

转移性肝癌的治疗

王凤山, 刘永锋

王凤山, 刘永锋, 中国医科大学附属一院肝胆外科 辽宁省沈阳市 110001

王凤山, 1996年获医学博士学位, 主要从事肝胆外科及器官移植的基础研究和临床工作。

王凤山, 1996年获中国医科大学外科博士学位, 主要从事外科及器官移植的基础和临床研究。

辽宁省教育厅高等学校科学研究资助项目, No. 05L496

通讯作者: 王凤山, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属一院肝胆外科。

wangfs2006@yahoo.com.cn

电话: 024-83283308

收稿日期: 2007-06-11 修回日期: 2007-11-04

Treatment strategies for hepatic metastasis

Feng-Shan Wang, Yong-Feng Liu

Feng-Shan Wang, Yong-Feng Liu, Department of Hepatobiliary Surgery, the First University Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by: the Science Research Programs of Educational Department of Liaoning Province, No. 05L496

Correspondence to: Dr. Feng-Shan Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, the First University Hospital of China Medical University, 155 Nanjing Northern Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wangfs2006@yahoo.com.cn

Received: 2007-06-11 Revised: 2007-11-04

Abstract

The treatment of hepatic metastasis is a very difficult problem in tumor treatment. Although there are more therapeutic methods now available, the cure rate is still not very satisfactory. Metastatic liver cancer prognosis depends on the site of the original tumor, the degree of malignancy, the involvement of the liver, and extrahepatic metastases in patients with systemic conditions. Patients with Advanced liver metastasis of the tumor, can only be treated with a comprehensive treatment consisting mainly of surgical methods that can improve the quality of life and prolong survival. This paper reviews the progress in the treatment of hepatic metastasis.

Key Words: Hepatic metastasis; Therapy in hepatocarcinoma

Wang FS, Liu YF. Treatment strategies for hepatic metastasis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(2): 115-119

摘要

转移性肝癌的治疗是肿瘤治疗中十分棘手的难题, 治疗方法虽然较多, 但迄今疗效不甚满意。转移性肝癌的预后取决于原发肿瘤的部位、恶性程度、肝受累范围、有无肝外转移灶和患者的全身情况。对已有肝转移的晚期肿瘤, 只有在尽可能切除原发灶的情况下, 采取以手术为主的综合治疗的方法, 才有可能最大限度地使患者病情缓解, 提高生活质量, 延长生存期。本文综述了各种转移性肝癌的治疗进展。

关键词: 转移性肝癌; 肝癌治疗

王凤山, 刘永锋. 转移性肝癌的治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 115-119

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/115.asp>

0 引言

转移性肝癌亦称继发性肝癌, 属于恶性肿瘤晚期的表现。肝脏是恶性肿瘤常见的转移部位, 尸检表明, 我国转移性肝癌为原发性肝癌的1.2倍, 欧美则为20倍^[1]。对转移性肝癌治疗的效果直接影响患者生存质量和生存期, 但转移性肝癌的治疗是肿瘤治疗中十分棘手的难题。随着肿瘤诊断治疗技术和肝脏外科技术的进步, 临床医生越来越多地需要面对转移性肝癌的治疗问题。转移性肝癌治疗方法虽然较多, 但迄今疗效不甚满意。

1 转移性肝癌的手术治疗

1.1 转移性肝癌的发生途径 身体各部位癌转移到肝脏可通过如下途径: 经门静脉转移; 经肝动脉转移; 经淋巴转移和直接蔓延。转移性肝癌常常为多发病灶, 但也可见单发病灶。消化道及盆腔部位的恶性肿瘤多经门静脉转移到肝脏, 占转移性肝癌的30%-50%。

1.2 转移性肝癌的手术适应症 手术切除转移性肝癌是一种有效并可能使患者长期存活的治疗方法。手术切除需要符合以下条件: (1)全身情况好, 心、肺、肝和肾功能基本正常; (2)转移灶为

■背景资料

肝脏是恶性肿瘤常见的转移部位, 尸检表明我国转移性肝癌为原发性肝癌的1.2倍, 欧美则为20倍。对转移性肝癌治疗的效果直接影响患者生存质量和生存期, 但转移性肝癌的治疗是肿瘤治疗中十分棘手的难题, 随着肿瘤诊断治疗技术以及肝脏外科技术的进步, 临床医生越来越多地需要面对转移性肝癌的治疗问题。

■同行评议者

龚建平, 教授, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

■相关报道

欧美报道对转移性肝癌实施肝移植, 除神经内分泌系统来源以外的转移性肝癌, 一年生存率约5%。

单发或虽为多发但范围局限于半肝; (3)原发灶能够切除或已经切除; (4)无肝外转移灶或肝外转移灶能够得到有效治疗。目前, 国内一些较大的肝胆外科中心肝癌的总切除率可达30%-40%, 而手术死亡率在5%以内^[2]。欧美报告, 转移性肝癌切除后5年生存率为25%-49%^[3-5]。虽然手术切除在所有治疗方法中效果较好, 但仍有70%-80%患者术后会复发与转移, 对于符合手术条件的再次复发病例仍可考虑手术切除。有报道对残肝复发癌积极地进行手术切除, 也能得到与初次肝切除相近的治疗效果^[6-8]。与初次肝切除相比, 再次肝切除可能手术时间长、出血量多, 但合并症及院内死亡的发生率与初次肝切除相比无显著差异, 切除率在10%-15%^[8]。

1.3 转移性肝癌的手术时机 关于转移性肝癌切除的时机, 意见尚不统一。同时性肝转移的情况下, 多数主张同期进行肝切除^[9-10], 也有主张先将原发灶切除, 3-6 mo后再进行肝转移灶切除。主张同期进行肝切除的理由是因为肝转移灶以后有可能发生二次转移, 多发肝转移灶经过3-6 mo后有可能失去切除机会。主张3-6 mo后再进行肝转移灶切除的理由是同期手术死亡率和并发症的发生率高, 微小肝转移灶可能会被漏掉。

1.4 转移性肝癌的手术术式 关于转移性肝癌的切除术式, 可进行扩大肝切除、规则性肝叶切除、肝段切除和肝部分切除。正常肝切除量的安全限度为60%-65%^[11-12], 目前肝部分切除逐渐成为主要的手术术式。术前需要明确转移灶与门静脉、肝静脉及下腔静脉的关系, CTAP及3D-CT是常用的手段, 术中有时需要在超声引导下进行转移灶切除。部分肝切除的优点是能尽量保存肝组织, 术后不易发生肝衰竭。切除缘距肿瘤应在1 cm以上。另外, 也有同时进行肝门淋巴结廓清的报道^[13]。

1.5 肝脏移植 目前对转移性肝癌患者进行肝移植治疗的经验还不多。由于移植后肿瘤早期复发, 肝移植的远期效果较差。欧美报道对转移性肝癌实施肝移植, 除神经内分泌系统来源以外的转移性肝癌, 一年生存率约5%^[14-15]。神经内分泌系统来源的转移性肝癌因浸润性相对较弱, 故是肝移植的一个较好适应症。对于不能手术切除的神经内分泌系统来源的转移性肝癌, 如原发灶已切除, 肝移植后可使病情得到长期缓解甚至治愈^[16]。由于供肝短缺, 在病例选择方面要求无肝外转移灶, 而且所有其他治疗方法均无效。

2 转移性肝癌的非手术治疗

2.1 肝动脉化疗栓塞 经肝动脉进行化疗栓塞是治疗转移性肝癌的一种有效方法^[17-19], 对少血供型患者采用稀碘油化疗药乳剂适量栓塞, 可以明显提高治疗效果。由于大多数转移性肝癌的血供主要来源于肝动脉, 经肝动脉灌注化疗可提高肿瘤局部的化疗药物浓度, 对肿瘤细胞的杀伤选择性较全身化疗强, 全身毒性反应小, 患者耐受性好。灌注化疗加用栓塞剂后可减少肿瘤的血供, 控制其生长甚至使肿瘤发生缺血坏死而提高疗效。碘油是最常用的栓塞剂, 与化疗药物混合后经肝动脉注入可使药物进入肿瘤血管内, 同时又达到对肿瘤血管的暂时性栓塞作用。

2.2 肝癌射频消融术 这是近年来治疗肝癌的一种新技术, 他也适合于不能手术的转移性肝癌的治疗。射频消融的基本原理是, 在超声或CT引导下经皮穿刺将射频电极插入病灶, 发射出频率为460-500 kHz的射频电流使其周围组织中的带电粒子高速震荡摩擦产热, 温度达50℃-110℃, 致电极周围细胞凝固性坏死。通过杀伤癌细胞, 调节机体免疫, 抑制癌细胞生长, 诱导癌细胞凋亡分化, 干扰癌细胞DNA、RNA和蛋白质的生物合成。射频消融具有操作简单、时间短、安全、创伤小、疗效明显等特点^[20-22]。

2.3 经皮穿刺局部治疗 超声引导下的经皮穿刺局部治疗转移性肝癌, 如微波治疗, 冷冻治疗及瘤内酒精注射, 具有创伤性小, 患者耐受性好, 副作用低, 疗效高的优点, 但复发的有待进一步解决^[23-25]。

2.4 免疫调节及生物治疗 作为转移性肝癌治疗的辅助疗法, 基因治疗为近年来出现的肿瘤治疗的一种新方法, 其机制主要为诱导肿瘤细胞自身生长的停滞或凋亡。最近人们在对转移性肝癌有治疗作用的基因转入活体靶细胞方面取得了很大进展, 大量有治疗潜力的基因被克隆。目前研究的基因有“自杀基因”、抗血管生成基因、癌基因和肿瘤抑制基因等。化学、物理作用及病毒载体可促进治疗基因转入肿瘤细胞。相信不久的将来, 基因治疗会成为肿瘤治疗的主要手段之一。^[26-27]

3 不同原发灶的转移性肝癌的治疗现状

3.1 大肠癌 大肠癌血行转移的首发部位为肝脏, 肝转移之后依次为肺转移、脑转移及骨转移, 与其他消化系统肿瘤相比, 进展速度较慢。所以,

大肠癌肝转移常常是外科治疗的良好适应症, 治疗结果也相对较好^[28-31]。相反, 大肠癌肝转移对化疗敏感性低, 全身化疗, 采用5-FU加CPT-11方案, 有效率为25%-40%^[32-34], 另外, 肝动脉注射化疗有效率为50%-80%^[35-36], 但并未证实肝动脉注射化疗能够明显改善预后^[37-39]。而且, 即使有肝外的肺转移, 只要肺转移灶能切除, 也常常选择手术切除转移性肝癌。需要指出, 在同时性肝转移的情况下, 必须对原发灶做根治性切除。

大肠癌肝转移的手术适应症: (1)原发灶得到根治性切除; (2)转移仅限于肝内, 病灶少于等于3个, 多于3个应局限在半肝; (3)患者能够耐受肝切除; (4)如有肝外转移, 肝外转移灶能够得到有效治疗; (5)作为综合治疗的一环, 减瘤手术也有意义^[40]。按照大肠癌阶段性转移的理论^[41], 大部分病例先血行性转移到肝脏, 达到一定大小后, 再由肝脏转移到肺, 然后进一步转移到全身, 从这一理论出发, 即使大肠癌有血行转移, 在肝转移阶段, 进行肝切除, 亦能达到根治的效果。

不适合手术治疗的转移性肝癌, 可采用肝动脉化学栓塞治疗、微波热凝固治疗和射频消融治疗等方法。

3.2 胃癌 与大肠癌相比, 胃癌生物学恶性度高、进展速度快, 而且容易发生淋巴结转移、腹膜种植转移等血行转移以外的进展方式。单纯肝转移而无其他部位转移的病例相对较少, 适合手术治疗的也就较少^[42]。同时性肝转移的情况下, 有报告D1以上的原发灶切除, 加上肝动脉化学疗法, 有效率50%-70%^[43], 1年生存率83%^[44], 预后较好。化疗最有效的仍然是5-FU。胃癌肝转移, 常常同时伴有其他部位转移, 而且进展速度快, 单纯对肝转移癌的局部疗法很有限, 而且全身化疗作用也不十分理想。

3.3 胰腺癌 多数情况下, 胰腺癌的肝转移和腹膜转移预示着预后严重不良, 即使是原发灶进行了切除或放射治疗也是类似结果。原发灶能够根治切除, 又没有肝外转移, 能够实施肝转移癌切除的报告非常少。肝转移常常为多发散在的转移灶, 这也是不能进行肝切除的一个原因。另外以5-FU为主的化疗效果亦不好, 与不治疗相比的延命效果仅仅数月而已^[45-47]。另外, 肝转移灶实施肝动脉化疗也没有显著的疗效。胰腺癌肝转移已经预示着预后不良, 肝外转移的进展速度比胃癌还要快, 肝转移本身的局部治疗很难奏效, 全身治疗效果也不良。在同时性肝转移的情况下, 一般放弃对原发灶的手术治疗。

3.4 胆道癌 胆道系统恶性肿瘤的原发灶治疗相对比较困难, 转移性肝癌较少成为单独治疗的对象。同时性肝转移的情况下对原发灶的手术治疗比较消极。

3.5 食管癌 肝转移不一定是食管癌血行转移的首发部位, 治疗上也比较困难, 有进行肝切除及肝动脉化学疗法的报告, 但例数较少。5-FU+CDDP的全身化疗, 近年来显示了比较好的疗效, 成为主要的治疗手段。

3.6 平滑肌肉瘤 平滑肌肉瘤发病率相对较低, 没有有效的治疗药物。平滑肌肉瘤常表现为典型的血行性转移, 肝转移的发生率比较高。根据恶性程度, 其进展速度不同, 一般为扩张性生长, 肝转移灶对化疗不敏感, 如能切除, 尽量切除。不能切除的肝转移灶可进行肝动脉化学栓塞及肝动脉化疗。蔡光荣 *et al*^[48]报道源于平滑肌肉瘤的转移性肝癌, 肝切除术后3年生存率为36.6%。

3.7 乳癌和肺癌 与消化系癌不同, 乳癌和肺癌的肝转移是明显的肿瘤全身进展的一种表现, 乳癌和肺癌已形成标准的化疗方法, 肝转移癌较少成为单独治疗的对象。但在没有肝外转移的情况下, 肝转移灶也可进行局部治疗^[49-50], 包括进行肝切除及肝动脉化疗, 但一般认为局部治疗应当作为全身治疗的一个环节。

4 结论

转移性肝癌的预后取决于原发肿瘤的部位、恶性程度、肝受累范围、有无肝外部位转移灶和患者的全身情况。一般而言, 患者在诊断为肝脏转移后一年内死亡, 结直肠肿瘤的转移性肝癌预后相对较好, 多发性肝转移多死于2-3年内, 但16%的单发性肝转移者存活5年以上。对已有肝转移的晚期肿瘤, 只有在尽可能切除原发灶的情况下, 采取以手术为主的综合治疗的方法, 才有可能最大限度地使病情缓解, 提高患者生活质量, 延长生存时间。

5 参考文献

- 1 童颖, 杨甲梅. 转移性肝癌的治疗现状. 中国医师杂志 2000; 2: 197-199
- 2 郑树森. 肝切除技术现况和进展. 中国实用外科杂志 2005; 25: 65-67
- 3 Shah SA, Bromberg R, Coates A, Rempel E, Simunovic M, Gallinger S. Survival after liver resection for metastatic colorectal carcinoma in a large population. *J Am Coll Surg* 2007; 205: 676-683
- 4 Kan N. Analysis of long-term (5-year) survival in patients with metastatic breast cancer to the liver.

■创新盘点

本文重点阐述了转移性肝癌的手术和非手术治疗的具体方法, 较详细地叙述了各种不同原发灶来源的转移性肝癌的治疗现状。

■同行评价

本文叙述全面,内容详实,对临床有一定的指导意义。

- 5 Gan To Kagaku Ryoho 2006; 33: 1780-1784
- 6 Scheele J, Stang R, Altendorf-Hofmann A, Paul M. Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg* 1995; 19: 59-71
- 7 Gazzaniga GM, Ciferri E, Fazio S, Bagarolo C, Municino O, Cesaro S, Cogolo LA. Repeated hepatic resections for recurrent metastasis of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 1995; 42: 383-386
- 8 Fernandez-Trigo V, Shamsa F, Sugarbaker PH. Repeat liver resections from colorectal metastasis. Repeat Hepatic Metastases Registry. *Surgery* 1995; 117: 296-304
- 9 Di Carlo V, De Nardi P, Ferrari G, Gini P, Stella M. Repeated hepatectomy for colorectal metastasis. *Ann Ital Chir* 1997; 68: 775-780
- 10 刘念, 耿小平. 肝转移瘤同期切除的标准. 肝胆外科杂志 2006; 14: 402
- 11 魏晓岗, 赵海剑, 程若川, 田衍, 罗华友, 李清. 结肠癌肝转移灶同期切除后门静脉化疗. 昆明医学院学报 2006; 27: 82-84
- 12 Kubota K, Makuuchi M, Kusaka K, Kobayashi T, Miki K, Hasegawa K, Harihara Y, Takayama T. Measurement of liver volume and hepatic functional reserve as a guide to decision-making in resectional surgery for hepatic tumors. *Hepatology* 1997; 26: 1176-1181
- 13 Soyer P, Roche A, Elias D, Levesque M. Hepatic metastases from colorectal cancer: influence of hepatic volumetric analysis on surgical decision making. *Radiology* 1992; 184: 695-697
- 14 Tanaka K, Shimada H, Ohta M, Togo S, Saitou S, Yamaguchi S, Endo I, Sekido H. Procedures of choice for resection of primary and recurrent liver metastases from colorectal cancer. *World J Surg* 2004; 28: 482-487
- 15 Pichlmayr R, Weimann A, Ringe B. Indications for liver transplantation in hepatobiliary malignancy. *Hepatology* 1994; 20: 335-405
- 16 Jenkins RL, Pinson CW, Stone MD. Experience with transplantation in the treatment of liver cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 23 Suppl: S104-S109
- 17 Olausson M, Friman S, Herlenius G, Cahlin C, Nilsson O, Jansson S, Wangberg B, Ahlman H. Orthotopic liver or multivisceral transplantation as treatment of metastatic neuroendocrine tumors. *Liver Transpl* 2007; 13: 327-333
- 18 楚长青, 张保民. 介入治疗转移性肝癌. 医药论坛杂志 2006; 27: 99
- 19 温树伟, 党之俊, 畅俊平. 肝转移瘤的介入治疗. 山西医药杂志 2005; 34: 859-860
- 20 钱骏. 肝转移瘤的介入治疗. 中华消化杂志 2005; 25: 443-445
- 21 严昆, 陈敏华, 杨薇, 王艳滨, 高文. 肝细胞肝癌射频消融治疗远期疗效分析. 中华消化杂志 2006; 28: 556-558
- 22 陈敏华, 杨薇, 严昆, 高文, 戴莹, 王艳滨, 霍苓, 张晖, 黄信孚. 应用射频消融法对肝癌患者进行规范化治疗. 中华医学杂志 2005; 85: 1741-1746
- 23 杜燕夫, 韩进, 谢德红, 李敏哲, 邱繁荣. 腹腔镜辅助下原发性肝癌和肝转移瘤的射频消融术治疗. 腔镜外科杂志 2004; 9: 65-67
- 24 陈夷, 吴孟超, 陈汉. 微波热凝治疗转移性肝癌. 中华肝胆外科杂志 2006; 12: 118-120
- 25 梁萍, 董宝玮, 于晓玲, 杨艳荣, 于德江, 王暘, 肖秋金, 盛林, 陈钢. 超声引导经皮微波凝固治疗在肝转移瘤中的应用价值. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 301-304
- 26 刘宏, 兰守丽, 赵馥, 王文义, 阙劲松, 郑光辉, 高巧. 无水酒精注射治疗晚期肝转移瘤. 河南肿瘤学杂志 2004; 17: 426-427
- 27 吴文溪, 严鹏霄, 丁强, 沈历中, 范萍. IFN- γ 转基因治疗与重组IFN- γ 注射对肝转移瘤小鼠的治疗作用. 中国肿瘤生物治疗杂志 2004; 11: 99
- 28 叶胜龙. 肝癌免疫基因治疗的研究现状. 中华肝脏病杂志 2002; 10: 407-408
- 29 肖玉根, 段晓帆, 张晓华. 大肠癌肝转移的外科治疗. 肝胆外科杂志 2006; 6: 428-429
- 30 刘特彬, 陈漫清, 李晓辉. 大肠癌并肝转移65例诊治体会. 广东医学 2004; 25: 201-202
- 31 季加孚. 结直肠癌肝转移的治疗策略. 中国实用外科杂志 2004; 24: 398-400
- 32 蔡光荣, 邵祥麟, 李勇, 孙仁刚, 沈宝忠. 11例大肠癌肝转移手术后远期疗效分析. 中国肿瘤临床 2004; 31: 891-892
- 33 Kohne CH, Schoffski P, Wilke H, Kaufer C, Andreesen R, Ohl U, Klaasen U, Westerhausen M, Hiddemann W, Schott G, Harstick A, Bade J, Horster A, Schubert U, Hecker H, Dorken B, Schmoll HJ. Effective biomodulation by leucovorin of high-dose infusion fluorouracil given as a weekly 24-hour infusion: results of a randomized trial in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 418-426
- 34 秦海霞, 南克俊, 杨光. 三种方案治疗晚期大肠癌近期疗效比较. 中国癌症杂志 2004; 14: 265-267
- 35 Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000; 355: 1041-1047
- 36 Arai Y, Inaba Y, Takeuchi Y, Ariyoshi Y. Intermittent hepatic arterial infusion of high-dose 5FU on a weekly schedule for liver metastases from colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40: 526-530
- 37 何建苗, 蒲永东, 朱志东, 曹志宇, 杨波, 董立国. 双泵化疗在大肠癌肝转移中的应用. 中华肿瘤杂志 2002; 24: 167-169
- 38 Allen-Mersh TG, Earlam S, Fordy C, Abrams K, Houghton J. Quality of life and survival with continuous hepatic-artery floxuridine infusion for colorectal liver metastases. *Lancet* 1994; 344: 1255-1260
- 39 Begos DG, Ballantyne GH. Regional chemotherapy for colorectal liver metastases: thirty years without patient benefit. *J Surg Oncol* 1994; 56: 139-144
- 40 Reappraisal of hepatic arterial infusion in the treatment of nonresectable liver metastases from colorectal cancer. Meta-Analysis Group in Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 252-258
- 41 嵇振岭, 刘合代, 彭淑牖. 大肠癌肝转移治疗的进展. 临床肿瘤学杂志 2004; 9: 318-321, 封3
- 42 Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CH, Lopez MJ. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol* 1986; 150: 195-203
- 43 赵建国. 胃癌合并肝转移14例诊治体会. 肿瘤防治研究 2001; 28: 344
- 44 Kumada T, Arai Y, Itoh K, Takayasu Y, Nakamura K, Ariyoshi Y, Tajima K. Phase II study of combined administration of 5-fluorouracil, epirubicin and mitomycin-C by hepatic artery infusion in patients

- with liver metastases of gastric cancer. *Oncology* 1999; 57: 216-223
- 44 邵磊, 别志强, 马素芳, 陈军, 王维, 李占武. 胃癌肝转移手术切除与肝动脉门静脉双插管化疗47例体会. *中华普通外科杂志* 1999; 14: 21
- 45 Ishii H, Okada S, Tokuyue K, Nose H, Okusaka T, Yoshimori M, Nagahama H, Sumi M, Kagami Y, Ikeda H. Protracted 5-fluorouracil infusion with concurrent radiotherapy as a treatment for locally advanced pancreatic carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 1516-1520
- 46 Louvet C, Beerblock K, de Gramont A, Varette C, Demuynck B, Bennamoun M, Cady J, Delfau S, Maisani JE, Krulik M. High-dose folinic acid, 5-fluorouracil bolus and infusion in advanced pancreatic adenocarcinoma: a pilot study. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1217
- 47 Weinerman BH, MacCormick RE. A phase II survival comparison of patients with adenocarcinoma of the pancreas treated with 5-fluorouracil and calcium leucovorin versus a matched tumor registry control population. *Am J Clin Oncol* 1994; 17: 467-469
- 48 蔡光荣, 邵祥麟, 李勇, 柳新. 肝脏转移性平滑肌肉瘤的外科治疗. *腹部外科* 2003; 16: 22-23
- 49 龙清云, 刘骏方, 鲁植艳, 胡金香, 卓德强. 肺癌并肝转移的联合介入治疗(附15例报告). *放射学实践* 2003; 18: 437-438
- 50 李小平, 黄雯霞, 刘鲁明. 乳腺癌肝转移诊断和治疗现状. *临床肿瘤学杂志* 2003; 8: 299-301, 308

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的大型综合性消化病学类学术期刊. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号. 《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊和中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊. 《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录. 《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展. 从1993-2007《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文. 《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊. 《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能.

功能性胃肠病罗马标准的简介和解读

张万岱

■背景资料

功能性胃肠病是以消化系统症状为临床表现,应用生化、影像学和内镜检查等并未发现有器质性病变或不能用器质性病变解释症状的一组胃肠道疾病,罗马委员会早在15-20年前就开始收集、修改和更新FGID分类系统的相关信息,并先后制定了罗马I、II、III标准。

张万岱,南方医科大学南方医院消化疾病研究所 广东省广州市 510515

张万岱,教授,主任医师,主要从事胃肠道疾病的诊治研究。

通讯作者:张万岱, 510515, 广东省广州市南方医科大学南方医院消化疾病研究所. zhangwdcn@163.com

电话: 020-61641547 传真: 020-87280770

收稿日期: 2007-06-11 修回日期: 2008-01-01

Review of Rome criteria for the functional gastrointestinal disorders

Wan-Dai Zhang

Wan-Dai Zhang, Institute of Digestive Disease, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Wan-Dai Zhang, Institute of Digestive Disease, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. zhangwdcn@163.com

Received: 2007-06-11 Revised: 2008-01-01

Abstract

The new Rome III criteria reflect upon a more than 15-yr process to legitimize, classify and bring scientific credibility to the functional gastrointestinal disorders. This article will reviews the Rome committee process that led to the production of these documents, the Rome III Classification System, a description of the changes from the Rome II criteria (published in 2000), and the future of the Rome Foundation activities. These new criteria are of value in clinical practice, for epidemiological, pathophysiological and clinical research, and for the development of new therapeutic strategies.

Key Words: Functional gastrointestinal disorders; Rome III criteria; Classify; Diagnosis

Zhang WD. Review of Rome criteria for the functional gastrointestinal disorders. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 120-124

摘要

罗马委员会对功能性胃肠病(FGID)进行了系列地跟踪研究,先后制定了罗马I、II、III标准。本文重点评介了罗马III在诊断时限、分类

调整、诊断标准、分型修订、共病、症状重叠和精神社会因素对FGID的影响等方面的新亮点;其科学价值在于他体现了神经胃肠病学及相关检测技术和治疗学的科研成果,又有力地促进这些学科的深入发展;罗马III标准是FGID临床科研和诊治工作的规范和准则,具有重要的临床意义;应加强学习和贯彻罗马III标准,并在实践中验证、研究和总结,为完善罗马标准作出贡献。

关键词: 功能性胃肠病; 罗马III标准; 分类; 诊断

张万岱. 功能性胃肠病罗马标准的简介和解读. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 120-124

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/120.asp>

0 引言

人类疾病可以分为两大类,即器质性疾病和功能性疾病。凡有解剖学结构异常并产生相应症状体征者称器质性疾病;功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGID)是以消化系统症状为临床表现,应用生化、影像学和内镜检查等并未发现有器质性病变或不能用器质性病变解释症状的一组胃肠道疾病^[1],罗马委员会早在15-20年前就开始收集、修改和更新FGID分类系统的相关信息,并先后制定了罗马I、II、III标准。本文简述其演进历史,并就罗马III的标准新点、科学价值、临床意义和今后方向作一评述。

1 功能性胃肠病罗马标准的演进历史

人类对FGID的认识有一个渐进的过程。在早期欧洲文献中有一些胃肠功能障碍的报道,第1篇描述肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的英文文献在19世纪早期发表。医学界对IBS的认识在随后的120年里几乎没有进展。1962年,牛津大学Chardhary和Truelove首次对IBS患者进行了系统回顾,他们的报道将功能性疾病引入一个新领域,此后,关于功能性疾病的科学文献迅速增多^[1]。

The Irritable Gut (1979年)一书中包含对FGID

■同行评议者

潘秀珍,教授,福建省立医院消化研究所

的第一次分类. 1978年, Heaton *et al* 发表了对腹痛和肠功能障碍门诊患者的问卷调查结果, 与器质性肠道疾病相比, 15个症状中有6个在IBS中更常见, 这6个症状即成为诊断IBS的“Manning标准”. 1984年, 德国Kruis *et al* 发表了类似研究结果. 他们的主要贡献是记录一些警报症状, 以提醒医生考虑器质性病变. 以上两个研究, 加上Drossman和Whitehead提供的流行病学资料, 是IBS罗马标准的基础.

制定罗马标准的灵感来自1984年在里斯本召开的第12届国际胃肠病学会会议上的IBS专题讨论会, 会上讨论IBS的治疗和研究对指南的需要. 随后成立了一个工作组为下届在罗马召开的会议制定指南.

主席Thompson与Drossman(美国)、Heaton(英国)、Dotteval(瑞典)和Kruis(德国)合作了2年. 1987年, 他们在罗马讨论一个草案并达成共识, 并将该草案送达7个国家的16名专家同行征求意见. 随后在1988年罗马召开的第13届会议上公布第一个罗马标准. 1989年罗马指南发表. 指南文件和诊断标准被称为IBS罗马2标准.

此后, 成立了另一个委员会考虑IBS的分类情况. 经讨论, 将FGID归类为胃肠道5个解剖区域中的21种疾病. 第一次将诊断标准用于所有FGID, 并对1988年IBS标准进行了第一次修改, 于1990年完成, 可以被认为是罗马 I 标准的雏形. 工作组继续工作4年, 进一步研究上述5个解剖区域(食管、胃十二指肠、胆道、肠道和肛门直肠)的诊断标准, 并讨论功能性肠道疾病. 1994年发表了“功能性胃肠病: 诊断、病理生理学和治理, 一项全球共识”, 这才是定稿的罗马 I 标准.

1996年罗马组织作为FGID诊断工作组正式成立, 2003年更名为罗马基金会(委员会), 继续增进FGID的科研和临床知识为宗旨, 得到社会各界的广泛支持. 随后, 来自13个西方国家的50多名研究人员被分成10个委员会, 经过4年的工作制定了罗马 II 标准, 即“功能性胃肠病第2版: 诊断、病理生理学和治理, 一项全球共识”. 其中包括了几项重要的创新. 罗马 II 标准及重要的支持文献在1999年的*Gut*增刊上发表.

为制定罗马III, 委员会从18个国家中挑选87名参与者并分成了14个委员会. 发展中国家(包括中国、巴西、智利、委内瑞拉、匈牙利和罗马尼亚)也有成员加入. 关于性别、社会、患者、药理学及药代动力学等方面的新工作

组也相继成立. 功能性腹痛工作组从功能性肠病组中分出, 而且有两个委员会(新生儿和婴幼儿、儿童和青少年)分别研究儿童相关问题. 由附属委员会根据新标准设计成人及儿童的调查问卷. 罗马III标准于2004-11/12在罗马会议上完成, 委员会成员在2005年蒙特利尔世界胃肠病学大会上报告了罗马III标准, 在2006年洛杉矶召开的美国胃肠病学年会上报告诊断标准部分. 会议结果以文章的形式发表在2006-04出版的*Gastroenterology*杂志罗马III专刊, 并于2006-08发行《罗马III》一书, 其内容较专刊更丰富, 信息量更大. 中国《胃肠病学》2006年12期出专刊较全面系统地介绍《罗马III》有关文献和国内学者对其各类疾病诊断标准的解读.

尽管还存在争议, 罗马标准仍获得了广泛认同, 认为该标准是许多FGID研究的基础, 是临床药物试验的行业标准. 各研究组可以根据上述指南进行交流.

经过6年努力, 罗马III的发表更新了罗马 II 标准. 现在急需宣传推广这些标准, 以规范FGID的诊治工作; 同时在实践中验证这些标准, 开展科研工作, 用新的临床数据来强化和完善这些标准, 为制定罗马IV标准奠定基础.

2 罗马 III 标准的主要新点

经过18个国家87名专家6年的共同努力, 罗马III于2004-12在罗马会议上完成, 在2005年世界胃肠病学大会和2006年美国胃肠病学年会上报告和讨论, 于2006年在*Gastroenterology*杂志上发表. 罗马III标准的修订更多地基于循证医学, 与罗马 II 标准相比, 其主要新点如下^[2-3]:

- (1)FGID时间设定的变化: 罗马III推荐诊断前至少6 mo出现症状, 且近3 mo病情活动, 较罗马 II 对FGID病程的限定(过去12 mo内至少12 wk有症状)更为宽松, 在科研和临床实践中更易掌握.
- (2)分类: 从罗马 II 的7类增加到8类45种. 其中罗马 II 中的儿童FGID被重新划分两类: 新生儿和婴幼儿型(G)以及儿童和青少年型(H), 从而更能体现出不同生长和发育阶段儿童临床情况的差异.
- (3)反刍综合征从功能性食管疾病(A)改为列入功能性胃十二指肠疾病(B), 因为有证据表明该症状是由胃及腹部肌肉压力所致, 同时取消非特异性功能性食管病.
- (4)将功能性腹痛综合征(FAPS)由功能性肠病(C)抽出单独归为一类(D). 这是由于越来越多的证据表明, 较之胃肠道本身功能异常, FAPS更多地是由CNS对

■ 相关报道

我国学者日益重视功能性胃肠病的基础和临床研究, 并作出了有益的贡献, 如北京协和医院研究组关于肠道感染后肠易激综合征的一项研究成果作为罗马 III 制定的重要依据而被引用.

■创新盘点

罗马Ⅲ是目前关于功能性胃肠病的最新、最全面、最系统、最权威的医学经典,对提高FGID的临床诊治水平和科研学术水平必将起到巨大的推动作用。

正常内脏信号的放大所致^[4]。(5)诊断标准改变:罗马Ⅲ不再强调将功能性消化不良作为一个整体来研究,而是根据症状是否与进食相关分为两类:餐后不适综合征(PDS, B1a)(与进食相关的FD)和上腹痛综合征(EPS, B1b)(与进食无关的FD)。这是根据近年来神经胃肠病学研究成果所作出的。研究发现FD患者的早饱感,餐后腹胀等症状均与进餐相关,是胃排空延迟,内脏高敏感和胃底容受性扩张功能障碍所致,故而归为与进食相关的一类,与进食无关的疼痛不适则归为另一类。类似于罗马Ⅱ中的动力障碍型和溃疡型消化不良。(6)胆囊和Oddi括约肌功能障碍的诊断标准提出了更多的限制,一般应尽量避免内镜检查、逆行胰胆管造影或压力测定等侵入性方法,而是以症状为基础进行诊断,设定了更为特异的特征和排除诊断。(7)IBS亚型的修订:罗马Ⅲ对IBS分型作了简化,仅根据粪便性状(Bristol粪便评分表)分为腹泻型(IBS-D)($>25\%$ 的时间排稀糊便,而排块样或干硬粪便时间 $<25\%$)、便秘型(IBS-C)($>25\%$ 的时间排块样便或干硬便,而排稀糊便时间 $<25\%$)、混合型(IBS-M)(指排稀糊便和块样便或干硬便时间均 $>25\%$)和不定型(IBS-U)(粪便性状不符合上述三型任何一种),因而无论是IBS-C或IBS-D患者不一定仅仅有腹泻或便秘。这一分型与肠道运转的联系较排便困难更为密切。罗马Ⅱ的亚型(便秘型IBS和腹泻型IBS)在科研和临床中仍可使用。(8)共病:FGID可能与器质性疾病共存,此时诊断以后者为主,同时伴有FGID症候群。在彻底排除肠道炎症、结构异常、代谢异常或肿瘤病变后才能诊断FGID。(9)症状重叠:FD和IBS可同时存在。若上腹痛在排便后缓解则可诊为IBS,否则可能为FD。功能性腹胀必须在排除FD和IBS后才能诊断。症状重叠可能是由于他们有类似的病理生理基础或遗传因素,一些FGID常伴有焦虑抑郁状态,提示有中枢因素的作用,即受精神心理因素的影响。神经元对靶器官的调控呈多元交叉网络状态,胃肠道神经反射可出现一元多靶或多元一靶现象;这也是产生重叠症的一个原因。有研究表明,内脏感觉通路与大脑边缘系统重叠的共同通路学说可部分解释重叠症现象。(10)精神社会因素对FGID具有重要影响,尽管不作为诊断条件,但也应给予重视,若患者有明显的焦虑和抑郁症状,应给予心理治疗,必要时予抗焦虑抑郁药物治疗。

3 罗马Ⅲ标准的科学价值

罗马Ⅲ标准是现代神经胃肠病学及相关检测技术和治疗学科研成果的重大体现,又是推动这些学科进一步深入发展的强大动力,这就是罗马Ⅲ标准的科学价值。FGID研究领域的重大进展如下^[5]。

3.1 进一步丰富了医学模式转变的内涵 过去三个世纪中一直以生物医学模式占据统治地位,忽略了社会、神经和心理因素对疾病发生、发展的重要作用。现在已转变为生物社会心理医学模式,并用以指导FGID的科研和临床,从而提高了对FGID发病机制认识。Van Qudenhove *et al* 研究发现,FD患者症状的严重程度主要是由社会心理因素决定的,而不是由胃病理生理学机制所决定。Simren *et al* 也发现内脏高敏感性和心理因素对IBS胃肠道症状严重程度的影响最大。功能性腹痛综合征(FAPS)的发病与社会心理因素密切相关,罗马Ⅲ标准对其诊断和治疗中心理作用的重要性均非常关注。这些进一步证实了社会心理因素在FD、IBS和FAPS等FGID发病中的重要作用,同时这些科研成果也进一步丰富了生物社会心理医学模式的内涵。

3.2 进一步明确了FGID是一类独立的临床疾病 以往认为FGID的症状主要是由胃肠道动力异常所致,随着神经病理学的研究进展,人们发现FGID的症状与许多因素有关:(1)胃肠动力变化常由强烈的情绪或环境压力所引起,又与胃肠症状密切相关,尤其与呕吐、腹泻和便秘等症状密切相关^[6-7]。(2)内脏高敏感性是FGID共同的发病机制,他涉及肠道局部和脑肠轴的多个方面。Gwee *et al*^[8]发现沙门菌感染愈后三年发生炎症后IBS(PI-IBS),其结肠已无炎症改变但结肠敏感性高于对照组,说明内脏高敏感性在IBS发病中的重要作用。(3)黏膜免疫、炎症和肠道细菌菌群的改变是FGID胃肠症状产生的基础:1/3 IBS或FD的症状开始于急性肠道感染之后,约25%的急性肠道感染患者会发展成IBS或FD,这些患者的黏膜具有炎性细胞和炎性细胞因子表达增加的典型表现^[7-9]。(4)脑-肠轴可双向传入,将大脑的情绪和认识中枢与外周胃肠道功能连接起来。外在的视觉、嗅觉或脑部的情绪、思想的信息通过与高级中枢的神经连接起来影响胃肠道的感觉、动力、分泌和炎症。内脏的效应同样也可影响脑部疼痛的感觉、情绪和行为^[7]。(5)脑肠肽如5-羟色胺(5-HT)、阿片受体、P物质、降钙素基因相关肽,胆囊收缩素和皮质激

素释放激素等存在于肠道和CNS的神经肽和受体,与脑肠功能紊乱导致的FGID密切相关。(6)遗传因子可通过多种途径影响FGID,如降低IBS患者的白细胞介素(IL)-10的水平,影响肠黏膜神经敏感性;5-HT再摄取转运体多态性可能影响5-HT神经递质水平;G蛋白多态性可同时影响CNS和肠道相关的行为^[7],但环境因素和心理因素对FGID的表现更为重要。

3.3 研究方法取得了突破性进展 目前涌现出一批研究胃肠运动和感觉的新方法、新技术,使我们对FGID的发病机制及其相关因素有了更进一步的了解,如多通道腔内阻抗检测技术可同时检测食糜运转及其相关压力的改变。Berstad *et al*^[10]应用可测容积变化的新的多通道腔内阻抗技术检测了食管的容积和横切面的直径,验证了此项技术在食管动力研究中的价值。Berstad *et al*将正电子和定向检测手段(POM)与传统超声探头结合起来创建了三维超声检测法,他不仅提高了胃窦胃底的视觉影像效果,且可对影像进行三维重建。Padua *et al*应用此法研究发现阴道高压带与耻骨直肠肌压力的增加有关。应用正电子发射计算机断层显像(PET)和功能性磁共振成像(fMRI)等方法提供了研究胃肠道功能中枢调控及其与情绪和认识领域关系的一个窗口。Ringel *et al*应用fMRI发现IBS患者内脏高敏感性的产生与大脑特定区域活化有关。Kilpatrick *et al*应用fMRI发现替加色罗治疗IBS-C前后大脑对疼痛刺激反应区域的差异,直接反应了药物的治疗效果。胶囊内镜内包埋压力传感器可观察到胃和小肠腔收缩压力的改变,从而可用于胃肠动力的研究。Gaddipati *et al*应用胶囊内镜检测到空腹状态下胃收缩幅度与应用胃电图所得到的数据基本相同。

3.4 促进了治疗新药的研发 以往FGID的治疗主要是应用胃肠动力调节剂,随着神经胃肠病学研究的进展,人们认识到应该研制一些与纠正脑肠功能紊乱有关的制剂,如针对存在于肠道和CNS的神经肽和受体功能的制剂。现已发现许多5-HT受体激动剂或拮抗剂可用于调节胃肠功能,改善FGID患者症状。目前研究较多的是5-HT₃和5-HT₄受体激动剂和拮抗剂。现已批准上市的阿洛司琼(alsetron)系5-HT₃受体拮抗剂,他能阻断肠管内传入神经5-HT的激活,而影响内脏痛觉传递,主要用于女性以腹泻为主症的IBS患者。替加色罗新一代5-HT₄部分激动剂,选择性激活胃肠道5-HT₄受体,刺激胃肠道神经元

胞、分泌细胞和平滑肌细胞,诱发胃肠道蠕动增强,抑制结直肠的敏感性^[12],故主要用于治疗IBS-C和慢性便秘,同时也可用于上消化道动力不足的FD患者。

CRF可与特异的G蛋白偶联受体CRF₁和CRF₂相结合。应用CRF₁受体拮抗剂可改善动物模型中应激导致的结肠高敏感性,还可改善内脏刺激导致的腹痛、结肠动力的增加^[13],有可能应用于IBS的治疗中。

P2X受体是表达于神经细胞和非神经细胞的ATP门控离子通道。目前已克隆出8个不同的P2X受体,其中P2X₂和P2X₃与ENS关系密切。P2X受体拮抗剂具有抗伤害作用,且在动物模型的实验中发现其可缓解急性慢性疼痛^[14]。因此P2X受体与IBS关系的研究倍受重视。Xu *et al*认为P2X受体在肠道慢性刺激引起的内脏高敏感性中发挥重要的作用。P2X受体可能会成为FGIDs药物治疗的新靶点。

此外,CCK-1受体拮抗剂可增强胃排空,抑制食管括约肌一过性松弛(TLESR),目前正在研究中。

4 结论

《罗马III标准》规范了功能性胃肠病的定义、分类、范畴和诊断标准,并提示了治疗方向。这对于临床科研和治疗工作来说,是赖以遵循的科学准则、试验标准和临床指南。罗马III的发表既反应了对功能性胃肠病认识的现代观点,又提出了今后进一步研究的方向。罗马III是目前关于功能性胃肠病的最新、最全面、最系统、最权威的科学经典,对提高FGID的临床诊治水平和科研学术水平必将起到巨大的推动作用^[15]。

我国学者日益重视功能性胃肠病的基础和临床研究工作,并作出了有益的贡献,如北京协和医院研究组关于肠道感染后肠易激综合征的一项研究成果作为罗马III制定的重要依据而被引用。但与国外研究相比,我们的工作急待进一步加强,首先应根据我国实际情况对罗马III进行解读,并将其改写成适应国情的标准和指南,以利于普及和推广。其次应加强FGID的研究,我国幅员广阔、人口众多,有大量病源,最适宜进行临床和流行病学研究,我国目前的研究队伍和研究水平也完全可以进行高质量的基础和应用研究。罗马III提出的分类和标准尚有不少是基于推理的修改,尚待评估、验证和改进。我们

■应用要点

罗马III的发表更新了罗马II标准,宣传推广这些标准,便于规范FGID的诊治工作;同时,在实践中验证这些标准,开展科研工作,用新的临床数据来强化和完善这些标准。

■同行评价

本文论述全面, 深入, 科学性强, 具有较强的学术价值。

必须进一步提高对FGID的认识, 在科研和临床工作中认真贯彻罗马III标准, 并在实践中进行验证、深入研究和观察总结, 以期对FGID罗马标准的不断完善作出我们应有的贡献。

5 参考文献

- 1 Thompson WG. The road to rome. *Gastroenterology* 2006; 130: 1552-1556
- 2 柯美云, 方秀才. 功能性胃肠病研究进展与罗马III. *胃肠病学* 2006; 11: 709-712
- 3 罗金燕. 学习罗马III标准, 促进功能性胃肠病研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 762-763
- 4 Clouse RE, Mayer EA, Aziz Q, Drossman DA, Dumitrascu DL, Mönnikes H, Naliboff BD. Functional abdominal pain syndrome. *Gastroenterology* 2006; 130: 1492-1497
- 5 徐俊荣, 罗金燕. 罗马III标准解读. *胃肠病学* 2006; 11: 720-722
- 6 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- 7 Mearin F, Pérez-Oliveras M, Perelló A, Vinyet J, Ibañez A, Coderch J, Perona M. Dyspepsia and irritable bowel syndrome after a *Salmonella* gastroenteritis outbreak: one-year follow-up cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129: 98-104

- 8 Gwee KA, Leong YL, Graham C, McKendrick MW, Collins SM, Walters SJ, Underwood JE, Read NW. The role of psychological and biological factors in postinfective gut dysfunction. *Gut* 1999; 44: 400-406
- 9 Tache Y, Martinez V, Wang L, Million M. CRF1 receptor signaling pathways are involved in stress-related alterations of colonic function and viscerosensitivity: implications for irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 1321-1330
- 10 Berstad A, Hauksen T, Gilja OH, Hveem K, Undeland KA, Wilhelmsen I, Haug TT. Gastric accommodation in functional dyspepsia. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 193-197
- 11 Schikowski A, Thewissen M, Mathis C, Ross HG, Enck P. Serotonin type-4 receptors modulate the sensitivity of intramural mechanoreceptive afferents of the cat rectum. *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14: 221-227
- 12 Ramkumar D, Rao SS. Efficacy and safety of traditional medical therapies for chronic constipation: systematic review. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 936-971
- 13 Chizh BA, Illes P. P2X receptors and nociception. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 553-568
- 14 North RA. The P2X3 subunit: a molecular target in pain therapeutics. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4: 833-840
- 15 胡品津. 参与罗马III制定的体会. *胃肠病学* 2006; 11: 708

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

● 消息 ●

欢迎订阅 2008 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。

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用。

《世界华人消化杂志》2008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,出版日期每月8, 18, 28日,月价72.00,年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023,北京市2345信箱。联系电话: 010-85381901-638; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; <http://www.wjgnet.com>。

黄芪总苷对小鼠日本血吸虫病肝纤维化的影响

丁向东, 王红群, 吴强, 汪学龙, 黄焰, 张晴, 杨枫

丁向东, 王红群, 吴强, 黄焰, 张晴, 杨枫, 安徽医科大学病理学教研室 安徽省合肥市 230032

汪学龙, 安徽医科大学寄生虫学教研室 安徽省合肥市 230032

丁向东, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事肿瘤病理及药理病理研究。

安徽省高校自然科学基金重点资助项目, No. 2006KJ092A

作者贡献分布: 丁向东与吴强对此论文所作贡献均等; 此课题由丁向东, 吴强, 王红群及汪学龙设计; 研究过程由丁向东, 王红群, 黄焰, 张晴及杨枫操作完成; 研究所用试剂及分析工具由吴强提供; 数据分析由丁向东, 吴强及王红群完成; 本论文写作由丁向东, 吴强完成。

通讯作者: 吴强, 230032, 安徽省合肥市梅山路69号, 安徽医科大学病理学教研室. aydjohn@yahoo.com

电话: 0551-5161130 传真: 0551-5161130

收稿日期: 2007-07-27 修回日期: 2007-12-03

Effect of astrogalosides on liver fibrosis in mice with schistosomiasis japonica

Xiang-Dong Ding, Hong-Qun Wang, Qiang Wu, Xue-Long Wang, Yan Huang, Qing Zhang, Feng Yang

Xiang-Dong Ding, Hong-Qun Wang, Qiang Wu, Yan Huang, Qing Zhang, Feng Yang, Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Xue-Long Wang, Department of Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Anhui Provincial Education Department (Key project), No. 2006KJ092A

Correspondence to: Dr. Qiang Wu, Department of Pathology, Anhui Medical University, 69 Meishan Road, Hefei 230032, Anhui Province, China. aydjohn@yahoo.com

Received: 2007-07-27 Revised: 2007-12-03

Abstract

AIM: To investigate the effect of astrogalosides on periovular granuloma and liver fibrosis in mice with *schistosomiasis japonica*.

METHODS: One hundred and twenty ICR mice were infected with cercariae of *Schistosoma japonicum*. The infected mice were divided randomly into four groups at the end of the 5th week after infection: model group, high dose astrogaloside group (20 mg/kg per day), low dose astrogaloside group (10 mg/kg per day) and liver protection tablet (Hugan pian) group (540 mg/kg per day) as positive drug control group. Forty days after infection, the four groups were treated with

praziquantel (500 mg/kg per day) for 2 days. Thirty healthy ICR mice were used in this experiment as normal control group. Ten mice in each group were sacrificed at the end of the 6th, 10th and 14th weeks, respectively. Meanwhile, the liver index, hematoxylin and eosin stain and Sirius red stain were used to evaluate the mean area of periovular nodules and the degree of liver fibrosis. Types I and III collagen on tissue microarray sections were detected by immunohistochemistry.

RESULTS: At the end of either the 10th or the 14th week in groups receiving two different doses of astrogalosides, the mean area of periovular nodules was decreased significantly, the degree of liver fibrosis and the expression of types I and III collagen ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) was also reduced in comparison with those in the model group. The mean optical density values at the end of the 10th week in the high and low dose astrogaloside groups and the model group were 0.093 ± 0.002 , 0.084 ± 0.003 and 0.134 ± 0.004 for type I collagen, and 0.074 ± 0.002 , 0.104 ± 0.005 and 0.146 ± 0.008 for type III collagen, and those at the end of the 14th week in the three groups were 0.099 ± 0.004 , 0.095 ± 0.004 and 0.141 ± 0.007 for type I collagen, and 0.070 ± 0.003 , 0.077 ± 0.003 and 0.101 ± 0.004 for type III collagen. Meanwhile, there was a significant difference in the protein expression of type III collagen between the high and low dose astrogaloside groups at the end of the 10th week ($P < 0.01$). However, at the end of the 6th week, there were not any differences in all the above parameters among the different groups.

CONCLUSION: Astrogaloside exerts its effects on hepatic fibrosis in ICR mice with *schistosomiasis japonica* by inhibiting periovular granuloma and reducing the synthesis of types I and III collagen.

Key Words: Astrogaloside; *Schistosomiasis japonica*; Liver fibrosis; Immunohistochemistry

Ding XD, Wang HQ, Wu Q, Wang XL, Huang Y, Zhang Q, Yang F. Effect of astrogalosides on liver fibrosis in mice

■背景资料

日本血吸虫病肝纤维化是日本血吸虫病患者死亡的主要原因。抗血吸虫药物有效杀虫后, 肝组织内的虫卵结节及纤维化仍能继续发展。而黄芪总苷是一种新的有效的抗肝纤维化药物, 研究表明其具有显著的抗炎, 抗损伤, 抗肝纤维化和免疫调节作用, 本文研究了其对日本血吸虫病肝纤维化和虫卵肉芽肿的影响。

■同行评议者

陈治水, 主任医师, 中国人民解放军第211医院

■研究前沿

目前的研究主要集中于阻滞肝星状细胞活化途径的相关细胞因子,从而逆转或延缓肝纤维化的进程,但国内外至今无理想的抗肝纤维化药物。

with *schistosomiasis japonica*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(2): 125-131

摘要

目的: 研究黄芪总苷(AST)对小鼠日本血吸虫病肝纤维化和虫卵肉芽肿的影响。

方法: 以日本血吸虫尾蚴感染ICR小鼠制作肝纤维化动物模型, 5 wk末随机分为: AST高剂量组20 mg/(kg·d)、AST低剂量组10 mg/(kg·d)、阳性药护肝片组540 mg/(kg·d)和模型对照组, 各组均于感染40 d后, 吡喹酮杀虫2 d 500 mg/(kg·d)。同时设置正常对照组30只。感染后6、10和14 wk每组随机处死10只, 观察肝脏指数, 应用HE和天狼猩红染色观察小鼠虫卵结节大小及纤维化程度; 构建组织芯片, 应用免疫组织化学方法检测虫卵结节中I、III型胶原蛋白的表达。

结果: 感染后10、14 wk, AST高、低剂量组与模型组相比较, 肝组织中血吸虫虫卵结节显著缩小, 纤维化程度明显减轻, I、III型胶原蛋白含量(MOD)明显减低(10 wk: 0.093 ± 0.002 、 0.084 ± 0.003 vs 0.134 ± 0.004 , $P < 0.01$; 0.074 ± 0.002 、 0.104 ± 0.005 vs 0.146 ± 0.008 , $P < 0.05$; 14 wk: 0.099 ± 0.004 、 0.095 ± 0.004 vs 0.141 ± 0.007 , $P < 0.01$; 0.070 ± 0.003 、 0.077 ± 0.003 vs 0.101 ± 0.004 , $P < 0.05$)。感染10 wk, AST高、低剂量组III型胶原蛋白含量有统计学差异($P < 0.01$)。

结论: AST通过抑制虫卵结节、减少I、III型胶原的合成发挥抗小鼠日本血吸虫病肝纤维化的作用。

关键词: 黄芪总苷; 日本血吸虫病; 肝纤维化; 免疫组织化学

丁向东, 王红群, 吴强, 汪学龙, 黄焰, 张晴, 杨枫. 黄芪总苷对小鼠日本血吸虫病肝纤维化的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 125-131
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/125.asp>

0 引言

日本血吸虫病肝纤维化是导致门静脉高压、腹水和上消化道出血的主要原因, 也是日本血吸虫病患者死亡的主要原因。针对血吸虫病肝纤维化的发生发展过程, 抗血吸虫药物主要针对杀虫、抑制虫卵肉芽肿和延缓甚至阻止肝纤维化发展三个关键环节, 但杀虫药在有效杀虫

后, 肝组织内的虫卵结节及纤维化仍能继续发展^[1-2], 国内外尚无理想的抗血吸虫病肝纤维化药物。黄芪总苷(astrogalosides, AST)是一种新的有效的抗肝纤维化药物, 研究表明AST具有显著的抗炎、抗损伤、抗肝纤维化和免疫调节作用, 而且毒副作用小^[3-7]。目前除本实验室一篇体外AST抗血吸虫病肝纤维化报道外^[3], 尚未见AST抗血吸虫病肝纤维化报道。本文采用ICR小鼠制作血吸虫病肝纤维化模型, 并给予AST ig, 观察小鼠肝组织中虫卵结节大小、纤维化程度及I型、III型胶原蛋白合成的变化, 研究AST对小鼠日本血吸虫病肝纤维化的影响。

1 材料和方法

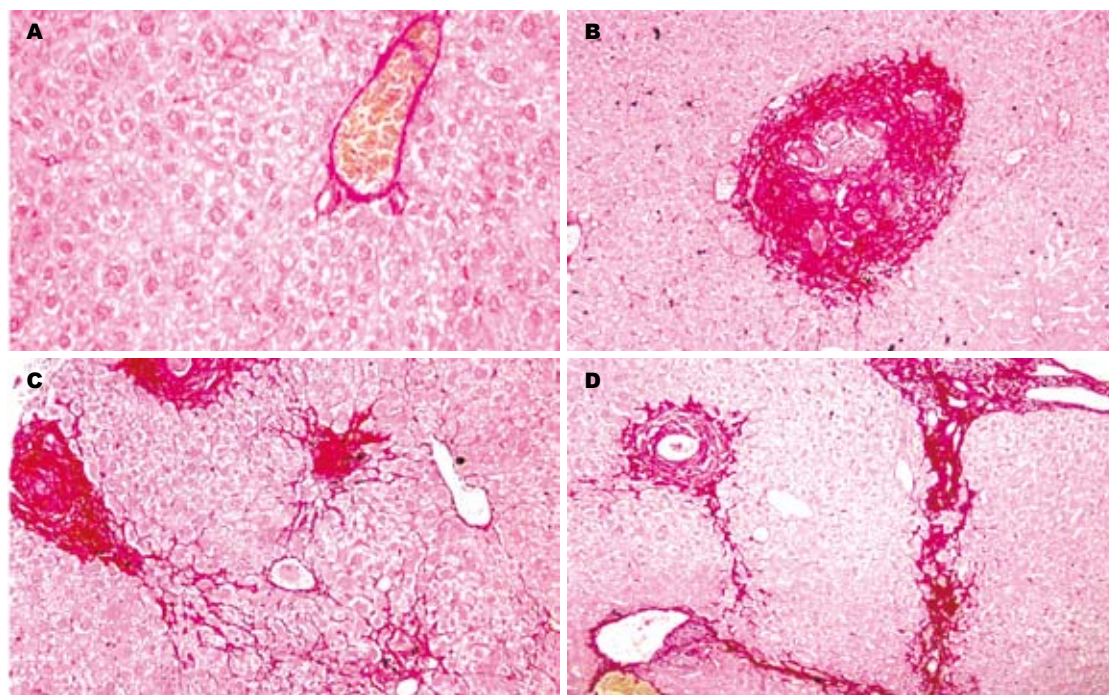
1.1 材料 清洁级ICR小鼠150只, 购自安徽省实验动物中心, 雌雄各半, 6-8周龄, 体质量 31 ± 2 g, 中国大陆株日本血吸虫阳性钉螺购自江苏省血吸虫病防治所, AST由合肥工业大学生物学院张宵翔教授提供, 吡喹酮为南京制药厂有限公司生产, 护肝片为哈尔滨葵花药业有限公司产品, 多克隆兔抗小鼠胶原I抗体(浓缩液200 mg/L, BA0326, 武汉博士德生物构成有限公司, 工作滴度1:50), 多克隆山羊抗小鼠胶原III抗体(浓缩液200 mg/L, Sc-25974, Santa Cruz, 工作滴度1:50), 通用型PV免疫组化试剂盒购于北京中杉生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠肝纤维化模型的建立: 将钉螺孵育后逸出的中国大陆株日本血吸虫尾蚴, 以盖玻片法经小鼠腹部皮肤攻击感染, 总计感染120只ICR小鼠, 每只小鼠感染 30 ± 1 条日本血吸虫尾蚴^[8]。

1.2.2 实验分组及给药: 实验小鼠造模35 d后, 随机分为4组: AST高剂量20 mg/(kg·d)组, AST低剂量10 mg/(kg·d)组, 护肝片540 mg/(kg·d)组和模型对照组, 每组30只, ig给药1次/d。实验小鼠均于日本血吸虫尾蚴感染40 d后, 吡喹酮500 mg/(kg·d)治疗2 d。药物均以5 g/L羧甲基纤维素钠作为溶媒, 10 mL/(kg·d) ig。正常对照组为30只健康鼠, 模型组和正常组以等量5 g/L羧甲基纤维素钠ig。感染后第6、10和14 wk分别取小鼠肝组织作病理学检测和免疫组织化学分析。

处死前隔夜禁食, 称体质量, 颈椎脱臼法处死, 迅速摘取肝脏并称湿质量, 观察肝脏大体标本, 取肝脏右叶组织1块, 40 g/L中性甲醛溶液固定, 用于组织学研究。按此公式计算肝脏指数:



■应用要点
本文研究黄芪总苷可通过缩小虫卵结节、减少胶原合成发挥抗血吸虫肝纤维化作用。

图1 各周小鼠肝组织天狼猩红染色结果($\times 100$)。A: 正常对照组; B: 6 wk; C: 10 wk; D: 14 wk。

肝脏指数 = 肝脏湿质量/体质量 $\times 100\%$ 。

1.2.3 病理学检查: 肝组织常规石蜡包埋, $4\ \mu\text{m}$ 连续切片, 作HE和天狼猩红染色。HE染色切片光镜观察肝脏虫卵结节的大小, 天狼猩红染色切片观察肝纤维化程度。肝纤维化程度判定标准^[9]: 0级 $2^0 = 1$, 正常; I级 $2^1 = 2$ 胶原纤维包绕肉芽肿周围并插入其中; II级 $2^2 = 4$ 汇管区有大量纤维, 小叶间仅有少量纤维; III级 $2^3 = 8$ 纤维组织大量延伸至小叶间。

1.2.4 组织芯片的构建: HE染色切片, 光镜下定位器定位标记病变区域, 使用内径 $2\ \text{mm}$ 取样针从供体蜡块取样, 每个蜡块取样3个, 并放入事先制备的 7×6 点阵的模型蜡块中, 经二次包埋后制成组织芯片, $4\ \mu\text{m}$ 厚连续切片, 分别作HE和免疫组化染色。

1.2.5 I、III型胶原的免疫组织化学检测: 免疫组化染色操作按抗体及试剂盒说明书进行。每例均拍摄病变组织5个高倍视野照片, 采用Image-pro plus图像分析软件, 计算平均光密度(mean optical density, MOD)。

统计学处理 计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用SPSS13.0软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 肝脏指数 6、10和14 wk时, AST两个剂量组及模型组的肝脏指数均高于正常组($P < 0.01$), AST高、低剂量组和模型组之间无

表1 小鼠肝脏指数($n = 10$)

分组	肝脏指数		
	6 wk	10 wk	14 wk
正常对照组	4.64 ± 0.14	3.94 ± 0.16	4.23 ± 0.35
模型对照组	7.33 ± 0.31^b	6.10 ± 0.13^b	5.34 ± 0.34^b
AST高剂量	7.52 ± 0.22^b	6.21 ± 0.19^b	5.38 ± 0.21^b
AST低剂量	7.93 ± 0.30^b	6.66 ± 0.29^b	5.30 ± 0.13^b
护肝片组	7.14 ± 0.25	6.42 ± 0.32	5.08 ± 0.15

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组。

明显差异(表1)。

2.2 肝组织HE和天狼猩红染色切片观察 正常组小鼠肝组织的小叶结构完整, 可见中央静脉及放射状肝细胞索, 汇管区见少量胶原纤维(图1A)。6 wk时AST高、低剂量组和模型组之间的一般组织形态学无显著差异, 病变主要是散在的急性虫卵结节, 汇管区有大量淋巴细胞及嗜酸性粒细胞浸润, 可见肝组织灶性坏死, 部分汇管区见虫卵聚集成簇, 虫卵结节周围可见少量胶原纤维(图1B)。10 wk时主要表现为慢性虫卵结节, 虫卵周围可见梭形的成纤维细胞和胶原纤维包绕, 亦可见少量急性虫卵结节。AST两个剂量组的虫卵结节面积均明显低于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$); 虫卵结节和小静脉周围的胶原纤维增生, 部分向肝小叶间延伸(图1C)。14 wk时主要为纤维化结节, 可见胶原纤维沿汇管区延

■名词解释

血吸虫病肝纤维化: 血吸虫卵沉积于肝脏汇管区后, 在虫卵抗原的刺激下形成虫卵结节, 结节周围纤维组织增生, 沿着汇管区延伸, 形成干线型肝纤维化。

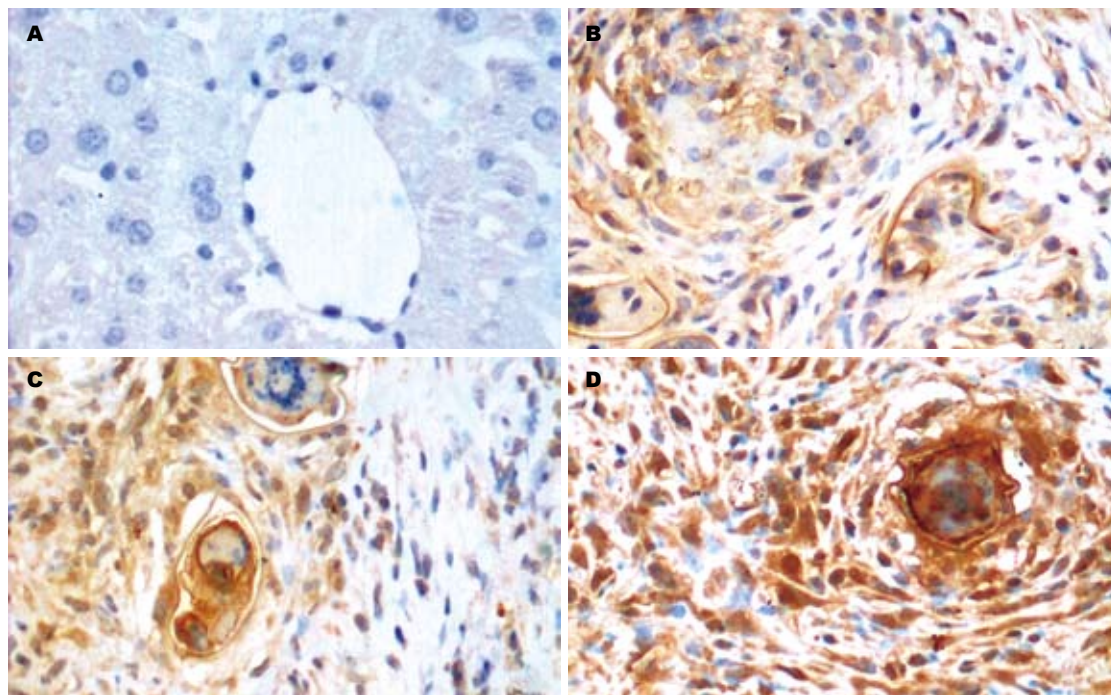


图 2 各组小鼠10 wk肝组织虫卵结节内 I 型胶原的表达(免疫组织化学PV法×400). A: 正常组; B: AST高剂量组; C: AST低剂量组; D: 模型组.

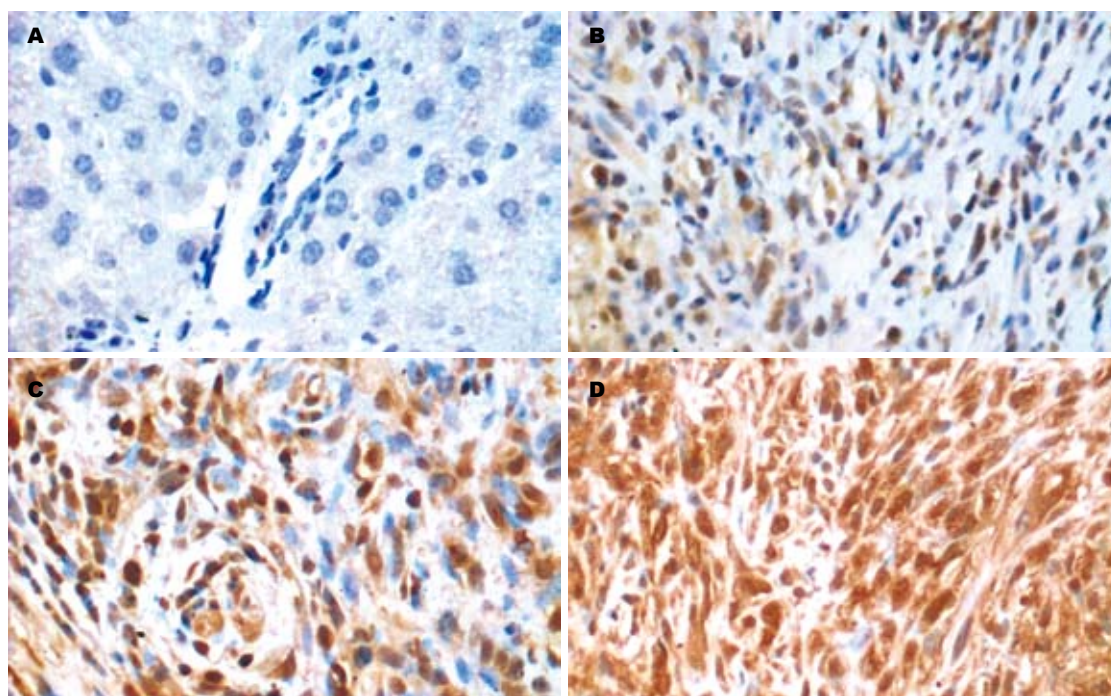


图 3 各组小鼠10 wk肝组织虫卵结节内 III 型胶原的表达(免疫组织化学PV法×400). A: 正常组; B: AST高剂量组; C: AST低剂量组; D: 模型组.

伸并相互连接, 部分肝细胞间亦可见少量胶原纤维(图1D), AST高低剂量组虫卵结节面积及纤维化程度均明显低于模型组($P<0.01$). 模型组虫卵结节和肝纤维化程度在10 wk时均高于6 wk和14 wk. 14 wk AST两剂量组虫卵结节和肝纤维

化程度显著低于10 wk, 肝纤维化程度与6 wk时的水平相近(表2).

2.3 肝组织中 I、III 型胶原蛋白的表达 免疫组化染色结果显示(图2-3), 正常小鼠肝内胶原表达很弱, 主要分布在汇管区. 血吸虫感染后, 各

表 2 各组小鼠虫卵结节大小及肝纤维化程度($n=10$)

分组	虫卵结节大小($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)			肝纤维化程度		
	6 wk	10 wk	14 wk	6 wk	10 wk	14 wk
模型对照组	8.51 \pm 1.13	13.84 \pm 0.77	10.45 \pm 0.90	3.80 \pm 0.20	6.80 \pm 0.61	5.20 \pm 0.61
AST低剂量	8.68 \pm 1.30	11.16 \pm 0.88 ^a	7.97 \pm 0.50 ^a	3.90 \pm 0.38	4.80 \pm 0.53 ^a	4.20 \pm 0.69 ^a
AST高剂量	9.38 \pm 0.87	10.32 \pm 0.57 ^b	6.76 \pm 0.59 ^b	3.60 \pm 0.30	4.40 \pm 0.65 ^b	3.60 \pm 0.58 ^b
葵花护肝片	9.37 \pm 0.37	9.75 \pm 0.64	6.72 \pm 0.43	3.80 \pm 0.55	5.20 \pm 0.61	4.60 \pm 0.60

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 模型对照组.表 3 各组小鼠胶原 I 和 III 的含量(MOD, $n=10$)

分组	胶原 I			胶原 III		
	6 wk	10 wk	14 wk	6 wk	10 wk	14 wk
正常组	0.025 \pm 0.002	0.028 \pm 0.003	0.024 \pm 0.002	0.030 \pm 0.003	0.037 \pm 0.004	0.032 \pm 0.003
模型组	0.086 \pm 0.003 ^f	0.134 \pm 0.004 ^f	0.141 \pm 0.007 ^f	0.102 \pm 0.006 ^f	0.146 \pm 0.008 ^f	0.101 \pm 0.004 ^f
AST低剂量	0.081 \pm 0.003	0.084 \pm 0.003 ^b	0.095 \pm 0.004 ^b	0.098 \pm 0.005	0.104 \pm 0.005 ^{bd}	0.077 \pm 0.003 ^b
AST高剂量	0.089 \pm 0.004	0.093 \pm 0.002 ^b	0.099 \pm 0.004 ^b	0.092 \pm 0.005	0.074 \pm 0.002 ^b	0.070 \pm 0.003 ^b
护肝片	0.086 \pm 0.004	0.101 \pm 0.005	0.102 \pm 0.007	0.101 \pm 0.004	0.120 \pm 0.002	0.078 \pm 0.003

^b $P<0.01$ vs 模型组; ^d $P<0.01$ vs AST高剂量组; ^f $P<0.01$ vs 正常组.

组(AST高、低剂量组及模型组)肝组织内 I、III型胶原含量均不同程度增加, 主要见于汇管区及虫卵结节. 模型组小鼠随着感染时间的延长, I 型胶原含量逐渐增加, 10-14 wk维持在相对较高的水平. III型胶原在10 wk时含量最高, 14 wk时已下降至6 wk水平, 各时间点模型组与正常组相比较均有显著差异($P<0.01$). 各时间点AST高、低剂量组相比较显示, 小鼠肝组织 I、III型胶原蛋白含量随着时间的延长稳定在相对较低的水平或略有减少, 与相应时间点模型组相比较均有显著差异($P<0.01$). 10 wk时AST高剂量组的III型胶原含量明显低于AST低剂量组($P<0.01$). 6 wk时各实验组之间的胶原含量差异无统计学意义(表3).

3 讨论

血吸虫病肝纤维化是在虫卵肉芽肿基础上产生的, 其核心机制是在可溶性虫卵抗原刺激下, 巨噬细胞与淋巴细胞产生PDGF和TGF β 1等各种细胞因子刺激肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化、增殖、转化为肌纤维母细胞, 并与其他来源的成纤维细胞一起合成以 I 和III型胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM). 目前国内外肝病学者普遍认为, 肝纤维化是可逆转的^[10-16], 抑制HSC活化、增殖和合成胶原已

成为抗肝纤维化治疗的重要对策^[17-26].

针对肝纤维化发展的机制, 近年来抗肝纤维化药物的研究取得了很大发展, 大量研究资料表明, 中医中药在抗肝纤维化方面独树一帜^[27-32]. 在众多抗肝纤维化中药复方中, 黄芪频频出现^[33-34], 但除本实验室一篇AST体外抗血吸虫病肝纤维化的报道外^[3], 未见其他报道. 本研究动态观察黄芪总苷干预小鼠血吸虫病肝纤维化的过程, 结果显示, 6 wk时各组虫卵周围均有大量嗜酸性粒细胞为主的炎细胞浸润, 构成以虫卵为中心的、嗜酸性脓肿为主要表现的急性虫卵结节, 此时血吸虫肝病组织中已有胶原纤维的增多, 但各组结节的大小、I 型、III型胶原蛋白表达均无统计学差异. 10 wk时主要为慢性虫卵肉芽肿, 其虫卵周围包绕较多的成纤维细胞和胶原纤维. AST高、低剂量组与模型组之间的 I、III型胶原含量、虫卵结节大小及肝纤维化程度均显著差异, 且AST两剂量组之间, III型胶原的表达亦有明显差异. 14 wk时虫卵肉芽肿纤维化形成纤维性虫卵结节, 各组结节均变小, 结节中细胞数也明显减少. 其中AST高、低剂量组与模型组之间, I、III型胶原含量和虫卵结节大小均明显降低, 肝脏纤维化程度显著减轻, 但AST两剂量组无统计学差异. 提示AST对血吸虫病肝纤维化有明显的抑制作用, 但AST的剂量在

同行评价

本文研究内容新颖, 设计合理, 数据可信, 但在阳性对照组选择上欠妥.

持续性干预中的效果可能没有剂量依赖性。各组不同时间点虫卵结节大小、肝纤维化程度和I、III型胶原表达结果提示AST抑制了I、III型胶原蛋白的合成,使胶原蛋白处于相对稳定的低水平表达,从而抑制了血吸虫病肝纤维化的进程,表现为虫卵结节缩小,肝纤维化减轻。同时积极的进行大剂量AST的干预可能使胶原蛋白的合成较早稳定在较低的表达水平。AST抗血吸虫病肝纤维化的机制是否与AST减少虫卵结节中成纤维细胞的数量和合成胶原纤维活性有关,我们将做进一步研究。

4 参考文献

- Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Boros DL. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during the resorption of schistosome egg-induced fibrosis in praziquantel-treated mice. *Immunology* 2004; 111: 343-352
- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet* 2006; 368: 1106-1118
- Wu Q, Zhu H, Yuan XS, Wang XL, Shen JL. Effect of astragalosides on schistosomal hepatic fibrosis in vitro. *Shock* 2006; 26 suppl 1: 26-27
- Zhang ZC, Li SJ, Yang YZ. Effect of astragaloside on myocardial fibrosis in chronic myocarditis. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2007; 27: 728-731
- Hu JY, Huang YS, Song HP, Zhang DX, Xiang F, Zhu ZG, Teng M, Zhang Q. Protective effects of Astragaloside and Quercetin on rat myocardial cells after hypoxia. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 2007; 23: 175-178
- Xu XL, Ji H, Gu SY, Shao Q, Huang QJ, Cheng YP. Modification of alterations in cardiac function and sarcoplasmic reticulum by astragaloside IV in myocardial injury in vivo. *Eur J Pharmacol* 2007; 568: 203-212
- 吴强, 杨雁, 薛绍礼, 张宵翔, 邹宇宏, 陈敏珠, 黄茂总. 对肝星状细胞增殖和合成胶原的抑制作用. *中国药理学通报* 2003; 19: 892-895
- Coutinho EM. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 85-92
- 杨艳宏, 蔡卫民, 金国梁, 朱善济, 陈峰, 翁红雷, 刘荣华. 日本血吸虫感染兔肝肌成纤维细胞的动态变化及其意义. *中华医学杂志* 1999; 79: 870-873
- Jin B, Alter HJ, Zhang ZC, Shih JW, Esteban JM, Sun T, Yang YS, Qiu Q, Liu XL, Yao L, Wang HD, Cheng LF. Reversibility of experimental rabbit liver cirrhosis by portal collagenase administration. *Lab Invest* 2005; 85: 992-1002
- Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1728-1734
- Kumar M, Sarin SK. Is cirrhosis of the liver reversible? *Indian J Pediatr* 2007; 74: 393-399
- Helmy AH, Abdel-Hady AA, el-Shanawany F, Hammam O, Abdel-Hady A. The pharmacological approach to reverse portal hypertension and hepatic schistosomal fibrosis in Egypt, control experimental study. *J Egypt Soc Parasitol* 2005; 35: 731-750
- O'Connell MA, Rushworth SA. Curcumin: potential for hepatic fibrosis therapy? *Br J Pharmacol* 2007
- Zhang WC, Mao YF. Re-understanding of liver cirrhosis induced by Schistosomiasis japonica. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2006; 24: 382-384
- Zou WL, Yang Z, Zang YJ, Li DJ, Liang ZP, Shen ZY. Inhibitory effects of prostaglandin E1 on activation of hepatic stellate cells in rabbits with schistosomiasis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6: 176-181
- Nara T, Iizumi K, Ohmae H, Sy OS, Tsubota S, Inaba Y, Tsubouchi A, Tanabe M, Kojima S, Aoki T. Antibody isotype responses to paramyosin, a vaccine candidate for schistosomiasis, and their correlations with resistance and fibrosis in patients infected with *Schistosoma japonicum* in Leyte, The Philippines. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76: 384-391
- Bartley PB, Ramm GA, Jones MK, Ruddell RG, Li Y, McManus DP. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. *Int J Parasitol* 2006; 36: 993-1001
- Reiman RM, Thompson RW, Feng CG, Hari D, Knight R, Cheever AW, Rosenberg HF, Wynn TA. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect Immun* 2006; 74: 1471-1479
- Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 148-154
- Pesce J, Kaviratne M, Ramalingam TR, Thompson RW, Urban JF Jr, Cheever AW, Young DA, Collins M, Grusby MJ, Wynn TA. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J Clin Invest* 2006; 116: 2044-2055
- Abath FG, Morais CN, Montenegro CE, Wynn TA, Montenegro SM. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol* 2006; 22: 85-91
- 申月明, 朱莹. 肝星状细胞激活与信号转导. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 873-878
- 徐进梅, 吴海玮, 吴观陵. 血吸虫病肝纤维化中细胞因子的网络作用. *国外医学寄生虫病分册* 2004; 31: 150-153
- Chatterjee S, Vrolix G, Depoortere I, Peeters T, Van Marck E. The therapeutic effect of the neuropeptide hormone somatostatin on *Schistosoma mansoni* caused liver fibrosis. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 45
- Zhang BB, Jiao YW, Cai WM, Tao J, Liu RH. Influence of interferon gamma treatment on expression of TGF-beta1 and its receptors in liver fibrosis of mice with schistosomiasis japonica. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2004; 22: 340-343
- Ji G, Wang L, Zhang SH, Liu JW, Zheng PY, Liu T. Effect of Chinese medicine Qinggan Huoxuefang on inducing HSC apoptosis in alcoholic liver fibrosis rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2047-2052
- Song SL, Gong ZJ, Zhang QR, Huang TX. Effects of Chinese traditional compound, JinSanE, on expression of TGF-beta1 and TGF-beta1 type II receptor mRNA, Smad3 and Smad7 on experimental hepatic fibrosis in vivo. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2269-2276
- He SX, Luo JY, Wang YP, Wang YL, Fu H, Xu JL, Zhao G, Liu EQ. Effects of extract from Ginkgo

- biloba on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3924-3928
- 30 徐标, 韩春荣, 何生松. 槲皮素抗小鼠日本血吸虫肝纤维化的实验研究. *中国人兽共患病学报* 2006; 22 : 423-427
- 31 徐标. 和络舒肝胶囊对日本血吸虫病肝纤维化的治疗作用研究. *时珍国医国药* 2006; 17: 190-192
- 32 丁国建, 喻鑫玲, 马雨慧, 陈学金, 邓维成. 当归根提取物和心得安治疗血吸虫性肝纤维化的实验研究. *实用预防医学* 2004; 11: 1098-1100
- 33 易文龙, 陈建明. 水蛭、桃仁、黄芪及当归合剂对小鼠血吸虫性肝纤维化的影响. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2004; 22: 62
- 34 黄敏, 毕静, 范虹, 高清华, 胡孝国. 黄芪注射液对血吸虫病肝纤维化小鼠血清透明质酸和肝组织羟脯氨酸含量的影响. *中西医结合肝病杂志* 2003; 13: 217-218

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志个性化服务订购活动

本刊讯 为了满足读者的多样化需求, 解决一些作者因为资金不足而导致订阅印刷版的困难, 自2007年开始, 世界华人消化杂志(WCJD), 推出以下个性化服务策略来为广大读者服务.

1 精彩专家述评专辑印刷版杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail发送精彩专家述评PDF; (2)2007年底将精彩专家述评专辑一本挂号邮寄用户收. 定价: 50元/年.

2 WCJD电子杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒PDF电子杂志(1-36期). 定价: 180元/年.

3 WCJD网络版杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒网络版杂志(1-36期). 定价: 160元/年.

4 WCJD印刷版杂志

WCJD印刷版1-36期. 定价: 864元/年.

5 订购信息

邮政编码, 姓名, 地址, 部门, 机构名称, E-mail, 手机号.

6 汇款的方式

邮局汇款: 世界胃肠病学杂志社收, 100023, 北京市2345信箱. 附言注明订购的内容.

银行汇款: 户名: 北京百世登生物医学科技有限公司; 开户银行: 中国工商银行北京商务中心区支行国贸大厦分理处; 账号: 0200041609020180741. 附言注明: 订购的内容和发票的抬头.

总之, WCJD将尽自己的最大努力, 满足广大读者的需求, 同时欢迎更多个性化服务的意见和建议E-mail发至: h.n.zhang@wjgnet.com. 谢谢!(世界胃肠病学杂志社 2008-01-08).

CCl₄诱导大鼠肝硬化形成过程中Caspase-12蛋白表达与肝细胞凋亡的相关性

慕永平, 刘平, 都广礼, 王磊, 龙爱华, 李风华

■背景资料

肝细胞凋亡在肝纤维化、肝硬化的形成过程中发挥重要的作用, 近年来, 内质网凋亡通路受到普遍关注, 而Caspase-12在这一凋亡通路中发挥着关键作用, 但在肝纤维化、肝硬化形成过程中的动态变化及与肝细胞凋亡的相关性尚不清楚。

慕永平, 上海中医药大学肝病研究所, 现在上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心工作 上海市 201203

刘平, 王磊, 龙爱华, 李风华, 上海中医药大学肝病研究所 上海市 201203

都广礼, 上海中医药大学中药学院 上海市 201203

慕永平, 2006年博士毕业, 主治医师, 主要从事中医药防治肝纤维化、肝硬化的基础与临床研究。

国家自然科学基金重大研究计划重点资助项目, No. 90409020
上海市教育委员会E-研究院建设计划资助项目, No. E03008
上海市重点学科建设资助项目, No. Y0302

作者贡献分布: 本课题由刘平、慕永平设计; 由慕永平、龙爱华、王磊、都广礼、李风华操作完成; 数据分析由慕永平完成; 论文写作由慕永平、刘平、都广礼完成。

通讯作者: 刘平, 201203, 上海市蔡伦路1200号, 上海中医药大学肝病研究所. liuping@shutcm.com
电话: 021-51322002

收稿日期: 2007-06-29 修回日期: 2008-01-11

Correlation between expression of Caspase-12 protein and apoptosis of hepatocytes during rat liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride

Yong-Ping Mu, Ping Liu, Guang-Li Du, Lei Wang, Ai-Hua Long, Feng-Hua Li

Yong-Ping Mu, Ping Liu, Lei Wang, Ai-Hua Long, Feng-Hua Li, Institute of liver disease, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
Guang-Li Du, Department of Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Supported by: the Major Research Program of the National Natural Science Foundation of China, No. 90409020; E-institute to Shanghai Education Commission, No. E03008; Construction Fund for Key Subjects of Shanghai, No. Y0302

Correspondence to: Ping Liu, Institute of Liver Disease, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Cailun Road, Shanghai 201203, China. liuping@shutcm.com

Received: 2007-06-29 Revised: 2008-01-11

Abstract

AIM: To investigate the correlation between expression of Caspase-12 protein and apoptosis of hepatocytes during rat liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄).

METHODS: Liver cirrhosis in male Wistar rats

was induced by subcutaneous injection of undiluted CCl₄ (3 mL/kg body wt) followed by 500 mL/L CCl₄-olive solution (2 mL/kg body wt) twice a week for 12 weeks. Hepatocyte apoptosis indices (TUNEL staining), immunohistochemistry and expression of Caspase-12 protein were observed dynamically at wk 4, 8, 12 during the modeling course.

RESULTS: Typical acute liver injury was observed at wk 4, typical chronic liver injury and fibrosis at wk 8 and typical cirrhosis at wk 12, respectively. When the liver injury and cirrhosis became aggravated, hepatocyte apoptotic index increased significantly in the 4-week model group, compared with normal group and 8-week model group (70.4 ± 11.59 vs 9.6 ± 1.14 , 95.8 ± 10.94 , $P < 0.01$). There were significant differences in hepatocyte apoptotic index between 12- and 8- week model groups (122.8 ± 17.51 vs 95.8 ± 10.94 , $P < 0.05$). Caspase protein expression increased significantly in the 4-week model group, compared with the normal group and 8-week model group (0.071 ± 0.014 vs 0.014 ± 0.007 and 1.172 ± 0.028 , $P < 0.01$). There were significant differences in Caspase-12 protein expression between 12- and 8- week model groups (1.84 ± 0.083 vs 1.172 ± 0.028 , $P < 0.01$). Furthermore, hepatocyte apoptotic index was positively correlated to Caspase-12 protein expression ($r = 0.89$, $t = 9.125$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Endoplasmic reticulum apoptosis pathway is involved in hepatocyte apoptosis during rat liver cirrhosis induced by CCl₄. Expression of Caspase-12 protein, the key molecule in this pathway, represents the degree of hepatocyte apoptosis.

Key Words: Liver cirrhosis; Apoptosis; Caspase-12 protein

Mu YP, Liu P, Du GL, Wang L, Long AH, Li FH. Correlation between expression of Caspase-12 protein and apoptosis of hepatocytes during rat liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 132-137

■同行评议者

黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科

摘要

目的: 探讨CCl₄大鼠肝硬化形成过程中Caspase-12蛋白表达与肝细胞凋亡的相关性。

方法: 首次CCl₄ 3 mL/kg sc, 以后500 mL/L CCl₄橄榄油溶液2 mL/kg sc, 2次/wk, 共计12 wk制备大鼠肝硬化模型。设4 wk、8 wk、12 wk 3个时间点, 动态观察肝细胞凋亡指数、肝组织Caspase-12免疫组织化学及蛋白表达。

结果: 模型大鼠4 wk时呈典型的急性肝损伤改变, 8 wk时大鼠呈典型的慢性肝损伤肝纤维化的病理改变, 12 wk时已形成肝硬化; 随着肝损伤加重和肝硬化形成, 肝细胞凋亡指数显著增加, 模型对照4 wk与正常组、模型对照8 wk比较有显著差异(70.4 ± 11.59 vs 9.6 ± 1.14 , 95.8 ± 10.94 , $P < 0.01$), 模型对照12 wk与模型对照8 wk比较有统计学意义(122.8 ± 17.51 vs 95.8 ± 10.94 , $P < 0.05$)。Caspase-12蛋白表达亦显著增加, 模型对照4 wk与正常组、模型对照8 wk比较有显著差异(0.071 ± 0.014 vs 0.014 ± 0.007 , 1.172 ± 0.028 , $P < 0.01$), 模型对照12 wk与模型对照8 wk比较亦有显著差异(1.84 ± 0.083 vs 1.172 ± 0.028 , $P < 0.01$); 且肝细胞凋亡指数和Caspase-12蛋白表达量之间呈正相关($r = 0.89$, $t = 9.125$, $P < 0.01$)。

结论: 内质网凋亡通路参与CCl₄大鼠肝硬化形成过程中肝细胞凋亡事件, 其关键的凋亡酶Caspase-12蛋白表达量基本能够反映肝细胞的凋亡程度。

关键词: 肝硬化; 凋亡; Caspase-12蛋白

慕永平, 刘平, 都广礼, 王磊, 龙爱华, 李风华. CCl₄诱导大鼠肝硬化形成过程中Caspase-12蛋白表达与肝细胞凋亡的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 132-137

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/132.asp>

0 引言

长期以来, 肝纤维化的研究主要是针对纤维结缔组织的合成及降解过程, 近年来, 已开始重视保护肝实质细胞及组织支架的完整性这一始发因素以及干细胞对肝纤维化的影响, 而且可能是今后抗肝纤维化治疗研究的重要方向。炎症反应、肝星状细胞活化及肝实质细胞凋亡是各种慢性肝病的共同特征^[1], 肝细胞凋亡在肝纤维化、肝硬化的形成过程中发挥着重要的作用。在有害刺激条件下发生的“病理性”凋亡可导致趋化性/炎症性因子的释放, 加重肝损伤并激活HSCs^[2], 加速肝纤维化、肝硬化的形成, 因

此, 抑制肝细胞凋亡也许是抗肝纤维化的重要策略^[3]。已有的研究显示, CCl₄诱导的大鼠肝纤维化进展期存在大量的肝细胞凋亡^[4], 肝脏蛋白质组差异表达研究显示, CCl₄造模12 wk后模型大鼠有Caspase-12蛋白表达^[5], Caspase-12是内质网凋亡通路的关键酶, 而目前关于内质网凋亡通路在肝纤维化中的作用尚未见报道。本文重点观察了CCl₄大鼠肝硬化形成过程中肝细胞凋亡和Caspase-12的动态变化, 探讨Caspase-12蛋白表达与肝细胞凋亡的相关性, 现将研究结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 动物: 清洁级Wistar ♂ 大鼠47只, 体质量130-150 g, 购自中国科学院上海实验动物中心, 上海中医药大学实验动物中心饲养、造模和观察, 自由饮食。CCl₄(分析纯), 橄榄油购自中国医药集团上海化学试剂公司; 肝功能测定试剂盒购自卫生部上海生物制品研究所及南京建成生物工程研究所; TUNEL原位凋亡检测试剂盒购自CHEMICON公司; 山羊抗大鼠Caspase-12多克隆抗体购自Santa Cruz公司; 小鼠抗GAPDH mAb购自KangChen公司; HRP标记的兔抗山羊二抗购自北京中杉公司; HRP标记的山羊抗小鼠二抗购自CHEMICON公司。

1.2 方法

1.2.1 模型制备: 首次sc CCl₄ 3 mL/kg剂量, 以后用500 mL/L的CCl₄橄榄油溶液2 mL/kg剂量sc, 每周2次, 共12 wk。

1.2.2 样品的采集和处理: 造模4 wk、8 wk后, 随机抽取正常及模型大鼠各6只, 处死作动态观察。其余模型大鼠继续造模至12 wk末。大鼠用20 g/L戊巴比妥钠以2 mL/kg体质量剂量ip麻醉后, 仰卧位固定, 打开腹腔, 经下腔静脉采血, 4℃静置3 h后, 3000 r/min 30 min离心, 分离血清, 检测各项血清学指标。摘取肝脾, 从肝右叶切取1.0 cm×0.8 cm×0.3 cm大小肝组织1块, 40 g/L中性甲醛固定, 脱水、包埋、切片, 进行HE、胶原染色及免疫组织化学观察, 留取肝组织进行羟脯氨酸(Hyp)含量测定。

1.2.3 观测指标与方法: 一般情况: 包括大鼠的死亡情况, 体质量、肝脏大体形态、肝脏及脾脏质量。肝组织切片: HE及胶原染色, 观察肝脏组织学变化。肝组织Hyp含量测定: 参照Jamall *et al*^[6]的方法进行。肝细胞原位凋亡检测: 实验步骤参考试剂盒说明书方法。凋亡肝细胞的形

■ 相关报道

Caspase-12是ERS介导的细胞凋亡特异性启动蛋白酶, 而对非内质网应激介导凋亡的抵抗作用不明显, 现已证实多种慢性肝病的发生机制均与ERS有关, 并有证据表明在人类细胞有Caspase-12存在, 且与ERS介导的凋亡有关, Caspase-12的安全性及对ERS的特异性使其有可能成为较理想的抗凋亡治疗靶标。

■创新盘点

本文重点观察了CCl₄诱导肝硬化形成过程中肝细胞凋亡指数与Caspase-12蛋白表达量的动态变化以及二者之间的相关性,提出Caspase-12蛋白表达量的变化可能能够直接反应肝细胞的凋亡程度。

表 1 各组大鼠肝功能及肝组织羟脯氨酸含量变化(mean ± SD)

分组	<i>n</i>	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBil(μmol/L)	GGT(U/L)	Alb(g/L)	Hyp(μg/g湿肝)
正常组	8	32.80 ± 8.84 ^b	125.08 ± 23.46 ^b	5.73 ± 0.40 ^{df}	5.29 ± 1.75 ^{df}	33.28 ± 1.06 ^b	195.83 ± 7.16 ^b
模型对照组	4 wk	6 239.58 ± 42.08	261.42 ± 24.83 ^f	5.81 ± 0.97 ^{df}	6.57 ± 2.06 ^{df}	28.90 ± 1.85 ^{df}	312.85 ± 70.83 ^{df}
	8 wk	6 237.30 ± 17.56	267.94 ± 57.24 ^f	12.20 ± 3.19 ^f	32.76 ± 9.17 ^f	26.48 ± 1.85 ^f	461.33 ± 51.74 ^f
	12 wk	10 257.83 ± 33.50	339.36 ± 19.24	26.43 ± 9.46	46.44 ± 5.09	22.02 ± 2.40	818.42 ± 67.95

^b*P* < 0.01 vs 各时间点模型对照组; ^d*P* < 0.01 vs 8 wk模型对照组; ^f*P* < 0.01 vs 12 wk模型对照组。

态学识别参考Shi *et al*^[4]的方法,即对于模型组及药物干预组,在脂肪变肝细胞中凡满足下列条件之一者确定为凋亡肝细胞:(1)核呈新月牙状;(2)核浓缩;(3)核碎裂;(4)出现凋亡小体。每组取6个样本,每个样本计数5个不同视野凋亡肝细胞的总数。Caspase-12免疫组织化学:二步法。Caspase-12蛋白表达:Western blot方法,每组取4个样本,提取总蛋白,测定蛋白浓度,等量蛋白混合,上样量为30 μg,样品95℃-100℃变性5-10 min,SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h,加入一抗稀释液[Caspase-12, 1:100; GAPDH(内参照), 1:100]4℃孵育过夜,TTBS洗涤,与HRP偶联的二抗室温孵育1 h,TTBS洗涤,ECL显影、曝光,FR-980生物电泳图像分析系统分析底片中的目的条带,计算机自动读取并记录每条带的积分值,同一张膜重新封闭,检测GAPDH的蛋白表达,方法同上。

统计学处理 计量资料用统计分析软件SPSS11.5中的ANOVA程序进行单因素方差分析,*q*检验,并用LSD进行两两比较;相关分析采用双侧*t*检验。

2 结果

2.1 大鼠一般情况 造模前8 wk大鼠死亡5只。造模初期,模型大鼠体质量仍有所增加,3 wk后逐渐下降,与同期正常大鼠比较均具有显著性差异(*P* < 0.01);肝指数8 wk呈最高,12 wk降低的趋势,与同期正常大鼠比较均具有显著性差异(*P* < 0.01);脾指数逐渐增加,与同期正常大鼠比较均具有显著性差异(*P* < 0.01)。

2.2 肝组织病理变化 HE染色显示正常大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列。与正常大鼠比较,4 wk后模型大鼠可见以中央静脉为中心的肝细胞脂肪变性,汇管区周围未受损的肝细胞呈孤立的岛状结构,可见极菲薄的胶原纤维在脂肪变区域伸展。8 wk

后,模型大鼠肝细胞脂肪变性累及整个肝小叶,可见较细的胶原纤维形成不完全包绕,间隔内可见较多的成纤维细胞,少量炎性细胞浸润,大胆管损害明显,小胆管增生。12 wk后,正常肝小叶结构消失,大量的纤维结缔组织增生,形成大小不一的典型假小叶结构,部分假小叶内可见新生幼稚的肝细胞,间隔内可见大量的成纤维细胞和炎性细胞浸润,极少见正常的胆管样结构,小胆管增生明显。

天狼星红胶原原色显示,正常大鼠仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维。4 wk模型大鼠胶原纤维呈星芒状在脂肪变区域伸展,中央静脉管壁明显增厚。8 wk模型大鼠纤维间隔增厚,少数向小叶内延伸,极少部分形成较疏松的纤维包绕肝细胞。12 wk模型大鼠纤维间隔增宽致密,形成大小不一的完整假小叶结构。

2.3 大鼠肝功能及肝组织羟脯氨酸含量变化 与正常组比较,随着肝硬化的进展,模型对照组大鼠ALT、AST、GGT、TBil及Hyp逐渐升高,12 wk时达到高峰,且12 wk时AST、GGT、TBil及Hyp显著高于4 wk、8 wk模型对照组(*P* < 0.01);血清Alb逐渐降低,12 wk时显著低于4 wk、8 wk模型对照组(*P* < 0.01)(表1)。

2.4 肝细胞凋亡的动态变化 正常大鼠有少量肝细胞凋亡,随着造模时间的延长,肝细胞凋亡数目逐渐增多,且不同时间点相互比较均具有显著性差异(*P* < 0.05或*P* < 0.01,图1)。

2.5 Caspase-12蛋白表达的动态变化 免疫组化显示,正常大鼠肝细胞胞质内有少量Caspase-12阳性表达,模型大鼠脂肪变肝细胞胞质内强阳性表达,与肝细胞凋亡发生的部位相一致,并随着模型的加重而阳性表达明显增强。

Western blot显示正常大鼠有微量Caspase-12表达,造模4 wk时明显增加,12 wk时达到最高,且显著高于4 wk、8 wk模型对照组(*P* < 0.01,图2)。

2.6 肝细胞凋亡指数和Caspase-12蛋白表达量的

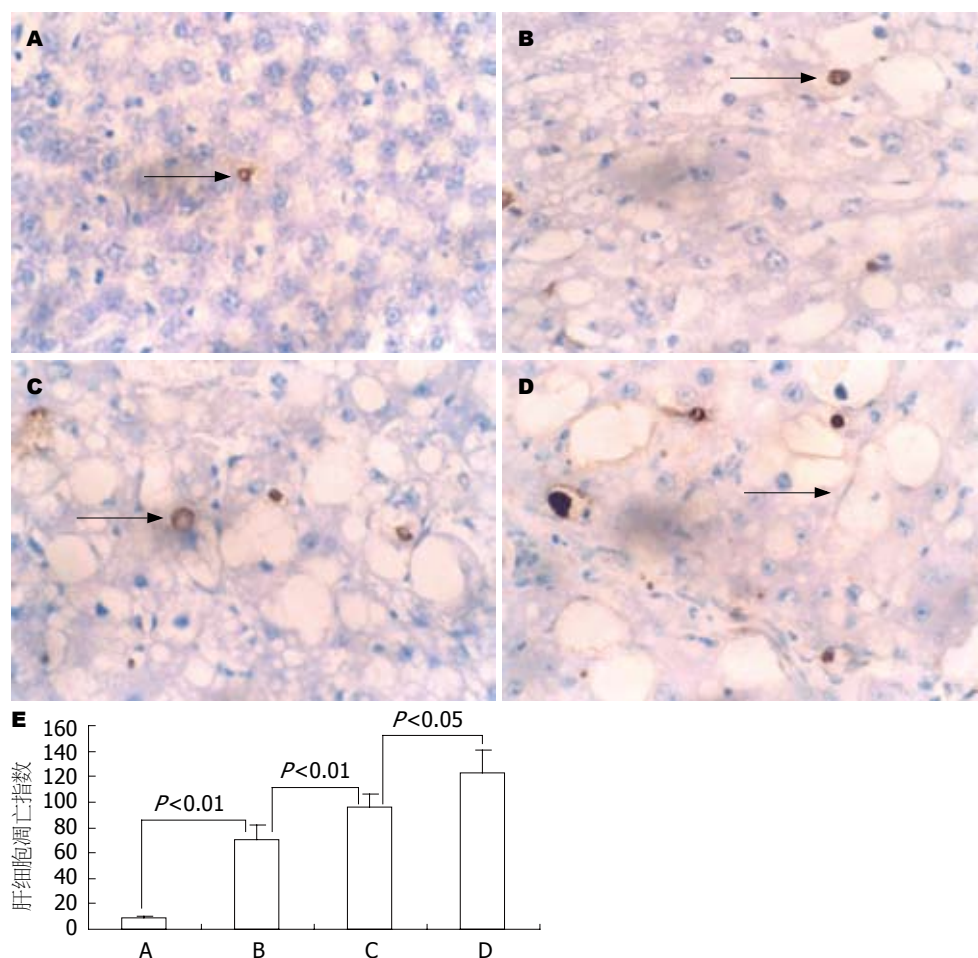


图1 肝细胞凋亡的动态变化(箭头所示为凋亡肝细胞). A: 正常组; B: 4 wk模型组; C: 8 wk模型组; D: 12 wk模型组; E: 肝细胞凋亡指数柱状图.

应用要点

本文研究结果提示在肝硬化形成过程中Caspase-12与肝细胞凋亡密切相关, 可能成为反映慢性肝病肝细胞凋亡程度的重要指标, 加之其安全性, 有可能成为抗凋亡治疗的新靶标.

相关性分析 肝细胞凋亡指数和Caspase-12蛋白表达量之间的相关性分析显示, 两者之间呈显著的正相关($r = 0.89$, $t = 9.125$, $P < 0.01$).

3 讨论

Caspase蛋白酶在脊椎动物的凋亡事件中扮演着非常重要的角色^[7-8], 死亡受体诱导的凋亡具有Caspase依赖性^[9-10], Caspase相关的凋亡信号传导通路至少有三种, 包括线粒体/细胞色素c通路、死亡受体通路和内质网通路等^[11]. 近年来, 内质网凋亡通路受到普遍关注, 内质网(endoplasmic reticulum, ER)不但在维持细胞内钙离子内环境稳定以及膜蛋白的合成、修饰和折叠方面发挥关键性作用^[12], 同时也在凋亡信号处理过程中发挥重要作用. 一定程度的内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)能够激活细胞保护机制, 但当应激原强度超过细胞自身处理能力时, 保护机制便不能与损伤相抗衡, ERS即可通过Caspase-12启动特有的ER性细胞凋亡途径, 这种凋亡途径是不同于死亡受体或经线粒体介

导凋亡的一种新的细胞凋亡途径, 称之为ER相关性死亡(ER associated death, ERAD)途径^[13]. Caspase-12是ERS介导的细胞凋亡特异性启动蛋白酶^[14], 在ERS时被激活, 是ER特有的Caspase, Caspase-12缺陷细胞较有Caspase-12表达的细胞对ERS介导的凋亡具有更强的抵抗, 而非内质网应激介导的凋亡, 二者的敏感性相似^[15-16], 表明Caspase-12与内质网应激介导凋亡的机制有关, 而非内质网应激介导的凋亡无关. 各种损伤都会导致内质网应激诱导Caspase-12表达, 同时也诱导胞质中的Caspase-7向内质网表面迁移, Caspase-7与Caspase-12相结合并打开Caspase-12的前域使其活化, 最终加速了细胞死亡^[17-19], 目前已经证实多种慢性肝病的发病机制均与ERS引起的损伤有关^[20-23]. 从治疗学上讲, 尽管关于人类Caspase-12的功能还存在着不同观点和争议^[24-25], 但许多研究表明在人类细胞有Caspase-12存在, 并与ERS介导的凋亡有关^[15,26-28], 目前已有研究表明神经生长因子能够通过抑制Caspase-12的活性来抑制ERS所导致的细胞凋亡^[29], 加之

■同行评价

本文的科学性、创新性能较好地反映我国消化病学临床和基础研究的先进水平。

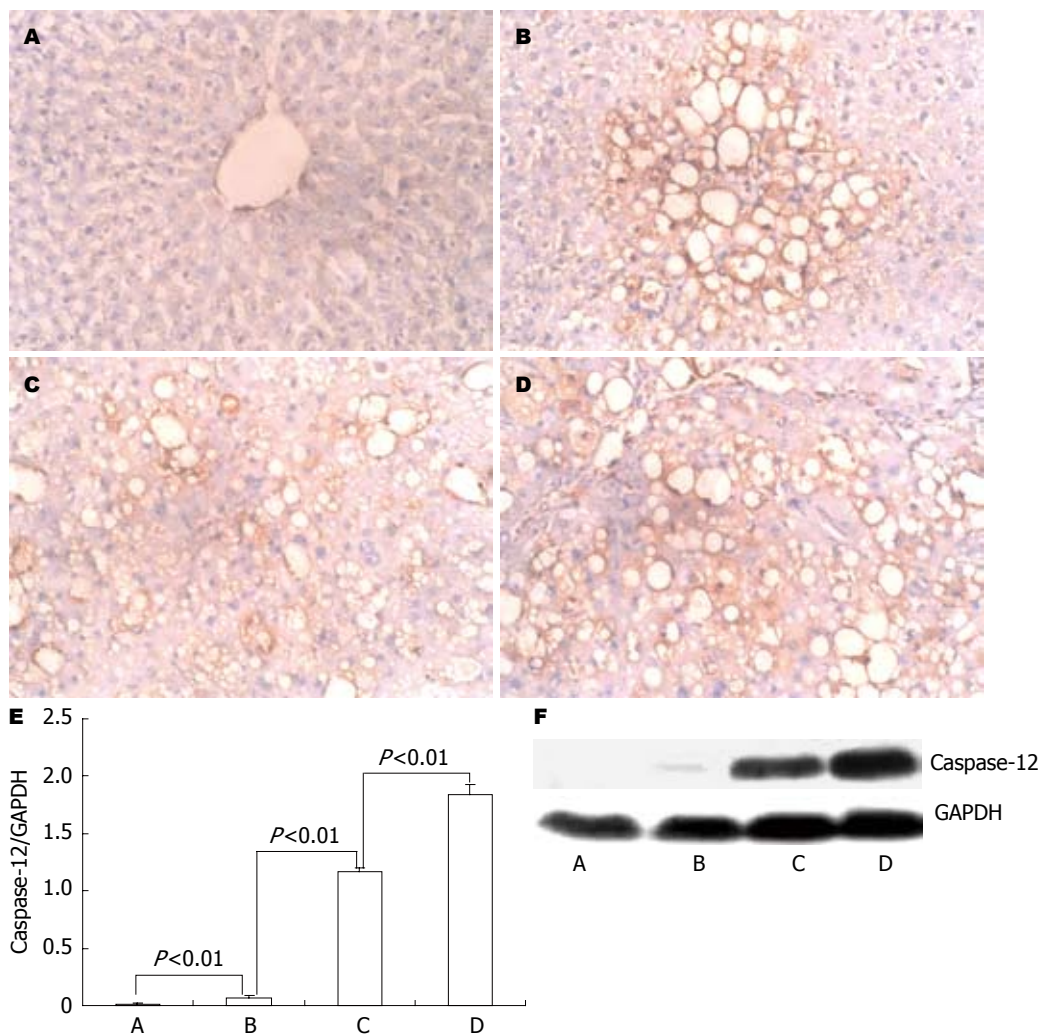


图2 Caspase-12蛋白表达的动态变化。A: 正常组; B: 4 wk模型组; C: 8 wk模型组; D: 12 wk模型组; E: Western blot灰度积分柱状图; F: Western blot图谱。

Caspase-12有很好的安全性, 因为Caspase-12基因敲除小鼠模型无明显发育或行为缺陷, 肿瘤发生率未见异常, 表明Caspase-12可能对正常发育或肿瘤形成并不重要, 因此Caspase-12有可能成为较理想的抗凋亡治疗靶标^[26,30]。

本实验结果显示, 肝细胞凋亡指数和Caspase-12的蛋白表达在急性肝损伤期既明显增加, 随着肝纤维化、肝硬化的形成, 肝细胞凋亡指数于4 wk、8 wk、12 wk较正常组分别增加了6.33倍、8.98倍、11.79倍; Caspase-12蛋白表达量较正常组分别增加了4.07倍、82.71倍、130.43倍。表明对于CCl₄大鼠肝硬化模型, 随着肝纤维化的进展, 肝细胞凋亡和Caspase-12蛋白表达呈递增趋势, 与肝纤维化的进展程度相一致, 且肝细胞凋亡指数和Caspase-12蛋白表达量之间有较好的相关性, 提示内质网凋亡通路参与了毒物刺激条件下肝细胞的凋亡事件和肝纤维化的进展, 其关键的凋亡酶Caspase-12基本能

够反应肝细胞的凋亡程度, 并有可能成为将来抗凋亡治疗的新靶点。

4 参考文献

- 1 Canbay A, Feldstein A, Baskin-Bey E, Bronk SF, Gores GJ. The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 1191-1196
- 2 Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004; 39: 273-278
- 3 Higuchi H, Gores GJ. Mechanisms of liver injury: an overview. *Curr Mol Med* 2003; 3: 483-490
- 4 Shi J, Aisaki K, Ikawa Y, Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol* 1998; 153: 515-525
- 5 刘莹, 刘平, 刘成海, 胡义杨, 徐列明, 慕永平, 都广礼. 细胞增殖与凋亡相关蛋白质在大鼠肝纤维化形成与消减中的动态变化. *中华肝脏病杂志* 2005; 18: 563-566
- 6 Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline

- in biological tissues. *Anal Biochem* 1981; 112: 70-75
- 7 Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316
- 8 Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev* 1998; 12: 1551-1570
- 9 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308
- 10 Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776
- 11 Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 2000; 14: 2035-2044
- 12 Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, Opas M, Bleackley RC, Green DR, Michalak M. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 150: 731-740
- 13 Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002; 7: 335-345
- 14 刘芳, 邹萍, 陈敏, 张敏, 吴耀辉, 肖娟. Caspase-12短发夹状RNA在内质网应激性凋亡中的作用. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 1568-1570
- 15 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403: 98-103
- 16 Mouw G, Zechel JL, Gamboa J, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat. *Neuroreport* 2003; 14: 183-186
- 17 Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 150: 887-894
- 18 Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T, Goldsmith PC, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett* 2002; 514: 122-128
- 19 Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 33869-33874
- 20 Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1488-1499
- 21 Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ* 1999; 6: 842-854
- 22 Pavio N, Romano PR, Graczyk TM, Feinstein SM, Taylor DR. Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase PERK. *J Virol* 2003; 77: 3578-3585
- 23 Tardif KD, Mori K, Siddiqui A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J Virol* 2002; 76: 7453-7459
- 24 Saleh M, Vaillancourt JP, Graham RK, Huyck M, Srinivasula SM, Alnemri ES, Steinberg MH, Nolan V, Baldwin CT, Hotchkiss RS, Buchman TG, Zehnbauser BA, Hayden MR, Farrer LA, Roy S, Nicholson DW. Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* 2004; 429: 75-79
- 25 Fischer H, Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 722-726
- 26 Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002; 277: 34287-34294
- 27 Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, Sohn J, Krishnan B, Lewis DE, Yoffe B. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology* 2002; 36: 592-601
- 28 Bitko V, Barik S. An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. *J Cell Biochem* 2001; 80: 441-454
- 29 Shimoke K, Amano H, Kishi S, Uchida H, Kudo M, Ikeuchi T. Nerve growth factor attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via suppression of caspase-12 activity. *J Biochem* 2004; 135: 439-446
- 30 Mehmet H. Caspases find a new place to hide. *Nature* 2000; 403: 29-30

编辑 周晓武 电编 刘勇

RNA干扰对肝素酶在肝癌细胞中表达及其肿瘤生长抑制的作用

檀英霞, 刘志玄, 李素波, 田曙光, 卞丽红, 宫 锋

■背景资料

研究证明肝素酶(Hpa)在肿瘤细胞浸润、转移和肿瘤血管的形成过程中起重要作用, 肿瘤恶性程度越高, Hpa mRNA的表达水平越高, 转移潜能越大; 动物实验表明抑制肝素酶的表达, 肿瘤转移明显受抑制。因此, 肝素酶作为肿瘤治疗及预防肿瘤转移的新靶点已被研究者关注。

檀英霞, 刘志玄, 李素波, 田曙光, 宫锋, 军事医学科学院野战输血研究所 北京市 100850

卞丽红, 军事医学科学院附属医院妇科 北京市 100071

檀英霞, 助理研究员, 主要从事血液生化研究。

军事医学科学院创新基金资助项目

作者贡献分布: 宫锋、檀英霞和刘志玄对此文所作贡献均等; 此课题由宫锋、檀英霞、刘志玄、李素波、田曙光及卞丽红设计; 研究过程由檀英霞、刘志玄、李素波、田曙光及卞丽红操作完成; 数据分析由刘志玄、宫锋完成; 本论文写作由檀英霞及宫锋完成。

通讯作者: 宫锋, 100850, 北京市, 军事医学科学院野战输血研究所。gongfeng@nic.bmi.ac.cn

电话: 010-66931992 传真: 010-66931992

收稿日期: 2007-07-14 修回日期: 2007-12-04

Silencing of heparanase by siRNA inhibits tumor growth of human hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*

Ying-Xia Tan, Zhi-Xuan Liu, Su-Bo Li, Shu-Guang Tian, Li-Hong Bian, Feng Gong

Ying-Xia Tan, Zhi-Xuan Liu, Su-Bo Li, Shu-Guang Tian, Feng Gong, Department of Blood Biology and Molecular Biology, Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Li-Hong Bian, Department of Obstetrics and Gynecology of Affiliated Hospital, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Supported by: Innovation Foundation of the Academy of Military Medical Science

Correspondence to: Dr. Feng Gong, Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China. gongfeng@nic.bmi.ac.cn

Received: 2007-07-14 Revised: 2007-12-04

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of siRNA on heparanase expression in HepG2 cells *in vitro* and *in vivo*.

METHODS: Human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HepG2, which has naturally high levels of endogenous heparanase, was transfected with a plasmid expressing siRNA directed against human heparanase mRNA (experimental groups). An empty vector was designed as a control. The stability of transfection was analyzed by flow cytometry. RT-PCR and Western blotting were used to confirm the efficient

silencing of heparanase gene expression. Cells transfected with siRNA vectors were inoculated subcutaneously into nude mice to test the proliferation of tumor cells. Heparanase expression in tumor was tested by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared with cells transfected with empty vector, HepG2 cells transfected with the anti-heparanase siRNA vectors had a significant decrease in heparanase expression. *In vivo*, tumors produced by cells transfected with the anti-heparanase siRNA vectors grew much slower than those arising from cells transfected with the empty vector. There were significant differences in the inhibitory effect on tumor growth between the experimental and control groups ($P < 0.05$), but there were no significant differences between the experimental groups.

CONCLUSION: Down-regulating the expression of heparanase by RNA interference can significantly reduce the expression of heparanase in HepG2 human HCC cells, which leads to inhibition of proliferation of HCC cells *in vivo*.

Key Words: RNA interference; Heparanase; Hepatocellular carcinoma; Western blotting; Immunohistochemistry

Tan YX, Liu ZX, Li SB, Tian SG, Bian LH, Gong F. Silencing of heparanase by siRNA inhibits tumor growth of human hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 138-143

摘要

目的: 采用RNA干扰(RNAi)技术抑制肝癌细胞系HepG2肝素酶(Hpa)的表达, 体内观察其对肿瘤生长的抑制作用。

方法: 以脂质体介导的方法将构建的2个抗Hpa短发卡式RNA(Hpa-shRNA)真核表达载体稳定转染人肝癌细胞株HepG2(高表达Hpa), 并设空载体对照组; 流式细胞技术鉴定转染稳定性, Western blot及RT-PCR检测肝素酶蛋白和mRNA表达; 将干扰组和对照组的肿瘤细胞皮下接种裸鼠, 比较各组肿瘤的体质量和体积大

■同行评议者

郝春秋, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科(全军感染病防治中心)

小, 免疫组化法检测肝素酶在肿瘤组织的表达。

结果: 与空载体组相比, 干扰后的HepG2细胞中Hpa mRNA和蛋白表达明显降低, 干扰组裸鼠的肿瘤生长速度明显变慢, 统计结果表明干扰组在抑制肿瘤生长方面与空载体组、空白对照组存在显著差异($P<0.05$), 两干扰组无显著差异($P>0.05$)。

结论: 应用RNAi技术沉默Hpa基因可以有效下调肝癌肿瘤细胞中Hpa mRNA及蛋白的表达, 抑制体内肿瘤生长。

关键词: RNA干扰; 肝素酶; 肝癌; 免疫印迹; 免疫组化法

檀英霞, 刘志玄, 李素波, 田曙光, 卞丽红, 宫锋. RNA干扰对肝素酶在肝癌细胞中表达及其肿瘤生长抑制的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 138-143

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/138.asp>

0 引言

肝素酶(heparanase, Hpa)是一种 β -D-葡萄糖苷酸内切酶, 能特异性识别、裂解细胞外基质(ECM)和基底膜(BM)的主要成分硫酸肝素蛋白多糖(HSPG)的硫酸肝素(HS)侧链, 进而破坏由细胞外基质和基底膜组成的屏障结构, 在肿瘤细胞浸润、转移和肿瘤血管形成过程中起重要作用^[1-4]。

已有大量研究证明Hpa对肿瘤扩散及转移有促进作用。研究者先后检验多种肿瘤(胃癌^[5-6]、肝癌^[7-9]、胰腺癌^[10]、结肠癌^[11]、乳腺癌^[12]、卵巢癌^[13]、血液系肿瘤^[14]、前列腺癌^[15]、膀胱癌^[16]、淋巴瘤及黑色素瘤^[17-18]、口腔鳞状细胞癌^[19])细胞内Hpa mRNA表达水平, 均发现肿瘤恶性程度越高, 转移潜能越大, 生长速度越快的肿瘤细胞, 其Hpa mRNA的表达水平越高, 而良性肿瘤mRNA则低水平表达, 瘤旁正常组织则不表达。因此, 肝素酶作为肿瘤治疗及预防肿瘤转移的新靶点已为研究者关注。

本实验采用RNA干扰(RNAi)技术抑制肝癌细胞中Hpa的表达, 体内观察其对肿瘤生长的抑制作用。我们选用并合成两对Hpa-siRNA, 构建siRNA的真核表达载体, 稳定转染肝癌细胞株HepG2, 通过RT-PCR、Western blot、裸鼠动物成瘤试验、免疫组化等方法检测siRNA的干扰效果及对肝癌细胞生长的影响, 为针对以肝素酶为靶点的抗肿瘤治疗提供新的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料 两段siRNA为商品化序列, 购自吉泰生物技术公司, pGCsi RNAi载体系统购自上海吉凯凯凯生物技术有限公司; Lipofectamine2000购自Gibco BRL公司; 反转录试剂盒购自Invitrogen公司; 兔抗肝素酶多抗购自Santa Cruz公司; 流式细胞仪(BD, FACSCalibur); 鼠抗人肝素酶mAb由本室制备; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠聚合体, DAB显色试剂盒购自中杉生物技术公司; ♀4-5周龄裸鼠由本院实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 构建Hpa-siRNA真核表达载体: 采用Ambion公司的Cenix Bioscience开发的设计软件设计并合成了两对针对Hpa的siRNA(为商品化序列), 载体为带有U6启动子、绿色荧光蛋白(GFP)基因和Neo基因的pGCsi RNAi系统, 构建2个针对Hpa的短发卡式RNA(Hpa-shRNA)真核表达载体。将含有Hpa-siRNA序列的DNA oligos退火(90℃温育4 min, 70℃ 10 min, 慢慢冷却到10℃), 接入线性化的pGCsi载体(*Bam*H I 和 *Hind* III酶切), 构建的载体命名为pGCsi-Hpa1和pGCsi-Hpa2(表1)。

1.2.2 稳定转染HepG2细胞: 取对数生长期肝癌细胞株HepG2(本室保存), 用0.25%的胰酶(0.25 g胰酶加入到100 mL PBS中)消化细胞, 接种于6孔板(5×10^5 /孔), 用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基培养至90%融合, Lipofectamine2000介导法进行转染, 实验方法按照说明书进行。实验分为3组: GFP空载体组, 只转染空载体pGCsi(带GFP报告基因); 阳性对照组, 共转染pGCsi和带有GFP-siRNA的pGCsi载体(验证载体的有效干扰性能); 干扰组, 分别转染pGCsi-Hpa1和pGCsi-Hpa2载体, 分别命名为Hpa-si1组、Hpa-si2。转染48 h后, 加入G418(100 mg/L), 待单克隆长成后, 镜下挑取单克隆细胞于96孔板培养, 荧光显微镜下挑取细胞克隆, 移至24孔板、6孔板, 最后于培养瓶中培养, 流式细胞仪(FACSCalibur)检测各组GFP荧光率, 保留荧光强度高的细胞株用于后续研究。

1.2.3 RT-PCR: 收集GFP空载体组、Hpa-si1干扰组、Hpa-si2干扰组细胞各 5×10^6 , 按TRIzol说明书提取细胞总RNA, 用SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR试剂盒按说明书进行RT-PCR。PCR引物(Hpa全长引物): 上游引物: 5'-ccgaattccaggacgtcgtggacc-3', 下游引物: 5'-cgcctaggtcagatgcaagcagca-3', 产物用10 g/L琼脂

■研究前沿

肝素酶同多种恶性肿瘤的转移、侵袭和预后相关, 可望成为肿瘤转移治疗的一个新的基因靶点。

■相关报道

目前以肝素酶为靶标的肿瘤治疗方法主要有3种: (1)Hpa抑制剂: 如硫酸昆布多糖(LS)、磷酸甘露糖戊糖硫酸盐(PI-88), PI-88已经进入II期临床试验; (2)免疫治疗: Hpa基因修饰的树突状细胞(DC)疫苗; (3)核酸治疗: 通过反义寡脱氧核苷酸(AS-ODN)、核酶和小干扰RNA(siRNA)技术使肝素酶基因沉默。

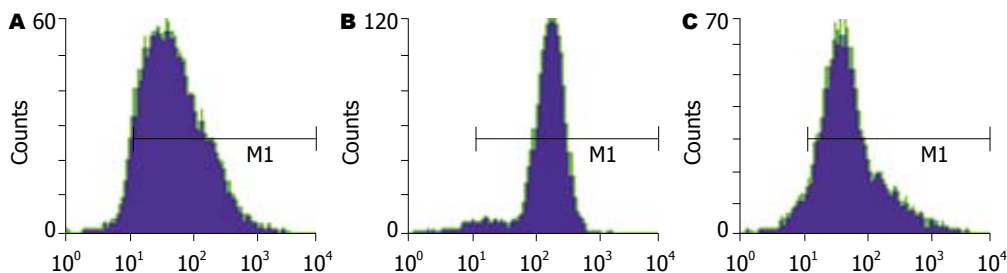


图1 流式细胞术检测GFP表达水平及稳定性. A: GFP空载组细胞; B: Hpa-si1干扰组细胞; C: Hpa-si2干扰组细胞.

表1 Hpa-siRNA序列

Hpa-siRNA	siRNA核苷酸序列
Hpa-siRNA1	GGAAUCAACCUUUGAAGAGTT CUCUCAAAGGUUGAUUCCTT
Hpa-siRNA2	GGAGAUUCUGUAAACUUAATT UUAAGUUUACAGAAUCUCCTC

糖凝胶电泳鉴定, β -actin为内参. PCR反应条件: 95℃预变性5 min, 94℃变性2 min, 58℃退火30 s, 72℃延伸90 s, 30个循环, 72℃延伸10 min.

1.2.4 Western blotting分析: Hpa蛋白检测: 收集GFP空载组、Hpa-si1干扰组、Hpa-si2干扰组细胞各 5×10^6 , 加入细胞裂解液, 提取细胞总蛋白, 用BCA试剂盒检测蛋白质浓度, 等量蛋白上样, 进行10 g/L SDS-PAGE电泳, 转PVDF膜, 50 g/L脱脂奶粉封闭, TBS-T室温洗涤, 依次与兔抗肝素酶多抗(1:100)为一抗, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG(1:500)反应, 化学发光法(ECL)曝光显影, 冲洗胶片, β -actin为内参, 操作方法同上.

1.2.5 裸鼠皮下成瘤试验: 收集GFP空载组、Hpa-si1干扰组、Hpa-si2干扰组细胞和未转染的HepG2细胞, PBS洗2遍, 0.25%的胰酶消化细胞, PBS洗涤重悬并计数, 选择4-5周龄胸腺缺失裸鼠(20只, 每组5只, 本院实验动物中心), 背部皮下接种, 每只约 1×10^6 个细胞, 隔天测量瘤体大小和鼠体质量.

接种第19天, 将裸鼠处死, 解剖, 完整切除实体瘤, 称质量后(新鲜湿质量)40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片(委托军事医学科学院二所病理室制备).

1.2.6 免疫组化检测不同组肿瘤肝素酶表达水平: 将GFP空载组、Hpa-si1干扰组、Hpa-si2干扰组的瘤组织切片放入65℃烤箱烘烤40 min, 常规方法脱蜡, 加入30 mL/L H_2O_2 浸泡10 min, 清水洗两

次, 柠檬酸缓冲液高压锅法抗原修复, 冷却至室温, PBS-T洗涤, 100 mL/L小牛血清PBTS-T 37℃. 鼠抗人肝素酶单抗37℃温育1 h, PBS-T洗涤, HRP标记的二抗聚合物37℃ 30 min, DAB显色, 苏木精复染, 封片剂封片, 于400倍显微镜下观察.

统计学处理 采用SPSS v13.0统计软件进行 t 检验, 数据以mean \pm SD表示, $P < 0.05$ 具有统计学意义.

2 结果

2.1 Hpa-siRNA HepG2细胞株 荧光显微镜下观察, 除阳性对照组, 即共转染pGCsi和pGCsi-GFP-siRNA载体组没有荧光, 其余各组克隆均有荧光. 说明GFP-siRNA发挥了干扰作用, 证明了吉凯公司合成的载体有效. 由此通过G418加压筛选所获得的Hpa-siRNA表达的阳性细胞可用于后续研究.

流式细胞术分析结果表明, GFP空载组、Hpa-si1和Hpa-si2干扰组细胞的GFP表达均为阳性, 间接说明Hpa-siRNA表达稳定性好, 可用于后续研究(图1).

2.2 siRNA对HepG2细胞Hpa基因mRNA转录水平及蛋白质水平的影响 为明确siRNA转染对靶基因的影响, 我们进行RT-PCR和Western blot检测. RT-PCR结果表明: 三组细胞Hpa mRNA的特异扩增片段长度为1.6 kb左右, 与理论设计扩增长度一致(空心箭头, 图2), Hpa-siRNA稳定转染HepG2细胞后, Hpa基因mRNA转录水平较空载组明显下调.

Western blot检测也得出类似结果, 三组细胞均有Hpa蛋白表达(图3), Hpa-siRNA稳定转染HepG2细胞后, Hpa蛋白表达水平较空载组明显下降. 实验结果表明Hpa-siRNA基因转染抑制了HepG2细胞肝素酶的表达.

2.3 RNAi在体内对肿瘤生长的影响 裸鼠接种HepG2细胞(空白对照组)、GFP空载组、Hpa-si1

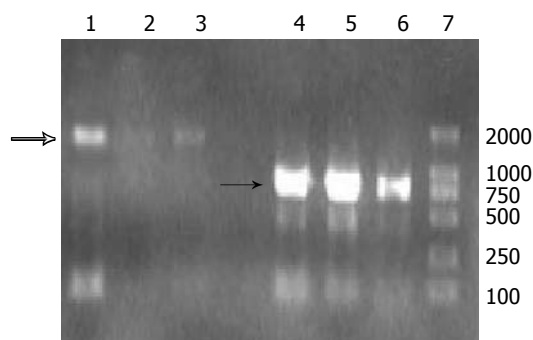


图 2 RT-PCR法检测HepG2细胞肝素酶mRNA表达. 1-3为肝素酶cDNA水平检测, 4-6: β -actin cDNA水平检测. 1, 4: GFP空载组细胞; 2, 5: Hpa-si1干扰组细胞; 3, 6: Hpa-si2干扰组细胞; 7: Marker 2 kDa.

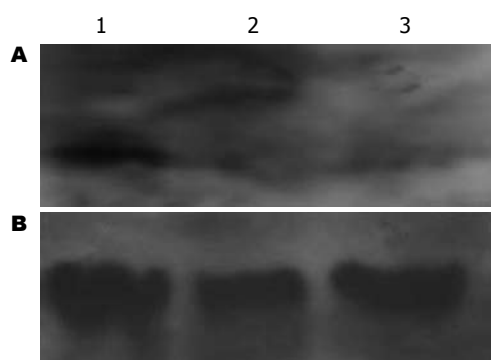


图 3 Western blot法检测HepG2细胞肝素酶蛋白表达. A: 肝素酶水平检测, B: β -actin水平检测: 1: GFP空载组细胞; 2: Hpa-si1干扰组细胞; 3: Hpa-si2干扰组细胞.

和Hpa-si2干扰组肿瘤细胞19 d时, 脱颈处死, 解剖取瘤称质量, 取每组平均值作图, 如图4所示. 数据经SPSS v13.0软件一维方差分析: HepG2组和GFP空载组间无显著差异($P>0.05$); Hpa-si1和Hpa-si2干扰组间无显著差异($P>0.05$), 空白对照组、GFP空载组与RNA干扰组差异显著($P<0.05$). 实验数据说明GFP基因不影响靶基因Hpa mRNA表达, 空白对照组、GFP空载组与Hpa-si1和Hpa-si2干扰组肿瘤质量差别具有统计学意义.

与肿瘤质量结果一致, 空白对照与GFP空载组肿瘤体积无显著差异($P>0.05$), 空白对照组、GFP空载组与RNA干扰组差异显著($P<0.05$). 从肿瘤生长趋势图可以看出, 初期各组肿瘤生长速度差异不明显, 而后期空白对照组、GFP组肿瘤生长速度快, Hpa-si1和Hpa-si2干扰组速度较慢, 尤其在第11天之后差距明显, 说明其对肝素酶表达水平的抑制影响了肿瘤细胞的成瘤性(图5). 肿瘤质量和大小的统计数据说明, Hpa-siRNA能够抑制肿瘤在体内的生长.

2.4 免疫组化检测结果 SO, AEP及倒置显微镜下观察, 三组细胞中均出现棕褐色颗粒状染色, 提

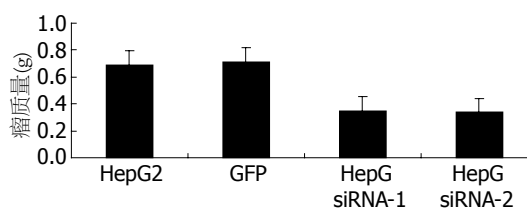


图 4 接种HepG2肿瘤细胞19 d时, 荷瘤裸鼠瘤质量.

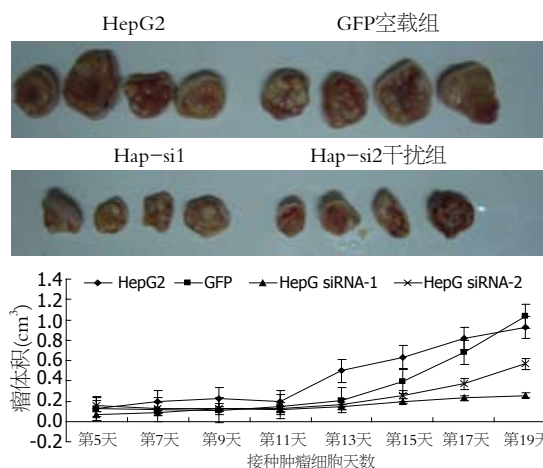


图 5 接种HepG2肿瘤细胞后, 荷瘤裸鼠瘤体积随接种天数的变化趋势.

示各组细胞均有肝素酶表达(图6), GFP空载组组织为肝素酶强阳性, 而Hpa-si1和Hpa-si2干扰组为弱阳性. 与体外实验结果一致, RNA干扰在体内降低了肿瘤细胞肝素酶表达水平, 结合成瘤试验, 提示肝素酶的表达水平与肿瘤生长速度和肿瘤质量成正比.

3 讨论

肿瘤局部浸润和转移是影响手术效果和生存期的主要原因. 肿瘤浸润和转移是个复杂的多步骤的连续过程, 其中肿瘤细胞的恶性增殖和细胞外基质降解是其中的重要步骤. Hpa通过降解BM和ECM中的HSPG, 破坏限制肿瘤转移的屏障, 释放活性物质, 产生链式反应, 加快血管生成, 加强肿瘤细胞的运动能力, 促进肿瘤生长和转移, 已成为肿瘤研究者关注的指标之一.^[1-2,20-23] 此外, 由于肝素酶活性与白细胞迁移进入炎症区有关, 抑制肝素酶活性也可能成为治疗炎症疾病的一个新策略, 故针对Hpa的研究意义重大.^[24-26]

随着有关Hpa分子生物学特性、结构与功能、对肿瘤转移的促进作用与机制等研究的不断深入, 肝素酶已成为抗癌药物的重要靶点, 目前Hpa抑制剂和针对Hpa的核酸治疗是研究热点.^[27-30]

■创新盘点
利用RNAi技术抑制肿瘤肝素酶基因表达的研究已有报道, 但未见肝素酶-siRNA抑制肝癌细胞HepG2在裸鼠体内生长的研究报道.

■应用要点

本研究结果表明应用RNAi技术沉默Hpa基因可以有效下调肝癌肿瘤细胞中Hpa mRNA及蛋白的表达,抑制体内肿瘤生长,研究结果为研究肝素酶对细胞生物行为的影响及其在肿瘤转移中的作用机制提供了实验数据。

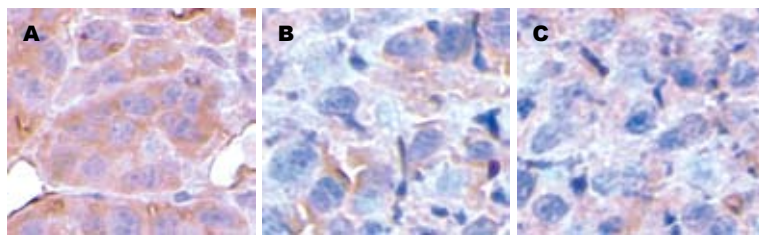


图6 HepG2细胞肝素酶免疫组化结果, DAB染色($\times 400$)。A: GFP空载体组细胞(强阳性); B: Hpa-si1干扰组细胞(弱阳性); C: Hpa-si2干扰组细胞(弱阳性)。

Hpa抑制剂的研发多集中于硫酸多糖类物质或结构类似于多糖的负离子多聚物。因为Hpa的底物HSPG具有以上两个结构特点,即含硫酸基团和糖链并带负电荷。故凡具备上述特点的生物或化学物质均有可能与HSPG竞争结合Hpa结合位点,阻止Hpa作用于底物,抑制其活性。核酸治疗,指通过Hpa反义寡脱氧核苷酸(AS-ODN)、核酶和RNAi技术使肝素酶基因沉默。

针对Hpa基因的siRNA技术已显示了对肿瘤的生长和转移良好的抑制作用。我们前期的免疫组化结果表明,肝癌细胞株HepG2高表达Hpa,本研究的目的是探讨下调Hpa基因对肝癌细胞生物学行为的影响。由于siRNA较单链反义寡核苷酸显示了更好的稳定性与基因沉默效果,因此我们采用RNAi技术,特异性下调肝癌细胞Hpa的表达,采用RT-PCR和Western blot方法分析靶基因Hpa mRNA及蛋白质水平的变化,结果表明Hpa siRNA对HepG2细胞表达Hpa有较强的抑制作用,成功地获得了稳定表达Hpa-siRNA的肝癌细胞株。

为了观察Hpa siRNA对肝癌细胞在体内生长的抑制效果,我们通过接种裸鼠成瘤试验,对瘤组织进行了质量、体积、免疫组化分析。经统计学分析表明干扰组在抑制肿瘤生长方面与空载组、空白对照组存在显著差异($P < 0.05$),两干扰组无显著差异($P > 0.05$); RNA干扰后的肝癌细胞在裸鼠体内生长速度明显下降,干扰组的Hpa表达水平明显降低,不仅验证了肝素酶在恶性肿瘤的发生过程中的促进作用,还显示出Hpa siRNA在肿瘤临床治疗方面具有研究价值和前景。

总之,本实验通过合成针对Hpa的siRNA,有效抑制了肝癌细胞Hpa基因的表达,抑制了肝癌细胞在裸鼠体内的生长,为今后进一步研究肝素酶对细胞生物行为的影响及肿瘤治疗提供了一个有效的方法。

4 参考文献

- Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O,

- Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med* 1999; 5: 793-802

- Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med* 1999; 5: 803-809

- Gong F, Jemth P, Escobar Galvis ML, Vlodavsky I, Horner A, Lindahl U, Li JP. Processing of macromolecular heparin by heparanase. *J Biol Chem* 2003; 278: 35152-35158

- Maxhimer JB, Quiros RM, Stewart R, Dowlatshahi K, Gattuso P, Fan M, Prinz RA, Xu X. Heparanase-1 expression is associated with the metastatic potential of breast cancer. *Surgery* 2002; 132: 326-333

- Wang Z, Xu H, Jiang L, Zhou X, Lu C, Zhang X. Positive association of heparanase expression with tumor invasion and lymphatic metastasis in gastric carcinoma. *Mod Pathol* 2005; 18: 205-211

- Tang W, Nakamura Y, Tsujimoto M, Sato M, Wang X, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Heparanase: a key enzyme in invasion and metastasis of gastric carcinoma. *Mod Pathol* 2002; 15: 593-598

- 张友磊,傅志仁,丁国善,傅宏,王元和,王强. 乙酰肝素酶mRNA在肝癌组织中的表达及其临床意义. *中华肿瘤杂志* 2003; 25: 359-361

- 刘颖斌,陈晓鹏,彭淑庸,方河清,史留斌,白明东,徐斌. 肝素酶与肝细胞癌侵袭转移的关系. *中华普通外科杂志* 2003; 18: 761-762

- El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1299-1305

- Koliopoulos A, Friess H, Kleeff J, Shi X, Liao Q, Pecker I, Vlodavsky I, Zimmermann A, Buchler MW. Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 4655-4659

- Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, Aviv A, Peretz T, Pecker I, Pappo O. Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1167-1175

- Cohen I, Pappo O, Elkin M, San T, Bar-Shavit R, Hazan R, Peretz T, Vlodavsky I, Abramovitch R. Heparanase promotes growth, angiogenesis and survival of primary breast tumors. *Int J Cancer* 2006; 118: 1609-1617

- Ginath S, Menczer J, Friedmann Y, Aingorn H, Aviv A, Tajima K, Dantes A, Glezerman M, Vlodavsky I, Amsterdam A. Expression of heparanase, Mdm2, and erbB2 in ovarian cancer. *Int J Oncol* 2001; 18:

- 1133-1144
- 14 Bitan M, Polliack A, Zecchina G, Nagler A, Friedmann Y, Nadav L, Deutsch V, Pecker I, Eldor A, Vlodavsky I, Katz BZ. Heparanase expression in human leukemias is restricted to acute myeloid leukemias. *Exp Hematol* 2002; 30: 34-41
- 15 Ogishima T, Shiina H, Breault JE, Tabatabai L, Bassett WW, Enokida H, Li LC, Kawakami T, Urakami S, Ribeiro-Filho LA, Terashima M, Fujime M, Igawa M, Dahiya R. Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1028-1036
- 16 Gohji K, Hirano H, Okamoto M, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Katsuoka Y, Nakajima M. Expression of three extracellular matrix degradative enzymes in bladder cancer. *Int J Cancer* 2001; 95: 295-301
- 17 Pikas DS, Li JP, Vlodavsky I, Lindahl U. Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets. *J Biol Chem* 1998; 273: 18770-18777
- 18 Vlodavsky I, Fuks Z, Bar-Ner M, Ariav Y, Schirmacher V. Lymphoma cell-mediated degradation of sulfated proteoglycans in the subendothelial extracellular matrix: relationship to tumor cell metastasis. *Cancer Res* 1983; 43: 2704-2711
- 19 Kurokawa H, Katsube K, Podyma KA, Ikuta M, Iseki H, Nakajima M, Akashi T, Omura K, Takagi M, Yanagishita M. Heparanase and tumor invasion patterns in human oral squamous cell carcinoma xenografts. *Cancer Sci* 2003; 94: 277-285
- 20 Vlodavsky I, Friedmann Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest* 2001; 108: 341-347
- 21 Marchetti D, Li J, Shen R. Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase. *Cancer Res* 2000; 60: 4767-4770
- 22 Gohji K, Katsuoka Y, Okamoto M, Kamidono S, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Nakajima M. Human heparanase: roles in invasion and metastasis of cancer. *Hinyokika Kiyo* 2000; 46: 757-762
- 23 Goldshmidt O, Zcharia E, Cohen M, Aingorn H, Cohen I, Nadav L, Katz BZ, Geiger B, Vlodavsky I. Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity. *FASEB J* 2003; 17: 1015-1025
- 24 Bame KJ. Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* 2001; 11: 91R-98R
- 25 Irony-Tur-Sinai M, Vlodavsky I, Ben-Sasson SA, Pinto F, Sicsic C, Brenner T. A synthetic heparin-mimicking polyanionic compound inhibits central nervous system inflammation. *J Neurol Sci* 2003; 206: 49-57
- 26 Benezra M, Ishai-Michaeli R, Ben-Sasson SA, Vlodavsky I. Structure-activity relationships of heparin-mimicking compounds in induction of bFGF release from extracellular matrix and inhibition of smooth muscle cell proliferation and heparanase activity. *J Cell Physiol* 2002; 192: 276-285
- 27 Miao HQ, Elkin M, Aingorn E, Ishai-Michaeli R, Stein CA, Vlodavsky I. Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Int J Cancer* 1999; 83: 424-431
- 28 Parish CR, Freeman C, Brown KJ, Francis DJ, Cowden WB. Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity. *Cancer Res* 1999; 59: 3433-3441
- 29 Edovitsky E, Elkin M, Zcharia E, Peretz T, Vlodavsky I. Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1219-1230
- 30 Zhang Y, Li L, Wang Y, Zhang J, Wei G, Sun Y, Shen F. Downregulating the expression of heparanase inhibits the invasion, angiogenesis and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 124-129

■同行评价

本文整体结构清晰, 层次分明, 实验设计基本合理, 对比恰当, 图片清晰, 结果可信, 文献引用得当。

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

STAT3在肝衰竭组织中的表达及其与肝前体细胞增殖的关系

吕晓辉, 刘兴利, 王炳元, 宋 敏

■背景资料

肝衰竭组织中存
在肝前体细胞的
活化及增殖, 由于
肝前体细胞具有
双向分化潜能, 他
可以分化为肝细
胞及胆管细胞, 故
肝前体细胞可望
成为严重肝病细
胞替代疗法以及
人工肝的供体细
胞, 因此使其成为
当前的一个研究
热点, 尤其肝前体
细胞活化增殖及
分化机制的研究
成为探讨的焦点。

吕晓辉, 王炳元, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

刘兴利, 中国医科大学附属盛京医院, 辽宁省沈阳市, 110004

宋敏, 中国医科大学病理教研室 辽宁省沈阳市 110001

吕晓辉, 1996年中国医科大学本科毕业, 2007年中国医科大学博士毕业, 副教授, 主要从事重型肝炎肝衰竭发病机制及病理的研究。

国家“十五科技攻关”课题资助项目, No. 20003BA753C

作者贡献分布: 此课题由吕晓辉, 王炳元及宋敏设计; 研究过程由吕晓辉, 刘兴利及宋敏等操作完成; 研究所用试剂及分析工具由吕晓辉提供, 数据分析由吕晓辉及刘兴利完成; 本论文写作由吕晓辉完成。

通讯作者: 吕晓辉, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化内科, lvxiaohui1122@163.com

电话: 024-83282199

收稿日期: 2007-08-30 修回日期: 2007-11-03

Expression of STAT3 in liver failure tissue and the relationship between expression of STAT3 and the proliferating features of hepatic progenitor cells

Xiao-Hui Lv, Xing-Li Liu, Bing-Yuan Wang, Min Song

Xiao-Hui Lv, Bing-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Xing-Li Liu, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Min Song, Department of Pathology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: National Medical Science and Technology Foundation during the 10th Five-year Plan Period, No. 20003BA753C

Correspondence to: Xiao-Hui Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. lvxiaohui1122@163.com

Received: 2007-08-30 Revised: 2007-11-03

Abstract

AIM: To investigate the proliferating features of hepatic progenitor cells (HPCs) and the expression of p-STAT3 in liver failure.

METHODS: Liver tissues taken from 76 patients with liver failure and acute or chronic light hepatitis were tested for the expression of HPCs with OV6 by immunohistochemistry. Mean-

while, expression of cytokeratin 19 (CK19) and p-STAT3 was also detected in liver tissues by immunohistochemistry.

RESULTS: There were a lot of proliferating ducts in subacute and acute-on-chronic liver failure by immunohistochemical staining with CK19. The percentage of patients with liver failure positive for CK19 (62.5%) was significantly higher than that in common hepatitis (30%) ($P < 0.05$). The percentage of cases of liver failure positive for OV6 (85.7%) was significantly higher than that in common hepatitis (35.0%) ($P < 0.05$). The percentage of patients with liver failure positive for p-STAT3 (67.9%) was significantly higher than that in common hepatitis (25%) ($P < 0.05$), the expression of OV6 had a positive correlation with that of CK19 ($r_s = 0.689$) and p-STAT3 ($r_s = 0.239$).

CONCLUSION: HPCs are frequently detected in patients with liver failure. Expression of p-STAT3 is significantly higher than that in common hepatitis and is associated with the proliferation of HPCs. Thus, p-STAT3 might participate in the proliferation of HPCs.

Key Words: Liver failure; p-STAT3; Immunohistochemistry

Lv XH, Liu XL, Wang BY, Song M. Expression of STAT3 in liver failure and the relationship between expression of STAT3 and the proliferating features of hepatic progenitor cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 144-149

摘要

目的: 探讨p-STAT3在肝衰竭组织中的表达及其与肝前体细胞(HPC)增殖的关系。

方法: 对76例肝衰竭组织及急慢性轻型肝炎组织进行HE染色以观察病变特点; 应用免疫组化化学的方法对肝衰竭组织及急慢性轻型肝炎组织进行OV6, CK19及p-STAT3检测。

结果: CK19免疫组化结果表明, 亚急性肝衰竭(SALF)组织及慢加急性(亚急性)肝衰竭

■同行评议者

戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

(ACLF)组织中可见大量增生的胆管,包括典型增生胆管和非典型增生胆管.肝衰竭组织的CK19阳性率(62.5%)明显高于急性慢性轻型肝炎的阳性率(30%)($P<0.05$).肝衰竭组织的OV6阳性率(85.7%)明显高于急性慢性轻型肝炎的阳性率(35.0%)($P<0.05$).p-STAT3的阳性表达主要位于汇管区增生的胆管细胞、肝前体细胞、炎性细胞、窦内皮细胞及肝细胞的胞核.肝衰竭组织的p-STAT3阳性率(67.9%)明显高于急性慢性轻型肝炎的阳性率(25%)($P<0.05$).相关分析表明,OV6的表达与CK19及p-STAT3表达成正相关($r_s=0.689$, $r_s=0.239$, $P<0.05$).

结论:肝衰竭组织中存在HPC的增殖;肝衰竭组织中p-STAT3的表达增加,与HPC表达成正相关,提示p-STAT3参与肝衰竭组织中HPC的增殖调控.

关键词:肝衰竭;免疫组织化学;磷酸化STAT3

吕晓辉, 刘兴利, 王炳元, 宋敏. STAT3在肝衰竭组织中的表达及其与肝前体细胞增殖的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 144-149
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/144.asp>

0 引言

各种病因(包括病毒性、化学性及酒精性)引起的肝衰竭严重威胁人类健康.迄今国际上对肝衰竭的定义、分类和诊断尚无一致意见.2006-09我国制订了第一部《肝衰竭诊疗指南》^[1-2],将肝衰竭分为急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)、亚急性肝衰竭(subacute liver failure, SALF)、慢加急性(亚急性)肝衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF)及慢性肝衰竭(chronic liver failure, CLF).

肝脏具有较强的再生能力,当肝损伤较轻时,通常由残存的肝细胞再生以代偿肝功能.但当严重肝损伤或其他原因影响了正常肝细胞的复制增殖能力时,可以有肝干细胞的活化、增殖和分化.在动物实验中为肝卵圆细胞,在人类中为管状细胞或小肝细胞样细胞^[3-8],称之为肝前体细胞(hepatic progenitor cell, HPC).目前研究表明肝衰竭组织中存在HPC的活化及增殖,他可以分化为肝细胞及胆管细胞.如果能诱导HPC的活化,增殖与分化则为干细胞移植带来富足的细胞来源.但HPC的活化、增殖及分化机制尚不清楚.

信号转导子和转录激活子家族(signal transducer and activator of transcription, STATs)是

一种存在于细胞质与酪氨酸磷酸化信号通道偶联的双功能蛋白. STAT3参与了许多细胞因子及生长因子介导的细胞增殖及分化过程^[9-16].

本文旨在研究急、慢性肝衰竭组织中HPC的增殖情况及STAT3的表达.

1 材料和方法

1.1 材料 1965-2005年中国医科大学第一临床学院尸检病例、肝脏外科手术病例(包括肝移植)及肝活检病例共76例.病理诊断符合2006年《肝衰竭诊疗指南》诊断标准^[2].年龄6-68岁,男性55例,女性21例.其中ALF20例、SALF10例、ACLF8例及CLF18例.另外选取轻度急性病毒性肝炎(acute viral hepatitis, AH)及轻度慢性病毒性肝炎(chronic viral hepatitis, CH)20例作为对照.所有病例肝组织标本均经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m厚连续切片.小鼠抗人OV6 mAb由美国BROWN大学Hixson教授惠赠.兔抗人Phospho-STAT3(Tyr705)多克隆抗体购自Cell Signaling公司;小鼠抗人细胞角蛋白19(Cytokeratin19, CK19)mAb购自Neo Markers公司.SP免疫组化试剂盒及DAB酶底物显色试剂盒购自福州迈新生物技术公司.

1.2 方法

1.2.1 肝组织学检查:石蜡切片进行HE染色,观察肝脏组织学基本病理改变.

1.2.2 免疫组织化学染色:连续石蜡切片经脱蜡后,以高温高压进行抗原修复.滴加A液(SP试剂盒中,即30 mL/L过氧化氢溶液)37℃ 30 min,以灭活内源性过氧化物酶. PBS洗3次;滴加B液(SP试剂盒中,即正常山羊血清)封闭37℃ 30 min;吸去血清,滴加一抗(p-STAT3稀释倍数1:100, CK19稀释倍数1:100; OV6稀释倍数1:200)4℃湿盒内孵育过夜.以不加一抗的PBS作为阴性对照. PBS洗3次;滴加C液(SP试剂盒中,即二抗),37℃湿盒内孵育30 min; PBS洗3次;滴加D液(SP试剂盒中,即SP复合物),37℃湿盒内孵育30 min; PBS洗3次;DAB显色,苏木素复染,中性树脂胶封片.

1.2.3 免疫组化结果判定:(1)OV6免疫组化半定量^[12]: OV6表达于细胞质,呈现棕色颗粒为阳性.每张切片随机选取5个高倍视野,每个视野计数100个细胞,计算阳性细胞的百分数. OV6染色阳性细胞为HPC. “-”:无HPC或有少量HPC; “+”:灶性HPC; “++”:连续性HPC,但范围

■ 研究前沿

信号转导子和转录激活子家族STATs是一种存在于细胞质与酪氨酸磷酸化信号通道偶联的双功能蛋白. STAT3参与了许多细胞因子及生长因子介导的细胞增殖及分化过程,但其在肝前体细胞增殖及分化过程中的作用有待进一步研究.

■相关报道

有研究表明在人类重型肝炎肝组织中存在着肝前体细胞的增殖,并且肝前体细胞的数目与肝病的严重程度密切相关。另有研究证实STAT3参与肝损伤后肝细胞再生的调控,促进受损肝脏肝细胞的增殖,但其在肝衰竭组织中肝前体细胞增殖中的作用尚不清楚。

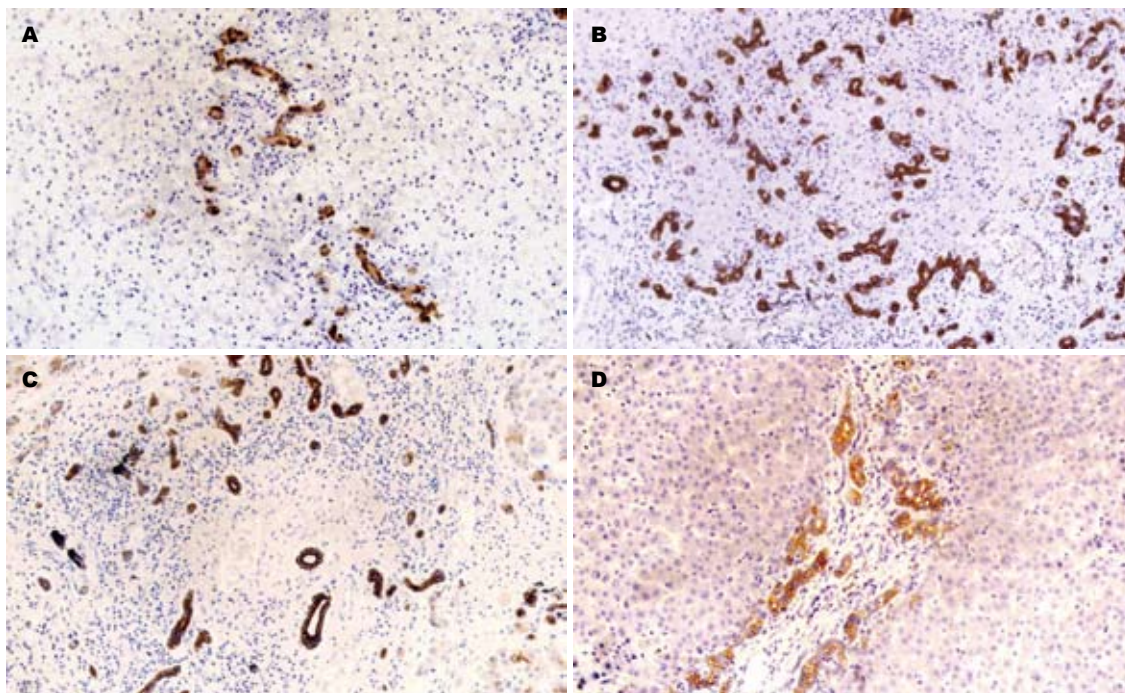


图1 CK19在各型肝炎衰竭组织中的表达(免疫组化SP法×200). A: ALF; B: SALF; C: ACLF; D: CLF.

<50%汇管区和纤维间隔;“+++”:连续性HPC,但范围>50%汇管区和纤维间隔.以“-”为阴性;“+”“++”及“+++”为阳性.(2)CK19及p-STAT3免疫组化染色结果判定^[17]:每张切片随机选取5个高倍视野,每个视野计数100个细胞,计算阳性细胞的百分数. CK19表达于细胞质, p-STAT3表达于细胞核,呈现棕色颗粒为阳性.无着色或阳性表达率≤25%为阴性;>25%为阳性.

统计学处理 所有资料采用SPSS13.0统计软件进行分析.不同组比较采用 χ^2 检验,相关分析采用Spearman法. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肝衰竭肝组织病理特征 各型肝炎衰竭组织HE染色结果如下: (1)ALF: 肝细胞大块或亚大块性坏死,坏死面积≥肝实质的2/3,残留的肝细胞多集中于汇管区周围. (2)SALF: 可见亚大块坏死或桥接坏死,坏死区周围出现大量增生的小胆管及胆管样肝细胞团,往往沿塌陷网状支架呈无序的再生,残留的肝细胞有增生. (3)ACLF: 在慢性肝病背景上发生新的程度不等的大块、亚大块性肝细胞坏死或桥接坏死.出现大量增生的小胆管及胆管样肝细胞团. (4)CLF: 弥漫性肝脏纤维化及假小叶形成,伴有局灶性肝细胞坏死.

2.2 CK19免疫组化染色结果 ALF肝组织中可见汇管区有CK19染色阳性的胆管,胆管多含有管腔,少数为不含管腔的非典型增生的假胆

表1 OV6, CK19, p-STAT3在肝衰竭组织中的表达

	OV6		CK19		p-STAT3	
	-	+	-	+	-	+
急慢性轻型肝炎	13	7	14	6	15	5
肝衰竭	8	48	21	35	18	38
χ^2	18.95		6.256		11.018	
P	<0.0005		0.012		0.001	

管. SALF及ACLF肝组织中可见大量增生的胆管, CLF肝组织中也可见到一些增生的胆管.从增生的胆管结构而言,可观察到两种类型的增生胆管,即典型增生胆管和非典型增生胆管.典型增生胆管可见到管腔结构及清晰的边界;而非典型增生胆管无明确的管腔结构,而且周围边界模糊(图1).肝衰竭组织CK19阳性率(62.5%)明显高于急、慢性轻型肝炎组织的阳性率(30%)($P<0.05$,表1).

2.3 OV6免疫组化染色结果 OV6是肝前体细胞的标记抗体,阳性染色呈现胞质棕色表达. OV6染色阳性的细胞主要有两种形式.大部分是组成非典型增生胆管的管状细胞.细胞体积较小,有卵圆形的核,核体积较大,细胞胞质较少,位于纤维间隔或炎症灶周围,以闭合的实心条索或细胞团的形式存在.另一种是汇管区出现的小肝细胞样细胞(图2).

急、慢性轻型肝炎仅见极少量的OV6阳性

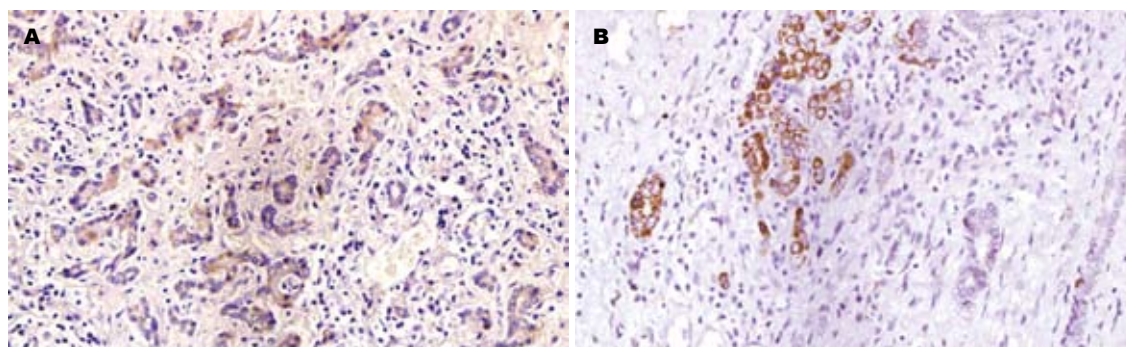


图 2 OV6在肝衰竭组织中的表达(免疫组化SP法×400). A: SALF, 非典型增生胆管表达阳性; B: ACLF, 小肝样细胞表达阳性.

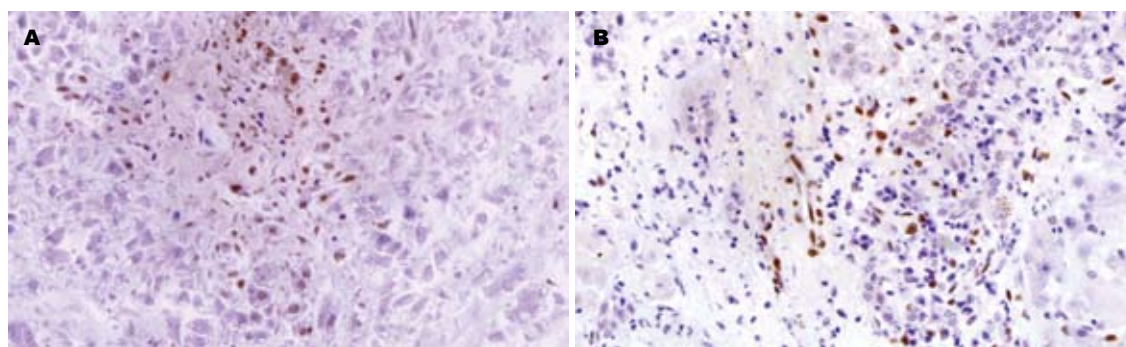


图 3 p-STAT3在肝衰竭组织中的表达(免疫组化SP法×400). A: ALF; B: SALF.

细胞, ALF组织阳性细胞也较少. 在SLF及ACLF组织中表达增加, 其中以ACLF组织表达最多. CLF肝组织中OV6阳性的细胞数有所减少. 统计学分析表明肝衰竭组织的OV6阳性率(85.7%)明显高于急、慢性轻型肝炎组织的阳性率(35.0%)($P<0.05$). 相关分析表明, OV6的表达与CK19的表达成正相关($r_s = 0.689$, $P<0.05$, 表1).

2.4 p-STAT3免疫组化染色结果 急、慢性轻型肝炎仅见少量的p-STAT3表达, 阳性表达的p-STAT3主要位于汇管区炎性细胞的胞核呈棕色颗粒. ALF, SLF, ACLF及CLF肝组织中p-STAT3的表达增加, 主要位于汇管区增生的胆管细胞、肝前体细胞、炎性细胞、窦内皮细胞及肝细胞的胞核(图3). 肝衰竭组织的p-STAT3阳性率(67.9%)明显高于急、慢性轻型肝炎组织的阳性率(25%)($P<0.05$). 相关分析表明, p-STAT3的表达与OV6的表达呈正相关($r_s = 0.239$, $P<0.05$, 表1).

3 讨论

1992年De Vos *et al*^[18]在慢性肝病患者的肝脏组织中检测到一种类似大鼠肝卵圆细胞的细胞, 并研究了超微结构. 研究发现HOC具有独特的

细胞形态, 细胞体积较小, 约为正常肝细胞的1/4至1/2大小, 整个细胞大部分为卵圆形胞核所占据, 表现为原始幼稚未分化细胞的超微结构特点. 他同时兼备肝细胞和胆管上皮细胞的特点. 有研究证实在人类重型肝炎肝组织中也存在着这种细胞^[19-30], 称为HPC.

本实验研究了各型肝衰竭患者肝组织中HPC的增生情况. 结果表明ALF组织中仅有很少量的OV6阳性的HPC的存在, 而SALF及CALF组织中可见到大量的OV6表达阳性的HPC细胞. CLF肝组织中OV6阳性的细胞数有所减少.

Lowes *et al*^[31]研究了HPC数目与遗传性血色病、慢性酒精性肝病、慢性肝炎和肝硬化等慢性肝病的关系, 发现HPC数目与肝病的严重程度密切相关. 病情越重, HPC数目就越多, 增生就越活跃.

HPC活化、增殖及分化的机制目前尚不清楚. STAT3是在1994年作为白细胞介素-6(interleukin, IL-6)信号传递中的急性期反应因子被纯化的. STAT3广泛表达于不同类型的细胞和组织中, 可被IL-6家族、表皮生长因子(epithelial growth factor, EGF)、肝细胞生长因子(hepatic growth factor, HGF)和磺胺噻唑激活, 发生

■创新盘点

本文应用免疫组化组织化学的方法研究了不同肝衰竭组织中肝前体细胞的活化及增殖情况, 表明肝衰竭组织存在着肝前体细胞的增殖, 并发现肝衰竭组织中STAT3表达增加, 证实STAT3可能参与了肝前体细胞的活化与增殖.

应用要点

通过本课题的研究,可了解肝前体细胞增殖、分化的某些调控因素,阐明信号转导分子在肝前体细胞增殖分化中的调控作用,为肝前体细胞的基础研究和临床应用研究提供试验依据。

磷酸化,磷酸化的STAT3可以通过调控核因子- κ B等转录因子进而参与细胞的增殖及分化^[32-41]。

Sakuda *et al*^[42]研究发现STAT3在正常的肝脏中以未活化的形式存在。在大鼠肝脏切除2/3不损伤留下的肝叶的情况下,活化的STAT3在30 min内出现,在3 h达到高峰,提示STAT3具有促进肝脏再生的作用。参与肝细胞再生过程的STAT3的活化主要由IL-6介导,IL-6基因缺陷小鼠的STAT3活化水平降低,肝细胞再生时DNA合成受抑制^[43-47]。上述研究提示STAT3参与肝损伤后的肝细胞再生的调控^[48-52]。但STAT3在急、慢性肝衰竭组织中的表达及其对HPC增殖的调控尚不清楚。

本实验研究表明ALF肝组织可见少量的p-STAT3表达,主要位于汇管区的炎性细胞。而SLF及ACLF肝组织中p-STAT3的表达增加,除了汇管区的炎性细胞外,增生的胆管细胞、肝前体细胞、窦内皮细胞及再生肝细胞的胞核均出现阳性表达。

Sanchez *et al*^[35]应用二乙酰氨基苄结合部分肝切除(AAF/PH)建立HPC增殖的动物模型,证实了STAT3的表达增加促进HPC的增殖,并且认为活化的STAT3具有调控HPC分化的作用。因此我们推测STAT3在急、慢性肝损伤过程中可以促进肝细胞及HPC的增殖以修复受损肝脏。

总之,本研究表明,在SALF、ACLF及CLF肝组织中存在HPC的活化及增殖,STAT3的表达促进HPC的增殖。

参考文献

- Polson J, Lee WM. AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology* 2005; 41: 1179-1197
- 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组; 中华医学会肝病学会分会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南. 中华肝病杂志 2006; 14: 643-646
- Gordon GJ, Coleman WB, Grisham JW. Temporal analysis of hepatocyte differentiation by small hepatocyte-like progenitor cells during liver regeneration in retrorsine-exposed rats. *Am J Pathol* 2000; 157: 771-786
- Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW. Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* 2000; 156: 607-619
- Mitaka T. Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 1-5
- Desmet V, Roskams T, Van Eyken P. Ductular reaction in the liver. *Pathol Res Pract* 1995; 191: 513-524
- Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 1990; 50: 3811-3815
- Gerber MA, Thung SN. Liver stem cells and development. *Lab Invest* 1993; 68: 253-254
- Singh SR, Chen X, Hou SX. JAK/STAT signaling regulates tissue outgrowth and male germline stem cell fate in *Drosophila*. *Cell Res* 2005; 15: 1-5
- Akhurst B, Matthews V, Husk K, Smyth MJ, Abraham LJ, Yeoh GC. Differential lymphotoxin-beta and interferon gamma signaling during mouse liver regeneration induced by chronic and acute injury. *Hepatology* 2005; 41: 327-335
- Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, Saiura A, Matsubara K, Kitagawa T, Yamamoto J, Kubo T, Yoshikawa H. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2005; 24: 6406-6417
- Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate? *J Pathol* 2000; 192: 373-378
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999; 98: 295-303
- Clevenger CV. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* 2004; 165: 1449-1460
- Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Shimosegawa T. Activation of JAK-STAT pathway is required for platelet-derived growth factor-induced proliferation of pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3385-3391
- Singh SR, Chen X, Hou SX. JAK/STAT signaling regulates tissue outgrowth and male germline stem cell fate in *Drosophila*. *Cell Res* 2005; 15: 1-5
- Campbell CL, Jiang Z, Savarese DM, Savarese TM. Increased expression of the interleukin-11 receptor and evidence of STAT3 activation in prostate carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 158: 25-32
- De Vos R, Desmet V. Ultrastructural characteristics of novel epithelial cell types identified in human pathologic liver specimens with chronic ductular reaction. *Am J Pathol* 1992; 140: 1441-1450
- Lowe KN, Croager EJ, Olynyk JK, Abraham LJ, Yeoh GC. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 4-12
- Mitaka T. Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 1-5
- Grisham JW, Coleman WB, Smith GJ. Isolation, culture, and transplantation of rat hepatocytic precursor (stem-like) cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 204: 270-279
- Chramostova K, Vondracek J, Sindlerova L, Vojtesek B, Kozubik A, Machala M. Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 196: 136-148
- Coleman WB, McCullough KD, Esch GL, Faris RA, Hixson DC, Smith GJ, Grisham JW. Evaluation of the differentiation potential of WB-F344 rat liver epithelial stem-like cells in vivo. Differentiation to hepatocytes after transplantation into dipeptidylpeptidase-IV-deficient rat liver. *Am J Pathol* 1997; 151: 353-359
- Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 2001; 33: 130-141
- Strain AJ, Crosby HA. Hepatic stem cells. *Gut* 2000;

- 46: 743-745
- 26 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
 - 27 Braun KM, Thompson AW, Sandgren EP. Hepatic microenvironment affects oval cell localization in albumin-urokinase-type plasminogen activator transgenic mice. *Am J Pathol* 2003; 162: 195-202
 - 28 Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999; 30: 1425-1433
 - 29 Yao P, Zhan YQ, Xu WX, Li CY, Yang XM, Hu DR. Mitogenic effects of growth and differentiation factors on rat liver stem cell WB-F344 *in vitro*. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2003; 11: 33-36
 - 30 Muller-Borer BJ, Cascio WE, Anderson PA, Snowwaert JN, Frye JR, Desai N, Esch GL, Brackham JA, Bagnell CR, Coleman WB, Grisham JW, Malouf NN. Adult-derived liver stem cells acquire a cardiomyocyte structural and functional phenotype *ex vivo*. *Am J Pathol* 2004; 165: 135-145
 - 31 Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* 1999; 154: 537-541
 - 32 Gao B. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol* 2005; 2: 92-100
 - 33 Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, Koike K, Takaki A, Shiratori Y. Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2005; 280: 6409-6415
 - 34 Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 2000; 19: 2548-2556
 - 35 Sanchez A, Factor VM, Schroeder IS, Nagy P, Thorgeirsson SS. Activation of NF-kappaB and STAT3 in rat oval cells during 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Hepatology* 2004; 39: 376-385
 - 36 Salazar-Montes A, Ruiz-Corro L, Sandoval-Rodriguez A, Lopez-Reyes A, Armendariz-Borunda J. Increased DNA binding activity of NF-kappaB, STAT-3, SMAD3 and AP-1 in acutely damaged liver. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5995-6001
 - 37 Laurent S, Horsmans Y, Starkel P, Leclercq I, Sempoux C, Lambotte L. Disrupted NF-kappa B activation after partial hepatectomy does not impair hepatocyte proliferation in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7345-7350
 - 38 Akhurst B, Matthews V, Husk K, Smyth MJ, Abraham LJ, Yeoh GC. Differential lymphotoxin-beta and interferon gamma signaling during mouse liver regeneration induced by chronic and acute injury. *Hepatology* 2005; 41: 327-335
 - 39 Kile BT, Alexander WS. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 1627-1635
 - 40 Ni Z, Lou W, Leman ES, Gao AC. Inhibition of constitutively activated Stat3 signaling pathway suppresses growth of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 1225-1228
 - 41 Williams JG. STAT signalling in cell proliferation and in development. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 503-507
 - 42 Sakuda S, Tamura S, Yamada A, Miyagawa J, Yamamoto K, Kiso S, Ito N, Imanaka K, Wada A, Naka T, Kishimoto T, Kawata S, Matsuzawa Y. Activation of signal transducer and activator transcription 3 and expression of suppressor of cytokine signal 1 during liver regeneration in rats. *J Hepatol* 2002; 36: 378-384
 - 43 Li W, Liang X, Kellendonk C, Poli V, Taub R. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem* 2002; 277: 28411-28417
 - 44 Yeoh GC, Ernst M, Rose-John S, Akhurst B, Payne C, Long S, Alexander W, Croker B, Grail D, Matthews VB. Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation. *Hepatology* 2007; 45: 486-494
 - 45 Isobe A, Takeda T, Sakata M, Yamamoto T, Minekawa R, Hayashi M, Auernhammer CJ, Tasaka K, Murata Y. STAT3-mediated constitutive expression of SOCS3 in an undifferentiated rat trophoblast-like cell line. *Placenta* 2006; 27: 912-918
 - 46 Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 1998; 12: 2048-2060
 - 47 Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 1999; 18: 4261-4269
 - 48 Demetris AJ, Lunz JG 3rd, Specht S, Nozaki I. Biliary wound healing, ductular reactions, and IL-6/gp130 signaling in the development of liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3512-3522
 - 49 Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 33-36
 - 50 Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 2003; 130: 2513-2524
 - 51 Brawley C, Matunis E. Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation *in vivo*. *Science* 2004; 304: 1331-1334
 - 52 Forrai A, Boyle K, Hart AH, Hartley L, Rakar S, Willson TA, Simpson KM, Roberts AW, Alexander WS, Voss AK, Robb L. Absence of suppressor of cytokine signalling 3 reduces self-renewal and promotes differentiation in murine embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 604-614

■同行评价

本文研究内容新颖,具有一定的创新性,对临床具有一定的参考价值。

编辑 程剑侠 电编 马文华

移植雄性骨髓的雌性小鼠肝组织肝再生相关基因的信号通路

李晶津, 李瀚旻, 高翔, 晏雪生

■背景资料

本文围绕肝再生这一重大而关键的科学问题, 在前期研究的基础上, 研究骨髓移植后放射性肝损伤的肝再生相关基因信号通路的变化规律。

李晶津, 武汉大学医学院2003级临床医学专业 湖北省武汉市 430072
李瀚旻, 高翔, 晏雪生, 湖北中医学院附属医院肝病研究所 湖北省武汉市 430061
李晶津, 2003年武汉大学医学院医学学士, 2004年武汉大学生命科学学院生命科学学士, 主要从事生命科学研究。
国家自然科学基金重大研究计划项目, No. 90709041
国家自然科学基金资助项目, No. 30672590, 30271562, 30371787
国家重大基础研究973资助项目, No. 2002CCC00300
湖北省自然科学基金资助项目, No. 2001ABB171
通讯作者: 李瀚旻, 430061, 湖北省武汉市武昌区花园山4号, 湖北中医学院附属医院肝病研究所(感染性疾病科).
lihanmin69@126.com
电话: 027-88929180
收稿日期: 2007-07-12 修回日期: 2007-12-28

Liver regeneration-related gene signaling pathways in female mice transplanted bone marrow from male mice

Jing-Jin Li, Han-Min Li, Xiang Gao, Xue-Sheng Yan

Jing-Jin Li, Medical College of Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei Province, China
Han-Min Li, Xiang Gao, Xue-Sheng Yan, Institute of Liver Diseases, Affiliated Hospital of Hubei Traditional Chinese Medicine College, Wuhan 430061, Hubei Province, China
Supported by: the National Key Technologies Research and Development Program of China, No. 90709041; National Natural Science Foundation of China, No. 30672590, 30271562, 30371787; the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2002CCC00300 and the Natural Science Foundation of Hubei Province, China, No. 2001ABB171
Correspondence to: Han-Min Li, Department of Infectious Disease, Institute of Liver Diseases, Affiliated Hospital of Hubei Traditional Chinese Medicine College, Wuhan 430061, Hubei Province, China. lihanmin69@126.com
Received: 2007-07-12 Revised: 2007-12-28

Abstract

AIM: To probe into the mechanism underlying the transformation of bone marrow into hepatic cells.

METHODS: Inter-sexual bone marrow transplantation models were induced by transplanting bone marrow from male mice into the liver cells from female mice. Female Balb/C mice were randomly divided model group and nor-

mal control group. The oligo-nucleotide acid chip with mouse gene expression spectrum was selected, and reverse transcription enzyme was used to synthesize the fluorescence-labeled cDNA probe. The probe and gene expression microchip were hybridized to observe changes of gene expression in the liver tissues, and genes with a different hybrid signal ratio were selected and the changes of liver regeneration-related gene pathways in female mice transplanted bone marrow from male mice were analyzed.

RESULTS: A significance difference in the expression of genes was found in liver tissue from the female mice transplanted bone marrow from male mice after 6 mo between the model and normal control groups. Eight hundred and sixty-five genes had different expressions, including 447 recognized functional genes, of which 92 were up-regulated genes and 355 down-regulated genes. The up-regulated genes involving the signal pathways of HGF, TGF- β , focal adhesion, JAK-Stat and VEGF could promote the proliferation and differentiation of hepatic cells. The down-regulated genes could inhibit the activation of TGF- β signaling pathways and the negative effect of liver regeneration, thus contributing to the proliferation and differentiation of liver cells.

CONCLUSION: The gene expression spectrum is remarkably changed in liver tissue from female mice transplanted bone marrow from male mice by activating gene signal pathways and inhibiting liver regeneration.

Key Words: Bone marrow transplantation; Liver regeneration; Gene chip; Gene expression spectrum; Signaling pathway

Li JJ, Li HM, Gao X, Yan XS. Liver regeneration-related gene signaling pathways in female mice transplanted bone marrow from male mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 150-155

摘要

目的: 探讨骨髓形成肝细胞的分子机制。

■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 成都军区昆明总医院病理实验科

方法: 采用移植♂骨髓的♀小鼠模型, ♀Balb/c小鼠随机分为模型组和正常对照组, 选用小鼠基因表达谱寡核苷酸芯片, 利用反转录酶合成掺有荧光标记的cDNA探针, 将探针与基因表达谱芯片杂交观察小鼠肝组织基因表达谱的变化, 筛选样本之间杂交信号比值有差异表达的基因. 采用生物信息学方法分析模型组中小鼠肝组织再生相关基因的信号通路变化规律.

结果: ♀小鼠在移植♂骨髓6 mo后肝组织的基因表达谱显著不同, 对照组相对于正常组的差异表达基因有865条, 已知功能基因有447条, 其中上调基因92条, 下调基因355条. 与肝再生相关基因信号通路涉及HGF, TGF- β , Focal Adhesion, JAK-Stat, VEGF等信号通路, 他们相关基因的上调表达促进肝细胞的增殖分化. TGF- β 信号通路中相关基因下调, 抑制信号通路的激活, 减弱肝再生的负性作用, 利于肝细胞的增殖分化.

结论: ♀小鼠移植♂骨髓后的肝组织基因表达谱显著变化, 有可能通过其肝再生相关基因的信号通路激活或抑制调节肝再生.

关键词: 骨髓移植; 肝再生; 基因芯片; 基因表达谱; 信号通路

李晶津, 李瀚旻, 高翔, 晏雪生. 移植雄性骨髓的雌性小鼠肝组织肝再生相关基因的信号通路. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 150-155
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/150.asp>

0 引言

鉴于有关人类胚胎干细胞的研究受到伦理道德和法律的限制, 成体干细胞的研究越来越受到重视. 最近的许多研究证明, 骨髓中的干细胞在特定环境下可分化成为多种组织细胞^[1], 骨髓干细胞向肝细胞横向分化的潜能已得到肯定^[2-8]. 但骨髓形成肝细胞的分子机制, 特别是有关这一过程的相关基因的信号转导通路尚缺乏系统深入的研究. 我们利用移植♂骨髓的♀小鼠模型(骨髓干细胞转化肝细胞的经典动物模型), 采用小鼠基因表达谱寡核苷酸芯片技术, 在探讨肝再生过程中基因表达谱变化规律的基础上, 对♀小鼠移植♂骨髓后肝组织相关基因的信号通路进行分析.

1 材料和方法

1.1 材料 Balb/c小鼠, 4周龄, SPF级, 湖北省预

防医学科学院实验动物中心提供, 动管证号: SCXK(鄂)2003-0005. ♀小鼠随机分为两组, A组为对照组(正常♀小鼠), B组为移植♂骨髓的♀小鼠, 每组40只, 骨髓移植术前1 wk起饮水中加入红霉素(250 mg/L)和庆大霉素(320 mg/L)以清洁消化道. Cy5 dCTP、Cy3 dCTP (Amersham); RNA inhibitor(TaKaRa); QIAquick Nucleotide Removal Kit(Qiagen); 小鼠16K v1.0基因表达谱寡核苷酸芯片由上海生物芯片公司提供. UVP杂交炉; Agilent扫描仪; Agilent 2100 Bioanalyzer.

1.2 方法 ♂小鼠颈椎脱臼处死, 750 mL/L乙醇浸泡10 min, 无菌条件下取股骨、剪开干骺端, 用5 mL注射器吸取RPMI-1640液0.5 mL冲出骨髓, 过6号针头3次、4号针头两次制成单个细胞悬液, 计数并调整细胞密度为 1×10^{10} /L. ♀小鼠接受⁶⁰Co源 γ 射线全身照射(总剂量9 Gy), 然后经尾静脉输入制备好的♂小鼠骨髓细胞悬液0.2 mL(约 2×10^6 个细胞). 移植♂小鼠骨髓的♀小鼠饲养于SPF级动物房, 饮水中加入红霉素(250 mg/L)和庆大霉素(320 mg/L), 每天更换垫料和饮水, 垫料、饲料和饮水均经高温消毒. 骨髓移植6 mo后, 颈椎脱臼处死小鼠, 无菌条件下切取肝组织用液氮速冻后保存于-80℃待测.

肝组织标本抽提并纯化总RNA后完成如下操作. 在cDNA第1链合成过程中, 通过反转录酶将CyDye标记核苷酸直接掺入到cDNA链中制备探针荧光探针. 使用QIAquick Nucleotide Removal Kit纯化荧光探针. 将纯化好的探针转入酶标板, 分别测定 A_{260} 、 A_{550} 、 A_{650} 以定量, $Cy3 \text{ probe}(\text{pmol}) = A_{550} \times \text{洗脱体积} / 0.15$, $Cy5 \text{ probe}(\text{pmol}) = A_{650} \times \text{洗脱体积} / 0.25$. 将探针吸回PCR管, 真空加热抽干, 避光保存于-20℃, 待杂交. 移植♂小鼠骨髓的♀小鼠(Cy3标记)与正常♀小鼠(Cy5标记)合做芯片. 洗涤盖玻片, 用50 mL离心管分别配制ddH₂O、950 mL/L乙醇、ddH₂O并置于沸水中加热, 将盖玻片依次放入ddH₂O、950 mL/L乙醇、ddH₂O, 各3 min, 最后放入50 mL离心管中1000 r/min离心3 min, 去除残留的水渍, 放置备用. 用纯水配制PBS溶液, 杂交前加入适量到杂交盒内以保持杂交体系100%的湿度. 平衡杂交炉, 用水平仪校准杂交炉, 保持水平, 确保杂交芯片的均一性. 使用Agilent Scanner获取图像, 利用Split-tiff软件和图像分析软件Imagene, 确定杂交点的范围, 过滤背景噪音, 提取得到基因表达的荧光信号强度值. 将所得数

■创新盘点

本文利用移植♂骨髓的♀小鼠模型, 采用基因芯片技术, 在探讨肝再生过程中基因表达谱变化规律的基础上, 对♀小鼠移植♂骨髓后肝组织肝再生相关基因的信号通路进行分析, 为研究骨髓移植治疗肝损伤提供科学依据.

■应用要点

本研究骨髓干细胞转化肝细胞的分子机制,为揭示肝再生的调控机制,为临床应用骨髓干细胞移植治疗肝损伤奠定坚实的实验基础。

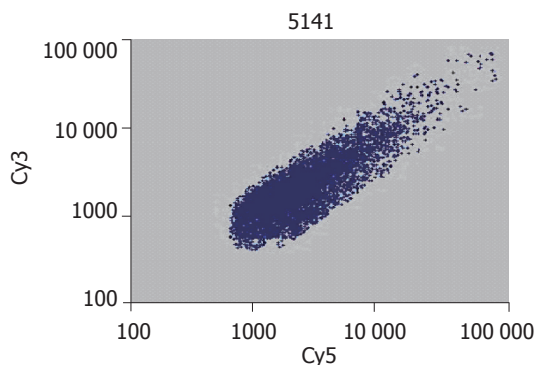


图1 Cy3与Cy5标记差异表达基因散点图。

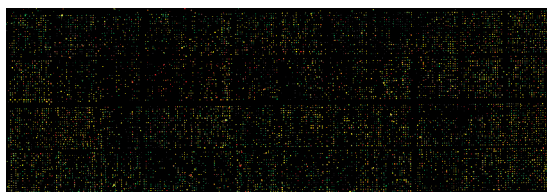


图2 差异表达基因杂交图。

据导入分析软件Genespring进行数据标准化处理,计算得到Ratio值(即两种荧光Cy3与Cy5的比值),Ratio值 ≤ 0.5 为基因表达水平下调,Ratio ≥ 2 为基因表达水平上调。甄选出肝再生相关的差异表达的基因,登陆<http://www.genome.jp/>京都基因和基因组百科全书(KEGG)的网页,搜取相关基因的资料,并得出相关信号通路的图示,供分析肝再生相关信号通路和其中差异表达的基因。

2 结果

2.1 移植 δ 骨髓的 δ 小鼠肝组织基因表达谱 在所检测的基因中,对照组相对于正常 δ 小鼠的差异表达基因有865条,已知功能基因有447条,其中上调基因92条、下调基因355条(图1-2)。

2.2 肝再生相关信号通路及差异表达基因 涉及肝再生相关的信号通路主要有细胞凋亡信号通路、Focal Adhesion通路、MAPK信号通路、WNT信号转导通路、Toll样受体信号通路、JAK-Stat信号通路、VEGF信号通路、TGF- β 通路的基因。主要有45条差异表达基因,其中含不同信号通路中相同的基因(图3,表1)。

3 讨论

在 δ 小鼠移植 δ 骨髓后,其体内骨髓形成肝细胞这一过程可以分为骨髓细胞迁移至肝脏和骨髓细胞在肝脏分化为肝细胞两个阶段,从骨髓干细胞的相关研究可以发现能够引起骨髓干细

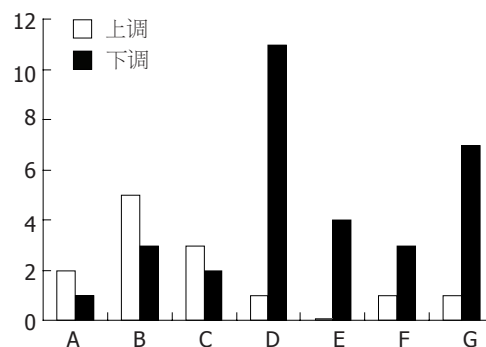


图3 肝再生相关信号通路差异表达基因。A: 细胞凋亡; B: 细胞因子相互作用受体; C: JAK-Stat信号通路; D: MAPK信号通路; E: TGF- β 信号通路; F: Toll信号通路; G: WNT信号通路。

胞动员和归巢的信号主要有间质细胞源性因子1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)及其受体CXCR4、干细胞因子(stem cell factor, SCF)及其受体c-kit、集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、整合素等^[9]。脏器损伤(本实验为致死性放射性损伤,包括肝损伤)可以引起一系列信号释放,刺激骨髓动员多种干细胞迁移至病变处,进而分化为相应的组织细胞进行自然的代偿性修复,而通过各种途径引入体内的外源性骨髓干细胞也可接受上述信号的刺激,定向归巢至损伤处,发挥增殖修复作用。移植 δ 骨髓的 δ 小鼠模型的肝组织中G-CSF3, TNF- α , IL-6 α , NGF等细胞因子/生长因子的受体表达上调。CSF是刺激骨髓干细胞动员和归巢的信号之一,主要包括G-CSF、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), G-CSF广泛用于干细胞的动员和归巢,但其中机制尚不明确; GM-CSF可引导人CD34⁺造血祖细胞骨髓归巢,还能增加骨髓内皮前体细胞和肌源性前体细胞的动员。TNF- α 主要由活化的单核巨噬细胞产生,抗原刺激的T淋巴细胞、活化的NK细胞和肥大细胞等也能分泌,其生物学活性取决于浓度的高低,低浓度的TNF- α 作用于局部的白细胞和血管内皮细胞中,诱发炎症反应;而高浓度的TNF- α 则可进入血流引起全身反应。IL-6主要由单核细胞、淋巴细胞、成纤维细胞产生,是B淋巴细胞终末分化因子、造血前体细胞克隆刺激因子,对早期的造血干细胞的增殖分化起重要作用,能刺激粒系和巨噬系造血祖细胞集落的形成,能促进巨核细胞的增殖分化而加速血小板的再生^[10]。

表 1 肝再生相关信号通路差异表达基因

通路名称	信号比值	Gene-symbol	Gene-description
Apoptosis	0.367	NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100
	2.951	MAP3K14	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
	2.733	PIK3RL	Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1(p85 alpha)
Cytokine-cytokine receptor interaction	0.481	BMP2	Bone morphogenetic protein 2
	0.25	TGFβ2	Transforming growth factor, beta 2
	2.136	HGF	Hepatocyte growth factor
	2.001	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C
	0.231	IL12Rβ2	Interleukin 12 receptor, beta 2
	2.001	CSF3R	Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
	2.026	IL6Rα	Interleukin 6 receptor, alpha
	0.493	IL13	Interleukin 13
	2.05	NGFR	Nerve growth factor receptor
Jak-Stat signaling pathway	2.733	PIK3RL	Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1(p85 alpha)
	2.001	CSF3R	Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
	0.231	IL12Rβ2	Interleukin 12 receptor, beta 2
	2.026	IL6Rα	Interleukin 6 receptor, alpha
	0.493	IL13	Interleukin 13
MAPK signaling pathway	0.475	PPM1B	Protein phosphatase 1B, Magnesium dependent, beta isoform
	0.298	PLA2GIB	Phospholipase A2, group IB, pancreas
	0.367	NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100
	2.951	MAP3K14	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
	0.463	PRKCβ	Protein kinase C, beta
	0.442	MAP3K6	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6
	0.25	TGFβ2	Transforming growth factor, beta 2
	0.376	MAPK8IP2	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2
	0.238	HSPA5	Heat shock 70 kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78 kDa)
	0.338	HSPA8	Heat shock 70 kDa protein 8
	0.35	HSPA11	Heat shock 70 kDa protein 1-like
	0.263	FOS	FBJ osteosarcoma oncogene
TGF-beta signaling pathway	0.25	TGFβ2	Transforming growth factor, beta 2
	0.429	DCN	Decorin
	0.481	BMP2	Bone morphogenetic protein 2
	0.429	BMP4	Bone morphogenetic protein 4
Toll-like receptor signaling pathway	0.367	NFKB2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100
	0.263	FOS	FBJ osteosarcoma oncogene
	0.395	TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein
	2.733	PIK3RL	Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1(p85 alpha)
WNT signaling pathway	0.463	PRKCβ	Protein kinase C, beta
	0.479	WNT4	Wingless-related MMTV integration site 4
	0.332	FOSL1	Fos-like antigen 1
	2.357	CSNK1α1	Casein kinase 1, alpha 1
	0.436	2410091N08RIK	RIKEN cDNA 2410091N08 gene
	0.334	FRATL	Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas
	0.263	CSNKLE	Casein kinase 1, epsilon
	0.262	LRP5	Low density lipoprotein receptor-related protein 5

■同行评价

本文研究MSC移植治疗肝损伤及其机制有重要意义, 对同行有一定参考价值。

♀小鼠移植♂骨髓后,其肝组织与肝再生相关基因涉及多条信号通路。其中HGF表达上调,TGF- β 表达下调,MAPK和WNT与肝再生相关的经典信号通路的相关基因表达下调。HGF是一种多功能因子,参与组织再生、肿瘤入侵和多种细胞修复过程^[11-16]。HGF的受体c-Met具有酪氨酸激酶活性,能介导各种HGF信号的传递。蛋白激酶C/A的激活、cAMP浓度的升高、细胞因子和炎症因子都可促进HGF的表达。HGF与其受体结合并激活受体上的PTK后,受体Y1349VHV及Y1356VNV序列中的Tyr首先自身磷酸化,该磷酸化序列被含SH2或SH3区蛋白质,如PI23K所识别,使二者短暂结合,受体PTK进而使之磷酸化。这些靶蛋白中的磷酸化Tyr序列再被其他含SH2或SH3区的蛋白质所识别。通过这种识别和结合机制,几条信号通路同时被启动,经瀑布式的磷酸化反应,将信号逐级放大,最终传到细胞核内的转录机构,导致细胞的增殖分化^[17-19]。♀小鼠移植♂骨髓后,其肝组织HGF表达上调,提示通过激活其信号通路,有利于肝组织细胞的增殖分化。

TGF- β 通路是正常肝再生的负性调控通路,肝再生失调时TGF- β 通过Smads通路激活HSC,促进胶原蛋白基因表达,使ECM合成、沉积而促进肝纤维化^[20-28]。TGF- β 与受体TGF β R结合后使Smad2、Smad3磷酸化,随即与Smad4形成异源寡聚体复合物,转入胞核与相应转录因子作用,调节靶基因的转录,促进HSC增殖,产生胶原,同时抑制ECM降解,加速肝纤维化的发展。在信号传递的过程中,Smad7发挥负反馈的调节作用,他与Smad2/3竞争性地与TGF β R1结合,抑制Smad2/3的磷酸化及其下游的信号转导^[29]。♀小鼠移植♂骨髓后,其肝组织TGF- β 呈下调表达,提示可通过抑制TGF- β 信号通路激活的复杂作用而有利于肝再生(包括骨髓干细胞转化为肝细胞的机制)。MAPK和WNT与肝再生相关的经典信号通路的相关基因表达下调,其可能的作用机制和意义尚需进一步研究。

4 参考文献

- 赵春华, 廖联明. 对成体干细胞可塑性的新认识及其在再生医学中的意义. 中华血液学杂志 2003; 24: 57-58
- Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* 1998; 27: 433-445
- Omori N, Omori M, Evarts RP, Teramoto T, Miller

- MJ, Hoang TN, Thorgeirsson SS. Partial cloning of rat CD34 cDNA and expression during stem cell-dependent liver regeneration in the adult rat. *Hepatology* 1997; 26: 720-727
- Omori M, Omori N, Evarts RP, Teramoto T, Thorgeirsson SS. Coexpression of flt-3 ligand/flt-3 and SCF/c-kit signal transduction system in bile-duct-ligated SI and W mice. *Am J Pathol* 1997; 150: 1179-1187
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
- Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- 李瀚旻, 晏雪生, 明安萍, 彭亚琴, 罗建君, 兰少波, 高翔. 肝脏细胞条件培养基诱导大鼠骨髓间质细胞分化为肝细胞的作用. 中西医结合肝病杂志 2005; 15: 28-30
- 马军, 葛均波. 骨髓干细胞归巢损伤脏器机制的研究概况. 中国临床医学 2004; 11: 453-454
- Patchen ML, MacVittie TJ, Williams JL, Schwartz GN, Souza LM. Administration of interleukin-6 stimulates multilineage hematopoiesis and accelerates recovery from radiation-induced hematopoietic depression. *Blood* 1991; 77: 472-480
- Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112: 160-169
- Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 500-504
- Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 156-164
- Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 24-30
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
- 唐力军, 高毅, 张志, 李浩, 单毓强. HGF+FGF-体外定向4诱导人骨髓来源的多能成体祖细胞向肝样细胞分化的特征性表型鉴定. 解放军医学杂志 2004; 29: 973-976
- Songyang Z, Shoelson SE, McGlade J, Olivier P, Pawson T, Bustelo XR, Barbacid M, Sabe H, Hanafusa H, Yi T. Specific motifs recognized by the

- SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2777-2785
- 18 Mayer BJ, Baltimore D. Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol* 1993; 3: 8-13
- 19 Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 1994; 77: 261-271
- 20 Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001; 48: 548-557
- 21 Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 123-126
- 22 Nakamura T, Ueno T, Sakamoto M, Sakata R, Torimura T, Hashimoto O, Ueno H, Sata M. Suppression of transforming growth factor-beta results in upregulation of transcription of regeneration factors after chronic liver injury. *J Hepatol* 2004; 41: 974-982
- 23 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001; 34: 89-100
- 24 Zhang LH, Pan JP, Yao HP, Sun WJ, Xia DJ, Wang QQ, He L, Wang J, Cao X. Intrasplenic transplantation of IL-18 gene-modified hepatocytes: an effective approach to reverse hepatic fibrosis in schistosomiasis through induction of dominant Th1 response. *Gene Ther* 2001; 8: 1333-1342
- 25 Zhang L, Mi J, Yu Y, Yao H, Chen H, Li M, Cao X. IFN-gamma gene therapy by intrasplenic hepatocyte transplantation: a novel strategy for reversing hepatic fibrosis in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Parasite Immunol* 2001; 23: 11-17
- 26 Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, De La Coste A, Soubrane O, Gilgenkrantz H, Kahn A. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 1998; 4: 1185-1188
- 27 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-807
- 28 Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 731-740
- 29 Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 2002; 296: 1646-1647

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志 2007 年 1-12 月份 收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 世界华人消化杂志2007年1-12月份收稿及发稿数字统计结果: 自2007-01-01/2007-12-31, 世界华人消化杂志共收到稿件1525篇, 退稿627篇, 退稿率41.11%。发表文章773篇, 其中述评47篇(6.1%), 基础研究198篇(25.61%), 临床研究94篇(12.16%), 文献综述109篇(14.10%), 研究快报91篇(11.77%), 临床经验201篇(26.00%), 病例报告10篇(1.29%), 焦点论坛19篇(2.46%)。会议纪要4篇(0.5%), 英文摘要740篇(95.98%)。其中受国家级基金资助的177篇(22.96%), 省部级基金资助的247篇(32.04%)。作者分布遍及全国各地, 绝大多数来自高等院校及附属医院。(常务副总编辑: 张海宁 2008-01-01)

结直肠癌PTEN基因表达及与ERK2、p27^{kip1}的相关性

张沛怡, 苏连明, 杜明, 胡立华, 李庆华

■背景资料

PTEN基因作为第一个被发现的具有双重特异性磷酸酶活性的肿瘤抑制基因, 在细胞的生长发育、凋亡、迁移、信号传递等方面起着重要的调控作用, 而且在肿瘤发生发展及转移中均起抑制作用。PTEN作为继p53之后发现的在人类肿瘤中突变率最高的基因, 自1997年发现起就受到众多研究者的关注, 成为研究的热点。

张沛怡, 杜明, 胡立华, 李庆华, 黑龙江省医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150036

苏连明, 牡丹江医学院红旗医院消化内科 黑龙江省牡丹江市 157011

张沛怡, 1982年哈尔滨医科大学医疗系本科毕业, 2003年哈尔滨医科大学病理生理专业硕士研究生毕业, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事消化系统疾病和肝病的研究。

作者贡献分布: 此课题由张沛怡, 苏连明及胡立华设计, 研究过程由张沛怡, 苏连明, 杜明, 胡立华及李庆华操作完成, 研究所用新试剂及分析工具由杜明提供, 数据分析由苏连明, 胡立华完成, 本论文写作由张沛怡, 苏连明及胡立华完成。

通讯作者: 苏连明, 157011, 黑龙江省牡丹江市, 牡丹江医学院红旗医院消化内科, dasulian_1999@163.com

收稿日期: 2007-09-12 修回日期: 2008-01-08

Expression of PTEN and its correlation with ERK2 and p27^{kip1} in colorectal cancer

Pei-Yi Zhang, Lian-Ming Su, Ming Du, Li-Hua Hu, Qing-Hua Li

Pei-Yi Zhang, Ming Du, Li-Hua Hu, Qing-Hua Li, Department of Gastroenterology, Heilongjiang Provincial Hospital, Haerbin 150036, Heilongjiang Province, China
Lian-Ming Su, Department of Gastroenterology, Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Dr. Lian-Ming Su, Department of Gastroenterology, Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China. dasulian_1999@163.com

Received: 2007-09-12 Revised: 2008-01-08

Abstract

AIM: To study the expression of phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (PTEN), ERK2 and p27^{kip1} protein in colorectal cancer, and its correlation with the progression of colorectal cancer.

METHODS: Expressions of PTEN, p27^{kip1} and ERK2 proteins were detected by immunohistochemistry in 40 samples of colorectal cancer tissue, 18 samples of colorectal adenoma tissue and 13 samples of normal colorectal tissue. PTEN protein expression was compared with the clinico-pathologic parameters related to p27^{kip1} and ERK2.

RESULTS: The positive expression rate of PTEN was significantly lower in colorectal

cancer tissue (57.5%) than in colorectal adenoma tissue (72.2%) and normal tissue (100%) ($P < 0.05$). The expression of PTEN was related with the loss of tumor differentiation, lymph node metastasis and Duke's stage ($P < 0.05$). The positive expression rate of ERK2 was higher in colorectal cancer tissue (70.0%) than in colorectal adenoma tissue (61.1%) and normal tissues (23.1%) ($P < 0.05$). The expression of ERK2 increased with lymph node metastasis and Duke's stage. The positive expression rate of p27^{kip1} was lower in colorectal cancer tissue (62.5%) than in colorectal adenoma tissue (77.8%) and normal tissue (100%) ($P < 0.05$), and the expression level of p27^{kip1} was related to lymph node metastasis and Duke's stage ($P < 0.05$). PTEN was negatively correlated with ERK2 ($r = -0.452$, $P < 0.05$). The expression of PTEN was positively related with the expression of p27^{kip1} in colorectal cancer ($r = 0.379$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression level of PTEN protein is closely related to the biological behavior of colorectal cancer. Decreased or deleted PTEN protein expression may be able to inhibit the over-activation of p27^{kip1} and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways, resulting in carcinogenesis, invasion and metastasis.

Key Words: PTEN; ERK2; p27^{kip1}; Colorectal cancer; Protein expression; Immunohistochemistry

Zhang PY, Su LM, Du M, Hu LH, Li QH. Expression of PTEN and its correlation with ERK2 and p27^{kip1} in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 156-162

摘要

目的: 研究结直肠癌中的PTEN、ERK2及p27^{kip1}蛋白的表达及相互关系, 初步探讨他们在结直肠癌发生发展中的生物学意义。

方法: 用免疫组织化学染色快捷法, 检测40例结直肠癌组织、18例结直肠腺瘤、13例结肠正常黏膜中PTEN蛋白、p27^{kip1}和ERK2蛋白的表达, 比较PTEN蛋白表达与临床病理指标的关系, 及其与p27^{kip1}、ERK2蛋白表达的

■同行评议者

王晓艳, 副教授, 中南大学湘雅三医院消化内科; 向德兵, 讲师, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心

相关性.

结果: 结直肠癌组织PTEN, ERK2和p27^{kip1}蛋白表达的阳性率与腺瘤及正常组织间比较差异有显著性(57.5% vs 72.2%, 100%; 70.0% vs 61.1%, 23.1%; 62.5% vs 77.8%, 100%; $P<0.05$); PTEN蛋白表达强度与ERK2蛋白表达强度之间呈负相关($r = -0.452$, $P<0.05$), 与p27蛋白表达强度呈正相关($r = 0.379$, $P<0.05$); PTEN, p27^{kip1}蛋白与结直肠癌分化程度、淋巴结转移及Dukes分期相关($P<0.05$); ERK2蛋白随结直肠癌淋巴结转移、Dukes分期的进展而增高.

结论: 抑癌基因PTEN的表达与结直肠癌生物学行为密切相关; 在结直肠癌发生、发展过程中, 可能由于PTEN蛋白的低表达或失表达抑制p27^{kip1}蛋白表达及Ras/Raf/MEK/ERK信号通路的异常激活, 使细胞发生癌变, 并促进癌变细胞的浸润、转移.

关键词: PTEN; ERK2; p27^{kip1}; 结直肠癌; 蛋白表达; 免疫组织化学

张沛怡, 苏连明, 杜明, 胡立华, 李庆华. 结直肠癌PTEN基因表达及与ERK2、p27^{kip1}的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 156-162

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/156.asp>

0 引言

肿瘤的发生、发展是一个复杂的生物学过程, 有多种基因的共同参与作用, 而细胞周期失控和Ras/Raf/MEK/ERK信号通路的异常激活与肿瘤发生发展密切相关. PTEN(又称MMAC1/TEP1)基因作为第一个被发现的具有双重特异性磷酸酶活性的肿瘤抑制基因, 在细胞的生长发育、凋亡、迁移、信号传递等方面起着重要的调控作用, 而且在肿瘤发生发展及转移中均起抑制作用^[1]. 细胞外信号调节激酶(ERK)级联是细胞内重要的信号转导途径, 他将细胞外刺激传递至细胞核, 参与细胞的生长、发育、分化等一系列生理过程, 其异常表达在细胞的恶性转化和肿瘤的发生发展中起重要作用^[2]. p27^{kip1}是细胞周期G₁期重要的调控因子, p27^{kip1}是G₁期向S期转换的负向调控因子, p27^{kip1}异常表达与肿瘤的发生、发展密切相关, 并认为他是一种肿瘤标志物及预后因子^[3]. PTEN及ERK2、p27^{kip1}蛋白表达在结直肠癌的关系, 国内未见报道. 本文应用免疫组化快捷法检测PTEN及ERK2、p27^{kip1}蛋白表达状况, 探讨他们

在结直肠癌发生、发展中的作用及临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 实验组: 标本均为2006-01/2007-06在黑龙江省医院普外科接受手术治疗的原发性结直肠癌患者石蜡切片, 共40例. 术前均未做化、放疗, 有完整的临床资料. 40例大肠癌患者男28例, 女12例. 年龄37-81(平均年龄63.8)岁. 肿瘤直径为手术切除标本中所测得的肿瘤最大直径; 肿瘤部位: 回盲部3例, 升结肠10例, 横结肠3例, 降结肠4例, 乙状结肠4例, 直肠16例; 淋巴结转移24例, 无淋巴结转移16例; Dukes分期A期7例、B期9例、C期14例、D期10例; 按照WHO大肠腺癌分化程度标准高分化12例, 中分化组19例, 低分化9例. 18例结肠腺瘤及13例正常结肠黏膜标本取自2007-01/2007-06黑龙江省医院消化内科内镜结肠镜下高频电凝电切术的息肉标本, 均经病理证实. 鼠抗人ERK2(浓缩型)mAb购自北京博奥森生物技术公司, 鼠抗人PTEN(即用型)mAb、鼠抗人p27^{kip1}(即用型)mAb、快捷法通用型二抗、氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司.

1.2 方法 取上述存档的石蜡包埋组织块, 制成4 μm厚的连续组织切片. 每份标本行常规HE染色对照.

1.2.1 免疫组化染色: 采用快捷法, 按试剂盒说明书进行. 甲醛溶液固定的石蜡组织切片经二甲苯脱蜡和梯度酒精(分别为1000 mL/L, 900 mL/L, 700 mL/L)脱水后, PTEN、ERK2抗原修复用pH6.0柠檬酸缓冲液微波处理15 min, p27^{kip1}抗原修复用EDTA液(10 mL: 490 mL)微波处理20 min, 室温下自然降温, PBS冲洗3次, 每次3 min(3 min×3)后加入一抗, 于室温下孵育60 min, PBS冲洗后(3 min×3), 滴加二抗, 室温下孵育15 min, PBS冲洗后(3 min×3). 用DAB显色5-10 min, 充分水洗. 苏木素复染、脱水、透明、中性树脂胶封片.

1.2.2 结果判定: 免疫组化染色评分判定: 根据以下3个方面判定^[4]: (1)染色密度评分: 0, 无染色; 1, 弱染色; 2, 中染色; 3, 强染色; (2)阳性细胞百分比评分: 0, 0%; 1, <10%; 2, 10%-50%; 3, 51%-90%; 4, >90%; (3)染色方式评分: 0, 无染色; 1, 散在染色; 2, 局灶染色; 3, 弥漫染色. 每例标本染色积分 = (1)×(2)×(3). 阴性为0分, 阳性为1-36分.

统计学处理 百分率比较用 χ^2 检验和Fisher's

■ 研发前沿

已经证实PTEN基因的表达水平与多数消化系统肿瘤的发生、发展及预后存在相关性, 但其精确作用点、作用机制以及他在消化系统肿瘤发生中的重要性等, 均有待于进一步阐明.

■相关报道

研究发现PTEN在多种肿瘤如胃癌、前列腺癌、乳腺癌等表达下调,并可负调控多种细胞信号传导通路,抑制肿瘤细胞生长。

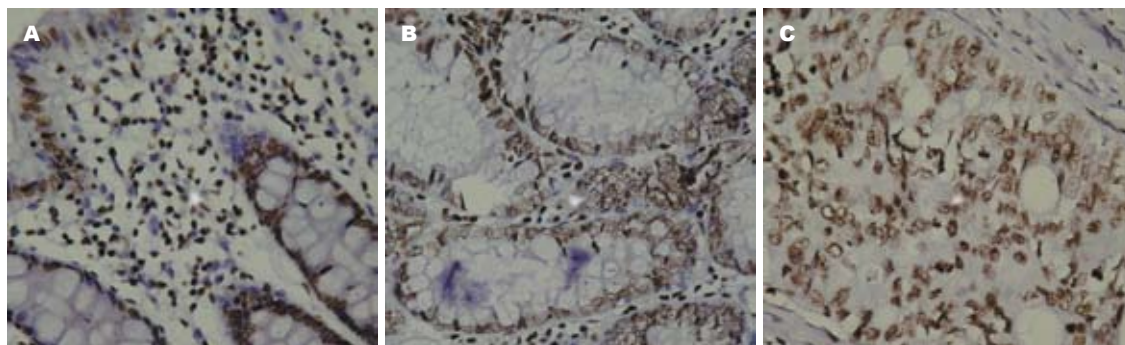


图1 PTEN在组织中的表达(快捷法×400). A: 正常黏膜; B: 腺瘤; C: 结直肠癌。

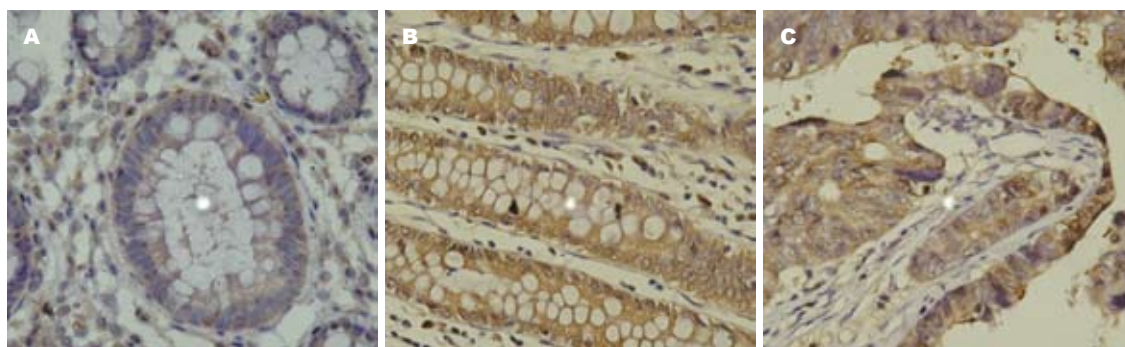


图2 ERK2在组织中的表达(快捷法×400). A: 正常黏膜; B: 腺瘤; C: 结直肠癌。

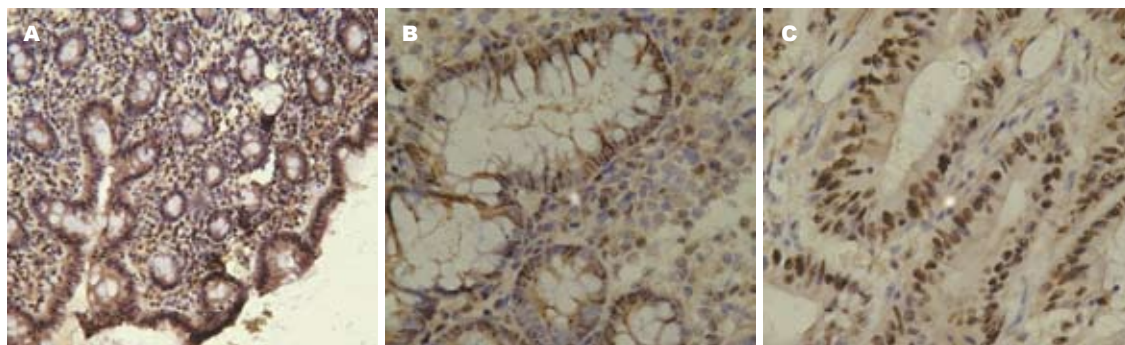


图3 p27^{kip1}在组织中的表达(快捷法×400). A: 正常黏膜; B: 腺瘤; C: 结直肠癌。

精确检验, 相关分析采用Spearman等级相关分析, 所有统计处理均在SPSS10.0统计软件包中完成. 检验标准 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 PTEN、ERK2、及p27^{kip1}在正常黏膜、腺瘤、结直肠癌组织中的表达 PTEN表达主要定位胞核中, 呈棕黄色, 胞质中偶有少量表达(图1). PTEN在正常黏膜、腺瘤、结直肠癌组织中阳性率分别为100%(13/13)、72.2%(13/18)、57.5%(23/40), 组间比较有显著性差异($\chi^2 = 8.40$, $P < 0.05$, 表1), 即PTEN在结直肠癌组织中表达减低. ERK2表达定位于胞质中, 呈棕黄色, 胞核中无表达(图2), ERK2在正常黏膜、腺瘤、

结直肠癌组织中阳性率分别为23.1%(3/13)、61.1%(11/18)、70.0%(28/40), 组间比较有显著性差异($\chi^2 = 8.98$, $P < 0.05$, 表1), 即ERK2在结直肠癌组织中表达升高. p27^{kip1}表达主要定位胞核中, 呈棕黄色, 胞质中亦有少量表达(图3), p27^{kip1}在正常黏膜、腺瘤、结直肠癌组织中阳性率分别为100%(13/13)、77.8%(14/18)、62.5%(25/40), 组间比较有显著性差异($\chi^2 = 7.29$, $P < 0.05$, 表1), 即p27^{kip1}在结直肠癌组织中表达减低。

2.2 PTEN、ERK2及p27^{kip1}表达与结直肠癌临床病理因素的关系 本组40例结直肠癌的PTEN、ERK2及p27^{kip1}蛋白表达随组织病理分化程度, 侵袭转移性高低不同而表现不同的阳性率。

表 1 正常黏膜、腺瘤、结直肠癌中PTEN、ERK2及p27^{kip1}的表达

组织类型	n	PTEN		ERK2		p27 ^{kip1}	
		-	+(%)	-	+(%)	-	+(%)
正常肠黏膜	13	0	13(100)	10	3(23.1)	0	13(100)
结肠腺瘤	18	5	13(72.2)	7	11(61.1)	4	14(77.8)
结直肠癌	40	17	23(57.5)	12	28(70.0)	15	25(62.5)

表 2 PTEN、ERK2、p27^{kip1}表达与结直肠癌临床病理因素关系

临床病理学特征		n	PTEN		χ^2 P	ERK2		χ^2 P	p27 ^{kip1}		χ^2 P
			-	+(%)		-	+(%)		-	+(%)	
性别	男	28	13	15(53.6)	0.59	10	18(64.3)	0.69	9	19(67.9)	0.51
	女	12	4	8(66.7)	>0.05	2	10(83.3)	>0.05	6	6(50.0)	>0.05
年龄	≥60	22	12	10(44.5)	2.90	9	13(59.1)	2.77	8	14(63.6)	2.69
	<60	18	5	13(72.2)	>0.05	3	15(83.3)	>0.05	7	11(61.1)	>0.05
肿瘤大小	≥5 cm	23	8	15(65.2)	1.31	6	17(73.9)	0.39	9	14(60.9)	0.06
	<5 cm	17	9	8(42.1)	>0.05	6	11(64.7)	>0.05	6	11(64.7)	>0.05
肿瘤位置	右半结肠	15	6	9(60.0)	2.79	6	9(60.0)	3.94	7	8(53.3)	3.48
	左半结肠	9	2	7(77.8)		4	5(55.6)		1	8(88.9)	
	直肠	16	9	7(43.8)	>0.05	2	14(87.5)	>0.05	7	9(56.3)	>0.05
Dukes分期	A	7	1	6(85.7)	9.55	5	1(14.3)	13.95	1	6(85.7)	10.69
	B	9	2	7(77.8)		3	6(66.7)		2	7(77.8)	
	C	14	6	8(57.1)		3	12(85.7)		4	10(71.4)	
	D	10	8	2(20.0)	<0.05	1	9(90.0)	<0.05	8	2(20.0)	<0.05
肿瘤分化程度	高分化	12	3	9(75.0)	6.34	2	10(83.3)	2.60	2	10(83.3)	8.74
	中分化	19	7	12(63.2)		8	11(57.9)		6	13(68.4)	
	低分化	9	7	2(22.2)	<0.05	2	7(77.8)	>0.05	7	2(22.2)	<0.05
淋巴结转移	无转移	16	3	13(81.2)	6.16	9	7(43.8)	6.79	3	13(81.2)	4.00
	有转移	24	14	10(41.7)	<0.05	3	21(87.5)	<0.05	12	12(50.0)	<0.05

表 3 ERK2和p27^{kip1}与PTEN蛋白表达在结直肠癌组织中的相关性

PTEN	ERK2		p27 ^{kip1}		合计
	-	+	-	+	
-	1	16	10	7	17
+	11	12	5	18	23
合计	12	28	15	15	40

PTEN、p27^{kip1}蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置间差异均无显著性,与Dukes分期、分化程度、淋巴结转移相关($P<0.05$). ERK2蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置及肿瘤分化程度间差异均无显著性,与Dukes分期、淋巴结转移相关($P<0.05$,表2).

2.3 PTEN和ERK2蛋白表达在结直肠癌组织中的相关性 统计学分析表明,结直肠癌组织PTEN蛋白表达与ERK2蛋白表达呈负相关($r = -0.452$,

$P<0.05$), PTEN蛋白表达随着结直肠癌淋巴结转移及Dukes分期的进展降低,而ERK2蛋白表达则增高,反之亦然(表3).

2.4 PTEN和p27^{kip1}蛋白表达在结直肠癌组织中的相关性 统计学分析表明,结直肠癌组织PTEN蛋白表达与p27^{kip1}蛋白表达呈正相关($r = 0.379$, $P<0.05$), PTEN蛋白表达与p27^{kip1}蛋白表达都随着结直肠癌分化程度、淋巴结转移及Dukes分期的进展降低, PTEN与p27^{kip1}蛋白表达呈同向趋势(表3).

3 讨论

目前研究认为,结直肠癌的发生、发展是多因素、多阶段、多因子的复杂过程,在此过程中癌基因的激活与抑癌基因的丢失或表达失调是其重要特征. 抑癌基因PTEN是1997年Steck *et al* 3个研究小组分别发现并命名的第1个具有磷酸酯酶活性的抑癌基因. 该基因定位于染色

■创新盘点

本文检测了抑癌基因PTEN在结肠癌中的表达,观察其与结肠癌临床病理因素的关系及与p27、ERK2蛋白表达的相关性,探讨PTEN基因在结肠癌发生发展过程中的作用.

■应用要点

PTEN的抑癌功能及调节细胞信号转导通路的功能可被引入肿瘤的基因治疗,从而使人工调节PTEN水平及干涉其作用通路成为治疗肿瘤的新的有效方法。

体10q23.3上,其主要结构功能区位于N端,是由403个氨基酸组成的一条多肽链,具有与细胞张力蛋白和辅助蛋白同源的序列,其编码的蛋白具有蛋白性磷酸酯酶活性和脂性磷酸酯酶活性,参与细胞生长调节,并在肿瘤细胞浸润、血管发生及肿瘤转移中起一定作用^[5]。大多数研究表明,在人类许多恶性肿瘤细胞中存在PTEN的杂合性丢失(LOH),并与肿瘤进展有关^[6]。本研究结果显示,正常黏膜、腺瘤组PTEN阳性率显著高于结直肠癌组织中的阳性率($P<0.05$),提示PTEN蛋白的表达异常可能参与结直肠黏膜恶性转化过程。结合本组结直肠癌临床病理学资料分析发现,PTEN蛋白表达与结直肠癌许多病理参数都有很强的相关性。同时本组研究显示PTEN蛋白的表达与癌组织分化程度、淋巴结转移及Dukes分期密切相关($P<0.05$),以上结果表明在高侵袭性、高转移性的结直肠癌PTEN的表达明显降低甚至无表达,由此提示PTEN表达的下调可能是肿瘤的侵袭程度和转移增加的原因,对结直肠癌的发展起促进作用,在一定程度上反映了结直肠癌细胞的侵袭和转移能力等生物学行为特征。

细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)中一条主要的和经典的并且与人类癌症关系最为密切的途径,定位于1号染色体。1990年, Boulton *et al*^[7]分离鉴定了一种蛋白激酶的C-DNA序列,并证实多种细胞外信号均可激活该蛋白激酶,因此将其命名为细胞外信号调节激酶1(ERK1),分子量为44 kDa。1991年, Boulton *et al*^[8]又鉴定了大鼠ERK亚家族的一个主要成员ERK2,分子量为42 kDa。实验证实ERK1和ERK2的氨基酸序列有90%相同,且在体外作用底物相同,提示二者有功能上的重叠^[9]。ERK信号级联是迄今为止研究最为透彻的一条信号转导通路,是一种保守的丝/苏氨酸蛋白激酶,广泛存在人类的多种细胞。许多生长因子、细胞素、激素及介导有丝分裂、分化的信号均可激活ERK,使其发生磷酸化而活化,进而调节细胞周期、分化,并且具有抵抗细胞凋亡的作用,能将多种细胞外信号通过磷酸化的活化方式逐级传递至细胞核,最终对细胞的增殖、分化和凋亡产生影响^[10]。本实验研究发现,ERK2蛋白表达在结直肠癌中最高,其次为结直肠腺瘤,正常黏膜组

组织中最低($P<0.05$),提示ERK2与结直肠癌的发生有关。本实验数据表明ERK2蛋白表达与结直肠癌的Dukes分期,淋巴结转移均显著有关($P<0.05$),提示ERK2过量表达与肿瘤分期、侵袭性密切相关。

p27^{kip1}是Polyak *et al*^[11]于1994年发现的新的CKI基因(细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, cyclin-dependent kinase inhibitors), CKI定位于12p12-12p13.1交界处,包含两个有编码功能的外显子和一个无功能的外显子及一个内含子, p27^{kip1} cDNA具有编码198个氨基酸组成的蛋白质。p27^{kip1}蛋白是高度保守的蛋白分子,研究发现p27^{kip1}蛋白具有多种生物学功能,他可直接抑制Cyclin-CDK(细胞周期素-细胞周期蛋白依赖性激酶)复合物的生物学活性从而阻止细胞通过G₁/S期转换的“关卡”,同时还可以作为细胞外刺激信号的潜在媒介来调控细胞周期。p27^{kip1}对靶分子的作用发生于细胞核内, p27^{kip1}在胞浆内的异常定位可导致p27^{kip1}失活及降解增加^[12-13]。本实验研究发现, p27^{kip1}在正常结直肠黏膜中的表达率为100.0%(10/10),在结肠腺瘤中为77.8%(14/18);而在结直肠癌中表达率为62.5%(25/40)($P<0.05$);显示p27^{kip1}蛋白表达下降与结直肠癌的发生有关,提示p27^{kip1}在结直肠癌的发生中可能起重要作用。本实验研究亦发现p27^{kip1}蛋白表达与结直肠癌的分化程度、Dukes分期、淋巴结转移均显著有关($P<0.05$)。p27^{kip1}蛋白水平在低分化、有淋巴结转移时降低,提示p27^{kip1}蛋白表达率降低的结直肠癌更易发生淋巴结及远处转移和肌层浸润, p27^{kip1}蛋白表达与肿瘤的恶性程度负相关。

结直肠癌组织中PTEN与ERK2蛋白表达的相关性及意义:文献报道PTEN可负调控多种细胞信号转导通路^[14-15],从而调节正常细胞的生长发育及抑制肿瘤的发生发展,然而目前对其研究多集中在:(1)通过使PIP3去磷酸化负调控PIP3/Akt途径调节细胞的增殖与凋亡平衡;(2)通过对局灶黏附激酶(FAK)的去磷酸化,负调控FAK-P130通路。但关于PTEN蛋白对ERK所介导的信号级联的调节尚有分歧, Tamura *et al*^[15]认为PTEN蛋白可阻断整合素、表皮生长因子(EGF)和血小板源性生长因子(PDGF)介导的ERK通路的活化,从而抑制细胞的增殖和迁移。但Davies *et al*^[16]发现,在表皮生长因子(EGF)刺激的胶质瘤细胞系U251中表达的PTEN蛋白并不能抑制

ERK磷酸化. 本实验结果显示: 在正常黏膜->增生->息肉->腺瘤->不典型增生->结肠癌的发生过程中, PTEN阳性表达率呈递减趋势, 而ERK2蛋白表达呈升高趋势; PTEN与ERK2之间表达呈负相关关系, 提示ERK2的上调和PTEN的下调在结直肠癌的发生、发展和转移过程中起着重要的作用. 可能是由于PTEN低表达不能有效抑制ERK信号通路的异常激活, 使细胞异常增殖并恶性转化. 因此, 联合检测PTEN和ERK2的表达对评估结直肠癌的发生发展具有重要意义, 可作为判断结直肠癌病理生物学行为和预后的参考指标. 同时, 我们推测, 通过磷酸酶激活剂或酪氨酸酶抑制剂, 阻断ERK信号通路的异常激活, 抑制细胞异常增殖及肿瘤转移, 将可能成为未来治疗结直肠癌的方向.

结直肠癌组织中PTEN与p27^{kip1}蛋白表达的相关性及意义: 本文研究显示, PTEN与p27^{kip1}均对细胞增殖起负性调控作用, 推测两者在肿瘤发生中具有相关性, p27^{kip1}可能是PTEN所调控的重要的下游分子, PTEN通过使p27^{kip1}去磷酸化, 从而降低其在细胞中的分解代谢水平. 因此, 当PTEN表达缺失时p27^{kip1}也表达下降. Gottschalk *et al*^[17]用腺病毒PTEN转染神经胶质瘤细胞后, p27^{kip1}表达明显增高. 进一步用p27^{kip1}反义寡核苷酸阻断p27^{kip1}蛋白产物后, PTEN对细胞增殖的抑制作用明显降低. 说明p27^{kip1}是PTEN发挥抑癌作用的关键调节因子. 但根据 Kurose *et al*^[18]报道, 人卵巢癌中PTEN表达与p27^{kip1}表达并无相关性, 提示, 在体内外, 不同组织的PTEN基因调控机制和下游通路等可能存在着差异. 本实验研究结果发现, 结直肠癌中PTEN表达与p27^{kip1}表达呈正相关, 因此, 检测结直肠癌组织中PTEN, p27^{kip1}两者表达状况有助于估计预后, 从而在术后进行生物免疫治疗、介入治疗的综合治疗, 以提高患者的生存率与生存质量, 同时为肿瘤的诊断、判断生物学行为及预后提供更可靠的依据. 本研究显示, PTEN表达与ERK2、p27^{kip1}蛋白表达之间存在明显相关性, 由此提示, PTEN对结直肠癌作用可能是通过ERK2、p27^{kip1}来影响结直肠癌的发生、发展.

4 参考文献

- 1 Pennisi E. New tumor suppressor found--twice. *Science* 1997; 275: 1876-1878
- 2 Webb CP, Van Aelst L, Wigler MH, Woude GF. Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity

- and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 8773-8778
- 3 Palmqvist R, Stenling R, Oberg A, Landberg G. Prognostic significance of p27(Kip1) expression in colorectal cancer: a clinico-pathological characterization. *J Pathol* 1999; 188: 18-23
- 4 Dong M, Nio Y, Sato Y, Tamura K, Song MM, Tian YL, Dong YT. Comparative study of p53 expression in primary invasive ductal carcinoma of the pancreas between Chinese and Japanese. *Pancreas* 1998; 17: 229-237
- 5 Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15: 356-362
- 6 Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res* 1997; 57: 4187-4190
- 7 Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 1990; 249: 64-67
- 8 Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65: 663-675
- 9 Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 1996; 74: 589-607
- 10 Zhan Y, Kim S, Izumi Y, Izumiya Y, Nakao T, Miyazaki H, Iwao H. Role of JNK, p38, and ERK in platelet-derived growth factor-induced vascular proliferation, migration, and gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 795-801
- 11 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66
- 12 Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002; 8: 1153-1160
- 13 Tsuzuki H, Fujieda S, Sunaga H, Narita N, Tokuriki M, Saito H. Expression of p27 and apoptosis in oral leukoplakia. *Anticancer Res* 2003; 23: 1265-1270
- 14 Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 2003; 22: 3113-3122
- 15 Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998; 280: 1614-1617
- 16 Davies MA, Lu Y, Sano T, Fang X, Tang P, LaPushin R, Koul D, Bookstein R, Stokoe D, Yung WK, Mills

■名词解释

PTEN: 与细胞骨架蛋白Tensin同源, 在第10号染色体有缺失的磷酸酯酶, 亦称在多个进展期肿瘤中均有突变的基因1或称能被TGF-β1(转移生长因子β1-transforming growth factor β1)调节并在上皮细胞富含的磷酸酶.

■同行评价

本文设计基本合理, 结果可靠, 有一定的新颖性, 具有一定临床应用价值.

- GB, Steck PA. Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res* 1998; 58: 5285-5290
- 17 Gottschalk AR, Basila D, Wong M, Dean NM, Brandts CH, Stokoe D, Haas-Kogan DA. p27Kip1 is required for PTEN-induced G1 growth arrest. *Cancer Res* 2001; 61: 2105-2111
- 18 Kurose K, Zhou XP, Araki T, Cannistra SA, Maher ER, Eng C. Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. *Am J Pathol* 2001; 158: 2097-2106

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1) 酝酿和设计实验; (2) 采集数据; (3) 分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1) 起草文章; (2) 对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1) 统计分析; (2) 获取研究经费; (3) 行政、技术或材料支持; (4) 指导; (5) 支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WCJD 和 WJG 即将开始实行网络版文章 与该文章发表前纪录的链接

本刊讯 WCJD和WJG即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文. 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

重组减毒沙门氏菌疫苗SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)抗小鼠大肠癌的生长

董坚, 陈明清, 杨军, 王熙才, 伍治平, 陈艳, 王志强, 李淼

董坚, 昆明医学院第一附属医院生物治疗科 云南省昆明市 650032

陈明清, 杨军, 王志强, 李淼, 昆明医学院第一附属医院肿瘤科 云南省昆明市 650032

王熙才, 伍治平, 陈艳, 昆明医学院第三附属医院肿瘤研究所 云南省昆明市 650118

陈明清, 1982年中山医科大学本科毕业, 1988年昆明医学院硕士研究生毕业, 2005年昆明医学院博士研究生毕业, 教授, 主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究工作。

云南省自然科学基金资助项目, No. 2005C0073M

昆明医学院创新群体基金资助项目, No. KMC2005DG01

作者贡献分布: 陈明清、董坚及王熙才对此文所作贡献均等; 此课题由陈明清、董坚以及王熙才设计; 研究过程由董坚, 陈明清, 杨军, 王熙才, 伍治平, 陈艳, 王志强, 李淼操作完成; 数据分析由董坚, 陈明清, 杨军完成; 本论文写作由董坚, 陈明清以及杨军完成。

通讯作者: 陈明清, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院肿瘤科, yougjen@yahoo.com.cn

电话: 0871-5361621 传真: 0871-5361621

收稿日期: 2007-07-18 修回日期: 2007-12-18

Recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4) inhibits growth of colorectal cancer in BALB/c mice

Jian Dong, Ming-Qing Chen, Jun Yang, Xi-Cai Wang, Zhi-Ping Wu, Yan Chen, Zhi-Qiang Wang, Miao Li

Jian Dong, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Ming-Qing Chen, Jun Yang, Zhi-Qiang Wang, Miao Li, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Xi-Cai Wang, Zhi-Ping Wu, Yan Chen, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650118, Yunnan province, China

Supported by: the Natural Science Fund of Yunnan Province, No. 2005C0073M and the Inaugurate Colony Research Fund of Kunming Medical College, No. KMC2005DG01

Correspondence to: Dr. Ming-Qing Chen, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. yougjen@yahoo.com.cn

Received: 2007-07-18 Revised: 2007-12-18

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of extracellular 1-4 segments of VEGFR2 on tumor growth.

METHODS: Oral DNA vaccine SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4) was developed and BALB/c mice were immunized with vaccine encoding flk-1_(n1-4) via gastrogavage. BALB/c mice receiving SL3261-pcDNA3.1+ or 10% NaHCO₃ via gastrogavage were used as vector control and NaHCO₃ group. Serum levels of VEGF and specific anti-flk-1_(n1-4)-IgG antibody were measured by ELISA. The subset of lympholeukocytes was analyzed by flow cytometry. Mouse models of CT-26 adenocarcinoma of colon were treated with SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4) through gastrogavage. Tumor diameter and weight were measured, microvessel density (MVD) in the tumor tissue was detected by immunohistochemistry, and the survival time of mice was also investigated.

RESULTS: The serum level of VEGF in the vaccine group was significantly lower than that in the control group. All mice immunized with the DNA vaccine had a high level of anti-flk-1_(n1-4)-IgG, and showed strong activities against flk-1_(n1-4). After inoculation of CT-26 cells, the number of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells was obviously greater in the vaccine group than in the control group. Tumor weight and diameter as well as MVD were significantly lower in the vaccine group than in the vector and NaHCO₃ control groups (3.64 ± 1.34 g vs 8.40 ± 0.66 g, 8.26 ± 0.44 g; 2.62 ± 0.54 mm³ vs 6.01 ± 0.14 mm³, 5.92 ± 0.25 mm³; 2.06 ± 1.02 vs 6.93 ± 2.34 , 7.34 ± 4.12 ; $P < 0.05$). The survival time of mice was longer in the vaccine group than in the control group.

CONCLUSION: The extracellular 1-4 segments of VEGFR2 can inhibit the growth of tumor by suppressing the growth of its endothelial cells.

Key Words: Vascular endothelial growth factor receptor 2; Extracellular region; Anti-angiogenesis; Colorectal cancer

Dong J, Chen MQ, Yang J, Wang XC, Wu ZP, Chen Y, Wang ZQ, Li M. Recombinant attenuated *Salmonella*

■背景资料

VEGF与其受体flk-1的相互作用, 在肿瘤周围血管形成过程中起到关键作用. 肿瘤细胞分泌大量的VEGF, 通过作用于内皮细胞上相应的跨膜受体, 引起内皮细胞的增殖和血管形成. 可溶性受体为VEGFR胞外不同大小的片段, 仅具有与其配体VEGF相结合的能力, 而无信号传导功能, 因此可竞争VEGF的功能受体, 阻止肿瘤血管的形成, 进而抑制肿瘤生长. 因此, 利用可溶性受体阻断VEGF与相应受体的结合, 在目前抗肿瘤血管形成的研究中倍受关注.

■同行评议者

陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

■相关报道

研究发现,采用基因重组的方法可以诱导可溶性受体的产生,由于可溶性受体(sVEGFR)仅具有与VEGF结合的能力,而无信号传导功能。因此可用sVEGFR竞争性结合VEGF, sVEGFR与VEGF结合后,耗竭肿瘤细胞产生的VEGF,从而抑制VEGF诱导的生物学活性,阻断VEGF与VEGFR2的结合,达到抑制肿瘤生长的目的。Niethammer *et al*将VEGFR2全长cDNA序列插入真核载体pcDNA3.1(+)构建重组质粒,再将重组质粒转化减毒沙门氏菌SL7207,通过胃饲小鼠,研究发现其对于实体瘤血管生成以及肿瘤生长有明显抑制作用。

typhimurium vaccine SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4) inhibits growth of colorectal cancer in BALB/c mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(2): 163-170

摘要

目的: 研究VEGFR2胞外1-4片段(fl k-1_(n1-4))抑制肿瘤生长效应。

方法: 构建DNA疫苗SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4), 经ig饲服BALB/c小鼠, 随机分为3组, 疫苗组, 载体对照组和NaHCO₃对照组。对小鼠进行基因免疫。ELISA检测小鼠血清中VEGF水平及特异性抗flk-1_(n1-4)-IgG抗体。流式细胞仪分析免疫小鼠淋巴细胞亚群。DNA疫苗免疫结肠癌荷瘤BALB/c小鼠, 测量免疫后荷瘤小鼠肿瘤大小, 检测肿瘤微血管密度。

结果: 免疫小鼠血清中VEGF水平明显降低, 并产生高水平的抗flk-1_(n1-4)-IgG抗体。免疫后荷瘤小鼠CD4⁺ T、CD8⁺ T值维持较高水平, 小鼠结肠腺癌皮下肿瘤生长与载体和NaHCO₃对照组相比明显受抑制, 疫苗组小鼠肿瘤质量、体积、平均微血管密度与载体和NaHCO₃对照组相比明显降低(3.64 ± 1.34 g vs 8.40 ± 0.66 g, 8.26 ± 0.44 g; 2.62 ± 0.54 mm³ vs 6.01 ± 0.14 mm³, 5.92 ± 0.25 mm³; 2.06 ± 1.02 vs 6.93 ± 2.34, 7.34 ± 4.12; *P* < 0.05)。疫苗组小鼠中位生存期较两对照组明显延长。

结论: flk-1_(n1-4)能够抑制肿瘤血管内皮细胞生长, 达到抗大肠癌生长作用。

关键词: 血管内皮细胞生长因子受体2; 胞外片段; 抗血管生成; 结肠癌

董坚, 陈明清, 杨军, 王熙才, 伍治平, 陈艳, 王志强, 李淼. 重组减毒沙门氏菌疫苗SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)抗小鼠大肠癌的生长. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 163-170

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/163.asp>

0 引言

VEGF/VEGFR2信号传导通路被证实在肿瘤血管生成过程中起关键性作用, 阻断该信号传导通路, 可达到抑制肿瘤生长和转移的目的^[1-4]。VEGFR2(血管内皮生长因子受体-2, flk-1)分子结构分为胞外段、跨膜段和胞内段, 其胞外段含7个免疫球蛋白样域^[5]。研究证实, VEGFR2胞外段是与VEGF相结合的部位, VEGFR2胞外第1样是与VEGF结合的必须部位, 第2-3样是与VEGF紧密结合的主要部位, 受体通过第4个Ig样

区形成同源二聚体的活性形式^[6], 而第5-7样与VEGF结合的关系不密切。以VEGFR2信号通路作为靶点构建的DNA疫苗药物不仅具有较高的疗效, 而且疫苗制备容易, 成本低^[7]。

已有研究所证实, 重组减毒胞内菌尤其是减毒沙门氏菌可用于DNA疫苗载体运送和表达外源蛋白抗原, 并且效果显著^[8]。减毒沙门氏菌主要通过将DNA疫苗直接呈送给抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC), 激活机体的细胞免疫和体液免疫, 诱发免疫记忆, 发挥免疫效果^[9]; 另外, 载体菌本身还可作为免疫佐剂, 加强免疫效果^[10]。

目前以VEGFR2进行抗肿瘤血管生成的研究主要集中在使用VEGFR2全长cDNA序列作为基因治疗靶标^[11-13], 本实验室已完成VEGFR2胞外全长片段的重组减毒沙门氏菌疫苗SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-7)^[14]的构建, 动物实验观察发现该疫苗有明显的抗肿瘤血管生成的效果。但仍存在分子质量较大, 转录过程中碱基错配发生机率高, 不利于蛋白质的正确表达, 不容易插入真核表达载体, 还可能诱发其他非血管抑制的功能问题。为了寻求能够与配体VEGF结合、同时分子质量又较小的可溶性flk-1功能域, 我们利用RT-PCR技术, 从BALB/c孕鼠胎盘中扩增出1248 bp的flk-1胞外第1-4样基因片段, 插入真核表达质粒载体pcDNA3.1(+), 构建重组质粒pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4), 重组质粒转化减毒沙门氏菌SL3261, 制备成抗大肠癌血管生成DNA疫苗SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4), 观察VEGFR2胞外1-4样作为目的基因抗小鼠大肠癌血管生成效应。该小片段目的基因已包含能与配体VEGF紧密结合的功能区域, 并具有分子质量较小, 转录过程中碱基错配发生机率小, 易于在真核细胞内进行蛋白的表达, 容易插入真核表达载体, 主要发挥抑制血管生成的作用, 同时具有与胞外全长片段相同的免疫原性等优点。本文旨在研究VEGFR2胞外段1-4样DNA序列作为基因疫苗抑制大肠癌皮下肿瘤生长的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级BALB/c小鼠购自昆明医学院动物中心, ♀, 4-6周龄。减毒沙门氏菌SL3261(芳香族氨基酸营养缺陷菌株)由英国帝国理工医学院S.J.Dunstan博士和山东大学医学院分子生物学实验室卞继峰副教授惠赠, pcDNA3.1(+)

质粒, TRIzol Reagent以及lipofectamine 2000购自Invitrogen公司; COS-7细胞株以及CT-26细胞株分别购自GIBCO公司和ATCC公司. RT-PCR扩增VEGFR2胞外1-4袢上游引物为: 5'-CCGGTACCATGGAGAGCAAGGCGC-3', 下游引物为: 5'-GCTCTAGATTAAGAGACCATGTGGCTCTG-3', 由上海博亚公司合成. CMV启动子上游引物为: 5'-CCCAGTACATGACCTTATGGG-3', 下游引物为: 5'-GGAGACTTGGAAATCCCCGT-3'^[15], 由上海捷瑞生物公司合成. One Step RT-PCR Kit购自Qiagen公司; Immun-Blot TM PVDF膜及蛋白质分子质量标准购自Bio-RAD公司, 限制性内切酶*Xba* I、*Kpn* I等购自大连宝生物公司; 小鼠VEGF细胞因子检测ELISA试剂盒购自晶美公司. OMEGA质粒小提试剂盒购自OMEGA公司, 山羊抗小鼠VEGFR2胞外段多克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊IgG, 以及DAB试剂盒为R&D公司产品. 通用基因组DNA快速提取试剂盒购自上海捷瑞生物公司.

1.2 方法

1.2.1 真核表达质粒pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)的构建: 取BALB/c14 d孕鼠胎盘, 匀浆后用TRIzol提取总RNA, 总RNA经RT-PCR法扩增出一段1.2 kb的VEGFR2胞外片段, 将其定向插入pcDNA3.1(+)载体的限制性酶切位点*Xba* I和*Kpn* I之间, 构建成重组质粒pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4).

1.2.2 真核表达质粒转染COS-7细胞及表达产物的检测: 接种 5×10^4 生长状态良好的COS-7细胞于24孔板的各孔, 在含有100 mL/L FBS的DMEM培养基中于37℃, 50 mL/L CO₂培养箱培养过夜, 分别设立转染pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)和空白对照两个组, 每个组设3个复孔. 将配好的转染混合物(100 μL OPTI-DMEM中加入5 μL脂质体, 2 μg待转质粒, 混匀; 室温放置15 min)逐滴加入待转细胞中, 轻轻混匀. 于37℃, 50 mL/L CO₂培养箱培养5 h后每孔加入0.2 mL含100 mL/L血清DMEM培养基, 培养48 h后收集COS-7细胞, 裂解细胞后取上清用于Western blot检测.

1.2.3 携带目的基因的重组减毒沙门氏菌的制备: 采用氯化钙法^[16]将重组质粒pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)导入感受态减毒沙门氏菌SL3261中, 分别设立转化pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)、pcDNA3.1(+)和空白对照3个组. 将重组疫苗菌SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)接种于3 mL含有氨苄青霉素的LB液体培养基中振荡过夜, 次日取1 mL菌液加入50 mL含有氨苄青霉素的LB

液体培养基中, 3 h后收集菌体, 用生理盐水清洗后, 用10% NaHCO₃溶液悬浮, 调整细菌浓度为 1×10^{12} cfu/L.

1.2.4 疫苗的免疫及肿瘤细胞的接种: 取30只BALB/c小鼠随机分为3组, 每组10只. 疫苗组: 灌胃饲服携带pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)的减毒沙门氏菌0.1 mL每周1次, 共3次; 载体对照组: 灌胃饲服携带质粒pcDNA3.1(+)的减毒沙门氏菌0.1 mL, 每周一次, 共三次; NaHCO₃对照组: 灌胃饲服10% NaHCO₃ 0.1 mL, 每周1次, 共3次. 常规培养CT-26小鼠结肠腺癌细胞, 在*po*免疫2 wk以后, 各组BALB/c小鼠右侧腋窝皮下接种 1×10^6 个CT-26小鼠结肠腺癌细胞. 另外取24只BALB/c小鼠随机分为3组, 每组8只, 分组及操作同上, 接种肿瘤细胞以后观察各组小鼠的生存时间, 监测小鼠体质量及肿瘤体积变化.

1.2.5 小鼠体内减毒沙门氏菌分布、体内VEGF水平和基因组中真核表达载体的检测: 最后一次免疫后2 wk在无菌条件下从各组小鼠随机挑选2只取出肝脏, 脾脏, 小肠以及大肠, 切成约1 mm×1 mm×1 mm大小, 固定后透射电镜下查找沙门氏菌, 剩余组织液氮冻存储备用. 取出液氮冻存的免疫组小鼠的肝脏、脾脏、小肠、结肠, 分别提取基因组DNA进行PCR反应. 反应条件为: 94℃变性30 s, 55℃复性30 s, 72℃延长45 s, 一共进行30个循环, 72℃延长10 min^[17]. 扩增片段于5 g/L琼脂糖凝胶电泳. 各组小鼠最后一次*po*免疫后2 wk、接种肿瘤2 wk后及处死前各采血一次, 离心收集上清液, 用抗小鼠VEGF单抗包被于酶标板, 加入生物素化抗小鼠VEGF抗体和辣根过氧化物酶标记的亲合素, 加入显色剂后于酶标仪测吸光度(A_{450})值显示小鼠血清VEGF水平.

1.2.6 小鼠外周血中抗pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)抗体的检测和淋巴细胞亚群分析: 在小鼠最后一次免疫后2 wk、接种肿瘤2 wk以后以及在处死以前各采血一次, 采用ELISA直接法, 以mVEGFR2多克隆抗体包被酶标板, 以HRP标记的羊抗小鼠IgG抗体作为第二抗体, 酶标仪测得吸光度(A_{480})值显示抗体水平. 每组小鼠最后一次*po*免疫后2 wk、接种肿瘤2 wk后及处死前各采血100 μL并抗凝处理, 流式细胞仪对每组小鼠的CD4⁺ T和CD8⁺ T计数.

1.2.7 口服疫苗抑制小鼠皮下肿瘤的作用: 接种肿瘤后第32天, 10% NaHCO₃对照组第一只小鼠出现死亡, 引颈处死所有小鼠, 取各组小鼠皮下

■创新盘点

本文将VEGFR2胞外1-4片段插入质粒pcDNA3.1(+), 转化减毒沙门氏菌SL3261后成功构建小鼠*po*基因工程疫苗SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4), 结果发现该疫苗对于小鼠皮下肿瘤的生长有明显的抑制作用, 并能够显著延长荷瘤小鼠的生存时间. 本研究结果为*po* DNA疫苗抗小鼠结肠腺癌的研究提供了强有力的支持.

应用要点

本文为小片段克隆合成并制备成为更为安全的DNA疫苗提供了新的思路,同时为以后抗血管生成策略应用于肿瘤的临治疗提供可靠的依据。

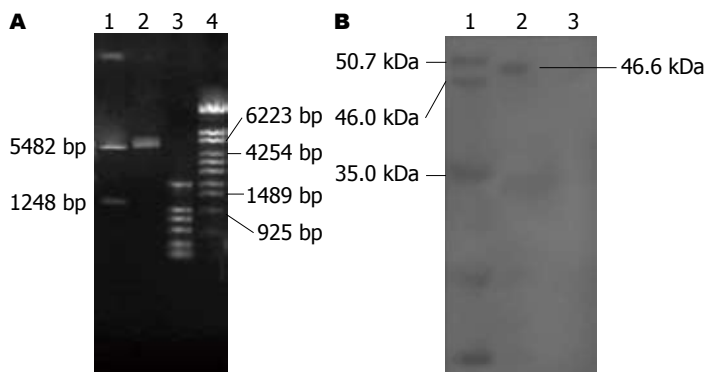


图1 重组质粒酶切电泳鉴定及Western blot检测COS-7细胞pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)表达产物。A: 1. *Kpn* I和*Xba* I双酶切的重组质粒pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4); 2. *Kpn* I和*Xba* I双酶切的空质粒pcDNA3.1(+); 3. DNA Marker 2 kDa; 4. λ -EcoT 14 I digest DNA Marker; B: 1. 蛋白质分子质量标准; 2. 重组质粒pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)在COS-7细胞中的蛋白质表达; 3. 空白对照。

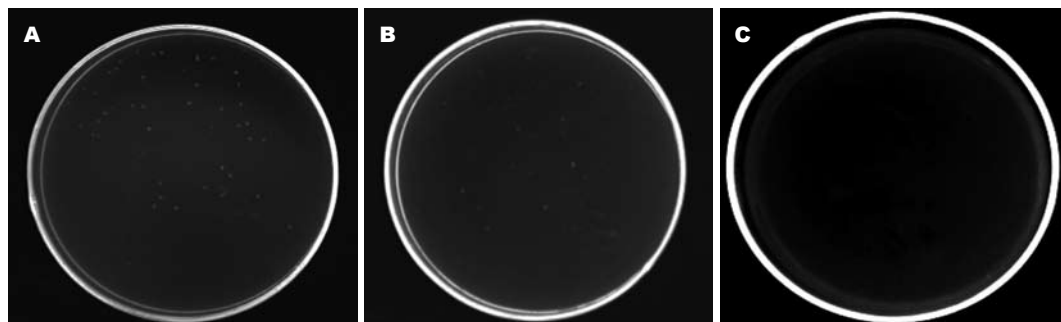


图2 重组减毒沙门氏菌疫苗SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)。A: 重组疫苗菌SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4); B: 质粒pcDNA3.1(+)转化减毒沙门氏菌SL3261; C: 阴性对照。

肿瘤组织,称质量,测量肿瘤体积,免疫组化测定微血管密度。微血管密度判定标准^[18]:每张切片在低倍镜($\times 100$)下确定肿瘤内5个血管密集区,再在高倍镜($\times 200$)下计数每个密集区中一个视野的微血管数,以5个区域微血管数的平均数作为微血管密度(microvessels density, MVD),在高倍镜($\times 400$)下拍照。

统计学处理 计量数据以mean \pm SD表示,数据采用方差分析,所有统计均由SPSS10.0统计软件处理完成。

2 结果

2.1 成功构建重组质粒pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)和重组口服DNA疫苗SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)成功地构建重组质粒pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4),且目的基因flk-1_(n1-4)在真核细胞COS-7细胞中得到表达(图1A-B);重组质粒pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)以及质粒pcDNA3.1(+)分别转化减毒沙门氏菌SL3261以后,在含氨苄青霉素的LB固体培养基上均呈单菌落生长,而阴性对照在含氨苄青霉素的LB固体培养基无菌落生长(图2)

2.2 重组沙门氏菌在小鼠体内分布透射电镜显示除10% NaHCO₃对照组外,疫苗组及载体对照组小鼠的肝、脾、小肠、结肠均可见重组沙门氏菌(图3)。

2.3 基因组中真核表达载体的检测结果显示除10% NaHCO₃对照组外,疫苗组及载体对照组小鼠的肝、脾、小肠、结肠组织中均可扩增出一个141 bp大小的片段,与引物设计时所预计的扩增片段大小相符,表示外源基因已整合到小鼠各组织器官中(图4)。

2.4 淋巴细胞亚群分析流式细胞仪检测在接种疫苗前以及接种疫苗后,疫苗组小鼠CD4⁺T与两对照组无明显差别($P>0.05$),肿瘤细胞接种2 wk后疫苗组CD4⁺T维持较高水平,两对照组较疫苗组明显下降($P<0.05$,表1);在接种疫苗前,疫苗组CD8⁺T与两对照组无明显差别,在疫苗接种后以及肿瘤模型建立2 wk后CD8⁺T在疫苗组明显比两对照组高($P<0.05$,表1)。

2.5 小鼠体内VEGF水平检测接种疫苗以及接种疫苗以前,疫苗组小鼠血清VEGF水平与两对照组无明显差异,在最后一次免疫后2 wk,两对照组的血清VEGF水平开始出现升高,而疫苗组血清VEGF水平出现下降,在接种肿瘤2 wk后,疫苗组VEGF水平较两对照组下降,而两对照组的VEGF水平明显升高(表1,图5)

2.6 重组疫苗菌诱导特异性抗体的产生SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)免疫组小鼠产生高水平的抗pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)-IgG抗体,且抗体水平持续增高;而载体对照组以及10% NaHCO₃对照组

表 1 CD4⁺ T, CD8⁺ T细胞的均数比较和小鼠血清VEGF水平(*n* = 8, mean ± SD)

分组		免疫前	免疫后	接种肿瘤后2 wk
CD4 ⁺ T细胞	疫苗组	62.34 ± 6.63	65.82 ± 7.25	62.12 ± 6.44
	载体对照组	64.15 ± 7.65	67.86 ± 8.24	44.79 ± 5.16 ^a
	10% NaHCO ₃ 对照组	62.78 ± 6.54	65.89 ± 7.94	43.76 ± 6.12 ^a
CD8 ⁺ T细胞	疫苗组	10.16 ± 0.84	15.64 ± 1.46	11.92 ± 2.60
	载体对照组	9.78 ± 0.59	9.58 ± 1.24 ^a	7.54 ± 2.97 ^a
	10% NaHCO ₃ 对照组	10.72 ± 1.54	9.49 ± 1.39 ^a	5.53 ± 2.40 ^a
血清VEGF × 10 ⁻² (A ₄₅₀)	疫苗组	58.24 ± 6.42	18.88 ± 8.07	2.66 ± 1.91
	载体对照组	60.45 ± 6.20	62.44 ± 6.43	85.65 ± 10.36 ^a
	10% NaHCO ₃ 对照组	59.86 ± 5.77	61.18 ± 6.72	92.86 ± 7.28 ^a

^a*P* < 0.05 vs 疫苗组.

■同行评价

本文具有一定的科学性和方法学创新性, 有一定的理论价值和应用价值.

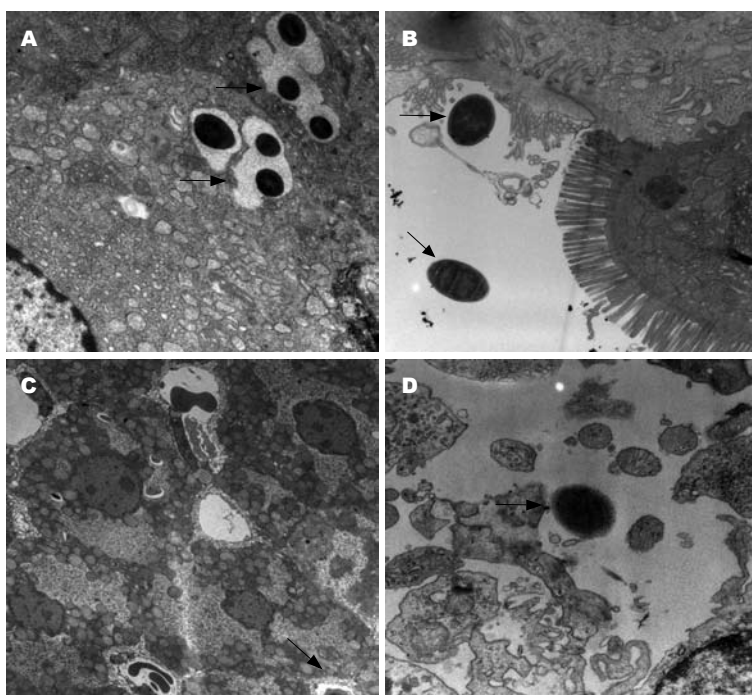


图 3 透射电镜下重组沙门氏菌在免疫组小鼠消化器官中的分布. A: 小肠(×20 000); B: 大肠(×15 000); C: 肝脏(×3 000); D: 脾脏(×25 000).

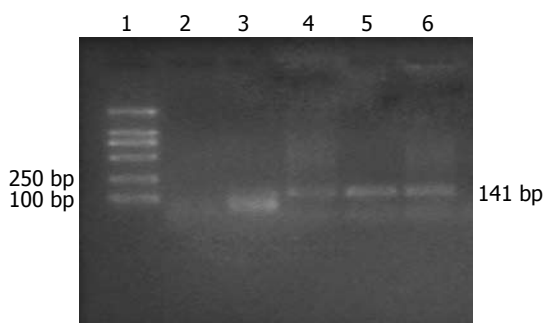
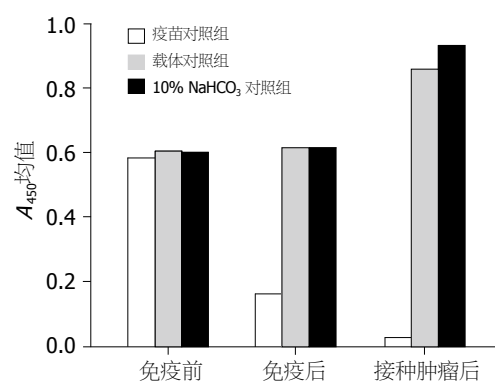
图 4 PCR扩增检测真核启动子CMV. 1: DNA Marker 2 kDa; 2: 10% NaHCO₃对照组; 3-6分别是肝脏、脾脏、小肠以及大肠PCR.

图 5 小鼠血清VEGF水平.

未产生抗pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)-IgG抗体(图6).

2.7 荷瘤动物模型的生存期观察 皮下动物模型显示, 疫苗组小鼠中位生存期为70.50 ± 5.58 d,

载体对照组小鼠中位生存期为36.75 ± 3.69 d, 10% NaHCO₃对照组小鼠中位生存期为47.95 ± 16.77 d, 疫苗组小鼠中位生存期较两对照组明显

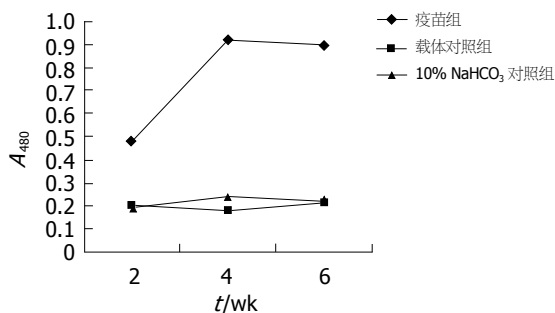


图6 免疫小鼠血清抗pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)-IgG抗体的检测.

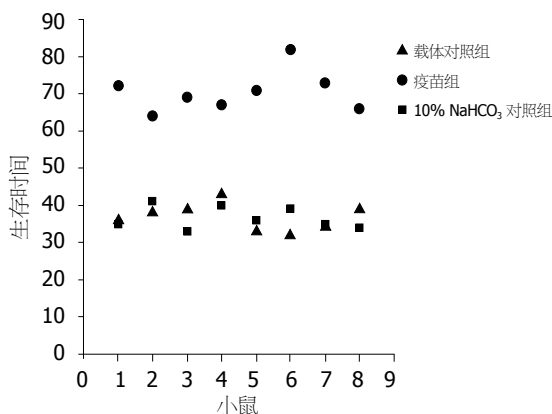


图7 各组小鼠生存时间.

表2 离体肿瘤质量、体积以及微血管密度计数
($n = 8$, mean \pm SD)

分组	肿瘤质量 (g)	肿瘤体积 (mm ³)	微血管密度计数
疫苗组	3.64 \pm 1.34 ^a	2.62 \pm 0.54 ^a	2.06 \pm 1.02 ^a
载体对照组	8.40 \pm 0.66	6.01 \pm 0.14	6.93 \pm 2.34
10% NaHCO ₃ 对照组	8.26 \pm 0.44	5.92 \pm 0.25	7.34 \pm 4.12

^a $P < 0.05$ vs 载体对照组和10% NaHCO₃对照组.



图8 接种皮下肿瘤4 wk后离体肿瘤标本. A: 疫苗组; B: 载体对照组; C: 10% NaHCO₃对照组.

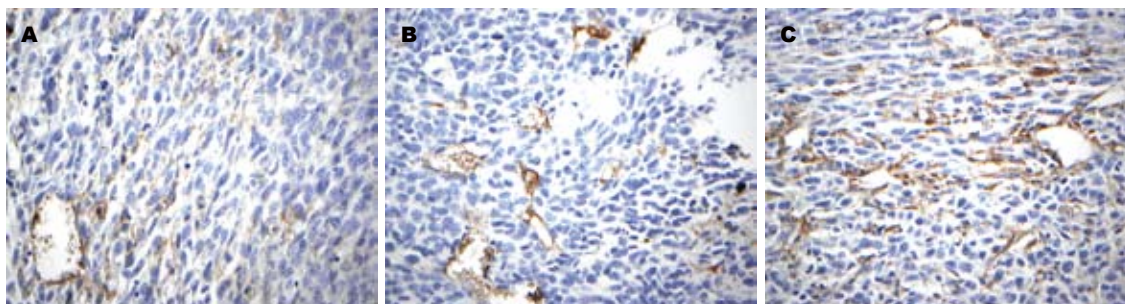


图9 免疫组化肿瘤周围微血管密度(CD31 \times 400). A: 疫苗组; B: 载体对照组; C: 10% NaHCO₃对照组.

延长($P < 0.05$); 免疫后小鼠接种皮下肿瘤, 疫苗组小鼠生存时间较其余两对照组小鼠的生存时间明显延长, 疫苗组小鼠在接种肿瘤后64 d才开始出现死亡, 其中荷瘤小鼠生存时间最长达82 d; 在两对照组中, 在接种肿瘤32 d后就有小鼠出现死亡, 最长生存时间为42 d(图7).

2.8 疫苗抑制小鼠皮下肿瘤生长观察 口服DNA疫苗SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4)能显著抑制小鼠结肠腺癌血管生成, 从而抑制肿瘤的生长, 疫苗组小鼠肿瘤重量、体积和微血管密度较两对照组有显著差异(表2, 图8-9).

3 讨论

血管生成在实体瘤的生长和转移中起重要作用,

阻断肿瘤的血流供应可以有效地抑制肿瘤的生长. 肿瘤血管靶向基因治疗具有特异性强, 毒副作用小, 作用持久等诸多优点, 因而, 抗肿瘤血管形成也就成为肿瘤生物学治疗的理想靶点^[19-21]. 目前, 已开发出如血管生长因子及其受体的中和抗体, 血管生成抑制因子及抗血管生成的化学药物等治疗手段^[22-25]. 而VEGF与其受体VEGFR2的相互作用, 是调控肿瘤血管形成的关键. 因此, VEGF及其受体也就成为抗肿瘤血管治疗最直接的靶点^[26]. 在目前已鉴定和克隆出的几种VEGF受体中, VEGFR2与VEGF具有较高亲和力, 仅存在于血管内皮细胞和一些肿瘤细胞中, 在正常情况下表达水平甚低. 许多肿瘤细胞分泌的VEGF与受体的胞外段结合后, 通

过胞内段的信号传导,可诱导内皮细胞增殖,血管新生及肿瘤细胞的分裂、增殖^[27-29]。可溶性受体为VEGFR胞外不同大小的片段,仅具有与配体结合的能力,而无信号传导功能,因此可竞争VEGF的功能受体,阻止肿瘤血管的形成,进而抑制肿瘤生长^[30]。

血管内皮细胞生长因子(VEGF)与其受体flk-1的相互作用,在肿瘤周围血管形成过程中起到关键作用。肿瘤细胞分泌大量的VEGF,通过作用于内皮细胞上相应的跨膜受体,引起内皮细胞的增殖和血管形成。因此,阻断VEGF与相应受体的结合,在目前抗肿瘤血管形成的研究中倍受关注。

本研究选择VEGFR2胞外段1-4样为研究对象,将flk-1_(n1-4)定向插入质粒pcDNA3.1(+)构建重组质粒pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4),将重组质粒转染COS-7细胞,Western blot检测到重组质粒能够在COS-7细胞中表达相应蛋白质,说明该目的基因片段能够在哺乳动物细胞中表达;将重组质粒转化减毒沙门氏菌SL3261,制备成口服DNA疫苗SL3261-pcDNA3.1+/flk-1_(n1-4);口服DNA疫苗灌胃饲服小鼠建立稳定免疫以后,取小鼠肝脏、脾脏、小肠以及大肠标本在透射电镜下观察,结果可见重组沙门氏菌再小鼠各主要消化器官内均有分布,说明沙门氏菌已将DNA疫苗带入机体;同时,提取小鼠肝脏、脾脏、小肠以及大肠标本DNA,经PCR特异性扩增DNA疫苗中的真核启动子CMV作为外源性目的基因整合入小鼠基因组的证据,结果证实目的基因flk-1_(n1-4)已整合到小鼠基因组中;动物试验表明,经疫苗免疫后荷瘤小鼠中位生存期较对照组明显延长;显著抑制小鼠结肠腺癌的血管生成,进而抑制肿瘤的生长;免疫学指标检测发现此口服DNA疫苗的作用机制可能是通过激活细胞免疫以及体液免疫而起到抗肿瘤血管生成及抑制肿瘤侵袭作用。以上结果表明本实验室制备的口服DNA疫苗具有抑制结肠腺癌生长的作用,VEGFR2胞外1-4样可能与完整受体竞争性结合VEGF,从而降低了血清VEGF水平,肿瘤周围血管内皮细胞受VEGF分泌刺激受限,并且完全阻断了完整VEGFR2胞内信号传导功能,导致血管内皮细胞的分裂及增殖能力降低,血管生成减少最终抑制肿瘤的生长^[31]。本研究结果为小片段克隆合成并制备成为更为安全的DNA疫苗提供了新的思路,同时也为结肠腺癌的抗血管生成治疗策略提供了强有力的支持。

4 参考文献

- Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z, Pytowski B, Kotanides H, Rockwell P, Böhlen P. Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 155-161
- Yoshida S, Amano H, Hayashi I, Kitasato H, Kamata M, Inukai M, Yoshimura H, Majima M. COX-2/VEGF-dependent facilitation of tumor-associated angiogenesis and tumor growth in vivo. *Lab Invest* 2003; 83: 1385-1394
- Verheul HM, Pinedo HM. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor angiogenesis and early clinical development of VEGF-receptor kinase inhibitors. *Clin Breast Cancer* 2000; 1 Suppl 1: S80-S84
- Werther K, Nielsen HJ. Significance of vascular endothelial growth factor--VEGF--in tumor angiogenesis. Therapeutic possibilities in solid tumors. *Ugeskr Laeger* 2000; 162: 4916-4920
- Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1998; 273: 31283-31318
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22
- Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Mwangi W, Knowles DP, Brown WC. Immunostimulatory CpG-modified plasmid DNA enhances IL-12, TNF-alpha, and NO production by bovine macrophages. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 103-112
- Dietrich G, Spreng S, Gentschev I, Goebel W. Bacterial systems for the delivery of eukaryotic antigen expression vectors. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000; 10: 391-399
- Darji A, zur Lage S, Garbe AI, Chakraborty T, Weiss S. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 27: 341-349
- Sirard JC, Niedergang F, Kraehenbuhl JP. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev* 1999; 171: 5-26
- Niethammer AG, Xiang R, Becker JC, Wodrich H, Pertl U, Karsten G, Eliceiri BP, Reisfeld RA. A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nat Med* 2002; 8: 1369-1375
- Lü F, Qin ZY, Yang WB, Qi YX, Li YM. A DNA vaccine against extracellular domains 1-3 of flk-1 and its immune preventive and therapeutic effects against H22 tumor cell in vivo. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2039-2044
- Feng KK, Zhao HY, Qiu H, Chen J. Specific anti-glioma angiogenesis immune response induced by attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine expressing vascular endothelial growth factor receptor-2. *Ai Zheng* 2005; 24: 548-553
- 陈明清, 杜伟, 王熙才, 伍治平, 陈艳, 王志强, 许岩. 口服DNA疫苗pcDNA3.1+/flk-1_(n1-7)抗小鼠结肠癌肝转移. *中国癌症杂志* 2006; 16: 641-646
- During MJ, Symes CW, Lawlor PA, Lin J, Dunning J, Fitzsimons HL, Poulsen D, Leone P, Xu R, Dicker BL, Lipski J, Young D. An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. *Science* 2000; 287: 1453-1460
- Huebener N, Lange B, Lemmel C, Rammensee HG,

- Strandsby A, Wenkel J, Jikai J, Zeng Y, Gaedicke G, Lode HN. Vaccination with minigenes encoding for novel 'self' antigens are effective in DNA-vaccination against neuroblastoma. *Cancer Lett* 2003; 197: 211-217
- 17 李玉华, 陈慧, 郭坤元, 解咏梅, 王丰, 谢匡诚, 黄建生, 任大明. 口服携带细胞因子基因的减毒沙门氏菌对小鼠肿瘤的预防作用. *科学通报* 2001; 46: 317-321
- 18 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887
- 19 Giordano FJ, Johnson RS. Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 35-40
- 20 Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-410
- 21 Blagosklonny MV. Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell* 2004; 5: 13-17
- 22 Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z, Pytowski B, Kotanides H, Rockwell P, Bohlen P. Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 155-161
- 23 Hunt S. Technology evaluation: IMC-1C11, ImClone Systems. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3: 418-424
- 24 Gingrich DE, Reddy DR, Iqbal MA, Singh J, Aimone LD, Angeles TS, Albom M, Yang S, Ator MA, Meyer SL, Robinson C, Ruggeri BA, Dionne CA, Vaught JL, Mallamo JP, Hudkins RL. A new class of potent vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: structure-activity relationships for a series of 9-alkoxymethyl-12-(3-hydroxypropyl)indeno[2,1-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5-ones and the identification of CEP-5214 and its dimethylglycine ester prodrug clinical candidate CEP-7055. *J Med Chem* 2003; 46: 5375-5388
- 25 Laird AD, Cherrington JM. Small molecule tyrosine kinase inhibitors: clinical development of anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12: 51-64
- 26 Strawn LM, McMahon G, App H, Schreck R, Kuchler WR, Longhi MP, Hui TH, Tang C, Levitzki A, Gazit A, Chen I, Keri G, Orfi L, Risau W, Flamme I, Ullrich A, Hirth KP, Shawver LK. Flk-1 as a target for tumor growth inhibition. *Cancer Res* 1996; 56: 3540-3545
- 27 Li B, Fuh G, Meng G, Xin X, Gerritsen ME, Cunningham B, de Vos AM. Receptor-selective variants of human vascular endothelial growth factor. Generation and characterization. *J Biol Chem* 2000; 275: 29823-29828
- 28 Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 2001; 276: 3222-3230
- 29 Larrivee B, Karsan A. Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor (review). *Int J Mol Med* 2000; 5: 447-456
- 30 Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994; 367: 576-579
- 31 寇伯君, 李玉林, 张丽红, 朱桂彬, 王心蕊, 李一雷, 王悦增, 石英爱. 可溶性血管内皮生长因子受体2片段的克隆、表达及其在肿瘤血管形成中的作用. *中华肿瘤杂志* 2004; 26: 337-341

编辑 程剑侠 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WCJD 和 WJG 2008 年对作者贡献分布 将开始实行公开策略

本刊讯 WCJD和WJG即将开始实行在每篇文章的脚注内注明每个作者对文章的贡献率, 如: 作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

反流性食管炎与幽门螺杆菌感染的关系

李渊, 周丽雅, 林三仁, 金珠, 崔荣丽, 何平平

李渊, 周丽雅, 林三仁, 金珠, 崔荣丽, 北京大学第三医院消化科 北京市 100083

何平平, 北京大学医学部公共卫生学院流行病学与生物统计教研室 北京市 100083

李渊, 北京大学医学部博士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病临床研究。

作者贡献分布: 此课题由周丽雅, 林三仁设计; 研究过程由李渊, 金珠, 崔荣丽操作完成; 数据分析由何平平完成; 本论文写作由李渊完成。

通讯作者: 李渊, 100083, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院消化科。leeeyuan@yahoo.com.cn

电话: 010-62017691-3126 传真: 010-82801249

收稿日期: 2007-08-18 修回日期: 2007-12-28

Relationship between *H pylori* infection and reflux esophagitis

Yuan Li, Li-Ya Zhou, San-Ren Lin, Zhu Jin, Rong-Li Cui, Ping-Ping He

Yuan Li, Li-Ya Zhou, San-Ren Lin, Zhu Jin, Rong-Li Cui, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China

Ping-Ping He, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China

Correspondence to: Yuan Li, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Peking University, 49 North Garden Road, Haidian District, Beijing 100083, China. leeeyuan@yahoo.com.cn

Received: 2007-08-18 Revised: 2007-12-28

Abstract

AIM: To study the prevalence, density and pattern of *H pylori* infection and the activity of reflux esophagitis (RE) and to compare the severity of esophagitis in *H pylori*-infected and non-infected RE patients.

METHODS: We conducted a prospective, random and case-control study. The condition of *H pylori* infection and the activity of gastritis in 89 RE patients and 89 non reflux esophagitis patients were compared. The RE patients were divided into *H pylori*-positive group and *H pylori*-negative group. The severity of esophagitis was compared between the two groups.

RESULTS: There was no statistic difference in the prevalence of *H pylori* infection between the RE and control groups ($P = 0.137$). However, the density of *H pylori* ($P = 0.024$ in the gastric body and $P = 0.000$ in the gastric sinus) and the activity of corpus gas-

tritis ($P = 0.001$) in the RE group were significantly lower than those in the control group. There was no statistic difference in the severity of esophagitis between *H pylori*-positive and *H pylori*-negative groups ($P = 0.353$), while the grade LA-C was 8.3% and 18.5% respectively and the grade LA-D was 4.2% and 12.3% respectively. No significant difference was found in the severity of esophagitis.

CONCLUSION: The degree of *H pylori* infection and the activity of corpus gastritis are inversely correlated with the formation of RE.

Key Words: *H pylori*; Reflux esophagitis; Gastritis

Li Y, Zhou LY, Lin SR, Jin Z, Cui RL, He PP. Relationship between *H pylori* infection and reflux esophagitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 171-174

摘要

目的: 研究反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)患者幽门螺杆菌(*H pylori*)感染率, 感染程度与定植部位及胃炎的活动度, 并对比 *H pylori*阳性与阴性的RE患者食管炎症的严重程度。

方法: 选取从2007-01/03在我科行胃镜检查证实的RE患者89例, 按年龄, 性别进行配对的方式随机抽取无反流对照组89例, 对比两组 *H pylori*感染率, 感染部位, 感染程度的差异, 并比较RE组中 *H pylori*阳性与阴性患者食管炎症的严重程度。

结果: RE组与对照组 *H pylori*感染率无统计学差异($P = 0.137$), 但RE组 *H pylori*感染程度较对照组轻($P_{胃体} = 0.024$, $P_{胃窦} = 0.000$), 且RE组胃体炎症严重程度较对照组轻($P = 0.001$); *H pylori*阳性与阴性的RE患者发生洛杉矶(LA)C级分别占8.3%和18.5%, D级分别占4.2%和12.3%, 但食管炎症的轻重程度无显著性差异($P = 0.353$)。

结论: *H pylori*的感染程度及胃体胃炎的活动性与RE的形成有负相关性。

关键词: 幽门螺杆菌; 反流性食管炎; 胃炎

■背景资料

GERD是目前研究热点。目前的许多流行病学研究显示, *H pylori*感染率高的国家GERD发病率较低; 这些国家 *H pylori*感染率下降后, GERD发病率有所升高, 而GERD发病率与 *H pylori*感染率及其他因素, 如生活方式改变的关系如何尚存争议。

■同行评议者

伊力亚尔·夏合丁, 教授, 新疆医科大学第一附属医院胸外科

■创新盘点

本研究通过对比RE(GERD的亚型之一)和无反流者的病理组织学特点(*H pylori*感染和胃炎情况),显示RE的产生与*H pylori*感染呈一定程度的负相关性。

李渊, 周丽雅, 林三仁, 金珠, 崔荣丽, 何平平. 反流性食管炎与幽门螺杆菌感染的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 171-174

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/171.asp>

0 引言

近年来, *H pylori*感染及溃疡病等*H pylori*相关性疾病的发病率呈下降趋势^[1], 而胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)的发病呈上升趋势. GERD与*H pylori*感染的关系尚有争议. 本研究探讨了GERD的主要分型之一反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)与*H pylori*感染的关系, 揭示在RE发病中*H pylori*感染所起的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 RE组为选取从2007-01/03在我科行胃镜检查证实的RE患者, 对照组为按年龄、性别与前组配对的方式随机抽取的欲行胃镜检查, 再经反流性疾病问卷^[2](reflux diagnostic questionnaire, RDQ, 又称耐信量表, 取RDQ分值12为诊断临界值, 其敏感性为94.12%, 特异性为50%)判定为无反流的患者, 胃镜检查进一步证实无RE, 食管裂孔疝及Barrett食管; 并注意排除一些可能存在反流的因素如贲门松弛和鳞柱状上皮交界(SCJ)模糊. 两组各89例. 两组的共同排除标准为(1)过去4 wk使用过质子泵抑制剂(PPI), 类固醇激素或非甾体类抗炎药; (2)以前进行过根除*H pylori*治疗, 或外科手术; (3)伴消化性溃疡, 胃癌以及幽门梗阻等疾病. 所有患者均在胃体和胃窦各取一块组织进行病理学检查. 2名病理检查医生对胃镜诊断结果不知情。

1.2 方法

1.2.1 病理诊断标准: 标本经石蜡切片, HE染色及Warrthin-Starry染色, 组织学诊断根据2000年慢性胃炎研讨会所定的诊断标准. 慢性炎症分级标准: 正常为单核细胞每高倍视野不超过5个, 轻度为慢性炎症细胞较少并局限于黏膜浅层, 不超过黏膜层的1/3, 中度为超过黏膜层的1/3, 但未达到2/3, 重度为占据黏膜全层. 病变程度无、轻、中、重分别定义为0、1、2、3分^[3].

1.2.2 *H pylori*感染程度分级: 观察胃黏膜黏液层, 表面上皮, 小凹上皮和腺管上皮表面的*H pylori*. 无: 未见*H pylori*; 轻: 偶见或小于标本全长1/3有少数*H pylori*; 中: *H pylori*分布超过标本全长1/3而未达到2/3或连续的, 薄而稀疏的存在于上皮表面; 重: *H pylori*成堆存在, 基本分布于标本全长. 标本全长中扣除肠化区域. 感染程度无、

轻、中、重分别定义为0、1、2、3分^[3]. RE组食管炎严重程度按洛杉矶标准分级(LA分级)^[4-5], 并比较*H pylori*阳性与阴性的RE患者的食管炎症的严重程度。

统计学处理 RE组和对照组*H pylori*的感染率的比较使用McNemar卡方检验, *H pylori*感染程度, 胃炎炎症程度的比较使用秩和检验。

2 结果

2.1 入组患者一般情况 入选RE组共89例患者, 其中LA分级A级33例(占37.1%), B级33例(占37.1%), C级14例(占15.7%), D级9例(占10.1%), 男55例, 女34例, 男: 女为1.62: 1. 入选对照组的人群为年龄性别与RE组一致的无反流患者。

2.2 两组感染*H pylori*的概率比较 RE组胃体感染*H pylori*阳性者共21例(23.6%), 对照组为32例(36.0%), 两组无显著性差异($\chi^2 = 2.154, P = 0.118$). RE组胃窦感染*H pylori*阳性者共20例(22.5%), 对照组为32例(32.6%), 两组无显著性差异($\chi^2 = 1.641, P = 0.200$). 若将胃体和/或胃窦*H pylori*阳性定为感染阳性, RE组为24例(27.0%), 对照组为35例(39.3%), 两组无统计学差异($\chi^2 = 2.326, P = 0.137$).

2.3 两组*H pylori*感染程度和胃炎炎症程度比较 RE组胃体和胃窦*H pylori*感染程度较对照组轻(胃体: $P = 0.024, Z = -2.251$, 胃窦: $P = 0.000, Z = -3.545$, 图1). RE组的胃体炎症严重程度较对照组轻($P = 0.001, Z = -3.460$, 图2), 而胃窦炎症严重程度与对照组相比差异无显著性($P = 0.076, Z = -1.774$, 图2).

2.4 RE组*H pylori*阳性者与*H pylori*阴性者按LA分级情况进行比较 RE组中*H pylori*阳性者24例, *H pylori*阴性者65例, *H pylori*阳性及*H pylori*阴性患者按LA分级的食管炎症程度比较结果: A级分别占37.5%和36.9%, B级分别占50.0%和32.3%, C级分别占8.3%和18.5%, D级分别占4.2%和12.3%. *H pylori*阳性的RE患者食管炎症程度较*H pylori*阴性的差异无显著性意义($P = 0.353, Z = -0.0929$, 图3).

3 讨论

GERD是一种发病率日渐增加的疾病^[6-10], 临床上将他分为NERD(non-erosive reflux disease), RE和Barrett食管, 其中Barrett与食管腺癌的发生密切相关^[11]. *H pylori*是上消化道的重要致病菌^[12-14], 他的感染程度与胃炎的活动程度呈正相关^[15]. 目前流行病学的研究发现, 绝大多数高

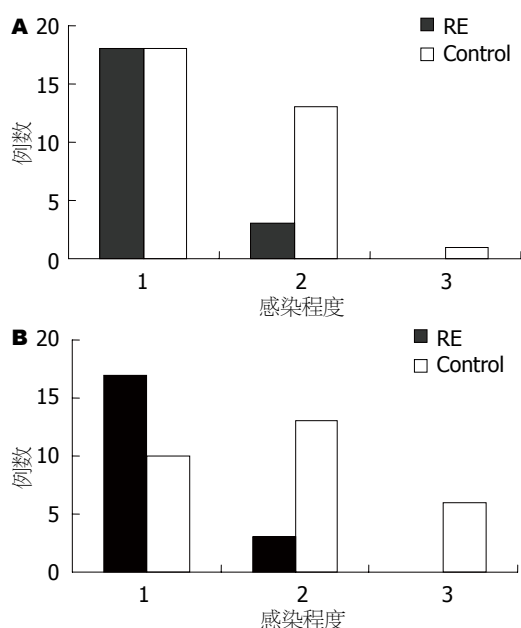


图 1 RE组与对照组胃部 $H. pylori$ 感染程度比较. A: 胃体; B: 胃窦.

$H. pylori$ 感染国家GERD的患病率低, 而随着这些国家 $H. pylori$ 感染率的下降, GERD及其并发症的发病率呈上升趋势^[8]. 但 $H. pylori$ 与GERD的关系及其在GERD形成中所起的作用尚不清楚. 本研究通过对RE(GERD的重要分型之一)与无反流对照组胃黏膜 $H. pylori$ 感染情况及胃炎的活动性进行比较, 来探索GERD和 $H. pylori$ 的相互关系.

为排除影响 $H. pylori$ 的各种因素, 并能较为直观地探讨RE和 $H. pylori$ 的关系, 我们在入组时剔除了使用过PPI类、抗生素以及消化性溃疡等因素. 我们在内镜检查中发现, GERD患者除了可能有RE, 食管裂孔疝或Barrett典型表现之外, 有时可能仅表现为贲门松弛和SCJ模糊^[16], 因此我们使用目前通用的反流性疾病问卷结合内镜检查, 使得无反流组的对照组的选择更可信.

本研究结果显示, RE组与对照组 $H. pylori$ 感染率相比, 数值上偏低, 但统计学上差异无显著性. 而将胃内 $H. pylori$ 感染程度进行比较, 则RE组的 $H. pylori$ 感染程度明显轻于对照组. 若将RE组分成 $H. pylori$ 感染阳性和感染阴性两组, 比较两组反流的严重程度, 虽统计学上差异无显著性, 但仍能看出 $H. pylori$ 阳性C级和D级食管炎的病例数较少. 以上结果显示 $H. pylori$ 与RE的形成呈负相关性. 这与多数研究的结果一致^[10,17-19]. 有资料表明RE的 $H. pylori$ 感染率低于NERD^[20], 高度不典型增生的Barrett及食管腺癌的感染率更低^[21]. 而且在消化性溃疡及胃炎患者根除 $H. pylori$ 后, RE的发病率比未根除组高, 从而

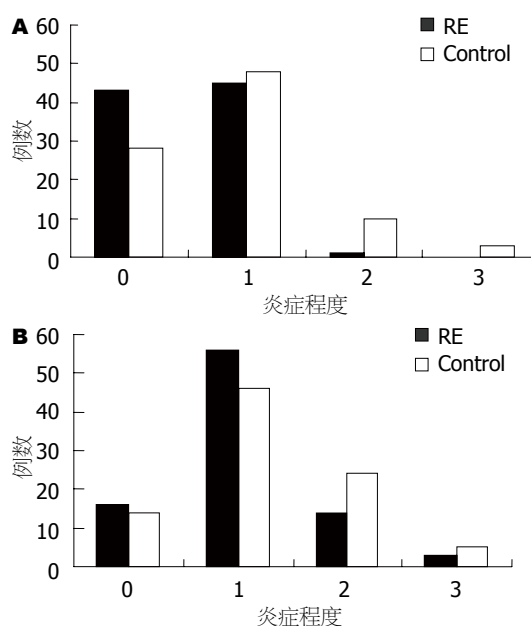


图 2 RE组与对照组胃部炎症程度比较. A: 胃体; B: 胃窦.

同行评价

本文课题设计合理, 数据可靠, 书写规范, 有一定的临床参考价值和学术价值.

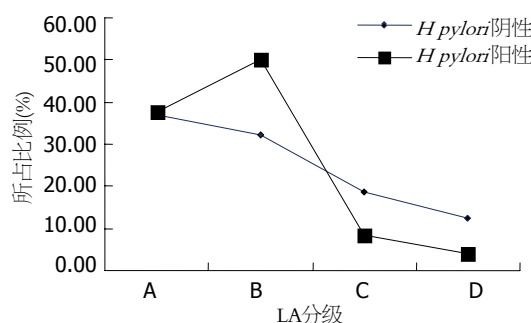


图 3 $H. pylori$ 阳性与阴性RE者食管炎症程度比较.

进一步证实 $H. pylori$ 对食管有保护性, 而其中 $H. pylori$ 的作用机制值得探究.

GERD发病机制包括食管抗反流屏障减弱, 食管廓清能力下降, 食管黏膜防御功能异常, 胃酸分泌异常, 胃排空延迟等. 我们的研究发现, RE组的胃体炎症严重程度较对照组轻, 而胃窦炎症严重程度与对照组相比, 差异无显著性. 提示在 $H. pylori$ 感染后, 当炎症累及胃体时, 胃酸分泌腺体的破坏导致胃酸分泌量的下降^[22], 胃内pH值升高^[23], 而且升高程度与胃体炎症程度正相关^[17]. 另外, 推测 $H. pylori$ 会产生尿素酶, 分解尿素后产生氨, 氨中和胃酸后使胃内pH值进一步升高, 使食管的酸负荷下降^[24], 这会导致GERD发病率下降. 但是尚未发现 $H. pylori$ 感染影响空腹或餐后下食管括约肌(lower esophageal sphincter, LES)压力, 也未改变一过性LES松弛的频率, 并且不会改变胃排空^[25-27], 因此 $H. pylori$ 没有破坏抗反流屏障, 他对GERD的形成起的

作用相对较弱。根除*H pylori*后也不会增加反流屏障正常者GERD的患病率^[18]。但对反流屏障功能异常的患者,根除*H pylori*后,胃体炎症减轻,GERD的患病率可能会增加^[27-28]。

因此,随着中国*H pylori*感染率的下降,GERD及其并发症食管腺癌的发病率有可能呈上升趋势^[29],应引起我们足够的重视,并应加强研究。

4 参考文献

- Zhou LY, Xue Y, Lin SR, Meng LM, Li CF, Yan XE, Gao N, Wang K, Duan ZY. The changes of gastric diseases during the past twenty five years. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2005; 44: 431-433
- 中国胃食管反流病研究协作组. 反流性疾病问卷在胃食管反流病诊断中的价值. *中华消化杂志* 2003; 23: 651-654
- 中华医学会消化病学分会. 全国慢性胃炎研讨会共识意见. *中华消化杂志* 2000; 20: 199-201
- DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1434-1442
- DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 190-200
- Armstrong D. Gastroesophageal reflux disease. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 589-595
- Fujimoto K. Review article: prevalence and epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease in Japan. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 8: 5-8
- Ho KY, Cheung TK, Wong BC. Gastroesophageal reflux disease in Asian countries: disorder of nature or nurture? *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1362-1365
- Richter JE. The many manifestations of gastroesophageal reflux disease: presentation, evaluation, and treatment. *Gastroenterol Clin North Am* 2007; 36: 577-599, viii-ix
- Ho KY, Chan YH, Kang JY. Increasing trend of reflux esophagitis and decreasing trend of *Helicobacter pylori* infection in patients from a multiethnic Asian country. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1923-1928
- Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global, evidence-based consensus paper. *Z Gastroenterol* 2007; 45: 1125-1140
- Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 659-672
- Moss SF, Malfertheiner P. *Helicobacter* and gastric malignancies. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 1: 23-30
- Rokkas T, Simsek I, Ladas S. *Helicobacter pylori* and non-malignant diseases. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 1: 20-22
- Zhou LY, Shen ZY, Lin SR, Jin Z, Ding SG, Huang XB, Xia ZW, Liu JJ, Guo HL, William C. Changes of gastric mucosa histopathology after *Helicobacter pylori* eradication. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2003; 42: 162-164
- Xue Y, Zhou LY, Lin SR, Huang YH. The application of high-resolution endoscopy in non-erosive reflux disease. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2006; 45: 389-392
- Wu JC, Sung JJ, Ng EK, Go MY, Chan WB, Chan FK, Leung WK, Choi CL, Chung SC. Prevalence and distribution of *Helicobacter pylori* in gastroesophageal reflux disease: a study from the East. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1790-1794
- Unal S, Karakan T, Dogan I, Cindoruk M, Dumlu S. The influence of *Helicobacter pylori* infection on the prevalence of endoscopic erosive esophagitis. *Helicobacter* 2006; 11: 556-561
- Zhang J, Chen XL, Wang KM, Guo XD, Zuo AL, Gong J. Relationship of gastric *Helicobacter pylori* infection to Barrett's esophagus and gastroesophageal reflux disease in Chinese. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 672-675
- Manes G, Mosca S, Laccetti M, Lioniello M, Balzano A. *Helicobacter pylori* infection, pattern of gastritis, and symptoms in erosive and nonerosive gastroesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 658-662
- Weston AP, Badr AS, Topalovski M, Cherian R, Dixon A, Hassanein RS. Prospective evaluation of the prevalence of gastric *Helicobacter pylori* infection in patients with GERD, Barrett's esophagus, Barrett's dysplasia, and Barrett's adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 387-394
- Gao BX, Duan LP, Wang K, Xia ZW, Lin SR. The roles of *Helicobacter pylori* and pattern of gastritis in the pathogenesis of reflux esophagitis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 86: 2674-2678
- Wu JC, Chan FK, Wong SK, Lee YT, Leung WK, Sung JJ. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on oesophageal acid exposure in patients with reflux esophagitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 545-552
- Lee OJ, Lee EJ, Kim HJ. Correlations among gastric juice pH and ammonia, *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal histology. *Korean J Intern Med* 2004; 19: 205-212
- Tanaka I, Tatsumi Y, Kodama T, Kato K, Fujita S, Mitsufuji S, Kashima K. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastroesophageal function. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 251-257
- Graham DY. The changing epidemiology of GERD: geography and *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1462-1470
- Manes G, Esposito P, Lioniello M, Bove A, Mosca S, Balzano A. Manometric and pH-metric features in gastro-oesophageal reflux disease patients with and without *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 372-377
- Wu JC, Chan FK, Ching JY, Leung WK, Hui Y, Leong R, Chung SC, Sung JJ. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on treatment of gastro-oesophageal reflux disease: a double blind, placebo controlled, randomised trial. *Gut* 2004; 53: 174-179
- Goh KL. Changing trends in gastrointestinal disease in the Asia-Pacific region. *J Dig Dis* 2007; 8: 179-185

编辑 程剑侠 电编 何基才

中药胃宁颗粒联合化疗防治胃癌复发转移的临床分析

邓鑫, 梁健, 覃黎葵, 朱朝阳, 李龙华

邓鑫, 梁健, 覃黎葵, 李龙华, 广西中医学院附属瑞康医院肝内科 广西南宁市 530011
朱朝阳, 广西崇左市人民医院消化科 广西崇左市 532200
邓鑫, 硕士, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病研究。
广西科技厅科技攻关资助项目, No. 桂科攻0537018-14
作者贡献分布: 邓鑫与梁健对此论文文献均等; 此课题由邓鑫, 梁健共同设计, 临床观察由覃黎葵, 朱朝阳, 李龙华完成, 由邓鑫负责临床质量控制, 数据分析由邓鑫, 梁健共同完成; 本文写作由邓鑫, 梁健完成。
通讯作者: 邓鑫, 530011, 广西南宁市华东路10号, 广西中医学院附属瑞康医院肝内科. dx8848@126.com
收稿日期: 2007-09-30 修回日期: 2008-01-03

Weining granules combined with chemotherapy for recurrent and metastatic gastric cancer

Xin Deng, Jian Liang, Li-Kui Qing, Chao-Yang Zhu, Long-Hua Li

Xin Deng, Jian Liang, Li-Kui Qing, Long-Hua Li, Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medicine College, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Chao-Yang Zhu, Chong zuo People's Hospital, Chongzuo 532200, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: the Science and Technology Program of Guangxi Science and Technology Department, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China, No. 0537018-14
Correspondence to: Xin Deng, Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medicine College, 10 Huadong Road, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. dx8848@126.com
Received: 2007-09-30 Revised: 2008-01-03

Abstract

AIM: To study the inhibitory effect of Weining granules combined with chemotherapy on recurrent and metastatic gastric cancer and its possible mechanism.

METHODS: One hundred and sixty cases of postoperative gastric cancer were randomly divided into treatment group ($n = 80$) receiving Weining granules combined with chemotherapy and control group ($n = 80$) receiving chemotherapy. The following parameters were observed, including recurrence and metastasis rate of gastric cancer within 1 year, and changes in plasma viscosity, blood viscosity, value K of blood sedimentation equation, erythrocyte aggregation index, fibrinogen, level of metalloproteinase -9

(MMP-9) and vascular endothelial growth factor (VEGF), size of recurrent tumors, life quality of recurrent and metastatic cases.

RESULTS: The recurrent and metastatic rate was 22.22% in the treatment group and 32.22% in the control group with a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). Plasma viscosity, blood viscosity, fibrinogen, MMP-9, VEGF were significantly higher in the treatment group than in the control group (1.26 ± 0.13 mPa·s vs 1.75 ± 0.11 mPa·s, 8.73 ± 1.98 mPa·s vs 20.56 ± 2.31 mPa·s, 2.15 ± 0.16 vs 3.85 ± 0.41 , 135.46 ± 22.16 μ g/L vs 186.23 ± 31.56 μ g/L, 102.46 ± 18.43 vs 176.43 ± 21.56 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$). The inhibitory rate for the recurrent and metastatic foci was 33.33% in the treatment group and 17.85% in the control group with a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). Improvement in the quality of life was much better in the treatment group than in the control group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Weining granules combined with chemotherapy inhibit recurrence and metastasis of gastric cancer and improve curative effect by decreasing MMP-9 and VEGF level and promoting microcirculation.

Key Words: Weining granule; Gastric cancer; Recurrence; Metastasis

Deng X, Liang J, Qing LK, Zhu CY, Li LH. Weining granules combined with chemotherapy for recurrent and metastatic gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 175-179

摘要

目的: 研究胃宁颗粒联合化疗对胃癌复发转移的防治作用。

方法: 160例术后胃癌患者随机分为治疗组80例予胃宁颗粒配合化疗, 对照组80例予单纯化疗。观察治疗前后局部复发及远处转移情况, 血液流变学指标血浆黏度、全血黏度、血沉方程(K值)、红细胞聚集指数、纤维蛋白原、金属蛋白酶-9(MMP-9)、血管内皮生长因子

■背景资料

胃癌在全世界范围内是发病率最高的癌症之一, 也是亚洲常见恶性肿瘤, 病情发展较快, 死亡率和发病率都较高。

■同行评议者

曹秀峰, 主任医师, 南京医科大学附属第一医院肿瘤中心; 关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

■ 研发前沿

肿瘤的侵袭和转移是恶性肿瘤的最本质表现。迄今为止,世界上尚无理想的、抗肿瘤转移的药物进入临床使用。本文从中医联合化疗药物途径,探讨中西医结合防治肿瘤转移的思路及方法。

(VEGF)含量、复发转移病灶大小、复发转移者生活质量的变化。

结果: 治疗组1年后复发转移率22.22%,对照组为32.22%,两组比较差异有显著性意义($P<0.05$);治疗组治疗后血浆黏度、全血黏度、纤维蛋白原、MMP-9、VEGF含量与对照组相比显著降低(1.26 ± 0.13 mPa·s vs 1.75 ± 0.11 mPa·s, 8.73 ± 1.98 mPa·s vs 20.56 ± 2.31 mPa·s, 2.15 ± 0.16 vs 3.85 ± 0.41 , 135.46 ± 22.16 $\mu\text{g/L}$ vs 186.23 ± 31.56 $\mu\text{g/L}$, 102.46 ± 18.43 vs 176.43 ± 21.56 , $P<0.05$ 或 $P<0.01$);治疗组对复发转移灶大小抑制率为30.00%,对照组为17.85%,两组比较差异有显著性意义($P<0.05$);治疗组对复发转移患者生活质量改善显著优于对照组($P<0.01$)。

结论: 胃宁颗粒和化疗药物联用,具有一定的协同作用,可以提高疗效,改善患者生存质量,其机制可能与改善微循环、降低MMP-9、VEGF含量有关。

关键词: 胃宁颗粒;胃癌;复发;转移

邓鑫, 梁健, 覃黎葵, 朱朝阳, 李龙华. 中药胃宁颗粒联合化疗防治胃癌复发转移的临床分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 175-179
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/175.asp>

0 引言

胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,据2000年资料统计,全球每年新发胃癌876 000例,占有新发癌症病例的9%,每年约有647 000人死于胃癌,位居癌症死因的第2位^[1-2],而死亡的主要原因是肿瘤的侵袭转移^[3-6]。转移是肿瘤重要的生物学特征,也是肿瘤治疗中面临的最大难题和防治重点。我们前期研究胃宁方剂具有抑制胃癌细胞增殖、黏附、迁移,具有抑制胃癌转移作用^[7-8]。本课题从临床角度,采用胃宁颗粒联合化疗方案,观察其对胃癌复发转移的防治作用。

1 材料和方法

1.1 材料 160例临床病例均来源于2003-04/2007-05广西中医学院附属瑞康医院、广西崇左市人民医院病理学诊断明确的胃癌患者, TNM分期为II-III期。分期标准参照国际抗癌联盟胃癌TNM分期标准^[9],均已行手术治疗(包括胃癌根治术、扩大根治术,少数患者行姑息性手术),且用药之前未发现有复发和远处转移, Karnofsky

评分60以上,无严重的心、肝、脑、肾等脏器的器质性或功能性疾患。采用信封法随机分成治疗组(胃宁颗粒加化疗)和对照组(单纯化疗)。治疗组90例,男51例,女39例;年龄42-67岁平均(55.26 ± 10.15)岁;病期:II期43例,III期47例;病理组织学分类:乳头状腺癌18例、管状腺癌32例、低分化腺癌12例、未分化腺癌21例、印戒细胞癌5例、黏液腺癌2例。对照组90例,男48例,女42例;年龄44-63岁平均(53 ± 9.23)岁;病期:II期46例,III期44例;病理组织学分类:乳头状腺癌19例、管状腺癌20例、低分化腺癌21例、未分化腺癌19例、印戒细胞癌7例、黏液腺癌4例。两组患者的年龄、性别、病期、病理组织学分类比较组间分布差异无显著性意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法: 对照组:应用FAM化疗方案,具体为5-氟脲嘧啶500 mg,静脉滴注,第1-5天;表阿霉素50 mg,静脉滴注,第1天;丝裂霉素4 mg,静脉推注,第1天;3-4 wk化疗1次,为1个疗程,共6个疗程。治疗组:po胃宁颗粒,4 g/次,2次/d,同时配合对照组化疗方案,疗程为6 mo。

1.2.2 观察指标及方法: 根据临床症状、体征、影像学检查及细胞学检查结果,观察两组患者用药后1年内发生局部复发及远处转移(肺、肝、脑、骨、腹腔淋巴结等)情况。采用全自动生化分析仪检测治疗前后检测血液流变学指标:血浆黏度、全血黏度、血沉方程(K值)、红细胞聚集指数、纤维蛋白原。酶联免疫吸附(ELISA)法测定治疗前后血清中金属蛋白酶-9(MMP-9)、血管内皮生长因子VEGF的含量。

1.2.3 复发转移病灶大小的比较: 1年内出现复发转移者,证实不能再次手术或拒绝手术者继续按原方案治疗2 mo,观察病灶大小的变化。按WHO疗效标准进行评定,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、无变化(NC)、进展(PD),其中CR+PR视为有效。

1.2.4 复发转移者生活质量的比较: 继续按原方案治疗2 mo,参照卫生部医政司中国常见肿瘤诊治规范体力状况评分标准,进行治疗前后Karnofsky评分。(1)生活质量提高:Karnofsky评分提高 ≥ 10 分;(2)生活质量下降:Karnofsky评分下降 ≥ 10 分;(3)生活质量稳定:Karnofsky评分提高或降低 < 10 分。其中生活质量提高、生活质量稳定视为有效。

统计学处理 数据采用SPSS11.5统计软件包进行数据处理,计量资料采用 t 检验;计数资料采

表 1 两组治疗前后血液流变学指标的比较($n=90$, mean \pm SD)

分组		血浆黏度(mPa · s)	全血黏度(mPa · s)	血沉方程(K值)	红细胞聚集指数	纤维蛋白原
治疗组	治疗前	1.43 \pm 0.21	18.35 \pm 1.73	68.31 \pm 6.5	2.55 \pm 0.12	3.42 \pm 0.36
	治疗后	1.26 \pm 0.13 ^{bd}	8.73 \pm 1.98 ^{ad}	50.23 \pm 4.4 ^a	1.31 \pm 0.23 ^b	2.15 \pm 0.16 ^{bd}
对照组	治疗前	1.47 \pm 0.25	17.18 \pm 2.02	67.42 \pm 6.5	2.23 \pm 0.78	3.14 \pm 0.24
	治疗后	1.75 \pm 0.11	20.56 \pm 2.31	65.12 \pm 7.5	2.18 \pm 0.45	3.85 \pm 0.41

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 治疗组治疗前; ^c $P<0.01$ vs 对照组治疗后.

表 2 两组治疗前后MMP-9、VEGF含量的比较($n=90$, mean \pm SD)

分组		MMP-9(μ g/L)	VEGF(ng/L)
治疗组	治疗前	215.62 \pm 32.75	196.35 \pm 21.56
	治疗后	135.46 \pm 22.16 ^{ad}	102.46 \pm 18.43 ^{ad}
对照组	治疗前	224.18 \pm 27.56	206.45 \pm 19.28
	治疗后	186.23 \pm 31.56	176.43 \pm 21.56

^a $P<0.05$ vs 对照组治疗后; ^c $P<0.01$ vs 治疗组治疗前.

用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 局部复发及远处转移情况 治疗组1年内复发6例, 转移14例, 复发转移率22.22%; 对照组1年内复发10例, 转移19例, 复发转移率32.22%; 两组比较差异有显著性意义($P<0.05$).

2.2 血液流变学指标的比较 治疗组治疗后较治疗前比较, 全血黏度、血沉方程(K值)显著降低($P<0.05$), 血浆黏度、红细胞聚集指数、纤维蛋白原显著降低($P<0.01$); 治疗组治疗后血浆黏度、全血黏度、纤维蛋白原较对照组比较显著降低($P<0.01$, 表1).

2.3 MMP-9、VEGF含量比较 治疗组治疗后与治疗前相比, MMP-9、VEGF含量显著降低($P<0.01$); 对照组治疗后较治疗前相比MMP-9、VEGF含量无显著变化($P>0.05$); 治疗组治疗后较对照组治疗后相比MMP-9、VEGF含量显著降低($P<0.05$, 表2).

2.4 复发转移病灶大小和复发转移者的生活质量 复发转移者经继续治疗2 mo后, 治疗组对复发转移灶大小抑制率为30.00%, 对照组为17.85%; 两组比较差异有显著性意义($P<0.05$, 表3). 治疗组20例, 生活质量提高者4例, 稳定者14例, 下降者2例; 对照组39例, 生活质量提高者0例, 稳定者2例, 下降者37例; 两组比较差异具有显著性意义($P<0.01$); 胃宁颗粒在提高复发转移

■应用要点

本文采用中西医结合方法, 提高了临床疗效, 改善了患者生存质量.

表 3 复发转移者经继续治疗2 mo后病灶大小比较

分组	n	CR	PR	NC	PD	有效率(%)
治疗组	20	2	4	8	6	30.00
对照组	39	0	7	18	14	17.85

患者生活质量优于对照组.

3 讨论

目前, 肿瘤疗效评价方法是以瘤体的改变作为疗效的标准, 治疗的主要目的是肿瘤的完全消失, 即彻底清除体内所有的肿瘤细胞达到“无瘤生存”. 肿瘤主要治疗手段包括手术、放疗、化疗、生物学治疗及几种疗法联合的综合治疗, 只能达到肉眼无瘤的状况, 并不能达到无复发及转移, 最终患者仍死于复发或远处转移.

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 手术切除仍是目前的主要治疗方法, 而手术后的复发和转移是影响疗效的关键. 目前, 无一种疗效确切的抗胃癌复发转移的药物被临床广泛应用^[10-12]. 近年来, 中医药在防治胃癌复发转移方面发挥了一定的作用^[13-15]. 中医认为, 胃癌是由正气不足、瘀毒内结所致, 行手术切除之后, 虽邪气大衰, 然正气亦损, 而化疗则更是伤阴耗气, 渐致正不抑邪, 邪毒夹瘀血乘虚留串经络, 客于脏腑, 久而成积, 形成胃癌的复发转移. 胃宁颗粒由黄芪、茯苓、莪术、枸杞组成, 具有健脾益气, 活血滋肾的作用, 用于胃癌的治疗和胃癌转移的防治. 现代药理表明, 黄芪可增强树突状细胞的抗肿瘤作用, 有效地促进荷瘤宿主的免疫应答, 具有显著的抗肿瘤转移效果^[15]. 我们采用胃宁颗粒联合化疗, 通过160例临床病例的观察, 经过6 mo的治疗, 治疗组(胃宁颗粒+化疗)1年内复发转移率22.22%, 对照组32.22%, 治疗组抑制胃癌术后复发转移率显著优于对照组($P<0.05$); 复发转移者经继续治疗2 mo后, 治疗组对复发转移灶大小抑制率为30.00%, 对照组

■同行评价

本文是一篇中西医结合治疗胃癌的临床研究,论据充分,推理合乎逻辑,有较高的学术价值和临床应用价值。

为17.85%;治疗组对复发转移灶大小抑制率显著优于对照组($P<0.05$)。表明胃宁颗粒和化疗方案联用,两者具有协同作用,可以降低肿瘤复发转移发生率,提高临床疗效。中医和西医是两个不同的医学体系,对肿瘤的治疗各具优势,中医强调整体调节,辨证与辨病相结合,重视和保护机体的抗病能力,接受放疗、化疗治疗的患者,辅以中药,可增强机体的免疫功能,调动机体的抗癌潜力,既可增强化疗、放疗的抗癌作用,也可增强机体对放疗、化疗的耐受能力。因此,在临床上将两者有机结合,优势互补,可起到丰富治疗方法,提高疗效。

肿瘤的复发转移是一个多因素、多步骤、多阶段的复杂过程,微循环功能紊乱是导致癌细胞转移的重要条件,癌细胞进入微循环,可使小动脉、后小动脉、前毛细血管栓塞,从而引起血液流变学的改变,血液流变学改变随着病情的加重而增加,改善血液微循环防止肿瘤细胞进一步的沉积,同时也可以提高肿瘤组织对治疗药物的敏感性,提高疗效^[16-17]。金属蛋白酶(MMP)是肿瘤转移过程中降解细胞外基质的重要酶类,MMP-9是MMP中重要的一员,胃癌细胞自身具有产生分泌MMP-9的能力,MMP-9结构中含有 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 等金属离子的蛋白水解酶类,能水解胶原蛋白、弹性蛋白、氨基葡聚糖等多种细胞外基质,参与肿瘤的侵袭与转移^[18-21]。VEGF作为重要的肿瘤血管形成因子,参与胃癌新生血管、淋巴管形成,并增加血管通透性,促进血管内营养物质泄漏,为肿瘤的转移提高物质基础,VEGF的表达与胃癌的恶性程度、转移潜能及预后密切相关,抑制VEGF的表达,可抑制肿瘤的复发转移^[22-27]。MMP-9、VEGF在胃癌组织中高表达,同样在患者血清中高表达,联合检测胃癌血清MMP-9、VEGF的含量有利于胃癌的预后^[28]。我们通过检测患者治疗前后血清血液流变学、MMP-9及VEGF的含量变化,治疗组治疗后与治疗前相比,血浆黏度、全血黏度、血沉方程(K值)、红细胞聚集指数、纤维蛋白原、MMP-9、VEGF含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);治疗组治疗后血浆黏度、全血黏度、纤维蛋白原、MMP-9、VEGF含量与对照组相比显著降低($P<0.05$);胃宁颗粒联合化疗抗胃癌复发转移可能与改善患者微循环,降低MMP-9及VEGF的含量有关。

近年来,评价和提高恶性肿瘤患者的生存质量问题得到了医学界的广泛关注^[28-31]。生存

质量评估通过对患者躯体感觉及功能、心理状态、社会职能及疾病本身和治疗所致的症状和体征诸方面所作的综合评价(包括患者对以上诸方面的自我评价),从一个新的角度评定治疗效果。同以往传统疗效评定标准不同,他更重视患者的主观感受,而不仅仅将临床的客观指标作为评价标准。患恶性肿瘤不仅是对患者躯体健康的打击,同时也严重损害了患者的生存质量。复发转移患者,治疗组20例,生活质量提高者4例,稳定者14例,下降者2例;对照组39例,生活质量提高者0例,稳定者2例,下降者37例;两组比较差异具有显著性意义($P<0.01$),表明胃宁颗粒在提高复发转移患者生活质量优于对照组。提示中药联合化疗药物不仅能防治胃癌转移,并且可以改善患者症状、增强体质,提高患者对化疗的耐受性。

肿瘤转移的观察是一个长期过程,由于时间关系未进行2年、3年、5年复发转移率的观察,也未能对复发转移者带瘤生存时间进行进一步观察。肿瘤的复发转移是一个多基因调控、多步骤的复杂生物学过程,涉及到肿瘤细胞、机体、靶组织间的相互作用及影响,如何利用中药复方成分多样性的特点,开发出可以多靶点、多层次作用于胃癌细胞的有效方剂,中西医结合,有效的阻断胃癌的复发转移,将是中医药防治胃癌复发转移的研究方向。

4 参考文献

- 1 Sun X, Mu R, Zhou Y, Dai X, Qiao Y, Zhang S, Huangfu X, Sun J, Li L, Lu F. 1990-1992 mortality of stomach cancer in China. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2002; 24: 4-8
- 2 徐飏, 王建明. 胃癌流行病学研究. *中华肿瘤防治杂志* 2006; 13: 1-8
- 3 Motoori M, Takemasa I, Yano M, Saito S, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Doki Y, Kurokawa Y, Ueno N, Oba S, Ishii S, Monden M, Kato K. Prediction of recurrence in advanced gastric cancer patients after curative resection by gene expression profiling. *Int J Cancer* 2005; 114: 963-968
- 4 Shimoyama S, Seto Y, Aoki F, Ogawa T, Toma T, Endo H, Itoji T, Kaminishi M. Gastric cancer with metastasis to the gingiva. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 831-835
- 5 Nakanishi H, Yasui K, Ikehara Y, Yokoyama H, Munesue S, Kodera Y, Tatematsu M. Establishment and characterization of three novel human gastric cancer cell lines with differentiated intestinal phenotype derived from liver metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22: 137-147
- 6 Park SS, Ryu JS, Min BW, Kim WB, Kim SJ, Kim CS, Mok YJ. Impact of skip metastasis in gastric cancer. *ANZ J Surg* 2005; 75: 645-649
- 7 梁健, 邓鑫, 黄仁彬. 胃宁方对人胃癌SGC-7910细胞增

- 殖凋亡的影响. 上海中医药杂志 2006; 40: 66-68
- 8 梁健, 邓鑫, 黄仁彬. 胃宁方对人胃癌细胞侵袭能力的影响. 辽宁中医杂志 2006; 33: 899-900
- 9 汤钊猷. 现代肿瘤学. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 2002: 711
- 10 Yamakado K, Nakatsuka A, Takaki H, Mori Y, Tonouchi H, Kusunoki M, Kida H, Takeda K. Prospective study of arterial infusion chemotherapy followed by radiofrequency ablation for the treatment of liver metastasis of gastric cancer. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 1747-1751
- 11 Peng Z, Wei D, Wang L, Tang H, Zhang J, Le X, Jia Z, Li Q, Xie K. RUNX3 inhibits the expression of vascular endothelial growth factor and reduces the angiogenesis, growth, and metastasis of human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6386-6394
- 12 Yamao T, Ohta K, Ohshima S, Ishihara S, Chin K, Maruyama M, Takahashi T, Nakajima T. A preliminary study of preoperative chemotherapy combining irinotecan and cisplatin in patients with gastric cancer with unresectable para-aortic lymph node metastases. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34: 255-261
- 13 许玲, 魏品康, 陈亚琳, 苏晓妹, 秦志丰, 施俊, 李峻, 何金. 中药消痰散结方抑制裸鼠原位移植人胃癌 SGC-7901 的生长转移. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1015-1020
- 14 Yang JK, Zhen J, Shen KP. Clinical study on post-operative metastasis prevention of progressive stage of gastric cancer by weichang'an. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2003; 23: 580-582
- 15 Xu YQ, Xue HN, Zhu XQ, Chen XD. Clinical observation on treatment for postoperative metastasis of gastric cancer by Jianpi Huoxue Jiedu prescription. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2003; 1: 192-194
- 16 毛志东. 100例晚期癌症患者24小时血液流变学变化的观察. 中国血液流变学杂志 2003; 13: 66-67
- 17 von Tempelhoff GF, Nieman F, Heilmann L, Hommel G. Association between blood rheology, thrombosis and cancer survival in patients with gynecologic malignancy. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000; 22: 107-130
- 18 Denys H, De Wever O, Nussgens B, Kong Y, Sciot R, Le AT, Van Dam K, Jadidizadeh A, Tejpar S, Mareel M, Alman B, Cassiman JJ. Invasion and MMP expression profile in desmoid tumours. *Br J Cancer* 2004; 90: 1443-1449
- 19 Wang L, Zhang LH, Li YL, Li YL, Liu Z. Expression of MMP-9 and MMP-9 mRNA in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003; 83: 782-786
- 20 Jung SA, Yang SK, Kim JS, Shim KN, Im SA, Myung SJ, Jung HY, Yu CS, Kim JC, Hong WS, Kim JH, Min YI. The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) and angiogenesis in relation to the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in submucosally invasive colorectal carcinoma. *Korean J Gastroenterol* 2005; 45: 401-408
- 21 Okada M, Miyake K, Matsumoto Y, Kawai N, Kunishio K, Nagao S. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expressions correlate with the recurrence of intracranial meningiomas. *J Neurooncol* 2004; 66: 29-37
- 22 Herrlinger U, Wiendl H, Renninger M, Forscherler H, Dichgans J, Weller M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in leptomeningeal metastasis: diagnostic and prognostic value. *Br J Cancer* 2004; 91: 219-224
- 23 Ohta M, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kamiya K, Syouji T, Kondoh K, Watanabe M, Terada H, Nakamura S. The significance of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in gastric cancer. *Cancer Lett* 2003; 192: 215-225
- 24 Takahashi Y, Mai M. Antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibits angiogenic switch and liver metastasis in orthotopic xenograft model with site-dependent expression of VEGF. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 237-243
- 25 Liu XE, Sun XD, Wu JM. Expression and significance of VEGF-C and FLT-4 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 352-355
- 26 Fondevila C, Metges JP, Fuster J, Grau JJ, Palacin A, Castells A, Volant A, Pera M. p53 and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric cancer. *Br J Cancer* 2004; 90: 206-215
- 27 Aoyagi K, Kouhiji K, Yano S, Miyagi M, Imaizumi T, Takeda J, Shirouzu K. VEGF significance in peritoneal recurrence from gastric cancer. *Gastric Cancer* 2005; 8: 155-163
- 28 沈志祥, 董卫国, 沈磊, 金海燕, 谭诗云, 李海霞. 胃癌患者血清中MMP-9的水平及其癌组织中MMP-9及VEGF的表达. 中国肿瘤临床 2003; 30: 689-693
- 29 Brunelli A, Succi L, Refai M, Salati M, Ximé F, Sabbatini A. Quality of life before and after major lung resection for lung cancer: a prospective follow-up analysis. *Ann Thorac Surg* 2007; 84: 410-416
- 30 Tian J, Chen JS. Nutritional status and quality of life of the gastric cancer patients in Changle County of China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1582-1586
- 31 Ikenaga N, Nishihara K, Iwashita T, Suehara N, Mitsuyama S. Long-term quality of life after laparoscopically assisted distal gastrectomy for gastric cancer. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2006; 16: 119-123

编辑 程剑侠 电编 何基才

骨髓干细胞在肝纤维化治疗中的作用机制

兰玲, 陈源文, 李定国

■背景资料

BMSC移植显示出一定的抗肝纤维化作用, 但具体作用机制尚不明确. 他可能通过多种途径来促进肝细胞再生、抑制肝组织纤维化形成, 其对肝纤维化改善的影响可能是多因素的.

兰玲, 陈源文, 李定国, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科 上海市 200092

国家自然科学基金资助课题, No. 30500236

作者贡献分布: 兰玲与陈源文对此文所作贡献均等; 与本综述相关课题由陈源文、兰玲设计; 写作由兰玲完成; 文献采集归纳由兰玲、陈源文完成; 修改和审校由李定国完成.

通讯作者: 李定国, 200092, 上海市, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科. dingguo_li@263.net

电话: 021-65790000-3362 传真: 021-55571294

收稿日期: 2007-08-17 修回日期: 2007-12-22

Mechanism of action of bone marrow stem cells in treatment of liver fibrosis

Ling Lan, Yuan-Wen Chen, Ding-Guo Li

Ling Lan, Yuan-Wen Chen, Ding-Guo Li, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500236

Correspondence to: Ding-Guo Li, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China. dingguo_li@263.net

Received: 2007-08-17 Revised: 2007-12-22

Abstract

Transplantation of bone marrow stem cells (BMSCs) is a potential method to treat liver fibrosis, but its mechanism of action is not clear. Many researches showed that BMSCs can play a role in the treatment of liver fibrosis mainly through two routes: (1)BMSCs promote liver regeneration by differentiating functional hepatocytes, secreting growth factors and deriving endogenous hepatocyte proliferation, and (2)BMSCs inhibit formation of hepatic fibrosis by secreting anti-fibrotic cytokines, influencing hepatic stellate cells and expressing matrix metalloproteinase-9. Here, we review the current researches on the mechanism of BMSCs in liver fibrosis to provide reference and guidance for researchers engaged in the treatment of liver fibrosis.

Key Words: Bone marrow stem cell; Liver fibrosis; Therapy

Lan L, Chen YW, Li DG. Mechanism of action of bone marrow stem cells in treatment of liver fibrosis. *Shijie*

Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(2): 180-184

摘要

近年来, 骨髓干细胞(bone marrow stem cell, BMSC)在肝纤维化中的应用研究日益增多, 显示出一定的抗肝纤维化作用, 但具体机制尚不明确. 众多研究结果显示, BMSC可能主要从两方面发挥抗肝纤维化作用, 一是通过分化为功能性肝细胞、分泌生长因子和增强内源性肝细胞增殖来促进肝再生, 二是通过分泌抗纤维化细胞因子、影响肝星状细胞和表达基质金属蛋白酶-9来抑制肝组织纤维化的形成. 本文对骨髓干细胞在肝纤维化治疗中可能的作用机制作一系统阐述, 为从事骨髓干细胞移植治疗肝纤维化的研究者提供借鉴和指导.

关键词: 骨髓干细胞; 肝纤维化; 治疗

兰玲, 陈源文, 李定国, 骨髓干细胞在肝纤维化治疗中的作用机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 180-184

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/180.asp>

0 引言

肝纤维化是各种慢性肝病演变为肝硬化的必经阶段, 其在细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积的同时造成功能性肝细胞的相对减少, 设法补充丢失的肝细胞已成为近年来研究的热点. 细胞移植具有来源广泛、创伤性小和可重复进行等优点^[1]而备受关注. 骨髓干细胞(bone marrow stem cell, BMSC)具有易采集且能体外大量扩增^[2]、可自我更新并向多种类型细胞分化^[3]、体积较小利于进入肝实质区、自体移植而无免疫排斥^[4]和不涉及伦理道德问题^[5]等优势, 被认为是最具治疗潜力的供体细胞.

目前, 评价BMSC对肝纤维化治疗作用的研究日益增多. 虽然BMSC移植入肝后能保持的数量和质量尚无定论^[6-9], 但很多有关治疗方面的研究仍然取得可喜成果, 其抗纤维化作用已得到证实^[10-14]. 但其具体作用机制尚不明确, 目前

■同行评议者

李继强, 教授, 上海交通大学附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

认为BMSC对肝纤维化主要有两方面作用,即促进肝细胞再生和抑制肝组织纤维化形成,其对肝纤维化改善的影响可能是多因素的.以下我们对其可能的作用机制作一系统阐述.

1 BMSC促进肝细胞再生的可能机制

1.1 BMSC分化为功能性肝细胞, 弥补内源性肝细胞的减少 BMSC在肝纤维化组织内可分化为肝细胞,但在正常受体肝内的种植和分化比例很低^[6],这说明肝纤维化所致的持续肝损伤可能形成特殊的微环境,利于BMSC的靶向种植和分化^[15-17].

1.1.1 外周循环微环境的影响: 研究显示,使用肝衰竭患者血清体外培养的BMSC能向肝细胞分化,并认为其血清中存在循环性可溶性因子,直接刺激BMSC的早期肝样分化^[18]. Hong *et al*^[17]研究发现肝损伤大鼠血清体外培养的骨髓基质细胞可表达非成熟肝细胞表型M2型丙酮酸激酶和发育期肝细胞表型Integrin- β 1,但并不表达成熟肝细胞表型L型丙酮酸激酶和白蛋白,他们对此有两种解释:(1)可能是肝损伤血清的刺激强度和时间不够;(2)可能是存在于肝损伤血清中的信号分子仅对BMSC的早期激活和定型起作用,而最终向肝细胞分化可能需要其他信号来刺激和诱导.

1.1.2 肝内微环境的影响: 动物实验表明,应激诱导的信号途径在生肝过程中起关键作用,多种炎症信号分子的基因被敲除后,大面积肝脏发生变性和退化^[19-20].因此,有人猜想可能是肝内某种与应激和炎症相关的未知信号促进和增强了BMSC的分化^[21].有学者通过微点阵分析联合自我组织图,对肝纤维化大鼠行BMSC移植后的基因激活分析显示,在BMSC分化早期,与形态学相关的基因上调,如同源异形盒、螺旋-环-螺旋转录因子和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGF);而在晚期,调节肝细胞分化的基因上调,如肝细胞核因子-4(hepatocyte nuclear factor-4, HNF-4)和葡萄糖-6-磷酸酶^[22].另外,蛋白组学分析显示,肝硬化小鼠在BMSC移植48 h后,脂类代谢激活,血清载脂蛋白a(apolipoprotein A1, apoA1)、载脂蛋白c3(apolipoprotein C3, apoC3)、维生素D结合蛋白(vitamin D-binding protein, DBP)、 α -抗胰蛋白酶(alpha-1-antitrypsin, AT)和I型蛋白酶体 α 亚基(proteasome subunit alpha type 1)5种蛋

白水平升高.其中apoA1在血清及肝内的表达持续1 wk,且与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在肝组织共表达,这说明BMSC移植后apoA1的表达与硬化肝脏的早期再生有关,apoA1可作为评价BMSC向肝细胞分化的有用指标^[23].上述两项研究分别从基因和蛋白水平初步揭示了肝纤维化微环境促进BMSC向肝细胞转化的分子机制.虽然具体的信号通路仍不清楚,但可以明确的是,肝纤维化所致的肝内局部微环境的改变很可能就是促进BMSC分化的“最终信号”.

BMSC向肝细胞的转化还与肝损伤的类型和严重程度相关^[24-25].一般来说,仅在肝损伤后的微环境有利于植入的BMSC生存的模型中,BMSC才会起到促进肝脏修复和存活的作用.有研究比较急、慢性肝损伤在骨髓源性肝细胞形成中的作用,结果显示,两种肝损伤均有利于骨髓源性肝细胞的形成和长期定植,其中慢性肝损伤更利于这一现象的持续存在^[26].另有研究对诱导肝损伤的CCl₄用量、注射次数和持续时间与BMSC在肝内种植和分化的比例进行比较,发现BMSC在肝内种植的数量和向肝细胞转化的比例均与肝损伤的严重程度呈正相关^[24],肝纤维化或肝硬化所致的慢性严重肝损伤可能更适于采取BMSC移植方法达到治疗目的.

最近有报道称,骨髓细胞能促进肝脏内的具有瘢痕形成功能的肝星状细胞和肌成纤维细胞的形成^[27],移植入肝纤维化患者^[28]或小鼠^[28-29]体内的BMSC更倾向于分化为上述两种细胞而非肝细胞,虽然数量不多,但在慢性肝损伤条件下能被激活,获得I型胶原转录活性,潜在地促进肝纤维化的发展^[29-30].因此,用于肝病治疗的BMSC移植研究必须警惕加重肝纤维化形成的可能^[27].目前,BMSC是否能分化为肝非实质细胞还不确定,明确二者之间的关系可能是明确BMSC如何影响肝纤维化的关键.

1.2 BMSC分泌多种生长因子,促进肝再生 Oyagi *et al*^[10]将大鼠骨髓间充质干细胞与损伤肝细胞体外共培养,培养液中的肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)含量较与正常肝细胞共培养者高,认为损伤肝细胞可能产生某种信号作用于BMSC,使其分泌HGF至胞外,而HGF可以促进BMSC分化^[6],且具有抗细胞凋亡活性,在纤维化肝脏的再生中起重要作用^[31-32].

另有研究发现,移植入肝纤维化大鼠体内的BMSC在肝内种植并共表达FGF和FGFR(FGF

■ 研发前沿

BMSC因其不可替代的多种优势而被认为是最具治疗潜力的供体细胞,而BMSC移植则被认为是最具应用前景的肝纤维化治疗措施之一,但其作用机制尚不完全清楚,需深入研究和探讨.

■创新盘点

近年来, BMSC在肝纤维化中的应用研究日益增多, 但大多致力于治疗效果的观察和评价, 对其作用机制的研究较少, 且较片面, 本文则首次对BMSC抗肝纤维化的可能作用机制作了较全面的归纳和系统的阐述。

receptor), 且肝组织中TNF- α 含量增加。此外, BMSC移植联合重组FGF2注射能显著提高受损肝组织中TNF- α 表达水平, 增加血清白蛋白含量, 明显改善肝脏功能和预后, 提高存活率。由此认为, FGF2是肝纤维化再生治疗中最重要的生长因子, 且能通过激活TNF- α 信号途径促进BMSC分化为功能性肝细胞^[33]。Sato *et al*^[34]发现, 种植于肝内的BMSC能分泌FGF2, 从而促进毛细血管上皮细胞的再生, 利于血管生成, 在局部为组织再生创造有利的微环境。

1.3 BMSC促进受体自身内源性肝细胞的增殖 Yannaki *et al*^[8]将BMSC注入用粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)预处理的慢性肝损伤小鼠模型体内, 结果发现, 种植于受体肝脏的外源性BMSC很少, 但受体自身的肝细胞增殖较明显, 肝损伤恢复较迅速, 认为其主要源于G-CSF与局部微环境相互作用, 动员自身造血干细胞向受损肝脏归巢, 促进内源性肝再生过程, 而并非完全依赖外源性BMSC对受体肝组织的修复。不过他们仍认为, 少量外源性BMSC迁移至损伤部位极可能是诱导内源性修复机制所必需, BMSC可能通过潜在的旁分泌功能产生并分泌营养因子和信号, 从而启动或触发内源性肝修复程序, 最终通过受体自身的肝细胞来修复损伤, 这可能就是“旁观者效应”。已有研究证实, BMSC能逆转小鼠高血糖症, 其机制可能是外源性BMSC与受体胰腺上皮细胞相互作用, 从而诱导内源性胰腺组织的修复^[35], 这一机制在肝组织修复中尚未得到证实, 需进一步研究和阐明。

2 BMSC抑制肝组织纤维化形成的可能机制

虽然BMSC在肝纤维化组织中能分化为肝细胞, 起到一定的促肝再生作用, 但其数量有限, 并不能靠自身直接代替损伤细胞来挽救受体的肝脏功能^[9]。此外, 由于肝纤维化具有不同于其他类型肝病(如急性肝衰竭和遗传代谢性肝病等)的特殊病理特征, 即除了功能性肝细胞相对减少外, 还存在ECM的过度沉积。目前认为, BMSC可能还通过多种方式抑制肝组织纤维化的形成。

2.1 BMSC分泌细胞因子改变种植部位的微环境 多个研究发现, 种植于肝脏的BMSC通过旁分泌形式分泌多种细胞因子和生长因子, 如IL-10^[36]、TNF- α ^[37]、GM-CSF^[8]、HGF^[10]和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)^[38]等, 使他们

的肝内甚至血清水平增加, 在促进肝脏再生和修复的同时, 抑制肝脏炎症反应、促进ECM降解、改善凋亡诱导的肝损伤、提高血清白蛋白水平等^[6,39-40]。

2.2 BMSC影响肝星状细胞以减少ECM沉积 研究显示, 共培养BMSC和肝星状细胞时, 处于G₀期的肝星状细胞增多, S期的减少^[12], 而移植入体内的BMSC在肝内也能降解由激活的肝星状细胞形成的稳定网状结构。故BMSC可能影响肝星状细胞, 或通过诱导凋亡减少其数量^[11], 或通过减少TGF- β 1的分泌抑制肝星状细胞的激活^[14,41], 从而减少ECM沉积, 改善肝纤维化程度。

2.3 BMSC表达基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)以降解明胶 肝纤维化最重要的特征是肝组织内胶原纤维大量增加, 膜I型基质金属蛋白酶(membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP)能将间质内胶原降解为明胶^[42], 而MMP-9则能降解明胶, 导致纤维融解, 控制肝纤维化的进展^[11,43]。研究显示, BMSC在小鼠的纤维化肝脏内沿胶原纤维分布, 种植数量随时间而增加, 至少持续3 wk可被检测到, 并逐渐形成上皮样细胞, 高度表达MMP-9, 可能由此导致胶原纤维降解、Hyp含量减少和血清白蛋白水平升高, 从而减轻肝纤维化程度, 提高受体存活率^[11]。此外, BMSC向受损肝内迁移也与MMP-9表达增加有关^[44-45], MMP-9抑制剂使细胞种植数量减少^[45], 这说明BMSC表达的MMP-9还可能有利于BMSC的靶向种植。

3 结论

BMSC移植为众多肝纤维化甚至肝硬化患者带来曙光, 被认为是最具应用前景的治疗措施之一。但其作用机制尚不完全清楚, 需要深入研究和探讨。如BMSC多种亚群间的相互作用及迁移机制, BMSC靶向种植于纤维化肝脏的影响因素, BMSC在肝纤维化环境中的生物学特性, 决定BMSC在肝内向何种细胞系分化的微环境和机制以及其抗肝纤维化的具体信号途径等。如能阐明上述问题, 并针对性地采取一些措施来提高BMSC治疗肝纤维化的有效性和安全性, 将会为肝纤维化的治疗带来一场革新。

4 参考文献

- 1 Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, Brulport M, Gabelein G, Schormann W, Schulze M, Ellis E, Kraemer M, Nocken F, Fleig W, Manns M, Strom SC, Hengstler JG. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver

- diseases. *J Hepatol* 2006; 45: 144-159
- 2 Ong SY, Dai H, Leong KW. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. *Biomaterials* 2006; 27: 4087-4097
- 3 Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157-168
- 4 Inderbitzin D, Avital I, Gloor B, Keogh A, Candinas D. Functional comparison of bone marrow-derived liver stem cells: selection strategy for cell-based therapy. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1340-1345
- 5 Zhang Y, Bai XF, Huang CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 201-204
- 6 Luk JM, Wang PP, Lee CK, Wang JH, Fan ST. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *J Immunol Methods* 2005; 305: 39-47
- 7 Shackel N, Rockey D. In pursuit of the "Holy Grail"-stem cells, hepatic injury, fibrogenesis and repair. *Hepatology* 2005; 41: 16-18
- 8 Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, Proya E, Anagnostopoulos A, Fassas A. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005; 33: 108-119
- 9 Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 Suppl 1: 11850-11853
- 10 Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J Hepatol* 2006; 44: 742-748
- 11 Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1304-1311
- 12 Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3431-3440
- 13 Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada T, Sakaida I, Nishina H, Okita K. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 1110-1118
- 14 Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004; 78: 83-88
- 15 Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise ND, Segovia JC. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology* 2006; 43: 108-116
- 16 Chien KR. Stem cells: lost in translation. *Nature* 2004; 428: 607-608
- 17 Hong H, Chen JZ, Zhou F, Xue L, Zhao GQ. Influence of serum from liver-damaged rats on differentiation tendency of bone marrow-derived stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2250-2253
- 18 Yamazaki S, Miki K, Hasegawa K, Sata M, Takayama T, Makuuchi M. Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *J Hepatol* 2003; 39: 17-23
- 19 Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* 1999; 284: 321-325
- 20 Nishina H, Vaz C, Billia P, Nghiem M, Sasaki T, De la Pompa JL, Furlonger K, Paige C, Hui C, Fischer KD, Kishimoto H, Iwatsubo T, Katada T, Woodgett JR, Penninger JM. Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4. *Development* 1999; 126: 505-516
- 21 Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 2003; 134: 551-558
- 22 Omori K, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Sakaida I, Nishina H, Shinoda K, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression. *FEBS Lett* 2004; 578: 10-20
- 23 Yokoyama Y, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Urata Y, Marumoto Y, Nishina H, Nakamura K, Okita K, Sakaida I. Proteomic analysis of serum marker proteins in recipient mice with liver cirrhosis after bone marrow cell transplantation. *Proteomics* 2006; 6: 2564-2570
- 24 Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539
- 25 Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001; 33: 738-750
- 26 Masson S, Harrison DJ, Plevris JN, Newsome PN. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review. *Stem Cells* 2004; 22: 897-907
- 27 Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130: 1807-1821
- 28 Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 955-963
- 29 Baba S, Fujii H, Hirose T, Yasuchika K, Azuma H, Hoppo T, Naito M, Machimoto T, Ikai I. Commitment of bone marrow cells to hepatic stellate cells in mouse. *J Hepatol* 2004; 40: 255-260
- 30 Kisseleva T, Uchinami H, Feirt N, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Schwabe RF, Brenner DA. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol* 2006; 45: 429-438
- 31 Matsuda Y, Matsumoto K, Ichida T, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses the onset of liver cirrhosis and abrogates lethal hepatic dysfunction in rats. *J Biochem* 1995; 118: 643-649
- 32 Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y,

■应用要点

本文为从事BMSC移植治疗肝纤维化的研究者提供了借鉴和指导。如能深入研究并阐明具体作用机制,并针对性地采取一些措施来提高BMSC治疗肝纤维化的有效性和安全性,将会为肝纤维化的治疗带来一场革新。

■同行评价

本文选题角度较新,行文流畅,对该领域的研究提出了一些问题,引用的参考文献较新,具有一定的学术价值和参考价值.

- Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999; 5: 226-230
- 33 Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Sakaida I, Murata T, Nishina H, Shinoda K, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Fibroblast growth factor 2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. *Cell Tissue Res* 2006; 323: 221-231
- 34 Sato Y, Matsui K, Ajiki T, Igarashi Y, Takahashi M, Murakami T, Hakamata Y, Tabata Y, Kobayashi E. Can a bone marrow cell contribute to organ regeneration? In vivo analysis using transgenic rats with reporter genes. *Transplant Proc* 2005; 37: 273-275
- 35 Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, Thyssen S, Gray DA, Bhatia M. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 763-770
- 36 Thompson K, Maltby J, Fallowfield J, McAulay M, Millward-Sadler H, Sheron N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 1998; 28: 1597-1606
- 37 Tilg H, Jalan R, Kaser A, Davies NA, Offner FA, Hodges SJ, Ludwiczek O, Shawcross D, Zoller H, Alisa A, Mookerjee RP, Graziadei I, Datz C, Trauner M, Schuppan D, Obert P, Vogel W, Williams R. Anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2003; 38: 419-425
- 38 Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002; 59: 514-523
- 39 Takeda M, Yamamoto M, Isoda K, Higashiyama S, Hirose M, Ohgushi H, Kawase M, Yagi K. Availability of bone marrow stromal cells in three-dimensional coculture with hepatocytes and transplantation into liver-damaged mice. *J Biosci Bioeng* 2005; 100: 77-81
- 40 Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004; 109: 1543-1549
- 41 Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol* 2005; 38: 197-202
- 42 Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 1997; 272: 2446-2451
- 43 Roderfeld M, Weiskirchen R, Wagner S, Berres ML, Henkel C, Grotzinger J, Gressner AM, Matern S, Roeb E. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. *FASEB J* 2006; 20: 444-454
- 44 Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002; 109: 625-637
- 45 Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112: 160-169

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2007)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2006年从6500种统计源析出的290余万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2006-01/12全文下载记录(2.1亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号:ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称:医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2611,影响因子为0.460,5年影响因子为0.482,即年指标为0.148,他引总引比为0.80,被引期刊数为585,被引半衰期为4.6,2006载文量为696,基金论文比为0.44,Web即年下载率为17.7.[中国学术期刊(光盘版)电子杂志社;中国科学文献计量评价研究中心].

肝纤维化过程中血液动力学因素对肝星状细胞的影响

陈 骧, 徐世荣, 吴云鹏

陈骧, 徐世荣, 吴云鹏, 重庆大学生物工程学院 重庆市 400044

作者贡献分布: 陈骧对此文作主要贡献; 此课题由陈骧, 徐世荣, 吴云鹏提出设计; 徐世荣, 吴云鹏对文章提出了修改意见并进行了审阅, 文章思路及写作由陈骧完成。

通讯作者: 徐世荣, 400044, 重庆市, 重庆大学生物工程学院。

xushirong05@tom.com

电话: 023-61380345 传真: 023-65112543

收稿日期: 2007-06-26 修回日期: 2008-01-02

Influence of hemodynamic factors on hepatic stellate cells during hepatic fibrosis

Xiang Chen, Shi-Rong Xu, Yun-Peng Wu

Xiang Chen, Shi-Rong Xu, Yun-Peng Wu, Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China

Correspondence to: Shi-Rong Xu, Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China. xushirong05@tom.com

Received: 2007-06-26 Revised: 2008-01-02

Abstract

Hepatic stellate cells (HSCs) play a central role in the development of liver fibrosis. In liver fibrosis, intrahepatic resistance and splanchnic blood flow are increased. Inflammation, hepatic sinusoid capillarization, portal hypertension are very important factors in the hemodynamics of liver. In order to study the influence of hemodynamic factors on HSCs during hepatic fibrosis, this paper describes the activation and expression of extracellular matrix in HSCs as well as hepatic vascular reconstruction when changes occur in the hemodynamics of liver fibrosis, in terms of the biomechanics of liver fibrosis mechanism to further understand the role of stress in the process of hepatic fibrosis. Based on the large number of literatures, we can draw a conclusion that an appropriate level of mechanical stress can activate HSCs, produce extracellular matrix (ECM), and accelerate liver regeneration.

Key Words: Inflammation; Hepatic stellate cells; Hemodynamics; Mechanical stress; Extracellular matrix; Liver fibrosis

Chen X, Xu SR, Wu YP. Influence of hemodynamic factors on hepatic stellate cells during hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 185-191

摘要

肝纤维化过程中, 肝脏炎症、胞外基质纤维化、肝血窦毛细血管化等, 无不对肝脏血流动力学造成影响, 表现为肝内血流阻力增加、门脉高压出现等。在肝纤维化过程中, 肝星状细胞发挥了关键作用。为了研究肝纤维化过程中肝星状细胞(HSC)所处环境的血液动力学因素变化对肝纤维化进程的影响, 本文综合探讨肝纤维化发生、发展过程中肝脏血液流体力学变化及其对肝星状细胞激活、胞外基质表达、肝脏血管重建的作用, 从生物力学的角度探讨纤维化机制, 以达到进一步明确应力在肝纤维化过程中的作用。

关键词: 炎症; 肝星状细胞; 血液动力学; 机械应力; 胞外基质; 肝纤维化

陈骧, 徐世荣, 吴云鹏. 肝纤维化过程中血液动力学因素对肝星状细胞的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(2): 185-191

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/185.asp>

0 引言

既往研究表明, 肝纤维化是各种原因导致肝脏损害后的一种修复过程^[1-2], 是导致肝衰竭、门脉高压的重要病变^[3], 进展为肝硬化是肝纤维化的必然结局。目前, Parsons *et al*^[4]学者普遍认为肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝脏合成细胞外基质(ECM)的主要细胞, 不同病因导致肝纤维化的共同途径是肝星状细胞激活转化为肌成纤维细胞, 合成大量的ECM, ECM分泌增加, 降解减少, 以致其在肝内大量沉积, 肝纤维化逐渐形成。HSCs是伴有乙肝病毒、丙肝病毒、遗传性血色素沉着病、胆道闭锁、囊肿性纤维化、酒精性肝脏疾病的肝纤维化和肝硬化的效应细胞^[5-6]。Safadi *et al*^[7]研究表明, 肝纤维化在去除损伤因素后尚有逆转的可能, 大大激发了人们对肝纤维化发病机制的研究。

■背景资料

肝纤维化诱发因素有多种, 病理过程的机制复杂。研究人员主要从生物、化学的角度来研究肝纤维化, 而目前生物力学的研究成果表明, 机械力能够刺激成纤维细胞、平滑肌细胞的增殖及胞外基质成分的表达。激活的肝星状细胞作为肝纤维化过程中肝脏胞外基质成分的主要产生者具有成纤维细胞和平滑肌细胞的相关特点, 并且对肝纤维化过程中肝脏中的血液动力学因素发生了明显的变化。因此, 考察机械力对肝星状细胞增殖和胞外基质表达的影响是有必要的。

■同行评议者

陈红松, 副研究员, 北京大学人民医院, 北京大学肝病研究所

■研究前沿

运用生物力学的方法研究肝纤维化目前还处于起步阶段,而生物力学在研究血管重建、门脉高压对门静脉重建方面已经取得了丰硕的成果。本文从肝纤维化过程中肝脏血液循环的变化入手,考察肝纤维化过程中肝星状细胞所受机械力的变化,结合已有的体外细胞力学研究成果,对肝纤维化过程中肝星状细胞胞外基质的表达从力学的角度加以解释。由于对肝星状细胞的生物力学研究还处于起步阶段,今后还需要进一步研究肝纤维化过程中肝脏血液循环的变化及其对肝星状细胞的影响。

在肝纤维化过程中肝脏的组织压力、血液流体力学发生了明显的变化,而处于肝血窦壁的肝星状细胞对肝脏血液循环的调节起重要作用,同时他也必然受到肝血流动力学变化的影响。而机械力对平滑肌细胞、成纤维细胞、血管重建作用的研究卓有成效,激起了人们从力学的角度探讨应力对肝星状细胞的影响,进而揭示机械力在肝纤维化过程中的作用,以从不同的角度探讨肝纤维化机制。

1 肝脏血液循环的特点及肝星状细胞的调节作用

1.1 肝脏血液循环的特点 肝脏由门静脉与肝动脉双重供血,成人休息状态每分钟流经肝脏的血液高达1500-2000 mL,约占心输出量的25%-30%。正常肝脏门静脉血供占60%-70%,肝动脉血供占30%-40%。

门静脉经多次分支形成入口微静脉,入口微静脉管壁无平滑肌,但与血窦相连处内皮细胞较大,富微丝,细胞舒缩形成肝腺泡的入口括约肌(inlet sphincter),调节肝腺泡内的门脉血流。肝动脉与门静脉分支在行程中可直接吻合,从而使肝动脉终末端的血压下降、血流减慢,而门静脉终末端的血压升高、血流加速,使肝动脉与门静脉终末支进入血窦前的血压与流速得以平衡,加上终末微动脉及入口静脉壁内皮细胞的调节作用和吻合丰富的小叶周围血窦的减压作用,使进入小叶血窦的血液流量、流速得以控制。肝动脉的血液仅有一小部分直接进入血窦,大部分经过各种通路流经门静脉后再进入肝血窦。在动脉分叉处、终末微动脉与血窦连接处、肝动脉-门静脉吻合支等均有括约机制。这些分支血管运动时对血窦的血流及压力起主要调节作用。肝血窦可开口于中央静脉,开口处内皮细胞的舒缩形成出口括约(outlet sphincter)控制血窦内血液的输出。中央静脉与小叶基部的小叶下静脉垂直连接,在同一平面内,如有二条中央静脉与肝静脉属支相连,则夹角为120度。肝血窦(hepatic sinusoid)位于肝板之间的陷窝内,是肝脏特殊形态的毛细血管,通过肝板孔而连接成网,宽大而不规则。入血窦呈囊状,直径20-30 μm 。腺泡 I 带血窦表面积与腔容积之比较大,窦腔窄而弯曲,血流缓慢,便于物质交换。III带血窦较直而宽,血流快,易进入中央静脉。窦内血流速度不同,直窦快,而连接部分慢^[8]。

肝脏微血管也接受来自于两种血管的血液:末端入口微静脉(the terminal portal venule, TPVn)

和末端肝微动脉(the terminal hepatic arteriole, THAo)。TPVns直接与肝实质中的毛细血管床即肝血窦相联系^[9]。THAo和肝窦间急剧的压力梯度是通过THAo末端的毛细血管前括约肌的舒缩来维持的,同时受到肝窦内皮窗口的舒缩调节,特别是门管区(zone 1)。肝动脉是为肝窦血液、胆管、门静脉和门管区神经提供氧所必须的,在肝窦微循环的调节中,肝动脉系统为肝窦血流的平稳和恒定提供动力,肝门静脉系统是肝血窦血流的主要调节者^[10]。

1.2 肝星状细胞对肝脏血流的调节作用 HSC占人类肝脏全部细胞的5%-8%,肝血窦细胞的13%。星状细胞位于前肝血窦Disse隙内皮屏障下,他们有长的细胞质突起与肝窦内皮壁相平行,从突触上生出分支包绕窦状隙,并且经肝细胞间穿过到达相邻的窦状隙^[11]。HSC具有平滑肌特点,具有收缩性。HSC在形态和超微结构特点上与其他器官中调节局部血流量的周细胞相似,显示肝星状细胞是肝脏特殊的周细胞。对各种血管活性物质的收缩和舒张能力也说明这些细胞可能在肝血窦水平对调节肝内血管阻力和血流量起作用^[12-14]。内皮素(endothelin, ET)、组胺、血管紧张素等血管活性物质使体外培养的星状细胞发生收缩;一氧化氮(nitric oxid, NO)、一氧化碳使其舒张。显微镜下活体观察,也观察到ET引起肝窦收缩,并证明肝窦收缩部位与星状细胞本身的荧光区是一致的^[15],其中内皮素-1(ET-1)的反应最强烈^[16]。肝星状细胞的解剖学位置及其对这些生物化学物质的反应说明了他们在肝脏血液循环中发挥了重要作用。

2 肝纤维化过程中肝脏血流动力学的变化

2.1 肝纤维化的病因 肝纤维化是病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪肝、中毒性肝病、自身免疫性肝病、胆道阻塞等生物、化学、物理因素导致肝脏损害后的一种修复过程,胞外基质过度积累而造成肝功能障碍。其间HSC激活、转化为肌成纤维细胞,合成大量的细胞外基质(ECM),从而使ECM降解减少,以致其在肝内大量沉积,肝纤维化逐渐形成。

活化的HSC特征发生一系列改变,包括^[11]: (1)增生频率增加; (2)由静止的HSC转分化为MFB; (3)储存的脂滴、维生素A减少或消失; (4)表达标志性蛋白- α -肌动蛋白和细胞珠蛋白(Cygb); 表达波形蛋白(vimentin)及结蛋白(desmin); (5)收缩性增强: 肝脏损伤时内皮细胞及活

化的HSC合成ET增加, 作用于HSC表面的特异性内皮素受体(endothelin receptor, ETR), 引起细胞收缩, 导致肝内微循环收缩和肝窦血管阻力升高, 促进肝硬化门静脉高压的发展; (6)分泌ECM增加: 活化的HSC是ECM生成的主要来源, 可分泌I、III、IV型胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、透明质酸等多种ECM成分. TGF- β 1是增加ECM分泌的最强因子; (7)分泌趋化因子及细胞因子, 如单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、HGF、白细胞介素10(IL-10)等; (8)TIMP合成和分泌增加: HSC激活后分泌TIMP-1、TIMP-2增加, 抑制MMP对ECM的降解, 从而促进肝纤维化的形成. 其中细胞增殖与纤维生成增强是重要特征.

胶原约占肝脏蛋白总量的5%-10%, 当肝脏发生纤维化时, 胶原蛋白可增加到50%左右. 正常肝脏一般以I、III型胶原各占40%, I/III型比例约为1. 肝硬化时I/III型比例增加, 晚期肝硬化I/III型比例可增至3左右. 肝脏慢性损伤时, I型胶原显著增多, 使正常肝内I/III型胶原比例倒置, 取代狄氏间隙的IV胶原, 导致肝窦毛细血管化与肝纤维化^[17]. 转化生长因子 β 1(TGF- β 1)是促肝纤维化的关键细胞因子, 慢性肝损伤时TGF- β 1以自分泌和旁分泌两种形式促进HSC活化, 使HSC细胞向肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)转化并生成大量ECM, 导致肝纤维化^[18].

2.2 肝纤维化病因对肝脏血流动力学影响 几乎所有慢性乙肝患者均有肝脏微循环障碍, 包括肝功能正常的患者, 主要表现在肝窦腔狭窄. 轻度时即见肝细胞肿胀, 气球样变性, 压迫肝窦, 造成肝窦腔狭窄, 偶尔见肝窦腔不规则狭窄与扩张并存. 重度慢性乙型肝炎(chronic viral hepatitis B, CHB)患者肝窦部位被胶原纤维填充, 严重者肝窦腔闭塞、消失. 随着病情加重, 微血栓形成率增加, 微血栓周围肝细胞有溶解坏死表现. 个别患者还见中央静脉内有微血栓形成^[19]及肝窦毛细血管化等, 引起肝窦阻力增加, 这些因素均可导致门静脉压力升高. 门脉高压是侧支循环形成的始动因素. 在正常情况下, 绝大部分的门静脉血经肝静脉回流, 而在肝硬化过程中经肝静脉回流的血流量可降低至门静脉血流量的13%, 其余进入侧支循环^[20]. 门静脉压力的增高是门脉阻力增高与血流量增多的共同作用的结果^[21].

肝脏纤维化对门静脉系统小分支及肝窦造成不同程度的压迫, 导致肝内血管阻力增加, 门静脉血流量增加, 引起门静脉高压, 表现为门静

脉和脾静脉增宽、脾脏增厚^[22].

狗的肝脏血流动力学变化会迅速地反应在胆道压力上, 楔形肝静脉压(wedged hepatic venous pressure)和门脉压随胆管压力升高则都升高, 相反胆管快速减压则两者也紧跟着下降, 显示胆管压力的变化可通过肝血窦影响肝脏血流动力学^[23], 反映了胆道闭塞能够引起肝血窦血压上升.

体外实验也表明, 高浓度乙醇减弱空肠环形肌条收缩振幅, 平滑肌收缩蛋白的合成速率减慢, 对空肠平滑肌收缩具有直接抑制作用. 在另外的研究中也发现乙醇抑制了膀胱平滑肌和血管平滑肌的收缩. 十二指肠和静脉灌流乙醇都减弱Oddi括约肌的运动, 抑制Oddi括约肌的收缩振幅^[24]. 乙醇是引起肝硬化的常见病因, 由这些研究可推断他也会改变肝脏的血液循环状态.

2.3 机械力对相关细胞的影响 肝星状细胞是肝脏特殊的血管周细胞, 激活后表现为成纤维细胞、肌成纤维细胞表型, 具有平滑肌细胞和成纤维细胞的性质, 且星状细胞在内脏中广泛分布. 因此, 我们有必要了解这些相关细胞的一些力学响应特性.

机械力作为各种组织中细胞形态和功能的重要调节因素, 能快速诱导血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)受体磷酸化、整合素受体活化、拉伸激活阳离子通道、G-蛋白. 他们可以作为力学传感器, 一旦感受到机械力, 蛋白激酶C和有丝分裂原活性蛋白激酶(MAPKs)被激活, 导致c-fos和c-jun基因表达并提高转录因子AP-1 DNA-结合活性. 机械应力能够直接拉伸细胞膜并改变受体或G蛋白的结构, 从而激活生长因子等信号传输途径^[25].

机械力对心血管系统的正常生理功能有重要影响, 他能使血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)肥大和增殖而促进动脉硬化、高血压、心血管再狭窄的发生、发展. 高压力和高血流量均可引起血管重建, 前者导致的血管重建是正反馈过程, 其管壁增厚、管腔变窄, 使血压进一步升高; 高流量则引起内外径增大, 使流量降低以达到一种稳定值^[26]. 血流状态变化也调节血管平滑肌细胞的数量. 跨壁压能直接作用于血管中膜平滑肌, 使之自身生长调节因子基因表达增强, 促使DNA和细胞外基质合成而影响血管壁的构建^[27]. 许多研究表明, 压力、切应力与周向张力升高, 可引起血管

■ 相关报道

对不同性质的机械力、同一种力的加载方式、力的加载时间细胞的响应不同. 冯元桢先生在他的作品《生物力学-运动、流动、应力和生长》中提出了关于组织和器官生长和应力关系的新假说, 并获得了众多实验的支持. 对胰腺星状细胞、肾小球膜系细胞、平滑肌细胞的力学研究均认为机械力能够影响细胞的增殖和胞外基质的表达. 这些研究成果都为本文提供了实践和理论基础.

■创新盘点

本文探讨了肝纤维化过程中肝脏血液动力学因素对肝星状细胞的影响;探讨了用生物力学的手段来研究肝星状细胞的可能性。以前的研究主要集中于机械拉伸对肝星状细胞的影响的研究。本研究发现在纤维化过程中肝血窦内血压有明显的增加,而肝内血管管径却随着肝纤维化的发展不一定增大,相反还有一部分血管管径缩小、甚至是小血管消失,提出了压力可能是影响肝星状细胞胞外基质产生的一个重要因素。

平滑肌细胞多种基因转录及表达上调,包括血小板衍生生长因子(PDGF)、TGF- β 、抑癌基因p53等,从而参与调节VSMCs的增殖。一定强度的静压力对细胞增殖、肌动蛋白和胶原蛋白的表达等也有重要影响。

机械力中的压力和流体剪切力是高血压和动脉硬化症的重要病因。140-180 mmHg的压力作用于人类大动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cells, HASMC), DNA的合成呈压力依赖性的方式,而小于或等于120 mmHg没有显著的变化,超过160 mmHg,则胞外信号调节激酶和c-jun N-端激酶活化^[28]。O'Callaghan *et al*^[29]发现,机械应变诱导血管平滑肌细胞TGF- β 1的增加。另有研究认为,高血压状态下,TGF- β 1增加可以增强其他生长因子(如PDGF、bFGF、EGF等)对VSMCs增殖的促进作用^[30],与体外高血压动物模型所观察到的结果相似,显示压力升高是引起高血压动脉重建中VSMC增殖加强的重要原因。Roelofsen *et al*^[31]采用最大为13 kPa, 0.3 Hz的间断压力作用于成骨细胞,其肌动蛋白和胶原蛋白的表达上调。静息的膜系细胞受到Flexercell Strain Unit 100B拉伸/松弛48 h,用荧光标记的I、III和IV型胶原抗体免疫染色检测胞外基质48 h后I、III、IV型胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白也增加。膜系细胞持续拉伸/松弛导致其细胞形态从正常的星形变为带状外观,细胞的长轴垂直于应力方向排列,拉伸/松弛12 h TGF- β 1 mRNA水平没有显著的变化,而24 h则显著增加^[32]。

很多信号分子都与机械转导过程有关,已证明整合素、G蛋白和Na⁺/H⁺泵是潜在的力传感器,而细胞内钙和细胞骨架是最为重要的力信号转导组分^[33]。MAPK和JAK/STAT途径作为机械应力诱导信号转导潜在的参与者,对机械力在细胞中的转导具有重要的作用。张应力比压应力对ERK, c-fos mRNA和c-fos蛋白显示更敏感和强烈的影响。这个发现指出,不同力学环境下的实验结果可能没有可比性。此外,因细胞加载同一幅度的压力和张力得出一些不同的结果,可以推测他们的机械转导机制可能不完全相同。不同特点的应变可能激活不同的信号转导途径或不同程度地活化同一途径。在张应力诱导下,RTK发挥的作用比细胞骨架重要得多。但是在压应力诱导下,细胞骨架更为重要,完整的细胞骨架是压力信号转导所必须的^[34]。

2.4 肝星状细胞相关的体外力学研究 采用旋转

辐流式生物反应器作为机械应力加载装置,对复合培养的、分离自大鼠的肝实质细胞和非实质细胞提供机械应力加载,当转速30 r/min时,6 h后,白蛋白的产生量达到最多;LDH的测定作为细胞损坏的一个标记物,在静态培养和应力加载条件下肝实质细胞和非实质细胞复合培养物中没有显著的变化;而IL-6在应力加载条件下所有的时间点均有显著升高;HGF在应力加载培养早期产生,3-6 h可以检测到,随后降低到检测极限水平以下,静态培养实验中HGF一直处于检测极限水平以下。应力加载培养36 h后电子显微镜观察,显示肝细胞有良好的保护结构,细胞表面有微绒毛,静态培养细胞表面有其破坏的显著空隙^[35]。

用Flexer(四点弯曲)细胞应力装置0.5 Hz、10%的振幅循环拉伸人肝星状细胞系LI90,拉伸的LI90细胞,MMP1的浓度相对不拉伸细胞增加,而MMP2, TIMP1和TIMP2浓度显示下降。但是I型胶原C末端肽(I CTP), III型胶原前肽(P IIP)、和透明质酸的变化没有显著差别^[36]。

使用Flexercell加载装置FX-2000对人工培养的人肝星状细胞系LI90 0.5 Hz、10%振幅周期性拉伸,从2 h到24 h,拉伸的肝星状细胞与未拉伸的肝星状细胞相比,TGF- β 的浓度呈时间依赖性增加,转化生长因子 β mRNA的表达也有所增加。转染Rho因子的阴性突变体后,则抑制了拉伸诱导的TGF- β 合成。Rho因子是一种与细胞黏附性和细胞骨架密切相关的分子,在力传导中扮演非常重要的角色,说明在肝星状细胞中,Rho与拉伸诱导的TGF- β 合成有密切关系^[37]。

胰腺星形细胞在胰腺纤维化过程中起中心作用。在慢性胰腺炎中,胰腺组织压力比正常胰腺的压力高,采用添加压缩氢气给压力加载装置中增加压力。在给定的压力水平分别为40 mmHg、80 mmHg、120 mmHg条件下,对胰星状细胞作用60 min,压力显著促进BrdU渗入,特别是80 mmHg时;80 mmHg压力还显著提高 α -SMA水平;80 mmHg 60 min后,I型胶原mRNA的表达增多,加载后培养48 h期间胰腺星形细胞分泌到培养基中的胶原与对照组相比有显著的增加^[38]。

进行性的肾脏疾病导致肾小球长期处于高血压环境,这诱导了肾小球膜系细胞的增殖。这种增殖被认为与肾脏损伤的发展相关。在压力加载MAPK(Tyr-204)后,磷酸化水平在1 min内快速达到一个峰值。发现压力加载是一种新的

MAPK激活因素,诱导酪氨酸激酶的活性,增加肾小球膜系细胞的增殖,可能是通过细胞周期蛋白D1的表达来实现^[39]。

这些研究均表明,外力的变化不仅会促进肝星状细胞的增殖,还会提高其胶原等胞外基质的表达水平。

2.5 胞外基质对肝星状细胞的影响 胞外基质(extracellular matrix, ECM)是细胞黏附、生长、分化的底物,并且为组织提供机械支持。已熟知的结缔组织细胞在机械加载中随其胞外基质的变化而变化。这必然存在一种反馈机制,即通过细胞调整蛋白表达的模式来感知机械应力,以重建胞外基质的模式去适应机械力变化的需求^[40]。肝星状细胞的形态、增殖、胶原合成根据基底的性质而不同。在基底膜凝胶上,肝星状细胞形成网孔状结构且增殖慢。在没有涂聚苯乙烯和有I型胶原涂层的培养皿上细胞分散良好且伸出细胞突起。生长在涂有I型胶原涂层上细胞较生长在聚苯乙烯器皿中的细胞增殖快,且合成的胶原的量也更多^[41]。在聚苯乙烯表面或氨基烷基硅烷涂层的玻璃上,HSC显示一种平的、成纤维状形态,应力纤维发育良好,没有细胞突起。而培养在I型胶原凝胶上可导致HSC变长,多极细胞突起,培养在基质凝胶上则保持圆形。而培养于I型、IV型胶原涂层容器中的HSC没有观察到突出。在IV型胶原、层粘连蛋白、蛋白聚糖、巢蛋白组成的基质凝胶上HSC保持圆形。不同的培养基质对肝星状细胞的细胞骨架也有影响。

在培养于I型胶原凝胶上的细胞中黏附斑分布于接近细胞与胶原纤维接触的底面和伸入胶原凝胶的细胞突出中。酪氨酸磷酸化蛋白与黏附斑有相似的分布,在I型胶原凝胶上培养的肝星状细胞突出的尖端丝状伪足的信号特别强烈。暗示在细胞突出扩张期间一种活性蛋白磷酸化^[42]。这些结果显示肝星状细胞的形态、增殖和胶原代谢受到胞外基质调节。

3 结论

根据冯元桢^[26]提出的应力-生长法则,组织的生长取决于应力和应变。根据这一法则,肝脏血液动力学的改变必然对肝脏内的结构重建产生重要影响,肝星状细胞也相应受到力学环境变化的影响。如血液对肝脏内血管壁的压力、周向拉伸及血液的剪切作用。且随着肝纤维化的发展,肝窦愈来愈狭窄,压力不断升高,甚至出现

肝窦血液向门脉倒流现象,因而血液压力的影响相对变得重要。相关的细胞力学研究表明,应力对于细胞的激活、增殖、胞外基质的表达、血管重建均有重要的影响。据此,根据肝星状细胞本身的生物学特性及其在肝纤维化中的性状变化,我们推测:肝脏血液动力学的改变可能对肝星状细胞的激活、增殖和胞外基质的表达存在重要的影响。

由于肝脏血液循环系统结构本身和供血的复杂性,目前在肝脏血液动力学方面还缺乏微观、系统的力学分析。肝星状细胞的力学响应方面的研究仍是初露端倪,且体外不同的力及加载方式对细胞有不同响应,因此还需要了解在肝纤维化过程中血液动力学特点的基础上,弄清各种应力肝星状细胞的增殖、细胞因子和ECM表达等规律。在肝纤维化过程中机械力对肝星状细胞是通过什么途径对肝纤维化起作用,机械力能引起胞外基质成分的变化,胞外基质成分的变化对体内肝星状细胞有何影响,机械力对肝星状细胞贮存维生素A有无影响,都有待进一步研究。

肝纤维化的治疗主要是祛除病因、防止肝细胞坏死和损伤、抑制肝星状细胞(HSC)活化和增殖、促进HSC凋亡、促进细胞外基质(ECM)降解等多环节。这些现象大多也出现在细胞力学的研究中,因而从力学细胞生物学角度探讨肝纤维化的病理机制或许能够为阐明肝纤维化发生发展机制提供新的依据,为新型抗肝纤维化药物的研究开发提供新的思路,为临床治疗门脉高压的血流分流手术,如血流分流量、血压分配量等提供参考,为肝纤维化的临床早期诊断提供新的思路和力学细胞生物学依据。比如,结合肝门静脉形态变化监测,建立相关数学模型,通过预测肝内血压预报肝纤维化发生的可能性或程度。

4 参考文献

- 1 Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-S53
- 2 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
- 3 萧瑶, 宋后燕. 肝星形细胞在肝纤维化发生及治疗中的作用. *生命的化学* 2005; 25: 391-393
- 4 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,

■应用要点

本文通过对肝星状细胞及相关细胞力学研究成果的综述,为今后对星状细胞的生物力学研究指出一个方向,最终能为肝硬化门脉高压手术时间、分流量提供理论基础;建立血流量压力关系的数学模型,为肝纤维化早期的体外诊断提供有意义的探讨;从而从阻断力学信号转导途径开发一些药物来阻止肝纤维化的发展。

■名词解释

生物力学: 就是应用于生物学的力学, 是用来探索了解生命系统的力学问题, 有助于人们了解器官的正常生理功能, 预言其本身的变化而引起, 并提出人为干预的方法。

- 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
- 5 Lewindon PJ, Pereira TN, Hoskins AC, Bridle KR, Williamson RM, Shepherd RW, Ramm GA. The role of hepatic stellate cells and transforming growth factor-beta(1) in cystic fibrosis liver disease. *Am J Pathol* 2002; 160: 1705-1715
- 6 Iredale JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ* 2003; 327: 143-147
- 7 Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
- 8 吴志全, 夏景林, 邱双键. 正常肝脏微循环及研究进展. *中国微循环* 1999; 3: 10-12
- 9 Oda M, Yokomori H, Han JY. Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003; 29: 167-182
- 10 Oda M, Yokomori H, Han JY. Regulatory mechanisms of hepatic microcirculatory hemodynamics: hepatic arterial system. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 34: 11-26
- 11 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 12 Ramadori G. The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. New insights into pathophysiology of an intriguing cell. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1991; 61: 147-158
- 13 Pinzani M, Failli P, Ruocco C, Casini A, Milani S, Baldi E, Giotti A, Gentilini P. Fat-storing cells as liver-specific pericytes. Spatial dynamics of agonist-stimulated intracellular calcium transients. *J Clin Invest* 1992; 90: 642-646
- 14 Pinzani M. Hepatic stellate (ITO) cells: expanding roles for a liver-specific pericyte. *J Hepatol* 1995; 22: 700-706
- 15 Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 1993; 213: 815-823
- 16 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 17 Aycok RS, Seyer JM. Collagens of normal and cirrhotic human liver. *Connect Tissue Res* 1989; 23: 19-31
- 18 Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001; 34: 859-867
- 19 郝菁华, 王万忠, 朱菊人, 任万华, 石军, 韩国庆, 王书运, 谢英渤. 慢性乙型肝炎的肝脏微循环变化. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 275-284
- 20 王万祥, 寿乃廷. 肝门静脉侧支循环分流量的测定及其临床意义. *内蒙古医学院学报* 1996; 18: 58-60
- 21 Lebrech D, Moreau R. Pathogenesis of portal hypertension. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 309-311
- 22 王建彬, 王艳, 耿惠杰. 门静脉血流动力学与肝脏病理表现的相关性研究. *临床荟萃* 2006; 21: 1640-1642
- 23 Tamakuma S, Wada N, Ishiyama M, Suzuki H, Kanayama T. Relationship between hepatic hemodynamics and biliary pressure in dogs: its significance in clinical shock following biliary decompression. *Jpn J Surg* 1975; 5: 255-268
- 24 杨春敏, 毛高平, 朱明, 张秀荣, 张映辉. 乙醇对清醒兔Oddi括约肌运动功能的影响. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 653-657
- 25 Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 2000; 12: 435-445
- 26 冯元桢. 生物力学——运动、流动、应力和生长. 第1版. 成都: 四川教育出版社, 1993: 655-680
- 27 Cahill PA, Redmond EM, Sitzmann JV. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Ther* 2001; 89: 273-293
- 28 Ozaki T, Iizuka K, Suzuki M, Murakami T, Kitabatake A, Kawaguchi H. Threshold-dependent DNA synthesis by pure pressure in human aortic smooth muscle cells: Gialpha-dependent and -independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 212-217
- 29 O'Callaghan CJ, Williams B. Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1). *Hypertension* 2000; 36: 319-324
- 30 Saltis J, Agrotis A, Bobik A. TGF-beta 1 potentiates growth factor-stimulated proliferation of vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. *Am J Physiol* 1992; 263: C420-C428
- 31 Roelofsens J, Klein-Nulend J, Burger EH. Mechanical stimulation by intermittent hydrostatic compression promotes bone-specific gene expression in vitro. *J Biomech* 1995; 28: 1493-1503
- 32 Yasuda T, Kondo S, Homma T, Harris RC. Regulation of extracellular matrix by mechanical stress in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1996; 98: 1991-2000
- 33 Zhang M, Wang JJ, Chen YJ. Effects of mechanical pressure on intracellular calcium release channel and cytoskeletal structure in rabbit mandibular condylar chondrocytes. *Life Sci* 2006; 78: 2480-2487
- 34 Liu J, Liu T, Zheng Y, Zhao Z, Liu Y, Cheng H, Luo S, Chen Y. Early responses of osteoblast-like cells to different mechanical signals through various signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 1167-1173
- 35 Miyazawa M, Torii T, Toshimitsu Y, Koyama I. Effect of mechanical stress imposition on co-culture of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells: possibility of stimulating production of regenerating factor. *Transplant Proc* 2005; 37: 2398-2401
- 36 Goto T, Mikami KI, Miura K, Ohshima S, Yoneyama K, Nakane K, Watanabe D, Otaka M, Watanabe S. Mechanical stretch induces matrix metalloproteinase 1 production in human hepatic stellate cells. *Pathophysiology* 2004; 11: 153-158
- 37 Sakata R, Ueno T, Nakamura T, Ueno H, Sata M. Mechanical stretch induces TGF-beta synthesis in hepatic stellate cells. *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 129-136
- 38 Watanabe S, Nagashio Y, Asaumi H, Nomiya Y, Taguchi M, Tashiro M, Kihara Y, Nakamura H, Otsuki M. Pressure activates rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;

- 287: G1175-G1181
- 39 Kawata Y, Mizukami Y, Fujii Z, Sakumura T, Yoshida K, Matsuzaki M. Applied pressure enhances cell proliferation through mitogen-activated protein kinase activation in mesangial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 16905-16912
- 40 Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol* 1999; 18: 417-426
- 41 Senoo H, Hata R. Extracellular matrix regulates and L-ascorbic acid 2-phosphate further modulates morphology, proliferation, and collagen synthesis of perisinusoidal stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 999-1006
- 42 Kojima N, Sato M, Imai K, Miura M, Matano Y, Senoo H. Hepatic stellate cells (vitamin A-storing cells) change their cytoskeleton structure by extracellular matrix components through a signal transduction system. *Histochem Cell Biol* 1998; 110: 121-128

■同行评价

本文从生物力学的角度探讨肝纤维化机制, 有一定的新颖性和科学意义。

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版

本刊讯 《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式, 自1995年起, 发表的文章可以在线免费阅读全文 (<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>). 自2003-04-15至2007-12-31, 电子版的点击次数为21762951, 平均每天点击12743次. 总下载次数280505, 平均每天下载164次. (世界胃肠病学杂志社 2008-01-08)

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价, 采用匿名方式. 通常每篇文章邀请2-3位专家审阅, 至少2人通过方可录用, 否则退稿. 每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿). 文章等级评定: ○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚. 其中A和B属于很好, C和D不算太好, E是很差, 还有一部分是不清楚.

Oddi括约肌运动功能障碍的诊断和治疗

司丽娟, 任建林, 董菁, 任旭, 迟宝荣

■背景资料

Oddi括约肌运动功能障碍(SOD)是临床较难诊断和治疗的疾病之一,尚缺乏简便、有效的检查方法及理想的治疗方法。

司丽娟, 任建林, 董菁, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化疾病研究所 福建省厦门市 361004
任旭, 黑龙江省消化病医院 黑龙江省哈尔滨市 150001
迟宝荣, 吉林大学第一医院消化内科 吉林省长春市 130021
作者贡献分布: 此课题由司丽娟、任旭教授设计并完成操作; 由司丽娟、董菁、任建林教授撰写; 迟宝荣教授修改审核。
通讯作者: 迟宝荣, 130021, 吉林省长春市, 长春市新民大街1号, 吉林大学第一医院消化内科. baorong_chi@yahoo.com
电话: 0431-5612437
收稿日期: 2007-08-27 修回日期: 2007-12-06

Diagnosis and treatment of Oddi sphincter dyskinesia

Li-Juan Si, Jian-Lin Ren, Jing Dong, Xu Ren, Bao-Rong Chi

Li-Juan Si, Jian-Lin Ren, Jing Dong, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Gastroenterology Institute of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China
Xu Ren, Digestive Disease Hospital of Heilongjiang Province, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Bao-Rong Chi, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China
Correspondence to: Bao-Rong Chi, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Jilin University, 1 Xinmin Street, Changchun 130021, Jilin Province, China. baorong_chi@yahoo.com
Received: 2007-08-27 Revised: 2007-12-06

Abstract

Oddi sphincter dyskinesia is a digestive disease which is difficult to diagnose in time and treat properly. Although some methods can be used to diagnose Oddi sphincter dyskinesia, no convenient method with a high sensitivity is available at present. Oddi sphincter manometry is considered a golden diagnostic standard for Oddi sphincter dyskinesia. However, it has not been widely used in clinical practice, because it is inaccurate and unfaithful and often leads to severe complications. Only few patients with Oddi sphincter dyskinesia could be treated with chemical drugs. At present, endoscopic sphincterotomy (EST) is the best choice of treatment for Oddi sphincter dyskinesia. This paper discusses the role of Oddi sphincter manometry and EST in treatment of Oddi sphincter dyskinesia. Some patients need to

undergo transduodenal sphincteroplasty or anastomosis of bile duct with intestine.

Key Words: Oddi sphincter dyskinesia; Oddi sphincter manometry; Endoscopic sphincterotomy

Si LJ, Ren JL, Dong J, Ren X, Chi BR. Diagnosis and treatment of Oddi sphincter dyskinesia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 192-198

摘要

Oddi括约肌运动功能障碍(SOD)是临床较难诊断和治疗的疾病之一。SOD诊断方法较多,但尚缺乏敏感性及特异性的诊断方法。目前认为Oddi括约肌压力测定(SOM)是诊断Oddi括约肌运动功能障碍的“金标准”,但因其数据结果的准确性及测压后并发症等影响,难以在临床广泛开展。极少数SOD患者可通过药物治疗缓解症状,更多的SOD患者依靠内镜下乳头括约肌切开术(EST)治疗,EST是SOD最常用且有效的治疗方法,尚有部分患者需通过经十二指肠Oddi括约肌切开成形术及胆肠吻合等外科手术方法才能达到治疗目的。

关键词: Oddi括约肌运动功能障碍; Oddi括约肌压力检测; 十二指肠乳头括约肌切开术

司丽娟, 任建林, 董菁, 任旭, 迟宝荣. Oddi括约肌运动功能障碍的诊断和治疗. *世界华人消化杂志* 2008; 16(2): 192-198
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/192.asp>

0 引言

Oddi括约肌运动功能障碍(sphincter of oddi dysfunction, SOD)分为Oddi括约肌狭窄和Oddi括约肌运动功能紊乱两种类型^[1-2]。前者为乳头括约肌的部分或全部狭窄,由慢性炎症和纤维化所导致。后者为乳头括约肌痉挛,常见胆囊切除术后的患者,两者鉴别有时较困难。SOD的诊断主要根据临床症状、肝功、血淀粉酶、ERCP和Oddi括约肌压力测定(SOM)等方法,目前认为Oddi括约肌压力测定是诊断SOD的“金标准”^[3-7]。内镜下乳头括约肌切开术(EST)是治疗SOD最常用的方法^[8-10],对不宜作EST治疗或

■同行评议者

杨维良, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

EST失败的SOD患者可考虑外科手术。

1 Oddi括约肌的解剖和生理功能

Oddi括约肌(sphincter of oddi, SO)通常是指围绕在胆总管壶腹和胆胰管末端的括约肌,由4部分组成:胆总管末端括约肌、胰管末端括约肌、位于乳头的壶腹括约肌和位于胰胆管间隔的纵肌束。每部分肌肉都有各自不同的受体,受不同的神经、体液信号调节。

通过对SO测压及电生理研究提示,Oddi括约肌有周期性前向收缩的特性,与十二指肠同步又互不相干,这是SO生理功能的重要基础^[11]。该特性对调节胆囊充盈,控制胆汁和胰液的排出,维持胆、胰管内压力,防止十二指肠液胆道返流有重要作用^[12]。SO运动受多种因素的影响,目前该方面研究颇多,各报道不一。综合常见的影响因素包括:(1)进食因素:正常人,消化间期SO运动存在两种形式,即自发性紧张性收缩和节律性收缩,节律性收缩发生于紧张性收缩基础上,与胃肠道MMC相关,有推进性蠕动和逆向性蠕动两种传播方式,一方面使肝脏分泌的胆汁转送入胆囊浓缩,另一方面也有少部分胆汁排入十二指肠。餐(尤其是脂餐)后激发胆囊收缩素(CCK)释放,胆囊收缩,SO松弛,使胆汁和胰液排入十二指肠,助于消化。(2)神经调节因素:SO上含有 α 和 β 肾上腺素受体,分别介导收缩和舒张,还有胆碱能受体介导收缩,对阿托品敏感。迷走神经兴奋时,胆囊收缩,SO舒张,有利于胆汁的排泄。(3)体液调节因素:胃肠道激素对SO的影响目前研究较少,已知的CCK能抑制SO收缩,增加胆汁流入十二指肠。促胃液素是一种类似于CCK的激素,可抑制胰管括约肌运动,有利于胰液的排出。胃泌素与五肽胃泌素对动物SO的作用与CCK相同,对人SO的作用不清。(4)药物因素:鸦片类、胆碱能拮抗剂、 α -肾上腺能拮抗剂、H1受体拮抗剂等可使SO压力升高。 β -受体拮抗剂、抗胆碱能制剂、硝酸酯、钙离子拮抗剂等可使SO压力下降。研究发现^[13-15],胆道流体力学与血液动力学有互动的关系,SO动力学改变和心血管系统和血液流变学有密切联系,可相互影响。入肝血流是影响SO动力学改变的重要因素之一,入肝血流量与胆管压高低和胆管压变化的幅度成正比关系。

此外,胆囊在调节胆道动力学方面发挥着重要作用。在生理条件下,胆囊SO作为一个整体,对胆汁从肝脏经胆道排入肠道起着协调作

用。胆囊压力与容积的改变可改变胆管内压力,一旦被切除,就有可能引起SO的功能异常。

2 SOD

2.1 病因 Oddi括约肌狭窄常见病因为慢性乳头炎所致Oddi括约肌纤维化和Oddi括约肌肥大。Oddi括约肌运动功能紊乱的病因为乳头括约肌痉挛,常见胆囊切除术后患者。但临床很难将两者区分开,也有报道认为Oddi括约肌运动功能紊乱与Oddi括约肌狭窄是SOD由轻到重的发展、演变。

2.2 发病机制 (1)神经调节异常:尽管SOD的病理生理机制目前还不清楚,但神经调控的异常可能与其发病有关。Oddi括约肌的运动功能受交感神经、副交感神经和肽能神经的支配;Oddi括约肌中 α 、 β 受体分布相当,交感神经对Oddi括约肌的调节作用既可以是收缩,也可能是舒张;但迷走神经对Oddi括约肌的作用机制不清楚;SOD与括约肌胆系或胰系部分均有关,因而呈现不同的临床综合征^[16]。(2)内脏感觉过敏: SOD患者术后十二指肠扩张可诱导与SOD同样的腹痛,并多伴有抑郁、焦虑等心理症状,提示内脏痛觉过敏与SOD术后腹痛的发生有关^[17]。(3)胰胆管合流异常:约有2/3的急性胰腺炎患者和1/3的慢性胰腺炎患者伴有SOD,但目前尚不清楚胰胆管合流异常在SOD中的作用。(4)体液因素:某些内分泌或体液因素,如胃泌素释放肽、胰泌素、生长抑素及CCK的分泌异常被认为与SOD的发病有关,但详细的分子生物学机制尚不明。(5)其他因素: Tierney *et al*^[18]观察了乙醇对狗Oddi括约肌的影响,认为大量乙醇(1.5 g/kg)灌注通过改变胆道括约肌的运动而诱发胆石形成。局部体表热刺激可抑制不同动物Oddi括约肌的运动功能,此作用可能是通过热敏感神经释放NO实现的,这可能为L2精氨酸/NO通路障碍疾病的治疗提供一种简便的方法^[19]。

2.3 SO分型 Hogan *et al*^[20]根据患者的临床表现、实验室检查和逆行胰胆管造影(ERCP)检查结果,将SOD分为胆道型和胰腺型两类,每类根据症状轻重又分为I、II、III型,其中I型除临床症状外,还包括酶学异常和胆管或胰管排空障碍,即(1)胆源性腹痛或胰源性腹痛;(2)1次以上血清转氨酶或碱性磷酸酶升高2倍以上,或1次以上血淀粉酶或脂肪酶升高2倍以上;(3)ERCP示胆总管扩张(>12 mm),或ERCP示胰管扩张(头部>6 mm,体部>5 mm);(4)ERCP示胆总管排

■相关报道
SOM作为诊断SOD的“金标准”,因所测数据受各方面因素影响较多,并合并胰腺炎的发生率较高,国内仅在少数几家医院开展。

■应用要点

本文对SOD多种诊断及治疗方法进行比较,以期避免一些不必要的检查,尤其是避免不必要的创伤性检查,并为SOD患者选择有效、微创的治疗方法,使更多的SOD患者得到及时的诊断、满意的治疗。

空时间延长(>45 min),或胰管排空时间延长(>9 min)。III型仅有临床表现,单纯的胆源性腹痛或胰源性腹痛。II型介于两者之间:胆源性腹痛或胰源性腹痛加上上述异常所见中的1-2项。

2006-05 DDW上,美国胃肠病学协会正式发布了功能性胃肠病的罗马III标准。罗马III专家委员会对胆道型Oddi括约肌功能障碍Geenen-Hogan分型标准进行了修订,主要区别在于诊断Oddi括约肌功能紊乱不再强调胆道、胰管引流时间,这样就可避免有创伤性ERCP检查^[21]。新的临床分型规定I型患者应具备:胆源性腹痛;至少2次丙氨酸胺基转移酶、天冬氨酸胺基转移酶、胆红素升高至大于正常值2倍;腹部B超发现胆道扩张,直径大于8 mm。I型患者Oddi括约肌测压异常比例高达65%-95%,此型患者主要由于Oddi括约肌狭窄所致。而II型患者除胆源性腹痛外,上述实验室或影像学检查仅1项异常即可,此型患者胆道测压异常率为50%-63%。III型患者仅有胆源性腹痛,此型患者胆道测压异常率为12%-59%。

2.4 临床表现 SOD多见于女性,常因胆囊结石而行胆囊切除术,症状常在术后5年出现,主要表现为腹痛,常在脐周并放射至右上腹及背部,且部位多变,常与脂肪餐有关,有时在凌晨或夜间出现,使患者痛醒。发作时可伴恶心、呕吐,每次可持续3-4 h,用解痉药可减轻症状,几周或数月发作1次。

2.5 诊断 ROME II 诊断标准^[4](根据临床症状):右上腹和上腹肯定而较重的疼痛发作,并伴有以下症状:(1)发作持续30 min或以上;(2)在过去12 mo中有一次或多次的发作;(3)疼痛稳定不变,并影响日常生活,需就医;(4)没有足以解释这些症状的结构方面异常的证据。

SOD常用的诊断方法:(1)超声(US):胆囊切除术后患者的胆总管扩张是SOD患者US检查的特征性表现之一^[1]。正常胆管US下测量,直径不超过7 mm,否则说明胆汁排泄受阻,如能除外器质性病变,则提示有SOD存在;脂肪餐或静注CCK后,胆管直径无缩小,也说明存在SOD。该方法简便,无创伤,是目前最实用的方法,但结果易受操作者的技术和主观因素影响。(2)定量肝胆闪烁扫描(HBS):属非创伤性检查,可通过括约肌阻力的增加来间接判断括约肌的运动功能。能通过肝脏摄入和排出的明显延迟,而做出定量和定性诊断,敏感性很高,多用于SOD可疑者的诊断^[22],但价格昂贵。(3)M-P实验:肌注吗啡

和新斯的明后,患者出现右上腹痛、血淀粉酶及转氨酶升高为阳性。因其敏感性不高、特异性较差,目前已少采用。近年来有学者^[1]联合应用激发实验与闪烁显像法检查胆囊切除术后有症状者,发现激发实验阳性与扫描梗阻图像间有很好的相关性,认为此综合检查法可能是诊断功能异常患者的一种理想方法。(4)ERCP:可见十二指肠乳头开放、关闭运动减弱或消失;乳头狭窄致插管困难;管腔扩张,胆总管内径>12 mm,胰管头部>6 mm,体部内径>5 mm;造影剂排空时间延长,胆总管排空时间>45 min,胰管排空时间>9 min;胆总管下端狭窄。此外,胆管内注入造影剂,随着压力增加患者出现腹痛,提示SOD。ERCP是确诊多数胆胰疾病的最佳手段,对SOD能进行准确的定位、定性诊断,是目前诊断SOD的较好的方法,并可同时行EST等治疗。但由于检查时,不同患者所使用造影剂和镇静剂数量不同,使该检查缺乏统一衡量标准,创伤性和需用镇静剂是ERCP的主要弊端。近年来,胆胰管和Oddi括约肌运动的检测是了解胆系运动的一种新方法。Abell *et al*^[23]认为在行ERC的同时监测胆胰和Oddi括约肌的电活动是可行的,并证实胆系不同部位的波形特点不同,胆胰管的电活动和机械活动间有很好的相关性,但需要进一步研究证实其潜在的临床价值及在SOD诊断中的意义。(5)磁共振胰胆管成像术(MRCP):该项检查是了解胆胰管器质病变和功能性改变的无创伤性的新技术,MRCP对胰胆管检查具有较高的精确度^[24]。对SO功能状态和ERCP相比具有相似的特异性和敏感性^[25-27]。当有相应的临床表现,ERCP或影像学检查提示有梗阻现象,而非侵入性检查又无阳性发现时,胰胆管测压应予以考虑^[28],但迄今累积的病例少,费用高。(6)Oddi括约肌压力测定。

总之, SOD的诊断方法很多,各种诊断方法都有其优缺点,诊断时应结合临床,多种诊断方法综合,以提高诊断率。

3 SOM

3.1 SO测压法 SO测压法有3种:直接内镜测压,探头传感器测压,间接测压。其中经内镜测压,是唯一直接测定Oddi括约肌运动功能的方法。

3.2 直接内镜测压

3.2.1 原理和方法:1974年Vondrasek *et al*^[29]首先报道了内镜下十二指肠乳头插管Oddi括约肌测压,由于该法可直接测定Oddi括约肌的运动功

能, 很快得到大多数学者的认可, 特别是近年来随着低顺应性毛细管液体灌注系统、多通道测压导管和计算机收集整理数据等新技术的广泛应用, 该项技术日益成熟, 大大推动了Oddi括约肌运动功能的研究. 常用的内镜测压方法有两种: 灌注导管法和微传感器法, 以前者最为常用. 水灌注式导管测压系统的原理: 是将1根三腔导管置于Oddi括约肌处, 由微量压力泵向导管内注水, 水在导管末端侧孔逸出时所克服的压力即为Oddi括约肌压力. 压力信号的变化通过水流传递到压力换能器感受, 并转变为数据信号, 直接输入电子计算机, 进行显示、数据处理、储存、描绘和打印. 水灌注式导管测压系统的方法: 术前准备及操作过程与一般ERCP检查基本相同, 术前不用任何解痉药或促胃肠动力药, 已被公认. 在镇静药的使用上观点不一, 有文献报道术前肌注安定对测压结果无影响, 也报道咪唑安定可明显降低Oddi括约肌基础压, 对测压结果有显著影响^[30]. 因此如患者耐受性好, 最好还是不用为最佳. 灌注式测压导管外径1.7 mm, 长为2 m, 顶端有3个侧孔, 开口于不同方向, 每一侧孔间相距2 mm. 测压时水流速度为0.2-0.6 mL/min. 先经乳头插入造影导管, 注入少量造影剂, 确认胆管后, 经导管插入直径0.46 mm的导丝, 退出导管, 将测压导管沿导丝插入十二指肠, 先测十二指肠内压, 并将十二指肠压力设为零压力. 然后将有标记的导管部分插入胆总管或胰管测压. 再按定点牵拉法, 边退边检测Oddi括约肌压力, 每1点至少检测30 s. 记录压力各项变化情况.

3.2.2 记录项目和正常参数: SOM包括以下项目, 即十二指肠内压(十二指肠腔相对于大气的压力), 管腔内压(胆管或胰管相对于十二指肠的压力), Oddi括约肌基础压(测压孔位于Oddi括约肌处测得压力), Oddi括约肌时相性收缩幅度, Oddi括约肌时相性收缩频率, Oddi括约肌时相性收缩间期和Oddi括约肌时相性收缩传播方式. 目前国内普遍采用1990年Guelrud *et al*^[31]报道的50例健康自愿者的资料, 用其提出的正常标准, 即基础压 ≤ 35 mmHg, 收缩幅度 ≤ 220 mmHg, 收缩间期 ≤ 8 s, 收缩频率 ≤ 10 次/min, 逆行收缩 $\leq 50\%$.

3.2.3 SOD的测压异常表现: Oddi括约肌基础压升高(≥ 5.3 kPa, 40 mmHg), Oddi括约肌收缩频率超过10次/min、收缩幅度 ≥ 240 mmHg, 收缩传导顺行减少而逆行增加, Oddi括约肌对CCK有矛盾反应和胆管、胰管压力升高. Oddi括

约肌狭窄测压表现为基础压的异常升高(≥ 40 mmHg), 可伴有或不伴有其他测压异常. Oddi括约肌运动功能紊乱表现为多种测压异常, 如间断性基础压升高, 收缩频率 ≥ 7 次/min, 逆行性收缩 $\geq 50\%$. 其中基础压升高是最恒定、可靠的指标, 常用于治疗方案的确定, 而且也是括约肌切开预后良好的判定指标.

3.2.4 SOD测压表现与临床分型的关系: 综合各型SOD患者测压结果发现, I型患者测压异常占65%-86%; II型占41%-55%; III型占19%-28%^[32]. 邹多武 *et al*^[33]报道 I型患者测压90%异常, 且80%表现为Oddi括约肌狭窄, 10%表现为Oddi括约肌运动功能紊乱; II型患者测压31.8%异常, Oddi括约肌狭窄占13.7%, Oddi括约肌运动功能紊乱占18.1%; III型测压6.7%异常, 均表现为Oddi括约肌运动功能紊乱. 证明SOD的Oddi括约肌测压与临床分型有较好的一致性^[34]. Oddi括约肌测压对研究Oddi括约肌运动功能具有较高价值.

3.2.5 SOM的影响因素^[35]: (1)腹压: 患者剧烈呕吐、腹压增高, 传至胰管、胆管导致假象出现. 因此在测压过程中应注意标记, 在分析结果时予以排除. (2)测压导管本身会导致动力学的改变, 使检查结果出现系统误差. (3)低顺应性毛细管液体灌注导管硬度不够, 插管成功率仅60%-75%. (4)镇静剂的使用影响数据测定, 不能真实反应压力与疼痛间的相关性.

3.2.6 SOM的并发症: 最主要的并发症是急性胰腺炎, 发生率高达31%^[4], 明显高于单纯ERCP, 尤以ERCP后立即行Oddi括约肌测压为显著^[36]. 近期研究表明, 经ERCP测压后胰腺炎的发病率大大高于胆道镜^[37]. 吴硕东 *et al*^[38]应用低顺应性毛细管液体灌注测压系统和三腔测压导管, 采用经胆道镜途径, 无一例出现并发症.

3.3 探头传感器测压 在ERCP检查时, 将探头传感器导管留置于胆总管, 可获得较长一段时间内的测压资料, 用于一些药物(如吗啡等)疗效评价, 并可判断疼痛程度是否与括约肌压力变化相关.

3.4 间接测压 是将导管经胆囊管或T形管插入, 灌注液体并测压, 用间接法测量胆总管内压力和通过括约肌的液量, 有助于对括约肌生理作用的理解, 且优于直接测压法. 缺点是数值欠精确, 仅能在术中使用.

4 SOD的治疗

SOD的治疗目的是降低胆汁和胰液排出时SO的

■同行评价

本文内容详实, 层次分明, 文笔流畅, 具有较好的学术价值.

张力, 以利于胆道和胰腺分泌的液体向十二指肠流出. 治疗包括药物治疗、内镜治疗和外科手术三种方法^[7,39].

4.1 药物治疗 (1)抗胆碱能药物: 主要抑制平滑肌上胆碱能受体起作用, 常用药物有阿托品、颠茄类生物碱及其衍生物. 抗胆碱能药物阿托品可显著降低SO基础压与收缩幅度, 但由于该药在心血管方面的不良作用, 目前仅用于急性发作时缓解症状. (2)硝酸甘油类: 有研究证实硝酸甘油是一种迅速有效降低Oddi括约肌压力的药物^[38], 同时对Oddi括约肌痉挛有解痉作用, 但因有相对的全身副作用, 使其应用受到了一定的限制. 该药物作用短暂, 长期疗效有待进一步研究. (3)钙通道阻滞剂: 该类药物通过阻滞钙通道而松弛平滑肌, 有研究证实^[40], 心痛定可明显降低Oddi括约肌基础压, 提示该药可能成为治疗SOD的有效药物. (4)促胃肠动力药: 1990年Baker *et al*^[8]观察了西沙比利对澳洲付鼠Oddi括约肌运动功能的影响. 结果发现用药后Oddi括约肌运动功能明显受抑制, 西沙比利还可促进胆囊排空, 说明他可促进胆囊及Oddi括约肌的协调运动. Nakayama *et al*^[41]也通过动物实验证实不同剂量的西沙比利对动物的SO作用不同, 小剂量可以促进SO收缩, 大剂量则抑制SO收缩. 吴硕东 *et al*^[38]研究说明常规剂量的西沙比利可松弛SO, 作用机制有待进一步研究. (5)生长抑素: 近年来发现生长抑素类药物对SO功能有重要影响, 能降低SO压力, 可作为SOD治疗的候选药物. 生长抑素可降低SO基础压和收缩压, 抑制SO收缩^[42], 奥曲肽可显著降低SO压力峰值和基础压而不改变波幅和波频或胆道压力^[43-44]. (6)中医中药对SO的影响: 国内亦有报道^[45]证实重用大黄可疏通毛细胆管内的胆汁瘀积并且增加胆管舒缩功能, 降低黏稠度, 增加胆流, 使胆囊收缩, 舒张SO; 与柴胡、川朴、陈皮、黄芩、公英诸药合用还能消除SO水肿, 促进炎症吸收, 增加胆汁酸随肠道内容物排出量. 但是, 袁耀宗 *et al*^[46]在研究生长抑素(SS)及大黄素对犬急性坏死性胰腺炎SO压力的影响时发现, SS能降低SO的基础压和收缩幅度, 甚至还可减慢其收缩频率, 而大黄素对SO作用的差异无显著性. 因此, 中药成方或单味药的有效成分对改善SOD的作用机制有待进一步观察和深入. 此外, 有实验发现^[13], 甲基莲心碱(Nef)对SO和胆道均有与戊脉安相似的阻止外钙内流导致SO松弛的作用, 并且发现Nef对胆道平滑肌的作用不同于血管平

滑肌, 他不拮抗去氧肾上腺素的收缩作用, 为探索药物治疗SOD提供了实验理论依据^[47-48]. 总之, 迄今为止还没有发现一种特异性作用于SO的药物.

4.2 内镜治疗 (1)内镜下括约肌切开术: EST是目前SOD最常用的和有效的治疗方法^[49-50], 与手术相比, 具有安全、经济、创伤小等优点. Geenen *et al*^[51]一项前瞻性随机研究, 发现EST对基础压超过5.31 kPa(40 mmHg)患者治疗效果好, 但对于基础压<5.31 kPa者效果不明显. 伴有测压异常的胆道型I型患者, EST术后症状100%改善, II型患者症状改善者占91%, III型患者症状改善50%. 胰腺型SOD患者EST治疗疗效较差, 但选择性进行胰管括约肌EST术可大大提高症状改善率^[9,14]. EST胰腺炎的发生率为5%, 因SOD行括约肌切开者, 胰腺炎的发生率可高达11%-30%^[52]. EST术后有出血、穿孔等并发症, 发生率约5%-16%; 死亡率为0%-22%; 术后再狭窄的发生率为11%. (2)内镜下放置支架引流: 对于间歇性运动障碍或痉挛, 静息时胆总管SO基础压正常者, EST效果并不肯定, 但若在胆总管SO内留置塑料支架可防止其闭塞, 从而缓解间歇性运动功能障碍或痉挛所产生的症状. (3)内镜下括约肌球囊导管扩张术(EPBD): EPBD术后短期内可以显著降低Oddi括约肌基础压, 适用于伴有Oddi括约肌基础压增高的胆道I型和II型SOD患者, 较EST安全, 但远期疗效差^[53]. (4)内镜下肉毒杆菌毒素注射术: 肉毒杆菌毒素(BTX)是胆碱能神经末梢乙酰胆碱释放的强力抑制剂, 可明显降低SO的平均基础压、振幅^[54]. Wehrann *et al*^[55]证明内镜下乏特氏壶腹注射BTX是安全的, 而且BTX治疗后的反应可用于SODIII型患者治疗方案的确定, 从而避免半数患者不必要的括约肌切开. 但部分患者BTX注射后无效者, 括约肌切开后依然无效, 提示除基础Oddi括约肌压力外, 其他病理因素可能与SODIII型患者的胆道症状也有关.

4.3 外科手术治疗 对不宜行EST治疗或EST治疗失败的SOD患者可考虑外科手术治疗. 外科手术的优点是既可消除胰管开口处的梗阻, 又可避免壶腹瘢痕和再狭窄的形成. 手术方式有十二指肠乳头括约肌成形术和胆肠吻合手术^[13,56-58].

4.3.1 十二指肠乳头括约肌切开成形术: Oddi括约肌切开成形术的优点: (1)符合胆流的正常生理通道. (2)与肝外胆道空肠或十二指肠吻合术相比没有形成盲端综合征的可能性. (3)不改变胃肠道

正常生理通道. Oddi括约肌切开成形术的缺点:

(1)成形术后有时不可避免地发生肠胆逆流. 如有逆流又能顺利排出, 就不易发生逆行性感染; 如有逆流又不能顺利排出, 则易招致逆行性感染发生. (2)可发生十二指肠漏、出血和急性胰腺炎等严重并发症, 一旦发生, 病死率极高. (3)若胆总管末端狭窄段较长者, 本术式不能解决问题; 宜采用胆肠吻合术为宜. (4)Vater壶腹旁有憩室、年老和病情危重者, 选用本术式宜慎重.

4.3.2 胆肠吻合术: 其适应症为(1)Oddi括约肌切开术后复发者或Oddi括约肌切开成形术后逆行感染严重者; (2)胆总管末端狭窄段较长者; (3)胆总管明显扩张, 肝胆管内堆满结石难以取净者; (4)Oddi括约肌狭窄并发胆总管泥沙样结石并有结石复发倾向者. 常见的方法有胆囊空肠袢式吻合术(即改良式胆囊空肠Roux-en-Y形吻合术)、胆总管十二指肠吻合术、间置空肠胆管十二指肠吻合术、胆管空肠Roux-en-Y形吻合术(特别是曾宪九法), 其中以后者为优, 故目前在临床上多采用此法. 胆管空肠Roux-en-Y形吻合术适于任何部位的胆道重建术, 也适于十二指肠乳头Oddi括约肌狭窄的胆道重建术. 由于本吻合口径在2.5 cm以上, 吻合口也没有张力, 所以只要吻合稳妥, 不会发生近期漏和远期吻合口再狭窄. 与胆总管十二指肠吻合术相比, 本法吻合口漏或吻合口狭窄均少, 抑或一旦发生也易于处理, 逆行性胆道感染的发生率也少. 总之, 空肠Roux-en-Y形吻合是胆肠内引流术的主要术式.

Oddi括约肌运动功能障碍的不同类型采取不同的治疗方案. 对于I型如考虑与乳头括约肌狭窄有关, 宜通过内镜下括约肌切开或外科手术解决, 内镜下括约肌切开具有损伤小、安全、经济等特点, 应作为首选方法. 对于II、III型, 特别是III型属功能障碍与括约肌痉挛、不协调运动或早期纤维化形成有关, 大部分可望通过药物治疗显效.

目前对于SOD的诊断和分型有赖于临床表现、生化测定、超声扫描、MRCP、ERCP等多种化验检查方法, 并除外胆胰其他器质性病变. SOM作为诊断SOD的“金标准”, 因所测数据受各方面因素影响较多, 并合并胰腺炎的发生率较高, 国内仅在少数几家医院开展. 随着内镜技术的不断发展, 更多的SOD患者有望通过内镜下乳头括约肌切开术得到满意的治疗. 对不宜作EST治疗或EST失败的SOD患者可考虑外科手术.

5 参考文献

- 1 Tzovaras G, Rowlands BJ. Diagnosis and treatment of sphincter of Oddi dysfunction. *Br J Surg* 1998; 85: 588-595
- 2 Lans JL, Parikh NP, Geenen JE. Application of sphincter of Oddi manometry in routine clinical investigations. *Endoscopy* 1991; 23: 139-143
- 3 朱明霞, 文明, 黄勇火, 罗洪浪. Oddi括约肌功能障碍的ERCP研究. *中国医学影像技术* 2002; 18: 1285-1287
- 4 董家鸿, 冷建军. Oddi括约肌功能障碍. *中国现代手术学杂志* 2002; 9: 164-166
- 5 陈仕珠. 胆道系统运动调节及功能性胆道运动异常的诊治. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 613-618
- 6 吴硕东, 孔静, 王伟, 张强, 金俊哲. 吗啡及M-胆碱能受体阻断剂对Oddi括约肌压力变化的影响观察. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1467-1469
- 7 兰梅, 王新, 樊代明. Oddi括约肌运动功能障碍的诊治进展. *国外医学内科学分册* 2000; 27: 286-289
- 8 Baker RA, Saccone GT, Toouli J. Cisapride inhibits motility of the sphincter of Oddi in the Australian possum. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 711-715
- 9 Neoptolemos JP, Bailey IS, Carr-Locke DL. Sphincter of Oddi dysfunction: results of treatment by endoscopic sphincterotomy. *Br J Surg* 1988; 75: 454-459
- 10 Fogel EL, Eversman D, Jamidar P, Sherman S, Lehman GA. Sphincter of Oddi dysfunction: pancreaticobiliary sphincterotomy with pancreatic stent placement has a lower rate of pancreatitis than biliary sphincterotomy alone. *Endoscopy* 2002; 34: 280-285
- 11 张少辉, 吴伟, 王尧华. Oddi括约肌生理与病理生理的动力学研究状况. *中国中西医结合外科杂志* 2004; 10: 398-400
- 12 孔静, 吴硕东. Oddi括约肌功能失调与胆囊结石及胆囊切除术后胆总管结石的关系. *肝胆外科杂志* 2002; 10: 75-77
- 13 吴高松, 邹声泉. Oddi括约肌功能异常的诊治. *中华肝胆外科杂志* 2003; 9: 442-444
- 14 Zou S, Zhang J, Qiu F. Influence of octapeptide of cholecystokinin, vasoactive intestinal peptide and substance P on dynamics of biliary system and cardiovascular system. *Chin Med J (Engl)* 1998; 111: 1071-1074
- 15 张剑峰, 邹声泉, 裘法祖. 胃肠道神经肽对胆道Oddi括约肌活动和心血管功能影响的实验研究. *同济医科大学学报* 1997; 26: 153
- 16 吴立胜, 黄强. Oddi括约肌运动功能不良诊治研究进展. *肝胆胰外科杂志* 2004; 16: 232-235
- 17 Chun A, Desautels S, Slivka A, Mitrani C, Starz T, DiLorenzo C, Wald A. Visceral algia in irritable bowel syndrome, fibromyalgia, and sphincter of oddi dysfunction, type III. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 631-636
- 18 Tierney S, Qian Z, Lipsett PA, Pitt HA, Lillemoe KD. Ethanol inhibits sphincter of Oddi motility. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 356-362
- 19 Chiu JH, Lui WY, Chen YL, Hong CY. Local somatothermal stimulation inhibits the motility of sphincter of Oddi in cats, rabbits and humans through nitrgic neural release of nitric oxide. *Life Sci* 1998; 63: 413-428
- 20 Hogan WJ, Geenen JE. Biliary dyskinesia. *Endoscopy* 1988; 20 Suppl 1: 179-183
- 21 邹多武. 功能性胃肠病罗马III标准解读: 胆囊及Oddi括约肌功能紊乱. *临床消化病杂志* 2006; 18: 262-263
- 22 Rosenblatt ML, Catalano MF, Alcocer E, Geenen JE.

- Comparison of sphincter of Oddi manometry, fatty meal sonography, and hepatobiliary scintigraphy in the diagnosis of sphincter of Oddi dysfunction. *Gastrointest Endosc* 2001; 54: 697-704
- 23 Abell TL, Werkman RF, Familoni BO, Baggous W, Massie D, Vera S. Biliary, pancreatic, and sphincter of Oddi electrical and mechanical signals recorded during ERCP. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 540-546
- 24 Rubini G, Dimonte M. Postcholecystectomy syndrome: evaluation by biliary cholecystigraphy and MR cholangiopancreatography. *Clin Nucl Med* 1999; 24: 784-788
- 25 Pamos S, Rivera P, Canelles P, Quiles F, Orti E, Cuquerella J, Martinez V, Medina E. Magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP) versus endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP): diagnostic usefulness. *Gastroenterol Hepatol* 1998; 21: 174-180
- 26 邢春根, 陆之安, 王灌忠, 刘根寿, 张联合, 沈钧康, 吴浩荣, 李军成. 磁共振胆胰管成像对阻塞性黄疸诊断价值研究. *中华普通外科杂志* 1999; 14: 285-287
- 27 周兴兴, 梁碧玲, 许凌云, 黄穗乔. 肝内胆管癌常规磁共振和磁共振胰胆管造影的诊断价值. *中华肿瘤杂志* 2004; 26: 421-423
- 28 Corazziari E, Shaffer EA, Hogan WJ, Sherman S, Tooouli J. Functional disorders of the biliary tract and pancreas. *Gut* 1999; 45 Suppl 2: II48-54
- 29 Vondrasek P, Eberhardt G. Semiconductors in the recording of pressure during endoscopy. Preliminary report on the technic of measurement. *Z Gastroenterol* 1974; 12: 453-458
- 30 Katsinelos P, Dimiropoulos S, Katsiba D, Arvaniti M, Tsolkas P, Galanis I, Papaziogas B, Limenopoulos V, Baltajiannis S, Vasilladis I. Pseudomonas aeruginosa liver abscesses after diagnostic endoscopic retrograde cholangiography in two patients with sphincter of Oddi dysfunction type 2. *Surg Endosc* 2002; 16: 1638
- 31 Guelrud M, Mendoza S, Rossiter G, Villegas MI. Sphincter of Oddi manometry in healthy volunteers. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 38-46
- 32 Sand JA, Turjanmaa VM, Koskinen MO, Makinen AM, Nordback IH. Variables affecting quantitative biliary scintigraphy in asymptomatic cholecystectomized volunteers. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 130-135
- 33 邹多武, 许国铭, 孙振兴, 李兆申, 尹宁. Oddi括约肌测压对胆囊切除术后腹痛患者的诊断价值. *第二军医大学学报* 1997; 18: 117-119
- 34 邹多武, 许国铭, 孙振兴, 李兆申, 尹宁. 内镜下测压对Oddi括约肌运动功能障碍的诊断价值. *中华消化杂志* 1997; 17: 64, 28
- 35 李虎城, 董家鸿. Oddi括约肌功能研究的现状. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 140-142
- 36 Maldonado ME, Brady PG, Mamel JJ, Robinson B. Incidence of pancreatitis in patients undergoing sphincter of Oddi manometry (SOM). *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 387-390
- 37 Meshkinpour H, Kay L, Mollot M. The role of the flow rate of the pneumohydraulic system on post-sphincter of Oddi manometry pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 1992; 14: 236-239
- 38 吴硕东, 金俊哲, 姜锡然, 张强, 王伟. 经胆道镜测压观察硝酸甘油等对Oddi括约肌的作用. *消化外科* 2002; 1: 40-42
- 39 许国铭, 邹多武. Oddi括约肌运动功能障碍的诊断和治疗. *临床内科杂志* 1999; 16: 67-69
- 40 Staritz M. Pharmacology of the sphincter of Oddi. *Endoscopy* 1988; 20 Suppl 1: 171-174
- 41 Nakayama S, Neya T, Yamasato T, Takaki M, Itano N. Effects of cisapride on the motility of the digestive tract in dogs and guinea pigs. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi* 1985; 21: 1-9
- 42 Lai KH, Lo GH, Cheng JS, Fu MT, Wang EM, Chan HH, Wang YY, Hsu PI, Lin CK. Effect of somatostatin on the sphincter of Oddi in patients with acute non-biliary pancreatitis. *Gut* 2001; 49: 843-846
- 43 Nemeth AM. Somatostatin in the treatment of pancreatic diseases. *Oro Hetil* 2002; 143: 1099-1108
- 44 Sand J, Nordback I, Koskinen M, Matikainen M, Lindholm TS. Nifedipine for suspected type II sphincter of Oddi dyskinesia. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 530-535
- 45 尹本如, 闵锐, 方敏. 中西医结合治疗胆道术后奥狄括约肌狭窄13例. *中国中西医结合外科杂志* 2002; 8: 44
- 46 袁耀宗, 诸琦, 夏璐, 翟祖康, 江石湖, 徐家裕. 生长抑素及大黄素对犬急性坏死性胰腺炎Oddi括约肌的作用. *中华消化杂志* 1999; 19: 252-255
- 47 邹声泉, 胡文淑. 甲基莲心碱对离体胆道Oddi括约肌的作用. *中华实验外科杂志* 1995; 12: 298-299
- 48 丁庆, 谭俊峰, 张丽娟, 郝战, 夏家红, 邹声泉, 胡文淑. 甲基莲心碱对豚鼠离体胆道平滑肌的作用. *同济医科大学学报* 1996; 25: 264-266
- 49 Tooouli J, Roberts-Thomson IC, Kellow J, Dowsett J, Saccone GT, Evans P, Jeans P, Cox M, Anderson P, Worthley C, Chan Y, Shanks N, Craig A. Manometry based randomised trial of endoscopic sphincterotomy for sphincter of Oddi dysfunction. *Gut* 2000; 46: 98-102
- 50 Elton E, Howell DA, Parsons WG, Qaseem T, Hanson BL. Endoscopic pancreatic sphincterotomy: indications, outcome, and a safe stentless technique. *Gastrointest Endosc* 1998; 47: 240-249
- 51 Geenen JE, Hogan WJ, Dodds WJ, Stewart ET, Arndorfer RC. Intraluminal pressure recording from the human sphincter of Oddi. *Gastroenterology* 1980; 78: 317-324
- 52 Tarnasky PR, Palesch YY, Cunningham JT, Mauldin PD, Cotton PB, Hawes RH. Pancreatic stenting prevents pancreatitis after biliary sphincterotomy in patients with sphincter of Oddi dysfunction. *Gastroenterology* 1998; 115: 1518-1524
- 53 Yasuda I, Tomita E, Enya M, Kato T, Moriwaki H. Can endoscopic papillary balloon dilation really preserve sphincter of Oddi function? *Gut* 2001; 49: 686-691
- 54 Hoogerwerf WA, Pasricha PJ. Botulinum toxin for spastic gastrointestinal disorders. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999; 13: 131-143
- 55 Wehrmann T, Seifert H, Seipp M, Lembcke B, Caspary WF. Endoscopic injection of botulinum toxin for biliary sphincter of Oddi dysfunction. *Endoscopy* 1998; 30: 702-707
- 56 杨维良, 张新晨. 十二指肠乳头良性狭窄治疗的术式选择与评价. *医师进修杂志(外科版)* 2004; 27: 57-59
- 57 全卓勇, 彭开勤, 张应天. Oddi括约肌切开成形术168例临床分析. *中国实用外科杂志* 2002; 22: 411-413
- 58 林擎天. 胆总管末端良性狭窄的诊断和治疗. *中华普通外科杂志* 1999; 14: 208-210

SP细胞分选与肿瘤干细胞关系的研究进展

王宁, 陈凇

王宁, 陈凇, 中国人民解放军总医院普通外科 北京市 100853
国家自然科学基金资助项目, No. 30570522
作者贡献分布: 王宁与陈凇对此文所作贡献均等; 此课题由陈凇设计; 写作由王宁完成; 陈凇负责校对。
通讯作者: 陈凇, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院普通外科, aning0516@hotmail.com
电话: 010-68217460 传真: 010-68219860
收稿日期: 2007-04-03 修回日期: 2007-12-20

Advances in the relationship between side population analysis and cancer stem cells

Ning Wang, Lin Chen

Ning Wang, Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570522
Correspondence to: Lin Chen, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. aning0516@hotmail.com
Received: 2007-04-03 Revised: 2007-12-20

Abstract

Cancer stem cells have become one of the hot spots in cancer research. The major difficulty in research of cancer stem cells is their isolation and purification because of lack of universally accepted markers of these cells. Side population (SP) analysis has been used as a useful tool in stem cell research as SP, a cell population enriched in stem cells, has more phenotypic markers and can be isolated with specific methods.

Key Words: Side population; Tumor; Tumor stem cells

Wang N, Chen L. Advances in the relationship between side population analysis and cancer stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 199-202

摘要

肿瘤干细胞已成为肿瘤研究的热点之一,但是由于缺乏特异的表面标记,肿瘤干细胞的分离纯化一直是亟待解决的难题。由于SP(side population)细胞富含干细胞样细胞,并且SP细胞具有较明确的表型标记和分离方法,近年

来,通过流式细胞仪分选SP细胞的方法越来越多地应用在肿瘤干细胞的研究中。

关键词: SP细胞; 肿瘤; 肿瘤干细胞

王宁, 陈凇. SP细胞分选与肿瘤干细胞关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(2): 199-202
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/199.asp>

0 引言

肿瘤干细胞学说认为肿瘤组织中存在极少量肿瘤细胞,具有自我更新能力和分化潜能,是肿瘤增殖生长、转移和复发的根源,肿瘤干细胞已成为肿瘤研究的热点^[1]。肿瘤干细胞研究的首要问题就是分离鉴定,但是由于缺乏特异的表面标记,肿瘤干细胞的分离纯化一直是长久以来各国科学家亟待解决的难题之一。近年来,通过流式细胞仪分选SP(side population)细胞的方法,在肿瘤干细胞研究中越来越受到重视。本文主要综述了SP细胞分选与肿瘤干细胞的研究进展。

1 SP(side population)细胞

1996年, Goodell *et al*^[2]在用Hoechst33342荧光染色对小鼠骨髓造血干细胞进行检测时,通过紫外激发检测双波长分别为450 nm的蓝色荧光和675 nm的红色荧光,发现不到0.1%的细胞发出极弱的蓝光和红光,在流式二维分析点阵图上,这一小群细胞呈彗星状分布在细胞主群的一侧,他们将这群细胞称为SP(side population)细胞。Goodell *et al*研究发现ABC转运蛋白家族中多药耐药基因1即MDR1与细胞泵出荧光染料Hoechst33342有关,利用MDR1抑制剂维拉帕米(verapamil)阻断MDR1泵后SP细胞数量显著下降。但是,维拉帕米对于MDR1没有特异性,并且MDR1在65%的骨髓细胞中都有表达,而SP细胞却只占骨髓细胞总量的0.1%,所以MDR1不能作为分离鉴定SP细胞的唯一标记,应该进一步分析决定SP表型的标志。

2001年, Zhou *et al*^[3]通过一系列研究发现不

■背景资料

肿瘤干细胞已成为肿瘤研究的热点之一,其首要问题就是肿瘤干细胞的分离和鉴定。SP(side population)细胞分选是研究肿瘤干细胞的重要方法。

■同行评议者

王振宁, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

■应用要点

本文利用流式细胞仪分选SP细胞的方法在肿瘤干细胞研究中越来越受到重视。这种方法确实、方便和经济,具有普遍适用性。

同组织来源的SP细胞均表达ABC转运蛋白家族中多药耐药基因ABCG2/BCRP1,他们利用逆转录病毒载体进行了ABCG2/BCRP1基因转染试验,探讨ABCG2/BCRP1基因表达与SP细胞表型特征的关系,结果证实ABCG2/BCRP1的表达与SP细胞表型呈强相关,是SP细胞表型特征的决定因素。

近年来在成体多种组织、胚胎甚至肿瘤细胞中都发现了SP细胞,他们同源性高,具有自我更新和多向分化潜能,在体内能够分化产生不同组织类型的细胞,因此很多学者认为SP细胞中富含干细胞,SP细胞可以作为干细胞研究的重要资源,尤其是对于那些不知道干细胞表面分子标记的细胞^[4]。但是也有学者质疑SP细胞中存在干细胞,Truel *et al*^[5]的实验表明并非从所有组织分离出来的SP细胞都具有干细胞的特性。他们从人和小鼠的表皮中分离了SP细胞,对这群细胞进行了表型和基因型的鉴定,结果显示这是一群分化的细胞而非干细胞。

2 细胞与ABCG2/BCRP1

SP细胞具有快速泵出荧光染料Hoechst的特性,研究显示,这种特性与ABC转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)家族成员ABCG2/BCRP1的表达密切相关,提示ABCG2/BCRP1可作为SP细胞的表型标记而用于分离鉴定。三磷酸腺苷(ATP)结合转运蛋白G超家族成员2(ABCG2)首先在乳癌细胞中被发现,其功能是参与肿瘤细胞的多药耐药性^[6-7],但长期以来有关其在正常生理状态下的功能并不十分清楚。Zhou *et al*^[3]利用逆转录病毒将ABCG2/BCRP1基因导入正常小鼠骨髓细胞,培养12 d以后,SP细胞数量明显增加,约占细胞总数的60%。而ABCG2/BCRP1基因敲除的小鼠,骨髓和骨骼肌的SP细胞都显著减少。利用抗ABCG2的单抗结合流式细胞技术分析表明,ABCG2/BCRP1的表达与SP细胞表型呈强相关,ABCG2/BCRP1的表达是SP细胞能泵出Hoechst荧光染料的一保守特性。

3 SP细胞与正常组织

SP细胞最初是在分离纯化小鼠骨髓造血干细胞时被分离和鉴定的^[2],近年来大量研究显示,SP细胞在人和动物的许多重要组织器官,如骨髓、骨骼肌^[8-9]、皮肤^[5,10]、角膜^[11]、肺^[12]、心肌^[13]、气管等均有广泛分布,其功能除了参与造血系统的重建外,还与相应组织的更新与再

生、器官系统的自我重建以及成体干细胞的多器官可塑性有关^[8-15]。有报道骨髓来源的SP细胞移植mdx小鼠后可以使肌肉再生^[14],也可以使心肌缺损的小鼠心肌再生^[13]。

SP细胞在不同成体组织的含量不尽相同,已有的实验数据显示,骨髓中的SP细胞占总骨髓细胞量的0.05%,占骨髓总有核细胞量的0.79%;而脾、肺组织中的SP细胞含量较高,分别占该两种组织中有核细胞的0.96%和0.98%;骨骼肌、肝、肾、心脏和小肠中SP细胞比例更高,可以达到3.1%-9.1%;而SP细胞最高的是脑组织,占总核细胞的15.1%^[16]。

4 SP细胞与肿瘤

由于肿瘤细胞与干细胞之间存在着许多相似性,近年提出了肿瘤干细胞学说,认为肿瘤组织中存在极少量肿瘤细胞在肿瘤中充当干细胞角色,具有无限的自我更新能力,能够产生与上一代完全相同的子代细胞;并有多分化潜能和高度增值能力,产生不同表型的肿瘤细胞,使肿瘤在体内不断扩大,或形成新的肿瘤。已经有越来越多的证据表明,至少一些肿瘤中存在肿瘤干细胞,肿瘤干细胞是肿瘤生长、侵袭、转移和复发的根源,而肿瘤干细胞可能起源于机体的正常干细胞或其前体细胞。Bonnet *et al*^[17]分离出人急性髓系白血病(AML)中的肿瘤干细胞为CD34+ CD38-细胞。尽管这些细胞只占有AML细胞的0.2%,但是他们是唯一能在NOD/DCID鼠内形成AML移植瘤的细胞。这就排除了所有AML细胞都能形成克隆的可能性,而能形成克隆的只是少数细胞亚群,并且能在动物体内形成移植瘤。Al-Hajj *et al*^[18]建立了严重联合免疫缺陷小鼠模型,用于肿瘤干细胞的鉴定,并利用细胞表面标志物分离出了人乳腺癌肿瘤干细胞,这些肿瘤干细胞表面抗原为ESA+、Lin-、CD44+、CD24-/low。

肿瘤干细胞的研究,首要的工作是分离出具有肿瘤源性的细胞,与造血系统肿瘤相比,实体瘤干细胞难以分离。主要的原因有二:一是在肿瘤组织制成单细胞悬液的过程中,蛋白水解酶对细胞表面抗原的破坏,会影响干细胞的鉴别;二是许多实体组织自身的干细胞表面标志物尚未确定。由于SP细胞分选具有普遍适用性,因此利用细胞高效外排DNA荧光染料Hoechst33342的特性,通过流式细胞仪分选SP细胞的方法在肿瘤干细胞研究中越来越受到重视。

表 1 关于肿瘤SP细胞与肿瘤干细胞的主要文章

肿瘤类别	报道年度	报道者
急性髓细胞白血病	2001	Wulf <i>et al</i> ^[23]
胶质瘤、乳腺癌、神经母细胞瘤、宫颈癌	2004	Setoguchi <i>et al</i> ^[19]
神经胶质瘤	2004	Kondo <i>et al</i> ^[20]
神经母细胞瘤	2004	Hirschmann <i>et al</i> ^[24]
视网膜母细胞瘤	2005	Seigel <i>et al</i> ^[25]
乳腺癌、胶质瘤、前列腺癌	2005	Patrawala <i>et al</i> ^[22]
消化道肿瘤(食道癌、胃癌、肝癌、结直肠癌)	2006	Haraguchi <i>et al</i> ^[26]
肝癌	2006	Chiba <i>et al</i> ^[21]
卵巢癌	2006	Szotek <i>et al</i> ^[27]
甲状腺癌	2007	Mitsutake <i>et al</i> ^[28]

Setoguchi *et al*^[19]发现C6胶质瘤细胞、MCF-7乳腺癌细胞、B104神经母细胞瘤和HeLa细胞内含有0.4%、2.0%、0.4%和1.2%的SP细胞,但是在人骨肉瘤U-20S和SaOS-2细胞内没有检测到SP细胞,表明并不是所有的肿瘤细胞系内都存在SP细胞. Kondo *et al*^[20]从大鼠胶质瘤细胞系C6中分离出占0.4%的SP细胞, SP细胞在合适培养条件下可重新形成SP和non-SP细胞亚群, SP细胞可分化为神经元细胞和胶质细胞,提示C6中SP细胞是典型的干细胞样细胞,也就是肿瘤干细胞. Chiba *et al*^[21]在肝癌细胞系Huh7和PLC/PRE/5中分选出SP细胞,分别占了0.80%和0.25%,并证实SP细胞具有肿瘤干细胞样的特性.近年来利用分选SP细胞的方法来研究肿瘤干细胞的主要文献见表1.但也有报道认为SP细胞的肿瘤细胞群中存在非干细胞^[22],因此肿瘤SP细胞的特征还不能完全等同于肿瘤干细胞.

5 结论

SP细胞分选具有普遍适用性,是肿瘤干细胞研究中的一种有效方法.然而,在干细胞研究中SP细胞分选还有其自身局限性,主要表现在两个方面^[29]:一、SP细胞不能完全体现干细胞的特性.虽然大量研究证据表明SP细胞与干细胞的分子表型和特性具有一致性,但另外一些试验也存在不同观点,如Triel *et al*^[5]的实验表明并非从所有组织分离出来的SP细胞都具有干细胞的特性.因此,干细胞特异性分子标记物的研究是今后要着重解决的关键问题之一,他可以与SP细胞的研究互为完善和补充.二、SP细胞分选过程中所使用荧光染料Hoechst33342的毒性问题.荧光染料Hoechst33342是一种脂溶性

DNA结合染料,可以穿过细胞膜而与DNA结合,因为这种荧光染料对许多细胞都具有毒性作用,所以分选出来的SP细胞和non-SP细胞难于比较各自的生物学特性.因此,为了使荧光染料Hoechst33342的毒性对实验影响最小,还必须进一步优化SP分选方法.为了减少染料Hoechst的毒性, Montanaro *et al*^[30]探讨了适合不同组织染色的Hoechst染料最佳浓度.

目前,肿瘤干细胞已成为肿瘤研究的热点,但是由于缺乏特异的表面标记,肿瘤干细胞的分离纯化一直是亟待解决的难题.由于SP细胞富含干细胞样细胞,并且SP细胞具有较明确的表型标记和分离方法,所以较好地解决了其来源问题,这对推动肿瘤干细胞的研究与发展具有重要的意义,也为肿瘤治疗提供了新思路.

6 参考文献

- 1 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- 2 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; 183: 1797-1806
- 3 Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7: 1028-1034
- 4 Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 2006; 24: 3-12
- 5 Triel C, Vestergaard ME, Bolund L, Jensen TG, Jensen UB. Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp Cell Res* 2004; 295: 79-90
- 6 Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15665-15670
- 7 Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 1998; 58: 5337-5339
- 8 Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12339-12344
- 9 Meeson AP, Hawke TJ, Graham S, Jiang N, Elterman J, Hutcheson K, Dimaio JM, Gallardo TD, Garry DJ. Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells* 2004; 22: 1305-1320
- 10 Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H. Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells* 2005; 23:

■名词解释

SP(side population)细胞:某些癌细胞和干细胞可以将荧光染料Hoechst33342排出细胞,表现为细胞核不着色或者很低程度的着色.利用流式细胞仪可以将这些不着色细胞加以分离,人们将这种可以排出Hoechst33342的特性称为SP表型,将利用该特性分离的这部分细胞称为SP细胞.

■同行评价

本文选题方向准确,内容全面,层次清楚,文字流畅,是一篇较好的综述。

- 834-841
- 11 De Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells. *Stem Cells* 2006; 24: 368-375
- 12 Summer R, Kotton DN, Sun X, Ma B, Fitzsimmons K, Fine A. Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L97-104
- 13 Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402
- 14 Bhattacharya S, Jackson JD, Das AV, Thoreson WB, Kuszynski C, James J, Joshi S, Ahmad I. Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2764-2773
- 15 Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401: 390-394
- 16 Asakura A, Rudnicki MA. Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol* 2002; 30: 1339-1345
- 17 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737
- 18 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-3988
- 19 Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle* 2004; 3: 414-415
- 20 Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 781-786
- 21 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- 22 Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 2005; 65: 6207-6219
- 23 Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, Andreeff M, Goodell MA. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 98: 1166-1173
- 24 Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 14228-14233
- 25 Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis* 2005; 11: 729-737
- 26 Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006; 24: 506-513
- 27 Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, Dombkowski D, Preffer F, Maclaughlin DT, Donahoe PK. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 11154-11159
- 28 Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, Namba H, Ohtsuru A, Saenko V, Yamashita S. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology* 2007; 148: 1797-1803
- 29 Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3701-3710
- 30 Montanaro F, Liadaki K, Schiend J, Flint A, Gussoni E, Kunkel LM. Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters. *Exp Cell Res* 2004; 298: 144-154

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

参附注射液对大鼠肝缺血再灌注NF- κ B和PGI₂/TXA₂的影响

彭松林, 黄勇, 顾玺, 赵阳, 戴朝六

彭松林, 顾玺, 赵阳, 戴朝六, 中国医科大学附属盛京医院肝胆胰外科 辽宁省沈阳市 110004
黄勇, 山东省枣庄市立医院普外科 山东省枣庄市 277100
辽宁省教育厅重大应用基础研究基金资助项目, No. 2004C052
作者贡献分布: 戴朝六与彭松林对此文所作贡献均等; 此课题由戴朝六指导、彭松林、黄勇设计; 研究过程由彭松林、黄勇、赵阳、顾玺完成; 数据分析由彭松林、黄勇完成; 本论文写作由彭松林完成。
通讯作者: 戴朝六, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院肝胆胰外科. daicl@cmu2h.com
电话: 024-83955232
收稿日期: 2007-08-15 修回日期: 2008-01-04

Effect of ginseng and prepared aconite injection on TXA₂/PGI₂ and nuclear factor- κ B in rat model of hepatic ischemia-reperfusion

Song-Lin Peng, Yong Huang, Xi Gu, Yang Zhao, Chao-Liu Dai

Song-Lin Peng, Xi Gu, Yang Zhao, Chao-Liu Dai, Department of Hepatobiliary and Mammary Surgery, the Affiliated Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Yong Huang, Department of General Surgery, Zaozhuang Municipal Hospital, Zaozhuang 277100, Shandong Province, China
Supported by: the Applied Basic Research Programs Fund of the Department of Education of Liaoning Province, No. 2004C052
Correspondence to: Chao-Liu Dai, Department of Hepatobiliary and Mammary Surgery, the Affiliated Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. daicl@cmu2h.com
Received: 2007-08-15 Revised: 2008-01-04

Abstract

AIM: To explore the protective effects of ginseng and prepared aconite (Shen Fu) injection on the TXA₂/PGI₂ and nucleus factor- κ B (NF- κ B) in a rat model of hepatic ischemia-reperfusion (IR).

METHODS: Twenty-four male Wistar rats weighing 200-250 g were randomly divided into Shen Fu (SF) group treated with intraperitoneal SF injection (10 mL/kg) and IR group treated with 0.9% sodium chloride solution (10 mL/kg) as control group. Hepatic ischemia was induced by Pringle's maneuver for 15 minutes, and then

reperfusion was performed for one or three hours. Venous blood samples were collected three hours after reperfusion for measurement of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1 α} . Liver tissue samples were collected one or three hours after reperfusion, for measurement of deoxidized glutathione (GSH) and morphological and immunochemical studies.

RESULTS: Plasma TXB₂ was lower in the SF group than in the IR group after three-hour reperfusion (118.7 ± 19.1 vs 386.3 ± 282.7 , $P > 0.05$), while 6-keto-PGF_{1 α} was higher in the SF group than in the IR group (1081.7 ± 282.7 vs 960.0 ± 209.9 , $P > 0.05$). The ratio of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1 α} (0.11 ± 0.03 vs 0.39 ± 0.24 , $P < 0.05$) was significantly lower in the SF group. Fifteen minutes after ischemia and one hour after reperfusion, NF- κ B p65 was expressed in hepatocytes and Kuffer cells. The percentage of NF- κ B p65 positive cells in the SF group was significantly lower ($59.33\% \pm 11.06\%$ vs $75.83\% \pm 11.46\%$, $P < 0.05$) and GSH was slightly higher (47.59 ± 19.07 vs 37.32 ± 4.71 , $P > 0.05$) than those in the IR group. Three-hour reperfusion fifteen minutes after ischemia caused important histologic alterations in the liver. Marked structural abnormalities were observed in the IR group, such as massive hepatocyte swelling, necrosis, mitochondria edema and vacuolar changes. In the SF group, hepatic tissue injury was significantly improved.

CONCLUSION: Shen Fu injection protects hepatic tissue from ischemia-reperfusion injury by decreasing the ratio of thromboxane A₂ and prostacyclin and inhibiting the activation of NF- κ B.

Key Words: Ischemia reperfusion; Prostacyclin; Thromboxane A₂; Nuclear factor-kappa B

Peng SL, Huang Y, Gu X, Zhao Y, Dai CL. Effect of ginseng and prepared aconite injection on TXA₂/PGI₂ and nuclear factor- κ B in rat model of hepatic ischemia-reperfusion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 203-207

■背景资料

近年研究发现一些中药对脏器的缺血再灌注损伤具有明显的保护作用, 参附注射液就是其中有代表性的药物之一. 与其他保护性药物相比, 他可多环节、多方面保护上述脏器的缺血再灌注损伤. 但是, 参附注射液对HIRI的作用及机制, 尤其是对NF- κ B/I κ B, 对花生四烯酸代谢所产生的多个细胞因子的作用尚不清楚.

■同行评议者

王鲁, 副教授, 复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所

■研发前沿

目前关于NF- κ B、花生四烯酸代谢产物(包括前列腺素类和白介素类)及磷脂酶A₂和环氧合酶在缺血再灌注损伤中的作用是缺血再灌注损伤研究的热点之一。本文介绍了参附注射液对NF- κ B的抑制作用和改善血栓素A₂/前列环素的比值,但对其代谢通路中关键酶环氧合酶的作用及调节机制有待进一步研究。

摘要

目的:探讨参附注射液对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。

方法:24只Wistar大鼠随机分为IR组和SF组。SF组腹腔注射参附注射液,10 mL/kg。IR组大鼠给予相同剂量的生理盐水。两组均采用Pringle's法阻断肝门缺血15 min再灌注1 h、3 h,测定血浆血栓素B₂(thromboxane B₂, TXB₂)、6-酮-前列腺素F_{1 α} (6-keto-PGF_{1 α})、肝组织NF- κ B p65表达和肝组织匀浆GSH含量,及观察肝组织形态学改变。

结果:再灌注3 h SF组血浆TXB₂低于IR组(118.7 \pm 19.1 vs 386.3 \pm 282.7, $P > 0.05$), 6-keto-PGF_{1 α} 高于IR组(1081.7 \pm 282.7 vs 960.0 \pm 209.9, $P > 0.05$), 二者比值TXB₂/6-keto-PGF_{1 α} 低于IR组(0.11 \pm 0.03 vs 0.39 \pm 0.24, $P < 0.05$);再灌注1 h SF组NF- κ B p65表达低于IR组(59.33% \pm 11.06% vs 75.83% \pm 11.46%, $P < 0.05$);而GSH稍高于IR组(47.59 \pm 19.07 vs 37.32 \pm 4.71, $P > 0.05$)。SF组肝实质细胞和线粒体损伤明显减轻。

结论:参附注射液对肝缺血再灌注损伤有保护作用,其机制与降低TXA₂/PGI₂比值,抑制NF- κ B活化有关。

关键词:缺血再灌注;前列腺素;血栓素A₂;核转录因子 κ B

彭松林, 黄勇, 顾玺, 赵阳, 戴朝六. 参附注射液对大鼠肝缺血再灌注NF- κ B和PGI₂/TXA₂的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 203-207

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/203.asp>

0 引言

近年研究发现核转录因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)在肝脏缺血再灌注损伤中起重要作用,通过调控多种细胞因子介导缺血再灌注损伤。而血栓素A₂(thromboxane A₂, TXA₂)和前列环素(prostacyclin, PGI₂)是一对互相拮抗的细胞因子,在肝缺血再灌注时介导微循环障碍等方面有重要作用。参附注射液由人参、附子提取物组成,其有效成分为人参皂甙和乌头类生物碱。近年来一些研究表明参附注射液对缺血再灌注损伤有保护作用。本文通过观察参附注射液对TXA₂、PGI₂和NF- κ B的影响探讨参附注射液保护肝缺血再灌注损伤的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠24只,购自中国医科大学附

属第二医院实验动物中心。参附注射液为雅安三九药业有限公司赠与,药物批号031115。测定6-keto-PGF_{1 α} 和TXB₂试剂盒购自北京解放军总医院科技开发中心放免所,测定NF- κ B p65所需的兔抗大鼠NF- κ B p65 mAb、即用型SP免疫试剂盒和DAB显色试剂盒购自中国北京中山生物技术有限公司。GSH试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药:24只大鼠随机分为肝缺血再灌注组(IR组, $n = 12$)和参附注射液加肝缺血再灌注组(SF组, $n = 12$)。SF组给予参附注射液10 mL/kg, ip, 1次/d,连续给药6 d,第6天于手术前30 min给药。IR组大鼠同样方法给予相同剂量的生理盐水。两组均于第6天手术,给药期间常规自由喂养,给水。

1.2.2 动物模型及取材:术前12 h禁食,自由饮水。10%水合氯醛3 mL/kg ip麻醉后,剔除腹部体毛,局部消毒,取腹正中切口开腹,开腹后离断肝周韧带,包括镰状韧带、肝胃韧带、冠状韧带,消除肝脏侧枝循环。用Pringle's法(无创伤微血管夹夹闭门静脉、肝动脉、胆总管)使肝缺血,持续15 min后松开血管夹,恢复肝脏血供,然后关腹,再灌注3 h再次开腹。先取一次性5 mL无菌注射器吸取消炎痛-EDTANa₂ 0.2 mL,自下腔静脉肝下段快速抽取静脉血3 mL,即刻在空针内颠倒混匀,3500 r/min、4℃离心15 min,分离血浆-20℃保存,待测血浆血栓素B₂(thromboxane B₂, TXB₂)和6-酮-前列腺素F_{1 α} (6-keto-prostaglandin F_{1 α} , 6-keto-PGF_{1 α})。快速取约1 cm \times 1 cm \times 0.5 cm大小肝组织,置于40 g/L甲醛溶液中固定,以用于作组织学和免疫组织化学检查,待测NF- κ B p65;然后快速切取全肝组织,置于液氮中冷冻后,用锡箔纸包裹置于液氮中保存,再转至-80℃冰箱中保存,待测还原型谷胱甘肽(deoxidized glutathione, GSH)。

1.2.3 检测指标:采用放免法检测TXB₂和6-keto-PGF_{1 α} ,按6-keto-PGF_{1 α} 和TXB₂试剂盒说明书操作进行。采用免疫组织化学SP法测定肝组织NF- κ B p65表达,按试剂盒说明书进行操作。免疫反应阳性细胞为细胞核或细胞质染成棕黄色或有棕黄色颗粒沉积,用双盲法在每张切片中选取有代表性的区域,在高倍镜($\times 400$)下观察,随机计数5个视野中阳性细胞数占总细胞的百分数取其均值。肝组织中GSH水平的测定,用电子天平称取冰冻肝脏组织100 mg,先用比色法按考

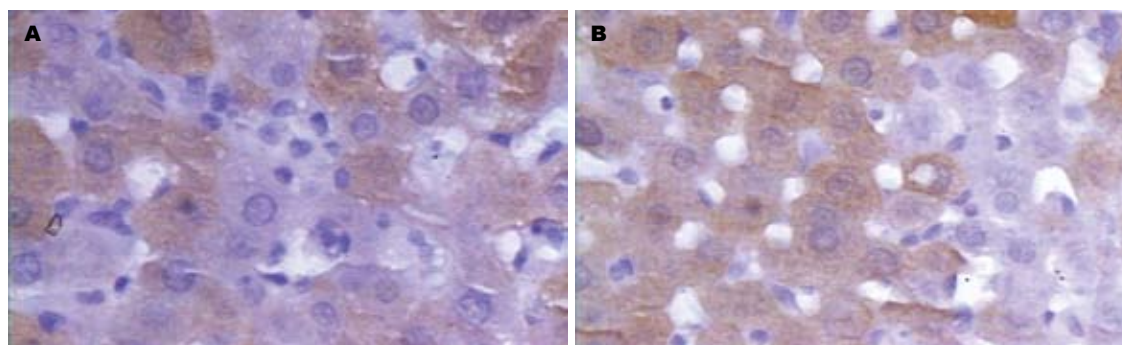


图1 肝缺血再灌注1 h NF-κB p65表达水平(SP × 400). A: SF组; B: IR组.

■ 相关报道

张汝鹏 *et al* 的研究提示TXA₂/PGI₂在缺血再灌注损伤的作用不是单纯的TXA₂升高或PGI₂降低, 主要是TXA₂/PGI₂比值升高. 吴刚和徐均 *et al* 的研究均表明NF-κB活化是导致缺血再灌注损伤的关键点之一, 抑制NF-κB活化可以减轻脏器缺血再灌注损伤.

表1 再灌注3 h血浆TXB₂、6-keto-PGF_{1α}浓度(ng/L)及比率(mean ± SD, n = 6)

分组	TXB ₂	6-keto-PGF _{1α}	TXB ₂ /6-keto-PGF _{1α}
IR	386.3 ± 282.7	960.0 ± 209.9	0.39 ± 0.24
SF	118.7 ± 19.1	1081.7 ± 282.7	0.11 ± 0.03 ^a

^aP < 0.05 vs IR组.

马斯亮兰试剂盒说明书操作, 测定肝组织匀浆的蛋白含量. 样品蛋白含量(g/L) = (测定管吸光度/标准管吸光度) × 标准管浓度(g/L). 按GSH试剂盒说明书进行操作, 比色法测定 GSH含量: 组织匀浆中GSH(mg/gprot) = (测定管吸光度A - 测定空白管吸光度A) / (标准管吸光度A - 空白管吸光度A) × 标准管浓度(0.5 mmol/L) × GSH分子量(307) / 组织蛋白含量(g/L). HE染色, 采用光学显微镜观察.

统计学处理 所有测定结果以mean ± SD表示, 采用独立样本t检验应用SPSS11.0统计软件进行统计分析, P < 0.05差异有统计学意义.

2 结果

2.1 血浆TXB₂和6-keto-PGF_{1α}浓度 本实验显示肝脏缺血15 min, 再灌注3 h后SF组血浆TXB₂浓度较IR组低(P > 0.05), 而6-keto-PGF_{1α}浓度升高(P > 0.05), TXB₂/6-keto-PGF_{1α}比值显著降低(P < 0.05, 表1).

2.2 肝脏组织中NF-κB p65的表达水平 NF-κB p65阳性细胞为细胞核或细胞质染成棕黄色或有棕黄色颗粒沉积, 肝脏缺血再灌注后肝细胞深染, 枯否氏细胞亦可见表达. 肝缺血15 min再灌注1 h, SF组的阳性细胞百分数较IR组显著减低(P < 0.05, 表2, 图1).

2.3 组织细胞学改变 光镜下IR组肝细胞水肿、

表2 再灌注1 h肝脏组织NF-κB p65表达阳性细胞百分数和GSH水平(mean ± SD, n = 6)

分组	NF-κB p65(%)	GSH(mg/gprot)
IR	75.83 ± 11.46	37.32 ± 4.71
SF	59.33 ± 11.06 ^a	47.59 ± 19.07

^aP < 0.05 vs IR组.

大片坏死, 肝窦和微血管内明显淤血. SF组肝窦内淤血和组织损伤明显减轻, 可见小灶状坏死.

3 讨论

研究表明, 肝脏缺血再灌注损伤首先表现的是微循环障碍, 具有血管活性的细胞因子导致的微循环收缩是导致肝缺血再灌注损伤的一个重要因素. Kondo *et al*^[1]报告, 在肝脏缺血期, 常温下缺血20 min就导致肝血窦直径和窦后小静脉直径在缺血末分别缩小25%和20%, 而且缺血后的肝功能障碍与这种微循环的收缩有关. TXA₂和PGI₂是花生四烯酸的两个产物, PGI₂具有很强的扩血管作用, 同时通过升高cAMP加强渗透屏障. 内源性PGI₂的反应性血管舒张作用维持比较短暂, 更为重要的是PGI₂可能激活依赖Ca²⁺激活的K⁺通道和依赖ATP激活的K⁺通道^[2-3], 这些离子通道的开放可使细胞膜超极化、减少细胞内钙超载和起到持久舒张血管的作用^[4-6]. 而TXA₂是一种很强的缩血管物质, 增加微血管的通透性. 研究表明缺血再灌注后PGI₂的释放下降^[7]或TXA₂的释放增加, 在再灌注损伤中起着重要作用^[8]. 肝缺血再灌注时TXA₂明显升高, 早期更趋明显, 晚期下降; PGI₂的含量亦增高, 但增高的梯度远低于TXA₂; TXA₂/PGI₂比值在肝缺血再灌注早期增高明显, 再灌注24 h接近正常^[9]. 用TXA₂合成酶抑制剂抑制TXA₂的释放或用受体拮抗剂阻断TXA₂效应^[10], 用PGI₂拟似

应用要点

本文的结果提示肝脏外科手术后应用参附注射液可以减轻肝脏的再灌注损伤。

剂^[8]或通过提高内源性PGI₂水平^[7],都可起到防护缺血再灌注损伤的作用. Xiao *et al*^[2]报告,当血栓素受体缺乏时也并不减轻心脏的缺血再灌注损伤,而当PGI₂受体缺乏时却明显加重心脏缺血再灌注损伤;内源性PGI₂水平下降比TXA₂水平升高更易导致再灌注后的组织损伤.因此,改善PGI₂与TXA₂二者比例失衡是防护缺血再灌注损伤的一个重要机制.

NF-κB是1986年Sen *et al*^[11]首次从B淋巴细胞核抽提物中检测到的一种核蛋白因子,是细胞内最重要的核转录因子.静息状态下,NF-κB多以p50和p65二聚体与其抑制蛋白IκB相结合而存在胞质,呈无活性状态^[12].外源性刺激如脂多糖、缺血再灌注和TNF-α等通过信号转导引起IκB降解,导致NF-κB-IκB复合物解体,NF-κB活化,借助于被暴露出来的核定位信号进入细胞核,在核内与靶基因的特异序列结合并启动转录发挥其调控作用^[12].目前研究表明NF-κB是缺血再灌注损伤过程中的一个关键环节,主要通过与其核内的特异序列结合调节IL-1、IL-6、TNF-α、iNOS和ICAM-1等多种相关炎症因子介导缺血再灌注损伤^[13-14],而且NF-κB与其特异调节基因序列的结合活性与肝脏缺血再灌注损伤程度有直接关系,缺血再灌注1 h至2 h,NF-κB结合的活性较强,缺血再灌注4 h NF-κB结合活性减弱^[15].缺血再灌注后NF-κB活化上调了炎性介质表达从而增加中性粒细胞浸润导致肝脏炎症反应^[16].通过抑制剂抑制其活化或抑制其与特异性调控序列结合可以明显改善肝脏缺血再灌注损伤^[16-17].同时NF-κB是缺血再灌注时导致肝脏损伤的另一重要因素枯否氏细胞激活的关键因子,肝缺血时间越长,枯否氏细胞NF-κB激活越明显,枯否氏细胞培养上清TNF-α含量越高^[18].一些研究还证实NF-κB参与环氧合酶-2(cyclooxygenase 2, COX-2)和磷脂酶A₂(phospholipase A₂, PLA₂)的调控^[19-20],而后二者调节花生四烯酸代谢和前列腺类物质的两个关键酶.因此,NF-κB是防护缺血再灌注损伤的一个重要靶点.

本实验大鼠肝脏在缺血15 min再灌注3 h后出现明显的组织损伤,肝细胞肿胀、坏死;电镜下大量线粒体水肿和空泡变性.给予参附注射液后再灌注1 h时NF-κB p65阳性细胞明显减少;再灌注3 h时TXA₂降低和PGI₂升高从而PGI₂与TXA₂二者的比例升高,同时在再灌注3 h组织损伤明显减轻.提示参附注射液通过抑制NF-κB活

化、改善PGI₂与TXA₂二者的比例失衡保护大鼠肝脏缺血再灌注损伤;而PGI₂与TXA₂水平的改变是否是由于NF-κB调节COX-2和PLA₂的结果及其机制有待进一步研究.作为体内另一种重要的抗缺血再灌注损伤的因子,GSH可在多种氧化应激中对抗氧自由基的损害,减轻组织损伤.虽然SF组GSH水平稍高于IR组,但本实验结果尚不能证实参附注射液的保护作用通过GSH途径.

参考文献

- Kondo T, Todoroki T, Hirano T, Schildberg FW, Messmer K. Impact of ischemia-reperfusion injury on dimensional changes of hepatic microvessels. *Res Exp Med (Berl)* 1998; 198: 63-72
- Xiao CY, Hara A, Yuhki K, Fujino T, Ma H, Okada Y, Takahata O, Yamada T, Murata T, Narumiya S, Ushikubi F. Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia-reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation* 2001; 104: 2210-2215
- Schubert R, Serebryakov VN, Mewes H, Hopp HH. Iloprost dilates rat small arteries: role of K(ATP)- and K(Ca)-channel activation by cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 1997; 272: H1147-H1156
- Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Hori M. Bradykinin mediation of Ca(2+)-activated K⁺ channels regulates coronary blood flow in ischemic myocardium. *Circulation* 1997; 95: 1560-1567
- Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 1992; 70: 223-233
- de Wit C, Bolz SS, Pohl U. Interaction of endothelial autacoids in microvascular control. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 9: IX/113-116
- Myers SI, Horton JW, Hernandez R, Walker PB, Vaughan WG. Pentoxifylline protects splanchnic prostacyclin synthesis during mesenteric ischemia/reperfusion. *Prostaglandins* 1994; 47: 137-150
- Jiang XW, Kambara K, Gotoh N, Nishigaki K, Fujiwara H. Effects of low-dose Beraprost sodium, a stable prostaglandin I₂ analogue, on reperfusion injury to rabbit lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1669-1675
- 张汝鹏, 王殿昌, 邢福成. 大鼠肝缺血再灌注损伤时血栓素A₂和前列环素变化及川芎嗪的作用. *中国中西医结合外科杂志* 1997; 3: 393-395
- Shirabe K, Kin S, Shinagawa Y, Chen S, Payne WD, Sugimachi K. Inhibition of thromboxane A₂ activity during warm ischemia of the liver. *J Surg Res* 1996; 61: 103-107
- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-716
- Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 3): 369-378
- Schmidt KN, Traenckner EB, Meier B, Baeuerle PA. Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem* 1995; 270: 27136-27142
- 徐明清, 薛兰, 龚建平, 韩本立, 董家鸿. NF-κB在缺血

- 再灌注肝脏枯否细胞活化中的作用. 第三军医大学学报 2002; 24: 149-151
- 15 Xu J, Yang Z, Zeng J. Role of NF-kappa B in liver ischemia reperfusion injury of rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003; 23: 158-160
- 16 吴刚, 赵宁, 刘永峰, 程颖, 杨蕾, 何三光. NF κ B抑制剂对白细胞介导肝脏缺血再灌注损伤的保护作用. 中华肝胆外科杂志 2004; 10: 323-325
- 17 徐钧, 解军, 鲍民生, 李正中, 杨镇. 核转录因子- κ B在FK506保护肝脏缺血再灌注损伤中的作用. 中华实验外科杂志 2003; 20: 232-233
- 18 Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001; 181: 160-166
- 19 Lappas M, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE. Regulation of phospholipase isozymes by nuclear factor-kappaB in human gestational tissues in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2365-2372
- 20 Lin CC, Hsiao LD, Chien CS, Lee CW, Hsieh JT, Yang CM. Tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression in human tracheal smooth muscle cells: involvement of p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB. *Cell Signal* 2004; 16: 597-607

■同行评价

本文缺乏新意, 建议讨论重点, 表明文章有何新发现, 与以往文章有何不同.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WCJD 和 WJG 2008 年对同行评议 将开始实行公开策略

本刊讯 世界华人消化杂志(WCJD)和World Journal of Gastroenterology (WJG)为了确保刊出文章的质量, 即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 如: 同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 2007 年 1-12 月份收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 World Journal of Gastroenterology (WJG) 2007年1-48期共发表文章1120篇, 其中国际文章791篇, 占71%; 国内文章329篇, 占29%. 社论63篇, 综述30篇, 专题亮点139篇, 文章663篇(基础研究和临床研究), 病例报告193篇, 读者来信等32篇, 评论性文章占发文总量的21%. 2007年1-12月份共收稿2628篇, 其中国内稿件980篇, 占37%; 国外稿件1648篇, 占63%; 退稿1052篇, 退稿率为40%. (常务副主任: 刘晔 2008-01-01)

褪黑素对噪声应激大鼠胃肠传输功能的影响及其机制

张磊, 刘芳娥, 胡文治, 王冠, 崔洪勇, 帅世炜

■背景资料

褪黑素是由松果体分泌的一种神经内分泌激素, 能够有效清除人体化学反应产生的氧自由基、对抗应激作用。本文对其防治噪声引起的大鼠胃肠传输功能的影响进行了探讨。

张磊, 崔洪勇, 王冠, 帅世炜, 中国人民解放军第四军医大学口腔医学系 陕西省西安市 710033

刘芳娥, 中国人民解放军第四军医大学基础部教学实验中心 陕西省西安市 710033

胡文治, 中国人民解放军第四军医大学航空航天医学系 陕西省西安市 710033

作者贡献分布: 张磊与刘芳娥对此文所作贡献均等, 此课题由张磊、刘芳娥设计, 研究过程由张磊、刘芳娥、胡文治、王冠、崔洪勇、帅世炜操作完成, 研究所用新试剂及分析工具由刘芳娥提供; 数据分析由张磊完成, 本论文写作由张磊、刘芳娥完成。

通讯作者: 刘芳娥, 710033, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学基础部教学实验中心. liufange@126.com

电话: 029-84774518

收稿日期: 2007-09-08 修回日期: 2007-11-05

Effect of melatonin on gastrointestinal transit in rats induced by noise stress and its mechanism

Lei Zhang, Fang-E Liu, Wen-Zhi Hu, Guan Wang, Hong-Yong Cui, Shi-Wei Shuai

Lei Zhang, Hong-Yong Cui, Guan Wang, Shi-Wei Shuai, School of Stomatology, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China
Fang-E Liu, Center of Basic Medicine Teaching Experiment, School of Basic Medicine, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China
Wen-Zhi Hu, School of Aerospace Medicine, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Fang-E Liu, Center of Basic Medicine Teaching Experiment, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710033, Shanxi Province, China. liufange@126.com

Received: 2007-09-08 Revised: 2007-11-05

Abstract

AIM: To study the effects of melatonin on gastrointestinal transit function in rats, and its possible mechanism.

METHODS: Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into a blank group, control groups 1 and 2, and experimental groups 1 and 2. Experimental and control groups were treated with 15 mg/kg melatonin by intraperitoneal injection, or the same volume of physiological saline, at 30 min before noise stress. Both groups were stimulated separately by 120 dB(A) impulse noise of type 56 submachine guns to set

up noise stress models. Rats in control group 1 and experimental group 1 were subjected to 1 d stress; rats in control group 2 and experimental group 2 were subjected to 3 d stress. We observed the effects of melatonin on stomach residual rate, small intestine transit time and the plasma levels of cortisol, motilin and calcitonin-gene related peptide (CGRP).

RESULTS: Stomach residual rate and small intestine transit time were significantly increased in control groups 1 and 2 compared with those in the blank group ($54.52\% \pm 4.53\%$, $63.56\% \pm 5.51\%$ vs $41.41\% \pm 7.74\%$, $58.42\% \pm 8.77\%$, $67.98\% \pm 6.63\%$ vs $41.26\% \pm 6.08\%$, $P < 0.05$). Stomach residual rate and small intestine transit time in experimental group 1 ($44.53\% \pm 8.93\%$, $44.18\% \pm 4.36\%$) and experimental group 2 ($47.52\% \pm 4.98\%$, $46.4\% \pm 4.96\%$) were significantly delayed compared with those in the control group ($P < 0.01$). However, there was no difference between the experimental group and the blank group. Levels of cortisol and motilin in blood plasma of control 1 and 2 groups were significantly enhanced compared to the blank group (1.99 ± 0.08 , 2.59 ± 0.09 vs 0.95 ± 0.10 , 158.09 ± 10.44 , 180.09 ± 14.85 vs 124.95 ± 7.83 , $P < 0.01$); the experimental groups (group 1: 1.27 ± 0.14 , 128.67 ± 10.25 ; group 2: 1.63 ± 0.09 , 134.29 ± 18.33) were degraded significantly compared to the control group ($P < 0.01$), but did not change much in comparison with the blank group ($P > 0.05$). Level of calcitonin-gene related peptide in blood plasma of control groups 1 and 2 was lower than that of the blank group (125.24 ± 8.5 , 134.29 ± 18.33 vs 195.03 ± 7.70 , $P < 0.01$), and was higher in the experimental group (191.67 ± 10.13 , 190.04 ± 11.43) than in the control group ($P < 0.01$), but did not significantly differ from blank group ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Melatonin is effective in preventing gastrointestinal transit in rats induced by noise stress. Cortisol, CGRP and motilin play an important role in the pathogenesis.

Key Words: Melatonin; Noise; Gastrointestinal transit; Cortisol; Calcitonin gene-related peptide; Motilin

■同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院消化内科; 姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

Zhang L, Liu FE, Hu WZ, Wang G, Cui HY, Shuai SW. Effect of melatonin on gastrointestinal transit in rats induced by noise stress and its mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 208-211

摘要

目的: 探讨褪黑素(MT)对噪声应激大鼠胃肠传输功能的影响及可能机制。

方法: 将♂SD大鼠40只随机分为空白对照组、对照1, 2组和实验1, 2组, 实验组和对照组分别在应激前30 min ip MT(15 mg/kg)和等体积生理盐水。对照和实验1组和以56式冲锋枪射击时产生的120 DB(A)的脉冲噪声, 对照和实验1组应激1 d, 对照和实验2组应激3 d, 建立噪声应激模型。噪声应激后, 观察MT在各组大鼠胃内残留率, 小肠推进比, 血浆中皮质醇、降钙素基因相关肽(CGRP)和胃动素(MTL)的影响。

结果: 对照1, 2组大鼠的胃残留率($54.52\% \pm 4.53\%$, $63.56\% \pm 5.51\%$ vs $41.41\% \pm 7.74\%$)、小肠推进比($58.42\% \pm 8.77\%$, $67.98\% \pm 6.63\%$ vs $41.26\% \pm 6.08\%$)、血浆皮质醇(1.99 ± 0.08 , 2.59 ± 0.09 vs 0.95 ± 0.10)、MTL浓度(158.09 ± 10.44 , 180.09 ± 14.85 vs 124.95 ± 7.83)与空白对照组相比明显升高($P < 0.01$), 其血浆CGRP浓度(125.24 ± 8.5 , 122.02 ± 10.36)与空白对照组(195.03 ± 7.70)相比显著降低; 实验1, 2组大鼠的胃残留率($44.53\% \pm 8.93\%$, $47.52\% \pm 4.98\%$)、小肠推进比($44.18\% \pm 4.36\%$, $46.4\% \pm 4.96\%$)、血浆皮质醇(1.27 ± 0.14 , 1.63 ± 0.09)、MTL浓度(128.67 ± 10.25 , 134.29 ± 18.33)与对照组相比显著降低, 其血浆CGRP浓度(191.67 ± 10.13 , 190.04 ± 11.43)与对照组相比显著升高。

结论: MT对噪声引起的大鼠胃肠传输功能紊乱具有保护作用, 皮质醇、CGRP和MTL在其发病机制中均起到重要作用。

关键词: 褪黑素; 噪声; 胃肠通过实验; 皮质醇; 降钙素基因相关肽; 胃动素

张磊, 刘芳娥, 胡文治, 王冠, 崔洪勇, 帅世伟. 褪黑素对噪声应激大鼠胃肠传输功能的影响及其机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16(2): 208-211
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/208.asp>

0 引言

噪声作为现代社会不得不面对的问题越来越受到人们的广泛关注。研究表明, 噪声不仅能够引

起记忆力减退^[1], 还可以导致胃肠对食物的传输功能紊乱^[2]。目前, 对噪声所致胃肠功能紊乱的防治国内外尚未有报道。我们观察了褪黑素(MT)对噪声应激大鼠胃肠传输功能的影响, 并通过测定大鼠血浆激素浓度的变化探讨其可能发生的机制, 为胃肠功能紊乱的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠40只, 周龄12 wk, 体质量 280 ± 30 g(由第四军医大学动物实验中心提供)。灌胃液是以50 g/L的炭末与100 g/L的阿拉伯树胶混合蒸馏水制成。褪黑素为Sigma公司产品, 降钙素基因相关肽(CGRP)、胃动素(MTL)试剂盒由解放军总医院放免研究所提供, XH2060型全自动 γ -免疫分析仪由中国核工业部西安二六二厂生产。

1.2 方法

1.2.1 给药: 大鼠在环境适应期(7 d)后随机分为5组: 空白对照组、两个对照组、两个实验组, 每组8只。除空白对照组外, 其余各组给予每天120 dB(A)噪声连续应激8 h, 对照1组和实验1组应激1 d, 对照2组及实验2组应激3 d, 每次噪声应激前30 min两个实验组分别ip MT(15 mg/kg), 两对照组ip等量生理盐水。为消除MT分泌的生物节律对实验结果的影响, 于上午8时开始实验。

1.2.2 枪击噪声应激模型的建立: 大鼠禁食12 h后置于隔音室内, 用56式冲锋枪射击时产生的噪音制成录音, 通过扬声器由电脑控制随机播放, 扬声器距离大鼠20-30 cm。采用国营红声器材厂生产的ND2型精密声级计及频谱分析仪分析检测, 控制噪音强度为120 DB(A), 频率为0.25-4.0 kHz。

1.2.3 大鼠液体食物胃肠传输功能的测量^[3]: 应激结束后, 各组大鼠分别ig 2.5 mL灌胃液, ig 15 min后采用戊巴比妥钠ip麻醉剖腹, 结扎胃贲门和幽门, 从贲门处至回肠末端分离胃肠。取贲门至回肠末端肠管, 将其自然拉直铺平, 分别测量从幽门括约肌至半固体糊前端及至回盲部的小肠长度, 计算小肠推进比, 即幽门括约肌至半固体糊前端的距离占幽门括约肌至回盲部距离百分比。取胃, 用滤纸拭干后称质量, 沿胃大弯剪开胃体, 洗去胃内容物后拭干, 称质量, 计算胃内残留率, 即胃内残留物占所灌半固体糊的质量百分比。

1.2.4 皮质醇、CGRP、MTL浓度的检测: 上述

■研究前沿

胃肠传输功能紊乱在临床较为多见, 目前的研究主要集中在药物对其的改善作用上, 具体机制还不明确, 尤其是应激对小肠传输功能的影响尚存在争议, 有待于进一步研究。

■相关报道

以往研究表明:褪黑素可以从三个水平对下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)产生调节作用,从而起到抗应激作用,对应激所引起的溃疡、学习记忆损伤、能量代谢紊乱都具有改善作用。

表 1 大鼠胃内残留率、小肠推进比,血浆皮质醇、CGRP、MTL浓度($n=8$, mean \pm SD)

分组	胃内残留率(%)	小肠推进比(%)	皮质醇($\mu\text{g/dl}$)	CGRP(ng/L)	MTL(ng/L)
空白对照组	41.41 \pm 7.74	41.26 \pm 6.08	0.95 \pm 0.10	195.03 \pm 7.70	124.95 \pm 7.83
对照1组	54.52 \pm 4.53 ^b	58.42 \pm 8.77 ^b	1.99 \pm 0.08 ^b	125.24 \pm 8.55 ^b	158.09 \pm 10.44 ^b
对照2组	63.56 \pm 5.51 ^{bd}	67.98 \pm 6.63 ^{bd}	2.59 \pm 0.09 ^{bd}	122.02 \pm 10.36 ^b	180.09 \pm 14.85 ^b
实验1组	44.53 \pm 8.93 ^d	44.18 \pm 4.36 ^d	1.27 \pm 0.14 ^d	191.67 \pm 10.13 ^d	128.67 \pm 10.25 ^d
实验2组	47.52 \pm 4.98 ^f	46.4 \pm 4.96 ^f	1.63 \pm 0.09 ^f	190.04 \pm 11.43 ^f	134.29 \pm 18.33 ^f

^b $P<0.01$ vs 空白对照组; ^d $P<0.01$ vs 对照1组; ^f $P<0.01$ vs 对照2组。

操作后,开胸取血4 mL加入含100 g/L乙二醇四乙酸钠30 μL 和抑肽酶40 μL 的离心管中,混匀,于4℃ 3000 r/min离心10 min,离心半径12 cm,分离出血浆,-20℃下保存待测定。采用放射免疫法测定血浆中皮质醇、MTL和CGRP含量。操作程序严格按照试剂盒及仪器说明书由一人完成检测。

统计学处理 所有数据均以mean \pm SD表示,结果采用SPSS10.0统计软件进行单因素方差分析,均数间的多重比较用LSD- t 进行显著性检验。

2 结果

两个对照组与空白对照组相比胃内残留率、小肠推进比显著升高($P<0.01$);对照2组较对照1组胃内残留率进一步升高($P<0.01$),小肠推进比进一步升高($P<0.01$);实验1组比对照1组胃内残留率、小肠推进比降低($P<0.01$),实验2组比对照2组胃内残留率、小肠推进比降低($P<0.01$);实验1组、实验2组与空白对照组间均无显著差异($P>0.01$)(表1)。两个对照组大鼠血浆皮质醇均较空白对照组显著升高($P<0.01$),对照2组较对照1组升高更加明显($P<0.01$),实验1组较对照1组显著降低($P<0.01$),实验2组较对照2组显著降低($P<0.01$),实验1组、实验2组与空白对照组间有显著差异($P<0.05$)(表1)。各组大鼠血浆CGRP水平变化为:对照1组及对照2组显著低于空白对照组($P<0.01$),实验1组较对照1组显著升高($P<0.01$),实验2组较对照2组显著升高($P<0.01$),实验1组、实验2组与空白对照组间均无显著差异($P>0.05$)(表1)。各组大鼠血浆MLT水平变化为:两个对照组显著高于空白对照组($P<0.01$),对照2组显著高于对照1组($P<0.01$),实验1组较对照1组显著降低($P<0.01$),实验2组较对照2组显著降低($P<0.01$),实验1组、实验2组与空白对照组间均无显著差异($P>0.01$,表1)。

3 讨论

应激是机体对各种刺激产生的一些非特异性反应,而下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamo-pituitary-adrenal axis, HPA轴)是应激系统的重要组成部分^[4],机体主要是通过HPA轴来调节机体,完成对应激的适应。HPA轴兴奋时,CRH合成增加,刺激垂体前叶释放ACTH,使肾上腺皮质释放皮质激素,血浆皮质激素水平是其最终表现形式。研究发现,心理应激可导致大鼠血浆内的皮质激素显著上升^[5]。本实验也表明,急性的噪声应激会导致大鼠血浆内的皮质醇水平较正常大鼠显著升高,并且随应激的加重升高更加明显,这进一步证明急性噪声刺激可使大鼠处于应激状态。

MT是人体松果体分泌的一种重要激素,对人体的作用极其广泛,尤其对应激反应有着重要影响。MT的分泌存在明显的昼夜节律变化,并且与HPA轴所涉及的激素分泌节律恰恰相反,这提示我们两者可能有着一定的关系。研究表明,连续5 d注射MT,使长期应用地塞米松引起的HPA轴失调征象(如室旁核CRH的转录增加)得到明显改善^[6];ip 0.2 mg/kg剂量的MT,即可对皮质醇诱导的HPA轴受抑制大鼠其下降的血浆ACTH及皮质酮水平均有上升^[7],提示外源性MT可在下丘脑、垂体和肾上腺轴三个水平对HPA轴进行调节。为避免内源性MT对实验结果的影响,我们在早8时进行实验。实验显示,两实验组的血浆皮质醇水平均显著低于相应对照组,但仍高于空白对照组。这说明外源性的MT不仅可以对抗外源性激素所诱导的HPA轴紊乱,还可以抑制由应激所引起的HPA轴的兴奋作用。但MT不能使大鼠血浆内的皮质激素水平完全等同于正常水平,说明其作用尚有局限性。

CGRP是由37个氨基酸组成的神经肽,具有调节胃窦内分泌细胞的功能。他对胃肠具有调节血流、调节运动功能的作用,能维持胞内 Ca^{2+}

■创新盘点

本文首次观察了褪黑素对噪声应激所引起的胃肠传输功能紊乱具有调节作用,并且对其机制进行了探讨,为临床的防治提供了理论依据。

稳定,降低细胞膜对 Ca^{2+} 的通透性^[8],从而影响细胞内外 Ca^{2+} 的浓度水平,而 Ca^{2+} 对胃肠平滑肌细胞的舒缩活动起到了关键作用.MLT是由22个氨基酸组成的多肽,能够促进胃肠道的运动,主要由位于十二指肠和空肠上段黏膜内的M细胞分泌,作用于平滑肌上的胃动素受体,促进胞内钙库释放 Ca^{2+} ,导致平滑肌收缩,加速胃排空和小肠传输时间、增加下食管括约肌压力、收缩胆囊.胃动素在血浆中的水平存在波动,其分泌高峰与总是伴随着消化间期运动复合波(migrating motor complex, MMC)MMCIII相.我们发现,噪声应激使两对照组大鼠较空白对照组胃内残留率、小肠推进比升高,血浆内CGRP水平降低、MLT水平升高.说明噪声应激抑制了胃的排空,加速了食物在小肠内的行进,其机制可能是通过调节血浆内的胃肠激素来完成的.刘婧 *et al*^[9]报道,烧、烫伤应激也可以抑制人及大鼠胃的排空,这与本实验的结果一致.正常大鼠禁食状态下,胃窦收缩呈规律的收缩相和相对静止相,类似于人胃、十二指肠运动的移行性MMC.而应激后大鼠胃窦运动的规则收缩消失,节律明显紊乱,胃窦运动呈增强趋势,这是机体对急性创伤所产生的应激反应.动物及临床实验均发现烧、烫伤应激致胃的无规则运动加强,使胃的各部不能协调收缩,会导致胃对食物的排空延迟.而应激对小肠运动的影响目前尚存在争议.穆振斌 *et al*^[2]研究发现,枪击噪声应激可以促进大鼠小肠传输液体食物,但也有研究显示,束缚应激可以抑制大鼠小肠动力,并证实束缚应激导致的小肠动力抑制的发生机制不同于去甲肾上腺素的作用机制;同时也有研究采用束缚应激模型,发现束缚应激对犬小肠运动起促进作用^[10].出现分歧的原因可能是研究本身的复杂性,以及造模标准不统一,或检测和描述方法的不一致造成的.我们还发现,对照2组较对照1组的胃内残留率、小肠推进比进一步升高,说明应激的加强对胃肠的传输功能的影响更加明显.值得注意的是两对照组间CGRP的水平并没有显著差异,而MLT水平差异显著,说明MLT可

调性更强,对胃肠传输功能的影响更为重要.在MT的作用下,两个实验组和相应对照组相比胃内残留率、小肠推进比、血浆内CGRP及MLT水平均有显著差异,与空白对照组无显著差异,这表明MT拮抗了噪声应激所导致的胃肠传输功能及胃肠激素分泌的紊乱.

本实验提示,噪声可使大鼠处于明显的应激状态,兴奋HPA轴,提高血浆内皮质醇水平,并且随应激时间的延长皮质醇水平升高更加明显.在HPA轴的影响下,大鼠胃肠激素CGRP、MLT分泌紊乱,影响了胃肠的传输功能.而外源性的褪黑素抑制了应激所导致的HPA轴的兴奋,使胃肠激素分泌处于正常水平,拮抗了应激所致的胃肠传输功能紊乱.由于MT在人体内尚未发现毒性作用,在多种动物体内也未建立其半数致死剂量(LD50),故其临床应用具有较高的安全性.进一步开展MT的临床研究,可望使其成为应激性胃肠传输功能紊乱治疗措施的一种新选择.

4 参考文献

- 1 刘挺松,孙喜庆,曹新生,吴兴裕.高+Gz和噪声复合应激对大鼠学习记忆的影响. *航天医学与医学工程* 2004; 17: 20-23
- 2 穆振斌,黄裕新,赵保民,刘震雄,张兵华,王庆莉.枪击噪声对大鼠胃肠传输液体食物的影响及其机制探讨. *解放军医学杂志* 2004; 29: 991-992
- 3 张庆芳,李岩,王启仪.和胃冲剂促进胃肠动力机制的实验研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 401-403
- 4 Seematter G, Binnert C, Martin JL, Tappy L. Relationship between stress, inflammation and metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 169-173
- 5 尹剑春,童昭岗,颜军.中小负荷运动对反复心理应激大鼠血清皮质酮、IL-2和血浆T淋巴细胞亚群的影响. *中国运动医学杂志* 2005; 24: 419-423
- 6 钟历勇,沈自尹.松果体腺、褪黑素与抗应激作用. *国外医学·生理、病理科学与临床分册* 2003; 23: 522-525
- 7 钟历勇,沈自尹,冉瑞琼,杨志红,王惠,宋萍.褪黑素对大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴及免疫功能受抑状态的影响. *中国免疫学杂志* 2003; 19: 761-764
- 8 Cullen JJ, Ephgrave KS, Caropreso DK. Gastrointestinal myoelectric activity during endotoxemia. *Am J Surg* 1996; 171: 596-599
- 9 刘婧,李兆申.烧伤应激对胃动力的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 134-139
- 10 孙燕,侯晓华.心理应激与胃肠道动力紊乱的研究. *中国实用内科杂志* 2006; 26: 725-726

■应用要点

本研究证实褪黑素可通过降低应激水平、调节体内激素分泌从而改善胃肠传输功能的紊乱.由于褪黑素尚未在人体内发现LD50,因此具有良好的临床应用前景.

■同行评价

本文选题新颖,分析系统,论据充足,结论可靠,具有较强的科学性和可读性.

编辑 李军亮 电编 何基才

人胃癌Runx3基因CpG岛甲基化的关键位点和演进

宋军民, 刘晓梅, 李岩, 韩成波

■背景资料

Runx3基因甲基化与胃癌的发生密切相关,但目前国内外众多文献报道的人胃癌组织中Runx3基因甲基化的阳性率差异较大,且与Runx3表达并不完全平行,甲基化的Runx3其表达水平不一定下调,提示各实验研究的位点不同以及不同位点甲基化的结局亦不同,可能存在其甲基化能引起该基因表达沉默的“关键位点”。

宋军民, 李岩, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004
刘晓梅, 中国医科大学附属盛京医院中心实验室 辽宁省沈阳市 110004
韩成波, 中国医科大学附属盛京医院肿瘤科 辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 此课题由宋军民, 刘晓梅, 李岩和韩成波共同设计; 研究过程由李岩指导, 宋军民和刘晓梅操作完成; 研究所用分析工具由刘晓梅提供; 数据分析由宋军民, 刘晓梅和韩成波完成; 论文写作由宋军民, 韩成波和李岩完成。

通讯作者: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院消化内科. yanli0227@126.com
电话: 024-83956986

收稿日期: 2007-07-02 修回日期: 2007-12-25

Critical regions and spreading of the Runx3 CpG island methylation in human gastric cancer

Jun-Min Song, Xiao-Mei Liu, Yan Li, Cheng-Bo Han

Jun-Min Song, Yan Li, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Xiao-Mei Liu, Central Laboratory, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Cheng-Bo Han, Department of Oncology, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yan Li, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. yanli0227@126.com

Received: 2007-07-12 Revised: 2007-12-25

Abstract

AIM: To investigate the critical regions and spreading of the Runx3 CpG island methylation in human gastric cancer.

METHODS: MSP and Western blot were used for 26 human primary gastric cancer samples and corresponding non-neoplastic gastric mucosa to detect the methylation status in successive six regions ranging from the most 5' region to the transcription start site within the Runx3 CpG island and the expression levels of Runx3 protein, respectively.

RESULTS: The methylation frequencies in the

successive six regions calculated by the results of MSP decreased gradually with the regions spreading to the transcription start site. The differences between cancer group and non-neoplastic group arose in the 3rd region, and became significant in the 5th and 6th regions ($P < 0.05$). When the grouping was related to the differentiation extent, the differences were significant in the 3rd-6th regions between poorly differentiated group and well differentiated group ($P < 0.05$). As far as the expression levels of Runx3 protein were concerned, the differences were significant between gastric cancer group and non-neoplastic group (0.499 ± 0.106 vs 0.721 ± 0.080 , $P < 0.01$), as well as between poorly differentiated group and well differentiated group (0.437 ± 0.053 vs 0.617 ± 0.073 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: Methylation of the Runx3 CpG island spreads from the most 5' region to the transcription start site in human gastric cancer, and the spreading is related to the differentiation extent of tumor. The transcription start site may be a critical region for the methylation of Runx3.

Key Words: Runx3; Gastric cancer; Methylation; Methylation specific PCR; Western blotting

Song JM, Liu XM, Li Y, Han CB. Critical regions and spreading of the Runx3 CpG island methylation in human gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 212-216

摘要

目的: 研究人胃癌Runx3基因CpG岛甲基化的关键位点和演进。

方法: 应用MSP法和Western blot法分别检测26例人胃癌和相应的癌旁正常组织标本Runx3基因CpG岛从5'区向转录起始点方向连续6个位点的甲基化状态和Runx3蛋白的表达。

结果: 根据MSP的结果计算出上述连续6个位点的甲基化阳性率, 结果随着向转录起始点方向的演进, 各位点甲基化的阳性率逐渐降低, 胃癌组和癌旁组从第3位点开始出现差异, 至

■同行评议者

王文跃, 主任医师, 中日友好医院普通外科; 欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科

第5和第6位点差异显著($P<0.05$); 按照胃癌分化程度分组, 低分化组与高分化组在3-6位点差异显著($P<0.05$). 胃癌组与癌旁组Runx3蛋白表达水平(0.499 ± 0.106 vs 0.721 ± 0.080)以及低分化组与高分化组(0.437 ± 0.053 vs 0.617 ± 0.073)Runx3蛋白表达水平均存在显著差异($P<0.01$).

结论: 人胃癌Runx3基因CpG岛的甲基化从5'区向转录起始点方向演进, 甲基化的演进与肿瘤的分化程度有关; 转录起始点部位可能为Runx3基因甲基化的关键位点.

关键词: Runx3; 胃癌; 甲基化; 甲基化特异性聚合酶链反应; 免疫印迹法

宋军民, 刘晓梅, 李岩, 韩成波. 人胃癌Runx3基因CpG岛甲基化的关键位点和演进. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 212-216
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/212.asp>

0 引言

Runx3(PEBP2aC/CBFA3/AML2)是新近发现的一种抑癌基因, 属于runt结构域转录因子家族成员, 参与对细胞生长和凋亡的调控. 近年来, 大量的研究表明Runx3与多种恶性肿瘤尤其是与胃癌的关系非常密切^[1-3], Runx3基因的沉默与胃癌的发生和发展有着高度的相关性, 而且也影响着胃癌的治疗效果及预后^[4-5], 因而Runx3基因有望成为胃癌诊断的特异性标志物和基因治疗的靶点. 但目前国内外众多文献报道的胃癌Runx3基因甲基化阳性率差异较大, 且其与Runx3表达并不完全平行^[6-7], 因此, Runx3基因启动子CpG岛各位点甲基化对于该基因沉默的作用可能不同. 本文通过检测人胃癌及相应的癌旁正常组织标本Runx3基因启动子CpG岛多位点的甲基化状态与Runx3蛋白表达的关系, 对甲基化的关键位点和演进作一推测和探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 2006-02/2006-12中国医科大学附属盛京医院手术切除并经病理证实的人胃癌和相应的癌旁正常组织标本各26例(所有标本均于手术切除后0.5 h内取材, 立即置于液氮中, 然后于-80℃保存备用, 癌旁正常组织的取材距胃癌原发灶10 cm以上), 其中男性16例, 女性10例, 年龄24-80(平均58.7)岁. 低分化(未分化或低分化)17例, 高分化(中分化或高分化)9例. 根据国际抗癌联盟分期(UICC, 1997), 早期(I期和II期)11例,

进展期(III期和IV期)15例. 采用HE染色确定肿瘤组织, 主要由肿瘤细胞构成且癌旁正常组织中没有肿瘤细胞浸润.

1.2 方法

1.2.1 甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)^[8]: 取胃癌和癌旁正常组织标本各100 mg用生理盐水冲净后剪成糊状, 采用苯酚-氯仿法提取DNA. 取5 μg(10 μL)DNA, 加入3 mol/L的氢氧化钠15.5 μL和去离子水24.5 μL, 37℃孵育15 min, 然后加入新鲜配制的10 mmol/L的对苯二酚15 μL和3 mol/L的亚硫酸氢钠(pH5.0)280 μL, 对提取的DNA进行修饰, 50℃保温16-20 h. 修饰后的DNA分别在4℃的500 mmol/L的醋酸钠和0.5 mmol/L的对苯二酚溶液中各透析4 h, 然后在4℃的0.5 mmol/L的醋酸钠溶液中透析过夜, 最后经4℃双蒸水透析过夜. 透析完毕后加入3 mol/L的氢氧化钠5.5 μL, 室温放置10-20 min, 然后加入6 mol/L的醋酸氨40 μL和2×无水乙醇, 混匀后置于-20℃过夜; 4℃、12 000 r/min离心10 min弃上清得DNA沉淀, 加入700 mL/L乙醇1 mL, 漂洗1次, 弃上清, 加入去离子水50 μL溶解于-20℃保存备用. 采用Runx3基因上述各位点(图1)特异的甲基化引物和非甲基化引物(北京三博远志公司)对处理后的DNA进行扩增, 扩增引物序列参照文献[9]. 反应系统(25 μL): 10×缓冲液2.5 μL, 每种引物各0.1 μL, dNTP 2 μL, Taq聚合酶(大连宝生物公司)0.2 μL, 模板DNA 5 μL, 去离子水15.1 μL; 反应条件: 混合物加热至95℃, 持续15 min后, 变性为94℃、30 s, 退火为55℃(第4-6位点为58℃)、60 s, 延伸为72℃、60 s, 最后再进行72℃延伸10 min, 共进行35个循环. PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳分离, 并经成像分析系统分析结果.

1.2.2 Western blot: 取胃癌和癌旁正常组织标本各150 mg用生理盐水冲净后剪成糊状, 加入6倍体积的组织细胞裂解液进行超声匀浆, 提取总蛋白, Lowry法蛋白定量. 取调节后的蛋白样品各40 μL加5×样品缓冲液10 μL混匀, 煮沸3 min冷却后上样. 60 V稳压电泳至溴酚蓝带进入分离胶后再100 V电泳3 h, 100 V转膜40 min, 使凝胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC膜). 用50 g/L牛血清白蛋白室温下封闭2 h, 1×TTBS洗膜两次, 加入新鲜配制的兔抗人Runx3多克隆抗体稀释液(1:400)(sc-30197, Santa Cruz公司), 4℃孵育过夜. 将NC膜用1×TBS洗一次, 1×TTBS

■创新盘点

本实验通过检测人胃癌及相应的癌旁正常组织标本Runx3基因启动子CpG岛多位点的甲基化状态与Runx3蛋白表达的关系, 研究Runx3基因启动子CpG岛甲基化的演进方向和关键位点.

应用要点

通过本文的研究可以确定Runx3基因启动子CpG岛甲基化的演进方向和关键位点,从而为胃癌的基因诊断和治疗提供依据。

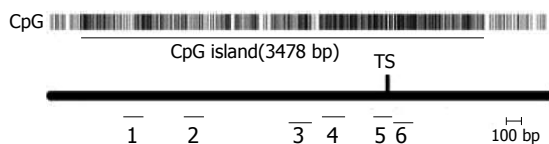


图1 Runx3基因CpG岛各研究位点示意图。1-6: 各研究位点; TS: 转录起始点。

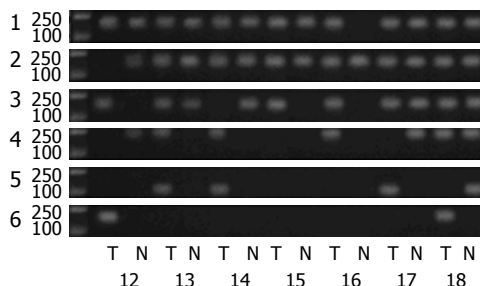


图2 甲基化特异性PCR结果(甲基化)。1-6: 各研究位点; 12-18: 各研究标本; T: 肿瘤组织; N: 癌旁正常组织。

洗两次, 加入新鲜配制的碱磷酶标记山羊抗兔IgG(1:1000)(北京中杉金桥公司), 室温孵育2 h。1×TTBS洗膜两次, 1×TBS洗膜一次, 显色液中染色至条带呈现, 终止染色。β-Tubulin(华特生公司)作为内参, 分子质量为 M_r 51 000, 重复上述步骤。用凝胶图像分析系统扫描分析结果, 以Runx3蛋白的灰度值/β-Tubulin的灰度值代表Runx3蛋白的相对表达水平进行统计学分析。

统计学处理 采用SPSS14.0统计软件, 计数资料的组间比较采用 χ^2 检验, 不符合 χ^2 检验条件的采用Fisher确切概率法, 计量资料的结果采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 甲基化特异性PCR结果 见表1, 胃癌和癌旁组从第3位点开始出现差异, 至第5和第6位点差异显著($P < 0.05$, 图2, 图3A), 低分化组与高分化组在3-6位点差异显著($P < 0.05$, 图3B), 而高龄组(≥ 60 岁)与低龄组(< 60 岁)、男性组与女性组以及早期组与进展期组, 上述各位点的甲基化阳性率无显著差异($P > 0.05$)。

2.2 Western blot结果 Runx3蛋白的相对表达水平, 胃癌组为 0.499 ± 0.106 ($n = 26$), 癌旁组为 0.721 ± 0.080 ($n = 26$), 两组的蛋白表达水平存在显著差异($P < 0.01$)。低分化组为 0.437 ± 0.053 ($n = 17$), 高分化组为 0.617 ± 0.073 ($n = 9$), 两组的蛋白表达水平存在显著差异($P < 0.01$)(图4, 表1)。男性组与女性组、高龄组(≥ 60 岁)与低龄组(< 60 岁)以及早期组与进展期组, 蛋白表达水平无显

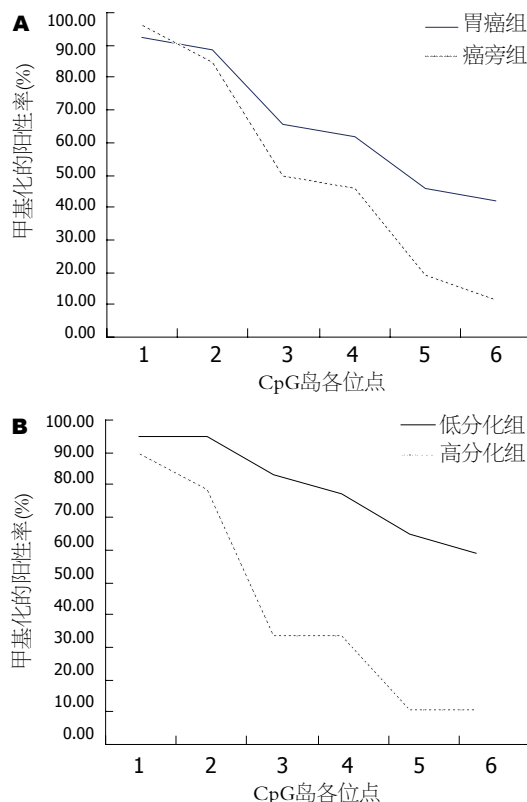


图3 Runx3基因CpG岛各位点甲基化阳性率的曲线图。A: 胃癌组和癌旁组; B: 低分化组和高分化组。

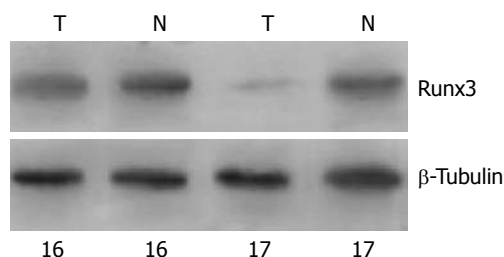


图4 Runx3蛋白的表达。16: 高分化胃癌; 17: 低分化胃癌; T: 肿瘤组织; N: 癌旁正常组织。

著差异($P > 0.05$, 表1)。

3 讨论

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 他的发生与端粒酶激活、抑癌基因失活和癌基因激活等因素有关, 其中抑癌基因的失活尤为重要^[10-11]。以往研究的抑癌基因, 如E-cadherin、p53、p16、Rb、DCC和APC等, 他们与胃癌的相关性较小, 而新近发现的Runx3可能是迄今为止与胃癌关系最为密切的一种抑癌基因。DNA甲基化是一种后天发生的修饰, 引起胞嘧啶5'甲基化, 在正常机体中普遍存在, 并与年龄相关, 抑癌基因启动子CpG岛高甲基化可使其表达受抑, 与肿瘤的发生密切相关^[12-13]。

研究表明, Runx3基因启动子CpG岛高甲基化

表 1 实验结果及临床病理学参数分析

临床及病理学参数		Runx3基因CpG岛各位点的甲基化阳性例数						Western blot (mean \pm SD)
		1	2	3	4	5	6	
标本	胃癌组($n = 26$)	24	23	17	16	12 ^a	11 ^a	0.499 \pm 0.106 ^b
	癌旁组($n = 26$)	25	22	13	12	5	3	0.721 \pm 0.080
性别	男性组($n = 16$)	14	14	10	9	6	7	0.507 \pm 0.101
	女性组($n = 10$)	10	9	7	7	6	4	0.486 \pm 0.117
年龄	高龄组($n = 13$)	13	11	10	10	7	6	0.494 \pm 0.114
	低龄组($n = 13$)	11	12	7	6	5	5	0.504 \pm 0.101
分化程度	低分化组($n = 17$)	16	16	14 ^c	13 ^c	11 ^c	10 ^c	0.437 \pm 0.053 ^d
	高分化组($n = 9$)	8	7	3	3	1	1	0.617 \pm 0.073
UICC分期	早期组($n = 11$)	10	11	7	6	4	6	0.531 \pm 0.126
	进展期组($n = 15$)	14	12	10	10	8	5	0.476 \pm 0.085

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 癌旁组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 高分化组。

是该基因表达沉默的主要方式之一^[1]。Kim *et al*^[2]用MSP法检测了胃癌和各种癌前病变启动子CpG岛的甲基化状态, 结果在慢性胃炎为8.1%($n = 99$), 肠化为28.1%($n = 32$), 胃腺瘤为27.3%($n = 77$), 胃癌为64%($n = 75$), 该研究提示Runx3的甲基化阳性率随着癌前病变的演变而增加。田筱青 *et al*^[6]应用MSP法对17例食管鳞状细胞癌、14例贲门癌及18例胃癌及相应的癌旁正常组织进行检测, 胃癌组的甲基化阳性率为8/18(44%), 而胃癌癌旁组、食管癌组和贲门癌组的甲基化阳性率分别为1/18、0/17和3/14, 该研究提示Runx3基因甲基化对于胃癌具有较高的特异性。Nakase *et al*^[14]应用MSP法研究了12例消化性溃疡术后残胃癌(RB组)和10例胃癌术后残胃癌(RM组)Runx3启动子的甲基化状态, 胃癌组织中Runx3的甲基化阳性率为63.6%(14/22), 癌旁组织中为27.2%(6/22), 进一步研究表明Runx3的甲基化状态与Runx3的表达明显相关, 该研究提示检测残胃Runx3的甲基化状态可以预测残胃恶变的风险。本文通过MSP法检测了26例胃癌和相应的癌旁正常组织标本Runx3基因启动子CpG岛连续6个位点的甲基化状态, 由于两组的第1和第2位点的甲基化阳性率无差异, 第3-6位点存在差异(第5和6位点差异显著), 因此目前众多实验研究的位点很可能位于该区间, 在本研究中其甲基化阳性率为42.31%-65.38%, 与上述报道相符。

研究表明, Runx3蛋白表达下调是胃癌发生的重要机制之一。Osaki *et al*^[15]应用Western blot法检测了6株胃癌细胞系的Runx3蛋白表达, 其中3株不同程度的表达了Runx3蛋白, 而另3株未

表达Runx3蛋白。曾超 *et al*^[16]应用Western blot法检测25例胃癌标本Runx3蛋白的表达, 结果发现胃癌组织中的Runx3蛋白表达明显低于相应正常胃黏膜组织, 尤其是低分化胃癌更加明显, 而高分化胃癌差异并不明显, 直线相关分析显示胃癌组织中Runx3蛋白和mRNA的表达具有相关性($r = 0.820$, $P < 0.05$)。Wei *et al*^[5]应用免疫组织化学法研究了86例胃癌组织的Runx3蛋白表达, 结果与正常胃黏膜组织相比, 胃癌组织标本中的Runx3蛋白表达明显降低, 并且与生存期降低明显相关($P = 0.0005$), Cox比例风险回归模型显示, Runx3蛋白的表达可独立的预测良好的生存率($P = 0.036$), 因而认为Runx3蛋白是影响胃癌预后的独立因素。本文应用Western blot法检测了26例胃癌及相应的癌旁正常组织的Runx3蛋白表达, 结果表明胃癌组Runx3蛋白表达明显低于癌旁组, 而且Runx3蛋白的表达与肿瘤的分化程度有关, 与上述报道相符。

但目前国内外众多文献报道的人胃癌组织Runx3基因的甲基化阳性率差异较大, 且与Runx3表达并不完全平行。田筱青 *et al*^[6]用RT-PCR方法研究了8例Runx3甲基化的胃癌标本, 结果仅3例出现mRNA的表达下调; Waki *et al*^[7]用RT-PCR方法检测了5株胃癌细胞系Runx3 mRNA的表达, 其中1株甲基化的Runx3细胞系(KATO-III)也表达mRNA。上述研究表明, 甲基化的Runx3其mRNA表达水平不一定下调, 因此Runx3基因CpG岛不同位点甲基化的结局不同, 可能存在其甲基化能引起该基因表达沉默的“关键位点”。本研究的结果表明, 按性别、年龄和临床分期分组, 各位点的甲基化阳性率

■同行评价

本实验设计合理, 研究具有一定新颖性, 讨论充分有说服力, 具有较强的临床指导意义。

无显著差异,同时该情况下Runx3蛋白的表达亦无显著差异,而胃癌组与癌旁组以及低分化胃癌组和高分化胃癌组的甲基化阳性率存在显著差异,同时该情况下Runx3蛋白的表达亦存在显著差异($P<0.01$),这种现象提示,转录起始点部位(即文中第5、6位点)的甲基化很可能引起Runx3蛋白的表达下调,因此该部位可能为Runx3基因启动子CpG岛甲基化的关键位点.同时本研究结果表明,从5'区向转录起始点方向连续6个位点的甲基化阳性率逐渐降低,提示甲基化最初可能发生在Runx3基因CpG岛的5'端,并逐渐向转录起始点方向演进,与文献报道相符^[9];进一步统计分析表明,各位点的甲基化阳性率与性别、年龄和临床分期无关,而第3-6位点的阳性率与肿瘤的分化程度有关,提示甲基化的演进可能与肿瘤的分化程度相关,而与性别、年龄和临床分期无关.

总之,Runx3作为新近发现的一种抑癌基因,受到越来越多的关注和研究,有望成为胃癌诊断的特异性标志物和基因治疗的靶点,通过本文的研究可以确定该基因启动子CpG岛甲基化的演进方向和关键位点,从而为基因诊断和治疗提供依据.

4 参考文献

- 1 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- 2 Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang YJ, Kang GH. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 2004; 84: 479-484
- 3 Guo WH, Weng LQ, Ito K, Chen LF, Nakanishi H, Tatematsu M, Ito Y. Inhibition of growth of mouse gastric cancer cells by Runx3, a novel tumor suppressor. *Oncogene* 2002; 21: 8351-8355
- 4 Guo C, Ding J, Yao L, Sun L, Lin T, Song Y, Sun L, Fan D. Tumor suppressor gene Runx3 sensitizes gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs by downregulating Bcl-2, MDR-1 and MRP-1. *Int J Cancer* 2005; 116: 155-160
- 5 Wei D, Gong W, Oh SC, Li Q, Kim WD, Wang L, Le X, Yao J, Wu TT, Huang S, Xie K. Loss of RUNX3 expression significantly affects the clinical outcome of gastric cancer patients and its restoration causes drastic suppression of tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2005; 65: 4809-4816
- 6 田筱青, 张军, 范立宏, 郭长存. 上消化道癌中runx3基因甲基化研究. *中华消化杂志* 2005; 25: 688-689
- 7 Waki T, Tamura G, Sato M, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 2003; 94: 360-364
- 8 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-986
- 9 Homma N, Tamura G, Honda T, Matsumoto Y, Nishizuka S, Kawata S, Motoyama T. Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. *Cancer Sci* 2006; 97: 51-56
- 10 Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000; 35 Suppl 12: 111-115
- 11 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- 12 So K, Tamura G, Honda T, Homma N, Waki T, Togawa N, Nishizuka S, Motoyama T. Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 2006; 97: 1155-1158
- 13 Roa JC, Anabalon L, Roa I, Tapia O, Melo A, Villaseca M, Araya JC. Promoter methylation profile in gastric cancer. *Rev Med Chil* 2005; 133: 874-880
- 14 Nakase Y, Sakakura C, Miyagawa K, Kin S, Fukuda K, Yanagisawa A, Koide K, Morofuji N, Hosokawa Y, Shimomura K, Katsura K, Hagiwara A, Yamagishi H, Ito K, Ito Y. Frequent loss of RUNX3 gene expression in remnant stomach cancer and adjacent mucosa with special reference to topography. *Br J Cancer* 2005; 92: 562-569
- 15 Osaki M, Moriyama M, Adachi K, Nakada C, Takeda A, Inoue Y, Adachi H, Sato K, Oshimura M, Ito H. Expression of RUNX3 protein in human gastric mucosa, intestinal metaplasia and carcinoma. *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 605-612
- 16 曾超, 贺修胜, 罗桥, 赵帅, 邓敏. Runx3基因在胃癌中的表达及其表达下调机制. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 250-255

编辑 李军亮 电编 郭海丽

创伤后肝功能变化及其临床意义

阴英, 蓝宇, 孙成栋

阴英, 蓝宇, 孙成栋, 北京积水潭医院消化科 北京市 100035
作者贡献分布: 阴英对此文作出主要贡献; 此课题由蓝宇教授、阴英设计; 研究过程由阴英、蓝宇操作完成; 数据分析由阴英、孙成栋完成; 本论文写作由阴英完成。

通讯作者: 阴英, 100035, 北京市, 北京积水潭医院消化科。
jessica_yinyin@yahoo.com.cn

电话: 010-58517177

收稿日期: 2007-07-24 修回日期: 2007-11-04

Alteration in liver function after trauma and its clinical significance

Ying Yin, Yu Lan, Cheng-Dong Sun

Ying Yin, Yu Lan, Cheng-Dong Sun, Department of Digestive Diseases, Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China
Correspondence to: Ying Yin, Department of Digestive Diseases, Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China. jessica_yinyin@yahoo.com.cn

Received: 2007-07-24 Revised: 2007-11-04

Abstract

AIM: To discuss the change in liver function after hepatic trauma in the early stage and its clinical significance.

METHODS: Of the 719 patients with trauma admitted to our hospital from 2006-05 to 2006-08, 105 with hepatic trauma were included in this study. All patients were admitted within 24 hours after trauma. Those who had primary hepatic injuries or acute and chronic dysfunctions of the hepatic-biliary system were excluded. We collected vein blood samples to measure the serum levels of ALT, AST, ALP, GGT, LDH, TBIL, DBIL, ALB, PT, 24 and 48 hours after trauma.

RESULTS: The percentage of hepatic trauma was 14.6%. The abnormality rate of ALT, AST, ALP, GGT, LDH, ALB, TBIL and PT was 91.4%, 64.8%, 42.9%, 61.9%, 27.6%, 20.9%, 30.5% and 5.7%, respectively, in the 105 patients. Of these 105 patients, ALT level increased 1-3 folds in 78, AST level increased 1-3 folds in 49, GGT level increased 1-3 folds in 42. The patients with decreased ALB and increased TBIL and PT had more severe traumas than those without such changes ($P<0.001$). No significant difference was

found in the levels of TBIL, DBIL/TBI, ALP and GGT. Thirty patients had significantly higher levels of ALT, AST, ALP and GGT within 48 hours than those within 24 hours after trauma ($P<0.01$).

CONCLUSION: Hepatic trauma is common and often occurs in early stage of trauma. The moderate increase in liver functions is commonly observed. Patients with decreased ALB and increased jaundice and PT usually have more severe traumas or more complications. Jaundice induced by trauma belongs to hepatocellular jaundice and may not be correlated with cholestasis.

Key Words: Liver function; Hepatic injury; Trauma

Yin Y, Lan Y, Sun CD. Alteration in liver function after trauma and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 217-220

摘要

目的: 探讨创伤后早期肝功能损害各指标的变化及其临床意义。

方法: 分析2006-05/2006-08我院创伤骨科入院患者719例中肝功能损害105例伤后24 h及48 h内肝功能指标血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)、乳酸脱氢酶(LDH)、总胆红素(TBIL)、结合胆红素(DBIL)、白蛋白(ALB)、凝血酶原时间(PT)。

结果: 创伤后肝损害的发生率为14.6%, 肝功能指标ALT, AST, ALP, GGT, LDH, ALB, TBIL和PT异常发生率分别为91.4%, 64.8%, 42.9%, 61.9%, 27.6%, 20.9%, 30.5%, 5.7%; 创伤后ALT, AST和GGT升高1-3倍者分别为78例(81.3%), 49例(72.1%)和42例(64.6%)。严重创伤患者出现ALB降低、TBIL升高及PT延长($P<0.001$), 创伤后肝功能指标ALT、AST、ALP及GGT 48 h与24 h相比明显升高($P<0.01$)。

结论: 创伤后早期即可出现肝功能损害, 肝功能指标一般呈轻中度升高, 当创伤伤情严重及并发症多时, 可出现ALB降低、黄疸及PT延长, 创伤后黄疸为肝细胞性黄疸, 可能与胆汁淤积无关。

■背景资料

创伤后肝功能障碍将影响整个机体的预后和转归。明确创伤后肝功能的变化规律并加以预防, 对患者的整体康复与保护肝功能具有重要意义。

■同行评议者

汪波, 副主任医师, 北京大学第一医院急诊科

■研究前沿

虽然有关创伤后肝功能变化的文章并不少见,但研究肝功能各项指标具体变化的报道较为少见,而研究创伤后肝损害的演变过程的文章更少见。

关键词: 肝功能; 肝损害; 创伤

阴英, 蓝宇, 孙成栋. 创伤后肝功能变化及其临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 217-220
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/217.asp>

0 引言

人类创伤在直接造成局部器官组织损伤的同时,会通过应激变化、炎症反应等多种途径导致全身其他组织器官的功能改变^[1]. 肝脏是人的重要器官,创伤后肝功能障碍将影响整个机体的预后和转归^[2]. 明确创伤后肝功能的变化规律并加以预防,对患者的整体康复与保护肝功能具有重要意义. 本文总结分析了2006-05/2006-08之间我院创伤骨科收治的存在肝功能损害的骨折患者临床资料105例,对创伤后肝功能损害各项指标的变化规律加以分析总结.

1 材料和方法

1.1 材料 自2006-05/2006-08间,我院骨科共收治创伤骨折患者719例,创伤后肝损害患者105例,男87例,女18例,年龄17-74(平均38.8)岁. 患者均在受伤后24 h内入院,且除外各种急、慢性肝胆疾病及原发性肝外伤. 创伤原因包括车祸伤43例,高处坠落伤9例,挤压伤或砸伤7例,摔伤33例,扭伤11例,绞伤2例. 105例患者中开放伤32例,多发伤及复合伤55例,合并血管神经损伤27例,合并感染37例,合并创伤失血性休克11例,合并全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS^[3])的患者50例,既往中存在饮酒史(男>140 g/wk,女>70 g/wk^[4])42例,脂肪肝46例.

1.2 方法 采集患者入院后的体温、脉搏、呼吸频率、血压、白细胞计数、血色素(Hb)及血气分析等临床资料,并行急性和慢性生理状况评估(APACHE II)^[5]. 105例患者均于次日晨空腹抽静脉血查血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰基转移酶(GGT)、乳酸脱氢酶(LDH)、总胆红素(TBIL)、结合胆红素(DBIL)、白蛋白(ALB)、凝血酶原时间(PT)等指标;其中有30例患者在入院时即刻抽静脉血化验上述指标,了解其24 h内肝功能指标的变化.

统计学处理 肝功能各参数以mean \pm SD表示,应用SPSS11.5统计软件,对ALB、TBIL及PT异常与正常的APACHE II评分进行方差分析;对黄疸患者进行矫正单因素方差分析及相关性检验;对30例24 h内与48 h内肝功能指标行矫正配对 t 检验.

2 结果

2.1 肝功能指标异常发生率 同期创伤入院患者共719例,其中合并肝功能损害的105例,肝损害发生率为14.6%. 105例患者中,肝功能各项指标异常发生率见表1.

2.2 创伤后肝功能各项指标的变化 105例创伤后肝损害患者肝功能各项指标平均值分别为: ALT: 88.7 \pm 77.0 IU/L, AST: 80.7 \pm 84.1 IU/L, ALP: 90.0 \pm 38.0 IU/L, GGT: 92.5 \pm 99.3 IU/L, LDH: 247.2 \pm 131.8 IU/L, ALB: 39.2 \pm 6.0 g/L, TBIL: 17.2 \pm 11.3 μ mol/L, PT: 12.0 \pm 1.5 s. 将ALT、AST、GGT数值升高情况进行总结显示,整体上升1-3倍者占多数;其中ALT升高1-3倍者为78例(占81.3%),AST升高1-3倍者为49例(占72.1%),GGT升高1-3倍者为42例(占64.6%);上述指标约半数病例升高1-2倍(图1).

2.3 ALB、TBIL及PT正常与异常的APACHE II评分比较 分别对表1中22例ALB降低、32例TBIL升高及6例PT延长的患者进行APACHE II评分比较(表2),结果显示均为伤情较重或有全身合并症的患者.

2.4 黄疸患者和非黄疸患者的比较 为34.8% \pm 8.69%,TBIL、DBIL/TBIL与ALT、AST、ALP及GGT的升高均无相关性($P>0.05$). 虽然黄疸患者ALT、AST、ALP及GGT各项均值与非黄疸患者统计比较无显著性差异($P>0.05$),但前者各项均值均高于后者(表3).

2.5 创伤后24 h之内与其48 h之内肝功能各项指标比较 30例患者创伤后48 h之内肝功能指标与其24 h内指标相比,ALT、AST、ALP及GGT明显升高($P<0.01$,表4).

3 讨论

Nast-Kolb *et al*^[6]报道,创伤后肝脏是第二个最易受到严重损害的器官,仅次于肺脏. 严重创伤时,肝脏将完成一系列防御反应和代谢功能,非常容易产生损伤而影响肝功能,严重者还可进一步导致多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS^[7]). 所以,对待急性创伤患者,密切监测肝功能变化,并采取积极措施预防出现肝损伤或防止损伤不断加重,在临床上具有重要意义. 因此本文重点总结了急性创伤后肝功能各项指标所发生的变化,并分析其产生的原因及临床意义.

肝损害与创伤严重程度相关. 严重创伤后肠道细菌和内毒素易移位至肝脏,可损害肝细胞和枯

■创新盘点

目前国内有少量关于颅脑创伤后肝功能损伤的文献报道,但尚无关于骨科创伤后肝损害情况与变化规律的报道. 本文不仅报道了骨科各种创伤后引起的肝功能变化,而且对其演变规律也作了初步的探讨,具有临床实际指导意义.

表 1 肝功能指标异常发生率

	ALT	AST	ALP	GGT	LDH	ALB	TBIL	PT
例数	96	68	45	65	29	22	32	6
异常率(%)	91.4	64.8	42.9	61.9	27.6	20.9	30.5	5.7

■应用要点

本文可以指导临床工作, 对各种创伤后引起的肝功能损伤应积极地给予预防与治疗, 减少并发症的发生。

表 2 ALB、TBIL及PT正常与异常的APACHE II 评分比较

	ALB	TBIL	PT
异常组	20.31 ± 3.68 ^b	17.45 ± 5.14 ^b	18.77 ± 3.41 ^b
正常组	12.84 ± 4.15	11.55 ± 4.37	13.67 ± 2.11

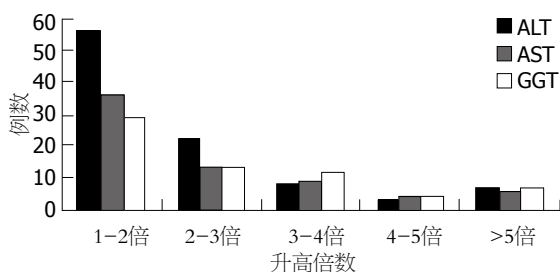
^bP<0.01

图 1 ALT、AST和GGT变化分布情况。

否氏细胞^[8]。创伤通常是对机体严重、突发的刺激因素, 体内产生大量细胞因子, 引起应激反应, 严重的可导致大量炎性介质的释放, 形成自身损伤性的全身性反应, 即SIRS。当创伤严重而出现休克时, 创伤与失血都可使机体产生大量炎性介质和氧自由基, 加速SIRS的出现从而导致肝功能损害^[9]。此外感染除可以导致SIRS而造成肝损害外, 还可以导致感染性休克、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)等系统或器官功能的改变, 从而导致肝细胞损伤。由于肝脏的代谢极其活跃, 使其更易在SIRS过程中受到损伤, 同时肝脏又是SIRS的积极参与者。肝脏的枯否氏细胞在损伤因素的刺激下产生大量的肿瘤坏死因子等炎性介质, 加速了机体自身损伤的反应过程, 而使肝脏进一步受到损伤。因此, 创伤后出现SIRS的患者, 其肝功能损害更明显, 且与伤情严重程度密切相关。其次, 文献报道缺血与再灌注损伤同样是导致肝细胞损伤的重要因素^[10]。肝损害是MODS的表现之一^[11], 因此在临床中应特别给予重视。

本文资料显示, 创伤后肝损害的发生率为14.6%, 较为常见, 且本组资料显示肝损害均发生在受伤后24-48 h之内, 提示创伤后早期即

可发生。创伤后早期由于机体应激反应和组织损伤产生各种细胞因子, 可损害肝细胞, 而引起肝功能损伤并出现继发性肝损害。从本研究结果看, 创伤后患者的肝功能异常主要表现在ALT、AST及GGT的异常增高, 而且呈轻中度增高, ALT、AST及GGT升高1-3倍者分别占81.3%、72.1%、64.6%。而LDH、ALP、ALB、TBIL以及PT的均值在正常范围内。

本组105例患者中, 肝功能指标异常发生率由高到低依次为ALT、AST、GGT、ALP、TBIL、LDH、ALB、PT。ALT广泛存在于多种器官中, 按含量依次为肝、肾、心及骨骼肌等, 肝中的ALT多存在于细胞质中。AST也广泛存在于多种器官中, 按含量依次为心、肝、骨骼肌及肾等, 而且AST在各器官中均比ALT含量高, 肝内AST 70%存在于肝细胞的线粒体中。ALT与AST能敏感提示肝细胞的损伤及损伤的程度。反映急性肝细胞损伤时, 以ALT最为敏感, 故本组中ALT的异常率最高。相对而言, AST更能够反映肝功能损害程度。所以判断创伤后肝损害, ALT与AST是较为敏感指标, 他们能够较好地反映出肝脏损伤后的功能状况, 对诊断有重要的参考价值^[12], 临床中应给予足够重视。

血清ALB反映了肝脏合成蛋白质的功能, 但由于其半衰期为15-19 d, 且肝脏的代偿功能较强, 所以早期可以不受肝功能损害的影响, 本组ALB的均值在正常范围之内。然而105例患者中有22例ALB值低于正常, 多数患者为创伤伤情较重或有休克、SIRS、感染等, 因此ALB的降低很可能是由于创伤后虽然肝脏摄取氨基酸加速, 但主要用于急性相蛋白的合成, 导致了ALB的下降^[13]。同时, 由于严重创伤时伤口局部渗出进一步加剧了体内蛋白的丢失, 此时的血清ALB指标不能完全用来反映肝脏的合成功能。PT的改变同样是反映肝功能改变的重要指标, 而且一般在肝病的初期就可以表现出异常^[14]。本组中6例PT延长的患者创伤伤情均较为严重, 说明了伤情对肝功能影响的重大作用。

TBIL的增高同样反映出肝细胞损害较为严重。本组105例患者中, 有32例出现黄疸, 化验证

■同行评价

本文是对临床工作的具体总结与分析,对今后的临床实践具有一定的指导意义,实用性较强。

表 3 黄疸与非黄疸患者肝功能指标(IU/L, mean ± SD)

分组	n	ALT	AST	ALP	GGT
黄疸	32	104.2 ± 122.9	102.2 ± 132.9	91.0 ± 40.9	115.8 ± 137.9
非黄疸	73	81.9 ± 43.6	71.3 ± 48.1	89.6 ± 37.0	82.3 ± 75.5

表 4 创伤后24 h与48 h之内肝功能各项指标(mean ± SD)

分组	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	ALP(IU/L)	GGT(IU/L)	LDH(IU/L)	ALB(g/L)	TBIL(μmol/L)	PT(s)
24 h	48.7 ± 29.8	66.7 ± 50.0	58.0 ± 25.7	38.9 ± 38.6	297.0 ± 129.8	35.7 ± 9.0	14.5 ± 12.4	13.3 ± 6.6
48 h	83.0 ± 47.1 ^b	117.0 ± 116.0 ^b	90.5 ± 50.7 ^b	78.2 ± 64.8 ^b	335.0 ± 171.3	34.8 ± 7.4	16.9 ± 14.8	13.0 ± 2.0

^bP<0.01

实皆为血清结合胆红素及非结合胆红素双相增高,但以结合胆红素增高为主,表现为肝细胞性黄疸。从表3可以看出黄疸患者ALT、AST、ALP及GGT各项均值均高于非黄疸患者,但统计学比较无显著性差异,考虑可能与样本较少有关。创伤后由于肝细胞受损,从而导致了肝脏对胆红素的摄取、转化及排泄异常而出现黄疸。此外,本资料分析结果表明,黄疸的出现可能与胆汁淤积关系不大。另一方面,32例黄疸患者创伤伤情均较为严重,说明伤情的严重性与肝细胞损害有直接的相关性。因此,临床上对于合并严重创伤的患者,伤后更应重视其肝功能的变化。

30例患者肝功能指标创伤后24 h内即发生改变,说明创伤后肝功能损害在早期出现。这与文献[15]相符。虽然与48 h内的指标相比,ALT、AST、ALP及GGT都有显著性升高,但本资料不能区别48 h内肝功能指标的上升是创伤后肝功能指标的演变过程还是体现了肝损伤的加重。因此积极控制创伤伤情的不断进展,并密切监测肝功能指标,对肝功能损害进行早期预防、早期治疗,是防止肝功能进一步恶化,甚至发展成为MODS最为有效的方法。

总之,由于肝功能的特殊性,使其在创伤的救治过程中起到重要作用。要进一步提高严重创伤的存活率,对肝功能的保护是非常重要的的一环。

4 参考文献

- 黎鳌. 创伤后脏器功能不全. 第1版. 河北: 科学技术出版社, 1999; 160-166
- Khan SA, Shah N, Williams R, Jalan R. Acute liver failure: a review. *Clin Liver Dis* 2006; 10: 239-258
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM,

Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101: 1644-1655

- 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊断标准. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 71
- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13: 818-829
- Nast-Kolb D, Aufmkolk M, Rucholtz S, Obertacke U, Waydhas C. Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma. *J Trauma* 2001; 51: 835-841; discussion 841-842
- 张淑文, 王超, 阴赅宏, 苏强, 王红, 王宝恩. 1087例多器官功能障碍综合征临床流行病学调查. *中国危重病急救医学* 2007; 19: 2-6
- Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 961-965
- Muckart DJ, Bhagwanjee S. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference definitions of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit Care Med* 1997; 25: 1789-1795
- Regel G, Grotz M, Weltner T, Sturm JA, Tscherne H. Pattern of organ failure following severe trauma. *World J Surg* 1996; 20: 422-429
- Harbrecht BG, Zenati MS, Doyle HR, McMichael J, Townsend RN, Clancy KD, Peitzman AB. Hepatic dysfunction increases length of stay and risk of death after injury. *J Trauma* 2002; 53: 517-523
- Kröger H, Hauschild A, Ohde M, Bache K, Voigt WP, Thefeldt W, Krüger D. Nicotinamide and methionine reduce the liver toxic effect of methotrexate. *Gen Pharmacol* 1999; 33: 203-206
- 黎鳌. 现代创伤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1996; 330-334
- Wiklund RA. Preoperative preparation of patients with advanced liver disease. *Crit Care Med* 2004; 32: S106-S115
- 张玉霞, 李赢, 王美清. 严重创伤后的肝脏损害. *中国急救医学* 2001; 21: 234-235

编辑 程剑侠 电编 李军亮

Mirizzi综合征诊治分析53例

王小梅, 孙科, 吴传新, 刘作金, 丁雄, 李生伟, 龚建平

王小梅, 孙科, 吴传新, 刘作金, 丁雄, 李生伟, 龚建平, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 重庆医科大学附属第二医院 重庆市 400010

作者贡献分布: 王小梅与孙科对此文所作贡献均等; 此课题由王小梅, 孙科, 李生伟, 龚建平设计; 研究过程由吴传新, 刘作金, 丁雄, 李生伟, 龚建平操作完成; 数据分析由王小梅, 孙科, 龚建平完成; 本论文写作由孙科, 龚建平完成。

通讯作者: 龚建平, 400010, 重庆市渝中区临江路76号, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科. gongjianping11@126.com

电话: 023-63693521

收稿日期: 2007-06-16 修回日期: 2008-01-08

Diagnosis and treatment of 53 patients with Mirizzi syndrome

Xiao-Mei Wang, Ke Sun, Chuan-Xin Wu, Zuo-Jin Liu, Xiong Ding, Sheng-Wei Li, Jian-Ping Gong

Xiao-Mei Wang, Ke Sun, Chuan-Xin Wu, Zuo-Jin Liu, Xiong Ding, Sheng-Wei Li, Jian-Ping Gong, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China

Correspondence to: Jian-Ping Gong, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, 76 Linjiang Road, Yuzhong District, Chongqing 400010, China. gongjianping11@126.com

Received: 2007-06-16 Revised: 2008-01-08

Abstract

AIM: To explore the diagnosis and treatment of Mirizzi syndrome.

METHODS: A retrospective analysis of 53 patients (15 males and 38 females) with Mirizzi syndrome between 1997-10 and 2006-9 was performed. The age of these patients ranged from 28 to 82 years, the mean age was 62 years. Ultrasound, computerized tomography (CT), endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) and magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP) were performed before operation. The final diagnosis was made based upon the findings in operation. Different operation procedures were used in the treatment of different individuals.

RESULTS: The 53 patients with Mirizzi syndrome were diagnosed following the classification of Csendes *et al* as type I in 31, type II in 12, type III in 7 and type IV in 3 cases, respec-

tively. All patients underwent operation and different operation procedures were used for different individuals. The length of hospital stay ranged from 5 days to 2 months, with a mean time of 15 days. The findings in the follow-up from 6 months to 10 years were as follows: loss of follow-up in 5 cases, death of other diseases in 1 case, healing after surgical intervention in 2 cases. No death occurred during the operation. Recurrence of biliary fistula in 1 case was cured after surgical intervention.

CONCLUSION: A preoperative diagnosis of Mirizzi syndrome may be difficult to make before operation. Its diagnosis can be made by various imaging techniques. A definite diagnosis of Mirizzi syndrome can reduce the iatrogenic injury to the bile duct, and different diagnostic methods and treatment modalities should be used for different cases of Mirizzi syndrome.

Key Words: Mirizzi syndrome; Diagnosis; Surgery; Operative treatment

Wang XM, Sun K, Wu CX, Liu ZJ, Ding X, Li SW, Gong JP. Diagnosis and treatment of 53 patients with Mirizzi syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 221-224

摘要

目的: 探讨Mirizzi综合征的诊断和治疗方法。

方法: 回顾性分析本院1997-10/2006-09共收治的Mirizzi综合征53例患者的临床资料, 男15例, 女38例, 年龄28-82(平均62)岁。术前主要以B超、计算机体层摄影术(CT)、内窥镜逆行胰胆管造影术(ERCP)和磁共振胰胆管造影术(MRCP)等检查手段进行筛查, 以术中结果为最终诊断, 针对不同的病例选用适合不同个体的手术治疗方式。

结果: Mirizzi综合征患者53例按Csendes分型法分为I型31例, II型12例, III型7例, IV型3例。均行手术治疗, 患者住院时间最短5 d, 最长2 mo, 平均15 d。术后随访6 mo-10年, 5例失访, 1例因其他疾病死亡, 2例胆道再发结石手术治愈, 全组无手术死亡, 近期发生胆瘘1例再

■背景资料

关于Mirizzi综合征的发病特点、分型及治疗的报道屡见不鲜, 该病在临床中也比较常见。本文就重庆医科大学附属第二医院肝胆外科9年来手术确诊的Mirizzi综合征的术前筛查和手术方式进行总结, 从而有助于对该病的进一步认识。

■同行评议者

张筱茵, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

■研发前沿

Mirizzi综合征的病因、发病机制、分型、诊断和临床治疗一直是大家讨论的热点,这方面已有众多研究与报道,在以后的研究中将进一步研究术前确诊本病的方法。

次手术治愈。

结论: Mirizzi综合征术前诊断困难,需借助多种影像学技术,术前明确诊断可减少Mirizzi综合征术中胆道损伤的发生率,要针对不同的病例选用适合不同个体的诊断和治疗手段。

关键词: Mirizzi综合征; 诊断; 外科; 手术治疗

王小梅, 孙科, 吴传新, 刘作金, 丁雄, 李生伟, 龚建平. Mirizzi综合征诊治分析53例. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 221-224
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/221.asp>

0 引言

Mirizzi综合征是一组由于胆囊颈或胆囊管结石嵌顿,引起胆总管的机械压迫或继发炎症导致胆总管狭窄、胆囊胆总管瘘。该病是胆囊结石少见的并发症,其发病率占有行胆囊切除术的0.7%-1.4%^[1-2]。Csendes *et al*在对大宗胆囊结石术后的患者(17 395例)研究中发现,219例发生Mirizzi综合征(发病率为1.3%)^[3]。由于胆囊结石十分常见,其1.3%也并不是小数目,然而就目前的诊疗手段难以做到术前明确诊断,术中胆道损伤的发生率较高^[4],因此外科医生需要对其有充分的认识和足够的重视,才能最大限度的减少医源性胆管损伤。本院1997-10/2006-09共行胆囊、胆道手术7212例,其中Mirizzi综合征53例,占0.73%。

1 材料和方法

1.1 材料 本院1997-10/2006-09共收治Mirizzi综合征患者53例,男性15例,女性38例,男:女=1:2.53。年龄28-82(平均62)岁。临床表现为反复右上腹胀痛,胆绞痛,发热,28例同时伴有黄疸。实验室检查:血清总胆红素升高(22.5-238.4 mmol/L)38例,碱性磷酸酶(ALP)升高34例。

1.2 方法 所有患者术前行B超检查,均提示有胆囊结石,其中胆囊颈或胆囊管结石36例,肝总管扩张15例,肝内胆管轻度扩张18例。行电子计算机X线断层扫描(CT)检查41例,提示胆囊结石并肝内胆管轻度扩张27例,胆囊管结石压迫胆总管11例。行逆行性胰胆管造影(ERCP)23例,均未见胆囊显影,其中13例见胆总管上段充盈缺损。行磁共振胰胆管造影(MRCP)18例,其中胆总管上段充盈缺损15例。本组术前11例考虑Mirizzi综合征的可能,所有病例均为术中造影确诊。本组53例,术中按Csendes分型法^[3]: I型31例(胆囊颈

或胆囊结石嵌顿压迫胆总管),行经腹腔镜胆囊切除术(LC)30例,开腹胆囊切除1例。II型12例(胆囊胆管瘘形成,瘘管口径小于胆总管周径的1/3),行LC5例,中转1例,胆囊大部切除术2例,胆囊切除+胆总管探查+T管引流5例。III型7例(瘘口径超过胆总管周径的2/3),胆囊切除+瘘口修补+T管引流术4例,胆囊大部切除+瘘口修补+T管引流术2例,胆囊切除+肝总管空肠Roux-Y吻合术1例。IV型3例(胆囊胆管瘘完全破坏了胆总管),胆囊切除+肝总管空肠Roux-Y吻合术3例。

2 结果

患者住院时间最短5 d,最长2 mo,平均15 d。术后随访6 mo至10年,5例失访,1例因其他疾病死亡,2例胆道再发结石手术治愈,全组无手术死亡,近期发生胆瘘1例再次手术治愈。

3 讨论

现在多数学者认为胆囊管较长、胆囊管和胆总管并行和(或)低位汇入胆总管时易发生此综合征^[1-2]。Mirizzi综合征的发病与胆囊结石的长期存在以及慢性炎症有着直接的关系。最初嵌顿在Hartmann's囊的结石长期压迫胆总管,并引起炎症的反复发生。嵌顿的结石导致胆(肝)总管受压迫发生坏死,或若胆管炎症反复发生,最终导致结石侵蚀临近胆管而形成瘘^[5]。

早期正确的诊断对于治疗及预防远期并发症有着十分重要的意义,然而,要在术前确诊却比较困难^[1,5]。

B超是筛查Mirizzi综合征的首要诊断工具,他对肝胆系统结石、胆囊炎症及胆囊肿大的诊断有很高的敏感性。据报道B超对Mirizzi综合征诊断的敏感性只有27%^[3,6]。近来运用导管内超声成像技术(IDUS)对病变局部进行检查,大大提高了超声对本综合征的诊断敏感性和特异性。据Wehrmann *et al*的实验报道, IDUS对该病的敏感性和特异性分别达97%和100%^[7-8]。本组术前B超拟诊15例,术中造影明确诊断4例(26.7%)。电子计算机X线断层扫描(CT)不受肠道气体的影响,可揭示胆总管远段狭窄或结石,可以鉴别突发的肝总管狭窄是否是由于肝管外包块压迫引起的,并排除胆道内或肝门部的占位性病变。本组术前CT拟诊23例,术中造影明确诊断9例(39.1%)。逆行性胰胆管造影(ERCP)对胆道系统显影清晰,可以发现CT无法发现的细小胆道,对Mirizzi综合征有较高的敏感性(大约55%),并

■相关报道

Mirizzi综合征相关报道较多集中于如何更好的术前明确诊断和各种分型的手术治疗,以及是否能用腹腔镜治疗。



图1 Mirizzi综合征术前MRCP被误认为胆总管上端肿瘤。

可以确定是否有瘘道的存在^[6,9]。本组术前ERCP拟诊19例,术中造影明确诊断12例(63.1%)。此外,ERCP还可以作为一种治疗工具,包括取石、引流和放置支架等,特别在没有手术指征的患者中可以说是最好的选择。磁共振胰胆管造影(MRCP)对胆道系统显影清楚,对Mirizzi综合征的诊断敏感性可与ERCP相同,但其为无创性检查,能更好的被患者接受,是诊断本综合征的最好选择。MRCP与ERCP比较有一不足之处,他不能证实瘘的存在,也不能进行治疗^[10-11]。本综合征MRCP检查较难与胆总管上端肿瘤相鉴别,本组曾有一例术前误诊为胆总管上端肿瘤,术中才明确诊断为本综合征(图1)。

Mirizzi综合征术前很难判断是否存在胆囊胆管瘘,然而瘘的存在与否直接关系到手术方式的选择。易滨 *et al*^[12]认为,在考虑Mirizzi综合征诊断的前提下,如下判断可能有助于胆囊胆管瘘的诊断: (1)术前黄疸持续时间不足6 wk可能不存在瘘,超过7 wk可能存在瘘; (2)黄疸持续6 wk以后的ERCP或MRCP检查,若提示有肝外胆管狭窄,则提示可能未发生瘘或瘘口有结石嵌顿; (3)若发现无肝外胆管狭窄,并存在胆总管结石,则不能简单地诊断胆总管结石(可伴胆囊结石),而忽略瘘的可能。

Mirizzi综合征继发肿瘤的可能性较大,但由于胆囊癌早期常无特殊的临床表现,早期诊断很低^[13]。血液中CA19-9水平测定可能是胆囊癌早期诊断的有效指标,虽然Mirizzi综合征、胆道的慢性炎症或黄疸也可使CA19-9水平增高,但超过1000 kU/L以上则多为恶性病变^[14],最终诊断仍需要病理学检查,不能仅凭CA19-9的水平高低来判断其良恶性程度^[15]。

治疗Mirizzi综合征的原则包括: (1)术前认识此病; (2)以开腹手术为主; (3)术中仔细、小心的认清胆道解剖结构,切除病变胆囊、取尽结石、解除梗阻、通畅引流、修补胆道缺损。但对不同

的病例、不同的类型,需选用不同的方法。

目前I型和IV型手术方法比较清楚,I型可行保留胆囊管的胆囊切除术^[2]。对于极少数不存在胆囊管的患者,需保留足够的胆囊颈,并将其缝合,以避免结扎引起肝或/和胆总管扭曲狭窄。当胆囊三角炎症较重,难以解剖时,完全的切除胆囊可能比较困难,可采用逆行切除胆囊大部,将残余胆囊壁黏膜剥除或烧灼,缝合浆肌层即可。取出结石后,受压的肝总管即可自行复原^[16]。缺点是胆囊黏膜可能破坏不完全,残留的胆囊管和部分胆囊组织可以造成胆囊管综合征或逐渐形成小胆囊或假胆囊,导致术后复发,需再次手术。对于IV型患者,公认可采用胆管空肠吻合术,胆总管或肝总管Roux-en-Y胆肠吻合术较为安全妥当,术后较少发生胆道逆行感染或吻合口狭窄^[9-10,16]。

对于II型和III型的手术方式存在比较大的争议。过度的解剖胆囊颈和暴露胆囊三角将损伤甚至扩大胆总管瘘口,并且导致无足够的组织满意的缝合瘘口^[16]。在这种情况下可先切开胆囊底部,取出嵌顿的结石,再使用残余的胆囊壁用可吸收缝线缝合瘘口。胆管成型使用的胆囊壁必须要保证良好的血供,其血供情况可直接由胆囊壁的出血情况来判断。缝合后安置T管支撑,T管不应安置在瘘口处,而应安置于瘘口的上或下方,以防术后拔除T管后胆道狭窄的发生。以T管的一臂支撑瘘口吻合处可起到支撑和引流的双重作用。胆肠吻合术仍是有瘘口存在的Mirizzi综合征治疗的金标准,特别是那些瘘口较大或/和胆道损伤可能性较大的病例^[10]。

对Mirizzi综合征是否行腹腔镜手术一直是被受争议的,过去将其作为禁忌症,随着腹腔镜手术技术的提高有人认为Mirizzi综合征的I型和II型在熟练掌握内镜技术和胆道外科基本操作技术的前提下是可行腹腔镜治疗的^[1,5]。如果胆囊三角区解剖不清可以行腹腔镜下胆囊大部切除术加腹腔内引流^[17]。但一般认为Mirizzi综合征使用腹腔镜手术将比开腹手术的胆道损伤率高。在综合大量的病例研究后发现:经腹腔镜胆囊切除术(LC)中转开腹比例报道率为0%-100%,如果II型以上,或瘘比较大的病例,中转率可高达近100%。并发症发生率大致在0%-60%之间,胆道损伤率从0%-22.2%,住院死亡率在0%-25%之间^[18]。也有报道手助腹腔镜手术与单纯腹腔镜手术比较,具有缩短手术时间,最低限度的减少并发症的优点,可代替单纯腹腔镜手

■创新盘点

本文较突出的是所搜集资料年限长,病例数较多,资料准确可靠,在一定程度上可反映本地区Mirizzi综合征的发病率。本文对该病的术前诊断方式和手术方式的选择作了较为详细的总结和分析。

■应用要点

本文总结分析Mirizzi综合征术前各种辅助检查的优缺点和不同分型所适合的手术方式,有一定临床参考价值和应用意义。

■同行评价

本文对Mirizzi综合征进行了回顾性分析,对于临床诊断和治疗具有一定的指导意义,也具有一定的学术价值。

术进行比较复杂的胆石症手术^[19]。

近来内窥镜越来越广泛的应用于Mirizzi综合征的诊断和治疗。处于急性炎症期的患者,立即行开腹手术风险相对较大;且对年老体弱或合并其他重要脏器功能障碍的患者,开腹手术为其禁忌症,可行暂时性引流、解除梗阻,或行内镜下姑息治疗。对于医疗设备完善的单位,可选择经十二指肠逆行插管内镜治疗。切开十二指肠乳头,行逆行性胆道造影明确病变类型,然后向胆道内放内支撑架或置管引流,待黄疸减退或急性炎症缓解后,再行开腹胆囊切除胆道修补。若患者不愿或不能行开腹手术,则可再次用取石篮或/和气电碎石技术彻底清除胆道结石并更换内支撑架^[20],此法对年老患者尤为适用。

总之现有的检查手段对Mirizzi综合征还不能达到很高的术前确诊率,故术中明确诊断对减少医源性胆道损伤、术后并发症及死亡率都显得十分必要。针对不同的病例选用适合不同个体的诊断和治疗手段。随着医生警惕性和医疗手段的提高,由Mirizzi综合征导致的胆道损伤将会明显下降。

4 参考文献

- 1 Kwon AH, Inui H. Preoperative diagnosis and efficacy of laparoscopic procedures in the treatment of Mirizzi syndrome. *J Am Coll Surg* 2007; 204: 409-415
- 2 Abou-Saif A, Al-Kawas FH. Complications of gallstone disease: Mirizzi syndrome, cholecystocholedochal fistula, and gallstone ileus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 249-254
- 3 Csendes A, Diaz JC, Burdiles P, Maluenda F, Nava O. Mirizzi syndrome and cholecystobiliary fistula: a unifying classification. *Br J Surg* 1989; 76: 1139-1143
- 4 Ahlawat SK, Singhania R, Al-Kawas FH. Mirizzi syndrome. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2007; 10: 102-110
- 5 Rohatgi A, Singh KK. Mirizzi syndrome: laparoscopic management by subtotal cholecystectomy. *Surg Endosc* 2006; 20: 1477-1481
- 6 Chan CY, Liau KH, Ho CK, Chew SP. Mirizzi syndrome: a diagnostic and operative challenge. *Surgeon* 2003; 1: 273-278
- 7 Wehrmann T, Riphaus A, Martchenko K, Kokabpick S, Pauka H, Stergiou N, Frenz MB. Intraductal ultrasonography in the diagnosis of Mirizzi syndrome. *Endoscopy* 2006; 38: 717-722
- 8 Phatak N, Kochman ML. Biliary endoscopy. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20: 281-287
- 9 Chatzoulis G, Kaltsas A, Danilidis L, Dimitriou J, Pachiadakis I. Mirizzi syndrome type IV associated with cholecystocolic fistula: a very rare condition--report of a case. *BMC Surg* 2007; 7: 6
- 10 Tan KY, Chng HC, Chen CY, Tan SM, Poh BK, Hoe MN. Mirizzi syndrome: noteworthy aspects of a retrospective study in one centre. *ANZ J Surg* 2004; 74: 833-837
- 11 Kaya D, Karcaaltincaba M, Akhan O, Uslu N, Haliloglu M. MRCP diagnosis of Mirizzi syndrome in a paediatric patient: importance of T1-weighted gradient echo images for diagnosis. *Pediatr Radiol* 2006; 36: 980-982
- 12 易滨, 张柏, 吴孟超, 张永杰. Mirizzi综合征15例的术前诊断分析. *中华普通外科杂志* 2001; 16: 147-149
- 13 Prasad TL, Kumar A, Sikora SS, Saxena R, Kapoor VK. Mirizzi syndrome and gallbladder cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006; 13: 323-326
- 14 Sanchez M, Gomes H, Marcus EN. Elevated CA 19-9 levels in a patient with Mirizzi syndrome: case report. *South Med J* 2006; 99: 160-163
- 15 Robertson AG, Davidson BR. Mirizzi syndrome complicating an anomalous biliary tract: a novel cause of a hugely elevated CA19-9. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 167-169
- 16 Johnson LW, Sehon JK, Lee WC, Zibari GB, McDonald JC. Mirizzi's syndrome: experience from a multi-institutional review. *Am Surg* 2001; 67: 11-14
- 17 Rohatgi A, Singh KK. Mirizzi syndrome: laparoscopic management by subtotal cholecystectomy. *Surg Endosc* 2006; 20: 1477-1481
- 18 Lai EC, Lau WY. Mirizzi syndrome: history, present and future development. *ANZ J Surg* 2006; 76: 251-257
- 19 Wei Q, Shen LG, Zheng HM. Hand-assisted laparoscopic surgery for complex gallstone disease: a report of five cases. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3311-3314
- 20 Shim CS, Moon JH, Cho YD, Kim YS, Hong SJ, Kim JO, Cho JY, Kim YS, Lee JS, Lee MS. The role of extracorporeal shock wave lithotripsy combined with endoscopic management of impacted cystic duct stones in patients with high surgical risk. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1026-1029

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

洛铂与草酸铂在联合化疗方案中毒副作用的比较

周宏锋, 张玉新, 吴良平, 邓鉴文, 丁洪亮, 康慧鑫

周宏锋, 张玉新, 吴良平, 邓鉴文, 丁洪亮, 康慧鑫, 广州军区
广州总医院普通外科 广东省广州市 510010

作者贡献分布: 周宏锋与张玉新对此文所作贡献均等; 此课题由
周宏锋, 张玉新设计; 研究过程由吴良平, 邓鉴文, 丁洪亮及康慧
鑫操作完成; 研究所用试剂由及分析工具由康慧鑫提供; 数据分
析由周宏锋完成; 本论文写作由周宏锋完成。

通讯作者: 周宏锋, 510010, 广东省广州市荔湾区流花路111号,
广州军区广州总医院普通外科. zhouhf69@hotmail.com
电话: 020-36653547 传真: 020-36222793
收稿日期: 2007-07-29 修回日期: 2007-11-25

Comparison of adverse reactions of combination chemotherapy: lobaplatin versus oxaliplatin

Hong-Feng Zhou, Yu-Xin Zhang, Liang-Ping Wu, Jian-Wen Deng, Hong-Liang Ding, Hui-Xin Kang

Hong-Feng Zhou, Yu-Xin Zhang, Liang-Ping Wu, Jian-Wen Deng, Hong-Liang Ding, Hui-Xin Kang, Department of General Surgery, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Correspondence to: Hong-Feng Zhou, Department of General Surgery, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, 111 Liuhua Road, Liwan District, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China. zhouhf69@hotmail.com

Received: 2007-07-29 Revised: 2007-11-25

Abstract

AIM: To compare the adverse effects of lobaplatin with that of oxaliplatin in combination chemotherapy.

METHODS: From 2006 to 2007, 52 colorectal cancer patients after surgery were randomly separated into two groups. A total of 85 courses were completed for 26 patients in the lobaplatin combination chemotherapy group. A total of 73 courses were completed for 26 patients in the oxaliplatin combination chemotherapy group. The drug regimens were: lobaplatin 50 mg/m² (or oxaliplatin, 80 mg/m²), iv in 500 mL D5W over 2 h on day 1; calcium leucovorin 200 mg/m², iv in D5W over 2 h on day 1 and day 2; fluorouracil 400 mg/m², iv bolus, after calcium leucovorin, then 600 mg/m², iv over 22 h on day 1 and day 2.

RESULTS: The adverse reactions that occurred

frequently were myelosuppression and gastrointestinal tract reaction. In the lobaplatin group, white cell count was decreased to grade I or II in 60.0% of courses, and grade III in 6.7% of courses ($P < 0.01$). Platelet count was decreased to grade I or II in 66.7% of courses, and grade III in 10.0% of courses ($P < 0.01$). Nausea was seen in 16.7% and vomiting in 3.3% of courses ($P < 0.01$). Peripheral neuropathy was seen in 5.9% of courses ($P < 0.01$). In the oxaliplatin group, white cell count was decreased to grade I or II in 50.7% of courses, grade III or IV in 41.3% of courses. Platelet count was decreased to grade I or II in 21.3% of courses. Nausea was 37.3% and vomiting was seen in 6.7% of courses ($P < 0.01$). Peripheral neuropathy of grade I or II was seen in 42.7% of courses, and grade III or IV in 9.3% of courses. Hemoglobin, GPT, diarrhea, urea nitrogen and alopecia did not differ significantly between the two groups.

CONCLUSION: Chemotherapy in combination with lobaplatin and oxaliplatin or in combination with fluorouracil or calcium leucovorin is safe. Platelet count is significantly decreased during myelosuppression in patients treated with lobaplatin combination therapy. Leukocyte count is significantly decreased with oxaliplatin chemotherapy. Gastrointestinal tract reactions and neurotoxicity are less frequent in patients treated with lobaplatin rather than oxaliplatin chemotherapy.

Key Words: Adverse reaction; Combination chemotherapy; Lobaplatin; Oxaliplatin; Fluorouracil; Calcium leucovorin

Zhou HF, Zhang YX, Wu LP, Deng JW, Ding HL, Kang HX. Comparison of adverse reactions of combination chemotherapy: lobaplatin versus oxaliplatin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(2): 225-227

摘要

目的: 比较洛铂、草酸铂在氟尿嘧啶、四氢叶酸钙联合化疗方案中的毒副作用。

方法: 将2006-2007年52例结、直肠癌术后患者随机分为两组, 洛铂联合化疗组26例, 共85个疗程, 草酸铂联合化疗组26例, 共73个疗程。

■背景资料

目前, 结直肠癌以FOLFOX作为一线化疗方案, FOLFOX4是国际公认的标准方案, 但毒副反应较大。洛铂是第三代的铂类抗癌药, 临床前研究结果表明, 他与顺铂的抗癌活性相似, 但肾毒性和胃肠道反应较轻, 且可能对部分顺铂耐药的肿瘤有效。国内曾进行了I、II临床研究, 当时中文名叫乐铂。2005年被SFDA批准为一类抗肿瘤新药上市。将洛铂替换FOLFOX4方案中草酸铂以降低化疗的毒副作用成为符合逻辑的推理, 国内几家大医院已开始对新方案进行初步的临床研究。

■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

■创新盘点

本化疗方案的安全性笔者曾做过报道。与草酸铂的毒副作用比较亦为首次报道。因病例较少,随访时间较短,对其疗效和安全性还有待进一步观察。

化疗方案为洛铂50 mg/m²或草酸铂85 mg/m²,静脉滴注2 h以上,第1天;四氢叶酸钙200 mg/m²静脉滴注2 h以上,第1天和第2天;氟尿嘧啶400 mg/m²静脉推注,然后600 mg/m²持续静脉输注22 h以上,第1天和第2天;每2周重复。

结果:毒副作用以骨髓抑制及胃肠道反应为主。洛铂组和草酸铂组患者白细胞减少 I - II 级分别占60.0%, 50.7%;血小板减少 I - II 级占66.7%, 21.3%;胃肠道反应恶心占16.7%, 37.3%;发生呕吐占3.3%, 6.7%;洛铂组患者白细胞和血小板减少 III 级分别占6.7%, 10.0%,周围神经症状 I 级占5.9%;草酸铂组白细胞减少 III - IV 级占41.3%,周围神经症状 I - II 级占42.7%, III - IV 级占9.3%。

结论:洛铂、草酸铂分别与氟尿嘧啶和四氢叶酸钙联合使用均为安全的化疗方案。洛铂组对骨髓的抑制主要表现在血小板减少,而草酸铂组主要表现在白细胞减少。洛铂组的胃肠道反应及神经毒性较草酸铂组轻。

关键词:毒副作用;联合化疗;洛铂;草酸铂;氟尿嘧啶;四氢叶酸钙

周宏锋, 张玉新, 吴良平, 邓鉴文, 丁洪亮, 康慧鑫. 洛铂与草酸铂在联合化疗方案中毒副作用的比较. 世界华人消化杂志 2008; 16(2): 225-227

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/225.asp>

0 引言

FOLFOX4方案是国际公认的结肠癌辅助化疗的标准方案^[1],洛铂(lobaplatin)是第三代的铂类抗癌药,是SFDA2005年批准上市的一类抗肿瘤新药。对于洛铂的疗效及毒副作用国内外已有

文献报道^[2-7]。我科自2006-2007年以来将洛铂替换FOLFOX4方案中的草酸铂作为结肠癌辅助化疗的新方案,共治疗了85个疗程,对两种方案的毒副作用进行了观察和比较,现报道于下。

1 材料和方法

1.1 材料 全组患者52例,男33例,女19例,年龄32-78(平均53.6±15.2)岁,均为结、直肠癌术后患者,近1 mo未进行化疗或放疗。随机分为两组,一组接受含洛铂的联合化疗方案治疗,另一组接受FOLFOX4方案治疗。洛铂联合化疗组26例,共85个疗程,草酸铂联合化疗组26例,共73个疗程。

1.2 方法 洛铂的联合化疗方案:洛铂50 mg/m²静脉滴注2 h以上,第1天;四氢叶酸钙200 mg/m²静脉滴注2 h以上,第1天和第2天;氟尿嘧啶400 mg/m²静脉推注,然后600 mg/m²持续静脉输注22 h以上,第1天和第2天;共约48 h为一个疗程,每2周重复,连续治疗6个疗程。FOLFOX4方案^[8]:草酸铂85 mg/m²静脉滴注2 h以上,第1天;四氢叶酸钙200 mg/m²静脉滴注2 h以上,第1天和第2天;氟尿嘧啶400 mg/m²静脉推注,然后600 mg/m²持续静脉输注22 h以上,第1天和第2天;共约48 h为一个疗程,每2周重复,连续治疗6个疗程。治疗毒副反应判断标准按WHO标准评定。

统计学处理 应用SPSS10.0软件包进行 χ^2 检验。

2 结果

毒副作用以骨髓抑制及胃肠道反应为主,见表1,洛铂组患者白细胞减少 I - II 级占60.0%, III 级占6.7%($P<0.01$)。血小板减少 I - II 级占66.7%, III 级占10.0%($P<0.01$)。胃肠道反应恶心占16.7%,发生呕吐占3.3%($P<0.01$)。周围神经症状 I 级占

表 1 洛铂、草酸铂在联合化疗中毒副作用比较

毒副反应	洛铂组					草酸铂组					χ^2	P
	0	I	II	III	IV	0	I	II	III	IV		
血红蛋白降低	60	17	6	2	0	57	11	7	0	0	2.826	>0.05
白细胞减少	28	37	14	6	0	10	15	23	27	4	37.217	<0.01
血小板减少	20	28	28	9	0	59	13	3	0	0	53.482	<0.01
出血	85	0	0	0	0	75	0	0	0	0		
谷丙转氨酶升高	79	6	0	0	0	73	2	0	0	0	1.618	>0.05
恶心呕吐	68	14	3	0	0	32	28	5	0	0	15.740	<0.01
腹泻	85	0	0	0	0	71	4	0	0	0	2.719	>0.05
尿素氮升高	78	7	0	0	0	71	3	1	0	0	2.313	>0.05
头发	82	3	0	0	0	70	5	0	0	0	0.297	>0.05
周围神经	80	5	0	0	0	37	21	11	6	1	43.282	<0.01

5.9% ($P < 0.01$). 草酸铂组患者白细胞减少 I - II 级占 50.7%, III-IV 级占 41.3%. 血小板减少 I - II 级占 21.3%. 胃肠道反应恶心占 37.3%, 发生呕吐者占 6.7%. 周围神经症状 I - II 级占 42.7%, III-IV 级占 9.3%. 血红蛋白、谷丙转氨酶、腹泻、尿素氮、脱发在两组中无显著性差异.

3 讨论

洛铂是第三代的铂类抗癌药, 国外文献报道其与顺铂的抗癌活性相似, 但肾毒性和胃肠道反应较轻, 且可能与顺铂有部分非交叉性耐药^[9-10].

本临床观察发现, 洛铂、草酸铂分别与氟尿嘧啶和四氢叶酸钙联合化疗的毒副作用以骨髓抑制及胃肠道反应为主. 其中以白细胞和血小板减少尤为明显, 是主要的剂量限制性因素, 与文献报道一致^[2-3,11]. 因白细胞、血小板以化疗结束后 2 wk 降到最低, 而此时患者都已出院, 因此 2 wk 后一定要求患者复查血象, 根据结果采取措施, 防止感染和出血. 洛铂组对骨髓的抑制主要表现在血小板减少, 而草酸铂组主要表现在白细胞减少. 这种对骨髓抑制选择性有待进一步研究. 洛铂组的胃肠道反应及神经毒性较草酸铂组轻, 这也是影响患者主观感受的主要因素, 在本研究的预实验期, 我们发现同时接受两种化疗方案的患者明显感觉接受洛铂治疗较草酸铂治疗舒适.

本化疗方案因治疗病例较少, 随访时间较短, 国内外尚无大宗病例报道, 疗效有待进一步观察^[12-13].

4 参考文献

- 1 Fuse N, Doi T, Ohtsu A, Takeuchi S, Kojima T, Taku K, Tahara M, Muto M, Asaka M, Yoshida S. Feasibility of oxaliplatin and infusional fluorouracil/leucovorin (FOLFOX4) for Japanese patients with unresectable metastatic colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 434-439
- 2 姜文奇, 林桐榆, 徐瑞华, 管忠震. 乐铂单药治疗肺癌的临床研究. *浙江肿瘤* 1998; 4: 241-242
- 3 冯光丽, 廖美琳, 赵家美, 张心敏, 陈智伟, 白皓, 钟华. 乐铂单药治疗 42 例原发性支气管肺癌. *中国癌症杂志* 2000; 10: 306-309
- 4 Gietema JA, Veldhuis GJ, Guchelaar HJ, Willemse PH, Uges DR, Cats A, Boonstra H, van der Graaf WT, Sleijfer DT, de Vries EG. Phase II and pharmacokinetic study of lobaplatin in patients with relapsed ovarian cancer. *Br J Cancer* 1995; 71: 1302-1307
- 5 Gietema JA, de Vries EG, Sleijfer DT, Willemse PH, Guchelaar HJ, Uges DR, Aulenbacher P, Voegeli R, Mulder NH. A phase I study of 1,2-diamminomethyl-cyclobutane-platinum (II)-lactate (D-19466; lobaplatin) administered daily for 5 days. *Br J Cancer* 1993; 67: 396-401
- 6 姜文奇, 林桐榆, 徐瑞华, 管忠震. 乐铂单药治疗乳腺癌的 II 期临床研究. *实用癌症杂志* 1998; 13: 294-295
- 7 周宏锋, 张玉新, 程黎阳, 丁洪亮. 洛铂、氟尿嘧啶与亚叶酸钙联合化疗的临床毒副作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 86-87
- 8 Xu N, Fang WJ, Zhang XC, Yu LF, Bao HY, Shi GM, Huang S, Shen P. A Phase II Trial of Oxaliplatin, Folinic Acid, and 5-Fluorouracil (FOLFOX4) as First-Line Chemotherapy in Advanced Colorectal Cancer: A China Single-Center Experience. *Cancer Invest* 2007; : 1-7
- 9 Harstrick A, Bokemeyer C, Scharnofske M, Hapke G, Reile D, Schmoll HJ. Preclinical activity of a new platinum analogue, lobaplatin, in cisplatin-sensitive and -resistant human testicular, ovarian, and gastric carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993; 33: 43-47
- 10 刘秀峰, 秦叔逵. 洛铂的临床研究进展. *临床肿瘤学杂志* 2006; 11: 549-552
- 11 魏嘉, 王立峰, 刘宝瑞. 5-FU 相关的药物疗效及毒性预测分子研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1889-1893
- 12 Galanski M, Jakupiec MA, Keppler BK. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr Med Chem* 2005; 12: 2075-2094
- 13 林丽珠, 周岱翰, 郑心婷. 洛铂联合氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸治疗晚期耐药胃癌、结直肠癌疗效观察. *中国肿瘤临床* 2007; 34: 286-288

■同行评价

本文比较了洛铂与草酸铂在联合化疗方案中毒副作用, 可读性强, 文笔流畅, 统计准确, 有一定的临床指导价值.

编辑 程剑侠 电编 何基才