发挥着关键作用。

**关键词:** 扑热息痛; 肝损害; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 细胞间黏附分子-1

田丰, 王颖, 吴作艳, 王学清, 李岩. 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、细胞间黏附分子-1与扑热息痛肝损害. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2222-2226  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2222.asp>

## 0 引言

肝脏是药物代谢的主要器官. 近年来随着新药的不断面世, 药物性肝损害的发生率也日益增高. 在所有药物不良反应中, 肝损害的发生率仅次于皮肤损害和药物热, 居第三位, 约占10%-15%<sup>[1]</sup>. 因此, 对于药物性肝损害发病机制研究有着非常重要的意义. 近来, 炎症反应在药物性肝损害中的作用引起人们的重视. 中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)的聚集、浸润是炎症反应发生的关键步骤<sup>[2]</sup>. 各种药物可以通过不同途径激活肝枯否氏细胞和内皮细胞, 产生肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )等促炎因子, TNF- $\alpha$ 对PMN无直接趋化作用, 但可以上调黏附分子和趋化因子的表达<sup>[3]</sup>. 趋化因子和黏附分子协同作用导致PMN黏附、集聚并过度活化, 释放氧自由基和蛋白酶, 对组织细胞造成损害. 细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1 ICAM-1)是重要的黏附因子. 我们应用扑热息痛(Acetaminophen AAP)建立Sprague Dawley(SD)大鼠药物性肝损害模型, 放免法检测血清中TNF- $\alpha$ 的含量, RT-PCR方法检测肝组织中ICAM-1mRNA的表达, 以探讨两者在扑热息痛肝损害中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验动物5-6周龄的雌性Sprague Dawley(SD)大鼠, 体质量180-240 g, 购自中国医科大学动物实验中心. 大鼠实验前于本院动物实验中心饲养1 wk, 昼夜交替12 h, 在室温及稳定湿度条件下, 用平衡饲料喂养. AAP购自Sigma公司, TNF- $\alpha$ 放射免疫分析试剂盒购自北京福瑞生物工程公司, Trizol变性液购自晶美生物工程有限公司, RT-PCR试剂盒和逆转录酶购自TaKaRa Taq大连宝生物工程有限公司, PCR引物由上海博亚生物技术有限公司合成, DNA Marker

DL2000购自大连博瑞得生物技术有限责任公司, 自动生物化学分析仪(日本岛津公司), 普通光学显微镜(日本Olympus公司), FT-613自动放免测量仪(北京核仪器厂), 低温高速离心机(HERMLE Z-383K, 德国), 电泳仪(Bio-RAD, 美国), 紫外分光光度计(Shimadzu UV-1201, 日本), 凝胶成像分析系统(Kodak 1D, 美国).

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组和处理** 40只♀SD大鼠随机分为正常对照组和AAP组, 每组20只. 试验前1夜禁食水, 2 d上午给药. AAP溶于37℃ PBS液(pH7.4)中(100 g/L), AAP组给予AAP(1 g/kg)腹腔注射<sup>[4]</sup>, 正常对照组给予等量PBS液腹腔注射, 给药后自由进食水. 于给药后3、6、12、24 h(每时点各组分别有5只大鼠)用10%水合氯醛(5 mL/kg)腹腔注射麻醉, 心脏穿刺取血, 分离血清, -20℃保存; 后用锋利的手术刀于肝脏中叶取1块肝组织, 置于40 g/L甲醛中固定, 后立即取下余下肝组织, 置于液氮中, -80℃保存.

**1.2.2 ALT测定** 用自动生物化学分析仪进行.

**1.2.3 病理检测** 取肝中叶组织一块, 用40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 5  $\mu$ m厚切片, 常规HE染色, 光镜下观察其病理改变.

**1.2.4 血清TNF- $\alpha$ 水平测定** 采用放射免疫分析法进行.

**1.2.5 RT-PCR检测** 按产品说明书应用Trizol试剂提取肝脏组织总RNA. 每份组织取2  $\mu$ L总RNA按产品说明书进行逆转录合成cDNA链. PCR扩增(1)ICAM-1的扩增: 取3  $\mu$ L cDNA作为模板, 反应体系25  $\mu$ L. 含cDNA 3  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 17.1  $\mu$ L、10 $\times$ 反应缓冲液2.5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L、5 $\times 10^6$  U/L Taq酶0.2  $\mu$ L、ICAM-1的上、下游引物各0.1  $\mu$ L. 经94℃变性3 min后进入循环; 包括94℃变性45 s, 52℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃最后延伸7 min. ICAM-1引物序列为: 上游5' TACTGAACTTGCTGCCTATT3'; 下游: 5' ACTGTACCTGGTGACCTTGA3'; 产物长度为284 bp. (2)内参照物 $\beta$ -actin的扩增: 取3  $\mu$ L cDNA作为模板, 反应体系25  $\mu$ L. 含cDNA 3  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 17.1  $\mu$ L、10 $\times$ 反应缓冲液2.5  $\mu$ L、2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L、5 $\times 10^6$  U/L Taq酶 0.2  $\mu$ L、 $\beta$ -actin的上、下游引物各0.1  $\mu$ L. 经94℃变性3 min后进入循环; 包括94℃变性30 s, 55℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 35个循环; 72℃最后延伸7 min.  $\beta$ -actin引物序列为: 上游5' CACCCTGTGCTGCTACCGAAGCC3'; 下游5' CCACACAGATGACTTGCCCTCAGG3'; 产物长度为690 bp. 取10  $\mu$ L PCR扩增产物与内参照物 $\beta$ -actin及DNA Marker DL2000在20 g/L的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭(EB)染色, 经凝胶成像分析系统摄影, 扫描PCR产物强度, 以PCR产物密度/ $\beta$ -actin密度来表示检测指标mRNA的相对含量, 进行半定量分析.



**统计学处理** 数据用均数±标准差(mean±SD)表示, 各组间均数比较用t检验, 用SPSS11.0统计软件进行分析。

## 2 结果

**2.1 血清ALT水平变化** 各时间点AAP组血清ALT(nkat/L)水平较对照组均显著升高(给药后3、6、12、24 h分别为: 1 166.90±151.03 *vs* 586.78±89.35, 2 153.84±254.55 *vs* 573.45±75.18, 4 220.84±928.52 *vs* 750.15±81.68, 13 202.64±1 392.78 *vs* 780.16±161.37, ( $P<0.01$ ), 且随时间进行性升高, 24 h达高峰(图1)。

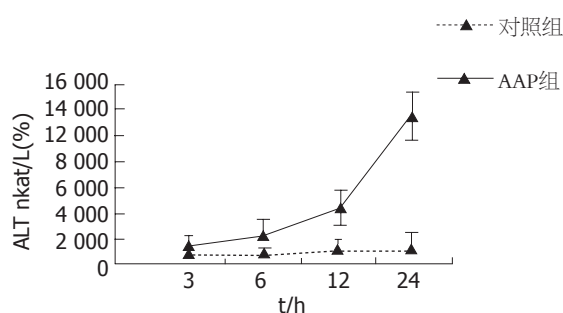


图1 ALT 随时间的变化。

**2.2 肝组织病理学变化** AAP组肝脏明显肿大、充血, 镜下: 轻者表现为肝细胞点状坏死、重者表现为小叶中心肝细胞广泛的炎性细胞浸润、出血、带状坏死, 且随时间进行性加重, 24 h达高峰。对照组未见异常(图2)。

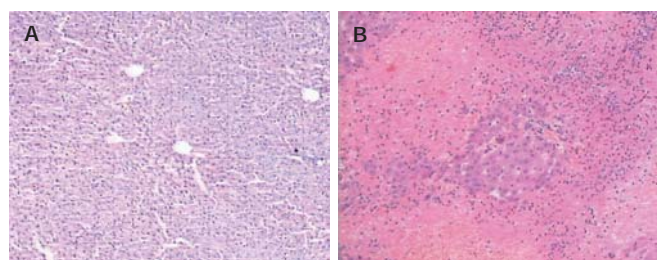


图2 24 h肝组织病理学变化 (H&E×100)。A: 对照组; B: AAP组。

**2.3 血清TNF-α水平变化** 给药后24 h, AAP组血清TNF-α(μg/L)水平显著高于对照组(5.69±0.46 *vs* 2.64±0.27,  $P<0.01$ ) 且与血清ALT水平呈显著的正相关( $r = 0.773$ ,  $P<0.01$ ) 余时间点两组间无显著性差异(图3)。

**2.4 血清TNF-α水平变化** 肝组织ICAM-1 mRNA的表达 AAP组各时间点肝组织ICAM-1 mRNA表达均显著高于对照组( $P<0.01$ ), 于给药后3 h达高峰, 24 h时仍高于正常水平(图4)。

## 3 讨论

AAP是目前世界上广泛使用的解热镇痛药, 在治疗剂

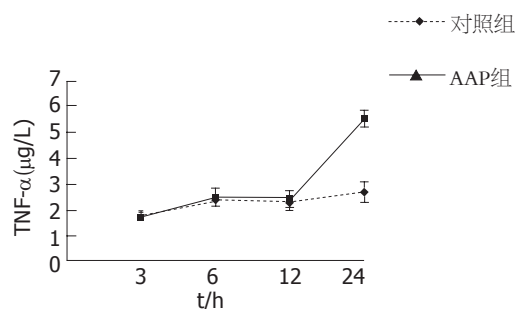


图3 TNF-α随时间变化。

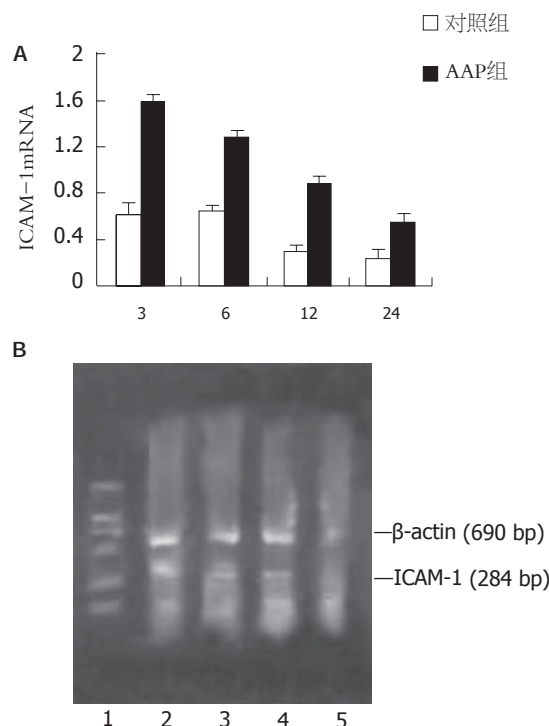


图4 ICAM-1 mRNA表达。A: ICAM-1 mRNA 相对含量; B: 1: DNA Marker DL2000; 2-5: AAP组给药后3、6、12、24 h。

量下使用是比较安全的, 而过量使用将导致严重的肝损害。在正常情况下, 健康人口服治疗剂量AAP, 90%以上通过与葡萄糖醛酸和硫酸结合由尿排泄, 仅有不到5%由细胞色素P-450系统代谢成亲电子的毒性中间代谢产物乙酰苯醌亚胺(N-acetyl-P-benzoquinone imine, NAPQI), NAPQI通过与谷胱甘肽结合迅速被清除<sup>[5]</sup>。但在AAP过量的情况下, 可导致葡萄糖醛酸化和硫酸化道路饱和, 大量的AAP转由细胞色素P-450系统氧化, 结果导致谷胱甘肽储备的耗竭, 并剩下多余的不能与谷胱甘肽结合的NAPQI。NAPQI与肝细胞的蛋白共价结合, 产生肝毒性<sup>[6-8]</sup>。这是目前普遍接受的AAP引起肝损害的机制。近来, 炎症反应在AAP肝损害中的作用引起人们的重视。

TNF-α主要是由激活的肝脏枯否氏细胞释放的重要的促炎因子<sup>[9]</sup>。它的产生被认为是肝脏炎症反应中最早出现的表现之一。TNF-α导致其它促炎因子级联样的释放, 引起各种炎症细胞的浸润和激活<sup>[10-11]</sup>。

TNF- $\alpha$ 还可以直接引起细胞毒性, 而导致细胞的坏死和调亡<sup>[12-13]</sup>. TNF- $\alpha$ 的生物活性是由两个结构相关, 但功能不同的TNF- $\alpha$ 受体所调节, 即: TNFR1(p55)和TNFR2(p75)<sup>[10]</sup>. TNF- $\alpha$ 主要通过TNFR1的途径引起炎症反应<sup>[14]</sup>, TNFR1的表达在枯否氏细胞和肝细胞上相对较高, 而且这种受体的表达在各种肝脏炎症损伤模型中明显上调, 说明TNF- $\alpha$ 是导致肝毒性的一个主要促炎因子<sup>[15]</sup>. 本实验结果表明AAP引起肝损害时, 血清TNF- $\alpha$ 水平显著升高, 且与血清ALT水平呈显著的正相关, 说明TNF- $\alpha$ 在AAP引起肝损害中发挥着关键作用, 与国内外报道相似.

AAP引起的损伤可以激活肝枯否氏细胞和内皮细胞<sup>[16]</sup>, 产生促炎因子, 如IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 等, 但它们对PMN无直接趋化作用, 而是通过上调黏附分子和趋化因子的表达, 引起PMN、巨噬细胞和单核细胞在肝脏的浸润和激活, 最终导致氧化应激和过氧化亚硝酸盐形成, 造成肝损害. ICAM-1是目前研究较为深入和广泛的一种细胞黏附分子, 其配体是淋巴细胞相关抗原-1(LFA-1)和巨噬细胞抗原复合体-1(MAC-1). 在炎症状态下, ICAM-1参与白细胞与肝窦周皮细胞的黏附, 完成其跨膜迁移, 黏附并损伤肝细胞等病理过程. 在正常肝组织内, 窦周肝细胞有不同程度的ICAM-1表达, 而肝细胞无表达, TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IL-1等细胞因子均能增加肝组织内ICAM-1的表达<sup>[17-20]</sup>. 陆伦根 *et al*<sup>[21]</sup>证实不同的肝损害因素均可通过TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、IL-1等细胞因子引起ICAM-1在肝细胞及窦周肝细胞表达增强, 表明尽管引起肝脏损伤的病因不同, 但造成肝组织损伤可能都是通过ICAM-1在肝细胞的表达而实现的. 当肝细胞表达ICAM-1时, 炎症细胞通过ICAM-1/LFA-1或ICAM-1/MAC-1结合而介导肝细胞和窦周细胞损伤, 缺乏ICAM-1表达时, 肝损伤不会发生. 有文章报道, 在肝脏缺血再灌注损伤时, 由于TNF- $\alpha$ 、IL-1等作用, ICAM-1表达上调, 增加了PMN与内皮细胞的黏附<sup>[22]</sup>. ICAM-1的单克隆抗体则可明显减少PMN的浸润, 有效减轻肝功能损害, 并促进ATP水平的迅速恢复<sup>[23]</sup>. 本组实验证实SD大鼠腹腔注射AAP后, 肝组织ICAM-1 mRNA表达显著高于对照组, 于3 h达高峰, 24 h时仍高于正常水平, 同时伴随着血清ALT进行性升高和病理损伤进行性加剧, 于24 h达到高峰, 与Bauer I *et al*<sup>[4]</sup>报道相似. 说明ICAM-1 mRNA表达在AAP肝损害的发生、发展过程发挥着关键的作用. 此外, 本组实验结果显示: 肝组织ICAM-1 mRNA表达高峰明显提前于血清TNF- $\alpha$ 水平的显著升高, 由此可见TNF- $\alpha$ 可能是通过自分泌或旁分泌作用, 而非内分泌作用引起ICAM-1 mRNA表达的增加.

总之, AAP可以通过激活肝枯否氏细胞和内皮细胞, 产生TNF- $\alpha$ 等促炎因子, 使肝组织ICAM-1 mRNA表

达增加, 而引起肝损害, 提示我们有可能通过在转录水平抑制ICAM-1 mRNA表达或使用相应的拮抗剂来预防和治疗AAP肝损害, 相关研究有待进一步进行.

#### 4 参考文献

- 1 Davids M. Hepatic disorders. Oxford: Oxford University Press. 1977;146-172
- 2 DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology* 1998;51:S62-S68
- 3 吴刚, 刘永锋, 杨蕾, 程颖, 赵宁, 何三光. 阿霉素预处理替代缺血预处理提供鼠肝缺血耐受力的实验研究. *中华肝胆外科杂志* 2002;82:97-300
- 4 Bauer I, Vollmar B, Jaeschke H, Rensing H, Kraemer T, Larsen R, Bauer M. Transcriptional activation of hemeoxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat. *J Hepatol* 2000;33:395-406
- 5 Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:1327-1331
- 6 Cohen SD, Hoivik DJ, Khairallah EA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. In: Plaa GL, Hewitt WR, eds. *Toxicology of the Liver*. 2nd ed. Washington: Taylor & Francis 1998:159-186
- 7 Jollow DJ, Mitchell JR, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1973;187:195-202
- 8 Hinson JA, Pumford NR, Roberts DW. Mechanisms of acetaminophen toxicity: immunochemical detection of drug-protein adducts. *Drug Metab Rev* 1995;27:73-92
- 9 Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990;192: 245-261
- 10 Bradham CA, Plumpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* 1998;275:G387-G392
- 11 Luster MI, Simeonova PP, Gallucci RM, Brucoleri A, Blazka ME, Yucesoy B. Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 2001;120:317-321
- 12 Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermuller S, Tiegs G, Wendel A. DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am J Pathol* 1996;149:1381-1393
- 13 Wang GH, Redmond HP, Watson RWG. Role of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induction of hepatocyte necrosis. *Am J Physiol* 1995;269:297-304
- 14 Douni E, Akassoglou K, Alexopoulou L, Georgopoulos S, Haralambous S, Hill S, Kassiotis G, Kontoyiannis D, Pasparakis M, Plows D, Probert L, Kollias G. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm* 1996;47:27-38
- 15 Faubion WA, Gores GJ. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology* 1999;29:1-4
- 16 Laskin DL, Pilaro AM. Potential role of macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. I. Isolation and characterization of activated macrophages from rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986;86:204-215
- 17 Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994;8:504-512
- 18 Hellerbrand, Wang SC, Tsukamoto H, Brenner DA, Rippe RA. Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996;24:670-676
- 19 Bautista AP. Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophage inflammatory protein-2 production and intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver. *Hepatology* 1997;25:335-342
- 20 Kvale D, Brandtzaeg P. Immune modulation of adhesion molecules ICAM-1( CD54) and LFA-3( CD58) in human hepatocytic

- cell lines. *J Hepatol* 1993;17:347-352
- 21 陆伦根, 曾民德, 范建高, 李继强, 刘颀, 任卫平, 戴宁. 实验性肝纤维化组织中细胞间黏附分子-1表达的研究. *中华内科杂志* 1999;38:37-39
- 22 Ohira H, Ueno T, Shakado S, Sakamoto M, Torimura T, Inuzuka S, Sata M, Tanikawa K. Cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells express intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)by tumor necrosis factor- $\alpha$  or interleukin-1 alpha stimulation. *J Hepatol* 1994;20:729-734
- 23 Jaeschke H, Farhood A, Bautista A. The F(ab)fragment of anti-ICAM-1 monoclonal antibody attenuate liver after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1996;61:99-104

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 消息 •

## 2006 年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行

**本刊讯** 世界华人消化杂志主要报道食管癌、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最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

据中国科技期刊引证报告(潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 1-289)统计, 世界华人消化杂志 2003 年发表文章 594 篇, 地区分布 25 个, 机构分布 191 个, 基金论文比 31%, 总被引频次 5249 次, 影响因子 2.924, 即年指标 0.529, 引用期刊数 260 种, 被引半衰期 3.06. 中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的 10 个科学计量指标, 并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊。世界华人消化杂志获得 2001 年和 2003 年中国百种杰出学术期刊。

据《中文核心期刊要目总览 2004 年版》(戴龙基, 蔡蓉华主编. 北京: 北京大学出版社, 2004: 1-678), 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库有 51 种, 统计到的文献数量共计 9435301 篇次, 涉及期刊 39893 种次. 参加核心期刊评审的学科专家达 1873 位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从中国正在出版的近 1 万 2 千种中文期刊中评选出 1800 种核心期刊. 世界华人消化杂志被评为中文核心期刊要目总览。

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 2006 年由北京报刊发行局发行, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 邮发代号 82-262, 出版日期 8, 18, 28 日, 页码 160, 月价 72.00。(世界胃肠病学杂志社 2005-06-29)



## SD 大鼠胰腺癌模型组神经生长因子 mRNA 表达

杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰

杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰, 中南大学湘雅二医院肝胆胰疾病研究室湖南省长沙市 410011

杨竹林, 男, 1962-08-08生, 湖南省涟源市人, 汉族, 1998年湖南医科大学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事消化系统疾病的病理研究。

通讯作者: 杨竹林, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院肝胆胰疾病研究室. zhulinyang@sina.com

收稿日期: 2005-06-01 接受日期: 2005-06-18

### Expression of nerve growth factor messenger RNA in pancreatic cancer tissues in Sprague Dawley rats

Zhu-Lin Yang, Xing-Hui Deng, Le-Ping Yang, Qing-Long Li, Wen-Tao Fan, Shan Liang, Xiong-Ying Miao

Zhu-lin Yang, Xing-Hui Deng, Le-Ping Yang, Qing-Long Li, Wen-Tao Fan, Shan Liang, Xiong-Ying Miao, Laboratory of Hepatobiliary Diseases, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Zhu-Lin Yang, Laboratory of Hepatobiliary Diseases, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Received: 2005-06-01 Accepted: 2005-06-18

### Abstract

**AIM:** To establish a model of pancreatic cancer in Sprague-Dawley(SD)rats and to explore the expression and its significance of nerve growth factor(NGF)mRNA in pancreatic cancer and non-cancer tissues.

**METHODS:** Ninety rats were randomly divided into A ( $n = 40$ ), B ( $n = 40$ ) and C ( $n = 10$ ) group. For group A and B, dimethylbenzanthracene (DMBA) was directly implanted into the parenchyma of the rat pancreas to establish pancreatic cancer model. The rats in group B were treated with trichostatin(TSA). The rats in group C served as the controls. The rats were executed within 3-5 mo, and the carcinogenesis of the rats was observed by pathological methods. *In situ* hybridization was used to detect the expression of NGF mRNA in the formalin-fixed and routinely paraffin-embedded sections of pancreatic cancer and non-cancer tissues.

**RESULTS:** The prevalence rate of pancreatic cancer in group A was 48.7%(18/37) within 3-5 mo, 28.6%(2/7) at mo, 40.0%(4/10) at 4 mo and 60%(12/20) at 5 mo ( $P > 0.05$ ), and that in group B was 33.3%(12/36), 16.7%(1/6), 30.0%(3/10) and (40.0%)8/20, respectively

( $P > 0.05$ ). The prevalence rate in group A was higher than that of group B ( $P > 0.05$ ). The diameters of tumor mass in group A were significantly larger than those in group B (group A: 0.5-1.0 cm 7 cases, 1.0-2.0 cm 10 cases,  $> 2$  cm 1 case vs group B: 0.5-1.0 cm 9 case, 1.0-2.0 cm 2 cases,  $> 2.0$  cm 1 case,  $P < 0.05$ ). No tumor formed in the pancreas of the rats in group C or in other main organs of the rats in group A and B. The positive rate of NGF mRNA expression in the pancreatic ductal cancer tissues was significantly higher than that in non-cancer tissues (67.9% vs 18.6%,  $P < 0.01$ ), and severely atypical hyperplasia was observed in the positive non-cancer pancreatic tissues of ductal epithelium. The positive rate of NGF mRNA expression in ductal adenocarcinoma was markedly higher in group A than that in group B ( $P = 0.052$ ). The positive rate of NGF mRNA in the rats with tumor maximal diameter  $\leq 1.0$  cm was lower than that in the ones with tumor maximal diameter  $> 1.0$  cm ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Direct implantation of DMBA in the parenchyma of pancreas can induce pancreatic cancer with a high occurrence rate in a short time. NGF may play an important role in the carcinogenesis of pancreatic cancer. TSA can inhibit the occurrence and progression of pancreatic cancer by inhibiting NGF expression.

**Key Words:** Nerve growth factor; Dimethylbenzanthracene; Trichostatin

Yang ZL, Deng XH, Yang LP, Li QL, Fan WT, Liang S, Miao XY. Expression of nerve growth factor messenger RNA in pancreatic cancer tissues in Sprague Dawley rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2227-2230

### 摘要

**目的:** 建立SD鼠胰腺癌模型并探讨胰腺癌和非癌胰腺组织神经生长因子(NGF)mRNA表达及其意义。

**方法:** 90只SD大鼠随机分为模型组(A,  $n = 40$ )、DMBA干预组(B,  $n = 40$ )和对照组(C,  $n = 10$ )。将二甲苯并蒽(DMBA)置入A、B组大鼠胰腺实质内建立胰腺癌模型, B组大鼠以曲古霉素(TSA)干预, 3-5 mo内处死观察胰腺癌发生情况, 标本经40 g/L中性甲

醛固定后常规制作石蜡包埋切片, 原位杂交行NGF mRNA表达研究.

**结果:** A组(实验组)3-5 mo发癌率48.7%, 5 mo(60%)高于4 mo组(40.0%)和3 mo组(28.6%); B组发癌率为33.3%, 5 mo组(40.0%)高于4 mo组(30.0%)和3 mo组(16.7%); A和B组胰腺导管癌分别为17例和11例, 余为纤维肉瘤; A组发癌率高于B组( $P>0.05$ ), A组肿块最大径明显大于B组(A组: 0.5-1.0 cm 7例, 1.0-2.0 cm 10例,  $>2.0$  cm 1例; B组: 0.5-1.0 cm 9例, 1.0-2.0 cm 2例,  $>2.0$  cm 1例,  $P<0.05$ ); C组(对照组)胰腺及A、B两组胰腺外主要脏器均无明显病理改变. SD大鼠胰腺导管癌NGF mRNA表达阳性率明显高于非癌胰腺组织(67.9% vs 18.6%,  $P<0.01$ ), 且非癌胰腺组织阳性表达者导管上皮均呈重度不典型增生; A组胰腺导管癌NGF mRNA表达阳性率高于B组( $P=0.052$ ); 肿块最大径 $\leq 1.0$  cm者NGF mRNA表达阳性率低于肿块最大径 $\geq 1.0$  cm者( $P>0.05$ ).

**结论:** DMBA置入胰实质可在短期内获得较高的SD鼠胰腺癌发生率, NGF在SD鼠胰腺癌发生过程中可能起重要作用. TSA能抑制胰腺癌的发生和生长, 其作用可能与抑制NGF表达有关.

**关键词:** 神经生长因子; 二甲基苯并蒽; 曲古霉素

杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 李清龙, 范文涛, 梁珊, 苗雄鹰. SD大鼠胰腺癌模型组神经生长因子mRNA表达. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2227-2230  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2227.asp>

## 0 引言

胰腺癌早期诊断和手术切除极为困难<sup>[1-4]</sup>, 动物模型为探讨癌变机制及肿瘤防治的重要手段<sup>[5-8]</sup>. 目前, 仍缺乏理想的胰腺癌动物模型. 我们应用二甲基苯并蒽(dimethylbenzanthracene, DBMA)置入SD大鼠胰腺实质内建立胰腺癌模型及设立曲古霉素(trichostatin, TSA)干预组<sup>[9-11]</sup>. 应用原位杂交方法研究胰腺癌和非癌胰腺组织内神经生长因子(nerve growth factor, NGF)mRNA表达水平, 探讨模型优劣、TSA干预机制及胰腺癌发生发展过程中NGF的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 动物模型** 由湘雅二医院实验动物中心提供的SD大鼠90只, 体质量为150-200 g, 雌雄不限, 随机分成A, B, C3组, A组40只(DMBA组), B组40只(DMBA+TSA组)和C组10只(空白对照组). 术前禁食24 h, 不禁水, 20 g/L戊巴比妥钠(1.5 mL/kg)ip麻醉, 经上腹正中切口进腹, 暴露胰腺后于胰体尾部切开胰腺被膜及部分胰实质, 深1 mm, A, B两组置入9 mg DMBA,

缝合胰腺被膜后关腹. C组除不置DMBA外, 余同A组. 在普通环境中喂养, 自由饮净化水及全价营养颗粒饮食. B组鼠每周ip 1 mg/L TSA 1 mL. 除自然死亡外, 分别于3, 4, 5 mo随机处死A组(7, 10和20只)和B组(6, 10和20只), C组鼠于5 mo全部处死. 行病理学观察.

**1.2 NGF mRNA表达** NGF mRNA原位杂交试剂盒及DAB-HCL显色试剂盒均购自武汉博士德公司. SD大鼠胰腺及非癌胰腺组织NGF mRNA染色方法为分子原位杂交染色法, 严格按试剂盒说明书操作(具体步骤略). 细胞质内含棕黄色颗粒者为阳性细胞, 以切片中阳性细胞 $\geq 25\%$ 为阳性,  $<25\%$ 为阴性<sup>[12-13]</sup>. 以试剂盒阳性切片作为染色的阳性对照, 以0.5 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)替代杂交液作为阴性对照.

**统计学处理** 采用SPSS10.0软件包进行 $\chi^2$ 检验、秩和检验或Fishers精确概率法, 检验水准 $\alpha=0.05$ .

## 2 结果

**2.1 建模情况** A组37只(2只在术后1 mo和1只在术后2 mo内自然死亡)发生胰腺癌18只(48.7%), 其中5 mo组(60.0%)较明显高于4 mo组(40.0%)和3 mo组(28.6%), 但差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 病理组织学类型包括胰腺导管癌17例(高分化6例、中分化7例和低分化4例)和纤维肉瘤1例. B组36只(3只在术后1 mo和1只在术后2 mo内自然死亡)发生胰腺癌12只(33.3%), 其中5 mo组(40.0%)高于4 mo(30.0%)和3 mo组(16.7%), 但差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 病理组织学类型包括胰腺导管癌11例(高分化6例, 中分化4例和低分化1例)和纤维肉瘤1例. A组发癌率高于B组, 但差异无统计学意义( $P>0.05$ ). A组肿块最大径(0.5-1.0 cm 7例, 1.0-2.0 cm 10例和 $>2.0$  cm 1例)明显大于B组(0.5-1.0 cm 9例, 1.0-2.0 cm 2例和 $>2.0$  cm 1例), 经秩和检验差异有统计学意义( $P<0.05$ ). A组和B组胰腺导管癌组织学结构完全相同于人类胰腺导管癌(图1A), 无1例腺泡细胞癌. A组和B组纤维肉瘤(图1B)分别发生肝转移和网膜脂肪组织转移. C组胰腺组织均无明显病理学变化. 胰腺外主要脏器(包括肝、胆囊、胆总管、胃、肠、肺、脑等)均无肿瘤发生及病理组织学改变. 3-5 mo处死大鼠非癌胰腺组织可见腺泡细胞形态改变, 导管上皮细胞乳头状增生及不典型增生等病理改变, 其中导管上皮中至重度不典型增生者A组(52.6%)高于B组(33.3%), 但差异无统计学意义( $P>0.05$ ).

**2.2 NGF mRNA表达** A, B组胰腺导管癌28例NGF mRNA表达阳性19例(67.9%), 明显高于非癌胰腺组织(8/43, 18.6%), 差异有高度统计学意义( $P<0.01$ ); A、B两组纤维肉瘤均呈NGF mRNA阳性表达. A组胰腺导管癌NGF mRNA表达阳性率(14/17, 82.4%)明显高于A组



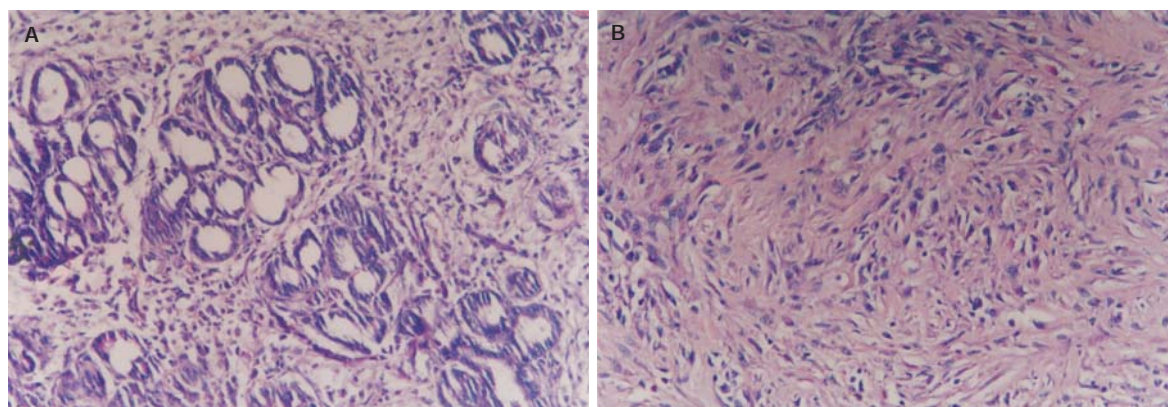


图1 SD大鼠实验胰腺肿瘤HE×200. A: 高化导管腺癌; B: 纤维肉瘤.

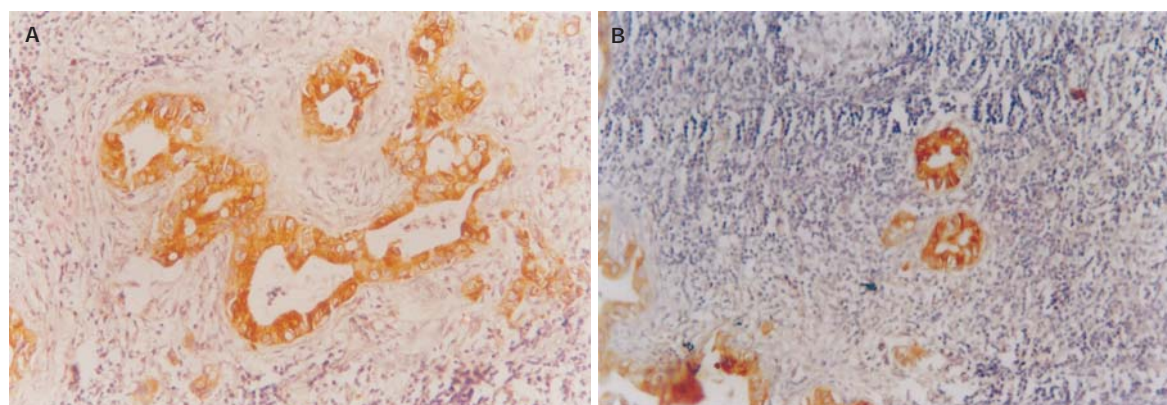


图2 大鼠胰腺NGF mRNA阳性表达, 原位杂交×200. A: 中分化导管癌; B: 非癌胰腺组织.

非癌胰腺组织(5/19, 26.3%), 差异有高度统计学意义( $P<0.01$ ), 且非癌胰腺组织阳性者导管上皮均呈重度不典型增生. B组胰腺导管癌NGF mRNA表达阳性率(5/11, 45.5%)明显高于B组非癌胰腺组织(3/24, 12.5%), 差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 且非癌胰腺组织阳性者导管上皮均呈重度不典型增生. A组胰腺导管癌NGF mRNA阳性率(82.4%)高于B组胰腺导管癌(45.5%), 但差异无统计学意义( $P=0.052$ ). 肿块最大径 $\leq 1.0$  cm的胰腺导管癌NGF mRNA阳性率(8/15, 53.3%)明显低于肿块最大径 $>1.0$  cm胰腺导管癌(11/13, 84.6%), 但差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图2).

### 3 讨论

我们应用较大剂量DMBA置入SD大鼠胰腺组织内3-5 mo内总发癌率A组达48.7%, B组总发癌率为33.3%, 病理学类型除2例纤维肉瘤外, 均与人类胰腺导管腺癌组织学结构相同. B组肿块直径明显低于A组, 非癌病变胰腺组织可观察到导管上皮从增生至不典型增生等癌前病理改变; 且两组大鼠除2例胰腺纤维肉瘤分别发生肝脏和网膜脂肪组织转移外, 均未见胰腺外主要脏器发生肿瘤及其他病理改变. 我们制作的SD大鼠模型具有以下优点<sup>[1-8, 11, 14-21]</sup>: (1)成瘤周期短; (2)能在短期内观察胰腺癌发生发展的病变过程; (3)组织学特征

更接近人类胰腺导管癌; (4)胰腺外其他脏器均未见恶性肿瘤出现; (5)TSA抑癌作用及抑癌生长效果较明显; (6)制作成本低廉. NGF是一种 $M_r$ 为26 000多肽, 属神经生长因子家族的成员. TrKA是NGF的高亲和力受体,  $M_r$ 14 000的跨膜糖蛋白, NGF与TrKA结合后使胞质内区的酪氨酸激酶活性增高, 进而引起生物学效应<sup>[22-25]</sup>. NGF在神经嵴来源肿瘤呈高表达, 部分非神经嵴来源的肿瘤NGF及其受体TrKA也呈高表达, 其作用与神经嵴来源肿瘤相反, 认为是促进恶性细胞增生和使其向更“恶性”表型转化<sup>[12, 13, 26-29]</sup>. NGF及其受体TrKA表达与乳腺癌、涎腺囊性腺癌、胰腺癌等非神经嵴来源肿瘤发生、进展、侵袭潜力、转移及预后密切相关, 阳性表达者多进展快、侵袭潜力强、易发生嗜神经侵袭、易发生转移和预后差<sup>[12, 13, 20, 22, 24-30]</sup>. 胰腺癌为嗜神经侵袭的恶性肿瘤, 嗜神经侵袭是影响胰腺癌预后的重要因素, 神经侵袭患者预后明显比神经未侵袭者差<sup>[12, 23, 24]</sup>. 我们应用原位杂交方法研究SD大鼠胰腺癌模型中胰腺癌和非癌胰腺组织NGF mRNA表达水平, 发现胰腺导管癌NGF mRNA表达水平明显高于非癌胰腺组织, 非癌胰腺组织NGF mRNA阳性者导管上皮均呈重度不典型增生; A组胰腺导管癌NGF mRNA阳性率高于B组, 以及肿瘤最大径 $\leq 1.0$  cm者NGF mRNA阳性率低于肿块最大径 $>1.0$  cm者, 但差异均无统计学



意义 ( $P>0.05$ ). 结果提示NGF在SD大鼠胰腺癌发生及生长速率方面有重要作用, TSA可能通过抑制NGF表达发挥抑瘤和抑瘤生长作用, 其作用机制有待更深入研究.

#### 4 参考文献

- Grippio PJ, Sandgren EP. Modeling pancreatic cancer in animals to address specific hypotheses. *Methods Mol Med* 2005;103:217-243
- Abraham AT, Shah SR, Davidson BR. The HaP-T1 Syrian golden hamster pancreatic cancer model: cell implantation is better than tissue implantation. *Pancreas* 2004;29:320-323
- Kurahashi M, Miyake H, Takagi T, Tashiro S. Changes of Lymphatic flow in case of pancreatic duct obstruction in the pig-as a model of pancreatic cancer. *J Med Invest* 2004;51:70-75
- Leach SD. Mouse models of pancreatic cancer: the fur is finally flying! *Cancer Cell* 2004;5:7-11
- Lowy AM. Transgenic models of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2003;33:71-78
- Yee NS, Pack M. Zebrafish as a model for pancreatic cancer research. *Methods Mol Med* 2005;103:273-298
- Miura Y, Ohnami S, Yoshida K, Ohashi M, Nakano M, Ohnami S, Fukuhara M, Yanagi K, Matsushita A, Uchida E, Asaka M, Yoshida T, Aoki K. Intraperitoneal injection of adenovirus expressing antisense K-ras RNA suppresses peritoneal dissemination of hamster syngeneic pancreatic cancer without systemic toxicity. *Cancer Lett* 2005;218:53-62
- Bockman DE, Guo J, Buchler P, Muller MW, Bergmann F, Friess H. Origin and development of the precursor lesions in experimental pancreatic cancer in rat. *Lab Invest* 2003;83:853-859
- Yamashita Y, Shimada M, Harimoto N, Rikimaru T, Shirabe K, Tanaka S, Sugimachi K. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells. *Int J Cancer* 2003;103:572-576
- Monneret C. Histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2005;40:1-13
- Touma SE, Goldberg JS, Moench P, Guo X, Tickoo SK, Gudas LJ, Nanus DM. Retinoic acid and histone deacetylase inhibitor trichostatin A inhibit the proliferation of human renal cell carcinoma in a xenograft tumor model. *Clin Cancer Res* 2005;11:3558-3566
- Okada Y, Eibl G, Guha S, Duffy JP, Reber HA, Hines OJ. Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cell. *Clin Exp Metastasis* 2004;21:285-292
- Tokusashi Y, Asai K, Tamakawa S, Yamamoto M, Yoshie M, Yaginuma Y, Miyokawa N, Aoki T, Kino S, Kasai S, Ogawa K. Expression of NGF in hepatocellular carcinoma cells with its receptors in non-tumor cell components. *Int J Cancer* 2005;114: 39-45
- Yamagishi M, Natsume M, Osakabe N, Nakamura H, Furukawa F, Imazawa T, Nishikawa A, Hirose M. Effects of cacao liquor proanthocyanidins on PhIP-induced mutagenesis in vitro, and in vivo mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 2002;185:123-130
- Gendler SJ, Mukherjee P. Spontaneous adenocarcinoma mouse models for immunotherapy. *Trends Mol Med* 2001;7:471-475
- Wang B, Shi Q, Abbruzzese JL, Xiong Q, Le X, Xie K. A novel clinically relevant animal model of metastatic pancreatic adenocarcinoma biology and therapy. *Int J Pancreatol* 2001;29:37-46
- Standop J, Schneider MB, Ulrich A, Pour PM. Experimental animal models in pancreatic carcinogenesis: Lessons for human pancreatic cancer. *Dig Dis* 2001;19:24-31
- Hotz HG, Reber HA, Hotz B, Foitzik T, Buhr HJ, Cortina G, Hines OJ. An improved clinical model of orthotopic pancreatic cancer in immunocompetent Lewis rats. *Pancreas* 2001;22:113-121
- Hotz HG, Hines OJ, Masood R, Hotz B, Foitzik T, Buhr HS, Gill PS, Reber HA. VEGF antisense therapy inhibits tumor growth and improves survival in experimental pancreatic cancer. *Surgery* 2005;137:192-199
- Li J, Weghorst CM, Tsutsumi M, Poi MJ, Knobloch TJ, Casto BC, Melvin WS, Tsai MD, Muscarella P. Frequent P16<sup>INK4A</sup>/CDKN2A alteration in chemically induced Syrian golden hamster pancreatic tumors. *Carcinogenesis* 2004;25:263-268
- Vernejoul F, Faure P, Benali N, Calise D, Tiraby G, Pradayrol L, Susini C, Buscail L. Antitumor effect of in vivo somatostatin receptor subtype 2 gene transfer in primary and metastatic pancreatic cancer models. *Cancer Res* 2002;62:6124-6131
- Du JJ, Dou KF, Peng SY, Qian BZ, Xiao HS, Liu F, Wang WZ, Guan WX, Gao ZQ, Liu YB, Han ZG. Expression of NGF family and their receptors in gastric carcinoma: a CDNA microarray study. *World J Gastroenterol* 2003;9:1431-1434
- Zhu ZW, Friess H, Wang L, Bogardus T, Korc M, Kleeff J, Buchler M. Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001;7:105-112
- Zhu Z, Friess H, diMola FF, Zimmermann A, Graber HU, Korc M, Buchler MW. Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:2419-2428
- Cohen S. Origins of growth factors: NGF and EGF. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1038:98-102
- Dolle L, Adriaenssens E, El Yazidi-Belkoura I, Le Bourhis X, Nurcombe V, Hondermarck H. Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:463-470
- 孙沫逸, 王磊, 杨连甲, 侯锐, 孙文斌, 卢超. NGF在涎腺腺样囊性癌中的表达与嗜神经侵袭和疼痛的关系. 第四军医大学学报 2004;25:1012-1014
- Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinase: A bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 2001;169:107-114
- Kishibe K, Yamada Y, Ogawa K. Production of nerve growth factor by mouse hepatocellular carcinoma cells and expression of TrKA in tumor-associated arteries in mice. *Gastroenterology* 2002;122:1978-1986
- Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, Nurcombe V, Hondermarck H. Nerve growth factor over expression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22:5592-5601

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 乳酸杆菌作为一种新型活疫苗抗原递送载体

庾庆华, 杨倩

庾庆华, 杨倩, 南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室 江苏省南京市 210095  
国家重点基础研究发展计划项目, No. 2004CB11750-  
通讯作者: 杨倩, 210095, 江苏省南京市, 南京农业大学农业部动物生理生化重点开放实验室: iamspringyqh@yahoo.com.cn  
电话: 025-84395817  
收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-07-23

## 摘要

乳酸杆菌不仅有多种生理功能, 如控制肠内感染、抗肿瘤活性等, 还能促进小肠局部细胞免疫和体液免疫。乳酸杆菌又是人和动物胃肠中正常存在的菌群, 作为活疫苗抗原递送载体具有很好的安全性。因此, 乳酸杆菌是一种理想的口服基因工程苗的表达载体。近年来, 国外一些学者已经构建了表达不同抗原的乳酸杆菌, 如炭疽杆菌保护性抗原、破伤风毒素C、霍乱毒素B亚单位、细菌素sakacin A和sakacin P等, 口服这些乳酸杆菌后动物体内均能产生特异性黏膜免疫应答反应。本文对近几年来乳酸杆菌作为抗原递送载体的研究进展进行了总结, 并对乳酸杆菌表达抗原时存在的问题进行了讨论。

**关键词:** 乳酸杆菌

庾庆华, 杨倩. 乳酸杆菌作为一种新型活疫苗抗原递送载体. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2231-2234  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2231.asp>

## 0 引言

几个世纪以来, 乳酸杆菌作为重要的益生菌已广泛地应用于食品及饮料加工业, 以乳酸杆菌作为发酵菌的食品工业所创造出的经济价值占全球总的发酵类食品的20%。数千年, 乳酸杆菌被人类大量食用, 没有引起任何已知的健康问题, 从而使其成为安全(口服)疫苗开发的具有吸引力的候选物。一系列复制子构建的具广泛宿主范围的质粒载体系统已成功地转化乳酸杆菌并表达内源及外源基因。但是与医药微生物基因工程研究相比, 乳酸杆菌基因工程进展较慢, 为有利于该项基因工程的发展和产业化作综述如下。

## 1 口服黏膜免疫研究进展

口服黏膜免疫方法简便、安全, 不仅在黏膜局部和其他黏膜组织产生免疫应答, 还可引起全身性体液免疫应答, 多年来受到国内外免疫学家的密切关注。目前儿童广泛口服的脊髓灰质炎糖丸就是一个消化道黏膜免疫成功的例子。脊髓灰质炎口服疫苗的应用, 使全球小儿麻

痹发病得到有效控制, 为口服疫苗的研制与应用起到了指导作用。但是在实践中, 口服疫苗经过消化道时常受到消化液的降解, 疫苗很容易被破坏, 影响免疫力的效果, 使消化道黏膜免疫方法的应用和推广受到限制。近年来疫苗投递系统成为研究传染病防御领域新技术的热点之一。尤其是细菌活载体疫苗因具有培养方便, 外源基因容量大, 刺激细胞免疫力强等优点具有巨大的应用潜力。细菌载体疫苗是新兴现代疫苗的重要发展方向, 所谓细菌载体疫苗是将所需的编码病原菌特异性抗原的DNA片段插入减毒的病原菌或者共生菌中, 提呈表达所编码的抗原, 以期达到预防一种或多种疾病的目的。通过活菌载体递送疫苗抗原不仅可刺激肠道局部免疫应答, 又可针对特异性抗原产生特异性免疫应答, 使机体可以获得全面的保护力。

以前的研究<sup>[1-4]</sup>表明一些减毒细菌可作为疫苗抗原的载体, 如沙门氏菌、弱毒李斯特菌等。国外学者以减毒沙门氏菌为载体在真核细胞中成功表达了lacZ基因、绿色荧光蛋白(GFP)基因、HIV-gp140基因、李斯特菌溶血素基因等。但沙门氏菌为载体传递DNA疫苗也存在潜在危险性。首先, 减毒细菌可能存在毒力返强的危险; 其次, 质粒DNA可能会整合到宿主细胞基因组, 从而引起调控细胞生长的基因紊乱、原癌基因和抑癌基因的表达失控、体细胞癌变、细胞转型等一系列问题<sup>[5]</sup>。此外, 减毒细菌对一些老弱病残个体可能有潜在致病性。因此, 选择理想的疫苗抗原载体是建立生物学新技术的关键。理想的输送抗原的载体应该是能够在体内较长时间存在, 本身对机体既安全又能产生持续免疫力的一些微生物。

## 2 乳酸杆菌对黏膜免疫的影响

乳酸杆菌是人体和动物肠道中一种正常的益生菌, 具有多种生理功能, 如控制肠道感染、增加某些食物的营养价值、控制血清胆固醇水平、改善乳糖代谢、诱导体内特异性及非特异性免疫应答以及抗肿瘤活性等功能, 在科学界越来越显示出强大的生命力。作为一种重要的益生菌, 多年来乳酸杆菌被大量用于食品的制造中, 如干酪、酸乳酪和干腊肠。数千年来人们大量的消费这些食品, 从未引起任何的健康问题。作为口服疫苗, 乳酸杆菌还具有很好的安全性。因此, 乳酸杆菌非常适宜作为安全的口服疫苗和其他病原体的抗原载体。

进入胃肠道中的乳酸杆菌具备抗胆汁酸和在胃肠道

中持续存在的能力. 与一般微生物抗原一样, 乳酸杆菌在诱导黏膜免疫应答时或是经过小肠上皮之间的微皱褶细胞(microfold cell, M细胞), 或者通过上皮下的树突状细胞(dendritic cell, DC)进入固有层, 激活Th2淋巴细胞, 产生大量的白介素(IL)-5, 后者是有效的IgA刺激因子, 可激活B细胞, 分泌IgA, IgA与肠黏膜上皮产生的分泌片段结合, 形成黏膜表面抗体sIgA(分泌型IgA), 阻止致病菌的吸附和入侵<sup>[6]</sup>. 许多乳酸杆菌由于抗酸、抗胆汁盐, 能够顺利通过胃和回肠, 大量存在于小肠和大肠的上游处<sup>[7]</sup>. 乳酸杆菌进入胃肠道后可持续诱导局部细胞免疫和体液免疫, 并具有减少变态反应、增强肠道屏障功能和治疗自身免疫病等功能.

乳酸杆菌能显著增加肠道中非特异性和特异性抗体水平. 对0-6个月健康新生儿的研究发现, 肠道内的乳酸杆菌和双歧杆菌定植的时间越早, 外周血中IgA定向细胞出现得就越早; 随着肠内乳酸杆菌和双歧杆菌数目的增加, 外周血中的IgA定向细胞的数量也增加; 在轮状病毒导致的腹泻婴儿中, 喂食乳酸杆菌株后可使病程减短, 病情减轻<sup>[8]</sup>; 减毒的*Salmonella typhi*感染小鼠后, 如果口服含有*L. acidophilus* Lal发酵乳, 小鼠体内针对*S. typhi*的血清总IgA水平均升高<sup>[9]</sup>. 乳酸杆菌还可明显促进小肠中细胞免疫反应, 如乳酸杆菌能增强肠上皮淋巴细胞细胞毒活性, 诱导产生多种淋巴因子; 激发固有层CD4+细胞产生干扰素; 增强单核-吞噬细胞的吞噬作用, 从而杀灭肠道病毒和肠道内的其他细菌, 小鼠口服含有大量乳酸杆菌的Kefir奶可以协助特异性抗原提高小肠特异性黏膜免疫反应<sup>[10]</sup>. 乳酸杆菌中含有大量未甲基化的CpG DNA, 脂磷壁酸(lipoteichoic acids, LTA)和肽聚糖, 通常这些物质可与Toll样受体(toll like receptors, TLRs)结合, 刺激先天免疫系统产生应激反应. 所以口服乳酸杆菌对增强小肠特异和非特异性免疫应答均具有重要作用.

### 3 乳酸杆菌作为活疫苗抗原递送载体

乳酸杆菌是安全的益生菌, 利用一些乳酸杆菌在胃肠道、泌尿、生殖系统中或黏膜部位黏附存活且无病原性等特点, 开展活菌口服疫苗和黏膜疫苗载体的研究, 日益受到了广泛的重视. 理想的疫苗载体系统能够把表达的外源性蛋白抗原分泌到细胞外. 外源蛋白在细菌中的表达在生物技术上一直是一个挑战. 乳酸杆菌的一些菌株具有S层(S-layer), 由单一的蛋白亚单位组成规则排列的类晶格结构. 与大肠杆菌相比, 乳酸杆菌仅有一层细胞膜, 目的蛋白可在S层蛋白信号肽的引导下直接分泌到细胞外, 从而容易获得目的蛋白. 将目的抗原与乳酸杆菌S层蛋白信号肽序列融合, 将其克隆于乳酸杆菌表达质粒启动子下游, 通过电转化可以获得稳定表达抗原的乳酸杆菌. 虽然一些革兰氏阴性菌也具有S层, 但

革兰氏阴性菌存在一定缺点, 如在大肠杆菌中, 重组蛋白易被内毒素污染并易以不溶的包涵体形式在细胞质中堆积; 而乳酸杆菌则能稳定的将异源性重组蛋白表达于细胞外<sup>[11]</sup>. 但是前几年乳酸杆菌的遗传和分子生物学研究进展较为缓慢, 主要是由于乳酸杆菌的转化系统研究的不够深入. 最近乳酸杆菌作为递呈保护性抗原的有效活载体有了突破性进展. 法国学者Grangette *et al*<sup>[12]</sup>首先用乳酸杆菌作为破伤风毒素黏膜疫苗的抗原递送系统, 通过鼻腔免疫, 成功诱导了IgA抗体和IgG抗体的特异性体液免疫反应以及细胞免疫反应; Sorvig *et al*<sup>[13]</sup>应用乳酸杆菌成功构建了可表达细菌素sakacin A和sakacin P的载体; Scheppler *et al*<sup>[14]</sup>将编码德氏乳酸杆菌prtB蛋白酶(与破伤风毒素A的模拟表位相连)的溶血乳酸杆菌口服接种动物, 可同时产生特异性IgG应答和黏膜IgA免疫应答. 目前, 已成功构建了许多可表达不同抗原的乳酸杆菌, 如炭疽杆菌保护性抗原, 破伤风毒素片段C(tetanus toxin fragment C, TTFC)和霍乱毒素B亚单位等<sup>[15]</sup>.

乳酸杆菌有50多种, 生化特性、生态、分子构成和免疫特性均不同, 种间转录和翻译的差异也很大. 不同菌株对同一抗原的表达水平和表达产物不同, 对动物产生的抗体水平也有差别. 一种抗原在一种乳酸杆菌上的表达水平很高, 但在其他菌株表达水平并不一定高. 不同菌株可刺激淋巴细胞表达不同细胞因子, 可能与不同的基因表达有关<sup>[16]</sup>. 此外, 不同乳酸杆菌引起的免疫应答水平有所差异, 如植物乳酸杆菌作为抗原载体时的免疫应答水平比干酪乳酸杆菌要高; 不同的乳酸杆菌菌株诱导细胞因子产生的种类也不同. 因此如果诱导特定细胞因子的产生和免疫应答, 应该筛选不同的乳酸杆菌<sup>[17]</sup>.

乳酸杆菌进入机体的免疫途径不同, 对动物产生的免疫反应也不同. 表达TTFC的植物乳酸杆菌经鼻腔免疫和口服免疫均可诱导特异性TTFC免疫应答. 但鼻腔免疫产生的抗体效价比口服免疫的高<sup>[18-19]</sup>. Shaw *et al*<sup>[18]</sup>通过口服免疫表达TTFC的植物乳酸杆菌后却检测不到特异性TTFC抗体, 可能与TTFC的表达水平太低有关. Grangette *et al*<sup>[12]</sup>还对乳酸杆菌死菌和活菌的效果进行了比较, 发现应用乳酸杆菌活菌接种小鼠产生的保护力水平比细菌经过丝裂霉素C处理后产生的保护力要高的多, 表明乳酸杆菌活菌诱导动物免疫反应的能力比死菌效果更好. 为了进一步提高乳酸杆菌对免疫反应的影响, 一些学者试图通过在重组的乳酸杆菌疫苗中联合表达一些细胞因子, 如在乳酸乳球菌中表达TTFC时再联合表达IL-2或IL-6. 给小鼠口服这些菌株后, 这两种细胞因子的表达可使小鼠对TTFC产生的免疫应答过程更快, 产生的特异性TTFC抗体滴度更高<sup>[20]</sup>.

乳酸杆菌的基因转化需要一些合适的克隆体系. Nisin诱导型表达非常适用于乳酸杆菌的转化, 其是由



NisR和NisK组成的双组分调节基因, 分别编码组氨酸激酶和应答调节物, 构成乳链菌肽生物合成的双组分调节系统<sup>[13]</sup>. 该调节系统, 在NisA和NisF启动子的控制下诱导基因的转录. 此外, 相同表达系统应用于不同乳酸杆菌菌株时, 启动子的活性、复制效率和质粒的拷贝数也会不同<sup>[21]</sup>.

在研究乳酸杆菌启动小肠免疫应答的机制时, 需要对乳酸杆菌进行标记以便于观察. GFP是一种完美的荧光标记分子, 与其他生物发光或荧光指示分子不同, 该蛋白能够自身催化形成发光结构并在紫外或蓝光激发下发出绿色荧光<sup>[22]</sup>. 作为荧光标记分子, GFP具有很多优点, 如检测方便, 荧光稳定, 易于构建载体且对活细胞无毒害, 对目的基因的功能没有影响, 转化后细胞可以继续传代. 因此, GFP是稳定的非种属限制的标记分子, 能够检测活体细胞的运动. 在食品科学界, Gory *et al*<sup>[23]</sup>和Arellano *et al*<sup>[22]</sup>先后在食品中的乳酸杆菌成功构建了表达GFP的载体. Gory将GFP基因插入*L. sakei*组成型启动子的下游, 可在干腊肠中直接观察到GFP阳性的*L. sakei*. Geoffroy *et al*<sup>[24]</sup>报道, 给小鼠口服GFP标记的植物乳酸杆菌, 结果发现荧光蛋白标记的乳酸杆菌大部分都存在于肠黏液中或游离于肠腔中. 鼻腔接种GFP标记的植物乳酸杆菌, 发现乳酸杆菌被支气管肺泡冲洗液中的巨噬细胞吞噬, 但标记的乳酸杆菌如何进入小肠上皮诱导局部免疫反应尚未见有报道.

总之, 乳酸杆菌最令人感兴趣的新领域之一是利用乳酸杆菌作为口服疫苗的载体. TTFC在乳酸杆菌中的成功表达证明将乳酸杆菌应用于黏膜免疫是完全可行的. 在许多动物模型中进行的黏膜疫苗的研究, 都取得了较好的免疫效果, 但这些结果和结论能否适用于人类, 仍存在一定距离. 现在构建乳酸杆菌口服基因工程苗的表达载体的条件都已逐渐完善, 只是乳酸杆菌如何诱导小肠产生局部免疫反应的机制尚不清楚. 我们所面对的巨大挑战是如何使机体对表达任何抗原的乳酸杆菌都能产生需要的免疫应答. 我们相信有了乳酸杆菌的标记系统, 弄清乳酸杆菌如何诱导黏膜免疫反应的机制只是时间上的问题. 乳酸杆菌很有希望成为非常具有吸引力的口服基因工程苗的表达载体.

#### 4 参考文献

- 1 Darji A, Guzman CA, Gerstel B, Wachholz P, Timmis KN, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* 1997;91:765-775
- 2 Paglia P, Medina E, Arioli I, Guzman CA, Colombo MP. Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* 1998;92:3172-3176
- 3 Shata MT, Reitz MS Jr, DeVico AL, Lewis GK, Hone DM. Mucosal and systemic HIV-1 Env-specific CD8(+) T-cells develop after intragastric vaccination with a *Salmonella* Env DNA vaccine vector. *Vaccine* 2001;20:623-629
- 4 Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, Kolb-Maurer A, Daniels J, Hess J, Kaufmann SH, Goebel W. Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J Biotechnol* 2000;83:19-26
- 5 梁雪芽, 宋厚辉, 江玲丽, 陈雪燕, 方维焕, 李建荣. 沙门氏菌的基因工程减毒以及在DNA疫苗载体中的应用. *中国兽医杂志* 2002;38:35-37
- 6 郭兴华主编. 益生菌基础与应用. 第1版. 北京: 北京科学技术出版社 2002:335-339
- 7 Havenith CEG, Seegers JF, Pouwels PH. Gut-associated lactobacilli for oral immunisation. *Food Research International* 2002;35:151-163
- 8 Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 1992;32:141-144
- 9 郭本恒主编. 益生菌. 第1版. 北京: 化学工业出版社 2003:101-104
- 10 Thoreux K, Schmucker DL. Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. *J Nutr* 2001;131:807-812
- 11 Novotny R, Scheberl A, Giry-Laterriere M, Messner P, Schaffer C. Gene cloning, functional expression and secretion of the S-layer protein SgsE from *Geobacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett* 2005;242:27-35
- 12 Grangette C, Muller-Alouf H, Goudercourt D, Geoffroy MC, Turneer M, Mercenier A. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun* 2001;69:1547-1553
- 13 Sorvig E, Gronqvist S, Naterstad K, Mathiesen G, Eijssink VG, Axelsson L. Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;229:119-126
- 14 Scheppler L, Vogel M, Zuercher AW, Zuercher M, Germond JE, Miescher SM, Stadler BM. Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle. *Vaccine* 2002;20:2913-2920
- 15 Oliveira ML, Monedero V, Miyaji EN, Leite LC, Lee Ho P, Perez-Martinez G. Expression of *Streptococcus pneumoniae* antigens, PsaA (pneumococcal surface antigen A) and PspA (pneumococcal surface protein A) by *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;227:25-31
- 16 Pouwels PH, Leer RJ, Shaw M, Heijne den Bak-Glashouwer MJ, Tielen FD, Smit E, Martinez B, Jore J, Conway PL. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int J Food Microbiol* 1998;41:155-167
- 17 Maassen CB, van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJ, Claassen E. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* 2000;18:2613-2623
- 18 Shaw DM, Gaerthe B, Leer RJ, Van Der Stap JG, Smittenaar C, Heijne Den Bak-Glashouwer M, Thole JE, Tielen FJ, Pouwels PH, Havenith CE. Engineering the microflora to vaccinate the mucosa: serum immunoglobulin G responses and activated draining cervical lymph nodes following mucosal application of tetanus toxin fragment C-expressing lactobacilli. *Immunology* 2000;100:510-518
- 19 Reveneau N, Geoffroy MC, Loch C, Chagnaud P, Mercenier A. Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine* 2002;20:1769-1777
- 20 Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, Le Page RW, Wells JM. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* 1998;66:3183-3189
- 21 Seegers JF. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors:

- progress and prospects. *Trends Biotechnol* 2002;20:508-515
- 22 Perez-Arellano I, Perez-Martinez G. Optimization of the green fluorescent protein (GFP) expression from a lactose-inducible promoter in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;222:123-127
- 23 Gory L, Montel MC, Zagorec M. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products. *FEMS Microbiol Lett* 2001;194:127-133
- 24 Geoffroy MC, Guyard C, Quatannens B, Pavan S, Lange M, Mercenier A. Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:383-391

电编 张敏 编辑 王瑾晖 审读 张海宁

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

## • 消息 •

# WJG 和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传, 于 2003-04-15 开通. WJG 包括: 1995-2005 年 1-48 期及特刊. 世界华人消化杂志包括: 1993-2005 年第 1-24 期及特刊.

## 1 本系统的功能

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

## 2 网址

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

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

## 3 论文摘要格式

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护.

世界华人消化杂志 2004 年 5 月;12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

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

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

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

## 论文目次

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

## 4 全文

全文网页包括: 投稿, 摘要, PDF, 被引用, 点击率: 301, 下载率: 9, 相关文章, 相关评论, 图片及参考文献外链接.

## 5 投稿查询

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

# 一氧化氮和一氧化氮合酶与肿瘤放疗敏感性的关系

江春平, 丁义涛

江春平, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008  
南京市留学归国人员科研启动基金资助课题, No. 2004021  
通讯作者: 江春平, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科. chunpingjiang@yahoo.com.cn  
电话: 025-83304616-11902  
收稿日期: 2005-05-31 接受日期: 2005-06-13

## 摘要

一氧化氮(nitric oxide, NO)的生物学作用具有复杂性和多样性, 在基础条件下诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)活性很低, 当机体遭受微生物内外毒素、炎症介质等刺激时iNOS可诱导合成大量的NO. 肿瘤生物学上一般认为高水平的NO对肿瘤细胞具有直接的细胞毒作用, 而较低水平的NO具有生长刺激作用. 多种试验显示NO的供体能增加肿瘤的放疗敏感性. 研究认为, NO的生物学作用可能是通过p53依赖途径介导的. 调节NO杀灭肿瘤或促进肿瘤生长, p53起到关键性的作用. 已有多种药品作为放射敏化剂, NO供体药物在体内给药可能导致系统低血压, 增加肿瘤血液灌注和氧合作用, 具有潜在的促进肿瘤生长的作用, 限制了其临床使用. 直接将iNOS基因转染入肿瘤细胞内, 肿瘤内的乏氧环境, 可降低iNOS的活性而影响NO的产量. 携带iNOS基因的腺病毒(adenoviral vector carrying the iNOS cDNA, AdiNOS)转染靶细胞导致iNOS过表达, 产生大量NO, 有望成为一种增加肿瘤放疗敏感性有效可行的方法.

江春平, 丁义涛. 一氧化氮和一氧化氮合酶与肿瘤放疗敏感性的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2235-2237  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2235.asp>

## 0 引言

随着放射医学的迅猛发展, 大量临床资料证明消化系统恶性肿瘤虽不属于最敏感可用放疗痊愈的疾病, 但属于有效的一类. 尤其是术前放疗, 其作用已获肯定, 它不但能缩小原发肿瘤的体积, 降低肿瘤浸润程度, 而且可降低癌旁淋巴结的受侵率, 从而增加外科手术的切除率和肿瘤的控制率<sup>[1]</sup>. 尽管如此, 由于大部分肿瘤的中央区处于乏氧状况或肿瘤基因突变, 导致放疗耐受, 如何克服肿瘤的放疗耐受, 提高肿瘤放疗敏感性, 成为临床医师所关注的问题. NO和一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)与肿瘤放疗敏感性的关系已成为研究热点.

## 1 NO和NOS

1987年在生物体内发现NO, 1992年Science杂志命名NO为当年的“明星分子”. NO是一个不带电荷的无机小

分子, 其性质很不稳定, 半衰期变异很大, 为5-30 s, 具有水溶性和脂溶性, 极易通过细胞膜, 可在细胞内外自由扩散, 十分活跃. NO在体内广泛存在, 而且发挥多种多样的生物学功能. NO是一种唯一具有神经介质、构成介质和诱导介质作用等多种作用的内生因子, 其生物学作用具有复杂性和多样性, 这些多样性取决于其产生的速率、活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性一氧化氮(reactive nitrogen oxide species, RNOS)的形式、细胞来源、遗传类型和细胞内外生物调节因子等. NO的生物合成和代谢相当复杂, 是由L-精氨酸通过NOS家族合成<sup>[2]</sup>. NOS分为三种类型, 以其组成和克隆的先后次序命名为神经型(I型)(nNOS, NOS-1)、巨噬细胞(诱导)型(II型)(iNOS, NOS-2)、内皮型(III型)(eNOS, NOS-3). nNOS主要在神经元中表达, eNOS主要分存在脑血管组织, iNOS存在于肝细胞、单核巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞. 在基础条件下iNOS活性很低, 当机体遭受微生物内外毒素、炎症介质如肿瘤坏死因子、白介素等刺激而产生, 可诱导合成大量的NO<sup>[3]</sup>.

## 2 NO的细胞毒性机制

研究表明NO具有直接和间接细胞毒作用. 直接作用是在NO低速率产生时发挥的, 其可通过脱氧核苷和脱氧核苷酸的脱氨基作用导致DNA损害、DNA环的断裂, 抑制核糖核苷酸还原酶导致DNA合成障碍, 抑制DNA修复酶. 当NO高速率产生时, NO能与氧气或过氧化物(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)结合分别形成ROS(OONO<sup>-</sup>)或RNOS(NO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)发挥间接细胞毒作用. RNOS和ROS可通过脱氨基作用、DNA环的断裂、耗竭谷胱甘肽的储备来诱导DNA的损害<sup>[4, 5]</sup>.

## 3 NO在肿瘤生物学上的作用

NO在肿瘤生物学上的作用是错综复杂的. NO由巨噬细胞产生, 在宿主体内发挥杀灭肿瘤细胞的防御作用. 在人结肠癌研究中, 大多数试验是检测NO和肿瘤进展的相互关系, 并得出两者呈负相关<sup>[6, 7]</sup>. 实际上, 结直肠癌iNOS表达可通过肿瘤浸润白细胞(tumor infiltrating leukocytes, TILs)完成, 这意味着NO能限制结肠癌细胞的生长. 因为较多的进展期结直肠肿瘤中含有低水平的iNOS, 因此应想到这些肿瘤可能部分通过削弱TILs产生NO的能力, 而躲避宿主的防御作用. 结肠肿瘤细胞可产生一种可溶性因子, 抑制宿主细胞产生NO<sup>[8]</sup>. 而有研究表明iNOS的表达与肿瘤的恶性程度呈正相关, 提示NO



有促进肿瘤细胞生长的作用。Jenkins *et al*<sup>[9]</sup>最近的研究结果解释了NO对肿瘤生长的两种不同作用，他观察到NO在同一种肿瘤细胞中发挥两种作用，取决于试验在体内还是在体外进行。在这些试验中，体外肿瘤细胞被激活过多地表达iNOS，抑制大肠癌细胞生长，而在体内则相反，促进肿瘤细胞的生长。随后的研究表明，NO在新生血管形成和肿瘤血流动力学上起到很重要的作用。一般认为，高水平的NO可能对肿瘤细胞具有直接的细胞毒作用，而较低水平的NO维持量具有刺激肿瘤生长的作用<sup>[10,11]</sup>。

#### 4 NO作为放疗敏化剂

随着对NO的放疗敏化特性的认识，多种试验应用NO的供体来增加肿瘤的放疗敏感性。首先，NO是一种高度活性的物质，在缺氧状态下不能发挥细胞毒性作用。这种特性在肿瘤治疗中非常重要，因为肿瘤往往有中央缺氧区，放疗难以奏效，这就需要一个有氧环境去部分介导细胞毒性作用。第二，NO具有水溶性和脂溶性，极易通过细胞膜，在细胞间弥散，具有强有力的渗透性，在肿瘤深处发挥作用。第三，NO具有细胞渗透性，它在一个细胞内产生，并弥散出来影响其它细胞，这就是所谓的“旁观者效应”<sup>[12]</sup>。结果，尽管一小部分细胞产生NO，却产生了很大的杀灭肿瘤的效果。第四，因为NO可能与O<sub>2</sub>或O<sub>2</sub><sup>-</sup>结合形成其它的细胞毒性分子(RNOS和ROS)，如果NO在高速率传递和产生，在有氧环境下，辐射敏化作用可能大大提高。Mitchell *et al*<sup>[13,14]</sup>报道NO供体能提高体外缺氧状态下哺乳动物细胞的放疗敏感性。Griffin *et al*<sup>[15]</sup>表明NO供体在放疗敏感的缺氧哺乳动物细胞中与有氧一样有效。Verovski *et al*<sup>[16,17]</sup>研究表明NO能提高缺氧状态下放疗不敏感的胰腺肿瘤细胞的放疗敏感性。然而，NO增强放射细胞毒性的机制尚未完全清楚。

#### 5 p53在调节NO对肿瘤细胞生长影响的作用

最近研究认为p53的功能状态与肿瘤放疗敏感相关。NO的生物学作用可能是通过p53依赖途径介导的<sup>[18,19]</sup>。有作者发现放射诱导DNA的损害，导致iNOS的表达和产生NO。产生的NO刺激野生型p53(wild type-p53, WT-p53)集聚。WT-p53自身也可以通过抑制iNOS的转录从而限制NO的产生。p53被认为是一种DNA损害以后细胞生存的重要的决定性物质。他的集聚导致细胞循环的停止和DNA的修复，给细胞一个修复可逆性损伤的机会，同时也刺激凋亡途径，迫使细胞发生不可逆的损伤以至毁灭。NO除了能刺激p53的集聚之外，还能改变自身结构，从而改变蛋白质的功能。NO对p53的作用是浓度依赖性，低水平的NO增强p53的功能，高水平的NO导致p53的功能缺失。调节NO杀灭肿瘤或促进肿瘤生长，p53起到关键性的作用。在检测具有各种iNOS表达的WT-p53和突变p53的人结肠癌细胞生长时发现，WT-p53癌细胞克隆株的生长随着iNOS的产量增加而变慢，而突变p53癌细胞克隆

株却相反。这些结果的一种解释是突变p53癌细胞克隆株新生血管形成增多<sup>[20]</sup>。

#### 6 提高肿瘤放疗敏感性的药物

为了克服肿瘤的放疗耐受作用，已有多种药品作为放射敏化剂。一些研究已表明NO供体药物如S-硝基乙酰青酶胺(S-nitroso-N-acetylpenicillamine, SNAP)、FK-406、PKC-412和米索硝唑等可以提高乏氧环境下肿瘤的放疗敏感性<sup>[21]</sup>。尽管这些药剂显示出很有潜力，但在体内给药可能导致系统低血压，增加了肿瘤的血液灌注和氧合作用，具有潜在的促进肿瘤生长的作用，从而限制其临床的使用，因而仍处于研究之中。直接将iNOS基因转染入肿瘤细胞内，以获得肿瘤内高产量的NO，而无系统副反应，可替代NO供体药物，但由于肿瘤内乏氧环境，可降低iNOS的活性而影响NO的产量。有资料表明iNOS过表达可产生大量NO，人iNOS cDNA已被成功克隆，AdiNOS也已成功构建，AdiNOS转染靶细胞能够导致iNOS过表达，并能产生大量NO<sup>[22]</sup>，AdiNOS转染靶细胞以期提高肿瘤放疗敏感性，有望成为一种有效可行的方法。

#### 7 参考文献

- 1 Jeremic B. Radiation therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004;18:1-12
- 2 Mancardi D, Ridnour LA, Thomas DD, Katori T, Tocchetti CG, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N, Wink DA. The chemical dynamics of NO and reactive nitrogen oxides: a practical guide. *Curr Mol Med* 2004;4:723-740
- 3 Lirk P, Hoffmann G, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase-time for reappraisal. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1:89-108
- 4 Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, Jhappan C, Higashimoto Y, He P, Linke SP, Quezado MM, Zurer I, Rotter V, Wink DA, Appella E, Harris CC. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:143-148
- 5 Miranda KM, Nims RW, Thomas DD, Espey MG, Citrin D, Bartberger MD, Paolocci N, Fukuto JM, Feelisch M, Wink DA. Comparison of the reactivity of nitric oxide and nitroxyl with heme proteins. A chemical discussion of the differential biological effects of these redox related products of NOS. *J Inorg Biochem* 2003;93:52-60
- 6 Xie K, Huang S. Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. *Free Radic Biol Med* 2003;34:969-986
- 7 Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med* 2003;34:955-968
- 8 Hussain SP, Trivers GE, Hofseth LJ, He P, Shaikh I, Mechanic LE, Doja S, Jiang W, Subleski J, Shorts L, Haines D, Laubach VE, Wiltout RH, Djurickovic D, Harris CC. Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis. *Cancer Res* 2004;64:6849-6853
- 9 Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, Rhodes P, Westmore K, Emson PC, Moncada S. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4392-4396
- 10 Cook JA, Gius D, Wink DA, Krishna MC, Russo A, Mitchell JB. Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. *Semin Radiat Oncol* 2004;14:259-266
- 11 Wink DA, Mitchell JB. Nitric oxide and cancer: an introduc-

- tion. *Free Radic Biol Med* 2003;34:951-954
- 12 Matsumoto H, Takahashi A, Ohnishi T. Radiation-induced adaptive responses and bystander effects. *Biol Sci Space* 2004;18:247-254
- 13 Mitchell JB, Russo A, Kuppusamy P, Krishna MC. Radiation, radicals, and images. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:28-43
- 14 Mitchell JB, Cook JA, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Fisher J, Christodoulou D, Wink DA. Radiation sensitisation by nitric oxide releasing agents. *Br J Cancer Suppl* 1996;27: S181-184
- 15 Griffin RJ, Makepeace CM, Hur WJ, Song CW. Radiosensitization of hypoxic tumor cells in vitro by nitric oxide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;36:377-383
- 16 Verovski VN, Van den Berge DL, Soete GA, Bols BL, Storme GA. Intrinsic radiosensitivity of human pancreatic tumour cells and the radiosensitising potency of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *Br J Cancer* 1996;74:1734-1742
- 17 Verovski VN, Van den Berge DL, Delvaeye MM, Scheper RJ, De Neve WJ, Storme GA. Low-level doxorubicin resistance in P-glycoprotein-negative human pancreatic tumour PSN1/ADR cells implicates a brefeldin A-sensitive mechanism of drug extrusion. *Br J Cancer* 1996;73:596-602
- 18 Cook T, Wang Z, Alber S, Liu K, Watkins SC, Vodovotz Y, Billiar TR, Blumberg D. Nitric oxide and ionizing radiation synergistically promote apoptosis and growth inhibition of cancer by activating p53. *Cancer Res* 2004;64:8015-8021
- 19 Goodman JE, Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. Nitric oxide and p53 in cancer-prone chronic inflammation and oxyradical overload disease. *Environ Mol Mutagen* 2004;44:3-9
- 20 Zaugg K, Rocha S, Resch H, Hegyi I, Oehler C, Glanzmann C, Fabbro D, Bodis S, Pruschy M. Differential p53-dependent mechanism of radiosensitization in vitro and in vivo by the protein kinase C-specific inhibitor PKC412. *Cancer Res* 2001;61:732-738
- 21 Thomas DD, Miranda KM, Espey MG, Citrin D, Jourdeuil D, Paolocci N, Hewett SJ, Colton CA, Grisham MB, Feelisch M, Wink DA. Guide for the use of nitric oxide (NO) donors as probes of the chemistry of NO and related redox species in biological systems. *Methods Enzymol* 2002;359:84-105
- 22 Raman KG, Shapiro RA, Tzeng E, Kibbe MR. Adenovirus-mediated nitric oxide synthase gene transfer. *Methods Mol Biol* 2004;279:225-234

电编 张敏 编辑 张海宁

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

• 消息 •

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

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

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

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

# Id基因家族对消化系统实体瘤作用的研究进展

杨海彦, 刘连新, 曲志博, 刘改云, 陈 炜, 郭化鑫, 陈 曦

杨海彦, 刘连新, 曲志博, 陈炜, 郭化鑫, 陈曦, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外三科 黑龙江省哈尔滨市 150001  
刘改云, 哈尔滨医科大学遗传学实验室 黑龙江省哈尔滨市 150086  
通讯作者: 刘连新, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外三科. liulianxin@medmail.com.cn  
电话: 0451-53643849-5885 传真: 0451-53670428  
收稿日期: 2005-08-03 接受日期: 2005-08-26

## 摘要

诱导分化疗法是一种可以彻底治愈肿瘤的治疗方法. Id基因的发现为人们提供了一条诱导肿瘤细胞分化的新思路, Id基因在肿瘤中的表达及其作用机制越来越多地被研究者们发现, 但其家族各成员在肿瘤中的确切表达和作用机制还有待于进一步研究. 本文就Id基因家族各成员在消化系统实体瘤中的表达及其作用机制做一综述.

杨海彦, 刘连新, 曲志博, 刘改云, 陈炜, 郭化鑫, 陈曦. Id基因家族对消化系统实体瘤作用的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2238-2242  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2238.asp>

## 0 引言

肿瘤因其特殊的生物学特性, 临床治疗相当困难. 尽管目前针对肿瘤的治疗方法众多, 而且某些肿瘤的治疗还取得了可喜的业绩<sup>[1-4]</sup>, 但总的说来, 效果还不甚理想. Id基因的发现为诱导肿瘤细胞分化从而彻底治愈肿瘤提供了思路, 而且Id基因在肿瘤中的表达及作用机制越来越受到研究者的重视<sup>[5-31]</sup>. Id(inhibitor of DNA binding or inhibitor of differentiation)基因属于编码HLH(helix-loop-helix)蛋白的基因家族中的一种<sup>[31-37]</sup>, 是Benezra *et al*<sup>[38]</sup>1990年首次从cDNA细胞文库中克隆成功的. 目前高等生物中的Id基因共发现四种同源系列: Id-1、Id-2、Id-3和Id-4.

## 1 HLH蛋白

一般来说, HLH(螺旋-环-螺旋)蛋白包括四百多种分子, 广泛存在于从低等生物酵母到高等生物人类的细胞中. HLH蛋白具有螺旋-环-螺旋结构, 通常是转录因子<sup>[39-51]</sup>, 可通过两个螺旋(helix)区互相作用形成二聚体, 调控基因表达. HLH蛋白可分为三类: (1)bHLH蛋白; (2)bHLH-zip蛋白; (3)dnHLH蛋白. bHLH蛋白的N端有一段碱性区, 是转录因子与DNA作用的直接界面, 可识别并结合特定的DNA序列, 作为转录激活因子调节转录. 而dnHLH蛋白不存在碱性区, 因此不能与DNA直接结合, 但可以与其他种类的HLH蛋白结合形成二聚体, Id

蛋白就属于dnHLH蛋白, 可与bHLH蛋白结合形成无功能二聚体, 以抑制bHLH蛋白的转录激活活性<sup>[52]</sup>.

## 2 Id蛋白的功能

Id基因的表达可以促进肿瘤细胞去分化, 缩短细胞生长和肿瘤细胞增殖周期. 现已在多种肿瘤细胞系中发现Id基因的过度表达可以抑制肿瘤细胞分化. Id基因家族的四个同源序列定位于不同的同源染色体, 因此其表达形式和功能都有显著差异. 很多研究者都已发现降低Id基因的表达水平可能是促进多种肿瘤细胞分化的途径之一. 尽管不同Id基因HLH序列都很相似, 但HLH结构域以外的区域却各有差别, 这也决定了Id蛋白功能的组织专一性, 同时也决定了与特定bHLH蛋白结合的专一性. Mathew *et al*<sup>[53]</sup>通过体细胞杂交和荧光原位杂交的实验方法确定了Id-1和Id-2分别定位于染色体20q11和2p25. Deed *et al*<sup>[54]</sup>发现Id-3定位于染色体1p36. Ruzinova *et al*<sup>[55]</sup>发现Id-4定位于染色体6p21-22.

Id蛋白是HLH转录因子的显性负性调节物, 早期发现Id蛋白有促进细胞增殖和抑制细胞分化的作用, 随着研究的深入, 现已发现Id蛋白的功能不限于此. 其功能有: (1)促进细胞增殖、抑制细胞分化; (2)在胚胎发生和器官形成中起重要作用; (3)在细胞分裂周期中起作用; (4)抑制细胞凋亡; (5)起癌蛋白作用; (6)促进肿瘤血管形成; (7)与肿瘤侵袭力有关.

Id蛋白在健康人体内少见, 但已在多种肿瘤中发现了Id蛋白的表达. 其中, Id-1和Id-3的表达几乎无所不在, 但Id-2和Id-4的表达却受一定条件的限制. 目前, 对于Id-1和Id-2的研究较多.

**2.1 Id-1** Id-1是Id基因家族中研究得最多最透彻的基因, 在抑制细胞分化、调节细胞周期、促进血管形成和肿瘤发生中起关键作用. 现已发现在多种人类肿瘤细胞中都有Id-1的表达上调, 而且表达上调的程度与肿瘤的恶性程度相关. 另外, Id-1在人类肿瘤细胞中的异位表达可以在适度条件下促进细胞增殖和抑制细胞凋亡. 这一系列的研究结果也强有力地证明了Id-1蛋白是细胞增殖过程中的正调节蛋白, 其表达也可能是肿瘤细胞增殖过程中的关键因素.

在各种实体肿瘤中, Id-1抑制肿瘤细胞分化、促进肿瘤细胞增殖的分子机制不尽相同, 但以下2种机制却具有一定的普遍性: (1)Id-1的表达可以促进肿瘤细胞的血管形成<sup>[56]</sup>; (2)通过Raf/MEK通路抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[57]</sup>.



Parrinello *et al*<sup>[58]</sup>发现在小鼠早期胚胎和发育过程中, Id-1可以促进乳腺上皮细胞的增殖, 在培养的细胞增殖到一定密集程度时又可以促进细胞凋亡. 这也说明Id-1在某些情况下可以促进细胞凋亡.

**2.2 Id-2** Id-2与Id-1相比, 由于染色体位点不同, 因此表达方式和功能也有所不同. 早期发现Id-2与细胞周期和细胞分化有关, 可以促进细胞增殖. Wagsater *et al*<sup>[59]</sup>用全反式维甲酸处理单核细胞白血病THP-1细胞系, 结果发现Id-2的mRNA表达下调, 且Id-2表达下调的程度与肿瘤细胞生长受抑制程度相关, 这一结果也支持Id-2可以促进细胞增殖这一普遍观点. Id-1在所有类型的细胞都是在增殖过程中表达升高而分化过程中表达降低. 但Id-2却不像Id-1那样有着恒定的作用. 不但可以促进某些细胞增殖, 还可以促进某些细胞的分化, 比如, 在骨髓前体细胞(如H60细胞)、胚胎干细胞中的造血细胞分化过程中Id-2的表达水平都升高. Parrinello *et al*<sup>[58]</sup>发现在小鼠乳腺上皮细胞增殖过程中Id-1表达, 而未见Id-2表达. 但在细胞分化过程中却发现Id-2表达, 而Id-1不表达. 因此推断Id-2促进乳腺上皮细胞的分化. 此外, Id-2促进肿瘤细胞增殖的作用机制也与Id-1有差别, 主要是通过Id-2蛋白与其他肿瘤相关蛋白的间接交互作用促进肿瘤细胞增殖.

由于细胞生长与分化需要靠生长和分化蛋白的精确调控, 这可以通过3种途径来实现: 蛋白的直接交互作用、多蛋白复合体的间接交互作用和配偶蛋白的表达水平. 基于这一理论, Smialowski *et al*<sup>[60]</sup>应用质谱分析法、核磁共振、亲和色谱下降分析和凝胶过滤色谱法, 分析pRb蛋白的小袋区和Id-2蛋白以及其他蛋白之间的相互作用, 结果发现, 这些蛋白之间不存在两两直接的交互作用, 因此推断Id-2调控细胞生长和抑制分化的作用是由多种相关蛋白的间接交互作用引起的. Id-2在肿瘤细胞中的表达及其调节受以下因素影响: (1) 肿瘤内部缺氧环境诱导Id-2表达<sup>[61]</sup>; (2) 另外, Id-2的表达还可以受到I型胰岛素生长因子受体(IGF-IR)的调节<sup>[62]</sup>.

**2.3 Id-3 和Id-4** Id-3和Id-1有大量的序列同源性, 因此在胚胎形成和人体组织中的表达方式都很相似, 作用也大致相同, 都可以促进肿瘤细胞增殖. 而对胃癌、乳腺癌、结肠癌等的研究发现Id-4和Id-2很多时候都抑制肿瘤的进展, 或抑制肿瘤细胞的增殖, 或抑制肿瘤局部淋巴结的转移.

### 3 Id基因在若干种实体肿瘤中的表达及其作用

#### 3.1 肝癌

**3.1.1 Id蛋白在肝癌细胞中的表达** Id蛋白的表达在肝癌细胞增殖过程中不是一直都保持在高水平, 而是在肿瘤发生的早期高水平表达. 在肿瘤晚期表达水平降低或根本不表达, 这与Id蛋白在乳腺癌、前列腺癌、结肠癌中的表达情

况恰恰相反, 可见Id蛋白在肝癌的进展期起关键作用, 最终导致肝癌细胞的去分化(dedifferentiation)<sup>[63]</sup>.

**3.1.2 Id蛋白对肝癌的作用机制** Id-1抑制细胞分化与其抑制肝癌细胞中p16<sup>INK4a</sup>的活性有关. Lee *et al*<sup>[64]</sup>对62例人肝癌细胞标本进行研究, 证实肝癌细胞标本中Id-1的表达在转录和翻译水平都升高, 且升高的水平与增殖细胞核抗原(PCNA)相关( $r = 0.334$ ,  $P = 0.033$ ). Id-1蛋白表达低的肝癌细胞, 其mRNA的表达水平更低( $P = 0.039$ ). 同时在Id-1蛋白表达水平低的肝癌细胞中, p16<sup>INK4a</sup>的表达水平要比Id-1蛋白表达水平高的肝癌细胞更高( $P = 0.039$ ), 另外还证实Id-1表达的肝癌细胞中, S期的细胞比例升高, 而这正是细胞分化程度降低的标志. 以上事实说明Id-1抑制细胞分化与其灭活肝癌细胞中p16<sup>INK4a</sup>的活性有关.

**3.2 胃癌** Id-1可以抑制胃癌细胞分化, 促进癌细胞增殖. Han *et al*<sup>[65]</sup>用Western印迹测定15份正常胃组织、胃癌组织和胃细胞系中Id-1蛋白含量, 结果发现相对于周围正常胃组织, 15份胃癌样本中有11份Id-1表达处于高水平. 相对于高分化细胞系, 低分化细胞系中Id-1的表达上调更明显. 通过半定量RT-PCR法测定发现在绝大多数样本中Id-1的表达都增高. 因此推断Id-1蛋白在胃癌发生进程中起重要作用, Id-1的高表达也与胃癌的恶性潜力有关.

Id-4在胃癌中表达下调, 与其在乳腺癌中的表达变化相同. 也说明Id-4可以促进胃癌细胞分化, 而其表达下降也可能与肿瘤发生有关. Chan *et al*<sup>[66]</sup>应用重亚硫酸盐基因测序, 发现在大多数胃癌细胞系和30%的早期胃癌中Id-4启动子都被超甲基化, 从而灭活Id-4, 用5-乙酰-2'-脱氧胞苷酸(DNA甲基转移酶抑制剂)处理后, 各种胃癌细胞系中的Id-4又可重新表达. 有时候需要组蛋白脱乙酰基酶抑制剂一曲古抑菌素A的协同作用, 但单独应用曲古抑菌素A却不会产生这种效应. Id-4的重新表达是与Id-4启动子的脱甲基化同时发生的. 另外还发现Id-4启动子的甲基化与hMLH1启动子的甲基化( $P = 0.008$ )和微卫星不稳定( $P = 0.006$ )关系密切.

**3.3 结肠癌** 在结肠癌中, Id-1、Id-2、Id-3的表达与Id-4的表达呈现不同的特点, Id-1、Id-2、Id-3表达升高, 而Id-4表达下降, 且下降的程度与肿瘤的病理学分级相关. Wilson *et al*<sup>[67]</sup>为了测定Id-1、Id-2、Id-3在结肠癌中的表达, 对34例人早期结肠腺癌标本进行分析, 结果发现相对于正常黏膜组织, 腺癌中Id-1( $P = 0.001$ )、Id-2( $P = 0.001$ )、Id-3( $P = 0.002$ )的免疫原性显著增高; 而17例腺癌中却未见Id蛋白的表达, 另外还发现结肠腺癌中Id-1和Id-2的表达与分裂指数有关, Id-1的相关性较强( $P = 0.005$ ), Id-2的相关性较弱( $P = 0.042$ ). 此外, 三种Id蛋白的表达与p53的免疫反应性有关, 在p53基因敲除的小鼠正常肠黏膜产生的自发性肿瘤中, 三种Id蛋白的表达都上调.

为了研究三种Id蛋白的作用, Wilson *et al*<sup>[67]</sup>应用反义核苷酸阻断Id蛋白的表达后, 人结肠腺癌的增殖也受到抑制. 在人结肠腺癌细胞系中如果人为地促使E47 bHLH蛋白的异位表达, 通过共免疫沉淀和亚细胞共区域化方法发现E47 bHLH蛋白可以高效地与内源性Id蛋白结合形成Id-bHLH异二聚体, 使癌细胞生长停滞. 说明Id-1、Id-2、Id-3可以促进结肠腺癌细胞增殖. 如果人为地促进E47 bHLH蛋白突变体的表达, 也可以部分抑制肿瘤细胞增殖. 这些实验结果起码说明这样一个问题, 就是在人结肠腺癌细胞系中, 如果对三种Id蛋白的表达上调解除管制, 对于癌细胞的无限增殖来说, 其效果和敲除p53基因的效果起码是部分相同的.

Id-4在结肠癌中的表达下降. Umetani *et al*<sup>[68]</sup>应用甲基化专一性PCR分析(methylation-specific PCR)和重亚硫酸盐测序测定Id-4的甲基化, 用定量实时逆转录PCR (quantitative real-time reverse transcription-PCR)测定Id-4 mRNA的表达, 实验对象包括9份正常上皮组织标本、13份腺瘤标本、93份早期结肠癌标本和26份结肠癌肝转移标本, 用甲基化专一性PCR分析(methylation-specific PCR)测定这些标本中Id-4的甲基化, 用免疫组化法测定标本中Id-4蛋白含量. 结果显示: 结肠癌细胞系中Id-4被超甲基化, mRNA表达受抑, 但应用5-氮(杂)胞苷处理后mRNA表达可以恢复. 在正常上皮组织标本、腺瘤标本、早期结肠癌标本和结肠癌肝转移标本中超甲基化的频率分别为0/9、0/13、49/92 (53%)和19/26 (73%). 而且结肠癌中Id-4的甲基化与病理学分级有明显关系( $P = 0.028$ ). 免疫组化分析显示: 除了在超甲基化的肿瘤标本中未见mRNA表达外, 其余标本中都有mRNA表达. 而且术后患者的生存状况也与肿瘤有无Id-4的甲基化有关( $P = 0.0066$ ). 因此推断, Id-4是一个潜在的肿瘤抑制基因, 其甲基化可能在肿瘤进展过程中起着重要作用.

Id蛋白的表达受哪些因素的影响呢? Rivat *et al*<sup>[69]</sup>研究人结肠癌细胞系HCT8/S11时发现, 内源性三叶肽(TFF3)和血管内皮生长因子(VEGF)可以使STAT3 $\alpha$ 和STAT3 $\beta$ 两个亚型的酪氨酸磷酸化, 从而激活STAT3信号途径, DNA微阵列分析显示STAT3 $\beta$ 的过度表达可以下调Id-2的表达.

**3.4 食管癌** 迄今, 对Id蛋白在食管癌中的表达和作用还知之甚少, 只是Hu *et al*<sup>[70]</sup>对两种ESCC细胞系(HKESC-1和HKESC-2)中Id-1的表达进行了研究, 结果发现, 在检测的61份HKESC-1和HKESC-2细胞系标本中, 有57份标本Id-1的表达与正常食管上皮相比明显升高, 占87%. 根据Id-1在其他肿瘤中的作用, 我们可以推断Id-1促进了食管癌细胞增殖, 又因为它是典型的分化抑制基因, 因此其也可能抑制了食管癌细胞的分化.

**3.5 胰腺癌** 在胰腺癌中Id-1、Id-2和Id-3表达都升高,

说明三种Id蛋白在胰腺癌中都起促进肿瘤增殖的作用, 尤其值得一提的是, Id-2与另外两种Id蛋白一起对肿瘤增殖起正调控作用, 这与其在乳腺癌中恰相反, 而与结肠癌中的作用相同, 也说明了Id-2在不同肿瘤中作用的可变性. 为了研究Id-2对胰腺细胞生长增殖的调控作用, Maruyama *et al*<sup>[71]</sup>分别检测了正常胰腺组织、慢性胰腺炎和胰腺癌中三种Id蛋白的表达, 结果发现在正常胰腺组织中, 仅有Id-1和Id-2的微弱表达, 而癌细胞中的检测结果却相反, 与各自的对照组相比, 无论从阳性细胞计数还是免疫染色强度上看, 都说明Id-1和Id-2的表达明显升高, 在癌细胞周围的慢性胰腺炎样区域内的不典型排泄小管中也检测到了Id-1和Id-2的轻度或中度表达. 在慢性胰腺炎中, 发育不良的和典型的排泄小管内, Id-1和Id-2的表达也象在胰腺癌中一样, 升高很明显. Id-3的表达不象另外两种Id蛋白那么有规律性, 在正常胰腺组织中其表达因区域的不同有弱有强, 在胰腺癌中的表达则普遍升高.

上述结果说明, Id蛋白的表达对于胰腺癌细胞和慢性胰腺炎中的不典型增生细胞来说, 都可以促进其增殖, 通过这一现象我们可以推断, Id蛋白在胰腺癌的发生和进展过程中可能起到了推波助澜的作用. 因此不难设想, 如果我们抑制胰腺癌中Id蛋白的表达, 很有可能会抑制胰腺癌的进展.

尽管Id基因的发现已有十多年的历史, 对Id基因的研究还有待深入, 目前, 就Id-1、Id-2、Id-3和Id-4这四种基因来说, Id-1的作用已经比较明确, 无论在何种肿瘤中, 它都是肿瘤增殖的正性调控基因. Id-3和Id-1有高度的序列同源性, 因此作用也很相似, 可以促进肿瘤细胞增殖, 但也有例外, 比如在骨肉瘤MG-63细胞系, Id-3表达反倒可以促进细胞凋亡. Id-2和Id-4多充当肿瘤增殖的负性调控基因. 对Id-1和Id-2的研究较多, 但Id-3和Id-4对实体肿瘤的作用还需进一步研究.

诱导肿瘤细胞分化是一种十分振奋人心的治疗方法, 有人曾形象地称这种方法为“改邪归正”, 即把肿瘤细胞诱导分化成为正常的细胞, 是一种可以彻底治愈肿瘤的治疗方法, 现今研究的诱导分化药物不下上千种, 但真正可以用于临床的可谓寥寥, 究其原因, 就是因为很多药物在细胞水平可以诱导肿瘤细胞分化, 进入体内则失效了. 而且用于临床的药物又有已经发现的或潜在的副作用. 而针对分化抑制基因的肿瘤基因治疗则有很大的优势, 我们可以在转录或翻译水平上阻止或促进Id基因的表达, 比如说, 我们可以应用某些方法(如反义技术等)使Id-1基因沉默. 这样就可以抑制Id-1基因对肿瘤增殖的正性调控作用, 而对于某些肿瘤同时又有Id-2作为肿瘤负性调控基因表达的, 我们还可以人为地促进Id-2表达, 甚至可以将两种方法结合起来. 当然, 有Id-3和Id-4表达的, 我们可以根据其所起作用的不同, 或促进、或抑制其表



达, 从而达到诱导肿瘤细胞分化的目的。

#### 4 参考文献

- Axelsson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pahlman S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells-A mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:554-563
- Du C, Li D, Lin Y, Wu M. Differentiation of human nasopharyngeal carcinoma xenografts and repression of telomerase activity induced by arsenic trioxide. *Natl Med J India* 2004;17:67-70
- Hoehner JC, Prabhakaran K. Induced differentiation affords neuroblastoma cells protection from hypoxic injury: *J Pediatr Surg* 2003;38:1069-1074
- Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E, Sarraf P, Naujoks R, Campbell N, Spiegelman BM, Singer S. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3951-3956
- Zhang X, Ling MT, Feng H, Wong YC, Tsao SW, Wang X. Id-1 stimulates cell proliferation through activation of EGFR in ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 2004;91:2042-2047
- Kebebew E, Peng M, Treseler PA, Clark OH, Duh QY, Ginzinger D, Miner R. Id1 gene expression is up-regulated in hyperplastic and neoplastic thyroid tissue and regulates growth and differentiation in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6105-6111
- Coppe JP, Itahana Y, Moore DH, Bennington JL, Desprez PY. Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 2004;10:2044-2051
- Matsuda Y, Yamagiwa S, Takamura M, Honda Y, Ishimoto Y, Ichida T, Aoyagi Y. Overexpressed Id-1 is associated with a high risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrhosis without transcriptional repression of p16. *Cancer* 2005;104:1037-1044
- Yeung SC, Yip HK. Developmental expression patterns and localization of DNA-binding protein inhibitor (Id3) in the mouse retina. *Neuroreport* 2005;16:673-676
- Buitenhuis M, van Deutekom HW, Verhagen LP, Castor A, Jacobsen SE, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Differential regulation of granulopoiesis by the basic helix-loop-helix transcriptional inhibitors Id1 and Id2. *Blood* 2005;105:4272-4281
- Schindl M, Schoppmann SF, Strobel T, Heinzl H, Leisser C, Horvat R, Birner P. Level of Id-1 protein expression correlates with poor differentiation, enhanced malignant potential, and more aggressive clinical behavior of epithelial ovarian tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9:779-785
- Ling MT, Wang X, Ouyang XS, Lee TK, Fan TY, Xu K, Tsao SW, Wong YC. Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth. *Oncogene* 2002;21:8498-8505
- Ouyang XS, Wang X, Ling MT, Wong HL, Tsao SW, Wong YC. Id-1 stimulates serum independent prostate cancer cell proliferation through inactivation of p16(INK4a)/pRB pathway. *Carcinogenesis* 2002;23:721-725
- Ouyang XS, Wang X, Lee DT, Tsao SW, Wong YC. Over expression of ID-1 in prostate cancer. *J Urol* 2002;167:2598-2602
- Vandeputte DA, Troost D, Leenstra S, Ijlst-Keizers H, Ramkema M, Bosch DA, Baas F, Das NK, Aronica E. Expression and distribution of id helix-loop-helix proteins in human astrocytic tumors. *Glia* 2002;38:329-338
- Kroll T, Odyanova L, Clement JH, Platzer C, Naumann A, Marr N, Hoffken K, Wolf S. Molecular characterization of breast cancer cell lines by expression profiling. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:125-134
- Singh J, Murata K, Itahana Y, Desprez PY. Constitutive expression of the Id-1 promoter in human metastatic breast cancer cells is linked with the loss of NF-1/Rb/HDAC-1 transcription repressor complex. *Oncogene* 2002;21:1812-1822
- Umetani N, Mori T, Koyanagi K, Shinozaki M, Kim J, Giuliano AE, Hoon DS. Aberrant hypermethylation of ID4 gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Oncogene* 2005;24:4721-4727
- Stighall M, Manetopoulos C, Axelsson H, Landberg G. High ID2 protein expression correlates with a favourable prognosis in patients with primary breast cancer and reduces cellular invasiveness of breast cancer cells. *Int J Cancer* 2005;115:403-411
- Kebebew E, Peng M, Treseler PA, Clark OH, Duh QY, Ginzinger D, Miner R. Id1 gene expression is up-regulated in hyperplastic and neoplastic thyroid tissue and regulates growth and differentiation in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6105-6111
- Li H, Gerald WL, Benezra R. Utilization of bone marrow-derived endothelial cell precursors in spontaneous prostate tumors varies with tumor grade. *Cancer Res* 2004;64:6137-6143
- Ling MT, Wang X, Ouyang XS, Xu K, Tsao SW, Wong YC. Id-1 expression promotes cell survival through activation of NF-kappaB signalling pathway in prostate cancer cells. *Oncogene* 2003;22:4498-4508
- Rivera R, Murre C. The regulation and function of the Id proteins in lymphocyte development. *Oncogene* 2001;20:8308-8316
- Schindl M, Oberhuber G, Obermair A, Schoppmann SF, Karner B, Birner P. Overexpression of Id-1 protein is a marker for unfavorable prognosis in early-stage cervical cancer. *Cancer Res* 2001;61:5703-5706
- Ouyang XS, Wang X, Lee DT, Tsao SW, Wong YC. Up-regulation of TRPM-2, MMP-7 and ID-1 during sex hormone-induced prostate carcinogenesis in the Noble rat. *Carcinogenesis* 2001;22:965-973
- Houldsworth J, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS. ID gene expression varies with lineage during differentiation of pluripotential male germ cell tumor cell lines. *Cell Tissue Res* 2001;303:371-379
- Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Miyakawa I. Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2001;165:185-193
- Kebebew E, Treseler PA, Duh QY, Clark OH. The helix-loop-helix transcription factor, Id-1, is overexpressed in medullary thyroid cancer. *Surgery* 2000;128:952-957
- Langlands K, Down GA, Kealey T. Id proteins are dynamically expressed in normal epidermis and dysregulated in squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:5929-5933
- Lasorella A, Nosedà M, Beyna M, Yokota Y, Iavarone A. Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* 2000;407:592-598
- Kleeff J, Ishiwata T, Friess H, Buchler MW, Israel MA, Korc M. The helix-loop-helix protein Id2 is overexpressed in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1998;58:3769-3772
- Forrest S, McNamara C. Id family of transcription factors and vascular lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2014-2020
- O'Toole PJ, Inoue T, Emerson L, Morrison IE, Mackie AR, Cherry RJ, Norton JD. Id proteins negatively regulate basic helix-loop-helix transcription factor function by disrupting subnuclear compartmentalization. *J Biol Chem* 2003;278:45770-45776
- Stinson J, Inoue T, Yates P, Clancy A, Norton JD, Sharrocks AD. Regulation of TCF ETS-domain transcription factors by helix-loop-helix motifs. *Nucleic Acids Res* 2003;31:4717-4728
- Kumar MS, Hendrix JA, Johnson AD, Owens GK. Smooth muscle alpha-actin gene requires two E-boxes for proper expression in vivo and is a target of class I basic helix-loop-helix proteins. *Circ Res* 2003;92:840-847
- Humphries A, Klein D, Baler R, Carter DA. cDNA array analysis of pineal gene expression reveals circadian rhythmicity of the dominant negative helix-loop-helix protein-encoding gene, Id-1. *J Neuroendocrinol* 2002;14:101-108
- Roberts EC, Deed RW, Inoue T, Norton JD, Sharrocks AD. Id helix-loop-helix proteins antagonize pax transcription factor activity by inhibiting DNA binding. *Mol Cell Biol* 2001;21:524-533
- Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA



- binding proteins. *Cell* 1990;61:49-59
- 39 Norton JD. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 2000;113:3897-3905
- 40 Deed RW, Bianchi SM, Atherton GT, Johnston D, Santibanez-Koref M, Murphy JJ, Norton JD. An immediate early human gene encodes an Id-like helix-loop-helix protein and is regulated by protein kinase C activation in diverse cell types. *Oncogene* 1993;8:599-607
- 41 Liu J, Shi W, Warburton D. A cysteine residue in the helix-loop-helix domain of Id2 is critical for homodimerization and function. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:1042-1047
- 42 Rivera RR, Johns CP, Quan J, Johnson RS, Murre C. Thymocyte selection is regulated by the helix-loop-helix inhibitor protein, Id3. *Immunity* 2000;12:17-26
- 43 Moldes M, Boizard M, Liepvre XL, Feve B, Dugail I, Pairault J. Functional antagonism between inhibitor of DNA binding (Id) and adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element-binding protein-1c (ADD1/SREBP-1c) trans-factors for the regulation of fatty acid synthase promoter in adipocytes. *Biochem J* 1999;344:873-880
- 44 Chaudhary J, Skinner MK. Basic helix-loop-helix proteins can act at the E-box within the serum response element of the c-fos promoter to influence hormone-induced promoter activation in Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 1999;13:774-786
- 45 Yokota Y, Mansouri A, Mori S, Sugawara S, Adachi S, Nishikawa S, Gruss P. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 1999;397:702-706
- 46 Florio M, Hernandez MC, Yang H, Shu HK, Cleveland JL, Israel MA. Id2 promotes apoptosis by a novel mechanism independent of dimerization to basic helix-loop-helix factors. *Mol Cell Biol* 1998;18:5435-544
- 47 Stewart HJ, Zoidl G, Rossner M, Brennan A, Zoidl C, Nave KA, Mirsky R, Jessen KR. Helix-loop-helix proteins in Schwann cells: a study of regulation and subcellular localization of Ids, REB, and E12/47 during embryonic and postnatal development. *J Neurosci Res* 1997;50:684-701
- 48 Rescan PY. Identification in a fish species of two Id (inhibitor of DNA binding/differentiation)-related helix-loop-helix factors expressed in the slow oxidative muscle fibers. *Eur J Biochem* 1997;247:870-876
- 49 Tzeng SF, de Vellis J. Expression and functional role of the Id HLH family in cultured astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;46:136-142
- 50 Cooper CL, Brady G, Bilia F, Iscove NN, Quesenberry PJ. Expression of the Id family helix-loop-helix regulators during growth and development in the hematopoietic system. *Blood* 1997;89:3155-3165
- 51 Melnikova IN, Christy BA. Muscle cell differentiation is inhibited by the helix-loop-helix protein Id3. *Cell Growth Differ* 1996;7:1067-1079
- 52 冯洁,王永潮.分化抑制因子(Id)家族研究进展. *生理科学进展* 1997;28:139-141
- 53 Mathew S, Chen W, Murty VV, Benezra R, Chaganti RS. Chromosomal assignment of human ID1 and ID2 genes. *Genomics* 1995;30:385-387
- 54 Deed RW, Hirose T, Mitchell EL, Santibanez-Koref MF, Norton JD. Structural organisation and chromosomal mapping of the human Id-3 gene. *Gene* 1994;151:309-314
- 55 Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* 2003;13:410-418
- 56 Volpert OV, Pili R, Sikder HA, Nelius T, Zaichuk T, Morris C, Shiflett CB, Devlin MK, Conant K, Alani RM. Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell* 2002;2:473-483
- 57 Cheung HW, Ling MT, Tsao SW, Wong YC, Wang X. Id-1-induced Raf/MEK pathway activation is essential for its protective role against taxol-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2004;25:881-887
- 58 Parrinello S, Lin CQ, Murata K, Itahana Y, Singh J, Krtolica A, Campisi J, Desprez PY. Id-1, ITF-2, and Id-2 comprise a network of Helix-Loop-Helix proteins that regulate mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:39213-39219
- 59 Wagsater D, Sirsjo A, Dimberg J. Down-regulation of ID2 by all-trans retinoic acid in monocytic leukemia cells (THP-1). *J Exp Clin Cancer Res* 2003;22:471-475
- 60 Smialowski P, Singh M, Mikolajka A, Majumdar S, Joy JK, Nalabothula N, Krajewski M, Degenkolbe R, Bernard HU, Holak TA. NMR and mass spectrometry studies of putative interactions of cell cycle proteins pRb and CDK6 with cell differentiation proteins MyoD and ID-2. *Biochim Biophys Acta* 2005;1750:48-60
- 61 Lofstedt T, Jogi A, Sigvardsson M, Gradin K, Poellinger L, Pahlman S, Axelson H. Induction of ID2 expression by hypoxia-inducible factor-1: a role in dedifferentiation of hypoxic neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2004;279:39223-39231
- 62 Navarro M, Valentinis B, Belletti B, Romano G, Reiss K, Baserga R. Regulation of Id2 gene expression by the type 1 IGF receptor and the insulin receptor substrate-1. *Endocrinology* 2001;142:5149-5157
- 63 Damdinsuren B, Nagano H, Kondo M, Yamamoto H, Hiraoka N, Yamamoto T, Marubashi S, Miyamoto A, Umeshita K, Dono K, Nakamori S, Wakasa K, Sakon M, Monden M. Expression of Id proteins in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Int J Oncol* 2005;26:319-327
- 64 Lee TK, Man K, Ling MT, Wang XH, Wong YC, Lo CM, Poon RT, Ng IO, Fan ST. Over-expression of Id-1 induces cell proliferation in hepatocellular carcinoma through inactivation of p16<sup>INK4a</sup>/RB pathway. *Carcinogenesis* 2003;24:1729-1736
- 65 Han S, Gou C, Hong L, Liu J, Zheyi Han, Liu C, Wang J, Wu K, Ding J, Fan D. Expression and significances of Id1 helix-loop-helix protein overexpression in gastric cancer. *Cancer Lett* 2004;216:63-71
- 66 Chan AS, Tsui WY, Chen X, Chu KM, Chan TL, Chan AS, Li R, So S, Yuen ST, Leung SY. Downregulation of ID4 by promoter hypermethylation in gastric adenocarcinoma. *Oncogene* 2003;22:6946-6953
- 67 Wilson JW, Deed RW, Inoue T, Balzi M, Becciolini A, Faraoni P, Potten CS, Norton JD. Expression of Id Helix-Loop-Helix Proteins in Colorectal Adenocarcinoma Correlates with p53 Expression and Mitotic Index. *Cancer Research* 2001;61:8803-8810
- 68 Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A, Shinozaki M, Bilchik AJ, Hoon DS. Epigenetic inactivation of ID4 in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:7475-7483
- 69 Rivat C, Rodrigues S, Bruyneel E, Pietu G, Robert A, Redeuilh G, Bracke M, Gespach C, Attoub S. Implication of STAT3 signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) and vascular endothelial growth factor-mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res* 2005;65:195-202
- 70 Hu YC, Lam KY, Law S, Wong J, Srivastava G. Identification of Differentially Expressed Genes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) by cDNA Expression Array. *Clinical Cancer Research* 2001;7:2213-2221
- 71 Maruyama H, Kleeff J, Wildi S, Friess H, Buchler MW, Israel MA, Korc M. Id-1 and Id-2 Are Overexpressed in Pancreatic Cancer and in Dysplastic Lesions in Chronic Pancreatitis. *Am J Pathol* 1999;155:815-822

# 影响拉米夫定相关乙肝病毒YMDD变异的因素

陆德云, 王 甦, 赵连三

陆德云, 王甦, 赵连三, 四川大学华西医院感染性疾病中心 生物治疗国家重点实验室(四川大学)感染病分子生物学研究室 四川省成都市610041

通讯作者: 赵连三, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院感染性疾病中心.

电话: 028-85422650 传真: 028-85422113

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-17

## 摘要

拉米夫定是抗乙肝病毒的主要药物之一, 因其抗病毒作用确切而被广泛用于治疗慢性乙型肝炎. 随着拉米夫定的广泛应用, 由拉米夫定导致的耐药问题逐渐成为人们关注的焦点. 诱发乙肝病毒YMDD变异是引起拉米夫定耐药的主要机制. 当YMDD变异病毒株成为优势株时就会影响拉米夫定的抗病毒疗效, 出现耐药, 导致病毒重新活跃, 甚至病情的加重或死亡. 目前研究认为影响拉米夫定相关YMDD变异的因素有: (1)拉米夫定用药时间. 用药时间越长, 发生YMDD变异的几率越大; (2)用药前病毒荷量、ALT水平及HBeAg状态. 基线HBV DNA滴度高、ALT水平低或HBeAg阳性者较易发生YMDD变异; (3)前C区变异; (4)乙肝病毒基因型; (5)联合用药.

陆德云, 王甦, 赵连三. 影响拉米夫定相关乙肝病毒YMDD变异的因素. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2243-2245

http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2243.asp

## 0 引言

拉米夫定是第一个批准用于治疗慢性HBV感染的胞嘧啶核苷类似物, 其作用机制是抑制具有逆转录活性的HBV DNA聚合酶, 中止HBV DNA链的延长, 有效抑制HBV的复制. 拉米夫定具有口服吸收完全、半衰期长、毒副作用小和抑制HBV复制迅速等优点. 但是, 长期使用拉米夫定可发生耐药. 耐药的主要是由YMDD(酪氨酸、蛋氨酸、天门冬氨酸和天门冬氨酸)区域及其上游调节序列发生变异所引起. HBV DNA聚合酶C区第552位密码子蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)取代(M552V)成为YVDD, 被异亮氨酸(I)取代(M552I)成为YIDD<sup>[1,2]</sup>. 乙肝病毒发生YMDD变异后, 改变了HBV DNA聚合酶的亚结构, 减少了拉米夫定与该酶的结合, 造成HBV对拉米夫定的耐药. 当变异株成为优势株时就会影响拉米夫定的抗病毒效果, 出现耐药, 导致病毒重新活跃, 甚至病情的加重或死亡<sup>[3-6]</sup>. 研究影响拉米夫定相关乙肝病毒YMDD变异的因素, 有助于减少YMDD变异的发生. 我们就影响拉米夫定相关乙肝病毒YMDD变异的因素作一简述.

## 1 拉米夫定用药时间与YMDD变异

拉米夫定用药时间与YMDD变异率呈正相关, 随着用药时间的延长, YMDD变异率逐渐增加. 来自亚洲的资料显示, 拉米夫定治疗1-4 a时YMDD变异发生率分别为14%、38%、49%和67%<sup>[7-10]</sup>. YMDD变异多在使用拉米夫定9 mo后被检测出, 少数病例也可在更短的时间内检出. 近期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. 临床上对于需要拉米夫定长期治疗的患者, 应注意监测YMDD变异, 特别是那些出现病情反跳的患者, 以便及时采取相应补救措施.

## 2 用药前病毒荷量、ALT水平及HBeAg状态与YMDD变异

初始治疗时的HBV DNA荷量、ALT水平以及HBeAg状态与YMDD变异有一定关系. 基线HBV DNA水平高, 或基线ALT低者较易发生YMDD变异. 此外, HBeAg阳性较HBeAg阴性患者变异发生率高.

台湾学者Chang *et al*<sup>[11]</sup>对56例无肝硬化和58例有肝硬化的乙肝患者进行追踪, 他们接受拉米夫定治疗的平均时间为34 mo(12-60 mo). 结果观察到, 37例无肝硬化患者和36例肝硬化患者发生了YMDD变异. 通过逐步Logistic回归分析显示: 用药前HBeAg阳性, HBV-DNA滴度和ALT水平为诱发YMDD变异的独立因素. 进一步分层分析和相关性检验显示: HBeAg阳性, HBV DNA大于500 ng/L和ALT小于5 ULN(正常值上限)者, YMDD变异率更高.

王磊 *et al*<sup>[12]</sup>采用错配聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析的方法, 对拉米夫定治疗的249例慢乙肝和64例乙型肝炎肝硬化患者进行了YMDD变异检测. 结果显示: 于12、24、36、48 mo时, 慢乙肝和乙肝肝硬化患者YMDD变异率分别达8.84%和17.19%、20.91%和32.40%、26.92%和39.56%、26.92%和58.79%. 提示随着治疗时间的延长, YMDD变异的累计发生率逐渐升高; 而且, 合并肝硬化者的YMDD变异率始终高于无肝硬化者. 时序检验及Cox回归分析的结果均表明: 未联合干扰素治疗、ALT水平较低、HBV DNA水平较高和治疗前诊断为肝硬化者均与YMDD变异的较早出现有关( $P < 0.05$ ). 据此我们认为, 使用拉米夫定发生YMDD变异的预测因子包括: 未联合干扰素治疗、治疗前基线ALT水平较低、HBV DNA滴度较高和肝硬化.

因此, 在拉米夫定治疗时, 需要严格掌握其适应证, 避免任意扩大适应证, 以免诱发YMDD变异的发生, 进而导致治疗失败.

### 3 前C区变异与YMDD变异

对于HBV前C区变异是否与YMDD变异相关,各家报道不一致.Tassopoulos *et al*<sup>[13]</sup>发现,前C区变异株感染的患者发生YMDD变异的频率较高.60例HBeAg阴性伴前C区变异的患者予拉米夫定治疗1 a, YMDD变异率为27%.张凯宇*et al*<sup>[14]</sup>报告,前C区G1896A和基本C区启动子区A1762T、G1764A双突变对拉米夫定治疗后出现的病毒学反弹没有影响;而在前C区G1896A突变株, YMDD变异减少.Tacke *et al*<sup>[15]</sup>研究表明,基本C区启动子区A1762T、G1764A双突变和前C区G1896A突变对药物的敏感性将不会产生影响;但是,基本C区启动子区A1762T、G1764A突变可以增加拉米夫定耐药突变株的复制水平,甚至可以超过野生株的基线复制水平,前C区G1896A突变也可以代偿拉米夫定耐药突变株的复制效率低下的不足.

### 4 基因型与YMDD变异

根据HBV核苷酸全序列异源性 $\geq 8\%$ 或S基因核苷酸序列差异 $\geq 4.1\%$ 基因型的判断标准,可将HBV分为A、B、C、D、E、F、G和H型8个基因型.对于HBV基因型对YMDD变异的影响,各家报道不一<sup>[16,17]</sup>.

周建良*et al*<sup>[18]</sup>在回顾调查235例拉米夫定治疗组和对照组患者的临床资料时发现, YMDD变异发生率治疗组中B和C基因型患者分别为3.6%和16.5% ( $\chi^2 = 5.508$ ,  $P < 0.01$ ).该研究提示, B基因型较C基因型有更低的YMDD诱变率,基因型是影响变异的重要因素之一.

日本学者Akuta *et al*<sup>[19]</sup>研究显示拉米夫定的YMDD变异与HBV基因型无关,而与基因型亚型有关.疗程超过1 a的213例日本慢性HBV感染者,检测YMDD变异的发生率时发现基因型A、B及C基因型病人中YMDD变异的发生率无差异,而YMDD变异发生率在HBV/Ba明显高于HBV/Bj ( $P < 0.05$ ),该研究显示YMDD变异的发生率与B基因型的亚型有关.

宋淑静*et al*<sup>[20]</sup>在研究拉米夫定早期疗效与乙型肝炎病毒(HBV)基因型的关系时发现,595例慢性乙型肝炎患者拉米夫定治疗12 mo时,69例发生了YMDD变异,其中C型46例(15.38%),B型9例(16.98%),BC混合型14例(13.86%),YMDD变异在各基因型组差异无统计学意义,基因型与YMDD变异未见直接关系.Moskovitz *et al*<sup>[21]</sup>回顾性调查71例长达5 a的拉米夫定治疗的患者的YMDD变异时,并没有发现YMDD变异与基因型有关.

### 5 联合用药与YMDD变异

目前研究证实拉米夫定与其他抗病毒药物联合应用可以延缓或减少YMDD变异的发生.Jang *et al*<sup>[22]</sup>研究证实联合用药能够减少YMDD变异的发生.83例被肝组织病理学证实为慢性乙型肝炎患者随机分为联合用药组(拉米夫定加 $\alpha$ -干扰素组,41例)和拉米夫定组(42例),疗程大

于12 mo.两组HBV DNA累积阴转率在24 mo时没有统计学差异(100% *vs* 100%, 24 mo,  $P = 0.13$ ).12、24、36 mo HBeAg累积消失率在两组间没有统计学差异(49% *vs* 31%, 12 mo; 61% *vs* 39%, 24 mo; 67% *vs* 42%, 36 mo;  $P = 0.07$ ).联合用药组病毒反跳发生率在12、24及36 mo分别低于单用拉米夫定组(5% *vs* 10%, 12 mo; 20% *vs* 55%, 24 mo; 30% *vs* 58%, 36 mo;  $P = 0.006$ ).联合用药组发生YMDD变异为5例,单用拉米夫定组则为18例.该研究显示,长期应用拉米夫定治疗,加用 $\alpha$ -干扰素可减少病毒的反跳和YMDD变异的发生.

宋家武 *et al*<sup>[23]</sup>在研究拉米夫定联合干扰素的疗效时发现,联合用药较单用拉米夫定疗效好,且YMDD变异率也较单用拉米夫定低.150例患者分为5组, A组前3个月用拉米夫定100 mg/d,第4个月加用干扰素,第10个月拉米夫定改为100 mg.隔日一次,疗程12 mo; B组拉米夫定, 100 mg/d, C组干扰素, 3 MU, 每周3次, D组拉米夫定100 mg/d,加用干扰素, 3 MU, 每周3次, F组为阴性对照组,结果治疗结束时, A组发生YMDD变异3例, B组10例, D组5例, A组及D组的YMDD变异明显低于B组,有统计学意义,说明联合用药能够降低YMDD变异的发生率.

拉米夫定联合泛昔洛韦等核苷类似物也可以减少YMDD变异的发生率<sup>[24,25]</sup>,还有联合苦参素、膦甲酸钠、胸腺肽以及中药均能减少YMDD变异的发生率的报道<sup>[26-31]</sup>.虽然多数研究证实了拉米夫定联合用药能够减少YMDD变异的发生率,但是联合用药并没有相应提高疗效,相反还有可能带来多重耐药以及增加经济负担等负面影响,所以联合用药应当慎重.上面宋家武的研究给我们以启示,从卫生经济学角度考虑,用拉米夫定治疗一段时间后,改为隔日一次,既可以减少YMDD变异的发生,又可以节约费用,是值得探索的一种治疗方法,目前没有剂量与YMDD变异发生呈正相关的证据.Lai *et al*<sup>[7]</sup>报道,两组分别接受拉米夫定25 mg/d与100 mg/d治疗1 a的患者,其YMDD变异的发生率无差异.

拉米夫定已获得广泛应用,然而临床上拉米夫定的不恰当使用,带来了拉米夫定耐药的新难题,影响了其抗病毒作用的发挥.如何减少拉米夫定的耐药,成为广大医生需要解决的现实问题.临床上应用拉米夫定时,应严格掌握其适应证,切忌任意扩大其使用范围,以免诱发耐药.对于需要长期用药者,应严密监视拉米夫定耐药情况,以便及时处理.

### 6 参考文献

- 1 Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condeay LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998;27:1670-1677
- 2 Gutfreund KS, Williams M, George R, Bain VG, Ma



- MM, Yoshida EM, Villeneuve JP, Fischer KP, Tyrrel DL. Genotypic succession of mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance. *J Hepatol* 2000;33:469-475
- 3 Wang JH, Lu SN, Lee CM, Lee JF, Chou YP. Fatal hepatic failure after emergence of the hepatitis B virus mutant during lamivudine therapy in a patient with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:366-369
- 4 Lok AS, Lai CL, Leung N, Yao GB, Cui ZY, Schiff ER, Dienstag JL, Heathcote EJ, Little NR, Griffiths DA, Gardner SD, Castiglia M. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003;125:1714-1722
- 5 Kagawa T, Watanabe N, Kanouda H, Takayama I, Shiba T, Kanai T, Kawazoe K, Takashimizu S, Kumaki N, Shimamura K, Matsuzaki S, Mine T. Fatal liver failure due to reactivation of lamivudine-resistant HBV mutant. *World J Gastroenterol* 2004;10:1686-1687
- 6 Natsuizaka M, Hige S, Ono Y, Ogawa K, Nakanishi M, Chuma M, Yoshida S, Asaka M. Long-term follow-up of chronic hepatitis B after the emergence of mutations in the hepatitis B virus polymerase region. *J Viral Hepat* 2005;12:154-159
- 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. *Gastroenterology* 2000;119:172-180
- 9 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 rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001;33:1527-1532
- 10 Chang TT, Lai CL, Chien RN, Guan R, Lim SG, Lee CM, Ng KY, Nicholls GJ, Dent JC, Leung NW. Four years of lamivudine treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:1276-1282
- 11 Chang ML, Chien RN, Yeh CT, Liaw YF. Virus and transaminase levels determine the emergence of drug resistance during long-term lamivudine therapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2005;43:72-77
- 12 王磊, 闫杰, 张照华, 王晶波, 杜以真, 李晓迎, 王耀宗. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎患者YMDD变异及影响因素的研究. 中华肝脏病杂志 2004;12:585-588
- 13 Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G, Heathcote J, Buti M, Goldin RD, Hawley S, Barber J, Condreay L, Gray DF. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology* 1999;29:889-896
- 14 张凯宇, 牛俊奇, 王玥, 丁艳华, 李玉香, 王峰. 乙型肝炎病毒前-C区1896和基本C区启动子区1762、1764双突变及YMDD变异对拉米夫定治疗的影响. 吉林大学学报(医学版) 2005;31:176-178
- 15 Tacke F, Gehrke C, Luedde T, Heim A, Manns MP, Trautwein C. Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of Lamivudine-resistant mutants. *J Virol* 2004;78:8524-8535
- 16 许正锯, 杨红, 张启华, 陈先礼, 李树清, 王崇国. 乙型肝炎病毒基因型与拉米夫定疗效关系的研究. 临床肝胆病杂志 2005;21:157-159
- 17 徐蓓, 姚光弼, 程建新, 朱玫. 乙型肝炎病毒基因型对拉米夫定长期疗效影响的评估. 肝脏 2005;10:76-78
- 18 周建良, 吴诗品. 拉米夫定治疗乙型肝炎病毒B、C基因型疗效比较. 中华肝脏病杂志 2004;12:489-490
- 19 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
- 20 宋淑静, 庄辉, 闫杰, 魏红山, 何忠平, 宋川, 董庆鸣, 肖元朴. 拉米夫定早期疗效与乙型肝炎病毒基因型的关系. 中华预防医学杂志 2005;39:203-205
- 21 Moskovitz DN, Osioy C, Giles E, Tomlinson G, Heathcote EJ. Response to long-term lamivudine treatment (up to 5 years) in patients with severe chronic hepatitis B, role of genotype and drug resistance. *J Viral Hepat* 2005;12:398-404
- 22 Jang MK, Chung YH, Choi MH, Kim JA, Ryu SH, Shin JW, Kim IS, Park NH, Lee HC, Lee YS, Suh DJ. Combination of alpha-interferon with lamivudine reduces viral breakthrough during long-term therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:1363-1368
- 23 宋家武, 张国, 林建国, 唐望先, 林菊生. 一种新的拉米夫定及干扰素联合疗法抗乙型肝炎病毒的临床研究. 中华肝脏病杂志 2004;12:593-596
- 24 丁虹, 曹立森, 裴浩, 沙安莉. 拉米夫定泛昔洛韦联合治疗慢性乙肝对临床疗效的影响. 临床肝胆病杂志 2002;18:332-333
- 25 Shen H, Alsatie M, Eckert G, Chalasani N, Lumeng L, Kwo PY. Combination therapy with lamivudine and famciclovir for chronic hepatitis B infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:330-336
- 26 申悦平, 张圆海, 王晨红, 张莉莉. 苦参素联合拉米夫定对YMDD变异的临床研究. 中国临床医学 2004;11:500-501
- 27 吴勤, 李莉, 韩萍, 白文林, 李梵, 臧红, 许桂林, 张敏娜, 刘泽. 膦甲酸钠联合拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的临床疗效. 临床内科杂志 2004;21:713-714
- 28 凌乔, 张长, 毛文忠. 胸腺肽、拉米夫定序贯治疗慢性乙型肝炎的初步评价. 临床荟萃 2004;19:338-339
- 29 谷强业, 陈合民. 拉米夫定加肝络欣治疗慢性乙型肝炎疗效及对YMDD变异的影响. 临床肝胆病杂志 2005;21:79-80
- 30 陈泽雄, 张诗军, 胡洪涛. 中药预防慢性乙型肝炎YMDD变异的临床研究. 中西医结合肝病杂志 2005;15:168-170
- 31 Shen WS, Yang HZ, Hong Q, Zhang YQ, Xie HP, Bian Z. Two-year observation of the clinical efficacy in treating chronic hepatitis B Patients with Ganxian recipe and lamivudine. *Chin J Integr Med* 2005;11:5-10

# 成人间活体肝移植中小肝综合征的预防策略

马跃峰, 李相成

马跃峰, 李相成, 南京医科大学附属第一医院肝脏移植中心 江苏省南京市 210029

通讯作者: 李相成, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心. doclix@hotmai.com

电话: 025-83718836-6476 传真: 025-86660751

收稿日期: 2005-06-01 接受日期: 2005-06-23

## 摘要

小肝综合征(small-for-size syndrome)是造成成人间活体肝脏移植预后差的重要原因, 其确切概念尚未完全统一, 本文对其发病机制的研究进展作了概括, 同时主要从移植物的选择、门静脉压力的控制、肝静脉的回流及移植体内炎症基因表达的调控四个方面介绍了预防小肝综合征发生的策略。

**关键词:** 小肝综合征; 肝移植; 成人

马跃峰, 李相成. 成人间活体肝移植中小肝综合征的预防策略. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2246-2250

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2246.asp>

## 0 引言

随着肝脏移植适应证的拓广, 肝脏短缺的问题在欧美国家越来越严重, 在亚洲, 由于受传统道德观念及宗教的影响, 尸体供肝非常稀少, 活体肝脏移植(LDLT)正是在这样的背景下问世, 为解决供肝严重匮乏提供了新的途径<sup>[1]</sup>. 但是目前成人受术术后的存活率低于儿童受体, 据日本肝移植协会的报告, 1989-11/2001-11, 950名儿童患者和614名成人患者在43个治疗中心进行了活体肝脏移植, 总的5 a生存率: 儿童81.5%, 成人为69.7%, 成人的生存率显著低于儿童( $P < 0.0001$ )<sup>[2]</sup>. 其中移植物过小导致的小肝综合征被认为是造成这种差别的主要原因。

## 1 小肝综合征的概念

小肝综合征(small-for-size syndrome)是一种可发生在扩大肝切除或减体积肝脏移植后的临床综合征, 其确切的概念目前尚未统一<sup>[3]</sup>, 对于部分肝脏移植, Heaton<sup>[4]</sup>对小肝综合征的概念是: 由于植入的肝脏体积小而导致功能上不能满足受体的需求, 而出现的一种临床综合征, 其临床表现为: 术后持续性胆汁淤积, 凝血机制紊乱, 门静脉高压, 严重者会出现腹水. 持续性的肝脏功能异常将进一步诱发脓毒血症、胃肠出血等并发症. 组织学特征为: 肝细胞呈气球样变、脂肪变性, 胆汁郁积形成胆栓, 缺血性斑片状坏死区和增生区并存. 如果患

者恢复顺利, 这些症状及生化指标会在术后几个星期后逐渐改善. 但是约有50%受体会在移植后的4-6 wk内死于脓毒血症<sup>[4]</sup>.

## 2 活体肝脏移植中小肝综合征的发病机制

小肝综合征的发病机制尚未完全清楚, 考虑与供受体多个因素及手术因素有关, 目前较为认同的发病机制为功能性肝脏体积过小和移植术后持续性门脉高灌注<sup>[5]</sup>.

理论上讲, 部分肝脏移植可以通过再生的方式达到满足受体所需要的体积<sup>[6]</sup>, 但是在肝脏再生之前, 移植体必须提供受体即时所需的功能, 根据肝脏手术的经验, 对于未合并有肝硬化的患者可耐受80-85%的切除量, 这就意味着15-20%的肝脏可以满足机体代谢的需要, 但是这一标准并不能直接用到LDLT, 因为手术过程中, 移植体遭受了冷热缺血和再灌注损伤的打击. 而受体的一般状况较差, 肝脏功能常处于失代偿状态, 对于肝脏功能需求增加, 这就意味着受体需要大于此范围的肝脏体积. 但是临床上, 出于对供体安全的考虑, 多数供者只能提供有限体积移植肝脏, 即所谓的小体积移植体(small-for-size graft). 这种供需矛盾是导致小肝综合征发生的重要原因. 研究证明, 移植体与受体标准肝脏的质量比值同移植体的存活率具有明显的相关性<sup>[7]</sup>.

在部分肝脏移植中, 由于供受体的门静脉、肝静脉不匹配和有效血管床的减少, 使得移植后的一段时间里门静脉血流增加、压力升高<sup>[8,9]</sup>. 小体积移植体再灌注后, 门静脉的血流和移植体的体积呈负相关, 即移植体的体积越小, 门静脉的血流越快<sup>[10]</sup>. 门静脉的血流增高状态会一直持续到术后的几个月. 研究表明<sup>[8]</sup>再灌注期第1 h门脉血流量与术后第2天胆红素水平具有明显相关性, 移植后1 wk门静脉压力增高同菌血症、胆汁淤积、凝血酶原时间延长、腹水等小肝综合征的表现呈正相关. 预后调查发现, 如果再灌注早期门脉血流大于260 mL/(min·100 g), 且伴有门静脉压力升高, 小移植体的预后往往很差<sup>[11]</sup>, 因而可认为门脉血流增加和门脉高压对移植体具有明显的伤害作用<sup>[10]</sup>. Man *et al*<sup>[12]</sup>的研究发现, 小体积肝脏移植后, 短暂的门静脉压力增高可引起肝窦机械性损伤, 导致肝窦间隙肿胀变形、窦间隙内衬细胞间隙增宽, 严重情况会出现狄氏间隙的崩解. 小体积移植体这种不可逆的内皮细胞损伤促进了肝脏微循环的衰竭. 同时还发现: 门脉压力增高可导致移植体的内皮素-1(ET-1)的表达上调, 血浆一氧化氮(NO)

水平降低; 移植物内血红素氧化酶-1(HO-1)和热休克蛋白-70(HSP-70)的表达下降<sup>[13]</sup>. 前者变化使肝窦收缩, 增加了入肝血流的阻力, 使移植物耐受缺血的能力明显降低. 而后两种应激蛋白低表达使移植物的维持稳态和自我修复能力明显减弱.

同门静脉血流增加不同, 肝动脉的血流随着移植物的体积而成比例减少<sup>[10]</sup>. 在移植物与受体质量比小于0.6%的情况下, 由于门静脉血流的显著增加, 肝窦发生严重的充血, 肝动脉血液入肝的阻力增大. 移植物再灌注早期肝动脉血流仅占全肝血流的10%, 并且受热缺血性损伤、急性排斥反应和动脉吻合技术的影响, 肝动脉的血流会进一步减少<sup>[14, 15]</sup>, 使得小体积移植物对于缺血性损伤、肝动脉栓塞的反应更为敏感<sup>[10, 15]</sup>.

肝静脉回流是活体肝脏移植常涉及的问题, 动物模型的研究发现, 肝静脉回流障碍区域的肝脏只有肝动脉供血, 门静脉供血几乎停止, 甚至会出现返流情况, 这使得该区域肝脏无法发挥功能<sup>[16]</sup>, 临床上证实, 淤血区域的肝脏再生能力明显下降, 不含肝中静脉的移植物的前段部分的再生明显小于后段<sup>[17]</sup>, 从而妨碍了部分肝脏的再生, 使得移植物短期内无法快速达到满足机体要求的体积.

### 3 预防小肝综合征的策略

基于上述发病机制, 目前预防小肝综合征的策略主要集中在: (1) 移植物的选择; (2) 门静脉压力的控制; (3) 肝脏静脉回流的改进; (4) 移植体内微循环的改进及炎症基因表达的调控.

**3.1 移植物的选择** 到目前为止, 成人活体肝脏移植所需的最小功能性的肝脏体积的标准还没有完全确定, 目前常用两种方法表示移植物的大小: (1) 移植物与受体标准肝脏的体积比(GV/SLV), 其中标准肝脏体积通过受体的身高和质量进行计算; (2) 移植物和受体的质量比(GRWR). 小体积肝脏移植物的安全界限为: GV/SLV为30-40%<sup>[7, 18]</sup>, GRWR为0.6-0.8%<sup>[19, 20]</sup>. 如何获得足够体积的肝脏移植物, 各移植中心的做法不尽相同, 目前主要有如下选择.

**3.1.1 左肝移植** 在成人活体肝移植的早期阶段, 只采用左半肝作为移植物. 但是由于左半肝体积相对较小, 人们很快认识到了小体积移植物的问题, 即术后早期移植物功能差、肝细胞损伤严重, 患者生存率降低. 在Tanaka *et al*<sup>[3]</sup>早期的39例左叶成人活体肝移植中, GRWR $\geq$ 0.8组( $n = 28$ )的生存率为82.1%, 而GRWR $<$ 0.8的生存率为54.5%. 因此多数移植外科医生认为左半肝往往满足不了成人机体的代谢需求<sup>[21]</sup>. 在西方, 采用左叶作为成人间的活体肝脏移植物已经被摒弃.

但是目前Shinshu大学仍较多的采用左半肝作为移植物, 并取得良好的效果<sup>[22]</sup>. 为增加移植物体积, Shin-

shu大学采用左肝加尾叶作为移植物<sup>[23]</sup>, 尾叶占全肝体积的3-4%, 对左半肝而言, 尾叶可将移植物的质量提高8-12. 在多数病例中, 他们都采用含有肝中静脉的左半肝作为移植物, Nishizaki *et al*<sup>[22]</sup>报道了33例患者进行了左肝的肝移植, 其中5例移植物小于标准肝脏体积30%的患者都获得生存, 无明显小肝综合征发生.

**3.1.2 右肝移植** 很显然, 对于成人患者, 采用右叶肝脏作为移植物可减轻肝脏大小不匹配的问题. 但是关于移植物中肝中静脉的去留一直存在争议, 目前多数学者倾向于保留肝中静脉, 因为肝中静脉是移植物中间右侧部分的主要流出道, 而对于左侧肝脏血液回流作用较小. Tanaka *et al*<sup>[3]</sup>认为, 缺乏肝中静脉的移植物前段会发生淤血, 而这种淤血对于边缘性供肝往往会起到致命的破坏作用, 因为淤血段的肝脏会出现肝功能障碍. 实践中证实保留肝中静脉的右叶肝移植物的生理效果优于不保留肝中静脉者, 但是对于供体的危险会增加<sup>[24]</sup>.

但是, 也有一些中心认为, 采用不含肝中静脉的肝右叶作为移植物, 不会导致肝脏的回流障碍<sup>[25]</sup>. 他们认为缺乏肝中静脉回流的区域会通过侧支血管引流到肝右静脉, 通过多普勒超声检测发现这些侧支循环血管会在移植后的1 wk内迅速形成<sup>[26]</sup>, 使得淤血区域在一定的时间内无论在形态上还是功能上都能够恢复, 虽然不含肝中静脉的移植物前段部分的再生明显小于后段, 但是对于移植物再生作用的影响是非常有限的, 认为不含肝中静脉的移植物会再生到满足机体代谢需要的大小, 而且不会引起严重并发症<sup>[17]</sup>.

成人接受右叶肝移植的最严重问题是胆道并发症, 包括: 来自移植物断面或胆道解剖处的胆漏, 发生率为15-32%<sup>[24, 27]</sup>, 高于全肝移植<sup>[28]</sup>. 胆漏发生率高的原因可能是肝右叶解剖结构较为复杂.

**3.1.3 肝右后叶移植** 近来有人用右肝后叶(VI, VII段 按照Couinaud 分段法)作为移植物<sup>[29]</sup>, 其具体操作步骤如下: 先阻断门静脉和肝动脉的右旁正中支和左支, 观察在肝表面形成的分界线, 在门静脉右支入肝门处左侧的5 mm处进行解剖, 阻断门静脉、肝动脉的右旁正中支后, 采用Kelly钳断肝, 术中应用胆道造影来判断右外侧区的胆道走向.

该类手术的适应证为: (1) 术前评估右半肝占全部供体肝脏体积的70%; (2) 估计右后叶的肝脏体积大于左侧肝脏<sup>[30]</sup>. 近来通过CT容积分析的方法发现, 右叶肝脏超过全肝体积70%, 约有72%的肝脏右后叶会超过左侧叶加尾状叶的体积<sup>[31]</sup>. 如果肝外侧区域的体积大于受体标准肝脏的40%, 则即使其移植给一般状况较差的患者, 也不会引起小肝综合征的发生. 该方法为移植物选择提供了新的思路, 但是该项操作的技术要求较高, 手术者应具有丰富的经验和技巧.

**3.1.4 双肝移植** 为了解决极端的小体积移植物, 韩国



医疗组积极采用了双肝作为移植物<sup>[32]</sup>,在20例双肝移植中,14例接受两个左叶,4例接受一个左叶+左外叶,1例接受一左叶和一个右叶,1例为左外叶+右后叶。Tanaka *et al*<sup>[3]</sup>亦报道1例该类手术,采用右叶加左外叶,分别来自于一对孪生兄弟。双肝叶移植可为供体提供足够体积的肝脏,但该手术具有很大的挑战性,并且多个供体的可行性也是问题。

在活体肝脏移植中,既要保证供体的绝对安全,又要为受体提供足够体积的肝脏,对于医生来讲,有时确实是一个艰难的选择,尽管目前的观点倾向于采用右半肝脏作为移植物来减少术后小肝综合征的发生,但应该看到,右叶切除对于供体绝非安全,在常规采用右半肝作为移植物的美国,目前已报道有七名供体死亡,因此移植物的类型应该通过计算供受体的身材比例来进行选择,如果供体的体形大于受体,则供体的左叶肝脏很可能超过受体标准肝脏体积的40%,为受体提供足够的肝脏功能。此时左半肝可能会是移植物的选择。同时还需考虑受体术前的状况和基础疾病,如果受体状态稳定、营养状态良好合并轻中度门静脉高压,GRWR=1%的移植物应该足够,不会发生小肝综合征,对于代偿的患者,尤其是那些合并严重门脉高压者,GRWR应该大于或等于1.5%<sup>[4]</sup>。

3.2 降低门静脉的灌注 由于门静脉高灌注和门脉高压对于小体积肝脏移植物的破坏作用已得到公认,因此降低门静脉灌注和压力也就成了预防小肝综合征的主要手段。

3.2.1 脾动脉结扎(splenic arterial ligation, SAL) Ito *et al*<sup>[11]</sup>的研究表明,脾动脉结扎可使门静脉压力从10-20 mmHg(平均16 mmHg)降低到9-13 mmHg(平均11 mmHg),并且会持续到移植术后的一个星期。实践证明实施SAL患者的预后明显好于那些门脉压力增高而没有实施SAL的患者。Lo *et al*<sup>[33]</sup>对1例由于植入的肝右叶体积过小而发生了原发性肝无功能的患者,采用脾动脉结扎降低了门静脉压力和灌注,从而成功挽救了移植物。脾动脉结扎操作简单,可以用来预防和治疗由小体积肝移植引起的门静脉高灌注和持续性门静脉压力增高。

3.2.2 门腔静脉分流(portacaval shunting, PC) 当门静脉血流显著升高[pvf>500 mL/(min·g)]或对于脾静脉结扎反应差时,可采用门腔静脉分流,动物实验证明,对于GRWR为0.6%的肝移植物,采用切断门静脉和肠系膜静脉的联系的方法可以有效降低门静脉血流,提高动物的生存率<sup>[34]</sup>。实践中,Boillot *et al*<sup>[35]</sup>采用完全分流肠系膜静脉血流的方法:结扎肠系膜静脉主干,结扎处远端与下腔静脉进行吻合。该方法可显著降低门脉的灌注。Tanaka *et al*<sup>[3]</sup>对该方法作以改进,即不结扎肠系膜静脉,将受体的门静脉分支与下腔静脉作吻合,从而分流了部分门静脉血流,取得了较好的结果。但是目前该类手术报道例数尚少,其临床应用价值有待于进一步考证。

3.3 流出道重建 流出道血流受阻将严重影响移植物的功

能<sup>[16]</sup>。在不含肝中静脉的右叶活体肝脏移植中,重建前段流出道有助于减少小肝综合征,但是由于肝内存在到肝右静脉的交通血管,因此不是所有这样的移植物都需要进行肝静脉重建。Sano *et al*<sup>[36]</sup>采用术中暂时夹闭动脉的方法来决定实施静脉重建的适应证:如果夹闭肝动脉后,移植物减去改变颜色的区域小于受体标准肝脏体积的40%,则术后发生小肝综合征的几率明显增大,应该实施肝静脉的成型重建。重建血管可采用受体的肠系膜下静脉、大隐静脉或卵巢静脉,静脉直径应该大于10 mm,这样才能保证肝静脉回流通畅,也会间接降低门静脉压力。此外,术中妥善固定肝脏对保证肝脏静脉回流亦起到很大作用<sup>[37]</sup>。

#### 3.4 移植体内微循环的改进及炎症基因表达的调控

3.4.1 缺血预处理 实施扩大肝脏切除前进行短暂缺血预处理,可使肝脏耐受接下来更长时间的缺血性损伤,对残余肝脏具有明显的保护作用<sup>[38,39]</sup>。研究发现缺血预处理对于活体肝移植中的小体积移植物也具有保护作用,该方法可以保持肝的微循环,减少Kupffer细胞的活化,促进肝细胞生长因子的产生,使移植物的炎症反应减轻,早期进入肝细胞再生周期<sup>[40,41]</sup>。同时手术时避免热缺血,减少冷缺血时间和早期给予抗排斥治疗也是提高小体积移植物生存率的主要措施。

3.4.2 药物预处理 尽管在临床上,还没有药物被用来预防小肝综合征,但动物实验显示,许多药物具有减轻小肝综合征的作用,这方面香港的医疗机构作了许多有益探索。

作为NO的释放剂和血管舒张剂,FK409已被证明可以改善肝微循环,最近,Man *et al*<sup>[42]</sup>研究表明,对于小体积肝脏移植物进行FK409的预处理可以预防小肝综合征的发生。相对于对照组,移植1 h后门静脉压力显著下降,移植物的早期生长反应素-1(EGF-1)及其下游的ET-1、诱导性一氧化氮合酶(iNOS)和巨噬细胞炎性蛋白-1(MIP-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )表达下调,急性炎症反应明显减弱,而HSP-70这两种热休克蛋白表达增高,而这两者对于维持细胞内的稳态和血管扩张起到很大作用,移植体内这些基因独特的高表达与良好的肝功能和术后高生存率相一致。同时病理发现,FK409组肝窦内皮细胞凋亡明显减少,其超微结构线粒体结构保持完整。因此可以认为FK409可以降低移植后早期门静脉压力,下调EGF-1等促炎基因的表达,上调抗凋亡和抗应激基因的表达,从而保护小体积肝移植物。近来,他们又采用FTY720对供肝进行预处理,发现这种免疫抑制剂对小体积移植物亦有保护作用,其机制是通过激活Akt信号系统抑制细胞凋亡,同时抑制了MAPK急性炎症反应途径,减少了细胞的炎症反应<sup>[43]</sup>。血红素氧化酶对于肝脏缺血再灌注损伤的作用已经得到证实,他们采用逆转录病毒作载体将血红素氧化酶编码基因导入大

鼠供体, 可使小体积肝移植物的H0-1表达增加, 从而有效降低了细胞间黏附因子和炎症因子的表达, 起到对肝移植物的保护作用<sup>[44]</sup>。

总之, 术前对于肝脏移植物的正确选择, 术中注意检测门静脉的血流及压力变化, 采取相应的预防措施, 可以减少小肝综合征的发生。在将来, 随着对于小肝综合征发病机制的不断研究, 会产生更多而且有效的治疗策略, 进一步提高活体肝脏移植患者的生存率。

#### 4 参考文献

- Testa G, Malago M, Broelsch CE. From living related to in-situ split liver transplantation: how to reduce waiting-list mortality. *Pediatr transplant* 2001;5:16-20
- Sugawara Y, Makuuchi M. Small-for-size graft problems in adult-to-adult living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2003;75:20-22
- Tanaka K, Ogura Y. "Small-for-size graft" and "small-for-size syndrome" in living donor liver transplantation. *Yonsei Med J* 2004;45:1089-1094
- Heaton N. Small-for-size liver syndrome after auxiliary and split liver transplantation: donor selection. *Liver Transpl* 2003;9:26-28
- Emond JC, Renz JF, Ferrell LD, Rosenthal P, Lim RC, Roberts JP, Lake JR, Ascher NL. Functional analysis of grafts from living donors. implications for the treatment of older recipients. *Ann Surg* 1996;224:544-552
- Kawasaki S, Makuuchi M, Ishizone S, Matsunami H, Terada M, Kawarazaki H. Liver regeneration in recipients and donors after transplantation. *Lancet* 1992;339:580-581
- Lo CM, Fan ST, Liu CL, Chan JK, Lam BK, Lau GK, Wei WL, Wong J. Minimum graft size for successful living donor liver transplantation. *Transplantation* 1999;68:1112-1116
- Gondolesi GE, Florman S, Matsumoto C, Huang R, Fishbein TM, Sheiner PA, Schwartz ME, Emre S, Thung S, Shapiro R, Miller CM. Venous hemodynamics in living donor right lobe liver transplantation. *Liver Transpl* 2002;8:809-813
- Smyrniotis V, Kostopanagiotou G, Kondi A, Gamaletsos E, Theodoraki K, Kehagias D, Mystakidou K, Contis J. Hemodynamic interaction between portal vein and hepatic artery flow in small-for-size split liver transplantation. *Transpl Int* 2002;15:355-360
- Marcos A, Olzinski AT, Ham JM, Fisher RA, Posner MP. The interrelationship between portal and arterial blood flow after adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation* 2000;70:1697-1703
- Ito T, Kiuchi T, Yamamoto H, Oike F, Ogura Y, Fujimoto Y, Hirohashi K, Tanaka AK. Changes in portal venous pressure in the early phase after living donor liver transplantation: pathogenesis and clinical implications. *Transplantation* 2003;75:1313-1317
- Man K, Lo CM, Ng IO, Wong YC, Qin LF, Fan ST, Wong J. Liver transplantation in rats using small-for-size grafts: a study of hemodynamic and morphological changes. *Arch Surg* 2001;136:280-285
- Man K, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Fung PC, Liang TB, Lee TK, Tsui SH, Ng IO, Zhang ZW, Wong J. Graft injury in relation to graft size in right lobe live donor liver transplantation: a study of hepatic sinusoidal injury in correlation with portal hemodynamics and intra-graft gene expression. *Ann Surg* 2003;237:256-264
- Payen DM, Fratacci MD, Dupuy P, Gatecel C, Vigouroux C, Ozier Y, Houssin D, Chapuis Y. Portal and hepatic arterial blood flow measurements of human transplanted liver by implanted Doppler probes. *Surgery* 1990;107:417-427
- Rela M, Vougas V, Muiesan P, Vilca-Melendez H, Smyrniotis V, Gibbs P, Karani J, Williams R, Heaton N. Split-liver transplantation: King's College Hospital experience. *Ann Surg* 1998;227:282-288
- Cui D, Kiuchi T, Egawa H, Hayashi M, Sakamoto S, Ueda M, Kaihara S, Uemoto S, Inomata Y, Tanaka K. Microcirculatory changes in right lobe grafts in living-donor liver transplantation: a near-infrared spectrometry study. *Transplantation* 2001;72:291-295
- Maetani Y, Itoh K, Egawa H, Shibata T, Ametani F, Kubo T, Kiuchi T, Tanaka K, Konishi J. Factors influencing liver regeneration following living-donor liver transplantation of the right hepatic lobe. *Transplantation* 2003;75:97-102
- Kawasaki S, Makuuchi M, Matsunami H, Hashikura Y, Ikegami T, Nakazawa Y, Chisuwa H, Terada M, Miyagawa S. Living related liver transplantation in adults. *Ann surg* 1998;227:269-274
- Kiuchi T, Kasahara M, Uryuhara K, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Egawa H, Fujita S, Hayashi M, Tanaka K. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation* 1999;67:321-327
- Ben-Haim M, Emre S, Fishbein TM, Sheiner PA, Bodian CA, Kim-Schluger L, Schwartz ME, Miller CM. Critical graft size in adult-to-adult living donor liver transplantation: impact of the recipient's disease. *Liver transpl* 2001;7:948-953
- Sugawara Y, Makuuchi M, Takayama T, Imamura H, Dowaki S, Mizuta K, Kawarasaki H, Hashizume K. Small-for-size grafts in living-related liver transplantation. *J Am Coll Surg* 2001;192:510-513
- Nishizaki T, Ikegami T, Hiroshige S, Hashimoto K, Uchiyama H, Yoshizumi T, Kishikawa K, Shimada M, Sugimachi K. Small graft for living donor liver transplantation. *Ann Surg* 2001;233:575-580
- Miyagawa S, Hashikura Y, Miwa S, Ikegami T, Urata K, Terada M, Kubota T, Nakata T, Kawasaki S. Concomitant caudate lobe resection as an option for donor hepatectomy in adult living related liver transplantation. *Transplantation* 1998;66:661-663
- Cattral MS, Molinari M, Vollmer CM Jr, McGilvray I, Wei A, Walsh M, Adcock L, Marks N, Lilly L, Girgrah N, Levy G, Greig PD, Grant DR. Living-donor right hepatectomy with or without inclusion of middle hepatic vein: comparison of morbidity and outcome in 56 patients. *Am J Transplant* 2004;4:751-757
- Bak T, Wachs M, Trotter J, Everson G, Trouillot T, Kugelmass M, Steinberg T, Kam I. Adult-to-adult living donor liver transplantation using right-lobe grafts: Results and lessons learned from a single-center experience. *Liver Transpl* 2001;7: 680-686
- Kaneko T, Kaneko K, Sugimoto H, Inoue S, Hatsumoto T, Sawada K, Ando H, Nakao A. Intrahepatic anastomosis formation between the hepatic veins in the graft liver of the living related liver transplantation: observation by Doppler ultrasonography. *Transplantation* 2000;70:982-985
- Broelsch CE, Malago M, Testa G, Valentin Gamazo C. Living donor liver transplantation in adults: Outcome in Europe. *Liver Transpl* 2000;6:64-65
- Trotter JF, Wachs M, Everson GT, Kam I. Adult-to-adult transplantation of the right hepatic lobe from a living donor. *N Engl J Med* 2002;346:1074-1082
- Sugawara Y, Makuuchi M, Takayama T, Mizuta K, Kawarasaki H, Imamura H, Hashizume K. Liver transplantation using a right lateral sector graft from a living donor to her granddaughter. *Hepatogastroenterology* 2001;48:261-263
- Sugawara Y, Makuuchi M, Takayama T, Imamura H, Kaneko J. Right lateral sector graft in adult living-related liver transplantation. *Transplantation* 2002;73:111-114
- Leelaudomlipi S, Sugawara Y, Kaneko J, Matsui Y, Ohkubo T, Makuuchi M. Volumetric analysis of liver segments in 155 living donors. *Liver Transpl* 2002;8:612-614
- Lee SG, Park KM, Hwang S, Lee YJ, Kim KH, Ahn CS, Choi DL, Joo SH, Jeon JY, Chu CW, Moon DB, Min PC, Koh KS, Han SH, Park SH, Choi GT, Hwang KS, Lee EJ, Chung YH, Lee YS,

- Lee HJ, Kim MH, Lee SK, Suh DJ, Kim JJ, Sung KB. Adult-to-adult living donor liver transplantation at the Asan Medical Center, Korea. *Asian J Surg* 2002;25:277-284
- 33 Lo CM, Liu CL, Fan ST. Portal hyperperfusion injury as the cause of primary nonfunction in a small-for-size liver graft-successful treatment with splenic artery ligation. *Liver transpl* 2003;9:626-628
- 34 Lo CM, Liu CL, Fan ST. Portomesenteric disconnection for small for-size grafts in liver transplantation: preclinical studies in pigs. *Liver Transpl* 2003;9:42-46
- 35 Boillot O, Delafosse B, Mechet I, Boucaud C, Pouyet M. Small-for-size partial liver graft in an adult recipient: a new transplant technique. *Lancet* 2002;359:406-407
- 36 Sano K, Makuuchi M, Miki K, Maema A, Sugawara Y, Imamura H, Matsunami H, Takayama T. Evaluation of Hepatic Venous Congestion: Proposed indication criteria for hepatic vein reconstruction. *Ann of surg* 2002;236:241-247
- 37 Tucker ON, Heaton N. The "small-for-size" liver syndrome. *Current opinion in critical care* 2005;11:150-155
- 38 Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000;232:163-165
- 39 Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003;238:843-850
- 40 Franco-Gou R, Peralta C, Massip-Salcedo M, Xaus C, Serafin A, Rosello-Catafau J. Protection of reduced-size liver for transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:1408-1420
- 41 Vajdova K, Heinrich S, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning and intermittent clamping improve murine hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury. *Liver Transpl* 2004;10:520-528
- 42 Man K, Lee TK, Liang TB, Lo CM, Fung PC, Tsui SH, Li XL, Ng KT, Fan ST. FK 409 ameliorates small-for-size liver graft injury by attenuation of portal hypertension and down-regulation of Egr-1 pathway. *Ann Surg* 2004;240:159-168
- 43 Zhao Y, Man K, Lo CM, Ng KT, Li XL, Sun CK, Lee TK, Dai XW, Fan ST. Attenuation of small-for-size liver graft injury by FTY720: significance of cell-survival Akt signaling pathway. *Am J Transplant* 2004;4:1399-1407
- 44 Yang ZF, Tsui TY, Ho DW, Tang TC, Fan ST. Heme oxygenase-1 potentiates the survival of small-for-size liver graft. *Liver Transpl* 2004;10:784-793

电编 李琪 编辑 王谨晖 审读 张海宁

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

• 消息 •

## 欢迎订阅 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最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,页码 160,月价 72.00,年价 864 元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、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:wcjd@wjgnet.com;网址:www.wjgnet.com。



# 肝细胞癌生物标志物的研究进展

王嘉倍, 刘连新

王嘉倍, 刘连新, 哈尔滨医科大学附属第一医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150001

国家自然科学基金资助项目, No. 30300339

通讯作者: 刘连新, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院普外科三病房. liulianxin@medmail.com.cn

电话: 0451-53658828 传真: 0451-53670428

收稿日期: 2005-08-10 接受日期: 2005-08-26

## 摘要

原发性肝癌(primary hepatic cancer, PHC)是世界范围内第8位最常见的恶性肿瘤, 在我国肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占其91.5%. HCC是肿瘤病因学中的重要类型, 肝硬化、病毒性肝炎、化学致癌物及环境因素等所造成的慢性肝脏损害都可诱发HCC. HCC恶性度高, 容易复发及转移, 预后差, 而且早期诊断较困难, 延误了最佳治疗时期. HCC的生物标志物对于HCC的早期诊断、监测肿瘤进展、疗效判定、复发和存活率的判定十分重要. 因此, 寻找有效的HCC生物标志物是医学工作者多年以来的努力方向, 并取得了很大的进展. 甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是临床上诊断HCC最常用的指标, 其敏感性和特异性分别为60%和90%, AFP-L3、AFU、DCP及anti-p53等也都有各自的优缺点, 新近发现SCCA-IgM IC在HCC患者有表达, 其敏感性及特异性均较高, 可能不久以后会成为HCC早期诊断的重要依据.

**关键词:** 肝细胞癌; 生物标志物; 鳞状细胞癌抗原免疫球蛋白M复合物; 甲胎蛋白;

王嘉倍, 刘连新. 肝细胞癌生物标志物的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2251-2256

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2251.asp>

## 0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界范围内第四位常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>. 每年大约有250 000名患者死于肝细胞癌<sup>[2]</sup>. 肝细胞癌的发病机制至今仍未清楚. 其在临床上恶性度较高, 死亡率在消化道恶性肿瘤中排第三位. 所以早期发现、早期治疗是提高患者生存率的关键, 而大多数患者就诊时已届中晚期, 失去了最佳治疗时机. HCC患者死亡的原因多为肿瘤破裂所致的大出血、食道胃底静脉曲张破裂出血、肝性脑病、多脏器功能衰竭及肝肾综合征等. 因此寻找有助于HCC早期诊断的生物标志物具有很高的临床价值. 本文就一些HCC生物标志物加以阐述.

## 1 生物标志物

### 1.1 鳞状细胞癌抗原免疫球蛋白M复合物(SCCA-IgM IC)

SCCA是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 可存在于正常鳞状上皮的棘状层和颗粒层, 但其在上皮起源的肿瘤细胞中典型表达<sup>[3-4]</sup>. 其同源体SCCA-1和SCCA-2可保护肿瘤细胞免于凋亡, SCCA-1还可促进肿瘤生长<sup>[5]</sup>. 最近有报道<sup>[6]</sup>在所有手术切除的HCC标本中经免疫组化均发现了过度表达的鳞状细胞癌抗原(SCCA)异质体(SCCA-1, SCCA-2和SCCA-PD), 而在正常肝脏组织中未发现此类物质.

Beneduce *et al*<sup>[7]</sup>对50例HCC患者, 50例肝硬化患者, 50例慢性肝炎患者及73例正常对照组的健康人的血清SCCA-IgM IC进行了检测, 研究发现: 由SCCA及IgM组成的循环免疫复合物在73名正常对照组中没有被检测到, 而在50例HCC患者中有35例(70%)检测到了SCCA-IgM IC; 在50例肝硬化患者中有13例(26%)检测到了SCCA-IgM IC; 在50例慢性肝炎患者中有9例(18%)检测到了SCCA-IgM IC. 研究还发现, SCCA-IgM IC水平与AFP水平无关联性, 因为在相同的50例HCC患者中有21例(42%)检测到AFP显著升高(>200  $\mu\text{g/L}$ ). Giannelli *et al*<sup>[8]</sup>的研究还发现, SCCA-IgM IC在HCC肿瘤组织中的表达要比癌周组织中强得多, 而且在转移的肿瘤结节中也可以发现明显的SCCA-IgM IC的表达. 但并没有发现SCCA-IgM IC的表达与HCC的组织学分期及肿瘤大小之间的关联性. 因此, SCCA-IgM IC作为一种新的血清生物标志物, 其敏感性及特异性均较高, 对微小的转移灶也有较高的敏感性, 其单独或与AFP联合应用, 可极大的提高对HCC诊断的敏感性及特异性.

1.2 甲胎蛋白(AFP) 甲胎蛋白是在胎儿发育过程中由胎肝合成的, AFP在胚胎的12-14 wk合成达高峰, 血清浓度可达1-3 g/L, 胎儿出生后, 基因表达即关闭, 出生1 a后, 血清浓度降至正常水平, 约为5.8  $\mu\text{g/L}$ . 但当肝细胞发生病变时, AFP基因表达开放, 于血清中可检测到AFP浓度显著升高, 因此AFP成为诊断肝癌的生物标志物.

1.2.1 AFP Abelev在1968年首次将AFP作为HCC的生物标志物加以研究<sup>[9]</sup>. 在当前, 临床上诊断HCC最常用的仍然是AFP, 最初其阳性值设定为>400  $\mu\text{g/L}$ , AFP检测具有较高的敏感性, 30-60%的HCC患者表现为AFP的显著升高, 但AFP诊断HCC仍有一定的局限性, 因为有相当多的肝硬化患者的血清AFP值在200  $\mu\text{g/L}$ 以上. Gupta *et al*<sup>[10]</sup>发现AFP对丙型肝炎患者的敏感性和特异性分别是41-65%和80-94%. 此外, 部分良性肝病, 生殖系统和胃肠道的一些恶性肿瘤中AFP值也升高. 而且在乙肝表面抗原阴性的HCC患者中AFP水平明显低于乙肝表面抗原阳性或者

丙肝表面抗原阳性的患者<sup>[11]</sup>.

尽管AFP作为HCC生物标志物有一定的缺陷,但其通常与超声检查联合应用来筛查HCC<sup>[12-13]</sup>.尽管有些临床医生认为AFP对HCC的筛查没有作用<sup>[14]</sup>,但He *et al*<sup>[15]</sup>研究证明AFP与超声联合应用筛查HCC的敏感性几乎可达到100%.

另外,有研究<sup>[16-17]</sup>证明AFP水平与肿瘤大小、组织学分级、肝内转移和门静脉癌栓形成等肿瘤各项指标无关.

1.2.2 AFP异质体(AFP variants) 随着生物化学及其相关分析技术的进展与应用,发现AFP分子与外源性凝集素的亲和力不同,即存在不均一性的糖链异质性.应用不同的凝集素亲和电泳可以把它们分成若干个组分.也可以用等电聚焦技术来分离AFP组分<sup>[18-19]</sup>.研究发现总AFP中包含三种组分:AFP-L1,来自良性肝病,是AFP的主要组分;AFP-L2来自孕妇;AFP-L3为HCC细胞所特有.

Yoshida *et al*<sup>[20]</sup>以AFP-L3百分比大于15%作为正常与否的临界值,并发现AFP-L3所占百分比与HCC的分期及肿瘤的大小有着很高的关联性,而这些是AFP所不具备的. Khien *et al*<sup>[21]</sup>测定了65例HCC患者、25例慢性肝病患者的AFP-L3, HCC患者中敏感性为96.9%,特异性为92.0%,准确性为95.5%. AFP水平与AFP-L3水平无明显相关性.在非恶性肝病中,肝细胞不表达AFP-L3.约35%小肝癌(<2cm)患者血清中可检测出AFP-L3,与影像学比较可提前9-12 mo发现HCC<sup>[22]</sup>. Tada *et al*<sup>[23]</sup>研究还发现,病理检查发现HCC患者门静脉及肝静脉受浸润者血清的AFP-L3的表达要比单纯HCC患者的AFP-L3表达强得多,而门静脉及肝静脉受浸润往往是预后不良的提示. AFP-L3降低与否还可以作为HCC患者治疗的评估指标<sup>[24]</sup>.所以, AFP-L3不仅可以早期诊断HCC,而且还可以评估HCC患者的治疗及预后.因此, AFP-L3作为AFP异质体是新一代的HCC生物标志物.有着很高的临床使用价值.

1.2.3 AFP mRNA HCC可以通过检测血清AFP mRNA进行早期诊断及判断预后,因为AFP mRNA是肝癌细胞表达的第一步,是从病变处脱离入血的微量肝癌细胞的标志,它反映了循环血中HCC肿瘤细胞的存在及肝外转移的发生<sup>[25]</sup>.应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)可以检测到外周血中微量的HCC肿瘤细胞的存在<sup>[26]</sup>.但AFP mRNA的临床价值仍然存在争议.

Ijichi *et al*<sup>[27]</sup>对87例HCC患者进行研究,检测术前及术后的血清AFP mRNA水平,并跟踪调查这些患者术后28 mo的复发情况.在术前有31例患者(36%)血清AFP mRNA阳性,术后有30例患者(34%)血清AFP mRNA阳性,术后28 mo有46例患者(53%)复发. HCC患者术前及术后AFP mRNA均为阳性的患者有极高的复发率(85%),并有远处转移及多部位复发的趋势.术后AFP mRNA阳性患者的复发间期要明显短于阴性患者,所以术后AFP mRNA水平与肿瘤术后转移间隔时间呈正相关.

Cillo *et al*<sup>[25]</sup>还发现循环血中AFP mRNA的水平与胆汁郁积指数、结节大小及动脉侵入有显著关联性.因此AFP mRNA不仅可以早期预测HCC,而且还可以评估HCC患者的预后及复发.

1.3  $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶(AFU) AFU是广泛分布于人体组织细胞、血液、体液中的溶酶体酸性水解酶,系统命名为 $\alpha$ -L-岩藻糖苷岩藻糖水解酶(EC3, 2, 1, 51).法国学者Deugnier于1984年首先提出AFU可能成为诊断原发性肝癌的一项有用指标.

Giardina *et al*<sup>[28]</sup>对132例肝硬化患者进行了长达8 a的跟踪调查发现:在超声诊断HCC前6-9 mo,有43.7%的HCC患者血清AFU值显著升高,而且对于AFP阴性的HCC患者血清AFU也有较高的敏感性(57.1%).但是,研究还发现AFU与肿瘤大小无关联性,而AFP则与肿瘤大小有显著关联性.因此,血清AFU对早期的HCC诊断有很大的帮助,临床上应对血清AFU升高的肝硬化患者提高警惕.而且,鉴于AFU检测方法简单、快速、方便,适合大规模人群普查早期HCC,临床上应该大力推广<sup>[29]</sup>.

1.4 组织多肽特异性抗原(TPS) TPS是从组织多肽抗原(TPA)中纯化而来,其实质是细胞角蛋白18片段上的M<sub>3</sub>决定簇<sup>[30]</sup>,在细胞周期的S晚期和G<sub>2</sub>期,伴随着DNA、蛋白质的合成,TPS被合成并于细胞分裂后不久释放入血或体液中.所以,血清TPS水平常反映肿瘤细胞的分裂增殖活性.

Yao *et al*<sup>[31]</sup>的研究发现:TPS仅与肿瘤大小有关.他们分别对69例HCC患者,57例健康人,56例慢性肝炎患者和49例肝硬化患者应用单克隆TPS IRMA测定其血清TPS水平,同时还测定了AFP值.结果显示:TPS血清水平仅高于正常对照组( $P = 0.001$ ),与肝硬化及肝炎组无显著差异. TPS与AFP无显著相关性.血清TPS仅与肿瘤大小之间存在显著相关性( $P = 0.005$ );AFP与肿瘤大小,门脉癌栓及肿瘤分化程度之间存在显著相关性( $P < 0.05$ ).血清TPS与HCC肿瘤侵袭性之间无显著相关性.但与肝功能受损程度相关性显著,导致在部分肝硬化患者或肝炎患者中出现了高水平表达.因此,TPS虽然尚不能够独立诊断HCC,但是对肝病患者血清TPS的升高应注意结合其它相关的临床指标加以具体分析,以便能够达到早期诊断HCC的目的.

1.5 anti-p53 p53基因定位于17P13.1,长约20 kb,含11个外显子,转录mRNA长约2.8 kb,产物p53蛋白由393个氨基酸组成.野生型p53基因克隆或其cDNA的表达,可抑制其它癌基因对细胞的转化,一旦其发生了突变或缺失,即可诱发多种肿瘤.长时间接触真菌毒素及黄曲霉毒素B1均可诱发p53基因突变<sup>[32]</sup>.可通过检测anti-p53水平来加以判断.

Alves *et al*<sup>[33]</sup>应用免疫组化方法对54例HCC患者,30例肝硬化患者的anti-p53进行检测.在III-IV级的HCC



患者中有58.3%检测到了anti-p53的免疫表达,在I-II级的HCC患者中有22.2%的患者显示阳性结果,平均阳性率为35.2%。其数据介于美国与非洲报道的数据之间(6-18%, 40-50%)。而在癌旁组织及30例肝硬化患者中没有检测到anti-p53的免疫表达。因此,anti-p53的检测对HCC的诊断具有一定的价值,可作为一种新的HCC生物标志物,但由于其与美国和非洲所报道的数据有所差别,而且其对于其它的胃肠道恶性肿瘤也有较高的阳性率:胆管癌(100%),胰腺癌(75%),结肠癌(70%),食管癌(60%)和胃癌(35%)。所以其仍需进一步的研究以供临床应用。

1.6 脱- $\gamma$ -羧基凝血酶原(DCP) 正常肝脏组织可以在肝细胞内质网内将DCP羧化使之成为有活性的凝血酶原,一旦机体需要,凝血酶原即可转变成凝血酶参与机体的各项生理功能。但HCC患者肝细胞发生癌变,内质网失去其正常功能,不能将DCP羧化成为有活性的凝血酶原,从而血清中DCP含量增高。

1984年Liebman首次报道91%的肝癌患者血清中DCP的水平升高。血清DCP水平与HCC患者是否有动脉侵入有很大关联性,血清DCP水平 $>300$  AU/L的HCC患者绝大多数伴有动脉侵入,而DCP水平与肿瘤结节数量之间没有发现关联性<sup>[34]</sup>。有研究表明,DCP作为HCC的生物标志物具有48-62%的敏感性和81-98%的特异性<sup>[35]</sup>。袁联文 *et al*<sup>[36]</sup>测定了东京大学医学部附属医院肝胆胰外科1995至1997年间收治的92例HCC患者血清DCP和AFP水平,发现DCP诊断HCC的准确率,敏感性和特异性分别为56%, 46%和92%, AFP阳性率为41%,且两者在诊断上无明显相关性,即血清DCP在诊断HCC不仅与AFP同样有效,而且具有较高的特异性。HCC患者血清DCP水平与癌灶大小呈正相关,且术前血清DCP高的患者5 a生存率明显低于血清DCP低的患者<sup>[37]</sup>。

由于DCP和AFP之间在诊断HCC上没有关联性,而且单独的DCP或AFP都不是诊断HCC的完美指标,所以联合这两种生物标志物来提高对HCC的诊断率是一种合乎逻辑的方法。Marrero *et al*<sup>[38]</sup>研究发现联合应用DCP和AFP在鉴别HCC和其他肝脏疾病方面并不优于单独应用DCP。可是联合应用DCP和AFP-L3对于早期诊断HCC有较大的帮助<sup>[39]</sup>。

1.7 磷脂酰基醇蛋白聚糖-3(GPC3) GPC3是一种硫酸类肝素蛋白多糖<sup>[40]</sup>,它可以借助磷脂酰基醇糖基锚定在细胞膜上。GPC3在绝大多数HCC患者有表达,而在正常肝组织及良性肝脏病变中不表达, GPC3通过增强自分泌或旁分泌Wnt基因表达信号来刺激体内和体外HCC肿瘤细胞生长<sup>[41]</sup>。GPC3能够黏附Wnt基因,促进Wnt基因高表达, Wnt基因的表达产物能够促进多种肿瘤组织生长。有研究证明, HCC患者的GPC3 mRNA表达增强<sup>[42, 43]</sup>。并且由Sung *et al*<sup>[44]</sup>证明培养基上的HCC细胞可以分泌GPC3。根据Capurro *et al*<sup>[45]</sup>的研究结果,只有1/20的肝硬化

患者在血清中检测到GPC3。所以检测血清GPC蛋白含量或GPC mRNA含量对于HCC的诊断具有较大帮助。

在75%的HCC患者中可以检测到GPC3 mRNA的过量表达,仅在3.2%的正常人血清中检测到GPC3 mRNA的高表达<sup>[46]</sup>。免疫组化实验证实72%的HCC患者肝脏组织中可以检测到GPC3蛋白<sup>[47]</sup>;而且,应用酶联免疫标记试验(ELISA)在40-53% HCC患者的循环血中可以检测到GPC3蛋白<sup>[47, 48]</sup>。此外, GPC3的表达与肿瘤组织的分级及大小无关,与AFP无关联性<sup>[49]</sup>。因此,在临床上检测GPC3可以对HCC患者进行早期诊断,鉴于其对AFP阴性的HCC患者也有较高的敏感性,可将其与AFP联合应用。

1.8  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶(GGT) 及GGT-mRNA GGT可以催化谷胱甘肽中的 $\gamma$ -谷氨酸残基向氨基酸肽链或水转移。GGT在肝脏主要定位于Kupffer细胞、门脉周围血管和胆管内皮细胞,在肝细胞为阴性。可是发生癌变的肝细胞GGT均为阳性。应用聚丙烯酰胺凝胶电泳可将GGT分离出9-11条区带,其中I'、II和II'为肝癌特异性GGT<sup>[50]</sup>。其检测HCC的阳性率可达75%,假阳性 $<5\%$ ,血清GGT浓度与AFP和肿瘤大小无关联性,其对AFP阴性的HCC患者的阳性率可达75%,从而可以弥补AFP的不足。所以, GGT可以作为早期诊断HCC的一个极其敏感的酶学指标<sup>[51]</sup>。

GGT-mRNA分三种亚型(A、B、C亚型),应用RT-PCR技术可检测患者外周血中的GGT-mRNA, A亚型主要存在于正常肝脏组织中, HCC组织中主要含有B亚型。GGT-mRNA亚型转化与GGT基因异常表达、甲基化状态改变和肝癌的发生关系密切。

1.9 血管内皮生长因子(VEGF) VEGF由血管内皮细胞分泌,在正常血管的生长发育中起着重要作用。但VEGF同时也能促进肿瘤组织内血管的生长。由VEGF调节的肿瘤相关的血管生长对于HCC的生长及转移非常重要<sup>[52]</sup>。晚期HCC患者肿瘤组织多表现出血管增多的特性。VEGF和它的受体(VEGFR-1和VEGFR-2)交互作用,在HCC的发展过程中起着关键性作用<sup>[53]</sup>。HCC患者血清VEGF的浓度要比健康者显著升高;但在HCC患者和非HCC肝病之间却未发现显著区别。免疫组化分析显示VEGF蛋白在高分化的HCC细胞中和HCC患者正常肝组织中均显著表达;而在低分化的HCC中, VEGF在瘤内血管的内皮细胞中的表达要明显强于在肿瘤细胞中的表达<sup>[54]</sup>。此外,血清VEGF的浓度与CT和MR成像信号的强度和性质之间有关联性<sup>[55-56]</sup>。

鉴于VEGF的血清浓度会在HCC出现前显著升高,并且VEGF的分布状态会随着HCC的发展而显著改变,因此,检测患者血清VEGF浓度也是早期预测HCC的一项重要手段,但由于其特异性较低,所以应结合其它标志物共同使用。

1.10 转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1) TGF- $\beta$ 1是一大类多功能的生长因子,哺乳动物中只表达TGF- $\beta$ 1, 2, 3, 其中TGF- $\beta$ 1含量最多。TGF- $\beta$ 1参与正常和转化细胞的生长



和分化. TGF- $\beta$ 1可以抑制免疫系统, 从而促进癌细胞生长、浸润及远处转移. TGF- $\beta$ 1 mRNA在HCC患者有高表达, 尤其在小HCC与高分化的HCC的肿瘤组织中. 对38例小HCC(<3 cm)患者血清TGF- $\beta$ 1检测时发现其值显著升高. 将血清TGF- $\beta$ 1阳性标准定为800 ng/L时, 其诊断小HCC的特异性超过95%, 敏感性为68%<sup>[57]</sup>.

TGF- $\beta$ 1是HCC肿瘤发生的原始标志物<sup>[58]</sup>. 由于AFP对小HCC的敏感性较低(24%), TGF- $\beta$ 1在诊断小HCC比AFP具有更高的敏感性及特异性, 所以TGF- $\beta$ 1可以作为一种生物标志物对可疑HCC患者进行早期检测.

1.11 其它 从生蛋白也叫载脂蛋白J, 是一种糖蛋白二聚体, 存在于大多数动物的组织和体液中<sup>[59]</sup>. 有报道从生蛋白在应激反应<sup>[60]</sup>、细胞凋亡和肿瘤发生中起到了重要作用. 从生蛋白在人体多种恶性肿瘤中过度表达, 包括乳腺<sup>[61]</sup>、肾脏<sup>[62]</sup>、膀胱<sup>[63]</sup>、胰腺<sup>[64]</sup>、结肠<sup>[65]</sup>和淋巴<sup>[66]</sup>的恶性肿瘤. 从生蛋白在肿瘤转化及恶化过程中所起的作用并没有得到明确阐述; 由于从生蛋白经过翻译后修饰可以得到不同的亚型, 所以产生了很多有争议的结果<sup>[67]</sup>. 但是, 从生蛋白在人类的几种恶性肿瘤中起到重要作用这一点是明确的. 经过免疫组化染色分析从生蛋白在HCC患者中有89%的阳性率<sup>[68]</sup>, 经过化学治疗的HCC患者从生蛋白有上调趋势<sup>[69]</sup>. 其对HCC诊断的临床使用价值有待于进一步研究.

甘氨酸脯氨酸二肽氨基肽酶(GPDA)在1987年第一次被用作HCC的生物标志物来研究, 最近Ni *et al*<sup>[70]</sup>证明GPDA的同工酶GPDA-F在HCC患者血清呈持续阳性, 他们认为此生物标志物对于诊断无AFP分泌的HCC有较高的敏感性.

## 2 展望

我国是HCC的高发区, 这与我国肝炎病毒感染较重, 传播广泛有关, 尤其是HBV、HCV的感染, 病毒性肝炎与HCC的发生密切相关. 所以, 防治HCC是医学工作者们面临的一项重要任务. 如果能够较早的发现并确定诊断HCC, 及早进行治疗, 那样将会极大地提高生存率. 可是目前所发现的与HCC有关的生物标志物虽然很多, 但尚无一种生物标志物能够独立确诊所有的HCC, 而且这些生物标志物之间不能起到关联互补的作用, 这就给防治HCC的工作带来了极大的困难. 因此应该有效地利用已知的HCC生物标志物, 并不断地深入研究探索新的HCC生物标志物, 从而有效地对HCC做到早期发现, 早期诊断, 早期治疗, 并做好预后评估, 防治复发.

## 3 参考文献

- 1 Yuen MF, Lai CL. Serological markers of liver cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:91-99
- 2 Kew MC. Hepatocellular cancer. A century of progress. *Clin Liver Dis* 2000;4:257-268
- 3 Hirakawa H, Nawata S, Sueoka K, Murakami A, Takeda O, Numa F, Kato H, Sugino N. Regulation of squamous cell carcinoma antigen production by E-cadherin mediated cell

cell adhesion in squamous cell carcinoma cell line. *Oncol Rep* 2004;11:415-419

- 4 Uemura Y, Pak SC, Luke C, Cataltepe S, Tsu C, Schick C, Kamachi Y, Pomeroy SL, Perlmutter DH, Silverman GA. Circulating serpin tumor markers SCCA1 and SCCA2 are not actively secreted but reside in the cytosol of squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 2000;89:368-377
- 5 Suminami Y, Nagashima S, Murakami A, Nawata S, Gondo T, Hirakawa H, Numa F, Silverman GA, Kato H. Suppression of a squamous cell carcinoma (SCC)-related serpin, SCC Antigen, inhibits tumor growth with increased intratumor infiltration of natural killer cells. *Cancer Res* 2001;61:1176-1180
- 6 Pontisso P, Calabrese F, Benvegna L, Lise M, Belluco C, Ruvoletto MG, Marino M, Valente M, Nitti D, Gatta A, Fassina G. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2004;90:833-837
- 7 Beneduce L, Castaldi F, Marino M, Quarta S, Ruvoletto M, Benvegna L, Calabrese F, Gatta A, Pontisso P, Fassina G. Squamous Cell Carcinoma Antigen- Immunoglobulin M Complexes as Novel Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma. *Cancer* 2005;103:2558-2565
- 8 Giannelli G, Marinosci F, Sgarra C, Lupo L, Dentico P, Antonaci S. Clinical role of tissue and serum levels of SCCA antigen in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2005;116:579-583
- 9 Abelev GI. Production of embryonal serum alpha-globulin by hepatomas: review of experimental and clinical data. *Cancer Res* 1968;28:1344-1350
- 10 Gupta S, Bent S, Kohlwe J. Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. A systematic review and critical analysis. *Ann Intern Med* 2003;139:46-50
- 11 Tangkijvanich P. Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: analysis based on serum alpha-fetoprotein levels. *J Clin Gastroenterol* 2000;31:302-308
- 12 Yuen MF, Cheng CC, Lauder IJ, Lam SK, Ooi CG, Lai CL. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience. *Hepatology* 2000;31:330-335
- 13 Yuen MF, Lai CL. Screening for hepatocellular carcinoma: survival benefit and cost-effectiveness. *Ann Oncol* 2003;14:1463-1467
- 14 Sherman M. Alphafetoprotein: an obituary. *J Hepatol* 2001;34:603-605
- 15 He YM, Wang XY, Gao SD, Yu LY, Lin XD, Lin LW. Ultrasound-guided fine needle biopsy of intrahepatic nodules and low elevation of AFP in early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005;4:50-54
- 16 Gotoh M, Nakatani T, Masuda T, Mizuguchi Y, Sakamoto M, Tsuchiya R, Kato H, Furuta K. Prediction of invasive activities in hepatocellular carcinomas with special reference to alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxyprothrombin. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:522-526
- 17 Koike Y, Shiratori Y, Sato S, Obi S, Teratani T, Imamura M, Yoshida H, Shiina S, Omata M. Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients. *Cancer* 2001;91:561-569
- 18 Johnson PJ, Poon TC, Hjelm NM, Ho CS, Blake C, Ho SK. Structures of disease-specific serum alpha-fetoprotein isoforms. *Br J Cancer* 2000;83:1330-1337
- 19 Poon TC, Mok TS, Chan AT, Chan CM, Leong V, Tsui SH, Leung TW, Wong HT, Ho SK, Johnson PJ. Quantification and utility of monosialylated alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma with nondiagnostic serum total alpha-fetoprotein. *Clin Chem* 2002;48:1021-1027
- 20 Yoshida S, Kurokohchi K, Arima K, Masaki T, Hosomi N, Funaki T, Murota M, Kita Y, Watanabe S, Kuriyama S. Clinical significance of lens culinaris agglutinin-reactive fraction

- of serum alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002;20:305-309
- 21 Khien VV, Mao HV, Chinh TT, Ha PT, Bang MH, Lac BV, Hop TV, Tuan NA, Don LV, Taketa K, Satomura S. Clinical evaluation of lentil lectin-reactive alpha-fetoprotein-L3 in histology-proven hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Markers* 2001;16:105-111
- 22 Li D, Mallory T, Satomura S. AFP-L3 a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin chim Acta* 2001;313:15-19
- 23 Tada T, Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kitabatake S, Kuzuya T, Nonogaki K, Shimizu J, Yamaguchi A, Isogai M, Kaneoka Y, Washizu J, Satomura S. Relationship between Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and pathologic features of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2005;25:848-853
- 24 Song BC, Suh DJ, Yang SH, Lee HC, Chung YH, Sung KB, Lee YS. Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein as a prognostic marker in patients with hepatocellular carcinoma undergoing transcatheter arterial chemoembolization. *J Clin Gastroenterol* 2002;35:398-402
- 25 Cillo U, Navaglia F, Vitale A, Molari A, Basso D, Bassanello M, Brolese A, Zanusi G, Montin U, D'Amico F, Ciarleglio FA, Carraro A, Brida A, Burra P, Carraro P, Plebani M, D'Amico DF. Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA in blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2004;347:129-138
- 26 Jeng KS, Sheen IS, Tsai YC. Circulating messenger RNA of alpha-fetoprotein: a possible risk factor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 2004;139:1055-1060
- 27 Ijichi M, Takayama T, Matsumura M, Shiratori Y, Omata M, Makuuchi M. alpha-Fetoprotein mRNA in the circulation as a predictor of postsurgical recurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Hepatology* 2002;35:853-860
- 28 Giardina MG, Matarazzo M, Morante R, Lucariello A, Varriale A, Guardasole V, De Marco G. Serum alpha-L-fucosidase activity and early detection of hepatocellular carcinoma: a prospective study of patients with cirrhosis. *Cancer* 1998;83:2468-2474
- 29 Wang JJ, Cao EH. Rapid kinetic rate assay of the serum alpha-L-fucosidase in patients with hepatocellular carcinoma by using a novel substrate. *Clin Chim Acta* 2004;347:103-109
- 30 Rebhandl W, Handisurya A, Memaran N, Felberbauer FX, Aberle J, Paya K, Strobl B, Horcher E. Expression of cytokeratin-18-related tissue polypeptide-specific (TPS) antigen in Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol* 2001;37:357-364
- 31 Yao WJ, Chang TT, Wang ST, Chow NH, Lin PW, Chang YC, Tu DG, Chiu NT. Clinicopathologic correlation of serum tissue polypeptide specific antigen in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2001;61:64-70
- 32 Kimbi GC, Kew MC, Yu MC, Arakawa K, Hodgkinson J. 249p53 mutation in the serum of black southern African patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1185-1190
- 33 Alves VA, Nita ME, Carrilho FJ, Ono-Nita SK, Wakamatsu A, Leirbach DM, de Carvalho MF, de Mello ES, Gayotto LC, da Silva LC. P53 Immunostaining pattern in Brazilian patients with hepatocellular carcinoma. *Rev Inst Med trop Sao Paulo* 2004;46:25-31
- 34 Shimada M, Yonemura Y, Ijichi H, Harada N, Shiotani S, Ninomiya M, Terashi T, Yoshizumi T, Soejima Y, Maehara Y. Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a special reference to a preoperative des-gamma-carboxy prothrombin value. *Transplant Proc* 2005;37:1177-1179
- 35 Ishii M, Gama H, Chida N, Ueno Y, Shinzawa H, Takagi T, Toyota T, Takahashi T, Kasukawa R. Simultaneous measurements of serum alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence for detecting hepatocellular carcinoma. South Tohoku District Study Group. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1036-1040
- 36 袁联文, 唐伟, 李永国. 脱- $\gamma$ -羧基凝血酶原: 一种有用的血清肝癌标志物. *中华普通外科杂志* 2004;19:506
- 37 Fujiyama S, Tanaka M, Maeda S, Ashihara H, Hirata R, Tomita K. Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2002;62:57-63
- 38 Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, Lok AS. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology* 2003;37:1114-1121
- 39 Shimauchi Y, Tanaka M, Kuromatsu R, Ogata R, Tateishi Y, Itano S, Ono N, Yutani S, Nagamatsu H, Matsugaki S, Yamasaki S, Tanikawa K, Sata M. A simultaneous monitoring of Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin as an early diagnosis of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients. *Oncol Rep* 2000;7:249-256
- 40 Filmus J, Selleck SB. Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest* 2001;108:497-501
- 41 Capurro MI, Xiang YY, Lobe C, Filmus J. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res* 2005;65:6245-6254
- 42 Zhu ZW, Friess H, Wang L, Abou-Shady M, Zimmermann A, Lander AD, Korc M, Kleeff J, Buchler MW. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. *Gut* 2001;48:558-564
- 43 Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, Ashihara H, Katagiri T, Furukawa Y, Fujiyama S, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:16-25
- 44 Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, Bae HI, Kim JC, Kim M. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2003;94:259-262
- 45 Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003;125:89-97
- 46 Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. *Cancer Res* 1997;57:5179-5184
- 47 Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003;125:89-97
- 48 Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, Ashihara H, Katagiri T, Furukawa Y, Fujiyama S, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:16-25
- 49 Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, Ohashi KI, Midorikawa Y, Morishita Y, Niki T, Shibahara J, Mori M, Makuuchi M, Hippo Y, Kodama T, Iwanari H, Aburatani H, Fukayama M. The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2005;13
- 50 Yao DF, Huang ZW, Chen SZ, Huang JF, Lu JX, Xiao MB, Meng XY. Diagnosis of hepatocellular carcinoma by quantitative detection of hepatoma-specific bands of serum gamma-glutamyltransferase. *Am J Clin Pathol* 1998;110:743-749
- 51 Yao DF, Dong ZZ, Yao DB, Wu XH, Wu W, Qiu LW, Wang HM, Meng XY. Abnormal expression of hepatoma-derived gamma-glutamyltransferase subtyping and its early alteration for carcinogenesis of hepatocytes. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:564-570
- 52 Imura S, Miyake H, Izumi K, Tashiro S, Uehara H. Correlation

- of vascular endothelial cell proliferation with microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in hepatocellular carcinoma. *J Med Invest* 2004;51:202-209
- 53 Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, Namisaki T, Kitade M, Yamazaki M, Uemura M, Fukui H. Different cascades in the signaling pathway of two vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors for the VEGF-mediated murine hepatocellular carcinoma development. *Oncol Rep* 2005;13:853-857
  - 54 Uematsu S, Higashi T, Nouse K, Kariyama K, Nakamura S, Suzuki M, Nakatsukasa H, Kobayashi Y, Hanafusa T, Tsuji T, Shiratori Y. Altered expression of vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2 and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:583-588
  - 55 Kanematsu M, Osada S, Amaoka N, Goshima S, Kondo H, Kato H, Nishibori H, Yokoyama R, Hoshi H, Moriyama N. Expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and the surrounding liver and correlation with MRI findings. *AJR Am J Roentgenol* 2005;184:832-841
  - 56 Kanematsu M, Osada S, Amaoka N, Goshima S, Kondo H, Nishibori H, Kato H, Matsuo M, Yokoyama R, Hoshi H, Moriyama N. Expression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and the surrounding liver: correlation with angiographically assisted CT. *AJR Am J Roentgenol* 2004;183:1585-1593
  - 57 Song BC, Chung YH, Kim JA, Choi WB, Suh DD, Pyo SI, Shin JW, Lee HC, Lee YS, Suh DJ. Transforming growth factor-beta1 as a useful serologic marker of small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:175-180
  - 58 Ali MA, Koura BA, el-Mashad N, Zaghloul MH. The Bcl-2 and TGF-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Egypt J Immunol* 2004;11:83-90
  - 59 Trougakos IP, Gonos ES. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1430-1448
  - 60 Poon S, Easterbrook-Smith SB, Rybchyn MS, Carver JA, Wilson MR. Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry* 2000;39:15953-15960
  - 61 Redondo M, Villar E, Torres-Munoz J, Tellez T, Morell M, Petito CK. Over-expression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 2000;157:393-399
  - 62 Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S, Hara I. Over expression of clusterin is an independent prognostic factor for nonpapillary renal cell carcinoma. *J Urol* 2002;167:703-706
  - 63 Miyake H, Gleave M, Kamidono S, Hara I. Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence. *Urology* 2002;59: 150-154
  - 64 Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Mouri H, Ohtsubo K, Matsubara F, Sawabu N. Expression of clusterin in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2002;25:234-238
  - 65 Chen X, Halberg RB, Ehrhardt WM, Torrealba J, Dove WF. Clusterin as a biomarker in murine and human intestinal neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9530-9535
  - 66 Wellmann A, Thieblemont C, Pittaluga S, Sakai A, Jaffe ES, Siebert P, Raffeld M. Detection of differentially expressed genes in lymphomas using cDNA arrays: identification of clusterin as a new diagnostic marker for anaplastic large-cell lymphomas. *Blood* 2000;96:398-404
  - 67 Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli LG. Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* 2004;23:2298-2304
  - 68 Kang YK, Hong SW, Lee H, Kim WH. Overexpression of clusterin in human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2004;35:1340-1346
  - 69 Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Gleave ME. Acquisition of chemoresistant phenotype by overexpression of the antiapoptotic gene testosterone-repressed prostate message-2 in prostate cancer xenograft models. *Cancer Res* 2000;60:2547-2554
  - 70 Ni RZ, Huang JF, Xiao MB, Li M, Meng XY. Glycylproline dipeptidyl aminopeptidase isoenzyme in diagnosis of primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:710-713

电编 李琪 编辑 张海宁

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

## • 消息 •

## 2006年即将召开的国际会议

10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus  
February 22-25, 2006  
isde@sapmea.asn.au  
www.isde.net

Easl 2006 - The 41st Annual Meeting  
April 26-30, 2006

Canadian Digestive Disease Week Conference  
March 4-12, 2006  
www.cag-acg.org

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

World Congress on Gastrointestinal Cancer  
June 14-17, 2006  
c.chase@imedex.com

7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association  
September 3-7, 2006  
convention@edinburgh.org  
www.edinburgh.org/conference

Annual Postgraduate Course  
May 25-26, 2006  
www.asge.org/education

71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course  
October 20-25, 2006



# 肠黏膜免疫调节紊乱介导炎症性肠病的发生

王旭丹, 袁学勤

王旭丹, 北京中医药大学基础医学院 北京市 100029  
袁学勤, 中国医药研究开发中心有限公司 北京市 102206  
通讯作者: 王旭丹, 100029, 北京市北三环东路11号, 北京中医药大学基础医学院医学病原系. wangxd@bbn.cn  
电话: 010-64286972  
收稿日期: 2005-06-28 接受日期: 2005-07-06

## 摘要

肠黏膜免疫调节紊乱导致炎症性肠病的发生. 肠道共生的微生物抗原刺激肠黏膜T细胞, CD4<sup>+</sup>T细胞在IL-12的作用下分化为Th1, 形成IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 升高的Th1型黏膜炎症, 表现与Crohn病相似; CD4<sup>+</sup>T细胞或非典型NKT细胞活化后, 分泌IL-13, IL-4, IL-5, 形成Th2型黏膜炎症, 表现与溃疡性结肠炎相似. 调节性T细胞Th3, Tr1和CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞通过分泌TGF- $\beta$ 和IL-10等作用抑制肠黏膜免疫反应, 维持肠黏膜平衡.

王旭丹, 袁学勤. 肠黏膜免疫调节紊乱介导炎症性肠病的发生. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2257-2262  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2257.asp>

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因不明的慢性肠道炎症性疾病, 主要包含了两个独立的疾病, 溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克隆病(crohn's disease, CD), 二者在临床表现和病理特点上各不相同. 目前普遍认为IBD的产生主要来自于黏膜免疫、相关基因和环境因素, 其中免疫因素是IBD目前研究最活跃的领域. 采用自发的动物模型和基因工程动物模型及可诱导的动物模型为研究IBD的免疫机制的提供了重要的工具, 并取得大量有价值的研究成果.

## 1 肠道微生物来源的抗原性刺激

淋巴细胞异常活化参与了IBD的发生. 淋巴细胞的活化需要抗原, 越来越多的资料表明, 肠道微生物, 尤其是共生细菌承担了启动黏膜免疫细胞活化的抗原的角色. 人类肠道黏膜表面分布了大量的微生物, 这些微生物从人一出生就定居于此. 从某种意义上说, 这些共生的微生物可能已成为人体成分的一部分, 它们的某些抗原成分甚至能进入人体内环境, 并可能经过胸腺处理, 以至于等同于自身抗原<sup>[1]</sup>. 因此, 正常个体的血液和黏膜的单个核细胞对自身来源的微生物并不发生免疫应答, 但对其它个体肠道的微生物群则有反应, 即使是相同的品系的微生物也是这样<sup>[2]</sup>. 但IBD患者结肠黏膜的单个

核细胞在自身同源的肠道细菌刺激下也会发生增生, 症状缓解的患者则失去增生能力<sup>[3]</sup>. 多项证据证明了IBD的产生与肠道微生物密切相关. 如在普通饲养条件或无特定病原体条件下建立的动物结肠炎, 在无菌条件下不能建立<sup>[4]</sup>. 预先用抗生素处理可以减轻消炎痛结肠炎、DSS(dextran sulfate sodium, 硫酸葡聚糖钠)结肠炎、TNBS(trinitrobenzene sulfonic acid, 三硝基苯磺酸)结肠炎的肠道炎症反应; 如未经抗生素处理, TNBS在注入24 h后, 即可观察到动物结肠黏膜和黏膜下层有细菌入侵现象<sup>[5]</sup>. 研究表明, 虽然共生微生物中的厌氧菌较需氧菌产生更为严重的黏膜损害和炎症, 但共生的厌氧菌和需氧菌的复杂的共同作用为免疫性结肠炎症的产生提供了持续的抗原性刺激<sup>[6]</sup>.

究竟是何种抗原成分启动了肠道黏膜免疫反应一直为研究者所关注. 将肝螺杆菌(*Helicobacter hepaticus*)接种于无特定病原体的IL-10<sup>-/-</sup>小鼠中可诱导的盲肠和结肠炎, 与炎症相关的Th1细胞可与肝螺杆菌裂解液中的可溶性抗原SheLAg发生反应, 且SheLAg特异的CD4<sup>+</sup>T细胞的过继转移可导致肝螺杆菌感染的RAG<sup>-/-</sup>小鼠出现结肠炎, 但在没有感染肝螺杆菌的RAG<sup>-/-</sup>小鼠并不出现. 这些CD4<sup>+</sup>T细胞克隆中的其中一个识别肝螺杆菌中的一个718个氨基酸构成的鞭毛钩状蛋白, 其识别表位为VFEGGRASFNSDGSL, 这是迄今为止获得的第一份导致结肠炎的单一的细菌抗原成分<sup>[7]</sup>. 临床研究也得到了相似的结论<sup>[8]</sup>.

## 2 T淋巴细胞活化为效应细胞介导肠黏膜炎症

肠黏膜屏障功能的完整是维持肠黏膜正常功能的基础. 黏膜屏障功能的缺陷有利于微生物抗原进入肠黏膜固有层, 诱发异常的黏膜免疫应答. 例如, 预先用洗涤剂处理肠黏膜去除上皮磷脂层并减少肠黏膜的表面疏水性, 将增加DSS诱导的大鼠黏膜上皮的炎症损伤; 相反, 用表面活性脂局部处理则减少了DSS结肠炎的易感性, 并有效地保护上皮<sup>[9]</sup>. 效应T细胞的活化是肠黏膜免疫及其后续炎症的起点. 外周T细胞亚群中, 已明确CD4<sup>+</sup>T细胞是导致肠黏膜炎症的主要效应细胞, 因为到目前为止所研究的所有结肠炎模型中黏膜组织浸润中最主要的细胞类型即为CD4<sup>+</sup>T细胞; 而且在一些研究中, 体内删除CD4<sup>+</sup>T细胞, 炎症即好转<sup>[10]</sup>. CD4<sup>+</sup>T细胞的活化需要抗原特异性信号以及协同刺激信号. 抗原特异性信号涉及到数量庞大的肠道微生物抗原, 研究有一定的难度. 协

同刺激信号在炎症性肠病中的作用报道较多,如IBD中CD40和CD40L表达显著增强,并能促进IL-12和TNF- $\alpha$ 的释放<sup>[11]</sup>.

2.1 效应CD4<sup>+</sup>T细胞极化为Th1细胞介导的肠黏膜炎症  
CD4<sup>+</sup>T细胞获得充分的活化信号后,在IL-12存在的情况下极化为Th1并分泌IFN- $\gamma$ 介导肠黏膜炎症,此类结肠炎体内存在高水平的IFN- $\gamma$ ,IL-2等细胞因子,故为Th1型炎症.一般而言,CD的炎症特征在肉眼和光镜水平下与Th1介导的黏膜炎症模型相似.IL-12在Th极化为Th1中起到了关键作用.单核巨噬细胞针对细菌、细菌产物或寄生虫反应是IL-12的主要来源.如CD患者病灶原位巨噬细胞产生大量的IL-12,而UC患者则无此现象,且活化的CD4<sup>+</sup>T细胞主要分泌IFN- $\gamma$ ,但产生IL-4的T细胞很少<sup>[12,13]</sup>.与健康人比较,CD患者的炎症损伤处分离的巨噬细胞体外产生的IL-12增加<sup>[14]</sup>,而UC患者产生的IL-12则减少.IL-23是新发现的促进T细胞向Th1极化的细胞因子,由于IL-23与IL-12共用了一个亚单位p40,故二者之间具有相似的生物学作用,但在刺激Th1记忆细胞方面IL-23比IL-12更为有效,因此IL-23主要是起到维持Th1介导的炎症反应的作用<sup>[15]</sup>.最近发现IL-21也有助于CD患者的Th1反应的建立过程<sup>[16]</sup>.TNBS结肠炎是典型的Th1型肠黏膜炎症模型,其肠道中可观察到与CD的病理特点非常相似的炎性细胞在各层中浸润并伴有肉芽肿的特征.Neurath *et al*发现该模型中分离的巨噬细胞产生大量的IL-12,淋巴细胞产生大量的IFN- $\gamma$ 和IL-2.用抗IL-12抗体治疗就可完全阻断TNBS诱导的结肠炎的发生,或者使已建立模型的小鼠炎症损伤彻底地消失<sup>[17]</sup>.这一事实证明,TNBS结肠炎是由IL-12启动,T淋巴细胞分化为Th1细胞释放IFN- $\gamma$ 所介导.SCID过继转移结肠炎模型是另一种典型的Th1型肠黏膜炎症模型,将高表达CD45RB分子的CD4<sup>+</sup>T细胞(CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup>,初始T细胞)过继转移给SCID小鼠或Rag2<sup>-/-</sup>小鼠即可建立<sup>[18]</sup>.SCID结肠炎的T细胞反应也是由IL-12驱动,IFN- $\gamma$ 介导<sup>[19]</sup>.尽管CD45RB<sup>hi</sup>T细胞占据了SCID小鼠的小肠和大肠,但炎症仅局限于结肠,而且还发现在一个近乎无菌的环境中饲养的小鼠接受过继转移的细胞后炎症水平降低,这表明结肠中的微生物为黏膜炎症提供了抗原刺激<sup>[20]</sup>.

Th1发挥炎症作用是通过分泌IFN- $\gamma$ ,IL-2和TNF- $\beta$ 等细胞因子实现的.其中IFN- $\gamma$ 在Th1反应中起中心角色.Th1细胞过度产生IFN- $\gamma$ 的原因可能与T-bet和STAT4两个分子有关.T-bet是T-box蛋白,当其在T细胞上过度表达时,可使T细胞执行高水平的IFN- $\gamma$ 反应、较低IL-4反应<sup>[21]</sup>.即使在缺乏STAT-4的细胞中T-bet过度表达也能导致IFN- $\gamma$ 反应,该因子可能是Th1分化的分子开关. STAT4也是Th1分化的必需的因子,可能扮演IFN- $\gamma$ 转录因子以及维持Th1细胞生存因子的角色.TNP(TNBS半抗原的表位)偶联的KLH在正常小鼠上并未诱导出结肠

炎,但在STAT4的转基因小鼠则能诱导Th1型结肠炎,表明结肠炎与STAT4的异常表达相关;来自于这些小鼠的脾细胞体外与自身来源的微生物接触后增生,增生的T细胞转移到SCID小鼠上,可诱导结肠炎;初始但过度表达T-bet(通过表达T-bet的反转录病毒感染)的T细胞过继转移到SCID小鼠上,能诱导结肠炎加速建立<sup>[22]</sup>.CD患者也同样存在这两个分子的异常,如炎症组织中的T细胞的核提取物中的STAT4和T-bet含量显著增加,且组织中Th1细胞数量也显著增加的,因为这些T细胞表达Th1细胞的特征性受体IL-12R $\beta$ 2<sup>[23,24]</sup>.根据这些发现,CD患者炎症组织中T细胞产生大量的IFN- $\gamma$ ,但IL-4的产量降低也就不奇怪了.Th1细胞释放的IFN- $\gamma$ 能活化单核巨噬细胞,使之释放前炎性细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1参与炎症过程,其中TNF- $\alpha$ 直接参与了Th1炎症反应,这一推测已被TNF <sup>$\Delta$ ARE</sup>小鼠结肠炎模型所证实<sup>[25]</sup>.该模型与CD极为相似,其炎症很可能是由微生物的LPS诱导TNF- $\alpha$ 的产生并启动和维持.

虽然CD主要由Th1型免疫反应所介导,但也不是绝对的.新近的研究发现,SAMP1/YitFc小鼠自发性末端回肠炎的病理特点与CD相似,但炎症既有Th1细胞参与,也有Th2细胞参与.Th1细胞因子IFN- $\gamma$ 和TNF参与回肠炎的初始化,中和IFN- $\gamma$ 可干扰淋巴细胞扩增及有利于慢性炎症的终止;当进展为慢性回肠炎时,Th2型细胞因子IL-5和IL-13显著增加,封闭IL-4能显著改善回肠炎<sup>[26]</sup>.大量的IFN- $\gamma$ 产生可诱导吞噬细胞活化并释放前炎症因子,如IL-1、TNF- $\alpha$ 等.这些细胞因子活化血管内皮细胞血管黏附分子的上调,并募集白细胞和单核细胞进入黏膜固有层.活化的白细胞和单核细胞在局部的浸润并释放炎症介质,进一步放大了炎症并导致组织损伤.多种生物活性物质如蛋白酶、PAF、NO、前列腺素、反应性氧中介物等对组织的损伤负有责任<sup>[27]</sup>.图1中我们对CD的主要发病机制进行了简单的归纳.

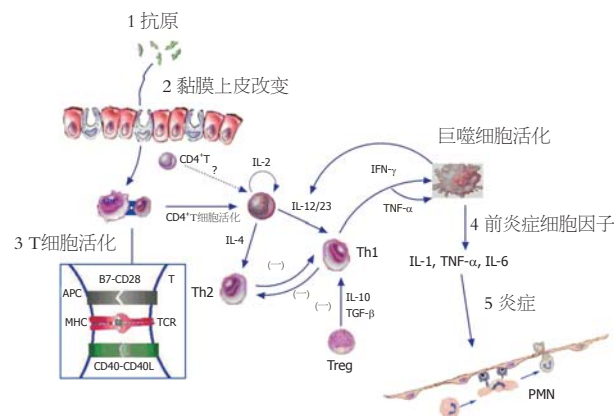


图1 CD的发病机制.

## 2.2 效应CD4<sup>+</sup>T细胞极化为Th2细胞介导的肠黏膜炎



症 Th2细胞介导的结肠炎具有多种表现形式, 其炎症类型与Th1结肠炎不同, 与CD比较更像是UC. 因此推测UC是Th2细胞介导的疾病, 但支持这一观点的证据并不充分. 虽然UC中IL-12/IFN- $\gamma$ 量并未增加, 但Th2特征性细胞因子IL-4也没有增加, 且损伤组织中的炎症也并不像常见的以嗜酸性粒细胞浸润为主要特征的Th2型炎症. 事实上, 唯一被报道增加的Th2型的细胞因子是IL-5<sup>[28, 12, 13]</sup>. 当然, 尚有其它的一些证据认为UC是Th2介导的肠道炎症性疾病: (1)在UC患者比CD患者体内存在更多的自身抗体, 如抗中性粒细胞胞质抗体(pANCA)和抗原肌球蛋白抗体, Th2细胞能为B细胞活化并分化为浆细胞和产生抗体提供更大的帮助; (2)UC中增加的自身抗体主要为与Th2相关的抗体类型, 如Ig G1和Ig G4; (3)EB病毒诱导的基因3(EBI3)编码的产物现在被鉴定为Th2型细胞因子, 这种细胞因子在UC中而不是在CD中增加<sup>[29]</sup>. 尽管UC的组织学表现与Th2细胞介导的实验性结肠炎密切相关, 但目前把UC归纳为Th2型疾病似乎还不成熟. 实验性结肠炎表现为Th2型的主要有TCR- $\alpha$ 缺陷小鼠结肠炎和恶唑酮(oxazolone)诱导的结肠炎. TCR- $\alpha$ 链缺乏的小鼠结肠炎模型是目前研究的最好的Th2介导的炎症模型, 其炎症损伤相对表浅, 偶尔会扩展到黏膜下层. 组织学表现为隐窝延长、变形, 偶见隐窝脓肿, 很少出现透壁性的裂隙和肉芽肿, 故与UC相似; 且模型小鼠循环中能检测到pANCA及其他自身抗体<sup>[30]</sup>. 由于TCR- $\alpha$ 链缺失, 故此模型小鼠的T细胞亚群主要是 $\gamma\delta$ TCR的T细胞, 也混杂了少量的 $\beta\beta$ TCR的T细胞, 后来证实 $\beta\beta$ TCR的T细胞是导致炎症的效应细胞<sup>[31]</sup>, 该模型的效应细胞因子是IL-4而不是IFN- $\gamma$ <sup>[32]</sup>.

半抗原恶唑酮可在SJL/J小鼠中诱导出类似UC的实验性结肠炎, 炎症位于远端结肠, 伴有溃疡<sup>[33]</sup>. 刺激炎症组织中CD4<sup>+</sup>T细胞能产生大量的IL-4和IL-5, 但IFN- $\gamma$ 正常或者减少; 抗IL-4治疗能显著缓解疾病, 而抗IL-12治疗无效或者恶化. 研究发现非典型NKT细胞在恶唑酮结肠炎扮演重要角色: 恶唑酮与非典型的MHC I类分子CD1d的结合后递呈给NKT细胞, 导致NKT应答并分泌IL-13, 中和IL-13可阻断结肠炎. 因此, 恶唑酮结肠炎可能是NK-T活化并分泌的IL-13启动非典型的Th2反应, 进而导致黏膜炎症<sup>[34]</sup>. 在UC患者中存在类似情况, 非典型的NKT细胞在抗-CD2/抗-CD28抗体刺激下或者转染表达CD1d的B细胞刺激下可产生了大量的IL-13, 并对HT-29系上皮细胞具有细胞毒作用; IL-13能促进此细胞毒作用. 因此, 研究者推测UC的发生可能是表达CD1d的树突状细胞和上皮细胞递呈抗原给NKT细胞, NKT细胞活化后分泌IL-13并开始溶解上皮细胞, 导致上皮细胞减少、溃疡以及上皮屏障出现裂口; 此后, 肠道微生物进入固有层以及IL-13诱导趋化因子产生导致后续的更为严重的炎症反应(图2)<sup>[35]</sup>.

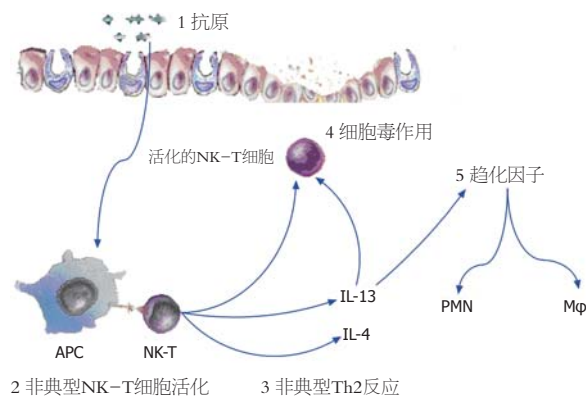


图2 UC可能的发病机制图.

### 3 T效应细胞和调节细胞在维持肠黏膜稳定中的作用

3.1 效应细胞的自我调节防止免疫反应扩大化 炎症效应T细胞活化后, 表面开始表达CTLA-4和PD-1等分子并向胞内传递抑制信号, 防止免疫细胞的过度活化. 例如在UC和CD患者的病变结肠中发现PD-1在T细胞上的表达显著增加; SCID过继转移小鼠结肠炎模型中, PD-1阳性的细胞在炎症结肠黏膜也比对照组显著增加<sup>[36]</sup>. 凋亡也是效应细胞重要的转归, 但IBD患者往往存在凋亡的障碍. 例如, 虽然IBD的肠道炎症中的固有层T细胞上Fas的表达并不比对照低, 但能抵抗Fas诱导凋亡, 其原因可能与IL-6、IL-12和TNF- $\alpha$ 等细胞因子有助于T细胞直接抵抗凋亡相关<sup>[37, 38]</sup>, 因为在小鼠结肠炎中使用IL-12, TNF- $\alpha$ 以及IL-6受体的抗体处理可诱导T细胞凋亡<sup>[39-41]</sup>. 临床也观察到抗TNF- $\alpha$ 抗体治疗可抑制CD的疾病活动<sup>[42]</sup>, 这是抗体诱导肠道中T细胞凋亡的结果<sup>[43]</sup>.

3.2 调节性细胞是肠道和平的监护者 正常的肠黏膜中效应细胞和调节细胞处在动态平衡状态, 保持肠黏膜免疫系统稳定. 如果效应细胞的作用远远超过调节性细胞, 或者是调节性细胞不足, 均可打破二者平衡, 导致肠黏膜炎症. 越来越多的证据表明调节性细胞可通过直接接触、释放细胞因子达到抑制免疫反应的作用. 如在研究口服诱导耐受的过程中发现的Th3细胞可通过分泌的TGF- $\beta$ 在黏膜免疫中承担调节作用<sup>[44]</sup>. TGF- $\beta$ 具有广泛的抗炎作用, 能抑制Th1和Th2细胞的活化, 是自身免疫调节的重要因素. 另一种调节型T细胞Tr1可分泌高水平的IL-10、低水平的IL-2, 不产生IL-4, 增生能力很弱<sup>[45]</sup>. 肠道内环境的稳定需要Tr1, 当肠道病原体被清除后, Tr1可通过IL-10下调炎症反应, 如Tr1细胞可抑制SCID小鼠建立过继性结肠炎<sup>[46, 47]</sup>. 最近鉴定出的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T调节细胞是目前研究的热点. 胸腺来源的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T调节型T细胞对于维持自身耐受极为必要. 骨髓转移Tg $\epsilon$ 26小鼠(BM $\rightarrow$ Tg $\epsilon$ 26)所建立的结肠炎模型中, 肠系膜淋巴结中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞减少, 其原因可能是胸腺异常所致. 正常小鼠的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞转移到BM $\rightarrow$ Tg $\epsilon$ 26小鼠可使肠系膜淋巴结中的T细胞数和功能正常,



并阻止了结肠炎的发生<sup>[48]</sup>。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞发挥抑制作用需要细胞间的接触。大部分CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞以TGF- $\beta$ 蛋白前体形式产生细胞表面的TGF- $\beta$ ，表面TGF- $\beta$ 可通过细胞间的接触介导抑制作用；但如果刺激信号强烈，也可分泌TGF- $\beta$ 和IL-10发挥作用<sup>[49]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞也利用CTLA-4信号<sup>[50]</sup>、GITR信号<sup>[51]</sup>介导的免疫抑制效应。此外，CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节型T细胞体内也可以调控树突状细胞的活化达到免疫抑制效应<sup>[50]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节型T细胞在SCID小鼠结肠模型的MLN和炎性结肠中增生，它们定居于CD11c<sup>+</sup>细胞和病理性T细胞之间，与这些细胞均有广泛联系，这有利于调节作用的发挥<sup>[52]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节型T细胞对SCID小鼠结肠炎的抑制作用并非是抑制病理性T细胞实现的，似乎是诱导了效应T细胞的灭活状态、或潜在性诱导Th2效应，因为当移除调节型T细胞后，效应T细胞体外同样对刺激有反应，分泌的IFN- $\gamma$ 也同样多<sup>[53]</sup>。小鼠CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞选择性表达建立T细胞抑制效应的关键因子FoxP3<sup>[54]</sup>。FoxP3参与X伴随的隐性染色体病IPEX，这是一种自身免疫性和炎症性的肠病。小鼠的FoxP3只在CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节型T细胞上表达，在活化的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞上并不被诱导，但用反转录病毒引入FoxP3后，天然的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞可以转化为调节型T细胞，因此FoxP3是小鼠CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞建立所必须的。人类CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节型T细胞也表达FoxP3，CD25<sup>+</sup>T细胞并不表达<sup>[55]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>作为调节型T细胞与他们表达FoxP3是分不开的。

此外，肠黏膜上皮层独有的CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>的双阳性T细胞(TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>)以IL-10依赖的方式抑制Th1T细胞被动转移给RAG-1/-小鼠所诱导的结肠黏膜炎症<sup>[56]</sup>； $\gamma\delta$ T细胞分泌角质细胞生长因子(KGF)促进DSS结肠炎损伤的上皮细胞恢复完整性<sup>[57]</sup>，还可通过促进中性粒细胞增生并迁移到黏膜，以拮抗单个核细胞在炎症部位的浸润，因为单个核细胞在黏膜的浸润所导致的炎症往往更加严重和致命<sup>[58]</sup>；典型的NKT细胞以CD1d限制性方式活化，活化后调节肠道炎症<sup>[59]</sup>，其调节机制可能与调整了肠道黏膜Th1/Th2反应，使之保持平衡有关<sup>[60]</sup>；B细胞<sup>[61]</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞<sup>[62,63]</sup>中某些亚群也参与了肠黏膜免疫的调节。

总之，虽然对炎症性肠病的免疫机制已经有了广泛而深入地了解，但大量而有趣的研究来自于动物模型，与人类IBD毕竟不能完全等同。因此，人类IBD的研究尚需进一步加强。在今后的研究中，仍有很多问题亟待解决。如病理性抗原的寻找和鉴定，调节性T细胞的分类、功能和作用机制，个体遗传与黏膜免疫反应关系等。但从目前已知的成果中，我们也能够得到一些治疗IBD的有益启示。如调节Th1/Th2平衡，采用肠道内鞭毛寄生虫感染治疗CD短期安全而又有效，其治疗机制可能是通过寄生虫感染诱导体内出现强烈的Th2反应，从而抑制CD患者的Th1免疫效应<sup>[64]</sup>；再如阻断效应T细胞活

化或增强调节性细胞功能，以维持肠道中效应细胞与调节细胞间的平衡，采用IL-12p40-IgG2b融合蛋白拮抗IL-12信号显著改善TNBS诱导的结肠炎，并抑制CD患者固有层单个核细胞增生和释放IFN- $\gamma$ 、促进其凋亡<sup>[65]</sup>。

#### 4 参考文献

- Karlsson MR, Kahu H, Hanson LA, Telemo E, Dahlgren UI. Neonatal colonization of rats induces immunological tolerance to bacterial antigens. *Eur J Immunol* 1999;29:109-118
- Duchmann R, Neurath MF, Meyer zum Buschenfelde KH. Responses to self and non-self intestinal microflora in health and inflammatory bowel disease. *Res Immunol* 1997;148:589-594
- Panes J. Inflammatory bowel disease: pathogenesis and targets for therapeutic interventions. *Acta Physiol Scand* 2001;173:159-165
- Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994;180:2359-2364
- Guarner F, Malagelada JR. Role of bacteria in experimental colitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:793-804
- Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Scholmerich J, Sartor RB. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 2001;69:2277-2285
- Kullberg MC, Andersen JF, Gorelick PL, Caspar P, Suerbaum S, Fox JG, Cheever AW, Jankovic D, Sher A. Induction of colitis by a CD4<sup>+</sup>T cell clone specific for a bacterial epitope. *PNAS* 2003;100:15830-15835
- Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M, Hershberg RM. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 2004;113:1296-1306
- Lugea A, Salas A, Casatol J, Guarner F, Malagelada JR. Surface hydrophobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins. *Gut* 2000;46:515-521
- Okamoto S, Watanabe M, Yamazaki M, Yajima T, Hayashi T, Ishii H, Mukai M, Yamada T, Watanabe N, Jameson BA, Hibi T. A synthetic mimetic of CD4 is able to suppress disease in rodent model of immune colitis. *Eur J Immunol* 1999;29:355-366
- Danese S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L co-stimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53:1035-1043
- Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzo F, Pallone F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997;112:1169-1178
- Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 2002;50:60-64
- Liu Z, Colpaert S, D'Haens GR, Kasran A, de Boer M, Rutgeerts P, Geboes K, Ceuppens JL. Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production. *J Immunol* 1999;163:4049-4057
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu YJ, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13:715-725
- Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, Caruso R, Tersigni R, Alessandrini L, Biancone L, Naccari GC, Macdonald TT, Pallone F. Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon- $\gamma$  production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128:687-694

- 17 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995;182:1281-1290
- 18 Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD. CD4<sup>+</sup> T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 1993;178:237-244
- 19 de Winter H, Cheroutre H, Kronenberg M. Mucosal immunity and inflammation II. The yin and yang of T cells in intestinal inflammation: pathogenic and protective roles in a mouse colitis model. *Am J Physiol* 1999;276:G1317-1321
- 20 Aranda R, Sydora BC, McAllister PL, Binder SW, Yang HY, Targan SR, Kronenberg M. Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4<sup>+</sup>, CD45RB<sup>high</sup> T cells to SCID recipients. *J Immunol* 1997;158:3464-3473
- 21 Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100:665-669
- 22 Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002;20:495-549
- 23 Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, Iijima H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Mudter J, Galle PR, Bhan A, Autschbach F, Sullivan BM, Szabo SJ, Glimcher LH, Blumberg RS. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 2002;195:1129-1143
- 24 Parrello T, Monteleone G, Cucchiara S, Monteleone I, Sebkova L, Doldo P, Luzzza F, Pallone F. Up-regulation of the IL-12 receptor  $\beta$ 2 chain in Crohn's disease. *J Immunol* 2000;165:7234-7239
- 25 Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro T, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 1999;10:387-398
- 26 Bamias G, Martin III C, Mishina M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Marini M, Cominelli F. Proinflammatory effects of T<sub>H</sub>2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005;128:654-666
- 27 Blumberg RS, Strober W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *Jama* 2001;285:643-647
- 28 Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4<sup>+</sup> lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- $\gamma$ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-1270
- 29 Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev* 2003;3:521-533
- 30 Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, Spiekermann GM, Tonegawa S, Nagler-Anderson C, Bhan AK. Cytokine imbalance and autoantibody production in T cell receptor- $\alpha$  mutant mice with inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 1996;183:847-856
- 31 Iijima H, Takahashi I, Kishi D, Kim JK, Kawano S, Hori M, Kiyono H. Alteration of interleukin 4 production results in the inhibition of T helper type 2 cell-dominated inflammatory bowel disease in T cell receptor  $\alpha$  chain-deficient mice. *J Exp Med* 1999;190:607-615
- 32 Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK. The critical role of interleukin-4 but not interferon gamma in the pathogenesis of colitis in T-cell receptor  $\alpha$  mutant mice. *Gastroenterology* 1999;116:320-326
- 33 Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998;188:1929-1939
- 34 Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis E, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002;17:629-638
- 35 Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004;113:1490-1497
- 36 Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Makita S, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Machida U, Iwai H, Azuma M, Chen L, Watanabe M. Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 2003;171:4156-4163
- 37 Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Strober W. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 1999;116:557-565
- 38 Kollias G, Kontoyiannis D. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:315-321
- 39 Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ito H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol* 2000;164:4878-4882
- 40 Mudter J, Wirtz S, Galle PR, Neurath MF. A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive cell transfer of CD62L+CD4+T cells: insights into the regulatory role of IL-6 on apoptosis. *Pathobiology* 2002;70:170-176
- 41 Fuss IJ, Marth T, Neurath MF, Pearlstein GR, Jain A, Strober W. Anti-interleukin 12 treatment regulates apoptosis of Th1 T cells in experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 1999;117:1078-1088
- 42 van Deventer SJ. Anti-tumour necrosis factor therapy in Crohn's disease: where are we now? *Gut* 2002;51:362-363
- 43 ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJH. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002;50:206-211
- 44 Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- $\beta$ -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182:207-214
- 45 Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordinon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182:68-79
- 46 Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-742
- 47 Cong Y, Weaver CT, Lazenby A, Elson CO. Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. *J Immunol* 2002;169:6112-6119
- 48 Veltkamp C, Sartor RB, Giese T, Autschbach F, Kaden I, Veltkamp R, Rost D, Kallinowski B, Stremmel W. Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells reverse imbalances in the T cell pool of bone marrow transplanted TGE26 mice leading to the prevention of colitis. *Gut* 2005;54:207-214
- 49 Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . *J Exp Med* 2001;194:629-644
- 50 Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295-302
- 51 Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3:135-142
- 52 Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: Cure of colitis by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2003;170:3939-3943
- 53 Martin B, Banz A, Bienvenu B, Cordier C, Dautigny N, Becourt C, Lucas B. Suppression of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte effector functions by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cell in vivo. *J Immunol* 2004;172:3391-3398

- 54 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336
- 55 Walker MR, Kasprlowicz DJ, Gersuk VH, Bènard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Clin Invest* 2003;112:1437-1443
- 56 Das G, Augustine MM, Das J, Bottomly K, Ray P, Ray A. An important regulatory role for CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha\alpha$  T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease. *Pnas* 2003;100:5324-5329
- 57 Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells. *Pnas* 2002;99:14338-14343
- 58 Tsuchiya T, Fukuda S, Hamada H, Nakamura A, Kohama Y, Ishikawa H, Tsujikawa K, Yamamoto H. Role of  $\gamma\delta$  T cells in the inflammatory response of experimental colitis mice. *J Immunol* 2003;171:5507-5513
- 59 Saubermann LJ, Beck P, De Jong YP, Pitman RS, Ryan MS, Kim HS, Exley M, Snapper S, Balk SP, Hagen SJ, Kanauchi O, Moto-ki K, Sakai T, Terhorst C, Koezuka Y, Podolsky DK, Blumberg RS. Activation of natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology* 2000;119:119-128
- 60 Ueno Y, Tanaka S, Sumii M, Miyake S, Tazuma S, Taniguchi M, Yamamura T, Chayama K. Single Dose of OCH improves mucosal T helper type 1/T helper type 2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of V  $\alpha$  14 natural killer T cells in mice. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:35-41
- 61 Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK. Immune networks in animal models of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:246-259
- 62 Allez M, Brimnes J, Dotan I, Mayer L. Expansion of CD8<sup>+</sup> T cells with regulatory function with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2002;123:1516-1526
- 63 Poussier P, Ning T, Banerjee D, Julius M. A unique subset of self-specific intraintestinal T cells maintains gut integrity. *J Exp Med* 2002;195:1491-1497
- 64 GL Radford-Smith. Will worms really cure Crohn's disease? *Gut* 2005;54:6-8
- 65 Stallmach A, Marth T, Weiß B, Wittig BM, Hombach A, Schmidt C, Neurath M, Zeitz M, Zeuzem S, Abken H. An interleukin 12 p40-IgG2b fusion protein abrogates T cell mediated inflammation:anti-inflammatory activity in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. *Gut* 2004;53:339-345

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 消息 •

## 消化道肿瘤外科治疗 2006 高级论坛征文通知

本刊讯 《中华胃肠外科杂志》与浙江省人民医院定于 2006-04-21/25 在杭州共同举办“消化道肿瘤外科治疗专题”高级论坛，主要探讨消化道肿瘤手术治疗的有关问题，包括不同术式的选择手术的规范化问题、腹腔镜下进行各种手术的选择及相关问题。为活跃学术论坛，促进消化道肿瘤外科治疗的发展，特向广大普外科工作者征稿。

### 1 会议具体内容

论坛的具体内容包括：(1) 肝移植手术适应证及相关问题（黄洁夫主讲）；肝胆系统肿瘤手术的选择（郑树森主讲）；(3) 消化系统肿瘤的综合治疗（樊代明主讲）；(4) 胰腺肿瘤外科治疗进展（赵玉沛主讲）；(5) 胃癌的根治性手术（詹文华主讲）；(6) 腹腔镜下的胃癌根治术（余佩武主讲）；(7) 胃癌腹膜转移的外科治疗；（朱正纲主讲）；(8) 低位直肠癌的保肛手术（汪建平主讲）；(9) 腹腔镜下的结直肠癌手术（郑民华主讲）；(10) 规范的 TME 手术及相关问题（顾晋主讲）；胃癌外科治疗的新进展（叶再元主讲）。

### 2 征文要求

内容应与消化道肿瘤（以胃肠道为主）外科治疗有关。采用 word 文档格式，字数 3500 字符左右，摘要 500 字左右（宋体、小四号）。

### 3 文章投送形式

分两种：(1) 电子邮件投稿：将征文以附件形式提交，注明“消化道肿瘤外科治疗 2006 高级论坛”征文，文件名为会议名称加第一作者姓名；电子信箱：zhwcwk@21cn.com。(2) 邮寄：打印稿用 A4(附软盘)，软盘请注明研讨题目、作者。

### 4 联系地址及截稿

截稿日期：2006-01-31(以当地邮戳为准)。联系地址：广州市中山二路 58 号(510080)中山大学附属第一医院《中华胃肠外科杂志》编辑部一室，电话：020-87335945。



# sp600125 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响

唐文, 蒋明德, 李小安

唐文, 蒋明德, 李小安, 第三军医大学成都临床学院 成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083

全军十五医药卫生科研基金项目, No. 01MB037

通讯作者: 蒋明德, 610083, 四川省成都市成都军区总医院消化内科.

jiangmd88@yahoo.com.cn

电话: 028-86570346 传真: 028-86570346

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-08-05

Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats

Wen Tang, Ming-De Jiang, Xiao-An Li

Wen Tang, Ming-De Jiang, Xiao-An Li, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Supported by the Military Medicine Scientific Research Foundation during 10th Five-Year Plan Period, No. 01MB037

Correspondence to: Dr. Ming-De Jiang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. jiangmd88@yahoo.com.cn

Received: 2005-07-19 Accepted: 2005-08-05

## Abstract

**AIM:** To explore the effect of sp600125, a special inhibitor of c-Jun terminal kinase (JNK), on the acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells-T6 (HSC-T6) and the expression of Caspase-3 protein in rats.

**METHODS:** The rat HSC-T6 induced by acetaldehyde was treated with different doses of sp600125. The proliferation of HSC-T6 was evaluated by MTT colorimetric assay, and the morphological changes of HSC-T6 were observed by Hoechst 33258 staining. The apoptotic rate of HSC-T6 was analyzed by flow cytometry (FCM), and the expression of Caspase-3 protein was examined by SABC method.

**RESULTS:** The proliferation of HSC-T6 was inhibited by different doses of sp600125 ( $F = 102.53$ ,  $P < 0.01$ ). The apoptotic rate of HSC-T6 ( $F = 38.26$ ,  $P < 0.01$ ) and the expression of Caspase-3 protein ( $F = 38.26$ ,  $P < 0.01$ ) were significantly increased with the increasing of the sp600125 doses.

**CONCLUSION:** sp600125 can inhibit the proliferation

and accelerate the apoptosis of HSC-T6, which may be related to the increased expression of Caspase-3 protein.

**Key Words:** Liver fibrosis; Hepatic stellate cells; sp600125; Caspase-3

Tang W, Jiang MD, Li XA. Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2263-2265

## 摘要

**目的:** 探讨c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号传导通路特异阻断剂sp600125对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)凋亡以及Caspase-3蛋白表达的影响。

**方法:** 不同浓度sp600125对乙醛刺激的大鼠HSC-T6进行处理后, MTT比色法检测细胞增殖, 用Hoechst 33258染色来观察凋亡细胞的形态变化, FCM检测细胞凋亡率, SABC法检测Caspase-3蛋白表达。

**结果:** 不同浓度的sp600125能抑制HSC-T6增殖( $F = 102.53$ ,  $P < 0.01$ ), 诱导HSC-T6凋亡; 随着sp600125浓度增加, HSC-T6凋亡率逐渐增高( $F = 38.26$ ,  $P < 0.01$ ), HSC-T6细胞内Caspase-3蛋白阳性表达率也逐渐增高( $F = 38.26$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** 不同浓度sp600125能抑制HSC-T6增殖, 诱导HSC-T6凋亡, 这可能与促进Caspase-3蛋白表达有关。

**关键词:** 肝纤维化; 肝星状细胞; sp600125; Caspase-3

唐文, 蒋明德, 李小安. sp600125对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及Caspase-3蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(18):2263-2265

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2263.asp>

## 0 引言

目前认为肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活、增殖是肝纤维化发生的关键环节. 乙醛刺激的HSC激活、增殖是导致酒精性肝纤维化发生的关键因素<sup>[1,2]</sup>. 近年来研究表明<sup>[3]</sup>, MAPK (mitogen-activated protein kinase, 包括ERK、JNK、P38)是HSC激活、增殖并导致肝纤维化发生的主要信号传导通路之一, 其中, JNK信号传导通路参与了细胞增殖、分化以及凋亡的调控. 在我们既往对肝纤维化发病机制的研究中<sup>[4]</sup>,

已经用Western blot法证实, 乙醛刺激的HSC的p-JNK水平随sp600125 (JNK信号传导通路特异阻断剂) 浓度增加而减少, sp600125可以抑制HSC的增殖, 阻止肝纤维化的发生. 研究显示, JNK信号传导通路在细胞凋亡中起重要作用, HSC凋亡有利于阻止肝纤维化的发生, 但JNK信号传导通路在HSC凋亡过程中的作用机制尚不清楚, 我们拟用sp600125处理乙醛刺激的HSC-T6, 观察sp600125对HSC-T6凋亡以及Caspase-3蛋白表达的影响, 进一步探讨酒精性肝纤维化的发生机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 大鼠HSC-T6株(上海中医药大学肝病研究所); sp600125(美国Alexis公司); Caspase-3单克隆抗体、SABC试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); MTT(美国Amresco公司); Hoechst 33258试剂盒(碧云天生物技术公司); DAB试剂盒(北京中山生物技术有限公司); 小牛血清(成都哈里生物工程有限公司); DMEM培养基(美国Gibco公司).

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含100 mL/L小牛血清的DMEM培养基, 另添加适量的HEPES、抗生素; 37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>的孵箱中培养HSC-T6, 细胞换液时间为1-2 d, 传代时间为3-5 d, 传代前用2.5 g/L胰酶消化.

1.2.2 实验分组 空白对照组(A组): 加入含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液; 乙醛对照组(B组): 在含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液中加入乙醛200 μmol/L; 实验组: 在B组基础上加入sp600125, 终浓度分别为25、50、75、100 μmol/L, 分别称为C、D、E、F组.

1.2.3 MTT检测HSC-T6增殖 取大鼠HSC-T6, 调整浓度至 $1 \times 10^5$ /L, 接种于96孔细胞培养板中, 每孔200 μL细胞悬液, 每组6复孔, 细胞生长至80%以上融合度时, 无血清培养基同步化处理24 h, 实验组经sp600125预处理1 h后, 加乙醛至200 μmol/L, CO<sub>2</sub>培养箱中继续孵育24 h后(乙醛每12 h补充一次), 每孔加5 g/L的MTT 20 μL, 37℃反应4 h, 然后弃去培养液, 每孔加150 μL DMSO, 30 min后用酶标仪, 双波长测定A值, 测定波长为570 nm, 参考波长为630 nm, 酶标仪所示A值为 $A_{570nm}$ 减去 $A_{630nm}$ , A值反应细胞增殖水平.

1.2.4 Hoechst 33258检测HSC-T6凋亡 用6孔板制作HSC-T6细胞爬片(每孔 $1 \times 10^5$ /L细胞悬液1 mL, 每组重复实验3次), 孵育24 h后再进行无血清DMEM液同步化处理24 h, 实验组经sp600125预处理1 h后, 加乙醛至200 μmol/L, CO<sub>2</sub>培养箱中继续孵育24 h后(乙醛每12 h补充一次), 去培养液, PBS洗2遍, 每次3 min, 按Hoechst 33258试剂盒说明操作, 在荧光显微镜下观察HSC-T6细胞形态变化.

1.2.5 FCM测定HSC-T6细胞凋亡 每组重复实验3次, 收集培养的各组HSC-T6, 预冷PBS清洗, 700 mL/L冷乙

醇固定, 50 mg/L Rnase 37℃消化, 65 mg/L碘化丙啶(PI) 4℃染色1 h. 上机检测, 计算细胞凋亡率.

1.2.6 SABC法测定HSC-T6中Caspase-3蛋白表达 制作HSC-T6细胞爬片, 每组重复实验3次, 再按SABC试剂盒说明进行操作, 显微镜下观察, 细胞中有棕黄色或棕褐色颗粒者为阳性结果, 计算Caspase-3蛋白表达阳性率.

统计学处理 运用SPSS10.0软件, 用One-way ANOVA分析, 并用LSD方法进行组间两两比较, 数据以mean ± SD表示,  $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 MTT检测HSC-T6增殖 培养的HSC-T6中加入乙醛后, 细胞增殖明显; 当分别加入不同浓度的sp600125后, HSC-T6增殖受到抑制( $F = 102.53$ ,  $P < 0.01$ , 表1).

2.2 Hoechst 33258检测HSC-T6凋亡细胞的形态改变 在荧光显微镜下可观察到乙醛组HSC-T6的细胞核染色及大小较均一; 当加入不同浓度的sp600125后, HSC-T6凋亡细胞逐渐增多, 表现为细胞核浓缩、染色深, 细胞核大小不均、裂解、形成凋亡小体.

2.3 FCM测定细胞凋亡 A组HSC-T6凋亡率除了与C组无显著性差异外, 与其他组均有显著性差异( $P < 0.01$ ); 乙醛组与其他组均有显著性差异( $P < 0.01$ ). 随着sp600125浓度增加HSC-T6细胞凋亡率逐渐增加( $F = 54.83$ ,  $P < 0.01$ , 表2).

2.4 SABC法测定HSC-T6中Caspase-3蛋白表达 A组HSC-T6中Caspase-3蛋白表达阳性率与B组、C组无显著性差异外, 与其他组均有显著性差异( $P < 0.01$ ); 乙醛组与sp600125实验组均有显著性差异( $P < 0.01$ ). 随着sp600125浓度增加HSC-T6细胞中Caspase-3蛋白表达阳性率逐渐增加( $F = 38.26$ ,  $P < 0.01$ , 表3).

表1 sp600125对乙醛刺激的HSC-T6增殖的影响 (mean ± SD,  $n = 6$ )

组别	sp600125(μmol/L)+乙醛(μmol/L)	A值
A	0+0	0.0850 ± 0.0065 <sup>d</sup>
B	0+200	0.1410 ± 0.0029 <sup>b</sup>
C	25+200	0.1343 ± 0.0039 <sup>b</sup>
D	50+200	0.1297 ± 0.0033 <sup>bd</sup>
E	75+200	0.1138 ± 0.0082 <sup>bd</sup>
F	100+200	0.0877 ± 0.0077 <sup>d</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 乙醛组.

表2 sp600125对乙醛刺激的HSC-T6凋亡的影响 (mean ± SD,  $n = 3$ )

组别	sp600125(μmol/L)+乙醛(μmol/L)	凋亡率(%)
A	0+0	10.17 ± 0.64 <sup>d</sup>
B	0+200	8.57 ± 0.31 <sup>b</sup>
C	25+200	11.07 ± 0.25 <sup>d</sup>
D	50+200	11.83 ± 0.47 <sup>bd</sup>
E	75+200	13.47 ± 0.72 <sup>bd</sup>
F	100+200	16.13 ± 1.00 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 乙醛组.

表3 sp600125对乙醛刺激的HSC-T6 Caspase-3蛋白表达的影响  
(mean ± SD,  $n = 3$ )

组别	sp600125(μmol/L)+乙醛(μmol/L)	阳性率(%)
A	0+0	18.34 ± 1.39
B	0+200	16.27 ± 0.47
C	25+200	18.81 ± 1.18 <sup>d</sup>
D	50+200	22.64 ± 1.48 <sup>bd</sup>
E	75+200	25.23 ± 1.11 <sup>bd</sup>
F	100+200	27.46 ± 1.41 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 乙醛组.

### 3 讨论

研究<sup>[5,6]</sup>表明HSC的激活、增殖是肝纤维化发生、发展的中心环节,而HSC的凋亡有利于肝纤维化的逆转.因而,抑制激活的HSC增殖和诱导激活的HSC凋亡是治疗肝纤维化的一个重要研究方向.

MAPK信号传导通路(包括ERK、JNK、P38)是细胞外的各种信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要通路. JNK为MAPK家族重要成员, JNK的活化是通过其氨基酸残基磷酸化,细胞质中的JNK移位到细胞核,活化的JNK可以和转录因子ATF2及c-JNK的氨基末端区域结合,使转录因子的活性区域发生磷酸化,从而促进相应基因的表达<sup>[7]</sup>. JNK信号传导通路的激活在肝纤维化发生中起重要作用: Marra *et al*<sup>[8]</sup>研究表明, sp600125能抑制白细胞介素-1(IL-1)或肿瘤坏死因子(TNF)诱导的HSC CCL2(MCP-1)分泌和基因表达; Li *et al*<sup>[9]</sup>研究表明酒精代谢产物亚麻酸乙酯(linolenic acid ethyl ester, LAEE)可通过ERK、JNK途径影响HSC AP-1活性及表达; Carriers *et al*<sup>[10]</sup>研究表明,放线菌酮(Cycloheximide, CHX)与CD95L一起通过JNK途径诱导HSC凋亡; Anania *et al*<sup>[11]</sup>研究表明阻断JNK活性后可抑制HSC内 $\alpha(2)$ -1胶原的表达. 我们用sp600125阻断JNK活性后,能有效抑制HSC-T6增殖,随着sp600125剂量的增加,其抑制HSC-T6增殖的作用增强,说明阻断JNK信号传导通路可以抑制乙醛刺激的HSC增殖,从而阻止酒精性肝纤维化的发生.

细胞凋亡是基因控制的细胞程序化死亡,是一系列半胱氨酸蛋白酶Caspase级联反应的结果.在多种细胞和各种刺激因素的作用下, Caspase-3被认为是凋亡的关键执行者, Caspase-3处于该级联反应的下游,其通过降解细胞内相应底物(如细胞骨架蛋白、核蛋白等)使细胞凋亡.研究<sup>[12,13]</sup>表明Superoxide、Tetrandrine等可通过Caspase-3诱导HSC凋亡. 本实验用不同浓度sp600125

阻断JNK活性后,乙醛刺激的大鼠HSC-T6凋亡率逐渐增加,同时Caspase-3蛋白表达率也逐渐增加,说明sp600125阻断JNK信号传导通路后可以诱导HSC-T6凋亡,并且其作用机制可能在于上调Caspase-3基因表达.

HSC的凋亡不仅能够减少激活的HSC的数量,而且能够抑制HSC的激活,从而减少细胞外基质成分产生,达到阻止肝纤维化的发生、甚至逆转肝纤维化的目的.我们以sp600125阻断JNK信号传导通路为切入点,研究HSC凋亡,这对进一步阐明肝纤维化发生的分子机制和寻找一条治疗肝纤维化的可能途径均有重要意义.

### 4 参考文献

- 1 Anania FA, Womack L, Jiang M, Saxena NK. Aldehydes potentiate  $\alpha(2)$ (I) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2001;30:846-857
- 2 Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Saccomanno S, Bendia E, Benedetti A, Greenwel P. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001;33:1130-1140
- 3 王琼. 酪氨酸蛋白激酶及其抑制剂在肝星状细胞激活中的研究进展. *华西医学* 2002;17:147-148
- 4 钟显飞, 蒋明德, 马洪德, 曾维政, 李小安. JNK信号通路对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增殖的影响. *西南国防医药* 2004;14:350-353
- 5 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-549
- 6 Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001;161:1-151
- 7 陈良恩. JNK信号转导通路及其在应激中的作用. *国外医学. 生理病理科学与临床分册* 2001;21:169-171
- 8 Marra F, Delogu W, Petrai I, Pastacaldi S, Bonacchi A, Efsen E, Aleffi S, Bertolani C, Pinzani M, Gentilini P. Differential requirement of members of the MAPK family for CCL2 expression by hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G18-G26
- 9 Li J, Hu W, Baldassare JJ, Bora PS, Chen S, Poulos JE, O'Neill R, Britton RS, Bacon BR. The ethanol metabolite, linolenic acid ethyl ester, stimulates mitogen-activated protein kinase and cyclin signaling in hepatic stellate cells. *Life Sci* 2003;73:1083-1096
- 10 Carriers A, Reinehr R, Fischer R, Warskulat U, Haussinger D. c-Jun-N-terminal kinase dependent membrane targeting of CD95 in rat hepatic stellate cells. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:179-186
- 11 Anania FA, Womack L, Jiang M, Saxena NK. Aldehydes potentiate  $\alpha(2)$ (I) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2001;30:846-857
- 12 Thirunavukkarasu C, Watkins S, Harvey SA, Gandhi CR. Superoxide-induced apoptosis of activated rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004;41:567-575
- 13 Zhao YZ, Kim JY, Park EJ, Lee SH, Woo SW, Ko G, Sohn DH. Tetrandrine induces apoptosis in hepatic stellate cells. *Phytother Res* 2004;18:306-309

电编 张勇 编辑 张海宁



# 血小板活化因子对幼鼠肠道免疫屏障功能的影响

王丽杰, 刘冬妍, 孙梅, 赵恂

王丽杰, 孙梅, 中国医科大学附属第二临床学院儿科 辽宁省沈阳市 110004

刘冬妍, 中国医科大学附属第二临床学院检验科 辽宁省沈阳市 110004

赵恂, 中国医科大学实验技术中心二部 辽宁省沈阳市 110001

通讯作者: 王丽杰, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二临床学院儿科. wlj682002@yahoo.com.cn

电话: 024-23255060 传真: 024-83955509

收稿日期: 2005-08-03 接受日期: 2005-08-10

## Effect of platelet activating factor on function of intestinal immunological barrier in young rats

Li-Jie Wang, Dong-Yan Liu, Mei Sun, Xun Zhao

Li-Jie Wang, Mei Sun, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Clinical College, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Dong-Yan Liu, Department of Medical Examination, the Second Affiliated Clinical College, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Xun Zhao, the Second Department of Experimental Technique Center, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Li-Jie Wang, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Clinical College, China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wlj682002@yahoo.com.cn

Received: 2005-08-03 Accepted: 2005-08-10

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of platelet activating factor (PAF) on the content of secretory IgA (SIgA) in intestinal mucosa.

**METHODS:** The rats were intraperitoneally injected with different concentrations of PAF (50 and 65  $\mu\text{g/kg}$ ) at a dose of 1  $\mu\text{L/g}$ . Double antibody-PEG radioimmunoassay was used to determine the amount of SIgA in the intestinal mucosa. The histological changes were detected by hematoxylin and Eosin staining under light microscope.

**RESULTS:** In the PAF<sub>65</sub> group, the histological examination showed edema of the villus, capillary congestion of the lamina propria, extension of the subepithelial lymphatic channel, polymorphonuclear infiltration in enteric cavity, and shedding of the epithelial layer at 0.5, 1.5, and 3 h. Edema of the villus were still shown at 6 and 24 h. In the PAF<sub>50</sub> group, edema of the villus, capillary congestion of the lamina propria were showed at 0.5 and 1.5 h. Edema of the villus were still shown at

3, 6 and 24 h. The content of SIgA was obviously decreased in the experimental group than that in the control group ( $0.31 \pm 0.03$  mg/L,  $0.40 \pm 0.10$  mg/L,  $P < 0.01$ ;  $0.43 \pm 0.13$  mg/L,  $0.46 \pm 0.11$  mg/L,  $P < 0.05$ , in PAF<sub>50</sub> group;  $0.28 \pm 0.07$  mg/L,  $0.36 \pm 0.08$  mg/L,  $P < 0.01$ ,  $0.40 \pm 0.11$  mg/L,  $0.42 \pm 0.06$  mg/L,  $P < 0.05$ , in PAF<sub>65</sub> group vs  $0.66 \pm 0.10$  mg/L in the control) at 0.5, 1.5, 3 and 6 h, respectively. The SIgA content decreased most at 0.5 h, but then gradually increased.

**CONCLUSION:** PAF can lead to damages of the intestinal immunologic barrier by decreasing the SIgA content.

**Key Words:** Platelet activating factor; Intestinal immunological barrier; Young rats

Wang LJ, Liu DY, Sun M, Zhao X. Effect of platelet activating factor on intestinal immunological barrier in young rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(18):2266-2268

## 摘要

**目的:** 探讨血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)对肠黏膜分泌型IgA(secretory IgA, SIgA)的影响。

**方法:** 用50  $\mu\text{g/kg}$ 和65  $\mu\text{g/kg}$  PAF对大鼠进行腹腔注射(1  $\mu\text{L/g}$ ), 不同时间点处死动物, 应用双抗体-PEG放射免疫法测定肠黏膜中SIgA含量, 常规苏木精-伊红染色, 光镜观察形态学改变。

**结果:** PAF<sub>65</sub>组回肠0.5, 1.5, 3 h可见绒毛水肿, 固有层血管充血, 间质淋巴管扩张, 肠腔炎性渗出, 上皮脱落, 6, 24 h绒毛水肿。PAF<sub>50</sub>组0.5, 1.5 h可见绒毛水肿, 固有层血管充血, 3, 6, 24 h绒毛水肿。实验组0.5, 1.5, 3, 6 h SIgA 均较对照组显著降低(PAF<sub>50</sub>组分别为 $0.31 \pm 0.03$  mg/L,  $0.40 \pm 0.10$  mg/L,  $P < 0.01$ ,  $0.43 \pm 0.13$  mg/L,  $0.46 \pm 0.11$  mg/L,  $P < 0.05$ ; PAF<sub>65</sub>组分别为 $0.28 \pm 0.07$  mg/L,  $0.36 \pm 0.08$  mg/L,  $P < 0.01$ ,  $0.40 \pm 0.11$  mg/L,  $0.42 \pm 0.06$  mg/L,  $P < 0.05$  vs  $0.66 \pm 0.10$  mg/L)。0.5 h下降幅度最大, 随时间推移有逐渐升高趋势。

**结论:** PAF可损害肠黏膜的免疫屏障功能, 使SIgA降低。

**关键词:** 血小板活化因子; 肠道免疫屏障; 幼鼠

王丽杰, 刘冬妍, 孙梅, 赵恂. 血小板活化因子对幼鼠肠道免疫屏障功能的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2266-2268

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2266.asp>

## 0 引言

肠源性感染是机体遭受严重损伤后发生顽固性休克、全身感染及多器官功能衰竭的重要潜在因素,而肠黏膜屏障功能损害则是肠源性感染发生的关键.近年来血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)在胃肠黏膜损害中的作用日益受到重视.我们对PAF对幼鼠肠黏膜免疫屏障功能损害作一初步研究.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康18日龄Wistar大鼠,平均体质量 $32.21 \pm 6.67$  g,与母鼠共同饲养,由中国医科大学附属第二临床学院实验动物中心提供. PAF(1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine)(美国Sigma公司产品).全自动 $\gamma$ 放免计数器FJ-2008PS(西安检测仪器厂). SIgA试剂盒由中国原子能科学研究所提供.

**1.2 方法** 随机分为对照组8只,实验组分为PAF<sub>50</sub>和PAF<sub>65</sub>两组,每一时相点(0.5, 1.5, 3, 6, 24, 48, 72 h)各8只. PAF 2 g/L溶于氯仿中,再溶于含2.5 mL/L小牛血清白蛋白盐水中,于实验前配成浓度为50 mg/L的溶液.按Bhatia<sup>[1]</sup>的方法,实验组用微量加样器分别以PAF 50  $\mu$ g/kg和65  $\mu$ g/kg腹腔注射(1  $\mu$ L/g),对照组按

1  $\mu$ L/g注入无菌生理盐水.用药后各组均放回鼠笼,继续哺乳,直至实验结束.按时间点分别处死动物,距回盲部3 cm处取回肠5 cm,加入生理盐水200  $\mu$ L, 4℃过夜, 2 000 r/min离心15 min,取上清-20℃保存.应用双抗体-PEG放射免疫法测定肠黏膜中SIgA含量.实验严格按照说明书要求操作.再取部分回肠于40 g/L甲醛中固定,石蜡包埋,作4-5 mm连续切片,常规苏木精-伊红染色,光镜观察形态学改变.

**统计学处理** 采用SPSS 10.0 For Windows数据分析软件,所有数据用mean $\pm$ SD表示,组间比较采用配对 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 组织形态学改变** 光镜下观察( $\times 100, \times 400$ ), PAF<sub>65</sub>组回肠0.5, 1.5, 3 h可见绒毛水肿,固有层血管充血,间质淋巴管扩张,肠腔炎性渗出,上皮脱落,6, 24 h绒毛水肿,以0.5, 1.5 h改变最明显. 48, 72 h无明显改变. PAF<sub>50</sub>组0.5, 1.5 h可见绒毛水肿,固有层血管充血,3, 6, 24 h绒毛水肿, 48, 72 h无改变.对照组各时相点回肠结构正常(图1).

**2.2 SIgA 改变 (表1)** 实验组0.5, 1.5, 3, 6 h SIgA均

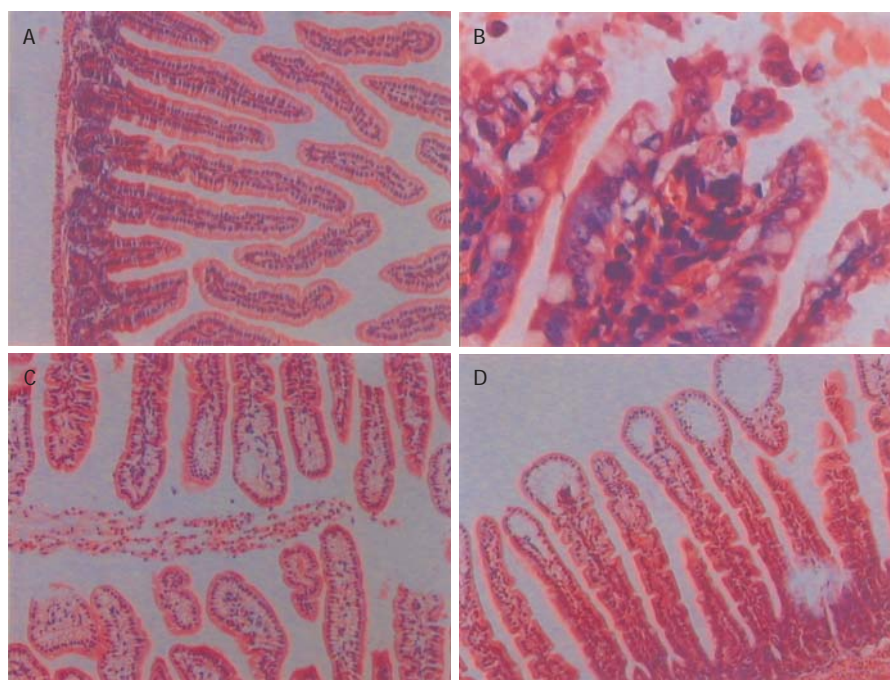


图1 回肠组织病理学改变(苏木精-伊红染色 $\times 100, \times 400$ ) A:正常小肠绒毛; B: PAF<sub>65</sub>组0.5 h血管充血,上皮脱落,肠腔炎性渗出( $\times 400$ ); C: PAF<sub>65</sub>组1.5 h绒毛水肿,炎性渗出; D: PAF<sub>50</sub>组1.5 h绒毛水肿

表1 幼鼠各组回肠SIgA水平 ( $n = 8$ , mean  $\pm$  SD, mg/L)

分组	0.5 h	1.5 h	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
PAF <sub>65</sub> 组	$0.28 \pm 0.07^b$	$0.36 \pm 0.08^b$	$0.40 \pm 0.11^a$	$0.42 \pm 0.06^a$	$0.47 \pm 0.20$	$0.60 \pm 0.08$	$0.61 \pm 0.10$
PAF <sub>50</sub> 组	$0.31 \pm 0.03^b$	$0.40 \pm 0.10^b$	$0.43 \pm 0.13^a$	$0.46 \pm 0.11^a$	$0.60 \pm 0.06$	$0.51 \pm 0.08$	$0.69 \pm 0.18$
对照组	$0.65 \pm 0.11$	$0.66 \pm 0.08$	$0.66 \pm 0.10$	$0.66 \pm 0.12$	$0.66 \pm 0.13$	$0.66 \pm 0.09$	$0.66 \pm 0.11$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

较对照组 ( $0.66 \pm 0.10$  mg/L) 显著降低 (PAF<sub>50</sub> 组分别为  $0.31 \pm 0.03$  mg/L,  $0.40 \pm 0.10$  mg/L,  $P < 0.01$ ,  $0.43 \pm 0.13$  mg/L,  $0.46 \pm 0.11$  mg/L,  $P < 0.05$ ; PAF<sub>65</sub> 组分别为  $0.28 \pm 0.07$  mg/L,  $0.36 \pm 0.08$  mg/L,  $P < 0.01$ ,  $0.40 \pm 0.11$  mg/L,  $0.42 \pm 0.06$  mg/L,  $P < 0.05$ ), 24, 48, 72 h 较前略升高, 与对照组比较无统计学意义. 0.5 h 下降幅度最大, 随时间推移有逐渐升高趋势. PAF<sub>65</sub> 组各时相点 SIgA 较 PAF<sub>50</sub> 组略低, 但无统计学差异.

### 3 讨论

血小板活化因子是第一个被发现的具有强大生物活性的磷脂, 能调节多种细胞活性, 如调节细胞因子网络、免疫反应、聚集血小板、舒缩小血管等, 从而在内毒素血症及休克等病理过程中起到重要作用.

有研究认为 PAF 在诸多参与胃肠黏膜损害的炎症介质中可能起到“中心放大”的介导作用<sup>[2]</sup>. 目前国内外多应用 PAF 受体拮抗剂可减轻细菌移位或应用静脉注射 PAF 等方法证实 PAF 对胃肠的损伤作用<sup>[3,6]</sup>, 本文采用直接腹腔注射的方法研究 PAF 对胃肠的损伤<sup>[1]</sup>. 实验中应用 PAF 0.5 h 后即可见肠水肿, 点片状出血, 甚至坏死, 以空回肠明显. 随时间推移, 肠损伤逐渐减轻. 至 24 h 无或仅有轻度水肿, 无出血. 大体所见 PAF<sub>65</sub> 组较 PAF<sub>50</sub> 组改变稍重, 与病理改变相符. 本文所测 SIgA 与病情严重程度相关, 即大体与病理改变愈明显, SIgA 愈低. SIgA 的下降程度与 PAF 剂量有关, 剂量越大, SIgA 下降越多, 但无统计学差异.

肠道是人体最大的淋巴器官, 人的肠腔不断与病毒、细菌和外来异物等微生物接触, 为阻止有害物质的入侵, 肠腔表面被覆的黏膜起了重要作用. 肠黏膜形成黏膜免疫系统, 在机体担负第一线的局部防御任务, SIgA 是肠黏膜主要的免疫球蛋白, 长期以来一直被认为是第一线的免疫防御<sup>[7,8]</sup>, 对黏膜固有的和入侵的病原体具有保护作用. 可抑制由 IgM 免疫复合物介导的抗体依赖性细胞毒作用对肠道局部的免疫损伤<sup>[9]</sup>. SIgA 具有杀菌、抑菌、阻止细菌对肠上皮细胞的黏附, 破坏及中和毒素等多种保护作用<sup>[10-12]</sup>. SIgA 分泌减少与细菌移位关系密切<sup>[13-15]</sup>. SIgA 分泌减少, 一方面使其不能有效包被革兰氏阴性杆菌, 使肠道抵御病原体和毒素侵袭的能力下降, 对机体有害的代谢产物增加, 细菌对肠上皮的吸附、穿透能力增加, 导致肠源性感染; 另一方面使其对某些抗原物质的封闭作用减弱, 导致部分 T 淋巴细胞活化, 激活炎症细胞因子, 产生过度炎症反应, 进一步损害肠黏膜, 引起全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)<sup>[16]</sup>.

本文研究结果证实, PAF 可损害肠黏膜的免疫屏障功能, 因此如何维护肠道免疫屏障功能的稳定, 防治肠源性感染以减少对机体的继发损伤, 成为基础及临床工作者必须面对的课题.

### 4 参考文献

- 1 Bhatia AM, Ramos CT, Scott SM, Musemeche CA. Developmental susceptibility to intestinal injury by platelet-activating factor in the newborn rat. *J Invest Surg* 1996;9:351-358
- 2 Anderson BO, Bensard DD, Harken AH. The role of platelet activating factor and its antagonists in shock, sepsis and multiple organ failure. *Surg Gynecol Obstet* 1991;172:415-424
- 3 de Souza LJ, Sampietre SN, Assis RS, Knowles CH, Leite KR, Jancar S, Monteiro Cunha JE, Machado MC. Effect of platelet-activating factor antagonists (BN-52021, WEB-2170, and BB-882) on bacterial translocation in acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2001;5:364-370
- 4 Leveau P, Wang X, Sun Z, Borjesson A, Andersson E, Andersson R. Severity of pancreatitis-associated gut barrier dysfunction is reduced following treatment with the PAF inhibitor lexipafant. *Biochem Pharmacol* 2005;69:1325-1331
- 5 Sun XM, Caplan MS, Liu YY, Hsueh W. Endotoxin-resistant mice are protected from PAF-induced bowel injury and death. Role of TNF, complement activation, and endogenous PAF production. *Dig Dis and Sci* 1995;40:495-502
- 6 Han XB, Liu X, Hsueh W, De Plaen IG. Macrophage inflammatory protein-2 mediates the bowel injury induced by platelet-activating factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G1220-G1226
- 7 Keren DF, Brown JE, McDonald RA, Wassef JS. Secretory immunoglobulin A response to Shiga toxin in rabbits: kinetics of the initial mucosal immune response and inhibition of toxicity in vitro and in vivo. *Infect Immun* 1989;57:1885-1889
- 8 Kunisawa J, Kiyono H. A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1308-1321
- 9 Punthuprapasa P, Thammapalard N, Chularerk U, Charoenlarp K, Bhaibulaya M. Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32:159-164
- 10 Chen LW, Hsu CM, Huang JK, Chen JS, Chen SC. Effects of bombesin on gut mucosal immunity in rats after thermal injury. *J Formos Med Assoc* 2000;99:491-498
- 11 Silvey KJ, Hutchings AB, Vajdy M, Petzke MM, Neutra MR. Role of immunoglobulin A in protection against reovirus entry into Murine Peyer's patches. *J Virol* 2001;75:10870-10879
- 12 Favre L, Spertini F, Corthesy B. Secretory IgA possesses intrinsic modulatory properties stimulating mucosal and systemic immune responses. *J Immunol* 2005;175:2793-2800
- 13 Wang ZT, Yao YM, Xiao GX, Sheng ZY. Risk factors of development of gut-derived bacterial translocation in thermally injured rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:1619-1624
- 14 Wang ZT, Yao YM, Xiao GX, Sheng ZY. The protective effect of supplementation of probiotics combined with riboflavin on the intestinal barrier of the rats after scald injury. *Zhonghua ShaoShang ZaZhi* 2004;20:202-205
- 15 Bollinger RR, Everett ML, Palestro D, Love SD, Lin SS, Parker W. Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology* 2003;109:580-587
- 16 Ikeda S, Zarza BL, Johnson CD, Fukatsu K, Kudsk KA. Total parenteral nutrition supplementation with glutamine improves survival after gut ischemia/reperfusion. *J Parenter Enteral Nutr* 2002;26:169-173



• 临床经验 •

# 肝硬化患者食管静脉曲张的相关因素分析 501 例

崔春吉, 金永日, 朴熙绪, 裴风郁

崔春吉, 金永日, 朴熙绪, 裴风郁, 延边大学医学院附属医院消化内科  
吉林省延吉市 133000

通讯作者: 崔春吉, 133000, 吉林省延吉市局子街119号, 延边大学医学院  
附属医院消化内科. yjadsl27181@163.com

电话: 0433-2660061 传真: 0433-2513610

收稿日期: 2005-07-28 接受日期: 2005-08-26

## Correlative factors of esophageal varices in patients with hepatocirrhosis: an analysis of 501 cases

Chun-Ji Cui, Yong-Ri Jin, Xi-Xu Piao, Feng-Yu Pei

Chun-Ji Cui, Yong-Ri Jin, Xi-Xu Piao, Feng-Yu Pei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital, Medical College of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Correspondence to: Chun-Ji Cui, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital, Medical College of Yanbian University, 119 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. yjadsl27181@163.com

Received: 2005-07-28 Accepted: 2005-08-26

### Abstract

**AIM:** To investigate the incidence rate and the risk factors of esophageal varices (EV) in patients with hepatocirrhosis.

**METHODS:** The clinical data of 501 patients with hepatocirrhosis were retrospectively studied.

**RESULTS:** The incidence rate of EV in patients with hepatocirrhosis were significantly different between the groups of different sex (male 84.3% vs female 72.0%,  $P < 0.05$ ), different diameters of the portal vein ( $\geq 14$  mm 85.9% vs  $< 14$  mm 72.5%,  $P < 0.05$ ), and different grades of Child-Pugh. It was significantly different between the patients with and without sotting (84.9% vs 77.3%,  $P < 0.05$ ) and ascites (83.9% vs 73.7%,  $P < 0.05$ ). The serum albumin and cholinesterase in EV patients with hepatocirrhosis were significantly lower than those in non-EV patients. The EV incidence rate was correlated with the sex and diameters of portal vein ( $OR = 0.491$ ,  $P = 0.016$ ,  $OR = 2.203$ ,  $P = 0.001$ ).

**CONCLUSION:** The incidence of EV in patients with hepatocirrhosis is related to sex, the diameters of the portal vein, ascites, sotting, degree of hypohepatia, and dysbolism of serum albumin and cholinesterase. Sex and the diameters of the portal vein are more risky

factors.

**Key Words:** Hepatocirrhosis; Esophageal varices; Incidence rate

Cui CJ, Jin YR, Piao XX, Pei FY. Correlative factors of esophageal varices in patients with hepatocirrhosis: an analysis of 501 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(18):2269-2272

### 摘要

**目的:** 探讨肝硬化患者食管静脉曲张(EV)的发生率及其危险因素.

**方法:** 对501例肝硬化患者的临床资料进行回顾性分析.

**结果:** 肝硬化患者EV的发生率在不同的性别(男性84.3%, 284/337 vs 女性72.0%, 164/118,  $P < 0.05$ )、门静脉内径( $\geq 14$  mm, 85.9%, 249/290 vs  $< 14$  mm, 72.5%, 153/211,  $P < 0.05$ ); 及肝功能分级之间比较差异均有统计学意义, 在有无嗜酒(嗜酒组 84.9%, 163/192 vs 非嗜酒组 77.3%, 239/309,  $P < 0.05$ )、有无腹水(有腹水组83.9%, 270/322 vs 无腹水组73.7%, 132/179,  $P < 0.05$ )之间比较差异亦均有统计学意义. 肝硬化EV组血清白蛋白、胆碱酯酶显著低于非EV组, 差异有统计学意义. 性别及门静脉内径是肝硬化患者EV的的发病率明显相关( $OR = 0.491$ ,  $P = 0.016$ ;  $OR = 2.203$ ,  $P = 0.001$ )主要危险因素.

**结论:** 肝硬化患者EV与性别、门静脉内径、有无腹水、嗜酒、肝功能损害程度以及肝功能损害造成的血清白蛋白和胆碱酯酶代谢障碍等因素有一定关系, 其中与性别及门静脉内径关系最密切.

**关键词:** 肝硬化; 食管静脉曲张; 发生率

崔春吉, 金永日, 朴熙绪, 裴风郁. 肝硬化患者食管静脉曲张的相关因素分析 501例. *世界华人消化杂志* 2005; 13(18):2269-2272

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2269.asp>

### 0 引言

食管静脉曲张 (EV) 破裂出血是肝硬化门脉高压症患者最凶险的并发症, 大约 1/3 的患者最终将发生出血<sup>[1]</sup>, 而 EV 是 EV 破裂出血的基础. 我们对 501 例住院肝硬化患者进行了回顾性分析, 旨在探讨肝硬化患者发生 EV 的一些相关因素, 为预测及防治肝硬化患者发生 EV 及其破裂出血提供依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 按照 1990 年全国肝硬化专题学术会制定的诊断标准<sup>[2]</sup>, 经临床及辅助检查综合诊断的住院肝硬化患者 501 例, 其中男 337 例, 女 164 例; 根据黄自平 *et al* 的方法<sup>[3]</sup>, EV 分为 I、II、III 级; 根据 Child-Pugh 评分<sup>[4]</sup>, 肝功能分为 A、B、C 级; 长期多量饮酒为嗜酒, 不饮酒或偶尔饮酒为非嗜酒。

1.2 方法 在全自动生化分析仪上检测清晨空腹血清白蛋白 (ALB)、胆碱酯酶 (CHE) 及总胆红素 (T-BIL), 采用酶联免疫吸附法检测抗 HCV 及 HBsAg 等丙型肝炎病毒标志物, 使用 Aloka620 型超声诊断仪检测门静脉内径。

**统计学处理** 根据资料类型及特点, 分别采用  $\chi^2$  检验、秩和检验和  $t$  检验, 多组间两两比较分别采用  $\chi^2$  分割法和方差分析。对肝硬化患者 EV 的相关因素进行 logistic 回归分析。

## 2 结果

2.1 肝硬化患者 EV 的发生率 在 501 例肝硬化患者中 402 例有 EV, EV 发生率为 80.2%(402/501)。

2.2 肝硬化患者 EV 与性别、民族的关系 肝硬化患者 EV 发生率男性 (84.3%, 284/337) 显著高于女性 (72.0%, 164/118) ( $P<0.05$ ); 而汉族 (83.1%, 108/130) 与朝鲜族 (79.2%, 294/371) 之间差异无统计学意义。

2.3 肝硬化患者 EV 与年龄、肝病病程的关系 小于 40 岁组、40-49 岁组、50-59 岁组、等于或超过 60 岁组 EV 的发生率分别为 79.1%(53/67)、83.1%(108/130)、75.3%(113/150)、83.1%(128/154), 显示肝硬化患者 EV 发生率在不同年龄组之间差异均无统计学意义。肝硬化患者 EV 组、单纯肝硬化组和 EV I 级组、EV II 级组、EV III 级组平均年龄分别为 52.4 $\pm$ 11.6 岁、52.0 $\pm$ 11.3 岁、53.5 $\pm$ 12.1 岁、51.3 $\pm$ 11.5 岁、52.6 $\pm$ 11.3 岁, 显示平均年龄在肝硬化患者 EV 组与单纯肝硬化组之间以及在不同的 EV 级别组之间差异均无统计学意义。肝病病程少于 5、5-14、15-24 a、等于或超过 25 a 组 EV 的发生率分别为 79.3%(188/237)、86.3%(132/153)、75.7%(53/70)、70.7%(29/41), 显示肝硬化患者 EV 发生率在不同肝病病程组之间差异均无统计学意义。

2.4 肝硬化患者 EV 与门静脉内径、腹水的关系 肝硬化患者 EV 发生率门静脉内径等于或大于 14 mm 组 (85.9%,

249/290) 显著高于门静脉内径小于 14 mm 组 (72.5%, 153/211) ( $P<0.05$ ); 有腹水组 (83.9%, 270/322) 显著高于无腹水组 (73.7%, 132/179) ( $P<0.05$ )。少量腹水组、中等量腹水组和大量腹水组 EV 的发生率分别为 82.2%(97/118)、85.1%(97/114)、84.4%(76/90), 显示肝硬化患者 EV 发生率在不同量的腹水组之间差异均无统计学意义。

2.5 肝硬化患者 EV 与肝硬化病因的关系 肝硬化患者 EV 发生率嗜酒组 (84.9%, 163/192) 显著高于非嗜酒组 (77.3%, 239/309) ( $P<0.05$ ); 而在抗 HCV 阳性组 (81.6%, 142/174) 与抗 HCV 阴性组 (79.5%, 260/327) 以及 HBsAg 阳性组 (79.1%, 200/253) 与 HBsAg 阴性组 (81.5%, 202/248) 之间差异均无统计学意义。

2.6 肝硬化患者 EV 与肝功能分级的关系 肝功能 A 级、B 级、C 级患者 EV 的发生率分别为 69.8%(88/126)、84.7%(188/222)、82.9%(126/152), 显示肝硬化患者 EV 的发生率在肝功能 A 级组显著低于肝功能 B 级组和 C 级组, 差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ )。

2.7 肝硬化患者 EV 与肝功能生化指标的关系 肝硬化患者 EV 组、单纯肝硬化组和 EV I 级组、EV II 级组、EV III 级组血清 ALB 分别为 31.6 $\pm$ 6.5 g/L、34.07 $\pm$ 7.5 g/L、32.4 $\pm$ 7.1 g/L、31.6 $\pm$ 6.3 g/L、30.3 $\pm$ 5.7 g/L, 肝硬化 EV 组血清 ALB 显著低于单纯肝硬化组 ( $P<0.01$ ), EV I 级组显著高于 EV III 级组 ( $P<0.05$ )。肝硬化患者 EV 组、单纯肝硬化组和 EV I 级组、EV II 级组、EV III 级组血清 CHE 分别为 1 889.8 $\pm$ 1 246.9、2 279.4 $\pm$ 1 532.9、2 219.0 $\pm$ 1 504.5、1 714.0 $\pm$ 1 004.7、1 698.6 $\pm$ 1 094.8 nkat/L, 肝硬化 EV 组血清 CHE 显著低于单纯肝硬化组 ( $P<0.01$ ), EV I 级组显著高于 EV II 级组和 EV III 级组 ( $P<0.01$ )。肝硬化患者 EV 组、单纯肝硬化组和 EV I 级组、EV II 级组、EV III 级组血清 T-BIL 分别为 31.5(5.5-907.0)、30.2(6.3-297.4)、33.5(5.7-688.3)、32.6(5.5-907.0)、31.5(8.0-243.1)  $\mu$ mol/L, 显示血清 T-BIL 在肝硬化患者 EV 组与非 EV 组之间以及不同的 EV 级别组之间差异均无统计学意义。

2.8 肝硬化患者 EV 相关危险因素的回归分析 (表 1) 先对肝硬化患者 EV 的相关因素进行赋值, 民族 ( $x_1$ ): 朝鲜族 = 1, 汉族 = 2; 性别 ( $x_2$ ): 男 = 1, 女 = 2; 年龄 ( $x_3$ ): 小于 40 岁 = 1, 40-49 岁 = 2, 50-59 岁 = 3, 等于或超过 60 岁 = 4; HBsAg ( $x_4$ ): 阴性 = 0, 阳性 = 1; 抗 HCV ( $x_5$ ): 阴性 = 0, 阳性 = 1; 嗜酒 ( $x_6$ ):

表 1 501 例肝硬化患者 EV 的相关因素回归分析

项目	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	$x_6$	$x_7$	$x_8$	$x_9$	$x_{10}$
<i>B</i>	0.164	-0.711	0.106	-0.155	0.239	0.096	0.790	-0.102	0.150	0.196
<i>S.E.</i>	0.284	0.295	0.128	0.307	0.323	0.312	0.238	0.123	0.141	0.205
<i>Wald</i>	0.332	5.825	0.687	0.254	0.548	0.096	10.983	0.687	1.132	0.910
<i>P</i>	0.564	0.016	0.407	0.614	0.459	0.757	0.001	0.407	0.287	0.340
<i>OR</i>	1.178	0.491	1.112	0.857	1.270	1.101	2.203	0.903	1.162	1.216

阴性 = 0, 阳性 = 1; 门静脉内径 ( $x_7$ ): 等于或超过 14 mm = 1, 小于 14 mm = 2; 病程 ( $x_8$ ): 小于 5 a = 1, 5-14 a = 2, 15-24 a = 3, 等于或超过 25 a = 4; 腹水 ( $x_9$ ): 无 = 0, 少量 = 1, 中等量 = 2, 大量 = 3; 肝功能分级 ( $x_{10}$ ): A 级 = 1, B 级 = 2, C 级 = 3; 肝硬化 EV ( $y$ ): 无 = 0, 有 = 1. 然后进行 logistic 回归分析. 结果表明, 性别及门静脉内径是肝硬化患者 EV 的危险因素.

### 3 讨论

肝硬化患者常发生 EV. 本资料表明, 肝硬化患者 EV 的发生率为 80.2%, 这与文献报道基本一致<sup>[5,6]</sup>. 本文结果显示, 肝硬化患者 EV 的发生率男性显著高于女性, 而汉族与朝鲜族之间差异无统计学意义. logistic 回归分析结果亦显示, 性别是肝硬化患者 EV 的危险因素之一. 说明肝硬化患者 EV 与性别有一定关系, 而与民族无明显关系. 其原因尚不清楚, 可能与男女在饮酒及内分泌上的差异等因素有关, 有待进一步探讨.

一般认为门静脉内径等于或大于 14 mm 为扩张, 提示有门静脉高压<sup>[7,8]</sup>, 而门静脉压力与 EV 呈正相关<sup>[9]</sup>. 本文结果显示, 肝硬化患者 EV 的发生率, 门静脉内径等于或大于 14 mm 组显著高于门静脉内径小于 14 mm 组. Logistic 回归分析结果亦显示, 门静脉内径是肝硬化患者 EV 的危险因素之一. 说明肝硬化患者 EV 与门静脉内径及门静脉高压有明显关系, 故降低门静脉压力可能有助于降低肝硬化患者 EV 的发生率. 腹水是肝硬化患者最突出的临床表现. 本文结果显示, 肝硬化患者 EV 发生率有腹水组显著高于无腹水组, 而在不同量的腹水组之间虽有所不同, 但差异无统计学意义. 说明肝硬化患者 EV 与有无腹水有明显关系, 而与腹水量的多少无明显关系. 其原因尚不清楚, 可能与有腹水者门静脉较无腹水者为宽<sup>[10]</sup>等因素有关. 本文结果显示, 肝硬化患者 EV 发生率在不同年龄组之间虽有所不同, 但差异均无统计学意义. 肝硬化 EV 组平均年龄虽大于非 EV 组, 但差异均无统计学意义. 说明肝硬化患者 EV 与年龄无明显关系.

嗜酒、乙型肝炎病毒及丙型肝炎病毒感染是肝硬化的主要病因. 本文结果显示, 肝硬化患者 EV 发生率嗜酒组显著高于非嗜酒组, 而在抗 HCV 阳性组与阴性组以及 HBsAg 阳性组与 HBsAg 阴性组之间差异均无统计学意义. 说明肝硬化患者 EV 与嗜酒有明显关系, 而与 HCV 及 HBV 感染无明显关系. 故及早戒酒可能有助于降低肝硬化患者 EV 的发生率. 据文献报道, 门静脉压力随着肝纤维化程度的加重, 而逐渐升高<sup>[11,12]</sup>, 并与肝纤维化程度呈极显著正相关<sup>[13]</sup>. 肝硬化患者 EV 与嗜酒有明显关系的原因目前尚不清楚, 可能机制为乙醇及其代谢产物乙醛通过多种途径造成肝细胞损伤, 肝细胞损伤及持续炎症反应可激活 Kupffer 细胞, 释放 TNF、IL-6、IL-1、TGF- $\beta$  和 PDGF 等多种细胞因子, 同时乙醇可直接

损伤血管内皮, 使血小板聚集, 而血管内皮细胞和血小板也可释放血小板源性生长因子 (PDGF); 这些细胞因子相互作用构成复杂的细胞因子网络, 激活储脂细胞, 变成肌纤维细胞, 合成和分泌大量胶原纤维, 形成肝纤维化<sup>[14]</sup>; 而肝纤维化可使肝小叶结构破坏, 肝内血管走行紊乱、狭窄、闭塞, 从而使门脉压升高<sup>[12]</sup>. 另外, 大量饮酒者门静脉血中酒精浓度过高, 可使肝内血管收缩、血流减少, 引起门脉高压<sup>[15]</sup>. 本文结果显示, 肝硬化患者 EV 的发生率在不同的肝病病程组之间虽有所不同, 但差异均无统计学意义. 说明肝硬化患者 EV 与肝病病程无明显关系.

肝功能 Child-Pugh 分级是临床评估肝功能损害程度的重要依据, 而血清 ALB、CHE 及 T-BIL 是反映肝功能损害程度的常用生化指标. 本文结果显示, 肝硬化患者 EV 发生率肝功能 B 级组和 C 级组显著高于肝功能 A 级组. 说明肝硬化患者 EV 与肝功能损害程度有明显关系. 其原因尚不清楚, 可能与门静脉压力与 Child 肝功能分级呈正相关<sup>[9]</sup>等因素有关. 故改善肝功能可能有助于降低肝硬化患者 EV 的发生率. 本文结果显示, 肝硬化 EV 组血清 T-BIL, 虽不同于非 EV 组, 但无显著性差异. 肝硬化 EV 组血清 ALB 及 CHE 显著低于非 EV 组, 且随 EV 级别的递增而逐级降低. 血清 ALB 在 EV I 级组显著低于 EV III 级组, 而血清 CHE 在 EV I 级组显著低于 EV II 级组和 EV III 级组. 说明肝硬化患者 EV 与血清 T-BIL 等无明显关系, 而与血清 ALB、CHE 等有明显关系. 故检测血清 ALB、CHE 等肝功能生化指标可能有助于预测肝硬化患者 EV 的发生率及其程度.

### 4 参考文献

- 1 El Atti EA, Nevens F, Bogaerts K, Verbeke G, Fevery J. Variceal pressure is a strong predictor of variceal haemorrhage in patients with cirrhosis as well as in patients with non-cirrhotic portal hypertension. *Gut* 1999;45:618-621
- 2 王吉耀. 全国肝硬化专题学术讨论会纪要. *中华消化杂志* 1991;11:290-291
- 3 黄自平, 梁扩寰. 门脉高压症患者的胃粘膜病变. *中华内科杂志* 1988;27:210-213
- 4 Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:646-649
- 5 井戸健一, 酒井秀朗, 堀口正彦, 古杉譲, 野上和加博, 田中昌宏, 吉田行雄, 関 秀一, 山中恒夫, 木村 健. 肝硬化50例の門脈圧と食道静脈瘤内視鏡の対比研究. *日本消化器病学会雑誌* 昭和 55;77:871-876
- 6 庞春梅, 舒建昌, 杨绮红, 张文茹, 黎铭恩, 张晓燕, 宋慧东. 肝硬化患者食管静脉曲张的无创性预测因素分析. *胃肠病学和肝病杂志* 2005;14:283-285
- 7 陈宏辉, 李双喜. 门静脉、脾静脉内径与食管胃底静脉曲张及破裂出血的关系. *衡阳医学院学报* 1999;27:446-447
- 8 苏明华, 江建宁, 刘志红. 肝硬化患者食管静脉曲张与门脾静脉直径关系的研究. *广西医科大学学报* 2001;18:832-833
- 9 仇日火, 郑玉凤, 季秀英, 刘胜民. 肝硬化门脉高压及其相关因素的临床研究. *中华消化杂志* 1992;12:220-222
- 10 刘艳华, 徐克成, 孟宪镛, 成建萍. B型超声对门脉高压的诊断价值. *江苏医药* 1986;12:63-65
- 11 谢冬英, 谢仕斌, 李勇忠, 姚春澜, 姚集鲁. 肝纤维化与门静脉、



- 脾静脉直径、脾脏大小及血细胞计数的关系. 中华消化杂志 2000;20:308-310
- 12 李勇忠,谢冬英,姚春斓,周元平,郑容琴. 门静脉主干及脾静脉宽度与肝组织纤维化的关系研究. 中国医师杂志 2001;3:105-107
- 13 黄自平,袁顺玉,谢国建,梁扩寰. 肝硬化大鼠肝脏组织学与门脉高

- 压的相关性. 中华消化杂志 1992;12:173-174
- 14 林红,吕淼,张义侠,王炳元,傅宝玉. 酒精性肝病大鼠模型的建立. 世界华人消化杂志 2001;9:24-28
- 15 张顺财,石碧坚,王伟岸. 慢性肝病. 第一版. 北京:科学技术文献出版社 2005:162-167

电编 张勇 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 临床经验 •

## 中晚期肝门部胆管癌诊治15例

张宗明, 邢海林, 李刚, 刘凯, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星

张宗明, 李刚, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星, 清华大学第一附属医院消化医学中心 北京市 100016  
邢海林, 刘凯, 同济大学附属同济医院普外一科 上海市 200065  
通讯作者: 张宗明, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化医学中心. zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn  
电话: 010-64372362 传真: 010-64361322  
收稿日期: 2005-08-26 接受日期: 2005-09-05

### Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases

Zong-Ming Zhang, Hai-Lin Xing, Gang Li, Kai Liu, Jian-Ping Zhu, Yan-Ming Su, Hua Zhong, Jin-Xing Guo

Zong-Ming Zhang, Gang Li, Jian-Ping Zhu, Yan-Ming Su, Hua Zhong, Jin-Xing Guo, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China  
Hai-Lin Xing, Kai Liu, the First Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China  
Correspondence to: Zong-Ming Zhang, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China. zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn  
Received: 2005-08-26 Accepted: 2005-09-05

### Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy of the surgical treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma in order to enhance the resection rate and the curative effect.

**METHODS:** A retrospective analysis was performed on the data of 15 patients underwent surgical treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma, including 7 mid-term cases (4 for Bismuth type IIIa, 3 for IIb) and 8 late-term cases (Bismuth type IV).

**RESULTS:** Ten patients underwent successful resection, and 5 received non-surgical internal biliary stent

drainage, of which 14 patients were followed-up (93.3%, 14/15), including all the 10 cases in the surgical resection group with the median survival time of 14.2 mo (16 d-32.3 mo). The median survival time for the patients received internal biliary stent drainage was 3.8 mo (1.3-7.2 mo), which was significantly different from that for the patients received surgical resection ( $t = 2.802$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Palliative resection combined with hepatectomy can significantly prolong the survival time of the patients with advanced hilar cholangiocarcinoma. Internal drainage through hepatico-jejunal bridge can enhance the surgical resection rate and decrease the occurrence rate of postoperative biliary fistula.

**Key Words:** Hilar cholangiocarcinoma; Radical resection; Palliative resection; Internal drainage through hepatico-jejunal bridge

Zhang ZM, Xing HL, Li G, Liu K, Li G, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX. Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2272-2274

### 摘要

**目的:** 探讨中晚期肝门部胆管癌的外科治疗方式选择, 提高手术切除率和疗效。

**方法:** 对2001-10/2004-12收治的15例中晚期肝门部胆管癌的外科治疗方式和随访结果进行回顾性分析, 其中中期7例(Bismuth IIIa型4例, IIb型3例), 晚期(IV型)8例。

**结果:** 手术切除10例, 非手术胆道支架内引流5例(IV型5例)。随访14例(14/15, 93.3%), 手术切除组随访10例, 中位生存

- 脾静脉直径、脾脏大小及血细胞计数的关系. 中华消化杂志 2000;20:308-310
- 12 李勇忠,谢冬英,姚春斓,周元平,郑容琴. 门静脉主干及脾静脉宽度与肝组织纤维化的关系研究. 中国医师杂志 2001;3:105-107
- 13 黄自平,袁顺玉,谢国建,梁扩寰. 肝硬化大鼠肝脏组织学与门脉高

- 压的相关性. 中华消化杂志 1992;12:173-174
- 14 林红,吕淼,张义侠,王炳元,傅宝玉. 酒精性肝病大鼠模型的建立. 世界华人消化杂志 2001;9:24-28
- 15 张顺财,石碧坚,王伟岸. 慢性肝病. 第一版. 北京:科学技术文献出版社 2005:162-167

电编 张勇 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 临床经验 •

## 中晚期肝门部胆管癌诊治15例

张宗明, 邢海林, 李刚, 刘凯, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星

张宗明, 李刚, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星, 清华大学第一附属医院消化医学中心 北京市 100016  
邢海林, 刘凯, 同济大学附属同济医院普外一科 上海市 200065  
通讯作者: 张宗明, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化医学中心. zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn  
电话: 010-64372362 传真: 010-64361322  
收稿日期: 2005-08-26 接受日期: 2005-09-05

### Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases

Zong-Ming Zhang, Hai-Lin Xing, Gang Li, Kai Liu, Jian-Ping Zhu, Yan-Ming Su, Hua Zhong, Jin-Xing Guo

Zong-Ming Zhang, Gang Li, Jian-Ping Zhu, Yan-Ming Su, Hua Zhong, Jin-Xing Guo, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China  
Hai-Lin Xing, Kai Liu, the First Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China  
Correspondence to: Zong-Ming Zhang, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China. zhangzongming@mail.tsinghua.edu.cn  
Received: 2005-08-26 Accepted: 2005-09-05

### Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy of the surgical treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma in order to enhance the resection rate and the curative effect.

**METHODS:** A retrospective analysis was performed on the data of 15 patients underwent surgical treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma, including 7 mid-term cases (4 for Bismuth type IIIa, 3 for IIIb) and 8 late-term cases (Bismuth type IV).

**RESULTS:** Ten patients underwent successful resection, and 5 received non-surgical internal biliary stent

drainage, of which 14 patients were followed-up (93.3%, 14/15), including all the 10 cases in the surgical resection group with the median survival time of 14.2 mo (16 d-32.3 mo). The median survival time for the patients received internal biliary stent drainage was 3.8 mo (1.3-7.2 mo), which was significantly different from that for the patients received surgical resection ( $t = 2.802$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Palliative resection combined with hepatectomy can significantly prolong the survival time of the patients with advanced hilar cholangiocarcinoma. Internal drainage through hepatico-jejunal bridge can enhance the surgical resection rate and decrease the occurrence rate of postoperative biliary fistula.

**Key Words:** Hilar cholangiocarcinoma; Radical resection; Palliative resection; Internal drainage through hepatico-jejunal bridge

Zhang ZM, Xing HL, Li G, Liu K, Li G, Zhu JP, Su YM, Zhong H, Guo JX. Diagnosis and treatment for advanced hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 15 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2272-2274

### 摘要

**目的:** 探讨中晚期肝门部胆管癌的外科治疗方式选择, 提高手术切除率和疗效.

**方法:** 对2001-10/2004-12收治的15例中晚期肝门部胆管癌的外科治疗方式和随访结果进行回顾性分析, 其中中期7例(Bismuth IIIa型4例, IIIb型3例), 晚期(IV型)8例.

**结果:** 手术切除10例, 非手术胆道支架内引流5例(IV型5例). 随访14例(14/15, 93.3%), 手术切除组随访10例, 中位生存

期14.2 mo(16 d-32.3 mo); 非手术胆道支架内引流组随访4例, 中位生存期3.8 mo(1.3-7.2 mo); 两组中位生存期差异显著( $t = 2.802$ ,  $P < 0.05$ ).

**结论:** 对于中晚期肝门部胆管癌, 联合肝切除的姑息性肝门部胆管癌切除可显著延长患者生存期、提高生活质量, 必要时辅以“架桥式”肝管空肠内引流对提高手术切除率、降低术后胆漏发生率具有重要作用.

**关键词:** 肝门; 胆管癌; 根治性切除; 姑息性切除; “架桥式”肝管空肠内引流

张宗明, 邢海林, 李刚, 刘凯, 朱建平, 宿砚明, 钟华, 郭金星. 中晚期肝门部胆管癌诊治15例. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2272-2274  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2272.asp>

## 0 引言

肝门部胆管癌(hilar cholangiocarcinoma, HCC), 又称 Klatskin 瘤<sup>[1]</sup>, 是指位于肝总管、左右肝管汇合部和左右肝管的癌, 约占肝外胆管癌的 58-75%. 根据 Bismuth 分型<sup>[2,3]</sup>, 将其 III 型、IV 型分别称为中、晚期 HCC. 由于 HCC 早期临床表现不明显, 多数患者就诊时已处于中晚期, 手术切除率低, 术后复发率高, 预后差, 是目前胆道外科面临的一大难题<sup>[4-7]</sup>. 我院 2001-10/2004-12 收治中晚期 HCC 15 例, 现对其外科治疗方式和随访结果进行回顾性分析, 总结报告如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院2001-10 / 2004-12收治的中晚期HCC患者15例, 男性6例, 女性9例, 年龄43-83岁, 平均70.2 ± 11.7岁. 临床表现以皮肤、巩膜黄疸为首发症状者13例(86.7%), 皮肤瘙痒9例(60%), 陶土色大便8例(53.3%).

### 1.2 方法

**1.2.1 实验室检查** 血清 CA19-9 231.4 ± 158.7 kU/L CEA 14.8 ± 1.6 μg/L. 血清总胆红素(TB) 213.9 ± 125.7 μmol/L, 直接胆红素(DB) 139.3 ± 83.7 μmol/L, 谷丙转氨酶(ALT) 2062.1 ± 968.5 nkat/L, 碱性磷酸酶(ALP) 8293.3 ± 5222.7 nkat/L, γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT) 11965.7 ± 7639.9 nkat/L.

**1.2.2 影像学检查** 全组病例均行B型超声检查, 提示肝弥漫性肿大、肝内胆管扩张、肝门部肿物. 13例行CT检查, 显示肝门部胆管占位性病变、肝内胆管扩张. 14例行磁共振胰胆管成像(MRCP)检查, 显示肝门部胆管阻塞、肝内胆管扩张. 9例经内镜逆行性胰胆管造影(ERCP)检查, 显示梗阻部位位于肝门部, 呈鸟嘴状或截断征改变.

**1.2.3 临床分型** 根据影像学检查和手术所见, 按 Bismuth 分型标准<sup>[2,3]</sup>, 判定 IIIa 型 4 例, IIIb 型 3 例, IV 型 8 例.

**统计学处理** 采用 SPSS 10.0 软件, 对手术切除组和非手术胆道支架内引流组的中位生存期差异进行  $t$  检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

**2.1 治疗方式** 手术切除10例, 切除率66.7%(10/15), 其中: (1)根治性切除3例(IIIa型1例, IIIb型2例):行右/左肝管和汇合部肿瘤及以下胆管切除、胆囊切除、肝十二指肠韧带骨骼化, 左、右肝管集合成形、肝管空肠 Roux-en-Y 吻合术, 联合肝方叶切除2例; 左半肝切除1例. (2)姑息性切除4例(IIIa型3例, IIIb型1例), 因肿瘤侵犯门静脉分叉行姑息性右/左肝管和汇合部肿瘤切除、胆囊切除, 左、右肝管集合成形、肝管空肠 Roux-en-Y 吻合术, 联合肝方叶切除3例. (3)姑息性切除加“架桥式”肝管空肠内引流3例(IV型3例), 因肿瘤侵犯门静脉分叉或左、右分支, 行姑息性左、右肝管和汇合部肿瘤切除、胆囊切除, 在左、右肝管集合成形困难或不满意情况下, 将T管长臂或硅胶管一端置入肝管并缝合固定, 另一端置入空肠并造隧道固定, 完成“架桥式”肝管空肠 Roux-en-Y 吻合术, 联合肝方叶切除3例.

非手术胆道支架内引流 5 例, 均为 IV 型, 其中经内镜逆行性胆道支架内引流(ERBD)3例, 经皮肝穿刺胆道支架内引流(PTBD)2例.

全组手术切除或非手术胆道支架内引流病例, 均无胆漏发生.

**2.2 病理检查** 10例手术切除病例中, 高分化腺癌5例, 中分化腺癌2例, 低分化腺癌3例.

**2.3 生存情况** 2005-02/2005-04 对全组病例进行随访, 获得随访资料 14 例, 随访率 93.3%(14/15), 平均生存期为 11.2 mo. 手术切除组随访 10 例, 中位生存期 14.2 mo(16 d-32.3 mo); 非手术胆道支架内引流组随访 4 例, 中位生存期 3.8 mo(1.3-7.2 mo); 两组中位生存期差异显著( $P < 0.05$ ,  $t = 2.802$ ).

## 3 讨论

**3.1 提高早期诊断水平** 肝门部胆管癌起病隐匿, 症状缺乏特异性, 就诊时多数已处于中晚期, 因此提高早期诊断水平具有重要现实意义. 根据本组病例的血生化和影像学检查结果, 对上腹部疼痛不适、食欲不振、乏力、消瘦、皮肤瘙痒的患者应考虑到该病的可能, 积极的血清肝功能、CA19-9、CEA 检查能提示恶性梗阻性黄疸的可能, B超、CT、MRCP 多能明确该病诊断, ERCP 可进一步确诊并了解肿瘤的确切部位和大小.

按 Bismuth 所建议的分型方法<sup>[2,3]</sup>, 根据胆管受累范围, 将肝门部胆管癌分型如下: I 型: 肿瘤位于肝总管, 但未侵犯分叉部及左右肝管; II 型: 肿瘤自肝总管侵犯左、右肝管分叉部; III 型: 肿瘤自肝总管侵犯单侧一级肝管分支(IIIa 型: 侵犯右肝管; IIIb 型: 侵犯左肝



管); IV型:肿瘤同时侵犯肝总管和左右肝管. 本研究将上述 III型、IV型分别称为中、晚期肝门部胆管癌.

**3.2 根治性切除** 肝门部胆管癌的治疗仍以根治性切除为首选<sup>[8-10]</sup>, 要求完全切除肿瘤及其上方胆管 1 cm 以上, 并对肝十二指肠韧带进行骨骼化清扫, 但由于其解剖位置的特殊性, 易于侵犯肝门区重要血管和肝实质, 因此根治性切除率很低. 本组根治性切除 3 例(切除率 30%), 其中联合肝方叶切除 2 例、左半肝切除 1 例, 表明联合肝切除对于提高中晚期肝门部胆管癌的根治性切除率具有重要作用. 新近, 有学者为了提高根治性切除率, 采用联合肝叶和胰十二指肠切除、扩大肝右三叶切除等扩大手术, 尽管有生存 5 a 的病例<sup>[11]</sup>, 但由于伴有较高的手术死亡率和并发症发生率, 该种“激进”的手术方式尚值得商榷<sup>[12]</sup>, 其作用有待于总结更多的病例作出评价.

**3.3 姑息性切除** 中晚期肝门部胆管癌患者, 多因肿瘤侵犯肝门区重要血管而失去根治性切除机会, 姑息性切除就显得非常重要, 其主要目的在于尽可能解除胆管癌阻塞肝门造成的肝内胆汁淤积, 要求尽可能切除肿瘤、通畅胆道引流, 即使肿瘤上方胆管切缘达不到无瘤原则, 也会对提高患者术后生活质量、延长生存时间起到积极的促进作用. 对于侵犯肝门血管的肝门部胆管癌, 有学者认为除了切除肿瘤外, 还需全部或部分切除受侵犯的血管, 并重建或修补血管<sup>[13]</sup>; 但也有学者持相反态度, Launois *et al*<sup>[14]</sup> 报告的肝门部胆管癌切除率为 49.4%, 对于侵犯门静脉或其分支的中晚期患者, 切除受侵血管的 1, 3, 5 a 生存率无明显提高.

**3.4 “架桥式”肝管空肠内引流** 肝门部胆管癌根治性切除后胆道重建较难, 其主要困难在于肝胆管壁较薄, 减压后肝胆管较细, 胆肠吻合难以满意完成, 且易发生胆漏. 本组 3 例 IV 型肝门部胆管癌患者, 术中探查发现肿瘤侵犯门静脉而施行姑息性切除, 并将肿瘤上方的肝管尽可能切除 1 cm 以上, 在将左、右肝管的主分支开口集合成形后, 因肝管成形后的管壁短、薄, 周围肝组织软、脆, 难以完成肝管-空肠吻合, 将 T 管长臂或硅胶管一端置入肝管并缝合固定, 另一端置入空肠并造隧道固定, 完成“架桥式”肝管空肠 Roux-en-Y 吻合术, 术后胆道引流通畅、且无胆漏发生. 该“架桥”术式的成功实施, 对于扩大姑息性切除范围、提高手术切除率、降低术后胆漏发生率具有重要作用, 有待积累更多病例.

**3.5 非手术胆道支架内引流** 该方法是微创性治疗方法之一, 是应用介入放射学技术, 通过 PTC 或 ERCP 将导丝送入肝内胆管或胆总管, 并使其通过肿瘤占据的狭窄部位, 再沿导丝将胆道内支架输送器送至狭窄部位的远端, 然后选择合适的可展性支架通过支架输送器置入胆道狭窄部位, 置入后约两周, 胆道黏膜逐渐覆盖支架, 保持支架的稳定和持续性张力, 引流效果较好, 胆汁不丢失,

患者生活质量高于外引流术者, 适用于肝门部胆管癌晚期, 患者全身情况差, 估计肿瘤不能切除或难以耐受剖腹探查者, 不失为晚期肝门部胆管癌的可供选择的较理想治疗手段之一<sup>[15]</sup>. 本组 5 例 IV 型肝门部胆管癌, 经内镜逆行性胆道支架内引流 3 例, 经皮肝穿刺胆道支架内引流 2 例, 尽管中位生存期仅为 3.8 个月, 但术后黄疸明显下降, 全身严重瘙痒症状减轻或消失, 能适量进食, 生活质量明显提高.

#### 4 参考文献

- 1 Klatskin G. Adenocarcinoma of the hepatic duct at its bifurcation within the porta hepatis. An unusual tumor with distinctive clinical and pathological features. *Am J Med* 1965;38:241-256
- 2 Bismuth H, Corlette MB. Intrahepatic cholangioenteric anastomosis in carcinoma of the hilus of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1975;140:170-178
- 3 Bismuth H, Castaing D, Traynor O. Resection or palliation: priority of surgery in the treatment of hilar cancer. *World J Surg* 1988;12:39-47
- 4 黄志强. 肝门部胆管癌外科治疗面临的问题与出路. *中华实验外科杂志* 2004;21:773-775
- 5 Hemming AW, Reed AI, Fujita S, Foley DP, Howard RJ. Surgical management of hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2005;241:693-699
- 6 Safioleas MC. A new technique for the palliative treatment of high bile duct cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;52:378-380
- 7 Lang H, Sotiropoulos GC, Fruhauf NR, Domland M, Paul A, Kind EM, Malago M, Broelsch CE. Extended hepatectomy for intrahepatic cholangiocellular carcinoma (ICC): when is it worthwhile? Single center experience with 27 resections in 50 patients over a 5-year period. *Ann Surg* 2005;241:134-143
- 8 Yi B, Zhang BH, Zhang YJ, Jiang XQ, Zhang BH, Yu WL, Chen QB, Wu MC. Surgical procedure and prognosis of hilar cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:453-457
- 9 Yi B, Zhang BH, Zhang YJ, Jiang XQ, Zhang BH, Yu WL, Cheng QB, Wu MC. Analysis of the relation between surgery and prognosis of hilar cholangiocarcinoma. *Zhonghua WaiKe ZaZhi* 2005;43:842-845
- 10 Ebata T, Nagino M, Kamiya J, Uesaka K, Nagasaka T, Nimura Y. Hepatectomy with portal vein resection for hilar cholangiocarcinoma: audit of 52 consecutive cases. *Ann Surg* 2003;238:720-727
- 11 Akatsu T, Shimazu M, Kawachi S, Tanabe M, Aiura K, Wakabashi G, Ueda M, Sakamoto M, Kitajima M. Long-term survival of intrahepatic cholangiocarcinoma with hilar lymph node metastasis and portal vein involvement. *Hepatogastroenterology* 2005;52:603-605
- 12 Zervos EE, Pearson H, Durkin AJ, Thometz D, Rosemurgy P, Kelley S, Rosemurgy AS. In-continuity hepatic resection for advanced hilar cholangiocarcinoma. *Am J Surg* 2004;188:584-588
- 13 Klempnauer J, Ridder GJ, von Wasielewski R, Werner M, Weimann A, Pichlmayr R. Resectional surgery of hilar cholangiocarcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors. *J Clin Oncol* 1997;15:947-954
- 14 Launois B, Terblanche J, Lakehal M, Catheline JM, Bardaxoglou E, Landen S, Campion JP, Sutherland F, Meunier B. Proximal bile duct cancer: high resectability rate and 5-year survival. *Ann Surg* 1999;230:266-275
- 15 Singhal D, van Gulik TM, Gouma DJ. Palliative management of hilar cholangiocarcinoma. *Surg Oncol* 2005;14:59-74

• 临床经验 •

# 肝病患者 IgA 和 sIgA 含量变化的临床意义

刘冬妍, 刘沛

刘冬妍, 刘沛, 中国医科大学附属第二医院传染科 辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 刘沛, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学附属第二医院传染科. sylupei2003@yahoo.com.cn

电话: 024-83956962

收稿日期: 2005-06-30 接受日期: 2005-07-15

## Changes of IgA and sIgA and its clinical significant in hepatic diseases

Dong-Yan Liu, Pei Liu

Dong-Yan Liu, Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sylupei2003@yahoo.com.cn

Received: 2005-06-30 Accepted: 2005-07-15

### Abstract

**AIM:** To investigate the values of IgA and sIgA detection in the clinical diagnosis of hepatic diseases.

**METHODS:** Patients with acute hepatitis (AH,  $n = 35$ ), chronic severe hepatitis (CSH,  $n = 9$ ), chronic hepatitis (CH,  $n = 67$ ) and liver cirrhosis (LC,  $n = 57$ ) were involved. The level of IgA was assayed by rate nephelometry, and the level of sIgA was detected by radioimmunoassay.

**RESULTS:** The levels of fecal IgA and sIgA were notably elevated in patients with AH, CSH, CH and LC as compared with those in the controls (IgA:  $100 \pm 47$ ,  $251 \pm 178$ ,  $80 \pm 24$ ,  $145 \pm 164$  mg/L vs  $< 67$  mg/L,  $P < 0.01$ ; sIgA:  $88 \pm 96$ ,  $326 \pm 237$ ,  $88 \pm 121$ ,  $104 \pm 109$  mg/L vs  $13 \pm 10$  mg/L,  $P < 0.01$ ). IgA was positively correlated with sIgA ( $r = 0.4371$ ,  $P < 0.01$ ). The levels of serum IgA and sIgA were markedly increased in patients with AH, CSH, CH and LC as compared with those in the controls (IgA:  $3.1 \pm 1.1$ ,  $3.4 \pm 1.8$ ,  $3.3 \pm 1.7$ ,  $4.9 \pm 3.3$  g/L vs  $1.6 \pm 0.2$  g/L,  $P < 0.01$ ; sIgA:  $31.1 \pm 25.8$ ,  $80.3 \pm 25.4$ ,  $30.5 \pm 24.1$ ,  $50.0 \pm 20.5$   $\mu$ g/L vs  $23.4 \pm 8.2$   $\mu$ g/L,  $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The fecal IgA and sIgA were not correlated with serum IgA and sIgA, and serum IgA was not correlated with serum sIgA ( $P > 0.05$ ). In patients with CH, CSH and LC, serum sIgA was significantly correlated with alkaline phosphatase ( $r = 0.523$ ,  $P < 0.01$ )

and total bilirubin ( $r = 0.4581$ ,  $P < 0.01$ ). In patients with AH, serum sIgA level was correlated with alanine aminotransferase ( $r = 0.4692$ ,  $P < 0.01$ ), total bilirubin ( $r = 0.4265$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** The detection of IgA and sIgA can be used in the clinical diagnosis of hepatic diseases.

**Key Words:** IgA; sIgA; Hepatic disease

Liu DY, Liu P. Changes of IgA and sIgA and its clinical significant in hepatic diseases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(18):2275-2277

### 摘要

**目的:** 探讨肝脏病变时IgA和sIgA对临床诊断的意义。

**方法:** 肝病患者共168例, 包括急性肝炎35例, 慢性重症肝炎9例, 慢性肝炎67例, 肝硬化57例, 用免疫速率比浊法检测IgA, 用放射免疫分析法检测sIgA。

**结果:** 肝脏患者粪便IgA, sIgA均显著高于正常对照组 (IgA:  $100 \pm 47$ ,  $251 \pm 178$ ,  $80 \pm 24$ ,  $145 \pm 164$  mg/L vs  $< 67$  mg/L,  $P < 0.01$ ; sIgA:  $88 \pm 96$ ,  $326 \pm 237$ ,  $88 \pm 121$ ,  $104 \pm 109$  mg/L vs  $13 \pm 10$  mg/L,  $P < 0.01$ ), IgA和sIgA呈显著正相关 ( $r = 0.4371$ ,  $P < 0.01$ )。血清中IgA和sIgA显著高于正常对照组 (IgA:  $3.1 \pm 1.1$ ,  $3.4 \pm 1.8$ ,  $3.3 \pm 1.7$ ,  $4.9 \pm 3.3$  g/L vs  $1.6 \pm 0.2$  g/L,  $P < 0.01$ ; sIgA:  $31.1 \pm 25.8$ ,  $80.3 \pm 25.4$ ,  $30.5 \pm 24.1$ ,  $50.0 \pm 20.5$  g/L vs  $23.4 \pm 8.2$  g/L,  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 粪便IgA和sIgA与血清中IgA, sIgA含量无相关性, 血清中IgA与血清中sIgA亦无相关性。慢性肝炎、慢性重症肝炎、肝硬化患者血清sIgA与碱性磷酸酶 ( $r = 0.523$ ,  $P < 0.01$ )、总胆红素 ( $r = 0.4581$ ,  $P < 0.01$ ) 有相关性; 急性肝炎血清sIgA与ALT ( $r = 0.4692$ ,  $P < 0.01$ )、总胆红素 ( $r = 0.4265$ ,  $P < 0.01$ ) 有相关性。

**结论:** 检测粪便中和血清中IgA和sIgA对肝脏的临床诊断有重要的临床意义。

**关键词:** IgA; sIgA; 肝病

刘冬妍, 刘沛. 肝病患者IgA和sIgA含量变化的临床意义. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2275-2277

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2275.asp>

### 0 引言

肠黏膜 sIgA 是肠道主要的免疫球蛋白, 是肠道的第一线的免疫防御, 对黏膜固有的和入侵的病原体具有抵抗作用。我们检测 168 例各型肝炎和肝硬化患者血清和粪

表1 肝病患者粪便IgA、sIgA含量及血清肝功的变化 (mean ± SD)

分组	n	IgA(mg/L)	sIgA(mg/L)	ALT(nkat/L)	ALP(nkat)	D-BIL(μmol/L)
对照组	30	<67	13 ± 10	260 ± 20	528 ± 43	18 ± 1
重症肝炎	9	251 ± 178 <sup>b</sup>	326 ± 237 <sup>b</sup>	8 098 ± 438	3 492 ± 510	588 ± 107
肝硬化	57	145 ± 164 <sup>b</sup>	104 ± 109 <sup>b</sup>	5 748 ± 342	3 151 ± 423	496 ± 189
慢性肝炎	67	80 ± 24 <sup>b</sup>	88 ± 121 <sup>b</sup>	5 133 ± 363	2 924 ± 445	451 ± 116
急性肝炎	35	100 ± 47 <sup>b</sup>	88 ± 96 <sup>b</sup>	5 613 ± 377	3 744 ± 362	489 ± 100

<sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组.

表2 肝病患者血清IgA, IgM, IgG, sIgA含量的变化 (mean ± SD)

分组	n	IgA(g/L)	IgM(g/L)	IgG(g/L)	SigA(μg/L)
对照组	50	1.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2	8.2 ± 2.4	23.4 ± 8.2
重症肝炎	9	3.4 ± 1.8 <sup>b</sup>	2.0 ± 1.5 <sup>b</sup>	18.7 ± 6.5 <sup>b</sup>	80.3 ± 25.4 <sup>b</sup>
肝硬化	57	4.9 ± 3.3 <sup>b</sup>	1.9 ± 1.2 <sup>b</sup>	19.4 ± 6.7 <sup>b</sup>	50.0 ± 20.5 <sup>b</sup>
慢性肝炎	67	3.3 ± 1.7 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	16.3 ± 5.1 <sup>b</sup>	30.5 ± 24.1 <sup>a</sup>
急性肝炎	35	3.1 ± 1.1 <sup>b</sup>	2.1 ± 1.2 <sup>b</sup>	13.1 ± 3.4 <sup>b</sup>	31.1 ± 25.8 <sup>a</sup>

<sup>b</sup>P<0.01, <sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组.

便中 IgA 和 sIgA 的含量, 以探讨在各种肝病患者肠道免疫防御的变化情况.

## 1 材料和方法

1.1 材料 住院肝病患者168例, 男123例, 女45例, 年龄17-94岁, 急性肝炎(包括甲、乙、丙、戊)35例, 慢性重症肝炎9例, 慢性肝炎(包括乙、丙)67例, 肝硬化(包括肝炎后肝硬化和酒精性肝硬化)57例. 粪便正常对照组为我院五官科住院患者(肝功能正常, HBV和HCV血清标志物阴性)30例, 血清正常对照组为我院体检中心健康者(肝功能正常, HBV和HCV血清标志物阴性)50例. 取患者清晨第一次新鲜粪便称质重, 按1:10(m/m)加入0.01 mol/L pH7.4 PBS, 对照组粪便按1:2加入0.01 mol/L pH7.4 PBS, 混匀, 漩涡振荡器充分震荡5 min, 以10 000 g低温离心30 min, 取上清-30℃冰冻保存待用. 全部受检者于清晨空腹抽血, 分离血清-30℃冰冻保存.

1.2 方法 IgA, IgG, IgM用免疫散射比浊法检测, 仪器和试剂为库尔特公司提供, 血清正常参考值分别为 IgA 1.0-3.2 g/L, IgG 7.0-15.2 g/L, IgM 0.4-1.6 g/L; sIgA用中国原子能科学院提供 sIgA放射免疫分析药盒, 检测仪器为美国德普 γ 计数器, 按说明书操作; 碱性磷酸酶 (ALP)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、总胆红素 (T-BIL) 分别用优化速率法、连续监测法和亚硝酸盐法, 采用日本日立公司生产 7600 全自动生化分析仪操作, 正常参考值分别为 ALP 750-2 200 nkat/L、ALT 83-667 nkat/L、T-BIL 1.7-20.5 μmol/L.

统计学处理 采用SPSS10.0进行统计学分析, 以 P<0.05时有显著性差异.

## 2 结果

肝病患者粪中IgA和sIgA含量均明显高于正常对照组

(P<0.01), 其增高幅度随病变严重程度而增高(表1), 总IgA和sIgA呈显著正相关( $r = 0.4371$ ,  $P<0.01$ ). 肝病患者血清中IgA和sIgA含量均明显高于正常对照组(P<0.01)(表2). 粪中IgA和sIgA与血清中IgA, sIgA含量无相关性( $r = 0.1547$ ,  $r = 0.1593$ ,  $r = 0.1210$ ,  $r = 0.1135$ ), 血清中IgA与血清中sIgA亦无相关性( $r = 0.1983$ ). 慢性肝炎、慢性重症肝炎、肝硬化患者血清sIgA与ALP( $r = 0.5230$ ,  $P<0.01$ )、D-BIL( $r = 0.458$ ,  $P<0.01$ )有相关性; 急性肝炎患者血清sIgA与ALT( $r = 0.4692$ ,  $P<0.01$ )、D-BIL( $r = 0.4265$ ,  $P<0.01$ )有相关性.

## 3 讨论

肠道 sIgA 主要由肠黏膜中的 IgA 浆细胞分泌出聚合 IgA, 然后与上皮细胞分泌的 SC 结合, 继之被上皮细胞以内化的方式携入胞内形成吞饮小泡, 在小泡内被转运至上皮细胞的顶端, 并以 IgA-SC 复合物的形式被胞吐释放入肠腔. 血清 sIgA 的来源有: 一是 sIgA 直接由胆汁反流入血; 二是肝内膜相 SC 游离入血后迅速与血中 pIgA 结合而成. 一般而言, 黏膜病变如炎症、肿瘤只引起局部 SC 改变, 极少引起大量 SC 入血, 故血清 sIgA 多代表肝胆疾病. 人体存在聚和 IgA 的肠肝循环, 即入血的聚合 IgA 经肝脏重回肠腔, 因此肝脏是肠道黏膜免疫系统的组成部分. sIgA 在肠道免疫中起重要作用, 它能与细菌<sup>[1]</sup>和病毒<sup>[2-4]</sup>的特异性抗原相结合或结合在其他毒性分子上, 阻止他们粘附在黏膜表面. 还能排除已穿透上皮细胞层的感染因子, 并与细菌过度生长、细菌易位和肠道渗透性增高呈反比关系<sup>[5]</sup>, 它在抗感染中起重要作用<sup>[6,7]</sup>.

我们发现肝病患者 IgA, sIgA 显著升高, 随病变严重程度增高顺序依次为: 重症肝炎、肝硬化、急性肝炎、慢性肝炎, 粪中 IgA 和 sIgA 呈显著正相关. 肝硬化等



严重肝病时,内毒素(LPS)产生和吸收增多,引起内毒素血症,LPS能刺激机体产生抗LPS的抗体<sup>[8,9]</sup>,用伤寒沙门氏菌通过口腔、鼻腔、直肠和阴道免疫机体发现直肠免疫后,在结直肠分泌液和粪便内能诱导大量抗LPS-IgA抗体,此学者认为此菌能进攻不同的黏膜组织,诱导长期的局部抗LPS的IgA反应<sup>[10]</sup>.有学者发现服用适量的LPS后肺合成sIgA以45%增加,没有任何毒性作用或致热作用<sup>[11]</sup>,这可能是IgA,sIgA升高的一个原因.另外活动性肝病时常伴有炎症性肠病、自身免疫性肠病和感染性肠病,在感染过程中sIgA可升高,炎症性肠病时B淋巴细胞激活,IgA,IgM,IgG较正常肠黏膜产生更多.再有在重症肝炎时有抗肝炎病毒的特异性抗体和自身抗体产生,以及肝库氏细胞功能失调,失去对肠道抗原的处理能力,由肠道吸收的细菌抗原及病毒抗原形成的抗体增多.肝病患者血中IgA,IgG,IgM,sIgA亦显著增高,血清中sIgA与IgA无相关性,有学者发现HIV感染者血清中升高的sIgA与血清中的IgA及多聚IgA无相关性,认为血清中sIgA可能由黏膜部位产生<sup>[12]</sup>.本研究结果患者粪中IgA和sIgA与血清中IgA,sIgA也无相关性,提示血清sIgA与肠道sIgA的合成是相互独立的<sup>[13]</sup>.到底血清中sIgA来源于何处有待于进一步探讨.尽管血清sIgA与IgA无相关性,但是sIgA与碱性磷酸酶、丙氨酸氨基转移酶、总胆红素呈正相关,说明sIgA与病变程度有一定的关系,检测sIgA有助于临床对肝脏病变的鉴别诊断.由上可知,检测肝病患者IgA,sIgA对临床诊断有重要意义,尤其粪便的检测,由于取材简便,方便患者,减少抽血的麻烦,易于临床应用.

#### 4 参考文献

- 1 Kudsk KA. Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. *Am J Surg* 2002;183:390-398
- 2 Mantis NJ, Farrant SA, Mehta S. Oligosaccharide side chains on human secretory IgA serve as receptors for ricin. *J Immunol* 2004;172:6838-6845
- 3 Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, Lamm ME. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol Today* 1993;14:430-435
- 4 Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 1997;3:42-47
- 5 Deitch EA, Xu D, Qi L, Berg R. Elemental diet-induced immune suppression is caused by both bacterial and dietary factors. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1993;17:332-336
- 6 Mayer L. Review article: Local and systemic regulation of mucosal immunity. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:81-85
- 7 Mayer L. The role of the epithelium in mucosal immunity. *Res Immunol* 1997;148:498-504
- 8 Parlesak A, Schafer C, Bode C. IgA against gut-derived endotoxins: does it contribute to suppression of hepatic inflammation in alcohol-induced liver disease? *Dig Dis Sci* 2002;47:760-766
- 9 Vindurampulle CJ, Attridge SR. Impact of vector priming on the immunogenicity of recombinant Salmonella vaccines. *Infect Immun* 2003;71:287-297
- 10 Hopkins S, Kraehenbuhl JP, Schodel F, Potts A, Peterson D, de Grandi P, Nardelli-Haeffliger D. A recombinant Salmonella typhimurium vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infect Immun* 1995;63:3279-3286
- 11 Kofler N, Wolf H. [Stimulation of synthesis of secretory immunoglobulin A in the lung by oral immunization: an approach with therapeutic relevance?] *Wien Klin Wochenschr* 1996;108:432-437
- 12 Vincent C, Cozon G, Zittoun M, Mellquist M, Kazatchkine MD, Czerkinsky C, Revillard JP. Secretory immunoglobulins in serum from human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. *J Clin Immunol* 1992;12:381-388
- 13 Bartholomeusz RC, Forrest BD, Labrooy JT, Ey PL, Pyle D, Shearman DJ, Rowley D. The serum polymeric IgA antibody response to typhoid vaccination; its relationship to the intestinal IgA response. *Immunology* 1990;69:190-194

电编 张勇 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 全直肠系膜切除术切缘血管内皮生长因子检测的临床意义

战学雷, 田素礼

战学雷, 田素礼, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 战学雷, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路 246 号, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科. zhanxuelei@126.com

电话: 0451-86605575

收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-13

## Clinical significance of detection for vascular endothelial growth factor in resection margin following total mesorectal excision

Xue-Lei Zhan, Su-Li Tian

Xue-Lei Zhan, Su-Li Tian, the Third Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Xue-Lei Zhan, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zhanxuelei@126.com

Received: 2005-05-28 Accepted: 2005-06-13

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression and its significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the resection margin following total mesorectal excision (TME) for human rectal cancer.

**METHODS:** VEGF was detected in the tissue specimens of cancer, distal mesorectal margin (DMM), circumferential resection margin (CRM) and outer pelvic fascia from 60 rectal cancer patients received TME. The pathological data were retrospectively analyzed.

**RESULTS:** VEGF expression was significantly higher in the tissues of rectal cancer than that in the normal tissues (54/60 vs 2/20,  $P < 0.001$ ). VEGF was also expressed in tissues of CRM (9/60). However, no VEGF expression was detected in the tissues of DMM and outer pelvic fascia. VEGF expression was closely related with the differentiation degree, Dukes staging and lymph node metastasis ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** VEGF is highly expressed in tissues of rectal cancer, and negatively or weakly positively expressed in DMM and CRM.

**Key Words:** Rectal cancer; Distal mesorectal margin; Circumferential resection margin; Outer pelvic fascia;

Total mesorectal excision; Vascular endothelial growth factor

Zhan XL, Tian SL. Clinical significance of detection for vascular endothelial growth factor in resection margin following total mesorectal excision. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;(18):2278-2281

### 摘要

**目的:** 探讨血管内皮生长因子(VEGF)在直肠癌及其切缘的表达及其临床意义。

**方法:** 取实施TME的60例直肠癌患者直肠癌组织(I)、直肠系膜远端切缘(II)、直肠系膜周围切缘(III)、盆筋膜壁层(IV)病理标本, 采用免疫组化SP法对标本进行VEGF检测, 并回顾性分析临床病理学资料。

**结果:** 直肠癌组织中VEGF高度表达(54/60), 肿瘤相对的盆筋膜脏层(直肠系膜周围切缘)中有VEGF存在(9/60), 在直肠系膜远端切缘及盆筋膜壁层标本中未见VEGF表达。VEGF在直肠癌组织中的表达有高度特异性。VEGF表达与直肠癌分化程度、Dukes分期及淋巴结转移密切相关( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

**结论:** VEGF在直肠癌组织中高度表达, 直肠远端系膜切缘及直肠系膜周围切缘不表达或表达为弱阳性。

**关键词:** 直肠癌; 直肠系膜远端切缘; 直肠系膜周围切缘; 盆筋膜壁层; 全直肠系膜切除术; 血管内皮生长因子

战学雷, 田素礼. 全直肠系膜切除术切缘血管内皮生长因子检测的临床意义. *世界华人消化杂志* 2005;(18):2278-2281

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2278.asp>

### 0 引言

包括直肠癌在内的实体肿瘤的生长与转移依赖血管新生的理论已被大量实验和临床研究证实, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为最重要的促血管生成因子, 在肿瘤发生、发展中起重要作用<sup>[1-4]</sup>。全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME)已成为一种标准的直肠癌根治技术, 已被越来越多的外科医生应用于临床<sup>[5-7]</sup>。国外学者的研究表明, VEGF在直肠癌组织中、癌组织侵袭前缘以及微小转移灶中的表达比率可以作为直肠癌预后的一种独立、敏感和有效的标志物<sup>[8-12]</sup>。我们拟通过免疫组化方法对TME手术后系膜切缘VEGF的检测, 为证实TME技

术在直肠癌治疗中的价值提供分子水平的依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集本院2004-01/2005-03行TME的60例直肠癌患者的病理标本,术前未接受过抗肿瘤治疗。男22例,女38例,平均年龄34—78岁。所有病例均经病理诊断证实。其中溃疡型33例(55.0%),肿块型4例(6.7%),浸润型26例(38.3%);腺瘤癌变3例(5.0%),高分化腺癌18例(30.0%),中、低分化腺癌23例(38.3%),黏液腺癌13例(21.7%),印戒细胞癌3例(5.0%)。Dukes A期3例(5.0%),B期27例(45.0%),C期28例(46.7%),D期2例(3.3%);每例分别于直肠癌组织(I)、直肠系膜远端切缘(II)、直肠系膜周围切缘(III)、盆筋膜壁层(IV)取病理标本(大小约1 cm×1 cm×1 cm)作为试验组;另选取20例直肠腺瘤病例的正常肠组织(I')及正常结肠系膜(II')作阴性对照组。标本置于40 g/L甲醛固定液,常规石蜡包埋,连续切片2张,4 μm厚连续切片。抗VEGF和UltraSensitiveTM S-P超敏试剂盒购于福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 方法 进行常规HE染色组织学分析和VEGF免疫组化S-P法检测。VEGF采用0.01 mol/L(pH6.0)柠檬酸盐缓冲液高温、高压抗原修复,检测时每批染色均设阴性对照(以PBS代替一抗)。VEGF阳性为细胞质或细胞膜染色呈棕黄色,在显微镜下(×400)计数至少5个随机视野,取平均值。阳性细胞数<10%为(-),11-25%为(+),26-50%为(++),≥51%为(+++)。同时,收集该组患者的临床病理资料,包括患者的年龄、性别、肿瘤的部位、类型、分化程度、分期、有无淋巴结转移以及远处转移等进行回顾性分析。

**统计学处理** 采用SPSS10.0统计分析软件包处理,数据统计采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

2.1 VEGF在不同组织中的表达情况 试验组直肠癌组织(I)标本VEGF染色为阳性,其余标本染色为阴性或弱阳性;对照组各个标本染色均为阴性或弱阳性。VEGF在癌组织中的表达与对照组组织中的表达存在显著差异( $P<0.05$ ,表1)

2.2 VEGF与临床病理指标的关系 经 $\chi^2$ 检验VEGF表达与

直肠癌分化程度、Dukes分期及淋巴结转移密切相关( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。低分化腺癌VEGF阳性率高于高分化腺癌( $P<0.01$ );Dukes分期的C和D期VEGF阳性率(93.3%)明显高于A和B期(43.3%);有淋巴结转移的病例VEGF阳性率(93.8%)显著高于无淋巴结转移病例(85.7%)。但是VEGF表达与患者年龄、性别、浸润深度以及远处器官转移不相关( $P>0.05$ ,表2)。

表2 直肠癌组织VEGF表达与临床病理指标的关系

	n	VEGF表达强度	
		-	≥ +
性别			
男	22	2	20
女	38	4	34
年龄(岁)			
<50	16	1	15
≥50	44	5	39
肿瘤大小			
<5cm	23	3	20
≥5cm	37	3	24
肿瘤类型			
肿块型	4	0	4
溃疡型	33	4	29
浸润型	26	2	24
分化程度			
腺瘤癌变	3	3	0
高分化腺癌	18	2	16
中、低分化腺癌	23	1	22
黏液腺癌	13	0	13
印戒细胞癌	3	0	3
浸润深度			
肌层	27	3	24
全层	33	3	30
淋巴结转移			
无	28	4	24
有	32	2	30
远处转移			
无	59	6	53
有	1	0	1
Dukes分期			
A+B	30	4	26
C+D	30	2	28

## 3 讨论

直肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,约占大肠癌的60%,近年来发病率呈明显上升的趋势<sup>[13]</sup>。手术根治性切除仍是直肠癌的主要治疗方法。Heald *et al*<sup>[14-16]</sup>提出切除标本的直肠系膜完整无撕裂,在肉眼及镜下无切缘累及(circumference margin involvement, CMI)是判断根治手术是否成功的重要因素。TME的彻底与否须经病理医生严格检查后判定。“彻底的”TME须做到直肠远端系膜边缘(distal mesorectal margin, DMM)和直肠系膜周围切除边缘(circumferential resection margin, CRM)阴性。直肠系膜切除不足,CRM(+)常导致局部复发。DMM(+)及CRM(+)是肿瘤进展的预后因素。目前病理的“R”分级已取代传统的外科医生根据手

表1 VEGF的表达情况

分组		VEGF表达强度			
		-	+	++	+++
试验组	I	6	15	31	8
	II	60	0	0	0
	III	51	9	0	0
	IV	60	0	0	0
对照组	I'	53	7	0	0
	II'	60	0	0	0



术判定所谓的“治愈切除”的概念。直肠癌手术  $R_0$  代表直肠系膜完整切除, 且 CRM(-) 及 DMM(-);  $R_1$  为镜下播散, 有癌残留;  $R_2$  为肉眼播散, 有癌残留。理想的 TME 应做到  $R_0$ , 即直肠系膜的完整切除并且 CRM(-) 及 DMM(-)。但是“肉眼及镜下”的观察毕竟在一定程度上对发现微小转移灶有相当局限性<sup>[17, 18]</sup>。肿瘤的浸润和转移是肿瘤细胞与细胞外基质 (ECM) 相互作用的结果<sup>[19, 20]</sup>, 此过程远远早于肉眼和常规病理切片检查所见<sup>[21, 22]</sup>。肿瘤及其微小转移癌巢基质所分泌的 VEGF 不仅具有血管相和淋巴相作用, 还可以通过降低同质性黏附作用使肿瘤细胞容易从瘤体脱落, 并与基质的胶原纤维黏附, 有利于肿瘤细胞的运动和转移灶形成<sup>[23-25]</sup>。而业已证实, VEGF 可以通过简单、廉价的免疫组化法检出<sup>[26]</sup>。本试验显示, VEGF 在肿瘤及其累及区域表达为阳性或强阳性, 在正常组织中不表达或为弱阳性; VEGF 表达强度与直肠癌的分化程度、Dukes 分期及淋巴结转移密切相关, 但与患者的年龄、性别、肿瘤大小、部位、浸润深度以及远处器官转移没有明显相关性。我们通过对直肠癌组织及其周围组织的 VEGF 检测, 证明直肠癌存在着局部的累及<sup>[27, 28]</sup>。直肠系膜远端切缘和直肠系膜周围切缘不仅在镜下未见癌细胞, 实现了  $R_0$ <sup>[29]</sup>, 而且在分子水平上通过 VEGF 的表达证明了 CRM(-) 及 DMM(-)。由此在分子水平论证了 TME 在直肠癌治疗中的价值。与既往的方法相比, 本试验快捷、检出率高, 更能说明直肠癌存在局部病变, TME 彻底切除了直肠癌的局部病变。通过精确取材、减少试验步骤, 降低了假阴性和假阳性的发生几率, 提高了试验的准确性。

然而, 在本试验中, 我们观察到, 有 9 例标本直肠系膜周围切缘常规病理检查为阴性, 而采用免疫组化 S-P 法检测 VEGF 时结果却为阳性。这 9 例病例究竟是假阳性还是癌巢残留或仅表明其恶性程度更高, 尚需要更进一步的研究。

#### 4 参考文献

- Ogawa Y, Chung YS, Nakata B, Takatsuka S, Maeda K, Sawada T, Kato Y, Yoshikawa K, Sakurai M, Sowa M. Microvessel quantitation in invasive breast cancer by staining for factor VIII-related antigen. *Br J Cancer* 1995;71:1297-1301
- Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 2003;3:643-651
- Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29:15-18
- Valter MM, Hugel A, Huang HJ, Cavenne WK, Wiestler OD, Pietsch T, Wernert N. Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:5608-5614
- Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982;69:613-616
- Havenga K, DeRuiter MC, Enker WE, Welvaart K. Anatomical basis of autonomic nerve-preserving total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 1996;83:384-388
- Enker WE. Total mesorectal excision--the new golden standard of surgery for rectal cancer. *Ann Med* 1997;29:127-133
- Takeda A, Shimada H, Imaseki H, Okazumi S, Natsume T, Suzuki T, Ochiai T. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in colorectal cancer patients: correlation with clinicopathological factors and tumor markers. *Oncol Rep* 2000;7:333-338
- Ishigami SI, Arie S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, Mori A, Onodera H, Imamura M. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;78:1379-1384
- Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Kuroda T, Chayama K. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D expression by the organ microenvironment in human colon carcinoma. *Eur J Cancer* 2004;40:1604-1609
- Cheng J, Slavin RE, Gallagher JA, Zhu G, Biehl TR, Swanson LL, Hansen PD. Expression of vascular endothelial growth factor and receptor flk-1 in colon cancer liver metastases. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004;11:164-170
- Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P, Imperatore V, Romano C, Ciardiello F, Agostini B, Pignatelli C. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004;10:3490-3499
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108
- Heald RJ. Total mesorectal exsicion (TME). *Acta Chir Lugosl* 2000;47:17-18
- Kockerling F, Yildirim C, Rose J, Scheidbach H, Geers P. Total mesorectal excision with the water-jet-dissection. Technique and results. *Tech Coloproctol* 2004;8:S217-S225
- Arbman G, Nilsson E, Hallbook O, Sjobahl R. Local recurrence following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 1996;83:375-379
- Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette L. Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. *J Clin Oncol* 2005;23:2020-2027
- Guzinska-Ustymowicz K, Kemona A. Transforming growth factor beta can be a parameter of aggressiveness of pT1 colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:1193-1195
- Li Z, Ren Y, Wu QC, Lin SX, Liang YJ, Liang HZ. Macrophage migration inhibitory factor enhances neoplastic cell invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinase 9 and interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:107-114
- Das A, Tan WL, Smith DR. Expression of extracellular matrix markers in benign meningiomas. *Neuropathology* 2003;23:275-281
- Wang Y, Jatko T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, McLeod HL, Atkins D. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1564-1571
- Takayama S, Ishii S, Ikeda T, Masamura S, Doi M, Kitajima M. The relationship between bone metastasis from human breast cancer and integrin alpha(v)beta3 expression. *Anticancer Res* 2005;25:79-83
- Barnhill RL, Piepkorn MW, Cochran AJ, Flynn E, Karaoli T, Folkman J. Tumor vascularity, proliferation, and apoptosis in human melanoma micrometastases and macrometastases. *Arch Dermatol* 1998;134:991-994
- Nieder C, Schlegel J, Andratschke N, Thamm R, Grosu AL, Molls M. The role of growth factors in central nervous system tumours. *Anticancer Res* 2003;23:1681-1686
- Yang XF, Yang L, Mao XY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. Pathobiological behavior and molecular mechanism of signet ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of the stomach: a comparative study. *World J Gastroenterol* 2004;10:750-754

- 26 Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 1991;174:1275-1278
- 27 Kapiteijn E, van De Velde CJ. European trials with total mesorectal excision. *Semin Surg Oncol* 2000;19:350-357
- 28 Wang Z, Zhou ZG, Wang C, Zhao GP, Chen YD, Gao HK, Zheng XL, Wang R, Chen DY, Liu WP. Microscopic spread of low rectal cancer in regions of mesorectum: pathologic assessment with whole-mount sections. *World J Gastroenterol* 2004;10:2949-2953
- 29 Stocchi L, Nelson H, Sargent DJ, O'Connell MJ, Tepper JE, Krook JE, Beart R Jr. Impact of surgical and pathologic variables in rectal cancer: a United States community and cooperative group report. *J Clin Oncol* 2001;19:3895-3902

电编 张勇 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 临床经验 •

## 善宁对急性胰腺炎患者血小板参数变化的影响

黄坚, 陆士奇, 陈建荣

黄坚, 陆士奇, 陈建荣, 苏州大学附属第一医院急诊内科 江苏省苏州市 215006

通讯作者: 黄坚, 215006, 江苏省苏州市, 苏州大学附属第一医院急诊内科. huanganran2004@yahoo.com.cn

电话: 0512-67790752 传真: 0512-65292927

收稿日期: 2005-08-03 接受日期: 2005-08-26

### Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis

Jian Huang, Shi-Qi Lu, Jian-Rong Chen

Jian Huang, Shi-Qi Lu, Jian-Rong Chen, Department of Emergency and Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jian Huang, Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. huanganran2004@yahoo.com.cn

Received: 2005-08-03 Accepted: 2005-08-26

### Abstract

**AIM:** To investigate the changes of platelet parameters in patients with mild and severe acute pancreatitis (MAP and SAP) after treated with octreotide.

**METHODS:** The full-automatic blood cell counter was used to obtain the platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV), and platelet distribution width (PDW) in the patients with MAP and SAP before and 1 wk after treatment with octreotide.

**RESULTS:** The platelet parameters of the patients with MAP were not significantly different from that of the normal controls. One week after treatment, there was still no significant change in the PLT. However, the

MPV and PDW were increased markedly ( $10.88 \pm 2.40$  vs  $10.11 \pm 1.66$ ,  $P < 0.05$ ;  $17.98 \pm 4.41$  vs  $16.62 \pm 1.38$ ,  $P < 0.05$ ). In patients with SAP, the PLT was decreased markedly ( $161.61 \pm 68.30$  vs  $191.60 \pm 31.98$ ,  $P < 0.05$ ), and the MPV and PDW were increased markedly ( $11.82 \pm 2.33$  vs  $9.81 \pm 0.79$ ,  $P < 0.01$ ;  $19.33 \pm 7.07$  vs  $16.36 \pm 0.51$ ,  $P < 0.05$ ) as compared with those in the normal controls. One week after treatment, the PLT was notably elevated ( $251.61 \pm 84.07$  vs  $161.61 \pm 68.30$ ,  $P < 0.01$ ), while the MPV and PDW were not changed ( $P > 0.05$ ) as compared with those before treatment. For SAP, the PLT increased more ( $112.53 \pm 89.31$  vs  $57.81 \pm 68.24$ ,  $P < 0.05$ ), and the MPV and PDW decreased more ( $1.29 \pm 2.79$  vs  $-0.17 \pm 2.04$ ,  $P < 0.01$ ;  $2.75 \pm 8.81$  vs  $-0.89 \pm 3.44$ ,  $P < 0.01$ ) at 1 wk in the octreotide treatment patients as compared with those of general treatment ones.

**CONCLUSION:** The platelet parameters can reflect the severeness of acute pancreatitis. Octreotide can improve the microcirculation by decreasing MPV and PDW, increasing PLT.

**Key Words:** Acute pancreatitis; Octreotide; Platelet count; Mean platelet volume; Platelet distribution width

Huang J, Lu SQ, Chen JR. Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2281-2283

### 摘要

**目的:** 研究血小板参数在轻症急性胰腺炎(MAP)与重症急性胰腺炎(SAP)中的变化特点及善宁治疗后对其的影响。

- 26 Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 1991;174:1275-1278
- 27 Kapiteijn E, van De Velde CJ. European trials with total mesorectal excision. *Semin Surg Oncol* 2000;19:350-357
- 28 Wang Z, Zhou ZG, Wang C, Zhao GP, Chen YD, Gao HK, Zheng XL, Wang R, Chen DY, Liu WP. Microscopic spread of low rectal cancer in regions of mesorectum: pathologic assessment with whole-mount sections. *World J Gastroenterol* 2004;10:2949-2953
- 29 Stocchi L, Nelson H, Sargent DJ, O'Connell MJ, Tepper JE, Krook JE, Beart R Jr. Impact of surgical and pathologic variables in rectal cancer: a United States community and cooperative group report. *J Clin Oncol* 2001;19:3895-3902

电编 张勇 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 临床经验 •

## 善宁对急性胰腺炎患者血小板参数变化的影响

黄坚, 陆士奇, 陈建荣

黄坚, 陆士奇, 陈建荣, 苏州大学附属第一医院急诊内科 江苏省苏州市 215006

通讯作者: 黄坚, 215006, 江苏省苏州市, 苏州大学附属第一医院急诊内科. huanganran2004@yahoo.com.cn

电话: 0512-67790752 传真: 0512-65292927

收稿日期: 2005-08-03 接受日期: 2005-08-26

### Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis

Jian Huang, Shi-Qi Lu, Jian-Rong Chen

Jian Huang, Shi-Qi Lu, Jian-Rong Chen, Department of Emergency and Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jian Huang, Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. huanganran2004@yahoo.com.cn

Received: 2005-08-03 Accepted: 2005-08-26

### Abstract

**AIM:** To investigate the changes of platelet parameters in patients with mild and severe acute pancreatitis (MAP and SAP) after treated with octreotide.

**METHODS:** The full-automatic blood cell counter was used to obtain the platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV), and platelet distribution width (PDW) in the patients with MAP and SAP before and 1 wk after treatment with octreotide.

**RESULTS:** The platelet parameters of the patients with MAP were not significantly different from that of the normal controls. One week after treatment, there was still no significant change in the PLT. However, the

MPV and PDW were increased markedly ( $10.88 \pm 2.40$  vs  $10.11 \pm 1.66$ ,  $P < 0.05$ ;  $17.98 \pm 4.41$  vs  $16.62 \pm 1.38$ ,  $P < 0.05$ ). In patients with SAP, the PLT was decreased markedly ( $161.61 \pm 68.30$  vs  $191.60 \pm 31.98$ ,  $P < 0.05$ ), and the MPV and PDW were increased markedly ( $11.82 \pm 2.33$  vs  $9.81 \pm 0.79$ ,  $P < 0.01$ ;  $19.33 \pm 7.07$  vs  $16.36 \pm 0.51$ ,  $P < 0.05$ ) as compared with those in the normal controls. One week after treatment, the PLT was notably elevated ( $251.61 \pm 84.07$  vs  $161.61 \pm 68.30$ ,  $P < 0.01$ ), while the MPV and PDW were not changed ( $P > 0.05$ ) as compared with those before treatment. For SAP, the PLT increased more ( $112.53 \pm 89.31$  vs  $57.81 \pm 68.24$ ,  $P < 0.05$ ), and the MPV and PDW decreased more ( $1.29 \pm 2.79$  vs  $-0.17 \pm 2.04$ ,  $P < 0.01$ ;  $2.75 \pm 8.81$  vs  $-0.89 \pm 3.44$ ,  $P < 0.01$ ) at 1 wk in the octreotide treatment patients as compared with those of general treatment ones.

**CONCLUSION:** The platelet parameters can reflect the severeness of acute pancreatitis. Octreotide can improve the microcirculation by decreasing MPV and PDW, increasing PLT.

**Key Words:** Acute pancreatitis; Octreotide; Platelet count; Mean platelet volume; Platelet distribution width

Huang J, Lu SQ, Chen JR. Effects of octreotide on platelet parameters in patients with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2281-2283

### 摘要

**目的:** 研究血小板参数在轻症急性胰腺炎(MAP)与重症急性胰腺炎(SAP)中的变化特点及善宁治疗后对其的影响。



**方法:** 用全自动血球计数仪测定MAP与SAP患者入院及用善宁治疗1 wk后血小板计数(PLT)、平均血小板体积(MPV)和血小板分布宽度(PDW)。

**结果:** 入院时MAP患者血小板参数无变化, 治疗1 wk后PLT无显著性升高, MPV、PDW明显增高 ( $10.88 \pm 2.40$  vs  $10.11 \pm 1.66$ ,  $P < 0.05$ ;  $17.98 \pm 4.41$  vs  $16.62 \pm 1.38$ ,  $P < 0.05$ ) ; SAP组入院时PLT明显降低( $161.61 \pm 68.30$  vs  $191.60 \pm 31.98$ ,  $P < 0.05$ ), MPV、PDW明显增高 ( $11.82 \pm 2.33$  vs  $9.81 \pm 0.79$ ,  $P < 0.01$ ;  $19.33 \pm 7.07$  vs  $16.36 \pm 0.51$ ,  $P < 0.05$ ), 1 wk后PLT增高 ( $251.61 \pm 84.07$  vs  $161.61 \pm 68.30$ ,  $P < 0.01$ ) , MPV、PDW变化不明显 ( $P > 0.05$ ) ; SAP经治疗1 wk后善宁组较一般治疗组PLT增高更为显著 ( $57.81 \pm 68.24$  vs  $112.53 \pm 89.31$ ,  $P < 0.05$ ) , MPV、PDW下降明显 ( $1.29 \pm 2.79$  vs  $-0.17 \pm 2.04$ ,  $P < 0.01$ ;  $2.75 \pm 8.81$  vs  $-0.89 \pm 3.44$ ,  $P < 0.01$ ) 。

**结论:** MAP与SAP患者血小板参数变化明显不同, 可反映不同病情程度; 善宁治疗可使SAP患者PLT增多, MPV、PDW下降, 降低血小板活性, 从而改善微循环, 有重要的治疗作用。

**关键词:** 急性胰腺炎; 善宁; 血小板计数; 平均血小板体积; 血小板分布宽度

黄坚, 陆士奇, 陈建荣. 善宁对急性胰腺炎患者血小板参数变化的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(18):2281-2283

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2281.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是常见急腹症之一, 其发病过程常伴有胰腺微循环障碍, 血管通透性增加, 血小板聚集活化, 凝血和纤溶系统改变, 血小板参数会发生一定改变, 从而影响疾病的进程和预后<sup>[1,2]</sup>。本文主要探讨急性胰腺炎患者外周血中的血小板参数: 血小板计数(PLT)、平均血小板体积(MPV)和血小板分布宽度(PDW)的变化在AP发生、发展中的作用, 以及经善宁治疗后对其的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院2002-01/2005-05住院急性胰腺炎患者132例, 所有患者均符合急性胰腺炎诊断标准(症状、

体征、实验室检查、B超、CT等)<sup>[3]</sup>, 并按APACHE II评分 $\geq 8$ 分、Bathazar CT分级 $\geq$  II级为判断重症标准, 其中轻症急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)81例, 男49例, 女32例, 年龄25-78岁; 重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)51例, 男31例, 女20例, 年龄28-88岁。对照组30例为同期健康体检者, 男18例, 女12例, 年龄23-69岁。

**1.2 方法** 51例SAP分为: 一般治疗组(禁食、胃肠减压、输液、抑酸、抑酶、抗炎等治疗)21例, 男14例、女7例; 善宁治疗组(一般治疗基础上加用善宁0.1 mg/次, 每8小时一次皮下注射, 5-7 d, 善宁为诺华制药有限公司合成的天然生长抑素八肽衍生物)30例, 男17例、女13例。测定方法: 取患者入院24 h内及治疗1 wk后外周静脉血, 以全自动血球计数仪(Coulter STKS 美国生产)进行测定。

**统计学处理** 均数以mean $\pm$ SD表示, 行 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MAP与SAP入院时及治疗后血小板参数变化(表1)**

表1 MAP与SAP血小板参数比较(mean $\pm$ SD)

	<i>n</i>	PLT( $\times 10^9$ )	MPV (fL)	PDW (%)
对照组	30	191.60 $\pm$ 31.98	9.81 $\pm$ 0.79	16.36 $\pm$ 0.51
MAP入院	81	187.58 $\pm$ 59.49	10.11 $\pm$ 1.66	16.62 $\pm$ 1.38
1 wk后	81	199.11 $\pm$ 49.31	10.88 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>	17.98 $\pm$ 4.41 <sup>a</sup>
SAP入院	51	161.61 $\pm$ 68.30 <sup>c</sup>	11.82 $\pm$ 2.33 <sup>d</sup>	19.33 $\pm$ 7.07 <sup>c</sup>
1 wk后	51	251.61 $\pm$ 84.07 <sup>b</sup>	11.13 $\pm$ 1.77	18.08 $\pm$ 1.70

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 入院时; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

MAP组入院时与健康对照组PLT、MPV、PDW无显著性差异( $P > 0.05$ ), 治疗一周后PLT变化无显著性( $P > 0.05$ ), MPV、PDW较入院时增高明显( $P < 0.05$ ); SAP组入院时较对照组PLT明显减少( $P < 0.05$ ), MPV、PDW明显增高( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 治疗1 wk后较入院时PLT增高( $P < 0.01$ ), MPV、PDW变化不明显( $P > 0.05$ ); 入院时, SAP组较MAP组PLT低( $P < 0.05$ ), MPV、PDW高( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), 1 wk后SAP组PLT较MAP组高( $P < 0.05$ ), MPV、PDW无显著性差异( $P > 0.05$ ,  $P > 0.05$ )。

**2.2 SAP经一般治疗和善宁治疗1 wk前后血小板参数变化(表2)** SAP经治疗1 wk后善宁组较一般治疗组PLT明

表2 SAP一般治疗和善宁治疗一周后血小板参数变化(mean $\pm$ SD)

	<i>n</i>	PLT ( $\times 10^9$ )	MPV (fL)	PDW (%)
一般组	治疗前	21	161.76 $\pm$ 72.19	11.73 $\pm$ 2.35
	治疗后	21	219.57 $\pm$ 55.76	11.90 $\pm$ 1.48
	前后变化	21	57.81 $\pm$ 68.24	-0.17 $\pm$ 2.04
善宁组	治疗前	30	161.50 $\pm$ 65.44	11.88 $\pm$ 2.32
	治疗后	30	274.03 $\pm$ 92.83 <sup>a</sup>	10.58 $\pm$ 1.75 <sup>b</sup>
	前后变化	30	112.53 $\pm$ 89.31 <sup>c</sup>	1.29 $\pm$ 2.79 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 一般治疗组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 一般治疗组。

显增高 ( $P < 0.05$ ), MPV、PDW降低 ( $P < 0.01, P < 0.01$ ); 治疗前后数值变化, 一般治疗组与善宁组比较 PLT、MPV 有显著性差异 ( $P < 0.05, P < 0.05$ ), PDW 无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

AP 发病机制至今未能完全明了, 不仅涉及免疫防御系统, 激肽、补体、溶血及纤溶系统也参与其中。近年来, 对胰腺微循环障碍与急性胰腺炎关系有了更深入研究, 包括微血管内皮细胞损伤、微血管通透性增加、胰腺缺血-再灌注损伤、血液流变学改变、血小板聚集活化等, 这些都是改变急性胰腺炎病程的重要因素<sup>[4-6]</sup>。血小板是外周血中对化学和物理因素最敏感的成分, AP 患者体内大量血小板破坏, 释放高浓度的 5-羟色胺, 血栓素 A 等血管活性物质, 这些物质一方面有强烈缩血管作用, 另一方面与内皮细胞作用进一步介导炎症介质的释放, 并作为炎症介质参与全身炎症反应过程, 促进全身炎症反应综合征 (SIRS) 发生<sup>[7]</sup>, 这可能是 MAP 病情恶化、SAP 患者并发多脏器功能不全 (MODS) 及死亡的重要因素。Mitchell *et al*<sup>[8]</sup> 研究证实持续 SIRS 时间与血小板计数呈负相关。

本文 MAP 初期 PLT、MPV、PDW 较健康组变化无显著性, 1 wk 后, PLT 无显著性变化, 而 MPV、PDW 渐增高, 血小板体积增大, 推测可能与胰腺微循环障碍时血小板破坏, 通过反馈机制使巨核细胞激活产生大体积血小板有关, 此种血小板的致密小体多, 酶活力高, 功能活跃, 其出现是一种应激代偿作用, 以适应机体的需要<sup>[9]</sup>。研究表明大体积血小板代谢活跃, 聚集黏附力强和止血性强, 故平均血小板体积 (MPV) 与血小板体外功能明显相关<sup>[10]</sup>, 可根据 MPV 和 PDW 来估计血小板的活性。

SAP 初期较对照组、MAP 组 PLT 降低明显, MPV、PDW 增高, 表明患者体内有大量血小板黏附、聚集而高度活化, 造成循环血中血小板明显减少, 骨髓中巨核细胞反应性生成大体积血小板, 使循环血中血小板均一性降低, 导致 MPV、PDW 值增大, 因此监测 AP 患者循环血中血小板参数变化有助于病情判断<sup>[11, 12]</sup>。1 wk 后, PLT 显著性增高, 而 MPV、PDW 变化不明显, 可能与经治疗后微循环改善, 阻止血小板进一步聚集破坏有关。

善宁 (生长抑素八肽衍生物) 治疗 SAP 患者 1 wk 后与一般治疗组比较: PLT 增高, MAP 和 PDW 降低明显, 说明善宁治疗可降低血小板活性, 增加血小板数量, 其机制可能是善宁阻断细胞因子 (包括血小板活化因子等) 及炎症介质的释放<sup>[13, 14]</sup>, 从而减轻了全身炎症反应进程,

改善微循环及血液流变学, 防止血小板过度聚集活化, 改善 SAP 的病程和预后, 降低死亡率<sup>[15, 16]</sup>。因此善宁在 SAP 治疗中具有极其重要作用, 应广泛推广。

### 4 参考文献

- 1 Sugimoto M, Takada T, Yasuda H. A new experimental pancreatitis by incomplete closed duodenal loop: the influence of pancreatic microcirculation on the development and progression of induced severe pancreatitis in rats. *Pancreas* 2004;28:e112-e119
- 2 Chen HM, Sunamura M, Shibuya K, Yamauchi JI, Sakai Y, Fukuyama S, Mikami Y, Takeda K, Matsuno S. Early microcirculatory derangement in mild and severe pancreatitis models in mice. *Surg Today* 2001;31:634-642
- 3 王兴鹏, 许国铭, 袁耀宗, 李兆申. 中国急性胰腺炎诊治指南 (草案). *中华消化杂志* 2004;3:190-192
- 4 de la Mano AM, Sevillano S, Manso MA, Perez M, de Dios I. Cholecystokinin blockade alters the systemic immune response in rats with acute pancreatitis. *Int J Exp Pathol* 2004;85:75-84
- 5 金忱, 倪泉兴, 张群华, 曹国海, 向阳, 张姐, 张延龄. 急性胰腺炎时胰腺缺血与细胞因子相关性的实验研究. *中华普通外科杂志* 2001;11:662-664
- 6 Wittel UA, Rau B, Gansauge F, Gansauge S, Nussler AK, Beger HG, Poch B. Influence of PMN leukocyte-mediated pancreatic damage on the systemic immune response in severe acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 2004;49:1348-1357
- 7 冯文明, 鲍鹰, 陈秋强, 杨琦, 陶玉龙. 血小板计数和持续全身炎症反应综合征预测急性胰腺炎并发多脏器功能不全的研究. *中国急救医学* 2001;21:86-87
- 8 Mitchell RM, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. *Lancet* 2003;361:1447-1455
- 9 张振玉, 孙士其, 孔超美. 急性胰腺炎患者血小板体积变化分析. *临床荟萃* 2000;15:224
- 10 Mimidis K, Papadopoulos V, Kotsianidis J, Filippou D, Spanoudakis E, Bourikas G, Derveniz C, Kartalis G. Alterations of platelet function, number and indexes during acute pancreatitis. *Pancreatol* 2004;4:22-27
- 11 Dabrowski A, Gabryelewicz A, Chyczewski L. The effect of platelet activating factor antagonist (BN 52021) on acute experimental pancreatitis with reference to multiorgan oxidative stress. *Int J Pancreatol* 1995;17:173-180
- 12 Hackert T, Pfeil D, Hartwig W, Gebhard MM, Buchler MW, Werner J. Platelet function in acute experimental pancreatitis induced by ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 2005;92:724-728
- 13 Andoh A, Hata K, Shimada M, Fujino S, Tasaki K, Bamba S, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T. Inhibitory effects of somatostatin on tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-6 secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Int J Mol Med* 2002;10:89-93
- 14 Nikou GC, Giamarellos-Bourboulis EJ, Grecka P, Toumpanakis Ch, Giannikopoulos G, Katsilambros N. Effect of octreotide administration on serum interleukin-6 (IL-6) levels of patients with acute edematous pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2004;51:599-602
- 15 Piri M, Alhan E, Kucuktulu U, Ercin C, Deger O, Yucel K, Cicek R. The effects of somatostatin on the microperfusion of the pancreas during acute necrotizing pancreatitis in rats. *Hepatogastroenterology* 2002;49:833-837
- 16 王艳蕾, 贾玉杰, 王立娜, 姜妙娜, 赵景霞. 善宁对重症急性胰腺炎胰腺细胞的保护作用. *四川大学学报 (医学版)* 2005;36:134-135

# 肝肾联合移植术治疗移植肾慢性失功伴肝硬化1例

朱建平, 张宗明, 管德林, 李刚, 黄庆荣, 宿砚明, 陈以安, 刘辉

朱建平, 张宗明, 李刚, 黄庆荣, 宿砚明, 陈以安, 刘辉, 清华大学第一附属医院消化医学中心 北京市 100016  
管德林, 清华大学第一附属医院泌尿医学中心 北京市 100016  
通讯作者: 朱建平, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化医学中心. zhujianningwz@yahoo.com.cn  
电话: 010-64308506 传真: 010-64361322  
收稿日期: 2005-07-15 接受日期: 2005-08-03

## 摘要

患者因移植肾慢性失功伴肝炎后肝硬化, 处于尿毒症和肝功能失代偿期, 施行一期肝肾联合移植术, 供、受体血型一致; 肝移植采用经典原位肝移植技术, 肾移植采用常规方法. 免疫抑制方案采用simulect和ATG免疫诱导下的FK506 + MMF + MP三联方案. 患者术后恢复顺利, 移植肝、肾功能良好, 术后45 d出院. 故完善的手术技巧、严密的围手术期监测和及时预防处理并发症是肝肾联合移植成功的重要条件, 免疫诱导下的三联免疫抑制方案效果良好.

**关键词:** 肝移植; 肾移植; 肝肾联合移植; 肝炎; 肝硬化

朱建平, 张宗明, 管德林, 李刚, 黄庆荣, 宿砚明, 陈以安, 刘辉. 肝肾联合移植术治疗移植肾慢性失功伴肝硬化1例. 世界华人消化杂志 2005;(18):2284-2286  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2284.asp>

## 0 引言

自1983年Margreiter *et al*<sup>[1]</sup>为1例肾移植术后发生慢性排异反应而并发肝硬化的患者成功施行全球首例肝肾联合移植以来, 全球各大中心相继开展了此项技术, 而且成绩喜人. 我国起步晚、开展单位相对分散, 至今尚无大宗报告, 我院于2005-04-29为1例移植肾慢性失功伴肝炎后肝硬化患者成功实施了肝肾联合移植手术, 现报告如下.

## 1 病例报告

患者女性, 49岁. 10 a前因肾小球肾炎逐渐恶化发展为尿毒症, 需维持血透治疗, 期间每月输血2次, 每次400 mL. 6 a前于当地医院行“同种异体肾移植术”, 术后服用环孢素及硫唑嘌呤免疫抑制治疗, 术后3 mo发现丙肝阳性, 移植肾功能正常. 2 a前出现肝硬化、腹水, 尿量减少, 伴全身瘙痒及乏力、纳差, 血肌酐升高, 尿量开始减少和出现无尿. 1.5 a前开始每10 d抽放腹水7 000-10 000 mL, 同时进行血液透析, 每2-3 d 1次. 近年来经常有腹痛、发烧, 术前10 d高烧、腹痛, 体温39.5℃, 抗菌素治疗好转; 1 mo前右胸带状疱疹、口角疱疹, 抗病毒治疗好转; 而且近月

来出现肝性脑病、浅昏迷5次. 既往有乙肝疫苗注射史, 身高150 cm, 平素体重55 kg, 术前体重37 kg. 术前检查与配型: T 37.2℃, P 90次/分, R 21次/分, BP 120/80 mmHg, 显著消瘦, 双侧巩膜轻度黄染, 腹胀明显, 可见腹壁静脉曲张, 全腹轻度压痛. 血常规: WBC  $3.3 \times 10^9/L$ , HB 47 g/L, PLT  $66 \times 10^9/L$ ; 血透后肾功能: 血肌酐461  $\mu\text{mol/L}$ , BUN 10.32 mmol/L; 肝功能: TP 56.4 g/L, ALB 33.3 g/L, TBIL 30.5  $\mu\text{mol/L}$ ; 胆碱酯酶1 040 kat/L. 丙、乙肝情况: HBsAg(-), HBsAb > 1 000 U/L, HBcAb(+); Anti-HCV(+). B超: 肝硬化、脾大、大量腹水: 腹水培养: 草绿色链球菌. 术前患者: HLA-I类抗原: A24(9), 31(19), B14, 55(22), BW6, -; HLA-II类抗原: DR1, 4, DR53, -, DQ5(1), 4; PRA群体反应: I类阴性, II类90%. 供体为脑死亡者: HLA-I类抗原: A24(9), 31(19), B35, 48, BW6, -; HLA-II类抗原: DR7, 12(5), DR52, 53, DQ2, 7(3); 供、受体血型均为B型. 术前1 d常规血透、输血及进行血浆置换, 放腹水5 500 mL, 用亚安培能、万古霉素等加强抗感染治疗和肠道准备, 输血调整HB为92 g/L. 手术情况: 供体采取腹部大十字切口暴露, 腹主动脉及门静脉插管同时灌注肝脏、肾脏, 灌注液为肾保液和UW液. 联合快速切取肝、肾, 修整供肝和供肾, 热缺血12 min. 受体手术: 取上腹部人字形切口进腹, 抽出腹水2 500 mL, 腹腔粘连严重, 胃、十二指肠、全部小肠、结肠和大网膜粘连成团, 肝脏呈小结节状硬化, 肝周有膜状白苔样结构, 考虑为自发性腹膜炎所致, 因尚无肠梗阻, 故只予分离肝周粘连, 非转流下常规法切除受体病肝, 术中根据严密监测的心率、血压、中心静脉压、肺动脉楔压等, 指导输液、输血, 确保血流动力学的稳定. 依次吻合肝上下腔静脉、肝下腔静脉、门静脉, 开放血流时突然发生室颤, 及时积极处理, 1 min后完全恢复正常; 继续依次吻合肝动脉及胆总管(置10号T管); 肾移植于左侧髂窝. 供肝冷缺血13 h, 供肾冷缺血17.5 h, 无肝期65 min. 术后患者入ICU病房监护, 监测心、肺、肝、肾及凝血功能等, 术后1 wk平均每日输液5 000 mL(2 000-7 000 mL/d), 控制CVP在8-10 cm H<sub>2</sub>O. 术后27 h患者完全清醒, 拔除气管插管, 能较好地配合各种治疗. 术后第3天开始饮水, 第5天排气、排便后恢复进食; 因重度营养不良, 术后采用生长激素(GH)联合蛋白强化的营养支持治疗5 d(GH思真4 U/d, Gln谷氨酰胺13.6 g/d, 非蛋白热卡1 000 kcal/d; 白蛋白40-80 g/d)<sup>[2]</sup>. 术后第3天因左胸腔大量积液致肺不张、呼吸困难, 行胸腔穿刺引流



出 1 100 mL, 配合物理治疗和 BIPAP (双水平无创正压通气)<sup>[3]</sup> 间断支持治疗 2 d 后好转. 术后 24 h 尿量 4 546 mL, 血肌酐降至 136.2  $\mu\text{mol/L}$ ; 术后第 4 天肾功能完全恢复正常; 术后 24 h T 管引流胆汁量 131 mL, 之后 T 管引流胆汁量保持在 250–490 mL/d, 肝功能于术后 2 wk 恢复正常. 免疫抑制方案采用 Simulect (苏莱) 和 ATG (抗人 T-淋巴细胞球蛋白) 免疫诱导下的 FK506 (普乐可复)+MMF (骁悉)+MP (甲强龙) 三联方案. 术后 2 h 及术后第 4 天分别应用 1 次 Simulect, 剂量 20 mg; 术后 3 d 应用 ATG, 100 mg/d; 监测血 FK506 谷浓度, 早期维持在 5–7  $\mu\text{g/L}$ . 住院期间无急性排异反应发生, 肾功能恢复良好. 术后第 10 天复查 PRA 群体反应 I 类: 阴性; II 类: 41% (较术前明显下降). 术后 10 d 内, 膈下引流液、痰涂片和培养有细菌 (主要为路邓-葡萄球菌)、真菌生长, 在监测血 C 反应蛋白 (CRP) 下, 用美平、万古霉素、大扶康、伊曲康唑、大蒜素治疗 10 d 痊愈. 病理讨论认为: 病肝为丙、乙型肝炎病毒混合感染, 慢性病毒性肝炎伴小结节性肝硬化. 术后采用更昔洛韦抗病毒治疗 2 wk, 拉米夫定、利巴韦林预防乙肝和丙肝, 术后血标本多次化验结果: HBsAg (-), HBsAb > 1 000 U/L, HBeAb (+), HBcAb (+); Anti-HCV: (-). 术后第 9 天开始床边活动, 第 15 天顺利拔除导尿管, 并很快恢复生活自理和进行简单的体育锻炼, 经反复调整药物剂量维持稳定的血药浓度后, 于 2005-06-13 痊愈出院.

## 2 讨论

1988–2002 美国实施肝肾联合移植已超过 850 例次, 术后 1 a 及 3 a 生存率分别为 85% 和 82%. 我国于 1996–07 实施首例同种异体肝肾联合移植以来, 开展的单位分散, 尚无大宗病例报告, 在此我们总结本例成功的经验体会.

**2.1 手术适应证** 任何原因导致的肝脏和肾脏两个脏器不可逆的功能不全或衰竭, 均是肝肾联合移植的适应证. 本例患者既往因尿毒症长期进行维持性血透和间断输血, 而且在第 1 次肾移植手术时, 也有输血史, 术后使用的环孢素和硫唑嘌呤等药本身就有较大的肝毒性, 患者于术后 3 mo 即出现丙型肝炎, 结合我国为病毒性肝炎的高发地区, 近年对血液透析相关病毒性肝炎的研究发现: 血透患者 HCV 感染率为 13.6–67.6%<sup>[4]</sup>, 考虑此患者的 HCV 可能为输血后或既往血透被感染, 在接受肾移植后, 由于免疫抑制剂的影响, 机体免疫力低下, 以及术后糖皮质激素的应用, 使肝炎病毒复制活跃, 肝炎活动, 同时加上环孢素和硫唑嘌呤的肝毒性作用, 使肝炎患者的肝损害进一步加重, 加速了病毒性肝炎的病理改变, 以致很快发展为肝硬化和肝功能失代偿. 本例患者可能同时合并有乙型肝炎病毒感染史, 虽然 HBsAg 阴性, 但其血中 HBcAb 和 HBeAb 均阳性, 而且术后经病理证实, 考虑该患者肝脏为丙、乙型肝炎病毒的混合感染所致, 肾

移植后免疫抑制剂加速了肝损害, 由于患者移植肾完全失功能, 肝硬化功能失代偿也已成不可逆转, 所以肝肾联合移植是唯一的选择.

**2.2 肝炎防治与免疫抑制剂** 术后既要预防丙肝和乙肝的复发, 又要防治排斥反应的发生, 同时还要尽最大的可能减少免疫抑制剂的危害, 免疫抑制方案采用 Simulect 和 ATG 免疫诱导下的 FK506+MMF+MP 三联方案. 为最大限度减少免疫抑制剂对肝炎病毒的影响, 以及减轻肝肾毒性作用, 我们选用无肝肾毒性的 MMF, 同时术后较晚才服用 FK506, 并从小剂量开始维持低浓度的 FK506 血药浓度, 以及短期低剂量使用糖皮质激素, 此患者第 1 月用强的松 15 mg/d, 第 2 月用强的松 10 mg/d, 准备 3–6 mo 停用<sup>[5,6]</sup>. 患者移植肾慢性失功能后, 血中的 PRA 群体反应 II 类抗体极高, 为 90%, 术前给予血浆置换以降低抗体水平; 虽然配型较好, 我们仍采用 Simulect 和 ATG 行免疫诱导保驾<sup>[7,8]</sup>, 再加上肝脏对移植肾脏有保护作用<sup>[9]</sup>, 使患者术后顺利渡过了急性排斥期.

**2.3 感染的防治** 此患者术前有反复自发性腹膜炎, 腹水培养: 草绿色链球菌. 器官移植患者术前存在感染, 我们直接选择有针对性的最高档抗菌素, 术后再强化使用抗菌素及抗真菌药, 并根据血 CRP 的监测评估感染控制的疗效和停止治疗性用药.

**2.4 液体治疗与营养支持** 在严密监测心、肺、肝、肾及凝血功能下, 为保证移植肝肾的有效灌注, 同时避免因容量超负荷而影响移植肝肾的血液回流, 我们严格制定输液指导目标, 监测和控制 CVP 维持在 8–10 cm H<sub>2</sub>O, 以及使白蛋白不低于 35 g/L, 总蛋白不低于 65 g/L, 保证较高的胶体渗透压, 减轻组织水肿.

此患者重度营养不良, 术前曾反复出现肝昏迷. 既往体重 55 kg, 术前体重 37 kg, 极度消瘦, 术后极易出现呼吸肌力弱和咳嗽无力, 造成通气不足、肺不张和肺炎等并发症, 我们采用生长激素联合蛋白强化的营养支持治疗<sup>[2]</sup>, 使患者术后体能快速增强, 配合及时处理大量胸腔积液和术后拔除气管插管后使用 BIPAP 双水平无创正压通气<sup>[10]</sup>, 使患者术后通气不足顺利解决.

肝肾联合移植是终末期肝肾疾病的一种有效治疗手段, 在我国有大批终末期肾功能衰竭的患者, 故开展肝肾联合移植具有非常现实的意义.

## 3 参考文献

- 1 Margreiter R, Kramar R, Huber C, Steiner E, Niederwieser D, Judmaier G, Vogel W. Combined liver and kidney transplantation. *Lancet* 1984;1:1077-1078
- 2 朱建平, 张同琳, 袁炯, 宋世兵, 修典荣, 王谊冰, 付卫, 王德臣, 蒋斌, 马朝来, 侯宽永. 肝移植术后的营养管理. *中国临床营养杂志* 2003;11:144-146
- 3 王新荣, 赵苏. BiPAP 呼吸机治疗急性呼吸衰竭的疗效观察. *武汉大学学报(医学版)* 2005;26:131-132
- 4 郁佩青, 徐琴君. 血液透析相关丙型肝炎的研究进展. *中华护理杂志* 2004;39:615-617
- 5 Zhu JP, Zhang TL, Li L, Yuan J, Song SB, Xiu DR, Hou KY, Li T, Zhuang H. Prevention and treatment of hepatitis B recurrence

- after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:500-503
- 6 朱建平, 李磊, 张同琳, 裴斐, 庄辉. 小剂量乙型肝炎免疫球蛋白与拉米夫定联合使用对肝移植后乙肝复发的疗效. *实用临床医药杂志* 2003;7:139-242
- 7 Kahan BD, Rajagopalan PR, Hall M. Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basilixmab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. *United States Simulect Renal Study Group. Transplantation* 1999; 67:276-284
- 8 郭在柱, 袁小鹏, 高伟, 李杰, 张国平. SIMULECT预防肾移植术后早期急性排斥反应的临床报告. *广州医药* 2003;34:23-25
- 9 Rasmussen A, Davies HF, Jamieson NV, Evans DB, Calne RY. Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. *Transplantation* 1995;59:919-921
- 10 张川, 郑碧霞, 程金川, 马红原. 无创呼吸机在综合监护室的应用. *四川医学* 2005;26:91-92

电编 张勇 审读 张海宁

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

• 消息 •

## 中国生物医学基金论文摘要注册方法

### 0 引言

中国生物医学基金论文摘要库(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)收录了1994-2005年国内发表在1204种生物医学类期刊总计20万以上的论文摘要. 这些论文受国家、军队和省部级自然科学基金、杰出青年基金、重大项目基金资助, 内容丰富、数据准确, 核心的体现了我国生物医学的发展历程、脉络和方向, 可为相关领域广大学者和研究人员了解并掌握当前研究动态、开辟新的研究领域提供了思路. 本摘要库为世界胃肠病学杂志社所有, 从2006年起, 对其使用方法作如下调整:

### 1 开放政策

中国生物医学基金论文摘要的使用实行会员制, 凡注册者均可使用. 个人注册: 150元/年, 300元/3年. 机构注册: 1000元/年, 2500元/3年. 《世界华人消化杂志》和《世界胃肠病学杂志》(英文版)编委, 以及给以上两种杂志投稿者(包括已发表), 可免费注册使用3年, 医药类大学在校学生(学士、硕士、博士), 凭学生证和身份证也可免费注册使用3年. 订购《世界华人消化杂志》或《世界胃肠病学杂志》(英文版)者, 凭订购单可免费注册使用1年.

### 2 注册方法

分三种: (1) 免费注册须填写免费会员注册表(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/39.doc>), 附本人学生证和身份证. (2) 个人注册须填写个人会员注册表(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/40.doc>), 附本人身份证; (3) 机构注册须填写机构会员注册表(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/41.doc>). 以上材料通过邮局寄送至: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 另外, 注册表还需要通过E-mail发送至: [cmfa@wjgnet.com](mailto:cmfa@wjgnet.com).

### 3 用户设置

用户名和密码均由注册用户自己提供, 用户名必须为使用者的E-mail地址.

### 4 注册对象

中国生物医学基金论文摘要库的注册对象包括: 各大医药类高校、图书馆、研究所以及医疗机构, 从事医药领域基础及临床研究的学生、医生、以及科研人员.

总之, 《世界华人消化杂志》将始终贯彻质量第一的方针, 满足广大作者和读者的需求. 在此, 我热烈欢迎再次投稿.

• 病例报告 •

# 丙型肝炎肝硬化患者骨髓和血液同时分离出鼠伤寒沙门菌1例

郭微媛, 齐桂云, 多丽波, 闫立昕, 孙琪, 张和光

郭微媛, 齐桂云, 多丽波, 闫立昕, 孙琪, 张和光, 哈尔滨医科大学附属二院微生物室, 黑龙江哈尔滨市 150086

通讯作者: 郭微媛, 150086, 哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属二院微生物室

电话: 0451-86605382

收稿日期: 2005-07-28 接收日期: 2005-08-05

## 摘要

患者, 男, 68岁, 因高烧16 d入院, 伴寒战、乏力。经化验和腹部超声证实为丙型肝炎肝硬化腹水, 后经血和骨髓培养确诊为鼠伤寒(败血症型)合并真菌感染, 此病例很少见。

**关键词:** 丙型肝炎, 鼠伤寒沙门菌

郭微媛, 齐桂云, 多丽波, 闫立昕, 孙琪, 张和光. 丙型肝炎肝硬化患者骨髓和血液同时分离出鼠伤寒沙门菌1例. 世界华人消化杂志 2005;18(18):2287

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2287.asp>

## 1 病例报告

患者, 男, 68岁. 无明显诱因持续性高热 16 d, 伴寒战、乏力, 体温在 39-41℃之间波动, 发热高峰在 10 点和 16 点. 无恶心、呕吐, 无腹胀、腹痛、反酸、嗝气. 睡眠一般, 近日消瘦 5 kg. 查体: 心肺正常, 腹软, 肝未触及, 脾可触及肋下 3 cm, 双下肢无水肿. BP: 16/8.7 kPa (120/65 mmHg), P: 94 次/分, 抗 HCV (+), HCV-RNA  $\leq 5.0 \times 10^5$  拷贝/L. 血常规: WBC  $11.4 \times 10^9/L$ , RBC  $3.4 \times 10^{12}/L$ , PLT  $11 \times 10^9/L$ . 生化检查: ALT 44 U/L, AST 73 U/L, TP 64.9 g/L, ALB 24 g/L, GLO 40.9 g/L, TBIL 25.06  $\mu\text{mol/L}$ , DBIL 6.72  $\mu\text{mol/L}$ , IDIL 18.34  $\mu\text{mol/L}$ , CHE 767 U/L. 超声显示肝硬化、中等量腹水. 细菌培养: BACTEC9120 全自动血培养仪培养患者骨髓标本和血标本各一份, 同时口腔黏膜涂片查获少量真菌孢子和菌丝. 从骨髓和血液同时分离出革兰氏阴性杆菌, 血平板上生长出中等大小、光滑湿润灰色菌落, 通过系统生化鉴定苯丙氨酸 (-), 葡萄糖酸盐 (-), 硫化氢 (+), 动力 (+), 枸橼酸盐 (+), 尿素 (-), 赖氨

酸 (+), 鸟氨酸 (+) 符合沙门菌特点. 0 多价因子血清凝集, 0:1、0:4、0:5、0:12、H:1、H:2 因子血清凝集鉴定为鼠伤寒沙门菌. 药敏结果: 头孢吡肟、氨曲南、头孢噻肟、头孢哌酮、头孢呋辛、头孢唑林、亚胺培南、丁胺卡那、头孢哌酮/舒巴坦、头孢西丁敏感, 氯霉素、庆大霉素、左旋氧氟沙星耐药.

## 2 讨论

鼠伤寒是一种以消化道传染为特征的感染性疾病, 多发生于婴幼儿. 鼠伤寒沙门菌是细胞内致病菌, 可通过肠黏膜侵入黏膜相关淋巴组织<sup>[1]</sup>, 1892年Loffler从鼠身上分离出该菌, 1893年在Breslan城首先证实该菌可引起食物中毒, 明确本菌可使人、鼠共患病<sup>[1]</sup>. 1980年后我国许多省区发生规模较大的医院内鼠伤寒沙门菌感染, 临床以起病急、发热、呕吐、腹泻为特征, 主要分为四型, 即无症状携带型、胃肠型、败血症型和内脏损伤型. 该患者发热2 wk以上、年龄大、病情较重, 属于败血症型. 目前发热的原因可能与合并真菌二重感染及对使用的抗生素产生耐药有关, 患者继续口服大扶康治疗. 伤寒患者病后2 wk细菌培养阳性率最高, 特别是骨髓培养阳性率高于血培养和尿、便培养. 因为骨髓内的网状细胞可大量吸纳细菌, 该菌容易对使用的抗生素产生耐药<sup>[2]</sup>. 该患丙肝阳性伴肝硬化腹水, 免疫力低下身体状况较差, 患者居住城市, 近期未到过疫区, 鼠伤寒沙门菌的感染源不清楚, 随着人们生活水平的提高, 人类接触病原菌的机会增多, 感染呈逐年上升趋势, 鼠伤寒沙门菌耐药株增加. 应注意观察其周围人群有无不明原因发热者, 避免鼠伤寒在一定社区及医院内爆发流行.

## 3 参考文献

- 1 王宏卫, 赵平, 张珉, 朱诗应, 戚中田. 鼠伤寒沙门菌pagC启动子的克隆与活性分析. 微生物学报 2003;43:308-314
- 2 唐小平, 吴婉芬, 袁小珍. 丙型肝炎病毒基因分型及其与疾病程度、感染途径和干扰素疗效的关系. 中华微生物和免疫学杂志 1997;117:92-95

电编 张勇 编辑 张海宁



• 致谢 •

## 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!

陈立波 副教授

武汉华中科技大学同济医学院附属协和医院外科

王小众 副教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

陈蔚文 教授

广州中医药大学脾胃研究所

王兴鹏 教授

复旦大学第一临床医学院,上海市第一人民医院消化内科

旦增 副主任医师

西藏自治区人民医院消化科

向德兵 讲师

重庆市第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科

来茂德 教授

浙江大学医学院病理学教研室

徐列明 教授

上海中医药大学附属曙光医院

李定国 教授

上海第二医科大学附属新华医院

徐小元 教授

北大医院感染科

罗和生 教授

武汉大学人民医院消化内科

于颖彦 教授

上海第二医科大学附属瑞金医院消化外科研究所

牛建昭 教授

北京中医药大学

张锦 生教授

上海复旦大学上海医学院病理学系

潘兴华副 主任医师

成都军区昆明总医院医学实验科

张青云 研究员

北京大学临床肿瘤学院、北京肿瘤医院

钱建民 教授

南京医科大学第一附属医院肝胆外科

张宗明 教授

清华大学第一医院

邱双健 副教授

上海复旦大学附属中山医院

钟鸣 副研究员

广西民族医药研究所

石统东 副教授

第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所

周士胜 教授

大连大学医学院医学研究中心