

# 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张 坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化 楠

岳茂兴, 邹德威, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠, 中国人民解放军第306医院载人航天主着陆场医疗救护队 北京市 100101  
闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 中国人民解放军总装备部卫生局 北京市 100101  
岳茂兴, 男, 1944-11-27 生, 汉族, 江苏省武进市人, 教授, 主任医师. 已发表论文 293 篇, 获全军科技成果奖二等奖 3 项, 编著《危重病急救与监测》《载人航天工程医疗救护实用知识概论》《救护》《多器官功能障碍综合征的现代救治》《反化学恐怖医疗手册》等著作 8 部, 参编 9 部, 享受“政府特殊津贴”及“军队优秀专业技术人才岗位津贴”, 2003 年荣获“中国航天基金奖”. 中国中西医结合学会急救医学学会副主任委员, 中国康复医学学会创伤康复专业委员会副主任委员, 载人航天紧急救护专家组组长, 神舟号宇宙飞船主着陆场区医疗救护队技术组组长.  
总装备部卫生局重点科研课题资助项目, No. 9521086  
项目负责人: 岳茂兴, 100101, 北京市, 中国人民解放军第 306 医院载人航天主着陆场医疗救护队. yuemx@ns.cetin.net.cn  
电话: 010-66354546  
收稿日期: 2004-02-27 接受日期: 2004-03-18

## 摘要

目的: 探讨中国首次载人航天主着陆场区航天员医疗保障及救护的经验体会.

方法: 结合我们参加中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的体会, 8 次在直升机上的医疗救护演练经验, 2 次突发意外事故乘直升机远距离实施医疗救护的体会, 多次在载人航天医疗救护车上的医疗救护演练体会. 并参考国内外相关资料, 对载人航天航天员意外伤害提出有效的防治预案.

结果: 主要针对首飞载人航天航天员可能发生意外伤害的原因, 创新地把一个高质量的 ICU 全天候前移至草原上、沙漠里, 载体是载人航天医疗救护直升机及医疗救护车, 可以确保意外情况下航天员的安全. 创造了反应速度第一; 技术装备第一. 使救治规则、卫勤保障原则更趋于合理, 抢救成功率更高. 载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求. 航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应, 立体救护”的理念. 载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用, 他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可着落实施救护.

结论: 返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护, 能保障航天员安全, 圆满完成载人航天任务.

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1009-1014  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1009.asp>

## 0 引言

中国第一位“太空使者”杨利伟, 38 岁, 2003-10-15-T09:00 乘神舟五号飞船从酒泉卫星发射中心发射升

空, 在太空遨游 21 小时 23 分钟, 于 2003-10-16-T06:23, 在内蒙古四子王旗的主着陆场成功着陆, 与理论着陆点仅相差 4.8 km<sup>[1]</sup>, 与 1961-04-12 前苏联航天员加加林乘东方 1 号飞船代表人类首次进入太空历时 108 min 相比, 在太空中多待了 1 175 min. 此次载人航天医疗救护直升机几乎与神舟返回舱同时落地, 医护人员在几分钟时间内已经到达航天员身边, 航天员立即接受医检医保医疗救护人员的检查, 此时载人航天医疗救护车及医检医保车等也很快赶到了返回舱现场, 中国航天第一人杨利伟在返回舱内适应地面状况 43 min 后, 自主走出返回舱, 进入医监医保车脱航天服, 再次接受医监医保等人员的程序检查, 检查结果均正常. 由医疗救护直升机护送航天员飞某军用机场, 再转乘专机返回北京, 航天员全程均有医监医保医疗救护人员护送及监护. 航天员从内蒙草原着陆到北京仅用 3 个多小时. 当日上午 09:52 返回北京. 在北京航天城航天员公寓医监医保室, 杨利伟接受了北京航天医学工程研究所及解放军第 306 医院共同进行的内科、外科、耳鼻喉科、眼科、口腔科、皮肤科、心电图、超声波、血常规、尿常规、血生化等多项检查, 各项检查结果均在正常范围之内<sup>[2]</sup>. 我国首次载人航天飞行获得圆满成功! 中国人实现了千百年的飞天梦想. 这是新世纪实现中华民族伟大复兴具有标志意义的重大事件, 是继“两弹一星”之后我国高科技领域最具影响力的里程碑工程. 为保证首飞航天员的安全, 解放军第 306 医院载人航天主着陆场医疗救护队在航天员的医疗保障及救护工作方面做了大量工作. 创新地把一个高质量的 ICU 加强医疗病房全气候前移至草原上、沙漠里, 可以确保意外情况下航天员的安全. 达到了反应速度第一; 技术装备第一<sup>[3]</sup>. 圆满完成首飞航天员的医疗保障及救护任务. 现报告如下.

## 1 创造辉煌历史的一幕幕精彩瞬间

2003-10-15-T05:20, 航天员出征仪式在航天员公寓问天阁举行. 05:30 我国首位航天员杨利伟向中国载人航天工程总指挥李继耐报告, 请示出征. 05:40 载着中国首飞航天员的车队驶向载人航天发射场. 05:58 航天员杨利伟走向塔架防爆电梯. 06:15 进入飞船返回舱的杨利伟坐到了用合成材料特制的座椅上. 杨利伟在舱内进行起飞前的各项准备. 地面指挥控制中心屏幕显示, 杨利伟生理参数正常. 06:25 在返回舱状态确认单上, 杨利伟郑重地签名, 然后开始完成连接通信头戴、生理信号

插头、供氧和通风软管、打开航天服通风机等一系列动作。08:00 整,杨利伟呈仰卧姿态,双手放在膝盖上,戴上了头盔和对讲话筒。08:10,3名技术人员启动配气按钮,开始给火箭贮箱增压,确保火箭发动机点火后正常工作。08:20环抱着飞船的第三组平台徐徐展开,乳白色的船箭塔组合体完全展露,飞船上的五星红旗格外醒目耀眼。08:30 杨利伟调整好束缚带的松紧度。08:45 飞船发射进入 15 min 准备。08:55 神舟 5 号发射进入 5 min 准备,杨利伟关上了面窗,并戴上头盔面罩,整装待发。08:59 进入最后 1 min 准备。此时杨利伟充满信心地躺在特制的航天座椅上。“10, 9, 8, ……”此时飞船发射进入最后读秒阶段。2003-10-15-T09:00 整,长征 2F 火箭在震天撼地的轰鸣中腾空而起,托举着神舟 5 号飞船顺利升空,急速飞向太空。09:10 飞船进入预定轨道。从这一刻起,杨利伟成了浩瀚太空迎来的第一位中国访客。09:12 神舟 5 号载人飞船推进舱太阳帆板展开。09:14 神舟 5 号载人飞船轨道舱太阳帆板打展开。09:32 北京中心实施数据注入,更新飞船飞行程序。09:33 停泊在南太平洋的远望 2 号测量船捕获飞船信息。09:34 神舟 5 号飞船的舱内图像清晰地显示在北京航天指控中心的大屏幕上。杨利伟在与医学监督医生通话时显得相当沉稳。他说:“我感觉良好!”同时,参加神舟 5 号海上应急救援的 3 艘救捞船“北海”102 轮、“德鲲”轮、“德意”轮完成任务返航。09:42 载人航天工程总指挥李继耐宣布:飞船已进入预定轨道,发射取得成功。10:00 许,在神舟 5 号飞船进行环绕地球第一圈飞行时,地面指挥人员报告舱内环境正常后,杨利伟得到指令,打开面罩,拿着书和笔。当他松开手时,笔在太空失重环境下立即飘浮起来。10:31 神舟 5 号飞船进入喀什测控站检测区域。在接到地面指令后,杨利伟摘下手套,并解开系在膝盖下方的束缚带。在北京航天指控控制中心的大屏幕上可以看到,杨利伟的动作非常轻松熟练。10:40 飞船开始绕地球飞行第二圈。通过飞船传回的图像可看到,杨利伟由卧姿改为坐姿,并通过圆形舷窗向外观测。11:08 杨利伟开始在太空中进餐。他一边看书,一边用捏挤包装袋的方式享用这顿不同寻常的午餐。包括八宝饭、鱼香肉丝、宫保鸡丁和用中药及滋补品制成的饮料等。11:12 杨利伟进行太空飞行中的首次休息。他的这次酣眠持续了约 3 h。15:52 北京航天指控控制中心向杨利伟了解了飞船工作状况和他的身体状况。航天员向地面报告:航天服气密性良好,飞船工作正常。15:54 飞船变轨程序启动。指挥控制大厅右侧大屏幕三维动画实时显示,飞船尾部喷出桔黄色的火焰,加速飞行。很快,飞船又进入平稳的飞行状态。整个过程中,杨利伟始终神情镇定。南太平洋上的远望 2 号测量船向北京传来数据,表明变轨圆满成功。18:40 神舟 5 号飞船运行到第 7 圈,杨利伟在太空中展示中国国旗和联合国旗。21:31 神舟 5 号飞船进入第 9 圈飞行。23:08 神舟 5 号飞船进入第 10 圈飞行,航天员杨利伟

开始休息。23:27 远望 4 号测量船捕捉到神舟 5 号。23:32 杨利伟合上双眼休息。这是他的第二次太空休息。23:45 神舟 5 号飞船正在绕地球进行第 11 圈飞行。此刻,航天员杨利伟已在静谧的太空中安然入眠。2003-10-16-T00:00,神舟 5 号已在预定轨道飞行了 14 小时 50 分钟。飞船一切正常。2003-10-16-T01:17 神舟 5 号已经飞行进入第 12 圈。测控点向北京航天指控中心报告飞船跟踪正常。2003-10-16-T01:18 航天员杨利伟第二次休息结束。2003-10-16-T02:52 飞船进入第 13 圈。航天员杨利伟汇报身体感觉良好。2003-10-16-T 03:10 杨利伟进行压力服气密性检查。2003-10-16-T 03:59 轨道舱泄压。2003-10-16-T04:19 神舟 5 号飞船进入环游太空的最后一圈,即第 14 圈。2003-10-16-T04:31 北京航天指挥控制中心通过天地通系统与航天员杨利伟进行了沟通,杨利伟报告,各项身体指标正常。2003-10-16-T04:53 返回段进入 40 min 准备。05:04 神舟 5 号飞船返回舱成功进入返回轨道。05:23 返回段进入 10 min 准备。05:33 返回段测控开始。05:35 飞船第一次调姿。北京航天指挥控制中心成功向正在太空运行的神舟 5 号载人飞船发送返回指令。按照程序,飞船将在建立返回姿态后,经过返回制动、轨道舱与返回舱分离、推进舱与返回舱分离等一系列太空控制动作,开始返回内蒙古主着陆场。远在大西洋上的远望 3 号测量船及时捕获飞船。05:36 神舟 5 号飞船轨道舱与返回舱成功分离。返回舱与推进舱轨道高度不断降低,向预定落点返回。飞船轨道舱将留轨工作半年,开展相关的科学实验。05:38 神舟 5 号载人飞船制动火箭点火,飞船返回舱飞行速度减缓,轨道高度进一步降低。返回舱向预定着陆场降落。05:59 在北京航天指挥控制中心的组织指挥下,神舟 5 号载人飞船返回舱与推进舱成功分离,成功进入返回轨道。飞船返回舱失去动力后,按照升力控制技术向预定着陆场降落。稍后,布设在新疆和田的活动测量站报告,神舟 5 号飞船进入中国国境上空。6:04 神舟 5 号飞船再入大气层。飞船处于“黑障”阶段。6:07 搜救直升机收到神舟 5 号飞船返回舱发出的无线电信号。机上搜索人员目视到神舟 5 号返回舱。由 5 架直升机组成的空中搜救分队和 14 辆专用车辆组成的地面搜救分队立即从不同的方向迅速向落点前进。06:22 杨利伟报告身体状况良好。返回舱引导伞已打开。稍后,杨利伟再次报告身体状况良好。主伞工作正常。稍后,主着陆区直升机驾驶员目视到飞船降落伞,地面搜索人员看到了降落伞,返回舱主伞已脱落。5 架直升机跟踪正常。2003-10-16-T06:28 地面搜索人员报告距神舟 5 号返回舱落点 4.8 km。稍后,温家宝总理与杨利伟通话,祝贺他顺利返航。06:25 地面搜索人员找到了神舟 5 号返回舱。06:38 搜索人员报告,杨利伟身体状况良好。2003-10-16-T06:51 杨利伟在神舟 5 号舱口向大家招手。06:54 李继耐在北京航天指挥控制中心宣布:神舟 5 号载人飞船 2003-10-16-T06:23 在内蒙古主着陆场成功着陆,实际着陆点与理论着陆点相

差 4.8 km. 返回舱完好无损. 07:23 杨利伟在距返回舱约 10 m 的一辆医疗检查车上进行体检. 2003-10-16-T09:52 杨利伟乘专机从内蒙古着陆场飞抵北京.

## 2 载人航天主着陆场医疗救护队队员参试过程

2003-9-28-T08:00 救护队全体人员集合出发, 晚上到达内蒙古呼市. 2003-09-29 到达内蒙古四子王旗. 2003-09-30 空中医疗分队和地面医疗分队分别进行了演习, 使所有使用的设备和药物处于实战状态. 在医疗救护直升机上演练时, 发生一名机组通信人员出现剧烈胃肠疼痛, 医疗救护人员立即给予注射急救药物, 很快使他止住了胃肠疼痛, 在机上恢复了工作. 此后又进行了二次医疗救护直升机、医疗救护车内的全程实战演练. 2003-10-12 取到航天员的 B 型备血. 2003-10-15-T23:00 点, 医疗救护队全体人员从四子王旗出发到达预定地点后, T01:00, 进行了战前动员. 地面医疗分队首先出发, 空中医疗分队人员在大庙待命. T05:00 医疗救护直升机起飞, 飞向飞船返回舱理论落点, 并进行空中搜索. 地面医疗救护车在理论落点待命. 两方面的救护人员, 将所有的急救器材、设备、药物准备齐全, 急救药物抽到注射器中, 监护仪和呼吸机等都开机待用. 我们将 1 119 种急救物品, 11 个手术包, 药品 3 000 多支,

B 型血 2 000 mL, 血浆 800 mL, 人血白蛋白注射液 8 支, 有的一支抗太空病的药就达 7 000 元. 真正前移至医疗救护直升机及医疗救护车(图 1: 空中医疗分队和地面医疗分队做好迎接返回航天员的各种医疗保障准备工作. A, B, C, D, E, F, G, H, I, J). 形成了对航天员能实施“快速反应, 立体救护”<sup>[4-7]</sup>的格局. 06:09 航天医疗救护直升机上的医疗救护人员目视到神舟五号返回舱正在以每秒 4-5 m 的速度缓慢下降着陆. 06:23 “神舟”五号飞船返回舱安全侧向着陆, 载人航天医疗救护直升机几乎与神舟返回舱同时落地<sup>[3]</sup>, 医护人员在几分钟时间内已经到达航天员身边, 开舱后航天员立即接受医检医保医疗救护人员的检查, 中国航天第一人杨利伟在返回舱内适应地面状况 43 min 后, 自主走出返回舱, 进入医监医保车脱航天服, 再次接受医监医保等人员的程序检查, 检查结果均正常. 由医疗救护直升机护送航天员飞某军用机场, 再转乘专机返回北京, 航天员全程均有医监医保医疗救护人员护送及监护<sup>[4]</sup>, 医疗救护队派出二名人员全程护送及监护航天员. 航天员从内蒙草原着陆到北京仅用 3 个多小时. 当日上午 09:52 返回北京(图 2: 医监医保医疗救护人员对航天员进行了十分细致的检查、监护、护送等医疗保障工作. A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N).



图 1 空中医疗分队和地面医疗分队做好迎接返回航天员的各种医疗保障准备工作. A: 首飞航天员主着陆场医疗保障及救护系统分为机载和车载二个平台, 图为医疗救护直升机(右 1)在任务中; B: 特种医学中心岳茂兴主任、刘志国博士在载人航天航天员医疗救护车上执行任务; C: 主着陆场医疗救护队邹德威队长与岳茂兴主任等在载人航天航天员医疗救护车行进途中讨论急救预案; D: 针对航天员可能发生的意外伤情, 解放军第 306 医院主着陆场区医疗救护队将 1119 种便携式 ICU 急救设备仪器前移至草原上、沙漠里; E: 在草原上、沙漠里也可以进行决定性的 ICU 加强急救治疗; F: 在草原或沙漠上实施“快速反应、立体救护” ICU 的加强治疗; G: 2003-10-15 晚上 11 点, 医疗救护队全体人员从四子王旗出发到达大庙后, 凌晨 1 点钟, 进行了战前动员; H: 将 ICU 全套设备还可以移至医疗救护直升机内, 医疗救护队队员正在抽取急救药品; I: 神舟五号主着陆场医疗救护队在直升机内作好了医疗保障及救护的充分准备, 5:30 直升机正飞向飞船返回舱预定落点; J: 载人航天医疗救护直升机有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可看落实施救护.





图2 医监医保医疗救护人员对航天员进行了十分细致的检查、监护、护送等医疗保障工作。A: 医疗救护直升机几乎与神舟五号飞船返回舱同时落地, 医护人员在几分钟时间内已经到达航天员身边; B: 解放军第306医院医疗救护人员第一时间到达神舟五号飞船返回舱, 创造了两个第一: 即反应速度第一 技术和设备第一; C: 航天员杨利伟立即接受医监医保医疗救护人员的检查, 医监医保医疗救护队邹德威院长、刘建中副主任医师等正在给航天员检查身体; D: 中国航天第一人杨利伟在返回舱内适应地面状况 43 min 后, 自主走出返回舱; E: 解放军第306医院主着陆场医疗救护队队员在神舟五号飞船返回舱前庆祝胜利; F: 庆祝胜利; G: 庆祝胜利; H: 中国首飞航天员杨利伟正在上载人航天医监医保医疗救护车; I: 杨利伟进入医监医保车脱航天服, 再次接受医监医保等人员的程序检查, 检查结果均正常; J: 现场扫描; K: 杨利伟下医监医保车, 准备上医疗救护直升机; L: 杨利伟上了医疗救护直升机; M: 载有航天员的医疗救护直升机在现场起飞, 护送航天员飞某机场; N: 航天员全程均有医监医保医疗救护人员护送及监护。图为解放军第306医院邹德威院长等护送首飞航天员杨利伟回京; O: 庆祝我国首次载人航天飞行圆满成功大会。

### 3 首次载人航天航天员返回阶段出现的工况

在整个飞行过程中, 发射和返回过程对航天员的身体和心理考验最大, 而返回阶段尤为突出。(1)在穿越“黑障区”即在 80-50 km 高度间, 飞船高速进入大

气层, 表面温度高达数千摄氏度, 形成一个大火球。此时有很大的噪声, 航天员承受体质量 3 倍左右的重力, 对航天员心理是一个巨大的考验。(2)飞船返回阶段由超音速跨越音障进入低于音速的飞行速度时, 飞船

状态变得很不稳定,震动,发抖,人会有一种要散架的感觉。(3)当减速伞突然打开时,返回舱会受到一个很大的拉力,此时航天员要遭受数倍于体重的过载。同时,这时飞船会突然旋转、摆动,这种复合运动会使人感觉非常难受。(4)最后一关就是着陆冲击。尽管经过降落伞减速后,返回舱的着陆速度会很低,但是,质量超过3 t的返回舱着陆的瞬间,航天员仍然会受到很大的冲击力。

#### 4 中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的经验体会

4.1 总结美国和原苏联载人航天航天员所发生的各种意外伤害十分必要 在世界载人航天42 a历史中,美国和原苏联取得了辉煌成就,但也付出22名航天员的生命代价<sup>[4]</sup>。其中地面模拟试验死亡1人(原苏联),地面试验死亡3人(美国),飞船起飞阶段死亡7人(美国),飞船返回阶段死亡11人(美国7人,原苏联4人)。由此可以看出,航天员重大的意外伤害事故主要发生在起飞前、起飞及着落阶段。在飞船发射、在轨运行和返回着陆过程中,可能会出现危及航天员健康的不同应急工况。总结载人航天航天员所发生的意外伤害,对载人航天飞行的安全保证是十分必要的。根据美国和原苏联载人航天航天员所发生的各种意外伤害,具体分析出我国载人航天航天员可能出现的严重伤情:(1)冲击过载:造成严重颅脑损伤、脊柱与脊髓损伤、胸外伤、腹腔重要脏器破裂大出血等。(2)有毒有害气体超标中毒(四氧化二氮、偏二甲基肼、无水肼等)、缺氧、严重烧伤。(3)各种原因造成的呼吸道梗阻、心跳呼吸停止。(4)减压病。(5)高温、低温伤。(6)严重多发伤、复合伤致MODS等。并据此作好各种急救准备工作有重要意义。

4.2 多方位进行立体防治 主着陆场航天员医疗保障及救护准备工作,事关航天员的生命安危和整个任务的成败,责任十分重大。按照载人航天着陆特点和需要,立足最复杂伤情,从严设计每个细节。既考虑了抽组人员的业务和身体素质,又考虑了医疗救护程序和临时处置能力;既考虑了设备、药品、物资的配备基数,又考虑了持续保障水平。反复论证、修改,形成了航天员医疗救护组织指挥保障、发射前医学检查、应急返回、着陆现场、后送途中、后支医院院内医疗救护、医疗交接、医监医保医疗救护演练等8个方案。主着陆场医监医保医疗救护队配备了载人航天医疗救护车、医疗救护直升机,全套高级便携式急救设备。作到一备、二齐、三查、四落实。同时装备了小型和高机动性的后送抢救工具、急救设备等。本次组建的内蒙古主着陆场医疗救护队是有各个专业的专家组成,9人中8人具有高级职称,人员精干。航天员医疗保障及救护系统分为机载和车载二个平台,医疗救护直升机(5人)及航天医疗救护车(4人),一旦航天员出现意外伤害,这二个平台就可以体现“立体救护、快速反应”的救治原则。我们对医疗救护的药品、器械、

装备进行了长达几个月的准备,配备了目前市场上先进的品种,全套高级便携式特种医学急救设备,设想可以应付各种复杂情况的预案,同时还完成空降兵航天专用急救包的研制工作,填补了我国在这一领域的空白。还完成了载人航天航天员专用急救箱的改装工作。

4.3 医疗救护培训、训练和演练十分重要 鉴于航天员医疗救护工作的复杂性和意外伤害的突发性,我们制定了载人航天航天员伤病救治规则,编写航天员医疗救护培训教材<sup>[6]</sup>,921工程第5次飞行试验航天员医疗救护演练实施细则,现场应急医疗救护处置程序、航天员后送程序和标准、航天员后支医院医疗救护程序等。结合救护特点,重点抓了自训、集中培训和救护演练工作。通过组织医疗救护知识和技能自训,举办了航天员医疗救护培训班,系统学习了相关知识。同时在主着陆场区组织了航天员医疗救护综合演练,并进行了效果评估。培训和演练从实战出发,注重了实际效果。还规范了医疗救护记录,制定了航天员现场救治记录、航天员停机坪救治记录、航天员急诊室救治记录等8种医疗救护记录单。进一步强化定岗定位和岗位责任制,加强岗位技术、野外救治适应能力和应变能力训练。三是做好车载、机载医疗设备调试和检修工作,确保医疗装备野外机动适应性、稳定性和可靠性;对后支医院医疗设备进行检修、调试,确保状态性能良好。真正达到“拉得出、展得开、救得快、治得好”的保障要求<sup>[9]</sup>。

4.4 应用高新技术和理论服务于载人航天航天员的医疗保障及救护是可行的 采用高新技术、新的急救理论,为航天员返回着陆的医疗救护服务。如航天员非正常着陆的搜寻、个人信息载体、生理指标、航天舱室有害气体浓度、航天员状态等参数,通过携带、发送、接收的高技术在线监测装置,建立立体交叉的卫勤指挥救援系统为中心的高技术平台。首飞航天员杨利伟从15日早晨进入飞船船舱,到发射前,从9时发射升空,到安全返回,杨利伟的平均心率每分钟为70多次,没有出现急性适应期反应,也没有发生运动病。在飞船飞行的第一圈,杨利伟曾有过短暂的上下倒置错觉,但他很快就调整了过来。这个高技术平台在我国首次载人航天飞行任务中状态良好。历时十载对航天毒理学的科研保证了航天员安全<sup>[10-11]</sup>。此次“神舟”五号发射过程中,几百套安全方案无一启动,创下了零缺陷的记录,为航天事业下一步建立空间站等新课题打下了“软件”基础。

4.5 把多年在临床上危重病急救领域的研究成果应用于首飞航天员的医疗保障及救护 解放军第306医院长期以来一直致力于危重病急救的理论研究和临床救治,于1982年就组建了全军第一个外科ICU病房,1987年出版我国第一部ICU专著《危重病急救与监测》,对MODS的基础与临床救治进行了22年的研究<sup>[12-16]</sup>,是国内第一个在南太平洋的大风浪中成功地进行外科手术的单元,是全军派出赴基地参加重大特发事件意外伤害临床一线救治最多专家的单位之一,首创“四大一支持”

综合冲击疗法, 挽救了一大批危重患者的生命<sup>[17-19]</sup>, 2001-08/29 又创建了我国第一个中西医结合的既能临床一线抢救、手术, 又能针对特种医学危重病难题进行科研的特种医学中心、特种病科。主要研究航天员的医疗保障及救护, 这些基础将为意外情况下航天员的安全起到重要作用。此次主着陆场医疗救护队创新性地把一个高质量的 ICU 加强医疗病房全气候前移至草原上、沙漠里, 可以确保意外情况下航天员的安全。达到了反应速度第一; 技术装备第一。把多年在临床上危重病急救领域的研究成果应用于首飞航天员的医疗保障及救护, 圆满完成了首飞航天员的医疗保障及救护任务。从我国载人航天首飞航天员主着陆场的医疗保障及救治验证了我们提出的“立体救护、快速反应”、“医疗与伤员同在”、“必要时可将一个高质量的 ICU 加强医疗病房全气候前移至草原上、沙漠里, 在现场对伤员进行决定性的治疗”的理论是可行的。另外这项经验还可以提示我们, 建立一些设备优良、机动性好、有综合救治能力的精干的应急医疗队, 在灾害事故发生的现场, 可以及时对病情进行包括简单手术在内的决定性治疗。这种策略有可能改善预后, 降低灾害现场危重伤员的死亡率。

载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求。航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应, 立体救护”的理念。载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用, 他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可着落实施救护。这对返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护十分有利, 能保障航天员安全, 圆满完成载人航天任务。

## 5 参考文献

- 1 Yue MX, Zou DW, Min QW, Yang SZ, Zhang J, Liu ZG, Cui SJ, Fang WW, Zhou XF, Gao TS, Hua N. Experience in first-aid for first Chinese astronaut in landing site proves the feasibility of new concept emergency treatment. *Zhonghua Jizhen Yixue Zazhi* 2004;13:7-9
- 2 Yue MX, Zou DW, Min QW, Yang SZ, Zhang J, Liu ZG, Cui SJ, Fang WW, Zhou XF, Gao TS, Hua N. Medical support and rescue for the first Chinese astronaut in the landing place. *Zhonghua Hangkong Hangtian Yixue Zazhi* 2003;14:193-195
- 3 岳茂兴, 邹德威, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 对我国首次载人航天航天员医疗保障及救护措施的探讨. *中国危重病急救医学杂志* 2003;15:710-714
- 4 岳茂兴. 载人航天航天员可能发生的意外伤害及其防治对策. *总装备部医学学报* 2003;5:561-563
- 5 岳茂兴, 杨志焕, 魏荣贵, 马华松, 夏亚东, 黄韶清. 爆炸致冲烧毒复合伤的特点和紧急救治. *创伤外科杂志* 2003;5:236-239
- 6 岳茂兴. 现代特种战伤特点及其对策. *人民军医* 2003;46:3-4
- 7 岳茂兴. 爆炸致复合伤的基本特点和初期急救原则及抢救程序. *中国急救医学杂志* 2002;22:146-149
- 8 岳茂兴. 载人航天工程医疗救护实用知识概论. 第3篇. 临床医学知识. 北京: 解放军出版社, 2003:147-390
- 9 杨善芝, 孙联众, 张宝真. 载人航天若干毒理学问题的新思考. *卫生毒理学杂志* 2001;15(3增刊):3-4
- 10 梁宏, 贡司光. 航天毒理学面临的挑战及其对策. *中华航空航天医学杂志* 2001;12:126-128
- 11 余秉良. 国外载人航天座舱空气化学污染与对策. *中国航天* 1998;7:24-26
- 12 岳茂兴. 腹部外科疾病并发 MODS 时的临床. *世界华人消化杂志* 2002;10:456-458
- 13 岳茂兴. 胃肠道功能障碍及衰竭的诊断和治疗. *世界华人消化杂志* 2002;10:3-6
- 14 岳茂兴, 李成林, 赵尔增, 李新元, 李学彪, 冯凯, 张诗琳, 薛亮, 张连春, 罗放, 王新明, 张圭显. 山莨菪碱及地塞米松对 MODS 时微循环及免疫病理学改变的实验研究. *中华外科杂志* 1997;35:392-396
- 15 Yue MX. A new combined therapy to 15 patients with multiple organ failure in abdominal-surgery. *China Natl J New Gastroenrol* 1996;2:6-8
- 16 岳茂兴, 李成林, 杨鹤鸣, 李建忠, 李新元, 赵尔增. 山莨菪碱联用地塞米松治疗多器官功能障碍综合征机制的研究. *中国危重病急救医学* 2000;12:341-343
- 17 岳茂兴. “四大一支持”综合疗法在救治腹部外科疾病并发多器官功能衰竭病人时的临床应用(附 15 例报告). *中国危重病急救医学杂志* 1996;8:168
- 18 岳茂兴. “四大一支持”综合冲击疗法在腹部外科疾病并发 MODS 时的临床应用. *伤残医学杂志* 2003;11:5-8
- 19 岳茂兴. 山莨菪碱和地塞米松联用治疗 MODS 的多中心临床试验研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1566-1568

## World Journal of Gastroenterology 发行

《World Journal of Gastroenterology, WJG》2003 年印刷版共发行 973 份, 其中国内邮局征订 168 份, 分布在 27 个省市自治区; 国外发行 105 份, 分布在 56 个国家和地区; 向承担国家 973 和 863 及国家自然科学基金项目负责人赠送 700 份。让更多的国际胃肠病学和肝病专家阅读和使用 WJG 发表的具有我国特色及国际先进水平的学术论文, WJG 向美国胃肠病学会会员, 美国肝病学会会员, 美国癌症研究会会员免费提供每期的全文电子版, 目前每期电子版的发行量已达 21200 份。



# 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

许 玲, 魏品康, 陈亚琳, 苏晓妹, 秦志丰, 施 俊, 李 峻, 何 金

许玲, 魏品康, 陈亚琳, 苏晓妹, 秦志丰, 施俊, 李峻, 何金, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院中医科 上海市 200003  
军队新药基金资助项目, No. 2000b06  
项目负责人: 许玲, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院中医科. czzk@smmu.edu.cn  
电话: 021-63610109-73403  
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-29

## Xiaotansanjie recipe inhibits growth and metastasis of human gastric adenocarcinoma cell SGC-7901 transplanted in nude mouse

Ling Xu, Pin-Kang Wei, Ya-Lin Chen, Xiao-Mei Su, Zhi-Feng Qin, Jun Shi, Jun Li, Jin He

Ling Xu, Pin-Kang Wei, Ya-Lin Chen, Xiao-Mei Su, Zhi-Feng Qin, Jun Shi, Jun Li, Jin He, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China  
Supported by New Drug R and D Fund of the PLA, No. 2000b06  
Correspondence to: Dr. Ling Xu, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, 415 Fengyang Road, Shanghai 200003, China. czzk@smmu.edu.cn  
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-29

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of the Xiaotansanjie recipe on the nude mouse model of human gastric carcinoma cells using orthotopic transplantation.

**METHODS:** Firstly we established the metastatic gastric carcinoma model of nude mice by orthotopic implantation. On the second day they were divided into four groups at random. The inhibitory rates of tumour growth were detected, and local invasiveness, the rates of metastasis in the local lymph node, lung, liver and peritoneum were compared between different groups. By Envision immunohistochemical method and semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction, the expression of P21ras, P185, Ras, CerbB<sub>2</sub>, VEGF and KDR in gastric carcinoma were determined.

**RESULTS:** The inhibitory rates of Xiaotansanjie recipe group, 5-Fu group and combined group were 72.0%, 51.3% and 70.1% respectively. Compared with the control group, the rates of local invasiveness, metastasis in the lymph node and distal organs in other three groups were significantly lower ( $P < 0.05$ ). The positive rate of P21ras, P185, Ras, CerbB<sub>2</sub>, VEGF and KDR in Xiaotansanjie recipe group obviously lower than those in control group ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Xiao Recipe has a strong inhibitory effect on both growth and metastasis of gastric cancer, and the

mechanism of that may related with the reduced expression of oncogene cerbB<sub>2</sub>, ras, VEGF and KDR.

Xu L, Wei PK, Chen YL, Su XM, Qin ZF, Shi J, Li J, He J. Xiaotansanjie recipe inhibits growth and metastasis of human gastric adenocarcinoma cell SGC-7901 transplanted in nude mouse. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1015-1020

## 摘要

**目的:** 研究中药消痰散结方对裸鼠原位移植人胃癌生长转移的抑制作用。

**方法:** 建立裸鼠原位移植人胃癌模型; 实验分组: 对照组、中药组、化疗组、联合组各 10 只; 观察和比较各组肿瘤抑制率和肿瘤转移情况。用免疫组化法定性分析和比较肿瘤转移相关指标 P21 ras, P185, VEGF 蛋白, KDR 蛋白的表达, 用 RT-PCR 法定量分析和比较各组 ras, cerbB<sub>2</sub>, VEGF, KDR 的表达。

**结果:** 中药组、化疗组和联合组的抑瘤率分别为 72.0%、51.3%、70.1%; 在远处淋巴结转移率和脏器转移率方面, 与对照组相比, 中药组、化疗组和联合组均减少了转移的发生, 有显著性差异( $P < 0.05$ )。中药组、化疗组、联合组在不同程度上下调了 ras, cerbB<sub>2</sub>, VEGF 和 KDR 在蛋白水平和 mRNA 水平的表达。

**结论:** 消痰散结方具有抑制裸鼠原位移植人胃癌生长和转移的作用, 其作用机制可能与下调了肿瘤转移相关基因 ras, cerbB<sub>2</sub>, VEGF, KDR 的表达有关。

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(5):1015-1020

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1015.asp>

## 0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-6]</sup>, 早诊率低、手术切除率低、5 a 生存率低。探寻有效的综合治疗措施是提高肿瘤患者生活质量、延长生存期的重要途径<sup>[7-9]</sup>。中医认为, 肿瘤的产生主要由于脏腑、阴阳、气血失调, 在正虚的基础上, 外邪入侵, 或痰、湿、气、瘀等搏结日久, 积滞而成。我们在临床实践中发现胃癌的形态多为肿块, 与痰结局部而形成的痰核相似, 而且胃癌浸润转移与“痰”的特性颇相似。“痰”是胃癌形成和发展

的重要病理物质, 消痰散结方联合化疗治疗晚期胃癌104例改善症状有效率为82.9%, 卡氏评分提高率为84.4%, 中位生存期为12.25 mo, 3 a生存率为22.1%. 因此, 我们建立裸鼠人胃癌原位移植模型, 研究消痰散结方的作用如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c无胸腺裸鼠40只, 6周龄, 雌雄各半, 质量18-20 g, 传代于裸鼠皮下的人胃癌组织SGC-7901由中国医学科学院上海实验动物中心提供, 在该中心SPF级动物实验室内饲养. 第2批实验采用上述动物48只. 消痰散结方: 天南星15 g, 半夏15 g, 茯苓15 g, 枳实10 g, 陈皮9 g, 鸡内金15 g, 炙甘草6 g, 全蝎6 g, 蜈蚣3条, 川贝9 g, 白芥子9 g组成, 以常规方法水煮醇澄制备成针剂, 含生药2.5 kg/L备用(由第二军医大学附属长征医院制剂中心提供). 均购自上海市药材公司, 地道药材, 产地明确, 经第二军医大学药学院生药教研室鉴定. 5-FU 250 mg/支, 氯胺酮100 mg/支, 上海旭东海普药业有限公司出品. 兔抗人cerbB2(P185)一抗, 稀释度: 1:200.

鼠抗人p21ras一抗: 稀释度: 1:60, Envision试剂(二抗), 丹麦Dako公司.

鼠抗人VEGF蛋白一抗: 浓缩型抗体, 1:50稀释, 购自美国Oncogene公司. 鼠抗人KDR蛋白一抗: 浓缩型抗体, 1:50稀释, 购自福州迈新生物技术开发公司. 100 g/L多聚赖氨酸: Sigma公司提供. Trizol, 由美国Invitrogen公司提供. Amv Rtase, RNase Inhibitor和PCR试剂盒, 由TaKaRa公司提供.

1.2 方法 取传代后14 d处于对数生长期的荷瘤鼠, 从腋部皮下剥取肿瘤组织, 剪成1 mm × 1 mm × 1 mm小块备用. 实验动物禁食12 h, 用氯胺酮50 mg/kg ip麻醉后, 常规手术, 在胃大弯处近胃窦旁用1 mL无菌空针头划破胃壁浆肌层, 用无齿镊将破损处向内推压, 使局部胃壁形成凹窝, 植入1块瘤组织于凹内, 并在瘤块表面滴OB生物胶1滴, 40 s凝固后将胃壁回纳入腹腔, 0号丝线缝合腹膜及皮肤, 关腹. 定时观察所有模型鼠全身状况、运动情况、腹部体征. 当荷瘤鼠出现明显消瘦、弓背、精神萎靡等衰竭体征时(约12 wk), 处死动物, 观察原位肿瘤生长情况, 全面探查腹腔, 取肿大淋巴结、胸腔、腹腔内脏器以40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋、切片, HE染色, 作组织病理学检查. 收取腹水. 取部分移植瘤组织, 放培养液中, 剪成小于1 mm × 1 mm的小块, 培养液洗涤2次; 将组织小块植入培养瓶内, 置37 °C恒温箱中, 贴壁; 加培养液平置于37 °C的CO<sub>2</sub>孵箱中; 培养4 d后, 在倒置显微镜下, 组织小块周围可见到新的细胞样生长物出现, 待肿瘤细胞生长旺盛, 并长满成单层时即可进行第1次传代后收获制作染色体标本. 加入秋水仙素37 °C温育处理3 h, 加固定液后, 离心, 加低渗液处理(反复3次), 加数滴新固定液,

轻弹离心管底使细胞成混悬液后, 冰湿片滴片, 空气干燥后Giemsa染色12 min, 封片, 显微摄影.

1.2.1 动物实验 第1次实验动物随机分为对照组、中药组、化疗组和联合组, 每组10只, 于模型建立24 h后开始给药. 对照组给予生理盐水, 每次0.2 mL, ip, 1次/d, 连续给药3 wk; 中药组给予消痰散结方, 每次0.2 mL, ip, 1次/d, 连续给药3 wk; 化疗组给予5-FU, 以生理盐水稀释成6 g/L, 每次0.2 mL, 60 mg/kg, ip, 1 wk/次, 共给药3 wk; 联合组同时给予中药组及化疗组的治疗方案. 第2次实验动物共48只, 分组同上, 每组12只, 用药方法同上.

1.2.2 P21ras, P185, VEGF和KDR蛋白染色 操作按照Envision试剂盒说明书进行, 以PBS为一抗设阴性对照, 以丹麦Dako公司提供的阳性切片为阳性对照. 阳性部位呈棕褐色, 染色分布不均匀, 强度有差别. 以任意5个阳性区域高倍镜视野中阳性细胞所占百分比作为评定依据. 0-5%为阴性(-), 5-25%为弱阳性(+), 25-50%为中度阳性(++), 50%以上为强阳性(+++).

1.2.3 RT-PCR检测 根据文献合成ras, cerbB<sub>2</sub>癌基因RT-PCR引物(由上海博亚生物制品公司合成). ras基因引物序列: 正义链: 5' -ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA-3'; 反义链: 5' -TGT CTT GTC TTT GCT GAT GTT TCA-3' (扩增片段长449 bp). cerbB<sub>2</sub>基因引物序列: 正义链: 5' -GAA GGT GAA GGT GCT TGG ATC TGG-3'; 反义链: 5' -TAG CTC ATC CCC TTG GCA ATC TGC-3' (扩增片段长341 bp). VEGF引物序列为: 正义链: 5' -TGC CTT GCT GCT CTA CCT CC-3', 反义链: 5' -TCA CCG CCT CGG CTT GTC AC-3' (扩增片段VEGF121、165分别为540、410 bp). KDR引物序列为: 正义链: 5' -TAC CGG GAA ACT GAC TTG GCC T-3' 反义链: 5' -TCA GTT CTT GCT GTA CAA TTT A-3' (扩增片段为440 bp). 人β-肌动蛋白(β-actin)作为内参照, 特异性扩增片段分别为660, 443和310 bp. 用一步快速热酚法<sup>[3]</sup>提取裸鼠原位移植瘤组织的总RNA, 紫外分光光度计定量并计算A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比值, 计算RNA的纯度及完整性. 参照逆转录聚合酶链反应试剂盒说明书逆转录合成ras, cerbB<sub>2</sub>, VEGF, KDR及β-actin的cDNA. 在每一反应管中加样本cDNA 1 μL, 10 × Buffer(缓冲液)(Mg<sup>2+</sup> free) 2.5 μL, dNTP 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> 1.7 μL, 各引物正义链、反义链各0.5 μL, Tag酶1 μL (5 mu/L), dd H<sub>2</sub>O 14.3 μL, 反应体系共25 μL, 经95 °C变性, 5 min; 95 °C变性40 s, 55 °C退火40 s, 72 °C延伸1 min, 扩增30个循环; 再72 °C延伸, 10 min, 6 °C保存, 2 min. PCR扩增产物行2 g/L琼脂糖凝胶电泳, 电压80 v, 30 min, EB染色显示特异性扩增产物, 以LD 2 000 DNA电泳Marker(外参照)作为分子质量参照, 在紫外灯下观察、摄片. 用Gis凝胶影像处理系统(上海天能科技有限公司)进行电泳道的纵向扫描, 根据每一泳道内各区带对光的吸收, 求ras, cerbB<sub>2</sub>,



VEGF, KDR 与  $\beta$ -actin 带的比值, 加以统计分析.

2 结果

2.1 淋巴结及脏器转移 第 1 次动物实验 4 组共 40 只裸鼠, 术后第 3 d 死亡 5 只(表 1). 第 2 次动物实验裸鼠共 48 只, 每组 12 只, 各组抑瘤率为: 化疗组 49.3%, 中

药组 72.0%, 联合组 75.0%. 淋巴结转移和肝转移的发生率与第 1 次实验结果相近.

2.2 P21ras 及 P185 两种癌基因蛋白表达 消痰散结方对人胃癌 SGC-7901 组织中 P21ras 及 P185 两种癌基因蛋白的表达有明显的下调作用(表 2, 图 1-4).

扩增的 ras、cerbB<sub>2</sub> 基因片段在各组的阳性表达(见

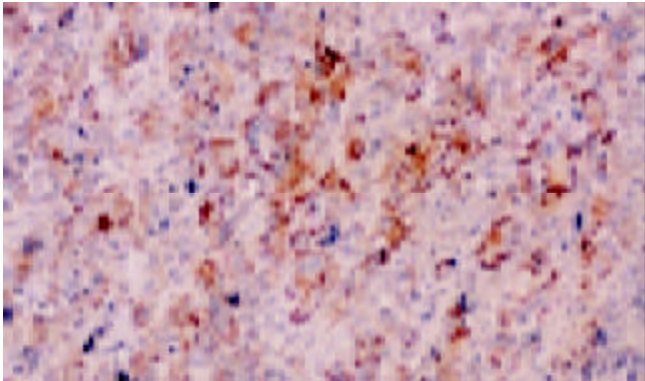


图 1 对照组 P185 蛋白表达情况

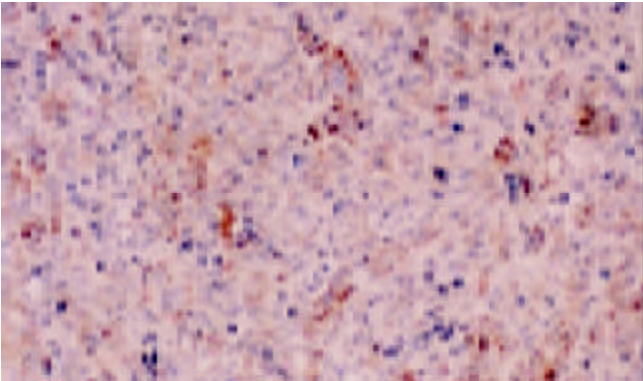


图 2 中药组 P185 蛋白表达情况

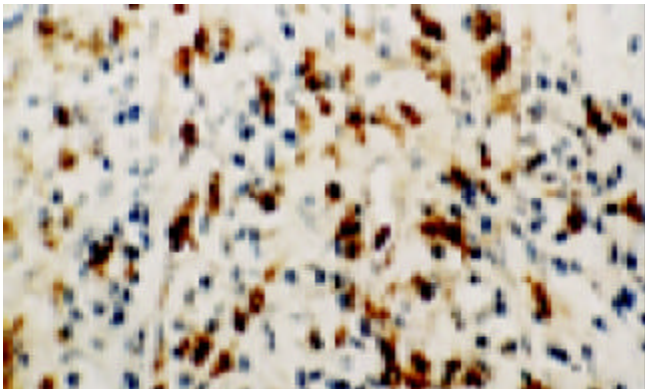


图 3 对照组 P21ras 蛋白表达情况

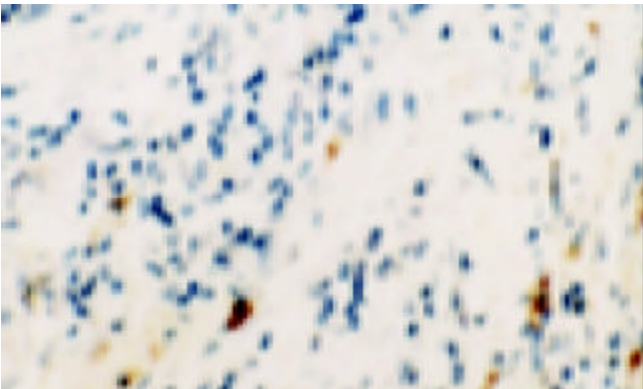


图 4 中药组 P21ras 蛋白表达情况

表 1 胃原位移植瘤质量、抑瘤率及局部浸润转移(*n*)

分组	<i>n</i>	瘤重(g)	抑瘤率(%)	局部浸润	近淋巴结	远淋巴结	肺脏	肝脏	脾脏
对照组	10	2.3 ± 0.8		10	10	9	7	7	6
化疗组	8	1.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	51.3	7	7	4	3	3	5
中药组	9	0.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	72.0	8	7	5	3	4	5
联合组	8	0.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	70.1	8	6	5	4	4	5

<sup>a</sup>*P* <0.05, vs 对照组.

表 2 鼠原位移植瘤组织中两种癌基因蛋白表达的阳性强度

分组	<i>n</i>	P21ras				P185					
		-	+	++	+++	-	+	++	+++		
对照组	50	24	8	12	6	26 (52.0)	22	8	14	6	28 (56.0)
化疗组	40	29	4	5	2	11 (27.5) <sup>a</sup>	28	3	6	3	12 (30.0) <sup>a</sup>
中药组	45	33	4	6	2	12 (26.7) <sup>a</sup>	31	4	7	3	14 (31.1) <sup>a</sup>
联合组	40	28	3	7	2	12 (30.0) <sup>a</sup>	29	3	5	3	11 (27.5) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P* <0.05, vs 对照组.

表3, 图5-6).

表3 ras cerbB<sub>2</sub> 基因片段在各组的阳性表达情况(mean±SD)

分组	n	ras/β-actin	cerbB <sub>2</sub> /β-actin
对照组	10	1.11 ± 0.21	0.59 ± 0.11
中药组	9	0.26 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>a</sup>
化疗组	8	0.74 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>ad</sup>
联合组	8	0.31 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.11 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, vs 对照组; <sup>d</sup>P < 0.01, vs 中药组.

ras 扩增产物电泳条带(见图5).

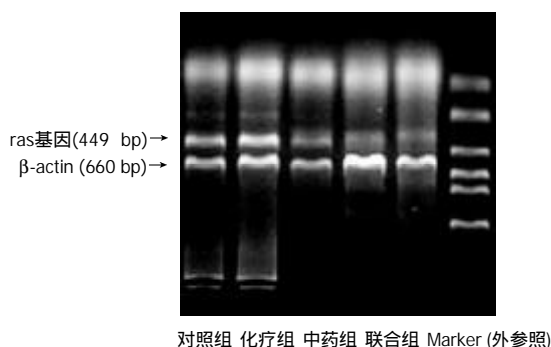


图5 鼠胃癌组织中 ras mRNA 的表达.

cerbB<sub>2</sub> 扩增产物电泳条带(见图6).

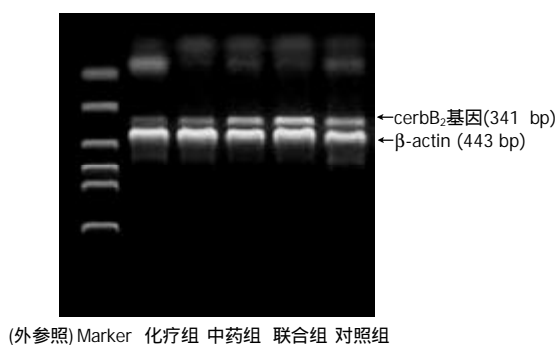


图6 鼠胃癌组织中 cerbB<sub>2</sub> mRNA 的表达.

2.3 VEGF 及其受体 KDR 及其 mRNA 表达 消痰散结方人胃癌 SGC-7901 组织中血管内皮细胞生长因子 VEGF 及其受体 KDR 的表达有下调作用(表4, 图7-10).

表4 胃癌组织中 VEGF 及其 KDR 的表达(60, mean±SD)

分组	VEGF		KDR	
	阴性	阳性率(%)	阴性	阳性率(%)
对照组	9	51 (85.0)	17	43 (71.7)
化疗组	26	34 (56.7) <sup>b</sup>	29	31 (51.7) <sup>b</sup>
中药组	43	17 (28.3) <sup>bd</sup>	46	14 (23.3) <sup>bd</sup>
联合组	46	14 (23.3) <sup>bd</sup>	48	12 (20.0) <sup>bd</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01, vs 对照组; <sup>d</sup>P < 0.01, vs 化疗组.

血管内皮细胞生长因子 VEGF 及其受体 KDR 在各组 mRNA 的表达(见表5, 图11-12).

表5 各组胃癌组织中 VEGF、KDR mRNA 表达的比较(与 β-actin 的比值)

分组	VEGF121	VEGF165	KDR
对照组	0.615 ± 0.002	0.673 ± 0.003	0.455 ± 0.005
化疗组	0.579 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.630 ± 0.003 <sup>b</sup>	0.429 ± 0.004 <sup>b</sup>
中药组	0.450 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.522 ± 0.002 <sup>bd</sup>	0.406 ± 0.003 <sup>bd</sup>
联合组	0.448 ± 0.004 <sup>bd</sup>	0.520 ± 0.003 <sup>bd</sup>	0.402 ± 0.003 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01, vs 对照组; <sup>d</sup>P < 0.01, vs 化疗组.

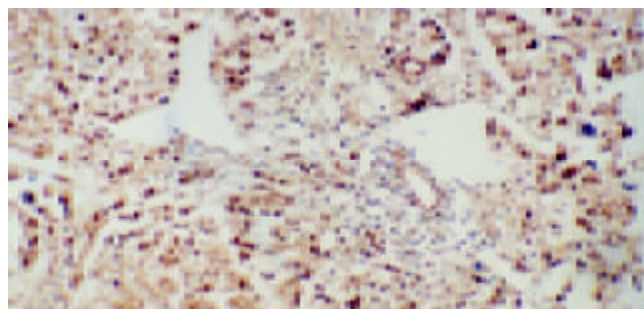


图7 对照组 VEGF 蛋白表达.

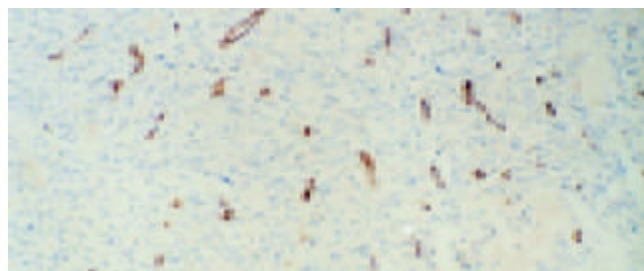


图8 中药组 VEGF 蛋白表达.

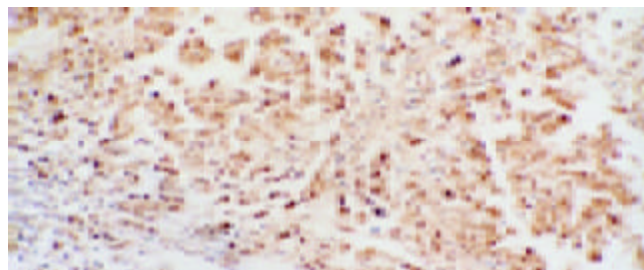


图9 对照组 KDR 蛋白的表达.

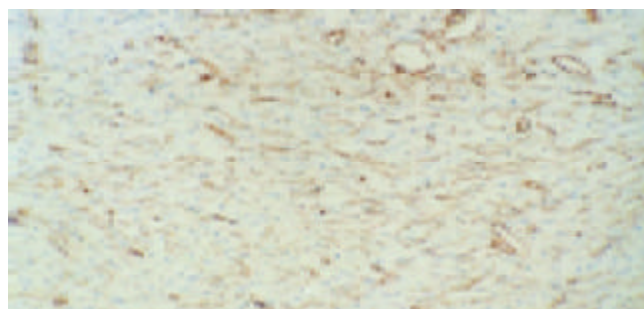


图10 中药组 KDR 蛋白的表达.

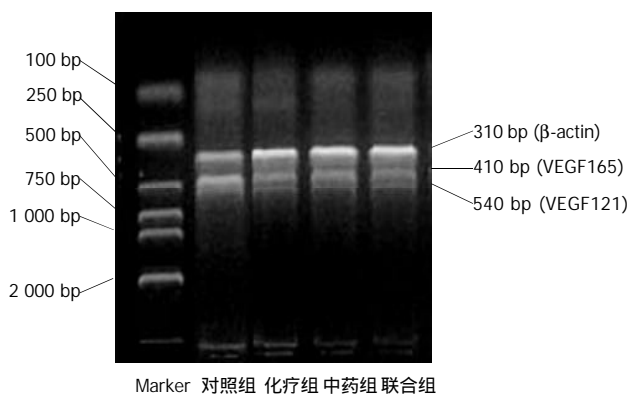


图 11 鼠胃癌组织中 VEGF mRNA 的表达.

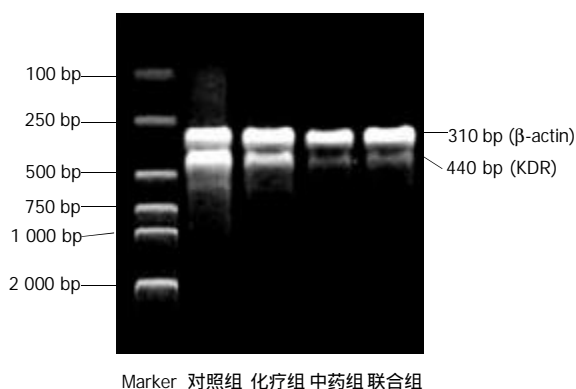


图 12 鼠胃癌组织中 KDR mRNA 的表达.

### 3 讨论

祖国医学胃癌主要归属于“噎膈”、“反胃”、“胃脘痛”等范畴。现代药理实验研究发现消痰中药半夏、天南星具有抗癌作用<sup>[10-11]</sup>, 消痰散结方是在消痰名方“导痰汤”的基础上化裁的, 生南星、生半夏为君药燥痰化湿, 消肿散结; 茯苓臣药, 健脾渗湿以制脾之生痰之源; 枳实、陈皮为佐药行气化湿。方中生南星、生半夏具有消肿散结作用, 但南星、半夏力量尚嫌不足, 因为痰浊所致的肿瘤可上达巅顶, 下至涌泉, 流窜脏腑经络, 尚缺乏穿透络脉、化痰开结之力, 故消痰散结方还应用了全蝎、蜈蚣、川贝、白芥子、鸡内金等, 《玉楸药解》说全蝎能“穿筋透骨、逐湿除风”, 具有以毒攻毒, 解毒散结, 消肿止痛的功效。《医学衷中参西录》则认为蜈蚣走窜之力最速, 内而脏腑, 外而经络, 凡气血凝聚之处皆能开之, 性微毒, 而专善解毒, 凡一切疮疡诸能消之。全蝎、蜈蚣常相须配伍治疗癰瘤肿块。消痰散结方以生南星、生半夏燥湿化痰为君药, 伍以全蝎、蜈蚣通络消痰, 解毒散结以加强抑瘤作用也为君药。再以利气豁痰的白芥子协助祛除阻于经络之痰湿, 川贝清热化痰, 托毒散结, 茯苓健脾渗湿, 三药共为臣药起协同增效作用。《本草再新》言鸡内金能“化痰、理气、利湿”, 在方中既能化痰, 又能健脾助运, 助药、食吸收, 与枳实、陈皮行气利湿共为佐药, 甘草为使药调和诸药, 起到消痰散结, 抗肿瘤转移的作用。

在胃大弯血管分布稠密处用空针头划破浆肌层, 用无齿镊将破损处向内推压, 使局部胃壁形成凹窝, 植入 1 块直径约 1mm 的瘤组织块于凹内, 用 OB 生物胶 1-2 滴粘贴, 迅速凝固后即可关腹<sup>[12-14]</sup>。本实验发现给裸鼠作了上述处理后, 约 3-4 wk 左右, 模型鼠上腹可触及 0.1-0.4 cm 结节肿块, 8-10 wk 时肿块明显增大, 局部包块透壁可见, 直径约 1.0-1.9 cm 大小, 表面呈结节状, 质地较硬。发现裸鼠胃原位成瘤率 100%, 组织病理学检查发现, 多数荷瘤鼠出现肝、胰腺等远处脏器转移, 部分出现血性腹水。证明胃癌转移模型建立成功。关于 VEGF 与胃癌浸润、转移及预后的关系, 文献<sup>[15-27]</sup>报道较多。c-erbB2 基因增生和/或蛋白过度表达与胃癌恶性转化、胃癌发展有关<sup>[28-34]</sup>。我们观察到, 消痰散结方具有抑制裸鼠原位移植人胃癌生长的作用, 中药组和联合组的抑瘤率分别为 72.0% 和 70.1%, 达到了较好的抑瘤效果。同时, 消痰散结方还能减少肿瘤局部浸润、淋巴结转移、重要脏器如肺、肝、脾等的转移。其作用机制的研究发现消痰散结方组胃癌组织中的 VEGF, KDR, 癌基因 cerBb2, ras 无论在蛋白水平还是 mRNA 水平都有不同程度的下调。因此, 消痰散结方抑制肿瘤生长和转移的作用机制可能是多方面的, 消痰散结方可能是通过影响肿瘤新生血管的生成, 下调 VEGF 和 KDR 的表达, 通过降低肿瘤转移相关基因 cerBb2、ras 的表达而抑制了肿瘤转移的作用。

中医理论认为消痰可以影响痰的“易行”和“易聚”, 散结则可能有利于消除结块。而本研究已发现消痰散结可以下调肿瘤转移相关因素如 VEGF, KDR, cerBb2 和 ras。然而, “痰”、“结”是如何形成肿瘤, 他们与癌基因和肿瘤血管形成之间到底存在怎样的关系, 尚有待于进一步探讨。

### 4 参考文献

- 王春晖, 唐承薇. 奥曲肽抑制胃癌侵袭和转移的实验研究. 中华医学杂志 2002;82:19-22
- 王东旭, 房殿春, 刘为纹. 胃黏膜肠化及异型增生和胃癌组织中多基因异常. 世界华人消化杂志 2000;8:855-859
- 房静远. 胃癌发生中后生修饰的异常. 世界华人消化杂志 2002;10:749-752
- 吴云林, 陈颖. 早期胃癌的临床筛选研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1372-1375
- 刘占奎, 张超. TK 基因治疗胃肠道肿瘤的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1064-1067
- 沈波, 朱金水. 胃癌供血及其动脉介入化疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1425-1428
- 李海霞, 沈志祥, 谭诗云. 胃癌侵袭转移及预后的标志物. 世界华人消化杂志 2002;10:80-82
- 黄海力, 吴本伊, 尤经纬, 申明识. 进展期胃癌病理和预后影响因素的关系. 世界华人消化杂志 2003;11:1297-1301
- 熊训斌. 运用肿瘤发病及转归多元律对 2 例胃癌患者选择治疗方法与疗效观察. 世界华人消化杂志 2002;10:1113-1114
- 王锐, 倪京满, 马蓉. 中药半夏挥发油成分的研究. 中国药理学杂志 1995;30:457
- 赵付之, 匡建民, 钟华. 生半夏生胆南星为主治疗食管癌. 山东中医杂志 1999;18:546-547
- Illert B, Otto C, Thiede A, Timmermann W. Detection of disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer. Clin Exp Metastasis 2003;20:549-554



- 13 Illert B, Otto C, Braendlein S, Thiede A, Timmermann W. Optimization of a metastasizing human gastric cancer model in nude mice. *Microsurgery* 2003;23:508-512
- 14 Cui JH, Krueger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Orthotopic transplantation model of human gastrointestinal cancer and detection of micrometastases. *World J Gastroenterol* 2001;7:381-386
- 15 Takahashi A, Kono K, Ichihara F, Sugai H, Fujii H, Matsumoto Y. Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines. *Cancer Immunol Immunother* 2003 10 [Epub ahead of print]
- 16 Kitadai Y, Sasaki A, Ito M, Tanaka S, Oue N, Yasui W, Aihara M, Imagawa K, Haruma K, Chayama K. *Helicobacter pylori* infection influences expression of genes related to angiogenesis and invasion in human gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:809-814
- 17 Du JR, Jiang Y, Zhang YM, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:1604-1606
- 18 Huang SP, Wu MS, Wang HP, Yang CS, Kuo ML, Lin JT. Correlation between serum levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor in gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1165-1169
- 19 Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:591-595
- 20 Liu DH, Zhang XY, Fan DM, Huang YX, Zhang JS, Huang WQ, Zhang YQ, Huang QS, Ma WY, Chai YB, Jin M. Expression of vascular endothelial growth factor and its role in oncogenesis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:500-505
- 21 Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Sugimachi K. Overexpression of vascular endothelial growth factor C is related to lymphogenous metastasis in early gastric carcinoma. *Oncology* 2001;60:146-150
- 22 Kim YB, Han JY, Kim TS, Kim PS, Chu YC. Overexpression of c-H-ras p21 is correlated with vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in advanced gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1393-1399
- 23 Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:994-998
- 24 Ren J, Dong L, Xu CB, Pan BR. The role of KDR in the interactions between human gastric carcinoma cell and vascular endothelial cell. *World J Gastroenterol* 2002;8:596-601
- 25 张瑞芳, 蔡永葆, 黄伟良, 朱玉芳, 曾艳, 萧东, 袁胜涛, 丁健. 胃腺癌的血管内皮细胞生长因子和 KDR 受体的表达及其临床意义. *癌症* 2001;20:61-64
- 26 Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Baibas N, Polychronidis A, Simopoulos C, Karatzas G. Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colorectal cancer and the effect of tumor surgery. *Surgery* 2002;131:548-555
- 27 刘东屏, 王炳元, 姜若兰. 胃癌组织内血管内皮生长因子及其受体 Flt、KDR mRNA 的表达. *中华消化杂志* 2000;20:252-254
- 28 Abraham SC, Park SJ, Lee JH, Mugartegui L, Wu TT. Genetic alterations in gastric adenomas of intestinal and foveolar phenotypes. *Mod Pathol* 2003;16:786-795
- 29 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
- 30 Sowa M, Nakata B. Genome analyses for precancerous lesions in the gastrointestinal tract. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000;27:335-340
- 31 Kuraoka K, Matsumura S, Hamai Y, Nakachi K, Imai K, Matsusaki K, Oue N, Ito R, Nakayama H, Yasui W. A single nucleotide polymorphism in the transmembrane domain coding region of HER-2 is associated with development and malignant phenotype of gastric cancer. *Int J Cancer* 2003;107:593-596
- 32 Pinto-de-Sousa J, David L, Almeida R, Leitao D, Preto JR, Seixas M, Pimenta A. C-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma. *Int J Surg Pathol* 2002;10:247-256
- 33 Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest* 2001;19:554-568
- 34 Kono K, Naganuma H, Sekikawa T, Amemiya H, Takahashi A, Iizuka H, Matsumoto Y. Serum level of HER-2/neu in patients with gastric cancer: correlation with HER-2/neu overexpression in gastric carcinoma tissue. *Tumour Biol* 2000;21:139-144

## World Journal of Gastroenterology 荣誉

《World Journal of Gastroenterology, WJG》是我国自然科学核心期刊及全国优秀科技期刊, 荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊, 2001 年入选中国期刊方阵“双百”期刊. 2002-10-11 获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助(项目批准号: 30224801), 资助期限 2 年, 资助强度为每年 8 万元.

# 吲哚美辛和、或顺铂对胃癌细胞凋亡的影响

牛小平, 袁伟建, 张桂英

牛小平, 袁伟建, 张桂英, 中南大学附属湘雅医院消化科  
湖南省长沙市 410008  
牛小平, 女, 1975-05-05 生, 河南省洛阳市人, 中南大学附属湘雅医院消化科硕士研究生。  
湖南省教育厅重点学科建设基金, No. 2002(15)  
项目负责人: 袁伟建, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学附属湘雅医院消化科, ywj59@hotmail.com  
电话: 0731-4327106 传真: 0731-4327106  
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-29

## Effects of indomethacin and/or casplatin on apoptosis of gastric cancer cells

Xiao-Ping Niu, Wei-Jian Yuan, Gui-Ying Zhang

Xiao-Ping Niu, Wei-Jian Yuan, Gui-Ying Zhang, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China  
Supported by the Key-Subject Construction Fund of the Department of Education of Hunan Province, No.2002 (15)  
Correspondence to: Wei-Jian Yuan, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China. ywj59@hotmail.com  
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-29

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of indomethacin (IN) and casplatin (CDDP) on apoptosis of gastric cancer cell line MGC803 and to provide the theoretic basis for gastric cancer therapy.

**METHODS:** Gastric cancer MGC803 cells were treated with IN and /or CDDP. Proliferation of the cells was detected by using MTT assay. Apoptosis of cells was measured by using fluorescence staining, and cell cycle kinetics by flow cytometry.

**RESULTS:** Both IN and CDDP were able to restrain the proliferation and induce apoptosis of the cells. There was dose-dependent and time-dependent cell proliferation induced by IN. High concentration of CDDP (10 mg/L) had also the time-effect, but a low dose of CDDP (0.1, 1 mg/L) did not. The percentage of apoptotic cells did not changed after 24h incubation with a low dose of CDDP. There also existed good dose-dependent and time-dependent effects when every concentration of CDDP combined with moderate dose IN (200  $\mu$ mol/L). Low dose CDDP with IN had the similar effect to that of high dose CDDP alone.

**CONCLUSION:** IN and CDDP have the synergistic action when they work together on gastric cancer cell line MGC-803 and perhaps IN can antagonize the chemo-resistance of gastric cancer to other chemical drugs.

Niu XP, Yuan WJ, Zhang GY. Effects of indomethacin and/or casplatin on apoptosis of gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(5):1021-1024

## 摘要

**目的:** 探讨吲哚美辛(indomethacin, IN)、顺铂(cisplatin, CDDP)对胃癌细胞株 MGC803 凋亡的影响, 为寻求新的胃癌治疗策略提供理论依据。

**方法:** MGC803 细胞经 IN、CDDP 处理后, 用 MTT 法检测药物对细胞增生的抑制; 荧光染色检测细胞凋亡率; 流式细胞仪测定细胞周期。

**结果:** IN、CDDP 均可抑制 MGC803 细胞的增生、并诱导其凋亡; IN 对胃癌细胞系 MGC803 的作用有较强的量效和时效依赖关系; 高浓度的 CDDP (10 mg/L) 对此胃癌细胞系有较强的时效依赖关系, 而低浓度的 CDDP (0.1 mg/L, 1 mg/L) 在作用 24 h 后, 由于肿瘤细胞的耐药机制, 细胞凋亡率不再发生改变; 中等剂量 IN (200  $\mu$ mol/L) 加各种浓度 CDDP 对此胃癌细胞系也有较强的量效和时效依赖关系, 且加 IN 后, 低浓度的顺铂诱导凋亡作用接近于单独作用组高浓度顺铂的效用。

**结论:** 吲哚美辛与顺铂对胃癌细胞株 MGC803 有协同作用, IN 可能能够对抗胃癌对化疗药物的耐药。

牛小平, 袁伟建, 张桂英. 吲哚美辛和、或顺铂对胃癌细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1021-1024  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1021.asp>

## 0 引言

细胞凋亡是一种不同于坏死的生理性死亡方式, 他与胃癌的发生、发展以及对放化疗的敏感性密切相关<sup>[1-4]</sup>, 研究表明, 大多数化疗药物的主要作用机制在于诱导敏感靶细胞发生凋亡, 对化疗耐药的肿瘤细胞, 其耐药机制除了肿瘤细胞能过度表达 mdrl 编码的 P 糖蛋白增加药物排出外, 还在于能抵抗药物诱导的凋亡<sup>[5-11]</sup>. 近年来的研究表明, 非甾体抗炎药(NSAID)对恶性肿瘤尤其是消化系统肿瘤有较好的作用, 其可能机制: 抑制环氧化酶2(COX-2)、诱导细胞凋亡、抗血管生成等<sup>[12-19]</sup>. NSAID 对结直肠癌的防治从流行病学观察、动物实验及体外研究均已得到证实<sup>[20-22]</sup>, 而对于胃癌, 这方面的研究尚处于初始阶段. 诱导癌细胞凋亡是 NSAID 与细胞毒性药物抗肿瘤共有的作用机制, 二者联合应用可能具有协同作用, 这一点已有人在肝细胞癌的动物实验中得到证实<sup>[23]</sup>. 我们通过 MTT、流式细胞仪、荧光染色等方法, 观察吲哚美辛(IN)、顺铂(CDDP)在体外对胃癌细

胞株 MGC-803 凋亡的影响, 并探讨其可能作用机制, 为寻求新的胃癌治疗策略提供试验室依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞系 MGC803 购自湘雅医学院细胞中心; 主要试剂: RPMI1640 培养液(GibcoBRL 公司), 小牛血清(杭州四季青公司), 噻唑蓝(MTT, Sigma), 溴乙定(EB, Sigma),  $\gamma$  吡啶橙(AO, Sigma), 顺铂(山东齐鲁制药厂, 培养基溶), 吡咯美辛(Sigma, 二甲基亚砜溶, 培养基稀释)

1.2 方法 MGC803 培养于含 100 mL/L 灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 置 37 °C, 50 mL/L 的 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

1.2.1 药物对细胞增生的影响 以  $5 \times 10^3$ /孔接种 MGC803 细胞于 96 孔培养板, 每孔设 3 个复孔, 与终浓度分别为 CDDP 0.1, 1.0, 10.0 mg/L; IN(1)50, 100, 200  $\mu$ mol/L; 中等剂量 IN (200  $\mu$ mol/L) + 上述各种浓度 CDDP(空白对照: 培养基加生理盐水, 试验对照: MGC803 细胞加生理盐水)。分别共同孵育 12, 24, 48, 72 h 后, 每孔加 20  $\mu$ L 的 MTT, 继续培养 4 h, 弃上清, 加 150  $\mu$ L 二甲基亚砜(DMSO)使 MTT 结晶完全溶解, 酶联免疫检测分析仪测定 570 nm 处的吸光度 A 值(A<sub>570nm</sub>), 并计算该浓度下的抑制率 = [(对照组 A<sub>570nm</sub> - 试验组 A<sub>570nm</sub>) / 对照组 A<sub>570nm</sub>]  $\times$  100%, 根据回归计算各组半抑制浓度。

1.2.2 药物对细胞周期的影响 将终浓度分别为 CDDP 0.1, 1.0 mg/L, 10.0 mg/L; IN50, 100, 200  $\mu$ mol/L, 与 MGC803 细胞共同作用 48 h 后, 常规消化细胞, 离心, PBS 洗 2 次, 每管加入 700 mL/L 的冰乙醇 1-1.5 mL, 使每个样品含细胞数至少  $10^6$  个, -20 °C 固定 3 d 后, 经流式细胞仪测定细胞周期中不同时相的细胞数。

1.2.3 药物对细胞凋亡的作用 将细胞与终浓度分别为 CDDP0.1, 1, 10.0 mg/L; IN50, 100, 200  $\mu$ mol/L; IN(200  $\mu$ mol/L) + 上述各浓度的 CDDP 组分别作用 12, 24, 48 h, 将各组细胞全部收集离心, 弃上清加入 PBS 洗 3 次, 分别制成细胞悬液, 加入终浓度均为 100 mg/L 的 AO, EB, 充分混匀, 滴于玻片上, 分别计数至少 200 个细胞的凋亡比率。早期凋亡细胞核染色质着绿色, 呈固缩状或圆珠状。晚期凋亡细胞核染色质着桔红色, 呈固缩状或破裂状。坏死细胞核染色质着桔红色, 呈正常细胞结构。活细胞核染色质着绿色, 呈正常细胞结构<sup>[24]</sup>。

## 2 结果

2.1 药物对胃癌细胞增生的影响 MTT 法测定各组药物对 MGC803 细胞株抑制作用, 并绘制时效依赖曲线。各浓度 IN 对胃癌细胞株 MGC803 的作用具有时间依赖性, 随着时间的延长, 吸光值减少, 表明活细胞数减少, 细胞增生受抑(图 1)。除高浓度(10.0 mg/L)的 CDDP 组曲线

有明显的持续下降趋势外, 低浓度(0.1, 1.0 mg/L)的 CDDP 组两条曲线在作用 24 h 后均无明显下降趋势(图 2)。200  $\mu$ mol/L 的 IN 加各浓度的 CDDP 后各条曲线均可看到明显的持续下降趋势(图 3)。

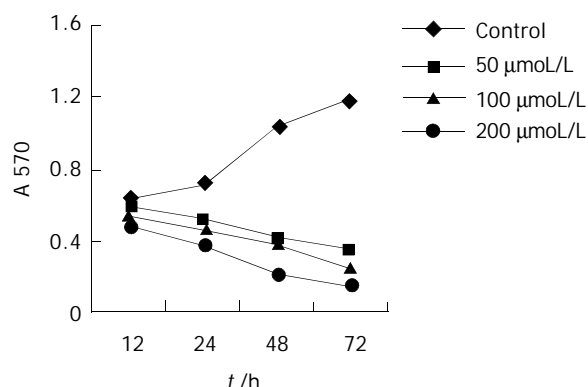


图 1 IN 对胃癌细胞 MGC803 作用。

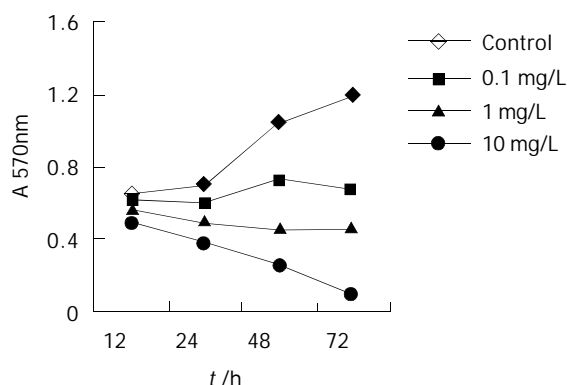


图 2 CDDP 对胃癌细胞 MGC803 作用。

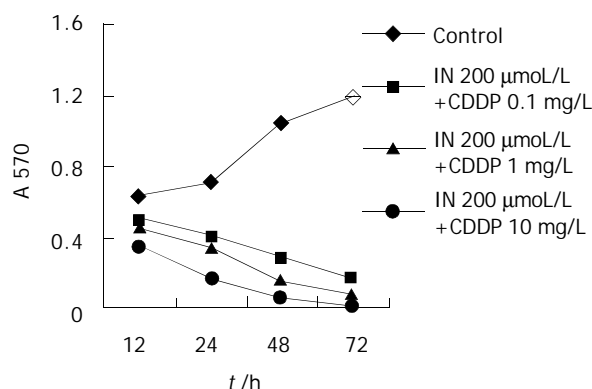


图 3 IN (200  $\mu$ mol/L)加 CDDP 对 MGC803 作用。

2.2 药物对胃癌细胞周期的影响 MGC803 细胞经不同浓度的 IN、CDDP 作用 48 h 后, 细胞周期均发生明显的改变。IN 作用后表现为, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例增加, S 期及 G<sub>2</sub>/M 期下降; CDDP 作用后表现为, S 期增加, G<sub>2</sub>/M 期下降。CDDP 和 IN 对细胞周期的影响均具有明显的量效依赖关系(表 1-2)。

2.3 药物对胃癌细胞凋亡的影响 荧光染色计算凋亡细胞数可发现, IN 对 MGC803 细胞凋亡具有明显的浓度、时间依赖性, 随着药物浓度的增加及时间的延



长, 凋亡率明显增加. 高浓度的 CDDP 细胞凋亡率随时间明显增加, 而低浓度的 CDDP (0.1, 1 mg/L) 作用于胃癌细胞 24 h 后, 细胞凋亡率不再发生改变. 中等剂量的 IN (200  $\mu$ mol/L) 加各浓度的顺铂作用后, 凋亡率随时间明显增加, IN 加小剂量的 CDDP 后, 细胞凋亡率接近于较大剂量顺铂(图 4).

表 1 IN 对 MGC803 细胞周期的影响

浓度( $\mu$ mol/L)	G0/G1	S	G2/M
0	0.58	0.30	0.11
50	0.67	0.23	0.10
100	0.72	0.18	0.09
200	0.80	0.15	0.04

表 2 CDDP 对 MGC803 周期的影响

浓度(mg/L)	G0/G1	S	G2/M
0	0.58	0.30	0.11
0.1	0.51	0.38	0.12
10	0.51	0.40	0.08
100	0.53	0.47	0.00

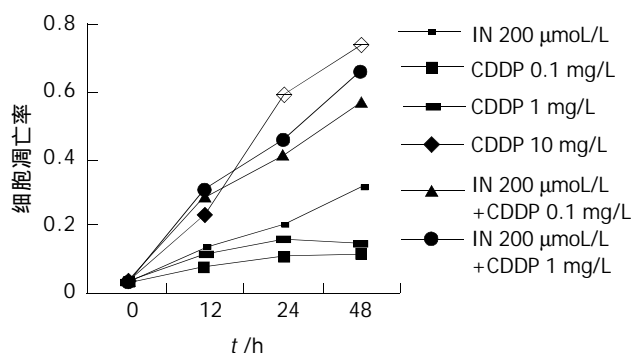


图 4 IN, CDDP 诱导胃癌细胞株 MGC803 凋亡.

### 3 讨论

胃癌化学治疗的主要作用机制为诱导肿瘤细胞凋亡, 诱导凋亡能力的强弱与化疗敏感性密切相关, 在化疗基础上辅以促凋亡药物可显著提高胃癌的化疗敏感性<sup>[25]</sup>. NSAID 长期用于风湿、类风湿疾病的治疗, 近些年研究表明, 常规服用 NSAID 可显著降低消化系统恶性肿瘤的发病率和死亡率. 诱导癌细胞凋亡是 NSAID 与细胞毒性药物抗肿瘤共有的作用机制, 在常规化疗基础上辅以 NSAID 可增强治疗效果, 这在结肠癌的体内、体外试验中均已得到证实<sup>[26]</sup>. Ogino et al<sup>[27]</sup>通过对子宫颈癌细胞的体外研究发现, IN 对 CDDP, 5-FU 等化疗药物具有增效作用, 这些化疗药物与 IN 合用后, 其在细胞内的浓度与未加 IN 组相比, 明显增加. 也有人通过对胶质瘤、肺癌的研究发现, 虽然 IN 可增加其他一些化疗药物如阿霉素、长春新碱等的细胞毒作用, 但对 CDDP 无影响. 我们采用体外细胞培养的

方法, 观察 IN、CDDP 对胃癌细胞株 MGC803 增生和凋亡的影响. 研究发现, IN 对 CDDP 具有协同、增效作用; 经 IN 处理的 MGC803 细胞, 生长明显受抑, 其抑制率与 IN 的浓度和作用时间有相关性, 表明 IN 能有效地抑制 MGC803 细胞的生长, 提示可能会在胃癌的治疗中发挥作用. 经 CDDP 处理的 MGC803 细胞, 高浓度组 (10 mg/L) 有较好的时间相关性, 低浓度组 (0.1, 1 mg/L) 在药物作用 24 h 后, 对细胞增生的抑制作用逐渐丧失, 这可能与肿瘤细胞的耐药机制有关. CDDP 加 IN 处理后, 有较好的时效、浓度相关性, 且小剂量 CDDP 加 IN 后, 接近于大剂量 CDDP 的效用, IN 对 CDDP 具有协同、增效作用, 这与上述文献报道基本一致.

近些年来研究表明, 某些肿瘤细胞凋亡存在细胞周期的特异性, 表现为不同因素诱导的细胞凋亡发生在细胞周期的不同时期, 这类细胞凋亡的发生, 往往是细胞先被阻滞在细胞周期的某一时相, 然后发生细胞凋亡. 许多抗肿瘤药物正是通过诱导细胞周期特异性细胞凋亡, 达到治疗目的. 我们的研究发现, IN 处理后的胃癌细胞株 MGC803, 经流式细胞仪检测发现, 细胞周期发生了变化, 其中 G0/G1 期细胞比例增加, S 期及 G2/M 期下降, 说明 IN 作用在 S 期和 G2/M 期, 使 G0/G1 期细胞堆积, 这与有关文献研究结果相一致<sup>[28-29]</sup>. MGC803 细胞经 CDDP 处理后, S 期增加, G2/M 期下降, 说明细胞受阻于 S 期, 不能进入 G2/M 期. IN 和 CDDP 分别作用于 MGC803 细胞周期的不同位点, 可能是 IN 对 CDDP 具有协同、增效作用原因之一.

肿瘤细胞对 CDDP 的耐药机制目前尚不十分清楚, 有研究表明, 化疗药物产生耐药的原因之一是化疗药物接触肿瘤细胞后可诱导肿瘤细胞 COX-2 表达增加, 进而诱导抗凋亡基因 Bcl-2 的表达. 在传统的化疗方案中联合应用 NSAID 可阻断这一耐药机制, 提高化疗疗效. Zhou et al<sup>[30]</sup>报道了 IN 尚可通过上调胃癌细胞 bax、bak 的表达以及激活 caspase-3 而发挥抗肿瘤效果. 新近研究还表明, 胃癌细胞对 CDDP 的耐药机制之一是 CDDP 可诱导凋亡抑制基因家族 (IAP) 的新成员 survivin 的表达增加<sup>[31-32]</sup>. 本研究显示, 随着作用时间的延长, MGC803 细胞对低剂量的 CDDP 易产生耐药, 而低剂量 CDDP 加 IN 后, 抑制胃癌细胞增生、诱导凋亡作用明显增加, 接近于大剂量 CDDP. 这可能与 IN 能够拮抗化疗药物诱导 COX-2 的表达有关. 此外, IN 是否能抑制胃癌细胞 survivin 的表达, 尚有待于进一步研究.

总之, 本实验发现 IN 能有效抑制胃癌细胞株 MGC803 的增生, 对 CDDP 有协同、增效作用, 能有效地克服胃癌细胞对低浓度 CDDP 的耐药的发生, 且 IN 价格低廉, 药源充分, 深入研究其作用机制和体内抗癌剂量, 以减少化疗药物的用量、提高疗效、减少药物的毒副作用, 无疑具有重大的临床意义.

## 4 参考文献

- 1 Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by helicobacter pylori infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:16-26
- 2 Wu K, Li Y, Zhao Y, Shan YJ, Xia W, Yu WP, Zhao L. Roles of Fas signaling pathway in vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:982-986
- 3 Liu LX, Liu ZH, Jiang HC, Qu X, Zhang WH, Wu LF, Zhu AL, Wang XQ, Wu M. Profiling of differentially expressed genes in human gastric carcinoma by cDNA expression array. *World J Gastroenterol* 2002;8:580-585
- 4 Zhou HB, Zhu JR. Paclitaxel induces apoptosis in human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:442-445
- 5 陈春燕, 朱兆华. 胃癌 P-糖蛋白表达与化疗效果相关. *世界华人消化杂志* 2003;11:36-38
- 6 Yang JY, Luo HY, Lin QY, Liu ZM, Yan LN, Lin P, Zhang J, Lei S. Subcellular daunorubicin distribution and its relation to multidrug resistance phenotype in drug-resistant cell line SMMC-7721/R. *World J Gastroenterol* 2002;8:644-649
- 7 Wang H, Chen XP, Qiu FZ. Overcoming multi-drug resistance by anti-MDR1 ribozyme. *World J Gastroenterol* 2003;9:1444-1449
- 8 Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Yagihashi A, Hirata K, Torigoe T, Sato N, Watanabe N. Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients. *Cancer Sci* 2004;95:44-51
- 9 Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003;22:3138-3151
- 10 Chang Q, Liu ZR, Wang DY, Kumar M, Chen YB, Qin RY. Survivin expression induced by doxorubicin in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:415-418
- 11 Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, Perego P, Supino R, Gatti L, Pilotti S, Zunino F, Daidone MG. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1406-1412
- 12 李建英, 于皆平, 罗和生, 余保平, 黄杰安. 非甾体抗炎药对胃癌 SGC7901 细胞增生及环氧化酶活性的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:262-265
- 13 Leng J, Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK, Wu T. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology* 2003;38:756-768
- 14 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 15 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 16 Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, Tang ZH, Wang JH. Celecoxib inhibits proliferation and induces apoptosis via prostaglandin E2 pathway in human cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2003;9:1302-1306
- 17 Amin R, Kamitani H, Sultana H, Taniura S, Islam A, Sho A, Ishibashi M, Eling TE, Watanabe T. Aspirin and indomethacin exhibit antiproliferative effects and induce apoptosis in T98G human glioblastoma cells. *Neurol Res* 2003;25:370-376
- 18 Moody TW, Leyton J, Zakowicz H, Hida T, Kang Y, Jakowlew S, You L, Ozbun L, Zia H, Youngberg J, Malkinson A. Indomethacin reduces lung adenoma number in A/J mice. *Anticancer Res* 2001;21:1749-1755
- 19 Connolly EM, Harmey JH, O'Grady T, Foley D, Roche-Nagle G, Kay E, Bouchier-Hayes DJ. Cyclo-oxygenase inhibition reduces tumour growth and metastasis in an orthotopic model of breast cancer. *Br J Cancer* 2002;87:231-237
- 20 Ricchi P, Zarrilli R, Di Palma A, Acquaviva AM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br J Cancer* 2003;88:803-807
- 21 Falkowski M, Skogstad S, Shahzidi S, Smedsrod B, Sveinbjornsson B. The effect of cyclooxygenase inhibitor diclofenac on experimental murine colon carcinoma. *Anticancer Res* 2003;23:2303-2308
- 22 Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 2002;531:278-284
- 23 Li XH, Li XK, Cai SH, Tang FX, Zhong XY, Ren XD. Synergistic effects of nimesulide and 5-fluorouracil on tumor growth and apoptosis in the implanted hepatoma in mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:936-940
- 24 陈惠英, 刘文虎, 秦叔逵. 三氧化二砷对肝癌细胞株凋亡的诱导作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:532-535
- 25 马韬, 朱正纲. 胃癌化疗与细胞凋亡研究进展. *国外医学·消化系统疾病分册* 2003;23:15-18
- 26 Hattori K, Matsushita R, Kimura K, Abe Y, Nakashima E. Synergistic effect of indomethacin with adriamycin and cisplatin on tumor growth. *Biol Pharm Bull* 2001;24:1214-1217
- 27 Ogino M, Minoura S. Indomethacin increases the cytotoxicity of cis-platinum and 5-fluorouracil in the human uterine cervical cancer cell lines SKG-2 and HKUS by increasing the intracellular uptake of the agents. *Int J Clin Oncol* 2001;6:84-89
- 28 Li JY, Wang XZ, Chen FL, Yu JP, Luo HS. Nimesulide inhibits proliferation via induction of apoptosis and cell cycle arrest in human gastric adenocarcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 2003;9:915-920
- 29 Detjen KM, Welzel M, Wiedenmann B, Rosewicz S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit growth of human neuroendocrine tumor cells via G1 cell-cycle arrest. *Int J Cancer* 2003;107:844-853
- 30 Zhou XM, Wong BC, Fan XM, Zhang HB, Lin MC, Kung HF, Fan DM, Lam SK. Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak. *Carcinogenesis* 2001;22:1393-1397
- 31 Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment. *Apoptosis* 2002;7:23-29
- 32 Ikeguchi M, Nakamura S, Kaibara N. Quantitative analysis of expression levels of bax, bcl-2, and survivin in cancer cells during cisplatin treatment. *Oncol Rep* 2002;9:1121-1126

# BAK基因过表达对胃癌细胞的诱导凋亡作用及其分子机制

郑丽端, 童强松, 刘俊, 汪良, 钱伟

郑丽端, 华中科技大学同济医学院附属协和医院病理科  
湖北省武汉市 430022  
童强松, 汪良, 华中科技大学同济医学院附属协和医院外科  
湖北省武汉市 430022  
刘俊, 钱伟, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科  
湖北省武汉市 430022

郑丽端, 女, 1973-10-11 生, 福建省南安市人, 汉族. 1997 年同济医科大学  
本科毕业, 2001 级华中科技大学同济医学院在读硕士研究生, 主治医师. 主  
要从事消化系统疾病的分子病理研究.

项目负责人: 童强松, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附  
属协和医院外科. qs\_tong@hotmail.com

电话: 027-85726129

收稿日期: 2003-11-22 接受日期: 2003-12-22

## Effects of BAK gene over-expression on apoptosis in gastric cancer cells and its molecular mechanisms

Li-Duan Zheng, Qiang-Song Tong, Jun Liu, Liang Wang,  
Wei Qian

Li-Duan Zheng, Department of Pathology, Union Hospital of Tongji  
Medical College, Huazhong University of Science and Technology,  
Wuhan 430022, Hubei Province, China

Qiang-Song Tong, Liang Wang, Department of Surgery, Union Hospital  
of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and  
Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Jun Liu, Wei Qian, Department of Gastroenterology, Union Hospital of  
Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology,  
Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Qiang-Song Tong, Department of Surgery,  
Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of  
Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China.  
qs\_tong@hotmail.com

Received: 2003-11-22 Accepted: 2003-12-22

## Abstract

**AIM:** To explore the apoptosis-inducing effects of extrinsic BAK gene transfer and its over-expression on gastric cancer cells and its molecular mechanisms.

**METHODS:** The eukaryotic expression for BAK gene was constructed and transferred into gastric cancer MKN-45 cell line. After being transferred for 1 to 5 days, cellular BAK gene expression was detected by RT-PCR and Western blotting methods. The growth activities of cancer cells were detected by cell count and MTT colorimetry. Cell cycle changes were assayed by flow cytometry. Cellular apoptosis was assayed by electronic microscopy and in situ terminally labeled transferase technique (TUNEL). Cellular caspase-3 activities were observed by colorimetric method.

**RESULTS:** After being transferred for 1 to 5 days, cellular BAK mRNA and protein expression levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ). In vitro growth of gastric cancer cells was inhibited by 11.6-35.3% ( $P < 0.01$ ). The cellular proliferation activities were decreased by 10.2-32.4% ( $P < 0.01$ ), with cell cycle being blocked at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. Partial cancer

cells presented the characteristic morphological changes of apoptosis, with the apoptotic rates being 21.4% ( $P < 0.01$ ). The cellular caspase-3 activities were enhanced by 4.45 times ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Transfection of extrinsic BAK gene, resulting in its over-expression, can significantly induce apoptosis of gastric cancer MKN-45 cells through activating caspase-3, which is a potential strategy for gene therapy of gastric cancer.

Zheng LD, Tong QS, Liu J, Wang L, Qian W. Effects of BAK gene over-expression on apoptosis in gastric cancer cells and its molecular mechanisms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1025-1029

## 摘要

**目的:** 探讨转染外源性BAK基因及其过表达对胃癌细胞的诱导凋亡作用和分子机制.

**方法:** 构建携带有 BAK 基因的真核表达载体并转染胃癌 MKN-45 细胞 1-5 d 后, RT-PCR 和 Western Blotting 法检测 BAK 基因表达; 细胞计数、MTT 比色法检测癌细胞生长活性, 流式细胞仪分析细胞周期时相改变, 透射电镜、末端 TdT 酶标记技术检测癌细胞凋亡; 比色法检测癌细胞内 Caspase-3 活性改变.

**结果:** 转染 1-5 d 后, 癌细胞 BAK mRNA 和蛋白表达水平显著增强( $P < 0.01$ ), 癌细胞体外生长抑制 11.6-35.3% ( $P < 0.01$ ), 增生活性抑制 10.2-32.4% ( $P < 0.01$ ), 细胞周期出现 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞, 部分癌细胞出现胞体缩小、核固缩等凋亡形态学改变, 凋亡率为 21.4% ( $P < 0.01$ ); 癌细胞 Caspase-3 活性增强 4.45 倍( $P < 0.01$ ).

**结论:** 转染外源性 BAK 基因使其过表达能激活 Caspase-3, 显著诱导胃癌 MKN-45 细胞凋亡, 有望成为胃癌治疗的新途径.

郑丽端, 童强松, 刘俊, 汪良, 钱伟. BAK 基因过表达对胃癌细胞的诱导凋亡作用及其分子机制. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1025-1029

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1025.asp>

## 0 引言

胃癌是我国常见的恶性肿瘤, 在不同地区约居癌症发病数的第 1-3 位, 且近年来发病率有上升趋势, 但其晚期治疗效果仍不理想<sup>[1-7]</sup>. 利用基因转导技术促进肿瘤细胞凋亡, 成为目前胃癌治疗研究的热点之一<sup>[8-14]</sup>. BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer) 基因是近年来发现的一种促凋亡基因, 应用基因转导的手段将其导入



肿瘤细胞已成功抑制了肺癌、乳腺癌等多种肿瘤的生长<sup>[15]</sup>。我们通过构建携带 BAK cDNA 的真核表达载体,观察了 BAK 基因过表达对胃癌细胞的诱导凋亡作用及其分子机制,旨在寻求胃癌治疗的新途径。

## 1 材料和方法

1.1 材料 质粒 pET-BAK 由美国冷泉港分子生物学实验室 Patty Wendel 博士惠赠,在其限制性酶切位点 Xho I 和 Hind III 间含有 BAK 基因 cDNA (633 bp)。真核表达载体 pcDNA<sub>3</sub> 由本校生化教研室屈伸教授惠赠。限制性内切酶和 DNA 快速回收纯化试剂盒购自 Promega 公司, T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 Takara 公司。碘化丙锭购自 Sigma 公司。原位末端转移酶标记 (TUNEL) 试剂盒购自武汉博士德公司, Caspase-3 活性检测试剂盒购自 Clontech 公司。BAK 基因真核表达载体的构建参见 (Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998; 254-325)。限制性内切酶 Xho I、Hind III 双切质粒 pET-BAK 和 pcDNA<sub>3</sub>, 分别回收 0.63 kb 的基因片段和 5.4 kb 的线性化载体片段, T<sub>4</sub> DNA 酶进行连接反应, 将重组体命名为 pcDNA-BAK, 酶切鉴定。

1.2 方法 人胃癌细胞株 MKN-45 由本院中心实验室董继华教授惠赠。用含 100 mL/L 胎牛血清、100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养基 (Gibco), 在 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养。设置未转染对照组、pcDNA<sub>3</sub> 转染组、pcDNA-BAK 转染组, 基因转染参照脂质体 lipofectamine 2000 (Gibco) 说明书进行。BAK mRNA 表达水平检测采用 RT-PCR 法。细胞总 RNA 的提取参照 Trizol 试剂盒 (Life Technologies 公司) 说明书进行。逆转录反应后, 加入下列引物进行 PCR 扩增: BAK (502 bp) 上游 5' -CTGCCCTCTGCTTCTGA-3', 下游 5' -CGTTCAGGATGGGACCA-3'; 同时以  $\alpha$ -tubulin (295 bp) 上游 5' -CCCGTCTTCAGGGTCTCTTG-3', 下游 5' -TTAAGGTAAGTGTAGTTGGG-3' 作为反应内参照。扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下观察并拍照。凝胶图像分析仪 (Gel Doc 1000 型, Bio-Rad 公司) 检测 BAK 与  $\alpha$ -tubulin 扩增片段灰度的比值。BAK 蛋白表达水平检测采用 Western Blotting 法, 参照 (Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998; 254-325) 进行蛋白质提取、定量和分离。转膜后先后与 10 g/L 脱脂奶粉、鼠抗人 BAK mAb (武汉博士德公司)、过氧化物酶偶联的山羊抗鼠 IgG 孵育, 运用 ECL Western blotting kit 显色。图像分析系统测定 BAK 蛋白条带密度。

1.2.1 细胞生长特征 接种  $2 \times 10^5$  /L MKN-45 细胞 0.5 mL 入 24 孔培养板, 每组 5 个复孔, 转染后用 RPMI 1640 完全培养基在 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养, 每 24 h 用 1.25 g/L 胰酶 + 0.1 g/L EDTA 消化细胞, 台盼兰染色,

于倒置显微镜下计数活细胞, 每次计数重复 3 次, 连续测定 5 d, 绘制细胞生长曲线。细胞增生活性检测采用 MTT 比色法。转染 1、3、5 d 后, 加入 5 g/L MTT (Clontech 公司) 20  $\mu$ L/孔, 继续培养 4 h, 弃去上清, 加 DMSO 100  $\mu$ L/孔, 振荡至结晶溶解, 酶标仪 570 nm 波长处测定吸光度  $A_{570nm}$  值。细胞增生抑制率 (%) =  $(1 - \text{实验组平均吸光度 } A_{570nm} \text{ 值} / \text{对照组平均吸光度 } A_{570nm} \text{ 值}) \times 100\%$ 。细胞周期时相检测采用流式细胞仪法。上述三组癌细胞培养至 3 d, 分别收集  $2 \times 10^6$  细胞, PBS 洗涤 2 次, 700 mL/L 乙醇固定过夜, 4 °C 保存, 检测前用 PBS 洗涤, 加入 RNase (1 g/L) 200  $\mu$ L, 37 °C 水浴 30 min, 用碘化丙锭 (500 mg/L) 800  $\mu$ L 进行染色, 室温避光 30 min, 流式细胞仪 (Becton Dickson 公司) 进行 DNA 含量分析, 所用软件为 CellQuest。

1.2.2 细胞形态学检测 收集上述三组癌细胞, PBS 洗涤 1 次, 25 mL/L 戊二醛固定 30 min, PBS 洗涤并悬浮细胞, 常规包埋、切片, 透射电镜观察并摄影。采用末端 TdT 酶标记技术 (TUNEL) 检测转染 3 d 后各处理组的细胞凋亡。3 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭 30 min, 20 mg/L 蛋白酶 K 消化液作用 20 min, TUNEL 反应液 37 °C 孵育 60 min, 滴加过氧化物酶连接的抗体, 37 °C 孵育 30 min, DAB 显色, 苏木素复染。以 PBS 替代 TUNEL 反应液作阴性对照。在光学显微镜下, 凋亡细胞体积缩小, 核固缩, 染色质呈特异的棕黄色。细胞凋亡率 (%) =  $(500 \text{ 个细胞中凋亡细胞数} / 500) \times 100\%$ 。

1.2.3 Caspase-3 活性测定 分别收集  $2 \times 10^5$  各处理组细胞, 加入细胞裂解缓冲液 50  $\mu$ L, 冰上孵育 10 min; 12 000 r/min, 4 °C 离心细胞裂解液 3 min, 回收上清, 每管依次 50  $\mu$ L 的  $2 \times$  反应缓冲液, 1 mmol/L Caspase-3 底物 DEVD-pNA 5  $\mu$ L, 37 °C 孵育 1 h, 转移至 96 孔板中, 用酶标仪测定波长 405 nm 的吸光度值 ( $A_{405nm}$ ), 表示 Caspase-3 的相对活性。

统计学处理 采用 SPSS 统计学软件进行数据分析。

## 2 结果

将 BAK 基因片段正向插入到载体 pcDNA<sub>3</sub> 中, 得到携带 BAK 基因的真核表达载体 pcDNA-BAK (6.0 kb)。根据基因和载体的物理图谱, 选取 Xho I、Hind III 单酶切和 Xho I 和 Hind III 双酶切该重组体, 酶切产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 证实 BAK cDNA 已插入重组体 pcDNA-BAK 中 (图 1)。RT-PCR 产物电泳后, 未转染对照组和空载体 pcDNA<sub>3</sub> 转染组均可见 BAK (502 bp) 和  $\alpha$ -tubulin (295 bp) 条带, 二者 BAK/ $\alpha$ -tubulin 灰度比值分别为 0.81, 0.83, 统计学分析差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。外源性 BAK 基因转染 3 d 后, BAK/ $\alpha$ -tubulin 灰度比值为 2.98, 即 BAK mRNA 表达较未转染对照组增强 3.67 倍 ( $P < 0.01$ , 图 2)。未转染对照组、pcDNA<sub>3</sub> 转染组、pcDNA-BAK 转染组细胞经 Western Blotting 检测均可见  $M_r$  28 000 的蛋白条带。经图像分析系统证实,

pcDNA-BAK 转染组的 BAK 蛋白条带灰度值为对照组、pcDNA<sub>3</sub> 转染组的 3.1 倍( $P < 0.01$ )和 3.2 倍( $P < 0.01$ ); 未转染对照组、pcDNA<sub>3</sub> 转染组细胞 BAK 蛋白条带灰度值之间无显著性差异( $P > 0.05$ , 图 3).

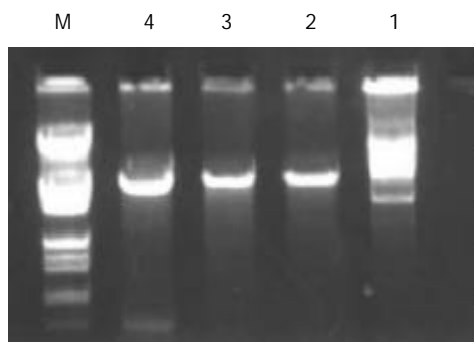


图 1 真核表达载体 pcDNA-BAK 的酶切鉴定分析. 1: pcDNA-BAK; 2: pcDNA-BAK / Xho I; 3: pcDNA-BAK / Hind III; 4: pcDNA-BAK / Xho I+Hind III; M:  $\lambda$  DNA / Hind III + EcoR I.

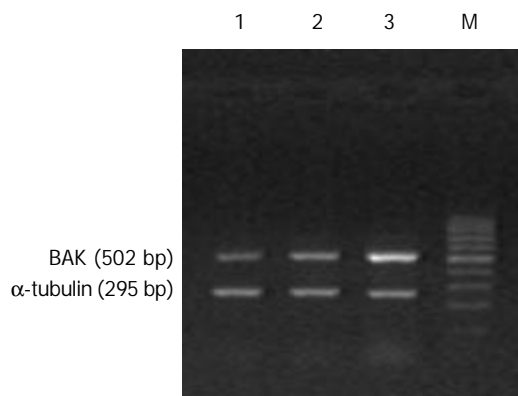


图 2 RT-PCR 检测各组癌细胞 BAK mRNA 表达水平. 1: 未转染对照组; 2: 空载体转染组; 3: BAK 转染组 M: PCR marker (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1 000 bp).

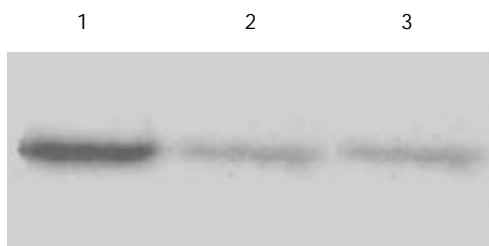


图 3 Western Blotting 检测各组癌细胞 BAK 蛋白表达水平. 1: BAK 转染组; 2: 空载体转染组; 3: 未转染对照组.

**2.1 细胞生长特征** 未转染对照组 MKN-45 细胞体外生长活跃, 经 pcDNA-BAK 转染 1-5 d 后, 癌细胞体外生长减慢, 抑制率为 11.6-35.3%( $P < 0.01$ ); 空载体 pcDNA<sub>3</sub> 转染组癌细胞体外生长活性与未转染对照组比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ , 图 4). 细胞增生活性检测未转染对照组  $A_{570nm}$  值随时间推移而递增, 反映癌细胞体外增生活跃. pcDNA-BAK 转染 1-5 d 后, MKN-45 细胞增生活性均不同程度地减弱, 抑制率为 10.2-32.4% ( $P < 0.01$ ). pcDNA<sub>3</sub> 转染组与未转染对照组  $A_{570nm}$  值之间的

差异无显著性意义( $P > 0.05$ , 图 5). 在 DNA 直方图上, pcDNA-BAK 转染组癌细胞 S 期比例(36.6%)显著低于非转染对照组(55.1%), 细胞生长受阻于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期 (比率分别为 32.2%、12.5%). pcDNA<sub>3</sub> 转染组与未转染对照组比较细胞周期时相分布无显著差异( $P > 0.05$ , 图 6).

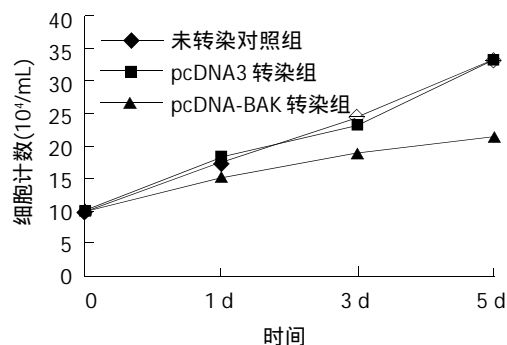


图 4 BAK 基因过表达对胃癌 MKN-45 细胞体外生长活性的影响.

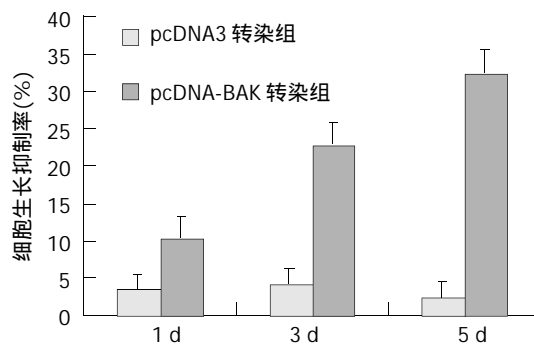


图 5 BAK 基因过表达对胃癌 MKN-45 细胞增生活性的抑制作用.

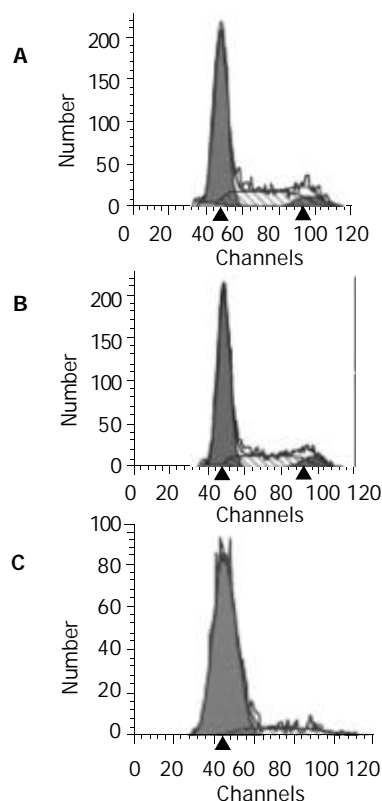


图 6 BAK 基因过表达诱导 MKN-45 细胞周期 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞. A: 未转染对照组; B: pcDNA<sub>3</sub> 转染组; C: pcDNA-BAK 转染组.

**2.2 细胞形态学** 未转染对照组细胞生长旺盛, 形态规则, 以多边形居多. pcDNA-BAK 转染后部分细胞体积缩小, 形态不规则, 圆形细胞比例增多. 透射电镜观察见部分癌细胞呈现核固缩、染色质核膜下聚集、胞体缩小、胞膜完整等凋亡特征性改变(图 7). 未转染对照组胃癌 MKN-45 细胞凋亡率为 4.7%. pcDNA-BAK 转染 3 d 后, 细胞凋亡率为 21.4%, 二者比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ ); 空载体转染对癌细胞凋亡率无显著性影响( $P > 0.05$ , 图 8).

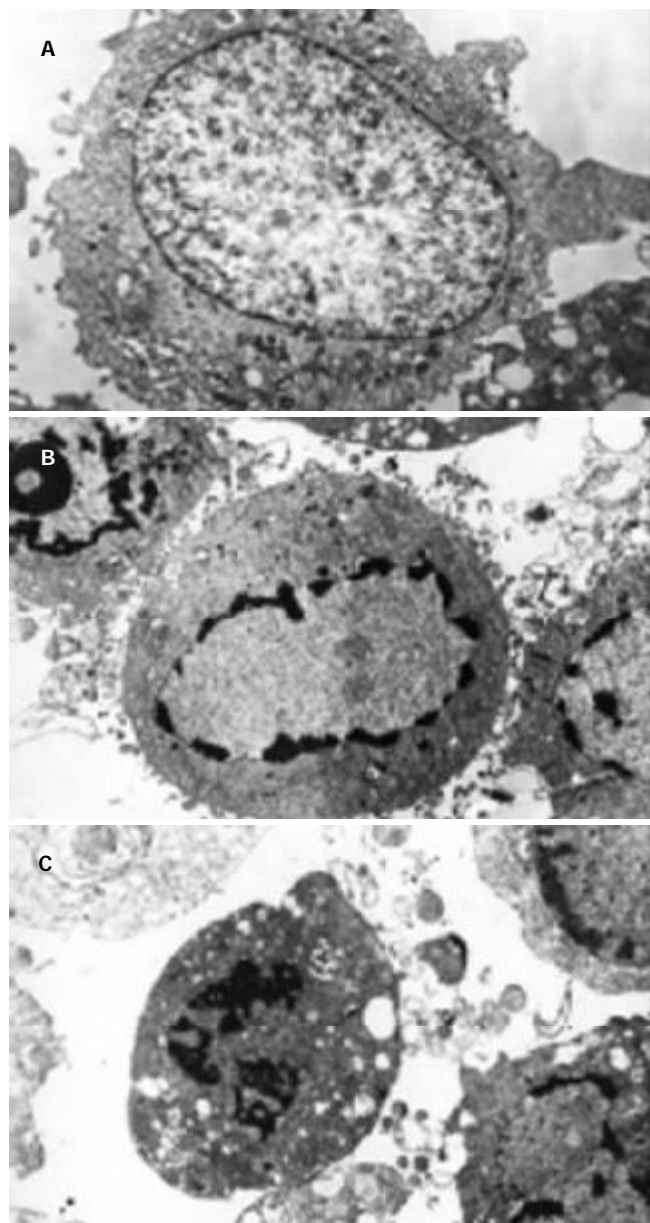


图 7 透射电镜观测 BAK 基因过表达后胃癌细胞形态学改变. A: 未转染对照组; B: pcDNA-BAK 转染组细胞染色质边集; C: pcDNA-BAK 转染组细胞核固缩.

**2.3 Caspase-3 活性** 未转染对照组 MKN-45 细胞  $A_{405\text{ nm}}$  值为  $0.055 \pm 0.008$ . 经 pcDNA-BAK 转染 3 d 后, 癌细胞  $A_{405\text{ nm}}$  值为  $0.245 \pm 0.012$  ( $P < 0.01$ ), 较对照组增强 4.45 倍. pcDNA<sub>3</sub> 转染组与未转染对照组比较  $A_{405\text{ nm}}$  值差异无显著性意义( $P > 0.05$ , 图 9).

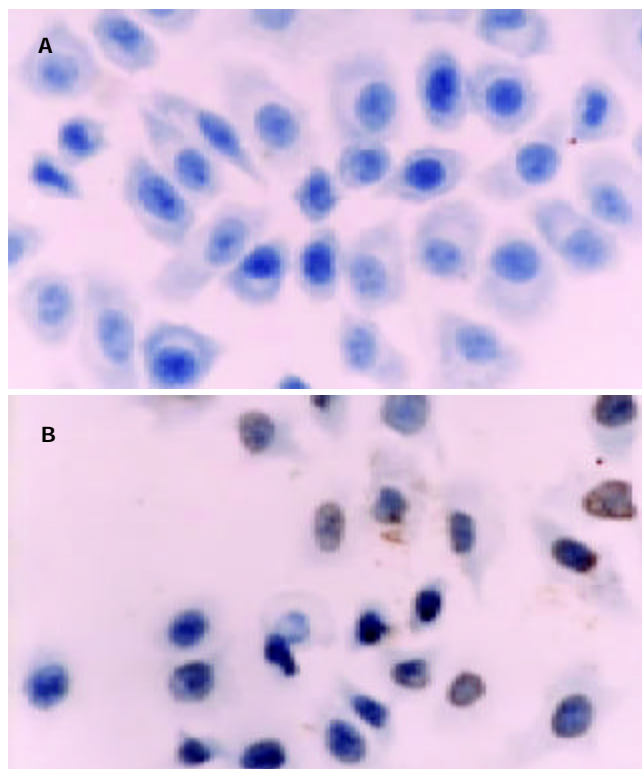


图 8 TUNEL 技术检测 BAK 基因过表达后癌细胞凋亡 ( $\times 200$ ). A: 未转染对照组未见明显的细胞凋亡; B: pcDNA-BAK 转染组癌细胞胞体缩小、核黄染.

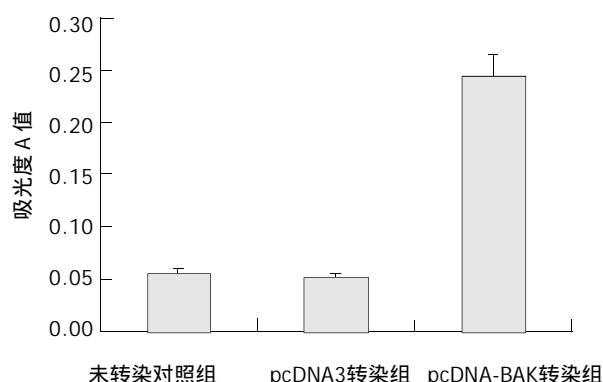


图 9 BAK 基因过表达后癌细胞 Caspase-3 活性检测.

### 3 讨论

肿瘤的发生不但与细胞增生和分化异常有关, 而且与细胞凋亡异常关系密切. Bcl-2 家族包括凋亡抑制基因 Bcl-2, Bcl-xl, ced-9 和促凋亡基因 Bax, Bad, Bcl-xs 等<sup>[16-18]</sup>. BAK 基因促进细胞凋亡的机制: BAK 通过其 BH<sub>3</sub> 结构域与 Bcl-2 和 Bcl-xl 相互作用形成异源二聚体, 从而抑制 Bcl-2 和 Bcl-xl 的抑凋亡活性, 具有加速细胞凋亡作用<sup>[19]</sup>; BAK 直接激活凋亡途径或作为细胞死亡过程中的组成部分被活化而促进细胞凋亡. 有研究表明, BAK 可通过与 CD95 和 TNF 死亡受体相似的途径活化而促进细胞凋亡<sup>[20]</sup>. BAK 基因表达的异常与肿瘤的发生、发展紧密相关. 在胃癌的研究中, Kondo et al<sup>[21]</sup>发现 BAK 基因表达的阳性率与胃癌病理分级、临床分期负相关. 许多肿瘤治疗药物(紫苏子醇、 $\gamma$ -干扰素)作用机制均

与上调BAK基因表达有关<sup>[22-24]</sup>。最近, Pataer et al<sup>[15, 25]</sup>应用腺病毒作为载体, 将BAK基因导入肺癌及乳腺癌细胞, 获得了显著的抑瘤效应, 为肿瘤基因治疗提供了新的思路。

我们通过分子克隆技术成功构建BAK基因的真核表达载体, 观测了转导外源性BAK基因对胃癌MKN-45细胞体外生长的影响, 结果表明: 未转染对照组胃癌MKN-45细胞中存在BAK基因弱阳性表达, 当脂质体介导BAK真核表达载体转染3 d后, 癌细胞BAK mRNA和蛋白水平均显著增强, 说明转染外源性BAK基因能使其在MKN-45细胞中过表达; BAK过表达后癌细胞体外生长及增生活性显著减慢, 细胞周期阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期; 通过不同方法均观察到癌细胞凋亡现象: 透射电镜观察到癌细胞凋亡特征性形态学改变, TUNEL进一步证实过表达BAK基因对胃癌细胞凋亡的促进作用, 凋亡率为21.4%。

近年来认为细胞凋亡的发生最终可能涉及到一种依赖天门冬氨酸的半胱氨酸酶, 称之为Caspase。至今为止, 已有编码14种Caspase的cDNA被克隆, 所有的Caspase都以非活性形式合成, 然后以亚单位形式激活后释放。其中, Caspase-3是Caspase酶联反应的终末因子之一。Bcl-2蛋白作为细胞凋亡的主要拮抗成分, 能抑制线粒体膜的通透性和阻止细胞色素C的释放。在凋亡信号传导的过程中, Bcl-2作用在Caspase-3的上游, 可通过阻断Caspase-3激活而发挥抑制细胞凋亡作用。本研究表明: 过表达BAK基因能促使癌细胞Caspase-3活性增强, 这可能与BAK基因可以拮抗Bcl-2生物学功能, 减轻对Caspases级联效应的负性调控有关。随着研究的深入, 我们相信: 作为一种新的诱导凋亡基因, BAK在胃癌治疗方面必将展现广泛的研究及应用前景。

#### 4 参考文献

- Gulmann C, Hegarty H, Grace A, Leader M, Patchett S, Kay E. Differences in proximal (cardia) versus distal (antral) gastric carcinogenesis via the retinoblastoma pathway. *World J Gastroenterol* 2004;10:17-21
- Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L, Liu YX. Correlation of tumor-positive ratio and number of perigastric lymph nodes with prognosis of patients with surgically-removed gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:182-185
- Yu Y, Zhang YC, Zhang WZ, Shen LS, Hertzog P, Wilson TJ, Xu DK. Ets1 as a marker of malignant potential in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2154-2159
- Zhang J, Su XQ, Wu XJ, Liu YH, Wang H, Zong XN, Wang Y, Ji JF. Effect of body mass index on adenocarcinoma of gastric cardia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2658-2661
- Guo HQ, Guan P, Shi HL, Zhang X, Zhou BS, Yuan Y. Prospective cohort study of comprehensive prevention to gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:432-436
- Shi XY, Zhao FZ, Dai X, Ma LS, Dong XY, Fang J. Effect of jianpiyiwei capsule on gastric precancerous lesions in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:608-612
- Wu GH, Zhang YW, Wu ZH. Modulation of postoperative immune and inflammatory response by immune-enhancing enteral diet in gastrointestinal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2001;7:357-362
- Yang LQ, Fang DC, Wang RQ, Yang SM. Effect of NF-kappaB, survivin, Bcl-2 and Caspase3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand. *World J Gastroenterol* 2004;10:22-25
- Liu YB, Wei ZX, Li L, Li HS, Chen H, Li XW. Construction and analysis of SSH cDNA library of human vascular endothelial cells related to gastroduodenal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2419-2423
- Zhang JH, Wan MX, Yuan JY, Pan BR. Construction and identification of recombinant vectors carrying herpes simplex virus thymidine kinase and cytokine genes expressed in gastric carcinoma cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2004;10:26-30
- Fu YG, Qu YJ, Wu KC, Zhai HH, Liu ZG, Fan DM. Apoptosis-inducing effect of recombinant Caspase-3 expressed by constructed eukaryotic vector on gastric cancer cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2003;9:1935-1939
- Zhu XD, Lin GJ, Qian LP, Chen ZQ. Expression of survivin in human gastric carcinoma and gastric carcinoma model of rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:1435-1438
- Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu JH, Ren XD, Wang CC. JTE-522-induced apoptosis in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells by caspase activation accompanying cytochrome C release, membrane translocation of Bax and loss of mitochondrial membrane potential. *World J Gastroenterol* 2002;8:217-223
- Han ZY, Wu KC, He FT, Han QL, Nie YZ, Han Y, Liu XN, Zheng JY, Xu MH, Lin T, Fan DM. Screening and identification of mimotope of gastric cancer associated antigen MGB1-Ag. *World J Gastroenterol* 2003;9:1920-1924
- Pataer A, Fang B, Yu R, Kagawa S, Hunt KK, McDonnell TJ, Roth JA, Swisher SG. Adenoviral Bak overexpression mediates caspase-dependent tumor killing. *Cancer Res* 2000;60:788-792
- Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003;7:249-257
- Sakudo A, Lee DC, Saeki K, Matsumoto Y, Itoharu S, Onodera T. Tumor necrosis factor attenuates prion protein-deficient neuronal cell death by increases in anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:725-729
- Kochendoerfer SK, Krishnan N, Buckley DJ, Buckley AR. Pro-lactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *J Endocrinol* 2003;178:265-273
- Ruffolo SC, Shore GC. Bcl-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem* 2003;278:25039-25045
- Werner AB, de Vries E, Tait SW, Bontjer I, Borst J. Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit is collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J Biol Chem* 2002;277:22781-22788
- Kondo S, Shinomura Y, Miyazaki Y, Kiyohara T, Tsutsui S, Kitamura S, Nagasawa Y, Nakahara M, Kanayama S, Matsuzawa Y. Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* 2000;60:4328-4330
- Shyu RY, Su HL, Yu JC, Jiang SY. Direct growth suppressive activity of interferon-alpha and gamma on human gastric cancer cells. *J Surg Oncol* 2000;75:122-130
- Ray S, Almasan A. Apoptosis induction in prostate cancer cells and xenografts by combined treatment with Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and CPT-11. *Cancer Res* 2003;63:4713-4723
- Zhou XM, Wong BC, Fan XM, Zhang HB, Lin MC, Kung HF, Fan DM, Lam SK. Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak. *Carcinogenesis* 2001;22:1393-1397
- Pearson AS, Spitz FR, Swisher SG, Kataoka M, Sarkiss MG, Meyn RE, McDonnell TJ, Cristiano RJ, Roth JA. Up-regulation of the proapoptotic mediators Bax and Bak after adenovirus-mediated p53 gene transfer in lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:887-890

# 错配修复基因hMLH3在家族性胃癌中的突变

赵成海, 刘宏旭, 卜献民

赵成海, 中国医科大学病理生理教研室 辽宁省沈阳市 110001  
刘宏旭, 中国医科大学附属第一医院胸外科 辽宁省沈阳市 110001  
卜献民, 中国医科大学附属第二医院普外科 辽宁省沈阳市 110001  
赵成海, 男, 1971-10-25 生, 辽宁省庄河市人, 汉族. 1997 年于中国医科大学硕士毕业, 讲师. 现主要从事肿瘤基础研究.  
项目负责人: 刘宏旭, 110001, 辽宁省沈阳市和平区, 中国医科大学附属第一医院胸外科. hongxulu@yahoo.com  
电话: 024-23256666-6256  
收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-01-15

## Mutation of mismatch repair gene hMLH3 in familial gastric cancer

Cheng-Hai Zhao, Hong-Xu Liu, Xian-Min Bu

Cheng-Hai Zhao, Department of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Hong-Xu Liu, Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Xian-Min Bu, Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Supported by Swedish Institute Bilateral Scholarship and China Medical University Doctor Foundation  
Correspondence to: Dr Hong-Xu Liu, Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. hongxulu@yahoo.com  
Received: 2003-12-29 Accepted: 2004-01-15

## Abstract

AIM: To detect the mutations of mismatch repair gene hMLH3 and to investigate its possible role in familial gastric cancer.

METHODS: A total of 84 members from 16 suggestive hereditary gastric cancer families were investigated with PCR, denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) and direct sequencing. The diagnostic criteria for familial gastric cancer are as follows: (1) at least two successive generations, (2) at least two patients with gastric cancer, (3) one of them should be first-degree relative of the other, and (4) at least one patient was diagnosed before 50 years old.

RESULTS: Five missense mutations were identified in five gastric cancer families, four mutations within exon 1 and one mutation within exon 12. Carcinogenesis was obviously associated with hMLH3 mutations in family 6, but not in other families. No mutations were found in sporadic gastric cancer and normal controls.

CONCLUSION: hMLH3 probably acts as a low risk gene in familial gastric cancer. The mutations of hMLH3 may work together with other genes and result in an elevated risk of gastric cancer in the family.

Zhao CH, Liu HX, Bu XM. Mutation of mismatch repair gene hMLH3 in familial gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1030-1033

## 摘要

目的: 检测错配修复基因hMLH3在家族性胃癌中的突变情况, 以探讨hMLH3在家族性胃癌中的作用.

方法: 采用聚合酶链反应(PCR)、变性高效液相色谱分析(DHPLC)和直接测序法, 检查有遗传背景的 16 个胃癌家系(共84名成员)的错配修复基因hMLH3突变情况. 胃癌家系选择参考以下标准: (1)至少连续两代; (2)至少2例胃癌患者; (3)至少有1例患者为其他患者的一级亲属; (4)至少有1例患者 50 岁前被诊断出胃癌.

结果: 所有样品的外显子均成功进行PCR扩增, DHPLC分析和基因测序. 共在 5 个家系中发现 5 处错义突变(31.3%, 5/16), 4 处在外显子 1, 另外 1 处在外显子 12. 家系 6 中 hMLH3 的突变与胃癌发生呈现出较强的相关性, 而另外几个家系中的突变情况与胃癌没有表现出明显的相关性. 在散发性胃癌及正常对照中未发现突变的存在.

结论: hMLH3基因在家族性胃癌发生中可能为一低风险基因, 他可能通过与其他基因互相叠加、共同起作用.

赵成海, 刘宏旭, 卜献民. 错配修复基因hMLH3在家族性胃癌中的突变. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1030-1033

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1030.asp>

## 0 引言

错配修复基因的缺陷与人类多种恶性肿瘤的发病关系密切<sup>[1-3]</sup>, 其中hMLH1、hMSH2和hMSH6等基因的突变在遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)中的作用已得到广泛的证实<sup>[4-6]</sup>. 胃癌在我国常见<sup>[7-18]</sup>, 也存在这些基因的变异或者失活以及其表达的改变<sup>[19-23]</sup>. hMLH3为一种新近被克隆和定性的错配修复基因, 可能是另一个与人类恶性肿瘤有关的错配修复备选基因. 目前已有学者在HNPCC患者中检出hMLH3突变<sup>[23-24]</sup>, 且部分家系显示出该突变具有较强的致病性<sup>[24]</sup>. 我们对部分有遗传背景的胃癌家系进行研究, 以探讨hMLH3在家族性胃癌中的作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 有遗传背景的胃癌家系 16 个, 均来自于中国医科大学附属第一医院, 共有84名成员. 另散发性胃癌 96 例及正常对照 96 例. 胃癌家系选择参考以下标准: 至少两代; 至少 2 例胃癌患者; 至少有 1 例患者为另外 1



例的一级亲属和至少有 1 例患者 50 岁前被诊断出胃癌。PCR 仪(UNO- II, Biometra); DNA 片段分析仪(Wave 2100, Transgenomic)及 WaveMaker4.1 软件; DNA 测序仪(Prism377, IBM). hMLH3 基因 12 个外显子的 17 对引物, Ampli Taq Gold 酶(5MU/L, Biosystems); DHPLC 分析缓冲液: 三乙基醋酸及己腈(Bie & Bernstein A-S); DNA 测序试剂盒(Biosystems); PCR 纯化试剂盒(Qiagen 公司).

1.2 方法 按常规方法提取血液和肿瘤组织 DNA. 将 hMLH3 基因第 1 外显子划分为 7 个重叠的片段, 而将片段过短且相距很近的外显子 9 和 10 划为 1 个片段, 因此共设计 17 对引物. 聚合酶链反应体系共 50  $\mu$ L, 含有 100 ng 基因组 DNA, 1  $\times$  PCR 缓冲液, 1.5 mmol/L 的  $Mg^{2+}$ , 100  $\mu$ mol/L 的各种 dNTP, 0.2  $\mu$ mol/L 的各种引物和 Ampli Taq Gold 聚合酶 1.25 U. PCR 片段的长度、引物序列、相应的退火温度及 PCR 的反应程序参考文献<sup>[24]</sup>. DHPLC 分析在装有 DNA 层析柱的 DNA 片段分析仪中自动进行. 具体操作程序参考文献<sup>[24]</sup>. 层析柱中 DNA 双链分离后, 可被紫外线吸收仪在波长为 254 nm 处检测到, 表现为特征性的洗脱峰. 同源双链(纯合的野生型)DNA 表现为单一窄峰, 而突变型和野生型 DNA 组成的异源杂合双链则表现为提前出现一个或多个的额外洗脱峰. 在 PCR 产物测序中将经 DHPLC 检测有异常峰型的 DNA 样品作为检测重点, 进行测序. 步骤: (1)重新进行 PCR 扩增; (2)PCR 产物纯化; (3)DNA 测序试剂盒进行测序反应; (4)DNA 测序仪上电泳, 测出碱基序列.

## 2 结果

在全部样品中所有外显子均成功进行 PCR 扩增(图 1),

DHPLC 分析(图 2)和基因测序(图 3). 共在 5 个胃癌家系中发现 5 处错义突变(31.3%, 5/16). 尽管未发现无义突变和移码突变, 但在散发性胃癌及正常对照中均未检出上述错义突变的存在(表 1).

错义突变 A1234G 见于家系 2 中. 该家系有 1 例 65 岁胃癌患者及其 1 例 32 岁健康子女被检出这种突变. 但其患胃癌的弟弟及健康的姐姐没有检出(图 4A). 错义突变 A2173C 见于家系 6 中. 该家系共有祖孙三代 3 例胃癌患者及 1 例健康亲属被检出, 显示出这种突变与该家系胃癌发生具有较强的相关性(图 4B). 错义突变 G2221T 见于家系 13 中. 该家系患胃癌的父亲及其 2 例患大肠癌的儿子被检出. 但其另 1 例患胃癌的儿子却没有检出. 该家系还有 1 例健康亲属被检出(图 4C). 错义突变 T2896C 见于家系 8 中. 该家系共有 5 例成员被检出, 包括 2 例胃癌患者(父女)及 1 例大肠癌患者. 同时他们的 2 例健康亲属也被检出. 但该家系另 1 例女性胃癌患者未被检出(图 4D). 错义突变 G4351A 见于家系 16 中. 该家系由父亲、母亲及其 3 例子女构成. 患胃癌的父亲没有检出. 但患大肠癌的母亲和 1 例患胃癌的儿子及另 1 例健康的儿子被检出(图 4E).

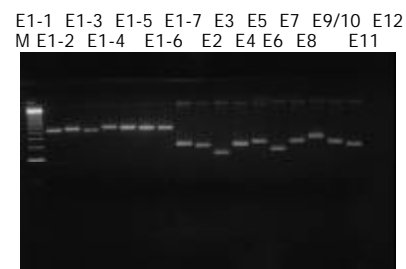


图 1 hMLH3 各片段 PCR 产物脂糖凝胶电泳. M: 分子质量标记物.

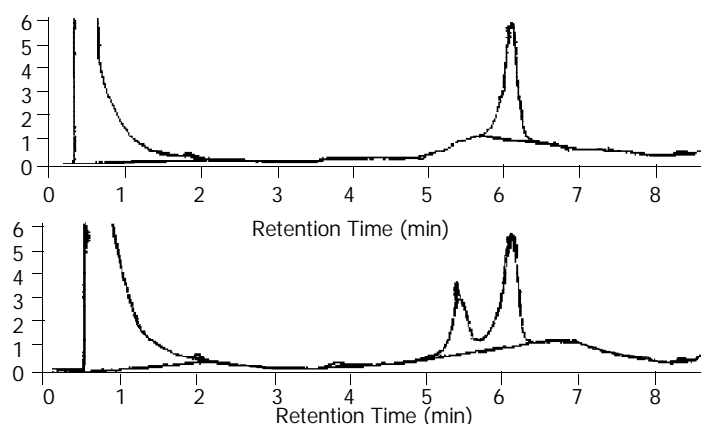


图 2 DHPLC 图像. 正常对照(纯合性)表现为单一的洗脱峰; 而发生突变形成异源杂合双链的 DNA 表现提前出现的额外洗脱峰.

表 1 hMLH3 在家族性胃癌中突变情况

外显子	核苷酸改变	氨基酸改变	家系	胃癌家系中的频率	散发胃癌中的频率	对照中的频率
1 <sup>1</sup>	A1234G	Lys412Glu	2	2.4% (2/84)	0% (0/96)	0% (0/96)
1	A2173C	Asn725His	6	4.8% (4/84)	0% (0/96)	0% (0/96)
1	G2221T	Val741Phe	13	4.8% (4/84)	0% (0/96)	0% (0/96)
1	T2896C	Ser966Pro	8	6.0% (5/84)	0% (0/96)	0% (0/96)
12	G4351A	Glu1451Lys	16	3.6% (3/84)	0% (0/96)	0% (0/96)

<sup>1</sup> 根据 cDNA 的起始密码子计数, 基因库号码 AF195657.

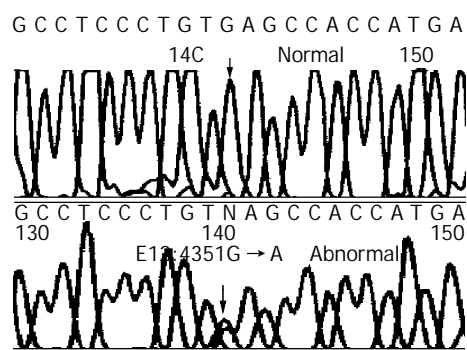


图3 测序结果显示外显子12中的杂合子的错义突变, G4351A, 导致 Glu1451Lys.

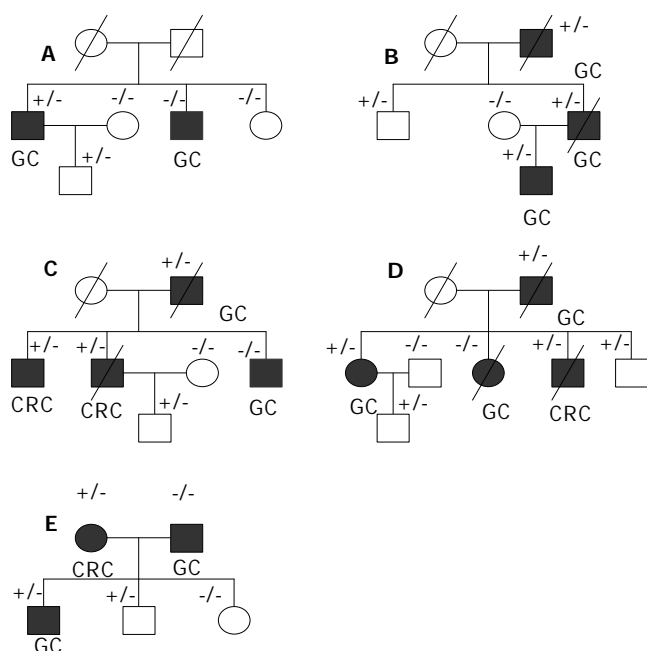


图4 有hMLH3基因突变的家系. GC: 胃癌; CRC: 大肠癌; +: 变异体携带者; -: 非变异体的携带者. A: 家系2 A1234G; B: 家系6 A2173C; C: 家系13 G2221T; D: 家系8 T2896C; E: 家系16 G4351A.

### 3 讨论

在我国的各种恶性肿瘤中, 胃癌一直具有较高的发病率和死亡率. 一些地区的胃癌患者亦呈现出明显的家族性, 显示出遗传因素在胃癌的发病中具有重要作用. 目前一般认为在消化道上皮恶性肿瘤中起作用的基因主要有三类: 癌基因, 抑癌基因及错配修复基因. 后者编码的错配修复系统可检查DNA双螺旋上错配的碱基对, 将其切除并重新合成正确的碱基对. 错配修复基因的突变可导致DNA复制后的修复缺陷, 产生基因组的不稳定性, 引起关键作用的基因突变频率显著增加, 特别是那些与癌变相关的原癌基因、抑癌基因或其他基因的突变, 导致肿瘤的发生. Fang et al<sup>[19]</sup>在68例胃癌患者中发现2例hMSH6移码突变. Menoyo et al<sup>[20]</sup>对23例MSI阳性的散发性胃癌移码突变研究中发现, 分别有56%和43%的患者具有hMSH3和hMSH6的移码突变. 但没有检出hMLH3移码突变, 尽管他们发现1例hMLH3腺嘌呤缺失. 然而更多的研究显示, hMLH1启动子甲基化

导致其失活及表达改变或消失<sup>[21-22]</sup>, 在一些胃癌的发病中可能起到更大的作用.

hMLH3是2000年克隆并定性的一种错配修复基因, 定位于14q24.3, 编码全长4.3 kb, 由12个外显子组成. 由于其存在与hMLH1相互作用的区域<sup>[25]</sup>, 且与酵母的MLH3极为相似<sup>[25]</sup>, 因此被预测可能是另一个与人类恶性肿瘤有关的错配修复备选基因. Wu et al<sup>[23]</sup>对288个疑似有HNPCC的索引患者的筛查中发现12个病例中存在10个不同的hMLH3生殖系突变, 1例移码突变和9例错义突变. Liu et al<sup>[24]</sup>在对70个HNPCC家系的研究中共鉴定出一个移码突变和9个错义突变. hMLH3与胃癌的关系除了前文所提的Anna Menoyo外, 再未见其他报道. 然而Anna Menoyo et al的研究对象是散发性胃癌, 他们也只观察了移码突变的情况, 其他的突变情况并没有涉及. 本文的研究尽管亦没有发现移码突变, 但发现了5处错义突变. 尤其是在家系6中由于祖孙三代3例胃癌患者均检出A2173C突变, 显示出该突变在这个胃癌家系中可能具有较强的致病性. 在其他的家系中, 尽管突变与胃癌没有显示出较强的相关性, 但在散发性胃癌及正常对照中均未检出同样的突变, 从而显示这些家系中存在的突变可能也具有一定的致病性. 目前推断hMLH3基因可能作为一个低风险的等位基因, 他可能通过与其他基因互相叠加、共同起作用, 在一些家系中提高了患HNPCC及胃癌等恶性肿瘤的风险. 但其确切的作用, 尚需进行蛋白功能方面的深入研究.

### 4 参考文献

- Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2642-2649
- Tomaszewska R, Okon K, Stachura J. Expression of the DNA mismatch repair proteins (hMLH1 and hMSH2) in infiltrating pancreatic cancer and its relation to some phenotypic features. *Pol J Pathol* 2003;54:31-37
- Geisler JP, Goodheart MJ, Sood AK, Holmes RJ, Hatterman-Zogg MA, Buller RE. Mismatch repair gene expression defects contribute to microsatellite instability in ovarian carcinoma. *Cancer* 2003;98:2199-2206
- Cui L, Jin HY, Cheng HY, Yan YD, Meng RG, Yu DH. Genetic detection of Chinese hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:209-213
- Ponz De Leon M, Benatti P, Di Gregorio C, Pedroni M, Losi L, Genuardi M, Viel A, Fornasari G, Lucci-Cordisco E, Anti M, Ponti G, Borghi F, Lamberti I, Roncucci L. Genetic testing among high-risk individuals in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004;90:882-887
- Zhao B, Wang ZJ, Xu YF, Wan YL, Li P, Huang YT. Report of 16 kindreds and one kindred with hMLH1 germline mutation. *World J Gastroenterol* 2002;8:263-266
- Wang CH, Tang CW, Liu CL, Tang LP. Inhibitory effect of octreotide on gastric cancer growth via MAPK pathway. *World J Gastroenterol* 2003;9:1904-1908
- Sun L, Wang X. Effects of allicin on both telomerase activity and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1930-1934
- Xu C, Li ZS, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Man XH. Distribution of cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from Chinese patients with different gastroduodenal diseases and its clinical and pathological significance. *World J Gastroenterol* 2003;9:2258-2260
- Qiu GB, Gong LG, Hao DM, Zhen ZH, Sun KL. Expression of MTLC gene in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;

- 9:2160-2163
- 11 Gao S, Yu BP, Li Y, Dong WG, Luo HS. Antiproliferative effect of octreotide on gastric cancer cells mediated by inhibition of Akt/PKB and telomerase. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2362-2365
- 12 Zhu JS, Shen B, Chen JL, Chen GQ, Yu XH, Yu HF, Zhu ZM. Molecule action mechanisms of NM-3 on human gastric cancer SGC-7901 cells in vivo or in vitro. *World J Gastroenterol* 2003;9:2366-2369
- 13 Zhang B, Wu Q, Ye XF, Liu S, Lin XF, Chen MC. Roles of PLC-gamma2 and PKCalpha in TPA-induced apoptosis of gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:2413-2418
- 14 Lu JB, Sun XB, Dai DX, Zhu SK, Chang QL, Liu SZ, Duan WJ. Epidemiology of gastroenterologic cancer in Henan Province, China. *World J Gastroenterol* 2003;9:2400-2403
- 15 Liu YB, Wei ZX, Li L, Li HS, Chen H, Li XW. Construction and analysis of SSH cDNA library of human vascular endothelial cells related to gastrocanceroma. *World J Gastroenterol* 2003;9: 2419-2423
- 16 Xu AH, Chen HS, Sun BC, Xiang XR, Chu YF, Zhai F, Jia LC. Therapeutic mechanism of ginkgo biloba exocarp polysaccharides on gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2424-2427
- 17 Wang KX, Wang XF, Peng JL, Cui YB, Wang J, Li CP. Detection of serum anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G in patients with different digestive malignant tumors. *World J Gastroenterol* 2003;9:2501-2504
- 18 Yang LQ, Fang DC, Wang RQ, Yang SM. Effect of NF-kappaB, survivin, Bcl-2 and Caspase3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand. *World J Gastroenterol* 2004;10:22-25
- 19 Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:522-526
- 20 Menoyo A, Alazzouzi H, Espin E, Armengol M, Yamamoto H, Schwartz S Jr. Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHKI in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Res* 2001;61:7727-7730
- 21 Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Luo YH. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2003;9:655-659
- 22 Kang YH, Bae SI, Kim WH. Comprehensive analysis of promoter methylation and altered expression of hMLH1 in gastric cancer cell lines with microsatellite instability. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:119-124
- 23 Wu Y, Berends MJ, Sijmons RH, Mensink RG, Verlind E, Kooi KA, van der Sluis T, Kempinga C, van dDer Zee AG, Hollema H, Buys CH, Kleibeuker JH, Hofstra RM. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 2001; 29:137-138
- 24 Liu HX, Zhou XL, Liu T, Werelius B, Lindmark G, Dahl N, Lindblom A. The role of hMLH3 in familial colorectal cancer. *Cancer Res* 2003;63:1894-1899
- 25 Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxeavanis AD, Lynch HT, Elliott RM, Collins FS. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet* 2000;24:27-35

## World Journal of Gastroenterology 国际检索系统收录

ISI 编制出版的《科学引文索引》(Science Citation Index®-Expanded, SCI-E)是一种大型的综合性检索工具, 收录世界上 5876 多种权威科技期刊. 它具有严格的选刊标准, 是国际公认的进行科学统计与科学评价的主要工具, 是衡量期刊质量和论文学术水平的重要依据. 由于 SCI-E 特有的著者与著者、文献与文献之间的引用与被引用关系, 使之成为目前国际上最具权威性的科研成果评价体系. 一个国家或地区的科技期刊和论文被 SCI-E 收录和引用的多少, 被认为是评价该国或该地区科学研究水平高低的标志之一. 1998 年以来《World Journal of Gastroenterology, WJG》先后被美国《科学引文索引》(SCI-E, Research Alert®, Current Contents/Clinical Medicine®, Journal Citation Reports®, Clinical Medicine Citation Index®), 美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE), 美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA), 荷兰《医学文摘库 / 医学文摘》(EMBASE/Excerpta Medica, EM), 俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journals, AJ) 收录.

# MAPK 信号转导通路与生存素反义寡核苷酸诱导人胃癌细胞凋亡的关系

付 广, 王国斌, 卢晓明, 黄庆先, 郑 海

付广, 王国斌, 卢晓明, 黄庆先, 郑海, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022

付广, 男, 1971-08-30 生, 辽宁省建平县人, 汉族. 1994 年同济医科大学本科毕业, 2004 年武汉市华中科技大学同济医学院博士毕业, 主治医师, 主要从事胃癌的机制和治疗研究.

项目负责人: 付广, 430022, 湖北省武汉市解放大道 1277 号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科. fuguang71@hotmail.com

电话: 027-85726201 传真: 027-85776334

收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-02-01

## MAPK signal transduction and apoptosis of human gastric carcinoma cells induced by liposomes of survivin antisense oligonucleotide

Guang Fu, Guo-Bin Wang, Xiao-Ming Lu, Qing-Xian Huang, Hai Zheng

Guang Fu, Guo-Bin Wang, Xiao-Ming Lu, Qing-Xian Huang, Hai Zheng, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Guang Fu, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, Hubei Province, China. fuguang71@hotmail.com  
Received: 2003-12-29 Accepted: 2004-02-01

## Abstract

**AIM:** To study the relation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction and apoptosis of human gastric carcinoma cells HS-746T induced by liposomes of survivin antisense oligonucleotide (ASODN).

**METHODS:** Survivin ASODN was designed and synthesised to transfect human gastric carcinoma cells HS-746T. The cultured cells were divided into 6 groups: vacuity control group, liposome and sense oligonucleotide (SODN) group, 100, 200 and 400 nmol/L ASODN group and P38MAPK, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) inhibitor groups. Apoptotic index (AI) and proliferative index (PI) were examined by flow cytometry after transfection 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h. RT-PCR, immunocytochemical stain, Western blot, immuno-precipitation and kinase activity assay were used to detect protein expression and activity of P38MAPK, ERK1/2, survivin and survivin mRNA after transfection.

**RESULTS:** Expression of ERK1/2 and P38MAPK has not significantly different among vacuity control group, liposomes group and SODN group. The apoptotic cells increased in anisoconcentration survivin ASODN groups and AI was higher than that of other control group. Apoptotic cells decreased in P38MAPK inhibitor group while increased in ERK1/2. The protein and mRNA expression of survivin de-

creased when transfection concentration was increased. The phosphorylated and nonphosphorylated ERK1/2 showed a dose-and time-dependent decrease whereas protein level of p38MAPK remained unchanged, but activity increased.

**CONCLUSION:** Survivin ASODN can induce apoptosis of human gastric carcinoma cells in vitro though MAPK signal transduction including activating apoptosis-related signal P38MAPK and suppressing proliferation-related signal ERK1/2.

Fu G, Wang GB, Lu XM, Huang QX, Zheng H. MAPK signal transduction and apoptosis of human gastric carcinoma cells induced by liposomes of survivin antisense oligonucleotide. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(5):1034-1039

## 摘要

**目的:** 探讨分裂原激活的蛋白激酶家族(MAPK)信号转导通路与脂质体生存素(survivin)反义寡核苷酸转染诱导人胃癌细胞系 HS-746T 凋亡的关系.

**方法:** 设计合成 survivin 反义寡核苷酸(ASODN)转染胃癌 HS-746T 细胞, 分空白对照组, 脂质体和正义链转染组, 100, 200, 400 nmol/L 反义链转染组及 P38MAPK、ERK1/2 抑制剂组. 用流质细胞仪检测转染后 2, 4, 8, 12, 24 和 48 h 各组细胞增生和凋亡指数. 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫细胞化学染色法、Western blot 蛋白免疫印迹法、免疫沉淀法及激酶活性测定法检测各对照组及 ASODN 组转染后 survivin mRNA 和 P38MAPK, ERK1/2, survivin 蛋白表达和活性的变化.

**结果:** 不同时间空白组、脂质体和正义链转染组 ERK1/2, P38MAPK 表达均无明显差异, 各浓度 survivin ASODN 转染组凋亡细胞增多, 凋亡指数高于其他对照组. P38MAPK 抑制剂组凋亡细胞减少, ERK1/2 抑制剂组增多. Survivin mRNA 和蛋白表达随着转染浓度的增加而降低. 磷酸化和非磷酸化细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase/2, ERK1/2)的表达随药物浓度增加而减弱. P38MAPK 的表达在各组均相同, 但 ASODN 转染组活性增高.

**结论:** Survivin 基因反义寡核苷酸在体外可能通过 MAPK 信号转导通路激活凋亡相关的信号途径 P38MAPK, 阻断与细胞增生相关的信号途径 ERK1/2 来诱导胃癌细胞凋亡, 抑制人胃癌细胞的增生.

付广, 王国斌, 卢晓明, 黄庆先, 郑海. MAPK 信号转导通路与生存素反义寡核苷酸诱导人胃癌细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1034-1039  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1034.asp>

## 0 引言

生存素(survivin)是细胞内凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis family of protein, IAPs)的一个新成员, 他可以通过有丝分裂促进细胞增生, 抑制细胞凋亡. 研究表明, 应用反义策略阻断 survivin 表达在体外可明显抑制胃癌细胞的生长. 分裂原激活的蛋白激酶家族(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通过三级酶促级联反应激活并调节特定的基因表达, 他所介导的信号转导通路是将细胞外丝裂原信号传递给细胞核并产生反应的重要通路, 在细胞增生和凋亡的调节中起重要作用. 我们在观察了 survivin 反义寡核苷酸(ASODN)诱导胃癌细胞 HS-746T 凋亡的基础上, 进一步探讨其与 MAPK 信号转导通路的关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 脂质体 Lipofectin 购自 LifeTechnologies 公司; 人胃癌细胞系 HS-746T 购自武汉大学培养物保存中心; RPMI1640 购自 GIBCO 公司; ECL 显色试剂盒购自武汉亚法生物工程公司. 抗磷酸化 ERK1/2 和磷酸化 p38MAPK 的抗体, 抗总 ERK1/2 和总 p38MAPK 蛋白的抗体及 PD98059, SB203580 购自美国 Sigma 公司. 根据生存素的基因序列(Genbank Accession Number: U75285), 应用 primer 5.0 软件设计互补于生存素 mRNA 的 232-251 序列的 20 个碱基组成的 ASODN 链, 序列为 5' -CCCAGCCTTCCAGCTCCTTG-3', 同时合成正义链, 序列为 5' -CAAGGAGCTGGAAGGCTGGG-3', 两序列在合成时均用巯基取代寡核苷酸片段磷上的羟基修饰. 在 Genbank 中行 Blastn 证实 ASODN 及 SODN 与任何已知哺乳动物基因无匹配. ASODN 5' 端以绿色荧光蛋白标记, 由上海生工生物公司合成.

1.2 方法 水浴复苏人胃癌细胞系 HS-746T 后接种于 30 mL 培养瓶及铺有无菌盖玻片的 6 孔培养板上, 在 37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养液常规培养, 胰蛋白酶消化细胞并计数, 培养至 80% 融合后取对数生长期细胞进行转染. 实验共分 6 组, 为空白对照组, 脂质体转染对照组, SODN 转染对照组和 100, 200, 400 nmol/L 三种浓度的 ASODN 转染组, 每组设 3 个复孔. 另设置 6 组转染时分别加入 ERK1/2 和 p38MAPK 特异性抑制剂 10 μmol/L PD98059, SB203580, 转染结束后再根据转染进行 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 分为 6 组, 收集不同时间的细胞进行检测. 采用阳离子脂质体 Lipofectin 进行转染, 将接种于 6 孔板培养至 80% 汇片的 HS-746T 细胞去除培养基, 用温热无血清的 RPMI 1640 漂洗细胞 2 次. 分别将寡核苷酸及 Lipofectin 10 mL 溶于预暖的无血清 RPMI 1640 100

和 90 μL, 室温下静置 30 min 后轻柔混合二者, 孵育 15 min, 不加抗生素, 用 800 μL 无血清 RPMI 1640 稀释后轻铺于细胞上, 在 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育. 8 h 后去除转染液, 继续以含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养. 培养过程中常规用台盼蓝染色法检测各组细胞死亡率均小于或等于 5%.

1.2.1 免疫细胞化学染色 按 SP 法操作, 制作培养的各组胃癌细胞爬片用冷丙酮固定, 加 3 mL/L 甲醇于室温封闭 30 min, 室温振荡 3 次, 用含 100 mL/L 山羊血清的 PBS 室温封闭 30 min. 分别加入一抗, 湿盒中 4 °C 过夜, 再加入通用型生物素化二抗 37 °C 孵育 30 min, 最后加入辣根酶标记的链霉亲和素, 37 °C 孵育 30 min. DAB 显色, 苏木素复染, 常规脱水, 透明, 中性树脂胶封片, 设置 PBS 代替一抗作为阴性对照. 稀释度为: 抗 ERK1/2 : 1 : 200; 抗 p38 : 1 : 200; 抗 p-ERK1/2 : 1 : 100; 抗 p-p38 : 1 : 100.

1.2.2 分析细胞凋亡比率及细胞周期 收集  $1.0 \times 10^6$  个细胞, 70 mL/L 冷乙醇 4 °C 固定, 加 RNase A 37 °C 孵育 1 h, 碘化丙啶(PI) 避光冰浴染色 1 h. 采用 Beckon/Dickinson FacsSort 型流式细胞仪, 在 488 nm 波长处进行检测, 用 multicycle 软件分析凋亡指数, DNA 含量及细胞周期, 细胞凋亡指数(AI) = 亚二倍峰细胞数 / 总细胞数  $\times 100\%$ , 细胞增生指数(PI) =  $(S+G2/M)/(G0/G1+S+G2/M) \times 100\%$ .

1.2.3 检测胃癌细胞 Survivin, ERK1/2 及 P38MAPK 蛋白表达 将转染后继续培养 4, 12, 24 h 的胃癌细胞用 PBS 液漂洗 3 次后加入预冷至 4 °C 的 50 μL 裂解缓冲液, 冰上作用 20 min, 4 °C, 12 000 r/min 离心 20 min, 上清液保存于 -20 °C. 采用 BCA 法测定蛋白质浓度, 用 40 μg/孔上样, 120 g/L SDS PAGE 凝胶电泳分离, 通过电转移法将蛋白质从 SDS PAGE 凝胶转移至硝酸纤维素膜后在含 50 g/L 脱脂奶粉的 TTBS 中 37 °C 封闭 90 min, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜, TTBS 漂洗后(10 min  $\times$  3 次), 加入二抗, 7 °C 作用 40 min, TTBS 充分漂洗(10 min  $\times$  3 次), 洗膜后加入增强化学发光底物 ECL 试剂. X 线片暗室曝光, 常规显影定影. 图像以 Bio Rad 图像分析系统分析, 用蛋白条带的平均光强度值表示 survivin, ERK1/2 及 P38MAPK 蛋白表达的相对强度.

1.2.4 检测胃癌细胞 survivin mRNA 表达 取转染后继续培养 24 h 的  $1 \times 10^6$  个胃癌细胞用 PBS 液漂洗 2 次, 以 Trizol 试剂提取总 RNA, 用紫外分光光度计检验纯度并定量. 在 1% 甲醛变性凝胶上电泳验证 RNA 完整性后逆转录为 cDNA, 产物进行 PCR, 设 GAPDH 为内参照, 对样品模板用量标准化, Survivin 和 GAPDH 分管扩增, 引物由上海生工公司合成. Survivin 引物(扩增产物 727 bp)序列: 上游 5' -GGGACCCGTTGGCAGAG-3', 下游 5' -AAAATGAGCCCCCAAAAAGA-3'; GAPDH 引物(扩增产物 372 bp)序列: 上游 5' -CACCATTCTCCAGGAGCGAG-3', 下游 5' -TCACGCCACA



GTTTCCCGGA-3'. RT-PCR 条件: 50 °C 逆转录 30 min, 94 °C 变性 2 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35(survivin)或26(GAPDH)个循环, 72 °C 充分延伸 10 min. PCR 扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以 Fluor S 多功能成像系统扫描拍照分析, 用以下公式计算其相对抑制率. 抑制率 =  $[1 - (\text{实验样品} / \text{实验内参}) / (\text{空白对照样品} / \text{空白对照内参})] \times 100\%$ .

1.2.5 ERK1/2, p38 MAPK 活性分析 参照李田昌 et al(基础医学与临床 1996;16:78-80)的方法, 将提取的各组胃癌细胞质蛋白稀释至 1.3 g/L, 分别与浓度为 0.5 g/L 的抗 ERK1/2, p38MAPK 抗体 4 °C 共同孵育 4 h, 加入激酶缓冲液 25 μL, 在 25 °C 水浴孵育 30 min, 加入 20 μmol/L ATP, 1.85 MBq [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 启动磷酸化反应, 然后进行放射自显影, β 液闪测定仪上测 cpm 值计数, 测定 <sup>32</sup>P 的放射活性, 以每克蛋白质 <sup>32</sup>P 的掺入量 [pkat/g] 表示 ERK1/2, p38MAPK 活性.

统计学处理 各组实验数据以平均值 ± 标准差 (mean ± SD) 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析, 多个样本间比较行单因素方差分析, 组间两两比较用 q 检验.  $P < 0.05$ , 差异在统计学上有显著性意义.

## 2 结果

2.1 Survivin ASODN 转染及 p38MAPK, ERK 抑制剂对胃癌细胞形态的影响 倒置荧光显微镜下观察各组胃癌细胞的变化, 不同浓度的 ASODN 转染组细胞可见清晰的绿色荧光, 空白对照组, 脂质体转染对照组, SODN 转染对照组则未见到(图 1). 光镜下见 ASODN 转染组 2 h 后有部分细胞贴壁性降低, 细胞变圆漂起, 突起收缩, 形成凋亡小体, 24 h 后达到高峰, 有大量坏死细胞漂浮(图 2 A, B). 加入 p38MAPK, ERK 抑制剂 SB203580, PD98059 后, ERK 组坏死细胞增多, 贴壁细胞减少; 而 p38MAPK 组效应则相反(图 2 C, D).

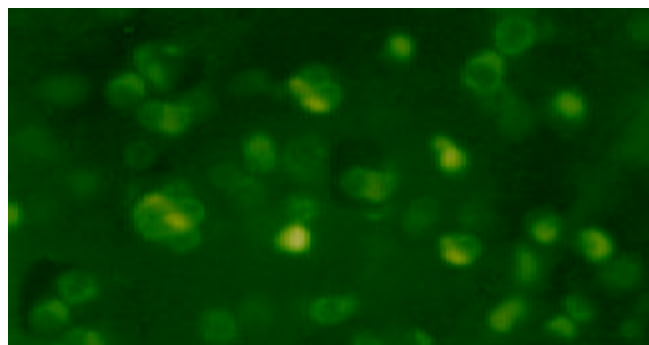


图 1 ASODN 转染后胃癌细胞 倒置荧光显微镜 × 200

2.2 免疫细胞化学检测结果 免疫组化染色后未见加抑制剂的对照组 p38MAPK, ERK 蛋白主要位于胃癌细胞核周区, 染色较弱, 呈淡黄色颗粒. ASODN 实验组中 p38MAPK 与其无明显差别, 而 ERK 蛋白则分布于胞核及胞质内, 黄染减弱(图 3 A, B). 加抑制剂的对照组和实验组中, 二者表达均减低.

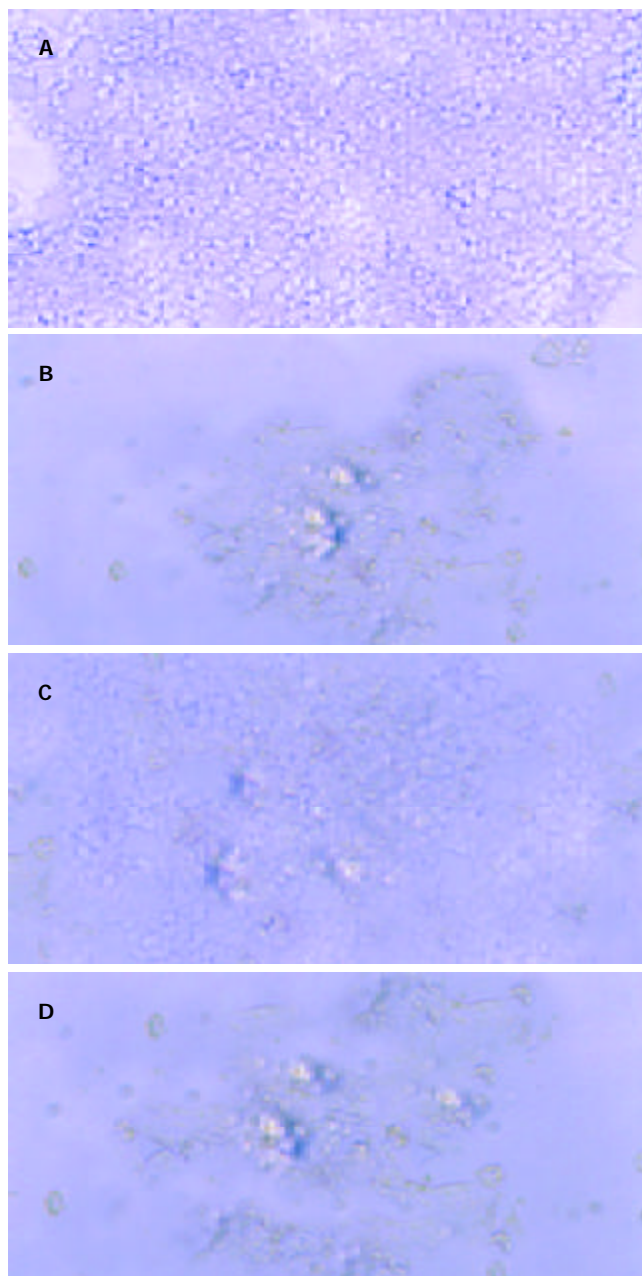


图2 胃癌细胞系HS-746T LM × 200. A: 空白对照组正常生长; B: ASODN 转染组; C: 转染后 p38MAPK 抑制剂组 D: 转染后 ERK 抑制剂组.

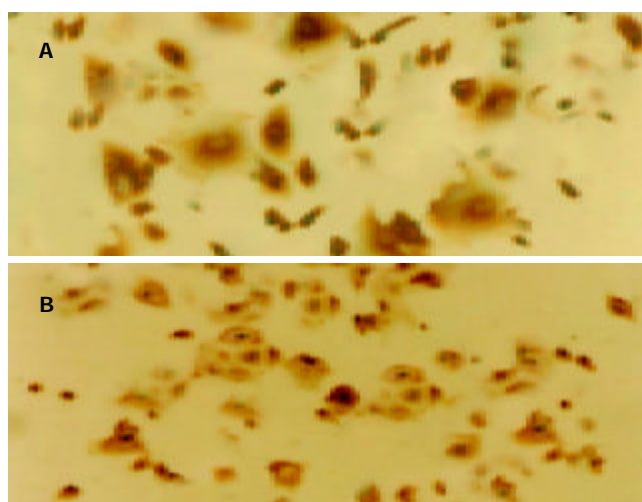


图3 胃癌细胞免疫组化 SP × 200. A: 对照组 p38MAPK B: ASODN 实验组 ERK.

**2.3 转染 survivin ASODN 对胃癌细胞凋亡和增生的影响** 用流式细胞仪定量检测发现各对照组不同时间人胃癌细胞凋亡指数(AI)无显著性差异, 不同浓度 ASODN 转染组 DNA 直方图可见二倍体峰减少,  $G_1$  峰左侧出现明显的亚二倍体凋亡峰, 转染 24 h 后测空白对照组, 脂质体转染组, SODN 转染组, 100, 200, 400 nmol/L ASODN 转染组细胞凋亡率分别为 0.8%, 1.0%, 1.3%, 14.8%, 19.4% 及 53.8%。400 nmol/L ASODN 转染组诱导凋亡最为明显, 各 ASODN 转染组细胞 AI 明显高于各对照组, 差异在统计学上有显著意义( $P < 0.05$ )。400 nmol/L 组 AI 明显高于 100, 200 nmol/L 组, 差异在统计学上也有显著意义( $P < 0.05$ )。

**2.4 转染 survivin ASODN 对胃癌细胞 survivin 蛋白及 mRNA 表达的影响** Western blot 印迹法显示各对照组不同时间人胃癌细胞内 survivin 蛋白表达无明显差异, 不同浓度 ASODN 转染组 survivin 蛋白表达均较各对照组低。应用计算机对条带净密度进行分析发现, ASODN 转染对 survivin 蛋白的抑制作用有明显的剂量依赖性, survivin 蛋白表达随着转染浓度的增加而降低, 转染 24 h 后 400 nmol/L 转染组蛋白表达仅为空白对照组的 30.5% (图 4 A)。RT-PCR 产物电泳结果显示出 372 bp 的 GAPDH DNA 片段和 727 bp 的 survivin 基因片段, 不同时间对照组人胃癌细胞内 survivin mRNA 表达量差异无显著意义。与各对照组相比较, 各浓度 ASODN 转染组 survivin mRNA 表达量均显著降低, 而且随着 ASODN 浓度增加, Survivin mRNA 表达量逐渐下降, 对 mRNA 表达相对抑制率逐渐升高, 转染 24 h 后 400 nmol/L 转染组相对抑制率可达 68.3%, ASODN 的抑制作用具有明显的剂量依赖性, 他可有效抑制人胃癌细胞内 survivin mRNA 表达(图 4 B)。

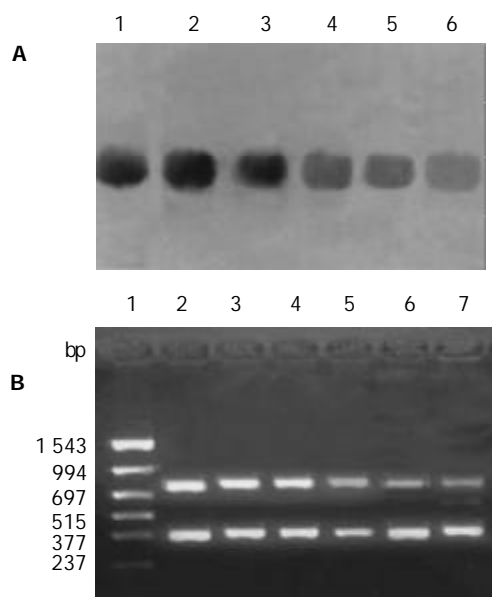


图 4 转染后 24 h 胃癌细胞 survivin 蛋白及 mRNA 表达。A: 1-6: 空白对照组, 脂质体转染组, SODN 转染组, 100, 200, 400 nmol/L ASODN 转染组; B: 1-7: Marker, 空白对照组, 脂质体转染组, SODN 转染组和 100, 200, 400 nmol/L ASODN 转染组。

**2.5 ERK1/2 和 p38MAPK 特异性抑制剂对胃癌细胞凋亡和增生的影响** 流式细胞术定量检测发现转染 survivin ASODN 24 h 后, 在用 p38MAPK 抑制剂 SB203580 组中, 空白对照组, 脂质体转染组, SODN 转染组, 100, 200, 400 nmol/L ASODN 转染组细胞凋亡率分别为 0.7%, 0.9%, 1.1%, 11.3%, 13.2% 及 31.5%, 均比未用抑制剂者减低。而在用 ERK1/2 抑制剂 PD98059 组中, 各组细胞凋亡率分别为 0.9%, 1.2%, 1.4%, 17.3%, 23.4% 及 63.5%, 均比未用抑制剂者增高。各 ASODN 转染组之间的差异在统计学上有显著意义( $P < 0.05$ )。

**2.6 转染 survivin ASODN 对胃癌细胞 ERK1/2 及 P38MAPK 活性及蛋白表达的影响** Western blot 法检测细胞转染后 4, 12, 24 h 的 ERK1/2 及 P38MAPK 活性(磷酸化水平), 同时检测非磷酸化的 ERK1/2 及 P38MAPK 蛋白表达情况作为对照。结果显示, 各对照组不同时间人胃癌细胞内磷酸化和非磷酸化的 ERK1/2, P38MAPK 蛋白表达无明显差异, 不同浓度 ASODN 转染组 p-ERK1/2 及 ERK1/2 表达均较各对照组低, 且随着时间延长和浓度增高而降低; 而 P38MAPK 蛋白在不同时间表达均相同, 但 p-P38MAPK 较各对照组高。应用计算机对条带净密度进行分析发现, p-ERK1/2, ERK1/2, p-P38MAPK 蛋白表达对 ASODN 转染浓度有明显的剂量依赖性, 转染 24 h 后 400 nmol/L 转染组 p-ERK1/2, ERK1/2, p-P38MAPK 表达为空白对照组的 50.5%, 45.6%, 180.7%(图 5)。

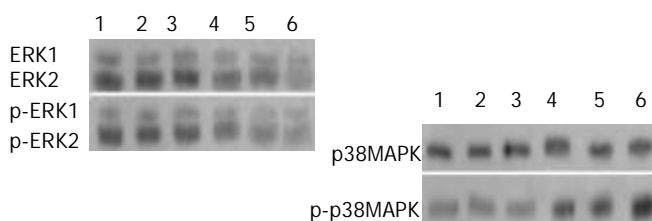


图 5 转染 survivin ASODN 后 24 h 磷酸化和非磷酸化的 ERK1/2, P38MAPK 蛋白表达。1-6: 空白对照组, 脂质体转染组, SODN 转染组, 100, 200, 400 nmol/L ASODN 转染组。

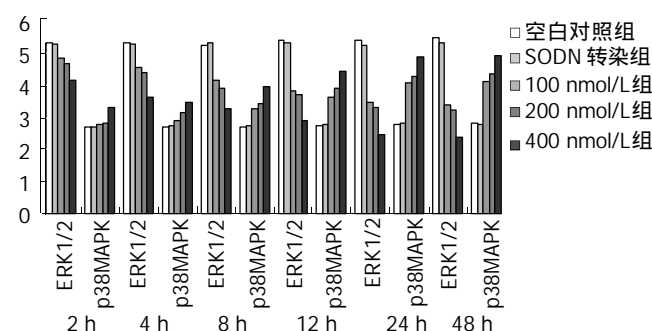


图 6 转染 survivin ASODN 后不同时间 ERK1/2 及 P38MAPK 的活性 pkat/g。

**2.7 ERK1/2 及 P38MAPK 活性的检测** 激酶活性检测结果显示, 转染 survivin ASODN 后 P38MAPK 活性随时间延长逐渐增高, 24 h 后增势减缓; 而 ERK1/2 活性则具

有与 P38MAPK 活性变化相反的趋势. 各对照组 ERK1/2 及 P38MAPK 活性变化不大, 与各实验组相比较, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ , 图 6).

### 3 讨论

近年研究显示, 利用反义技术, 抑制或封闭基因的表达, 干扰致病蛋白质的产生, 对肿瘤具有良好的治疗作用<sup>[1-4]</sup>. Survivin 基因是细胞内凋亡抑制蛋白家族的一个新成员, 他与胃癌的形成和发展有着较大的关系<sup>[5-9]</sup>. 我们以 survivin 为靶分子, 利用脂质体反义寡核苷酸在体外能够通过下调 survivin mRNA 和蛋白的表达, 诱导胃癌细胞凋亡, 抑制人胃癌细胞的增生能力. 由于 survivin 基因表达的蛋白定位于细胞有丝分裂的纺锤体, 而分裂原激活的蛋白激酶家族(MAPK)活性的异常又与肿瘤的发生和细胞凋亡的信号转导关系密切<sup>[10-13]</sup>, 所以推测 MAPK 通路可能参与了反义寡核苷酸诱导胃癌细胞凋亡的过程. 实验结果显示, 在 ASODN 实验组中加入 p38MAPK, ERK 抑制剂能够影响胃癌细胞凋亡率的变化, 且磷酸化和非磷酸化的 p38MAPK, ERK1/2 蛋白表达及二者的活性在实验组和对照组中均有不同, 这提示了 MAPK 通路中的 p38MAPK、ERK1/2 途径与 survivin ASODN 诱导胃癌细胞凋亡的过程有很大关系.

MAPK 信号转导通路是介导细胞反应的重要信号系统<sup>[14-23]</sup>, MAPK 的活化能将细胞生长因子等丝裂原信号传递到细胞核内诱导大多数真核细胞增生分化. 现在已经确定哺乳动物细胞中 MAPKs 途径大致分为 4 种: ERK1/2 途径, ERK5 途径, JNK 途径, p38 途径. 其中 p38MAPK 通路被称为应激激活的 MAPK 通路, 其被激活的磷酸化级联反应是: MLK(DLK)/TAK/ASK-MEK3/6-p38 MAPK, 主要增强细胞对应激原的抵抗力并介导细胞凋亡的信号转导;而细胞外信号调节激酶(ERK1/2)为分裂原激活的 MAPK 通路, 其级联反应是: Raf mos/TPL-1/2-ERK1/2, 主要介导细胞增生和分化的信号转导. MAPK 级联反应非常复杂, 这些通路可被不同的细胞外信号所激活, 然后将特异的细胞外刺激信号诱发的蛋白激酶酪氨酸磷酸化转变为蛋白激酶丝氨酸/苏氨酸磷酸化, 从而使信号向下游传导. 因此他位于许多细胞因子信号传导途径中的汇聚点. ERK1/2 主要与细胞的增生通路有关, 而 p38 主要在诱导细胞凋亡的信号传导途径中起作用, 两种途径可以独立或同时被激活. 在我们的研究中发现, ASODN 实验组中加入 p38MAPK 抑制剂 SB203580 后, 胃癌细胞凋亡减少;而加入 ERK 抑制剂 PD98059 后, 细胞凋亡增多, 二者呈现相反的效应. 对转染 survivin ASODN 后不同时间胃癌细胞 ERK1/2 及 P38MAPK 蛋白表达及活性分析显示, 不同浓度 ASODN 转染组 p-ERK1/2, ERK1/2 蛋白表达及激酶活性均较各对照组低, 且呈时间和剂量依赖性. 而 P38MAPK 的表达情况则与 ERK1/2 明显不同, 非磷酸化的 P38MAPK 蛋白无论在各对照组还是 ASODN

实验组, 表达均差异不大, 统计学上无显著性意义;但磷酸化的 P38MAPK 蛋白及激酶活性却明显增高, 也呈时间和剂量依赖性. 这些结果说明了 P38MAPK 蛋白在胃癌细胞中表达较稳定, 虽然 survivin ASODN 转染不能引起他的变化, 但他可致 P38MAPK 活性的增高, ERK1/2 蛋白表达及激酶活性的降低. Survivin ASODN 转染诱导胃癌细胞凋亡可能是通过促进 P38MAPK 活性, 抑制 ERK1/2 蛋白表达及活性, 产生相互协同效应来实现.

MAPK 通路的激活导致细胞增生主要是通过激活 raf1, 然后依次使 MEK 磷酸化, 激活 ERK1/2, 抑制 P38MAPK, 诱导细胞周期素, 激活细胞周期素依赖激酶, 促使 Rb 蛋白磷酸化, 从而导致细胞增生. Survivin 反义寡核苷酸抑制胃癌细胞的增生能力可能是通过抑制 survivin mRNA 及蛋白的产生, 使有丝分裂原形成减少, 从而抑制上述的过程, 提高 P38MAPK 的活性, 导致胃癌细胞增生减少, 凋亡增加. 总之, 胃癌在我国常见<sup>[24-35]</sup>, 利用反义技术诱导癌细胞凋亡的信号转导是一个复杂的过程, 其确切机制还有待进一步研究.

### 4 参考文献

- 1 Abaza MS, Al-Attayah RJ, Al-Saffar AM, Al-Sawan SM, Moussa NM. Antisense oligodeoxynucleotide directed against c-myc Has anticancer activity and potentiates the antiproliferative effect of conventional anticancer drugs acting by different mechanisms in human colorectal cancer cells. *Tumour Biol* 2003;24:241-257
- 2 Zang XP, Lerner MR, Dunn ST, Brackett DJ, Pento JT. Antisense KGF oligonucleotide inhibition of KGF-induced motility in breast cancer cells. *Anticancer Res* 2003;23:4913-4919
- 3 Du QY, Wang XB, Chen XJ, Zheng W, Wang SQ. Antitumor mechanism of antisense c-myc targeting human telomerase reverse transcriptase. *World J Gastroenterol* 2003;9:2030-2035
- 4 Gu ZP, Wang YJ, Li JG, Zhou YA. VEGF165 antisense RNA suppresses oncogenic properties of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:44-48
- 5 Yang XY, Wang MW, Wang GS, You WD. Expression of human anti-apoptotic gene survivin and its splice in normal human gastric tissue and gastric cancer. *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2003;20:75-76
- 6 Wakana Y, Kasuya K, Katayanagi S, Tsuchida A, Aoki T, Koyanagi Y, Ishii H, Ebihara Y. Effect of survivin on cell proliferation and apoptosis in gastric cancer. *Oncol Rep* 2002;9:1213-1218
- 7 Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, Wang HB, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 2002;87:91-97
- 8 Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Muller W, Takeno S, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br J Cancer* 2002;86:737-743
- 9 Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, Takano Y. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001;163:109-116
- 10 Zhao Y, Wu K, Yu Y, Li G. Roles of ERK1/2 MAPK in vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Weisheng Yanjiu* 2003;32:573-575
- 11 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

- 12 Park MT, Choi JA, Kim MJ, Um HD, Bae S, Kang CM, Cho CK, Kang S, Chung HY, Lee YS, Lee SJ. Suppression of extracellular signal-related kinase and activation of p38 MAPK are two critical events leading to caspase-8- and mitochondria-mediated cell death in phytosphingosine-treated human cancer cells. *J Biol Chem* 2003;278:50624-50634
- 13 Ling MT, Wang X, Ouyang XS, Lee TK, Fan TY, Xu K, Tsao SW, Wong YC. Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth. *Oncogene* 2002;21:8498-8505
- 14 Sawafuji K, Miyakawa Y, Weisberg E, Griffin JD, Ikeda Y, Kizaki M. Aminopeptidase inhibitors inhibit proliferation and induce apoptosis of K562 and STI571-resistant K562 cell lines through the MAPK and GSK-3 $\beta$  pathways. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1987-1996
- 15 Wu J, Haugk K, Plymate SR. Activation of pro-apoptotic p38-MAPK pathway in the prostate cancer cell line M12 expressing a truncated IGF-IR. *Horm Metab Res* 2003;35:751-757
- 16 Levy-Nissenbaum O, Sagi-Assif O, Raanani P, Avigdor A, Ben-Bassat I, Witz IP. cDNA microarray analysis reveals an overexpression of the dual-specificity MAPK phosphatase PYST2 in acute leukemia. *Methods Enzymol* 2003;366:103-113
- 17 Zhu KQ, Zhang SJ. Involvement of ATM/ATR-p38 MAPK cascade in MNNG induced G1-S arrest. *World J Gastroenterol* 2003;9:2073-2077
- 18 Liu HS, Pan CE, Liu QG, Yang W, Liu XM. Effect of NF-kappaB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2513-2518
- 19 Wang CH, Tang CW, Liu CL, Tang LP. Inhibitory effect of octreotide on gastric cancer growth via MAPK pathway. *World J Gastroenterol* 2003;9:1904-1908
- 20 Nemeth ZH, Leibovich SJ, Deitch EA, Sperlagh B, Virag L, Vizi ES, Szabo C, Hasko G. Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:883-888
- 21 Fujikawa K, Miletic AV, Alt FW, Faccio R, Brown T, Hoog J, Fredericks J, Nishi S, Mildiner S, Moores SL, Brugge J, Rosen FS, Swat W. Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *J Exp Med* 2003;198:1595-1608
- 22 Lee KH, Hyun MS, Kim JR. Growth factor-dependent activation of the MAPK pathway in human pancreatic cancer: MEK/ERK and p38 MAP kinase interaction in uPA synthesis. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:499-505
- 23 Kundu AK, Nagaoka M, Chowdhury EH, Hirose S, Sasagawa T, Akaike T. IGF-1 induces growth, survival and morphological change of primary hepatocytes on a galactose-bared polymer through both MAPK and beta-catenin pathways. *Cell Struct Funct* 2003;28:255-263
- 24 Lu JB, Sun XB, Dai DX, Zhu SK, Chang QL, Liu SZ, Duan WJ. Epidemiology of gastroenterologic cancer in Henan Province, China. *World J Gastroenterol* 2003;9:2400-2403
- 25 Zhang C, Liu ZK. Gene therapy for gastric cancer: a review. *World J Gastroenterol* 2003;9:2390-2394
- 26 Zhu XD, Lin GJ, Qian LP, Chen ZQ. Expression of survivin in human gastric carcinoma and gastric carcinoma model of rats. *World J Gastroenterol* 2003;9:1435-1438
- 27 Wang LD, Zheng S, Zheng ZY, Casson AG. Primary adenocarcinomas of lower esophagus, esophagogastric junction and gastric cardia: in special reference to China. *World J Gastroenterol* 2003;9:1156-1164
- 28 Yin GY, Zhang WN, Shen XJ, Chen Y, He XF. Ultrastructure and molecular biological changes of chronic gastritis, gastric cancer and gastric precancerous lesions: a comparative study. *World J Gastroenterol* 2003;9:851-857
- 29 Guo HQ, Guan P, Shi HL, Zhang X, Zhou BS, Yuan Y. Prospective cohort study of comprehensive prevention to gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:432-436
- 30 Xi WD, Zhao C, Ren GS. Endoscopic ultrasonography in pre-operative staging of gastric cancer: determination of tumor invasion depth, nodal involvement and surgical resectability. *World J Gastroenterol* 2003;9:254-257
- 31 Chen C, Liu FK, Qi XP, Li JS. The study of chemiluminescence in gastric and colonic carcinoma cell lines treated by anti-tumor drugs. *World J Gastroenterol* 2003;9:242-245
- 32 Cai L, Zheng ZL, Zhang ZF. Risk factors for the gastric cardia cancer: a case-control study in Fujian Province. *World J Gastroenterol* 2003;9:214-218
- 33 Hu JK, Chen ZX, Zhou ZG, Zhang B, Tian J, Chen JP, Wang L, Wang CH, Chen HY, Li YP. Intravenous chemotherapy for resected gastric cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol* 2002;8:1023-1028
- 34 Niu WX, Qin XY, Liu H, Wang CP. Clinicopathological analysis of patients with gastric cancer in 1200 cases. *World J Gastroenterol* 2001;7:281-284
- 35 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804

# 肿瘤转移抑制基因KAI1对MHCC97-H肝癌细胞粘弹性的影响

彭志红, 杨建民, 司遂海, 房殿春, 陈文生, 罗元辉

彭志红, 杨建民, 司遂海, 房殿春, 陈文生, 罗元辉, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038  
彭志红, 女, 1975-08-11 生, 四川省郫县人, 汉族, 2001 年第三军医大学消化病学硕士生, 主要从事肝癌侵袭转移机制及基因治疗研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30070348  
项目负责人: 杨建民, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心. jianminyang@hotmail.com  
电话: 023-68754678  
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-08

## Effects of metastasis-suppressor gene KAI1 on viscoelastic properties of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells with high metastatic potential

Zhi-Hong Peng, Jian-Min Yang, Sui-Hai Si, Dian-Chun Fang, Wen-Sheng Chen, Yuan-Hui Luo

Zhi-Hong Peng, Jian-Min Yang, Sui-Hai Si, Dian-Chun Fang, Wen-Sheng Chen, Yuan-Hui Luo, Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30070348  
Correspondence to: Jian-Min Yang, Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. jianminyang@hotmail.com  
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-08

## Abstract

**AIM:** To study the effects of metastasis-suppressor gene KAI1 on viscoelastic properties of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells with high metastatic potential.

**METHODS:** The viscoelastic properties of MHCC97-H cells with high metastatic potential transfected with sense or antisense KAI1 expression plasmid in our previous experiments were measured by means of micropipette aspiration technique.

**RESULTS:** The elastic coefficients K1, K2 and  $\mu$  of the MHCC97-H cells were significantly higher after transfected with sense KAI1 expression plasmid ( $P=0.007$ ), lower after transfected with antisense KAI1 expression plasmid ( $P=0.000$ ), and no significantly different after transfected with its control vector pCI-neo without KAI1 gene ( $P=0.444$ ), as compared with their paternal MHCC97-H cells.

**CONCLUSION:** The metastasis-suppressor gene KAI1 may significantly affect the viscoelastic properties of MHCC97-H cells with high metastatic potential. It offers an important clue to study the mechanisms of invasion and metastasis of the malignant tumor.

Peng ZH, Yang JM, Si SH, Fang DC, Chen WS, Luo YH. Effects of metastasis-suppressor gene KAI1 on viscoelastic properties of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells with high metastatic potential. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1040-1043

## 摘要

**目的:** 探讨肿瘤转移抑制基因KAI1对高转移潜能肝癌细胞MHCC97-H粘弹性的影响。

**方法:** 采用微管吸吮技术研究我们前已转染人类KAI1全长正或反义结构基因的人肝癌MHCC97-H细胞粘弹特性。

**结果:** MHCC97-H肝癌细胞的粘弹性系数K1, K2,  $\mu$ 在转染KAI1正义基因后明显增加( $P=0.007$ ), 在转染KAI1反义基因后明显降低( $P=0.000$ ), 而转染空载体后则无明显变化( $P=0.444$ )。

**结论:** KAI1基因对肝癌细胞的粘弹性有明显影响, 这为肝癌侵袭和转移机制的研究提供了重要线索。

彭志红, 杨建民, 司遂海, 房殿春, 陈文生, 罗元辉. 肿瘤转移抑制基因KAI1对MHCC97-H肝癌细胞粘弹性的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1040-1043

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1040.asp>

## 0 引言

肝癌是常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-7]</sup>, 严重威胁人类健康, 其侵袭转移和复发是患者死亡的主要原因<sup>[8-12]</sup>, 因此, 探索肝癌转移、复发的发生机制, 寻求有效的抗转移治疗措施, 对改善肝癌患者的预后具有重要意义. 肿瘤的侵袭和转移是具有复杂细胞流变学机制的病理过程, 其浸润性生长和穿透内皮细胞的过程是以癌细胞的运动和变形为基础的, 而粘弹性则是与细胞运动和变形密切相关的生物物理特性. 我们从此角度入手, 试图通过探讨肿瘤转移抑制基因KAI1对高转移潜能肝癌细胞MHCC97-H粘弹性的影响, 进而揭示肝癌细胞侵袭、转移的可能分子生物力学机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** MHCC97-H肝癌细胞系为上海复旦大学医学院附属中山医院肝癌研究所建立<sup>[13]</sup>的高转移潜能细胞, 属贴壁生长型. 我们前已利用亚克隆技术构建了人类KAI1全长正、反义结构基因哺乳动物真核表达



质粒, 通过 DOTAP 脂质体介导的转染系统分别将其转入该肝癌细胞中, 并进行了基因整合和表达的鉴定, 说明基因转染成功, 可获得预期 KAI1 蛋白表达<sup>[14]</sup>. 转染有 KAI1 正义基因的肝癌细胞重新命名为 MHCC97-H-S, 转染有 KAI1 反义基因的肝癌细胞命名为 MHCC97-H-AS, 转染有 pCI-neo 空载体的肝癌细胞命名为 MHCC97-H-pCI. 细胞培养条件为: 高糖 DMEM 加 100 mL/L 胎牛血清和两种抗生素(青霉素 100 mg/L, 链霉素 100 mg/L), 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 饱和湿度培养. 在细胞处于对数生长期时均经 2.5 g/L 酶 /0.4 g/L EDTA 消化后悬浮于 DMEM 培养液中, 浓度约为 5 × 10<sup>5</sup>/L. 微管吸吮实验中细胞分为 4 组, 分别为 MHCC97-H-S 组、MHCC97-H-AS 组、MHCC97-H-pCI 组及 MHCC97-H 亲本细胞对照组, 每组各观察测量 20 个细胞. 整个微管吸吮实验在 3 h 内完成.

## 1.2 方法

**1.2.1 微管吸吮实验** 采用微管吸吮技术对单个细胞的粘弹性特性进行实验测试<sup>[15]</sup>. 本实验在重庆大学生物医学工程学院及国家教育部生物力学与组织工程重点实验室完成. 微管吸吮实验系统由倒置显微镜、显微微操作器、图像处理仪、压力控制和记录系统及微管等部分组成(图 1). 将细胞悬液 0.5 mL 注入一特定的圆形小室内, 一同置于倒置显微镜(Axiovert 35, Zeiss Co.德国)载物台上. 微管采用普通玻璃毛细管由微管控制器(P-87.S  $\mu$ ttter Ins.Co., 美国)控制而成, 微管与显微微操作器(MR5170, eppendorf Co., 德国)相连并通过他连接于压力控制和记录系统. 利用显微微操作器控制微管尖端靠近细胞表面, 并用重庆大学研制的自动压力控制和记录系统通过微管给细胞施以阶跃负压, 使细胞的一小部分吸入微管, 细胞在微管内的变形时间过程由图像处理仪(Vidas21, 德国)记录, 并通过回放所记录的图像测量细胞在微管内的变形值. 所有实验均在室温(约 15 °C)下进行, 整个系统在图像监视器上的放大倍数为 3 500 倍, 并用 40  $\mu$ m 的光栅尺进行标定.

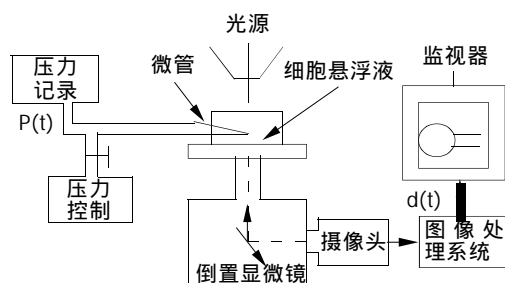


图 1 微管吸吮实验系统.

**1.2.2 细胞粘弹性模型** 在本研究中, MHCC97-H 细胞在外加负压作用下发生小的被动变形. 肝癌细胞可视为不可压缩的均质粘弹性球形固体, 其半径为  $R$ . 为对实验结果进行分类和比较, 采用一粘弹性拟合实验结果, 可定量地比较在不同条件下细胞的粘弹性参数. 参

照文献[16]选用标准线性固体模型拟合肝癌细胞变形的实验数据. 该模型由两条平行的“臂”组成, 其中一臂为弹性系数为  $K_1$  的弹性元件, 另一臂为弹性系数为  $K_2$  的弹性元件与粘性系数为  $\mu$  的粘性元件串联组成, 其本构方程由下式给出:

$$\sigma + (m/K_2) \partial \sigma / \partial t = K_1 \epsilon + m [1 + (K_1/K_2)] \partial \epsilon / \partial t$$

这里  $\sigma$  和  $\epsilon$  分别为应力和应变,  $\partial \sigma / \partial t$  和  $\partial \epsilon / \partial t$  分别为应力和应变对时间的偏导数. 弹性系数  $K_1$  和  $K_2$  与时间无关, 主要描述细胞的刚性, 反映细胞的初始变形程度随  $[(1/K_1) + (1/K_2)]$  而变化. 粘性系数  $\mu$  描述了细胞变形对时间的依赖性, 反映了细胞的粘性. 在本文所设计的蠕变力学实验中, 细胞蠕变特性由时间常数  $\mu[(1/K_1) + (1/K_2)]$  确定, 最大变形值正比于  $1/K_1$ <sup>[17]</sup>.

统计学处理 采用两样本均数  $t$  检验进行显著性分析.

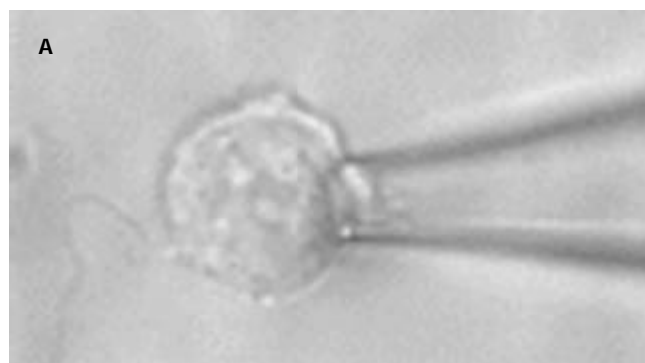
## 2 结果

在 475 N/m<sup>2</sup> 的阶跃负压作用下, 肝癌细胞在微管内的变形经历了初始快速响应和其后稳定增加的时间过程(图 2). 经拟合计算测得 MHCC97-H 亲本细胞、转染正义 KAI1 基因、反义 KAI1 基因以及空载体后该肝癌细胞的弹性系数  $K_1$ ,  $K_2$  及粘性系数  $\mu$ . MHCC97-H-AS 细胞的弹性系数  $K_1$ ,  $K_2$  和粘性系数  $\mu$  较对照组 MHCC97-H 亲本细胞相应值降低, 差异有显著性( $P = 0.000$ )(表 1), 这表明在实验条件下 MHCC97-H-AS 细胞较 MHCC97-H 亲本细胞的刚性降低, 变形性增加; MHCC97-H-S 细胞粘弹性系数  $K_1$ ,  $K_2$  和  $\mu$  均较对照组 MHCC97-H 亲本细胞的相应值增加, 差异有显著性( $P = 0.007$ ), 这表明 MHCC97-H-S 细胞较 MHCC97-H 亲本细胞变形性降低; 而 MHCC97-H-pCI 细胞与 MHCC97-H 亲本细胞比较则无明显变化( $P = 0.444$ ).

表 1 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 正反义基因转染前后粘弹性系数

粘弹性系数	MHCC97-H (mean $\pm$ SD)	MHCC97-H-S (mean $\pm$ SD)	MHCC97-H-AS (mean $\pm$ SD)	MHCC97-H-pCI (mean $\pm$ SD)
$K_1$ (dyn/cm <sup>2</sup> )	434.9 $\pm$ 12.6	450.95 $\pm$ 15.3 <sup>a</sup>	372.75 $\pm$ 24.9 <sup>b</sup>	437.6 $\pm$ 9.5
$K_2$ (dyn/cm <sup>2</sup> )	649.1 $\pm$ 15.2	670.3 $\pm$ 15.8 <sup>a</sup>	584.5 $\pm$ 13.3 <sup>b</sup>	643.2 $\pm$ 9.9
$\mu$ (dyn/(s $\cdot$ cm <sup>2</sup> ))	227.4 $\pm$ 10.4	251.9 $\pm$ 13.6 <sup>a</sup>	214.3 $\pm$ 13.7 <sup>b</sup>	233.2 $\pm$ 9.1

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs MHCC97-H.



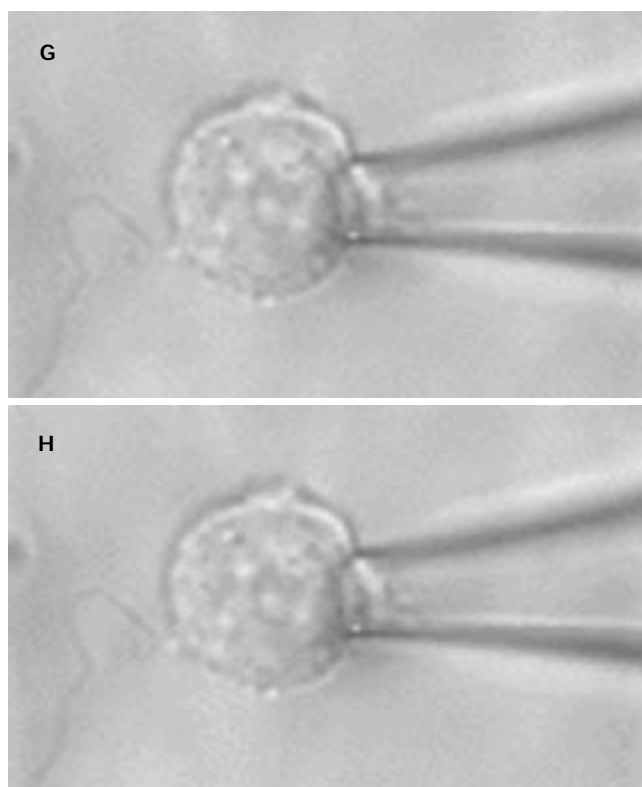
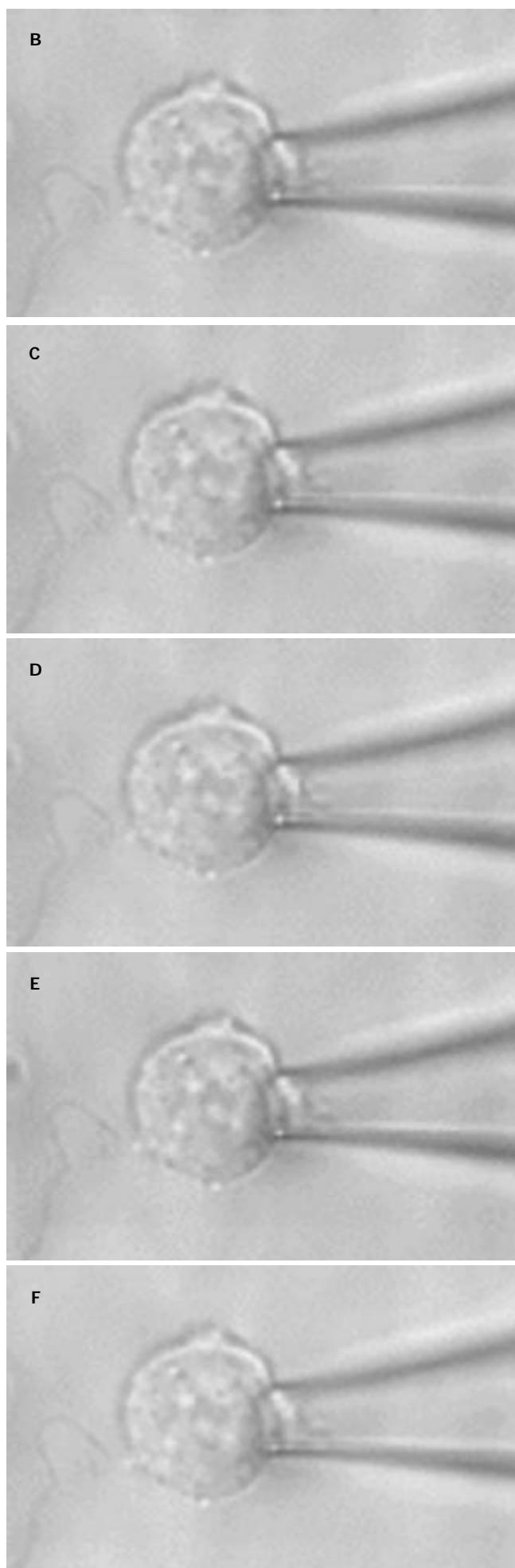


图2 MHCC97-H细胞在微管中随时间变化的变形图(时间间隔为200 ms).

### 3 讨论

KAI1 基因是 1995 年发现的一个新基因<sup>[18]</sup>, 是前列腺癌的转移抑制基因. KAI1 基因定位于人类染色体 11p11.2, 编码产物为含 267 个氨基酸的细胞膜糖蛋白, 属于跨膜 4 超家族<sup>[19]</sup> (Transmembrane 4 superfamily, TM4SF). 该家族包括 ME491/CD63, MRP-1/CD9, TAPA-1, CD81, CD37 和 CD53 等, 大部分成员已被确定为白细胞表面蛋白, 其中至少 3 种与肿瘤转移有关, 包括 CD9/MRP-1, CD63/ME491, CD82/KAI1. KAI1 基因不仅在前列腺癌中表达下调, 而且在多种人类实体上皮肿瘤如结直肠癌<sup>[20-23]</sup>、胰腺癌<sup>[24]</sup>中均存在表达异常的现象, 由此认为 KAI1 基因不仅能抑制前列腺癌的转移, 而且可能对其他恶性肿瘤的侵袭和转移也起抑制作用<sup>[25-27]</sup>.

肿瘤不仅在原发灶通过肿瘤血管从宿主获得营养, 而且向宿主输出大量恶性细胞, 导致肿瘤不断生长和转移<sup>[28-31]</sup>. 肝癌患者死亡的主要原因就在于其侵袭转移<sup>[32]</sup>. 癌细胞的侵袭转移是一个复杂的生物学过程, 涉及癌细胞从原发灶脱落, 侵袭和穿透基底膜, 降解细胞外基质, 向远处转移等<sup>[33]</sup>. 在此过程中首要的和重要的是癌细胞的运动和变形性, 而粘弹性是与细胞运动和变形密切相关的生物物理特性. 本实验即是从此角度入手, 采用微管吸吮技术, 测定已转染正、反义 KAI1 基因的高转移潜能肝癌 MHCC97-H 细胞的粘弹性, 从正反两方面阐明 KAI1 基因对肝癌细胞粘弹性的影响, 进而探讨 KAI1 基因在肝癌侵袭转移过程中的重要作用. 从实验结果可以看出, 转染反义 KAI1 基因后, MHCC97-H-

AS 的 3 个粘弹性系数  $K_1$ ,  $K_2$  和  $\mu$  均小于未转染组, 且二者间差异具有显著性, 说明 MHCC97-H-AS 较 MHCC97-H 亲本细胞更易发生运动和变形, 提示反义 KAI1 基因可能降低了肝癌细胞与周围组织的黏附性而容易从原发灶脱落, 这样 MHCC97-H-AS 癌细胞就更具有侵袭和转移的恶性表型. 转染正义 KAI1 基因的 MHCC97-H-S 细胞粘弹性系数  $K_1$ ,  $K_2$  和  $\mu$  均大于未转染组, 且二者间差异具有显著性, 说明 MHCC97-H-S 细胞没有 MHCC97-H 细胞容易运动和变形, 提示 KAI1 正义基因降低了 MHCC97-H 的粘弹性, 因而可能会降低癌细胞的侵袭和转移能力. 转染 pCI-neo 空载体的 MHCC97-H-pCI 细胞粘弹性系数  $K_1$ ,  $K_2$  和  $\mu$  与 MHCC97-H 细胞比较无明显变化.

由上可知, 肿瘤转移抑制基因 KAI1 影响了肝癌细胞的粘弹性, 这为肿瘤侵袭和转移机制的研究提供了重要线索. 但肿瘤的发生、发展与宿主的微环境是密不可分的, 与肿瘤细胞之间的相互作用也是相关联的, 在今后的工作中我们拟采用动物模型的办法, 研究体内肝癌侵袭、转移过程中 KAI1 基因的变化及其分子机制, 进一步为肝癌转移的防治提供理论和实验依据.

致谢:重庆大学生物工程学院及国家教育部生物力学与组织工程重点实验室秦建和宋关斌老师的帮助.

#### 4 参考文献

- Lee JH, Ku JL, Park YJ, Lee KU, Kim WH, Park JG. Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. *World J Gastroenterol* 1999;5:289-295
- 张静, 刘彦仿, 杨守京, 孙志伟, 乔庆, 张素珍. 抗肝癌单链抗体融合人突变型 TNF $\alpha$  的构建与表达. *世界华人消化杂志* 2000; 8:616-620
- 王九平, 段国荣, 赵玉玲, 杜德伟. 共聚焦方法分析 p16 基因的表达及对入肝癌细胞系 7721 生长的作用. *世界华人消化杂志* 2000; 8:767-770
- 邵晓冬, 吴开春, 郭晓钟, 徐建华, 郭长存, 孟繁平, 樊代明. KAI1 基因在肝硬化和肝细胞癌组织中的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:1238-1241
- 梁云, 陆斌, 崔贞福, 李晓冬, 郭亚军, 刘彦君. 肝细胞癌中 Fas/FasL 表达的意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:1364-1368
- 程虹, 刘彦仿, 张惠中, 沈万安, 张素珍. 分泌型抗肝癌单链双功能抗体融合 GFP 真核表达载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:640-644
- 蒋业贵, 王宇明, 李奇芬. HLA-DR 抗原和 HSP70 在肝细胞癌中的表达意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:1139-1142
- Jiang YF, Yang ZH, Hu JQ. Recurrence or metastasis of HCC: predictors, early detection and experimental antiangiogenic therapy. *World J Gastroenterol* 2000;6:61-65
- Li Y, Shang P, Qian AR, Wang L, Yang Y, Chen ZN. Inhibitory effects of antisense RNA of HAb18G/CD147 on invasion of hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2003;9:2174-2177
- Wang W, Yang LY, Yang ZL, Huang GW, Lu WQ. Expression and significance of RhoC gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1950-1953
- Qian J, Feng GS, Vogl T. Combined interventional therapies of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1885-1891
- Wan YL, Zheng SS, Zhao ZC, Li MW, Jia CK, Zhang H. Expression of co-stimulator 4-1BB molecule in hepatocellular carcinoma and adjacent non-tumor liver tissue, and its possible role in tumor immunity. *World J Gastroenterol* 2004;10:195-199
- Li Y, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Chen J, Xue Q, Chen J, Gao DM, Bao WH. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World J Gastroenterol* 2001;7:630-636
- 司遂海, 杨建民, 罗元辉, 房殿春, 周平. KAI1 正反义基因对 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:1341-1344
- 陈军, 肖光夏, 吴泽志, 秦健, 李章万. 肠上皮细胞的粘弹性生物力学研究. *四川大学学报(医学版)* 2003;34:34-35
- 张西正, 匡震邦, 蔡绍哲, 徐世荣, 黄岂平. 人、Wistar 大鼠、昆明小鼠成骨细胞粘弹性的测量. *北京生物医学工程* 2002;21:40-42
- 张钢, 龙勉, 吴泽志. 肝癌细胞粘弹性的实验研究. *解放军医学杂志* 2001;26:204-206
- Wu Q, Ji Y, Zhang MQ, Chen YQ, Chen F, Shi DL, Zheng ZH, Huang YJ, Su WJ. Role of tumor metastasis suppressor gene KAI1 in digestive tract carcinomas and cancer cells. *Cell Tissue Res* 2003;314:237-249
- Gao AC, Lou W, Dong JT, Barrett JC, Danielpour D, Isaacs JT. Defining regulatory elements in the human KAI1 (CD 82) metastasis suppressor gene. *Prostate* 2003;57:256-260
- Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Hattori N, Taki T, Hasegawa H, Satoh S, Kobayashi N, Yamaoka Y, Miyake M. Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br J Cancer* 2003;89:158-167
- Wu DH, Liu L, Chen LH, Ding YQ. Expression of KAI1/CD82 in human colorectal tumor. *Di Yi Jun Yi Daxue Xuebao* 2003;23:714-715
- Liu L, Wu DH, Li ZG, Yang GZ, Ding YQ. Effects of KAI1/CD82 on biological behavior of human colorectal carcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 2003;9:1231-1236
- Yang J, Liu FX, Yan XC, He GY, Liu LM. Role of tumor metastasis suppressor gene KAI1 in development of colorectal cancer. *Ai Zheng* 2003;22:533-536
- Friess H, Guo XZ, Tempia-Caliera AA, Fukuda A, Martignoni ME, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW. Differential expression of metastasis-associated genes in papilla of Vater and pancreatic cancer correlates with disease stage. *J Clin Oncol* 2001;19:2422-2432
- Schindl M, Birner P, Bachtiary B, Breitenacker G, Selzer E, Oberhuber G. KAI1 metastasis suppressor protein in cervical cancer. *Am J Pathol* 2002;160:1542-1543
- Uzawa K, Ono K, Suzuki H, Tanaka C, Yakushiji T, Yamamoto N, Yokoe H, Tanzawa H. High prevalence of decreased expression of KAI1 metastasis suppressor in human oral carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2002;8:828-835
- Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Taki T, Kondo K, Kohno N, Yamaoka Y, Miyake M. Integrin  $\alpha 3$  expression as a prognostic factor in colon cancer: association with MRP-1/CD9 and KAI1/CD82. *Int J Cancer* 2002;97:518-525
- Guo XZ, Friess H, Shao XD, Liu MP, Xia YT, Xu JH, Buchler MW. KAI1 gene is differently expressed in papillary and pancreatic cancer: influence on metastasis. *World J Gastroenterol* 2000;6:866-871
- Jaffe AB, Hall A. Rho GTPase in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res* 2002;84:57-80
- Jiang BJ, Sun RX, Lin H, Gao YF. Study on the risk factors of lymphatic metastasis and the indications of less invasive operations in early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6: 553-556
- Furger KA, Menon RK, Tuckl AB, Bramwell VH, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med* 2001;1:621-632
- Yang JM, Chen WS, Liu ZP, Luo YH, Liu WW. Effects of insulin-like growth factors-IR and-II R antisense gene transfection on the biological behaviors of SMMC-7721 human hepatoma cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:296-301
- Steege PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2003;3:55-63

# 多层螺旋CT显示肝癌寄生动脉在介入治疗中的意义

姜在波, 单 鸿, 黄明声, 李征然, 沈新颖, 关守海, 朱康顺

姜在波, 单鸿, 黄明声, 李征然, 沈新颖, 关守海, 朱康顺, 中山大学附属第三医院放射科 广东省广州市 510630  
姜在波, 男, 1967-11-15 生, 山东省潍坊市人, 汉族. 1996 年中山医科大学硕士, 讲师. 主要从事临床介入治疗工作.  
项目负责人: 单鸿, 510630, 广东省广州市天河路 600 号, 中山大学附属第三医院放射科. jzb01@163.net  
电话: 020-85516867-2066 传真: 020-87580725  
收稿日期: 2004-01-02 接受日期: 2004-01-12

## Multislice spiral CT displaying extrahepatic feeding arteries of hepatocellular carcinoma for interventional treatment

Zai-Bo Jiang, Hong Shan, Ming-Sheng Huang, Zheng-Ran Li, Xin-Ying Shen, Shou-Hai Guan, Kang-Shun Zhu

Zai-Bo Jiang, Hong Shan, Ming-Sheng Huang, Zheng-Ran Li, Xin-Ying Shen, Shou-Hai Guan, Kang-Shun Zhu, Department of Radiology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China  
Correspondence to: Dr. Hong Shan, Department of Radiology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. jzb01@163.net  
Received: 2004-01-02 Accepted: 2004-01-12

## Abstract

**AIM:** To diagnose extrahepatic feeding arteries of hepatocellular carcinoma (HCC) in hepatic arterial phase multislice computerized tomography (MSCT) for interventional treatment.

**METHODS:** Biphasic MSCT and transcatheter arterial chemoembolization (TACE) were performed in 52 patients with HCC, who were confirmed with 60 branches extrahepatic feeding arteries by arteriography, in which 34 were initial patients, 18 with multi-TACEs. According to the arteriography, the MSCT signs of feeding arteries and tumors were studied retrospectively.

**RESULTS:** Before initial TACE, 34 branches extrahepatic feeding arteries (56.7%, 34/60) were displayed in 33 patients in arterial phase MSCT. Follow-up data showed that another 13 branches were displayed (78.3%, 47/60), and 13 branches were not displayed. All the tumors fed by extrahepatic arteries located in the margin of liver and its longitude was average  $6.9 \pm 2.2$  cm. The tumors conglutinated with the nearby organs and tissues in 36 cases. The displaying rate was higher in longitudinal position arteries (for example, inferior phrenic arteries, internal thoracic artery.), showed a "dot" high density. In 33 branches feeding inferior phrenic arteries, 21 branches were displayed as the source arteries. The displaying rate was lower in axial position arteries.

**CONCLUSION:** Arterial phase MSCT can display extrahepatic feeding arteries of HCC easily. While TACE, extrahepatic

arteries are firstly identified and TACE later, followed by transhepatic artery TACE, which can improve the efficacy of interventional treatment.

Jiang ZB, Shan H, Huang MS, Li ZR, Shen XY, Guan SH, Zhu KS. Multislice spiral CT displaying extrahepatic feeding arteries of hepatocellular carcinoma for interventional treatment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1044-1047

## 摘要

**目的:** 探讨利用多层螺旋CT(multislice CT, MSCT)发现肝癌寄生动脉的方法及其在介入治疗中的意义。

**方法:** 肝癌患者 52 例行 MSCT 双期增强扫描及化疗栓塞 (TACE) 治疗, 动脉造影证实有 60 支寄生动脉, 34 例为首次治疗的患者, 18 例经多次介入治疗。回顾性研究寄生动脉及其供血肿瘤在 MSCT 上的表现及如何选择介入治疗程序。

**结果:** 介入治疗前 MSCT 显示寄生动脉 34 支, 阳性率为 56.7% (34/60); 多次复查时又显示 13 支, 总阳性率为 78.3% (47/60)。13 支未显示。寄生动脉供血的病灶均位于肝脏边缘, 长径平均  $6.9 \pm 2.2$  cm。在 MSCT 上, 36 例可见肿瘤侵犯附近组织或器官。呈纵行走向的寄生动脉(如膈下动脉、胸廓内动脉)易于在 CT 上显示, 横行走向的寄生动脉不易显示。

**结论:** MSCT 动脉期扫描可显示纵行走向的寄生动脉。介入治疗时, 先寻找寄生动脉并经其行 TACE, 再经肝动脉途径 TACE, 可有效提高介入治疗的质量。

姜在波, 单鸿, 黄明声, 李征然, 沈新颖, 关守海, 朱康顺. 多层螺旋 CT 显示肝癌寄生动脉在介入治疗中的意义. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1044-1047  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1044.asp>

## 0 引言

肝癌在我国常见<sup>[1-4]</sup>, 其诊断和治疗已有不少进展。肝癌介入治疗也取得进步。肝癌的肝外供血动脉称为寄生动脉, 能否寻找到寄生动脉并对其实施有效治疗可影响到患者的预后。多层螺旋 CT (multislice CT, MSCT) 因扫描速度快, 能够清晰显示动脉血管, 为诊断和治疗提供很大的帮助。笔者回顾性分析血管造影证实有寄生动脉供血的 52 例肝癌患者的 MSCT 资料, 发现 MSCT 在显示肝癌的寄生动脉上有一定规律性, 对指导介入治疗有一定的临床意义。



## 1 材料和方法

1.1 材料 2001-02/2003-11 原发性肝癌患者 52 例血管造影证实有寄生动脉 60 支, 47 例有 1 支, 3 例各有 2 支, 1 例有 3 支, 1 例有 4 支(表 1)。每次介入治疗前, 患者做 MSCT (GE LightSpeed, QX/i) 动脉期、静脉期扫描, 部分患者做动脉早期扫描, 每例患者皆有 2 次以上 MSCT 扫描和介入治疗。

R-IPA 右膈下动脉, L-IPA 左膈下动脉, R-ITA 右胸廓内动脉, L-ITA 左胸廓内动脉, R-AA 右肾上腺动脉, R-RCA 右肾包膜动脉, LGA 胃左动脉, OA 网膜动脉, R-ICA 右肋间动脉(含腰动脉)。

1.2 方法 MSCT 扫描技术分 2 种, (1)常规条件: 层厚 10 mm, 层间距 10 mm, 床速为 15 mm/rot, 螺距 3, 重建层厚 5 mm, 重建层间距 2 mm; (2)特殊条件: 层厚 5 mm, 层间距 5 mm, 床速为 7.5 mm/rot, 螺距 3, 重建层厚 2.5 mm, 重建层间距 1 mm。当高度怀疑肿瘤有寄生动脉供血时直接做特殊条件扫描。增强扫描时从手背或肘静脉以高压注射器注射造影剂(优维显 I 300 g/L 或碘必乐 I 300 g/L)80-85 mL (1.5 mL/kg), 注射速率 3 mL/s, 肝动脉早期、肝动脉期及门静脉期分别于注射后 18, 27 和 65 s 开始扫描。

介入治疗程序分 2 种, (1)先经肝动脉途径对肿瘤进行化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE), 再依据病变的部位、肿瘤染色是否完整及 MSCT 上可疑的寄生动脉征像, 针对性行腹腔动脉、肠系膜上动脉、胃左动脉、膈下动脉、肾上腺动脉、肋间动脉和胸廓内动脉等靶动脉造影寻找寄生动脉, 并经寄生动脉 TACE; (2)术前 MSCT 上显示有明显的寄生动脉影像时, 先寻找寄生动脉做 TACE, 再经肝动脉途径 TACE。经寄生动脉 TACE 时一定要超选择插管,

提倡使用微导管, 避免碘油化疗药物进入正常动脉支。1-3 mo 后 MSCT 复查并做第 2 个疗程介入治疗, 依次重复。

## 2 结果

2.1 MSCT 及血管造影显示寄生动脉情况 影像诊断医生未能通过 MSCT 对 52 例患者的寄生动脉作出诊断, 介入医生在治疗前只对 25 例患者怀疑有寄生动脉供血, 未超过 50%。血管造影发现寄生动脉时, 34 例为首次介入治疗的患者(图 1, 2), 18 例经 2 次以上治疗, 12 例合并肝动脉闭塞。通过对造影片及 CT 资料分析, 介入治疗前 33 例患者 CT 片上发现疑似寄生动脉 34 支, 阳性率为 56.7% (34/60); 多次复查时 CT 片上又显示 13 支, 总阳性率为 78.3% (47/60); 13 支未显示, 阴性率为 21.7% (13/60)(表 2)。除 3 例膈下动脉因管径细小而未显示外, 其余未显示的寄生动脉如肋间动脉、肾包膜动脉等因为横向走行、扫描间隔宽而漏掉(图 1, 3)。

2.2 寄生动脉及供血肿瘤的 MSCT 表现 呈纵行走向的寄生动脉容易显示, 典型者见于右膈下动脉, 表现为位于右膈脚的点状高密度影(图 1-3), 较正常者增粗, 可于多个层面上连续显示。胸廓内动脉也易于显示, 表现为位于前胸壁内的点状高密度影。在 CT 所显示的 33 条膈下动脉中, 通过图像重建技术 21 条显示了起源。呈横向走行或分布无规律的寄生动脉难以显示, 但仍可见肿瘤周围的血管影像(图 1)。所有寄生动脉供血的肿瘤均位于肝脏边缘, 与寄生动脉的走行、分布有明显的对应性。在发现寄生动脉供血时, 肿瘤长径 3.5-15 (6.9 ± 2.2 cm)。有时可见不同来源的供血动脉所供血肿瘤组织之间的分隔(图 2)。52 例患者中 36 例见肿瘤与周围组织有明显的粘连。

表 1 肝癌 52 例 60 支寄生动脉与供血肿瘤的关系(支)

肿瘤位置	寄生动脉								
	R-IPA	L-IPR	R-ITA	L-ITA	R-AA	R-CRA	LGA	OA	R-ICA
右上叶	25	1							
方叶	7		5	2			3		
右下叶					1	2		3	3
尾叶					2				
肝左叶		3					3		
总计	32	4	5	2	3	2	6	3	3

表 2 肝癌 52 例 MSCT 动脉期显示寄生动脉情况(支)

CT	寄生动脉								
	R-IPA	L-IPA	R-ITA	LITA	R-AA	R-RCA	LGA	OA	R-ICA
首次	24		4	1	2		2	1	
复查	7	2	1	1	1		1		
未显示	1	2				2	3	2	3
总计	32	4	5	2	3	2	6	3	3

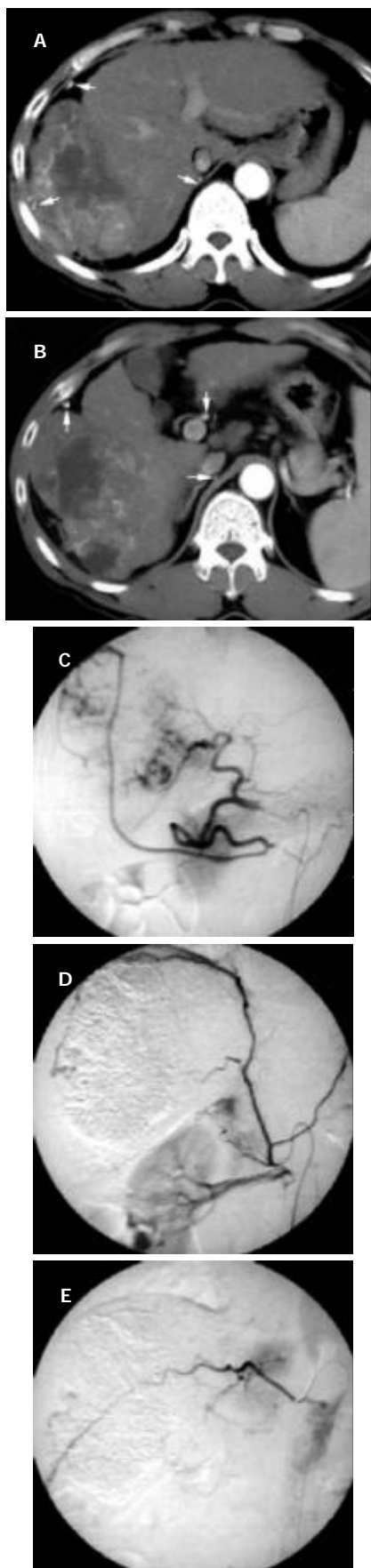


图1 男, 53岁, 原发性肝癌, 第1次介入治疗. A: 右肝上、下叶肿瘤, 长径13 cm, 肿瘤周边可见增粗的动脉影(大、小箭), 右膈角见增粗的右膈下动脉影(箭头); B: 扩张增粗的动脉影于多个层面上显示, 两箭所示动脉影推测为同一血管; C: 腹腔动脉造影, 示肿瘤除由肝右动脉供血外, 增粗的网膜动脉亦供血肿瘤, 证实CT所见; D: 左右膈下动脉共干起自右肾动脉, 扩张的右膈下动脉分支供血肿瘤; E: 第12肋间动脉造影, 见肿瘤染色, CT片上未显示.

2.3 经寄生动脉介入治疗 52例患者中39例肿瘤同时由肝动脉和寄生动脉双重供血, 30例患者首次造影时可发现明显的肿瘤染色缺损区, 即刻寻找到寄生动脉后造影, 刚好形成完整的肿瘤染色(图2). 6例造影时肿瘤染色比较完整的患者, 由于CT片上显示增粗的寄生动脉, 经进一步针对性造影而证实. 52例患者经寄生动脉TACE时, 均达到了超选择性插管, 49例使用了微导管, 但13例仍有少许碘油进入正常动脉支. 由于担心栓塞正常组织, 致使7例患者肿瘤栓塞不完全. TACE后, 对寄生动脉肿瘤支以PVA颗粒或明胶海绵栓塞, 其中23例合并经导管注射无水乙醇闭塞血管, 无严重并发症发生.

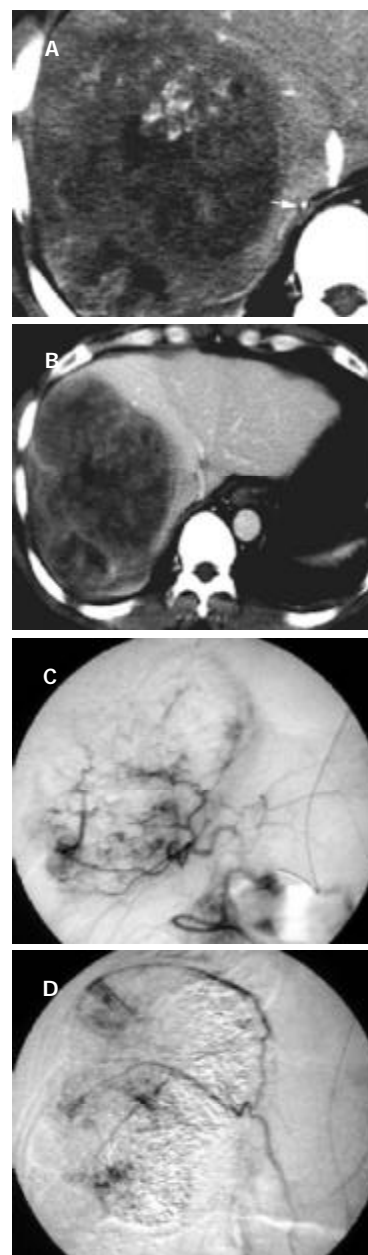


图2 男, 46岁, 原发性肝癌, 第1次介入治疗. A: 肝右上叶肿瘤, 长径约12 cm. 动脉期可见右膈角点状高密度影(白箭), 直径约3.5 mm, 为扩张的右膈下动脉; B: 静脉期肿瘤内部可见更低密度坏死区, 病灶之间可见不规则条状分隔; C: 肝总动脉造影示肿瘤主要由肝右动脉供血, 外上方存在染色缺损区; D: 右膈下动脉造影示右膈下动脉增粗, 多支寄生动脉供血病灶外围, 与2C图形成完整的肿瘤染色, 证实CT所见增粗之右膈下动脉为寄生动脉.

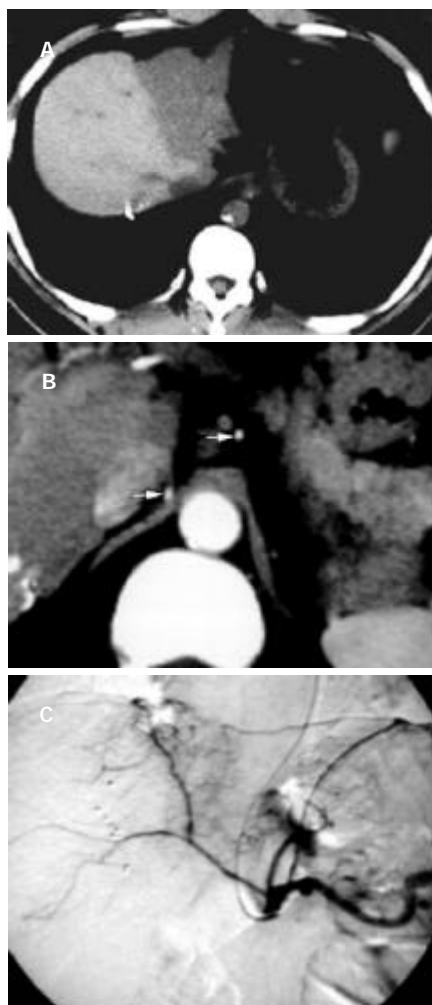


图3 男, 29岁, 肝左叶及方叶肝癌经药盒内化疗6疗程后1a复查, 肿瘤长径由15 cm缩小至5 cm. A: MSCT平扫示原肝左叶及方叶肿瘤明显缩小, 肝左叶近乎消失. 肿瘤形态不规则, 局部膨胀性凸出, 提示复发迹象; B: 动脉期见右膈角(箭)及腹主动脉左前方(箭头)小点状高密度影, 直径分别为2.5 mm和2.1 mm; C: 腹腔动脉造影示肝总动脉闭塞, 左右膈下动脉、胃左动脉寄生供血肿瘤, 但CT片上只显示右膈下动脉及胃左动脉.

### 3 讨论

寄生性供血指肝动脉以外的其他器官或组织的营养动脉参与肿瘤供血, 与肝动脉闭塞后形成的侧支动脉有不同. Takeuchi et al对23例患者用球囊临时阻塞肝固有动脉后行CT扫描及血管造影观察, 22例即刻出现肝外供血, 主要来自左右膈下动脉、肠系膜上动脉、腹腔干和胃左动脉. 这些动脉中虽然并非全部为寄生动脉, 也由此说明了肝癌血供的丰富性及复杂性, 给介入治疗带来了困难. 寄生性供血与肿瘤所在部位和范围有关, 如肝脏后面及两侧上部有冠状韧带、三角韧带与膈后部及外侧相连, 右肝后部有一部分无腹膜覆盖为肝裸区, 直接与膈相连、与肾后间隙相通. 因此与膈面相连的癌灶可从膈动脉获得血供; 若肿瘤突破肝裸区向肾后间隙生长, 肾上腺动脉也为其提供血供; 左外叶肝癌则可通过左三角韧带与冠状韧带从左膈动脉获得血供. 所以, 肝脏表面的癌组织侵及附近的组织器官就可获得寄生血供. 本组资料MSCT显示肿瘤明显与周围组织粘连者36例, 也证明了此种现象. 有多支供血者其长

径均在5 cm以上, 说明肿瘤越大, 越易侵犯周围组织, 并从肝外获得血供.

普通CT由于扫描速度慢, 一般难于发现细小的寄生动脉. Gokan et al对16例膈下动脉供血型肝癌进行了螺旋CT研究, 用10 mm层厚双期扫描, 动脉期在右膈脚显示增宽的右膈下动脉, 根据肿块的位置, 16例患者中13例正确预测到起源. 而本组MSCT所显示的33条膈下动脉中, 通过重建技术21条显示了其起源, 显示率偏低的原因可能与扫描技术有关. 笔者认为位于肝脏周边的肿瘤, MSCT动脉期其周围可见扩张的血管影像, 提示有肝外寄生动脉供血, 介入治疗时一定要仔细、耐心寻找. 由于肿瘤血流量大于正常组织, 寄生动脉血管较正常者增粗. 国人正常膈下动脉管径左侧平均为2.0 mm, 右侧平均为2.1 mm. 本组31例右膈下动脉测量, 其管径平均为3.3 mm, 明显高于正常值, 与文明 et al报道基本一致. Ohgiya et al对166例肝癌患者行双期螺旋CT扫描评估异常的肝和胃动脉, 于注射造影剂后30 s和70 s扫描, 在动脉造影有异常动脉的43患者中CT发现38例, 阳性率88%, 高于本组资料78.3%的阳性率. 作者认为仔细观察静脉韧带裂和门腔静脉间隙可帮助发现寄生动脉, 对外科和介入治疗有一定指导作用. CT不能发现寄生动脉的漏诊主要与术者的经验有关. 由于原发性肝癌是一种血供比较丰富的肿瘤, 如果常规肝动脉造影不能发现相应的肿瘤染色, 需要积极寻找肝外供血动脉. 介入治疗时, 先经肝动脉TACE, 如果血管造影机分辨率不高, 病灶内大量的碘油沉积后可能影响到发现细小的寄生动脉, 或因栓塞后患者的不适也易忽视寻找寄生动脉. 笔者建议, 术前仔细阅读CT片, 如果怀疑有寄生供血, 先寻找寄生动脉并经其TACE, 再经肝动脉TACE. 由腹主动脉或其分支发出的寄生动脉, 笔者推荐使用MIK或SHK导管寻找, 再根据情况决定是否更换导管或使用微导管. TACE时, 对寄生动脉肿瘤支一定要达到完全性栓塞. 总结本组资料, 寄生动脉及其供血肝癌的MSCT征像: (1)病灶位于肝脏边缘, 范围大, 呈膨胀性生长; (2)肿瘤与附近组织粘连; (3)肿瘤周围有明显扩张的动脉血管影像, 呈纵行走向的寄生动脉发现率高, 部分可正确预测其起源.

### 4 参考文献

- 1 贾雨辰, 田建明, 王振堂, 陈栋, 叶华, 刘崎, 杨继金, 孙飞, 林琳, 陆建平, 王飞, 程红岩. 肝癌万次介入治疗的回顾. 华人消化杂志 1998;6:2-3
- 2 Ohgiya Y, Gokan T, Munechika H. Demonstration of aberrant hepatic and gastric arteries with helical CT. *Invest Radiol* 1999; 34:579-584
- 3 Gokan T, Hashimoto T, Matsui S, Kushihashi T, Nobusawa H. Helical CT demonstration of dilated right inferior phrenic arteries as extrahepatic collateral arteries of hepatocellular carcinomas. *J Comput Assist Tomogr* 2001;25:68-73
- 4 郑金龙, 孔健, 冯敢生, 许林锋, 韩萍. 肝癌介入治疗的影像评估价值 - 着重CT平扫及双期动态增强与DSA的影像对比分析. 临床放射学杂志 2000;19:110-113

# ALA-PDT对SW480结肠癌细胞周期阻滞作用及对G<sub>1</sub>/S 关卡调控因子的影响

肖卫东, 陈 炜, 葛海燕, 陈祖林

肖卫东, 葛海燕, 陈祖林, 中国人民解放军第三军医大学新桥医院普通外科 重庆市 400037  
陈炜, 中国人民解放军第三军医大学基础部微生物学教研室 重庆市 400038  
肖卫东, 男, 1972-08-12 生, 内蒙古呼和浩特人, 汉族. 博士, 主治医师.  
国家自然科学基金资助项目, No. 30277829, 30200056  
项目负责人: 陈祖林, 400037, 重庆市沙坪坝区新桥正街1号, 中国人民解放军第三军医大学新桥医院普通外科. chenzulin@163.com  
电话: 023-68755605 传真: 023-68755302  
收稿日期: 2003-12-23 接受日期: 2004-01-15

## Involvement of G<sub>1</sub>/S checkpoint regulators during photodynamic-therapy-mediated cell cycle arrest in human colon carcinoma SW480 cells

Wei-Dong Xiao, Wei Chen, Hai-Yan Ge, Zu-Lin Chen

Wei-Dong Xiao, Hai-Yan Ge, Zu-Lin Chen, Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China  
Wei Chen, Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30277829, 30200056  
Correspondence to: Dr. Zu-Lin Chen, Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Shapingba District, Chongqing 400037, China. chenzulin@163.com  
Received: 2003-12-23 Accepted: 2004-01-15

## Abstract

AIM: To investigate the involvement of G<sub>1</sub>/S regulators during ALA-PDT-mediated cell cycle arrest.

METHODS: Colon carcinoma SW480 cells were treated with 1 mmol/L ALA and 6 h later irradiated with 9 J/cm<sup>2</sup> 631 nm light from a laser. The analysis of cell cycle arrest by ALA-PDT was performed by flow cytometry. The effect of ALA-PDT on G<sub>1</sub>/S cell cycle regulators Chk2, CyclinD1 and P21WAF1/Cip1/Sdi1 was examined by using immunocytochemical technique.

RESULTS: ALA-PDT resulted in G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> phase arrest of the tumor cell cycle in post-PDT in a time-dependent manner. Immunocytochemical analysis revealed that PDT resulted in an induction of G<sub>1</sub>/S checkpoint regulation factors such as Chk2 and P21WAF1/Cip1/Sdi1, and a down-regulation of CyclinD1 in a time-dependent manner.

CONCLUSION: ALA-PDT causes G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> phase arrest of SW480 cell cycle in post-PDT earlier period; PDT-mediated induction of G<sub>1</sub>/S checkpoint regulators Chk2 and P21WAF1/Cip1/Sdi1 results in the imposition of artificial checkpoint at G<sub>1</sub>-S checkpoint thereby leading to an arrest of cells in G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> phase of the cell cycle through inhibition in cyclinD1 in a time-dependent manner.

Xiao WD, Chen W, Ge HY, Chen ZL. Involvement of G<sub>1</sub>/S checkpoint regulators during photodynamic-therapy-mediated cell cycle arrest in human colon carcinoma SW480 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004; 12(5):1048-1052

## 摘要

目的: 了解光动力疗法对结肠癌SW480细胞的周期阻滞作用与G<sub>1</sub>/S关卡调控因子之间的联系。

方法: 对体外培养的SW480结肠癌细胞进行ALA-PDT实验, 使用流式细胞仪技术观测基于δ-氨基乙酰丙酸的光动力疗法对SW480细胞的细胞周期阻滞作用, 应用免疫细胞化学技术检测光动力疗法对G<sub>1</sub>/S关卡调控因子Chk2, P21WAF1/Cip1/Sdi1, CyclinD1蛋白表达的影响。

结果: 基于δ-氨基乙酰丙酸的光动力疗法可在其作用后早期诱导SW480细胞产生G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>细胞周期阻滞, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期比例显著增加, 而S期和G<sub>2</sub>/M期比例明显下降, 且呈时间依赖性变化; 光动力作用诱导SW480细胞G<sub>1</sub>/S关卡调控因子Chk2, P21WAF1/Cip1/Sdi1蛋白表达增高, 降低CyclinD1蛋白表达, 与G<sub>1</sub>/S期阻滞进程相一致, 均呈时间依赖性变化。

结论: 基于δ-氨基乙酰丙酸的光动力疗法可诱导SW480细胞产生G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>细胞周期阻滞, 光动力疗法对SW480细胞的G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期阻滞作用与其对多个G<sub>1</sub>/S关卡调控因子的调节事件有关。

肖卫东, 陈炜, 葛海燕, 陈祖林. ALA-PDT对SW480结肠癌细胞周期阻滞作用及对G<sub>1</sub>/S关卡调控因子的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1048-1052  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1048.asp>

## 0 引言

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)抑制肿瘤细胞的作用机制仍不完全清楚. 已有研究表明PDT可通过阻滞细胞周期于G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期来介导细胞凋亡<sup>[1]</sup>. 而近来研究表明G<sub>1</sub>/S期关卡是影响细胞周期进程的关键限制点, 他的转换决定着细胞是否进入S期继续增生还是停滞或死亡, 也是改进肿瘤治疗效果的理想干预点, 而G<sub>1</sub>/S关卡相关调控因子影响着这一进程<sup>[2]</sup>. 我们研究了ALA-PDT阻滞肿瘤细胞周期与G<sub>1</sub>/S关卡调控因子chk2, p21WAF1/Cip1/Sdi1, CyclinD1之间的可能联系。



## 1 材料和方法

1.1 材料  $\delta$ -氨基乙酰丙酸( $\delta$ -aminolevulinate acid,  $\delta$ -ALA)购自Sigma公司, 在实验当天于避光条件下使用D-Hanks液配制过滤后密封, 避光保存于4℃备用。人结肠腺癌SW480细胞株由第四军医大学实验动物中心细胞库提供; RPMI1640培养基购自Gibco公司; 新生小牛血清购自Hyclone公司; 小鼠抗人P21 WAF1/Cip1/Sdi1 mAb、小鼠抗人CyclinD1 mAb购自Santa Cruz公司; 小鼠抗人Chk2 mAb购自Neomarkers公司; 免疫组化Envision™试剂盒购自DAKO公司。

1.2 方法 SW480细胞常规在RPMI1640培养液(含100 mL/L灭活新生小牛血清, 青霉素100 ku/L, 链霉素50 g/L)中培养。置于CO<sub>2</sub>孵箱中, 恒温37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 饱和湿度。细胞培养密度 $0.1 \times 10^9$ – $1 \times 10^9$ /L, 每3–4 d传代1次, 取对数生长期细胞用于实验。A实验组(1 mmol/L ALA孵育6 h, 激光照射30 min); B正常对照组(不加ALA孵育, 不用激光照射); C光敏剂对照组(1 mmol/L ALA孵育6 h, 不用激光照射); D激光对照组(不加ALA孵育, 激光照射30 min)。

1.2.1 ALA-PDT实验 参照REN et al<sup>[3]</sup>及陈祖林 et al<sup>[23]</sup>的方法, 将SW480细胞按 $1 \times 10^5$ /L密度接种于培养板中(免疫组化实验需预置盖玻片), 待其贴壁后, 吸出含血清培养液后, D-Hanks液轻轻漂洗后弃去, 于暗室按预定时间加入含ALA(1 mmol/L)的RPMI1640培养液(不含血清), 孵育6 h, 弃去含ALA之培养液, D-Hanks液轻洗后, 加入新鲜培养液, 实验组和激光组细胞使用半导体激光仪(西南师范大学激光所, 距光斑3 cm处输出功率15 mW, 能量密度9 J/cm<sup>2</sup>)垂直照射培养孔, 于暗室连续照射30 min, 照射后细胞置培养箱中继续培养到实验设计各组时间, 0.25%胰蛋白酶液常规消化, D-Hanks液洗涤后收集备用。

1.2.2 SW480细胞周期蛋白表达 消化收集各组细胞, 1 000 r/min离心5 min, PBS漂洗后吹打成单细胞悬液, 700 mL/L冷乙醇4℃下固定24 h后送检, 流式细胞仪(BD公司, FACStar-PLUS型)检测细胞周期。Envision法检测SW480细胞Chk2, cyclinD1, p21WAF1/Cip1/Sdi1蛋白的表达(按DAKO公司说明书, 稍加修改) PDT实验后6, 12, 24 h依次取出盖玻片, PBS轻漂洗后, 4℃冷丙酮液固定5 min; 内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育10 min, PBS漂洗后加入一抗(Chk2 1:100; cyclinD1 1:50; p21WAF1/Cip1/Sdi1 1:40), 湿盒内孵育, 4℃过夜; 加入Envision酶复合物, 37℃孵育30 min; PBS漂洗后DAB镜下显色, 水洗终止; 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。结果判断: 光镜下观察, Chk2, CyclinD1, P21WAF1/Cip1/Sdi1蛋白阳性产物呈棕黄色, 以胞核为主, 少量胞质亦可见阳性颗粒。采用美国Image-pro-plus图像处理系统(Media cybernetics公司)检测, 各实验分组中每个样本随机抽取5个区域进行阳性细胞平均吸光度值(A<sub>xy</sub>)值测定。

统计学处理 实验采用SPSS11.0软件处理数据结果, 采用均值t检验, 结果用mean ± SD表示, 各组间相比采用配对t检验(显著水平 $\alpha$ 为0.05)

## 2 结果

2.1 ALA-PDT对SW480细胞周期的阻滞 PDT组细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期比例显著增加, 而S期和G<sub>2</sub>/M期比例明显下降, 同时在PDT作用后早期(6 h)就可观察到此变化, 而在PDT作用后48 h阻滞作用最为明显(表1), 而在3个组中则未见此种变化(本文未显示数据)。

表1 ALA-PDT作用后不同时相点细胞周期的变化(%)

分组	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> /M 期
PDT 前	30.5 ± 5.5	36.9 ± 1.4	30.7 ± 5.1
PDT 6 h	48.0 ± 0.3 <sup>b</sup>	35.9 ± 1.3 <sup>b</sup>	16.1 ± 1.0 <sup>a</sup>
PDT 12 h	55.0 ± 0.8 <sup>b</sup>	33.3 ± 1.9 <sup>b</sup>	11.7 ± 1.1 <sup>b</sup>
PDT 24 h	61.0 ± 2.6 <sup>a</sup>	30.3 ± 2.4	8.6 ± 2.7 <sup>a</sup>
PDT 48 h	72.6 ± 5.8 <sup>ad</sup>	21.9 ± 2.9 <sup>ac</sup>	5.6 ± 2.9 <sup>ad</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, vs 上一组; <sup>c</sup>P < 0.05, <sup>d</sup>P < 0.01 vs 3个对照组。

2.2 ALA-PDT对SW480细胞P21WAF1/Cip1/Sdi1, CyclinD1及Chk2蛋白表达的影响 镜下观察可见, P21WAF1/Cip1/Sdi1, CyclinD1, Chk2蛋白表达均呈棕黄色颗粒, 主要分布于细胞核, 胞质可见有少量表达。在PDT处理后, SW480细胞cyclinD1表达明显减弱, 阳性表达细胞比率降低, 阳性染色变淡, 而P21WAF1/Cip1/Sdi1和Chk2蛋白表达则在PDT处理后表达明显增强, 且均呈时间依赖性变化, 与对照组均有显著性差异(见图1、表2)。

表2 PDT作用后G<sub>1</sub>/S关卡调控蛋白的表达(A值mean ± SD)

蛋白	分组	PDT前	PDT后6 h	PDT后12 h	PDT后24 h
CyclinD1	PDT	0.317 ± 0.017	0.256 ± 0.020 <sup>a</sup>	0.223 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.216 ± 0.014 <sup>b</sup>
	光敏剂	0.317 ± 0.017	0.298 ± 0.016	0.283 ± 0.060 <sup>f</sup>	0.283 ± 0.026 <sup>g</sup>
	激光	0.317 ± 0.017	0.282 ± 0.015	0.269 ± 0.011 <sup>ac</sup>	0.263 ± 0.012 <sup>ah</sup>
	正常	0.317 ± 0.017	0.310 ± 0.020 <sup>c</sup>	0.297 ± 0.013 <sup>f</sup>	0.280 ± 0.016 <sup>g</sup>
P21WAF1	PDT	0.159 ± 0.015	0.240 ± 0.015 <sup>b</sup>	0.258 ± 0.016 <sup>b</sup>	0.255 ± 0.017 <sup>f</sup>
	光敏剂	0.159 ± 0.015	0.158 ± 0.020 <sup>c</sup>	0.162 ± 0.017 <sup>f</sup>	0.164 ± 0.029 <sup>h</sup>
	激光	0.159 ± 0.015	0.152 ± 0.021 <sup>c</sup>	0.161 ± 0.022 <sup>f</sup>	0.172 ± 0.022 <sup>h</sup>
	正常	0.159 ± 0.015	0.166 ± 0.031 <sup>c</sup>	0.158 ± 0.018 <sup>f</sup>	0.153 ± 0.026 <sup>h</sup>
Chk2	PDT	0.136 ± 0.012	0.191 ± 0.012 <sup>b</sup>	0.195 ± 0.018 <sup>b</sup>	0.194 ± 0.020 <sup>g</sup>
	光敏剂	0.136 ± 0.012	0.136 ± 0.020 <sup>d</sup>	0.145 ± 0.014 <sup>g</sup>	0.148 ± 0.017
	激光	0.136 ± 0.012	0.143 ± 0.024 <sup>c</sup>	0.168 ± 0.012 <sup>g</sup>	0.150 ± 0.018 <sup>g</sup>
	正常	0.136 ± 0.012	0.163 ± 0.034	0.141 ± 0.034	0.142 ± 0.046

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 vs PDT前; <sup>c</sup>P < 0.05, <sup>d</sup>P < 0.01 vs PDT6 h; <sup>e</sup>P < 0.05, <sup>f</sup>P < 0.01 vs PDT12 h; <sup>g</sup>P < 0.05, <sup>h</sup>P < 0.01 vs PDT24 h。

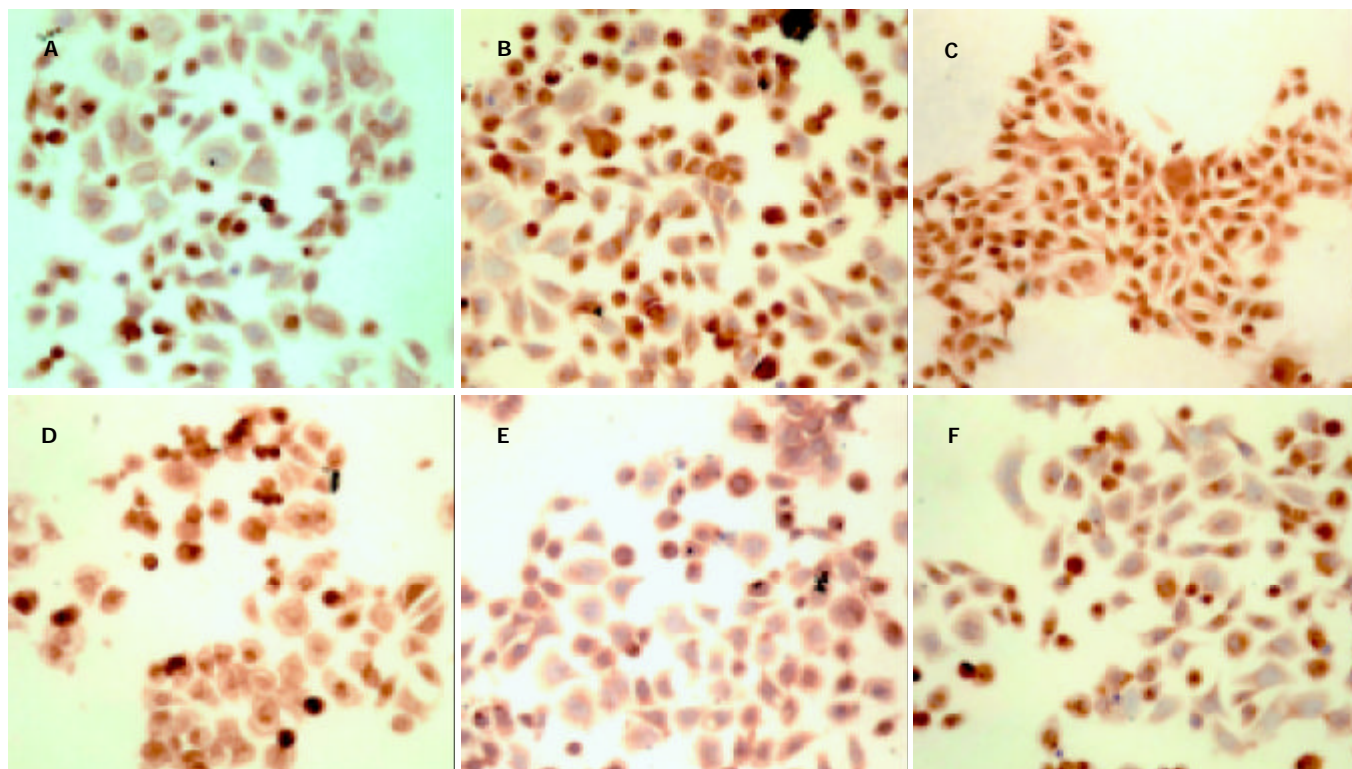


图1 ALA-PDT作用SW480细胞前后的G<sub>1</sub>/S关卡调控因子的表达(Chk2:A, B: CyclinD1; C, D: P21WAF1; E, F: A, C, E为ALA-PDT作用前, B, D, F为ALA-PDT作用后6 h, PDT作用后Chk2, P21WAF1表达明显增强, CyclinD1表达明显减弱。

### 3 讨论

PDT作为一种全新的肿瘤治疗手段,近年来备受重视。但PDT抑制肿瘤细胞的作用机制,仍不完全清楚,一般认为单态氧以及其他可能的活性氧成分是产生PDT作用的必要条件。大量研究表明,PDT可诱导肿瘤细胞凋亡,也可引起肿瘤细胞坏死,但目前仍无一种统一的机制来解释这种现象<sup>[4, 24-26]</sup>。Ahmad et al<sup>[1]</sup>研究表明,PDT以时间依赖方式导致细胞G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期阻滞和生长停滞,存活率下降,凋亡。他们认为PDT诱导的P21WAF1/Cip1/Sdi1的增加抑制了G<sub>1</sub>/S关卡转位,从而通过抑制CyclinD1、细胞周期素依赖性激酶2(cyclin dependent kinase 2, Cdk2)、Cdk6、CyclinE来使细胞阻滞在G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期,这种细胞周期阻滞是一种不可逆转的过程,最终导致凋亡。Fisher et al<sup>[6]</sup>发现PDT可通过诱导肿瘤细胞视网膜神经胶质瘤蛋白(retinoblastoma protein, PRB)快速移位和去磷酸化,从而诱导P53和P21WAF1/Cip1/Sdi1(以下简称P21WAF1)的表达,促使肿瘤细胞G<sub>1</sub>/S期阻滞和凋亡。

在本研究中,ALA-PDT作用结肠癌细胞SW480后6 h,即出现细胞生长减缓,细胞存活率下降,且表现为时间依赖性方式;12 h后,细胞开始出现明显的增生抑制,活细胞总数有所下降,而36 h后活细胞总数略有上升,但细胞总数和存活率仍较对照组差异明显<sup>[6]</sup>。流式细胞仪检测PDT后不同时相点结肠癌细胞周期变化,PDT后6-48 h细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>指数由 $30.5 \pm 5.5\%$ 升至 $72.6 \pm 5.8\%$ ;S期指数则由 $36.9 \pm 1.4\%$ 降到了 $21.9 \pm 2.9\%$ ;而G<sub>2</sub>/M期指数由PDT后6 h的 $16.1 \pm 1.0\%$ 降到

了 $5.6 \pm 2.9\%$ 。这表明ALA-PDT可以通过阻滞SW480细胞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期来抑制肿瘤细胞继续生长分裂,抑制肿瘤细胞增生。

细胞周期关卡(cell cycle checkpoint)是指控制细胞增生周期中的限速位点,他在DNA复制和有丝分裂前负责确定DNA合成的完整性,监控DNA的复制,在发生DNA损伤后修复和阻断细胞进入有丝分裂期,精确调节细胞周期的进行,以防止增生周期中发生错误<sup>[7]</sup>。细胞周期关卡控制的失调可导致基因不稳定性,增加癌症易感性<sup>[8]</sup>。在细胞周期关卡调控中,G<sub>1</sub>/S关卡的调控至关重要,细胞在该点对DNA损伤、各类信号传导因子等复杂的细胞内外信号进行整合和传递,决定细胞是否进行分裂、发生凋亡,或是进入G<sub>0</sub>期。G<sub>1</sub>/S关卡是细胞对DNA损伤的应激反应通路的重要枢纽,是由感觉因子(sensor)、传导因子(transducer)和效应因子(effector)构成的信号传导通路<sup>[9]</sup>。近来研究认为,在G<sub>1</sub>/S反应通路的上游是ATM(ataxia-telangiectasia, mutated)和ATR(ataxia-telangiectasia and Rad3-related)两个信号传导激酶,属于磷脂酰肌醇激酶(PIK)相关家族;传导因子主要是两个关卡激酶(check point kinase, Chk):关卡激酶1(Chk1)和关卡激酶2(Chk2),他们属于结构上无关但功能互补的丝氨酸/苏氨酸激酶家族,也是ATM和ATR调控的靶点,对DNA损伤做出反应。Chk下游是执行关卡反应的效应因子,这主要包括Chk激酶的底物,他们是与DNA修复、转录调节、细胞周期控制有关的相关蛋白,如P21WAF1、P53、BRCA1、Cdc25A/C等<sup>[10-12, 27-28]</sup>。

Chk2<sup>[13]</sup>可通过调控DNA修复和细胞存亡来调节细胞周期进程<sup>[14]</sup>. Chk2是保持细胞G<sub>1</sub>/S关卡完整性的关键信使, 他通过快速放大从DNA损伤到关卡效应因子的信号传导, 来延迟G<sub>1</sub>/S期进程和激活DNA修复. G<sub>1</sub>/S关卡调控机制通过ATM/ATR-Chk2-CDC25A关卡通路作用于下游效应因子来诱导快速的G<sub>1</sub>/S细胞周期阻滞<sup>[15-16]</sup>. 做为对外界刺激的反应, 上游信号传导激酶ATM/ATR激活Chk2, Chk2活化后, 以关卡通路的下游效应物为靶点, 沿多个通路传导关卡信号, 最终引起细胞周期在G<sub>1</sub>/S期阻滞, 激活DNA修复, 在细胞损伤严重的情况下, 诱导细胞凋亡坏死<sup>[17]</sup>. 目前已证实P21WAF1是Chk2的一个重要的下游关卡效应因子<sup>[15]</sup>. 研究表明Chk2是一个肿瘤抑制因子, Li-Fraumeni Syndrome横纹肌肉瘤家族均携带有突变的Chk2基因<sup>[18]</sup>.

CyclinD1是参与细胞周期G<sub>1</sub>/S关卡转换的重要正性调节因子, 他在肿瘤细胞中的过度表达使细胞周期G<sub>1</sub>/S转换时间缩短, 进而促进细胞周期进程和细胞过度增生, 加速其分裂进程<sup>[2]</sup>. CyclinD1基因同时又是一种弱致癌基因, 可与多种癌基因协同促进细胞转化, 其临床意义与肿瘤类型密切相关<sup>[19]</sup>. 在正常细胞中CyclinD1受严格控制, 这是由于CDK抑制蛋白(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)的抑制作用所致. P21WAF1是CKI家族最重要的成员之一, 是CyclinD1的主要抑制因子以及G<sub>1</sub>/S期关卡的重要调控因子, 现认为他可通过抑制Cyclin/CDK复合体, 阻滞DNA损伤后的细胞周期进程<sup>[20]</sup>, 使细胞周期阻滞于G<sub>1</sub>期以实现G<sub>1</sub>/S期的调节<sup>[21]</sup>. 他的G<sub>1</sub>期关卡调节因子的关键性已被另外一项研究证实: 作为对外来应激的细胞反应,  $\gamma$ 射线照射可引起表达p21WAF1的细胞G<sub>1</sub>期停滞, 但对缺乏p21WAF1表达的细胞则不能发挥周期阻滞作用<sup>[22]</sup>. 肿瘤细胞的CKI-Cyclin-CDK调控机制在G<sub>1</sub>/S关卡存在不同程度的缺陷, 可表现为P21WAF1-CyclinD1-CDK调控机制失常<sup>[29-32]</sup>. 我们也发现SW480细胞在PDT处理前P21WAF1蛋白阳性表达较弱, CyclinD1则呈强表达, 而在PDT处理后二者呈相反的变化趋势.

PDT对肿瘤细胞的G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期周期阻滞作用, 与G<sub>1</sub>/S关卡调控因子的变化均表现出相同的时间依赖方式. PDT作用后Chk2和P21WAF1的蛋白表达呈逐渐增高趋势, 而CyclinD1的蛋白水平表达呈渐下降趋势, 表明PDT对SW480细胞的G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期周期阻滞作用与对G<sub>1</sub>/S关卡调控因子的调节密切相关. 综合实验结果可以初步推测: PDT处理后, PDT产生的光化学反应可能通过损伤肿瘤细胞DNA诱导了G<sub>1</sub>关卡负向调控因子Chk2和P21WAF1的表达, 从而激活了ATM/ATR-Chk2-P21WAF1关卡通路, 肿瘤细胞在一定程度上恢复了G<sub>1</sub>/S关卡调控机制, 活化的Chk2激活p21WAF1等下游效应因子, P21WAF1通过抑制CyclinD1与CDK的结合来诱导快速的G<sub>1</sub>/S细胞周期阻滞, 使其发生坏死或凋亡.

#### 4 参考文献

- Ahmad N, Feyes DK, Agarwal R, Mukhtar H. Photodynamic therapy results in induction of WAF1/CIP1/P21 leading to cell cycle arrest and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 95:6977-6982
- Bartek J, Lukas J. Pathways governing G<sub>1</sub>/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* 2001;490:117-122
- Ren QG, Wu SM, Peng Q, Chen JY. Comparison of 5-aminolevulinic acid and its hexylester mediated photodynamic action on human hepatoma cells. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao (Shanghai)* 2002;34:650-654
- Wyld L, Reed MWR, Brown NJ. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br J Cancer* 2001;84:1384-1386
- Fisher AM, Ferrario A, Rucker N, Zhang S, Gomer CJ. Photodynamic therapy sensitivity is not altered in human tumor cells after abrogation of p53 function. *Cancer Res* 1999;59:331-335
- 肖卫东, 葛海燕, 陈祖林. 5-ALA光动力疗法对人结肠癌SW480细胞的抑制作用. *激光杂志* 2003;24:87-88
- Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996;274:1664-1672
- Zhou BB, Bartek JJ. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 2004;4:216-225
- Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408:433-439
- Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* 2002;511:145-178
- Ibrahim SO, Lillehaug JR, Vasstrand EN. Mutations of the cell cycle regulatory genes p16INK4A and p21WAF1 and the metastasis-inducing gene S100A4 are infrequent and unrelated to p53 tumour suppressor gene status and data on survival in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 2003; 23:4593-4600
- Pichierrri P, Rosselli F. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J* 2004;26:306-313
- Zhang J, Willers H, Feng Z, Ghosh JC, Kim S, Weaver DT, Chung JH, Powell SN, Xia F. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 2004; 24:708-718
- Falck J, Petrini JH, Williams BR, Lukas J, Bartek J. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 2002;30:290-294
- Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 2000;287: 1824-1827
- Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioreistant DNA synthesis. *Nature* 2001;410:842-847
- McGowan CH. Checking in on Cds1(Chk2): A checkpoint kinase and tumor suppressor. *Bioessays* 2002;24:502-511
- Hirao A, Cheung A, Duncan G, Girard PM, Elia AJ, Wakeham A, Okada H, Sarkissian T, Wong JA, Sakai T, De Stanchina E, Bristow RG, Suda T, Lowe SW, Jeggo PA, Elledge SJ, Mak TW. Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner. *Mol Cell Biol* 2002;22:6521-6532
- Gugger M, Kappeler A, Vonlanthen S, Altermatt HJ, Ris HB, Lardinois D, Borner MM, Heighway J, Betticher DC. Alterations of cell cycle regulators are less frequent in advanced non-small cell lung cancer than in resectable tumours. *Lung Cance* 2001;33:229-239
- Campanini F, Santucci MA, Brusa G, Pattacini L, Arpinati M, Rondelli D, Gamberi B, Barbieri E, Babini L, Tura S. Expression of P21(WAF1/CIP1/SID1) cyclin-dependent kinase inhibitor in hematopoietic progenitor cells. *Gene* 2001; 273:173-180

- 21 Owa T, Yoshino H, Yoshimatsu K, Nagasu T. Cell cycle regulation in the G1 phase: a promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr Med Chem* 2001;8:1487-1503
- 22 Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 1995;82:675-684
- 23 陈祖林, 唐建民, 单治堂, 罗云生. 细胞培养用品对光透射率的影响. *中国激光医学杂志* 1998;7:166-169
- 24 肖卫东, 葛海燕, 陈祖林. 光动力疗法治疗结肠癌肝转移的研究进展. *中国激光医学杂志* 2003;12:119-121
- 25 丁新民, 顾瑛, 刘凡光. 胰腺癌的光动力学治疗. *世界华人消化杂志* 2003;11:1621-1623
- 26 唐开业, 陈祖林, 唐建民. 光动力学疗法治疗早期胃癌. *华人消化杂志* 1998;6:349-350
- 27 Yang J, Xu ZP, Huang Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ, Yu YN. ATM and ATR: Sensing DNA damage. *World J Gastroenterol* 2004;10:155-160
- 28 Zhu KQ, Zhang SJ. Involvement of ATM/ATR-p38 MAPK cascade in MNNG induced G1-S arrest. *World J Gastroenterol* 2003;9:2073-2077
- 29 Li GQ, Li H, Zhang HF. Mad2 and p53 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2003;9:1972-1975
- 30 Dong ML, Zhu YC, Hopkins JV. Oil A induces apoptosis of pancreatic cancer cells via caspase activation, redistribution of cell cycle and GADD expression. *World J Gastroenterol* 2003;9:2745-2750
- 31 Shao JC, Wu JF, Wang DB, Qin R, Zhang H. Relationship between the expression of human telomerase reverse transcriptase gene and cell cycle regulators in gastric cancer and its significance. *World J Gastroenterol* 2003;9:427-431
- 32 Yu L, Sun ZJ, Wu SL, Pan CE. Effect of resveratrol on cell cycle proteins in murine transplantable liver cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2341-2343

## World Journal of Gastroenterology 编委会组成

《World Journal of Gastroenterology, WJG》编辑委员会由来自 53 个国家的 179 位消化病学专家组成, 具有广泛的代表性, 特别是聘请了一批工作在临床和科研一线, 具有良好科学记录的中青年专家为评委. 分别来自以下国家: ALBANIA(1), ALGERIA(1), ARGENTINA(2), AUSTRIA(1), BELARUS(1), BELGIUM(1), BRAZIL(1), CANADA(1), CHINA(38), COSTA RICA(1), DENMARK(1), EGYPT(1), FINLAND(1), GERMANY(7), GREECE(1), HUNGARY(2), ICELAND(1), INDIA(2), IRAN(1), IRELAND(1), ISRAEL(1), ITALY(2), JAPAN(3), KENYA(1), LATVIA(1), LITHUANIA(1), MACEDONIA(1), MALAYSIA(2), MONACO(1), NEW ZEALAND(1), PHILIPPINES(1), POLAND(2), ROMANIA(1), RUSSIA(3), SINGAPORE(1), SLOVENIA(3), SOUTH AFRICA(1), SOUTH KOREA(2), SPAIN(1), SRI LANKA(1), SWEDEN(2), SWITZERLAND(2), THAILAND(1), THE NETHERLANDS(1), TURKEY(1), UNITED KINGDOM(7), UNITED STATES(55), YUGOSLAVIA(1). WJG 编委的任务是针对论文的科学性、创新性和先进性及可读性进行评价和修改, 并针对我国现阶段科学研究整体水平和科研人员英文报告撰写能力的实际情况对稿件提出具体的建设性意见; 对投送 WJG 稿件的题名、摘要、引言、材料和方法、结果和讨论等进行综合评价, 根据是否能较好地反映我国或国际消化病学临床和基础的先进水平决定所投论文是否被接受. 目前, 投送 WJG 稿件的质量差别较大, 有些论文的科学性、可读性方面的问题较多. 为此, WJG 制定了稿件评审要点, 对控制 WJG 的学术质量起到了核心作用.

# 咖啡酸苯乙酯对大肠癌 HCT116 细胞增生的抑制作用

向德兵, 何渝军, 吴晓华, 王 东, 李增鹏, 何玉虹, 牟江洪, 肖华亮, 张沁宏

向德兵, 吴晓华, 王东, 李增鹏, 何玉虹, 牟江洪, 肖华亮, 张沁宏, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心病理科 重庆市 400042

何渝军, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普外科 重庆市 400042

向德兵, 男, 1972-08-21 生, 重庆市人, 汉族, 1997 年中国人民解放军第三军医大学病理学硕士。

国家自然科学基金资助项目, No. 30100228

重庆市科委应用基础基金资助项目, No. 6824

项目负责人: 向德兵, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心病理科。 xdb86@hotmail.com

电话: 023-68757374 传真: 023-68757706

收稿日期: 2003-09-09 接受日期: 2004-01-12

## Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation of human colorectal cancer cell line HCT116

De-Bing Xiang, Yu-Jun He, Xiao-Hua Wu, Dong Wang, Zeng-Peng Li, Yu-Hong He, Jiang-Hong Mou, Hua-Liang Xiao, Qing-Hong Zhang

De-Bing Xiang, Xiao-Hua Wu, Dong Wang, Zeng-Peng Li, Yu-Hong He, Jiang-Hong Mou, Hua-Liang Xiao, Qing-Hong Zhang, Department of Pathology, Cancer Center, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Yu-Jun He, Department of General Surgery, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30100228, and the Applied Basic Research Programs of Science and Technology Commission Foundation of Chongqing, No.6824

Correspondence to: De-Bing Xiang, Department of Pathology, Cancer Center, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. xdb86@hotmail.com

Received: 2003-09-09 Accepted: 2004-01-12

## Abstract

AIM: To study the effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on proliferation, cell cycle, apoptosis in the cultured colorectal cancer cell line HCT116.

METHODS: HCT116 cells were treated with CAPE at serial concentrations of 80, 40, 20, 10, 5, and 2.5 mg/L. The proliferative status of HCT116 cells was measured by using methabenzthiazuron (MTT) assay. Cell cycle was analyzed by using flow cytometry (FCM) with propidium iodide (PI) labeling method. The rate of apoptosis was detected by using FCM with Annexin V-FITC and PI double labeling method.

RESULTS: After HCT116 cells were exposed to CAPE (80, 40, 20, 10, 5 and 2.5 mg/L) for 24, 48, 72 and 96 h, CAPE displayed a strong growth inhibitory effect on HCT116 cells in a dose-and time-dependent manner. FCM analysis showed that G0/G1 phase rate increased, S phase rate decreased and apoptosis rate increased after HCT116 cells were exposed to CAPE (10, 5, and 2.5mg/L) for 24h, which were positively related to the concentration of CAPE.

CONCLUSION: CAPE can inhibit the proliferation of human colorectal cancer cell line HCT116, which is related to the cell cycle arrest and apoptosis.

Xiang DB, He YJ, Wu XH, Wang D, Li ZP, He YH, Mou JH, Xiao HL, Zhang QH. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation of human colorectal cancer cell line HCT116. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(5):1053-1056

## 摘要

目的: 探讨咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)对体外培养的大肠癌细胞 HCT116 细胞增生、细胞周期和凋亡的影响。

方法: 不同浓度 CAPE 处理体外培养的 HCT116 细胞后, 采用 MTT 法检测处理后 24、48、72、96 h HCT116 细胞的增生活性; PI 染色、流式细胞仪检测处理后 24 h 细胞周期分布; Annexin V-FITC/PI 双染色、流式细胞仪检测处理后 24 h 细胞凋亡率。

结果: 80, 40, 20, 10, 5.0, 2.5 mg/L CAPE 处理 HCT116 细胞 24, 48, 72, 96 h 后, 细胞增生明显受到抑制, 呈时间和剂量依赖性特点。流式细胞仪细胞周期分析表明, 10, 5.0, 2.5 mg/L CAPE 处理 HCT116 细胞 24 h 后, G0/G1 期细胞百分率上升, S 期细胞百分率下降, 呈剂量依赖性。流式细胞仪细胞凋亡率分析表明: 10, 5.0, 2.5 mg/L CAPE 处理 HCT116 细胞 24 h 后, 细胞凋亡率上升, 呈剂量依赖性。

结论: CAPE 对 HCT116 细胞具有明显的增生抑制作用, 其机制与其阻滞细胞周期和诱导凋亡有关。

向德兵, 何渝军, 吴晓华, 王东, 李增鹏, 何玉虹, 牟江洪, 肖华亮, 张沁宏。咖啡酸苯乙酯对大肠癌 HCT116 细胞增生的抑制作用。世界华人消化杂志 2004;12(5):1053-1056

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1053.asp>

## 0 引言

咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)是一种酚类抗氧化剂, 广泛存在于多种含树脂的植物和蜂胶中, 也能人工合成。蜂胶在国外作为一种民间药物, 证明其有抗病原微生物, 抗炎和抗肿瘤作用。近年国外有报道, CAPE 作为蜂胶抗肿瘤作用的主要活性成分, 对人白血病和多种实体瘤细胞有抑制增生和诱导凋亡作用<sup>[1-5]</sup>, 且发现 CAPE 可显著降低转基因小鼠(转染突变型 APC 基因)和致癌剂诱发的大鼠大肠肿瘤的发



生率<sup>[6-7]</sup>, 但CAPE能否抑制大肠癌细胞HCT116的增生, 作用机制如何, 目前尚不清楚. 我们探讨CAPE对体外培养的大肠癌细胞HCT116的增生抑制作用及其对细胞周期和凋亡的影响, 初步阐明其抗肿瘤作用机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 大肠癌细胞HCT116购自美国ATCC. CAPE、二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、碘化丙啉(PI)为Sigma公司产品. RPMI1640培养基、小牛血清为Hyclone公司产品. Annexin V-FITC试剂盒为美国贝克曼库尔特公司产品.

1.2 方法 HCT116细胞置于37℃, 饱和湿度, 含50 mL/L CO<sub>2</sub>的孵箱中培养, 培养液RPMI1640含有100 mL/L小牛血清, 1.0 × 10<sup>5</sup> U/L青霉素和链霉素. 根据细胞生长状况每2-3 d换液1次, 当细胞生长状态稳定, 呈对数生长期时, 用于实验. CAPE临用前以DMSO溶解, 用RPMI 1640液稀释(RPMI 1640液中DMSO浓度小于1 mL/L).

1.2.1 细胞增生抑制实验 采用MTT法检测CAPE对HCT116细胞生长的抑制作用. 对数生长期的HCT116细胞以4 × 10<sup>3</sup>/孔接种于96孔培养板培养, 24 h后吸除原培养液, 加入含CAPE浓度分别为2.5, 5.0, 10, 20, 40, 80 mg/L的RPMI1640培养液180 μL, 设培养液中不加药物(加相同浓度的DMSO)的为对照组, 另设只加培养液, 不加细胞和药物的为空白组. 每组6个复孔. 将各组细胞继续培养24, 48, 72, 96 h后, 进行MTT实验, 每孔加MTT溶液(5 g/L)20 μL, 继续培养4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入DMSO 150 μL, 振荡10 min, 使结晶充分溶解, 用酶标仪在490 nm波长处测定各孔的吸光度A值(A<sub>490</sub>), 按下列公式计算细胞生长抑制率:

细胞生长抑制率R=[1-(A实验组-A空白组)/(A对照组-A空白组)] × 100%.

1.2.2 细胞周期检测 对数生长期的HCT116细胞接种于6孔培养板培养, 24 h后吸除原培养液, 加入含CAPE浓度分别为2.5, 5.0, 10 mg/L的RPMI1640培养液, 设培养液中不加药物(加相同浓度的DMSO)的为对照组, 继续培养24 h后收集细胞, 2000转4℃离心5 min后弃上清, 冷PBS重悬, 离心, 弃上清, 用体积分数为70%乙醇固定, 4℃过夜, 染色前用PBS洗涤离心, 去除固定液, 用RNaseA(终浓度20 mg/L)消化, 37℃水浴30 min, 再加入PI染色液(终浓度50 mg/L), 混匀, 4℃避光染色30 min, 流式细胞仪上进行DNA含量和细胞周期分析, 得出细胞各周期的百分率.

1.2.3 细胞凋亡检测 对数生长期的HCT116细胞接种于6孔培养板培养, 24 h后吸除原培养液, 加入含CAPE浓度分别为2.5, 5.0, 10 mg/L的RPMI1640培养液, 设培养液中不加药物(加相同浓度的DMSO)的为对照组,

继续培养24 h后收集细胞, 2000 r/min 4℃离心5 min后, 冷PBS重悬, 离心, 弃上清, 再次重悬离心, 加Annexin-V-FITC溶液5 μL和PI 2.5 μL到100 μL细胞悬浮液中, 混匀后避光反应10 min, 加150 μL样品稀释液到样品中, 混匀后上机检测.

统计学处理 所有数据均以均数 ± 标准差(mean ± SD)表示. 以SPSS 9.0版专用统计分析程序对各组数据进行单因素方差分析. 以CalcuSyn Demo Version 1.1.4统计软件计算IC<sub>50</sub>.

## 2 结果

2.1 CAPE对HCT116细胞增生的抑制作用 CAPE作用24, 48, 72, 96 h后HCT116细胞的生长抑制率曲线(图1)可见, 随着CAPE浓度的增加和作用时间的延长, HCT116细胞的生长抑制率逐渐升高, 抑制作用表现量效依赖性和时间依赖性. 24, 48, 72, 96 h的IC<sub>50</sub>分别为22.45, 12.07, 6.47, 5.36 mg/L.

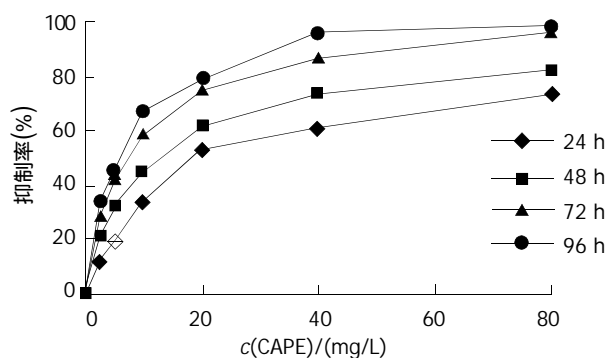


图1 CAPE对HCT116细胞增生的抑制作用.

2.2 CAPE对HCT116细胞周期的影响 HCT116细胞经2.5, 5.0, 10 mg/L的CAPE作用24 h后, 随着CAPE剂量的增加, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞逐渐增加, S期细胞逐渐下降, 与对照组比较, 差异有显著性, 而G<sub>2</sub>/M期改变不明显(表1, 图2).

表1 CAPE对HCT116细胞周期的影响

CAPE(mg/L)	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub> /M	S
0	0.40 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.45 ± 0.08
2.5	0.52 ± 0.06	0.16 ± 0.05	0.32 ± 0.02
5	0.56 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.01	0.29 ± 0.01 <sup>a</sup>
10	0.60 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.05	0.25 ± 0.04 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, vs 对照组.

2.3 CAPE对HCT116细胞凋亡的影响 对照组HCT116细胞自然凋亡率为5.5 ± 0.9%, 2.5, 5.0, 10 mg/L CAPE作用24 h后凋亡率分别为10.2 ± 0.7%, 16.6 ± 0.6%, 25.5 ± 3.3%, 均显著高于对照组(P < 0.01), 随CAPE剂量的增加, 凋亡率逐渐增加(图3, 4).

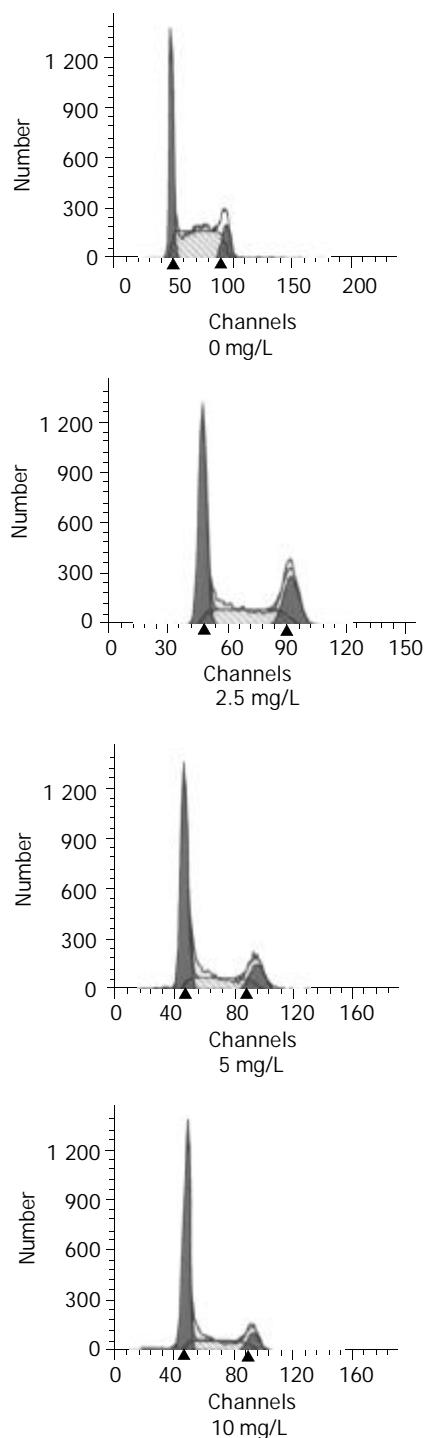


图2 不同浓度 CAPE 对 HCT116 细胞周期的影响.

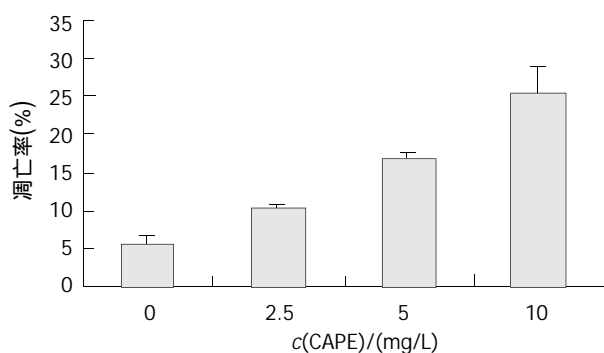


图3 CAPE 对 HCT116 细胞凋亡的影响.

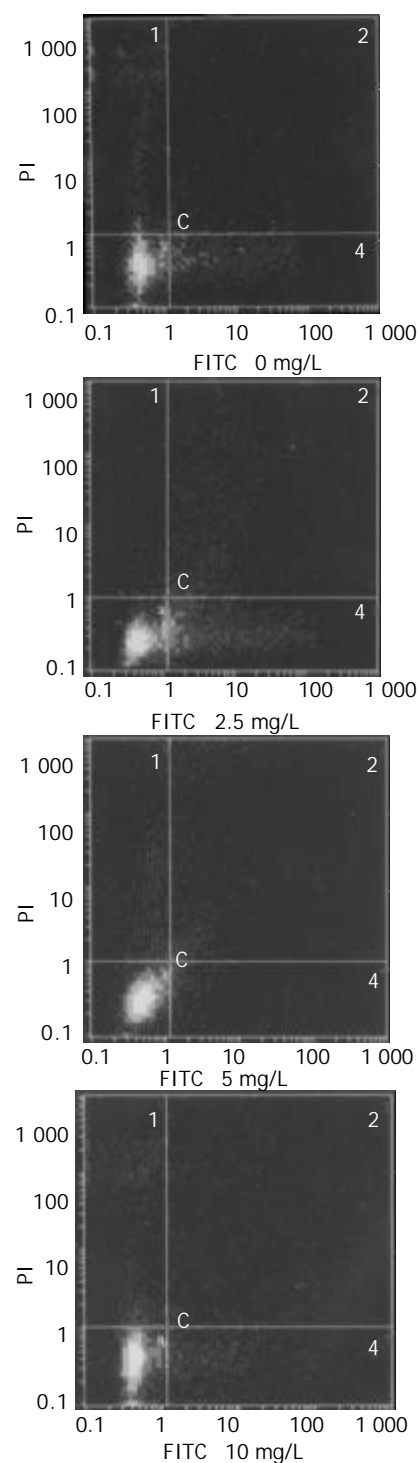


图4 不同浓度 CAPE 对 HCT116 细胞凋亡的影响.

### 3 讨论

大肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一<sup>[8-13]</sup>, 其发病呈上升趋势<sup>[14-16]</sup>, 严重威胁人民生命健康<sup>[17-21]</sup>, 目前国内外仍在积极探讨有效的治疗方法<sup>[22-25]</sup>. 流行病学调查显示, 大肠癌的发病与饮食结构有关, 西方发达国家人群中其发病率明显高于那些以素食为主、进食较少肉类和动物脂肪的人群, 如东南亚地区的居民. CAPE 广泛存在于多种含树脂的植物和蜂胶中, 且近年国外有报道, CAPE 作为蜂胶抗肿瘤作用的主要活性成分, 对人白血病、口腔鳞癌、乳腺癌、黑色素瘤细胞有抑

制增生和诱导凋亡作用,且与其抑制核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达有关。

我们应用CAPE作用人结肠癌HCT116细胞24, 48, 72, 96 h,发现CAPE能明显抑制细胞增生,随着CAPE浓度的增加和作用时间的延长,HCT116细胞的生长抑制率逐渐升高,抑制作用表现为剂量依赖性和时间依赖性。Nagaoka et al发现CAPE体外能显著抑制鼠肝转移结肠癌26-L5细胞株,鼠肝转移恶性黑色素瘤B16-BL6细胞株,鼠肺转移肺癌LLC细胞株,人纤维肉瘤HT-1080细胞株,人肺腺癌A549细胞株和人宫颈癌HeLa细胞株的生长,作用72 h的EC50分别为0.15, 2.57, 2.18, 14.4, 32.4, 10.7  $\mu$ M,说明不同的细胞株对CAPE的敏感性不同。

关于CAPE是否可调控细胞周期,目前尚未见文献报道。我们发现,CAPE作用HCT116细胞24 h后,细胞受阻于G0/G1期,S期细胞减少,且呈剂量依赖性。在一个完整的细胞周期中,有多个影响各时期过渡的限制点,他们分别处在由G1期到M期和M期到G1期的过渡阶段中。由于不同生物细胞的增生周期时间不同,主要表现在G1期持续时间的差异,而且G1期的启动是细胞周期的关键。因此G1-S期的调控尤为重要。G1期阻滞使HCT116细胞生长周期延长,细胞的恶性增生相应减慢。S期即DNA合成期,可反映细胞的增生情况。S期细胞占细胞周期的比例高则提示DNA合成活跃,细胞增生活跃。一般而言,肿瘤细胞的S期比例较正常细胞要高,其增生活性也较正常细胞高。因此,CAPE可调控细胞周期,使细胞受阻于G0/G1期,而不能进入S期,限制细胞增生。

Chen et al<sup>[2]</sup>研究表明,CAPE能诱导人白血病HL-60细胞凋亡,呈时间和浓度依赖性。Nomura et al<sup>[5]</sup>发现CAPE能明显诱导肿瘤细胞株NCI-H388和SK-OV-3等的凋亡,并且与其调节P53基因功能有关。我们应用Annexin V-FITC/PI双染色法检测CAPE对HCT116细胞凋亡的影响,该方法是目前检测凋亡的最敏感的方法之一,能检测出早期凋亡细胞,并区分出坏死细胞。结果显示,CAPE作用HCT116细胞24 h后,细胞凋亡率明显升高,呈剂量依赖性特点。

因此,本结果表明,CAPE对HCT116细胞具有明显的增生抑制作用,与其阻滞细胞周期和诱导凋亡有关,CAPE具体的抗癌作用机制仍需进一步研究。

#### 4 参考文献

- Chen YJ, Shiao MS, Wang SY. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anticancer Drugs* 2001;12:143-149
- Chen YJ, Shiao MS, Hsu ML, Tsai TH, Wang SY. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *J Agric Food Chem* 2001;49:5615-5619
- Lee YJ, Liao PH, Chen WK, Yang CY. Preferential cytotoxicity

- of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett* 2000;153:51-56
- Usia T, Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *J Nat Prod* 2002;65:673-676
- Nomura M, Kaji A, Ma W, Miyamoto K, Dong Z. Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester. *Mol Carcinog* 2001;31:83-89
- Mahmoud NN, Carothers AM, Grunberger D, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, Newmark HL, Bertagnolli MM. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* 2000;21:921-927
- Borrelli F, Izzo AA, Di Carlo G, Maffia P, Russo A, Maiello FM, Capasso F, Mascolo N. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia* 2002;73(Suppl 1):S38-43
- 房殿春, 杨仕明, 杨建民, 刘海峰, 彭贵勇, 肖天利, 汪荣泉, 刘为纹. 大肠癌组织微卫星不稳与hMLH1和hMSH2基因启动子区甲基化状态. *世界华人消化杂志* 2003;11:302-305
- 谢正勇, 卿三华. 国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点. *世界华人消化杂志* 2003;11:1511-1514
- 向德兵, 吴晓华, 李增鹏, 刘友生. beta-catenin, cyclin D1 and c-myc在大肠癌组织中的表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:305-308
- Chen K, Cai J, Liu XY, Ma XY, Yao KY, Zheng S. Nested case-control study on the risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:99-103
- Cai SJ, Xu Y, Cai GX, Lian P, Guan ZQ, Mo SJ, Sun MH, Cai Q, Shi DR. Clinical characteristics and diagnosis of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:284-287
- Qing SH, Rao KY, Jiang HY, Wexner SD. Racial differences in the anatomical distribution of colorectal cancer: a study of differences between American and Chinese patients. *World J Gastroenterol* 2003;9:721-725
- 谢正勇, 卿三华. 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势. *世界华人消化杂志* 2003;11:1050-1053
- Kim JJ, Park YJ, Kim KH, Kim JJ, Song BJ, Lee MS, Kim CN, Chang SH. hOGG1 Ser326Cys polymorphism modifies the significance of the environmental risk factor for colon cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:956-960
- Zhou ZG, Wang Z, Yu YY, Shu Y, Cheng Z, Li L, Lei WZ, Wang TC. Laparoscopic total mesorectal excision of low rectal cancer with preservation of anal sphincter: A report of 82 cases. *World J Gastroenterol* 2003;9:1477-1481
- Zhang JC, Wang ZR, Cheng YJ, Yang DZ, Shi JS, Liang AL, Liu NN, Wang XM. Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant exon 6 in primary tumors and corresponding lymph node metastases of colorectal carcinoma with Dukes' stage C or D. *World J Gastroenterol* 2003;9:1482-1486
- Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1227-1230
- 刘建平, 朱兆华. 大肠肿瘤COX-2的表达与临床病理特征的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:306-309
- 丁志杰, 单吉贤, 都姝妍. 直肠癌组织CD44v6, DNA含量的联合检测及临床意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:1382-1384
- 肖军, 邓长生, 朱允庆. 大肠腺癌组织Survivin蛋白的表达意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:540-543
- 布立民, 纪欣, 韩英, 陈刚, 王志红, 孙淑红. 丁酸钠联合穿琥宁对人大肠癌细胞HCT-8增生的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:1193-1196
- 王志华, 康熙雄, 张智清, 申宝忠, 李莹. 肠癌细胞BAI1基因表达的检测及其抗肿瘤作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:834-836
- 黎成金, 马庆久, 赖大年, 鲁建国, 王小军, 王青, 潘伯荣, 武永忠, 李金茂. CD/5-FC系统对结肠癌细胞的杀伤作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:535-539
- MacDonald TM, Morant SV, Goldstein JL, Burke TA, Pettitt D. Channelling bias and the incidence of gastrointestinal haemorrhage in users of meloxicam, coxibs, and older, non-specific non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Gut* 2003;52:1265-1270

# CDC25B在大肠肿瘤中的表达及意义

刘光军, 张丹, 张力, 王继红, 姜彦多, 高红, 刘丹, 金成兰

刘光军, 张力, 刘丹, 金成兰, 中国人民解放军 202 医院内窥镜中心  
辽宁省沈阳市 110003  
张丹, 中国人民解放军 202 医院消化科 辽宁省沈阳市 110003  
王继红, 姜彦多, 中国人民解放军 202 医院病理科 辽宁省沈阳市 110003  
高红, 中国医科大学第二临床学院卫生部小儿先天畸形重点实验室  
辽宁省沈阳市 110004  
刘光军, 男, 1967-09-05 生, 天津市人, 汉族. 2003 年白求恩医科大学硕士.  
主治医师, 主要从事胃肠道疾病的临床及基础研究.  
项目负责人: 刘光军, 110003, 辽宁省沈阳市, 中国人民解放军 202 医院内  
窥镜中心. lgj10258@163.com  
电话: 024-23053833  
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-02-01

## Expression of CDC25B and its clinical significance in colorectal neoplasms

Guang-Jun Liu, Dan Zhang, Li Zhang, Ji-Hong Wang,  
Yan-Duo Jiang, Hong Gao, Dan Liu, Cheng-Lan Jin

Guang-Jun Liu, Li Zhang, Dan Liu, Cheng-Lan Jin, Department of  
Endoscopy, 202 Hospital of Chinese PLA, Shenyang 110003, Liaoning  
Province, China  
Dan Zhang, Department of Gastroenterology, 202 Hospital of Chinese  
PLA, Shenyang 110003, Liaoning Province, China  
Ji-Hong Wang, Yan-Duo Jiang, Department of Pathology, 202 Hospi-  
tal of Chinese PLA, Shenyang 110003, Liaoning Province, China  
Gao Hong, Second Clinical College, China Medical University, Shenyang  
110004, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Guang-Jun Liu, Department of Endoscopy, 202  
Hospital of Chinese PLA, Shenyang 110003, Liaoning Province, China.  
lgj\_10258@163.com  
Received: 2003-12-12 Accepted: 2004-02-01

## Abstract

**AIM:** To elucidate the role of CDC25B in pathogenesis, evolution and metastasis of colorectal cancer and to investigate the relationship between the expression of CDC25B and the clinical pathological features of colorectal cancer and the prognosis of patients.

**METHODS:** The expression of CDC25B at the mRNA and protein levels was examined in patients with colorectal cancer ( $n=24$  by RT-PCR methods and  $n=168$  by S-P methods), colorectal adenoma ( $n=62$  by RT-PCR methods and  $n=25$  by S-P methods) and normal colorectal mucosa ( $n=10$  by RT-PCR methods and  $n=20$  by S-P methods) by RT-PCR and immunohistochemical S-P method. The survival of postoperative patients were followed-up.

**RESULTS:** The CDC25B mRNA expression in colorectal cancer and colorectal adenoma was higher than that of normal colorectal tissues ( $1.41 \pm 0.07$ ,  $1.32 \pm 0.17$  vs  $0.62 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ), and the CDC25B mRNA of colorectal cancer was higher than that of colorectal adenoma ( $1.41 \pm 0.07$  vs  $1.32 \pm 0.17$ ,  $P < 0.05$ ). The expression of CDC25B mRNA in colorectal adenoma with mild, moderate to severe hyperplasia was gradually increasing ( $1.25 \pm 0.21$  vs  $1.36 \pm 0.19$

vs  $1.40 \pm 0.07$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of CDC25B had a positive correlation with distant metastases. The patients whose expression of CDC25B was positive had a markedly low survival rate in 5 years.

**CONCLUSION:** CDC25B may be involved in the transition from adenoma to cancer. Expression of CDC25B in colorectal cancer may accelerate the transformation of cell cycle, which promotes the metastases to distant organs.

Liu GJ, Zhang D, Zhang L, Wang JH, Jiang YD, Gao H, Liu D, Jin CL. Expression of CDC25B and its clinical significance in colorectal neoplasms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1057-1060

## 摘要

**目的:** 探讨 CDC25B (cell division cycle 25B, 细胞分裂周期蛋白 25B) 在大肠肿瘤中的表达及临床意义。

**方法:** 应用半定量的 RT-PCR 及免疫组化染色 (S-P 法) 方法检测该基因在大肠癌 (RT-PCR 法,  $n=24$ ; S-P 法,  $n=168$ ), 大肠腺瘤 (RT-PCR 法,  $n=62$ ; S-P 法,  $n=25$ ) 及大肠正常黏膜 (RT-PCR 法,  $n=10$ ; S-P 法,  $n=20$ ) 中的表达。

**结果:** CDC25B mRNA 在大肠癌及大肠腺瘤中的相对含量明显高于正常大肠黏膜 ( $1.41 \pm 0.07$ ,  $1.32 \pm 0.17$  vs  $0.62 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ), 在大肠腺瘤伴轻 - 中 - 重度不典型增生组织中的相对含量逐渐增高 ( $1.25 \pm 0.21$ ,  $1.36 \pm 0.19$  和  $1.40 \pm 0.07$ ,  $P < 0.01$ ); CDC25B 基因翻译蛋白在正常大肠黏膜、腺瘤中未见表达, 在大肠癌中以细胞核表达为主, 其表达与大肠癌有无远处脏器转移相关 ( $2/46$  vs  $14/106$ ,  $P < 0.05$ ); 经随访发现 CDC25B 蛋白阳性表达者, 5 a 生存率明显降低 ( $25/31$  vs  $42/82$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** CDC25B 可能参与了大肠腺瘤到大肠癌的转变过程, 其在大肠癌发展中可能起一定作用, 为大肠癌预后不良的危险因素。

刘光军, 张丹, 张力, 王继红, 姜彦多, 高红, 刘丹, 金成兰. CDC25B 在大肠肿瘤中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1057-1060  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1057.asp>

## 0 引言

CDC25B 是 CDC25 磷酸酶家族中的一员, 是有丝分裂的激活剂, 加速细胞分裂. CDC25B 蛋白本身具有肿瘤源性. 大肠癌在我国常见<sup>[1-10]</sup>, 而 CDC25B 过度表达者预后差<sup>[11]</sup>, 且与有无远处脏器转移及肿瘤大小关系密切, 但未见有关该基因在腺瘤中表达情况的报道. 由于

多数大肠癌均是从大肠腺瘤发展而来,我们应用半定量的 RT-PCR 及免疫组化染色(S-P 法)方法检测该基因在大肠癌,大肠腺瘤及大肠正常黏膜中的表达,同时对术后病例进行随访,比较 CDC25B 阳性及阴性表达者 5 a 生存率的差异.以了解该蛋白在大肠癌发生、发展及转移中的作用,与临床病理特征的联系及与预后的相关性等.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 24 份大肠癌和 62 份大肠腺瘤活检组织标本均取自 2002-04/2002-12 我院肠镜室肠镜检查的患者,并均经病理检查证实. 10 份正常黏膜活检标本取自距癌肿 10 cm 以外的部位.将活检标本液氮速冻, -70 °C 冰箱冷冻待测.总 RNA 提取按 Trizol 试剂盒说明进行. CDC25B (416 bp)引物参照 Takemasa et al<sup>[11]</sup>资料设计:上游引物为 5'-CACGCCCCGTGCAGAATAAGC-3';下游引物为 5'-ATGACTCTCTTGTCCAGGCTACAGG-3'.同时设内参照  $\beta$ -actin (592 bp):上游引物为 5'-TGTATGCCTCTGGTCGATCCAC-3';下游引物为 5'-ACAGAGTAC TTGCTGTCAGGAG-3'.均由北京奥科生物有限公司合成.

**1.2 方法** 逆转录合成 cDNA 第一链各管反应总体积为 10  $\mu$ L. RT 反应条件为: 65 °C 预变性 1 min; 30 °C 变性 5 min, 65 °C 退火 30 min (15-30 min 匀速上升), 98 °C 延伸 5 min; 5 °C 延伸 5 min. PCR 扩增 CDC25B 总反应体积为 25  $\mu$ L. PCR 条件: 95 °C 预变性 12 min; 95 °C 变性 1 min, 62 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 循环; 72 °C 延伸 10 min.  $\beta$ -actin 总反应体积为 25  $\mu$ L. PCR 条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 循环; 72 °C 延伸 7 min. 将分别扩增的 CDC25B 和  $\beta$ -actin PCR 产物一起于 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,测相对含量;同时设标记物为  $\phi$ x174-Hinc II (Takara 公司).电泳后,经凝胶成像分析系统摄影,用相应软件扫描测定 PCR 产物经溴化乙锭染色后强度(公式: CDC25B 的相对含量 = CDC25B 密度 /  $\beta$ -actin 密度  $\times$  100 表示).

另收集我院 1991/1996 年资料完整手术切除的大肠癌标本 168 例,其中男 90 例,女 78 例.年龄 23-83 岁. 113 例随访 18-132 mo. Dukes A 期 46 例, B 期 62 例, C 期 42 例, D 期 18 例.同时选择正常大肠黏膜 20 例,大肠腺瘤 25 例.所有标本经 40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,厚度 3-5  $\mu$ m,分别行 HE 染色和免疫组化染色.采用 S-P 法,阳性细胞核染成棕黄色.细胞无染色或阳性细胞数小于 5% 记为(-);阳性细胞数 5-25% 记为(+);26-50% 记为(++);阳性细胞数大于 50% 记为(+++).从手术日起,到随访日期或由于复发、转移而死亡的日期为止,有 113 例完整的随访资料.

**统计学处理** 实验数据采用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示.计数资料采用  $\chi^2$  检验,计量资料采用 F 分析和 t 检验,以上均在 SPSS 8.0 软件包上进行.计算生存期,

对随访资料的生存期分析,按 Kaplan-Meier 法制作累积生存率曲线并作 Log-rank 检验.

## 2 结果

**2.1 CDC25B mRNA 的表达** 经紫外分光光度计测定提取的总 RNA A260/A280 在 1.6-1.9,电泳时可见清晰的 RNA 条带. RT-PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,紫外透射仪下在 416 bp 可见明显的特异产物带,无明显非特异产物带.正常组织未见电泳带;大肠腺瘤中随着组织不典型增生程度的加重,电泳带逐渐增宽、变亮;大肠癌组织的电泳带最亮且宽(图 1). CDC25B 在大肠癌、大肠腺瘤中的表达均明显高于正常组织( $P < 0.05$ ),但二者间差异不显著( $P > 0.05$ );同时 CDC25B 在大肠腺瘤中的表达与不典型增生程度无关( $P > 0.05$ ,表 1).在大肠癌、大肠腺瘤及正常组织中均有不同程度的 CDC25B mRNA 表达,其中以大肠癌中为最高,腺瘤居中,正常组织最少. CDC25B 在大肠癌中的相对含量高于大肠腺瘤( $P < 0.05$ );大肠癌和大肠腺瘤中的相对含量均高于正常组织( $P < 0.01$ ). CDC25B 在大肠腺瘤伴有轻、中、重度不典型增生组织中的相对含量逐渐增高( $P < 0.01$ ,表 1).

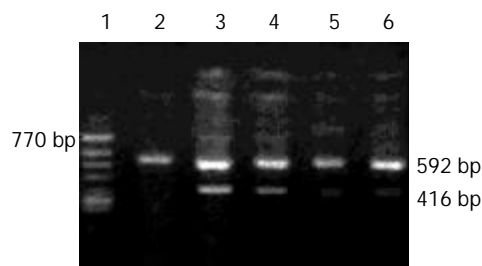


图1 大肠不同组织中 CDC25B mRNA 表达. 1:  $\phi$ x174-Hinc II; 2: 阴性对照; 3: 大肠腺瘤; 4: 大肠腺瘤伴重度不典型增生, 局部癌变; 5: 大肠腺瘤伴中度不典型增生; 6: 大肠腺瘤伴轻度不典型增生.

表1 结肠组织 CDC25B 表达和 CDC25B mRNA 相对含量

结肠组织	n	CDC25B		CDC25B mRNA (mean $\pm$ SD, ng)
		阳性(n)	阳性率(%)	
正常	10	0	0	0.62 $\pm$ 0.02
腺瘤	62	21	33.9 <sup>a</sup>	1.32 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>
轻度不典型增生	26	7	26.9	1.25 $\pm$ 0.21
中度不典型增生	24	8	33.3	1.36 $\pm$ 0.19 <sup>d</sup>
重度不典型增生	12	6	50	1.40 $\pm$ 0.07
大肠癌	24	9	37.5 <sup>a</sup>	1.41 $\pm$ 0.07 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 腺瘤; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 轻、重度不典型增生.

**2.2 CDC25B 蛋白的表达** 在 20 例正常大肠黏膜及 25 例大肠腺瘤组织中均未见 CDC25B 基因表达. 大肠癌组织中 CDC25B 基因表达以细胞核表达为主(图 2), 阳性率 71.4%(120/168), 其中(+)5.9%、(++)23.8%、(+++)41.7%. 癌旁正常组织中无表达. 大肠癌 CDC25B 基因表达与大



肠癌有无远处脏器转移、血清癌胚抗原(CEA)水平相关( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ), 而与临床病理分期、组织分级、淋巴结转移、肿瘤大小、性别、年龄均无关(表 2). 本组大肠癌随访 113 例(67.3%). 5 a 内死于本病者 46 例, 占 40.7%. Kaplan-Meier 生存率曲线分析, CDC25B 阴性和阳性表达者, 5 a 生存率分别为 80.6%(25/31)和 51.2%(42/82). 经 Log rank 检验, 阳性组 5 a 生存率显著低于阴性组( $P < 0.05$ , 图 3). 提示 CDC25B 阳性者恶性程度高, 预后差.

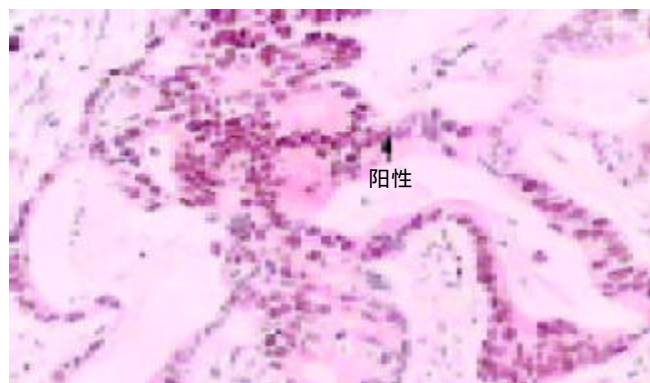


图 2 大肠癌组织中细胞核 CDC25B 表达阳性 S-P  $\times 200$ .

表 2 CDC25B 表达与大肠癌临床病理(n)

临床病理	阴性	阳性	合计
正常大肠黏膜	20	0	20 <sup>a</sup>
大肠腺瘤	25	0	25 <sup>a</sup>
大肠癌	48	120	168
Dukes A 期	8	38	46
Dukes B 期	14	48	62
Dukes C 期	18	24	42
Dukes D 期	8	10	18
高分化	22	54	76
中分化	20	58	78
低分化	6	8	14
淋巴结转移 无	26	84	110
有	22	36	58
远处转移 无	46	106	152
有	2	14	16 <sup>a</sup>
血清 CEA $\leq 15 \mu\text{g/L}$	38	84	122
$> 15 \mu\text{g/L}$	10	36	46 <sup>b</sup>
肿瘤直径 $\leq 5 \text{ cm}$	14	50	64
$> 5 \text{ cm}$	34	70	104
男	22	68	90
女	26	52	78
年龄 $\leq 60$ 岁	30	66	96
$> 60$ 岁	18	54	72

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ .

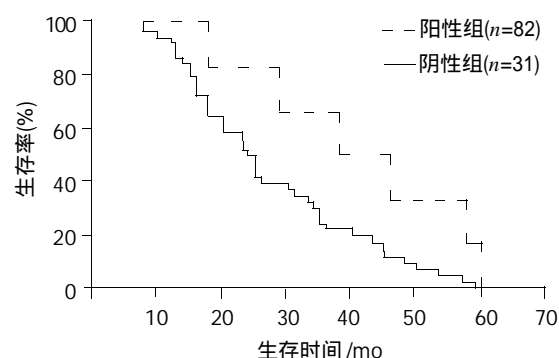


图 3 CDC25B 表达阴性和阳性者 Kaplan-Meier 生存率曲线.

### 3 讨论

CDC25B 是 CDC25 磷酸酶家族中的一员, 是有丝分裂的激活剂, 在  $G_2 \rightarrow M$  期通过对 cdc2(即 CDK<sub>1</sub>, 是原型的 CDK, 与 CyclinB 调节亚单位一起调节底物磷酸化, 引起细胞有丝分裂, 调节细胞  $G_2 \rightarrow M$  期转化)激酶的 Tyr-15 和 Thr-14 去磷酸化而激活 cdc2, 促进细胞进入有丝分裂期<sup>[11]</sup>. 我们应用 RT-PCR 方法检测正常大肠黏膜组织中 CDC25B 呈低水平表达(相对含量  $0.62 \pm 0.02$ ), 免疫组化染色发现少数正常大肠黏膜组织中细胞核染色阳性, 但阳性细胞数小于 5%, 故列为阴性. RT-PCR 检测大肠腺瘤中 CDC25B 呈过度表达(相对含量  $1.32 \pm 0.17$ , 高于正常组织 2 倍以上). 而免疫组化染色大肠腺瘤组织中未见表达, 我们在观察中也发现部分腺瘤中可见细胞核染色, 但阳性细胞数小于 5%, 故列为阴性. 考虑免疫组化为假阴性结果, 其原因可能是因标本固定时间较长, 造成抗原漏出而致假阴性. Takemasa et al<sup>[11]</sup>报道, CDC25B 在大肠癌检出率为 60%, 而 Hernandez et al<sup>[12]</sup>报道大肠癌检出率为 56%. 我们实验中, RT-PCR 检测大肠癌组织中呈过度表达(相对含量  $1.41 \pm 0.07$ , 高于正常组织 2 倍以上), 检出率为 37.5%; 免疫组化染色大肠癌组织中 CDC25B 基因表达阳性占 71.4% (120/168), 但强阳性仅占 41.7%, 均明显低于 Takemasa et al 及 Hernandez et al 的报道的过度表达率, 其原因也可能与种族有关.

从本实验结果看, 所测组织中均有 CDC25BmRNA 的表达. 腺癌和腺瘤中 CDC25BmRNA 的相对含量与正常组织相比差异有非常显著的意义, 癌和腺瘤中呈高水平表达; 并且癌和腺瘤二者中的表达差异亦有显著性意义; 同时发现, 从大肠腺瘤伴轻、中、重度不典型增生到腺癌 CDC25BmRNA 的相对含量呈逐渐增高趋势. 此结果表明, CDC25 基因表达所导致的细胞增生在大肠癌的恶性转化过程中起重要作用. CDC25B 是人体组织中存在的一种正常而微量的物质, 起着促进细胞从  $G_2 \rightarrow M$  期, 促进细胞有丝分裂的作用. 在发生肿瘤改变时, 由于致癌因素的作用使腺瘤中的 CDC25B 基因活性增强, 导致合成过量的 CDC25B, 促进肿瘤生长和恶性转化. 推测 CDC25B 基因的过度表达可能发生在恶性肿瘤的早期阶段, 进而引起 CDC25B 基因表达异常紊

乱,发生肿瘤改变,CDC25B的表达有可能作为转录紊乱的一个早期生物学指标,对于恶性肿瘤的诊断甚至是早期诊断评估有十分重要的作用。

我们发现,CDC25B基因表达与癌有无远处脏器转移( $P < 0.05$ ),血清CEA水平( $P < 0.005$ )相关。而与临床病理分期、组织分级、淋巴结转移、肿瘤大小、性别、年龄均无关( $P > 0.05$ )。提示CDC25B基因表达者很可能存在远处脏器转移。血清CEA水平监测对了解大肠癌有无复发、有无远处脏器转移、判断预后、评价疗效具有较高临床应用价值。本组资料显示CDC25B基因表达与血清CEA水平相关,提示同时监测血清CEA水平及CDC25B基因表达情况可判断预后,指导治疗。CDC25B作为细胞周期正调节因子,可促进肿瘤细胞的分裂增生,进而促进肿瘤的发生与发展,同时在一定条件下CDC25B还具有肿瘤源性,二者共同影响了患者的预后。本结果显示,CDC25B不仅与大肠癌远处脏器转移相关,而且对大肠癌预后也有一定的影响,我们通过生存曲线分析,发现CDC25B阳性表达者,其5a生存率显著低于阴性组。提示CDC25B蛋白过度表达患者预后较差,检测CDC25B表达情况可预测预后,指导治疗。由于CDC25B磷酸酶为细胞周期调控因子,如果能研究某种物质可抑制该蛋白活性,则可抑制细胞分裂,控制肿瘤的发生、发展。近年来Lazo et al<sup>[13-14]</sup>和Sodeoka et al<sup>[15]</sup>分别合成了某些化合物能够选择性抑制CDC25B磷酸酶,进而阻止了肿瘤细胞G<sub>2</sub>→M期的转化,抑制了人和鼠肿瘤细胞的生长,可能是防治结肠癌的可行途径之一。

#### 4 参考文献

1 来茂德. 中国结直肠癌发生发展相关基因. 世界华人消化杂志

- 2001;9:1227-1232
- 2 金顺钱,詹启敏. 肿瘤分子生物学是基础医学研究的前沿. 世界华人消化杂志 2002;10:678-680
- 3 谢正勇,卿三华. 结直肠癌发病率及解剖部位变化趋势. 世界华人消化杂志 2003;11:1050-1053
- 4 卿三华. 结、直肠癌临床病理分期系统及其临床意义. 世界华人消化杂志 2003;11:1760-1763
- 5 刘建平,朱兆华. 大肠肿瘤COX-2的表达与临床病理特征的关系. 世界华人消化杂志 2003;11:306-309
- 6 盛剑秋,晨智敏. 大肠癌相关基因对大肠癌的筛选. 世界华人消化杂志 2001;9:783-785
- 7 肖军,邓长生,朱尤庆. 大肠腺癌组织Survivin蛋白的表达意义. 世界华人消化杂志 2003;11:540-543
- 8 李世荣. 大肠癌早期诊断的策略. 世界华人消化杂志 2001;9:780-782
- 9 周海波,张居民,颜云. 结直肠癌组织中DPC<sub>4</sub>基因分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1140-1142
- 10 吴佩,方胜,芮景,夏祥厚. 大肠癌组织胃泌素生长抑素表达的意义. 世界华人消化杂志 2002;10:1404-1407
- 11 Takemasa I, Yamamoto H, Sekimoto M, Ohue M, Noura S, Miyake Y, Matsumoto T, Aihara T, Tomita N, Tamaki Y, Sakita I, Kikkawa N, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M. Overexpression of CDC25B phosphatase as a novel marker of poor prognosis of human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:3043-3050
- 12 Hernandez S, Bessa X, Bea S, Hernandez L, Nadal A, Mallofre C, Muntane J, Castells A, Fernandez PL, Cardesa A, Campo E. Differential expression of cdc25 cell-cycle-activating phosphatases in human colorectal carcinoma. *Lab Invest* 2001;81:465-473
- 13 Lazo JS, Nemoto K, Pestell KE, Cooley K, Southwick EC, Mitchell DA, Furey W, Gussio R, Zaharevitz DW, Joo B, Wipf P. Identification of a potent and selective pharmacophore for Cdc25 dual specificity phosphatase inhibitors. *Mol Pharmacol* 2002;61:720-728
- 14 Lazo JS, Aslan DC, Southwick EC, Cooley KA, Ducruet AP, Joo B, Vogt A, Wipf P. Discovery and biological evaluation of a new family of potent inhibitors of the dual specificity protein phosphatase Cdc25. *J Med Chem* 2001;44:4042-4049
- 15 Sodeoka M, Sampe R, Kojima S, Baba Y, Usui T, Ueda K, Osada H. Synthesis of a tetronic acid library focused on inhibitors of tyrosine and dual-specificity protein phosphatases and its evaluation regarding VHR and cdc25B inhibition. *J Med Chem* 2001;44:3216-3222

## 科技论文写作高级研修班即将开办

由国家自然科学基金委员会科学基金杂志部主办,中国科学院上海生命科学信息中心协办的“第二期科技论文写作高级研修班”定于2004-07-12/17在北京和上海举行。

本次研修班的主讲人有来自英国牛津、剑桥等著名学府的华人学者、Nature 期刊的高级编辑、国家自然科学基金委员会的管理专家等,涉及的主题有科技论文写作的理论与实践、投稿注意事项、科技编辑技巧,以及如何撰写科学基金项目申请书等。

有关科技论文写作高级研修班招生的详细内容敬请查询相关网站: [www.nsfc.gov.cn](http://www.nsfc.gov.cn); 或 [www.pub.nsfc.gov.cn](http://www.pub.nsfc.gov.cn)

咨询电话: 010-62326893

(武长白、莫京)

# 大肠癌 VEGF - C 表达与淋巴结转移和预后的关系

牟江洪, 阎晓初, 王 东, 吴小华, 李增鹏, 向德兵

牟江洪, 王东, 吴小华, 李增鹏, 向德兵, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心病理科 重庆市 400042  
阎晓初, 中国人民解放军第三军医大学西南医院病理学研究所 重庆市 400038  
牟江洪, 男, 1973-05-24 生, 四川省自贡市人, 汉族, 1996 年第三军医大学  
本科毕业, 2001 级在读硕士, 主治医师, 讲师, 主要从事肿瘤病理研究。  
项目负责人: 阎晓初, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南  
医院病理学研究所. yxchwq@mail.tmmu.com.cn  
电话: 023-68754432 传真: 023-68757374  
收稿日期: 2003-10-21 接受日期: 2004-01-12

## Relationship between VEGF-C expression and lymph node metastasis and prognosis in large intestinal carcinoma

Jiang-Hong Mou, Xiao-Chu Yan, Dong Wang, Xiao-Hua Wu, Zheng-Peng Li, De-Bing Xiang

Jiang-Hong Mou, Dong Wang, Xiao-Hua Wu, Zheng-Peng Li, De-Bing Xiang, Department of Pathology, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China  
Xiao-Chu Yan, Institute of Pathology, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Correspondence to: Dr. Xiao-Chu Yan, Institute of Pathology, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. yxchwq@mail.tmmu.com.cn  
Received: 2003-10-21 Accepted: 2004-01-12

## Abstract

**AIM:** To explore the expression of endothelial growth factors C (VEGF-C) in large intestine carcinoma, and its relationship to clinicopathological features and prognosis.

**METHODS:** The expression of VEGF-C in 96 cases of large intestine carcinoma was detected by SP immunohistochemical technique and its relationship to clinicopathological features and prognosis were analysed.

**RESULTS:** The expression of VEGF-C was significantly higher in intratumoral tissue than that in normal mucosa (42/96 vs 19/96,  $P < 0.01$ ). VEGF-C positive expression was significantly correlated with tumor differentiation, Dukes' stage, lymph node metastasis and prognosis in 96 cases of large intestine carcinoma ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), but its relationship to age and gender of patient, size, site and depth of invasion of tumour and organ metastasis was not found ( $P > 0.05$ ). The expression of VEGF-C in metastatic lymph nodes was fairly consistent with that in the primary tumour ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** The overexpression of VEGF-C in large intestine carcinoma can develop lymph node metastasis by inducing lymphangiogenesis, and it may serve as one prognostic factor and guide the treatment.

Mou JH, Yan XC, Wang D, Wu XH, Li ZP, Xiang DB. Relationship between VEGF-C expression and lymph node metastasis and prognosis in large intestinal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1061-1064

## 摘要

**目的:** 探讨大肠癌组织中血管内皮生长因子-C(VEGF-C)的表达及其与临床病理指标和预后的关系。

**方法:** 应用免疫组化 SP 法检测 96 例大肠癌组织中 VEGF-C 的表达, 并分析其与大肠癌临床病理指标和预后的关系。

**结果:** 大肠癌组织 VEGF-C 阳性率明显高于正常大肠组织 (42/96 vs 19/96,  $P < 0.01$ ); 大肠癌 VEGF-C 表达与大肠癌分化程度、Dukes 分期、淋巴结转移及患者预后密切相关 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 但是与患者年龄、性别、肿瘤大小、部位、浸润深度以及远处器官转移无关 ( $P > 0.05$ )。41 例有淋巴结转移病例的转移灶和原发灶癌组织的 VEGF-C 表达相当一致 ( $P < 0.01$ )。

**结论:** VEGF-C 可能通过诱导淋巴管生成促进大肠癌淋巴结转移, 并且可以作为指导大肠癌治疗和判断预后的一个重要指标。

牟江洪, 阎晓初, 王东, 吴小华, 李增鹏, 向德兵. 大肠癌 VEGF - C 表达与淋巴结转移和预后的关系. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1061-1064  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1061.asp>

## 0 引言

大肠癌发病率很高<sup>[1-10]</sup>, 并且具有较高的淋巴结转移率<sup>[11-14]</sup>. 血管内皮生长因子-C(VEGF-C)是第一个被发现的能够诱导淋巴管生成的生长因子, 其在肿瘤生长和转移中的作用已经逐渐引起人们的重视. VEGF-C 在大肠癌组织中的表达及其与临床病理指标之间的关系国内尚未见报道, 我们应用免疫组化 SP 法检测 VEGF-C 在人大肠癌组织中的表达并探讨其与临床病理指标和预后之间的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 大坪医院 1996/1998 年大肠癌根治术石蜡标本 96 例, 男 50 例, 女 46 例, 年龄 22-83 (平均 53 岁, 中位 57 岁); 术前均未进行任何形式的治疗. 其中有淋巴结转移的 41 例, 无淋巴结转移的 55 例; 有远处器官转移的 14 例, 无远处器官转移的 82 例. 所有患者均有术后随访记录, 总体随访时间 3-83 mo, 总体 5 a 生存率 61.5%。

**1.2 方法** 所有标本经 40 g/L 中性甲醛液固定, 常规石蜡包埋, 4  $\mu$ m 切片, 水化后行免疫组化 SP 法染色,

切片均采用胰酶消化和微波修复的抗原双暴露技术, 其余步骤参照试剂盒说明进行. 每例标本均做癌组织和癌旁正常组织染色, 有淋巴结转移或远处器官转移的病例同时做淋巴结或器官转移灶染色. 抗人 VEGF-C 多克隆抗体购自 Santa Cruz, SP 试剂盒购自北京中山生物技术公司. VEGF-C 表达根据细胞着色强弱和着色细胞比例联合确定<sup>[15]</sup>. 着色强弱分为四级: 不着色等于 0, 弱着色等于 1, 中等着色等于 2, 强着色等于 3; 细胞着色比例也分为四级: 无细胞着色等于 0, 着色细胞比例小于 25% 等于 1, 着色细胞比例 25-50% 等于 2, 着色细胞比例大于 50% 等于 3. 细胞着色强弱和着色细胞比例二者积分小于或等于 2 为阴性表达, 大于 2 为阳性表达.

统计学处理 应用 SPSS10.0 统计软件对 VEGF-C 表达与大肠癌临床病理指标之间的关系进行  $\chi^2$  检验; 生存率采用 Kaplan-Meier 法计算, 组间差异用 Log-rank 检验,  $P < 0.05$  表示差异显著有统计学意义.

## 2 结果

VEGF-C 阳性物质呈棕黄色细颗粒状, 主要定位于大肠癌细胞胞质, 少数病例癌细胞胞核着色, 另外有 2 例癌细胞阴性而间质纤维细胞阳性. (图1-2) 96例大肠癌标本中 VEGF-C 阳性 42 例(43.8%), 阴性 54 例(56.2%); 正常大肠组织 VEGF-C 阳性 19 例(19.8%), 阴性 77 例(80.2%). 大肠癌组织 VEGF-C 阳性率明显高于正常大肠组织(42/96 vs 19/96,  $P < 0.01$ ), 并且同一病例癌细胞着色都强于正常大肠黏膜上皮细胞, 大肠癌 VEGF-C 阴性病例的正常黏膜没有 VEGF-C 表达. 41 例转移至淋巴结的癌组织与原发部位癌组织 VEGF-C 表达相当一致 ( $P > 0.05$ , 表 1).

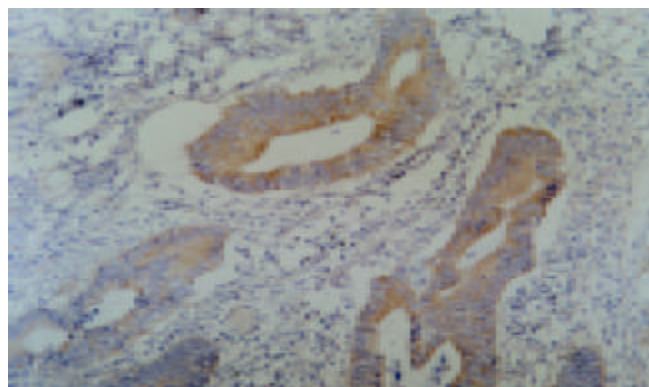


图1 大肠高分化腺癌 VEGF-C 阳性表达, SP×100.

表1 淋巴结转移灶与大肠癌原发灶 VEGF-C 表达的关系

	淋巴结转移灶		P 值
	VEGF-C(+)	VEGF-C(-)	
原发灶 VEGF-C(+)	24	3	$P < 0.05$
VEGF-C(-)	7	7	

2.1 大肠癌 VEGF-C 与临床病理指标的关系 经  $\chi^2$  检验 VEGF-C 表达与大肠癌分化程度、Dukes 分期及淋巴结转移密切相关( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ). 低分化腺癌 VEGF-C 阳性率(16.7%)低于高分化腺癌(51.9%); Dukes 分期的 C 和 D 期 VEGF-C 阳性率(63.0%)明显高于 A 和 B 期(26.0%); 有淋巴结转移的病例 VEGF-C 阳性率(65.9%)显著高于无淋巴结转移病例(27.3%). 但是 VEGF-C 表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、部位、浸润深度以及远处器官转移没有关系( $P > 0.05$ , 表 2).

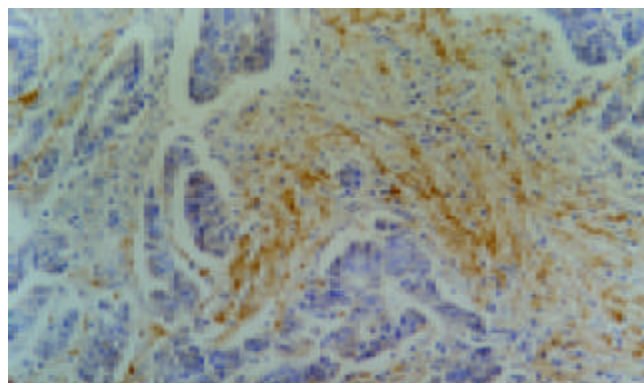


图2 间质纤维 VEGF-C 阳性表达, 而大肠癌组织阴性表达, SP×100.

表2 大肠癌 VEGF-C 与临床病理指标的关系

病理指标		n	VEGF-C	
			(+)	(-)
性别	女	46	19	27
	男	50	23	27
年龄(岁)	$\geq 57$	48	23	25
	$> 57$	48	43	19
肿瘤直径	$\leq 4$ cm	16	29	27
	$> 4$ cm	53	26	27
肿瘤部位	结肠及盲肠	35	15	20
	直肠	61	27	34
分化程度	高	54	28	26 <sup>a</sup>
	中	30	12	18
	低	12	2	10
浸润深度	未及浆膜	30	9	21
	浆膜及以上	66	33	33
淋巴结转移	有	41	27	14 <sup>b</sup>
	无	55	15	40
远处器官转移	有	14	8	6
	无	82	34	48
Dukes 分期	A+B	50	13	37 <sup>b</sup>
	C+D	46	29	17

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

2.2 大肠癌 VEGF-C 与预后的关系 大肠癌患者 96 例术后生存 5 a 及以上者 59 例, 总体 5 a 生存率 61.5%.



VEGF-C 阳性和 VEGF-C 阴性病例的 Kaplan-Meier 生存率曲线图如图 3 所示. 经 Log-rank 检验, 大肠癌 VEGF-C 表达与患者预后显著相关( $P < 0.05$ ), VEGF-C 阳性病例的 5 a 生存率为 50.0% 明显低于阴性病例 70.4% 的 5 a 生存率, 预后不良.

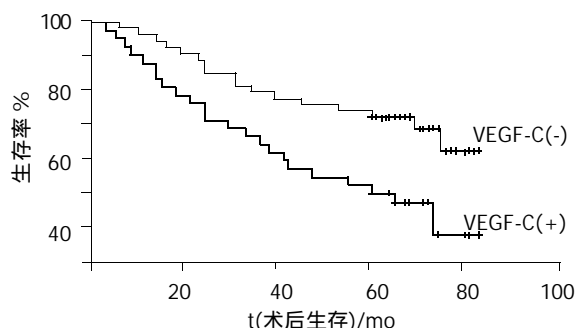


图3 VEGF-C 阳性和 VEGF-C 阴性病例的 Kaplan-Meier 生存率曲线图.

### 3 讨论

肿瘤扩散是肿瘤恶性发展和预后差的主要原因之一, 包括局部浸润、血道和淋巴道转移. VEGF 家族中 VEGF-C 具有与 VEGF-A 不同的特性<sup>[16-18]</sup>. VEGF-C 的受体为 VEGFR-2 和 VEGFR-3, 尽管两种受体在血管和淋巴管都有表达, 但是 VEGFR-3 主要位于淋巴管内皮细胞, 而且 VEGF-C 与 VEGFR-3 结合的亲和力比 VEGFR-2 要高的多, 所以 VEGF-C 更多地表现出促进淋巴管生成与扩张<sup>[19-21]</sup>. 大肠癌是严重威胁我国人民身体健康的恶性肿瘤, 发病率逐年上升, 国内统计已上升至第 4 位<sup>[22]</sup>, 并且具有较高的淋巴结转移率. 淋巴结转移是大肠癌预后的一个重要指标, 发生淋巴结转移的患者 5 a 生存率明显低于未转移者. VEGF-C 诱导淋巴管生成的特性使人们越来越希望了解其在肿瘤生长和转移中的作用. 本研究中 96 例大肠癌有 42 例(43.8%) VEGF-C 阳性, 54 例(56.3%) 阴性; 正常大肠组织 VEGF-C 阳性 19 例(19.8%), 阴性 77 例(80.2%). 大肠癌组织 VEGF-C 阳性率明显高于正常大肠组织( $P < 0.01$ ), 并且同一病例癌细胞着色都强于正常大肠黏膜上皮细胞, 大肠癌 VEGF-C 阴性病例的正常黏膜没有 VEGF-C 表达.

VEGF-C 是一种分泌型蛋白, 研究表明其在肿瘤组织中主要由肿瘤细胞合成. 我们的试验结果显示大肠癌 VEGF-C 的确主要在癌细胞中表达. 但是有意思的是, 有 2 例大肠癌癌细胞 VEGF-C 阴性, 而间质纤维细胞呈强阳性表达, 并且这 2 例病例均出现了淋巴结转移. 这表明除了肿瘤细胞外, 间质纤维细胞也可以合成分泌 VEGF-C, 至少在大肠癌中是这样. 这印证了 Ristamaki et al<sup>[23]</sup>的观点, 他认为巨噬细胞能够分泌某些细胞因子如 TNF- $\alpha$  上调肿瘤细胞和纤维母细胞中 VEGF-C 的表达. 我们的研究表明, 42 例 VEGF-C 阳性病例的淋巴结转移率(27/42, 64.3%)显著高于 VEGF-C 阴性病例(14/54, 25.9%,  $P < 0.01$ ). 同时与患者预后有关的 Dukes 分期也和大肠癌 VEGF-C 表达密切相关( $P < 0.01$ ),

Dukes 分期的 C 和 D 期 VEGF-C 阳性率(63.0%)明显高于 A 和 B 期(26.0%). 41 例转移至淋巴结的癌组织与原发部位癌组织 VEGF-C 表达相当一致( $P < 0.01$ ). 对于 7 例原发部位 VEGF-C 阴性而转移灶阳性的病例, 我们发现原发部位 VEGF-C 阴性只是根据我们评定 VEGF-C 表达的标准来判定的, 但是其中都有部分癌细胞表达 VEGF-C, 也许正是这些癌细胞转移到了淋巴结. 这似乎可以理解为对于单个癌细胞而言, 表达 VEGF-C 的癌细胞更具有侵袭淋巴管转移至淋巴结的可能性.

尽管很多人类肿瘤 VEGF-C 高表达与淋巴结转移密切相关<sup>[24-28]</sup>, 但是现在还不完全清楚 VEGF-C 是如何促进肿瘤细胞转移的. 多数学者认为 VEGF-C 促进肿瘤转移的可能的解释是<sup>[29]</sup>, VEGF-C 通过诱导淋巴管生成, 增加了肿瘤细胞与淋巴管内皮细胞的接触面积, 进而增加转移的可能性; 此外, VEGF-C 也可能通过增加淋巴管通透性、改变淋巴管内皮细胞黏附特性以及调节细胞因子(如肿瘤细胞趋化因子)、化学因子表达等多种方式促进肿瘤转移. 尽管高表达 VEGF-C 的肿瘤有更高的转移倾向, 但是只有部分动物模型发生了肿瘤淋巴结转移. 同时, 我们的研究显示低分化大肠癌 VEGF-C 表达明显低于高分化大肠癌, 这似乎与低分化大肠癌淋巴结转移率高的特性不符合<sup>[30]</sup>, 表明低分化大肠癌的转移机制中 VEGF-C 并非一个主要因素. 以上事实提示, 大肠癌转移除了与 VEGF-C 有关外, 还存在一些别的重要影响因素. 总之, 肿瘤转移是一个多因素参与的多机制的过程, 对肿瘤转移的机制还有待于更进一步的深入研究.

肿瘤可以通过淋巴道或血道转移至远处器官, 但是我们的研究没有发现大肠癌 VEGF-C 表达与远处器官转移之间的关系( $P > 0.05$ ). 另外, 大肠癌 VEGF-C 表达也与患者年龄、性别、肿瘤大小、部位以及肿瘤浸润深度无关( $P > 0.05$ ).

大肠癌 VEGF-C 表达与淋巴结转移密切相关, 因此对于 VEGF-C 阴性患者, 尤其是高分化大肠癌患者采用肿瘤局部切除的手术方式也许是可行的. 同时, 我们的研究也表明大肠癌 VEGF-C 表达与患者预后显著相关( $P < 0.05$ ), VEGF-C 阳性患者的 5 a 生存率为 50% 明显低于阴性病例 70.4% 的 5 a 生存率, 预后不良. 尽管大肠癌手术切除、化疗和放疗方法不断改进, 但是其恶性发展并没有得到根本抑制, 预后依然很差<sup>[31]</sup>, 大肠癌 VEGF-C 可能成为指导手术和放化疗方案以及判断预后的一个重要指标, 具有重要的临床意义.

### 4 参考文献

- Chen K, Cai J, Liu XY, Ma XY, Yao KY, Zheng S. Nested case-control study on the risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:99-103
- Cai SJ, Xu Y, Cai GX, Lian P, Guan ZQ, Mo SJ, Sun MH, Cai Q, Shi DR. Clinical characteristics and diagnosis of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:284-287



- 3 Jiang YA, Fan LF, Jiang CQ, Zhang YY, Luo HS, Tang ZJ, Xia D, Wang M. Expression and significance of PTEN, hypoxia-inducible factor-1 alpha in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:491-494
- 4 Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003;9:974-977
- 5 Xu XM, He C, Hu XT, Fang BL. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene on human colorectal cancer cell line HT29. *World J Gastroenterol* 2003;9:965-969
- 6 Platell C, Lim D, Tajudeen N, Tan JL, Wong K. Dose surgical sub-specialization influence survival in patients with colorectal cancer? *World J Gastroenterol* 2003;9:961-964
- 7 Kim JI, Park YJ, Kim KH, Kim JI, Song BJ, Lee MS, Kim CN, Chang SH. hOGG1 Ser326Cys polymorphism modifies the significance of the environmental risk factor for colon cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:956-960
- 8 Xu MH, Deng CS, Zhu YQ, Lin J. Role of inducible nitric oxide synthase expression in aberrant crypt foci-adenoma-carcinoma sequence. *World J Gastroenterol* 2003;9:1246-1250
- 9 Xiong B, Sun TJ, Yuan HY, Hu MB, Hu WD, Cheng FL. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1237-1240
- 10 Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1227-1230
- 11 Zhou ZG, Wang Z, Yu YY, Shu Y, Cheng Z, Li L, Lei WZ, Wang TC. Laparoscopic total mesorectal excision of low rectal cancer with preservation of anal sphincter: A report of 82 cases. *World J Gastroenterol* 2003;9:1477-1481
- 12 Zhang JC, Wang ZR, Cheng YJ, Yang DZ, Shi JS, Liang AL, Liu NN, Wang XM. Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant exon 6 in primary tumors and corresponding lymph node metastases of colorectal carcinoma with Dukes' stage C or D. *World J Gastroenterol* 2003;9:1482-1486
- 13 Gu J, Ma ZL, Li Y, Li M, Xu GW. Angiography for diagnosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:288-290
- 14 Hu HY, Liu XX, Jiang CY, Zhang Y, Bian JF, Lu Y, Geng Z, Liu SL, Liu CH, Wang XM, Wang W. Cloning and expression of ornithine decarboxylase gene from human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:714-716
- 15 余细球, 邓长生, 朱尤庆, 程芳洲. 大肠癌组织胸苷磷酸化酶/血小板衍生内皮细胞生长因子的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:1197-1199
- 16 赵敏芳, 毛华, 郑景熙, 袁亚维. 血管内皮细胞生长因子对大肠癌 HT-29 细胞黏附作用的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:646-649
- 17 Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR(VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996;15:290-298
- 18 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22
- 19 Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997;16:3898-3911
- 20 Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1997;188:96-109
- 21 Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997;276:1423-1425
- 22 李栓位, 王青波, 赵俭昌, 叶历, 丁金亮. 大肠癌 208 例发病年龄与预后的相关性. *世界华人消化杂志* 1998;6:363-364
- 23 Ristamaki A, Narko K, Enhom B, Joukov V, Alitalo K. Pro-inflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998;273:8413-8418
- 24 Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001;20:672-682
- 25 Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Tsukiyama A, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up. *Mod Pathol* 2003;16:309-314
- 26 Neuchrist C, Erovc BM, Handisurya A, Fischer MB, Steiner GE, Hollemann D, Gedlicka C, Saaristo A, Burian M. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck* 2003;25:464-474
- 27 Schietroma C, Cianfarani F, Lacal PM, Odorisio T, Orecchia A, Kanitakis J, D' Atri S, Failla CM, Zambruno G. Vascular endothelial growth factor-C expression correlates with lymph node localization of human melanoma metastases. *Cancer* 2003;98:789-797
- 28 Li Q, Dong X, Gu W, Qiu X, Wang E. Clinical significance of co-expression of VEGF-C and VEGFR-3 in non-small cell lung cancer. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:727-730
- 29 Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* 2003;98:413-423
- 30 蒋会勇, 卿三华. 大肠癌淋巴结转移相关因素研究现状. *世界华人消化杂志* 1999;7:982-984
- 31 向德兵, 吴晓华, 李增鹏, 刘友生. beta-catenin, cyclin D1 和 c-myc 在大肠癌组织中的表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:305-308

# 结肠癌组织 Smad4 蛋白表达的意义

肖德胜, 李景和, 傅春燕, 文继舫

肖德胜, 李景和, 傅春燕, 文继舫, 中南大学湘雅医学院病理学教研室  
湖南省长沙市 410078  
肖德胜, 男, 1970-12-25 生, 湖南省双峰县人, 汉族. 2001 年中南大学湘雅  
医学院硕士毕业, 现为该院博士生, 讲师. 主要从事消化道肿瘤病理研究.  
项目负责人: 文继舫, 410078, 湖南省长沙市湘雅路 88 号, 中南大学湘雅医  
学院病理学教研室. jifangwen@hotmail.com  
电话: 0731-2355098  
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-02-01

## Expression and significance of Smad4 in colorectal carcinoma tissue

De-Sheng Xiao, Jing-He Li, Chun-Yan Fu, Ji-Fang Wen

De-Sheng Xiao, Jing-He Li, Chun-Yan Fu, Ji-Fang Wen, Department of  
Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University,  
Changsha 410078, Hunan Province, China  
Correspondence to: Ji-Fang Wen, Department of Pathology, Xiangya  
School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan  
Province, China. jifangwen@hotmail.com  
Received: 2003-12-12 Accepted: 2004-02-01

### Abstract

AIM: To investigate the role of Smad4 protein in colorectal  
carcinogenesis.

METHODS: Expression of Smad4 was detected in 70 cases  
of normal tissues and colorectal tumor by a streptavidin-  
peroxidase conjugation method (S-P).

RESULTS: Smad4 expression was significantly lower in  
colorectal carcinoma ( $n=52$ ) than that in the normal tissues  
( $n=7$ ) and was related to the tumor stages, differentiation  
and metastasis (lymph node or blood) ( $P<0.05$ ).

CONCLUSION: Down-regulation of Smad4 expression may  
be associated with the carcinogenesis, and Smad4 may play  
a role in invasion and metastasis of colorectal carcinoma.

Xiao DS, Li JH, Fu CY, Wen JF. Expression and significance of Smad4  
in colorectal carcinoma tissue. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):  
1065-1068

### 摘要

目的: 探讨 Smad4 在结肠癌发生、发展过程中的作用.

方法: 采用免疫组化 S-P 法检测 70 例正常结肠黏膜组织和  
结肠肿瘤组织中 Smad4 的表达.

结果: 结肠癌( $n=52$ )中 Smad4 的表达水平明显低于正常结肠  
黏膜( $n=7$ ), 并与肿瘤分期、分化程度及转移有关( $P<0.05$ ).

结论: Smad4 的低表达可能与结肠癌的发生、发展过程有  
关, 并可能在结肠癌浸润和转移中发挥作用.

肖德胜, 李景和, 傅春燕, 文继舫. 结肠癌组织 Smad4 蛋白表达的意义. 世界  
华人消化杂志 2004;12(5):1065-1068

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1065.asp>

## 0 引言

转化生长因子  $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )  
超家族在机体的免疫调节、细胞生长和分化、细胞外基  
质的合成和储存、胚胎发育、创伤修复等方面发挥着十  
分重要的作用<sup>[1-5]</sup>. TGF- $\beta$  是机体上皮细胞生长、增生  
和分化强有力的抑制因子, 但是上皮源性的恶性肿瘤  
细胞丧失了对 TGF- $\beta$  的反应性而逃避 TGF- $\beta$  的生长抑  
制作用, 结果导致肿瘤发生<sup>[6-8]</sup>. Smad4 是 TGF- $\beta$  信号  
转导途径的中心分子, 几乎所有生物学效应均是 Smad4  
与不同的 Smads 蛋白相互作用的结果<sup>[9-12]</sup>. Smad4 是  
DPC4 的基因产物. 最近有文献报道, 伴远处转移的浸  
润癌和远处转移病灶其 DPC4 突变频率明显高于腺瘤和  
黏膜内癌, 且有显著性差异( $P=0.006-0.001$ ), 说明  
DPC4 的突变与结肠癌的恶性进展, 如远处转移有关.  
另有文献报道 Smad4 蛋白表达异常可能有利于结肠癌  
的浸润和转移<sup>[13-16]</sup>. 我们用免疫组织化学 S-P 法检测  
Smad4 蛋白的表达情况, 旨在探讨 Smad4 在结肠癌癌  
变机制中可能的作用, 并阐明 Smad4 与结肠癌浸润和  
转移的关系如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 我校 1996/2001 年结肠肿瘤及正常结肠黏膜  
存档蜡块共 70 例, 每例皆有完整病历和病理资料, 并  
经病理诊断核实. 所有标本经 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包  
埋, 5  $\mu$ m 连续切片. 正常结肠黏膜 7 例, 腺瘤 11 例,  
高分化腺癌 13 例, 低分化腺癌 25 例, 癌转移(经淋  
巴道及血道)14 例; Dukes A、B 期 38 例, C、D 期 14  
例; 男 45 例, 女 25 例; 小于 60 岁 39 例, 大于或等  
于 60 岁 31 例. 鼠抗人 Smad4 单克隆抗体为 neomarkers  
公司产品, 使用稀释度 1:50; S-P 试剂盒及 DAB 显色试  
剂盒由北京中山公司提供.

1.2 方法 采用 S-P 免疫组化法, 按试剂盒说明书进行  
操作. 以 Smad4 阳性的正常胰腺组织作阳性对照, 以  
PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照. 以细胞质、胞核出现  
棕黄色颗粒为阳性. 根据切片中阳性细胞数及染色反  
应强度分为 4 级并评分<sup>[17-18]</sup>: 阴性(0 分), 细胞不着色或阳  
性细胞数小于 25%; 弱阳性(1 分), 细胞内出现浅棕黄  
色颗粒或阳性细胞数为 25-50%; 阳性(2 分), 细胞内出

现棕黄色颗粒或阳性细胞数为 50-75%; 强阳性(3分), 细胞内出现深棕黄色颗粒或阳性细胞数为 大于 75%. 每张切片选取 10 个视野进行评分, 取平均值作为评分结果.

统计学处理 两组样本之间采用 t 检验.

## 2 结果

2.1 Smad4在结肠肿瘤中的表达 Smad4蛋白阳性信号定位于细胞质及胞核. 在正常结肠黏膜和结肠腺瘤中, Smad4 呈强阳性表达, 阳性细胞分布在黏膜全层中(图 1, 2). 在结肠癌组织中, Smad4 蛋白表达下降, 其分布及着色程度呈异质性, 其中高分化腺癌尚有部分表达(图 3), 低分化腺癌及转移癌表达明显下降, 有的甚至无表达(图 4-6).

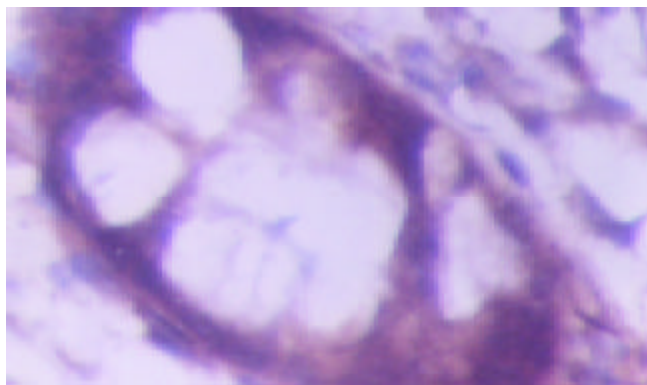


图1 正常结肠黏膜胞质及胞核 Smad4 强阳性 SP×200.

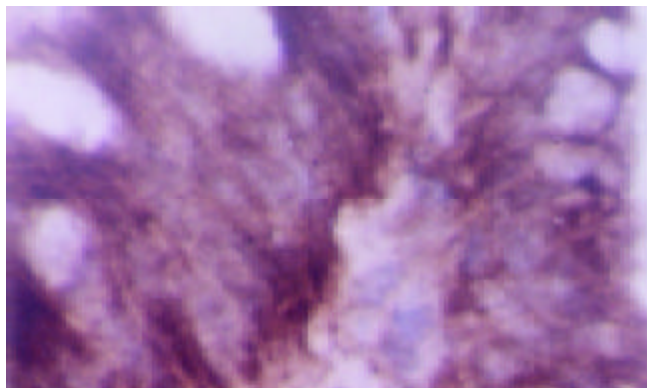


图2 结肠腺瘤胞质及胞核 Smad4 强阳性 SP×200.



图3 结肠高分化腺癌胞质 Smad4 阳性 SP×200.

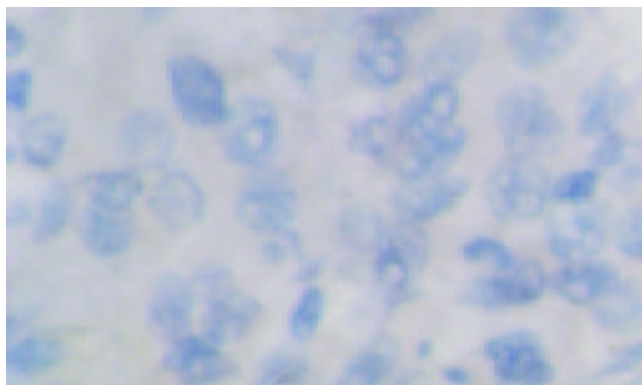


图4 结肠低分化腺癌胞质 Smad4 阴性 SP×200.

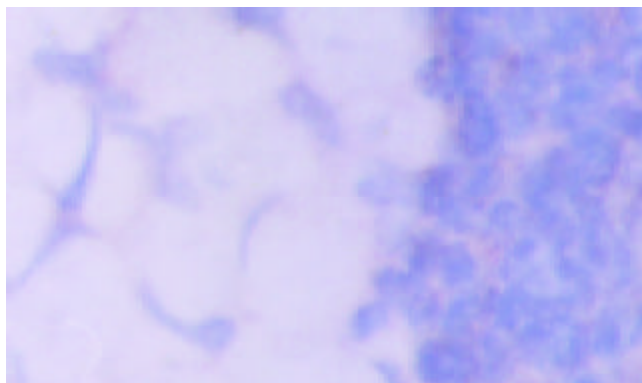


图5 结肠癌淋巴结转移 Smad4 阴性 SP×200.

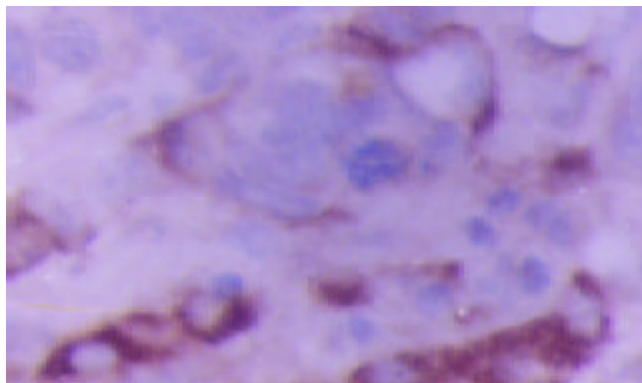


图6 结肠癌转移 Smad4 弱阳性 SP×200. (左上角为结肠癌组织, Smad4 蛋白表达呈弱阳性; 右下角为肝组织, Smad4 蛋白表达呈强阳性).

2.2 Smad4蛋白与结肠癌生物学行为的关系 Smad4蛋白在结肠肿瘤中的表达与肿瘤分期、分化程度及转移有关(表 1). Smad4 蛋白在正常结肠黏膜和腺瘤中全部表达, 且呈强阳性表达, 而在高分化腺癌、低分化腺癌及转移癌中均有较明显下降, 有的甚至不表达. 正常结肠黏膜与腺瘤比较, Smad4 蛋白表达无显著性差异( $P > 0.05$ ); 与正常结肠黏膜比较, 在高分化腺癌、低分化腺癌及转移癌中 Smad4 蛋白表达均有显著性差异( $P < 0.05$ ). 与低分化腺癌比较, 高分化腺癌 Smad4 蛋白表达较强, 有显著性差异( $P < 0.05$ ); 与 A, B 期结肠癌比较, C, D 期结肠癌 Smad4 蛋白表达弱, 有显著性差异( $P < 0.05$ ); Smad4 蛋白表达与结肠癌患者的性别、年龄均无统计学意义( $P > 0.05$ ).

表1 人结肠癌 Smad4 蛋白表达与临床病理参数的关系

病理参数	n	mean ± SD
正常结肠黏膜	7	2.86 ± 0.24
结肠腺瘤	11	2.56 ± 0.45
高分化结肠腺癌	13	1.66 ± 0.73 <sup>ac</sup>
低分化结肠腺癌	25	1.11 ± 0.78 <sup>a</sup>
癌转移	14	1.00 ± 0.78 <sup>a</sup>
DukesA, B 期	38	1.49 ± 0.70
DukesC, D 期	14	1.00 ± 0.79
男	45	1.57 ± 0.97
女	25	1.60 ± 0.92
年龄(岁) <60	39	1.49 ± 0.99
年龄(岁) ≥ 60	31	1.70 ± 0.89

<sup>a</sup>P <0.05, vs 正常结肠黏膜; <sup>c</sup>P <0.05, vs 低分化腺癌.

### 3 讨论

TGF- $\beta$  信号转导途径的失控可能会丧失对细胞的生长抑制而导致肿瘤的发生<sup>[19]</sup>. DPC4 的失活被认为是引起生长抑制丧失的一个重要原因, 可概括为: (1)染色体片段的丢失, 包括杂合型缺失或纯合型缺失; (2)基因突变, 如移码突变、无义突变、错义突变等; (3)基因表达水平异常, 即表达水平低下或缺乏<sup>[20]</sup>. DPC4 被认为是一种肿瘤抑制基因<sup>[21-25]</sup>, 大约 50% 的胰腺癌, 30% 的结肠癌其 DPC4 发生了突变<sup>[26-28]</sup>. DPC4 功能的失活能够导致肿瘤的发生, 在 DPC4 功能缺陷的肿瘤细胞株中通过 DPC4 表达的重建, 使之重新获得了抑制肿瘤形成的能力. 目前不少学者认为 DPC4 的失活发生在肿瘤进展的后期, 属于晚期分子事件, 并与肿瘤的浸润和转移密切相关<sup>[29-33]</sup>. DPC4 作为候选的肿瘤抑制基因, 对其功能的研究存在二个问题<sup>[34]</sup>: (1)DPC4 基因的蛋白产物 Smad4 在结肠癌中的表达情况, 国内外尚未见文献报道; (2) Smad4 蛋白的表达情况与结肠癌临床生物学行为的关系研究在国内外亦未见相关的文献报道.

我们研究结果表明, Smad4 在正常结肠黏膜中均有强的表达, 而在高分化腺癌、低分化腺癌及转移癌(淋巴道或血道)中表达均明显下降, 有的甚至无表达, 其差异均有显著性. 低分化腺癌与高分化腺癌比较, Smad4 蛋白表达有明显下降(P <0.05); C, D 期结肠癌与 A, B 期结肠癌比较, Smad4 蛋白的表达亦有明显下降(P <0.05); 表明 Smad4 蛋白在结肠肿瘤中的表达情况与肿瘤分期、分化程度及转移有关. Smad4 蛋白表达水平下降或缺乏削弱了 TGF- $\beta$  信号转导途径, 减弱或丧失了对细胞的生长抑制作用, 从而导致肿瘤的发生. Smad4 蛋白表达水平的下降或缺乏可能是由染色体片段丢失(杂合型缺失或纯合型缺失)或基因突变(移码突变、无义突变、错义突变等)引起的. DPC4 的失活可能发生在肿瘤进展的后期, 属于晚期分子事件, 并

参与肿瘤的浸润和转移. 此外, Smad4 蛋白的表达与结肠癌患者的性别、年龄均无统计学意义(P >0.05); 正常结肠黏膜与腺瘤比较, Smad4 蛋白的表达差异不明显(P >0.05). 表明 Smad4 可能具有抑制结肠癌细胞生长及抑制结肠癌浸润和转移的作用, 提示 Smad4 可能参与了结肠癌的演进过程, 有利于加深我们对结肠癌癌变机制的理解.

一般认为, 结肠癌的发生是一个长期的多因素形成的分阶段的过程. 从结肠黏膜上皮过度增生→不典型增生→结肠癌的演进过程中, 关键的步骤是癌基因的突变和抑癌基因的失活, 本结果表明 DPC4 的失活可能与结肠癌的发生和转移有关, 但 DPC4 失活绝不是导致结肠癌发生的惟一因素, 必定还有许多其他基因或因素的参与, 那么这些基因或因素是什么, 他们之间是如何相互作用的, 这些问题有待进一步的研究.

### 4 参考文献

- Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- Huang GC, Zhang JS, Zhang YE. Effects of retinoic acid on proliferation, phenotype and expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in TGF- $\beta$ 1-stimulated rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2000;6:819-823
- Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:37-41
- Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:522-526
- Xiong B, Gong LL, Zhang F, Hu MB, Yuan HY. TGF $\beta$ 1 expression and angiogenesis in colorectal cancer tissue. *World J Gastroenterol* 2002;8:496-498
- Yang X, Li C, Herrera PL, Deng CX. Generation of Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Genesis* 2002;32:80-81
- Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:799-804
- Cattaneo M, Orlandini S, Beghelli S, Moore PS, Sorio C, Bonora A, Bassi C, Talamini G, Zamboni G, Orlandi R, Menard S, Bernardi LR, Biunno I, Scarpa A. SEL1L expression in pancreatic adenocarcinoma parallels SMAD4 expression and delays tumor growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 2003;22:6359-6368
- Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:101-128
- Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W. Smad4 transcriptional pathways and angiogenesis. *Int J Gastrointest Cancer* 2002;31:47-59
- Lin X, Liang M, Liang YY, Brunnicardi FC, Melchior F, Feng XH. Activation of transforming growth factor- $\beta$  signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J Biol Chem* 2003;278:18714-18719
- Lin X, Liang M, Liang YY, Brunnicardi FC, Feng XH. SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 2003;278:31043-31048
- Yamaguchi A. Genetic changes in liver metastasis of colorectal cancer and their clinical application. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2001;102:370-375
- Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 1999;18:3098-3103

- 15 Mikami T, Ookawa K, Shimoyama T, Fukuda S, Saito H, Munakata A. KAI1, CAR, and Smad4 expression in the progression of colorectal tumor. *J Gastroenterol* 2001;36:465-469
- 16 Maitra A, Molberg K, Albores-Saavedra J, Lindberg G. Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease. *Am J Pathol* 2000;157:1105-1111
- 17 李保森, 游绍莉, 赵志海, 辛绍杰, 赵景民, 王松山. 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:483-485
- 18 金中元, 程瑞雪, 郑长黎, 郑晖. 原发性肝细胞癌中 PTTG 和 c-myc 基因表达的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1677-1681
- 19 Hu JY, Wang S, Zhu JG, Zhou GH, Sun QB. Expression of B7 costimulation molecules by colorectal cancer cells reduces tumorigenicity and induces anti-tumor immunity. *World J Gastroenterol* 1999;5:147-151
- 20 McCarthy DM, Hruban RH, Argani P, Howe JR, Conlon KC, Brennan MF, Zahurak M, Wilentz RE, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Klimstra DS. Role of the DPC4 tumor suppressor gene in adenocarcinoma of the ampulla of Vater: analysis of 140 cases. *Mod Pathol* 2003;16:272-278
- 21 Pizzi S, Azzoni C, Bassi D, Bottarelli L, Milione M, Bordini C. Genetic alterations in poorly differentiated endocrine carcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer* 2003;98:1273-1282
- 22 Schwarte-Waldhoff I, Klein S, Blass-Kampmann S, Hintelmann A, Eilert C, Dreschers S, Kalthoff H, Hahn SA, Schmiegeler W. DPC4/SMAD4 mediated tumor suppression of colon carcinoma cells is associated with reduced urokinase expression. *Oncogene* 1999;18:3152-3158
- 23 Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Luttgies J, Kloppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A, Schmiegeler W. Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9624-9629
- 24 Cao WX, Cheng QM, Fei XF, Li SF, Yin HR, Lin YZ. A study of preoperative methionine-depleting parenteral nutrition plus chemotherapy in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:255-258
- 25 肖德胜, 文继舫, 李景和, 胡忠良, 郑晖, 傅春燕. DPC4 基因转染对结肠癌细胞生物学行为的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:1004-1008
- 26 Xia NS, Yang HJ, Zhang J, Lin CQ, Wang YB, Wang J, Zhan MY, Ng MH. Prokaryotical expression of structural and non-structural proteins of hepatitis G virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:642-646
- 27 Xu HY, Yang YL, Gao YY, Wu QL, Gao GQ. Effect of arsenic trioxide on human hepatoma cell line BEL-7402 cultured in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:681-687
- 28 Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, Adsay V, Abrams RA, Cameron JL, Kern SE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:4115-4121
- 29 Barbera VM, Martin M, Marinoso L, Munne A, Carrato A, Real FX, Fabre M. The 18q21 region in colorectal and pancreatic cancer: independent loss of DCC and DPC4 expression. *Biochim Biophys Acta* 2000;1502:283-296
- 30 Schneider G, Schmid RM. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2003;2:15
- 31 Cowgill SM, Muscarella P. The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg* 2003;186:279-286
- 32 Moore PS, Beghelli S, Zamboni G, Scarpa A. Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003;2:7
- 33 Ohtaki N, Yamaguchi A, Goi T, Fukaya T, Takeuchi K, Katayama K, Hirose K, Urano T. Somatic alterations of the DPC4 and Madr2 genes in colorectal cancers and relationship to metastasis. *Int J Oncol* 2001;18:265-270
- 34 Xu X, Brodie SG, Yang X, Im YH, Parks WT, Chen L, Zhou YX, Weinstein M, Kim SJ, Deng CX. Haploid loss of the tumor suppressor Smad4/Dpc4 initiates gastric polyposis and cancer in mice. *Oncogene* 2000;19:1868-1874

## World Journal of Gastroenterology 2005 年将改为周刊

《World Journal of Gastroenterology, WJG》是我国消化病学领域中惟一以全英文发表原创性论文的国际性学术期刊. WJG 创刊于 1995 年, 原名《China National Journal of New Gastroenterology》, 1998 年更名为 WJG, 由世界胃肠病学杂志社出版. WJG 国际标准刊号 ISSN 1007-9327, 国内统一刊号 CN 14-1219/R, 月刊, 大 16 开, 256 页, 邮发代号 82-261, 北京报刊发行局发行. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 以及日益增多的国际科技交流的需要, 从 2005 年开始, WJG 将由半月刊改为周刊, 大 16 开, 160 页, 每月 7、14、21、28 日出版.



# 慢性乙型肝炎患者表位特异性CTL定量检测的评价

张静波, 陈思源, 杨志清, 李廷荣, 陈 安, 吴玉章

张静波, 陈安, 吴玉章, 中国人民解放军第三军医大学全军免疫研究所  
重庆市 400038  
陈思源, 李廷荣, 重庆市传染病医院 重庆市 400030  
杨志清, 中国人民解放军第三军医大学西南医院肝胆科 重庆市 400038  
张静波, 女, 1968-06-03 生, 重庆市人, 第三军医大学全军免疫研究所博士  
生, 主治医师, 讲师, 主要从事临床免疫学的研究.  
国家重点基础研究发展规划项目(973 计划), No. 2001CB510001  
国家自然科学基金重大项目, No. 11111111  
项目负责人: 吴玉章, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学全  
军免疫研究所. wuyuzhang@yahoo.com  
电话: 023-68752680 传真: 023-68752789  
收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2004-02-03

## Comprehensive analysis of the quantity of epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic viral hepatitis B infection

Jing-Bo Zhang, Shi-Yuan Chen, Zhi-Qing Yang, Ting-Rong Li,  
An Chen, Yu-Zhang Wu

Jing-Bo Zhang, An Chen, Yu-Zhang Wu, Institute of Immunology of  
Chinese PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Shi-Yuan Chen, Ting-Rong Li, Hospital of Infectious Diseases of  
Chongqing, Chongqing 400030, China  
Zhi-Qing Yang, Department of Hepatobiliary Diseases, Southwest  
Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Supported by the Major State Basic Research Development Program of  
China (973 Program), No. 2001CB510001; The Major Programs of the  
National Natural Science Foundation of China, No. 11111111  
Correspondence to: Yu-Zhang Wu, Institute of Immunology of Chi-  
nese PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China.  
wuyuzhang@yahoo.com  
Received: 2003-10-10 Accepted: 2004-02-03

## Abstract

**AIM:** To investigate the function state of epitope-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in chronic hepatitis B infection.

**METHODS:** The study was performed to quantify the HBV specific CTL directly *in vitro* by HLA-A2 tetrameric complexes for core 18-27 (Tc 18-27), envelope 183-191 (Te 183-191), envelope 335-343 (Te 335-343), and polymerase 575-583 (Tp 575-583) in active chronic hepatitis patients, and then the correlation of HBV epitope-specific CTL between serum HBV DNA loads or alanine aminotransferase (ALT) levels were analyzed by multiple regression analysis.

**RESULTS:** It was found that there were multiple CTLs responses in active chronic hepatitis patients. The frequency of Tc18-27 response was higher than the other three epitope-specific CTLs. No significant correlation was found either between the frequency of HBV specific CD8<sup>+</sup> T cells and the viral load, or the frequency of HBV specific CD8<sup>+</sup> T cells and the levels of alanine transaminase.

**CONCLUSION:** The frequencies of HBV-specific T cells are not determinant of immune-mediated protection in HBV infection and the existence of epitope-specific HBV CTLs is not directly correlated to hepatocytic injury.

Zhang JB, Chen SY, Yang ZQ, Li TR, Chen A, Wu YZ. Comprehensive analysis of the quantity of epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic viral hepatitis B infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1069-1072

## 摘要

**目的:** 评价慢性乙肝患者体内不同表位特异性细胞毒性T细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 的功能状态。

**方法:** 采用 MHC/ 肽四聚体复合物技术, 即 tetramer 技术, 定量外周血 HLA-A2 限制性表位即核心抗原 core18-27、被膜抗原 env 183-191、335-343、聚合酶抗原 pol 575-583 4 种表位特异性 CTL, 通过多元回归分析进行综合评价。

**结果:** 慢性乙肝患者体内存在多克隆 CTL 反应, core 18-27 为优势性表位。4 种表位特异性 CTL 的频率与病毒载量无相关性 ( $P > 0.05$ ); 表位特异性 CTL 与血清转氨酶水平平均无显著相关性 ( $P > 0.05$ )。

**结论:** 体内存在的 CTL 数量并不能代表机体的保护性免疫状态。

张静波, 陈思源, 杨志清, 李廷荣, 陈安, 吴玉章. 慢性乙型肝炎患者表位特异性 CTL 定量检测的评价. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1069-1072  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1069.asp>

## 0 引言

细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 在清除细胞内乙肝病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的同时, 也不可避免地造成宿主肝细胞的损伤<sup>[1-2]</sup>。随着生物学和免疫病理学的发展, 保护性免疫的观点也发生了深刻的变化。近年来的研究表明, 不同表位特异性 CTL 在清除胞内病毒感染和对宿主细胞损害的贡献不同。如何明确不同表位特异性 CTL 的功能状态, 对设计更为合理而有效的治疗性疫苗将是关键。慢性 HBV 感染中 CTL 的数量十分微弱, 我们采用全新的 MHC/ 肽四聚体复合物 (tetramer) 技术<sup>[3-5]</sup>, 对慢性 HBV 感染患者外周血 CTL 进行准确定量, 通过与病毒载量及肝功能状态的综合分析, 达到对不同表位特异性 CTL 的功能评价, 为进一步分析表位特异性 CTL 的效应机制及设计更为合理的免疫性治疗方案奠定基础<sup>[6]</sup>。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 重庆市传染病医院住院患者 35 例, 男 18 例, 女 17 例. 平均年龄 26.5 岁. 诊断符合第五次全国传染病寄生虫病学术会议讨论修订标准. 排除 HCV, HDV, HIV 病毒混合感染. 肝脏 B 超证实有慢性炎症. HLA-A2<sup>+</sup> 慢性活动性乙肝患者及 HLA-A2<sup>+</sup> 健康献血员 5 名为对照组. 淋巴细胞分离液(Ficoll-Hypaque)为天津 TDB 生物技术发展中心产品, 比重 1.077 g/L; RPMI1640 培养基(Gibico); R-PE 标记的 rMHC tetramer HLA-A\*0201/FLPSDFFPSV(Tc18-27), HLA-A\*0201/FLLTRILT1(Te183-191), HLA-A\*0201/WLSLLVPFV(Te335-343), HLA-A\*0201/FLLSLGIHL(Tp575-583) 购自英国 Proimmune 公司; R-PE 标记的亲合素购自美国 Sigma 公司; Cy-Chrome™ 标记的鼠抗人 CD8mAb 购自美国 BD PharMingen 公司; Cy-Chrome™ 标记的鼠 IgG<sub>1</sub>, κmAb 同型对照购自美国 BD PharMingen 公司; 红细胞裂解液购自美国 BD PharMingen 公司; FACS 洗涤液(含 1 g/L BSA, 0.1 g/L 叠氮钠的 PBS); HLA-A2 鼠抗人 mAb(来源于 BB7.2 小鼠杂交瘤细胞株, ATCC); FITC-羊抗小鼠 IgG 购自北京中山生物技术有限公司. TDGC2J 超净工作台(苏州); TGL-16B 台式离心机(上海); FACStar Plus 流式细胞仪/FCM(Becton-Dickinson); 定量 PCR 仪; 7150 全自动生化分析仪

**1.2 方法** 血清转氨酶水平测定采用 7150 全自动生化分析仪. 血清 HBV DNA 定量检测(定量 PCR, Roche 公司)按说明书进行. 采集肝素抗凝的外周静脉血 2 mL, 淋巴细胞分离液密度梯度法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 用 HLA-A2 鼠抗人 mAb (BB7.2, ATCC)为一抗, FITC-羊抗小鼠 IgG 为二抗进行间接免疫荧光染色, 流式细胞仪检测 HLA-A2 表型. Tetramer 染色参照 Proimmune 公司说明书. PBMCs  $1 \times 10^6$ /L 加入 tetramer 1 μg, 20 μL PE-Cy5 标记的 CD8 抗体, 混匀, 避光, 室温孵育 30 min 后 PBA 液(5 g/L 牛血清白蛋白, 0.5 g/L 叠氮钠, 0.01 mol/L PBS)洗涤 2 次; 10 g/L 多聚甲醛固定后上机检测; 或肝素抗凝的全血 0.25 mL 加 PBS 2 mL 稀释后, 500 g 离心 5 min; 用吸管小心移弃上清; 加入 tetramer 1 μg, PE-Cy5 20 μL 标记的 CD8 抗体于全血细胞中, 混匀; 室温孵育 30 min, 避光; PBA 液洗涤 1 次; 加 5 mL FACS 裂解液, 室温 10 min; 待细胞悬液变成真性溶液后 PBA 液洗涤 2 次; 10 g/L 多聚甲醛固定, FACStar Plus 流式细胞仪检测, BD FACS 专用 CELLQuest™ 软件分析.

**统计学处理** 本研究计量资料以均数±标准差(mean±SD)表示. 分别以病毒载量(以病毒拷贝数表示)和血清转氨酶水平为因变量(depend), 以 Tc18-27、Te183-191、Te335-343、Tp575-583 为自变量(independ), 采用多元逐步回归分析(multiple stepwise regression analysis). 显著性检验用 t 检验, 单相关分析用线性相关. 整个统计过程用 SPSS 8.0 统计软件进行.  $P < 0.05$  为有显著性意义.

## 2 结果

在 35 例慢性乙肝患者有 16 例为 HLA-A2<sup>+</sup>, 经流式细胞仪检测 HLA-A2<sup>+</sup> 阳性的平均荧光强度大于 90%. 通过对照 HLA-A2<sup>+</sup> 患者的 Tc18-27 染色发现, 以 CD8 阳性细胞设门, tetramer 阳性细胞频率在两种方法的检测中无明显差异. 在慢性乙肝患者中, HLA-A2<sup>+</sup> 组和 HLA-A2<sup>-</sup> 组之间无明显差异( $P > 0.05$ ), 但和正常健康 HLA-A2<sup>+</sup> 组有显著性差异( $P < 0.05$ ).

**2.1 不同表位特异性 CTL 的表达频率** HLA-A2<sup>+</sup> 正常健康组及 HLA-A2<sup>-</sup> 慢性乙肝患者组 tetramer<sup>+</sup> 细胞未超过 0.03%. 所有 HLA-A2<sup>+</sup> 患者的 tetramer<sup>+</sup> 细胞频率(图 1). 16 例 HLA-A2<sup>+</sup> 乙肝患者外周血中, Tc 18-27 有 12 例有 tetramer 阳性细胞存在, 频率为 0.01-3.52%, 其中在 9 例患者呈优势性表达. Te 183-191 在 8 例患者的阳性频率为 0.02-1.37%, 其中 3 例为优势性表达. Te 335-343 在 4 例患者的阳性频率为 0.02-0.79%, 无优势性表达. Tp 575-583 在 5 例患者中阳性表达频率为 0.01-1.01%, 无优势性表达. HLA-A2<sup>+</sup> 慢性乙肝感染组的 tetramer 阳性细胞频率与 HLA-A2<sup>-</sup> 慢性乙肝感染组及 HLA-A2<sup>+</sup> 正常健康组的 tetramer 阳性细胞频率比较有显著性差异( $P < 0.05$ ), HLA-A2<sup>-</sup> 慢性乙肝患者组与 HLA-A2<sup>+</sup> 正常健康组的 tetramer 阳性细胞频率比较无显著性差异( $P > 0.05$ , 图 2).

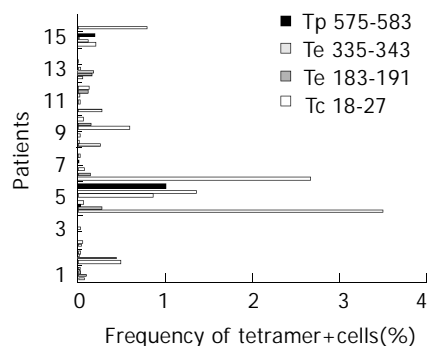


图 1 HLA-A2<sup>+</sup> 慢性乙肝感染患者外周血 tetramer<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞的表达频率. 全血(0.25 mL)经 PE 标记的 tetramer 染色(Tc18-27、Te183-191、Te335-343、Tp575-583)和 PE-Cy5 标记的 CD8 单克隆抗体进行双标染色, 在流式细胞仪上进行分析, 以 CD8 阳性细胞设门, 计数 50 000 个细胞, 双阳性细胞为 tetramer 细胞频率(以 % 表示).

**2.2 特异性 CTL 表达频率与病毒感染的关系** 以病毒载量为因变量; Tc18-27, Te183-1-91, Te335-343, Tp575-583 为自变量, 进行逐步回归分析, 得出线性模型如下: 病毒载量 =  $-111.7 + 331.7 (Tc18-27) + 4929.1 (Te183-191) + 3388.9 (Te335-343) - 7098.0 (Tp575-583)$ . 回归方程的整体性检验: 决定系数(r square)= 0.928, F 值为 7.003,  $P = 0.005$ , 有统计学意义. 4 个自变量对病毒载量的影响依次为  $Tc18-27 > Tp575-583 > Te183-191 > Te335-343$ . 但 4 种表位特异性 CTL 和病毒载量相关性无显著意义( $P > 0.05$ ). 以血清转氨酶水平为因变量; Tc18-27, Te183-1-91, Te335-343, Tp575-583 为

自变量, 进行逐步回归分析, 得出的回归方程无统计学意义( $P > 0.05$ ), 转氨酶水平和四种表位特异性CTL均无显著相关性( $P > 0.05$ ). 病毒载量和血清转氨酶水平无线性相关( $P > 0.05$ ).

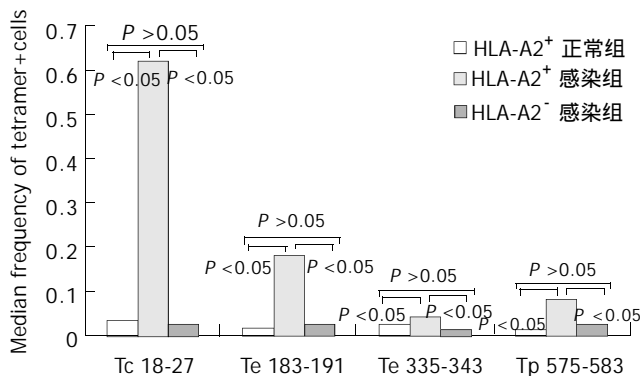


图2 tetramer<sup>+</sup> 细胞频率和病毒载量之间的关系. HLA-A2<sup>+</sup> 感染组的tetramer 阳性细胞频率与 HLA-A2<sup>-</sup> 感染组及 HLA-A2<sup>+</sup> 正常健康组的tetramer 阳性细胞频率比较有显著性差异( $P < 0.05$ ), HLA-A2<sup>-</sup> 感染组与 HLA-A2<sup>+</sup> 正常健康组的tetramer 阳性细胞频率比较无显著性差异( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

HBV 作为嗜肝细胞病毒, 病毒本身及其在体内的复制并不引起宿主肝细胞的损伤. HBV 感染通常被认为是宿主细胞免疫的结果<sup>[1, 7-11]</sup>. 由于HBV不能在体外组织培养中生长, 而黑猩猩是惟一能被感染的动物, 这些缺陷一直阻碍了HBV 感染免疫病理的研究<sup>[11-12]</sup>. 既往研究表明, 急性自限 HBV 感染患者体内出现强烈而多克隆的CTL 反应, 同时伴随血清转氨酶升高等肝脏病理损害, 进而引起HBV 的清除. 而在慢性乙肝患者体内CTL 反应非常微弱甚至检测不到<sup>[12]</sup>. MHC/肽四聚体复合物技术为检测表位特异性CTL 提供了定量标准<sup>[3-5]</sup>, 为进一步了解表位特异性CTL 与病毒复制及肝脏损害之间的相关关系提供了可能性. 全血染色法因所需样本量少, 无需进行淋巴细胞分离等烦琐的离心步骤, 并因更接近体内环境而日益受到重视<sup>[3-5, 13]</sup>. 我们尝试了全血法对乙肝患者外周血的tetramer 检测, 以CD8<sup>+</sup> 阳性细胞设门, 计算tetramer<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的双阳性细胞, 结果两种方法检测的tetramer<sup>+</sup> 细胞频率无显著性差异. 表明全血法检测是一种简单可行的方法. 通过慢性活动性乙肝患者, 发现病毒载量与血清转氨酶水平无明显相关性, 支持既往关于病毒本身并不引起肝细胞损害的观点<sup>[12]</sup>. 在慢性活动性乙肝患者体内出现多克隆的CTL 反应, 其中Tc18-27 为优势性表达. 但通过对4种不同表位特异性CTL 与病毒载量的关系发现, 4种表位特异性CTL 和病毒复制水平并不相关, 表明这些多克隆存在的CTL 并不能代表机体的保护性反应. 这些反应状态的不同差异以及与病毒载量的相关性差异, 其可能的原因为: (1) HBV 不同抗原可能具有不同的免疫原性和耐受原性<sup>[14]</sup>. Yang et al<sup>[15]</sup> 在HBV 质粒转染诱导的小鼠急性感染模型中, 并没有检测到针对核心抗原的CTL, 可能与小鼠的遗传背景

有关; (2) Kakimi et al<sup>[14]</sup>发现, 被膜抗原(envelope, ENV) 特异性CTL 处于耐受状态, 而针对聚合酶(polymerase, POL)的CTL 虽然存在, 但对乙肝病毒的复制和肝细胞的损伤均没有作用; 而Reignat et al<sup>[16]</sup>发现, 针对ENV 的耐受并不是经典的耐受. 需结合如Elispot 技术进行或统计分析的方法进行综合评价<sup>[17]</sup>, 这可能是本实验中Te183-191、Te335-343 及Tp575-583 与病毒载量之间无相关性的原因; (3) tetramer 技术的定量检测并不能反应CTL 在体内的功能状态<sup>[16, 18-20]</sup>. 这些病毒特异性CTL 能和体内高载量的病毒抗原共存而不具有杀伤靶细胞和分泌细胞因子的功能; (4) 我们仅选择了4个具有代表性针对HLA-A2 限制性的优势性表位. 新近在HIV 的研究表明, 单纯针对优势性表位的检测并不能反映机体的整个病毒感染的参数, 而应该由所有具有免疫潜能的表位特异性CTL 来反映<sup>[21-24]</sup>.

血清转氨酶水平升高是肝脏损害的标志<sup>[25]</sup>. 我们发现4种表位特异性CTL 与血清转氨酶水平无显著性相关. 可能一些未选择的亚优势表位发挥了肝细胞损害的功能<sup>[16]</sup>; CTL 可能通过非细胞毒机制发挥控制和清除HBV 病毒的作用<sup>[26]</sup>. 如果HBV 特异性效应CD8<sup>+</sup>T 细胞应答不能控制病毒复制, 则会直接或通过吸引其他非病毒抗原特异性T 细胞聚集而造成肝病理损害<sup>[19, 26]</sup>. Sitia et al<sup>[27-30]</sup>研究表明, 通过阻滞趋化因子的作用可减少抗原非特异性细胞在肝细胞的浸润, 从而降低肝细胞的损害程度. 表位特异性CTL 在慢性活动性乙肝患者体内的存在并不直接引起宿主肝细胞的损害, 而可能通过“募集”更多的抗原非特异性细胞间接地对肝细胞进行损伤. 这样可设计新型抗原分子, 诱导HLA-I 类分子限制性的HBV 特异性效应CD8<sup>+</sup>T 细胞表达, 在无肝细胞病理性损害的基础上, 籍抗原特异性CTL 作用而抑制HBV 复制、清除胞内病毒.

### 4 参考文献

- Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:395-403
- Guidotti LG. The role of cytotoxic T cells and cytokines in the control of hepatitis B virus infection. *Vaccine* 2002;20(Suppl 4): A80-82
- Appay V, Rowland-Jones SL. The assessment of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining. *J Immunol Methods* 2002; 268:9-19
- He XS, Rehmann B, Boisvert J, Mumm J, Maecker HT, Roederer M, Wright TL, Maino VC, Davis MM, Greenberg HB. Direct functional analysis of epitope-specific CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood. *Viral Immunol* 2001;14:59-69
- Tsai SL, Lee TH, Chien RN, Liao SK, Lin CL, Kuo GC, Liaw YF. A method to increase tetramer staining efficiency of CD8<sup>+</sup> T cells with MHC-peptide complexes: therapeutic applications in monitoring cytotoxic T lymphocyte activity during hepatitis B and C treatment. *J Immunol Methods* 2004;285:71-87
- Shi TD, Wu YZ, Jia ZC, Zhou W, Zou LY. Therapeutic polypeptides based on HBcAg (18-27) CTL epitope can induce antigen-specific CD8<sup>+</sup> CTL-mediated cytotoxicity in HLA-A2 transgenic mice. *World J Gastroenterol* 2004;10:1222-1226
- Tang TJ, Kwekkeboom J, Laman JD, Niesters HG, Zondervan PE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. The role of intrahepatic immune effector cells in inflammatory liver injury and

- viral control during chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2003;10:159-167
- 8 Liaw YF. Hepatitis flares and hepatitis Be antigen seroconversion: implication in anti-hepatitis B virus therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:246-252
  - 9 Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8 (+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003;77:68-76
  - 10 Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39(Suppl 1):S36-42
  - 11 Wieland SF, Spangenberg HC, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2129-2134
  - 12 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:43-50
  - 13 Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 2002;8:379-385
  - 14 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002;76:8609-8620
  - 15 Yang PL, Althage A, Chung J, Chisari FV. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13825-13830
  - 16 Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002;195:1089-1101
  - 17 Welsh RM. Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen. *J Exp Med* 2001;193:F19-22
  - 18 Langhans B, Schweitzer S, Nischalke HD, Braunschweiger I, Sauerbruch T, Spengler U. Hepatitis C virus-derived lipopeptides differentially induce epitope-specific immune responses in vitro. *J Infect Dis* 2004;189:248-253
  - 19 Webster G, Bertoletti A. Quantity and quality of virus-specific CD8 cell response: relevance to the design of a therapeutic vaccine for chronic HBV infection. *Mol Immunol* 2001;38:467-473
  - 20 Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertoletti A, Pilli M, Cavallo C, Cavalli A, Urbani S, Boehme R, Panebianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001;33:963-971
  - 21 Rehmann B. Intrahepatic T cells in hepatitis B: viral control versus liver cell injury. *J Exp Med* 2000;191:1263-1268
  - 22 Betts MR, Casazza JP, Patterson BA, Waldrop S, Trigona W, Fu TM, Kern F, Picker LJ, Koup RA. Putative immunodominant human immunodeficiency virus-specific CD8 (+) T-cell responses cannot be predicted by major histocompatibility complex class I haplotype. *J Virol* 2000;74:9144-9151
  - 23 Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brechley JM, Casazza JP, Koup RA, Picker LJ. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4 (+) and CD8 (+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol* 2001;75:11983-11991
  - 24 Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, Johnston MN, Corcoran C, Wurcel AG, Fitzpatrick CA, Feeney ME, Rodriguez WR, Basgoz N, Draenert R, Stone DR, Brander C, Goulder PJ, Rosenberg ES, Altfeld M, Walker BD. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* 2003;77:2081-2092
  - 25 Perrillo RP, Lai CL, Liaw YF, Dienstag JL, Schiff ER, Schalm SW, Heathcote EJ, Brown NA, Atkins M, Woessner M, Gardner SD. Predictors of HBeAg loss after lamivudine treatment for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002;36:186-194
  - 26 Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91
  - 27 Sitia G, Isogawa M, Kakimi K, Wieland SF, Chisari FV, Guidotti LG. Depletion of neutrophils blocks the recruitment of antigen-nonspecific cells into the liver without affecting the antiviral activity of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13717-13722
  - 28 Kakimi K, Lane TE, Wieland S, Asensio VC, Campbell IL, Chisari FV, Guidotti LG. Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 2001;194:1755-1766
  - 29 Kakimi K, Lane TE, Chisari FV, Guidotti LG. Cutting edge: Inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J Immunol* 2001;167:6701-6705
  - 30 Wieland SF, Vega RG, Muller R, Evans CF, Hilbush B, Guidotti LG, Sutcliffe JG, Schultz PG, Chisari FV. Searching for interferon-induced genes that inhibit hepatitis B virus replication in transgenic mouse hepatocytes. *J Virol* 2003;77:1227-1236

# 多引物对巢式PCR法检测HBV基因型的流行病学分析

谷鸿喜, 徐子龙, 刘建宇, 钟照华, 王华庆, 张淑云, 李迪, 张海红, 阿部贤治

谷鸿喜, 徐子龙, 刘建宇, 钟照华, 王华庆, 张淑云, 李迪, 哈尔滨医科大学微生物教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086  
张海红, 呼伦贝尔盟防疫站检验科 内蒙古海拉尔 021008  
阿部贤治, 日本国立感染症研究所病理室 日本东京 162-8640  
谷鸿喜, 女, 1943-09-18 生, 黑龙江省哈尔滨人, 汉族, 1967 年哈尔滨医科大学毕业, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤相关病毒的研究。  
日本健康科学基金资助项目, No. 0109  
项目负责人: 谷鸿喜, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 194 号, 哈尔滨医科大学微生物教研室. hxgu2432@163.com.  
电话: 0451-86685122 传真: 0451-86685122  
收稿日期: 2004-01-09 接受日期: 2004-03-02

## Epidemiology of HBV genotypes by nested PCR with multi-paired primers

Hong-Xi Gu, Zi-Long Xu, Jian-Yu Liu, Zhao-Hua Zhong, Hua-Qing Wang, Shu-Yun Zhang, Di Li, Hai-Hong Zhang, Kenji Abe

Hong-Xi Gu, Zi-Long Xu, Jian-Yu Liu, Zhao-Hua Zhong, Hua-Qing Wang, Shu-Yun Zhang, Di Li, Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Hai-Hong Zhang, Hulunbeier Center of Diseases Control and Prevention, Hailaer 021008, Inner Mongolia, China  
Kenji Abe, Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan  
Supported by Japan Health Science Foundation, No. 0109  
Correspondence to: Hong-Xi Gu, Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. hxgu2432@163.com  
Received: 2004-01-09 Accepted: 2004-03-02

## Abstract

**AIM:** To investigate the epidemiology of HBV genotypes among HBV-infected persons in northern China.

**METHODS:** The HBV DNA in 801 sera samples collected from hepatitis patients (594), healthy controls (154), and HCV-infected patients (53) were tested by nested PCR, the positive sera were then genotyped by nested PCR with six pairs of HBV genotype-specific primers (A to F).

**RESULTS:** 464 samples (57.9%) were HBV DNA positive among the 801 samples. Among 594 cases with various hepatitis B clinical manifestations, 74.4% (442/594) were HBV-DNA positive, while 8.4% (13/154) of healthy controls were HBV-DNA positive. There was significant difference between the hepatitis patients and healthy controls ( $P < 0.01$ ). 17% (9/53) of HCV-infected patients were HBV-DNA positive, too. Among the 464 HBV-DNA positive samples, the percentage of genotype A was 5.2% (24/464), genotype B 7.1% (33/464), and type C 77.2% (358/464), type D 2.4% (11/464), while none of type E and F had been found in those samples. 14 samples (3%) were both type B and C positive. The 24 samples could not be genotyped in this study.

**CONCLUSION:** The HBV genotypes prevailed among HBV-infected persons in northern China are types A, B, C, and

D, and the major genotype is type C (77.2%). Type C is also the major genotype among the clinical groups. There is no statistical difference between the groups.

Gu HX, Xu ZL, Liu JY, Zhong ZH, Wang HQ, Zhang SY, Li D, Zhang HH, Abe K. Epidemiology of HBV genotypes by nested PCR with multi-paired primers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1073-1076

## 摘要

**目的:** 掌握我国北方地区乙型肝炎病毒(HBV)感染者HBV基因型分布情况, 为了解其流行病学及临床意义提供基础。

**方法:** 首先采用巢式PCR法对801份血清进行HBV DNA检测, 其中包括 154 份健康人血清、594 份 HBV 感染的各类肝病患者及53例抗HCV阳性血清标本。再采用HBV A-F六个主要基因型特异性多引物对巢式PCR法对HBV DNA进行基因型检测及分析。

**结果:** 在 801 例血清标本中有 464 例(57.9%)检测到 HBV DNA, 其中 154 名健康人血清阳性率为 8.4%(13/154), 594 例不同临床表现的乙肝患者血清 HBV DNA 总检出率为 74.4%(442/594), 二者相比差异显著( $P < 0.01$ ); 抗HCV阳性血清中检出HBV DNA占17% (9/53)。464例HBV DNA 阳性标本中, HBV基因型检出率分别是: A型为5.2% (24/464), B型为 7.1%(33/464), C型为 77.2%(358/464), D型 2.4% (11/464), 未检出 E 和 F 型, 但尚有 14 例(3%)同时检出 B 型和 C 型, 有 24 例未检出型别。急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化、原发肝癌各不同临床表现组间基因型分布无统计学差异。

**结论:** 结果看出, 我国北方地区感染的 HBV 基因型存在 A、B、C、D 四个型别, 其中 C 型为主(77.2%), 各临床表现组基因型分布也均以 C 型为主, 组间无统计学差异。

谷鸿喜, 徐子龙, 刘建宇, 钟照华, 王华庆, 张淑云, 李迪, 张海红, 阿部贤治。  
多引物对巢式 PCR 法检测 HBV 基因型的流行病学分析。世界华人消化杂志  
2004;12(5):1073-1076

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1073.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是引起急、慢性肝炎的主要病原之一, 并可导致肝硬化和原发性肝癌, 严重危害人类健康。HBV DNA 易发生变异<sup>[1-2]</sup>, 基因变异可影响基因复制表达, 也可影响临床感染类型和机体免疫应答<sup>[3-4]</sup>。根据 HBV 基因组核苷酸序列的差



异,目前HBV可分为A-H 8个基因型<sup>[5-8]</sup>. HBV基因型分布有地域性,不同地区流行的基因型不同,而且基因型与疾病的预后、治疗药物的选择等均有一定关系<sup>[9-11]</sup>. 为了解我国北方地区HBV基因型流行病学情况及其临床意义,我们采用HBV A-F 6个主要基因型特异性多引物对巢式PCR法对594例不同临床表现的乙肝患者、154名健康人血清及53份丙肝患者血清中HBV DNA阳性的464例标本进行了基因分型和分析如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 HBV感染的不同类型肝病患者血清594份采自2001-09/2002-12哈尔滨医科大学附属一院、二院,解放军211医院及海拉尔呼盟人民医院门诊或住院患者,包括急性肝炎63例,慢性肝炎198例,肝硬化72例,原发性肝癌73例,HBV无症状携带者188例. 所有病例诊断均符合2000年西安全国肝病会议修订的病毒性肝炎诊断标准及肝癌、肝硬化等诊断指标;同时还采集53例临床诊断为丙型肝炎(抗HCV阳性)患者血清进行了HBV DNA及基因型检测;154份健康人血清采自黑龙江省商业大学2001级新生,HBV血清免疫学标志均为阴性. M-MLV逆转录酶(Promega, 200 MU/L); Taq DNA合成酶(Promega, 5 MU/L); 核酸提取试剂盒(Sepa-Gene RV-R)购自日本三光株式会社; 100 bp DNA Marker(华美生物技术公司). 巢式PCR检测HBV DNA的引物(X区),设计参见文献[12],由北京华美生物公司合成.

外引物对为: 5' -TGCCAACTGGATCCTTCGCGGG ACGTCCTT-3'(nt1 392-1 421); 5' -GTTCACGGTGGT CTCCATG-3'(nt1 625-1 607). 内引物对为: 5' -GTCC CCTTCTTCATCTGCCGT-3'(nt1 487-1 507); 5' -ACG

TGCAGAGGTGAAGCGAAG-3'(nt 1 604-1 584). 检测HBV基因型用引物根据HBV DNA pre-S和S基因区保守序列设计各基因型特异引物<sup>[13]</sup>, A, B, C…….F代表各基因型(表1). 引物由日本感染病研究所阿部贤治教授惠赠.

1.2 方法 待检血清HBV DNA扩增采用巢式PCR法. 首先取血清标本100 μL,按核酸提取试剂盒说明提取血清DNA,将提取物溶解于50 μL无RNA的去离子水中,混匀即为血清DNA提取物. 取DNA提取物5 μL为模板,总反应体系为50 μL,进行巢式PCR扩增HBV DNA,方法见文献[18]. 反应产物经25 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定,出现118bp DNA片段为HBV DNA阳性. HBV DNA阳性者测其基因型. HBV DNA基因型别的检测采用基因型特异多引物对巢式PCR法. 取待检DNA 5 μL为模板,总反应体系为40 μL. 第1次PCR反应参数为: 95℃ 10 min后, 94℃ 20 s, 55℃ 20 s, 72℃ 30 s, 40个循环,再72℃ 7 min. 第2次PCR分两组进行,先按表1分成A组(包括A, B, C基因型)和B组(包括D, E, F基因型)加引物,再分别加入第1次PCR产物1 μL. 第2次PCR反应参数为: 95℃ 10 min后,按94℃ 20 s, 58℃ 20 s, 72℃ 30 s进行20个循环之后,按94℃ 20 s, 60℃ 20 s, 72℃ 30 s,再进行20个循环,最后72℃ 7 min. 反应后,分别取A组和B组扩增产物10 μL于30 g/L琼脂糖凝胶进行电泳,溴化乙锭染色后,凝胶电泳分析系统(上海天美2010)观察并照相.

## 2 结果

2.1 HBV DNA检测结果 采用巢式PCR法对801份患者血清,其中包括594例HBV感染组不同肝疾患、53

表1 巢式PCR检测HBV基因型特异引物序列

引物	序列 <sup>a</sup>
第1次 PCR	
P1.....	5' -TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3'(nt2823-2845, 通用)
S1-2.....	5' -CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC-3' (nt685-704, 通用)
第2次 PCR	
A 组	
B2.....	5' -GGC TCM AGT TCM GGA ACA GT-3'(nt67-86, A-E型特异)
BA1R.....	5' -CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-3' (nt113-134, A型特异)
BB1R.....	5' -CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3' (nt324-345, B型特异)
BC1R.....	5' -GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3' (nt165-186, C型特异)
B 组	
BD1.....	5' -GCC AAC AAG GTA GGA GCT-3' (nt2979-2996, D型特异)
BE1.....	5' -CAC CAG AAA TCC AGA TTG GGA CCA-3' (nt2955-2978, E型特异)
BF1.....	5' -GYT ACG GTC CAG GGT TAC CA-3' (nt3032-3051, F型特异)
B2R.....	5' -GGA GGC GGA TYT GCT GGC AA-3' (nt3078-3097, D-F型特异)

<sup>a</sup>:“M”可代表一个核苷酸A或C; “Y”可代表一个核苷酸C或T.

例丙型肝炎组和154例健康人血清进行HBV DNA检测. 结果看出, HBV感染组各类型肝疾病患者血清中HBV DNA检出率65.8-77.7%, 各组间无统计学差异. 健康对照组HBV血清标志虽然均阴性, 但仍有8.4%(13/154)被检出HBV DNA, 其检出率与HBV感染组相比, 差异显著( $P < 0.01$ ). 丙型肝炎组(HCV抗体阳性)有17%(9/53)检出HBV DNA, 说明存在HCV和HBV混合感染的病例(表2).

表2 801份血清标本中HBV DNA检测结果

分组	n	HBV DNA 阳性	
		n	百分率(%)
健康人组	154	13	8.4
HBV感染组	594	442	74.4 <sup>b</sup>
无症状携带者	188	146	77.7
急性乙型肝炎	63	43	73.0
慢性乙型肝炎	198	153	77.3
肝硬化	72	49	68.1
原发性肝癌	73	48	65.8
丙型肝炎组	53	9	17.0

<sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs 健康人组.

**2.2 HBV DNA 基因型** 采用基因型特异多引物对巢式PCR法对464例HBV DNA阳性标本进行了HBV基因型检测, 出现68 bp, 281 bp, 122 bp和119 bp条带者分别为HBV A, B, C和D基因型特异条带, 未出现E和F基因型特异带(图1, 2).

**2.3 HBV DNA 基因的分布** 在464例HBV DNA阳性的血清标本中, 有440份被确定型别, 24份未测出型别. 检出的HBV型别有A, B, C, D型, E和F型未检出, 各型在不同临床组血清标本中的分布不同(表3). HBV基因型总检出率以C型为主, 占77.2%, 其他型别依次是A型为5.2%, B型为7.1%, D型为2.4%, E和F型未检出, 但有3.0%同时检出B型和C型, 还有5.2% HBV DNA没鉴定出基因型别. HBV感染组中不同肝疾病

患者血清中HBV基因型同样是以C型为主(77.6%), 不同基因型在各组分布, 组间无统计学差异. 健康人组13例HBV DNA阳性血清中也有10例检出C基因型, 占76.9%, 除1例B和C型混合外, 其余型别未被检出. 9例HBV DNA阳性的丙型肝炎血清中, 有5例是C型, 占55.6%, A和D型各检出1例.

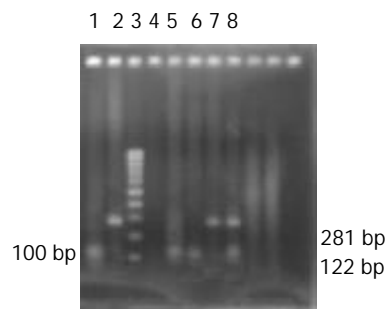


图1 HBV基因B, C型电泳图. 1, 2: C, B型阳性对照; 4: 阴性对照; 3: DNA分子大小标准; 5, 6: C型; 7: B型; 8: C和B混合型.

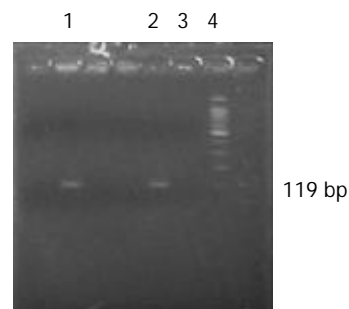


图2 HBV基因D型电泳图. 1: HBV D型; 2, 3: HBV D型阳性和阴性对照; 4: DNA marker.

### 3 讨论

乙型肝炎为世界流行性疾病, 不同国家和地区发病率有明显差异, 我国为高流行区, 人群感染率平均为10%左右. HBV感染的诊断对临床治疗有很大指导意义. 以往临床上主要依据HBV血清学免疫标志分析判断病毒在体内复制情况、传染性治疗方案等. 近年许多研究通过检测标本中HBV DNA或进行DNA定量来直接判断

表3 HBV基因型在各临床组血清标本中的分布

分组	HBV DNA 阳性 / n	HBV基因型 / n (%)					
		A	B	C	D	B+C	UC*
健康人组	13	0	0	10 (76.9)	0	1 (7.7)	2 (15.4)
HBV感染组(小计)	442	23 (5.2)	31 (7.0)	343 (77.6)	10 (2.3)	13(3.0)	20 (4.6)
HBV携带者	146	10 (6.8)	11 (7.5)	110 (75.3)	6 (4.1)	4 (2.7)	5 (3.4)
急性乙型肝炎	46	2 (4.3)	6 (13)	32 (69.6)	2 (4.3)	1 (2.2)	3 (6.5)
慢性乙型肝炎	153	9 (5.9)	11 (7.2)	119 (77.8)	2 (1.3)	3 (2.0)	9 (5.9)
肝硬化	49	2 (4.1)	3 (6.1)	39 (79.6)	0	2 (4.1)	3 (6.1)
原发性肝癌	48	0	2 (4.2)	43 (89.6)	0	3 (6.3)	0
丙型肝炎组	9	1 (11.1)	0	5 (55.6)	1 (11.1)	0	2 (22.2)

\*UC, 型别不确定.

病毒在体内复制情况. 若HBV血清学免疫标志与DNA检测结合起来会更科学确定乙型肝炎病程进展及治疗方案. 根据HBV抗原决定簇的差异可划分为4个血清型, 而按HBV基因序列差异目前分为A-H 8个基因型<sup>[17]</sup>. 虽然二者有一定的对应关系, 但血清亚型并不能完全反映出HBV各株间的异质性, 而HBV基因型确能更好地理解各流行株间的不同差异性. 为此了解世界各地HBV基因型分布情况, 对寻找和追踪传染源、分析病毒衍变和进化更有意义, 对研究不同株与临床疾病类型及预后也有一定指导意义, 特别是针对各地基因优势株制备疫苗是更值得考虑的问题.

HBV基因型分布有明显地域性<sup>[14-15]</sup>. A型主要分布于欧洲和美国; B, C型主要分布于远东和亚洲地区; D型是地中海地区和近东的优势基因型; E型主要分布非洲; F, G型见于美国; 最近中美洲有H型的报道<sup>[7]</sup>. 我国各地区报道也不同<sup>[15-17]</sup>. 我们采用基因型特异多引物对巢式PCR法, 对464例HBV DNA阳性患者血清中HBV进行了基因分型检测. 方法不仅简单而且结果可靠. 本结果表明, 北方地区被检血清标本中HBV DNA存在A, B, C, D 4个基因型, 其中以C型为主, 占77.2%, B, A和D型的检出率较低, 分别为7.1%, 5.2%和2.4%, E, F型未检出. 该结果与2002年南宁、广州地区报道相似<sup>[16-17]</sup>. 至于14例同时检出B型和C型基因是否是重叠感染, 尚须进一步证实. 还有24例患者血清中HBV DNA虽然阳性, 但未确定出型别, 有可能是A-F基因型以外的型别, 如G型或H型, 尚需进一步加以证实. 从本研究结果看出丙型肝炎患者血清中有17%检出HBV DNA, 其中也是以C型为主(55.6%), 说明两种肝炎病毒可重叠感染<sup>[18]</sup>.

#### 4 参考文献

- Seo Y, Yoon S, Nakaji M, Yano Y, Nagano H, Ninomiya T, Hayashi Y, Kasuga M. Hepatitis B virus DNA in anti-HBe-positive asymptomatic carriers. *Intervirology* 2003;46:43-49
- Hannoun C, Horal P, Lindh M. Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome. *J Gen Virol* 2000;81:75-83
- Pumpens P, Grens E, Nassal M. Molecular epidemiology and immunology of hepatitis B virus infection-an update. *Intervirology* 2002;45:218-232
- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002;83:1267-1280
- Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 2003;46:329-338
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:1207-1209
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 8):2059-2073
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000;81:67-74
- Joh R, Hasegawa K, Ogawa M, Ishikawa K, Iizuka A, Naritomi T, Kanai N, Torii N, Hashimoto E, Hayashi N. Genotypic analysis of hepatitis B virus from patients with fulminant hepatitis: comparison with acute self-limited hepatitis. *Hepatol Res* 2003;26:119-124
- Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *J Virol* 2002;76:6131-6137
- Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Wong DK, Hui CK, Wong BC, Chan AO, Lai CL. Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma. *Viral Hepatitis* 2003;37:562-567
- Konomi N, Yamaguchi M, Naoto H, Aiba N, Saito T, Arakawa Y, Abe K. Simultaneous detection of hepatitis B, C, and G viral genomes by multiplex PCR method. *Jpn J Infect Dis* 2000;53:70-72
- Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001;39:362-364
- Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, Carey W, Brown RS Jr, Luketic VA, Terrault N, Lok AS. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology* 2003;125:444-451
- Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001;44:43-47
- Ding X, Mizokami M, Ge X, Orito E, Iino S, Ueda R, Nakanishi M. Different hepatitis B virus genotype distributions among asymptomatic carriers and patients with liver diseases in Nanning, southern China. *Hepatol Res* 2002;22:37-44
- 黄晶, 高志良. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1362-1364
- Ding X, Gu HX, Zhong ZH, Zilong X, Tran HT, Iwaki Y, Li TC, Sata T, Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. *Jpn J Infect Dis* 2003;56:19-22

# 鼠暴发性肝衰竭中 Fas 表达与肝细胞凋亡的关系

王玉梅, 冯国和, 黄 芬, 石理兰, 李 颖, 王占英

王玉梅, 冯国和, 黄芬, 石理兰, 李颖, 王占英, 中国医科大学附属第二医院感染科 辽宁省沈阳市 110004  
王玉梅, 女, 1970-02-26 生, 山西省大同市人, 2002 年获中国医科大学博士, 讲师, 主要从事病毒性肝炎发病机制的研究。  
项目负责人: 王玉梅, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二医院感染科。wangym7002@yahoo.com  
电话: 024-83956961 传真: 024-62124785  
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-02-01

## Relationship between hepatocytic apoptosis and Fas expression in mouse fulminant hepatic failure

Yu-Mei Wang, Guo-He Feng, Fen Huang, Li-Lan Shi, Ying Li, Zhan-Ying Wang

Yu-Mei Wang, Guo-He Feng, Fen Huang, Li-Lan Shi, Ying Li, Zhan-Ying Wang, Department of Infectious Diseases, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Yu-Mei Wang, Department of Infectious Diseases, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wangym7002@yahoo.com  
Received: 2003-11-18 Accepted: 2004-02-01

## Abstract

**AIM:** To study the relationship among tumor necrosis factor- $\alpha$ , Fas expression and hepatocyte apoptosis in an experimental model of fulminant hepatic failure (FHF).

**METHODS:** A mouse model of FHF was established by LPS and D-GalN. The expression of Fas in liver tissue was detected by immunohistochemical method. Serum TNF- $\alpha$  level and TNF- $\alpha$  mRNA expression in liver were analyzed by ELISA and RT-PCR method respectively. Hepatocytic apoptosis was examined by DNA agarose gel electrophoresis and TUNEL method. TNF- $\alpha$ , Fas and hepatocytic apoptosis were observed in the different stage after drug administration. In addition, changes of the above items were observed after pretreatment with anti-TNF- $\alpha$ IgG1.

**RESULTS:** There was a little expression of Fas at 2 h in model group. The expression of Fas increased distinctly at 8 h and 12 h and there was no statistical difference between them. The expression of Fas at 8 h and 12 h was higher than that at 2 h and 4 h ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively). TNF- $\alpha$  mRNA expression in liver increased statistically ( $0.91 \pm 0.75$ ) and the data of normal control was ( $0.32 \pm 0.10$ ) in 2 hours to 4 hours after administration of LPS and D-GalN. The level of serum TNF- $\alpha$  increased ( $320 \pm 87$  ng/L, the data of normal control was  $17 \pm 7$  ng/L). There was typical manifestation of hepatocytic apoptosis at 8 h after the drug administration. The level of serum ALT and TBil obviously increased ( $9\ 352 \pm 1\ 000$  nkat/L and  $163.7 \pm 34.5$   $\mu$ mol/L, respectively, the data of normal control was  $393 \pm 134$  nkat/L and  $14.9 \pm 4.8$   $\mu$ mol/L, respectively). and there were hepatocytic apoptosis and

necrosis at 12 hour after drug administration, at the same time, the level of serum ALT and TBil reached the peak ( $11\ 141 \pm 1\ 312$  nkat/L and  $203.2 \pm 19.9$   $\mu$ mol/L, respectively). Hepatocytic apoptosis and liver injury and the expression of Fas could be blocked after antagonized with TNF- $\alpha$ .

**CONCLUSION:** TNF- $\alpha$  plays an important role on hepatocytic apoptosis and liver injury in fulminant hepatic failure. The hepatocytic apoptosis induced by TNF- $\alpha$  is correlated with the expression of Fas.

Wang YM, Feng GH, Huang F, Shi LL, Li Y, Wang ZY. Relationship between hepatocytic apoptosis and Fas expression in mouse fulminant hepatic failure. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(5):1077-1080

## 摘要

**目的:** 研究 Fas 表达及肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 在暴发性肝衰竭 (fulminant hepatic failure, FHF) 中与肝细胞凋亡的关系。

**方法:** 采用脂多糖 (LPS) 和 D-氨基半乳糖 (D-GalN) 联合用药制备 FHF 小鼠模型; 采用免疫组化方法检测肝组织 Fas 表达, 分别采用 ELISA 方法和 RT-PCR 法检测血清 TNF- $\alpha$  水平及肝组织 TNF- $\alpha$  mRNA 表达; 采用肝组织 DNA 琼脂糖凝胶电泳和 TUNEL 法检测肝细胞凋亡; 在用药后 2, 4, 8, 12 h 的不同时期动态观察 Fas 表达、血清 TNF- $\alpha$  水平及肝组织 TNF- $\alpha$  mRNA 表达及肝细胞凋亡的变化, 并对模型鼠给予 TNF- $\alpha$  mAb, 动态观察上述指标的变化。

**结果:** 在 FHF 模型小鼠中, 用药后 2 h 开始 Fas 有少量表达, 至 8 h 和 12 h 表达均很多, 二者比较无显著差异, 与 2 h 组比较  $P < 0.01$ , 与 4 h 组比较  $P < 0.05$ 。用药后 2-4 h 肝组织 TNF- $\alpha$  mRNA 表达显著增加 ( $0.91 \pm 0.75$ , 正常值为  $0.32 \pm 0.10$ ), 伴血清 TNF- $\alpha$  水平升高 ( $320 \pm 87$  ng/L, 正常值为  $17 \pm 7$  ng/L), 8 h 可出现典型的肝细胞凋亡表现, 血清 ALT 和 TBil 水平显著增加 (分别为  $9\ 352 \pm 1\ 000$  nkat/L 和  $163.7 \pm 34.5$   $\mu$ mol/L, 正常值分别为  $393 \pm 134$  nkat/L 和  $14.9 \pm 4.8$   $\mu$ mol/L), 12 h 肝细胞坏死和凋亡同时存在, 血清 ALT 和 TBil 水平达最高峰 (分别为  $11\ 141 \pm 1\ 312$  nkat/L 和  $203.2 \pm 19.9$   $\mu$ mol/L)。给予 TNF- $\alpha$  mAb 后 LPS/D-GalN 介导的肝细胞凋亡和损伤被阻断, Fas 表达亦被阻断。

**结论:** 在 FHF 中, TNF- $\alpha$  对肝细胞凋亡及肝损伤起重要的作用, 肝细胞凋亡的发生与 Fas 的表达增加有关。

王玉梅, 冯国和, 黄芬, 石理兰, 李颖, 王占英. 鼠暴发性肝衰竭中 Fas 表达与肝细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1077-1080

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1077.asp>

## 0 引言

近年研究发现,暴发性肝衰竭(fulminant hepatic failure, FHF)中肝细胞凋亡与坏死密切相关,是肝细胞坏死的早期过程.在肝脏疾病中,肝细胞的凋亡主要是通过 Fas/FasL 途径介导所致<sup>[12, 18-20]</sup>,但在 FHF 动物模型中对 Fas 表达与肝细胞凋亡关系的研究却很少见,我们对 FHF 模型鼠肝细胞凋亡、肝组织 Fas 及 TNF- $\alpha$  表达的检测,探讨在暴发性肝衰竭(fulminant hepatic failure, FHF)中肝组织 Fas 及 TNF- $\alpha$  表达与肝细胞凋亡的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** LPS 购自 Sigma 公司, D-GalN 购自重庆医科大学,抗 TNF- $\alpha$  IgG1(Endogen 公司产品)、TNF- $\alpha$  酶标试剂盒(Golden bridge 公司产品)购自深圳晶美生物公司, ALT 试剂盒购自上海复星长征医学科学有限公司, TBil 试剂盒购自日本纺绩株式会社, TNF- $\alpha$  mRNA 引物购自北京奥科生物公司, cDNA 合成试剂盒购自宝生物工程有限公司(TaKaRa 产品), TUNEL 试剂盒及 Fas 免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物公司. 雄性昆明小鼠(中国医科大学附属二院动物实验室提供) 76 只, 清洁级, 质量 20-25 g, 随机分成 12 组, 取 4 组(每组 7 只)给予 LPS 10  $\mu$ g/kg sc, D-GalN 800 mg/kg ip, 另取 4 组(每组 7 只)除注射 LPS 和 D-GalN 外, 同时 sc 抗 TNF- $\alpha$  IgG1 mAb 100  $\mu$ g, 余 4 组动物(每组 5 只)注射同样体积的生理盐水, 对上述小鼠分别于注药后 2, 4, 8, 12 h 处死, 每个时间点为 1 组动物, 留取血清及肝脏标本, 将血清于 -20  $^{\circ}$ C 冻存待检, 肝组织一部分于 40 g/L 中性甲醛固定, 一部分于 -80  $^{\circ}$ C 冻存待检. 注射 LPS+D-GalN 后 2, 4, 8, 12 h 分别编号为 A1, A2, A3, A4 组, 注射生理盐水后 2, 4, 8, 12 h 分别编号为 B1, B2, B3, B4 组, 注射 LPS+D-GalN+抗 TNF- $\alpha$  IgG1 单抗后 2, 4, 8, 12 h 分别编号为 C1, C2, C3, C4 组.

**1.2 方法** 于日立 7170 全自动生化分析仪进行血清 ALT, TBil 水平检测. TNF- $\alpha$  水平检测按试剂盒说明书进行, 抗原抗体反应后显色, 在酶标仪 492 nm 处读取 A 值, 并以标准曲线为标准计算样品的含量. TNF- $\alpha$  mRNA 的相对含量的检测采用异硫氰酸胍-酚-氯仿方法, 提取肝组织内 RNA, 采用 TNF- $\alpha$ -2(antisense primer), 在 30-65  $^{\circ}$ C, 35 min 条件下逆转录合成 TNF- $\alpha$  mRNA cDNA 后进行 PCR 反应, 引物序列如下: TNF- $\alpha$ -1 5' - ACCAGAGCGGCAAGAAGAACCAT-3' (sense primer); TNF- $\alpha$ -2 5' - CATCAGACATCGGAGGCAGGAAG-3' anti-sense primer(产物长 329 bp), 同时设内参照, 引物序列:  $\beta$ -ctin-1 5' - TGTATGCCTCTGGTCGTACCAC-3' (sense primer);  $\beta$ -ctin-2 5' - ACAGAGTACTTGCCTCA GGAG-3' (anti-sense primer)(产物长 592 bp). PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 变性 3 min, 然后 94  $^{\circ}$ C 30 s, 57  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min 进行 32 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 将 PCR

产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 用 Kodak 1D 型凝胶成像分析系统分析检测各扩增带的产物含量, 用下列公式表示: TNF- $\alpha$  mRNA 的相对含量 = TNF- $\alpha$  mRNA/ $\beta$  actin $\times$ 100. Fas 免疫组化检测按试剂盒说明书进行, 对石蜡包埋的肝组织切片进行抗原抗体反应后 DAB 显色, 染色后细胞质呈棕褐色染色的为阳性细胞, 细胞质无棕褐色染色的为阴性细胞. 阳性细胞记数分 3 级: 低倍镜视野阳性细胞数小于 1/3 为(+), 1/3-2/3 为(++), 大于 2/3 为(+++). 采用酚-氯仿提取肝组织 DNA, 于 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳(100 V, 1.5 h)观察 DNA 梯形带的变化. 缺口原位末端标记技术按试剂盒说明书进行检测, 对石蜡包埋的肝组织切片进行缺口原位末端标记后 DAB 显色, 染色后细胞核呈棕褐色染色的为阳性细胞, 细胞核无棕褐色染色的为阴性细胞. 阳性细胞记数分 3 级: 低倍镜视野阳性细胞数小于 1/3 为(+), 1/3-2/3 为(++), 大于 2/3 为(+++). 肝组织石蜡切片用 HE 染色于光镜下观察肝组织学变化.

统计学处理 采用 mean $\pm$ SD 表示血清 ALT, TBil, TNF- $\alpha$  水平及 TNF- $\alpha$  mRNA 相对含量, 使用 SAS 软件包作方差分析, 并进行两两比较, 采用  $\chi^2$  检验进行 Fas 阳性表达率及 TUNEL 法检测肝细胞凋亡的比较.

## 2 结果

**2.1 血清 ALT, TBil, TNF- $\alpha$  和肝组织 TNF- $\alpha$  mRNA 表达与对照组相比, 应用 LPS+D-GalN 后 2, 4, 8 h 血清 TNF- $\alpha$  水平、肝组织 TNF- $\alpha$  mRNA 的相对含量及阳性表达率均显著升高(P < 0.01), 其中, 尤以 2 h 组升高最为显著, 以后逐渐下降. 从 LPS+D-GalN 应用后 4 h 开始, ALT, TBil 明显升高, 与各时间点对照组相比有显著差异(P < 0.01), 其中 8, 12 h 升高更明显, 与 4 h 组相比 P < 0.01. 阻断 TNF- $\alpha$  后各时间点 ALT, TBil 水平均降至正常. 经阻断 TNF- $\alpha$  后, 血清 TNF- $\alpha$  水平及肝组织 TNF- $\alpha$  mRNA 的相对含量及阳性表达率均降至正常水平(表 1).**

表 1 鼠血清 ALT, TBil 和 TNF- $\alpha$  水平变化及肝组织 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的变化(mean $\pm$ SD)

分组	ALT(nkat/L)	TBil( $\mu$ mol/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	TNF- $\alpha$ mRNA 相对含量
A1	624 $\pm$ 67	15.8 $\pm$ 3.0	320 $\pm$ 87 <sup>b</sup>	0.91 $\pm$ 0.75 <sup>b</sup>
A2	1 238 $\pm$ 180 <sup>a</sup>	38.9 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	282 $\pm$ 53 <sup>b</sup>	0.82 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
A3	9 352 $\pm$ 1 000 <sup>b</sup>	163.7 $\pm$ 34.5 <sup>b</sup>	145 $\pm$ 29 <sup>b</sup>	0.70 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
A4	11 140 $\pm$ 1 312 <sup>bc</sup>	203.2 $\pm$ 19.9 <sup>bc</sup>	70 $\pm$ 17 <sup>bc</sup>	0.44 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>
B1	386 $\pm$ 136	13.3 $\pm$ 6.3	17 $\pm$ 7	0.32 $\pm$ 0.10
B2	401 $\pm$ 154	13.8 $\pm$ 4.7	16 $\pm$ 6	0.30 $\pm$ 0.11
B3	393 $\pm$ 134	14.9 $\pm$ 4.8	17 $\pm$ 4	0.31 $\pm$ 0.10
B4	381 $\pm$ 120 <sup><math>\Delta</math></sup>	15.1 $\pm$ 6.6 <sup><math>\Delta</math></sup>	17 $\pm$ 5 <sup><math>\Delta</math></sup>	0.30 $\pm$ 0.09 <sup><math>\Delta</math></sup>
C1	523 $\pm$ 122	13.5 $\pm$ 4.0	17 $\pm$ 4	0.33 $\pm$ 0.09
C2	558 $\pm$ 115	12.5 $\pm$ 4.36	17 $\pm$ 5	0.32 $\pm$ 0.08
C3	416 $\pm$ 191	12.7 $\pm$ 4.5	17 $\pm$ 5	0.34 $\pm$ 0.08
C4	429 $\pm$ 152	13.0 $\pm$ 4.3	17 $\pm$ 5	0.33 $\pm$ 0.09

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, vs 对照组; <sup>c</sup>P < 0.05, vs B4, C4.



**2.2 肝细胞凋亡的检测结果** LPS+D-GaIN 应用后 8 h 可见典型的 DNA 梯形带, LPS+D-GaIN 应用后 12 h 则出现坏死带, 其余时间点均无 DNA 梯形带或坏死带的出现, 经阻断 TNF- $\alpha$  后, 各时间点均无 DNA 梯形带或坏死带的出现(图 1). 肝组织 TUNEL 检测结果显示, LPS+D-GaIN 应用后 2 h, 肝组织可出现少量阳性细胞, 4 h 时阳性细胞有所增加, 8 h 时阳性细胞明显增加, 12 h 时亦存在凋亡细胞, 且肝组织出现明显的坏死表现. 经阻断 TNF- $\alpha$  后, 各时间点阳性细胞均显著减少(图 2).

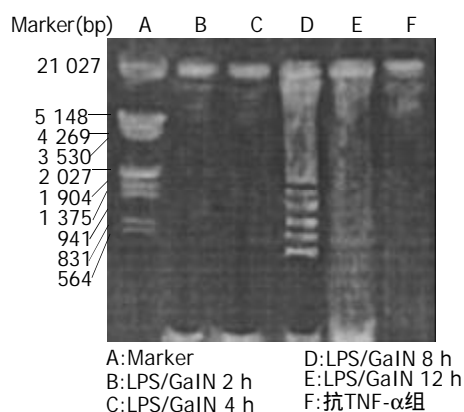


图 1 鼠肝组织 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果.

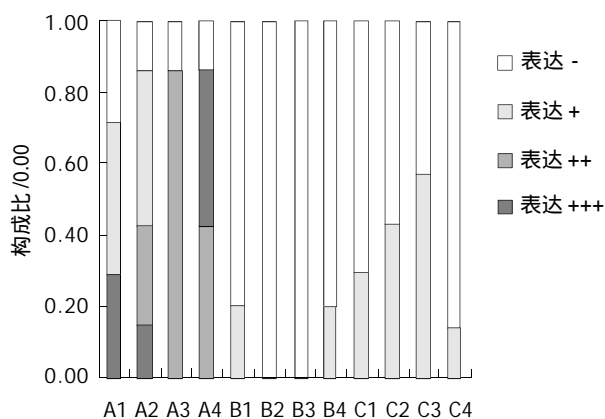


图 2 鼠肝组织 TUNEL 检测结果.

**2.3 肝组织 Fas 表达的检测结果** 在 LPS+D-GaIN 应用后 2 h Fas 有少量表达, 4 h 表达较多, 8 h 和 12 h 时表达均很多, 8 h 和 12 h 组比较无显著差异, 与 2 h 组比较  $P < 0.01$ , 与 4 h 组比较  $P < 0.05$ . 阻断 TNF- $\alpha$  后 Fas 表达显著减少, 与未阻断前 12, 8 h 比较  $P < 0.01$ , 与 4 h 组比较  $P < 0.05$ (表 2).

**2.4 肝组织学改变** LPS+D-GaIN 应用后 2 h 组肝组织基本上无异常所见, 4 h 组可见肝细胞胞质疏松化, 呈气球样变, 并可见散在的嗜酸变性, 8 h 组可见点片状肝细胞坏死, 其中有较多的嗜酸变性和坏死, 12 h 组则见肝细胞呈大片坏死, 核碎裂或溶解, 呈现大块状出血坏死. LPS+D-GaIN+ 抗-TNF- $\alpha$  组肝组织 HE 染色基本上无异常所见.

表 2 鼠肝组织 Fas 检测结果 % (n/n)

分组	表达(+++)	表达(++)	表达(+)	表达(-)
A1	0	0.14 (1/7)	0.43 (3/7)	0.43 (3/7) <sup>bd</sup>
A2	0.14 (1/7)	0.14 (1/7)	0.57 (4/7)	0.14 (1/7) <sup>bd</sup>
A3	0.86 (6/7)	0.14 (1/7)	0	0 <sup>b</sup>
A4	0.57 (4/7)	0.29 (2/7)	0.14 (1/7)	0 <sup>b</sup>
B1	0	0	0.20 (1/5)	0.80 (4/5)
B2	0	0	0.20 (1/5)	0.80 (4/5)
B3	0	0	0	1.00 (5/5)
B4	0	0	0	1.00 (5/5)
C1	0	0	0.43 (3/7)	0.57 (4/7)
C2	0	0	0.43 (3/7)	0.57 (4/7) <sup>e</sup>
C3	0	0	0.57 (4/7)	0.43 (3/7) <sup>d</sup>
C4	0	0	0.29 (2/7)	0.71 (5/7) <sup>f</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01, vs 对照组; <sup>d</sup>P < 0.01, vs A3; <sup>e</sup>P < 0.05, vs A2; <sup>f</sup>P < 0.01, vs A4.

### 3 讨论

暴发性肝衰竭是病毒性肝炎和许多肝病死亡的主要原因, 死亡率高达 70% 以上, 其发病机制复杂, 至今尚未完全阐明. 许多学者采用多种方法进行不同种动物 FHF 的体内和体外实验<sup>[1-7]</sup>, 对其发病机制及治疗等方面进行研究, 取得了一定的进展. 我们应用 LPS10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  + D-GaIN 800  $\text{mg}/\text{kg}$  联合用药建立 FHF 小鼠模型, 从动物的临床表现、生化检查和肝脏病理学检查所示的各种变化均符合 FHF, 与既往的研究一致<sup>[3, 8-9]</sup>. TNF- $\alpha$  对肝脏具有明显的损伤, 可引起肝细胞坏死<sup>[10]</sup>, 近年研究还发现, TNF- $\alpha$  可通过诱导肝细胞凋亡参与肝脏疾病的发病过程, Leist et al 的研究表明, 同时给小鼠注射 LPS 和 D-GaIN, 早期可出现肝细胞凋亡的病理及生化改变, 表明在 LPS+D-GaIN 的 FHF 模型中, LPS 的毒性作用实际上是体现为严重的凋亡性肝损伤和完全的破坏, TNF- $\alpha$  是 LPS 诱导肝细胞凋亡的重要递质. 已证实细胞内蛋白激酶的激活是 TNF- $\alpha$  诱导细胞凋亡的一种早期过程, 在 TNF- $\alpha$  诱导肝衰竭的实验研究中肝细胞凋亡与肝细胞坏死有着非常密切的联系<sup>[1-2, 10-17]</sup>. 本结果表明, 给予 LPS 和 D-GaIN 后 2 h TNF- $\alpha$  产生最多, 以后逐渐下降, 至 12 h 时降至正常, 且肝功及肝组织学变化显著, 于给药后 8 h 出现肝细胞凋亡, 12 h 出现肝细胞坏死, 给予 TNF- $\alpha$  mAb 后 TNF- $\alpha$  水平降至正常, 同时亦阻断了肝细胞凋亡及肝生化及组织学变化, 提示 TNF- $\alpha$  在 FHF 早期肝细胞凋亡的过程中起重要作用. Fas/Apo-1 系统与其 mAb 结合后  $\text{Ca}^{2+}$  内流, 胞质内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高可直接激活依赖  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  内源性核酸酶从而导致 DNA 断裂, 染色质固缩而使细胞凋亡, 在肝脏疾病中, 肝细胞的凋亡主要是通过 Fas/FasL 途径介导所致<sup>[1, 5, 11-15, 18-20, 28-29]</sup>. 在病毒性肝病中, 肝细胞的死亡主要是通过 Fas 抗原介导的, 对暴发性肝衰竭模型小鼠腹腔内注射 Fas 受体的抗体可加重肝细胞

凋亡和肝功能衰竭,在重型肝炎、慢性肝病患者的肝细胞表面均有 Fas 抗原的表达<sup>[21-25]</sup>。本结果表明,在 LPS+GalN 用药后 Fas 表达增加,且其表达水平的变化与肝细胞凋亡的检测结果相一致,提示在此种 FHF 模型中肝细胞凋亡的发生与 Fas 的表达增加有关。caspase-3 的激活在肝细胞凋亡的发生中起重要的作用, Fas 系统参与 caspase-3 细胞凋亡作用的发挥,在 Fas 介导细胞凋亡的过程中, caspase-3 是其死亡信号途径下游的一个关键效应组分,他可被水解成活性酶形式,进而酶切 PARP,导致 DNA 片段化、细胞凋亡<sup>[27]</sup>。TNF- $\alpha$  能激活 caspase-3 蛋白酶活性并能诱发肝细胞凋亡<sup>[26-27, 30]</sup>。本研究结果表明,在 LPS+GalN 所致的 FHF 中, TNF- $\alpha$  水平及 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达均增加, Fas 的表达亦增加,伴有肝细胞凋亡的发生,进一步阻断 TNF- $\alpha$  的作用后 Fas 的表达及肝细胞凋亡均被阻断,提示在此种模型中 TNF- $\alpha$  促进肝细胞凋亡的作用与 Fas 的表达增加有关。

#### 4 参考文献

- Xia M, Xu C, Ji S, Xue S. Shedding of Fas ectodomain that affects apoptosis of hepatocytes occurring in regenerative liver. *J Gastroenterol* 2002;37:1042-1047
- Matsuki Y, Li L, Hsu HC, Yang PA, Zheng R, Edwards CK 3rd, Chaudry IH, Zhang HG, Mountz JD. Soluble Fas gene therapy protects against Fas-mediated apoptosis of hepatocytes but not the lethal effects of Fas-induced TNF- $\alpha$  production by Kupffer cells. *Cell Death Differ* 2002;9:626-635
- Nagaki M, Naiki T, Brenner DA, Osawa Y, Imose M, Hayashi H, Banno Y, Nakashima S, Moriwaki H. Tumor necrosis factor alpha prevents tumor necrosis factor receptor-mediated mouse hepatocyte apoptosis, but not fas-mediated apoptosis: role of nuclear factor-kappaB. *Hepatology* 2000;32:1272-1279
- Imose M, Nagaki M, Naiki T, Osawa Y, Brenner DA, Asano T, Hayashi H, Kato T, Moriwaki H. Inhibition of nuclear factor kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt is essential for massive hepatocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha in mice. *Liver Int* 2003;23:386-396
- Jodo S, Kung JT, Xiao S, Chan DV, Kobayashi S, Tateno M, Lafyatis R, Ju ST. Anti-CD95-induced lethality requires radioresistant Fcgamma RII+ cells. A novel mechanism for fulminant hepatic failure. *J Biol Chem* 2003;278:7553-7557
- Galun E, Axelrod JH. The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:345-358
- Poussin D, Malassagne B, Tran Van Nhieu J, Trebeden H, Guery L, Chereau C, Soubrane O, Calmus Y, Weill B, Batteux F. Biliary administration of naked DNA encoding Fas-Fc protein prevents acute liver failure in mice. *Hum Gene Ther* 2002;13:901-908
- Arvelo MB, Cooper JT, Longo C, Daniel S, Grey ST, Mahiou J, Czismadia E, Abu-Jawdeh G, Ferran C. A20 protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide acute toxic lethal hepatitis. *Hepatology* 2002;35:535-543
- Nakama T, Hirono S, Moriuchi A, Hasuiki S, Nagata K, Hori T, Ido A, Hayashi K, Tsubouchi H. Etoposide prevents apoptosis in mouse liver with D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality. *Hepatology* 2001;33:1441-1450
- Hatano E, Bradham CA, Stark A, Iimuro Y, Lemasters JJ, Brenner DA. The mitochondrial permeability transition augments Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes. *J Biol Chem* 2000;275:11814-11823
- Ku NO, Soetikno RM, Omary MB. Keratin mutation in transgenic mice predisposes to Fas but not TNF-induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology* 2003;37:1006-1014
- Bajt ML, Vonderfecht SL, Jaeschke H. Differential protection with inhibitors of caspase-8 and caspase-3 in murine models of tumor necrosis factor and Fas receptor-mediated hepatocellular apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;175:243-252
- Osawa Y, Banno Y, Nagaki M, Brenner DA, Naiki T, Nozawa Y, Nakashima S, Moriwaki H. TNF- $\alpha$ -induced sphingosine 1-phosphate inhibits apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human hepatocytes. *J Immunol* 2001;167:173-180
- Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Yamada Y, Imose M, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S. Possible involvement of reactive oxygen species in D-galactosamine-induced sensitization against tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced hepatocyte apoptosis. *J Cell Physiol* 2001;187:374-385
- Hatano E, Bennett BL, Manning AM, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. NF-kappaB stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF- $\alpha$ -and Fas-mediated apoptosis. *Gastroenterology* 2001;120:1251-1262
- Mundt B, Kuhnel F, Zender L, Paul Y, Tillmann H, Trautwein C, Manns MP, Kubicka S. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J* 2003;17:94-96
- Zhang G, Zhou X, Wang C, Yao M, Yu H, Xie Q. mRNA and protein expression of Fas associated death domain protein in apoptotic hepatocyte induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:10-12
- Matsui H, Hikichi Y, Tsuji I, Yamada T, Shintani Y. LIGHT, a member of the tumor necrosis factor ligand superfamily, prevents tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated human primary hepatocyte apoptosis, but not Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:50054-50061
- Murohisa G, Kobayashi Y, Kawasaki T, Nakamura S, Nakamura H. Involvement of platelet-activating factor in hepatic apoptosis and necrosis in chronic ethanol-fed rats given endotoxin. *Liver* 2002;22:394-403
- Reinehr R, Graf D, Fischer R, Schliess F, Haussinger D. Hyperosmolarity triggers CD95 membrane trafficking and sensitizes rat hepatocytes toward CD95L-induced apoptosis. *Hepatology* 2002;36:602-614
- Kasahara I, Saitoh K, Nakamura K. Apoptosis in acute hepatic failure: histopathological study of human liver tissue using the tunel method and immunohistochemistry. *J Med Dent Sci* 2000;47:167-175
- Yang SH, Lee CG, Lee CW, Choi EJ, Yoon SK, Ahn KS, Sung YC. Hepatitis C virus core inhibits the Fas-mediated p38 mitogen activated kinase signaling pathway in hepatocytes. *Mol Cells* 2002;13:452-462
- McGregor AH, More LJ, Simpson KJ, Harrison DJ. Liver death and regeneration in paracetamol toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2003;22:221-227
- Rivero M, Crespo J, Fabrega E, Casafont F, Mayorga M, Gomez-Fleitas M, Pons-Romero F. Apoptosis mediated by the Fas system in the fulminant hepatitis by hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2002;9:107-113
- Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Lecoeur H, Gougeon ML, Kahn A, Buendia MA. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* 2002;21:377-386
- Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002;122:202-210
- Wang YM, Feng GH, Huang F, Li Y, Zhao GZ. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , caspase-3 expression and hepatocyte apoptosis in fulminant hepatic failure. *Zhonghua Neike Zazhi* 2003;42:566-570
- Zhao Y, Ding WX, Qian T, Watkins S, Lemasters JJ, Yin XM. Bid activates multiple mitochondrial apoptotic mechanisms in primary hepatocytes after death receptor engagement. *Gastroenterology* 2003;125:854-867
- Nakae H, Zheng YJ, Wada H, Tajimi K, Endo S. Involvement of IL-18 and soluble fas in patients with postoperative hepatic failure. *Eur Surg Res* 2003;35:61-66
- Schuchmann M, Varfolomeev EE, Hermann F, Rueckert F, Strand D, Koehler H, Strand S, Lohse AW, Wallach D, Galle PR. Dominant negative MORT1/FADD rescues mice from CD95 and TNF-induced liver failure. *Hepatology* 2003;37:129-135

# HBV PreS2S/Fc融合基因真核表达载体的构建及表达

陈红梅, 白雪帆, 黄长形, 李光玉, 洪 沙

陈红梅, 白雪帆, 黄长形, 李光玉, 洪沙, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染科 陕西省西安市 710038

陈红梅, 女, 1975-06-16 生, 山东省阳信县人, 汉族, 1998 年滨州医学院本科毕业, 1998-2004 年于第四军医大学攻读硕、博士学位. 主要从事乙型肝炎防治的研究.

项目负责人: 陈红梅, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染科.

电话: 029-87259845

收稿日期: 2003-11-26 接受日期: 2004-01-08

## Construction and expression of eukaryotic vector bearing fusion gene of HBV PreS2S and Fc fragment

Hong-Mei Chen, Xue-Fan Bai, Chang-Xing Huang, Gang-Yu Li, Sha Hong

Hong-Mei Chen, Xue-Fan Bai, Chang-Xing Huang, Gang-Yu Li, Sha Hong, Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Hong-Mei Chen, Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China.

Received: 2003-11-26 Accepted: 2004-01-08

## Abstract

**AIM:** To construct and express a recombinant eukaryotic expression vector bearing fusion gene of HBV S2S and Fc fragment.

**METHODS:** The technique of splicing by overlapping extension and twice PCR were used, and fusion gene fragment was obtained and cloned into pGEM-T Easy TA cloning vector to get suited enzyme sites. Recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3 S2S/Fc was constructed by double adhesive terminal ligation. Then the recombinant vector was transferred into SP2/0 cells by using Lipofectamine.

**RESULTS:** The recombinant vector was identified by digestion with restriction enzymes and confirmed by DNA sequencing analysis. And the vector bearing fusion gene could be expressed in eukaryotic cells detected by indirect immunofluorescence technique.

**CONCLUSION:** The relative efficient expression of the fusion gene in SP2/0 cells may provide an experimental basis for specific immunotherapy for HBV infection.

Chen HM, Bai XF, Huang CX, Li GY, Hong S. Construction and expression of eukaryotic vector bearing fusion gene of HBV PreS2S and Fc fragment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1081-1084

## 摘要

**目的:** 构建含 HBV PreS2S 和 Fc 融合基因的真核表达载体 pcDNA3 S2S/Fc 并在真核细胞中进行表达.

**方法:** 应用重叠延伸剪切技术(splicing by overlapping extension, 简称 SOE)经两次 PCR 获得嵌合基因片段 S2S/Fc, 回收后克隆到 pGEM-T Easy TA 克隆载体, 获得合适的酶切位点, 再采用双粘端连接法转克隆入真核表达载体 pcDNA3 中, 得到真核重组载体 pcDNA3 S2S/Fc. 然后用脂质体法转染 SP2/0 细胞.

**结果:** 对重组载体进行了限制性酶切鉴定及测序分析, 证明连接正确; 经间接免疫荧光检测证实该重组载体能在真核细胞中表达插入的外源性基因编码的融合蛋白.

**结论:** 真核表达载体 pcDNA3 S2S/Fc 的成功构建及在 SP2/0 细胞中的有效表达, 为进一步探讨 HBV 感染的特异性免疫治疗提供了实验依据.

陈红梅, 白雪帆, 黄长形, 李光玉, 洪沙. HBV PreS2S/Fc 融合基因真核表达载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1081-1084

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1081.asp>

## 0 引言

乙型病毒性肝炎是一种发病率高、严重危害人类健康的传染病<sup>[1-10]</sup>. 25% 的慢性乙肝患者可发展为肝硬化和肝癌<sup>[11-15]</sup>, 至今尚无一种真正有效的治疗药物<sup>[16]</sup>. 目前, 基因免疫在流感、艾滋病、乙丙型肝炎<sup>[17-18]</sup>等感染性疾病的治疗研究中呈现出广阔的应用前景. 体内外实验表明基因疫苗可以同时诱导针对病原的体液和细胞免疫反应. 已知乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝 DNA 病毒, 其包膜蛋白由 HBsAg, preS1Ag 和 preS2Ag 组成, 中和表位位于 S 区. preS1Ag 和 preS2Ag 也均含有 T 细胞和 B 细胞表位, 可增强 S 抗原的免疫原性<sup>[19]</sup>. 而免疫球蛋白的 Fc 片段可以通过受体途径提高抗原的提呈效率<sup>[20]</sup>. 因此, 我们采用分子克隆技术, 将 HBV preS2+S 基因与 Fc 基因重组成融合基因, 构建了真核表达载体 pcDNA3 S2S/Fc, 以期通过表达的融合蛋白发挥二者的协同作用, 增强基因疫苗诱导的免疫反应.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 含有人 Fc 片段编码基因的 pCMVsFc 质粒由陈思毅教授(*J Immunol* 2000;165(8):4581-91)惠赠. 含 HBV 全基因的质粒 p1.2 II 载体质粒 pcDNA3 及 SP2/0 细胞由本室保存. 高保真 polybest DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司. 各种限制性内切酶, Taq DNA 聚合酶, Wizard<sup>TM</sup> PCR Preps DNA Purification System 和 pGEM-T Easy Vector

Systems 均购自Promega 公司. 小提质粒试剂盒购自华舜公司. 脂质体转染试剂盒Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 Reagent 购自GIBCO 公司. 人抗HBsAg购自上海生物制品研究所, 小鼠抗人Fc为第四军医大学免疫学教研室产品. FITC标记山羊抗鼠IgG、兔抗人IgG均为北京中山生物技术有限公司进口分装试剂. 胰蛋白酶、酵母提取物为英国Oxford 产品. 其余生化试剂均为常规分析纯的进口或国产试剂. RPMI1640和DMEM培养基, 均购自GIBCO 公司. 胎牛血清购自杭州四季青生物制品公司.

**1.2 方法** 真核表达载体pcDNA3 S2S/Fc的构建参照文献(J Exp Med 1992;175:495-502), 用重叠延伸剪接术(splicing by overlap extention, SOE)经两次PCR 获得嵌和基因片段S2S/Fc, 回收后, 克隆入pGEM-T Easy TA 克隆载体, 转化大肠杆菌JM109, 挑选阳性克隆酶切鉴定后, 酶切目的片段转克隆入真核表达载体pcDNA3中. 根据HBV-adr亚型中国株基因序列和Fc基因序列合成并纯化4条引物, 引物由上海基康和Takara 生物技术有限公司合成. 引物序列如下: 上游引物F: 5' -CGGAAGCTTA TGCAGTGGAA CTCCACAAC-3' 中间引物M1: 5' -GCATGTGTGA GTTTTAATGT ATACCCAAAG-3'; 中间引物M2: 5' -CTTTGGGTAT ACATTAAAAC TCACACATGC-3'; 下游引物R: 5' -TATTATCATT TACCCGGAGA CAG-3'. F为HBV preS2S基因的上游引物, 引入Hind III酶切位点; 中间引物M1和M2是完全互补的, 分别含HBV S基因C端15 bp (2 639 nt-2 653 nt)和Fc N端去掉起始码和信号肽后的15 bp, 共30 bp的序列; R为Fc片段的下游引物. 第1次PCR, 以质粒p1.2 II为模板, 用引物F和M1扩增HBV preS2S基因片段(约850 bp). 以质粒pCMVsFc为模板, 用引物M2和R扩增Fc基因片段(634 bp). 反应条件: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性45 s, 55 °C退火45 s, 72 °C延伸45 s, 35个循环, 最后72 °C延伸10 min. 用10 g/L琼脂糖凝胶电泳分离上述PCR产物后, 以Wizard<sup>TM</sup> PCR Preps DNA Purification System回收产物. 第2次PCR, 以第1次PCR产物为模板, 各取100 ng, 用引物F和R扩增, 获得基因片段S2S/Fc. 反应条件: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性45 s, 58 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 35个循环, 最后72 °C延伸30 min. 回收第2次PCR产物. 目的片段S2S/Fc与pGEM-T Easy TA克隆载体的连接, 按操作说明书进行. 挑取单克隆菌落于3 mL+Amp的LB培养基中, 震荡过夜, 用小提质粒试剂盒提取质粒. 分别用Eco R I进行单、双酶切鉴定插入片段的大小. 将目的片段转克隆入真核表达载体pcDNA3中, 用Hind III和EcoR I双酶切pGEM-T EasyS2S/Fc质粒和载体pcDNA3, 得到目的片段和线形载体, 采用双粘端连接法连接, 转化新鲜的感受态菌JM109. 挑取单克隆菌落于3 mL+Amp的LB培养基中, 震荡过夜, 用小提质粒试剂盒提取质粒. 分别用Hind III和EcoR I+Hind III进行单、双酶切鉴定. 并送上海生

物工程有限公司测序.

**1.2.1 pcDNA3 S2S/Fc在SP2/0细胞中的瞬时表达** 用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基, 于37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>孵箱中培养. 用小提质粒试剂盒提取质粒. 重组质粒的转染用脂质体介导转染法进行. 按照脂质体转染试剂盒LIPOFECTAMINE<sup>TM</sup>2000 Reagent的操作说明书, (1)将SP2/0细胞接种于25 mL培养瓶内; (2)培养18-24 h, 使处于对数生长期的细胞达90-95%融和; (3)无菌Ep管中制备, 10 µg DNA溶于100 µL无血清、无抗生素的DMEM中; 15 µL Lipofectamine溶于85 µL无血清、无抗生素的DMEM中. 将此两溶液在5 min内混合; (4)用无血清、无抗生素的DMEM洗涤细胞2次. 加入1.8 mL无血清、无抗生素的DMEM; (5)将Lipofectamine+DNA混合物200 µL小心滴加至细胞上. (6)37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>孵箱中培养4-6 h后, 换为完全培养基继续培养; (7)转染48-72 h内检测重组质粒的表达. (8)同时设置一空白和空载体对照孔.

**1.2.2 用间接免疫荧光法检测抗原的表达** 参照实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术(四川科学技术出版社, 1994), (1)将转染细胞悬液滴加至用多聚赖氨酸预处理的载玻片上, 风干后, 置冷丙酮中固定10 min; (2)用pH 7.2的PBS冲洗5 min × 2次; (3)滴加含50 mL/L胎牛血清的PBS封闭30 min; (4)分别滴加未标记的第一抗体人抗HBsAg和鼠抗Fc(按1:50稀释)于固定细胞上, 置湿盒中37 °C作用1 h; (5)用PBS冲洗5 min × 3次; (6)分别滴加FITC标记的兔抗人和山羊抗鼠的第二抗体(按1:100稀释), 置37 °C湿盒中作用1 h; (7)用PBS冲洗5 min × 3次; (8)风干后, 用含500 mL/L甘油, 500 mL/L 0.01 mol/L, pH 7.2的PBS溶液封片, 荧光显微镜下观察.

## 2 结果

**2.1 pcDNA3 S2S/Fc重组体的鉴定** 重组质粒分别经Hind III和Hind III +EcoR I单双酶切, 可见与理论结果一致的6.8 kb, 5.4 kb和1.4 kb的电泳条带(图1), 测序确证.

**2.2 融合基因S2S/Fc在真核细胞中的瞬时表达** 用间接免疫荧光法, 在荧光显微镜下观察到了融合抗原的表达(图2).

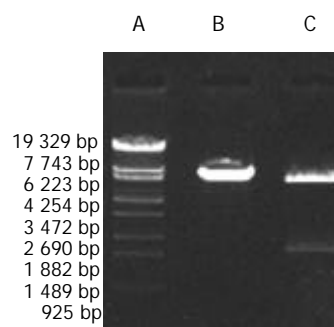


图1 重组质粒pcDNA3 S2S/Fc测序. A: λ -EcoT14I digest marker; B: pcDNA3 S2S/Fc digested by Hind III; C: pcDNA3 S2S/Fc digested by Hind III +EcoRI.

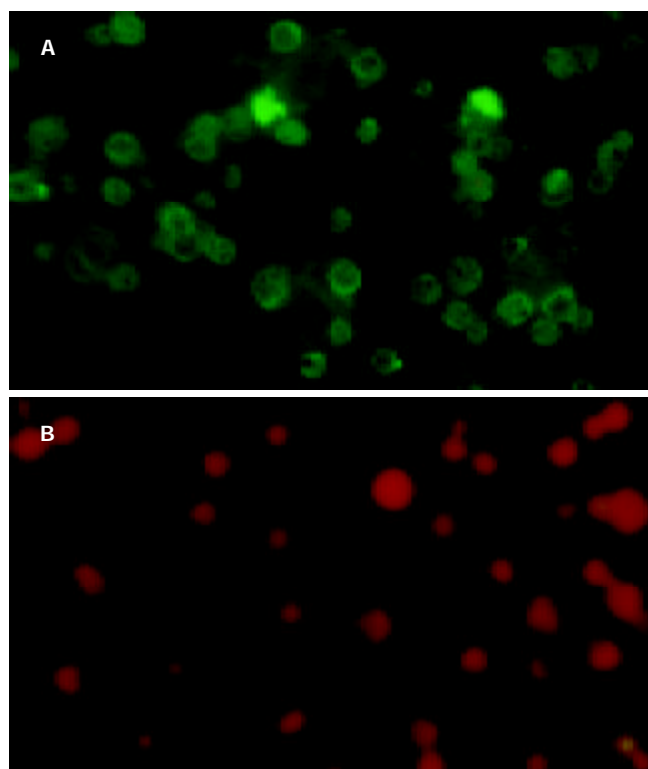


图2 重组质粒pcDNA3 S2S/Fc转染SP2/0细胞融合蛋白的表达. A: 细胞膜阳性; B: 阴性对照.

### 3 讨论

HBV S基因含前S1, 前S2和HBsAg基因, 分别编码前S1, 前S2和HBsAg, 他们是HBV包膜的主要成分, 可诱导机体产生相应的抗体, 这些抗体能保护机体免受HBV的感染, 产生保护性免疫. 近年来研究表明, 在HBV感染过程中, 前S2可能起着非常重要的作用. 阻断前S2的作用将可能阻止HBV的感染. 研究表明, 含前S1, 前S2和HBsAg的第三代重组疫苗的免疫原性较强, 能诱导机体产生较高的抗-HBs水平和免疫保护能力<sup>[21]</sup>. 应用前S2/HIVgp120嵌合基因<sup>[22]</sup>和前S2/HCV嵌合基因<sup>[23]</sup>的DNA疫苗可诱导小鼠产生很强的抗-HIV和抗-HCV的体液和细胞免疫反应, 显示前S2可能是一种广谱的免疫佐剂.

DNA疫苗诱导免疫反应的效率相对较低, 尤其是对于大动物种系和人类, 这削弱了他们的实际应用. 尽管花费了相当大的努力来提高DNA疫苗的运输效率, 但在接种DNA疫苗后仅少量抗原能够表达发挥免疫功效. 目前应用的提高和调节DNA疫苗诱导的免疫反应补充策略之一是, 通过与细胞表面受体分子结合的抗原融合将DNA疫苗编码的抗原靶向导入到细胞表面. 通过与MHCII类分子结合将抗原靶向到APCs, 以增强靶向蛋白的免疫原性. 诱导对靶向蛋白的体液免疫反应的水平 and 反应的速度都能被极大的提高, 尤其是应用低剂量的抗原时<sup>[24-30]</sup>.

基于以上的研究策略, 我们成功构建了含HBV preS2S与Fc融合基因的真核表达载体pcDNA3 S2S/Fc, 并在SP2/0细胞中进行了有效的表达, 为进一步提高

HBV DNA的免疫效果创造了条件.

### 4 参考文献

- 1 Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2003;9:641-644
- 2 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 3 Hou CS, Wang GQ, Lu SL, Yue B, Li MR, Wang XY, Yu JW. Role of activation-induced cell death in pathogenesis of patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2356-2358
- 4 Wang RX, Boland G, Guo Y, Lei SP, Yang CH, Chen J, Tian J, Wen JY, Du KH, van Hattum J, de Gast GC. Is a low dose of hepatitis B vaccine enough for a rapid vaccination scheme? *World J Gastroenterol* 2003;9:2353-2355
- 5 Bai YJ, Zhao JR, Lv GT, Zhang WH, Wang Y, Yan XJ. Rapid and high throughput detection of HBV YMDD mutants with fluorescence polarization. *World J Gastroenterol* 2003;9:2344-2347
- 6 Gao PJ, Piao YF, Liu XD, Qu LK, Shi Y, Wang XC, Yang HY. Studies on specific interaction of beta-2-glycoprotein I with HBsAg. *World J Gastroenterol* 2003;9:2114-2116
- 7 Wang JY, Liu P. Abnormal immunity and gene mutation in patients with severe hepatitis-B. *World J Gastroenterol* 2003;9:2009-2011
- 8 Wang NS, Wu ZL, Zhang YE, Guo MY, Liao LT. Role of hepatitis B virus infection in pathogenesis of IgA nephropathy. *World J Gastroenterol* 2003;9:2004-2008
- 9 Li XM, Yang YB, Hou HY, Shi ZJ, Shen HM, Teng BQ, Li AM, Shi MF, Zou L. Interruption of HBV intrauterine transmission: a clinical study. *World J Gastroenterol* 2003;9:1501-1503
- 10 Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine in vivo. *World J Gastroenterol* 2001;7:49-52
- 11 Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- 12 Yang X, Tang XP, Lei JH, Luo HY, Zhang YH. A novel stop codon mutation in HBsAg gene identified in a hepatitis B virus strain associated with cryptogenic cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1516-1520
- 13 Shen LJ, Zhang HX, Zhang ZJ, Li JY, Chen MQ, Yang WB, Huang R. Detection of HBV, PCNA and GST-pi in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9:459-462
- 14 Assy N, Paizi M, Gaitini D, Baruch Y, Spira G. Clinical implication of VEGF serum levels in cirrhotic patients with or without portal hypertension. *World J Gastroenterol* 1999;5:296-300
- 15 Han LH, Sun WS, Ma CH, Zhang LN, Liu SX, Zhang Q, Gao LF, Chen YH. Detection of soluble TRAIL in HBV infected patients and its clinical implications. *World J Gastroenterol* 2002;8:1077-1080
- 16 Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Li JQ, Wan MB, Li CZ, Chen CW, Fu QC, Wang JY, She WM, Cai X, Ye J, Zhou XQ, Wang H, Wu SM, Tang MF, Zhu JS, Chen WX, Zhang HQ. Oxymatrine therapy for chronic hepatitis B: a randomized double-blind and placebo-controlled multi-center trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:2480-2483
- 17 Maier I, Wu GY. Hepatitis C and HIV co-infection: a review. *World J Gastroenterol* 2002;8:577-579
- 18 Wang QC, Nie QH, Feng ZH. RNA interference: antiviral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9:1657-1661
- 19 Shi CH, Cao C, Khig JS, Li J, Ma QJ. Gene fusion of cholera toxin B subunit and HBV pre S2 epitope and the antigenicity of fusion protein. *Vaccine* 1995;13:933-937
- 20 You Z, Huang XF, Hester J, Rollins L, Rooney C, Chen SY. Induction of vigorous helper and cytotoxic T cell as well as B cell response by dendritic cells expressing a modified antigen



- targeting receptor-mediated internalization pathway. *J Immunol* 2000;165:4581-4592
- 21 Pride MW, Bailey CR, Muchmore E, Thanavala Y. Evaluation of B and T-cell responses in chimpanzees immunized with hepagene, a hepatitis B vaccine containing Pre-S1, Pre-S2 gene products. *Vaccine* 1998;16:543-550
- 22 Fomsgaard A, Nielsen HV, Bryder K, Nielsen C, Machuca R, Bruun L, Hansen J, Buus S. Improved humoral and cellular immune responses against the gp120 V3 loop of HIV-1 following genetic immunization with a chimeric DNA vaccine encoding the V3 inserted into the hepatitis B surface antigen. *Scand J Immunol* 1998;47:289-295
- 23 Major ME, Vitvitski L, Mink MA, Schleef M, Whalen RG, Trepo C, Inchauspe G. DNA-based immunization with chimeric vectors for the induction of immune responses against the hepatitis C virus nucleocapsid. *J Virol* 1995;69:5798-5805
- 24 Wang H, Griffiths MN, Burton DR, Ghazal P. Rapid antibody responses by low-dose, single-step, dendritic cell-targeted immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:847-852
- 25 Schjetne KW, Gundersen HT, Iversen JG, Thompson KM, Bogen B. Antibody-mediated delivery of antigen to chemokine receptors on antigen-presenting cells results in enhanced CD4+ T cell responses. *Eur J Immunol* 2003;33:3101-3108
- 26 Robson NC, Beacock-Sharp H, Donachie AM, Mowat AM. The role of antigen-presenting cells and interleukin-12 in the priming of antigen-specific CD4+ T cells by immune stimulating complexes. *Immunology* 2003;110:95-104
- 27 Creusot RJ, Thomsen LL, Tite JP, Chain BM. Local cooperation dominates over competition between CD4+ T cells of different antigen/MHC specificity. *J Immunol* 2003;171:240-246
- 28 Storni T, Bachmann MF. On the role of APC-activation for in vitro versus in vivo T cell priming. *Cell Immunol* 2003;225:1-11
- 29 Preynat-Seauve O, Coudurier S, Favier A, Marche PN, Villiers C. Oxidative stress impairs intracellular events involved in antigen processing and presentation to T cells. *Cell Stress Chaperones* 2003;8:162-171
- 30 Wauben MH, 't Hoen EN, Taams LS. Modulation of T cell responses after cross-talk between antigen presenting cells and T cells: a give-and-take relationship. *Novartis Found Symp* 2003;252:211-220

## World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高,质量较高的论文逐年增加,来自名牌大学、科研院所,特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《World Journal of Gastroenterology, WJG》共收到论文 618 篇,其中国内论文 501 篇(81.06%),国际论文 117 篇(18.93%). WJG 2003 年 1-10 期共发表论文 521 篇,其中文献综述 21 篇,食管癌 27 篇,胃癌 54 篇,肝癌 65 篇,大肠癌 39 篇,病毒性肝炎 46 篇,幽门螺杆菌 20 篇,基础研究 115 篇,临床研究 62 篇,研究快报 62 篇,病例报告 8 篇,读者来信 2 篇. 发表国内论文 450 篇(86.37%),发表国际论文 71 篇(13.62%). 作者共 2949 人,国际作者占 14.41%,国内作者占 85.90%. 发表论文分布 34 个国家和地区,包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文 292 篇(56.04%),各项目基金论文共 440 篇(84.45%),其中国际基金论文 25 篇(4.79%),国家 973、863、国家自然科学基金资助论文 180 篇(34.54%),部、省级基金资助论文 235 篇(45.10%). WJG 2002 年共发表论文 226 篇,分布为 26 个地区,国内论文占 93.36%,国际论文占 6.63%,基金论文占 60.61%. WJG 2001 年共发表论文 173 篇,分布 20 个地区,112 个机构,国际论文占 35%,基金论文占 55%. WJG 2000 年共发表论文 205 篇,基金论文占 50%. WJG 1999 年共发表论文 144 篇,分布 20 个地区,100 个机构,国际论文占 23%,基金论文占 50%. WJG 1998 年共发表论文 183 篇,11 个地区分布,国际论文占 9.84%,基金论文占 59.56%.

# 缬沙坦综合治疗慢性乙型肝炎和肝硬化的临床研究

宋怀宇, 王万忠, 朱菊人

宋怀宇, 广西壮族自治区人民医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021  
王万忠, 山东省立医院病理科 山东省济南市 250021  
朱菊人, 山东省立医院消化内科 山东省济南市 250021  
宋怀宇, 男, 1970-10-30 生, 福建省莆田市人, 汉族. 2002 年山东大学医学院博士, 主治医师, 主要从事慢性肝病的基础与临床研究, 已发表论文 16 篇.  
项目负责人: 宋怀宇, 530021, 广西壮族自治区南宁市桃源路 6 号, 广西壮族自治区人民医院消化内科. huaiyu\_song@sina.com  
电话: 0771-2186184  
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-02-01

## Therapeutic effect of valsartan on chronic type B hepatitis and liver cirrhosis

Huai-Yu Song, Wan-Zhong Wang, Ju-Ren Zhu

Huai-Yu Song, Department of Gastroenterology, The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Wan-Zhong Wang, Department of Pathology, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China  
Ju-Ren Zhu, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China  
Correspondence to: Huai-Yu Song, Department of Gastroenterology, The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China.  
Received: 2003-12-12 Accepted: 2004-02-01

## Abstract

**AIM:** To study the clinical effect of valsartan on chronic type B hepatitis and liver cirrhosis.

**METHODS:** A total of 54 patients with chronic type B hepatitis and liver cirrhosis were divided into therapy group and control group, and each group had 27 cases. The patients in the control group were treated with routine treatment, and those in the therapy group, besides routine treatment, were added with valsartan 80 mg/day, and the therapeutic period was one month. Before and after treatment, serum HA, LN, PCIII, IV-C were measured by radio-immunoassay in each group. The parameters of ALT, AST, TBIL, Alb, r-GT and AKP were obtained. In the therapy group, five patients' liver tissues were obtained by liver biopsy, and then stained by H-E staining before and after treatment.

**RESULTS:** In these two groups, the parameters of ALT, AST, r-GT, AKP, TBIL, HA, and IV-C were all improved remarkably ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ) after treatment. In the therapy group, the parameters of ALT ( $5.7 \pm 1.9$  ukat/L vs  $1.3 \pm 0.7$  ukat/L), AST ( $5.1 \pm 1.9$  ukat/L vs  $1.5 \pm 0.7$  ukat/L), HA ( $298 \pm 107$  ug/L vs  $159 \pm 92$  ug/L) and IV-C ( $102 \pm 24$  ug/L vs  $63 \pm 19$  ug/L) were all descended ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ,  $2.241 \leq t \leq 3.249$ ) before and after treated with valsartan. Compared with control group, especially in chronic hepatitis patients, these parameters were decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ,  $2.324 \leq t \leq 3.012$ ), the liver microcirculation was improved, the inflammatory infiltration in liver was relieved,

the liver tissue fibrosis was degraded, and the liver histology was remarkably improved.

**CONCLUSION:** As valsartan can effectively protect the liver cells, reverse the process of liver fibrosis, it is a feasible choice in the treatment of chronic hepatitis and liver cirrhosis.

Song HY, Wang WZ, Zhu JR. Therapeutic effect of valsartan on chronic type B hepatitis and liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(5):1085-1088

## 摘要

**目的:** 观察缬沙坦对慢性乙型肝炎(简称慢肝)和肝硬化患者的临床治疗效果, 并探讨其作用机制.

**方法:** 慢肝和肝硬化患者共 54 例分为对照组与治疗组, 每组各 27 例. 对照组给予常规治疗, 治疗组在常规治疗的基础上加用缬沙坦 80 mg/d, 疗程 1 mo. 两组患者于治疗前后抽血测肝功能、血清肝纤维化指标透明质酸(HA), 层粘连蛋白(LN), IV 型胶原(IV-C), III 型前胶原(PCIII)等以了解治疗前后肝功能、肝纤维化指标的变化. 治疗组中有 5 例患者于治疗前后行肝穿刺对照检查.

**结果:** 两组患者治疗后 ALT, AST, r-GT, AKP, TBIL 以及血清肝纤维化指标 HA, IV-C 均较治疗前明显好转 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ). 治疗组经缬沙坦治疗后, 与治疗前相比, ALT ( $5.7 \pm 1.9$  ukat/L vs  $1.3 \pm 0.7$  ukat/L), AST ( $5.1 \pm 1.9$  ukat/L vs  $1.5 \pm 0.7$  ukat/L), HA ( $298 \pm 107$  ug/L vs  $159 \pm 92$  ug/L), IV-C ( $102 \pm 24$  ug/L vs  $63 \pm 19$  ug/L) 等指标明显降低 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ,  $2.241 \leq t \leq 3.249$ ), 与对照组相比, 在慢性肝炎患者, 上述指标改善更为明显 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ,  $2.324 \leq t \leq 3.012$ ). 经缬沙坦治疗后, 肝脏微循环改善, 肝细胞炎症浸润程度减轻, 纤维化程度分级降低, 肝组织 G-S 分期与治疗前相比有一定程度的好转.

**结论:** 缬沙坦综合治疗慢肝、肝硬化患者能够发挥一定的保护肝细胞, 改善肝微循环, 逆转肝纤维化的作用.

宋怀宇, 王万忠, 朱菊人. 缬沙坦综合治疗慢性乙型肝炎和肝硬化的临床研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1085-1088

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1085.asp>

## 0 引言

慢性肝炎和肝硬化在我国常见<sup>[1-8]</sup>, 多由 HBV, HCV 感染引起<sup>[9-18]</sup>, 在其发生、发展过程中常伴有肾素 -

血管紧张素系统(RAS)的异常激活, 并且对慢肝患者病情的发展产生重要的影响. 我们探讨血管紧张素 II 型受体拮抗剂缬沙坦(商品名: 代文, 瑞士诺华公司出品, 80 mg/片)治疗慢肝和肝硬化患者的临床效果.

## 1 材料方法

1.1 材料 诊断明确的慢性乙型肝炎和肝硬化代偿期患者, 符合中华医学会传染病与寄生虫分会, 肝病学会 2000 年修订的诊断标准<sup>[19]</sup>, 共 54 例患者. 男 31 例, 女 23 例, 平均年龄 45.8 岁. 分为对照组与治疗组各 27 例. 两组患者在病变程度、性别、年龄构成等方面均具有可比性. 治疗组中有 5 例患者, 于治疗前后行肝穿刺对比检查.

1.2 方法 两组都给予易善复 15 mL 静滴 qd × 1 mo, 胸腺肽 60 mg 静滴 qd × 1 mo. 而治疗组再加缬沙坦 80 mg 口服 qd × 1 mo. ALT, AST, r-GT, AKP, TBil, Alb 用自动生化分析仪测定. 血清肝纤维化指标: 透明质

酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、IV 型胶原(IV-C)、三型前胶原(PCIII), 采用放射免疫法. 检测试剂盒购自上海研医学生物技术中心(具体检测步骤依试剂盒说明). 肝组织切片的病理分析: 由一名病理专业的副教授判断 HE 染色肝组织切片的 G-S 分期<sup>[19]</sup>, 并具体分析其病理改变.

统计学处理 采用 Student t 检验, 由 SPSS10.0 统计软件分析.

## 2 结果

经缬沙坦治疗后, 5 例患者第 2 次肝穿的肝组织 HE 染色 G-S 分期较治疗前有一定好转, 分别为 G4S4 vs G2S3, G4S4 vs G3S3, G3S3 vs G1S2, G2S3 vs G1S2 和 G2S2 vs G1S1(图 1-2). 肝组织血管内与肝窦间的淤血程度减轻, 肝脏微循环改善. 汇管区及周围炎性细胞浸润减少, 炎症程度减轻. 肝组织胶原纤维沉积减轻. 在整个治疗过程中, 患者无咳嗽、头晕、乏力、胃肠道反应等不适, 患者耐受良好.

表 1 治疗组和对照组慢肝患者治疗后 ALT, AST, Tbil, r-GT, AKP, HA 均有显著下降( $P < 0.05$ , 表 1). 与对照组相比, 治疗组经缬沙坦治疗后 ALT, AST, HA, IV-C 的改善优于对照组( $P < 0.01$  或  $0.05$ , 表 1)(mean±SD)

分组	n	ALT (ukat/L)	AST (ukat/L)	TBil (umol/L)	r-GT (ukat/L)	AKP (ukat/L)	HA (ug/L)	IV-C (ug/L)
治疗组	12	前 5.7±1.9	5.1±1.9	57.6±21.5	2.8±1.4	2.8±0.9	298±107	102±24
	12	后 1.3±0.7 <sup>bd</sup>	1.5±0.7 <sup>bc</sup>	24.1±11.4 <sup>a</sup>	1.5±0.6 <sup>b</sup>	1.2±0.5 <sup>b</sup>	159±92 <sup>bc</sup>	63±19 <sup>ac</sup>
对照组	11	前 5.2±2.0	5.4±2.7	49.3±13.3	2.5±1.3	2.8±1.1	306 ±111	96±33
	11	后 2.1±0.9 <sup>a</sup>	2.4±1.4 <sup>a</sup>	21.4±8.8 <sup>a</sup>	1.7±0.9 <sup>a</sup>	1.4±0.8 <sup>a</sup>	198±89 <sup>a</sup>	78±22

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ,  $2.241 \leq t \leq 3.249$ , vs 治疗前. <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ,  $2.324 \leq t \leq 3.012$ , vs 对照组.

表 2 治疗组和对照组肝硬化患者治疗后 ALT, AST, Tbil, HA 显著降低, Alb 明显升高( $P < 0.01$  或  $0.05$ , 表 2). 与对照组相比, 治疗组经缬沙坦治疗后 ALT, AST, HA 的改善优于对照组( $P < 0.05$ , 表 2)(mean±SD)

分组	n	ALT (ukat/L)	AST (ukat/L)	TBil (umol/L)	Alb (g/L)	HA (ug/L)
治疗组	15	前 2.8±1.1	1.8±1.0	37.0±14.3	36.1±5.0	321±109
	15	后 1.0±0.5 <sup>bc</sup>	1.3±0.7 <sup>ac</sup>	25.4±19.0 <sup>a</sup>	43.2±6.1 <sup>a</sup>	141±71 <sup>bc</sup>
对照组	16	前 2.7±0.7	2.0±1.0	31.6±11.7	35.1±4.7	314±121
	16	后 1.6±0.6 <sup>a</sup>	1.7±1.0	26.2±10.6 <sup>a</sup>	41.0±6.7 <sup>a</sup>	177±92 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ,  $2.153 \leq t \leq 3.156$ , vs 治疗前. <sup>c</sup> $P < 0.05$ ,  $2.215 \leq t \leq 2.593$ , vs 对照组.

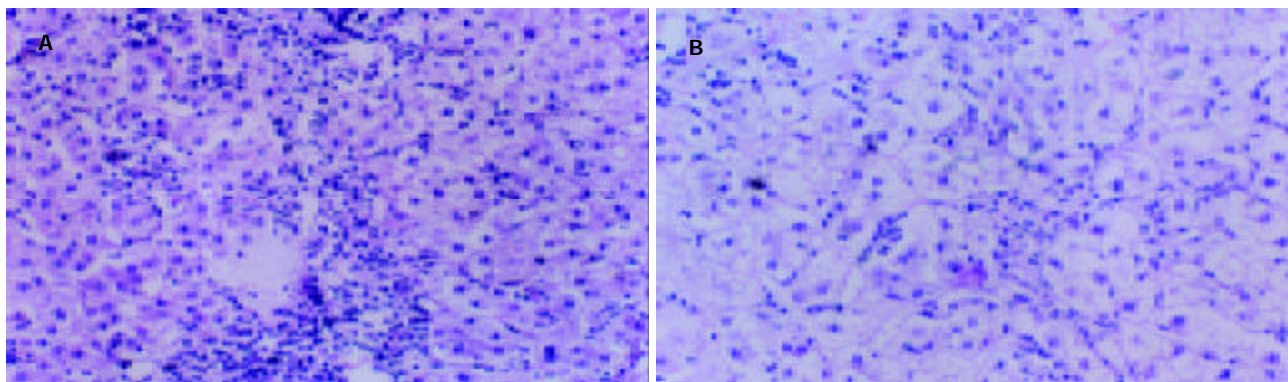


图 1 慢性肝炎治疗前后肝活检组织学改变 HE × 200. A: 慢肝患者治疗前肝组织内沿汇管区-汇管区-中央静脉大量炎细胞浸润, 胶原纤维增生(桥接坏死 G<sub>3</sub>S<sub>3</sub>); B: 治疗后肝组织炎性浸润和胶原纤维增生程度明显减轻(G<sub>1</sub>S<sub>2</sub>).

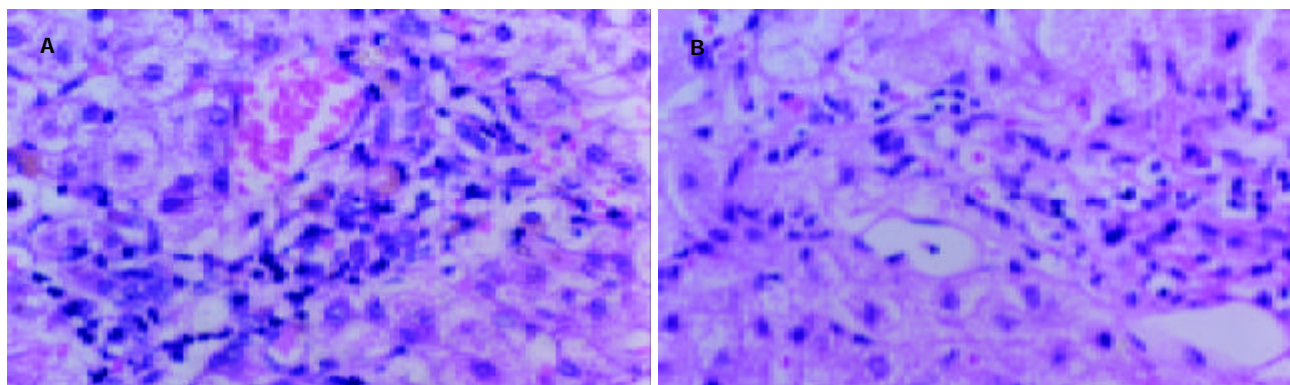


图2 慢性肝炎治疗前后肝活检组织学改变 HE  $\times 400$ . A: 慢肝治疗前肝组织汇管区内及周围大量炎细胞浸润, 血管及肝窦内红细胞淤滞, 肝微循环障碍(G2S3); B: 治疗后肝组织汇管区内及周围炎细胞浸润减轻, 血管及肝窦内淤血减轻, 肝微循环改善(G1S2).

### 3 讨论

动物及细胞实验表明, 在肝纤维化鼠肝脏局部以及肝星形细胞存在肾素 - 血管紧张素系统以及血管紧张素 III 型受体的表达, 血管紧张素 II(AII)可以促进肝星形细胞活化增生并加速肝纤维化的进展, 而应用血管紧张素 II 抑制剂可以抑制肝星形细胞的活化, 延缓肝纤维化鼠肝纤维化的进程<sup>[20-23]</sup>. 但目前将血管紧张素 II 抑制剂应用于临床慢肝、肝硬化治疗的报道极少. 我们发现, 在常规保肝治疗的基础上加用缬沙坦治疗慢性肝病肝功能降低更快, 并且肝组织学微循环改善明显, 肝纤维化程度减轻. 缬沙坦是特异性的血管紧张素 AII I 型受体拮抗剂, 作用于 AII 发挥其生理作用的最后环节, 阻滞 AII 与其特异性受体的结合, 从而拮抗 AII 的生理作用. 他治疗慢性肝病的作用机制可能是减轻肝细胞的免疫损伤. 在肝纤维化进程中, 肝细胞的免疫损伤占有重要地位. 而 AII 做为肝源性多肽, 可趋化吸引白细胞和中性粒细胞, 发挥促炎作用; 可诱导单核/巨噬细胞释放趋化因子; 还能激活巨噬细胞, 增强他们的吞噬活性. 缬沙坦直接拮抗 AII 的上述病理生理作用, 减轻炎症细胞的趋化、活化, 减少炎症因子的释放, 从而在一定程度上减轻肝细胞的炎症反应. 而且异常升高的 AII 可以: (1)直接损伤肝窦及血管内皮细胞, 促进内皮素(ET)的合成, 加快肝纤维化进程; (2)发挥强大的收缩血管作用; (3)促进纤溶酶原激活剂抑制剂-1(PAI-1)的表达, 减少组织型纤溶酶原激活剂(tPA)的释放, 加快血小板的聚集. 上述病理生理过程均可导致肝脏局部微循环的障碍. 缬沙坦一方面直接阻断 AII 对血管的收缩作用, 另一方面由于应用缬沙坦后机体循环血 AII 升高, 可促进 AII 与血管内皮上的血管紧张素 II2 型受体(AT<sub>2</sub>R)受体的结合. 而经由 AT<sub>2</sub>R 介导的生理功能可以促进一氧化氮(NO)的释放、修复受损的血管内皮. 因此缬沙坦可以降低肝内血管阻力, 增加肝窦血流量; 修复内皮功能, 改善肝微循环, 最终促进肝细胞的修复. AII 可以在多个环节参与促进肝脏细胞外基质(ECM)增生的病理生理过程. AII 对 ECM 主要成分表达的促进作用, 是通过 AT<sub>1</sub>R 介导的. 缬沙坦阻断血管紧张素 II 发挥生理

作用的最终环节, 可直接阻断 AII 所介导的各种促肝纤维化作用, 从而减少 ECM 的沉积, 促进 ECM 的降解<sup>[23-24]</sup>. 此外, ALD 已被证实有促进纤维化的作用<sup>[25]</sup>, 缬沙坦能够间接抑制醛固酮的产生, 也是其抗肝纤维化的作用机制之一.

我们发现, 在常规保肝治疗的基础上加用缬沙坦治疗慢性肝病, 可以更好的保护肝细胞, 改善肝脏微循环, 促进肝组织学修复和肝纤维化的逆转, 这在国内尚未见文献报道. 由于缬沙坦不通过肝脏代谢, 在肝功能受损时亦可应用, 服用方便, 患者易耐受, 研究过程中未见明显的副作用, 因此, 做为慢肝, 肝硬化临床治疗的辅助用药, 可能会起到减少门脉高压, 肝肾综合症等并发症的发生, 延缓慢性肝病进程的作用, 值得在临床进一步观察验证.

### 4 参考文献

- Zhang SL, Yue YF, Bai GQ, Shi L, Jiang H. Mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2004;10:437-438
- Li CP, Xu LF, Liu QH, Zhang C, Wang J, Zhu YX. Extraction of protoporphyrin disodium and its inhibitory effects on HBV-DNA. *World J Gastroenterol* 2004;10:433-436
- Song CZ, Wang QW, Song CC, Bai ZL. Viral replication modulated by synthetic peptide derived from hepatitis B virus X protein. *World J Gastroenterol* 2004;10:389-392
- Chen Y, Sze J, He ML. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *World J Gastroenterol* 2004;10:82-85
- Wang RX, Guo Y, Yang CH, Song Y, Chen J, Pang FS, Lei SP, Jia XM, Wen JY, Shi CY. Can HB vaccine yield a booster effect on individuals with positive serum anti-HBs and anti-HBc markers? *World J Gastroenterol* 2004;10:306-308
- Zhang CP, Tian ZB, Liu XS, Zhao QX, Wu J, Liang YX. Effects of Zhaoyangwan on chronic hepatitis B and posthepatic cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:295-298
- Lou SM, Li YM, Wang KM, Cai WM, Weng HL. Expression of platelet-derived growth factor-BB in liver tissues of patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2004;10:385-388
- Wang RX, Boland GJ, van Hattum J, de Gast GC. Long-term persistence of T cell memory to HBsAg after hepatitis B vaccination. *World J Gastroenterol* 2004;10:260-263
- Li CP, Lee FY, Hwang SJ, Lu RH, Lee WP, Chao Y, Wang SS, Chang FY, Whang-Peng J, Lee SD. Spider angiomas in patients with liver cirrhosis: role of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *World J Gastroenterol* 2003;9:2832-2835



- 10 Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Li JQ, Qiu DK, Fang JY, Cao AP, Wan MB, Li CZ, Ye J, Cai X, Chen CW, Wang JY, Wu SM, Zhu JS, Zhou XQ. Relationship between clinical and pathologic findings in patients with chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9:2796-2880
- 11 Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Li JQ, Wan MB, Li CZ, Chen CW, Fu QC, Wang JY, She WM, Cai X, Ye J, Zhou XQ, Wang H, Wu SM, Tang MF, Zhu JS, Chen WX, Zhang HQ. Oxymatrine therapy for chronic hepatitis B: a randomized double-blind and placebo-controlled multi-center trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:2480-2483
- 12 Chan HL, Wong ML, Hui AY, Chim AM, Tse AM, Hung LC, Chan FK, Sung JJ. Hepatitis B virus genotype has no impact on hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:2695-2697
- 13 Ustun S, Aksoy U, Dagci H, Ersoz G. Incidence of toxoplasmosis in patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:452-454
- 14 Zhang X, Yu WP, Gao L, Wei KB, Ju JL, Xu JZ. Effects of lipopolysaccharides stimulated Kupffer cells on activation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:610-613
- 15 Tang XP, Yang X, Tan H, Ding YL, Zhang M, Wang WL. Clinical and experimental study on therapeutic effect of umbilical cord blood transplantation on severe viral hepatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1999-2003
- 16 Yang L, Zhang CZ, Zhu QJ. Kangxian ruangan keli inhibits hepatic stellate cell proliferation mediated by PDGF. *World J Gastroenterol* 2003;9:2050-2053
- 17 Xu JW, Gong J, Chang XM, Luo JY, Dong L, Jia A, Xu GP. Effects of estradiol on liver estrogen receptor-alpha and its mRNA expression in hepatic fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:250-254
- 18 Mao HX, Lan SY, Hu YW, Xiang L, Yuan ZH. Establishment of a cell-based assay system for hepatitis C virus serine protease and its primary applications. *World J Gastroenterol* 2003;9:2474-2479
- 19 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝病杂志* 2000;8:324-329
- 20 Wei H, Lu H, Li D, Zhan Y, Wang Z, Huang X. The expression of AT1 receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:583-587
- 21 张晶, 宗春华, 李定国, 邹仁建, 杜学亮, 徐芹芳, 陆汉明. 肝星形细胞存在局部肾素-血管紧张素-醛固酮系统. *中华消化杂志* 2003;22:33-35
- 22 Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbign MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induced contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;118:1149-1156
- 23 Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- 24 Wei H, Li D, Lu H, Zhan Y, Wang Z, Huang X, Pan Q, Xu Q. Effects of angiotensin II receptor blockade on hepatic fibrosis in rats. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2000;8:302-304
- 25 杜昕, 易宗春, 辛华雯, 戴闰柱. 血管紧张素 II 和醛固酮对培养鼠心脏成纤维细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响. *中华老年心脑血管杂志* 2000;2:185

## World Journal of Gastroenterology 审稿要点

《World Journal of Gastroenterology, WJG》根据编委的审稿意见, 来稿分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审等项处理. WJG 为了确保其出版的每篇论文的学术质量, 特制定了以下评审要点. (1)题名: 是否准确反映了研究工作的科学问题, 内容是否简明而有特色. 若不符, 请提出具体修改意见. (2)摘要: 是否明确指出了研究的背景与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论, 创新点和重点科学问题是否与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论相符. (3)引言: 是否包括该研究的目的和与其他相关研究的关系. (4)材料和方法: 有无特色, 如大样本、安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验、特殊病例、细胞或组织样品; 研究方法和技术的有无创新性、系统性或特色. 改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当. (5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足. 临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果. (6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论. (7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况. (8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.



# 幽门螺杆菌相关性胃疾病胃蛋白酶原C的表达研究

宁佩芳, 刘惠杰, 袁媛

宁佩芳, 刘惠杰, 袁媛, 中国医科大学附属一院肿瘤研究所  
辽宁省沈阳市 110001  
宁佩芳, 女, 1976-05-17 生, 辽宁省沈阳人, 汉族. 2003 年中国医科大学硕士, 医师. 主要从事胃癌早诊的研究.  
国家十五科技攻关资助项目, No. 2001BA703B06(B)  
国家自然科学基金资助项目, No. 30171054  
项目负责人: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室. yyuan@mail.cmu.edu.cn  
电话: 024-2325666-6153  
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-12-08

## Expression of pepsinogen C in *Helicobacter pylori*-associated gastric lesions

Pei-Fang Ning, Hui-Jie Liu, Yuan Yuan

Pei-Fang Ning, Hui-Jie Liu, Yuan Yuan, Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by Key Technologies R and D Program, No. 2001BA703B06(B); and Natinal Natural Science Foundation of China, No. 30171054  
Correspondence to: Dr. Yuan Yuan, Third Department of Cancer Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yyuan@mail.cmu.edu.cn  
Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-12-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of pepsinogen C and its relation with *H pylori* infection in gastric cancer and precancerous lesions.

**METHODS:** The method of immunohistochemistry was used to examine the expression of pepsinogen C in 318 cases of stomach mucosa; the *H pylori* infection was determined by H-E stain, PCR and ELISA.

**RESULTS:** The rate of PGC over-expression in group of superficial gastritis of *H pylori* infection was higher than that of non-infection ( $P < 0.05$ , 28/33 vs 15/25). The positive rate of PGC in group of atrophic gastritis of *H pylori* infection was lower than that of non-infection ( $P < 0.01$ , 4/61 vs 9/30) and so were in dysplasia and gastric cancer.

**CONCLUSION:** There is a relationship between the *H pylori* infection and the expression of PGC in gastric mucosa. The expression of PGC increases in superficial gastritis and decreases in atrophic gastritis, dysplasia and gastric cancer with *H pylori* infection.

Ning PF, Liu HJ, Yuan Y. Expression of pepsinogen C in *Helicobacter pylori*-associated gastric lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(5):1089-1091

## 摘要

**目的:** 探讨幽门螺杆菌(*H pylori*)相关性胃疾病胃蛋白酶原C的表达及其意义。

**方法:** 采用免疫组织化学染色法检测318例胃黏膜标本中胃蛋白酶原C的表达情况; 采用HE染色、ELISA及PCR方法检测*H pylori*感染情况。

**结果:** *H pylori* 阳性组浅表性胃炎胃蛋白酶原C抗原的过表达率高于 *H pylori* 阴性组 ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 0.032$ , 28/33 vs 15/25), *H pylori* 阳性组萎缩性胃炎胃蛋白酶原C的表达率低于 *H pylori* 阴性组 ( $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 0.003$  4/61 vs 9/30), *H pylori* 阳性组的异型增生和胃癌胃蛋白酶原C的表达率与 *H pylori* 阴性组相比有下降趋势 ( $P > 0.05$ )。

**结论:** *H pylori* 感染与胃蛋白酶原C的表达密切相关, 在胃黏膜炎症中胃蛋白酶原C的表达增加; 在萎缩性胃炎、异型增生和胃癌中胃蛋白酶原C的表达降低。

宁佩芳, 刘惠杰, 袁媛. 幽门螺杆菌相关性胃疾病胃蛋白酶原C的表达研究. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1089-1091  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1089.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)与胃癌的发生发展关系密切<sup>[1-3]</sup>, 已被列为 I 类致癌因子, 但 *H pylori* 感染在胃癌发生中的作用机制目前还不甚明确. 胃蛋白酶原C是胃黏膜细胞分化成熟的终末产物, 他的变化可以反映胃黏膜的功能状态, 与胃癌及胃癌前疾病密切相关<sup>[4-8]</sup>, 胃蛋白酶原与 *H pylori* 感染的关系是近年来的研究热点. 我们利用从辽宁省庄河胃癌高发区普查中获得的不同类型胃黏膜活检标本观察胃蛋白酶原C的表达, 探讨 *H pylori* 感染对胃蛋白酶原C表达的影响及其意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 1997/2002年辽宁省庄河市胃癌高发区普查中获得的318例胃黏膜活检组织, 均由病理医师进行诊断. 包括浅表性胃炎58例, 萎缩性胃炎91例(均伴有肠上皮化生), 异型增生59例, 胃癌110例. 正常对照组与病例组在性别及年龄构成上无统计学差异. 抗胃蛋白酶原C抗体(anti-pepsinogen C antibody, 商品名2D5)由日本临床检验研究所惠赠; 免疫组化用SP二步法试剂盒为福建迈新公司产品(Lot No: Kit-9801D2); ELISA试剂盒购于华美公司; *H pylori* 基因PCR试剂盒购于上海复华公司。

**1.2 方法** 采用HE染色、ELISA检测*H pylori* -IgG抗体、PCR检测*H pylori* DNA三种方法检测*H pylori*,

同时具备三项中二项阳性者诊断为 H pylori 感染阳性. 胃蛋白酶原 C 的免疫组织化学染色(SP 二步法)按说明书进行操作. 结果判定采用综合评分法[GUT 1985;26: 1319-1321]: 根据细胞着色强度及阳性细胞数积分, 积分进行 4 级评分: 0 分为阴性(-); 2-3 分为(+); 4 分为(++); 5-6 分为(+++)大于或等于 2 分(+)为阳性表达; 大于或等于 4 分(++ ~ +++)为过表达或强阳性.

统计学处理 利用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计学处理, 采用  $\chi^2$  检验.

## 2 结果

318 例胃黏膜活检组织按有无 H pylori 感染分组, H pylori 阳性组 192 例, H pylori 阴性组 126 例. 浅表性胃炎胃黏膜无论 H pylori 感染与否 PGC 抗原均为阳性表达(100%), 但 H pylori 阳性组 PGC 过表达率高于阴性组, 差异显著( $P < 0.05$ , 图 1). 本组病例中萎缩性胃炎均伴有肠上皮化生, 肠化腺体的 PGC 均为阴性表达(0%); 而在其非肠化腺体中, H pylori 阳性组 PGC 表达率低于阴性组(图 2), 差异非常显著( $P < 0.01$ ). 同时 H pylori 阳性组异型增生和胃癌 PGC 表达率也低于与其相应的阴性组, 差异不显著( $P > 0.05$ , 表 1).

表 1 PGC 在 H pylori 相关性胃黏膜病变组织的表达

疾病分组	n	H pylori 阳性				n	H pylori 阴性			
		PGC 阳性表达		PGC 过表达			PGC 阳性表达		PGC 过表达	
		n	率(%)	n	率(%)		n	率(%)	n	率(%)
浅表性胃炎	33	33	100.0	28	84.8 <sup>a</sup>	25	25	100.0	15	60.0
萎缩性胃炎	61	4	6.6 <sup>b</sup>	0	0.0	30	9	30.0	1	3.3
肠上皮化生	61	0	0.0	0	0.0	30	0	0.0	0	0.0
异型增生	40	4	10.0	0	2.5	19	6	31.6	0	0.0
胃癌	58	0	0.0	0	0.0	52	3	5.8	0	0.0

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,  $\chi^2 = 0.032$  28/33 vs 15/25, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 0.003$  4/61 vs 9/30.

## 3 讨论

多数萎缩性胃炎都与 H pylori 感染有关, H pylori 阳性患者胃癌的发生率是 H pylori 阴性患者的 2.8-6 倍<sup>[8-10]</sup>. H pylori 感染导致慢性胃炎及消化性溃疡进一步发展为萎缩性胃炎、肠化、异型增生乃至癌变这一观点已被广泛认可. 大多数的研究认为 H pylori 感染对胃癌的致病作用主要发生在病变早期<sup>[11-12]</sup>, 对其在萎缩性胃炎以后的作用尚不清楚. 胃蛋白酶原(PG)是胃蛋白酶的前体, 可分为胃蛋白酶原 A(PGA)和胃蛋白酶原 C(PGC)<sup>[13-14]</sup>. 合成的 PG 大部分进入胃腔, 仅 1% 左右进入血循环. PGC 最初出现于胚胎后期, 是胃黏膜细胞分化成熟的终末产物, 是消化功能逐渐成熟一种标志<sup>[4-5]</sup>. 近年来的研究表明, PGC 的变化可以反映胃黏膜病变及分化程度, 与胃黏膜萎缩、肠上皮化生、异型增生有关, 慢性萎缩性胃炎和胃癌患者血清 PGA 的浓度和 PGA/PGC 的比值下降<sup>[6-7, 15-16]</sup>. 那

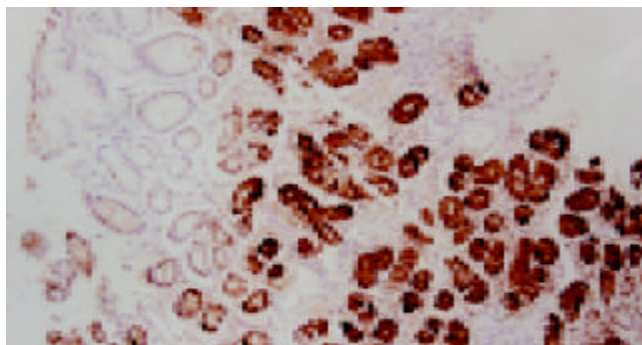


图 1 H pylori 阳性浅表性胃炎 PGC 阳性表达(SP × 100).

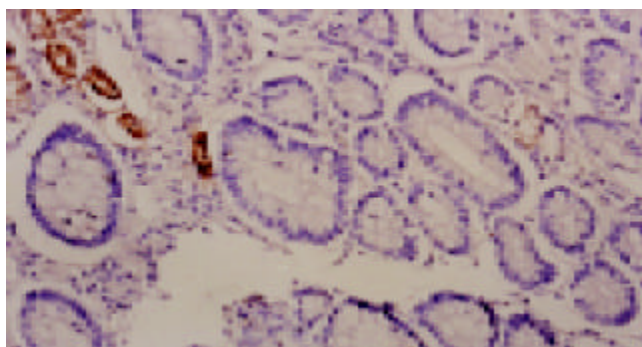


图 2 H pylori 阳性萎缩性胃炎 PGC 阴性表达(SP × 200).

么, H pylori 感染以后 PGC 如何表达呢?

我们发现, 浅表性胃炎 PGC 均为阳性表达, 但 H pylori 阳性组 PGC 的过表达率高于 H pylori 阴性组, 这与血清学的研究结果相一致<sup>[7, 17]</sup>. 文献报道, PGC 的水平与 H pylori 的定植密度成正比<sup>[18]</sup>, H pylori 引起慢性胃炎及胃溃疡患者血清 PG 水平升高, 尤其使 PGC 升高更加明显; 根除 H pylori 后血清 PGC 水平下降<sup>[19]</sup>. H pylori 引起胃黏膜分泌 PGC 增多可能由于<sup>[20-23]</sup>: 可诱导 PG 基因的表达, 脂多糖可刺激主细胞分泌胃蛋白酶原; 引起胃黏膜炎症, 参与炎症反应多种细胞因子如白三烯、TNF $\alpha$  可刺激主细胞分泌 PGC; 可引起胃酸和胃泌素分泌增加, 二者均能刺激 PG 分泌; 减少 D 细胞数量, 抑制生长抑素分泌, 减弱其对胃酸及胃蛋白酶原分泌的反馈性抑制, 从而增加 PG 水平. 受损的胃黏膜血管通透性增加, 血清 PG 水平增加. 大量 PG 进入胃腔,

遇酸活化形成胃蛋白酶, 对黏膜造成溶解和破坏, 促进胃黏膜炎症和溃疡形成。

H pylori 感染的重度胃黏膜病变中 PGC 表达减少, 肠化生黏膜 PGC 均为阴性表达, 表明肠化上皮不合成 PGC。H pylori 阳性组的萎缩性胃炎 PGC 表达率低于 H pylori 阴性组 ( $P < 0.01$ ); 在异型增生和胃癌中, 也具有相同的趋势; PGC 阳性的 3 例胃癌均为 H pylori 阴性, 且均为高分化腺癌。免疫组化研究表明<sup>[24-26]</sup>, PGC 在萎缩性胃炎和胃癌组织中的表达显著下降, PGC 的表达下降与胃癌细胞的去分化程度和疾病预后密切相关。张祥宏 et al<sup>[27]</sup>通过对人群的随访研究发现, 血清 PG 异常伴有 H pylori 感染者腺体萎缩、异型增生的发生率高于 H pylori 阴性者。H pylori 感染的胃癌前疾病和胃癌黏膜 PGC 表达降低, 可能由于 H pylori 引起的胃黏膜免疫 - 炎症反应和 H pylori 细胞毒性因子等共同作用, 使自由基、超氧化物生成增加, 这些致癌因子使胚细胞中的胃蛋白酶原基因受损突变, 导致胃黏膜细胞的终末分化产物 PGC-Ag 表达减少, 细胞分化程度降低, 细胞增生、分化和凋亡失衡, 癌变危险性增加。

总之, H pylori 感染使胃黏膜炎症 PGC 表达增加, 而在萎缩性胃炎、异型增生和胃癌阶段 PGC 的表达降低, 对后者应密切随访, 有利于提高胃癌早诊率、监测复发及预后。

#### 4 参考文献

- Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK, Chen JS. China gastric cancer study group. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291:187-194
- Lu XL, Qian KD, Tang XQ, Zhu YL. Distribution of H pylori antigens in gastric mucosa and its significance. *J Zhejiang Univ Sci* 2004;5:242-245
- International agency for research of cancer monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Infection with *Helicobacter pylori*. Vol 61. Lyon: IARC Scientific Publications, 1994:177-240
- Korstanje A, den Hartog G, Biemond I, Lamers CB. The serological gastric biopsy: a non-endoscopic diagnostic approach in management of the dyspeptic patient: significance for primary care based on a survey of the literature. *Scand J Gastroenterol* 2002;( Suppl):22-26
- Kageyama T, Ichinose M, Tsukada-Kato S, Omata M, Narita Y, Moriyama A, Yonezawa S. Molecular cloning of neonate/infant-specific pepsinogens from rat stomach mucosa and their expressional change during development. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:806-812
- Broutet N, Plebani M, Sakarovich C, Sipponen P, Megraud F. Eurohepygast study group. Pepsinogen A, pepsinogen C, and gastrin as markers of atrophic chronic gastritis in European dyspeptics. *Br J Cancer* 2003;88:1239-1247
- Miki K. Serum pepsinogen test for the diagnosis of stomach cancer. *Nippon Rinsho* 2001;(Suppl 4):204-207
- Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Nakamura H, Yoshikawa A, Yanaoka K, Arii K, Tamai H, Shimizu Y, Takeshita T, Mohara O, Ichinose M. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int J Cancer* 2004;109:138-143
- Filipe MI, Potet F, Bogomoletz WV, Dawson PA, Fabiani B, Chauveinc P, Fenzy A, Gazzard B, Goldfain C, Zeegen R. Incomplete sulphmucin-secreting intestinal metaplasia for gastric cancer. Preliminary data from a prospective study from three centrals. *Gut* 1985;26:1319-1321
- Haruma K, Komoto K, Kamada T, Ito M, Kitadai Y, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G. *Helicobacter pylori* infection is a major risk factor for gastric carcinoma in young patients. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:255-259
- Ohkuma K, Okada M, Murayama H, Seo M, Maeda K, Kanda M, Okabe N. Association of *Helicobacter pylori* infection with atrophic gastritis and intestinal metaplasia. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1105-1112
- Lee SA, Kang D, Shim KN, Choe JW, Hong WS, Choi H. Effect of diet and *Helicobacter pylori* infection to the risk of early gastric cancer. *J Epidemiol* 2003;13:162-168
- Miki K, Morita M, Sasajima M, Hoshina R, Kanda E, Urita Y. Usefulness of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Am J Gastroenterol* 2003;98:735-739
- Foster C, Aktar A, Kopf D, Zhang P, Guttentag S. Pepsinogen C: a type 2 cell-specific protease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L382-387
- Fahey MT, Hamada GS, Nishimoto IN, Kowalski LP, Iriya K, Gama-Rodrigues JJ, Tsugane S. Ethnic differences in serum pepsinogen levels among Japanese and non-Japanese Brazilian gastric cancer patients and controls. *Cancer Detect Prev* 2000;24:564-571
- Dinis-Ribeiro M, Lopes C, da Costa-Pereira A, Guilherme M, Barbosa J, Lomba-Viana H, Silva R, Moreira-Dias L. A follow up model for patients with atrophic chronic gastritis and intestinal metaplasia. *J Clin Pathol* 2004;57:177-182
- Basso D, Gallo N, Zambon CF, Navaglia F, Stockreiter E, Di Mario F, Rugge M, Plebani M. Different effects of *H pylori* water extracts on cytokines, pepsinogen C and gastrin mucosal release in patients with or without duodenal ulcer. *J Med* 2001;32:97-112
- Bodger K, Wyatt JJ, Heatley RV. Variation in serum pepsinogens with severity and topography of *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis in dyspeptic patients referred for endoscopy. *Helicobacter* 2001;6:216-224
- Kikuchi S, Kurosawa M, Sakiyama T, Tenjin H, Miki K, Wada O, Inaba Y. Long-term effect of *Helicobacter pylori* infection on serum pepsinogens. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:471-476
- Kishi K, Kinoshita Y, Matsushima Y, Okada A, Maekawa T, Kawanami C, Watanabe N, Chiba T. Pepsinogen C gene product is a possible growth factor during gastric mucosal healing. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:17-20
- Sato Y, Iwafuchi M, Ueki J, Yoshimura A, Mochizuki T, Motoyama H, Sugimura K, Honma T, Narisawa R, Ichida T, Asakura H, Van Thiel DH. Gastric carcinoid tumors without autoimmune gastritis in Japan: a relationship with *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 2002;47:579-585
- Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, Shirai N, Takashima M, Sugimura H, Sugimura H. Interleukin 1beta polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology* 2002;123:957
- Milutinovic AS, Todorovic V, Milosavljevic T, Micev M, Spuran M, Drndarevic N. Somatostatin and D cells in patients with gastritis in the course of *Helicobacter pylori* eradication: a six-month, follow-up study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:755-766
- Testino G, Cornaggia M, De Iaco F, Gada D. Is it possible with an immunophenotypic study to foresee the oncologic risk of epithelial gastric dysplasia? *Hepatogastroenterology* 2002;49:601-603
- Karita M, Noriyasu A, Kosako E, Teramukai S, Matsumoto S. Relationship between pepsinogen I and II and *H pylori* infection considered with grade of atrophy and gastroduodenal diseases. *Dig Dis Sci* 2003;48:1839-1845
- Fernandez R, Vizoso F, Rodriguez JC, Merino AM, Gonzalez LO, Quintela I, Andicoechea A, Truan N, Diez MC. Expression and prognostic significance of pepsinogen C in gastric carcinoma. *Annals Surg Oncol* 2000;7:508-514
- 张祥宏, 卜玉华, 王俊灵, 严霞, 米建民, 赵文元, 张振国, 杨永滨, 三角顺一, 青木一雄. 血清胃蛋白酶原异常居民胃黏膜变化的随访观察. *中国肿瘤临床* 2000;27:491-494

# 胃幽门螺杆菌感染清除后黏膜病理的动态变化

徐翠兰, 王琳, 赵丽华, 李军

徐翠兰, 赵丽华, 李军, 威海市立医院病理科 山东省威海市 264200  
王琳, 威海市立医院内科 山东省威海市 264200  
徐翠兰, 女, 1961-07-15 生, 山东省招远市人, 汉族. 1982 年毕业于滨州医学院, 副教授, 副主任医师. 主要从事临床病理诊断、胃肠肿瘤病理等研究工作. 山东省科技厅计划项目, No. 2000(69)  
项目负责人: 徐翠兰, 264200, 山东省威海市环翠区和平路 70 号, 威海市立医院病理科. wh-xcl@163.net  
电话: 0631-2877631 传真: 0631-5224816  
收稿日期: 2003-12-19 接受日期: 2004-02-01

## Dynamic changes of gastric mucosal pathology after clearance of *Helicobacter pylori* infection

Cui-Lan Xu, Lin Wang, Li-Hua Zhao, Jun Li

Cui-Lan Xu, Li-Hua Zhao, Jun Li, Department of Pathology, Weihai Municipal Hospital, Weihai 264200, Shandong Province, China  
Lin Wang, Department of Gastroenterology, Weihai Municipal Hospital, Weihai 264200, Shandong Province, China  
Supported by Scientific and Technological Bureau, Shandong Province, No. 2000(69)  
Correspondence to: Cui-Lan Xu, Department of Pathology, Weihai Municipal Hospital, Weihai 264200, Shandong Province, China. wh-xcl@163.net  
Received: 2003-12-19 Accepted: 2004-02-01

## Abstract

**AIM:** To investigate the characteristics of pathological changes in the gastric mucosa after anti-*Helicobacter pylori* (*H pylori*) therapy.

**METHODS:** The samples were obtained through electronic gastroscope or operation and divided into two groups: therapy group ( $n=32$ ) in which the patients received standard anti-*H pylori* therapy; and control group ( $n=25$ ) without anti-*H pylori* therapy. Histological examinations were carried out after gastroscopic inspection or operation, half a year and one year later.

**RESULTS:** *H pylori* in the mucous membrane of the stomach in all 32 cases in therapy group diminished or disappeared and pathological changes (inflammation, intestinal metaplasia and dysplasia) attenuated to some extent. There were significant differences between samples at different time points of examination ( $P<0.05$ ). In all 25 cases in group control, changes of *H pylori* and pathology of the mucous membrane were not apparent. There was not a statistical significance between samples at different time points of examination ( $P>0.05$ ). There was significant difference between samples of therapy and control groups ( $P<0.05$ ).

**CONCLUSION:** Anti-*H pylori* therapy has active significance for the improvement of pathological changes in the mucous membrane of the stomach.

Xu CL, Wang L, Zhao LH, Li J. Dynamic changes of gastric mucosal pathology after clearance of *Helicobacter pylori* infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(5):1092-1095

## 摘要

**目的:** 探讨幽门螺杆菌(简称 *H pylori*) 在胃部感染经抗 *H pylori* 药物治疗后, 黏膜病变的病理变化规律。

**方法:** 应用电子胃镜或手术标本取胃黏膜行病理观察, 抗 *H pylori* 规范治疗组( $n=32$ )和非抗 *H pylori* 规范治疗组( $n=25$ )对照, 间隔 6 mo, 1 a 随诊再次取材行胃黏膜组织学检查, 并做对比分析。

**结果:** 在 *H pylori* 感染治疗组 32 例中胃 *H pylori* 数量减少或消失, 胃黏膜病变(炎症、肠化及异型增生)均有不同程度的好转, 各组间差异均有显著性( $P<0.05$ )。未经抗 *H pylori* 治疗组 25 例, *H pylori* 数量及胃黏膜病变变化不明显, 无统计学意义( $P>0.05$ )。治疗组与对照组重度病变对比分析有统计学意义( $P<0.05$ )。

**结论:** 抗 *H pylori* 感染治疗对胃黏膜组织学病变的好转有着积极的意义; 而未经系统抗 *H pylori* 治疗组胃黏膜病变有待进一步研究。

徐翠兰, 王琳, 赵丽华, 李军. 胃幽门螺杆菌感染清除后黏膜病理的动态变化. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1092-1095

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1092.asp>

## 0 引言

近 20 a 来, 人们对 *H pylori* 的认识逐渐深入<sup>[1-12]</sup>. 特别是 1990 年以来, 对 *H pylori* 的研究非常之多<sup>[13-17]</sup>, 甚至达到了胃黏膜病变必谈 *H pylori* 的境地. 国内外大量的研究结果表明: *H pylori* 与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌与黏膜相关淋巴组织淋巴瘤有着密切的关系<sup>[18-24]</sup>. 口服大量抗 *H pylori* 药物后, 究竟胃黏膜有何变化, 组织结构和细胞形态变化有何规律, 迄今无客观指标衡量. 目前, *H pylori* 感染胃黏膜病变的研究基本上处于横向阶段, 为了观察 *H pylori* 感染治疗后胃黏膜病变的变化规律, 深入探讨其相关性, 我们进行了随诊复检相关患者的病理研究, 并进行了纵横向比较及相关分析。

## 1 材料和方法

1.1 材料 2001-2002 年病理科胃镜和手术切除胃窦部胃

黏膜标本 85 例, 其中胃镜活检标本 77 例, 胃大部切除标本(胃早期癌及不典型增生)8 例. 抗 H pylori 治疗组, 胃黏膜 H pylori 阳性者 45 例, 给予洛赛克 20 mg, 2 次/d, 克拉霉素 500 mg, 2 次/d, 阿莫西林 500 mg, 4 次/d, 连续 po 1 wk. 不能系统规范用药及未能坚持重复黏膜活检者 13 例, 材料完整者 32 例, 其中男 19 例, 女 13 例; 年龄 23-72 岁, 平均 48.9 岁; 病程最短 5 mo, 最长 12 a, 平均病程 40 mo. 未抗 H pylori 治疗组, 胃黏膜 H pylori 阳性者 40 例, 未应用抗 H pylori 药物. 复查失访者 15 例, 材料完整者 25 例, 男 16 例, 女 9 例; 年龄 33-70(平均 49.6 岁); 病程最短 2 mo, 最长 11 a, 平均 45 mo.

1.2 方法 胃炎患者从第 1 次胃镜开始取胃窦部黏膜, 间隔 6 mo, 1 a 分别再次在相同部位取胃黏膜进行病理组织学检查. 标本均经 40 g/L 甲醛固定, 常规脱水、透明浸蜡处理, 3  $\mu$ m 厚度连续切片, 捞取 2 张分别行 Giemsa 染色和 HE 染色. 切片由同一高年资病理医师按双盲法观察. H pylori 数量: 观察胃黏膜的黏液层、表面上皮、小凹上皮和腺管上皮表面的 H pylori 分布, +: 轻度: 在一个或两个高倍视野发现数个 H pylori; ++: 中度: 半数以上高倍视野有散在 H pylori 或 1-2 个高倍视野有成堆 H pylori; +++: 重度: 在多个高倍视野均可见成堆 H pylori. 慢性炎症: 根据慢性炎症细胞密集程度和浸润深度分级, 轻度(I): 慢性炎细胞较少并局限于黏膜浅层, 不超过黏膜层的 1/3. 中度(II): 慢性炎细胞较密集, 超过黏膜层的 1/3, 达到 2/3. 重度(III): 慢性炎细胞密集, 占居黏膜全层. 萎缩: 即胃固有腺体不同程度的萎缩和消失. 萎缩程度以胃固有腺体减少各 1/3 来计算. 轻度(I): 固有腺体数减少不超过原有腺体的 1/3, 大部分腺体仍保存. 中度(II): 固有腺体数减少超过 1/3, 但未超过 2/3. 重度(III): 固有腺体数减少超过 2/3, 仅残留少数腺体, 甚至完全消失. 取材过浅者已剔除. 肠化: 肠化部分占腺体和表面上皮总面积 1/3 以下的为轻度(I), 1/3-2/3 的为中度(II), 2/3 以上的为重度(III). 异型增生: 轻度(I): 发生在黏膜表面, 细胞异型性小, 核分裂少, 罕见病理性核分裂, 核的位置多位于整个细

胞的一半以下, 核仁小; 重度(III): 腺体有背靠背、共壁现象, 有时见出芽, 细胞异型性明显, 细胞排列不整, 见复层排列, 核深、核仁大, 可见病理性核分裂像. 中度(II): 介于轻度与重度之间. 以上 0 级表示无此病变.

统计学处理 两组计数资料采用  $\chi^2$ .

## 2 结果

镜检发现 H pylori 绝大多数仅限于黏膜上皮表面(图 1), 极少位于细胞内, 细胞间隙以及胃固有膜中. 抗 H pylori 规范治疗 32 例, 其 H pylori 数量明显减少, 28 例根除, 根除率达 87.5%. 第 3 次黏膜活检无重度感染者. H pylori 根除后患者上腹痛和烧心症状的频度和严重性均有好转, 无 1 例患者出现严重不良反应而导致治疗复查中断. 黏膜炎症和腺体萎缩情况: 黏膜炎症一般表现为慢性浅表性炎, 多部分合并急性炎(活动期), 镜检发现胃小凹固有膜内较多的浆细胞、淋巴细胞和一些中性粒细胞或嗜酸性粒细胞浸润(图 2), 一般表面上皮和腺上皮无明显受损, 重度炎症时可见有上皮细胞的破坏, 急性炎时合并较多的中性粒细胞浸润和糜烂. 经抗 H pylori 治疗组炎症明显减轻. 轻度炎症比例增加, 而重度炎症比例明显减少. 相关检验比较有明显差异( $P < 0.05$ ). 腺体萎缩情况: 表现为腺体层数减少或腺体间距增宽和固有膜纤维致密(图 3). 各检验指标比较有显著差异( $P < 0.05$ ). 腺上皮肠化及异型增生: 腺上皮肠化表现为出现杯状细胞、纹状缘、潘氏细胞和各种内分泌细胞, 个别出现纤毛细胞(图 4), 在根除 H pylori 后活检无明显差异( $P > 0.05$ ). 异型增生表现为部分黏膜增厚, 正常黏膜结构被增生性上皮取代, 腺腔不规则, 部分细胞大小不一、核染色加深、排列不齐, 并见异型性腺管呈囊性扩张(图 5). 腺上皮异型增生程度表达了显著的差异( $P < 0.05$ ). 根除 H pylori, 异型增生的上皮程度减轻, 部分恢复正常(表 1).

两组间对照: 就第 3 次黏膜活检, 在重度病变的各指标比较显示抗 H pylori 治疗组其炎症、腺体萎缩、腺上皮化生及胃黏膜上皮异型增生方面比例明显低于非抗 H pylori 治疗组. 二者有显著性差异( $P < 0.05$ , 表 2).

表 1 抗 H pylori 治疗组胃黏膜病变各指标对照

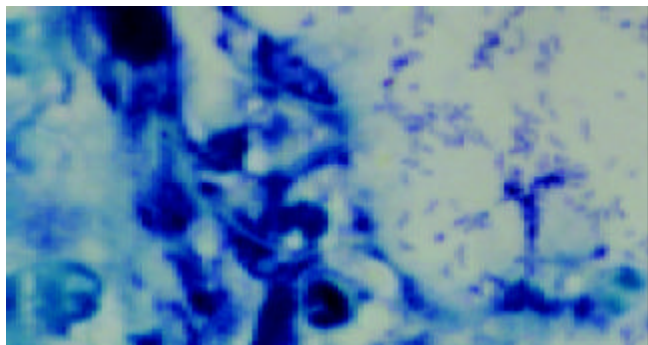
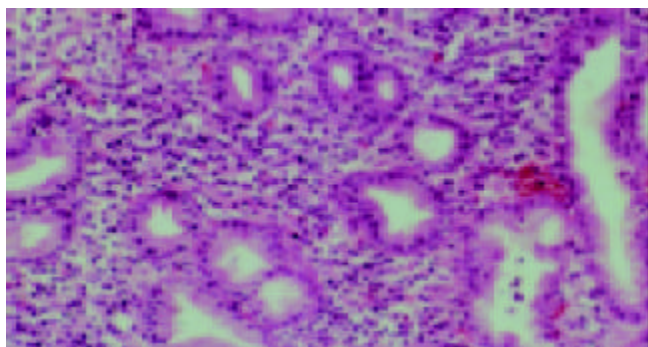
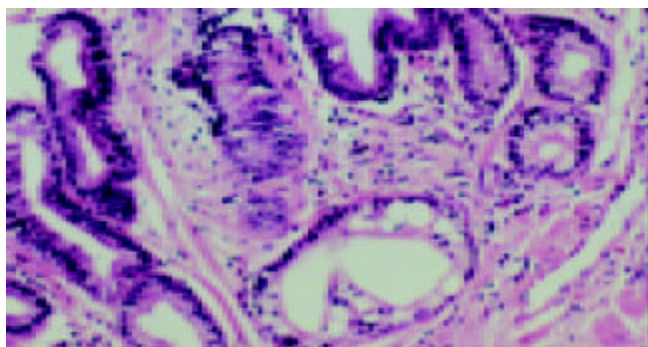
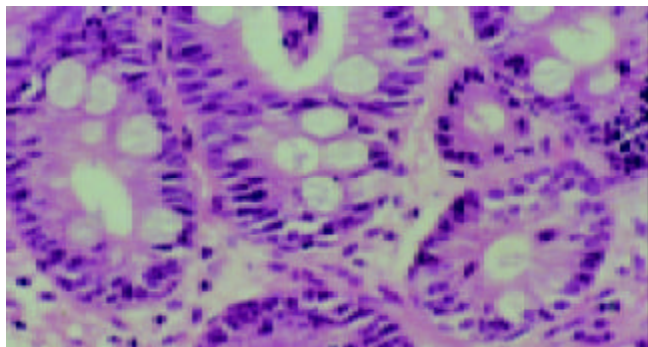
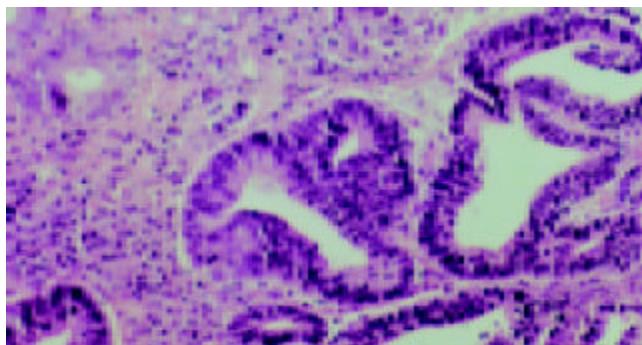
H pylori		H pylori <sup>a</sup>				黏膜炎症 <sup>a</sup>			黏膜萎缩 <sup>a</sup>				肠化 <sup>a</sup>				异型增生 <sup>a</sup>			
		-	+	++	+++	I	II	III	0	I	II	III	0	I	II	III	0	I	II	III
抗( $n=32$ )	第 1 次	0	10	14	8	11	12	9	16	8	6	2	10	6	10	6	17	10	4	1
	第 2 次	25	3	3	1	14	10	8	19	8	3	2	12	6	9	5	17	12	3	0
	第 3 次	28	2	2	0	19	11	2	27	1	2	2	11	8	8	5	29	2	1	0
非抗( $n=25$ )	第 1 次	0	10	6	9	7	9	9	10	6	7	2	6	8	7	4	11	8	5	1
	第 2 次	0	12	8	5	11	10	4	11	7	5	2	7	9	5	4	12	7	5	1
	第 3 次	1	8	6	10	10	5	10	10	4	4	7	5	6	2	12	12	8	1	4

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



表2 第3次活检胃黏膜重度病变对照表  $n$  (%)

	$n$	H pylori 根除	炎症(III)	萎缩(III)	肠化(III)	异型增生(III)
抗 <sup>a</sup>	32	28 (87.5)	2 (6.2)	2 (6.2)	5 (15.6)	0 (0.0)
非抗	25	1 (4.0)	10 (40.0)	7 (28.0)	12 (48.0)	4 (16.0)

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 非抗.图1 胃黏膜表面感染 H pylori Giemsa $\times 1\,000$ .图2 胃黏膜重度慢性炎 HE $\times 100$ .图3 胃黏膜腺体萎缩 HE $\times 100$ .图4 胃黏膜腺细胞肠上皮化生 HE $\times 200$ .图5 胃黏膜腺体异型增生 HE $\times 100$ .

### 3 讨论

我国在不同地区、不同环境、不同年龄 H pylori 感染率不等, 平均 50% 左右, H pylori 通过特异的黏附素位于胃型上皮, 目前认为是慢性胃炎的主要致病菌. 迟晶 et al<sup>[25]</sup>研究了沙土鼠胃 H pylori 长期感染的病理改变, 得出 H pylori 长期感染引起沙土鼠胃黏膜严重炎症、肠上皮化生及不典型增生. H pylori 感染可直接引起胃癌<sup>[26-27]</sup>. 与一般感染不同, H pylori 系慢性感染过程, 罕见有自发愈合, 可以存在很久, 直至发生黏膜萎缩、腺上皮肠化, 其中一部分增加了异型增生, 甚至癌变的危险, 其作用机制不十分清楚, 很多研究试图弄清 H pylori 感染在胃癌发生中的确切机制<sup>[28-29]</sup>. 我们认为, 不予以抗 H pylori 治疗, 随着时间的推移, H pylori 也必将对胃黏膜引起一系列的损害.

我们研究的是随访患者 3 次胃黏膜活检, 进行纵向观察对比并横向对照比较, 证实治疗以后胃黏膜变化均有不同程度的改观. 在 H pylori 感染的患者中, 给予抗 H pylori 治疗组胃黏膜病变除肠化外, 炎症、萎缩及异型增生逐渐减轻或消失, 各组间第 1 次与第 3 次比较有显著意义( $P < 0.05$ ), 对消除病变逐渐恢复正常有着积极的意义, 与刘天舒 et al<sup>[30]</sup>报道一致. 同时我们还发现抗 H pylori 治疗组根除 H pylori 几率达 87.5%, 与非抗 H pylori 治疗组在重度病变指标比较, 炎症、萎缩、肠化和异型增生的比例两组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ). 因此我们认为有消化道症状、H pylori 阳性患者、中度炎症以上应给予系统规范抗 H pylori 治疗.

本结果显示, 给予根除 H pylori 至少可以防止病变的进一步加重, 相当一部分可以向好的方向转化. 我国是胃癌高发区, H pylori 感染率显著高于胃癌低发区<sup>[31]</sup>. 我们医务工作者迫切要解决的是采取切实可行的措施减少胃癌的发病, 并且在胃癌高危人群中进行积极的干预, 给予有效的抗 H pylori 治疗, 我们认为在一定程度上能够预防胃癌的发生. 当然, 胃癌的发生是多因素的, 并是渐变的, 可能有环境因素、饮食因素或有基因突变的发生, 尤其是胃癌形成期或进展期. 因为胃癌不论其组织类型如何, 最初都是由于胃黏膜表面上皮(胃小凹深部细胞)或胃腺管上皮的肠上皮化生、异型增生而最终形成癌, 所以根除 H pylori 仍然可认为是有

效可行的防癌措施. 同时我们还发现, 非抗 *H pylori* 治疗组炎症有所减轻, 而萎缩、肠化及异型增生无明显加重倾向, 各指标间比较无统计学意义. 我们认为主要是时间因素, 而慢性活动性胃炎→萎缩→肠化→异型增生→胃癌一般需要 20 a 左右, 因此, 不能过早地下结论, 而需要进一步长时期的追踪观察和研究.

胃黏膜 *H pylori* 感染是一个历史长久的问题, 可能会追溯到古代<sup>[32]</sup>, 我们认为, 只要有消化道症状的患者胃镜检查都建议取胃黏膜至少 3 块行病理组织学检查, 确定 *H pylori* 感染与否、严重程度及炎症分类、萎缩、肠化及异型增生的病变程度, 提供是否需要根除 *H pylori* 的可靠依据, 使更多的患者得到确切而有效治疗, 对提高全人口的劳动力和生活质量, 延长寿命是极为有益的.

致谢 承蒙纪小龙教授指导.

#### 4 参考文献

- 高晓红, 潘伯荣. 幽门螺杆菌感染与胃癌. 新消化病学杂志 1995; 3:223-224
- 丁松泽, 李怀斌, 黄河. 幽门螺杆菌感染时致炎性因子的研究进展. 新消化病学杂志 1995;3:221-222
- 梁后杰, 刘为纹, 房殿春, 刘卫, 王俊茹. 幽门螺杆菌培养滤液诱导胃黏膜细胞恶性转化. 新消化病学杂志 1997;5:213-215
- 姜海行, 胡翠娥, 梁秀就. 幽门螺杆菌感染与胃黏膜增生细胞核抗原表达的关系. 新消化病学杂志 1997;5:223-224
- 纪小龙, 刘小兵. Hp 与胃癌: 已知的与未知的. 世界华人消化杂志 1998;6:451-453
- 卢世云, 潘秀珍, 彭孝伟, 施作霖. 幽门螺杆菌感染与胃黏膜上皮细胞增生和凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:975-977
- 郭浩岩, 张建中. 幽门螺杆菌黏附素研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:690-692
- 汪荣泉, 房殿春, 刘为纹, 罗元辉. 幽门螺杆菌感染与胃癌和癌旁组织中 MUC1 和 MUC6 基因表达的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:584-585
- 张万岱, 徐智民. 幽门螺杆菌研究现状及共识. 世界华人消化杂志 2000;8:1084-1088
- Hobsley M, Tovey FI. *Helicobacter pylori*: the primary cause of duodenal ulceration or a secondary infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:149-151
- Hua JS, Ho B, Zheng PY, Yeoh GK, Ng CH, Lin SG. Coexistence of *Helicobacter pylori* spiral and coccoid forms in experimental mice. *World J Gastroenterol* 1998;4:485-488
- Haas G, Karaali G, Ebermayer K, Metzger WG, Lamer S, Zimny-Arndt U, Diescher S, Goebel UB, Vogt K, Roznowski AB, Wiedenmann BJ, Meyer TF, Aebischer T, Jungblut PR. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics* 2002;2:313-324
- 潘秀珍, 陈明红. 幽门螺杆菌的毒力研究与分型. 世界华人消化杂志 2000;8:551-553
- 崔梅花, 胡伏莲. 幽门螺杆菌的致病因子. 世界华人消化杂志 2003; 11:1993-1996
- 宋春芳, 袁媛. 细胞凋亡与胃癌及幽门螺杆菌相关胃疾病. 世界华人消化杂志 2002;10:427-429
- 庄小强, 林三仁. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:206-207
- 姜海行, 梁淡涓, 王琳琳, 陈振依, 覃山羽, 单庆文. 儿童幽门螺杆菌感染的特征. 世界华人消化杂志 2001;9:1457-1459
- 庄小强, 林三仁. 胃癌及癌前病变中幽门螺杆菌分布的感染研究. 世界华人消化杂志 2000;8:710-711
- Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in Changle County, Fujian Province, China. *World J Gastroenterol* 2000;6:374-376
- 刘建生, 施尧, 刘文忠. 胃黏膜萎缩与 Hp 感染淋巴组织增生的关系. 世界华人消化杂志 1998;6:521-523
- 高利利, 梁浩, 纪小龙. 幽门螺杆菌相关性胃 MALT 淋巴瘤的发病机制及治疗. 世界华人消化杂志 1999;7:789-790
- 李兰更, 蒋树林, 姚希贤. 幽门螺杆菌对功能性消化不良黏膜病变的影响. 新消化病学杂志 1997;5:227-228
- Lin JT, Wang JT, Wang TH, Wu MS, Lee TK, Chen CJ. *Helicobacter pylori* infection in a randomly selected population, healthy volunteers, and patients with ulcer and gastric adenocarcinoma. A seroprevalences in Taiwan. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:1067-1072
- Holcombe C, Omotora BA, Eldridge J, Jones DM. *H pylori*, the most common bacterial infection in Africa random serological study. *Am J Gastroenterol* 1992;87:28-30
- 迟晶, 傅宝玉, 宋敏, 展广智, 吴利波, 服部隆则. 砂土鼠胃黏膜幽门螺杆菌长期感染的病理改变. 世界华人消化杂志 2002;10:415-417
- Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998;115:642-648
- Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res* 1998;58:4255-4259
- Kuipers EJ. Review article: Relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12(Suppl 1):25-36
- Kuipers EJ. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13 (Suppl 1):3-11
- 刘天舒, 王吉耀, 陈世耀, 乐凡. 幽门螺杆菌相关性胃部疾病的病理变迁. 中华消化杂志 2001;21:15-17
- Wang RT, Wang T, Chen K, Wang JY, Zhang JP, Lin SR, Zhu YM, Zhang WM, Cao YX, Zhu CW, Yu H, Cong YJ, Zheng S, Wu BQ. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:1103-1107
- 纪小龙, 申明识, 贾平, 龙学德. Hp 与胃黏膜病变 - 20 年前后比较. 新消化病学杂志 1994;2:32-33

# 幽门螺杆菌vacA毒性片段与hpaA融合基因的原核表达

刘 森, 杨致邦, 林珊珊, 吴利先

刘森, 杨致邦, 林珊珊, 吴利先, 重庆医科大学基础医学院微生物学教研室 重庆市 400016  
刘森, 男, 1976-11 生, 安徽人, 汉族, 硕士生, 主要从事机会致病菌感染研究。  
项目负责人: 杨致邦, 400016, 重庆市, 重庆医科大学基础医学院微生物学教研室。 dryangfm365@sina.com  
电话: 023-68485090 传真: 023-68486859  
收稿日期: 2003-10-27 接受日期: 2003-12-22

## Prokaryotic expression of fusion gene of vacuolating segment of vacA and hpaA in *Helicobacter pylori*

Miao Liu, Zhi-Bang Yang, Shan-Shan Lin, Li-Xian Wu

Miao Liu, Zhi-Bang Yang, Shan-Shan Lin, Li-Xian Wu, Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China  
Correspondence to: Dr Zhi-Bang Yang, Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China. dryangfm365@sina.com  
Received: 2003-10-27 Accepted: 2003-12-22

## Abstract

AIM: The prokaryotic expression vector of the fusion gene with v segment of the vacuolating cytotoxin and hpaA of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) was constructed and expressed. It would lay a foundation for prophylaxis and therapy of *H pylori* infection.

METHODS: By using the primer with a fragment encoding 12 amino acids of N-terminal of human interleukin-3 (IL-3), the vacuolating cytotoxin gene of *Hp* with linker was amplified from pQE30-V plasmid by PCR. The gene was cloned into plasmid pTrc99A-HpaA and fused with the hpaA gene. The fusion gene was cloned into prokaryotic expression vector pQE30. The recombinant plasmid of pQE30-V-HpaA was transformed into *E.coli*. DH5 $\alpha$  and expressed in the presence of IPTG. The expression product was analyzed by SDS-PAGE, its antigenicity of the expression product was identified by Western blotting.

RESULTS: Mr of recombinant protein was about 65 000 and represented 35% total protein of *E.coli*. Western blotting showed the recombinant protein could be recognized by the antiserum against *H pylori*.

CONCLUSION: The fusion gene and its prokaryotic expression vector pQE30-V-HpaA is constructed and expressed in DH5 $\alpha$  successfully. It provides the antigen basis for further studying the biological function of fusion protein and obtaining vaccine against the infection of *H pylori*.

Liu M, Yang ZB, Lin SS, Wu LX. Prokaryotic expression of fusion gene of vacuolating segment of vacA and hpaA in *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1096-1099

## 摘要

目的: 构建幽门螺杆菌 vacA 毒性片段(v)与 hpaA 融合基因的原核表达载体, 并诱导表达, 为制备具有治疗与预防作用的疫苗奠定基础。

方法: 通过设计带有编码 IL-3N 端 12 个氨基酸引物, 用 PCR 技术从 pQE30-V 质粒扩增出有接头的 v 基因, 克隆至质粒 pTrc99A-HpaA 中与 hpaA 融合。将融合基因插入原核表达载体 pQE30, 再将 pQE30-V-HpaA 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分析表达结果, Western blotting 鉴定其抗原性。

结果: 融合蛋白的相对分子量约为 65 000, 能与幽门螺杆菌感染的人阳性血清发生抗原抗体反应。

结论: 重组表达质粒 pQE30-V-HpaA 表达成功, 为进一步研究其免疫学活性及制备疫苗提供了材料。

刘森, 杨致邦, 林珊珊, 吴利先. 幽门螺杆菌 vacA 毒性片段与 hpaA 融合基因的原核表达. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1096-1099  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1096.asp>

## 0 引言

胃部疾病的发生、复发和幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染有关<sup>[1-19]</sup>。由于 *H pylori* 的感染途径尚未完全明了, 目前尚无阻止感染的有效措施。*H pylori* 在胃内定植的关键环节是黏附, 由黏附素受体系统介导, 依赖于黏附分子上某些特定的氨基酸位点与胃黏膜细胞上的受体特异性结合。鞭毛 N-乙酰神经胺乳糖结合凝集素是 *H pylori* 的主要定植因子。编码该因子的基因序列已基本明了, 其中黏附素(*Helicobacter pylori* adhesin A, HpaA)基因为 *H pylori* 特有, 长 783 bp, 较保守, 编码 *H pylori* 与胃黏膜细胞结合的亚单位蛋白, Mr 29 000。并有良好的免疫原性<sup>[20-23]</sup>。VacA 是 *H pylori* 引起细胞损伤的重要致病物质, 与消化性溃疡及胃癌的细胞病变有关, VacA 也具有好的免疫原性<sup>[24-32]</sup>。VacA 与 HpaA 均能刺激机体产生保护性免疫, 为此, 我们构建 vacA 与 hpaA 融合基因的原核表达载体。为维持两种抗原各自的空间构象, 融合基因中被加上编码 IL-3N 端 12 个氨基酸中间接头序列, 并在 *E.coli* 中表达, 以期获得 V-HpaA 融合蛋白, 为制备既能阻止 *H pylori* 黏附又能中和 VacA 毒性的集治疗和预防为一体的疫苗提供有效抗原。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** E.coli Top10, DH5 $\alpha$  菌株和 pQE30 载体, 为本校病毒性肝炎研究所惠赠, pTrc99A-HpaA 质粒(含 H pylori 黏附蛋白 DNA 序列), pQE30-V 质粒(含 H pylori 细胞空泡毒素毒性 DNA 序列)为本室构建、保存. T<sub>4</sub> DNA 连接酶和 SalI, BamHI, Nco I, EcoR I 购自宝生物公司, Pfu 酶为 MBI 公司产品. dNTP 为上海生工生物工程公司产品. DNA marker 为 MBI 公司售品, 蛋白质 marker 为医科院售品, 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒等为上海华舜公司售品, PCR 纯化试剂盒为 Omega 公司售品.

### 1.2 方法

**1.2.1 H pylori v 基因的 PCR 扩增** 用引物设计软件 premier 5.0 设计 v 基因引物, 由上海博亚生物公司合成. 配制为 20  $\mu$ M 贮存液. 引物序列是: 上游引物引入 Nco I 切点, 即 5' -CGACCATGGATGCATTATTGGGTCAGG-3'. 下游引物去掉终止密码子, 引入 IL-3 5' 端 36nt 及 EcoR I 酶切位点. 即: 5' -ATGAATTCCAGGAGCAGGACGGGCAGGCGGCTCATGTTTGGATCGTTACTATCTTGT-3'. 以 pQE30-V 质粒为模版, 反应体系共 50  $\mu$ L, 条件为: 94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 50 s, 57  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s, 72  $^{\circ}$ C 7 min, 共 35 个循环. 取 4  $\mu$ L PCR 产物 10 g/L 琼脂糖电泳, 在紫外灯下切下约为 750 bp 大小含 DNA 的胶块, 回收产物.

**1.2.2 重组载体 pTrc99A-HpaA-V 的构建** 纯化的 PCR 产物 v 基因和 pTrc99A-HpaA 质粒分别以 Nco I 和 EcoR I 双酶切, 并用 PCR 纯化试剂盒进行纯化, 将酶切纯化的目的基因和载体 pTrc99A-HpaA 按 6:1(浓度比)进行连接. 反应体系 20  $\mu$ L, 16  $^{\circ}$ C 连接 2 h. 连接产物用 CaCl<sub>2</sub> 法转化至大肠杆菌 Top10, 氨苄青霉素抗性及质粒少量抽提电泳筛选, 酶切鉴定, 得到阳性重组子 pTrc99A-HpaA-V.

**1.2.3 融合基因 v-hpaA PCR 扩增** 以 pTrc99A-HpaA-V 为模版扩增融合基因 v-hpaA. 引物序列是: 上游引物引入 BamHI 酶切位点, 即 5' CCGGATCCATGCATTATTGGGTCAAAGG-3'. 下游引物引入 SalI 酶切位点, 即 5' CGGTGCACTTCTTATGCGTTATTTGT-3'. 反应体系共 50  $\mu$ L, 条件为: 94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 50 s, 53  $^{\circ}$ C 50 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 72  $^{\circ}$ C 7 min, 共 35 个循环. 取 PCR 产物 4  $\mu$ L 进行 10 g/L 琼脂糖电泳, 在紫外灯下切下约为 1 550 bp 大小含 DNA 的胶块. 回收产物.

**1.2.4 重组载体 pQE30-V-HpaA 构建** 纯化的 V-HpaA PCR 产物和 pQE30 分别以 BamHI 和 SalI 双酶切, 并用 PCR 纯化试剂盒进行纯化, 酶切纯化的目的基因和载体 pQE30 按 6:1(浓度比)进行连接. 反应体系 20  $\mu$ L, 16  $^{\circ}$ C 2 h. 连接产物用 CaCl<sub>2</sub> 法转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  表达, 氨苄青霉素抗性及质粒少量抽提电泳筛选, 酶切鉴定, 得到阳性重组子. 将鉴定后的重组质粒送上海博亚生物有限公司进行测序. 以酶切鉴定的重组载体转化

E.coli DH5 $\alpha$ , 随后挑选含重组载体的单个菌落接种于盛有 LB 培养基的 6 支试管(含氨苄青霉素 100 mg/L)中, 与 DH5 $\alpha$ /pQE-30 菌一起. 于 37  $^{\circ}$ C 培养至 A<sub>600</sub>=0.4-0.6 时, 加入终浓度分别为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 4 h, 以 10 000 r/min 离心 2 min. 收集菌体, 加入蛋白上样缓冲液煮沸 5 min, 然后 120 g/L SDS-PAGE 电泳鉴定.

**1.2.5 Western blotting 检测重组蛋白的抗原性** 将诱导菌的全菌做 120 g/L SDS-PAGE. 使凝胶靠近阴性一侧, NC 膜靠近阳性一侧, 在 150V 条件下转移 2 h, 电转移后, 取出 NC 膜, 用 PBS 洗涤 4 次, 每次 5 min, 加封闭液, 室温封闭非特异性位点, 洗膜同前述. 然后, 依次加上 H pylori 全菌抗血清, 37  $^{\circ}$ C 作用 2 h, 同法洗膜. 再加 HRP 标记的羊抗人二抗, 37  $^{\circ}$ C 作用 2 h, 洗膜. 最后, 将 NC 膜浸泡于 DAB 显色剂中 10-15 min, 再用双蒸水冲洗, 以终止染色.

## 2 结果

**2.1 重组质粒 pTrc99A-V-HpaA 的构建** v 基因的 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖电泳, 在 750bp 有一条带, 大小与预想一致(图 1). 重组质粒 pTrc99A-V-HpaA 与 pTrc99A-HpaA 用 Nco I 和 EcoR I 双酶切后, 经 10 g/L 琼脂糖电泳, 可见 pTrc99A-V-HpaA 被切下 750 bp 左右的一条带, 大小与预想一致(图 2).

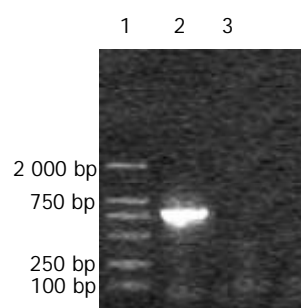


图 1 带有接头的 v 基因片段的 PCR 扩增. 1: DNA marker; 2: PCR product; 3: control.

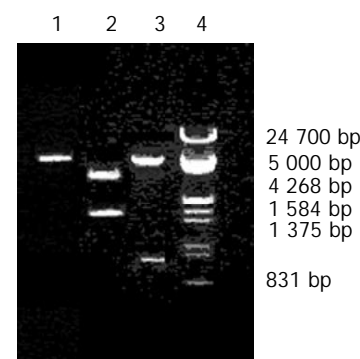


图 2 重组质粒 pTrc99A-V-HpaA 限制性酶切分析. 1: pTrc99A-HpaA/NcoI+EcoRI; 2: pTrc99A-V-HpaA/NcoI+BamHI; 3: pTrc99A-V-HpaA/NcoI+EcoRI; 4: DNA marker.

**2.2 重组质粒 pQE30-V-HpaA 鉴定** v-hpaA 的 PCR 产



物经 10 g/L 琼脂糖电泳, 在 1 548 bp 有一条带, 大小与预想一致(图 3). 重组质粒 pQE30-V-HpaA 与 pQE30 用 BamHI 和 SalI 双酶切后, 经 10 g/L 琼脂糖电泳, 可见 pQE30-V-HpaA 被切下 1 548 bp 的一条带, 大小与预想一致(图 4).

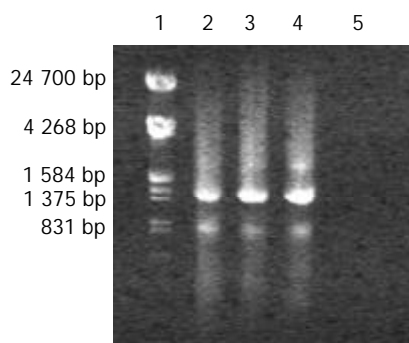


图3 融合基因v-hpaA 的PCR扩增. 1: DNA marker; 2-4: PCR product; 5: control.

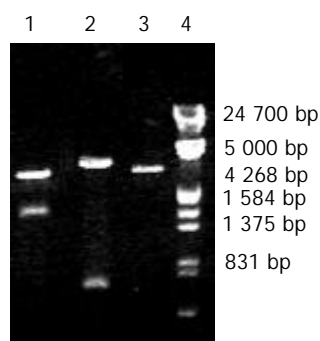


图4 重组质粒 pQE-30-hpa-vacA 限制性酶切分析. 1: pQE30-V-HpaA / BamHI + SalI; 2: pQE30-V-HpaA / EcoRI + BamHI; 3: pQE30 / BamHI + SalI; 4: DNA marker.

**2.3 重组质粒 pQE30-V-HpaA 的序列** 利用通用引物对重组质粒进行测序分析, 所得 hpaA, v 和接头序列均完整, 在同一 ORF 内, 无突变, 与预期一致.

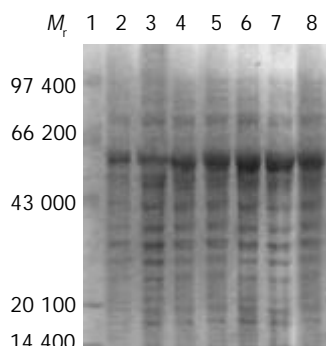


图5 DH5α/pQE30-V-HpaA 表达产物 SDS-PAGE 鉴定结果. 1: protein marker; 2: DH5α/pQE30 induced with IPTG; 3: DH5α/pQE30-V-HpaA induced without IPTG; 4-8: DH5α/pQE30-V-HpaA induced with IPTG.

**2.4 目的蛋白的表达和活性** 将鉴定正确的重组质粒 pQE30-V-HpaA 转化至大肠杆菌 DH5α, 经 IPTG 诱导表达, IPTG 的浓度为 0.5 mmol/L, 诱导 4 h, 全菌蛋白

SDS-PAGE 图谱如图 5, 薄层扫描分析表明, 目的蛋白表达量为 35% 以上(图 5). 将以 12% SDS-PAGE 分离的重组菌电转移到 NC 膜上, 依次加上 H pylori 全菌抗血清和 HRP 标记的羊抗人二抗, 显色后出现一条和预期大小一致的带(图 6).

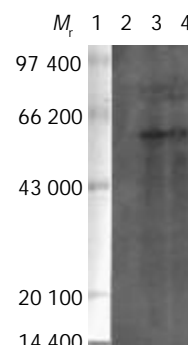


图6 融合蛋白的 Western blotting 鉴定结果. 1: Protein marker; 2: Noninduced protein exhibited with anti-serum against H pylori Ab-HRP; 3-4: induced protein exhibited with anti-serum against H pylori Ab-HRP.

### 3 讨论

如果一种蛋白能够包括 H pylori 的两种或多种有效抗原成分, 其刺激机体将会产生多重免疫保护性反应, 有利于防治 H pylori 的感染<sup>[33-35]</sup>. 为了实现这个目的, 我们构建了融合基因, 进而表达融合蛋白. 朱森林 et al 利用减毒鼠伤寒沙门菌能表达异种抗原, 在哺乳动物中经口、鼻、直肠和阴道黏膜途径免疫能诱导强大而特异的免疫反应的, 将载有 hpaA 基因的重组表达质粒导入减毒鼠伤寒沙门菌 SL3216, 构建成表达 HpaA 重组减毒鼠伤寒沙门疫苗菌, 发现 HpaA 能在疫苗中以二聚体形式稳定表达, 表达量为全菌体蛋白的 17%, 并证实具有免疫原性<sup>[36-39]</sup>. 研究表明, vacA 基因和 HpaA 基因的原核表达产物均有免疫原性, 并在治疗和预防 H pylori 感染中起到良好作用. 我们将 vacA 的毒性片段 v 和 HpaA 基因连接, 表达融合蛋白, 若不影响免疫原性, 制备抗 VacA 和 HpaA 抗体, 将既能中和已感染的 H pylori 产生的 VacA, 使其不引起细胞病变, 又能阻止 H pylori 在胃内定植, 防止 H pylori 的再感染, 起到预防和治疗作用. 此类融合蛋白和疫苗, 尚未见报道.

由于融合蛋白作为一个整体, 其一级结构已经改变, 而一级结构是决定蛋白质空间构象的基础. 因此融合蛋白就有可能具有与单独的蛋白不同的空间构象, 从而影响各组分蛋白各自功能的发挥. 一般认为以接头连接可以比直接连接融合蛋白减少上述影响. 我们构建 HpaA-V 融合蛋白的原核表达载体, 中间加上 IL-3N 端的接头 12 个氨基酸, 期望 HpaA 与 V 互不干扰而形成各自的天然构象, 从而同时获得具有两种抗原特性的重组蛋白, 达到预期的效果.

我们表达的融合蛋白必须具有单独 HpaA 与 VacA 免疫原性, 才能使机体产生针对 HpaA 与 VacA 的免疫,



成为制备疫苗的有效抗原. Western blotting 分析表明, 表达的蛋白能与 *H. pylori* 阳性血清反应, 有良好的抗原性, 但是否同时具有 HpaA 与 VacA 二者的免疫原性尚需进一步鉴定.

#### 4 参考文献

- Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- 杨艺, 邓长生, 姚学军, 刘汉燕, 陈默. 幽门螺杆菌对胃上皮细胞形态与生长的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:500-504
- 庆小强, 林三仁. 胃癌及癌前病变中幽门螺杆菌分布的感染研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:710-711
- 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 杨仕明, 赵丽. 幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞凋亡与 Bax 蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:860-862
- 张万岱, 徐智民. 幽门螺杆菌研究现状及共识. *世界华人消化杂志* 2000;8:1084-1088
- 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 张希德, 朱畴文. 幽门螺杆菌与蛋白激酶 C 在胃癌及癌前病变基因突变中的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:302-307
- 徐灿, 金震东, 李兆申. 幽门螺杆菌与胃食管反流病. *世界华人消化杂志* 2001;9:679-68
- 王东旭, 房殿春, 李为, 杜群先, 刘为纹. 幽门螺杆菌感染与抑癌基因失活的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9:984-987
- 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌与胃癌的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9:1045-1049
- Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H. pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- 宋春芳, 袁媛. 细胞凋亡与胃癌及幽门螺杆菌相关胃疾病. *世界华人消化杂志* 2002;10:427-429
- 于君, 沈祖尧. 幽门螺杆菌感染所致胃黏膜分子生物学行为改变在胃癌发生中的作用. *世界华人消化杂志* 2002;10:499-502
- 姜政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙. 幽门螺杆菌感染与胃肠外疾病关系的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:706-709
- 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 幽门螺杆菌感染与胃癌前病变演化的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:912-915
- Wang RT, Wang T, Chen K, Wang JY, Zhang JP, Lin SR, Zhu YM, Zhang WM, Cao YX, Zhu CW, Yu H, Cong YJ, Zheng S, Wu BQ. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:1103-1107
- Hu GY, Yu BP, Dong WG, Li MQ, Yu JP, Luo HS, Rang ZX. Expression of TFF2 and *Helicobacter pylori* infection in carcinogenesis of gastric mucosa. *World J Gastroenterol* 2003;9:910-914
- 徐智民, 张万岱, 周殿元. 幽门螺杆菌的研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:635-639
- Mitani K, Tatsuta M, Iishi H, Yano H, Uedo N, Iseki K, Narahara H. *Helicobacter pylori* infection as a risk factor for gastric ulceration. *Hepatogastroenterology* 2004;51:309-312
- 崔梅花, 胡伏莲. 幽门螺杆菌的致病因子. *世界华人消化杂志* 2003;11:1993-1996
- Mao YF, Yan J, Li LW, Li SP. Construction of hpaA gene from a clinical isolate of *Helicobacter pylori* and identification of fusion protein. *World J Gastroenterol* 2003;9:1529-1536
- 毛亚飞, 严杰, 李立伟. 幽门螺杆菌临床菌株 HpaA 基因的克隆和表达及鉴定. *浙江大学学报(医学版)* 2003;32:9-12
- Voland P, Hafs N, Zeitner M, Laforsch S, Wagner H, Prinz C. Antigenic properties of HpaA and Omp18, two outer membrane proteins of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2003;71:3837-3843
- Lundstrom AM, Bolin I, Bystrom M, Nystrom S. Recombinant HpaA purified from *Escherichia coli* has biological properties similar to those of native *Helicobacter pylori* HpaA. *APMIS* 2003;111:389-397
- 王虹, 高建萍, 金秀芬, 何伟, 周磊, 赵子仪, 李泽民. 胃十二指肠疾病对 Hp cagA, vacA 基因产物的体液免疫应答. *世界华人消化杂志* 2001;9:504-507
- 叶桂安, 张万岱, 刘利民, 施理, 徐智民, 陈烨, 周殿元. 幽门螺杆菌 vacA 基因多态性与慢性胃病. *世界华人消化杂志* 2001;9:593-595
- 徐克强, 张万岱, 王继德, 李子旭, 周殿元, 张亚历, 黄文峰, 姜泊, 孙勇. 幽门螺杆菌细胞毒素促进胃黏膜分泌白介素 8 作用. *世界华人消化杂志* 2002;10:907-911
- 刘纯杰, 张兆山, 陶好霞, 李淑琴, 李勤, 刘秀丽, 段海清, 黄翠芳. 幽门螺杆菌 vacA 基因的克隆和序列分析. *生物技术通讯* 2002;13:126-127
- Muller I, Medina-Selby A, Palacios JL, Martinez P, Opazo P, Bruce E, Mancilla M, Valenzuela P, Yudelevich A, Venegas A. Cloning and comparison of ten gene sequences of a Chilean *H. pylori* strain with other *H. pylori* strains revealed higher variability for VacA and CagA virulence factors. *Biol Res* 2002;35:67-84
- Pessina A, Bayo M, Croera C, Meringolo F, Neri MG, Montesissa L, Raimondi A. In vitro sensitivity of human gastric cancer cells (HGC-27) to *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:1228-1234
- Tabel G, Hoa NT, Tarnawski A, Chen J, Domek M, Ma TY. *Helicobacter pylori* infection inhibits healing of the wounded duodenal epithelium in vitro. *J Lab Clin Med* 2003;142:421-430
- Willhite DC, Blanke SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol* 2004;6:143-154
- Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elia MM, Telford JL, Baldari CT. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med* 2003;198:1887-1897
- 郭刚, 邹全明. 幽门螺杆菌的基因组及蛋白质组学研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:2022-2026
- Jiang Z, Tao XH, Huang AL, Wang PL. A study of recombinant protective *H. pylori* antigens. *World J Gastroenterol* 2002;8:308-311
- Lehours P, Menard A, Dupouy S, Bergey B, Richy F, Zerbib F, Ruskone-Fourmestreaux A, Delchier JC, Megraud F. Evaluation of the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect Immun* 2004;72:880-888
- 朱森林, 陈昱洁, 廖文俊, 陈洁, 胡品津. 表达幽门螺杆菌 hpaA 重组减毒鼠伤寒沙门氏菌的构建和鉴定. *中国免疫学杂志* 2001;17:148-151
- 朱森林, 陈昱湖, 陈洁, 李国庆, 胡品津. 表达幽门螺杆菌 hpaA 基因的减毒鼠伤寒沙门氏菌对小鼠的免疫保护作用. *中国人兽共患病杂志* 2002;18:32-36
- 朱森林, 陈昱湖, 陈洁, 胡品津, 李国庆. 减毒鼠伤寒沙门氏菌全长 hpaA 基因工程菌的构建. *微生物学报* 2002;42:27-32
- 朱森林, 陈昱湖, 陈洁, 胡品津, 李国庆, 陈为, 彭晓忠. 优化构建 UreB/HpaA 双价幽门螺杆菌减毒活疫苗的免疫保护作用. *胃肠病学* 2002;7:11-12

# 胃食管反流病与幽门螺杆菌相关性胃炎及胃肠激素的关系

吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 张金池, 曾 哲

吴灵飞, 王炳周, 郑宗茂, 曾哲, 汕头大学医学院第二附属医院消化科 广东省汕头市 515041  
冯家琳, 汕头大学医学院第二附属医院信息科 广东省汕头市 515041  
张金池, 汕头大学医学院第二附属医院放射室 广东省汕头市 515041  
吴灵飞, 男, 1964-09-26 生, 汉族, 湖北省武汉市人. 1986 年湖北医科大学毕业, 医学硕士, 副主任医师. 主要从事胃肠疾病研究.  
广东省中医药管理局资助项目, No.99591  
项目负责人: 吴灵飞, 515041, 广东省汕头市东厦北路 69 号, 汕头大学医学院第二附属医院消化科. lingfeiwu@21cn.com  
电话: 0754-8355461 传真: 0754-8346543  
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-01-12

## Relationship of *Helicobacter pylori* related gastritis, gut hormones and gastroesophageal reflux disease

Ling-Fei Wu, Bing-Zhou Wang, Jia-Lin Feng, Zong-Mao Zheng, Jin-Chi Zhang, Zeng Zhe

Ling-Fei Wu, Bing-Zhou Wang, Zong-Mao Zheng, Zeng Zhe, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China  
Jia-Lin Feng, Department of Information, Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China  
Jin-Chi Zhang, Department of Radioimmunoassay, Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China  
Supported by Guangdong Chinese Traditional Medicine Management Agency, No.99591  
Correspondence to: Dr. Ling-Fei Wu, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China. lingfeiwu@21cn.com  
Received: 2003-12-12 Accepted: 2004-01-12

## Abstract

**AIM:** To evaluate the relationship of *H. pylori* infection, *H. pylori*-related gastritis, serum gastrin and motilin levels and esophageal lesions in gastroesophageal reflux disease (GERD).

**METHODS:** All 53 GERD patients were divided into non-erosive reflux disease (NERD group, 32 cases) and reflux esophagitis (RE group, 21 cases) by endoscopy. The degrees of gastritis in antrum and body as well as esophagitis were evaluated by pathological examinations. Fasting serum gastrin and motilin concentrations were determined by radioimmunoassay. *H. pylori* was examined by serum *H. pylori*-antibody, Warthin-Starry stain, urease-dependent test (rapid urease test or  $^{14}\text{C}$ -breath test). *H. pylori* infection was affirmed when at least two of three tests were positive. 20 normal persons were as controls. In NERD group, 18 were *H. pylori* positive and 14 were negative. In RE group 12 were *H. pylori* positive and 9 were negative. According to the classification of esophagitis, 11 were Class I, 7 Class II and 3 Class III. There were 30 *H. pylori* (+) and 23 *H. pylori* (-) in 53 GERD patients.

**RESULTS:** As compared with healthy controls, fasting serum motilin levels in RE group were significantly lower ( $360 \pm 126$  vs  $440 \pm 110$   $\mu\text{g/L}$ ,  $^aP < 0.05$ ) and those in NERD group were similar ( $P > 0.05$ ). No differences in gastrin levels were found between NERD or RE group and controls (both  $P > 0.05$ ). The serum gastrin levels in *H. pylori* (+) GERD were significantly higher than controls ( $35.8 \pm 11.6$  vs  $28.5 \pm 10.6$   $\mu\text{g/L}$ ,  $^bP < 0.05$ ). In *H. pylori* (+) GERD patients, gastritis grades in the antrum and gastric body were significantly higher than that in *H. pylori* (-) patients ( $\chi^2 = 32.97$ ,  $\chi^2 = 15.67$ , both  $P < 0.005$ ). The esophagitis grades were similar in *H. pylori* (+) and *H. pylori* (-) GERD ( $\chi^2 = 0.82$ ,  $P > 0.05$ ). The gastritis grades were not associated with the esophagitis degrees, but with *H. pylori* infection.

**CONCLUSION:** Motilin is involved in the pathogenesis of RE. *H. pylori* can lead to hypergastrinemia and gastritis in the antrum and gastric body.

Wu LF, Wang BZ, Feng JL, Zheng ZM, Zhang JC, Zhe Z. Relationship of *Helicobacter pylori* related gastritis, gut hormones and gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1100-1103

## 摘要

**目的:** 通过对胃食管反流病(GERD)患者幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染、*H. pylori*相关性胃炎的程度及血清胃泌素(Gas)、胃动素(Mot)水平的检测, 探讨*H. pylori*与GERD之间的关系.

**方法:** GERD 患者 53 例按内镜表现分为非糜烂性反流病(NERD)和反流性食管炎(RE)2 组, 结合病检评估胃窦、胃体黏膜炎症及食管黏膜损伤, 采用放免法检测空腹血 Gas, Mot 水平. *H. pylori* 检测采用血清抗体法, 组织银染及尿素酶依赖试验( $^{14}\text{C}$ -尿素呼气试验或快速尿素酶试验), 三项试验中二项阳性定为 *H. pylori* 感染. 20 名正常健康人作对照. 32 例 NERD 患者 18 例 *H. pylori* 阳性, 14 例阴性; 21 例 RE 患者 12 例 *H. pylori* 阳性, 9 例阴性. RE 组 I 级食管炎 11 例, II 级 7 例, III 级 3 例. 53 例 GERD 中, *H. pylori* (+) 30 例, *H. pylori* (-) 23 例.

**结果:** RE 组 Mot 水平显著低于对照组( $360 \pm 126$  vs  $440 \pm 110$   $\mu\text{g/L}$ ,  $^aP < 0.05$ ). NERD 组 Mot 水平与对照组相比差异无显著性( $P > 0.05$ ). NERD 和 RE 二组患者 Gas 水平与对照组相比均无显著性差异( $P > 0.05$ ), *H. pylori* (+) GERD 患者 Gas 水平显著高于对照组( $35.8 \pm 11.6$  vs  $28.5 \pm 10.6$   $\mu\text{g/L}$ ,  $^bP < 0.05$ ). *H. pylori* (+) GERD 患者与 *H. pylori* (-) 组相比, 胃窦胃炎及胃体胃炎均有高度显著性差异( $P < 0.005$ ), 但 2 组食管炎程度并无显著性差异( $P > 0.05$ ), 胃炎的程度与 *H. pylori* 感染有关但与食管炎的程度无关.

结论: Mot 与 RE 发病有关. H pylori (+)GERD 患者有较高 Gas 水平及明显胃窦及胃体炎症, 但 H pylori 性胃炎与食管病变分级无关.

吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 张金池, 曾哲. 胃食管反流病与幽门螺杆菌相关性胃炎及胃肠激素的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1100-1103  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1100.asp

## 0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是一种临床常见疾病, 根据有无食管炎症状, 一般将之分为非糜烂性胃食管反流病(non-erosive reflux disease, NERD)、反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)和 Barrett 食管三种类型<sup>[1]</sup>, 其发病机制较复杂. 一般认为与食管下端括约肌 (LES)、膈肌功能异常<sup>[2-5]</sup>及酸突破<sup>[6-10]</sup>有关, 与幽门螺杆菌 (H pylori)的关系争论颇多<sup>[11-17]</sup>. 我们通过观察 NERD 和 RE 患者血清胃动素与胃泌素含量的变化, 并作 H pylori 阳性和阴性 GERD 患者胃炎与食管炎程度的相关性分析, 旨在探讨 H pylori 及其胃炎与 GERD 之间的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本院 2001/10 -2003/10 门诊患者具有反酸、烧心、反食、胸痛等症状至少 3 mo. 内镜诊断为 RE 者应排除消化性溃疡及肿瘤. 内镜检查阴性者经质子泵抑制剂(PPI)试验 (Losec 20 mg bid × 7 d)明显减轻症状则诊断为 NERD<sup>[18]</sup>. 由于 Barrett 食管仅 3 例, 故本组 GERD 剔除 Barrett 食管患者, 只包括 NERD( $n=32$ )和 RE ( $n=21$ )二类患者. 所有患者均无上消化道手术史及严重心、肝、肾等疾病, 近 1 mo 均无使用非甾体类消炎药、胃肠动力药及抗 H pylori 药物. 对诊断为 NERD 的患者回顾性分析 PPI 试验前的检测数据. 对照组 20 名健康志愿者, 均无 GERD 症状, 亦无近期服药史. RE 分级参照 2000 全国《反流性食管病(炎)治疗及诊断方案(试行)》标准<sup>[19]</sup>. I 级: 食管黏膜点状或条状发红、糜烂, 无融合现象; II 级: 有条状发红, 糜烂, 并有融合, 但非全周性; III 级: 病变广泛、发红、糜烂, 融合呈全周性, 或有溃疡. 胃炎的诊断标准参照全国《慢性胃炎研讨会共识意见》标准<sup>[20]</sup>, 分别按部位(胃窦、胃体及胃底贲门部)各取活检组织行 HE 染色及病理学检查, 根据炎症的程度分为无、轻度、中度及重度四级.

**1.2 方法** 采用 WS 染色、尿素酶依赖试验(快速尿素酶

试验或<sup>14</sup>C-呼气试验)及查血清 H pylori 抗体的方法, 三项试验中二项阳性诊断 H pylori 感染. 所有病例均于清晨空腹静脉采血, 按照说明书以放免法进行检测. Gas 试剂盒购自北方生物技术研究, Mot 试剂盒购自 301 医院科技开发中心放免所.

统计学处理 计量资料采用 mean±SD 表示, 均数的检验采用 t 检验. 计数资料采用  $\chi^2$  检验或 Radit 分析,  $P<0.05$  认为差异有统计学意义.

## 2 结果

NERD 组 32 例, 男 19 例, 女 13 例, 平均年龄  $43 \pm 11$  岁, 其中 H pylori (+)18 例, H pylori (-)14 例. RE 组 21 例, 男 14 例, 女 7 例, 平均年龄  $47 \pm 12$  岁, 其中 H pylori (+)12 例, H pylori (-)9 例. 内镜分级: I 级 11 例, II 级 7 例, III 级 3 例. 二组患者 H pylori 感染率均为 56%, 无统计学差异( $P>0.05$ ). 二组年龄亦无显著性差异( $P>0.05$ ). 对照组 20 例, 男 12 例, 女 9 例, 平均年龄  $35 \pm 12$  岁, 胃镜检查阴性.

**2.1 血清 Gas、Mot 水平** GERD 患者根据内镜下表现分为阴性(NERD)和阳性(RE)2 组. 2 组患者血 Gas 水平与对照组比较均无显著性差异( $P>0.05$ ). NERD 组 Mot 水平较低, 但与对照组比较无统计学意义( $P>0.05$ ). RE 组 Mot 含量与对照组相比, 有显著性差异( $P<0.05$ ). 若根据 H pylori 情况分组, H pylori (+)组( $n=30$ )GERD 患者 Gas 水平较高, 与对照组相比有显著性差异( $P<0.05$ ), H pylori (-)组( $n=23$ )GERD 患者 Gas 水平与对照组相比无显著性差异( $P>0.05$ ). H pylori (+)/(-)组 Mot 水平均低于对照组, 但无统计学意义( $P>0.05$ , 表 1).

表 1 GERD 患者血清 Gas, Mot 含量 (mean ± SD,  $\mu\text{g/L}$ )

分组	<i>n</i>	Gas	Mot
内镜表现			
NERD	32	$32.9 \pm 12.1$	$405 \pm 113$
RE	21	$26.8 \pm 9.8$	$360 \pm 126^a$
H pylori			
(+)	30	$35.8 \pm 11.6^b$	$378 \pm 10$
(-)	23	$23.5 \pm 10.7$	$300 \pm 121$
对照组	20	$28.5 \pm 10.6$	$440 \pm 110^b$

<sup>a</sup> $P<0.05$ ,  $t=2.16$  vs 对照组; <sup>b</sup> $P<0.05$ ,  $t=2.26$  vs 对照组.

**2.2 H pylori (+)/(-) GERD 患者胃食管炎** H pylori (+)胃窦胃炎、胃体胃炎均较明显. 30 例 H pylori (+)患者中

表 2 GERD 患者 H pylori (+)/(-)组胃食管炎症分级 (*n*)

H pylori	<i>n</i>	胃窦胃炎				胃体胃炎				食管炎			
		无	轻	中	重	无	轻	中	重	无	轻	中	重
(+)	30	0	19	8	3	3	18	5	4	18	7	4	1
(-)	23	17	4	2	0	14	5	2	2	14	4	3	2
		$\chi^2=32.97$				$\chi^2=15.67$				$\chi^2=0.82$			
		$P<0.005$				$P<0.005$				$P>0.05$			

有19例有轻度胃窦部炎症, 8例中度炎症, 3例重度炎症. 在胃体部炎症中, 18例为轻度炎症, 5例为中度炎症, 4例重度炎症. 23例 *H pylori* (-)患者中胃炎均较少见. *H pylori* (+)/(-)组比较, 胃窦胃炎及胃体胃炎均有高度显著性差异( $P < 0.005$ ). 二组患者食管炎程度的比较则无显著性差异( $P > 0.05$ , 表2). 胃窦炎症、胃体炎症的程度与食管病变的程度进行Radt分析, 均未见显著性差异( $P > 0.05$ ). GERD患者食管病变的程度均不与胃窦、胃体炎症程度相关.

### 3 讨论

GERD的发生与多因素有关. 食管胃动力异常、食管对反流物清除机制缺陷或黏膜上皮防御机制损伤均可导致GERD发病<sup>[20-24]</sup>. 然而, 影响LES压力及食管蠕动的因素颇多<sup>[2-5]</sup>. 研究表明, Mot水平降低可使胃排空延缓<sup>[24-27]</sup>, Gas则可使LES压力升高, 但生理状态下Gas对LES的影响并不大<sup>[27]</sup>. 文献报道*H pylori*感染者常引起高Gas血症, 根除*H pylori*后可使Gas水平恢复正常<sup>[24, 28]</sup>. *H pylori* (+)GERD患者是否亦有Gas异常未见报道. 本组中, *H pylori* (+)组Gas水平显著高于*H pylori* (-)组, 说明*H pylori*同样对GERD患者Gas有影响. Gisbert et al<sup>[28]</sup>对*H pylori* (+)与*H pylori* (-)GERD患者进行食管测压及24 h食管pH值测定, 结果二组患者并无显著性差别. 本组中, GERD患者无论有无食管黏膜的损伤, 其空腹血中Gas水平与对照组相比均无统计学意义. *H pylori* (+)GERD患者Gas较高但与Mot无相关, 表明在GERD的发生过程中Gas对食管动力并未起重要作用. RE组Mot显著性低于正常值, 表明Mot与GERD进展有关. GERD与*H pylori*的关系一直引人注目. 流行病学资料表明, GERD患者*H pylori*感染率低. 土耳其后裔的人群中*H pylori*感染率高(60.6%)而RE发生率低(9.7%), 荷兰人群中*H pylori*感染率低(18.5%)而RE发生率高(33.0%), 二者呈反比关系<sup>[29-30]</sup>. 但是, 不同地区有不同的结果<sup>[31-35]</sup>. 在本组中, GERD主要为NERD及RE患者, Barrett食管少见, 且二组*H pylori*感染率及年龄均无显著性差异, 说明*H pylori*及年龄因素在GERD病变逐渐进展的过程中并不起作用. 我们认为GERD患者的这些特点可能与我国为*H pylori*高发区及种族差异有关.

本组患者*H pylori*感染与GERD食管炎病变程度无关, 但与胃窦胃炎及胃体胃炎均有关. 在21例RE患者中, 11例*H pylori* (+)且病变程度较轻. 而在24例*H pylori* (+)患者中, 均有胃窦部炎症, 部分患者胃体部炎症更为严重. 由于本组无近期服药病史, 胃部炎症主要应为*H pylori*相关性胃炎<sup>[35]</sup>, 但胃炎与食管黏膜损伤无关. 有学者认为不是*H pylori*而是胃炎对GERD有保护作用<sup>[10, 36-39]</sup>. 我们认为这应依具体情况而定. 本组患者中胃体胃炎较重者食管病变较轻, 而胃体炎症较轻者GERD症状常较明显, 其他学者亦观察到类似现象<sup>[16, 21]</sup>. 此外, 我们注意到RE患者内镜下贲门炎不多见. 21例

RE中仅6例出现贲门炎, 为28.6%. 32例NERD患者中, 只2例(6.2%)有贲门炎, 并未见Csendes et al报道GERD患者贲门肠上皮化生多见的情况<sup>[40]</sup>. 这些结果的差异可能与不同人群的遗传背景、*H pylori*菌株的生物学特性、个体食管病前状态及对疾病的不同反应性有关<sup>[10-12, 41-47]</sup>.

本项研究中, NERD的诊断是采用PPI试验和非24 h食管pH值检测金标准, 毕竟pH检测、压力测定及核素法条件要求较高或患者依从性差, 难于普及. 文献报道, PPI试验敏感性和特异性可达80%以上<sup>[18]</sup>. 我们认为对疑似NERD的病例采用此法方便简捷, 值得推广. 然而, 亦应注意到PPI对酸耐受力差, 在胃中暴露于酸后易失效, 因此对某些胃排空延缓的病例由于药物可能已在胃中失效或减效并未显出实际效果, 因此本组应除外PPI无效的GERD病例. 此外, 胆汁反流的病例亦不在此列. 寻找一种简便有效的诊断方法或筛选指标有助于更广泛地探讨GERD的发病机制<sup>[48]</sup>.

### 4 参考文献

- 1 Wong WM, Lam KF, Lai KC, Hui WM, Hu WH, Lam CL, Wong NY, Xia HH, Huang JQ, Chan AO, Lam SK, Wong BC. Avaldated symptoms questionnaire (Chinese GERDQ) for the diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1407-1413
- 2 Fritscher-Ravens A, Mosse CA, Mukherjee D, Yazaki E, ParkPO, Mills T, Swain P. Transgastric gastropepy and hiatal hernia repair for GERD under EUS control: a porcine model. *Gastrointest Endosc* 2004;59:89-95
- 3 Chrysos E, Prokopakis G, Athanasakis E, Pechlivanides G, Tsiaoussis J, Mantides A, Xynos E. Factors affecting esophageal motility in gastroesophageal reflux disease. *Arch Surg* 2003;138:241-246
- 4 Cheng WF, Yi CQ. The study on the motive function of esophagus in patients with reflux esophagitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:444-445
- 5 Sarnelli G, Ierardi E, Grasso R, Verde C, Bottiglieri ME, Nardone G, Budillon G, Cuomo R. Acid exposure and altered acid clearance in GERD patients treated for *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis* 2003;35:151-156
- 6 Lin JK, Hu PJ, Zhu XY, Zheng MH, Li CJ, Ren M. The value of esophageal manometry and 24 hour pH monitoring in diagnosis of GERD. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:51-53
- 7 Pan LN, Zhao HQ. Reflux esophagitis: etiology and pH detection of esophagus and value of diagnosis of X-ray. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1135-1136
- 8 Freston JW, Triadafilopoulos G. Approaches to the long-term management of adults with GERD-proton pump inhibitor therapy, laparoscopic fundoplication or endoscopic therapy? *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19(Suppl 1):35-42
- 9 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
- 10 Ackermack P, Kuipers EJ, Wolf C, Breumelhof R, Seldenrijk CA, Timmer R, Segeren KC, Kusters JG, Smout AJ. Colonization with cagA-positive *Helicobacter pylori* strains in intestinal metaplasia of the esophagus and the esophagogastric junction. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1719-1724
- 11 Wang TY, Bi CS, Jiang JL, Wang ML, Liu B. Reflux esophagitis: a clinical analysis of 242 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:942-945
- 12 Manes G, Pieramico O, Uomo G, Mosca S, de Nucci C, Balzano A. Relationship of sliding hiatus hernia to gastroesophageal reflux disease: a possible role for *Helicobacter pylori* infection?

- Dig Dis Sci* 2003;48:303-307
- 13 Feng GJ, Hu FL, Wang HH, Liu JX. A study on the relationship of *Helicobacter pylori*, gastrin and gastroesophageal reflux disease. *CMJ* 2003;83:96-99
  - 14 Graham DY. *Helicobacter pylori* is not and never was "protective" against anything, including GERD. *Dig Dis Sci* 2003;48:629-630
  - 15 McColl KE. Motion-*Helicobacter pylori* causes or worsens GERD: arguments against the motion. *Can J Gastroenterol* 2002;16:615-617
  - 16 Cheng LG, Dong LH, Ge JR, Wang YP, Mao YL, Ma JH. A study on the relationship of *Helicobacter pylori* and reflux esophagitis. *Zhonghua Xiaohua Neijing Zazhi* 2003;20:47-48
  - 17 Alonso Aquirre PA. PPI test and endoscopy in GERD. *Rev Esp Enferm Dig* 2002;94:88-97
  - 18 Yu ZL. Diagnostic criterion and existing problems about reflux esophagitis. *Chinese J Internal* 2000;39:151-152
  - 19 The association of Chinese digestive disease. The common opinions on chronic gastritis in China. *Chinese J Digestion* 2000;20:117-118
  - 20 Zhang WD, Xiao HD, Hu FL, Hu PJ, Xu ZM. The common opinions on *Helicobacter pylori*. *CMJ* 2000;80:394-395
  - 21 Hirschowitz BI, Haber MM. *Helicobacter pylori* effects on gastritis, gastrin and enterochromaffin-like cells in Zollinger-Ellison syndrome and non-Zollinger-Ellison syndrome acid hypersecretors treated long-term with lansoprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:87-103
  - 22 Xie Y, Zhou XJ, Lui LH, Huang DQ, Cheng J, Huang Y, Wang CW, Zhu JQ, Zhang KH. Role of nitric oxide in the oxidative damages on esophageal mucus in reflux esophagitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1213-1214
  - 23 Liu WX, Hong G, Fu BY, Jiang RL, Liu ZY. Interdigestive serum motilin levels and Gut motility in functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:722-724
  - 24 Esposito S, Valente G, Zavallone A, Guidali P, Rapa A, Oderda G. Histological score for cells with irregular nuclear contours for the diagnosis of reflux esophagitis in children. *Hum Pathol* 2004;35:96-101
  - 25 Wilson P, Welch NT, Hinder RA, Anselmino M, Herrington MK, DeMeester TR, Adrian TE. Abnormal plasma gut hormones in pathologic duodenogastric reflux and their response to surgery. *Am J Surg* 1993;165:169-176
  - 26 Perdikis G, Wilson P, Hinder RA, Redmond EJ, Wetscher GJ, Saeki S, Adrian TE. Gastroesophageal reflux disease is associated with enteric hormone abnormalities. *Am J Surg* 1994;167:186-191
  - 27 Okamoto K, Iwakiri R, Mori M, Hara M, Oda K, Danjo A, Ootani A, Sakata H, Fujimoto K. Clinical symptoms in endoscopic reflux esophagitis: evaluation in 8031 adult subjects. *Dig Dis Sci* 2003;48:2237-2241
  - 28 Gisbert JP, de Pedro A, Losa C, Barreiro A, Pajares JM. *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease: lack of influence of infection on twenty-four-hour esophageal pH monitoring and endoscopic findings. *J Clin Gastroenterol* 2001;32:210-214
  - 29 Loffeld RJ. *H pylori* and reflux esophagitis in Turkish patients living in the Zaanstreek region in the Netherlands. *Dig Dis Sci* 2003;48:1846-1849
  - 30 Vinjirayer E, Gonzalez B, Brensinger C, Bracy N, Obelmeijas R, Katzka DA, Metz DC. Ineffective motility is not a marker for gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98:771-776
  - 31 Tack J, Fass R. Approaches to endoscopic-negative reflux disease: part of the GERD spectrum or a unique acid-related disorder? *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19(Suppl 1):28-34
  - 32 Fallone CA, Barkun AN, Friedman G, Mayrand S, Loo V, Beech R, Best L, Joseph L. Is *Helicobacter pylori* eradication associated with gastroesophageal reflux disease? *Am J Gastroenterol* 2000;95:914-920
  - 33 Graham DY. The changing epidemiology of GERD: geography and *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1462-1470
  - 34 Tefera S, Hatlebakk JG, Berstad AE, Berstad A. Eradication of *Helicobacter pylori* does not increase acid reflux in patients with mild to moderate reflux oesophagitis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:877-883
  - 35 Wu LF, Zheng ZM, Li GP, Wang BZ, Zhan HY, Zeng Z, Zhou ZQ. Effect of weishusan on patients with functional dyspepsia and *H pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:275-278
  - 36 Cremonini F, Di Caro S, Delgado-Aros S, Sepulveda A, Gasbarrini G, Gasbarrini A, Camilleri M. Meta-analysis: the relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:279-289
  - 37 Fujiwara Y, Higuchi K, Shiba M, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Matsumoto T, Arakawa T. Association between gastroesophageal flap valve, reflux esophagitis, Barrett's epithelium, and atrophic gastritis assessed by endoscopy in Japanese patients. *J Gastroenterol* 2003;38:533-539
  - 38 Wu LF, Li GP, Zheng ZM, Wang BZ, Zheng ZC, Zhou ZQ. Efficacy of Weishusan Combined with Furazolidone and Amoxycillin in the Eradication of *Helicobacter pylori* and Prevention of Recurrent Duodenal Ulcer. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2002;10:74-77
  - 39 Ishaq S, Jankowski JA. Barrett's metaplasia: clinical implications. *World J Gastroenterol* 2001;7:563-565
  - 40 Csendes A, Smok G, Quiroz J, Burdiles P, Rojas J, Castro C, Henriquez A. Clinical, endoscopic, and functional studies in 408 patients with Barrett's esophagus, compared to 174 cases of intestinal metaplasia of the cardia. *Am J Gastroenterol* 2002;97:554-560
  - 41 Goldblum JR, Vicari JJ, Falk GW, Rice TW, Peek RM, Easley K, Richter JE. Inflammation and intestinal metaplasia of the gastric cardia: the role of gastroesophageal reflux and *H pylori* infection. *Gastroenterology* 1998;114:633-639
  - 42 Byrne PJ, Mulligan ED, O' Riordan J, Keeling PW, Reynolds JV. Impaired visceral sensitivity to acid reflux in patients with Barrett's esophagus. The role of esophageal motility. *Dis Esophagus* 2003;16:199-203
  - 43 Dietz J, Meurer L, Maffazzoni DR, Furtado AD, Prolla JC. Intestinal metaplasia in the distal esophagus and correlation with symptoms of gastroesophageal reflux disease. *Dis Esophagus* 2003;16:29-32
  - 44 Moss SF, Armstrong D, Arnold R, Ferenci P, Fock KM, Holtmann G, McCarthy DM, Moraes-Filho JP, Mutschler E, Playford R, Spechler SJ, Stanghellini V, Modlin IM. GERD 2003-a consensus on the way ahead. *Digestion* 2003;67:111-117
  - 45 Kern M, Hofmann C, Hyde J, Shaker R. Characterization of the cerebral cortical representation of heartburn in GERD patients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G174-181
  - 46 Urbach DR, Ungar WJ, Rabeneck L. Whither surgery in the treatment of gastroesophageal reflux disease (GERD)? *CMAJ* 2004;170:219-221
  - 47 Nijevitch AA, Loguinovskaya VV, Tyrtyschnaya LV, Sataev VU, Ogorodnikova IN, Nuriakhmetova AN. *Helicobacter pylori* infection and reflux esophagitis in children with chronic asthma. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:14-18
  - 48 Kahrilas PJ. Diagnosis of symptomatic gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98(3 Suppl):S15-23



# SV40T外显子的拼接及逆转录病毒载体pLLTSN的构建

李俊刚, 陈耀凯, 王宇明

李俊刚, 陈耀凯, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038  
李俊刚, 男, 1975-06-10 生, 贵州省平坝县人, 汉族. 2001 年第三军医大学硕士生, 主要从事生物人工肝细胞材料的研究.  
国家自然科学基金资助项目, No. 30100080  
全军医学“十五”计划面上项目, No.01MA177  
项目负责人: 陈耀凯, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. yaokaichen@hotmail.com  
电话: 023-68754475-8006 传真: 023-65397072  
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

## Splicing of SV40T gene exons and construction of a retroviral vector pLLTSN

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

Jun-Gang Li, Yao-Kai Chen, Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30100080, and PLA Tenth Five-Year Medicine Project, No. 01MA177  
Correspondence to: Yao-Kai Chen, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. yaokaichen@hotmail.com  
Received: 2003-12-10 Accepted: 2004-02-01

## Abstract

**AIM:** To construct an immortalization vector for hepatocytes immortalization, and two exons of simian virus 40 large T antigen gene (SV40T) were spliced and a retroviral vector pLLTSN without intron was constructed.

**METHODS:** The two exons of SV40T were amplified respectively by high fidelity polymerase chain reaction (PCR) by using the plasmid pUC19-SV40T as the template. Then SV40T gene was spliced by overlapping extension (SOE), and cloned into the *EcoR* I and *BamH* I sites of the retroviral vector pLXSN. The positive recombinant clones were screened and identified by PCR by using colonies directly as templates, and by restriction endonuclease digestion analysis, and DNA sequence analysis.

**RESULTS:** The 2.1 kb SV40T gene was spliced. Among the ten colonies randomly screened, four were proved positive, and one of them was verified by plasmid DNA sequencing.

**CONCLUSION:** The retroviral vector pLLTSN containing SV40T without intron is successfully constructed.

Li JG, Chen YK, Wang YM. Splicing of SV40T gene exons and construction of a retroviral vector pLLTSN. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1104-1107

## 摘要

**目的:** 为构建肝细胞永生载体, 对猿猴病毒 40 大 T 抗原

基因(SV40T)外显子进行拼接并以其为外源片段构建逆转录病毒永生载体pLLTSN.

**方法:** 以质粒 pUC19-SV40T 为模板, 高保真 PCR 扩增 SV40T 的 2 个外显子, 重叠延伸拼接法将两个外显子拼接到一起, 然后用双粘端连接法将其克隆到空载体 pLXSN 的 *EcoR* I 和 *BamH* I 位点之间, 通过菌落 PCR 和酶切法筛选, 鉴定阳性克隆并经 DNA 测序验证.

**结果:** 拼接成 2.1 kb 的 SV40T, 用菌落 PCR 和酶切法随机筛选的 10 个菌落中 4 个为阳性, 均含有 2.1 kb SV40T 插入片段. 经质粒 DNA 测序分析的阳性克隆, 确证无内含子.

**结论:** 获得重组的 2.1 kb 无内含子的 SV40T, 成功构建了逆转录病毒载体 pLLTSN.

李俊刚, 陈耀凯, 王宇明. SV40T 外显子的拼接及逆转录病毒载体 pLLTSN 的构建. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1104-1107  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1104.asp>

## 0 引言

肝细胞是生物人工肝支持系统中核心生物成分<sup>[1-7]</sup>. 由正常肝细胞转化而来的肝细胞株具有正常肝细胞的某些主要功能<sup>[8]</sup>, 且在体外培养时增生能力强, 可迅速达到人工肝支持所需的细胞数量<sup>[9]</sup>. 构建逆转录病毒永生载体是肝细胞永生化的重要步骤. 猿猴病毒 40 T 抗原基因(simian virus 40 large T antigen, SV40T)是常用的细胞永生基因. 野生型 SV40T 由 2 个外显子和 1 个内含子组成, 在转录表达过程中, 可因其 mRNA 的剪接与否而表达 T 抗原或 t 抗原. 由于仅 T 抗原即可引起细胞的永生<sup>[10-12]</sup>, 国外学者采用不表达 t 抗原的 SV40T 逆转录病毒载体成功永生化了包括肝细胞在内的多种细胞<sup>[13]</sup>. 我们在构建肝细胞永生载体过程中, 为了避免 t 抗原的表达, 同时缩短 DNA 长度, 采用重叠延伸拼接法(splicing by overlapping extension, SOE)法<sup>[14-15]</sup>将 SV40T 的 2 个外显子拼接起来, 去除了内含子, 并将重组的 SV40T 克隆到逆转录病毒载体 pLXSN 的多克隆位点, 构建成含 2.1 kb SV40T 的逆转录病毒载体 pLLTSN, 旨在为肝细胞永生奠定基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 逆转录病毒载体 pLXSN 及其位于多克隆位点两侧测序引物 P5' 和 P3' 购于美国 Clontech 公司; 质

粒 pUC19-SV40 T 由第四军医大学段小红博士惠赠<sup>[16]</sup>, 该质粒含有 SV40T 的全部基因序列; 限制性内切酶 EcoR I, BamH I 等购自英国 NEB 公司; T4 DNA 连接酶为美国 Promega 公司产品; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  株为本研究所保存菌种; pfu DNA 聚合酶购自北京鼎国公司; 2  $\times$  PCR 混合液和玻璃珠法 DNA 胶回收纯化试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司; 重组 SV40T (r SV40T) PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 序列如下: P1: 5' -GCGAATTC(EcoRI)ACCATGGATAAAGTTTAAAC-3'; P2: 5' -CATCAGTTCCATAGGTTGGAATCTCAGTTGCATCCCAGAAGCC-3'; P3: 5' -CCAACCTATGGAAGTATGAATGGGAG-3'; P4: 5' -CCGGATCC(BamH I)TTATGTTTCAGGTTTCAGGG-3'. 其中 P2 和 P3 为内引物, 二者之间有 19 个碱基重叠互补. PCR 产物纯化试剂盒为德国 Roche 公司产品.

**1.2 方法** SV40T 外显子 1 的扩增: 在 100  $\mu$ L 反应体系中分别加入无菌水 91  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR Buffer 10  $\mu$ L, dNTP 2  $\mu$ L, P1, P2 各 2  $\mu$ L, 2.5 MU/L 的 pfu DNA 聚合酶 2  $\mu$ L, 模板 pUC19-SV40 T 质粒 1  $\mu$ L. 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后 94  $^{\circ}$ C 1 min, 58  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min 共 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 反应产物经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 目的片段应为 279 bp. SV40T 外显子 2 的扩增: 在上述 PCR 体系中将 P1 和 P2 换为 P3 和 P4, 其余成分不变. 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后 94  $^{\circ}$ C 1 min, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 3 min 共 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 目的片段约为 1.9 kb. PCR 产物的纯化按试剂盒说明书进行操作. 每 100  $\mu$ L PCR 产物纯化后浓缩为 10  $\mu$ L. SV40T 基因 2 个外显子的拼接: 在上述 PCR 体系中, 引物换为 P1 和 P4, 模板换为纯化的外显子 1 和 2 各 1  $\mu$ L, 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后 94  $^{\circ}$ C 1 min, 58  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 3 min 共 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 产物经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析后用 PCR 产物纯化试剂盒纯化. pLLTSN 载体的构建: 按图 1 所示流程进行. 同时用 EcoR I 和 BamH I 分别双酶切载体 pLXSN 和纯化的 2.1 kb rSV40T, 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离 5.9 kb 线性 pLXSN 和 2.1 kb rSV40 T, 玻璃珠法 DNA 胶回收纯化试剂盒从凝胶中回收纯化目的片段. 将回收的 pLXSN 和 rSV40T 片段按约 1:3 的摩尔比混合(共约 100 ng), 45  $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 再冷却到 0  $^{\circ}$ C, 在 10  $\mu$ L 体系中用 T4 DNA 连接酶 16  $^{\circ}$ C 过夜连接. 次日取 5  $\mu$ L 连接产物转化氯化钙法制备的感受态 DH5  $\alpha$  细胞. pLLTSN 阳性克隆的筛选和鉴定: (1)菌落 PCR 法<sup>[17-18]</sup>: 用分别与载体序列和 SV40T 序列互补的引物 P5' 和 P4 配对进行 PCR, 可同时鉴定重组体是否确为 pLXSN 与 rSV40T 嵌合体, 以及 SV40T 在载体中插入的方向. 在 20  $\mu$ L 反应体系中加入无菌水 19.2  $\mu$ L, 2  $\times$  PCR 混合液 10  $\mu$ L, P5' 和 P4 引物各 0.8  $\mu$ L, 以高压灭菌牙签沾取单个菌落少许, 点入反应体系中作为模板. 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;

然后 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 50 s 共 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 将 PCR 产物进行 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 出现 2.1 kb 条带者为阳性. (2)酶切法: 取 PCR 阳性克隆接种于 5 mL 含 100 kU/L 氨苄西林的 LB 培养基, 37  $^{\circ}$ C 摇床中 250 r/min 振荡培养过夜. 碱裂解法提取质粒 DNA, 以 EcoR I 和 BamH I 双酶切和 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 电泳分离出 2.1 kb 条带者为阳性. 同时以空载体 pLXSN 行相同双酶切作为对照. 随机取一株鉴定为阳性的 pLLTSN 克隆进行 rSV40T 的 DNA 序列测定, 由上海生工生物工程技术有限公司完成, 测序引物为 P5' 和 P3'.

## 2 结果

**2.1 SV40T 基因的拼接** 通过 PCR 成功地扩增出了 SV40T 基因 279 bp 和 1.9 kb 两个外显子 DNA 片段; 再以两个 DNA 片段为模板, 使用 SOE 法成功地将两个片段顺序连接成连续的, 无内含子的 2.1 kb rSV40T 基因(图 2).

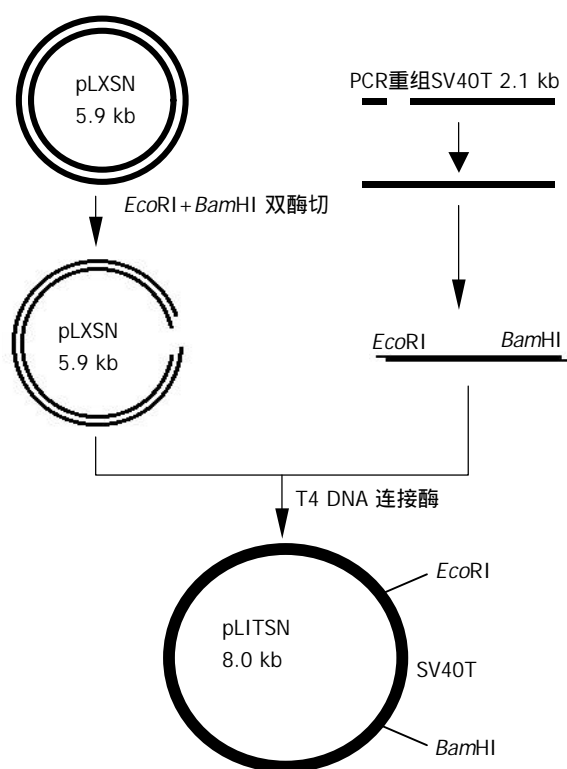


图 1 pLLTSN 构建流程.

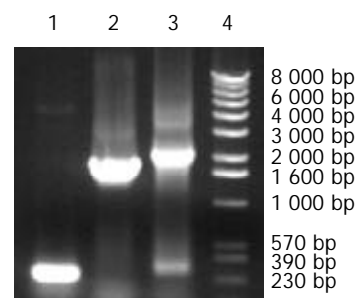


图 2 PCR 重组 2.1 kb SV40T 基因. 1: 外显子 1; 2: 外显子 2; 3: 重组后的 2.1 kb SV40T; M: 标准参照物.

**2.2 pLLTSN 重组体阳性克隆的 PCR 鉴定** 转化平板长出几百个菌落, 随机挑取10个克隆进行筛选和鉴定. 应用 P5' 和 P4 为引物, 以单个菌落的少许菌体为模板, 同时以载体 pLXSN 质粒作为阴性对照模板进行 PCR 扩增. 用 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 结果随机筛选的 10 个菌落中有 4 个可见 2.1 kb 的阳性条带, 阴性对照并未见任何条带.

**2.3 pLLTSN 重组体阳性克隆的酶切鉴定** 挑取4个PCR阳性克隆进行碱裂解法提取质粒 DNA, 以 EcoR I 和 BamH I 双酶切和 8g/L 琼脂糖凝胶电泳分析. 结果 4 个克隆均被切为 5.9kb 和 2.1kb 两个片段(图 3).

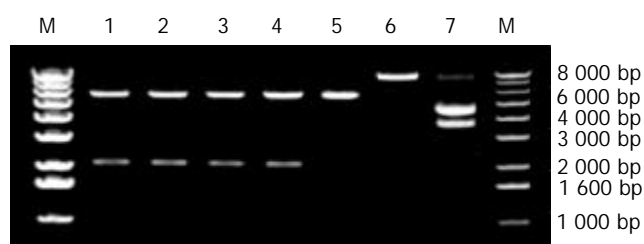


图3 重组 pLLTSN 克隆的酶切鉴定. M: 标准参照物; 1-4: pLLTSN 克隆 1-4 EcoR I 和 BamH I 双酶切; 5: pLXSN 双酶切对照; 6: EcoR I 单酶切 pLLTSN 克隆 1; 7: 未酶切 pLLTSN 克隆 1 质粒对照.

**2.4 pLLTSN 重组体的测序验证** 经过测序, pLLTSN 中的 rSV40T 全长 2 127 bp, 共有 4 处点突变, 即 G888A, T1063C, A1701G 和 T1868C 突变, 但皆为同义突变, 其编码蛋白的氨基酸序列并无改变. 突变处(下划线)部分序列如下:

```
851 ATGTGTTGTT ATTGCTTGGG ATGTACTTGG AATTTCAATA CAGTTTTGAA...
1051 GATAGCCTAC AACTAAGTAG AGAACAAATG TTAACAAACA GATTTAATGA...
1701 GATAATTCAA AGTGGCATTG CTTTGCTTCT TATGTTAATT TGGTACAGAC...
1851 TAATGTGGCT ATGGGAAC TG GAGTTTTAGA TTGGCTAAGA AACAGTGATA...
```

### 3 讨论

基因的重叠延伸拼接(SOE)<sup>[14]</sup>又称重组 PCR, 是将不相邻的两个基因或DNA片段拼接起来构成融合基因/DNA的PCR方法. 其原理是: 使用两对引物 P1, P2 和 P3, P4 经过第一轮 PCR 分别扩增出两个 DNA 片段 A 和 B, 其中 P2 和 P3 为内引物, 具有部分序列重叠互补, 使 A 的 3' 端和 B 的 5' 端具有同源互补序列; 第二轮 PCR 再以 A 和 B 混合作为模板, 经变性, 退火, 复性时, A 的正链和 B 的负链的 3' 端同源互补序列将结合在一起, 使两条链互为引物, 通过 PCR 得到延伸和扩增, 从而连接 A 和 B. 其特点是不需要使用限制性内切酶和连接酶, 可以避免引入限制性酶切位点的核苷酸序列, 可将两个 DNA 片段精确地连接在一起. 使用这种方法时, 为了尽可能避免或减少碱基错配, 往往需加大模板, 引物和 dNTP 的用量, 同时减少 PCR 的循环数, 因此有时在其 PCR 产物的凝胶电泳图像中仍可见模板 DNA 的相应条带. 在图 2 中第三泳道出现与外显子 1 相同大小的较

弱条带即属此种情况. 一方面是由于模板过多, 另一方面是因为内引物 P2 较长, 在外显子 1 的 PCR 产物纯化过程中有所残留, 导致第二轮 PCR 过程中产生一定扩增. 因此应用 SOE 时, 第一轮 PCR 产物最好经电泳分离后切胶回收纯化以除去多余的引物和其他非特异序列.

野生型 SV40T 基因全长 2 473 bp, 其中前 246 bp 为第一外显子, 247-592 bp 为内含子, 593-2 476 bp 为第二外显子, 两个外显子连接后编码序列长 2 127 bp. 所使用的外引物引入了额外的酶切位点序列, 所以第 1 外显子 PCR 产物长 279 bp. SV40T 第 1 外显子和内含子部分序列(前 561 bp)又可编码 t 抗原. 在 SV40 转录表达过程中, 其 mRNA 发生剪接时则转译为 T 抗原, 而不剪除内含子序列时则表达 t 抗原. t 抗原在细胞中的作用复杂, 可以促进 T 抗原对细胞的转化<sup>[19]</sup>, 也可增加细胞凋亡的敏感性<sup>[20]</sup>, 而 T 抗原却可通过 PI3 激酶途径激活 Akt 抑制细胞凋亡<sup>[21]</sup>. 为了避免 t 抗原表达引起的其他不确定因素<sup>[10]</sup>, 我们用 SOE 法成功地连接了 SV40T 的两个外显子, 删除其内含子序列, 同时减少 SV40T 在载体中所占容量以利于载体后续加入其他基因, 并将拼接的 2.1 kb SV40T 克隆到 pLTSN 的 EcoR I 和 BamH I 酶切位点之间, 构建了只有 T 抗原可得到表达的逆转录病毒载体 pLLTSN.

SV40T 是使用最广泛的永生基因, 他不但能刺激细胞增生, 延长培养细胞的生命期, 而且诱导细胞分化却不完全转化细胞. 如通过分子克隆的 SV40 DNA 转染而永生化的猫成纤维细胞, 培养传代长达 6 mo 之久而不显示与其原代细胞不同的表型<sup>[22]</sup>. 应用 SV40T 基因永生化的多种哺乳动物细胞, 这已为国内外许多研究报道所证实<sup>[8, 23-28]</sup>. 体外培养的二倍体细胞是不能无限分裂增生的, 而用基因转移技术将 SV40T 转到二倍体细胞中并稳定表达<sup>[29]</sup>, 可获得永生化的细胞<sup>[30-34]</sup>. p53 与 pRB 是调控细胞增生和细胞凋亡的抑癌基因, p53 的突变和 pRB 的失活都可导致细胞增生周期的失控, 引起细胞的无限生长. SV40T 抗原与 p53<sup>[35]</sup>及 pRB<sup>[36-37]</sup>结合并使后者失活, 从而延长细胞生命. 为探索用 SV40T 基因永生化的肝细胞的可行性, 我们构建了含 SV40T 的逆转录病毒表达载体. 该载体的真核表达元件为莫洛尼小鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, MoMuLV)长末端重复序列(long terminal repeat, LTR), SV40T, SV40 早期启动子以及新霉素耐药基因(Neo<sup>r</sup>), 因此命名为 pLLTSN.

逆转录病毒载体是目前哺乳动物细胞基因转移最有效的工具, 可高效转导骨髓细胞等<sup>[38]</sup>, 已被应用于遗传性疾病及癌症基因治疗的临床试验<sup>[39-40]</sup>. pLXSN 是基于 MoMLV 构建的经典逆转录病毒载体之一. 当含目的基因的 pLXSN 转染包装细胞后, 可产生无复制活性的感染性病毒. 这些病毒颗粒可感染靶细胞并转移目的基因, 但不能在靶细胞中复制. 将 pLLTSN 包装为多嗜性复制缺陷病毒, 可感染包括人在内的多种哺乳动物

细胞. 病毒颗粒感染细胞后, 其基因可整合到宿主细胞基因组, 稳定表达 SV40T 和 Neo<sup>r</sup>. 用其感染人肝细胞可望建立永生化人肝细胞系.

#### 4 参考文献

- Ding YT, Qiu YD, Chen Z, Xu QX, Zhang HY, Tang Q, Yu DC. The development of a new bioartificial liver and its application in 12 acute liver failure patients. *World J Gastroenterol* 2003;9:829-832
- Chen XP, Xue YL, Li XJ, Zhang ZY, Li YL, Huang ZQ. Experimental research on TECA-I bioartificial liver support system to treat canines with acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2001;7:706-709
- Wang YJ, Li MD, Wang YM, Chen GZ, Lu GD, Tan ZX. Effect of extracorporeal bioartificial liver support system on fulminant hepatic failure rabbits. *World J Gastroenterol* 2000;6: 252-254
- Xue YL, Zhao SF, Zhang ZY, Wang YF, Li XJ, Huang XQ, Luo Y, Huang YC, Liu CG. Effects of a bioartificial liver support system on acetaminophen induced acute liver failure canines. *World J Gastroenterol* 1999;5:308-311
- Gao Y, Xu XP, Hu HZ, Yang JZ. Cultivation of human liver cell lines with microcarriers acting as biological materials of bioartificial liver. *World J Gastroenterol* 1999;5:221-224
- Wang YJ, Li MD, Wang YM, Nie QH, Chen GZ. Experimental study of bioartificial liver with cultured human liver cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:135-137
- 李俊刚, 陈耀凯. 生物人工肝细胞材料研究进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:699-701
- Maruyama M, Kobayashi N, Westerman KA, Sakaguchi M, Allain JE, Totsugawa T, Okitsu T, Fukazawa T, Weber A, Stolz DB, Leboulch P, Tanaka N. Establishment of a highly differentiated immortalized human cholangiocyte cell line with SV40T and hTERT. *Transplantation* 2004;77:446-451
- 陈耀凯, 王宇明. 人工肝生物成分的研究进展. *中华实验外科杂志* 2000;17:479-480
- Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, Miyazaki M, Cai J, Tanaka N, Fox JJ, Leboulch P. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 2000;287:1258-1262
- Allain JE, Dagher I, Mahieu-Caputo D, Loux N, Andreoletti M, Westerman K, Briand P, Franco D, Leboulch P, Weber A. Immortalization of a primate bipotent epithelial liver stem cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3639-3644
- Beachy TM, Cole SL, Cavender JF, Tevethia MJ. Regions and activities of simian virus 40 T antigen that cooperate with an activated ras oncogene in transforming primary rat embryo fibroblasts. *J Virol* 2002;76:3145-3157
- Westerman KA, Leboulch P. Reversible immortalization of mammalian cells mediated by retroviral transfer and site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8971-8976
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 1989;77:61-68
- Warrens AN, Jones MD, Lechler RI. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* 1997;186:29-35
- 段小红, 吴军正, 毛勇, 李峰, 杨元彤. SV40 诱导髌突软骨细胞永生化实验研究. *中华口腔医学杂志* 2001;36:14-16
- Takumi T. Rapid cDNA cloning by PCR screening (RC-PCR). *Methods Mol Biol* 2002;192:385-389
- Liao CH, Shollenberger LM. Detection of Salmonella by indicator agar media and PCR as affected by alfalfa seed homogenates and native bacteria. *Lett Appl Microbiol* 2003; 36:152-156
- Bocchetta M, Miele L, Pass HI, Carbone M. Notch-1 induction, a novel activity of SV40 required for growth of SV40-transformed human mesothelial cells. *Oncogene* 2003;22:81-89
- Cole SL, Tevethia MJ. Simian virus 40 large T antigen and two independent T-antigen segments sensitize cells to apoptosis following genotoxic damage. *J Virol* 2002;76:8420-8432
- Yu Y, Alwine JC. Human cytomegalovirus major immediate-early proteins and simian virus 40 large T antigen can inhibit apoptosis through activation of the phosphatidylinositol 3'-OH kinase pathway and the cellular kinase Akt. *J Virol* 2002; 76:3731-3738
- Koksoy S, Phipps AJ, Hayes KA, Mathes LE. SV40 immortalization of feline fibroblasts as targets for MHC-restricted cytotoxic T-cell assays. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;79: 285-295
- Yuan L, Yu WM, Qu CK. DNA damage-induced G2/M checkpoint in SV40 large T antigen-immortalized embryonic fibroblast cells requires SHP-2 tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 2003;278:42812-42820
- Jacobberger J, Frisa P. Cell density-dependent related gene expression: SV40 large T antigen levels in immortalized astrocyte lines. *BMC Cell Biol* 2002;3:10
- Ali SH, DeCaprio JA. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol* 2001; 11:15-23
- van Leeuwen EB, Wisman GB, Tervaert JW, Palmans LL, van Wijk RT, Veenstra R, Molema G, van der Zee AG, van der MJ, Ruiters MH. An SV40 large T-antigen immortalized human umbilical vein endothelial cell line for anti-endothelial cell antibody detection. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:283-290
- Darimont C, Avanti O, Tromvoukis Y, Vautravers-Leone P, Kurihara N, Roodman GD, Colgin LM, Tullberg-Reinert H, Pfeifer AM, Offord EA, Mace K. SV40 T antigen and telomerase are required to obtain immortalized human adult bone cells without loss of the differentiated phenotype. *Cell Growth Differ* 2002;13:59-67
- Tsao SW, Wang X, Liu Y, Cheung YC, Feng H, Zheng Z, Wong N, Yuen PW, Lo AK, Wong YC, Huang DP. Establishment of two immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16E6/E7 viral oncogenes. *Biochim Biophys Acta* 2002;1590:150-158
- Berghella L, De Angelis L, Coletta M, Berarducci B, Sonnino C, Salvatori G, Anthonissen C, Cooper R, Butler-Browne GS, Mouly V, Ferrari G, Mavilio F, Cossu G. Reversible immortalization of human myogenic cells by site-specific excision of a retrovirally transferred oncogene. *Hum Gene Ther* 1999;10: 1607-1617
- Behrens A, Gordon EM, Li L, Liu PX, Chen Z, Peng H, La Bree L, Anderson WF, Hall FL, McDonnell PJ. Retroviral gene therapy vectors for prevention of excimer laser-induced corneal haze. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:968-977
- Jha KK, Banga S, Palejwala V, Ozer HL. SV40-Mediated immortalization. *Exp Cell Res* 1998;245:1-7
- Nelson K, Melville EL, Meikle PJ, Anson DS. Immortalisation of a mucopolysaccharidosis type IIIC fibroblast cell line via expression of SV40 T antigen. *Cell Biol Int* 2003;27:567-570
- Chen W, Hahn WC. SV40 early region oncoproteins and human cell transformation. *Histol Histopathol* 2003;18:541-550
- Hattori K, Muta M, Toi M, Iizasa H, Shinsei M, Terasaki T, Obinata M, Ueda M, Nakashima E. Establishment of bone marrow-derived endothelial cell lines from ts-SV40 T-antigen gene transgenic rats. *Pharm Res* 2001;18:9-15
- Khandjian EW, Rose TM. Disruption of LT-antigen/p53 complex by heat treatment correlates with inhibition of DNA synthesis during transforming infection with SV40. *Biochem Cell Biol* 2000;78:437-445
- Modi S, Kubo A, Oie H, Coxon AB, Rehmatulla A, Kaye FJ. Protein expression of the RB-related gene family and SV40 large T antigen in mesothelioma and lung cancer. *Oncogene* 2000;19:4632-4639
- Lee C, Cho Y. Interactions of SV40 large T antigen and other viral proteins with retinoblastoma tumour suppressor. *Rev Med Virol* 2002;12:81-92
- Hong Y, Lee K, Choi JY, Yu SS, Kim E, Sugimoto Y, Ueno M, Kato I, Kim S. High efficiency gene transfer to human CD34+ cells. *Int J Hematol* 2002;76(Suppl 1):264-265
- McTaggart S, Al Rubeai M. Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnol Adv* 2002;20:1-31
- Hong Y, Yu SS, Kim JM, Lee K, Na YS, Whitley CB, Sugimoto Y, Kim S. Construction of a high efficiency retroviral vector for gene therapy of Hunter's syndrome. *J Gene Med* 2003;5:18-29

# 外源质粒 DNA 经小鼠胃肠道的吸收代谢动力学

刘建文, 施用晖, 乐国伟, 方希修

刘建文, 施用晖, 乐国伟, 方希修, 江南大学营养与生物技术教研室, 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏省无锡市 214036  
刘建文, 男, 1977-04-28 生, 福建仙游人, 汉族, 1999 年无锡轻工大学本科毕业, 现江南大学分子营养学博士研究生, 主要从事分子营养与代谢调控研究。国家自然科学基金资助项目, No. 30270970  
项目负责人: 乐国伟, 214036, 江苏省无锡市惠河路 170 号, 江南大学营养与生物技术教研室, 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 1gw@sytu.edu.cn  
电话: 0510-5869236 传真: 0510-5869236  
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-01-08

## Metabolic kinetics of foreign plasmid DNA uptake via gastrointestinal tract in mice

Jian-Wen Liu, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le, Xi-Xiu Fang

Jian-Wen Liu, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le, Xi-Xiu Fang, Department of Nutrition and Biological Technology, Department of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30270970  
Correspondence to: Dr. Guo-Wei Le, Department of Nutrition and Biological Technology, Southern Yangtze University, 170 Huihe Road, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China. 1gw@sytu.edu.cn  
Received: 2003-11-18 Accepted: 2004-01-08

## Abstract

**AIM:** To analyse the changes of foreign plasmid copies in different tissues after uptake via gastrointestinal tract and to evaluate the possibility of foreign plasmid integrating on the host genome.

**METHODS:** Samples including lung, kidney, spleen, mesenteric lymph node, thymus, gonads, feces, duodenum, large intestine, blood and liver were obtained 1, 3, 6, 24, and 48 h and 3, 6 wk after oral administration of 200 µg plasmid pcDNA3s. PCR technique was used to detect the distribution and kinetics of plasmid in different tissues. Genomic DNA was assayed for integrated plasmid by PCR after purification of high-molecular-weight genomic DNA away from free plasmid by using gel electrophoresis.

**RESULTS:** Plasmid could be detected in almost all tissues 1 h after oral administration and the copies of plasmid in tissues changed with time. Foreign plasmid could be detected only in kidney and blood at sixth week time. Foreign plasmid mainly as fragment survived in vivo.

**CONCLUSION:** Foreign plasmid can be absorbed by gastrointestinal tract and distribute in different tissues quickly, surviving as the form of fragment. Foreign plasmid DNA probably integrates into the host genome via the gastrointestinal tract.

Liu JW, Shi YH, Le GW, Fang XX. Metabolic kinetics of foreign plasmid DNA uptake via gastrointestinal tract in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1108-1113

## 摘要

**目的:** 分析外源质粒 pcDNA3s 经胃肠道吸收后在组织中的动态变化, 评价外源质粒整合到宿主基因组上的可能性。

**方法:** 分别于灌胃 200 µg 质粒 pcDNA3s 后 1, 3, 6, 24, 48 h 及 3, 6 wk, 提取小鼠肺、肾、脾、肠系膜淋巴结、胸腺、生殖器官、粪便、十二指肠、大肠、血液及肝脏的总 DNA, 通过 PCR 方法检测质粒 pcDNA3s 在各组织中的分布及随时间变化的情况。琼脂糖凝胶分离高分子量基因组 DNA 与游离质粒, PCR 方法检测外源质粒在基因组 DNA 上的整合情况。

**结果:** 灌胃给药后 1 h 所有的组织均能检测到质粒的存在, 质粒在组织中的拷贝数水平随时间的推移呈动态变化, 至 6 wk 仅在肾脏和血液中检测到外源质粒, 质粒在体内主要以碎片的形式存在。

**结论:** 外源质粒能被胃肠道吸收, 迅速分布全身各个器官并以碎片的形式在体内存留较长的时间。外源质粒 DNA 经胃肠道途径有可能整合到宿主染色体基因组上。

刘建文, 施用晖, 乐国伟, 方希修. 外源质粒 DNA 经小鼠胃肠道的吸收代谢动力学. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1108-1113

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1108.asp>

## 0 引言

哺乳动物胃肠道是外源 DNA 进入机体的主要器官<sup>[1-3]</sup>。外源 DNA 进入胃肠道后在胃的酸性环境和肠道核酸酶的攻击下, 迅速降解成碎片随粪便排出, 一小部分外源 DNA 能够以碎片的形式进入机体, 随血液循环分布于各个器官组织中<sup>[4]</sup>。外源 DNA 在肠道降解不完全, 能够由肠壁上皮细胞吸收, 经淋巴结, 然后通过外周血液白细胞运送到各个器官中。以上说明胃肠道对外源 DNA 并非是一个不可穿越的屏障<sup>[4-7]</sup>。与其他营养物质一样, 外源 DNA 经胃肠道吸收后, 可以递呈到机体的外周与中枢系统中, 可能插入到哺乳动物基因组上, 引起宿主基因组的缺失和重排, 改变宿主基因组相关基因的转录活性, 可能激活原癌基因、抑制抑癌基因而导致致癌。宿主基因组会通过改变 DNA 甲基化模式这一古老的细胞防御机制来抵抗外源 DNA 的入侵<sup>[8-10]</sup>。因此经口服摄入外源 DNA 对哺乳动物基因组长期进化的影响是一个不容忽视的问题。我们采用裸 DNA (质粒 pcDNA3s) 作为研究对象, 考察质粒 pcDNA3s 经胃肠道给药后在小鼠体内



的组织分布及其整合情况.

1 材料和方法

1.1 材料 昆明种小鼠, 6 周龄, 雌雄各半, 体质量 20 ± 2 g, 由江苏省实验动物中心提供. 大肠杆菌 JM109 及重组质粒 pcDNA3s 由本室保存, pcDNA3 上 BamHI 与 EcoRI 位点之间插入 HBsAg 抗原基因, 长度为 930 bp, 质粒 pcDNA3s 总长约 6 400 bp. pcDNA3s 上具有 CMV 启动子, 可在大肠杆菌中复制, 在真核细胞中表达外源抗原, 是一种典型的真核表达载体. 大量制备质粒, 碱裂解法大量提取 5 L 发酵液, 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提, 2 倍体积无水乙醇沉淀, RNase 酶去除 RNA, 聚乙二醇纯化, TE(pH8.0)溶解沉淀, -20 ℃ 保存备用<sup>[11]</sup>.

1.2 方法 给每只小鼠灌胃 pcDNA3s 质粒溶液 200 μL (1 g/L), 于灌胃后 1, 3, 6, 24, 48 h 及 3, 6 wk 宰杀雌雄各 3 只及对照组 (空白 TE 溶液)1 只. 分离肺、肾、脾、肠系膜淋巴结、胸腺、生殖器官、十二指肠、大肠、血液、肌肉及肝脏等, 分离后的组织分别放入塑料口袋中封口, 在液氮中快速冷冻, 于 -80 ℃ 保存待用. 取 50 mg 的新鲜组织加入 DNA 提取缓冲液[0.4 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 2 mmol/L EDTA (pH8.0)], 用匀浆器彻底匀浆后, 加入 100 g/L 的 SDS 40 μL, 5 g/L 蛋白酶 K(终浓度 400 mg/L) 32 μL, 充分混匀后放入 55 ℃ 水浴锅中温浴 2 h, 加 6 mol/L NaCl 300 μL, 混匀, 10 000 rpm/min 离心 15min, 移上清到另一离心管中, 等体积的酚-氯仿抽提一次, 无水乙醇沉淀, 沉淀得到的 DNA 用 20 mg/L RNA 酶溶液 400 μL 溶解, 37 ℃ 水浴 30 min, 等体积的酚-氯仿、氯仿各抽提一次, 无水乙醇沉淀, 沉淀以 700 mL/L 的乙醇漂洗后用无菌水溶解. 检测 DNA 样品在 260 nm/280 nm 下的吸光度 A 值, 确保二者之比大于 1.8, 同时进行 5 g/L 的琼脂糖凝胶电泳确保 DNA 的完整性并无 RNA<sup>[17]</sup>.

1.2.1 PCR 扩增检测组织中质粒 DNA 采用两对引物分别扩增 pcDNA3s 质粒上部分抗原基因序列(antigen)和整个抗原基因序列(T7-SP6), 引物设计采用 oligo6.0, 引

物序列: Antigen, P1: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA 3'; P2: 5' TAG TTG ATG TTC CTG GAA GTA 3', 396 bp; T7-SP6, P3: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA 3', P4: 5' GAT TTA GGT GAC ACT ATAG 3', 1 065 bp. PCR 反应体积 50 μL, 含有 10 × 缓冲液(含 MgCl<sub>2</sub> 15 mmol/L), dNTP 各 200 μmol/L, 上下游引物各 100 pmol, DNA 模板 10 μL, TaqDNA 聚合酶 1 μL, 无菌去离子水 36 μL. PCR 扩增热循环条件如下: 第 1 个循环 95 ℃, 10 min; 第 2 个循环 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min 35 cycle; 第 3 个循环 72 ℃ 10 min 4 ℃ 保存. 每一种组织来源的样本均设立各自的参比对照系列.

1.2.2 质粒 DNA 整合情况检测 按上述方法抽提不同组织及不同时间的基因组 DNA. 将各组基因组 DNA 用 EcoRI 酶切, 使游离状态及多聚状态质粒变成线性单体(整合入基因组的质粒只能在酶切位点才将基因组切开, 而不能将质粒从基因组上切下来), 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳回收后再次 PCR 扩增. 在 1 μg 无灌胃质粒的鼠基因组 DNA 中加入不同拷贝数的阳性质粒, 用来评估质粒检测的敏感性.

1.2.3 粪便中筛选 pcDNA3s 质粒阳性克隆 收集不同时间的粪便, 重悬于 LB 液体培养基中, 37 ℃ 水浴温育 1 h 后, 涂布于含有 Ampicillin 的平板上, 24 h 后观察细菌菌落的生长情况.

统计学处理 应用 SPSS 统计软件进行方差分析统计学处理.

2 结果

2.1 pcDNA3s 质粒的组织分布 外源质粒在小鼠体内不同组织的质粒拷贝数水平不同, 得到阳性扩增条带为 396 bp 短片段 PCR 产物(结果见表 1、图 2-11). 用 T7、SP6 引物扩增组织每个时间点总 DNA 结果显示, 仅在极其个别的器官中检测到微弱的阳性条带, 绝大部分组织各时间点均呈阴性, 提示外源质粒在胃肠道环境下迅速被降解, 外源质粒仅以小片段形式进入机体(图 12).

表 1 不同组织的质粒 DNA 拷贝数水平比较

组织 时间	肺	肾	脾	肠系膜淋巴结	粪便	胸腺	生殖器官	肌肉	十二指肠	大肠	血液	肝脏
30 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 h	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3 h	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
6 h	+	+	+	+	++	+	+	+	++	ND	-	+
24 h	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	++
3 wk	+	+	-	++	+	+	-	++	-	ND	++	++
6 wk	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

+: 阳性; -: 阴性; ND: 未检测.

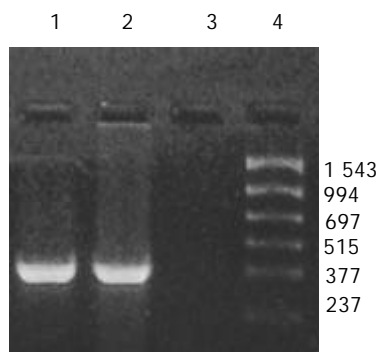


图1 质粒阳性与阴性对照 PCR 结果. 1: 灌胃质粒 pcDNA3s 溶液的小鼠组织 DNA; 2: 质粒 pcDNA3s; 3: 灌胃 TE 溶液的小鼠组织 DNA; 4: Marker.

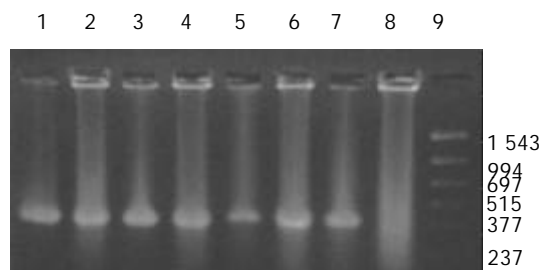


图2 灌胃 1 h 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 肺; 2: 肾; 3: 脾; 4: 肠系膜淋巴结; 5: 胸腺; 6: 生殖腺; 7: 肌肉; 8: 十二指肠; 9: Marker. Marker: 1: 1 543 bp; 2: 994 bp; 3: 697 bp; 4: 515 bp; 5: 377 bp; 6: 237 bp.

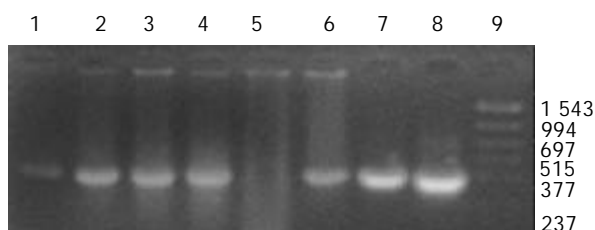


图3 灌胃 3 h 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 肺; 2: 肾; 3: 脾; 4: 十二指肠; 5: 肠系膜淋巴结; 6: 1 h 肝脏; 7: 3 h 肝脏; 8: 6 h 肝脏; 9: Marker.

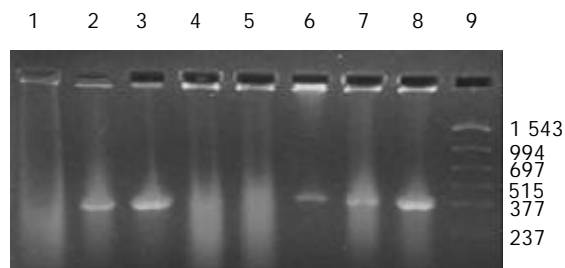


图4 1: 1 h 十二指肠; 2: 3 h 十二指肠; 3: 6 h 十二指肠; 4: 24 h 十二指肠; 5: 10 wk 十二指肠; 6: 3 h 粪便; 7: 3 h 大肠; 8: 3 h 肌肉; 9: Marker.

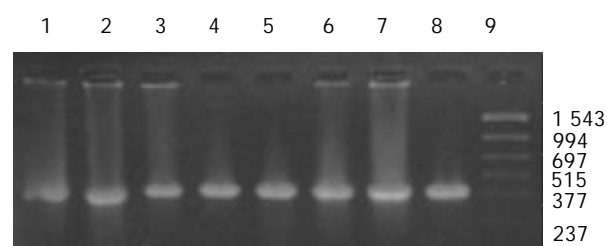


图5 灌胃 6 h 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 肺; 2: 肾; 3: 脾; 4: 肠系膜淋巴结; 5: 粪便; 6: 胸腺; 7: 生殖腺; 8: 肌肉; 9: Marker.

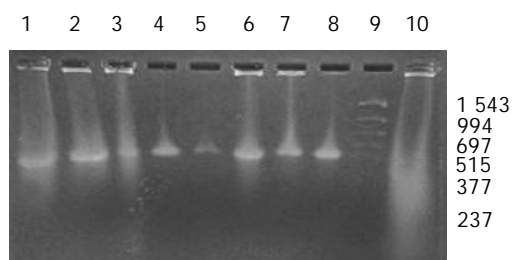


图6 灌胃 24 h 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 肺; 2: 肾; 3: 脾; 4: 肠系膜淋巴结; 5: 粪便; 6: 胸腺; 7: 生殖腺; 8: 肌肉; 9: Marker; 10: 大肠.

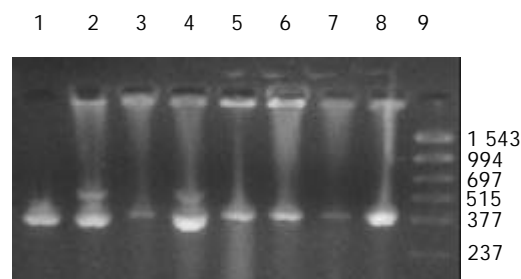


图7 灌胃 3 wk 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 肺; 2: 肾; 3: 脾; 4: 肠系膜淋巴结; 5: 粪便; 6: 胸腺; 7: 生殖腺; 8: 肌肉; 9: Marker.

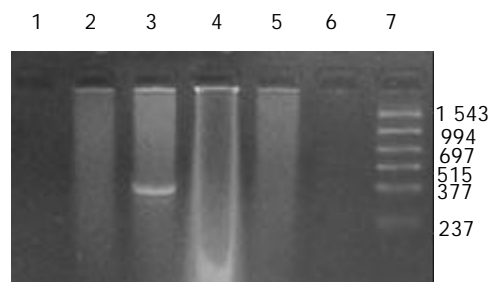


图8 灌胃 6 wk 后各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: 阴性对照; 2: 肝脏; 3: 肾脏; 4: 十二指肠; 5: 肌肉; 6: 阴性对照; 7: Marker.

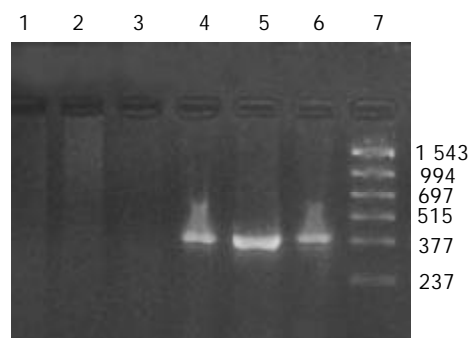


图9 不同时间血液的 PCR 扩增结果. 1: 1 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 24 h; 5: 3 wk; 6: 6 wk; 7: Marker.

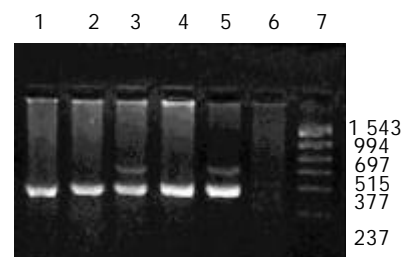


图10 不同时间肝脏的 PCR 扩增结果. 1: 1 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 24 h; 5: 3 wk; 6: 6 wk; 7: Marker.

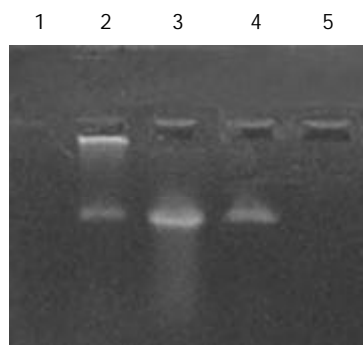


图 11 不同时间粪便的 PCR 扩增结果. 1: 1 h; 2: 3 h; 3: 6 h; 4: 24 h; 5: 3 wk.

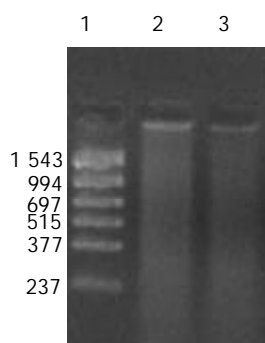


图 12 T7 和 SP6 引物扩增各组织 DNA 的 PCR 结果. 1: Marker; 2: 1 h 肺; 3: 6 h 脾.

**2.2 外源质粒 pcDNA3s 整合入宿主基因组** 提取 6 h 时肾脏及其生殖器官的总 DNA, 5 g/L 的琼脂糖凝胶分离宿主基因组与游离质粒, PCR 扩增纯化后的基因组 DNA, 可检测到微弱的阳性条带, 说明经口服摄入的外源质粒有可能整合入宿主基因组上. PCR 敏感性参照, 取 100, 50, 25, 10 拷贝质粒 DNA 加入到 1  $\mu$ g 基因组 DNA 中, 琼脂糖凝胶观察, 当质粒为 100, 50, 25 拷贝时 PCR 检测为阳性, 10 拷贝时检测为阴性, 说明 PCR 的灵敏度为 25 拷贝. 得到的阳性条带强度较 25 拷贝的 PCR 扩增结果弱, 外源质粒如整合入基因组中, 其拷贝数应低于 25 拷贝(图 13).

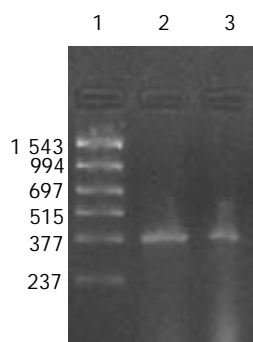


图 13 宿主基因组的 PCR 扩增结果. 1: Marker; 2: 6 h 肾; 3: 6 h 生殖腺.

**2.3 肠道中粪便细菌克隆筛选** 质粒 pcDNA3s 上带有 ampicillin 抗性基因, 因此用 ampicillin 来筛选粪便细菌中的阳性克隆, 37  $^{\circ}$ C 于琼脂平板上培养 24 h 后, 未

见到阳性克隆. 当然不能排除外源质粒能够被肠道细菌吸收, 但是不能在细菌中复制形成阳性菌落.

### 3 讨论

胃肠道是外源 DNA 进入哺乳动物机体的最主要途径, 肠上皮细胞的巨大表层为营养素和大分子物质(DNA)的吸收创造了条件<sup>[12-13]</sup>. 外源 DNA 随着食物的进入而被胃肠道大量吸收, 同时肠道细菌 DNA 及基因治疗 DNA 也是哺乳动物外源 DNA 的来源. 外源 DNA 经胃肠道吸收后代谢命运及吸收机制一直是人们关心的话题. 黏膜表面, 特别是肠道上段含有大量的抗原递呈细胞、树状细胞、巨噬细胞和 B 淋巴细胞<sup>[12-13]</sup>. 他们可以通过胞饮或吞噬作用吞食 DNA. 一旦被激活, 树状细胞迁移到淋巴组织中, 特异性递呈抗原到 T 和 B 淋巴细胞上, 诱导抗原特异性免疫应答. 残留在肠道中的一小部分 DNA 碎片直接通过上皮细胞或免疫系统的抗原递呈细胞被小肠黏膜吸收. 如果肠道上皮表面受到破坏, DNA 和其他大分子可以向固有层扩散. 说明大部分 DNA 能够被组织巨噬细胞、免疫系统的树状细胞或其他末端分化吞噬细胞所吞噬<sup>[14]</sup>. 外源 DNA 如细菌 DNA 和质粒 DNA 上含有非甲基化 CpG 基序, 可与胃肠道中免疫细胞上的 TLR9 受体作用, 从而引发免疫应答.

DNA 是一种较为稳定的大分子物质, 能够在极端环境下存在, 并且能够在有机体残骸中存在成千上万年<sup>[1-2]</sup>. 那么外源 DNA 是否能抵抗哺乳动物胃肠道的酶系统是个令人关注的问题. 我们结果表明, 外源质粒 pcDNA3s 经胃肠道吸收后, 能够抵抗胃肠道及机体核酸酶的降解, 以碎片形式广泛分布全身各个器官中, 并且在组织中存留较长的时间. 外源质粒给药后在体内的拷贝数水平呈动态变化(见图 2-11). 灌胃后 1 h, 即可在体内检测到质粒的存在, 并且一直持续到 3-6 wk, 仅在肾脏及血液中发现质粒的存在. 3-24 h 内, 可检测出外源质粒在粪便中存在, 至 6 h 时质粒浓度达到最高 ( $P < 0.01$ )(图 11). 随着时间的推移, 外源质粒在肝脏中的拷贝数水平有增加的趋势. 质粒在肺中 24 h 时, 累积浓度达到最高. 质粒浓度在肾脏中各时间点变化不明显. 脾脏在 1 h、3 h 时质粒的浓度较高, 6 h 时开始逐渐减弱 ( $P < 0.05$ ), 24 h 时急剧减弱 ( $P < 0.01$ ), 至 3 wk 时已无质粒检出. 肠系膜淋巴结至 3 wk 时质粒累积浓度达到最高 ( $P < 0.01$ ), 而且较其他器官高, 肠系膜作为肠道系统的免疫器官, 可识别外源抗原物质(如 DNA), 因此肠系膜也是外源质粒的主要累积器官. Schubert 研究表明外源 M13 由肠黏膜上皮细胞吸收, 经肠系膜淋巴结递呈各个器官中, 肠系膜淋巴结也是外源 DNA 进入机体的一个主要通道<sup>[4]</sup>. 与其他器官相比, 胸腺在 1 h 时质粒的浓度相对较低, 其他时间点质粒浓度无显著差别. 外源质粒在生殖器官中的浓度在 1 h、3 h、6 h 保持较高的浓度, 24 h 开始减弱, 至 3 wk 时降为零. 外源质粒可在生殖器官中累积, 因此外源质粒是否可以

通过生殖系统遗传给下一代值得进一步探讨<sup>[15]</sup>。肌肉中的质粒浓度一直较高,至3 wk时仅次于肠系膜淋巴结。这与肌纤维细胞具有特殊的结构,较易吸收外源质粒及递呈抗原有关。

我们采用裸 pcDNA3s 为研究对象, Blast 同源性分析及 PCR 阴性对照结果表明(图 1), PCR 扩增目的片段与小鼠基因组、大肠杆菌及食物基因组无同源性序列,保证了扩增的特异性及可行性。质粒 pcDNA3s 作为一种真核表达载体,同时也为口服 DNA 疫苗提供了试验依据。口服灌注质粒 pcDNA3s 后,我们观察到了外源质粒在体内各个组织器官中的广泛分布,随着时间的分布呈动态变化,并持续较长的时间,质粒在体内存留的最长时间与 Schubert et al (1997)<sup>[4]</sup>研究结果有所差异,可能与载体系统、载体大小及给药数量差异有关。实验表明外源质粒能够抵抗胃肠道核酸酶的降解,肠道对外源质粒 DNA 并不是不可逾越的屏障。

进入细胞的外源质粒一部分以游离体形式存在于胞质中,一部分进入细胞核整合入宿主染色体中<sup>[7]</sup>。我们发现微弱的外源质粒特异性条带,初步说明经胃肠道吸收后外源质粒会整合到宿主染色体基因组。Schubert et al (1997)将插入有 M13DNA 的老鼠脾细胞 DNA 重克隆至质粒载体中,也分离出 1.3 kb M13 DNA 片段, DNA 序列分析发现与该片段共价相连的 DNA 与老鼠 IgE 受体基因有 70% 的同源性。但是与 PCR 敏感性参照比较,整合的外源质粒低于 25 拷贝。如果以 30 个拷贝数来进行计算,也就是外源质粒进入宿主细胞后,在 1  $\mu$ g 细胞染色体 DNA 中引起基因突变的最大可能性为 30。小鼠的 1 个细胞染色体组大约含有  $3 \times 10^9$  个碱基对,重量为 6 g,那么 1  $\mu$ g 的染色体组大约含有  $1.5 \times 10^5$  的染色体组。实际上,哺乳动物染色体组中的基因是不断地发生着自发突变,只要其发生的概率对于每一个基因来说不超过  $10^{-6}$ ,就不会对哺乳动物的健康造成影响。由于每个细胞染色体组中大约含有  $7.5 \times 10^4$  个基因,那么  $1.5 \times 10^5$  个细胞染色体组就含有  $11.25 \times 10^9$  个基因,如果外源 DNA 在  $1.5 \times 10^5$  个细胞染色体中造成 30 次突变,那么他的突变概率就是  $2.7 \times 10^{-9}$ 。根据计算的结果和正常所容许的基因突变概率  $10^{-6}$  相比,外源质粒 DNA 经胃肠道吸收后可能引起的基因突变概率要比细胞的自发突变率低 2 700 倍<sup>[16-32]</sup>。因此认为外源质粒即使有可能和细胞染色体组的 DNA 发生随机整合,对于其安全性也是不足为虑的。

外源质粒 DNA 作为大分子通过胃肠道途径摄入后被不完全降解后吸收,以碎片形式分布于全身各个组织中。外源 DNA 经肠黏膜吸收机制还不清楚,肠黏膜上的 M 细胞或淋巴细胞是否作为外源 DNA 穿透肠壁的主要通道,肠黏膜细胞上是否存在 DNA 结合蛋白介导外源 DNA 的吸收,不同的生理状态下外源 DNA 的吸收情况等还有待于深入研究。外源 DNA 经胃肠道吸收后可能整合到宿主基因组上,引起基因组突变及甲基化等

不可预见后果。因此,外源 DNA 在哺乳动物中的吸收代谢必然会影响宿主基因组的功能,从而对哺乳动物的进化产生影响。

#### 4 参考文献

- Doerfler W, Schubert R. Uptake of foreign DNA from the environment: the gastrointestinal tract and the placenta as portals of entry. *Wien Klin Wochenschr* 1998;110:40-44
- Doerfler W. Foreign DNA in mammalian systems. Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto 2000:147-156
- Doerfler W, Remus R, Muller K, Heller H, Hohlweg U, Schubert R. The fate of foreign DNA in mammalian cells and organisms. *Dev Biol (Basel)* 2001;106:89-97
- Schubert R, Renz D, Schmitz B, Doerfler W. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:961-966
- Schubert R, Hohlweg U, Renz D, Doerfler W. On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol Gen Genet* 1998;259:569-576
- Hohlweg U, Doerfler W. On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol Genet Genomics* 2001;265:225-233
- Palka-Santini M, Schwarz-Herzke B, Hosel M, Renz D, Auerbach S, Brondke H, Doerfler W. The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins. *Mol Genet Genomics* 2003;270:201-215
- Doerfler W, Hohlweg U, Muller K, Remus R, Heller H, Hertz J. Foreign DNA integration-perturbations of the genome-oncogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:276-288
- Muller K, Heller H, Doerfler W. Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes. *J Biol Chem* 2001;276:14271-14278
- Remus R, Kammer C, Heller H, Schmitz B, Schell G, Doerfler W. Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *J Virol* 1999;73:1010-1022
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001:26-50
- Ren JM, Zou QM, Wang FK, He Q, Chen W, Zen WK. PELA microspheres loaded *H pylori* lysates and their mucosal immune response. *World J Gastroenterol* 2002;8:1098-1102
- Cen XQ, Zhang WD, Song YG, Zhou DY. Induction of apoptosis of lymphocytes in rat mucosal immune system. *World J Gastroenterol* 1998;4:19-23
- Beever DE, Kemp CF. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutri Abstr Rev* 2000;70:175-182
- Kang KK, Choi SM, Choi JH, Lee DS, Kim CY, Ahn BO, Kim BM, Kim WB. Safety evaluation of GX-12, a new HIV therapeutic vaccine: investigation of integration into the host genome and expression in the reproductive organs. *Intervirology* 2003;46:270-276
- Haworth R, Pilling AM. The PCR assay in the preclinical safety evaluation of nucleic acid medicines. *Hum Exp Toxicol* 2000;19:267-276
- Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd, Harper LB, Schock HB, Zhang H, Faris JE, Way PA, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA. *Dev Biol (Basel)* 2000;104:33-43
- Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd, Harper LB, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into

- host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology* 2000;43:258-272
- 19 Manam S, Ledwith BJ, Barnum AB, Troilo PJ, Pauley CJ, Harper LB, Griffiths TG 2nd, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Pacchione SJ, Wang Z, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* 2000;43:273-281
- 20 Wang Z, Troilo PJ, Wang X, Griffiths TG, Pacchione SJ, Barnum AB, Harper LB, Pauley CJ, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Rizzuto G, Ciliberto G, Fattori E, Monica NL, Manam S, Ledwith BJ. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther* 2004;15(in press)
- 21 Vandegraaff N, Kumar R, Burrell CJ, Li P. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV) DNA integration in acutely infected cells as determined using a novel assay for detection of integrated HIV DNA. *J Virol* 2001;75:11253-11260
- 22 Lin NT, Chang RY, Lee SJ, Tseng YH. Plasmids carrying cloned fragments of RF DNA from the filamentous phage (phi)Lf can be integrated into the host chromosome via site-specific integration and homologous recombination. *Mol Genet Genomics* 2001;266:425-435
- 23 Oh YK, Kim JP, Hwang TS, Ko JJ, Kim JM, Yang JS, Kim CK. Nasal absorption and biodistribution of plasmid DNA: an alternative route of DNA vaccine delivery. *Vaccine* 2001;19:4519-4525
- 24 Imboden M, Shi F, Pugh TD, Freud AG, Thom NJ, Hank JA, Hao Z, Staelin ST, Sondel PM, Mahvi DM. Safety of interleukin-12 gene therapy against cancer: a murine biodistribution and toxicity study. *Hum Gene Ther* 2003;14:1037-1048
- 25 Mooney DA, Liljestrom P, Todd D, Atkins GJ. Semliki Forest virus-based vaccines: persistence, distribution and pathological analysis in two animal systems. *Vaccine* 2001;19:1978-1988
- 26 Lunsford L, McKeever U, Eckstein V, Hedley ML. Tissue distribution and persistence in mice of plasmid DNA encapsulated in a PLGA-based microsphere delivery vehicle. *J Drug Target* 2000;8:39-50
- 27 Parker SE, Monteith D, Horton H, Hof R, Hernandez P, Vilalta A, Hartikka J, Hobart P, Bentley CE, Chang A, Hedstrom R, Rogers WO, Kumar S, Hoffman SL, Norman JA. Safety of a GM-CSF adjuvant-plasmid DNA malaria vaccine. *Gene Ther* 2001;8:1011-1023
- 28 Bureau MF, Naimi S, Torero Ibad R, Seguin J, Georger C, Arnould E, Maton L, Blanche F, Delaere P, Scherman D. Intramuscular plasmid DNA electrotransfer. Biodistribution and degradation. *Biochim Biophys Acta* 2004;1676:138-148
- 29 Hulse DJ, Romero CH. Fate of plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus VP2 capsid protein gene after injection into the pectoralis muscle of the chicken. *Poult Sci* 2002;81:213-216
- 30 Imboden M, Shi F, Pugh TD, Freud AG, Thom NJ, Hank JA, Hao Z, Staelin ST, Sondel PM, Mahvi DM. Safety of interleukin-12 gene therapy against cancer: a murine biodistribution and toxicity study. *Hum Gene Ther* 2003;14:1037-1048
- 31 Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, Otten GR, Ulmer JB, Donnelly JJ, Ott G, McDonald DM. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol* 2000;165:2850-2858
- 32 Al-Qarawi AA, Ali BH, Al-Mougy SA, Mousa HM. Gastrointestinal transit in mice treated with various extracts of date (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Chem Toxicol* 2003;41:37-39

## World Journal of Gastroenterology 电子版

《World Journal of Gastroenterology, WJG》网(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)于2003-04-15开通, 截止2003-10-26 点击率已达 452392 人次. WJG 电子版由以下7个栏目组成. (1) 期刊介绍: 编委成员, 编委成员简介, 编辑, 检索系统收录, 影响因子. (2) 出版: 出版, 版权, 征订. (3) 投稿: 投稿细则、文献综述、研究论文、研究快报、病例报告等的书写格式. (4) 新闻: IM 收录期刊、JCR 报道的影响因子. (5) 投稿查询: 提交用户名和密码, 可查询到稿件的全部流程, 共计28项. (6) 电子期刊: 现刊和过刊(1995-2003), 全刊索引. WJG 电子期刊功能包括 HTML、PDF、摘要、相关性文献、被引频次、点击次数、下载次数、评论等. (7) 参考文献链接: WJG 对刊出论文的全部参考文献与原文的首页进行校对, 保证了每条参考文献的作者、题名、年、卷号、页码、PMID 等内容正确性, 并与 PubMed 和 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp> 中的摘要及全文进行链接, 提高了参考文献的引用准确性, 也方便了读者查阅参考文献的全文及摘要.



# 高胆固醇血症兔 Oddi 括约肌张力的变化机制

张孝勇, 魏经国, 马进, 王莎, 马孝武, 马克军, 王亚蓉

张孝勇, 魏经国, 马克军, 王亚蓉, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科 陕西省西安市 710038  
马进, 马孝武, 中国人民解放军第四军医大学航空航天生理学教研室 陕西省西安市 710032  
王莎, 中国人民解放军第四军医大学西京医院血液科 陕西省西安市 710032  
张孝勇, 男, 1974-12-10 生, 山东省济南市人, 汉族. 1998 年第四军医大学本科毕业, 2001 年第四军医大学硕士研究生, 主要从事胆系疾病的分子病理学研究.  
陕西省自然科学基金资助项目, No. 2002C2-19  
项目负责人: 魏经国, 710038, 陕西省西安市霸桥区新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科. pistol\_zhang@sina.com.cn  
电话: 029-83373135 传真: 029-83377163  
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2003-12-22

## Mechanisms of tension changes of the sphincter of Oddi from hypercholesterolemic rabbits

Xiao-Yong Zhang, Jing-Guo Wei, Jin Ma, Sha Wang, Xiao-Wu Ma, Ke-Jun Ma, Ya-Rong Wang

Xiao-Yong Zhang, Jing-Guo Wei, Ke-Jun Ma, Ya-Rong Wang, Department of Radiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shannxi Province, China  
Jin Ma, Xiao-Wu Ma, Department of Aerospace Physiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China  
Sha Wang, Department of Hematology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China  
Supported by Shannxi Provincial Natural Science Foundation, No. 2002C2-19  
Correspondence to: Jing-Guo Wei, Department of Radiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shannxi Province, China. pistol\_zhang@sina.com.cn  
Received: 2003-11-18 Accepted: 2003-12-22

## Abstract

**AIM:** To observe the effects of hypercholesterolemia (HC) on tension of sphincter of Oddi (SO) in rabbits and to study the mechanisms of the sphincter of Oddi dysfunction (SOD).

**METHODS:** Twenty-four New Zealand female rabbits were divided randomly into control group and HC group (12 rabbits each). Sphincter of Oddi muscle rings were dissociated from both groups *in vitro*. Automatic contractility was observed firstly. Then the contraction responses evoked by KCl and CaCl<sub>2</sub> and relaxation responses caused by sodium nitroprusside (SNP) and nifedipine (Nif) were measured.

**RESULTS:** Compared with control group, the automatic contractile frequency of HC group was increased ( $P < 0.05$ ), and the automatic contractile amplitude of HC group was decreased ( $P < 0.05$ ). The tension of SO rings evoked by KCl at low and moderate concentrations (10-40 mmol/L) was significantly higher in HC group than in control group ( $P < 0.01$ ). The maximum tension was not found difference between two groups, and both could be completely relaxed by Nif (3  $\mu$ mol/L). Compared with the control group,

relaxation responses of SO rings in HC group to SNP (0.1 nmol/L-1 mmol/L) were markedly decreased after the administration of KCl (60 mmol/L) in HC group ( $P < 0.01$ ). The minimum solution value (0.1 mmol/L) of Ca<sup>2+</sup> evoking contraction in HC group was evidently lower than that of the control group (1.0 mmol/L) ( $P < 0.001$ ). Tensions of SO rings evoked by Ca<sup>2+</sup> (2.5 mmol/L) were entirely relaxed by Nif (3  $\mu$ mol/L) both in HC group and control group. After the administration of KCl (60 mmol/L) relaxation responses of rabbit SO rings to Nif (0.1 nmol/L-3  $\mu$ mol/L) were not found difference between in the two groups. Nif (3  $\mu$ mol/L) could completely inhibit the contraction responses evoked by KCl or CaCl<sub>2</sub> in both groups.

**CONCLUSION:** Hypercholesterolemia can lead to SO dysfunction and increase the sensitivity of SO to KCl at low and moderate concentrations *in vitro*. The overloading of intracellular Ca<sup>2+</sup> is an important reason for these phenomena, which has no direct relation with L-type voltage-dependent calcium channels of smooth muscle cells.

Zhang XY, Wei JG, Ma J, Wang S, Ma XW, Ma KJ, Wang YR. Mechanisms of tension changes of the sphincter of Oddi from hypercholesterolemic rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1114-1118

## 摘要

**目的:** 观察高胆固醇血症(hypercholesterolemia, HC)兔离体 Oddi 括约肌(sphincter of oddi, SO)张力的变化, 探讨其作用机制.

**方法:** 新西兰雌兔24只随机分成两组: 对照组和HC模型组各 12 只, 分别取两组 SO 制备成离体肌环, 观察 SO 的自主收缩运动及其对 KCl 和 Ca<sup>2+</sup> 的收缩反应, 以及对硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)和硝苯吡啶(nifedipine, Nif)的舒张反应.

**结果:** HC 组的自主收缩频率高于对照组( $P < 0.05$ ,  $t = 2.86$ ), 自主收缩波幅较对照组降低( $P < 0.05$ ,  $t = 2.48$ ). 以 10 mmol/L 为浓度梯度累积加入 KCl 至 90 mmol/L, HC 组对低浓度 KCl (10-40 mmol/L) 收缩反应高于对照组( $P < 0.01$ ,  $t = 4.01$ ); 两组最大收缩力无显著差异, 且均可被 3  $\mu$ mol/L Nif 完全缓解. 用 60 mmol/L KCl 预收缩 SO 肌环后加入 SNP (0.1 nmol/L-1 mmol/L), 在各个浓度点 HC 组的舒张反应均明显低于对照组( $P < 0.01$ ,  $t = 5.12$ ). SO 肌环在无钙 Krebs 液中温育 5 min 后复钙引起两组明显收缩反应所需的 Ca<sup>2+</sup> 浓度分别为 0.1 和 1.0 mmol/L, HC 组显著低于对照组( $P < 0.01$ ,  $t = 4.91$ ); 复钙 2.5 mmol/L 诱发两组肌环的收缩反应均可被 3  $\mu$ mol/L Nif 完全缓解. 用 60 mmol/L KCl 预收缩 SO 肌环后加入 Nif, 两组对 Nif (0.1 nmol/L-3  $\mu$ mol/L)

的舒张反应在各个浓度点均无明显差别. 在Krebs液中先加入 3  $\mu\text{mol/L}$  Nif, 再加入 KCl,  $\text{CaCl}_2$ , 两组肌环均未发生收缩反应.

结论: 在离体条件下, HC 可导致 SO 张力异常, SO 处于易激惹状态, 其机制与 SO 细胞内钙离子浓度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )过载有关, 而该过载状态与 L 型电压依赖性钙通道(L-type Voltage-dependent calcium channels, L-VDCs)无关.

张孝勇, 魏经国, 马进, 王莎, 马孝武, 马克军, 王亚蓉. 高胆固醇血症兔 Oddi 括约肌张力的变化机制. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1114-1118

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1114.asp>

## 0 引言

胆系疾病近年来不断增多<sup>[1-5]</sup>, 已成为研究热点<sup>[6-10]</sup>. 然而高胆固醇血症(HC)对胆管系统影响的研究少见. Wei et al<sup>[11]</sup>在研究 HC 对 SO 运动功能的影响中发现, 经胆固醇(cholesterol, Ch)饲养 4 wk 后, HC 兔 SO 压力增高且收缩幅度下降, 舒张功能受损, 提示 HC 可引起 SO 舒缩功能异常. Wang et al<sup>[12]</sup>通过 SO 细胞原代培养证实, HC 可致细胞内钙离子浓度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )呈过载状态, 但机制尚不明确. 我们通过制备 SO 肌环, 用灌流法在离体条件下观察 HC 对兔 SO 肌环张力的影响, 初步探讨其发生机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 新西兰雌兔由第四军医大学实验动物中心提供; 胆固醇(Ch)分析纯, 购自上海化学试剂公司; NaCl, KCl,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 葡萄糖, 二甲基亚砜(DMSO)分析纯, 购自西安化学试剂厂; 硝普钠(sodium nitroprusside, SNP), 硝苯吡啶(nifedipine, Nif), EGTA,  $\text{CaCl}_2$  购自美国 Sigma 公司; 张力换能器 JZ-BK 型, 购自中国贝科公司; 台式自动平衡记录仪 XWTD464 型, 购自上海大华仪表厂; 电子天平 ACA-100 型, 购自美国 Denver 公司; 解剖显微镜 PM-6 型, 购自日本 Olympus 公司.  $\text{♀}$ 新西兰兔 24 只, 2-3 mo, 体质量 1.8-2.2 kg, 随机分为 2 组, 每组 12 只. 对照组(Control)饲以标准饲料, 实验组(HC)饲以标准饲料+Ch. 1 g/d, 每周 6 d, 停喂 1 d, 共 8 wk. 高 Ch 血症模型判定标准[人类疾病的动物模型 1982: 120-129]: 兔血清总 Ch 浓度小于 3.0 mmol/L 为正常, 大于 10 mmol/L 为达到高 Ch 血症标准. 实验开始前将血清总 Ch 大于 3.0 mmol/L 兔剔除.

1.2 方法 经耳缘静脉注入约 10 mL 空气处死兔, 迅速分离 SO 段, 在解剖显微镜下小心去除 SO 周围脂肪与结缔组织, 取其近心段并修剪成横径为 4 mm 的肌环. 肌环一端藉不锈钢丝挂钩固定于肌槽底部的挂钩上, 另一端通过挂钩与肌肉张力换能器相连. 肌槽内盛 37  $^{\circ}\text{C}$  Krebs 液, 并持续充以 50 mL/L  $\text{CO}_2$ + 950 mL/L  $\text{O}_2$  混合气. Krebs 液组成(mmol/L): NaCl 115.0, KCl 5.9,

$\text{NaHCO}_3$  22.8,  $\text{MgCl}_2$  1.2,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  2.5, 葡萄糖 10.0, pH= 7.4. 另每组随机选取 2 例沿横轴切取宽约 4 mm 肌环进行光镜观察, 标本用 40 g/L 甲醛固定, HE 染色组织学检查.

1.2.1 SO 肌环反应性测定 将肌环置于 Krebs 液中温育, 首先给予 0.6 g 初始前负荷, 在平衡的过程中, 通过旋钮不断调节张力, 使其稳定在初始前负荷水平, 每隔 20 min 换 1 次 Krebs 液. 平衡 60 min 后以 60 mmol/L KCl 为激动剂, 以 0.2 g 为步幅逐步提高前负荷值至其产生最大收缩反应, 此时的静息张力即为最适静息张力, 随后实验均在各肌环最适静息张力下进行. 首先记录两组的自主收缩波幅和频率, 绘制波形曲线. 收缩反应通过加入累积浓度的 KCl (10-90 mmol/L)测得, 记录不同浓度肌环的收缩反应. 舒张反应测定是先用 60 mmol/L 的 KCl 预收缩肌环, 等收缩力平稳后, 加入累积浓度 (0.1 nmol/L-1 mmol/L)的 SNP 同时记录不同浓度下肌环的舒张反应, 用同样的方法纪录累积浓度 (0.1 nmol/L-3  $\mu\text{mol/L}$ )的 Nif 的舒张反应. 其舒张作用以所引起的舒张幅度占 KCl 预收缩幅度的百分比表示. 肌张力变化经张力换能器转换为电信号后由台式自动平衡记录仪记录. 由所得数据绘制累积浓度-效应曲线.

1.2.2 复钙对肌环收缩反应的观察 肌环在无钙 Krebs(含 EGTA, 50  $\mu\text{mol/L}$ )液温育的方式有 2 种[中国病理学与毒理学杂志 1996;10(1):34-38]: (1) 5 min, 完全去除细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  而不影响细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  释放; (2) 1 h, 导致细胞内钙耗竭. 按第 1 种方式温育 5 min, 换上不含 EGTA 的无钙 Krebs 液, 然后加累积浓度  $\text{CaCl}_2$  (0.01-2.5 mmol/L), 记录两组肌环的收缩反应. 然后按第 2 种方式温育 1 h, 按相同方法记录肌环对  $\text{CaCl}_2$  的收缩反应. 实验结束后, 用滤纸吸干肌环表面水分, 用电子天平称重.

统计学处理 采用统计软件 SPSS10.0 进行数据的统计学分析. 实验数据以  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 两组间数据比较采用 t 检验,  $P < 0.05$  为差异显著.

## 2 结果

两组 SO 肌环的外径、长度、质量均无显著差异(表 1). 光镜下观察各组 SO 平滑肌均排列规整, 未见明显的炎细胞浸润和纤维组织增生.

表 1 高胆固醇血症组与对照组 SO 肌环物理参数( $n=12$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ )

分组	外径 (mm)	长度 (mm)	重量 (mg)
对照组(Control)	$1.52 \pm 0.03$	$4.23 \pm 0.07$	$2.12 \pm 0.09$
实验组 (HC)	$1.48 \pm 0.04$	$4.21 \pm 0.07$	$2.13 \pm 0.08$

2.1 SO 自主收缩波幅及频率 将肌环置于 Krebs 液中平衡 30 min, 待 SO 肌环自主收缩平稳后, HC 组的 SO 肌环的自主收缩频率高于对照组( $P < 0.05$ ), 而自主收缩波幅较对照组降低( $P < 0.05$ ) (表 2). 对照组自主收缩波形规则、频率稳定, 而 HC 组呈大小不一、宽窄不

等的不规则波形(图1).

表2 两组 SO 肌环的平均自主收缩波幅和频率( $n=12$ , mean $\pm$ SD)

分组	频率(f/min)	波幅(g)
对照组(Control)	8.0 $\pm$ 0.6	0.21 $\pm$ 0.02
实验组(HC)	9.3 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,  $t = 2.86$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ,  $t = 2.48$  vs Control.

对照组



HC 组



图1 兔 SO 肌环自主收缩波形曲线.

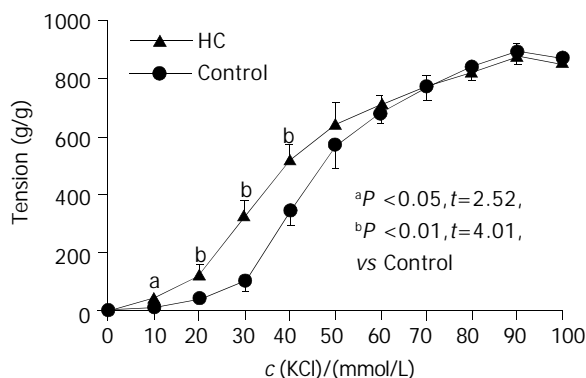


图2 HC 组和对照组兔 SO 肌环对 KCl 的收缩反应.

**2.2 KCl 和复钙所致 SO 肌环的收缩反应** 低浓度(10-40 mmol/L) KCl 诱发 HC 组 SO 肌环的收缩力较对照组显著提高. 10 mmol/L 时 HC 组为  $40 \pm 10$  g/g 较对照组增加 45% ( $P < 0.05$ ); 20 mmol/L 时 HC 组为  $120 \pm 30$  g/g 较对照组增加 67% ( $P < 0.01$ ); 30 mmol/L 时 HC 组为  $340 \pm 60$  g/g 较对照组增加 85% ( $P < 0.01$ ); 40 mmol/L 时 HC 组为  $510 \pm 80$  g/g 较对照组增加 57% ( $P < 0.01$ ); 50 mmol/L, HC 组为  $640 \pm 80$  g/g, 与对照组无明显差异; 在 60, 70, 80, 90 mmol/L 等浓度点, 两组亦无显著差异. 可见两组 SO 肌环对 KCl 最大收缩力无显著差异(图2).

肌环在无钙 Krebs 液(含 EGTA 50  $\mu$ mol/L)温育 5 min 后换上不含 EGTA 的无钙 Krebs, 从 0.01 mmol/L 开始复钙, 当至 0.1 mmol/L 时, 可引发 HC 组明显的收缩, 幅度为 20.0 g/g, 而对照组未发生明显收缩反应; 复钙至 0.4 mmol/L, HC 组收缩幅度为  $60.0 \pm 10.0$  g/g, 对照组仍未见明确收缩反应; 复钙至 1.0 mmol/L, 可引发对照组幅度为  $65.0 \pm 10.0$  g/g 的收缩反应, HC 组为  $95.0 \pm 20.0$  g/g, HC 组明显高于对照组( $P < 0.01$ ); 继续复钙至 2.5 mmol/L, 两组的收缩反应差别不明显. 由此可见,

能引发 HC 组和对照组收缩反应对应的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度分别为 0.1 和 1 mmol/L, HC 组显著低于对照组( $P < 0.001$ , 图3). 洗脱后, 两组肌环在无钙 Krebs(含 EGTA 50  $\mu$ mol/L)液温育 1 h 后换成不含 EGTA 的无钙 Krebs, 重新复钙 2.5 mmol/L, 两组肌环均发生收缩反应, 上述收缩反应均可被 3  $\mu$ mol/L Nif 完全缓解.

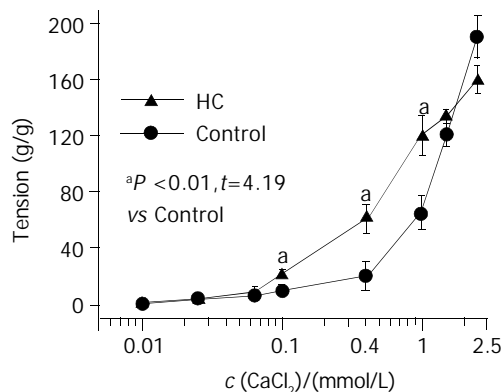


图3 复  $\text{Ca}^{2+}$  引发 HC 组及对照组的收缩反应.

**2.3 SO 肌环对 SNP 及 Nif 的舒张反应** 先用 60 mmol/L KCl 预收缩肌环, 等收缩力平稳后, 加入累积浓度(0.1 nmol/L-1 mmol/L)的 SNP, 记录不同浓度下肌环舒张的百分率, 与对照组相比, HC 组 SO 肌环对 SNP 的舒张反应在各浓度点明显降低. 在 1  $\mu$ mol/L, HC 组舒张率为 21.4%, 较对照组降低 32.0% ( $P < 0.01$ ); 10  $\mu$ mol/L 时, HC 组舒张率为 45.9%, 较对照组降低 46.0% ( $P < 0.01$ ); 0.1 mmol/L 时, HC 组舒张率为 67.7%, 较对照组降低 32.0% ( $P < 0.01$ ); 1 mmol/L 时, HC 组舒张率为 75.2%, 较对照组降低 35.0% ( $P < 0.01$ , 图4). 上述结果表明 HC 组对 SNP 舒张反应在各个浓度点较对照组均下降.

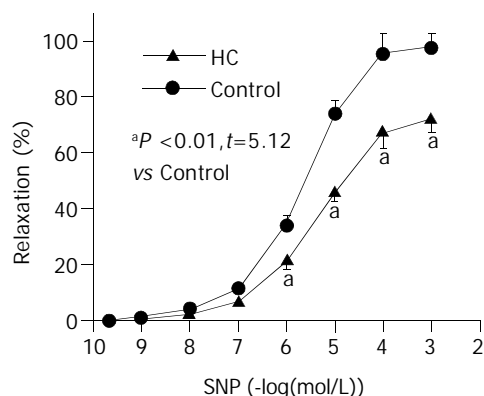


图4 HC 组和对照组兔 SO 肌环对 SNP 的舒张反应.

用 60 mmol/L KCl 预收缩肌环, 等收缩力平稳后, 加入累积浓度(0.1 nmol/L-1, 2, 3  $\mu$ mol/L)的 Nif, 记录不同浓度下肌环舒张的百分率, 两组在各个浓度点对 Nif 的舒张反应均无明显差异, 3  $\mu$ mol/L Nif 可 100% 舒张两组 SO 肌环. 反之, 在 Krebs 液中先加入 3  $\mu$ mol/L Nif, 然后分别加入 60 mmol/L KCl 和 2.5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  预刺激, 发现两组 SO 肌环均未发生收缩反应,

且节律性收缩运动消失. 洗脱后继续温育 30 min, 待自主运动恢复正常, 加入 60 mmol/L KCl, 两组均可达到最大收缩幅度, 分别加入 3  $\mu\text{mol/L}$  Nif, 两组均可完全舒张(图 5).

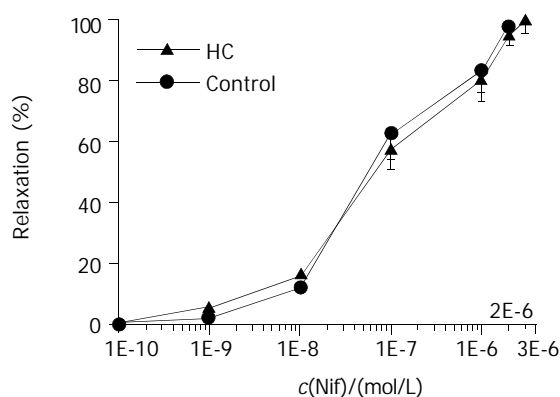


图5 HC组和对照组兔SO肌环对Nif的舒张反应.

### 3 讨论

Oddi括约肌包绕于胰胆管汇合进入十二指肠处, 是独立于十二指肠壁平滑肌、具有精细分工的肌性结构, 在神经与激素的共同作用下, 产生协调的舒缩运动, 对调节胆囊充盈、控制胆汁排出及维持胆道系统正常压力具有重要作用. 已经证实胆囊切除术后可诱发其功能紊乱, 进一步研究发现胆囊切除术前可能已经存在SO肌动力异常. 1997年Szilvassy et al<sup>[13]</sup>首次报道HC和高甘油三酯血症合并Oddi括约肌功能紊乱(sphincter of oddi dysfunction, SOD)的病例. SOD可诱发胆道疾病、胰腺疾病及胃肠道等疾病的发生<sup>[14]</sup>. HC可损害兔SO的舒张功能<sup>[15]</sup>, 可能是原发性SOD的重要诱因之一. 相继的实验研究<sup>[16-18]</sup>表明HC可导致兔SO压力增高, 舒张功能受损, 提示HC可引起SO舒缩功能异常. Wei et al<sup>[19]</sup>研究证实, HC所致的SOD的组织结构与单纯胆囊切除术后犬SOD组织结构具有惊人的一致性. 但到目前为止有关HC与SOD的关系仍有许多不明之处.

本组实验结果显示, HC组兔SO肌环自主收缩运动发生改变, 其特征为收缩波幅降低, 波形不规则, 呈大小不一、频率不等的杂乱波形, 但两组最大收缩幅度无明显差别. 进一步研究发现, 浓度为10-40 mmol/L KCl诱发HC组SO肌环的收缩力较对照组显著提高. KCl的主要作用是破坏细胞内外电化学平衡, 使细胞膜去极化, 激活L-VDCs, 引发 $\text{Ca}^{2+}$ 内流, 提高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , 触发平滑肌收缩. 在这一调节过程中, 细胞的极化状态是关键因素之一. 本组结果显示在低浓度KCl的刺激下HC组SO的反应性提高, 似可提示实验组SO细胞质膜更易发生去极化. 进一步研究表明, HC组SO肌环对平滑肌舒张剂SNP的舒张反应在各个浓度点较对照组均明显降低, 其最大舒张率也显著下降, 而组织学检查HC组SO未见纤维化改变. 上述结果证实HC可导致SO张力功能异常, 且SO肌环对激动剂的反应呈明显易激惹

状态.

Theilmeier et al<sup>[20]</sup>发现HC损害了血管平滑肌的舒张功能. Fleischhacker et al<sup>[21]</sup>在观察血管平滑肌舒张功能时发现, HC确可提高血管平滑肌的反应性, 并提出其可能原因是细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 分布的改变所致. 由于平滑肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的动态平衡以及由此而激活钙调素(calmodulin, CaM)是调节平滑肌功能状态的重要机制之一. 已有报道<sup>[22-24]</sup>高Ch可影响 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的代谢, 刺激细胞内肌浆网内储钙释放, 使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高. 本组观察无钙Krebs液中复钙对SO肌环的影响, 结果证实复钙引起实验组SO肌环收缩所需加入的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度仅为0.1 mmol/L, 而对照组所需 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为1.0 mmol/L. 在L-VDCs功能正常的前提下, 细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 进入细胞内是启动及提高细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的重要途径. 已经证实 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升至1  $\mu\text{mol/L}$ 是 $\text{Ca}^{2+}$ 与CaM结合激活信号转导途径使平滑肌收缩的阈浓度, 而当细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高到一定程度时通过膜电位改变又致L-VDCs暂时失活,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 下降. 在这一调节过程中细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流是启动环节之一. 细胞外复钙可引发血管平滑肌的收缩运动, 其机制与细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 通过L-VDCs流入到细胞内, 引起细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高有关. 何令帅 et al<sup>[25]</sup>也报道复钙可使细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流, 通过升高细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 直接引发平滑肌收缩. 本组实验显示, 低浓度的细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 即可引发HC组SO收缩, 说明HC组SO细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 基础值处于较高水平, 由此降低了 $\text{Ca}^{2+}$ 激活CaM的阈值, 这是低浓度 $\text{Ca}^{2+}$ 即可诱发HC组SO肌环收缩的原因之一. 杨向新 et al<sup>[26]</sup>的研究结果证实HC作用下, SO细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 呈过载状态, 与本实验结果完全相符.

L-VDCs是细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 进入细胞内的主要通道, 对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的调节有着重要的作用. Craig et al<sup>[27]</sup>发现Nif对离体条件下负鼠SO的动力功能有显著改善作用. Craig et al<sup>[28-29]</sup>还发现L-VDCs拮抗剂对SOD有改善功能. Clunn et al<sup>[30]</sup>研究发现在HC并未直接改变平滑肌细胞L-VDCs功能. 我们采用双氢嘧啶类(DHPs)钙拮抗剂Nif观察对SO的舒张效应. 结果发现两组SO肌环对Nif在各个浓度点的舒张反应无显著差异,  $\text{CaCl}_2$ , KCl等所引发SO肌环的收缩反应也均可被Nif完全缓解. 提示HC作用下, SO细胞的L-VDCs调节 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的功能并未受到损害, 证实HC组SO细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 过载状态并非是L-VDCs功能改变所致.

总之, 我们通过复制HC兔模型, 制备SO肌环, 在离体条件下观察发现HC导致SO肌环张力状态异常, SO处于易激惹状态. 其机制与 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 过载有关, 并且该过载状态并非由L-VDCs功能改变所致. 至于HC是如何引起SO细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 过载, 其原因尚需进一步研究阐明.

### 4 参考文献

- 1 吴彩新, 卿三华. 溃疡病胆道疾病综合征的诊断和治疗. 世界华

- 人消化杂志 2000;8:698-699
- 2 张书民, 李祥兵, 俞磊, 胡宗宇. 胆总管囊肿 16 例. 世界华人消化杂志 2002;10:1109
- 3 逢锦忠, 童赛雄. 原发性胆囊癌分子生物学研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:441-444
- 4 魏经国, 杜凡, 王耀程, 王伟. 高胆固醇诱发 Oddi 括约肌功能紊乱实验研究. 中国病理生理杂志 2000;16:446-450
- 5 王新疆, 魏经国, 王耀程, 徐家宽, 邬秋珍, 吴道澄, 杨向新. 胆固醇脂质体对兔胆道口平滑肌收缩性的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:633-637
- 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 陈晓文, 智发朝, 周丹, 万田谟, 朱建新. 胆总管结石伴胆道感染者胆汁细菌培养结果分析. 世界华人消化杂志 2003;11:369-370
- 8 张国梁, 韦斌, 朱春兰, 任旭. 影像学检查对肝门部胆管癌进展范围评价的临床价值. 世界华人消化杂志 2003;11:865-867
- 9 闫庆国, 师建国, 黄高昇, 张传山, 李青, 胡沛臻, 王文亮. 肝外胆管癌组织 BAG-1 及 BAD 的表达与凋亡调控原位的定量研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1144-1147
- 10 陈勇军, 俞亚红, 丁志强. 胆管癌组织 P53 和血管内皮生长因子表达与血管生成的相关性研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1827-1830
- 11 Wei JG, Wang YC, Du F, Yu HJ. Dynamic and ultrastructural study of sphincter of Oddi in early-stage cholelithiasis in rabbits with hypercholesterolemia. *World J Gastroenterol* 2000;6:102-106
- 12 Wang XJ, Wei JG, Wang CM, Wang YC, Wu QZ, Xu JK, Yang XX. Effect of cholesterol liposomes on calcium mobilization in muscle cells from the rabbit sphincter of Oddi. *World J Gastroenterol* 2002;8:144-149
- 13 Szilvassy Z, Nagy I, Madacsy L, Hajnal F, Velosy B, Takacs T, Lonovics J. Beneficial effect of lovastatin on sphincter of Oddi dyskinesia in hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. *Am J Gastroenterol* 1997;92:900-902
- 14 Coyle WJ, Pineau BC, Tarnasky PR, Knapp WL, Aabakken L, Hoffman BJ, Cunningham JT, Hawes RH, Cotton PB. Evaluation of unexplained acute and acute recurrent pancreatitis using endoscopic retrograde cholangiopancreatography, sphincter of Oddi manometry and endoscopic ultrasound. *Endoscopy* 2002;34:617-623
- 15 Szilvassy Z, Sari R, Nemeth J, Nagy I, Csati S, Lonovics J. Improvement of nitric relaxation by farnesol of the sphincter of Oddi from hypercholesterolaemic rabbits. *Eur J Pharmacol* 1998;353:75-78
- 16 杜凡, 魏经国. 高胆固醇血症兔胆道口括约肌动力功能与一氧化氮合酶关系. 第四军医大学学报 2000;21:148-151
- 17 黄海东, 魏经国, 杨春敏. 高胆固醇对兔胆管和胆道口括约肌的动力及超微结构影响. 第四军医大学学报 2000;21:1402-1405
- 18 Sari R, Nemeth J, Porszasz R, Horvath P, Blasig IE, Ferdinandy P, Nagy I, Lonovics J, Szilvassy Z. Impairment by lovastatin of neural relaxation of the rabbit sphincter of Oddi. *Eur J Pharmacol* 2001;432:91-97
- 19 Wei JG, Wang YC, Liang GM, Wang W, Chen BY, Xu JK, Song LJ. The study between the dynamics and the X-ray anatomy and regularizing effect of gallbladder on bile duct sphincter of the dog. *World J Gastroenterol* 2003;9:1014-1019
- 20 Theilmeier G, Quarck R, Verhamme P, Bochaton-Piallat ML, Lox M, Bernar H, Janssens S, Kockx M, Gabbiani G, Collen D, Holvoet P. Hypercholesterolemia impairs vascular remodeling after porcine coronary angioplasty. *Cardiovasc Res* 2002;55:385-395
- 21 Fleischhacker E, Esenabhalu VE, Holzmann S, Skrabal F, Koidl B, Kostner GM, Graier WF. In human hypercholesterolemia increased reactivity of vascular smooth muscle cells is due to altered subcellular Ca(2+) distribution. *Atherosclerosis* 2000;149:33-42
- 22 Ares MP, Porn-Ares MI, Moses S, Thyberg J, Juntti-Berggren L, Berggren P, Hultgardh-Nilsson A, Kallin B, Nilsson J. 7beta-hydroxycholesterol induces Ca(2+) oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2000;153:23-35
- 23 王新疆, 魏经国, 王春梅, 王耀程, 黄海东, 邬秋珍, 马福成. 缩胆素诱导兔 Oddi 括约肌细胞钙动员途径. 第四军医大学学报 2001;22:2064-2067
- 24 Mokele EA, Hu Q, Song M, Toro L, Reddy HK, Sturek M. Altered functional coupling of coronary K+ channels in diabetic dyslipidemic pigs is prevented by exercise. *J Appl Physiol* 2003;95:1179-1193
- 25 何令帅, 戴德哉, 陈静, 黄敏. 对氯苄基四氯小檗碱(CPU-86017)及 L-甲状腺素对大鼠主动脉环  $\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$  亚型的选择性. 中国药科大学学报 2002;33:245-249
- 26 杨向新, 魏经国, 王春梅, 陈宝莹, 陈丹, 王耀程, 邬秋珍. 高胆固醇血症对兔胆管括约肌细胞内  $Ca^{2+}$  转运的影响. 第四军医大学学报 2002;23:1698-1701
- 27 Craig AG, Tottrup A, Toouli J, Saccone GT. Relative effects of dihydropyridine L-type calcium channel antagonism on biliary, duodenal, and vascular tissues: an *in vivo* and *in vitro* analysis in Australian brush-tailed possum. *Dig Dis Sci* 2002;47:2029-2036
- 28 Craig AG, Toouli J. Sphincter of Oddi dysfunction: is there a role for medical therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:172-176
- 29 Craig AG, Toouli J. Slow release nifedipine for patients with sphincter of Oddi dyskinesia: results of a pilot study. *Intern Med J* 2002;32:119-120
- 30 Clunn GF, Wijetunge S, Hughes AD. Effect of hypercholesterolaemia on voltage-operated calcium channel currents in rabbit arterial smooth muscle cells. *J Hum Hypertens* 1999;13:849-853



# 理肠中药方对溃疡性结肠炎大鼠结肠细胞凋亡及其调控基因表达的影响

范 恒, 邱明义, 梅家俊, 沈关心, 刘松林

范恒, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科  
湖北省武汉市 430022  
邱明义, 梅家俊, 刘松林, 湖北中医学院 湖北省武汉市 430061  
沈关心, 华中科技大学同济医学院 湖北省武汉市 430022  
范恒, 男, 1966-04-29 生, 湖北浠水人, 汉族, 1990 年湖北中医学院本科毕业, 1997 年湖北中医学院硕士研究生毕业, 2003 年湖北中医学院博士研究生毕业, 副主任医师、副教授, 主要从事胃肠病的临床与基础研究。  
湖北省教委资助项目, No. 99Z014  
项目负责人: 邱明义, 430061, 湖北省武汉市, 湖北中医学院. fanheng001@hotmail.com  
电话: 027-68889082  
收稿日期: 2003-10-15 接受日期: 2003-12-08

## Effect of Lichangsifang on cellular apoptosis and expression of the related regulatory genes in rats with ulcerative colitis

Heng Fan, Ming-Yi Qiu, Jia-Jun Mei, Guan-Xin Shen, Song-Lin Liu

Heng Fan, Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China  
Ming-Yi Qiu, Jia-Jun Mei, Song-Lin Liu, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China  
Guan-Xin Shen, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China  
Supported by the education department Foundation of Hubei, No. 99Z014  
Correspondence to: Ming-Yi Qiu, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China. fanheng001@hotmail.com  
Received: 2003-10-15 Accepted: 2003-12-08

## Abstract

**AIM:** To study the immunoregulatory and treatment effects of Lichangsifang (LCSF) on apoptosis and protein expression of Bcl-2, Bax and Fas genes in rats with ulcerative colitis (UC), and to analyze its underlying mechanism.

**METHODS:** In the experiment, ninety-eight SD rats were randomly divided into seven groups: normal control group, pathologic control group, sulfasalazine (SASP) group, Wumeiwan (WMW) group, Baitouwengtang (BTWT) group, Senglingbaishusan (SLSS) group, and Tongxieyaofang (TXYF) group. Every group had fourteen rats (seven male and seven female). Except the normal control group, A UC animal model was made with DNCB and acetic acid the other six groups, which were treated by distilled water, SASP, TXYF, WMW, BTWT, SLBSS and TXYF, respectively. After these treatment, the changes of apoptosis and protein expression of Bcl-2, Bax and Fas gene in UC were observed.

**RESULTS:** The level of apoptotic index (AI) in pathologic group was significantly higher than that in normal group

( $P < 0.01$   $t = 3.835$ ). After these treatment, the degree of the AI decreased in each experimental group, as compared with the pathologic group ( $P < 0.05$ ,  $q = 4.210$  vs TXYF group or  $P < 0.01$ ,  $q = 5.973$  vs WMW group,  $q = 5.986$  vs BTWT group,  $q = 5.905$  vs SASP group,  $q = 5.889$  vs SASP group). The apoptosis of normal control group (Bcl-2/Bax $>1$ ) together with LCSF and SASP groups was less ( $P < 0.01$   $q = 3.972$  vs WMW group,  $q = 3.523$  vs BTWT group,  $q = 3.694$  vs SLBSS group,  $q = 3.549$  vs TXYF group,  $q = 3.727$  vs SASP group). There was remarkable difference in the degree of Bcl-2 and Bax expression between pathologic group (Bcl-2/Bax $<1$ ) and normal group ( $P < 0.01$ ,  $F = 2.96$ ). The degree of apoptosis in pathologic group was significantly higher than that in normal group ( $P < 0.05$ ,  $t = 3.956$  vs pathologic group). There was no remarkable difference between LCSF and SASP groups in the protein expression on Bcl-2, Bax and Fas genes in UC ( $P > 0.05$ ,  $F = 3.19$ ,  $3.05$ , and  $2.97$ ).

**CONCLUSION:** This model induced with DNCB and acetic acid is successful. It is obvious that the apoptosis and protein expression of Bcl-2, Bax and Fas genes play an important role in the pathogenesis of UC. All the treatment groups (including SASP group) have rather better curative effects on UC by reducing apoptosis and adjusting cell immunity.

Fan H, Qiu MY, Mei JJ, Shen GX, Liu SL. Effect of Lichangsifang on cellular apoptosis and expression of the related regulatory genes in rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1119-1124

## 摘要

**目的:** 观察理肠中药方对溃疡性结肠炎大鼠结肠细胞凋亡及其调控基因 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白表达的影响, 分析其作用机制。

**方法:** 应用 2, 4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立 UC 大鼠模型, 将 98 只健康 SD 大鼠(雌雄各半), 按雌雄随机分 7 组, 分别为乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组、SASP 组、模型组和正常组, 分别观察治疗后大鼠结肠黏膜的结肠细胞凋亡及其调控基因 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白表达的变化。

**结果:** 模型组与正常组比较 AI 升高( $P < 0.01$ ,  $t = 3.835$ ), 治疗后 AI 下降, 各组与模型组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ,  $q = 4.210$  vs 痛泻要方组或  $P < 0.01$ ,  $q = 5.973$  vs 乌梅丸组,  $q = 5.986$  vs 白头翁汤组,  $q = 5.905$  vs 参苓白术散组,  $q = 5.889$  vs SASP 组)。与正常组比较均无显著性差异( $P > 0.05$ ,  $q = 3.972$  vs 乌梅丸组,  $q = 3.523$  vs 白头翁汤组,  $q = 3.694$  vs 参苓白术散组,  $q = 3.549$  vs 痛泻要方

组,  $q = 3.727$  vs SASP 组), 理肠中药方、SASP 组五组间比较, 均无显著性差异( $P > 0.05$ ,  $F = 2.96$ ), 正常组 Bcl-2/Bax  $> 1$ , 细胞较少发生凋亡, 而二者比较, 有显著意义( $P < 0.01$ ,  $t = 3.956$  vs 模型组). 理肠中药方、SASP 组五组 Bcl-2/Bax  $> 1$ , 模型组 Bcl-2, Bax, Fas 与正常组比较, 有非常显著意义( $P < 0.01$ ,  $t = 4.573, 4.826, 4.758$ ), 且模型组 Bcl-2/Bax  $< 1$  细胞凋亡占优势, 各治疗组与正常组无统计学意义( $P > 0.05$ ,  $F = 2.69$ ), 而与模型组比较有显著意义( $P < 0.05$ ,  $q = 4.98$  vs 乌梅丸组,  $q = 4.77$  vs 白头翁汤组,  $q = 4.68$  vs 参苓白术散组,  $q = 4.56$  vs 痛泻要方组,  $q = 4.64$  vs SASP 组), 各中药组 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白阳性率均与 SASP 组疗效相当( $P > 0.05$ ,  $F = 3.19, 3.05, 2.97$ ), 理肠四方各组比较, Bcl-2, Bax, Fas 蛋白阳性率亦无明显差异( $P > 0.05$ ).

结论: 细胞凋亡及其调控基因 Bcl-2, Bax 参与 UC 的形成, 中药及 SASP 均有良好的治疗效果.

范恒, 邱明义, 梅家俊, 沈关心, 刘松林. 理肠中药方对溃疡性结肠炎大鼠结肠细胞凋亡及其调控基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1119-1124  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1119.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(UC)病因及发病机制仍未完全明了<sup>[1-6]</sup>, 治疗也不够满意<sup>[7-12]</sup>. 细胞凋亡参与 UC 的发生, 虽然正常上皮细胞很少发生凋亡, 但 UC 时, 凋亡的结肠上皮细胞明显增多. 我们研究细胞凋亡在 UC 中的作用以及理肠四方对 UC 细胞凋亡及其调控基因 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白表达的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 理肠四方(乌梅丸、白头翁汤、参苓白术散、痛泻要方)的所组成药物剂量如下: 乌梅丸: 乌梅 16 g, 细辛 6 g, 干姜 10 g, 黄连 16 g, 当归 4 g, 附子 6 g, 蜀椒 4 g, 桂枝 6 g, 生晒参 6 g, 黄檗 6 g; 白头翁汤: 白头翁 30 g, 黄柏 24 g, 黄连 10 g, 秦皮 24 g; 参苓白术散: 莲子肉 10 g, 薏苡仁 10 g, 缩砂仁 10 g, 桔梗 10 g, 白扁豆 15 g, 白茯苓 20 g, 生晒参 20 g, 甘草 20 g, 白术 20 g, 山药 20 g; 痛泻要方: 炒白术 30 g, 白芍 20 g, 陈皮 15 g, 防风 20 g. 西药柳氮磺胺吡啶(SASP)批号为: 200111002, 由上海三维制药公司生产(250 mg/片). 40 g/L 多聚甲醛、多聚赖氨酸(poly-lysine)、载玻片(防脱片剂处理)、细胞凋亡检测试剂盒、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(Fas、Bax、Bcl-2)等均购于武汉博士德生物工程有限公司. 健康 SD 健康大鼠 98 只(雌雄各半, 体重  $300 \pm 50$  g).

1.2 方法 按雌雄随机分 7 组, 各组均为 14 只(雌雄各半), 第 1、2、3、4、5、6 为造模组, 第 7 组为正常组, 而第 1、2、3、4、5、6 组分别为乌梅

丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组、SASP 组和模型组, 各组体重统计学比较无显著性差异( $P > 0.05$ ). 应用 2, 4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立 UC 大鼠模型<sup>[13-15]</sup>. 将大鼠颈背部用 100 g/L  $\text{Na}_2\text{S}$  脱毛后, 以 20 g/L DNCB 丙酮液 0.25 mL (5 滴)滴背, 1 次/d, 连续 14 d, 在第 15 d 以直径 3 mm 导尿管经肛门插入结肠 8 cm 处, 注入 1 g/L DNCB 乙醇 0.25 mL, 在 16 d 同部位注入 80 mL/L 醋酸溶液 2 mL, 准确计时 10 s 后, 再用生理盐水 5 mL 冲洗. 再饲养 2 wk, 每天继续观察大鼠大便性状、饮食、毛发、活动状态等, 可以看到大鼠逐渐产生典型 UC 活动期症状, 30 d 后造模完成后, 每组随机抽取大鼠 2 只, 处死后取其结肠, 病理检查确认结肠出现充血、水肿、炎细胞浸润、隐窝脓肿、杯状细胞减少、腺体破坏及小溃疡形成等一系列变化. 乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散、痛泻要方组、SASP 组等五组: 每组每只大鼠分别用乌梅丸液 515 g/L、白头翁汤液(562 g/L)、参苓白术散液(987 g/L)、痛泻要方液(216 g/L)和 SASP 混悬液(26 g/L) 3 mL 灌胃, 1 次/d; 模型组、正常组: 每组每只大鼠均以蒸馏水 3 mL 灌胃, 1 次/d, 以上均给药 15 d.

1.2.1 细胞凋亡的检测 结肠组织经 40 g/L 多聚甲醛 0.1 mol/L PBS(PH7.0-7.6)固定 4 h 以上, 石蜡包埋, 切片(用 poly-lysine 载玻片)厚度 6  $\mu\text{m}$ ; 凋亡的特征是内源性核酸内切酶被激活, 细胞自身的染色质或 DNA 被切割, 出现单链或双链切口, 并产生与 DNA 断点相同的 3' -OH 末端. 末端脱氧核糖核酸转移酶可以将地高辛的 dUTP(DIG-dUTP)标记至 3' -OH 末端, DIG-dUTP 结合在 DNA 断点部位, 可以通过生物标记的抗地高辛抗体(Anti-DiG-Biotin)反应后, 再结合链亲和素-过氧化物酶(SABC), 然后加入显色底物 DAB 予以显示. 凋亡的细胞核呈黄色, 从而可以在显微镜下观察到着色的凋亡细胞.

1.2.2 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白的表达 结肠组织经 40 g/L 多聚甲醛固定 45-90 min, 然后 0.1 mol/L PBS 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 换液 1 次; ABC 法, 最后进行显色反应. 每组切片随机选取 5 张, 各随机选取 5 个视野, 用 HPIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文报告分析系统(版本 9.0)测量, 确定阳性灰度级后, 测定阳性面积比.

1.2.3 细胞凋亡指数(AI)计算 各组随机选取 4 个组织切片, 每一切片随机观察 5 个视野, 分别计数每一视野阳性细胞和阴性细胞数, 取其平均值作为该切片阳性细胞数和阴性细胞数, 以凋亡细胞数与细胞总数(阳性与阴性之和)的比率作为该切片的细胞凋亡指数(AI), 计算 7 组细胞凋亡指数.

统计学处理 采用 SPSS10.0 软件处理统计数据资料, 数据用  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 采用 t 检验和 F 分析(q 检验).

## 2 结果

2.1 细胞凋亡 TUNEL 阳性细胞在普通光镜下的特征是:

细胞收缩变小, 呈圆形, 与周围细胞分离, 细胞核显棕色或棕褐色或核碎裂, 为棕黄色颗粒. 光镜下, 正常组( $0.010 \pm 0.002$ )基本未见 TUNEL 阳性细胞, 模型组( $0.470 \pm 0.013$ )阳性细胞数目较多, 呈棕黄色, 而 SASP 组( $0.020 \pm 0.03$ )、乌梅丸组( $0.020 \pm 0.001$ )、白头翁汤组( $0.020 \pm 0.003$ )、参苓白术散组( $0.020 \pm 0.002$ )、痛泻要方组( $0.050 \pm 0.003$ ) 仅见少量的阳性细胞散在分布, 表明 UC 与细胞凋亡有关, 各组治疗后凋亡细胞减少, 说明他们通过减少其细胞凋亡而达到治疗 UC 目的(图 1A-G). 模型组与正常组比较 AI 升高( $P < 0.01$ ), 说明细胞凋亡参与 UC 形成, 治疗后 AI 下降, 各组与模型组比较有显著性差异( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ). 与正常组比较均无显著性差异( $P > 0.05$ ), 说明 SASP、理肠四方均有良好的治疗作用, 使其凋亡指数接近正常, 其治疗作用是可能通过抑制细胞凋亡达到治疗目的, 而 SASP 组、乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组五组间比较, 均无显著性差异( $P > 0.05$ ), 其治疗影响可能相差不明显.

## 2.2 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白表达 光镜观察正常组 SASP

组、乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组 Bcl-2 蛋白均高表达, 且大量地存在于细胞中, 细胞染色呈棕褐色, 而其 Bax, Fas 均低表达;模型组 Bcl-2 蛋白有低表达, Bax, Fas 蛋白有高表达, 大量地存在于细胞中, 细胞染色呈棕黄色(图 2-4A-G). 正常组 Bcl-2/Bax $>1$ , 细胞较少发生凋亡, 而二者比较, 有显著意义( $P < 0.01$ ). SASP 组、乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组 Bcl-2/Bax $>1$ , 说明抗细胞凋亡处于优势, UC 逐渐康复. 模型组 Bcl-2, Bax 与正常组比较, 有非常显著意义( $P < 0.01$ ), 且模型组 Bcl-2/Bax $<1$ , 细胞凋亡占优势, 说明 Bcl-2, Bax 参与 UC 的形成. 各治疗组与正常组比较无统计学意义( $P > 0.05$ ), 而与模型组比较有显著意义( $P < 0.05$ ), 说明各组药物包括 SASP 均有良好的治疗效果, 各药物治疗机制可能与减少细胞凋亡有关. 各中药组 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白阳性率均与 SASP 组疗效相当( $P > 0.05$ , 表 1), 其余中药各组(白头翁汤组、乌梅丸组、参苓白术散组、痛泻要方组)比较, Bcl-2, Bax, Fas 蛋白阳性率亦无明显差异( $P > 0.05$ ).

表 1 UC 大鼠 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白表达及变化(mean $\pm$ SD,  $n=4$ )

组别	Bcl-2 蛋白阳性率	Bax 蛋白阳性率	Bcl-2/Bax	Fas 阳性率
正常组	0.2 800 $\pm$ 0.014 <sup>b</sup>	0.1 231 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	2.08 $\pm$ 0.203 <sup>b</sup>	0.227 $\pm$ 0.012 <sup>b</sup>
模型组	0.1 501 $\pm$ 0.003	0.3 275 $\pm$ 0.015	0.672 $\pm$ 0.031	0.303 $\pm$ 0.011
SASP 组	0.2 103 $\pm$ 0.013 <sup>a</sup>	0.1 735 $\pm$ 0.030 <sup>a</sup>	1.519 $\pm$ 0.127 <sup>a</sup>	0.263 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>
乌梅丸组	0.2 420 $\pm$ 0.031 <sup>a</sup>	0.1 725 $\pm$ 0.025 <sup>a</sup>	1.577 $\pm$ 0.105 <sup>a</sup>	0.246 $\pm$ 0.031 <sup>a</sup>
白头翁汤组	0.2 237 $\pm$ 0.027 <sup>a</sup>	0.1 821 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>	1.533 $\pm$ 0.103 <sup>a</sup>	0.265 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>
参苓白术散组	0.2 125 $\pm$ 0.027 <sup>a</sup>	0.1 803 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>	1.580 $\pm$ 0.112 <sup>a</sup>	0.272 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>
痛泻要方组	0.2 007 $\pm$ 0.063 <sup>a</sup>	0.1 428 $\pm$ 0.035 <sup>a</sup>	1.274 $\pm$ 0.157 <sup>a</sup>	0.284 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型组.

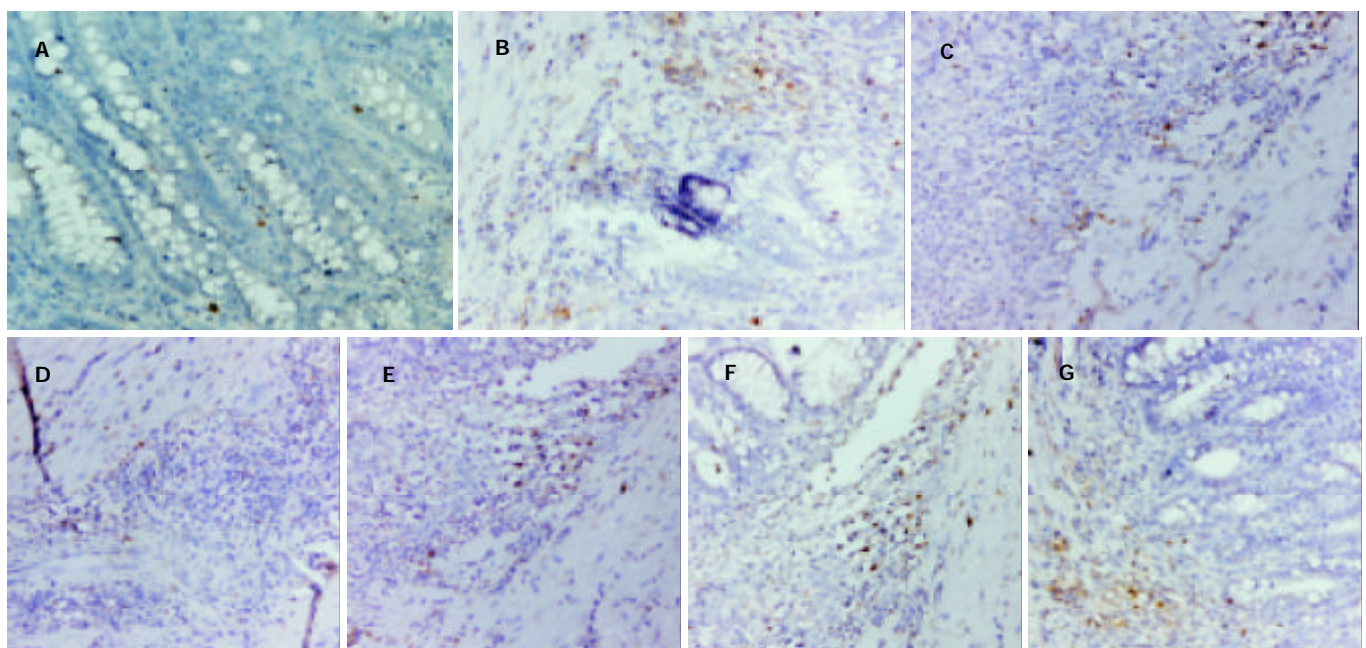


图 1 细胞凋亡图 $\times 200$ . A: 正常组; B: 模型组; C: SASP 组; D: 乌梅丸组; E: 白头翁汤组; F: 参苓白术散组; G: 痛泻要方组.



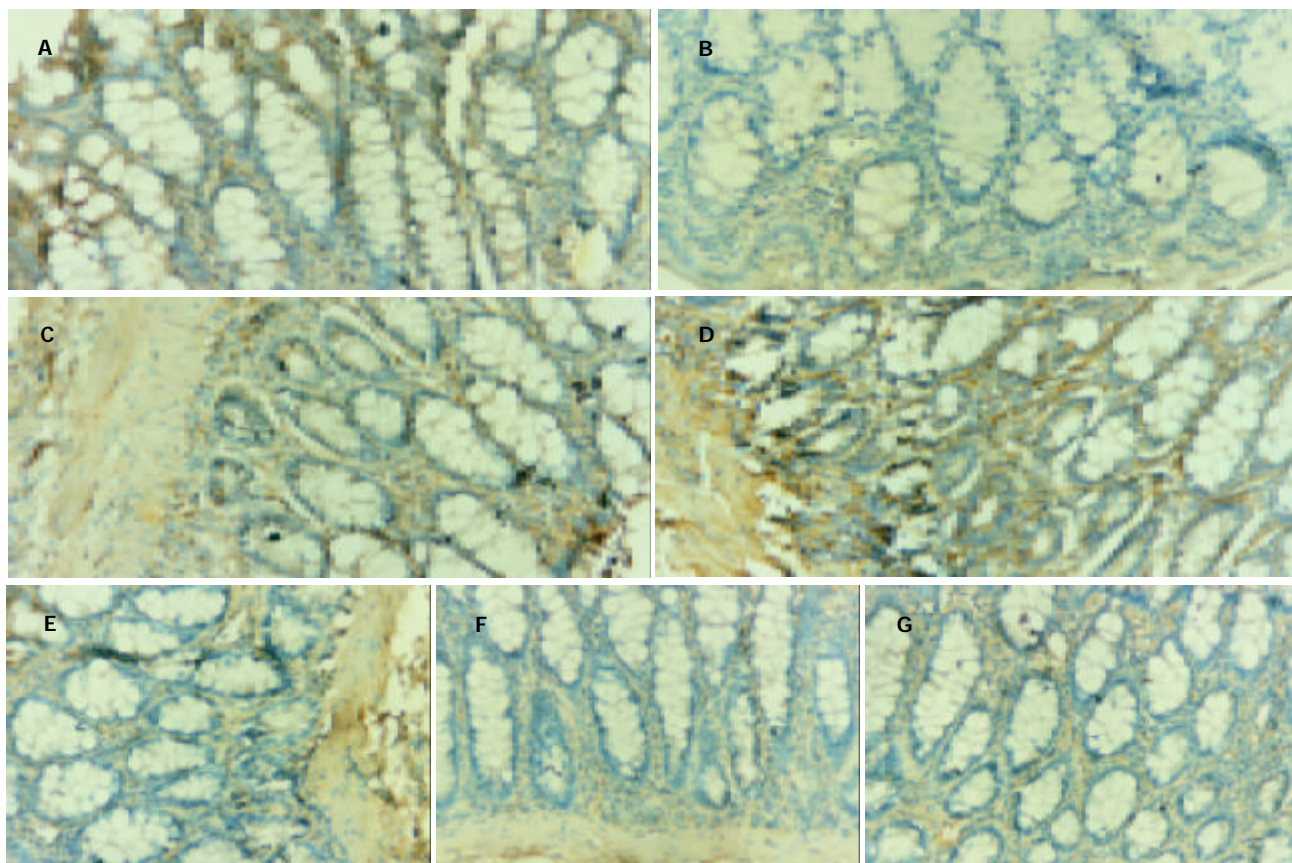


图 2 Bcl-2 蛋白表达图  $\times 200$  A: 正常组; B 模型组; C 乌梅丸组; D: 白头翁汤组; E: 参苓白术散组; F: 痛泻要方组; G: SASP 组.

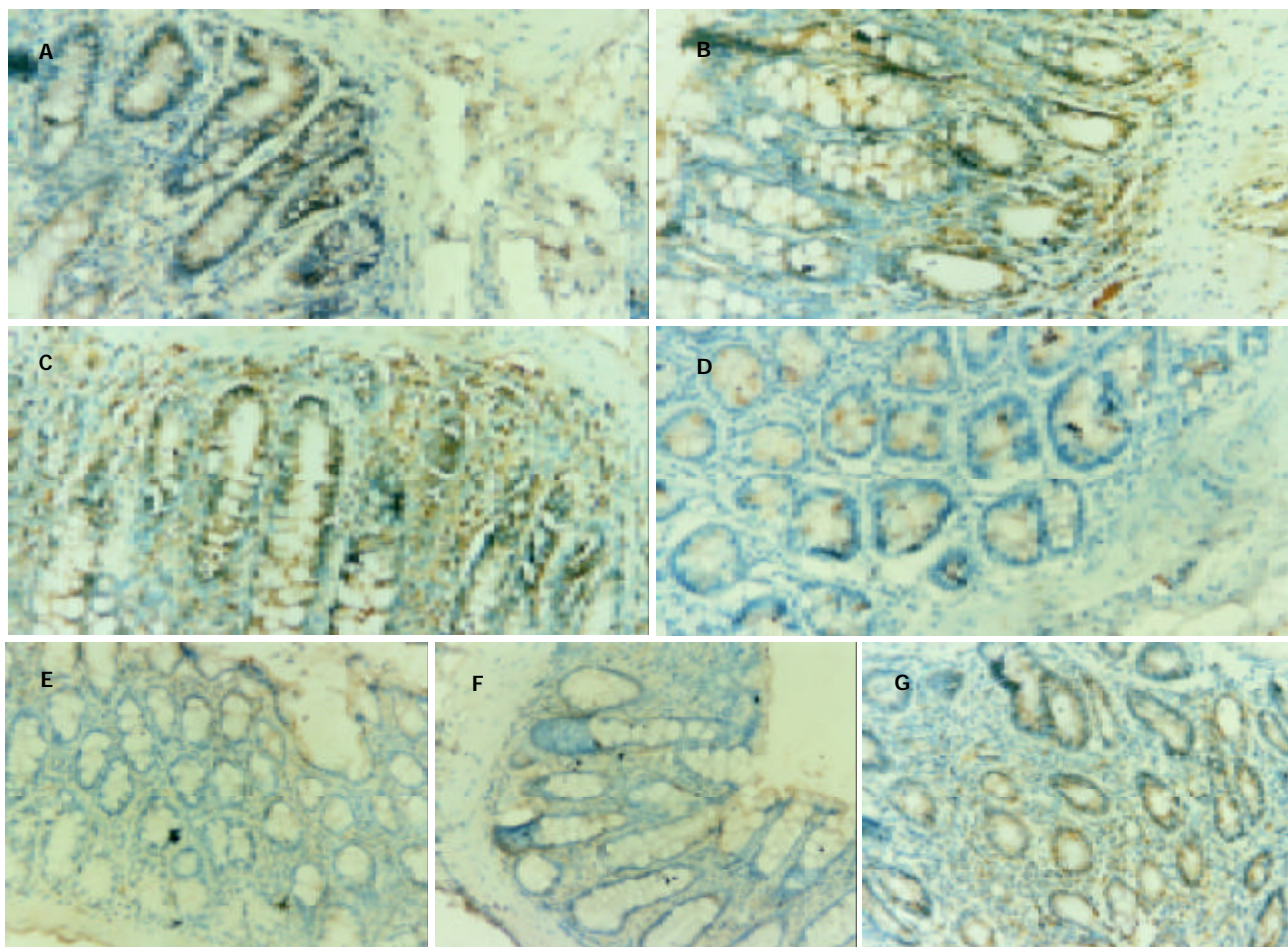


图 3 Bax 蛋白表达图  $\times 200$ . A: 正常组; B 模型组; C 乌梅丸组; D: 白头翁汤组; E: 参苓白术散组; F: 痛泻要方组; G: SASP 组.



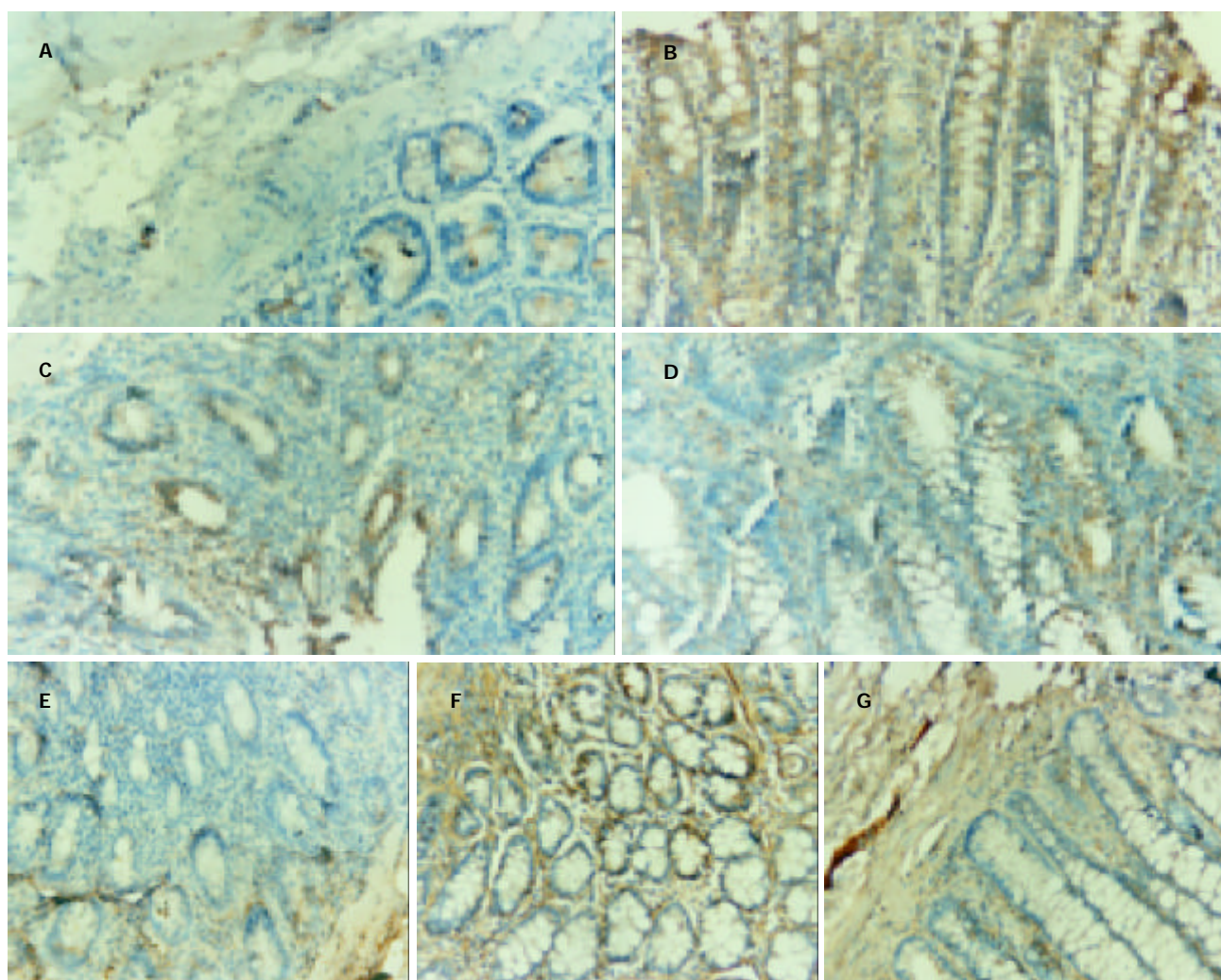


图4 Fas 蛋白表达图  $\times 200$ . A: 正常组; B 模型组; C 乌梅丸组; D: 白头翁汤组; E: 参苓白术散组; F: 痛泻要方组; G: SASP 组.

### 3 讨论

细胞凋亡(apoptosis)是一种高度调控的细胞死亡方式, 调控凋亡过程是人类防治这些病症的新途径. 结肠细胞凋亡主要发生肠腔上皮细胞; 活动期 UC 除此之外, 病变处及临近的非病变处隐窝上皮细胞凋亡增加, 从而使上皮细胞构成的黏膜屏障破坏, 导致结肠黏膜的损伤和溃疡<sup>[16]</sup>. UC 患者肠上皮细胞的凋亡加速, 特别是活动期上皮细胞的凋亡明显增加, 参与炎症性肠病 (IBD) 的发生. 另外, 一些细胞因子水平增高, 并与肠道炎症的发病及活动性有密切关系, 因此这些细胞因子与肠黏膜固有层淋巴细胞凋亡关系也开始受到关注, 如 TNF 介导细胞凋亡与抗原刺激后成熟 T 细胞清除有关, 而肠黏膜组织中 IL-15 含量增高<sup>[17]</sup>, 可以介导淋巴细胞逃避凋亡. 有人研究指出患者淋巴细胞凋亡异常也是导致 UC 免疫功能紊乱的重要原因<sup>[18-19]</sup>.

选择性地减少 UC 肠上皮细胞凋亡造成的组织损伤, 或选择性地诱导 UC 炎症细胞凋亡, 减轻炎症反应, 将可能成为治疗 UC 的有效方法. 由于细胞凋亡由参与凋亡调控的系列基因相对表达程度决定, 并受细胞凋亡影响<sup>[20-22]</sup>, 所以我们选取 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白表达作为检测指标来观察理肠四方对大鼠细胞凋亡

的影响. 结果表明: 细胞凋亡参与 UC 的形成. 模型组 Bcl-2/Bax $<1$ , 细胞凋亡占优势, 而正常组 Bcl-2/Bax $>1$ , 细胞较少发生凋亡. Bax 是编码 Bcl-2 相关 X 蛋白的基因, Bax 蛋白与 Bcl-2 蛋白有 21% 的同源性, 具有对抗 Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡的作用, 研究发现 Bcl-2/Bax 两蛋白之间的比例是决定对细胞凋亡抑制作用的强弱的关键因素<sup>[23]</sup>. 结肠上皮细胞凋亡增加, 从而使其黏膜屏障破坏, 导致 UC 的发生. 因此支持 Itoh 的观点即减少 Bax 表达和升高 Bcl-2/Bax 比率有利于抵抗慢性 IBD 细胞凋亡的发生<sup>[24]</sup>, 而不支持 Limura 的观点即在 UC 的炎症性肠病黏膜中, Bax/Bcl-2 系统似乎并不涉及诱导上皮细胞凋亡<sup>[25]</sup>. Fas 在 UC 中的表达增加, 与正常组显著不同 ( $P < 0.01$ ). 通过各治疗组与模型组比较, Fas 有明显下降 ( $P < 0.05$ ), 与正常组比较, 无显著差异 ( $P < 0.05$ ), 说明理肠四方与 SASP 均有调节 Fas 的作用. 各组中药及 SASP 治疗后 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白阳性率有不同程度变化. 说明他们均可以影响细胞凋亡达到治疗的目的. 氨基水杨酸 (SASP 吸收后分解物) 可以减弱结肠上皮细胞凋亡<sup>[26]</sup>. 5-氨基水杨酸 (5-ASA) 在体外能够加速 UC 中性粒细胞凋亡<sup>[27]</sup>. 由此可以推测中药治疗也可影响细胞凋亡, 其具体作用机制有待进一步研究.



#### 4 参考文献

- 1 江学良, 王志奎, 秦成勇. 中国溃疡性结肠炎的研究现状与对策. 世界华人消化杂志 2000;8:610-613
- 2 彭仲生, 胡品津, 林汉良, 崔毅, 陈为. 活检病理对诊断溃疡性结肠炎的价值. 世界华人消化杂志 2001;9:1269-1273
- 3 田力, 黄裕新. 针刺对溃疡性结肠炎细胞因子的调控意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1435-1438
- 4 吕永慧, 钟东江. 溃疡性结肠炎患者血液流变学与中医辨证关系. 世界华人消化杂志 2001;9:977-978
- 5 江学良, 崔慧斐. 中国溃疡性结肠炎 10 218 例的特点. 世界华人消化杂志 2001;9:869-873
- 6 杨春敏, 张映辉, 毛高平, 张秀荣, 曹传平. 溃疡性结肠炎患者直肠肛门动力和感觉功能变化. 世界华人消化杂志 2001;9:467-468
- 7 黄俊, 罗和生, 杨健新. 溃疡性结肠炎一氧化氮异常及丁酸钠的治疗作用. 世界华人消化杂志 2001;9:967-969
- 8 王碧辉. 溃疡性结肠炎中西医治疗进展. 世界华人消化杂志 1999;7:177-179
- 9 韩英, 李世荣. 溃疡性结肠炎治疗的新进展及新策略. 世界华人消化杂志 2000;8:1273-1275
- 10 言红健, 田自力, 崔克勤, 郭雅卿, 程勇. 低分子肝素联合黄芪治疗难治性溃疡性结肠炎. 世界华人消化杂志 2002;10:110-111
- 11 韩英, 李世荣. 溃疡性结肠炎治疗的新进展及新策略. 世界华人消化杂志 2000;8:1273-1275
- 12 焦君良, 王生茂, 李延昌, 要丽英, 李士军, 孟元勋, 刘巧格, 刘桂缺. 溃结康胶囊治疗溃疡性结肠炎 128 例. 世界华人消化杂志 2000;8:572-573
- 13 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军. 复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型及其免疫和超微结构变化. 世界华人消化杂志 1999;7:381-383
- 14 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军, 齐凤. 鱼腥草治疗溃疡性结肠炎的实验研究. 世界华人消化杂志 1999;7:786-787
- 15 李林, 王竹立, 柯剑婷, 张猛, 邵剑锋, 钟才能. 实验性溃疡性结肠炎动物模型选择. 世界华人消化杂志 2001;9:584-585
- 16 Suzuki A, Sugimura K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Suzuki K, Ishizuka K, Mochizuki T, Honma T, Narisawa R, Asakura H. Fas/Fas Ligand expression and Characteristics of Primed CD45 RO+ T cells in the inflamed mucos of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1278-1283
- 17 Liu Z, Geboes K, Colpaert S, D'Haens GR, Rutgeerts P, Ceuppens JL. IL-15 is highly express in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J Immunol* 2000;164:3608-3615
- 18 江学良, 权启镇, 刘涛, 董兴成. 溃疡性结肠炎研究的新进展. 世界华人消化杂志 2000;8:216-218
- 19 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 齐凤, 王东, 张修礼. 溃疡慢性结肠炎患者淋巴细胞凋亡调控蛋白的表达. 世界华人消化杂志 1999;7:903-904
- 20 陈少夫, 张卫卫, 王赫. 细胞凋亡与溃疡性结肠. 世界华人消化杂志 2002;10:431-432
- 21 范恒, 李小慧, 段雪云, 石托. 细胞凋亡与溃疡性结肠炎的发生. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:189-190
- 22 Coffey JC, Bennett MW, Wang JH, O'Connell J, Neary P, Shanahan F, Redmond HP, Kirwan WO. Upregulation of Fas-Fas-L (CD95/CD95L)-mediated epithelial apoptosis putative role in pouchitis? *J Surg Res* 2001;98:27-32
- 23 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 根除幽门螺杆菌对胃癌前病变组织中 Bax 蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:22-24
- 24 Itoh J. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* 2001;49:35-41
- 25 Limura M. Bax is down regulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 2002;47:228-235
- 26 刘时光, 刘新光, 谢鹏雁, 王化虹. 溃疡性结肠炎患者中性粒细胞凋亡异常及氨基水杨酸诱导其凋亡的研究. 中华消化杂志 2002;22:309-310
- 27 吴兴桂, 王广伟, 侯宪典, 宋豫军, 齐保庆. 炎性肠病患者血清可溶性 Fas、IL-6 的变化. 世界华人消化杂志 2002;10:865-866

## World Journal of Gastroenterology 稿件管理

为了加快《World Journal of Gastroenterology, WJG》稿件管理的信息化、电子化进程, 提高办刊质量, 规范编辑工作流程, 提高工作效率, 我们成功开发了世界胃肠病学杂志社稿件管理系统, 并于 2003-04-15 投入使用, 来稿登记、稿件回执、稿件初审、二审(包括选择审稿专家和发送审稿通知书)、审稿意见、终审定稿、发送录用通知书、退稿、编辑加工、数据交换、网上投稿查询等, 全部实现了自动生成, 电子化处理. 作者在 WJG 网上投稿查询系统内提交用户名(第一作者)和密码(文章编号)后可查询到稿件的处理状态, 如编号、刊名、题名、作者、收稿日期、送审日期、接受日期、退稿日期、发票编号、待发表日期、入卷(期)和出版页码等在内的 28 个项目.

# 急性肝衰竭大鼠肝细胞移植的实验研究

李 羽, 白雪帆, 张 海, 张 岩

李羽, 白雪帆, 张岩, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染病中心 陕西省西安市 710038  
张海, 中国人民解放军第四军医大学实验动物中心 陕西省西安市 710032  
李羽, 男, 1967-03-09 生, 辽宁省西丰县人, 汉族, 2002 年第四军医大学唐都医院感染病中心博士生, 主治医师, 主要从事感染性疾病的临床工作。  
项目负责人: 李羽, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院感染病中心。 lyly0309@sina.com.cn  
电话: 029-83377595 传真: 029-83537377  
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

## Hepatocytes transplantation in rats with acute hepatic failure

Yu Li, Xue-Fan Bai, Hai Zhang, Yan Zhang

Yu Li, Xue-Fan Bai, Yan Zhang, Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Hai Zhang, Laboratory Animal Research Center, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032 Shaanxi Province, China  
Correspondence to: Yu Li, Department of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province China. lyly0309@sina.com.cn  
Received: 2003-12-10 Accepted: 2004-02-01

## Abstract

**AIM:** To study the effect of allogeneic hepatocytes transplantation (HcT) intraperitoneally, intrasplenically or through vena portae in rats with acute hepatic failure (AHF) induced by D-galactosamine (D-gal).

**METHODS:** AHF rats were induced by D-gal. HcT was carried out 60h after intoxication, and all rats were divided into six groups: Group I received  $2 \times 10^{10}$ /L hepatocytes 1 mL intraperitoneally with cyclosporin A (CsA) at 10 mg/kg simultaneously; Group II received 1 mL normal saline (NS) intraperitoneally with CsA 10 mg/kg; Group III received  $2 \times 10^{10}$ /L hepatocytes 1 mL through vena portae; Group IV received 1 mL NS through vena portae; Group V received  $2 \times 10^{10}$ /L hepatocytes 1 mL intrasplenically; Group VI received 1 mL NS intrasplenically. After 1 wk the survival rates, liver function and liver histology of all rats were observed.

**RESULTS:** The survival rate of Group I was higher than that of Group II (60 % vs 20%,  $P < 0.01$ ), and their liver function and liver histology were obviously improved as compared with Group II. Similarly, the survival rate of Group V was higher than that of Group VI (47% vs 20%,  $P < 0.05$ ), and the liver function and liver histology were also improved in Group V as compared with Group VI. On the other hand, the survival rate of Group III was similar to that of Group VI (20% vs 13.3%,  $P > 0.05$ ), and their liver function and liver histology were also not improved significantly as compared with Group II.

**CONCLUSION:** After HcT intraperitoneally or intrasplenically, the survival rates of AHF rats intoxicated with D-gal are increased, and the liver function and histology are also

improved. On the contrary, the survival rate, liver function and liver histology of AHF rats through vena portae HcT are not improved.

Li Y, Bai XF, Zhang H, Zhang Y. Hepatocytes transplantation in rats with acute hepatic failure. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(5):1125-1128

## 摘要

**目的:** 探讨大鼠同种异体肝细胞经腹腔、脾脏、门静脉移植对药物性急性肝衰竭大鼠的治疗作用。

**方法:** D-氨基半乳糖诱导大鼠急性肝衰竭后 60 h, 分 6 组进行治疗实验。I 组: 腹腔内移植  $2 \times 10^{10}$ /L 肝细胞悬液 1 mL; II 组: 腹腔内注射生理盐水 1 mL; III 组: 经门静脉注射  $2 \times 10^{10}$ /L 肝细胞悬液 1 mL; IV 组: 经门静脉注射生理盐水 1 mL; V 组: 向脾脏内移植  $2 \times 10^{10}$ /L 肝细胞悬液 1 mL; VI 组: 脾内注射生理盐水 1 mL。移植同时各组大鼠肌肉注射环孢霉素 A(CsA) 10 mg/kg, 观察大鼠的存活率、肝脏功能和肝脏病理变化情况。

**结果:** I 组大鼠存活率比 II 组有明显提高(60% 对 20%,  $P < 0.01$ ), 肝脏功能及肝脏病理明显改善。III 组大鼠存活率与 IV 组无显著差异(20% 对 13.3%,  $P > 0.05$ ), 肝脏功能及肝脏病理未见改善。V 组与 VI 组比较存活率有提高(47% 对 20%,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 经腹腔及脾脏移植同种异体肝细胞可明显改善 D-gal 诱导的肝衰竭大鼠的存活率, 部分改善肝功能及肝脏病理; 经门静脉移植同种异体肝细胞不能改善 D-gal 诱导的肝衰竭大鼠的存活率、肝脏功能及肝脏病理。

李羽, 白雪帆, 张海, 张岩. 急性肝衰竭大鼠肝细胞移植的实验研究. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1125-1128

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1125.asp>

## 0 引言

急性肝功能衰竭患者死亡的主要原因在于大量肝细胞坏死。目前, 原位肝脏移植是挽救肝衰竭的惟一有效方法, 但由于受到肝脏供源及手术费用等因素的限制, 目前在我国广泛开展肝脏移植以治疗肝衰竭仍面临许多困难。肝细胞移植作为一种简便有效且对机体影响较小的技术愈来愈受到关注<sup>[1-5]</sup>, 与肝移植相比, 它具有以下优点: (1) 一个供体可以给多个受体提供细胞; (2) 移植技术相对简单; (3) 即使移植失败, 对受体影响也十分微小。肝细胞移植近年来得到较快发展, 成为继原

位肝移植后又一治疗各种肝功能衰竭的有效及有应用前景的方法<sup>[6-8]</sup>。我们采用D-氨基半乳糖(D-gal)诱导大鼠肝衰竭,经门静脉、脾脏及腹腔移植同种异体肝细胞治疗急性肝衰竭大鼠,拟在观察急性肝衰竭大鼠存活率、肝脏功能及肝脏病理的变化,为临床开展肝细胞移植提供了新的方法与途径。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** IV型胶原酶及DNA酶I购自Sigma公司,D-氨基半乳糖(D-gal)购于重庆医科大学。成年SD大鼠由第四军医大学实验动物中心提供。20 g/L戊巴比妥钠溶液30 mg/kg腹腔麻醉,同时腹腔内注射200 IU肝素钠溶液。采用原位二步法门静脉胶原酶灌注分离肝细胞,制成肝细胞混合悬液,37℃恒温水浴孵化10 min,然后,将此悬液以100目及200目网过滤,分装于3-4离心管中,以500 r/min离心2 min,弃上清,以4℃Hanks液重悬,清洗并反复离心3次,再以4℃Hanks液重悬,做细胞涂片行苏木精-伊红(HE)染色判断肝实质细胞纯度,用4 g/L台盼蓝(trypsin blue)染色判断细胞活率,用血细胞计数板检查细胞数量并计算细胞产量。

**1.2 方法** 成年SD大鼠186只,体质量170±30 g,清洁级。180只大鼠腹腔内注射1.6 g/kg的D-gal,根据肝脏病理及肝功能改变情况制备大鼠急性肝衰竭模型。另6只大鼠设为正常对照。肝衰竭动物随机分为6组:Ⅰ组30只,腹腔内移植浓度为 $2 \times 10^{10}$ /L的肝细胞悬液1 mL;Ⅱ组30只,腹腔注射生理盐水1 mL作为Ⅰ组的对照组;Ⅲ组30只,常规麻醉后切开腹腔,经门静脉穿刺注射浓度为 $2 \times 10^{10}$ /L的肝细胞悬液1 mL;Ⅳ组30只,经门静脉注射生理盐水1 mL,其余处理同Ⅲ组;Ⅴ组30只,常规麻醉后切开腹腔,将脾脏提出体外,由尾端向脾内注射浓度为 $2 \times 10^{10}$ /L的肝细胞悬液1 mL,结扎脾尾;Ⅵ组30只作为Ⅴ组的对照,脾内注射生理盐水1 mL,其余处理同前。各鼠在接受移植的同时肌肉注射环孢霉素A(CsA)10 mg/kg,每组分取15只用于观察1 wk存活率及组织学检查,15只用于抽血及组织学检查。观察各组大鼠在接受移植后的症状表现,分别于细胞移植后1, 3, 5, 7 d统计各组大鼠存活情况。于肝细胞移植后1, 3, 7 d,经腹主动脉抽血,用全自动生化分析仪测丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆红素(TBi),碱性磷酸酶(ALP)。取6只大鼠作正常对照。取大鼠肝脏标本,用40 g/L中性甲醛固定,按常规HE染色,观察肝组织学改变。

**统计学处理** 所有数据以mean±SD表示,死亡率比较采用Fisher确切概率计算,各项肝功能指标比较采用团体t检验。

## 2 结果

**2.1 大鼠存活率** 所有大鼠于药物诱导后逐渐进入严重的肝功能衰竭状态。最初表现为活动减少,不思饮食乃

至嗜睡、共济失调、昏迷,部分伴尿失禁、尿色深黄,口腔、泌尿生殖道出血。不同处理组大鼠1 wk存活率Ⅰ组为60%(9/15),Ⅱ组为20%(3/15),Ⅰ组比Ⅱ组大鼠存活率明显提高( $P < 0.01$ );Ⅲ组为20%(3/15),Ⅳ组为13.3%(2/15),Ⅲ组与Ⅳ组无显著差异( $P > 0.05$ );Ⅴ组为47%(7/15),Ⅵ组为20%(3/15),两组之间差异明显( $P < 0.05$ )。

**2.2 肝脏功能** 各对照组(Ⅱ, Ⅳ, Ⅵ)肝衰竭大鼠ALT, AST, TBi等指标在细胞移植前及细胞移植后1 d无明显差异,3 d肝功能异常达高峰,7 d逐步恢复。统计学分析显示,在移植肝细胞后1 d,不同移植方式治疗与对照组间各项指标差异无显著性( $P > 0.05$ )。至3 d,Ⅰ组与Ⅱ组,Ⅴ组与Ⅵ组比较各项指标均有改善( $P < 0.05$ ),Ⅲ组与Ⅳ组变化不明显。7 d,存活鼠肝功能明显恢复,各组之间无显著差异(表1)。

表1 肝衰竭大鼠细胞移植后肝脏生化指标(mean±SD)

分组	ALT(μkat/L)	AST(μkat/L)	TBi(μmol/L)	ALP(μkat/L)
正常鼠	0.7 ± 0.3	1.9 ± 0.9	1.7 ± 2.3	2.3 ± 0.9
模型鼠 1 d				
Ⅰ	31.3 ± 10.4	40.7 ± 10.9	133.4 ± 51.7	3.4 ± 0.9
Ⅱ	32.7 ± 10.4	43.2 ± 14.1	141.1 ± 47.4	4.1 ± 1.0
Ⅲ	32.8 ± 12.6	43.7 ± 9.0	137.4 ± 34.4	5.3 ± 1.0
Ⅳ	32.6 ± 8.3	46.0 ± 9.2	149.7 ± 72.1	5.1 ± 1.3
Ⅴ	32.0 ± 11.4	42.0 ± 12.1	142.3 ± 68.8	4.7 ± 1.1
Ⅵ	32.5 ± 12.0	41.5 ± 13.7	151.1 ± 58.7	4.9 ± 1.0
3 d				
Ⅰ	14.8 ± 5.2	18.8 ± 10.9	70.9 ± 36.3	2.5 ± 1.2
Ⅱ	37.0 ± 19.4	51.6 ± 27.1	166.1 ± 68.3	4.3 ± 1.7
Ⅲ	26.9 ± 14.4	43.4 ± 20.7	164.4 ± 88.4	3.8 ± 1.6
Ⅳ	38.0 ± 15.7	51.7 ± 18.8	176.0 ± 67.3	4.3 ± 1.6
Ⅴ	14.9 ± 5.5	20.7 ± 12.1	92.8 ± 32.7	3.0 ± 1.2
Ⅵ	36.3 ± 16.9	51.3 ± 21.3	172.4 ± 40.2	4.6 ± 1.8
7 d				
Ⅰ	0.8 ± 0.5	1.9 ± 0.9	2.5 ± 3.1	2.2 ± 0.8
Ⅱ	1.1 ± 0.4	2.1 ± 0.5	1.8 ± 2.2	3.1 ± 1.1
Ⅲ	0.9 ± 0.5	2.2 ± 0.6	2.5 ± 3.8	3.1 ± 1.0
Ⅳ	0.8 ± 0.4	2.3 ± 0.8	1.9 ± 3.1	2.7 ± 1.3
Ⅴ	0.8 ± 0.5	2.0 ± 1.0	2.0 ± 1.5	2.1 ± 0.9
Ⅵ	1.0 ± 0.6	2.3 ± 0.8	2.1 ± 1.8	2.9 ± 1.0

**2.3 肝组织学** 对照组(Ⅱ, Ⅳ, Ⅵ)在肝细胞移植后1, 3 d,肝脏小叶结构破坏,肝索紊乱。肝细胞大片变性坏死,表现为胞质疏松,大量空泡,可见核固缩或碎裂(图1)。Ⅰ组与Ⅴ组在移植后3 d,肝脏组织病变轻于其对照组,部分标本亦可见肝细胞破坏但较轻,表现为肝小叶结构尚清楚,肝细胞变性为主,坏死灶小,炎性细胞浸润少由汇管区开始淋巴细胞、中性白细胞等炎性细胞浸润,坏死区亦见炎性细胞浸润(图2)。Ⅴ组细胞移植后3 d,脾内可见散在的肝细胞或成群的细胞团,多围绕淋巴滤泡分布。肝细胞可呈圆形、椭圆形或多角形,胞质欠丰富。可见少量炎性细胞攻击。7 d脾脏切片内

已无法找到形态典型的肝细胞,多为纤维化条索替代(图3). I组在移植后1 d,腹腔内有游离的黄豆大小的黄白色团块及网膜包裹团块,HE染色见肝细胞,细胞成簇排列,周围可见普弗细胞,淋巴细胞等大量炎性细胞浸润;5 d后腹腔不见游离团块,仅见个别网膜裹聚团块,HE染色后难见完整肝细胞,可见淋巴细胞,肝细胞被纤维组织或肉芽组织替代;7 d腹腔内无肝细胞,仅见纤维组织. 细胞移植后7 d,各组动物肝组织学结构均大致恢复正常.

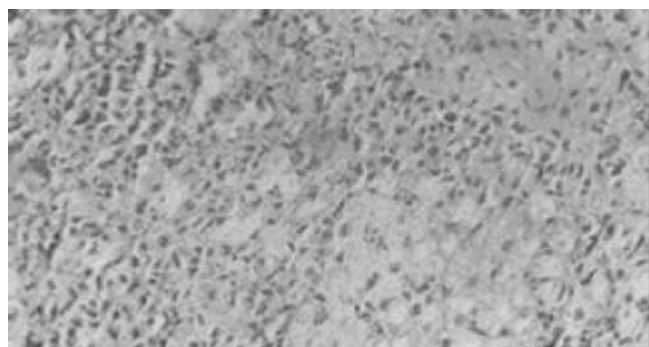


图1 II组大鼠肝细胞移植后3 d(肝脏).

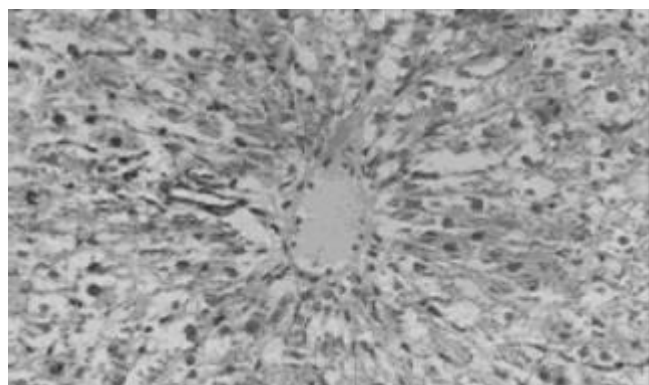


图2 I组大鼠肝细胞移植后3 d(肝脏).

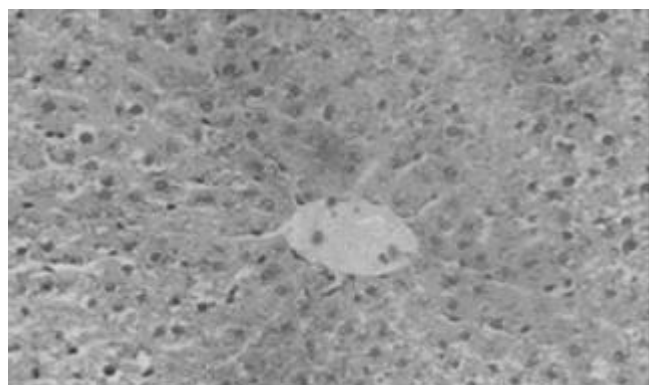


图3 V组大鼠肝细胞移植后7 d(肝脏).

### 3 讨论

肝细胞移植可以提供急性肝功能损害的代谢支持,以便让急性肝衰患者的肝细胞再生到足以支持肝功能或使患者度过急性肝衰的难关而等待原位肝移植,因而成为目前肝移植研究的热点之一. 目前,随着肝细胞材料方面研究进展,如肝细胞的分离纯化及微载体技术

的进一步深入<sup>[9-21]</sup>,动物实验研究水平有了明显的提高,且国外临床试验已取得较理想的治疗效果<sup>[6,22-24]</sup>. 肝细胞移植提高生存率的主要机制包括提供暂时的肝功能支持,以及可通过产生肝细胞生长刺激因子促进残存正常肝脏的再生和功能恢复<sup>[25-29]</sup>. 研究表明,植入的肝细胞可帮助机体迅速度过肝衰期,提高受体的存活率.

肝细胞移植部位的选择非常重要,因为成功的肝细胞移植需要来自门静脉血的亲肝因子的营养作用才足以维持异位移植肝细胞的功能<sup>[30]</sup>. 脾实质是较理想的移植部位,脾内移植的肝细胞具有良好的生理功能和长期存活率<sup>[31-35]</sup>,肝脏本身也因门脉内含高浓度的嗜肝细胞因子和局部生长因子,成为移植肝细胞生存的理想环境<sup>[36-37]</sup>,腹腔内移植因具有操作便利、营养物质及代谢产物交换表面积大等特点<sup>[38]</sup>也常被选用. 我们采用门静脉、脾脏和腹腔3种途径进行同种异体肝细胞移植,结果证实同种异体肝细胞经腹腔、脾脏移植可显著改善D-gal诱导的急性肝衰竭大鼠的存活率,治疗效果明显,与相关文献<sup>[28,35,38-39]</sup>报道一致. 肝脏病理改变与生化指标变化基本平行,细胞移植后1 d,各治疗组与对照组比较,肝脏病理无明显改善. 移植后3 d,脾脏及腹腔移植组肝脏组织学变化明显好于其对照组,移植肝细胞7 d,各组大鼠肝组织均得到明显恢复.

本结果还表明,同种异体肝细胞经门静脉移植不能提高D-gal诱导的急性肝衰竭大鼠的存活率,其疗效较差,与临床治疗效果存在一定差异<sup>[22,24]</sup>. 肝细胞移植后实验鼠死亡率较高,可能系由于实验大鼠个体小,门静脉内径窄,穿刺行肝细胞移植难度较高,移植细胞数量有限,且易发生门静脉出血、门静脉栓塞至肝脏急性缺血、坏死等并发症所至. 故有待较大个体肝衰竭动物的实验研究验证.

采用D-gal诱导急性肝衰竭大鼠模型,药物注射后2 d,肝脏生化指标ALT,AST,TBi,ALP出现明显变化,至5 d该变化达到高峰. 7 d,各组大鼠肝脏功能均大致恢复正常,同时肝脏的组织学变化与其生化指标改变基本平行. 提示该方法虽可较好模拟临床急性肝衰竭患者的病理生理改变,但仍存在模型动物生存时间短及稳定性较差的问题.

总之,运用肝细胞移植治疗急性肝功能衰竭的效果是肯定的,且会随着相关研究的深入而取得更加明显的疗效,同时肝细胞移植部位及方式、细胞种类的选择,细胞体外培养时间等问题也亟待解决. 本研究证实不同移植途径的治疗效果存在一定的差异,经脾脏及腹腔移植肝细胞治疗急性肝衰竭疗效明显,为临床开展肝细胞移植研究提供了新的资料.

### 4 参考文献

- 1 Di Campli C, Gasbarrini G, Gasbarrini A. A medicine based on cell transplantation-is there a future for treating liver diseases? *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:473-480
- 2 Di Campli C, Nestola M, Piscaglia AC, Santoliquido A, Gasbarrini G, Pola P, Gasbarrini A. Cell-based therapy for

- liver diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2003;7:41-44
- 3 Leckel K, Blaheta RA, Markus BH. State of hepatocyte transplantation: a risk or a chance? *Zentralbl Chir* 2003;128: 283-290
- 4 Gupta S. Hepatocyte transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S287-S293
- 5 Gupta S, Chowdhury JR. Therapeutic potential of hepatocyte transplantation. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:439-446
- 6 Ng VL, Alonso M, Bezerra JA. Hepatocyte transplantation advancing biology and treating children. *Clin Liver Dis* 2000; 4:929-945
- 7 Nakamura J, Okamoto T, Schumacher IK, Tabei I, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Fox IJ. Treatment of surgically induced acute liver failure by transplantation of conditionally immortalized hepatocytes. *Transplantation* 1997;63:1541-1547
- 8 Maruyama M, Totsugawa T, Kunieda T, Okitsu T, Shibata N, Takeesue M, Kurabayashi Y, Oshita M, Nakaji S, Kodama M, Tanaka N, Kobayashi N. Hepatocyte isolation and transplantation in the pig. *Cell Transplant* 2003;12:593-598
- 9 Ambrosino G, Varotto S, Basso SM, Cecchetto A, Carraro P, Naso A, De Silvestro G, Plebani M, Abatangelo G, Donato D, Cestrone A, Giron G, D'Amico DF. Hepatocyte transplantation in the treatment of acute liver failure: microencapsulated hepatocytes versus hepatocytes attached to an autologous biomatrix. *Cell Transplant* 2003;12:43-49
- 10 Mitry RR, Hughes RD, Dhawan A. Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:463-467
- 11 Aoki T, Umehara Y, Ferrareso C, Sugiyama N, Middleton Y, Avital I, Inderbitzin D, Demetriou AA, Rozga J. Intrasplenic transplantation of encapsulated cells: a novel approach to cell therapy. *Cell Transplant* 2002;11:553-561
- 12 王英杰, 王小红, 王宇明, 李梦东, 丁健. 培养胎肝细胞上清对暴发性肝衰竭小鼠存活率的影响. *世界华人消化杂志* 1997;5:77-78
- 13 徐小平, 高毅, 杨继震. 人工肝生物材料人肝细胞系 CL-1 的微载体培养. *世界华人消化杂志* 1999;7:197-199
- 14 刘树人, 李灼亮, 彭齐荣, 余宙耀, 张宜俊. 乳猪肝细胞的分离培养及其功能. *世界华人消化杂志* 1999;7:375-377
- 15 胡还章, 徐小平, 高毅, 杨继震. 生物人工肝治疗猪实验性急性肝衰. *世界华人消化杂志* 2001;9:139-143
- 16 于聪慧, 冷希圣, 魏玉华, 刘继超, 杜如昱. 微囊内残余海藻酸钠对微囊化大鼠肝细胞功能的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8: 1052-1053
- 17 王英杰, 王宇明, 李梦东, 刘国栋. 微载体培养人肝细胞及肝非实质细胞. *新消化病学杂志* 1997;5:293-294
- 18 王英杰, 王小红, 李梦东, 王宇明. 移植培养人肝细胞对急性肝衰竭小鼠的保护作用. *世界华人消化杂志* 1998;6:383-385
- 19 陈柯, 高毅, 潘玉先, 杨继震. 有效原代猪肝细胞培养体系的研制. *世界华人消化杂志* 1999;7:206-209
- 20 陈柯, 高毅, 潘玉先, 杨继震. 原代猪肝细胞的分离获取及培养. *世界华人消化杂志* 1999;7:200-202
- 21 陈柯, 高毅, 潘玉先, 杨继震. 正常原代猪肝细胞方瓶微载体静止培养. *世界华人消化杂志* 1999;7:203-205
- 22 Sokal EM, Smets F, Bourgois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, Bernard Otte J, Evrard V, Latinne D, Vincent MF, Moser A, Soriano HE. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 2003;76:735-738
- 23 Nagata H, Ito M, Cai J, Edge AS, Platt JL, Fox IJ. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation. *Gastroenterology* 2003;124:422-431
- 24 Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC, Fox IJ. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* 2003; 111(6 Pt 1):1262-1267
- 25 Strain AJ, Neuberger JM. A bioartificial liver-state of the art. *Science* 2002;295:1005-1009
- 26 Benoist S, Sarkis R, Chafai N, Barbu V, Honiger J, Lakehal F, Becquemont L, Baudrimont M, Capeau J, Housset C, Nordlinger B. Survival and differentiation of porcine hepatocytes encapsulated by semiautomatic device and allotransplanted in largenumber without immunosuppression. *J Hepatol* 2001;35:208-216
- 27 Boudjema K, Bachellier P, Wolf P, Tempe JD, Jaeck D. Auxiliary liver transplantation and bioartificial bridging procedures in treatment of acute liver failure. *World J Surg* 2002; 26:264-274
- 28 Watanabe H, Sumi S, Kitamura Y, Nio Y, Higami T. Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor, and their receptors in transplanted islets in rats. *Surg Today* 2003;33:854-860
- 29 Hodgson H. Liver cells: biology to therapeutics. *Clin Med* 2003; 3:161-165
- 30 Laconi E, Laconi S. Principles of hepatocyte repopulation. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:433-438
- 31 Kaufmann PM, Kneser U, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Izbicki JR, Herbst H, Rogiers X. Is there an optimal concentration of cotransplanted islets of langerhans for stimulation of hepatocytes in three dimensional matrices. *Transplantation* 1999;68:272-279
- 32 Rust C, Gores GJ. Hepatocyte transplantation in acute liver failure: a new therapeutic option for the next millennium? *Liver Transpl* 2000;6:41-43
- 33 Nagata H, Ito M, Shirota C, Edge A, McCowan TC, Fox IJ. Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen. *Transplantation* 2003;76:732-734
- 34 Ba MC, Zhou XD, Chen JS, Liu L. Proliferation of retrorsine-treated SD rat immortalized hepatocytes after intrasplenic transplantation. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao* 2003;23:546-548
- 35 Ahmad TA, Fujioka H, Eguchi S, Yanaga K, Kamohara Y, Furui J, Kanematsu T. Long-term effect of hepatocyte transplantation on fulminant hepatic failure in rats. *Hepatogastroenterology* 2003;50:467-471
- 36 Gupta S, Rajvanshi P, Lee CD. Integration of transplanted hepatocytes into host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5860-5864
- 37 Schneider A, Attaran M, Gratz KF, Bleck JS, Winkler M, Manns MP, Ott M. Intraportal infusion of 99mtechnetium-macroaggregated albumin particles and hepatocytes in rabbits: assessment of shunting and portal hemodynamic changes. *Transplantation* 2003;75:296-302
- 38 Selden C, Casbard A, Themis M, Hodgson HJ. Characterization of long-term survival of syngeneic hepatocytes in rat peritoneum. *Cell Transplant* 2003;12:569-578
- 39 Hamazaki K, Doi Y, Koide N. Microencapsulated multicellular spheroid of rat hepatocytes transplanted intraperitoneally after 90% hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1514-1516



# 肝细胞与骨髓间质干细胞共同培养时的肝细胞功能

黄艳欣, 杜雅菊, 李宝杰

黄艳欣, 杜雅菊, 李宝杰, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
黄艳欣, 女, 1977-11-14 生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族. 2001 年哈尔滨医科大学硕士生.  
项目负责人: 杜雅菊, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科.  
电话: 0451-86605143  
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

## Effect on function of rat hepatocytes cultured with bone marrow cells

Yan-Xin Huang, Ya-Ju Du, Bao-Jie Li

Yan-Xin Huang, Ya-Ju Du, Bao-Jie Li, Department of Gastroenterology, The Second Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Correspondence to: Dr. Ya-Ju Du, Department of Gastroenterology, The Second Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Received: 2003-12-10 Accepted: 2004-02-01

## Abstract

**AIM:** To study of the effect on the function of rat hepatocytes cultured with bone marrow cells.

**METHODS:** Rat hepatocytes were isolated by the modified two-step method described by Seglen. The primary cultured hepatocytes and bone marrow cells were served as cocultured group, and single cultured hepatocytes as control group. The yield and viability were assessed by trypan blue exclusion. The morphologic changes of cultured hepatocytes were observed. The concentrations of albumin and urea in the supernatant in different cultural period were examined.

**RESULTS:** The albumin synthesis ( $13.75 > 2.179$ ,  $P < 0.05$ ) and urea level ( $7.27 > 2.179$ ,  $P < 0.05$ ) had fluctuating changes in one week, and cocultured group had higher albumin synthesis and urea level.

**CONCLUSION:** Cocultured hepatocytes with bone marrow cells can improve the function of hepatocytes.

Huang YX, Du YJ, Li BJ. Effect on function of rat hepatocytes cultured with bone marrow cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1129-1131

## 摘要

**目的:** 利用原代培养的大鼠肝细胞与骨髓间质干细胞共同培养, 研究骨髓间质干细胞对肝细胞功能的影响, 以便更好用于肝细胞移植及生物人工肝。

**方法:** 采用低浓度胶原酶原位循环灌注法分离大鼠肝细胞, 获得有活性的肝细胞进行原代培养。台盼蓝排斥法计算细胞产量和细胞活性; 光镜下动态观察细胞形态学改变, 并收

集不同时期培养上清检测其细胞分泌等功能。比较肝细胞单纯培养及其与骨髓间质干细胞共同培养时细胞的功能。

**结果:** 培养 7 d 时两组均仍然维持白蛋白分泌及尿素合成功能; 共同培养组与单纯肝细胞培养组在白蛋白分泌 ( $13.75 > 2.179$ ,  $P < 0.05$ ) 及尿素合成功能 ( $7.27 > 2.179$ ,  $P < 0.05$ ) 存在显著性差异, 共同培养组明显高于单纯培养组。

**结论:** 肝细胞与骨髓间质干细胞共同培养, 可以使肝细胞维持特异性功能, 提高肝细胞活性。

黄艳欣, 杜雅菊, 李宝杰. 肝细胞与骨髓间质干细胞共同培养时的肝细胞功能. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1129-1131

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1129.asp>

## 0 引言

各种重型肝炎和晚期肝硬化患者的主要死因是肝功能衰竭<sup>[1-3]</sup>。目前肝细胞移植和生物人工肝是较为有前景的治疗方法<sup>[4-10]</sup>。研究表明, 原代肝细胞仍然是其最理想的生物材料<sup>[11-12]</sup>。但肝细胞由于组织分化程度高, 体外几乎不发生增生分裂, 传代极为困难。因此长期以来, 为尽可能的延长原代肝细胞的生存时间, 研究者进行了不懈的探索。国外有人开始尝试将肝细胞与骨髓间质干细胞共同培养, 但国内未见报道。我们应用原位胶原酶灌注法分离大鼠肝细胞, 获得有活性的肝细胞, 并将肝实质细胞与骨髓间质干细胞共同培养, 采用白蛋白和尿素合成作为指标, 与单纯肝细胞培养进行比较研究, 以期找到能使肝细胞在体外大量长期存活并保持良好功能的培养方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♀ 3 月龄 Wistar 大鼠, 质量 150-200 g 由哈尔滨医科大学二院动物实验中心提供。胎牛血清、DMEM 培养基、胶原酶溶液 IV、胰蛋白酶(Oifco)、EDTA (Amres10) 购于 Gibco 公司。0.22 μm 针头滤器(Millipore), Millex-GP 50 mL 塑料培养瓶(Orange Scientific)。肝脏灌洗液为 D-Hanks 液, 肝脏消化液为用 Hanks 液配制的 0.3 g/L IV 胶原酶溶液。配制 2.5 g/L 胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 溶液用以消化传代骨髓间质干细胞。

**1.2 方法** 取 3 月龄 Wistar ♀ 大鼠, 麻醉消毒后取得大鼠的骨髓细胞置入培养瓶中, 1 d 后首次进行换液, 后每 3 d 换液 1 次。待原代培养的细胞增生到 85% 时, 用相应的消化液进行消化, 使之成为单细胞悬液。收集

细胞,离心去上清.按1:2或1:3分配传代培养,传代的骨髓间质干细胞以备共同培养之用.以低浓度胶原酶原位循环灌流法分离获得肝细胞悬液.将分离的肝细胞悬液经离心提纯后加入肝细胞培养液DMEM,将肝细胞密度调整为 $4 \times 10^5/L$ .将第二代的骨髓间质干细胞经消化提纯后,调节细胞密度为 $1 \times 10^5/L$ .取肝细胞与骨髓间质干细胞共同放入培养瓶中,于培养箱中培养.单纯肝细胞培养组.两组都于接种24 h后,换液并继续培养,此后每24 h更换1次培养液.采用台盼蓝排斥法测定肝实质细胞活性,显微镜下计数200个细胞,测得细胞活性率.光镜观察下对培养中的肝细胞进行形态观察并照相纪录.白蛋白及尿素合成功能检测,用Beckman全自动生化分析仪测定肝细胞培养各次换液时所取上清液中白蛋白及尿素含量.

统计学处理 所有数据用均值 $\pm$ 标准差表示,采用对资料t检验进行数据处理,以 $P < 0.05$ 作为显著性界限,利用SPSS8.0软件进行处理.

## 2 结果

2.1 肝细胞活性 平均每只鼠肝可获取 $1.20 \times 10^8$ 个肝细胞,平均细胞活力92.6%.在倒置相差显微镜下观察,可见新鲜分离的离体肝细胞为透亮的圆形细胞,培养24 h后大部分肝细胞贴壁,呈典型的上皮细胞样的多角形形态,少数活力差的细胞悬浮于培养液中,换液时可以去除.培养2 d后,单纯肝细胞培养组中肝细胞黏附于培养瓶壁,相互融合,连接成岛状或条索状(图1);肝细胞与骨髓间质干细胞共同培养组中,有部分肝细胞呈岛状或条索状排列生长,另有大部分肝细胞被分散的骨髓间质干细胞包围(图2)或以骨髓间质干细胞为中心成片生长(图3).培养3 d后肝细胞开始增生,在老的肝细胞周围出现少数透明的,体积较小的上皮样细胞.培养6 d时,单纯培养的肝细胞部分开始颜色变深,颗粒增粗,细胞膜破损,细胞器流出细胞之外,细胞开始脱壁.而共同培养组,只有少数肝细胞直接黏附于瓶壁之上的肝细胞出现同样的改变,多数肝细胞黏附甚至埋于骨髓间质干细胞所分泌的胶原中,仍成片生长.

2.2 肝细胞功能 单纯肝细胞培养组与共同培养组不同培养时间各组内白蛋白的含量存在显著差异( $P < 0.05$ ).从白蛋白分泌的时效曲线分析(图4),单纯培养组中年大鼠肝细胞在培养3 d时达到峰值,其后逐渐下降,于6 d开始下降较为明显.而共同培养组4 d达到峰值,其后呈下降趋势,于5 d开始进入平台期(表1).开始二者均呈递增趋势,共同培养组峰值较单纯培养组高;其后二者均呈下降趋势,共同培养组呈现出平台期,而单纯培养组则下降得更快一些.培养上清液中尿素含量肝细胞单纯培养组与共同培养组存在显著性差异( $P < 0.05$ ),二者尿素合成均逐渐减少,单纯培养组尿素由 $1.33 \pm 0.05 \text{ mmol/L}$ 下降到 $0.51 \pm 0.03 \text{ mmol/L}$ ,共同培养组

由 $1.51 \pm 0.04 \text{ mmol/L}$ 下降到 $0.67 \pm 0.03 \text{ mmol/L}$ ,单纯培养组较共同培养下降迅速(表2).

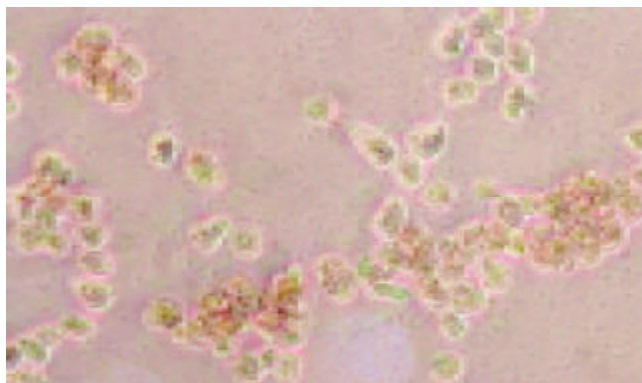


图1 共同培养组骨髓间质干细胞包围下生长的肝细胞 2 d $\times$ 200.

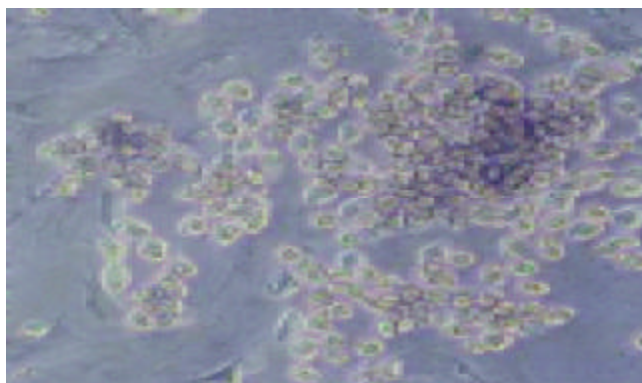


图2 共同培养组中肝细胞以骨髓间质干细胞为中心成片生长 2 d $\times$ 200.

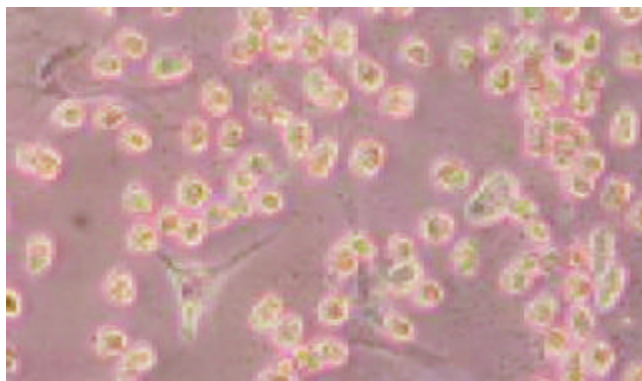


图3 单纯培养组与共同培养组白蛋白分泌时效曲线图.

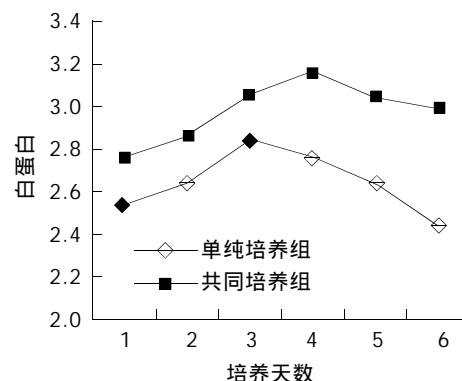


图4 单纯培养组肝细胞呈岛状或条索状排列生长 2 d $\times$ 200.

表 1 2-7 d 共同培养组与单纯培养组白蛋白浓度( $\text{g/L}^{-1}/10^5\text{cells}/24\text{ h}^{-1}$ )

	时间(d)					
	2	3	4	5	6	7
共同培养组	$2.76 \pm 0.05$	$2.86 \pm 0.05$	$3.06 \pm 0.05$	$3.17 \pm 0.05$	$3.04 \pm 0.08$	$2.99 \pm 0.07$
单纯培养组	$2.54 \pm 0.08$	$2.64 \pm 0.08$	$2.84 \pm 0.08$	$2.76 \pm 0.05$	$2.64 \pm 0.08$	$2.44 \pm 0.08$
T	$6.16^a$	$6.16^a$	$6.16^a$	$15.3^a$	$9.35^a$	$13.75^a$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 单纯培养组表 2 共同培养组与单纯培养组肝细胞的尿素浓度( $\text{mmol/L}^{-1}/10^5\text{cells}/24\text{ h}^{-1}$ )

	时间(d)					
	2	3	4	5	6	7
共同培养组	$1.51 \pm 0.04$	$1.22 \pm 0.04$	$1.13 \pm 0.06$	$0.9 \pm 0.06$	$0.8 \pm 0.04$	$0.74 \pm 0.03$
单纯培养组	$1.33 \pm 0.05$	$0.9 \pm 0.03$	$0.85 \pm 0.02$	$0.8 \pm 0.02$	$0.69 \pm 0.06$	$0.62 \pm 0.05$
T	$7.44^a$	$16.9^a$	$11.72^a$	$4.18^a$	$4.03^a$	$7.27^a$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 单纯培养组

### 3 讨论

近年应用肝细胞移植和生物人工肝治疗肝衰竭有了很大的发展. 但无论是肝细胞移植还是生物人工肝, 其支持作用都源于肝细胞良好的生物代谢功能. 理想的肝细胞应该是在培养环境中, 持续大量增生分化, 并且保持较高生物活性, 保持肝细胞的全部功能, 包括合成蛋白、保持酶的活性、代谢毒物、合成尿素等. 为了达到以上目标, 研究者在改进细胞分离及培养方法上进行了不懈的探索.

到目前为止, 我们所选用的胶原酶消化法, 尤其是 Seglen 的改良二步胶原酶灌注法分离肝细胞, 是目前最常用的细胞分离方法, 肝细胞产量可达到 75-85%, 分离肝细胞活率可达 90% 以上. 虽然培养方法不断改进, 但都不能使细胞充分扩增, 且细胞功能衰退较快. 近来, 人们研究发现肝细胞和非实质细胞共同培养, 可以更加充分模拟肝细胞在体内的生存环境, 延长肝细胞生存时间, 使肝细胞保持其特有功能. 骨髓间质干细胞是一种具有多种分化潜能的细胞, 既容易获得又易于在体外扩增, 并且已经有研究表明在肝细胞生长因子的作用下骨髓间质干细胞可以转化为肝细胞, 所以我们选用骨髓间质干细胞和肝细胞共同培养, 以初步探讨骨髓间质干细胞对肝细胞体外培养中生物性状的影响. 结果显示, 共同培养的肝细胞比单纯培养的生存时间有所延长, 生物活性更稳定. 这其中可能有多种原因: 骨髓间质干细胞可以产生各种促分裂素和促肝细胞生长因子(HGF), 这可能是骨髓间质干细胞促进肝细胞增生分裂的主要原因, 但是否有部分骨髓间质干细胞转化成肝细胞并具有一定的肝细胞的功能还值得进一步探讨. 因为肝细胞是一种“抛锚”生长的细胞, 生长时需要基质支撑, 才能保持其正常的生长和分化; 而在试验中观察到, 骨髓间质干细胞分泌大量胶原, 有试验表明骨髓间质干细胞可以合成细胞外基质, 包括 I 型胶原、纤维结合素、IV 型胶原及基底膜的层粘连蛋白,

形成集中的网状结构, 可更好模拟体内微环境, 维持肝细胞的立体构型. 这可能是共同培养时肝细胞的贴壁数量明显多于单纯培养的原因之一.

总之, 肝细胞与骨髓间质干细胞共同培养, 可以使肝细胞培养 7 d 时仍然维持特异性功能, 并且可以提高肝细胞活性; 而且培养 4 d 前后, 共同组的肝细胞处于功能活性的最佳状态, 可望成为应用于临床上肝细胞移植及生物人工肝支持治疗的最佳时机.

### 4 参考文献

- 1 Sass DA, Shakil AO. Fulminant hepatic failure. *Gastroenterol Clin North Am* 2003;32:1195-1211
- 2 Chung YJ, Lee HJ, Koh YT, Kim SB, Kim SH, Choi SH, Yi NJ, Chang SH, Yang EL, Suh KS, Lee YS, Lee KU. Isolation and culture of pig hepatocyte in large scale for the application of bioartificial liver system. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2002;8:249-255
- 3 Adham M. Extracorporeal liver support: waiting for the deciding vote. *ASAIO J* 2003;49:621-632
- 4 Patzer II JF, Lopez RC, Zhu Y, Wang ZF, Mazariegos GV, Fung JJ. Bioartificial liver assist devices in support of patients with liver failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:18-25
- 5 Fox II, Chowdhury JR. Hepatocyte transplantation. *Am J Transplant* 2004;4(Suppl 6):7-13
- 6 Sen S, Williams R. New liver support devices in acute liver failure: a critical evaluation. *Semin Liver Dis* 2003;23:283-294
- 7 Di Campli C, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Review article: a medicine based on cell transplantation-is there a future for treating liver diseases? *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:473-480
- 8 Di Campli C, Nestola M, Piscaglia AC, Santoliquido A, Gasbarrini G, Pola P, Gasbarrini A. Cell-based therapy for liver diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2003;7:41-44
- 9 Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. In vitro production of functionally mature hepatocytes from prospectively isolated hepatic stem cells. *Cell Transplant* 2003;12:469-473
- 10 van de Kerkhove MP, Hoekstra R, van Gulik TM, Chamuleau RA. Large animal models of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research. *Biomaterials* 2004;25:1613-1625
- 11 Tsiaoussis J, Newsome PN, Nelson LJ, Hayes PC, Plevris JN. Which hepatocyte will it be? Hepatocyte choice for bioartificial liver support systems. *Liver Transpl* 2001;7:2-10
- 12 Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003;120:117-130

# 血管紧张素转换酶抑制剂对肝纤维化大鼠 TGF $\beta_1$ , TGFR II, Smad3, 7 表达的影响

龚作炯, 宋仕玲, 阮 鹏, 向龙奎, 张志荣

龚作炯, 宋仕玲, 阮鹏, 向龙奎, 张志荣, 武汉大学病毒学教育部重点实验室, 武汉大学人民医院感染科 湖北省武汉市 430060  
龚作炯, 男, 1962-12-01 生, 湖北省云梦市人, 汉族, 1996 年比利时鲁汶大学医学院博士, 1996-1998 年比利时鲁汶大学医学院博士后, 现任武汉大学人民医院感染科主任, 教授, 博士生导师。主要从事病毒性肝炎的基础与临床研究。  
项目负责人: 龚作炯, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学病毒学教育部重点实验室, 武汉大学人民医院感染科。 zjgong@163.com  
电话: 027-88041911-8385 传真: 027-88042922  
收稿日期: 2003-12-19 接受日期: 2004-01-15

## Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor on expression of TGF $\beta_1$ and TGFR II mRNA, Smad3 and Smad7 on CCl<sub>4</sub>-inducing rat hepatic fibrogenesis

Zuo-Jiong Gong, Shi-Ling Song, Peng Ruan, Long-Kui Xiang, Zhi-Rong Zhang

Zuo-Jiong Gong, Shi-Ling Song, Peng Ruan, Long-Kui Xiang, Zhi-Rong Zhang, Key Laboratory of Virology for Ministry of Education. Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China  
Correspondence to: Dr. Zuo-Jiong Gong, Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China. zjgong@163.com  
Received: 2003-12-19 Accepted: 2004-01-15

## Abstract

**AIM:** To assess the effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril on preventing hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in rats and to investigate the alternation of the expression of transforming growth factor-beta1 (TGF $\beta_1$ ) and its receptor II (TGFR II) and smads on liver tissues.

**METHODS:** 80 Wistar rats were randomly allocated into five groups: group A was healthy controls, groups B and C were hepatic fibrotic models induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>), groups D and E were models treated with perindopril starting at the first and fourth week since rat exposed CCl<sub>4</sub>. Except for group A, rats were subcutaneously injected with CCl<sub>4</sub> for eight weeks. Rats in groups A, B and D were killed at eighth week, and rats in groups C and E were sacrificed at twelfth week. The blood and liver of rats were collected for further determinations. The effects of perindopril on hepatic fibrosis were evaluated by detecting the level of TGF $\beta_1$  and TGFR II mRNA by RT-PCR. And the expression and its localization of Smad3 and Smad7 in liver tissue by an immunohistochemical staining. The liver histopathology was also examined by HE staining and an electron microscope.

**RESULTS:** Contrasted to the groups B and C, the level of TGF $\beta_1$ , TGFR II mRNA and the expression of Smad3 were significantly decreased in groups D and E, and the expression

of Smad7 was also significantly increased in liver of the two groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The expression of TGF $\beta_1$  and TGFR II mRNA, Smad3 and Smad7 were not different between groups B and C ( $P > 0.05$ ), but there was a significant difference between groups D and E ( $P < 0.05$ ). Compared with model groups, the histological changes of fibrosis and the dynamic ultrastructural alterations in rats treated with perindopril were also obviously improved ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril has a protective effect on liver injury and can ameliorate hepatic fibrosis in rats induced by CCl<sub>4</sub>. The mechanisms of perindopril anti-fibrosis may be associated with their effects of down-regulating TGF $\beta_1$  and TGFR II mRNA and smad3, up-regulating Smad7 and result in suppressing the activation of hepatic stellate cells.

Gong ZJ, Song SL, Ruan P, Xiang LK, Zhang ZR. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor on expression of TGF $\beta_1$  and TGFR II mRNA, Smad3 and Smad7 on CCl<sub>4</sub>-inducing rat hepatic fibrogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1132-1135

## 摘要

**目的:** 观察血管紧张素转换酶抑制剂培哚普利抗大鼠肝纤维化的疗效及作用机制。

**方法:** 将 80 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组, 每组 16 只大鼠。A 组为正常对照组; B, C 组为肝纤维化模型组; D, E 组为培哚普利治疗组。B, C, D 和 E 组大鼠均给四氯化碳 8 wk 诱导肝纤维化; D, E 组大鼠分别于 4, 8 wk 予以培哚普利灌胃治疗。A, B, D 组大鼠于 8 wk 处死, C, E 组大鼠于 12 wk 处死。RT-PCR 检测大鼠肝组织 TGF $\beta_1$  与 TGFR II mRNA; 免疫组化技术检测 Smad3 及 Smad7 在肝内的表达及定位; HE 染色及电镜检测检测肝组织病理改变。

**结果:** 与模型组大鼠比较, RT-PCR 显示经培哚普利治疗大鼠肝内 TGF $\beta_1$  与 TGFR II mRNA ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 以及 Smad3 表达明显降低; 而 Smad7 的表达增加, Smad3 的免疫阳性反应信号主要位于纤维间隔中的细胞质, Smad7 则主要在肝细胞质表达。大鼠肝组织 TGF $\beta_1$  与 TGFR II mRNA, Smad3 与 Smad7 在 D 组与 E 组表达比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 而上述物质在 B 组与 C 组比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。培哚普利治疗后, 大鼠肝小叶结构趋于正常, 纤维间隔明显变薄, 肝细胞超微结构改善。

**结论:** 培哚普利能有效地减轻肝纤维化大鼠的肝脏损伤及纤维化程度, 其机制可能与抑制肝内 TGF $\beta_1$  与 TGFR II mRNA

及 Smad3 表达, 促进 Smad7 表达有关.

龚作炯, 宋仕玲, 阮鹏, 向龙奎, 张志荣. 血管紧张素转换酶抑制剂对肝纤维化大鼠 TGF $\beta$ , TGFR II, Smad3, 7 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(5): 1132-1135

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1132.asp>

## 0 引言

局部肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)可促进损伤组织修复和纤维化. 心、肾及肝中的 RAS 有促纤维化作用<sup>[1-3]</sup>. RAS 的这种促纤维化作用主要由多细胞产生并具多功能的转化生长因子 $\beta_1$ (transforming growth factor $\beta_1$ , TGF $\beta_1$ )介导. RAS 中首要效应器分子血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)可增强 TGF $\beta_1$  的作用<sup>[4-6]</sup>, 并刺激肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)增生和肝内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)形成. 肝内 TGF $\beta_1$  与其受体结合后, 再由 Smad 蛋白传导 TGF $\beta_1$  的信号至细胞内发挥作用<sup>[7-8]</sup>, TGF $\beta_1$  在肝纤维形成中起着重要作用<sup>[9-10]</sup>. 既往研究已经证实 ACEI 具有抗肝纤维化作用, 但其机制不甚明了. 我们研究血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)培哚普利(perindopril)对 TGF $\beta_1$  信号转导各阶段的影响, 探索培哚普利抗实验性肝纤维化的可能作用机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠 80 只, 雌雄各半, 180-220 g, 6-8 周龄, 武汉大学人民医院实验动物中心提供, 饲养期间, 动物自由进食饮水. 四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)分析纯购自武汉亚法生物技术有限公司, 以食用色拉油配制成 400 mL/L 溶液. 培哚普利(perindopril)由法国施维雅公司(Les Laboratoires Servier)提供. Catrimox-14™ RNA 提取试剂盒, AMV 逆转录酶, Taq DNA 聚合酶, dNTP 混合物, DL2000 Marker 等均为 Takara 公司产品. 引物委托大连 Takara 公司合成. (1)TGF $\beta_1$ : 正义序列 5'-TGAGTGGCTGTCTTTTGACG-3', 反义序列 5'-ACTTCCAACC CAGGTCCTTC-3', 产物 350 bp; (2)TGFR II: 正义序列 5'-CTACAAGGCC AAGCTGAAGC-3', 反义序列 5'-AGCCATGGAGTAGACATCCG-3', 产物 580 bp; (3)GAPDH: 正义序列 5'-TCCCTCA ACATT GTCAGCAA-3', 反义序列 5'-AGCTCCACAACGG ATACATT-3', 产物 309 bp. 抗 Smad3, 抗 Smad7 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品. 即用型 S-P 试剂盒为福州迈新生物技术开发公司产品.

1.2 方法 肝纤维化大鼠模型制作参照 Wang et al<sup>[11]</sup>方法略加改进. 大鼠随机分为 5 组: A 组为正常对照组, B 组为肝纤维化模型 1 组, C 组为肝纤维化模型 2 组, D 组为培哚普利治疗 1 组, E 组为培哚普利治疗 2 组, 每组各有大鼠 16 只. 除 A 组外, 各组大鼠按 3 mL/kg sc 400 mL/L CCl<sub>4</sub>, A 组予以生理盐水 3 mL/kg sc, 2 次/wk,

共 8 wk. D, E 组分别于造模 4, 8 wk 开始培哚普利 5 mg/kg, 加入生理盐水 ig, 1 次/d, 共用药各 8 wk. A, B, D 组大鼠于 8 wk 处死. C, E 组大鼠于 12 wk 处死, 分离血清 -20 °C 冰箱保存; 剖腹取部分肝左叶组织分别用 40 g/L 中性甲醛及 25 g/L 戊二醛固定, 其余肝组织 -70 °C 冰箱保存.

1.2.1 肝组织总 RNA 提取及 RT-PCR 反应 抽提肝组织总 RNA 按照 Catrimox-14™ RNA 提取试剂盒说明书操作, 测定样品 A268nm/A280nm 比值 1.6-1.8 时提取 RNA 纯度较好. 逆转录反应: 无菌 0.2 mL 的 Eppendorf 管中加入总 RNA 1  $\mu$ g, Random primer (50  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, Ribonuclease inhibitor (40 MU/L) 1  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.5  $\mu$ L, AMV (5MU/L) 1  $\mu$ L, 5  $\times$  AMV buffer 4  $\mu$ L 加 DEPC 处理的 dd H<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L. 反应条件为 42 °C 1 h, 95 °C 5 min. PCR 扩增: 在无菌 0.2 mL 的 Eppendorf 管中加入: 10  $\times$  Buffer 5  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, 正、反义引物(30  $\mu$ mol/ $\mu$ L)各 1  $\mu$ L, cDNA 4  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L, 加无菌 dd H<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L, 最后加石蜡油 40  $\mu$ L. 扩增条件: 94 °C 5 min, 1 个循环; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min, 1 个循环. 取 PCR 产物 10  $\mu$ L 进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 拍照后进行扫描测定灰度值, 将目的 mRNA 与 GAPDH 的 RT-PCR 产物的灰度值比值作为目的 mRNA 相对表达量.

1.2.2 免疫组织化学法检测大鼠肝组织 Smad3 和 Smad7 表达 具体步骤参照 SP 试剂盒说明书进行. 抗 Smad3 和抗 Smad7 多克隆抗体稀释度均为 1:100. PBS 代替一抗作阴性对照. 光学显微镜下观察, 阳性组织呈棕黄色, 阴性部分呈蓝色. 随机选取每张切片 10 个视野( $\times$  400 倍)测定阳性细胞的 A 值与所占视野面积, 取其乘积平均值为该组织切片所得值, 两项乘积越大表明组织中该抗原含量越高.

1.2.3 肝组织病理形态学观察 HE 染色光镜下观察肝组织炎症与纤维化程度. 肝纤维化积分参照《肝纤维化诊断及诊疗评估共识》<sup>[12]</sup>. 电镜观察大鼠肝脏超微结构变化.

统计学处理 各组计量资料以均数  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)表示, 数据呈正态分布采用 SPSS 统计软件(11.0 版)进行单因素组间方差分析.

## 2 结果

2.1 肝组织 TGF $\beta_1$  与 TGFR II mRNA 的表达 A 组大鼠肝脏仅微弱表达, B, C 组模型大鼠肝组织内高表达, 两组表达相对含量无明显差别(P > 0.05). D, E 组显示缬沙坦对 TGF $\beta_1$  与 TGFR II mRNA 有较强抑制作用, 两种物质在肝内表达减弱, D 组两种物质表达相对含量少于 E 组(P < 0.05). 见(表 1, 图 1-3).

2.2 肝组织 Smad3, Smad7 的表达 Smad3 与 Smad7 表达阳性物质主要集中在胞质内, 胞膜上也有少量表达. A 组在正常肝细胞内未见 Smad3 表达, 汇管区基质及间



质细胞胞质内少量表达; Smad7 在肝细胞胞质内强烈表达, 部分肝细胞核膜也有表达, 在汇管区未见明显表达. B, C 组肝内 Smad3 表达明显增强, 主要见于小叶周围扩大的纤维组织内的成纤维细胞, 窦周细胞, 炎性细胞以及增生的胆小管周围梭状细胞内, 肝细胞内无表达; Smad7 表达极少, 集中在少数肝细胞及纤维间隔梭状细胞胞质内, 阳性细胞着色浅淡. 两种物质在 B,

C 组表达量无明显差别; D, E 组肝组织: Smad3 表达量减少, 接近正常肝组织水平, 阳性表达集中在汇管区, 间质细胞和炎性细胞胞质内; Smad7 在肝细胞胞质内的表达强烈, 汇管区及纤维组织内表达较少, 二组阳性程度强于 B, C 组, D 组表达量与 E 组比较差异有显著性( $P < 0.05$ ). (见表 1).

2.3 肝组织病理变化 光镜下 A 组肝脏肝小叶结构正常,

表 1 肝纤维化大鼠肝组织 TGF $\beta$ 1 与 TGFR II mRNA, Smad3 和 Smad7 表达和坏死炎症和纤维化积分(mean $\pm$ SD)

分组	n	TGF $\beta$ 1 mRNA	TGFR2 mRNA	Smad3	Smad7	炎症坏死积分	纤维化积分
A	16	0.40 $\pm$ 0.06	0.28 $\pm$ 0.03	0.248 $\pm$ 0.042	4.674 $\pm$ 1.143	0	0
B	11	1.41 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.27 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.785 $\pm$ 0.904 <sup>b</sup>	0.414 $\pm$ 0.085 <sup>b</sup>	5.3 $\pm$ 1.3	7.4 $\pm$ 1.6
C	12	1.39 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.31 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.815 $\pm$ 0.677 <sup>b</sup>	0.481 $\pm$ 0.104 <sup>b</sup>	4.9 $\pm$ 1.3	7.0 $\pm$ 1.6
D	14	0.59 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	0.46 $\pm$ 0.03 <sup>bd</sup>	0.279 $\pm$ 0.085 <sup>d</sup>	2.137 $\pm$ 1.011 <sup>d</sup>	3.2 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	4.4 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
E	13	0.693 $\pm$ 0.057 <sup>bf</sup>	0.563 $\pm$ 0.045 <sup>bf</sup>	0.323 $\pm$ 0.094 <sup>g</sup>	1.674 $\pm$ 1.015 <sup>g</sup>	3.8 $\pm$ 1.0 <sup>ce</sup>	5.5 $\pm$ 1.5 <sup>de</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01 vs A 组; <sup>d</sup>P < 0.01 vs B 组; <sup>f</sup>P < 0.01 vs C 组; <sup>g</sup>P < 0.05 vs D 组.

肝细胞索排列规则有序, 肝窦与汇管区成纤维细胞少; B, C 组正常肝小叶结构紊乱, 肝细胞坏死分布不规则, 部分肝细胞呈脂肪变性, 可见嗜酸性小体, 中央静脉偏位, 缺如或二个以上, 肝细胞索失去放射状肝索结构, 间质中有炎性细胞浸润, 坏死区及汇管区纤维结缔组织增生形成细小的条索, 纤维宽窄不一, 呈星芒状向肝小叶内延伸; D, E 组肝细胞坏死, 纤维组织增生减少, 肝小叶结构较为正常, 肝内炎症细胞减少, 接近正常肝组织. 见表 1. 电镜下 A 组大鼠肝细胞结构完整, Disse 间隙内可见富含脂滴的 HSC, 内皮细胞窗孔丰富, 内皮细胞外侧未见基底膜存在, 细胞间隙未见明显胶原纤维. 模型 B, C 组大鼠肝内成纤维细胞形成, 细胞间隙增宽, 其间有大量胶原纤维沉积; 肝细胞内线粒体肿胀, 粗面内质网数量减少, 滑面内质网增多; 内皮细胞间窗孔明显减少, 细胞外侧可见基底膜形成. D, E 治疗组成纤维细胞减少, 可见含有脂滴的 HSC, 肝细胞间胶原纤维明显减少, 线粒体形态基本正常, 内皮细胞间窗孔增多, D 组大鼠肝组织细胞间胶原纤维少于 E 组大鼠, 细胞间隙增宽不明显.

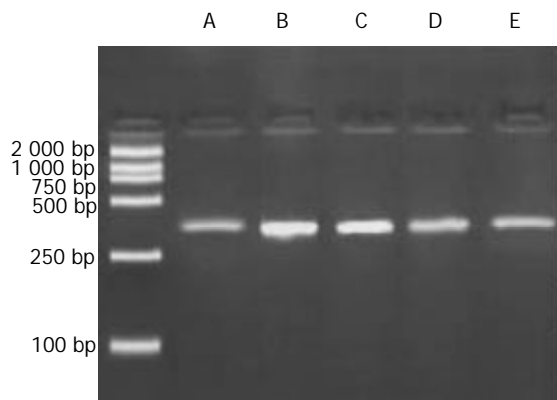


图 1 肝纤维化大鼠肝组织 TGF $\beta$ 1 mRNA.

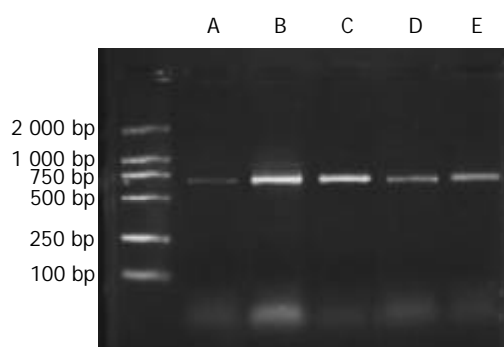


图 2 肝纤维化大鼠肝组织 TGFR II mRNA 的表达

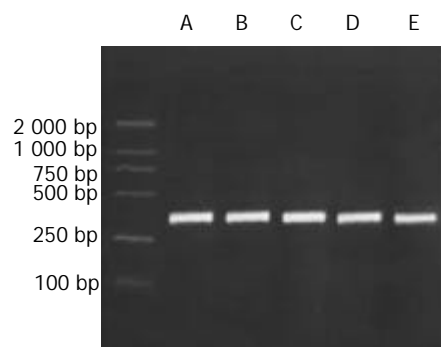


图 3 肝纤维化大鼠肝组织 GAPDH mRNA 的表达

### 3 讨论

培哚普利可显著减轻肝纤维化大鼠肝脏炎症和纤维化程度, 电镜观察肝组织超微结构显示, 与肝纤维化模型组大鼠对比, 经培哚普利治疗后肝细胞器结构接近正常, 细胞间隙变窄, 其间胶原纤维显著减少, 内皮细胞间窗孔明显增多, 未见到成纤维细胞. 说明培哚普利对 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化具有保护肝细胞, 减少胶原纤维形成并在细胞间隙沉积作用, 减轻肝窦毛细血管化, 阻断肝纤维化发生. 既往研究已经证明 ACEI 具有抗实

验性肝纤维化作用<sup>[1, 6, 13]</sup>, 该类药物可降低肝纤维化动物血清羟脯氨酸酶, 胶原含量, 通过蛋白激酶 C 抑制 TIMP-1 表达, 减少  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白在 HSC 的表达, 本实验结果与之吻合.

慢性肝病时血液循环中 Ang II 增多, HSC 能表达 Ang II 的 I 型受体(Ang II receptor type I, AT1R)<sup>[14]</sup>, 外源性 Ang II 通过 AT1R 能促进 HSC 分裂增生和胶原合成<sup>[15-16]</sup>, 上调大鼠原代 HSC 内 TGF $\beta$ <sub>1</sub><sup>[17]</sup>. HSC 能通过自分泌与旁分泌作用正反馈增加 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 合成分泌<sup>[18-19]</sup>, TGF $\beta$ <sub>1</sub> 又正反馈刺激 HSC 活化, 增生并转化为成纤维细胞, 最终大量 ECM 沉积于肝内, 形成肝纤维化. 本结果显示, 肝纤维化大鼠肝组织内 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 及 TGFR II mRNA 表达明显上升, 而经过培哚普利治疗大鼠肝组织内这两种物质表达明显减少, 说明培哚普利使肝纤维化大鼠 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 与其受体结合受阻, TGF $\beta$ <sub>1</sub> 信号下传在其受体水平上首先被抑制. 我们发现在 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化过程中, 早期应用培哚普利防治肝纤维化的作用明显优于晚期治疗组, 并接近于正常组, 说明早期给与 ACEI 培哚普利抑制 Ang II 生成, 可以早期阻止 HSC 活化分泌 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 与 TGFR II, 并早期阻断二者结合. 基因转导 Smad7 可抑制实验性小鼠肝纤维化, Smad7 通过活化的 TGF $\beta$  受体, 封锁 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 信号转导, 抑制 Smad2/3 磷酸化和活化的 Smad 复合物向核内易位, 最终降低 I 型胶原表达, 消除 HSC 的 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 依赖增生抑制作用. TGF $\beta$  可快速诱导 Smad7 mRNA 表达, Smad7 参与调控 TGF $\beta$  反应的负反馈环路, 但在肝纤维化大鼠中未见 TGF $\beta$  诱导性 Smad7 上调, 而 Smad3 mRNA 则有增加. 而 Smad3 与 HSC 中的 TGF $\beta$  反应元件相连接, 刺激  $\alpha$  I 型胶原与 I 型纤溶酶原激活物抑制因子(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)基因转录, 与 Smad2 不同的是, 这种作用不受 Smad7 过表达的抑制. 我们研究发现, 肝纤维化大鼠经培哚普利治疗后, 在 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 重要的下游信号通道蛋白 Smad 中, 对 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 具有正反馈作用的 Smad3 表达显著减少, 而具有负反馈作用的 Smad7 表达显著增多, 培哚普利早期治疗组对肝纤维化大鼠肝组织 Smad 作用强于晚期治疗组. 即使大鼠仍不断受到 CCl<sub>4</sub> 促纤维化刺激作用下, ACEI 不但使纤维化大鼠肝组织内 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 及其 II 型受体的合成, 结合受到抑制, 且作用于 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 细胞内信号通道蛋白, 促进抑制型 Smad7 合成, 降低途径限制型 Smad3 合成, 在多水平阻止 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 发挥病理作用, 以抑制 HSC 活化转化为成纤维细胞, 减少 ECM 减轻肝纤维化程度. 证实 ACEI 培哚普利具有抗试验性大鼠肝纤维化作用, 该药可改善肝组织细胞结构, 通过抑制 TGF $\beta$ <sub>1</sub> 和 TGFR II 受体 mRNA 表达, 肝内 TGF $\beta$  下游信号通道蛋白 Smad3 与 Smad7 削弱 TGF $\beta$  的信号传导通路, 从而抑制 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化程度. 由于病毒性肝炎及肝纤维化在我国是较严重的问题<sup>[15-16]</sup>, 本

课题须待进一步研究.

#### 4 参考文献

- Border WA, Noble N. Maximizing hemodynamic-independent effects of angiotensin II antagonists in fibrotic diseases. *Semin Nephrol* 2001;21:563-572
- Reaves PY, Gelband CH, Wang H, Yang H, Lu D, Berecek KH, Katovich MJ, Raizada MK. Permanent cardiovascular protection from hypertension by the AT(1) receptor antisense gene therapy in hypertensive rat offspring. *Circ Res* 1999;85:e44-50
- Bader M. Molecular interactions of vasoactive systems in cardiovascular damage. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:S7-9
- Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000;31:828-833
- Paizis G, Gilbert RE, Cooper ME, Murthi P, Schembri JM, Wu LL, Rumble JR, Kelly DJ, Tikellis C, Cox A, Smallwood RA, Angus PW. Effect of angiotensin II type 1 receptor blockade on experimental hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 2001;35:376-385
- Yoshiji H, Kuriyama S, Fukui H. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitors may be an alternative anti-angiogenic strategy in the treatment of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. Possible role of vascular endothelial growth factor. *Tumour Biol* 2002;23:348-356
- Blobe GC, Schiemann WP, Pepin MC, Beauchemin M, Moustakas A, Lodish HF, O'Connor-McCourt MD. Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling. *J Biol Chem* 2001;276:24627-24637
- Fortuno ES 3rd, LeSueur JA, Graff JM. The amino terminus of Smads permits transcriptional specificity. *Dev Biol* 2001;230:110-124
- Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003;124:147-159
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGFbeta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807
- Wang YQ, Ikeda K, Ikebe T, Hirakawa K, Sowa M, Nakatani K, Kawada N, Kaneda K. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *Hepatology* 2000;32:980-989
- 中华肝病协会肝纤维化研究组. 肝纤维化诊断和疗效评估共识. *中华肝病杂志* 2002;10:327-328
- Yoshiji H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Imazu H, Yanase K, Kuriyama S, Fukui H. Inhibition of renin-angiotensin system attenuates liver enzyme-altered preneoplastic lesions and fibrosis development in rats. *J Hepatol* 2002;37:22-30
- Battaller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;118:1149-1156
- Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34:745-750
- Kurikawa N, Suga M, Kuroda S, Yamada K, Ishikawa H. An angiotensin II type 1 receptor antagonist, olmesartan medoxomil, improves experimental liver fibrosis by suppression of proliferation and collagen synthesis in activated hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol* 2003;139:1085-1094
- Okuno M, Akita K, Moriwaki H, Kawada N, Ikeda K, Kaneda K, Suzuki Y, Kojima S. Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGFbeta. *Gastroenterology* 2001;120:1784-1800

# 理气中药对鼠胃肠动力的影响

王贺玲, 李 岩, 白 菡, 张 健

王贺玲, 李岩, 中国医科大学附属第二医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004  
白菡, 中国医科大学附属第二医院感染科 辽宁省沈阳市 110004  
张健, 沈阳市第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110041  
项目负责人: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二医院消化内科.  
收稿日期: 2003-10-15 接受日期: 2004-02-03

## Effect of qi-regulating Chinese medicine on gastrointestinal motility

He-Ling Wang, Yan Li, Han Bai, Jian Zhang

He-Ling Wang, Yan Li, Department of Gastroenterology, Shengyang First Municipal Hospital, Shengyang 110004, Liaoning Province, China  
Han Bai, Department of Gastroenterology the Second Clinical Hospital of Chinese Medical University, Shengyang 110004, Liaoning Province, China  
Jian Zhang, Department of Infectious Disease, the Second Clinical Hospital of Chinese Medical University, Shengyang 110041, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Yan Li, Department of Gastroenterology, the Second Clinical Hospital of Chinese Medical University, Shengyang 110041, Liaoning Province, China  
Received: 2003-10-15 Accepted: 2004-02-03

## Abstract

AIM: To study the effects of Chinese qi-regulating medicine on gastrointestinal motility and their mechanism.

METHODS: The effect of the qi-regulating medicine on gastrointestinal motility was investigated by measuring the rate of the semisolid paste remaining in stomach and the rate of the semisolid paste's propulsion in the small intestine. To study the difference of gastrointestinal motility, motilin and NO produced by the radix aucklandiae and pericarpium arecae, a rat model of the abnormal gastrointestinal motility was induced by injecting L-Arg into rat's abdominal cavity.

RESULTS: Pericarpium arecae, Radix aucklandiae, Fructus amomum villosum, Cotex magnolia officinal and Pericarpium pumiciti petcultae had effects on gastric emptying in the rats ( $P < 0.05$ ). Fructus aurantii immaturus, Pericarpium arecae, Pericarpium pumiciti petcultae, Rhizoma cyperi, Amomum villosum and Melia toosenda had effects on small intestinal propulsion in the rats ( $P < 0.05$ ). Pericarpium arecae and Radix aucklandiae inhibited the effects of L-Arg on increasing the serum NO and on decreasing the plasma motilin (MTL) in rats ( $P < 0.05$ ). Pericarpium arecae and Radix aucklandiae could improve gastric emptying in the rat model.

CONCLUSION: Pericarpium arecae, Radix aucklandiae, Fructus amomum villosum, Cotex magnolia officinal and Pericarpium pumiciti petcultae can promote the gastrointestinal motility and the effects of Pericarpium arecae and Radix aucklandiae are stronger than others. Fructus aurantii immaturus, Pericarpium arecae, Pericarpium pumiciti petcultae,

Rhizoma cyperi, Amomum villosum and Melia toosenda can promote the small intestine's transmission function. Pericarpium arecae and Radix aucklandiae are able to improve the abnormal gastric dynamics in the rats, but can not improve the obstacle of small intestine transmission function made by L-Arg.

Wang HL, Li Y, Bai H, Zhang J. Effect of qi-regulating Chinese medicine on gastrointestinal motility. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(5):1136-1138

## 摘要

目的: 观察理气中药促胃肠动力作用及作用机制.

方法: 观察10种理气中药对健康小鼠服药前后胃内残留率及小肠推进率的变化; 以大鼠腹腔注射L-Arg造成的大鼠胃肠运动障碍模型为对象, 探讨木香及大腹皮对模型大鼠胃肠运动及胃动素、NO 的影响.

结果: 理气中药中大腹皮、陈皮、砂仁、厚朴、木香对健康小鼠胃残留率明显低于对照组; 陈皮、大腹皮、枳实、砂仁、苦楝子、香附对正常小鼠小肠推进率明显高于对照组( $P < 0.05$ ); 大腹皮、木香对造模大鼠用药后胃动素较造模组显著升高( $P < 0.05$ ); 大腹皮使造模大鼠血中一氧化氮显著下降( $P < 0.05$ ). 木香、大腹皮能显著改善造模大鼠的胃排空( $P < 0.05$ ), 且与西沙必利间无明显差异( $P > 0.05$ ).

结论: 理气中药木香、大腹皮、砂仁、厚朴、陈皮有明显的促进胃排空作用; 木香、大腹皮作用明显强于砂仁、厚朴、陈皮; 木香的作用优于西沙必利. 枳实、大腹皮、陈皮、香附、砂仁、苦楝子有促进小肠传输功能. 木香、大腹皮能明显改善L-Arg所致胃排空障碍. 木香、大腹皮对L-Arg所致小肠传输功能障碍无改善作用.

王贺玲, 李岩, 白菡, 张健. 理气中药对鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1136-1138

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1136.asp>

## 0 引言

理气药常被用来治疗消化系统疾患, 有促进胃肠动力的作用<sup>[1-7]</sup>, 但多局限于某个方剂或单味药药效学研究, 缺乏系统观察报道. 我们选用木香, 陈皮, 枳实, 大腹皮, 薤白, 乌药, 砂仁, 香附, 厚朴, 苦楝子等十味常用理气中药, 观察其对健康小鼠胃排空及小肠传输功能的影响, 并从中筛选出有显著增强胃肠运动的中药, 以现代医学的方法观察其中具有较

强作用的大腹皮、木香对一氧化氮前体盐酸左旋精氨酸(L-Arg)致大鼠胃动力异常模型的作用, 并进一步探讨了其作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 中国医科大学第二附属医院实验动物中心提供昆明系♂小白鼠, 质量20-24 g。中国医科大学实验动物部提供♂SD大白鼠, 质量200-250 g。理气类中药包括木香, 陈皮, 枳实, 大腹皮, 薤白, 乌药, 砂仁, 香附, 厚朴, 苦楝子(购于东北大药房), 用蒸馏水煎煮30 min过滤。将滤液浓缩成生药500 g/L浓度的水煎剂, 4℃保存备用, 全部药品均经鉴定为正品。西沙必利混悬液(西安杨森产品), 用蒸馏水配成0.2 g/L, 4℃保存备用。L-Arg上海康达氨基酸厂提供, 用时加生理盐水溶解, 并以盐酸调至pH7.0。胃动素(MTL)放免试剂盒北京东亚免疫技术研究所提供。一氧化氮(NO)试剂盒南京建成生物制品公司提供。电子天平称(沈阳龙腾电子称量仪器有限公司), FT-613自动计算<sup>125</sup>I放免测量仪(北京核仪器厂), CAY-1型液体快速混合器(北京长安仪器厂), 紫外光可见连续分光光度仪(法国S500P型)。

## 1.2 方法

**1.2.1 对正常小鼠胃排空的影响** 昆明系小鼠224只随机分为12组, 即对照组, 西沙必利组及10个中药组。中药组灌服中药水煎剂0.6 mL/只, 对照组灌服等体积蒸馏水, 西沙必利组灌服等体积西沙必利混悬液, 连续7 d, 禁食不禁水18 h后于8 d给药后1 h, 灌胃半固体糊(羧甲基纤维素2.5 g, 奶粉4 g, 糖2 g, 淀粉2 g加62.5 mL水, 1 mL碳素墨水, 配成75 mL约75 g的糊状物<sup>[2]</sup>)0.5 mL/只。15 min后脱颈处死动物, 剖开腹腔, 结扎胃贲门和幽门, 取胃, 用滤纸拭干后称质量, 然后沿胃大弯剪开胃体, 洗去胃内容物后拭干, 称胃净质量, 以胃全质量和胃净质量的差值为胃残留物质量, 以此与所给糊质量的百分比为胃内残留率。对小鼠小肠推进的影响, 剖开腹腔后迅速取出整个胃肠于实验台上, 轻轻剥离, 铺直, 测量幽门至盲肠部全长及幽门至半固体糊前沿的距离, 以幽门至半固体糊前沿距离占幽门至回盲部全长的百分率为半固体糊推进百分率。

**1.2.2 中药对以L-Arg致大鼠胃动力异常的影响** SD大鼠54只, 随机分为5组: 空白组10只, 每日腹腔内注射与其他组容量相同的生理盐水, 灌胃蒸馏水20 mL/kg; 造模组10只, L-Arg 5.2 g/kg(第1 d), 2.6 g/kg(第2-5 d)<sup>[1]</sup>腹腔注射, 同时常水20 mL/kg灌胃; L-Arg+木香或大腹皮各12只, 每日灌服10 g/kg单味中药, L-Arg用量及用法同2组。5组L-Arg+西沙必利组10只, 每日与西沙必利混悬液4.2 mg/kg, L-Arg用量及用法同造模组。用药后6 d, 灌服中药、西沙必利及蒸馏水60 min, 予异戊巴比妥(浓度10%)1 mL/kg麻醉, 眼底球后静脉采血2 mL, 放射免疫法测定血浆MTL, 硝酸还原酶法测定血清NO。采血完毕后, 将大鼠禁食不禁水18 h,

7 d灌药60 min后, 予以灌胃半固体糊2 mL/只, 30 min后脱颈处死, 剖开腹腔取胃肠, 实验方法同实验-1, 计算胃内残留率及小肠推进率。

统计学处理 数据以平均数标准差(mean±SD)表示, 采用Excel统计软件均数的t检验, P<0.05认为有统计学意义; 方差分析, 采用SPSS统计软件, P<0.05为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 胃排空功能和小肠推进率的影响与对照组比较**, 小鼠灌服大腹皮、陈皮、砂仁、厚朴、木香及西沙必利后胃残留率呈有意义的显著降低(P<0.05); 木香与砂仁、厚朴、陈皮与西沙必利相比, 木香作用明显优于其他(P<0.05, 表1); 砂仁、厚朴、陈皮、大腹皮及西沙必利对健康小鼠胃残留率无有效影响(P>0.05); 陈皮、大腹皮、枳实、砂仁、苦楝子、香附对正常小鼠小肠推进率的影响与对照组相比有显著差异(P<0.05, 表1), 此6味药和西沙必利对正常小鼠小肠推进率的影响无统计学意义(P>0.05)。

表1 理气中药对小鼠胃排空和小肠推进率的影响

组别	n	胃内残留率	小肠推进率
空白组	21	60.7 ± 17.4	50.0 ± 12.8
西沙必利	18	50.0 ± 7.6 <sup>a</sup>	58.7 ± 9.5
木香	19	40.1 ± 14.9 <sup>ac</sup>	61.7 ± 22.7 <sup>a</sup>
大腹皮	18	48.3 ± 12.8 <sup>a</sup>	60.2 ± 12.3 <sup>a</sup>
砂仁	18	49.9 ± 11.9 <sup>ad</sup>	58.3 ± 15.1 <sup>a</sup>
陈皮	19	50.2 ± 13.7 <sup>ad</sup>	57.8 ± 15.8 <sup>a</sup>
厚朴	19	50.3 ± 14.2 <sup>ad</sup>	57.4 ± 7.9 <sup>a</sup>
薤白	19	51.9 ± 14.8	57.1 ± 7.6 <sup>a</sup>
乌药	18	58.3 ± 19.1	55.2 ± 17.6
枳实	19	61.6 ± 8.19	52.4 ± 14.2
苦楝子	18	63.4 ± 14.3	48.5 ± 10.6
香附	18	69.9 ± 10.6	48.4 ± 12.4

<sup>a</sup>P<0.05 vs 空白组, <sup>b</sup>P<0.05 vs 西沙必利, <sup>c</sup>P<0.05 vs 木香。

表2 中药对左旋精氨酸所致大鼠胃肠动力和血浆激素的影响

组别	n	胃动素 nmol/L	NO μmol/L	胃残留率	小肠推进率
对照组	10	92.0 ± 16.7	41.9 ± 9.1	65.1 ± 14.8	64.9 ± 11.1
造模组	10	76.1 ± 11.7 <sup>a</sup>	51.7 ± 8.9 <sup>a</sup>	84.7 ± 8.7 <sup>a</sup>	53.7 ± 7.4 <sup>a</sup>
造模+西沙必利	10	83.6 ± 11.4	61.0 ± 16.7	70.8 ± 16.4 <sup>c</sup>	61.5 ± 8.8 <sup>c</sup>
造模+大腹皮	12	96.8 ± 18.0 <sup>b</sup>	41.5 ± 9.1 <sup>c</sup>	69.9 ± 16.0 <sup>c</sup>	58.9 ± 16.0
造模+木香	12	102.9 ± 13.5 <sup>c</sup>	44.2 ± 10.3	68.1 ± 17.2 <sup>c</sup>	54.5 ± 7.2

<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组, <sup>b</sup>P<0.05 vs 造模组。

**2.2 中药对左旋精氨酸致大鼠胃肠动力异常影响** 造模组血浆胃动素较对照组明显下降, 大腹皮、木香血浆

胃动素较造模组显著升高( $P < 0.05$ );大腹皮与造模组相比血中一氧化氮显著下降( $P < 0.05$ ).造模组胃排空,小肠推进显著减慢( $P < 0.05$ ,表2),而西沙必利、木香、大腹皮能显著改善大鼠胃肠动力障碍模型的胃排空( $P < 0.05$ ,表2),木香、大腹皮对此模型小肠推进无显著改善.

### 3 讨论

临床上胃肠运动功能障碍性疾病非常多见<sup>[8-13]</sup>,其主要病理生理基础为胃排空延迟及小肠传输功能障碍,目前临床最常用的促动力药有胃动力药有胃复安、吗丁啉、西沙必利等<sup>[10-19]</sup>.祖国传统医药在调治胃肠疾病方面有着悠久的历史和良好的疗效,胃动力中药将行气疏肝类、消食类、补气健脾类、利胆类、降下类及活血去瘀,化痰类等中药根据功效归为此类中药.大量研究表明许多理气类中药对胃肠运动有促进作用<sup>[21-28]</sup>.理气类中药对大鼠离体胃平滑肌条的作用发现<sup>[20]</sup>:陈皮、枳实对胃各部位平滑肌条均为抑制效应,香附、薤白、木香、乌药对胃底肌条为兴奋效应,但对其他部位肌条则表现为兴奋或抑制不同的效应,对其他肌条无影响.文献报道木香刺激胃黏膜M<sub>0</sub>细胞产生内源性胃动素,加速胃排空<sup>[24]</sup>;大腹皮、砂仁对胃排空有促进作用,厚朴、大腹皮有促进小肠的推进功能<sup>[4]</sup>.有关理气中药对胃肠运动的影响的系统性尚未见报道,本实验通过系统筛选表明大腹皮、陈皮、砂仁、厚朴、木香等可有效使健康小鼠的胃对半固体食物排空作用加强.进一步分析发现在此五种中药中大腹皮、木香作用较强,而且木香对胃排空作用强于西沙必利.大腹皮、陈皮、枳实、砂仁、苦楝子、香附对正常小鼠小肠对半固体食物传输有增强倾向,但无组间差异,可能与例数较少有关.上述分析表明大腹皮、陈皮、砂仁有增强正常全胃肠动力作用.

胃肠道的神经支配较为复杂,目前已知一氧化氮(NO)是胃肠道的抑制性递质之一.我们发现对大鼠腹腔注射NO前体L-Arg,不但使胃排空延迟,并且小肠传输也明显减慢,血浆胃动素较对照组明显下降.而两实验组以及西沙必利组胃动素与模型组想比较均有显著升高.这种变化与大腹皮、木香促胃肠动力作用是一致的,说明大腹皮、木香对胃肠动力障碍的改善与刺激内源性胃动素升高有关.

NO作为抑制性NANC神经原的传递递质,在胃排空的肠壁机械感受器和化学感受器的反馈调控中可能发挥重要作用<sup>[29]</sup>.NO对胃肠的舒张作用是通过调节胃肠肌电活动实现的,刺激胃肠道NANC神经或使用释放NO的药物,可使胃肠平滑肌的细胞产生抑制性接点电位,从而抑制平滑肌收缩<sup>[30]</sup>.模型组血浆NO含量异常升高,而木香和大腹皮对L-Arg引起的血浆NO含量的异常升高有较明显的抑制作用,考虑大腹皮、木香除了胆碱能途径外,部分是通过氮能神经的调节大鼠胃节律失常来实现的.

### 4 参考文献

- 李涯松,单兆伟,沈洪,马骋,吴静.和胃胶囊对实验大鼠胃动力的影响.中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:327-329
- 王长洪,陈多,吴春福,陆宇平.旋复代赭汤促胃肠动力作用的实验研究.中国中西医结合脾胃杂志 1999;7:4-7
- 李岩,孙思予,周卓.消食行气中药对小鼠胃肠动力的影响.新消化病学杂志 1997;5:153
- 李岩,孙思予,周卓,陈苏宁,王兴尧.健脾行气及消食中药组合对小鼠胃肠动力的影响.华人消化杂志 1998;6(特刊7):208-209
- 孙思予,李岩,周卓,金冶.和胃冲剂促进运动障碍样功能性消化不良患者胃排空.世界华人消化杂志 2000;8:810-820
- 王学清,张卫卫,李岩.平胃散对大鼠胃排空影响的实验研究.世界华人消化杂志 2002;10:719-720
- 李岩,王学清,张卫卫,王江玥.木香冲剂对小鼠胃肠动力的影响.世界华人消化杂志 2003;11:575-577
- 田丰,沈静雪,王伟,周卓,李岩.柴胡枳实合剂对运动障碍样型功能性消化不良患者症状,胃排空,胃电图的影响.世界华人消化杂志 2002;10:1357-1359
- 王承党,莫剑中,张德中,王少先,张开光,萧树东,江绍基.功能性消化不良患者胃排空功能与症状的相关性研究.新消化病学杂志 1996;4:637-639
- 刘维新,洪兴,傅宝玉,姜若兰,刘峥艳.功能性消化不良患者消化间期血浆胃动素水平及胃十二指肠动力的改变.世界华人消化杂志 2001;9:722-724
- 曹曙光,吴万春.应激与小肠运动的研究进展.世界华人消化杂志 2003;11:2005-2007
- 曹景岑.胃食管反流病452例分析.华人消化杂志 1998;6(特刊7):439
- 牟宽厚,冯捷,鱼晓洪.慢性瘙痒性皮肤病的胃肠动力学研究.世界华人消化杂志 2002;10:1227-1228
- 朱金照.促胃肠动力药物的研究现状.世界华人消化杂志 2001;9:1439-1444
- 陆宇平,王长洪.功能性消化不良的中医药治疗进展.中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:63-64
- 赵荣莱.非溃疡性消化不良(功能性消化不良)的中西医结合治疗.中国中西医结合脾胃杂志 1996;4:184-186
- 刘汶,张大伟.中药对胃肠运动功能的影响.中国中西医结合脾胃杂志 1998;6:191-193
- 陈多,王长洪,吴春福.消化道动力药物研究进展.中国中西医结合脾胃杂志 1996;4:120-123
- 刘进进,李键,丁红,屠柏强,许叔祥.西沙必利对功能性消化不良的疗效及对消化道激素的影响.中国新药与临床杂志 1999;18:357-358
- 郑天珍,李伟,瞿颂义,邱小青,田治锋,丁永辉,卫玉玲.理气类中药对大鼠离体胃平滑肌条的作用.兰州医学院学报 1998;24:1-3
- 朱金照,冷恩仁,周文.大腹皮促胃肠动力作用的机制研究.解放军医学杂志 2000;25:133-134
- 陈少夫,李宇权,何凤云,潘丽丽.木香对胃酸分泌、胃排空及血清胃泌素生长抑素,胃动素水平的影响.中国中西医结合杂志 1994;14:406-407
- 朱金照,冷恩仁,陈东风.木香对大鼠胃肠运动的影响及其机制探讨.中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:236-238
- 朱金照,冷恩仁,陈东风,张捷.砂仁对大鼠胃肠运动及神经递质的影响.中国中西医结合消化杂志 2001;9:205-207
- 任平,黄熙,张莉,王骊丽,刘芳,李彩月.四君子汤对实验性脾虚大鼠胃排空率的影响.中国中西医结合杂志 2000;20:596-598
- 夏立营,葛文清,李明喜.和胃消痞胶囊对大鼠胃肠肌间神经丛一氧化氮合酶的影响.中国中西医结合消化杂志 2001;9:259-260
- 朱金照,冷恩仁,陈东风.胃动素在大腹皮促动力效应中的变化及其意义.华西药理学杂志 2001;16:93-95
- 陈建永,邱建荣,詹程珥,潘峰.舒胃汤治疗功能性消化不良的临床观察.中国中西医结合消化杂志 2001;9:128-129
- Orihata M, Sarna SK. Nitric oxide mediates mechano- and chemoreceptor-activated intestinal feedback control of gastric emptying. *Dig Dis Sci* 1996;41:1303-1309
- Fiorucci S, Distrutti E, Quintieri A, Sarpi L, Spirchez Z, Gulla N, Morelli A. L-arginine/nitric oxide pathway modulates gastric motility and gallbladder emptying induced by erythromycin and liquid meal in humans. *Dig Dis Sci* 1995;40:1365-1371



# COX-2抑制剂联合顺铂对胰腺癌细胞增生和凋亡的影响

刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 宋振顺, 苏明权, 于文彬

刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 宋振顺, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032  
苏明权, 于文彬, 中国人民解放军第四军医大学西京医院临床分子生物学研究中心 陕西省西安市 710032  
刘江伟, 男, 1970-12-10 生, 新疆五家渠人, 汉族, 第四军医大学西京医院肝胆外科博士, 主治医师。  
项目负责人: 李开宗, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科。ljw273@sohu.com  
电话: 029-83375561  
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-21

## Effects of COX-2 inhibitor with cisplatin on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells

Jiang-Wei Liu, Kai-Zong Li, Ke-Feng Dou, Zhen-Shun Song, Ming-Quan Su, Wen-Bin Yu

Jiang-Wei Liu, Kai-Zong Li, Ke-Feng Dou, Zhen-Shun Song, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China  
Ming-Quan Su, Wen-Bin Yu, Clinical Molecular Biology Research Center, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China  
Correspondence to: Kai-Zong Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shannxi Province, China. ljw273@sohu.com  
Received: 2004-02-03 Accepted: 2004-02-21

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of proliferation and apoptosis induced by cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor celecoxib in combination with cisplatin.

**METHODS:** The human pancreatic cancer cell line BxPC-3 cells were treated with COX-2 inhibitors celecoxib and cisplatin. The cell relative viability was examined using 3 (4, 5-dimethylethiazoly 1-2-) 2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assays. the expression of COX-2 mRNA was detected by RT-PCR, flow cytometry and Hoechst-33258 were used to demonstrate apoptotic changes in celecoxib and cisplatin treated cells.

**RESULTS:** After treatment of BxPC-3 cells with celecoxib, as measured by MTT, cell viability was inhibited in a dose-dependent and time-dependent manner with an  $IC_{50}$  of 100 nM at the time of 24h. The expression of COX-2 mRNA could be significantly decreased by celecoxib. Furthermore, we demonstrated that the combination of celecoxib with cisplatin inhibited cell growth and induced cell apoptosis to a greater degree than either compound alone. The apoptotic morphologies were demonstrated by Hoechst-33 258.

**CONCLUSION:** Combination of celecoxib with cisplatin inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis, and the potent effectiveness of celecoxib in combination with gemcitabine may hold a promise in the clinical treatment

of pancreatic cancer.

Liu JW, Li KZ, Dou KF, Song ZS, Su MQ, Yu WB. Effects of COX-2 inhibitor with cisplatin on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1139-1143

## 摘要

**目的:** 探讨环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂 Celecoxib 和顺铂联合应用对胰腺癌细胞增生、凋亡的影响。

**方法:** 用 Celecoxib 和顺铂处理胰腺癌 BxPC-3 细胞后, 用噻唑蓝(MTT)检测细胞的相对存活率, RT-PCR 检测 COX-2 mRNA 的表达, 流式细胞术和 Hoechst-33 258 染色检测其对 BxPC-3 的凋亡诱导作用。

**结果:** Celecoxib 作用于 BxPC-3 细胞后, 细胞的存活率呈剂量和时间依赖性, 其中 24 h 的  $IC_{50}$  值为 100 nM, Celecoxib 可明显降低 BxPC-3 细胞 COX-2 mRNA 的表达; Celecoxib 和顺铂联合应用对胰腺癌细胞增生的抑制和凋亡的诱导作用更加明显, Hoechst-33 258 染色可呈现凋亡的形态学改变。

**结论:** COX-2 抑制剂和顺铂联合应用对抑制胰腺癌细胞增生和诱导细胞凋亡的高效性, 表明其在临床上具有潜在的应用价值。

刘江伟, 李开宗, 窦科峰, 宋振顺, 苏明权, 于文彬. COX-2 抑制剂联合顺铂对胰腺癌细胞增生和凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1139-1143  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1139.asp>

## 0 引言

环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是炎症过程中催化前列腺素合成的一个关键诱导酶, 与多种肿瘤细胞增生、抗凋亡和血管生成, 与肿瘤的发生、发展和预后密切相关<sup>[1-27]</sup>. COX-2 抑制剂能抑制多种肿瘤细胞的增生和诱导细胞凋亡<sup>[28-34]</sup>. Celecoxib(塞来昔布)为一种选择性 COX-2 抑制剂, 是近年来被 FDA 批准上市的非甾体类抗炎药物(Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 基于 COX-2 在胰腺癌组织中高表达<sup>[35]</sup>, 我们将 Celecoxib 与顺铂联合应用, 为胰腺癌的治疗寻求新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料 胰腺癌 BxPC-3 细胞系购自第四军医大学口

腔生物细胞培养库,以含 100 mL/L 的新生小牛血清(56 °C,灭活 30 min)、100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI1 640 培养基(Gibco 公司),在 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养,每当 2-3 d 换液传代,取对数期生长的细胞实验. RNA 提取液(Trizol),购自 Life Technologies 公司, RT-PCR 购自 Takara 公司; MTT(Sigma 公司); Annexin V 试剂盒(Roche 公司); Celecoxib (Searle 公司),用 1 kg/L 二甲基亚砜(DMSO)溶解,制成 20 mol/L 的储存液, -20 °C 保存; 顺铂(锦州制药一厂).

## 1.2 方法

1.2.1 细胞存活率的影响 单细胞悬液以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞 100  $\mu$ L 接种于 96 孔培养板中,贴壁 24 h 后更换培养液,同时加入不同浓度的 celecoxib 溶液,各组终浓度为 20  $\mu$ mol/L, 40  $\mu$ mol/L, 80  $\mu$ mol/L, 100  $\mu$ mol/L, 120  $\mu$ mol/L; 空白对照组只加含 1 g/L 的 DMSO 培养液. 分别于 12, 24, 48, 72, 96 h 加入 MTT 溶液(5 g/L) 20  $\mu$ L, 37 °C, 4 h 后弃上清,加入二甲基亚砜(DMSO) 150  $\mu$ L, 震荡 10 min, 选 490 nm 波长在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(A)值,每个浓度设 3 个复孔,计算肿瘤细胞相对存活率 = 实验孔 A 值 / 对照孔 A 值  $\times$  100%. 单细胞悬液以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞 100  $\mu$ L 接种于 96 孔培养板中,贴壁 24 h 后更换培养液,同时实验根据加入顺铂的浓度分 6 组: 0 mg/L, 1 mg/L, 2.5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L; 再在每个浓度组中分别加入 celecoxib 使其终浓度分别为: 0  $\mu$ mol/L、40  $\mu$ mol/L、80  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L, 作用 24 h 后用 MTT 分别检测各孔吸光度(A)值,计算相对存活率,实验同时设 3 个复孔.

1.2.2 COX-2 mRNA 的表达 用 100  $\mu$ mol/L celecoxib 作用 BxPC-3 细胞 24 h,收获  $1 \times 10^6$  细胞,用 RNA 提取液(Trizol)提取总 RNA,并用紫外分光光度计准确定量. 取 1  $\mu$ g 总 RNA 用于逆转录合成 cDNA, 20  $\mu$ L 反应体系包括: MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 4  $\mu$ L, 10  $\times$  RNA PCR 缓冲液 2  $\mu$ L, dNTP 混合物(各 10 mmol/L)2  $\mu$ L, RNase 抑制剂(40 MU/L) 0.5  $\mu$ L, AMV 逆转录酶(5 MU/L) 1  $\mu$ L, 随机引物(50  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L. 转录条件为 30 °C 10 min, 42 °C 30 min, 99 °C 5 min 至 4 °C 保存. 10  $\mu$ L cDNA 用于 PCR 反应, 50  $\mu$ L 反应体系包括: MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 3  $\mu$ L, 10  $\times$  RNA PCR 缓冲液 4  $\mu$ L, Takara Taq 酶(5 MU/L) 0.25  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L. COX-2 引物序列: 5' -TGAAACCCACTCCAAACACAG -3' (F)和 5' -TCATCAGGCACAGGAGGAAG-3' (R), 232 bp; 内参  $\beta$ -actin 引物序列: 5' -CTTCTACAATGAGCTG CGTG-3' (F)和 5' -TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3' (R), 309 bp. 扩增条件: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 51 °C 退火 30 s ( $\beta$ -actin 为 59 °C), 72 °C 延伸 90 s, 32 个循环后, 72 °C 延伸 5 min. PCR 产物 5  $\mu$ L 在 2 g/L 琼脂糖上电泳(含 0.5 mg/L 溴化乙锭),经凝胶

图像分析仪分析结果,将 COX-2 和  $\beta$ -actin 的比值做为 COX-2 表达的参数,对 COX-2 的 PCR 产物进行相对定量. 取未处理的 BxPC-3 细胞做对照,实验重复 2 次. 1.2.3 细胞凋亡的检测 分别用 100 mL 的培养瓶培养细胞至 70-80% 铺满后,根据加入的药物和浓度实验分 4 组: (1)对照组(未做处理); (2)100  $\mu$ mol/L celecoxib; (3) 5 mg/L 顺铂; (4) 100  $\mu$ mol/L celecoxib+5 mg/L 顺铂,作用 BxPC-3 细胞 24 h,漂浮细胞和用胰酶消化下的细胞  $5 \times 10^5$ , PBS 洗涤 2 次,加入 annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI),室温下避光孵育 15 min,立即进行流式细胞仪检测,实验重复 1 次. 另将密度  $5 \times 10^4$  的 BxPC-3 细胞加入不同的放有盖玻片的培养皿中,让细胞在盖玻片贴壁生长,2 d 更换培养液,同时加入不同浓度的药物: (1)对照组(未做处理); (2)100  $\mu$ mol/L celecoxib、(3) 5 mg/L 顺铂(4)100  $\mu$ mol/L celecoxib+5mg/L 顺铂. 作用 24 h 后,弃培养液,加入 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 冲洗,加入 1 mmol/L 的 Hoechst 33 258 (Sigma 公司, 美国) 室温染色 15 min, 封片,在激发 365 nm 波长荧光的荧光显微镜(Olympus Optical Co., 日本)下观察细胞核形态.

统计学处理 采用 SPSS 10.0, 进行作图和统计分析, 均数比较用 t 检验.

## 2 结果

2.1 BxPC-3 细胞存活率 celecoxib 处理 BxPC-3 细胞后,细胞存活率呈明显时间和浓度依赖性(图 1), 20  $\mu$ mol/L celecoxib 对细胞的存活率影响最小, 20  $\mu$ mol/L, 40  $\mu$ mol/L, 80  $\mu$ mol/L 的 celecoxib 在 96 h 细胞的存活率分别为  $90.5 \pm 0.8\%$ 、 $70.4 \pm 1.2\%$ 、 $49.1 \pm 0.6\%$ , 而 100  $\mu$ mol/L celecoxib 在 24 h 细胞的存活率可降到  $51.0 \pm 1.1\%$  (接近 IC<sub>50</sub> 值), 以 120  $\mu$ mol/L celecoxib 作用效果最明显, 24 h 细胞存活率为  $40.4 \pm 0.7\%$ , 96 h 细胞的存活率可降低到  $13.3 \pm 0.8\%$ . 24 h 单独应用 80  $\mu$ mol/L celecoxib 细胞的存活率为  $70.7 \pm 3.4\%$ ; 单独应用顺铂 1 mg/L, 2.5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 细胞的存活率分别为  $88.4 \pm 2.8\%$ 、 $56.4 \pm 1.3\%$ 、 $50.4 \pm 1.8\%$ 、 $45.0 \pm 3.9\%$ 、 $40.0 \pm 2.4\%$ ; 80  $\mu$ mol/L celecoxib 和不同浓度的顺铂联合应用, 细胞的存活率分别为:  $53.5 \pm 3.1\%$ 、 $37.7 \pm 2.2\%$ 、 $32.5 \pm 1.2\%$ 、 $29.6 \pm 1.1\%$ 、 $25.5 \pm 2.3\%$ ; 联合实验组与单独应用二者相比均能明显降低细胞的存活率, 差异均有显著性( $P < 0.01$ ). 联合实验的效果与 celecoxib 的浓度呈依赖性, 在 100  $\mu$ mol/L celecoxib 存在的情况下, 可使 5 mg/L 顺铂对细胞的存活率降为  $23.6 \pm 2.3\%$ , 其效果强于 80  $\mu$ mol/L celecoxib 和 15 mg/L 顺铂联合应用对细胞存活率的影响(图 2).

2.2 BxPC-3 细胞 mRNA 的表达 RT-PCR 产物电泳显示, 对照组和处理组在 232 bp 处均出现特异性 COX-2 条带, 实验组 COX-2 mRNA 表达明显低于对照组, 经凝胶图像分析仪分析结果显示: 实验组和对照组 COX-

2/ $\beta$ -actin 分别为  $0.31 \pm 0.03$  和  $0.86 \pm 0.06$ , 二者之间差异具有显著性( $P < 0.01$ )(图 3).

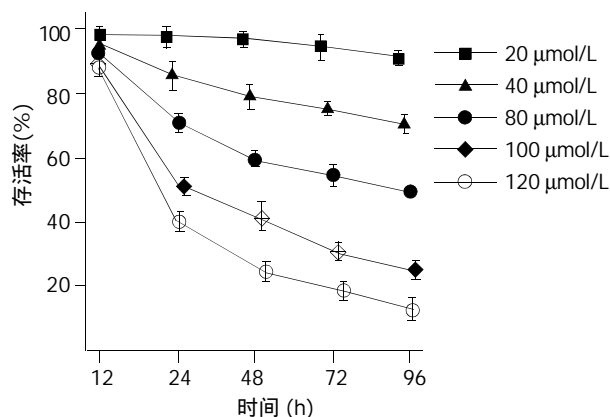


图1 Celecoxib 作用于 BxPC-3 细胞时间 - 浓度曲线.

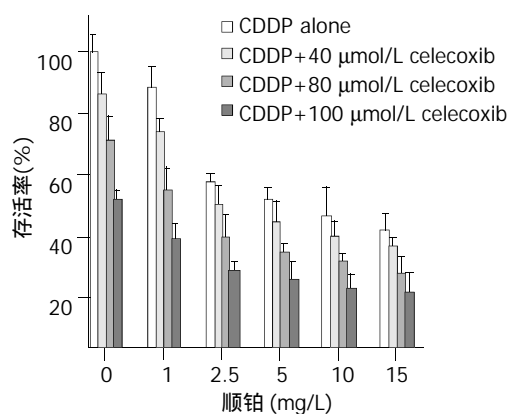


图2 Celecoxib 和顺铂联合作用直方图.

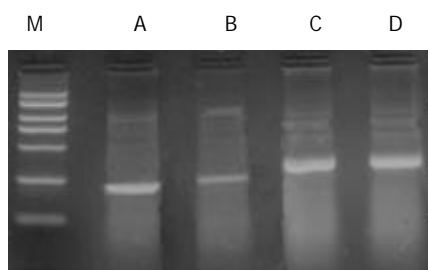


图3 Celecoxib 对 BxPC-3 细胞 mRNA 表达的影响. M: marker(DGL 2 000), 从上到下依次为: 2 000 bp、1 600 bp、1 000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp; A: 对照组; B: Celecoxib 作用组; C、D:  $\beta$ -actin.

**2.3 细胞凋亡率** 各实验组(1)对照组;(2)100  $\mu$ mol/L celecoxib、(3)5 mg/L 顺铂(4)100  $\mu$ mol/L celecoxib+5 mg/L 顺铂)作用 BxPC-3 细胞 24 h, 流式细胞仪检测细胞凋亡率分别为  $0.25 \pm 0.07\%$ 、 $14.55 \pm 0.35\%$ 、 $8.95 \pm 2.75\%$  和  $22.2 \pm 1.27\%$ , 其中各实验组与对照组相比以及联合用药组与单独用药组相比, 均具有显著性差异( $P < 0.01$ ). Hoechst 33 258 荧光染色显示 正常对照组细胞发出微弱的绿色荧光, 细胞核无明显的形态学改变, 在各实验组均发现有细胞核浓缩聚集, 核碎裂, 并发出较强的绿色荧光.(图 4A-D).

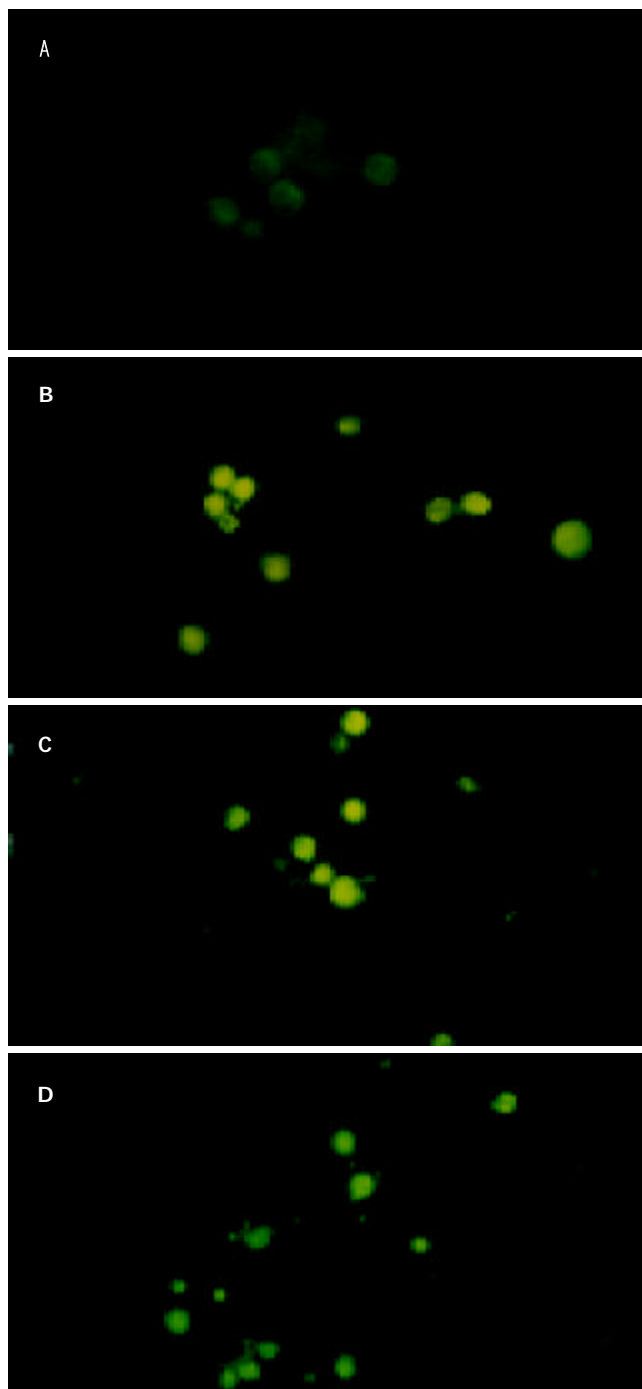


图4 Hoechst33258 荧光染色显示细胞凋亡形态. A: 正常对照; B: Celecoxib 作用组; C: 顺铂作用组; D: Celecoxib+ 顺铂组.

### 3 讨论

非甾体类抗炎药物(nonsteroidal anti-inflammatory drugs NSAIDs)能够有效地预防肿瘤, NSAIDs 主要作用于环氧化酶. 环氧化酶有两种同工酶 COX-1 和 COX-2. COX-2 在大多数正常组织中不表达, 但在细胞受到各种刺激如炎症因子、生长因子、促癌剂等诱导下迅速合成, 参与炎症过程和肿瘤的发生<sup>[36]</sup>. COX-2 过表达和预后不良有关<sup>[37]</sup>. 我们发现<sup>[35]</sup>, COX-2 在胰腺癌中的表达率为 74.5%, 而在癌旁非肿瘤胰腺组织中未见表达; COX-2 的表达与患者的临床分期和淋巴结转移呈密切正相关( $P < 0.05$ ), 表明 COX-2 抑制剂可能成为治疗胰腺癌的

有效药物,因传统的NSAIDs同时抑制COX-1和COX-2,易引起胃出血和肾功能损害等副作用,而选择性COX-2抑制剂则可避免这些不良反应,celecoxib是近年来被FDA批准上市的NSAIDs,是一种选择性的COX-2抑制剂,我们应用celecoxib作用于胰腺癌BxPC-3细胞,可明显降低COX-2 mRNA的表达,对细胞增生的抑制呈明显的剂量和时间依赖性,100  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib在24 h时细胞的存活率可降到50.99%(接近 $\text{IC}_{50}$ 值),以120  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib作用效果最明显,24 h时细胞的存活率为40.4%,96 h时细胞的存活率可降低到13.3%。

我们研究发现,联合实验组与单独应用两种药物相比均能明显降低细胞的存活率,差异均具有显著性( $P < 0.01$ )。80  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib与2.5 mg/L顺铂联合应用,细胞的存活率( $37.7 \pm 2.2\%$ )低于单独应用15 mg/L顺铂时的细胞存活率( $40.0 \pm 2.4\%$ );100  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib和5 mg/L顺铂联合应用对BxPC-3细胞增生抑制效果强于80  $\mu\text{mol/L}$  celecoxib和15 mg/L顺铂联合应用。可见,适当浓度的celecoxib与顺铂联合应用不但能减少顺铂的用量,而且能增强抗肿瘤效能。流式细胞仪对细胞凋亡率的检测发现:celecoxib和顺铂均能诱导细胞凋亡、二者联合应用更能促进凋亡的发生。

COX-2的诱导凋亡机制目前尚未阐明,可能与以下机制有关:COX-2抑制剂诱导肿瘤细胞的凋亡可通过细胞色素c的释放和caspase-9和caspase-3的激活<sup>[38]</sup>;COX-2抑制剂可降低肿瘤细胞Bcl-2的表达或通过抑制肿瘤细胞抗凋亡激酶Akt(又称蛋白激酶B)活性来诱导细胞凋亡<sup>[34]</sup>;COX-2在胆囊癌细胞的抗凋亡作用可通过上调Bcl-2家族的抗凋亡基因Mcl-1来实现<sup>[39]</sup>;Celecoxib诱导结肠癌HT-29细胞的凋亡可通过抑制3-磷酸肌醇依赖性激酶(3-phosphoinositide-dependent kinase 1, PDK1)的活性来完成<sup>[40]</sup>;Grosch et al<sup>[41]</sup>认为,celecoxib的抗肿瘤效应可通过下调cyclin A, cyclin B1, 和CDK-1(cyclin-dependent kinase-1)和上调周期抑制蛋白p21Waf1和p27Kip1使细胞在G0/G1期阻滞,表明celecoxib的抗肿瘤作用可能通过非依赖性COX-2途径实现,因而celecoxib对肿瘤的作用可能并不局限于COX-2的肿瘤。至于celecoxib诱导胰腺癌细胞凋亡的机制尚需进一步研究,我们的结果已显示COX-2抑制剂celecoxib可明显诱导胰腺癌细胞的凋亡和抑制细胞增生,celecoxib和顺铂联合应用的高效性,表明COX-2抑制剂在胰腺癌的治疗上具有潜在的临床应用价值。

#### 4 参考文献

- 1 Moran EM. Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002;21:193-201
- 2 郇恒骏, 于连珍, 孙亮, 缪琨, 白剑峰, 张小勇, 吕秀珍, 赵志泉. 胃癌及癌旁组织中COX-2基因蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:578-579
- 3 吴汉平, 吴开春, 李玲, 么立萍, 兰梅, 王新, 樊代明. 人环氧合酶-2(hCOX-2)编码基因的克隆及其反义核酸转染胃癌细胞的初步研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:1211-1217

- 4 Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, L XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *H pylori* infection, histological types and staging. *World J Gastroenterol* 2000;6:848-854
- 5 吴清明, 李胜保, 王强, 王德华, 李晓斌, 刘重贞. 食管癌环氧化酶-2高表达与临床病理特征的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9:11-14
- 6 孙波, 吴云林, 张学军, 王升年, 贺恒益, 乔敏敏, 章永平, 钟捷. 舒林酸抑制人胃腺癌细胞增生及诱导凋亡. *世界华人消化杂志* 2001;9:997-1002
- 7 庄则豪, 王立东. 非甾体类抗炎药与消化道肿瘤. *世界华人消化杂志* 2001;9:1050-1053
- 8 沈志祥, 曹歌, 孙军. 结直肠癌组织COX-2 mRNA表达的临床病理意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:1082-1084
- 9 Wang X, Lan M, Wu HP, Shi YQ, Lu J, Ding J, Wu KC, Jin JP, Fan DM. Direct effect of croton oil on intestinal epithelial cells and colonic smooth muscle cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:103-107
- 10 李建英, 于皆平, 罗和生, 余保平, 黄杰安. 非甾体类抗炎药对胃癌SGC7901细胞增生及环氧合酶活性的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:262-265
- 11 胡国勇, 于皆平, 冉宗学, 余保平, 罗和生. 选择性COX-2抑制剂尼美舒利抑制胃癌细胞株SGC7901端粒酶的活性. *世界华人消化杂志* 2003;11:25-28
- 12 刘建平, 朱兆华. 大肠肿瘤COX-2的表达与临床病理特征的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:306-309
- 13 吴高松, 武小勇, 邹声泉, 裘法祖. 环氧合酶-2反义核酸对人胆管癌细胞增生的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:733-736
- 14 谢传高, 王兴鹏, 董育玮, 杜勤, 蔡建庭, 钱可大. 选择性环氧合酶-2抑制剂Celebrex对胰腺癌PGE<sub>2</sub>和血管内皮因子表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:979-981
- 15 Wu AW, Gu J, Ji JF, Li ZF, Xu GW. Role of COX-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patients' prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1990-1994
- 16 Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1421-1426
- 17 Dong WG, Mei Q, Yu JP, Xu JM, Xiang L, Xu Y. Effects of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in rat models of colitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1307-1311
- 18 Li HX, Chang XM, Song ZJ, He SX. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:674-677
- 19 Li HX, Chang XM, Song ZJ, He SX. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:674-677
- 20 Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with Hp-cagA infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:246-249
- 21 Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:632-635
- 22 Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs* 2002;13:127-137
- 23 Niki T, Kohno T, Iba S, Moriya Y, Takahashi Y, Saito M, Maeshima A, Yamada T, Matsuno Y, Fukayama M, Yokota J, Hirohashi S. Frequent co-localization of Cox-2 and laminin-5 gamma2 chain at the invasive front of early-stage lung adenocarcinomas. *Am J Pathol* 2002;160:1129-1141
- 24 Zahner G, Wolf G, Ayoub M, Reinking R, Panzer U, Shankland SJ, Stahl RA. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits platelet-derived growth factor-induced mesangial cell proliferation through induction of the tumor suppressor gene p53 and the cyclin-dependent kinase inhibitors p21waf-1/cip-1 and p27kip-1. *J Biol Chem* 2002;277:9763-9771
- 25 Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, Wang DY. Bile from a patient with anomalous pancreaticobiliary ductal union promotes the pro-

- liferation of human cholangiocarcinoma cells via COX-2 pathway. *World J Gastroenterol* 2003;9:1094-1097
- 26 Wu GS, Zou SQ, Luo XW, Wu JH, Liu ZR. Proliferative activity of bile from congenital choledochal cyst patients. *World J Gastroenterol* 2003;9:184-187
- 27 Qiu DK, Ma X, Peng YS, Chen XY. Significance of cyclooxygenase-2 expression in human primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:815-817
- 28 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 29 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 30 Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, Tang ZH, Wang JH. Celecoxib inhibits proliferation and induces apoptosis via prostaglandin E2 pathway in human cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2003;9:302-306
- 31 Li MY, Deng H, Zhao JM, Dai D, Tan XY. PPARgamma pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1220-1226
- 32 Li JY, Wang XZ, Chen FL, Yu JP, Luo HS. Nimesulide inhibits proliferation via induction of apoptosis and cell cycle arrest in human gastric adenocarcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 2003;9:915-920
- 33 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF-kB, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435
- 34 Mizutani Y, Kamoi K, Ukimura O, Kawauchi A, Miki T. Synergistic cytotoxicity and apoptosis of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, and 5-fluorouracil against bladder cancer. *J Urol* 2002;168:2650-2654
- 35 刘江伟, 李开宗, 窦科峰. COX-2在胰腺癌组织中的表达及其与p53的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:229-232
- 36 Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:632-635
- 37 Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:429-434
- 38 Li M, Wu X, Xu XC. Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway. *Clin Cancer Res* 2001;7:1010-1016
- 39 Nzeako UC, Guicciardi ME, Yoon JH, Bronk SF, Gores GJ. COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2002;35:552-559
- 40 Arico S, Pattingre S, Bauvy C, Gane P, Barbat A, Codogno P, Ogier-Denis E. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem* 2002;277:27613-27621
- 41 Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 2001;15:2742-2744

## World Journal of Gastroenterology 出版周期

《World Journal of Gastroenterology, WJG》将从2004年起由月刊改为半月刊,以期在不增加出版篇幅的前提下进一步缩短出版周期,力争论文的投稿时滞控制在1-4个月内出版,并进入Science Citation Index-Expanded及Index Medicus/MEDLINE等国际著名检索系统,以展示我国消化病学者在该领域的国际领先地位。例如,2003年第10期刊出的浙江大学医学院附属第二医院普外科彭淑牖教授等撰写的“采用PMOD和刮吸术通过不同途径进行肝尾叶切除术:76例”,是一篇具有国际领先水平的论文,该文从收稿至出版仅用45天。



# 北京市普通型 SARS 801 例的临床特征与分期

陆海英, 徐小元, 雷 雨, 武阳丰, 陈博文, 肖 峰, 谢高强, 韩德民

陆海英, 徐小元, 北京大学第一医院感染疾病科 北京市 100034  
雷雨, 湖北省房县人民医院肝病中心 湖北省房县 442100  
韩德民, 首都医科大学附属北京同仁医院 北京市 100730  
武阳丰, 谢高强, 阜外心血管病医院 北京市 100037  
陈博文, 肖峰, 首都儿科研究所 北京市 100020  
国家 863 计划资助项目, No. 2003AA208107  
子课题项目负责人: 徐小元  
项目负责人: 韩德民, 100730, 北京市崇文区崇内大街 2 号, 首都医科大学附属北京同仁医院. handemin@trhos.com  
电话: 010-6528841  
收稿日期: 2004-02-24 接受日期: 2004-03-24

## Clinical characteristics and staging of SARS: A report of 801 cases in Beijing

Hai-Ying Lu, Xiao-Yuan Xu, Yu Lei, Yang-Feng Wu, Bo-Wen Chen, Feng Xiao, Gao-Qiang Xie, De-Min Han

Hai-Ying Lu, Xiao-Yuan Xu, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China  
Yu Lei, Department of Hepatic Disease, Renmin Hospital of Fang County, Fangxian 442100, Hubei Province, China  
De-Min Han, Beijing Tongren Hospital, Beijing 100730, China  
Yang-Feng Wu, Gao-Qiang Xie, Chinese Academy of Medical Sciences Fu Wai Hospital, Beijing 100037, China  
Bo-Wen Chen, Feng Xiao, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China  
Supported by the National 86-3 Project of China, No. 2003AA208107  
Correspondence to: De-Min Han, Beijing Tongren Hospital, 2 Chongnei Street, Dongcheng District, Beijing 100730, China. handemin@trhos.com  
Received: 2004-02-24 Accepted: 2003-03-24

## Abstract

**AIM:** To identify the clinical characteristic and stages of SARS.

**METHODS:** The data derived from 801 cases of patients with SARS (moderate type) were analyzed and the stages of SARS were classified by the respiratory symptoms, WBC and lymphocyte count, and chest radiography.

**RESULTS:** Three days after onset of SARS, the major clinical symptoms were fever (88.1%), fatigue, headache, myalgia, arthralgia (25-36%), and so on. Decrease of WBC (22.6%), lymphocyte (70.3%), and CD<sub>3</sub>, CD<sub>4</sub>, and CD<sub>8</sub> positive T cells (70%) was found. From 4 to 7 days, the unspecific symptoms became weak, however, the positive rates of respiratory tract symptoms, such as cough (24.2%), pectoration (14.3%), chest distress (21.0%) and shortness of breath (9.2%) went up, so did the abnormality on chest radiograph or CT. The counts of WBC, lymphocyte and CD<sub>3</sub>, CD<sub>4</sub>, and CD<sub>8</sub> positive T cells touched bottom. From 8 to 16 days, the patients presented progressive cough (30%), pectoration (13.1%), chest distress (35.3%) and shortness of breath (20.4%). 100% patients had infiltrates on chest radiograph or CT, even multi-infiltrates. From 17 to 24 days, patients' respiratory symptoms started to alleviate,

the infiltrates on the lung began to absorb gradually, the counts of WBC, lymphocyte and CD<sub>3</sub>, CD<sub>4</sub>, and CD<sub>8</sub> positive T cells got back normality. From 5 to 8 weeks, the patients' symptoms almost disappeared, and the infiltrates in lung were completely or mainly absorbed.

**CONCLUSION:** The course of SARS can be divided into five stages, namely the initial, progressive, fastigium, remittance and convalescence.

Lu HY, Xu XY, Lei Y, Wu YF, Chen BW, Xiao F, Xie GQ, Han DM. Clinical characteristics and staging of SARS: A report of 801 cases in Beijing. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(5):1144-1148

## 摘要

**目的:** 对 SARS 的病程进行临床分期。

**方法:** 对 801 例普通型 SARS 患者的临床资料按不同病程时间段进行分析, 以呼吸道症状、血常规及影像学检查为主要参考指标, 对 SARS 的病程进行临床分期。

**结果:** 发病 1-3 d, 临床症状以发热(88.1%)、乏力、头痛、肌肉酸痛(25%-36%)等中毒症状为主要表现, 化验外周血淋巴细胞(70.3%)、CD 细胞(70%)及 WBC(22.6%)减少, 多数患者肺部出现异常炎症阴影。发病第 4-7 d, 非特异的症状开始减轻, 但仍发热, 而且咳嗽(24.2%)、咳痰(14.3%)、胸闷(21.0%)、憋气症状(9.2%)开始加重, 首诊胸片检查阳性率(85%-90.4%), 胸片及 CT 检查多肺野阴影率开始升高(分别为 15.2% 和 28.12%), WBC, 淋巴细胞(78.8%)及其亚型分类细胞计数(>80%)在 4-7 d 下降到最低谷。发病 8-16 d, 咳嗽(30%)、胸闷(35.3%)、气短(20.4%)等呼吸道症状最明显, 肺部炎症(100%)进展迅速, 出现多肺野(胸片及 CT 阳性率分别为 25.4% 和 42.5%)的炎症阴影。发病 17-24 d, 患者体温正常, 临床症状开始缓解, 肺部炎症阴影开始吸收, 淋巴细胞和 CD 细胞恢复正常。发病 5-8 wk, 临床症状基本消失, 肺部炎症阴影完全或基本吸收。

**结论:** SARS 病程临床可分为初期(发病 1-3 d), 进展期(发病 4-7 d), 极期(发病 8-16 d), 缓解期(发病 17-24 d)和恢复期(发病 5-8 wk)。

陆海英, 徐小元, 雷雨, 武阳丰, 陈博文, 肖峰, 谢高强, 韩德民. 北京市普通型 SARS 801 例的临床特征与分期. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1144-1148  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1144.asp>

## 0 引言

传染性非典型肺炎(严重急性呼吸综合征, 即 SARS)是

一种以呼吸功能损害为主, 伴有其他多系统损害的急性传染病, 病情进展迅速, 其病理生理状况随病程的发展而改变, 临床表现在不同的阶段呈现相异的特点, 所采取的治疗方案也各不相同. 故 SARS 的临床分期对 SARS 的诊断和治疗具有重大的指导意义和价值. 目前我国还没有理想而统一的 SARS 临床分期方法, 为此我们对 801 例普通型 SARS 的临床资料进行了以下的回顾性分析研究, 以发现并总结 SARS 发展的一般临床规律, 制定一个适用于指导临床工作的分期方案.

## 1 材料与方法

1.1 材料 以 2003-03/06 月北京地区收治的临床诊断为普通型 SARS 的 801 例患者为研究对象, 诊断符合 2003-05 卫生部制定的《传染性非典型肺炎临床诊断标准[试行]》的标准. 男 388 例(48.4%), 女 413 例(51.6%), 平均年龄  $37.0 \pm 15.6(0.7-92.9)$  岁, 0-17 岁 44 例(5.5%), 18-39 岁 558 例(69.7%), 40-64 岁 170 例(21.2%), 64 岁以上 29 例(3.6%). 职业构成以医务人员比例最高(154 例, 19.2%), 干部职员 111 例(13.9%), 工人 95 例(11.9%), 学生 74 例(9.2%), 民工 50 例(6.2%). 有基础病 65 例(8.1%), 其中高血压 21 例(2.6%), 肝炎肝硬化 13 例(1.6%), 糖尿病 9 例(1.1%), 冠心病 8 例(1%).

1.2 方法 观察发病 1-3 d、4-7 d、8-11 d、12-14 d、第 3 wk、第 4 wk、第 5 wk、第 6 wk、第 7 wk 及第 8 wk 每例患者的临床症状、体征的变化情况; 分析患者在上述各时间段血气、生化、血常规及免疫活性细胞的检查结果; 分析患者胸片及 CT 检查结果. 判断异常的标准:  $WBC < 4 \times 10^9/L$ , 淋巴细胞  $< 1.28 \times 10^9/L$ ,  $CD3 < 1100$ ,  $CD4 < 500$ ,  $CD8 < 450$ ,  $SaO_2 < 95\%$ ,  $POa_2 < 12.7$  Kpa, 氧合指数  $< 350$  为降低;  $ALT > 40$  IU/L,  $AST > 45$  IU/L,  $Tbil > 20 \mu mol/L$ ,  $BUN > 7.85$  mmol/L,  $Cr > 106.5 \mu mol/L$  为升高; Na 的正常值范围为 135-145 mmol/L, K 和 CL 的正常值范围分别为 3.5-5.5 mmol/L 和 96-110 mmol/L, 低于正常范围的最低值为降低, 高于正常范围的最高值为升高. 肺炎炎症阴影  $\geq 3$  肺野为多肺野损伤.

统计学方法 计量资料用均数和标准差(mean  $\pm$  SD)或中位数表示; 构成比 = 某群体患者人数 / 总病例  $\times 100\%$ ; 阳性或异常率 = 异常人数 / 该时段观察总人数  $\times 100\%$ .

## 2 结果

2.1 住院及病程情况 普通型 SARS 患者平均病程为  $32.8 \pm 10.8(5-68)$  d, 平均住院  $29.0 \pm 9.7$  d. 在发病 1-3 d、4-7 d、8-11 d、12-14 d、15-21 d 住院患者人数占总病例数百分比分别为 64.2%, 88.9%, 93.5%, 95.5% 和 95.8%, 以后比例逐渐下降, 到第 6 wk 还有 45.1% 的患者住院治疗.

2.2 临床表现 发病 1-14 d 就诊患者首诊的平均体温  $38.36-38.11^\circ C$ . 发病 1 d, 88.1% 患者有发热, 但有发热主诉的患者高达 98.7%. 发病 7 d、14 d、21 d 和 28 d,

发热的阳性率分别为 40.3%, 15.1%, 5.1% 和 6.0%, 退热患者的累积比分别为 25.5%, 68.1%, 87.7% 和 97.7%. 入院后患者平均  $5.7 \pm 4.5$  d 开始退烧. 发病 1-3 d, SARS 患者以非特异的感染中毒症状为主要表现, 畏寒 12.6%, 寒战 4.3%, 乏力 33.9%, 头痛 21.3%, 关节痛 16.0%, 肌肉痛 22.2%, 咽痛(18.7%). 发病 4-7 d, 上述症状有所减轻, 咳嗽(24.2%), 咳痰(14.3%), 气促(9.2%)及胸闷(21.0%)症状开始加重, 并在发病 8-16 d 达高峰(分别为 30%, 14.3%、20.4%, 35.3%), 以后症状逐渐缓解(表 1). 咳嗽、咳痰在发病 2-3 d 出现, 并持续 7-8 d. 胸闷, 气促分别在发病 7 d, 5 d 出现, 并在发病 10 d, 17.5 d 消失. 畏寒、寒战及头痛持续的时间分别为  $3.28 \pm 5.55$  d,  $2.25 \pm 3.19$  d 和  $4.05 \pm 6.71$  d.

表 1 SARS 患者不同病程症状及体征阳性率

	1 d-	4 d-	8 d-	12 d-	15 d-	22 d-	29 d-
畏寒	12.6	9.3	4.3	2.4	1.4	0.3	0.6
寒战	4.3	2.4	0.6	1.1	0.3	0	0.2
乏力	33.7	27.6	22.7	14.2	3.3	8.5	4.3
头痛	21.3	12.0	7.5	3.2	13.9	2.0	1.9
关节痛	16.0	9.6	5.3	3.5	2.9	2.3	2.3
肌痛	22.2	13.223	7.6	5.4	4.3	2.9	1.5
咽红	12.5	5.0	3.5	1.0	1.6	1.0	1.2
腹泻	9.9	12.1	5	3.7	3.1	1.8	2.7
咳嗽	23.8	24.2	29.2	28.7	20.9	8.0	4.2
咳痰	8.0	14.3	13.1	11.4	8.6	3.1	2.0
胸闷	8.4	21.0	31.8	35.2	35.3	26.1	17.2
憋气	8.2	9.2	15.6	20.4	18.0	7.1	5.0
湿罗音	6.2	4.8	5.1	4.7	3.1	1.3	1.0

2.3 低氧血症 在发病 1-3 d、4-7 d、8-11 d、12-14 d、15-21 d、22-28 d, SARS 患者  $SaO_2$  下降的阳性率分别为 2.7%, 2.6%, 3.1%, 1.4%, 2.6% 和 2.2%, 均值在 96% 以上,  $SaO_2$  总异常率为 6.68%. 氧合指数下降的阳性率分别为 38.9%, 37.8%, 30.8%, 36.4%, 45.5% 和 33.3%, 均数在 410 以上. 氧分压( $PaO_2$ )下降的阳性率分别为 65.7%, 59.9%, 54.5%, 45.8%, 42.7% 和 40%, 均数分别为 12.4, 13.0, 14.7, 14.7, 15.5 和 15.5 Kpa.  $SaO_2$ ,  $PaO_2$  和氧合指数下降分别在发病 3 d、1 d 和 7 d 出现; 并约在发病 8 d、9.5 d 和 13 d 恢复正常.

在上述各时间段, 吸氧人数占同时段住院人数的比例分别为 26.5%, 34.8%, 17.1%, 12.3%, 11.7% 和 5.3%, 以后比例大多在 3% 以下. 各有 7 例、18 例、15 例、7 例和 3 例在上述时间段需无创呼吸机支持治疗, 在第 1-3 d 有 1 例需用有创呼吸机通气治疗. 由此可推测普通型 SARS 患者在病程早期便可出现轻度的低氧血症, 但经给氧处理后, 绝大多数患者的低氧血症都能纠正.

2.4 外周血细胞及生化检查 SARS 患者外周血 WBC, 淋巴细胞及  $CD_8$ 、 $CD_3$ 、 $CD_4$  在 1-3 d 便出现下降, 而且

在4-7 d降到最低点,第2 wk后逐渐上升,第4 wk基本接近正常(表2). 分别有64.7%, 44.3%和29.7%的患者出现ALT, AST及TBIL的升高,肝功能的异常可在病程的早期出现,但在第2-3 wk时最严重;20.9%、11.2%的患者出现BUN和肌酐的升高,前者在第2-3 wk最严重,而且恢复较慢,后者在第1-2 wk明显,恢复较快.

**2.5 X-ray及CT检查结果** 在上述各时间段, X-ray检查异常率,多肺野损伤的阳性率分别从96.6%和11.5%(1-3 d)升至97.0%和25.4%(8-11 d),然后逐渐下降,总阳性率分别为97.7%和37.2%(298/783). 有17.4%, 10.2%的患者分别在发病第6, 7 wk肺部仍有异常阴影,第8 wk仍有4.4%的患者肺部阴影还未完全吸收. CT检查结果与胸片的相似(表3). 发病1-3 d, 4-5 d, 6-8 d, 9 d就诊患者首诊胸片检查阳性率分别为73.3-74.8%, 85.4-90.6%, 94.7-92.3%和100%.

### 3 讨论

SARS临床表现为发热、全身肌肉酸痛、干咳、憋气及呼吸困难等症状;白细胞正常或减少;胸片有不规则渗出阴影;可造成肝脏、心脏等脏器的损伤,严重者可导致死亡<sup>[1-9]</sup>. 这些表现和特征可分别出现在不同的病程发展阶段. 由于SARS是一种新的疾病,目前人们对他的认识和了解还不彻底,如对于SARS的分期还未达成共

识,有些专家提出病毒血症期、免疫瀑布期等理论,这些分期方法在一定程度上解释了SARS的发病机制,但不能完全反映临床表现和疾病发展的全过程,不利于临床大夫对SARS整体认识和指导临床工作的开展;更多的学者根据SARS的临床特点,提出初期、极期、恢复期等的看法<sup>[10-13]</sup>,但对于每期的时间划分还未十分明确,而且这种分法也还有待于大批量临床资料的验证和支持. 因此在分析研究大量SARS病例基础上,归纳总结出不同时期SARS的临床特征、实验室及影像学检查结果特点,结合发病机制和病理生理改变特点,制定一个全面、合理而实用的SARS临床分期方法,是我们今后作好预防控制和治疗SARS工作所必须解决的首要课题.

本资料对801例普通型SARS病例进行了全面、系统地分析研究,发现普通型SARS患者的平均病程为 $32.8 \pm 10.8$  d,平均住院天数为 $29.0 \pm 9.7$  d,因此我们认为普通型SARS患者的病程约为4 wk左右.

大量的临床资料及实验室研究结果表明SARS是一种以急性的呼吸功能障碍或衰竭为主要表现的疾病,肺脏是SARS-CoV的主要靶器官<sup>[14-15]</sup>. 目前认为SARS的发病机制为SARS-CoV攻击淋巴细胞,使外周血淋巴细胞数减低,诱发一系列的病理免疫反应,导致多脏器的功能受损. T淋巴细胞介导的特异性细胞免疫功能低下是SARS患者的主要免疫病理改变之一,主要表现

表2 SARS患者不同病程WBC、淋巴细胞、CD结果及异常率

	1 d-	4 d-	8 d-	12 d-	15 d-	22 d-	29 d-
WBC 阳性率	22.6	38.9	16.5	8.4	6.4	6.8	8.7
均数	5.2	4.8	7.5	4.7	8.4	8.2	7.3
标准差	2.5	2.7	4.2	4.8	3.9	3.8	3.5
LC 阳性率	70.3	78.8	58.9	45.2	39.3	25.8	29.954
均数	1.131	1.2	1.5	1.7	1.725	1.9	1.794
标准差	0.5	0.6	0.8	0.9	0.9	0.9	0.8
CD8 率	68.4	80.3	75.8	67.4	51.6	48.2	35.4
均数	307.2	244.1	306.2	318.3	453.1	534.4	511.3
标准差	274.2	182.3	251.5	227.9	433.5	428.5	269.2
CD3 阳性率	68.4	87.1	82.3	71.453	60	54.453	46.954
均数	691	568.0	711.5	787.254	1 068.9	1 184.5	1 148.3
标准差	576.4	434.2	515.1	559.8	788.2	713.2	620.1
CD4 阳性率	69.1	84.4	72.6	60.8	48.4	44.4	36
均数	367	295.3	377.7	430.9	582.2	656.8	670.3
标准差	300.6	249.0	326.2	325.1	464.0	576.2	447.2

表3 SARS患者不同病程胸片和CT阳性率

	1 d-	4 d-	8 d-	12 d-	15 d-	22 d-	29 d-
x-ray 总阳性率	96.65	94.3	97.04	80.68	74.96	64.98	56.37
x-ray 多肺野损伤率	11.45	15.19	25.44	25.18	20.38	15.82	16.56
CT 总阳性率	95.45	95.92	95.56	91.67	84.21	73.97	82
CT 多肺野损伤率	21.88	28.21	42.5	37.5	24.14	20.31	20.19

为T淋巴细胞及其亚群的明显受损<sup>[16-17]</sup>. 因此我们选择反应肺脏炎症损害的症状体征、影像学检查及肺功能检查指标, 以及WBC、淋巴细胞、淋巴细胞亚群作为参考指标, 去判断SARS的病程进展. 当这些主要指标发生明显的改变时, 提示病情发生了一定的变化, 进入了新的病程阶段.

在发病1-3 d, 88.1%患者有发热, 25-36%的患者出现畏寒、头痛、咽红咽痛、肌肉痛和关节痛症状, 8.4%的患者有畏寒, 以上症状(除发热外)在第4 d开始明显的减少; 发病1-3 d, 化验检查, 70.3%的患者淋巴细胞 $<1.28 \times 10^9/L$ , 22.6%的患者WBC下降, 约70%的患者出现CD3、CD4、CD8细胞的下降, 多半数患者出现肺部异常炎症阴影. 发病1-3 d的临床症状与SARS-CoV感染后形成的病毒血症有关, 此外病毒还攻击机体的免疫细胞, 开始启动免疫系统的系列反应, 因此临床主要表现为非特异的感染中毒症状, 实验室检查有免疫功能方面的异常改变. 所谓某种疾病的早期应是指某病虽发病了, 但还未或还没有完全呈现其典型的临床特征与过程, 但机体已开始产生免疫应答的那段病程. 故发病1-3 d应是SARS病程的早期阶段.

发病第4 d后, 患者仍持续发热, 但头痛等非特异症状开始减轻, 而呼吸道症状, 如咳嗽(24.2%), 咳痰(14.3%), 胸闷(21.0%)和憋气症状(9.2%)开始加重, 首诊胸片检查阳性率(85%-90.4%), 胸片及CT检查多肺野阴影率开始升高(分别为15.2%和28.1%), 最有特征的是WBC和淋巴细胞(78.8%)及其亚型分类细胞计数(大于80%)在4-7 d下降到最低谷. 表明SARS病毒感染诱发机体产生的超敏变态反应达到顶峰, 并开始造成组织和器官的病理性损害. 因此发病4-7 d是SARS的进展期.

发病8-16 d, 患者感染中毒症状已明显减轻, 但仍有发热, 而且呼吸道症状进一步加重, 如咳嗽(30%)、咳痰(13.1%)、胸闷(35.34%)、憋气症状(20.4%)最严重, 肺功能检查表现为氧合指数(45.1%)和氧分压的(66.8%)明显下降, 需面罩及无创呼吸机支持治疗的病例绝大多数出现在此阶段. 部分患者出现肝、肾及心肌的损害. 首诊胸片检查阳性率达100%; 胸片及CT检查多肺野阴影率达最高峰(分别为25.4%和42.5%), 已有报道<sup>[18-21]</sup> SARS患者肺部阴影在第2-3 d开始出现, 第2-3 wk为炎症进展期. 此阶段, 住院人数明显增多, 第8-16 d是住院人数最多的时段, 占总病例数的90%以上, 在一定程度上表明这是SARS临床症状明显、病情较重的时期. 疾病的极期是指受累的组织或脏器病变最严重, 临床表现最明显的时期. 对SARS而言, 肺脏是其最主要侵犯的器官, 呼吸道症状、功能及影像学的显著异常应是极期的特征, 因此我们认为发病8-16 d是SARS的极期, 他是进展期中机体对SARS病毒产生的超敏变态反应所导致的严重后果, 尸解已发现SARS病程10 d左右时肺脏的病理改变主要为肺水肿、纤维素渗出、透明膜形成、肺泡腔内巨噬细胞积聚和增生的II型肺泡上皮细胞脱落到

肺泡内所形成的脱屑性肺炎及灶性肺出血等病变.

病程进入第17-24 d, 97.7%发热的患者体温已降至正常, 呼吸道症状逐渐缓解, 胸片(65%)及CT(74%)检查异常的阳性率和多肺野阴影率(15.8%)开始下降, T淋巴细胞及其亚群(CD3、CD4、CD8)计数逐渐恢复正常. 表明机体内免疫反应所导致的病理损伤停止, 免疫功能状态开始恢复正常, 肺脏的炎症渗出开始吸收, 受累脏器的功能逐渐恢复, 病情开始缓解. 疾病的恢复期是指病原体感染所导致受损组织或脏器的免疫、病理损伤停止, 功能开始恢复, 临床症状缓解的阶段. 因此第4 wk是SARS的缓解期.

发病第5-8 wk, SARS患者的临床症状基本消失, 但分别有17.4%、10.244%的患者在病程第6, 7 wk肺部还有异常阴影, 第8 wk仍有4.4%的患者肺部阴影还未完全吸收. 在病程超过3 wk的尸解病例中常可见到肺泡内渗出物的机化、透明膜的机化和肺泡间隔的纤维母细胞增生, 最终形成肺泡的闭塞和萎缩, 导致全肺实变; 少部分病例出现明显的纤维增生, 导致肺纤维化甚至硬化. 因此SARS患者肺部炎症渗出的吸收可能需2-4 wk或更长的时间. 疾病的恢复期是指受损组织或脏器的结构和功能完全或基本恢复正常的过程, 故肺部炎症渗出的吸收过程也就是SARS的恢复期.

轻型是目前较难确定而容易漏诊的类型, 发热不明显, 体温可在37-38℃, 部分患者可无发热, 而以咽痛、腹泻等为主要临床表现, 血常规基本正常, 胸片可无明显的异常改变, 需CT检查助诊; 患者可无极期表现而直接进入缓解期, 病程短, 一般15 d左右恢复正常.

重型和危重型患者病情进展快, 胸片炎症渗出影增加迅速, 患者呼吸困难明显, 氧饱和度及氧分压下降, 常需无创呼吸机支持, 可伴有严重的细菌感染和心脏、肝脏等脏器的损害(如转氨酶及心肌酶的升高)而导致病情恶化; 化验外周血淋巴细胞可明显降低, 合并细菌感染时白细胞则明显增高; 此型患者往往很快进入极期, 而且极期时间长, 可超过20 d, 缓解期出现较晚, 恢复期时间更长.

总之, 我们对普通型SARS提出初期(发病1-3 d)、进展期(发病4-7 d)、极期(发病8-16 d)、缓解期(发病17-24 d)和恢复期(发病5-8 wk)的SARS临床分期方法. 初期以发热、乏力、肌肉酸痛及全身不适等病毒血症症状为主要表现, 化验外周血淋巴细胞、CD细胞及WBC、减少; 胸片检查多表现为单侧的模糊渗出影. 进展期, 感染中毒症状有所减轻, 但病毒诱发机体产生的变态反应达顶峰, 表现为淋巴细胞和CD细胞减少达最低谷, 并开始造成组织和器官的病理性损害, 呼吸道症状及肺部炎症开始加重. 极期, 患者咳嗽、咳痰、胸闷气短等呼吸道症状体征最明显, 可出现呼吸功能衰竭; 肺部炎症进展迅速, 多肺野炎症阴影率达最高值; 可伴有肝肾、心肌的损害. 缓解期患者体温正常, 临床症状开始缓解, 肺部炎症阴影开始吸收, 淋巴细胞和CD细胞及其他化

验指标基本恢复正常. 恢复期主要是指肺部炎症阴影完全吸收的过程, 部分患者时间可能较长, 少数患者可遗留肺脏间质的纤维化.

北京市 SARS 临床诊断与转归研究课题组主要参加单位及个人:

管理组: 北京市卫局(韩德民、王月香、陈利、宋玫)、北京市 SARS 救治指挥中心(张罗、田建).

设计组: 北京市首都儿科研究所(陈博文、肖峰)、北京协和医院(王仲)、北京医院(黄慈波)、北京大学第一附属医院(王广发、徐小元)、解放军 302 医院(赵敏)、地坛医院(李兴旺)、中日友好医院(林江涛).

质量控制组: 阜外心血管病医院(武阳丰、谢高强、贾宣)、首都儿科研究所(陈博文、肖峰)、北京大学第一附属医院(李楠)、北京医院(王钱)、地坛医院(雄号峰)、协和医院(田凌)、天坛医院(陆洋).

数据分析组: 阜外心血管病医院(武阳丰、谢高强、吕敏、张林峰、陈祚)、首都儿科研究所(陈博文、肖峰、吕岩玉、尹德卢).

#### 4 参考文献

- 1 Nie QH, Luo XD, Zhang JZ, Su Q. Current status of severe acute respiratory syndrome in China. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1635-1645
- 2 Zhang JZ. Severe acute respiratory syndrome and its lesion in digestive system. *World J Gastroenterol* 2003;9:1135-1136
- 3 Nie QH, Luo XD, Hui WL. Advances in clinical diagnosis and treatment of severe acute respiratory syndrome. *World J Gastroenterol* 2003;9:1139-1143
- 4 Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, Ahuja A, Yung MY, Leung CB, To KF, Lui SF, Szeto CC, Chung S, Sung JJ. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003;348:1986-1994
- 5 Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, Lam WK, Seto WH, Yam LY, Cheung TM, Wong PC, Lam B, Ip MS, Chan J, Yuen KY, Lai KN. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003; 348:1977-1985
- 6 Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA, Rachlis AR, Rose DB, Dwosh HA, Walmsley SL, Mazzulli T, Avendano M,

- Derkach P, Ephtimios IE, Kitai I, Mederski BD, Shadowitz SB, Gold WL, Hawryluck LA, Rea E, Chenkin JS, Cescon DW, Poutanen SM, Detsky AS. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA* 2003;289:2801-2809
- 7 Poutanen SM, Low DE, Henry B, Finkelstein S, Rose D, Green K, Tellier R, Draker R, Adachi D, Ayers M, Chan AK, Skowronski DM, Salit I, Simor AE, Slutsky AS, Doyle PW, Krajden M, Petric M, Brunham RC, McGeer AJ. National Microbiology Laboratory, Canada; Canadian Severe Acute Respiratory Syndrome Study Team. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* 2003;348: 1995-2005
  - 8 聂青和, 罗新栋, 惠武利. 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征. *世界华人消化杂志* 2003;11:881-887
  - 9 陆海英, 霍娜, 童一帆, 王广发, 李海潮, 聂立功, 阙呈立, 李楠, 马静, 徐小元. SARS 伴腹泻病例的临床特点. *世界华人消化杂志* 2003;11:1929-1931
  - 10 徐小元, 王广发, 陆海英, 李海潮, 霍娜, 王军, 聂立功, 阙呈立. SARS 临床分期及各期治疗要点的经验总结. *北京大学学报(医学版)* 2003;35(增刊):5-6
  - 11 邹正升, 杨永平, 陈菊梅, 辛绍杰, 张伟, 周先志, 胡良平. 严重急性呼吸综合征临床分期与分型特点及其意义探讨. *解放军医学杂志* 2003;28:777-780
  - 12 吴昊, 陈新月, 赵春惠, 刘德恭. 严重急性呼吸综合征临床分型分期初步探讨. *中华传染病杂志* 2003;21:176-179
  - 13 梁迎春, 李铁一. SARS 临床分期与影像表现的研究. *临床荟萃* 2003;18:1282-1283
  - 14 赖日权, 冯晓冬, 王卓才, 赖晃文, 田野, 张伟, 杨传红. SARS 尸检组织的临床病理和超微结构观察. *中华病理学杂志* 2003;32:205-208
  - 15 陈杰, 谢永强, 张宏图, 万建伟, 王德田, 卢朝辉, 王青峙, 薛新华, 司文学, 罗玉凤, 邱红梅. SARS 尸检的肺部病理改变. *中国医学科学院学报* 2003;25:360-362
  - 16 李太生, 邱志峰, 韩扬, 张宏伟, 王仲, 刘正印, 范宏伟, 吕玮, 于莺, 王焕玲, 张惠媛, 谢静, 周宝桐, 马小军, 倪安平, 王爱霞, 邓国华. 严重急性呼吸综合征急性期 T 淋巴细胞亚群异常改变. *中华检验医学杂志* 2003;26:297-299
  - 17 尹炽标, 张复春, 唐小平, 陈伟烈, 陈燕清, 王健, 贾卫东. 93 例传染性非典型肺炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群变化及临床意义. *中华结核和呼吸杂志* 2003;26:343-346
  - 18 曾庆思, 陈苓, 蔡欣, 陈荣昌, 谢念危, 钟南山. SARS 的胸部 X 线与 CT 诊断. *中华放射学杂志* 2003;37:601-603
  - 19 杜湘珂, 郁万江, 王思伦, 朱奇志, 洪楠. SARS 的临床与影像分析. *中华放射学杂志* 2003;37:780-783
  - 20 王微, 马大庆, 赵大伟, 赵春惠, 郭雁宾, 吴昊, 袁椿旺, 段勇, 朗振为. SARS 的 CT 表现及动态变化. *中华放射学杂志* 2003;37:686-689
  - 21 赵大伟, 马大庆, 王微, 吴昊, 袁椿旺, 贾翠雨, 贺文, 陈疆红. SARS 的早期 X 线及 CT 表现. *中华放射学杂志* 2003;37:597-599

## 《中国生物学文摘》2004 年度收录 WJG 和世界华人消化杂志

本刊讯 经专家评估和遴选, WJG 和世界华人消化杂志被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库收录. 中国生物学文献数据库在期刊的基础上开发建设, 数据量已达20万多条, 并形成了期刊、光盘、网络版系列产品. 《中国生物学文摘》1998 年获得第六次全国科技期刊文献检索出版物评比一等奖. (世界胃肠病学杂志 2004-05-05)



# 北京市早期 SARS1062 例临床特征

陆海英, 徐小元, 雷 雨, 武阳丰, 陈博文, 肖 峰, 谢高强, 韩德民

陆海英, 徐小元, 北京大学第一医院感染疾病科 北京市 100034

雷雨, 湖北省房县人民医院肝病中心 湖北省房县 442100

韩德民, 首都医科大学附属北京同仁医院 北京市 100730

武阳丰, 谢高强, 阜外心血管病医院 北京市 100037

陈博文, 肖峰, 首都儿科研究所 北京市 100020

国家 86-3 计划资助项目, No. 2003AA208107

子课题负责人: 徐小元

项目负责人: 韩德民, 100730, 北京市崇文区崇内大街 2 号, 首都医科大学  
附属北京同仁医院. handemin@trhos.com

电话: 010-6528841

收稿日期: 2004-02-23 接受日期: 2004-03-06

## Characteristics of 1 062 patients with SARS in early stage in Beijing

Hai-Ying Lu, Xiao-Yuan Xu, Yu Lei, Yang-Feng Wu, Bo-Wen Chen, Feng Xiao, Gao-Qiang Xie, De-Min Han

Hai-Ying Lu, Xiao-Yuan Xu, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Yu Lei, Department of Hepatic Disease, Renmin Hospital of Fang County, Fangxian 442100, Hubei Province, China

De-Min Han, Beijing Tongren Hospital, Beijing 100730, China

Yang-Feng Wu, Gao-Qiang Xie, Chinese Academy of Medical Sciences Fuwai Hospital, Beijing 100037, China

Bo-Wen Chen, Feng Xiao, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Supported by the National 86-3 Project of China, No.2003AA208107  
Xiao-Yuan Xu, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, 8 Xishiku Road, Beijing 100034, China

Correspondence to: De-Min Han, Beijing Tongren Hospital, 2 Chongnei Street, Dongcheng District, Beijing 100730, China. handemin@trhos.com

Received: 2004-02-23 Accepted: 2004-03-06

## Abstract

**AIM:** To summarize the clinical features of patients with SARS in early stage.

**METHODS:** The clinical data of patients with SARS who were admitted to hospitals in the periods of 1 to 7 days after onset of illness. The early stage of SARS was identified by the syndromes and signs of lungs, oxygenation index and the examination of imaging.

**RESULTS:** The positive rates of the reference parameters were similar in the 1st day and 2nd to 3rd day, but changed obviously in the later days. The period of 1 to 3 days was therefore considered as the early stage of SARS. The study showed that 88.7 percent of patients got fever, 98.8 percent of patients had reported fever and 16.3 % patients with chilly, 4.3 percent of patients even shiver. 20 percent of patients had the unspecific syndrome, such as fatigue, headache, myalgia, and arthralgia. 16.1% patients had congestion in throat and 8.4% patients with pharyngalgia. Rhinorrhea, sneezing, skin rash and tumefaction of tonsil or lymph nodes were rare (the rates were 3.4%, 2.5%, 0.9% and 0.3% respectively). 4.3 percent of patients occurred diarrhea, but no hematenesis and hematochezia. Nausea,

vomiting and other positive signs of abdomen were not common. About one third patients presented cough, 14.6% expectoration, 7% chest distress and suffocated. The sign of lung was usually lacked, and the rate of moist rales were only 4.9%. 71.4% patients' artery pressure of oxygen decreased, 20.9% and 27. 8% patients oxygenation index and oxygen saturation also went down slightly. The reducing rate of WBC, lymphocyte and PLT were 22.5%, 36.4% and 13.4% respectively, but there were 6.4% patients with high WBC count. The mean counts of CD<sub>3</sub>, CD<sub>4</sub>, and CD<sub>8</sub> cells decreased obviously and their positive rates were more than 90%. Most patients of SARS (about 80% to 90%) had inflammatory shadow in chest films, majority had one lungfield shadow and minority with multi-lungfields, but some patients had normal films of chest X-ray (19.9%) and CT (9.1%). 10-15% patients' liver and renal functions were abnormal. 13-16% patients with high values of creatinine kinase, but that of CK-MB was only 5.9%.

**CONCLUSION:** In early stage of SARS (1 to 3 days), almost all the patients get fever, some have the unspecific symptom, but the sign of catarrh and tumefaction of lymph nodes are rare. About one third patients have cough and 14.6% expectoration, and present mild hypoxemia, but usually lack the sign of lung. In 22.5% and 36.4% patients WBC and lymphocyte reduce, and also the mean counts of CD<sub>3</sub>, CD<sub>4</sub> and CD<sub>8</sub> cells reduce significantly, the positive rates are more than 90%. About 80% (X-ray) to 90% (CT) patients show abnormal chest films in radiologic examination, but someones have the normal results of chest X-ray (19.9%) and CT (9.1%). About 10-16% patients suffer the damage of the liver, kidney and heart.

Lu HY, Xu XY, Lei Y, Wu YF, Chen BW, Xiao F, Xie GQ, Han DM. Characteristics of 1 062 patients with SARS in early stage in Beijing. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(5):1149-1154

## 摘要

**目的:** 归纳总结 SARS 早期临床特征。

**方法:** 分析 SARS 患者发病 1-7 d 入院时的临床资料, 以肺部的症状体征、氧合指数及影像学检查为参考指标, 划分 SARS 早期时间段, 分析该时间段 SARS 的临床资料。

**结果:** 以上参考指标在发病 1 d, 2-3 d 的阳性率相近, 以后的病日则有明显的改变, 故把发病 1-3 d 作为 SARS 的早期阶段。结果发现: 发病 1-3 d, 88.7% 患者有发热, 98.8% 患者有发热主诉, 可伴有畏寒(16.4%), 甚至寒战(4.3%), 20% 左右的患者有乏力、头痛、肌肉酸痛、关节痛等感染中毒症状。16.1% 的患者有咽红, 8.4% 患者有咽痛; 流涕(3.4%)、打喷嚏、皮疹、扁桃体及淋巴结肿大少见(2.5%, 0.9% 和 0.3%)。4.3% 的患者有腹泻, 但无

呕血、便血, 恶心呕吐、腹痛及腹部阳性体征少见. 约1/3患者有咳嗽, 14.6%有咳痰, 7%出现胸闷、气短憋气; 但肺部体征少, 湿罗音的阳性率为4.9%; 71.4%的患者有氧分压降低, 20.9%和27.8%的患者出现氧合指数、氧饱和度轻度的下降. WBC, 淋巴细胞, 血小板减少的阳性率分别为22.5%, 36.4%和13.4%, 但有6.4%的患者WBC升高;  $CD_3$ 、 $CD_4$ 、 $CD_8$ 均数明显下降, 异常率大于90%. 大多数(90%) SARS患者肺部影像学有异常改变, 以1个肺野阴影最多见, 少数可出现多肺野损害, 但部分患者X-ray(19.9%), CT(9.1%)检查结果正常. 10-15% SARS患者伴有肝功能及肾功能的异常; 13-16%的患者出现心肌酶谱的升高, 但CK-MB的阳性率仅为(5.9%).

结论: SARS早期, 绝大多数患者有发热, 部分患者可伴有感染中毒症状, 但卡他症状及淋巴结肿大等体征少见; 下呼吸道症状出现早(咳嗽约1/3, 咳痰14.6%), 但肺部体征少, 可出现轻度的低氧血症; 绝大多数患者WBC总数正常或降低, 36.4%患者淋巴细胞明显减少;  $CD_3$ 、 $CD_4$ 、 $CD_8$ 的改变更敏感(大于90%); 肺部炎症阴影出现早, 但部分患者X-ray(19.9%), CT(9.1%)检查可表现为正常. 少数患者(10-16%)患者可伴有肝、肾及心脏的损害.

陆海英, 徐小元, 雷雨, 武阳丰, 陈博文, 肖峰, 谢高强, 韩德民. 北京市早期SARS1062例临床特征. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1149-1154  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1149.asp>

## 0 引言

SARS是由新型冠状病毒感染, 以呼吸功能障碍为主要临床表现的一种急性传染性, 重症患者有明显的呼吸困难, 并可迅速发展为急性呼吸窘迫综合征, 平均死亡率达9.3%, 重症患者的死亡率更高<sup>[1-8]</sup>. 因此SARS的早期诊断、早期治疗在阻断或减缓病情的发展, 提高治愈率, 降低死亡率中起着关键的作用. 目前仍未找到简便易行的早期诊断SARS的病原学方法, 因此SARS的诊断主要依靠临床诊断. 为了解SARS的早期临床特征, 我们对临床诊为SARS的1062例患者发病1-7 d入院时的临床资料进行了以下的回顾性分析, 以归纳出SARS患者早期的临床特点, 为临床早期的诊断与治疗提供一些指导和帮助.

## 1 材料和方法

1.1 材料 北京SARS临床诊断与转归数据库收录了2003-03/2003-06北京地区收治的有完整临床资料的1291份SARS病例(诊断标准符合2003-05卫生部制定的《传染性非典型肺炎临床诊断标准[试行]》). 我们以该数据库中发病1-7 d入院的1062例SARS患者入院时的临床资料为研究内容, 发病第1 d入院患者226例(21.28%), 第2 d 195例(18.36%), 第3 d 145例(13.65%), 第4 d 175例(16.48%), 第5 d 142例(13.37%), 第6 d

104例(9.79%), 第7 d 75例(7.06%). 男510例(48.02%), 女552例(51.98%); 0-17岁43例(4.05%), 18-39岁635例(59.79%), 40-64岁303例(28.53%), 64岁以上81例(7.63%), 以上各年龄段的患者在性别上无明显差异( $\chi^2=4.712$ ,  $P=0.1941$ ). 职业分布以医务人员占的阳性率最高(21.28%, 226/1062), 尤其在女性患者中更明显(80.09%, 181/1062), 干部职工147例(13.84%), 工人11.68%(124/1062), 民工5.27%(56/1062), 教师和服务人员分别为2.28%(30/1062)和3.11%(33/1062). 有基础疾病285例(26.84%), 有基础疾病的患病率在性别上无统计学差异( $\chi^2=0.2794$ ,  $P=0.5971$ ). 发病1 wk内出现并发症110例, 其中第1 d 6例(2.65%), 第2 d 24例(5.78%), 第3 d 17例(3.17%), 第4 d 13例(1.87%), 第5 d 14例(1.70%), 第6 d 17例(1.86%), 第7 d 19例(1.96%). 死亡人数在发病第1 d为0例(0%), 第2 d 3例(7.13%), 第3 d 1例(1.78%), 第4 d 1例(1.36%), 第5 d 2例(2.28%), 第6 d 7例(7.14%), 第7 d 6例(5.73%).

1.2 方法 观察发病1 d, 2-3 d, 4 d, 5 d, 6-7 d入院时每例患者的临床症状、体征的变化情况; 分析患者入院时血气、生化、血常规及免疫活性细胞的检查结果; 分析患者胸片及CT检查结果. 判断异常的标准: WBC小于 $4 \times 10^9/L$ , 淋巴细胞小于 $0.9 \times 10^9/L$ ,  $CD3 < 100$ ,  $CD4 < 500$ ,  $CD8 < 450$ ,  $SaO_2 < 95\%$ ,  $POa_2 < 12.7 Kpa$ , 氧合指数 $< 350$ 为降低;  $ALT > 40 IU/L$ ,  $AST > 45 IU/L$ ,  $TBil > 20 \mu mol/L$ ,  $BUN > 7.85 mmol/L$ ,  $Cr > 106.5 \mu mol/L$ 为升高; Na的正常值范围为135-145 mmol/L, K和Cl的正常值范围分别为3.5-5.5 mmol/L和96-110 mmol/L, 低于正常范围的最低值为降低, 高于正常范围的最高值为升高. 肺炎阴影 $\geq 3$ 肺野为多肺野损伤.

统计学处理 计量资料用均数和标准差(mean  $\pm$  SD)或中位数表示, 组间均数差异用t检验进行统计学处理. 构成比 = 某群体患者人数 / 总病例  $\times 100\%$ ; 阳性率 = 异常人数 / 该时段观察总人数  $\times 100\%$ .

## 2 结果

2.1 临床表现 发病1-7 d患者入院时的平均体温38.37-38.38  $^{\circ}C$ ; 脉搏均数90-91 /min; 呼吸20/min; 收缩压均数15.6-15.7 Kpa; 舒张压9.7-9.9 Kpa. 发病1 d, 2-3 d, 4 d, 5 d及6-7 d入院患者, 首诊时咳嗽的阳性率从34.21%逐渐升至56.03%; 咳痰、胸闷、气短憋气、湿罗音的阳性率分别从14.74%, 7.37%, 6.84%和5.36%升至28.37%, 12.06%, 17.73%和10.95%. 发病1-3 d的SARS患者, 98.76%有发热主诉, 但测体温升高的比例仅为88.70%, 16.34%和4.3%的患者伴有畏寒和寒战, 24.94%的患者有乏力, 约20%的患者有头痛及肌肉酸痛, 但未发现肌肉有压痛的病例, 关节酸痛的阳性率达15.06%. 少数(3.44%)患者出现流涕, 打喷嚏的例数极少(0.64%). 16.08%的患者有咽红, 但咽痛的阳性率仅为8.39%. 扁桃体肿大和淋巴结肿大的病例

少见(2.54%和0.85%); 皮疹、水肿的发生率极低(0.27%和0.25%)。4.30%的患者可出现腹泻, 但无呕血、便血, 腹痛和恶心呕吐也很少见(小于2%), 腹部查体未发现有脾大病例, 腹部压痛也极少(0.25%)。咳嗽、咳痰、胸闷、气短憋气及胸痛的阳性率分别可达34.41%, 14.62%, 7.53%, 7.74%和1.72%, 有湿罗音、干罗音及咳血的患者不多见(4.93%, 0.23%和1.09%); 紫绀也很少见(0.52%)。

2.2 低氧血症 氧分压下降的患者在以上各时间段的比例在70%-75%之间, 氧分压均数从 $12.33 \pm 2.3$  Kpa (1 d) 降至 $11.43 \pm 1.9$  Kpa (6-7 d); 氧饱和度下降的阳性率从14.63%升至37.70%, 均数在93-94.95%之间; 氧合指数下降阳性率从25.00%升至80.00%, 均数从 $348 \pm 69$ 降至 $329 \pm 78$ 。发病1-3 d的SARS患者, 71.43%的患者有氧分压降低, 20.87%和27.78%的患者出现氧合指数和氧饱和度的下降; 前者的均数为 $11.55 \pm 4.38$  Kpa, 后二者的均数稍低于正常值。

2.3 外周血细胞 发病1 d入院患者血WBC减少的阳性率为21.54%, 有9.23%的患者 $WBC > 1.0 \times 10^9/L$ , 淋巴细胞小于 $0.9 \times 10^9/L$ 的阳性率为33.33%; 血小板减少的为15.43%; 以后患者血WBC, 淋巴细胞及血小板减少的阳性率分别升至(6-7 d) 43.71%, 43.65%和24.29%, WBC升高阳性率逐渐降到3.31%。以上各时间段患者血WBC的均数在 $5.51 \times 10^9/L$ - $6.21 \times 10^9/L$ 之间; 血小板均数在 $148 \times 10^9/L$ - $156 \times 10^9/L$ 之间; 淋巴细胞均数在 $1.08 \times 10^9/L$ - $1.11 \times 10^9/L$ 之间。发病1-3 d入院的SARS患者首诊时, 22.54%患者血WBC减少, 但有6.44%的患者 $WBC > 1.0 \times 10^9/L$ , 血小板减少为13.39%, WBC、血小板的均数在正常范围。36.43%的患者淋巴细胞 $< 0.9 \times 10^9/L$ , 其均数偏低( $1.11 \pm 0.75$ )  $\times 10^9/L$ 。90.91-92.86%的患者出现 $CD_3$ ,  $CD_4$ 和 $CD_8$ 细胞的减少, 而且均数都小于相应的正常值低线(分别为 $405.32 \pm 358.90$ ,  $217.82 \pm 19248$ 和 $188.58 \pm 166.40$ )。15%出现肝功能的异常; GLU升高的阳性率41.04%; 9.62%和7.60%的患者出现Cr、BUN升高; 13.64-16.88%的患者出现LDH, CK, HBDH的升高, 但CK-MB的异常率仅为5.88%, 而且出现心悸、胸痛、心律失常及心脏杂音的阳性率极少(0.24-0.52%)。低血钾, 低血钠和低血氯的阳性率分别为16.67%, 28.85%, 12.21%; 高血钾, 高血钠, 高血氯的阳性率为15.36%, 4.92%和1.31%。

2.4 X-ray及CT检查结果 发病1 d入院的患者中X-ray检查正常者占17.02%, 总的阳性率为82.98%。以后随着病程的延长, X-ray正常患者的比率逐渐下降, 阳性率上升(尤其是多肺野阴影的阳性率); 发病6-7 d入院的患者, 仅8.8%的患者胸片正常, 总阳性率达91.18%。发病1 d入院的患者, CT检查正常患者占5.26%, 在发病3 d以上的患者入院时CT检查无1例正常(表1)。SARS早期(1-3 d), 19.93%和9.09%患者X-ray、CT检查可表现为正常, 肺部的炎症阴影以1肺

野阴影(47.93%和61.36%)最多见, 但部分患者也可出现多肺野阴影的改变(10.19%和20.87%)。

表1 SARS发病1-7 d入院患者相关指标的阳性率(%)

指标	发病1 d	发病2-3 d	发病4 d	发病5 d	发病6-7 d
咳嗽	34.21	34.55	45.21	47.41	56.03
咳痰	14.74	14.55	23.29	18.10	28.37
胸闷	7.37	7.64	12.33	12.07	12.06
气短憋气	6.84	8.36	8.22	12.93	17.73
湿罗音	5.36	4.65	2.96	7.48	10.95
氧合指数降低	25.00	30.00	44.44	50.00	80.00
WBC降低	21.54	23.18	31.01	40.32	43.71
淋巴细胞降低	33.33	38.25	43.65	42.86	43.65
X线正常	17.02	21.62	13.51	10.84	8.82
X线多野阴影	9.22	10.81	17.12	14.46	15.69
CT正常	5.26	12.00	0	0	0
CT多野阴影	15.79	24.00	33.33	100	18.18

发病1-3 d入院患者, 咳嗽、咳痰、胸闷、气短憋气及胸痛的阳性率明显低于发病4-7 d入院患者; 血WBC, 血小板减少及X-ray阳性率也显著低于后者; 肝功能(AST, DBIL)心肌酶谱(LDH, CK, CK-MB, HBDH)升高的阳性率低于后者( $P < 0.05$ , 表2)。

表2 SARS发病1-3 d和4-7 d入院患者的首诊临床资料

指标	发病1-3 d			发病4-7 d			$\chi^2$	P
	总数	异常数	异常率	总数	异常数	异常率		
咳嗽	465	160	34.41	403	200	49.63	19.98	<0.00 001
咳痰	465	68	14.62	403	95	23.57	10.76	0.00103
胸闷	465	35	7.53	403	49	12.16	5.47	0.0194
气短憋气	465	36	7.74	403	52	12.90	5.76	0.0164
腹泻	465	20	4.30	403	37	9.18	7.6	0.0058
湿罗音	426	21	4.93	379	27	7.12	1.35	0.2447
WBC下降	497	112	22.54	433	165	38.11	26.09	<0.00 001
淋巴细胞下降	398	145	36.43	357	155	43.43	3.55	0.0 596
PLT下降	448	60	13.39	394	85	21.57	9.28	0.0 023
氧合指数下降	18	5	27.78	23	14	60.87	0.89	0.3 456
DBIL下降	179	2	1.12	225	46	20.44	33.75	<0.00 001
AST下降	247	38	15.38	243	56	23.05	4.16	0.0 415
LDH下降	209	35	16.75	206	66	32.04	12.36	0.00 044
CK下降	231	39	16.88	219	58	26.48	5.57	0.01 823
CK下降	187	11	5.88	187	33	17.65	11.36	0.00 075
HBDH下降	154	21	13.64	152	51	33.55	15.77	0.000 071
X线异常	363	291	80.17	296	263	88.85	8.55	0.00 346
X线阴影 $\geq 3$	363	37	10.19	296	47	15.88	4.24	0.0 394
CT异常	44	40	90.99	24	24	100		
CT阴影 $\geq 3$	44	9	20.45	24	7	29.17	0.26	0.60 987
合并症	566	47	8.30	496	54	10.89		
死亡	566	4	0.71	496	16	3.23		

### 3 讨论

SARS是由新型冠状病毒(SARS-CoV)<sup>[9-11]</sup>感染引起的,临床以急性呼吸功能障碍为主要表现的急性传染病,在发病1-7 d用RT-PCR方法从粪便、痰检测ScoV-RNA阳性率可达95%以上,但该检测方法较复杂,需要一定的条件和设备,临床难以开展;ScoV特异性IgM, IgG在发病10 d左右才可检出,而且阳性率不很高<sup>[12-13]</sup>,不能满足临床早期诊断的要求,故目前SARS的诊断大多是临床诊断.现SARS临床诊断主要标准有:有传染病接触史;有临床症状;胸片异常.该诊断标准曾有力地指导和保证2003年春季抗SARS工作的胜利.但在临床工作中,我们发现有些患者发病早期临床表现不典型,不完全符合卫生部的诊断标准,但临床仍考虑为SARS.这些现象和数据提示我们现有的SARS诊断标准还有待进一步的充实和完善.发病1 wk左右,绝大多数SARS患者的胸片或CT检查都会出现明显的炎症渗出阴影,此时结合流行病学史和其他临床资料,不难诊断SARS,但这不仅延误了治疗,而且还会导致SARS的传播流行,因此SARS的早期诊断具有重大的意义.现虽已有不少关于SARS的临床报道,但其病例数均不够多,资料也不很全,因此本文对北京地区1 062例SARS患者的早期临床资料进行全面的分析研究,以总结出SARS的早期临床特点,为SARS的早期诊断提供帮助.

为解决SARS早期诊断的问题,我们必须首先要回答这两个问题:何时是SARS的早期?SARS的早期又有那些临床特征?所谓某种疾病的早期应是指该病虽发病了,但还未或还没有完全呈现其典型的临床特征与过程的那段病程.大量的临床资料结果表明SARS是一种以急性的呼吸功能障碍或衰竭为主要表现的疾病,肺部胸片及CT检查有明显的炎症渗出阴影<sup>[14-17]</sup>;尸解已证实肺脏是SARS-CoV的主要靶器官,肺组织有弥漫性的损害,肺透明膜形成,通气功能障碍<sup>[18-19]</sup>.目前认为SARS的发病机制与SARS-CoV攻击淋巴细胞,通过病毒的细胞毒性作用以及诱导细胞凋亡,使WBC,淋巴细胞数量减少,并诱发一系列的病理免疫反应,导致多脏器的功能受损;尸解也证实死者的淋巴器官受累及.已有淋巴细胞等免疫活性细胞下降的程度与病情成正相关的报道<sup>[20-21]</sup>.因此我们可根据SARS的发病机制及其主要的病理改变特点,结合SARS的临床表现,选择能反应肺脏损害的症状体征、影像学检查及肺功能检查指标,以及与发病机制密切相关的淋巴细胞作为参考指标,去判断SARS的病程进展.由于淋巴细胞的下降也会导致WBC数发生不同程度的减少,故还可用之助诊;考虑到氧分压受年龄等因素影响较多,而且在轻度缺氧时,氧饱和度对反应低血氧程度也不很敏感,因此我们仅选用氧合指数作为判断肺功能的指标.当这些主要指标发生明显的改变时,提示病情发生了一定的变化,进入了新的阶段.

为了排除治疗因素对观察SARS自然病情的影响,我们仅研究不同病日入院患者入院时的临床资料,结果发现在发病1 d, 2-3 d, SARS患者乏力的阳性率相近(25.26%, 24.73%),咳嗽(34.21%, 34.55%)、咳痰(14.74%, 14.55%)、胸闷(7.37%, 7.64%)、气短憋气(6.84%, 8.36%)的阳性率相近;体征上湿罗音(5.63%, 4.6%)的阳性率也相差不远.以上各指标在发病4 d, 5 d和6-7 d的阳性率均有较明显的升高.发病1 d, 2-3 d, SARS患者氧合指数下降的阳性率相差最小(25%, 30%);外周血WBC (21.54%, 23.18%)和淋巴细胞(33.33%, 38.25%)的情况也如此,但发病4-7 d阳性率则开始明显地上升.发病1 d, 2-3 d胸片及CT检查,正常率(分别为17.02%和21.62%, 5.26%和12.00%)、多肺野炎症阴影率(分别为9.22%和10.81%, 15.79%和24%)最接近;以后胸片及CT检查正常率逐渐下降,尤其是CT检查,发病3 d后阳性率可达100%,而多肺野炎症阴影率则明显升高.发病1-3 d入院患者咳嗽、咳痰、胸闷、气短憋气及胸痛的阳性率明显低于发病4-7 d入院患者;血WBC,血小板减少及X-ray阳性率也显著低于后者;肝功能(AST, DBIL)心肌酶谱(LDH, CK, CK-MB, HBDH)升高的阳性率低于后者( $P < 0.05$ ).由此我们可以推断发病1-3 d是SARS病程较早期的阶段,此后病情可能开始进展,从而表现出较明显的呼吸道症状体征及肺部影像学的异常改变.

既然我们已找出了大致划分SARS早期的时间点,我们便可从SARS患者发病1-3 d的临床资料中去总结SARS的早期临床特征.SARS患者在发病早期(1-3 d)入院时脉搏、呼吸及血压的均数都在正常范围,44.65%的患者HR>100/min;6.87%的患者呼吸>24/min, 6.23%的患者收缩压异常, 3.11%的患者舒张压有异常改变,88.70%以上的患者体温升高,均数在38.3℃以上.除去发热、基础病等因素的影响,SARS患者在发病的早期生命体征的异常改变不明显.

SARS早期最突出的不适是发热(98.76%),但测体温升高的比例仅为88.70%,原因可能与患者虽发热但入院前已自服退烧药或者是患者还未出现发热有关,其中以前者所占的比例可能更大些;16.34%和4.3%的患者伴有畏寒和寒战,24.94%的患者有乏力,约20%的患者有头痛及肌肉酸痛,但未发现肌肉有压痛的病例,关节酸痛的阳性率达15.06%.极少数(3.44%)患者出现流涕,打喷嚏的例数极少(0.64%).16.08%的患者有咽红,但咽痛的阳性率仅为8.39%.扁桃腺肿大和淋巴结肿大的病例少见(2.54%和0.85%);皮疹、水肿的发生率极低(0.27%和0.25%).4.30%的患者可出现腹泻,但无呕血、便血,腹痛和恶心呕吐也很少见(小于2%),腹部查体阳性体征极少见.现已证实SARS患者早期存在病毒血症,以上的发热和中毒症状可能与之有关.

呼吸道症状是SARS早期另一组明显的症状,咳嗽、咳痰、胸闷、气短憋气及胸痛的阳性率分别可达34.41%,

14.62%, 7.53%, 7.74% 和 1.72%, 有湿罗音, 干罗音及咳血的患者不多见(4.93%, 0.23% 和 1.09%); 紫绀也很少见(0.52%). 由此可见 SARS 早期可出现呼吸道症状, 但多缺乏阳性的肺部阳性体征. 71.43% 的患者有氧分压降低, 20.87% 和 27.78% 的患者出现氧合指数和氧饱和度的下降; 前者的均数为  $11.55 \pm 4.38$  Kpa, 后二者的均数稍低于正常值. 表明 SARS 患者发病早期便可出现低氧血症, 但缺氧的程度一般较轻.

22.54% 患者血 WBC 减少, 但有 6.44% 的患者 WBC  $> 1.0 \times 10^9/L$ , 血小板减少为 13.39%, WBC, 血小板的均数在正常范围. 36.43% 的患者淋巴细胞  $< 0.9 \times 10^9/L$ , 其均数偏低  $(1.11 \pm 0.75) \times 10^9/L$ . 90.91-92.86% 的患者出现 CD<sub>3</sub>、CD<sub>4</sub> 和 CD<sub>8</sub> 细胞的减少, 而且均数都小于相应的正常值低线(分别为  $405.32 \pm 358.90$ 、 $217.82 \pm 19248$  和  $188.58 \pm 166.40$ ). 表明 SARS 的早期大多数患者 WBC 正常, 部分患者 WBC 减少; 淋巴细胞均数低于  $1.2 \times 10^9/L$ , 1/3 的患者淋巴细胞计数可有明显的下降: CD<sub>3</sub>, CD<sub>4</sub>, CD<sub>8</sub> 细胞是 T 淋巴细胞中与免疫反应关系最为密切的细胞, 故其下降更明显, 阳性率也就更高(>90%).

SARS 早期(1-3 d), 19.93 % 和 9.09% 患者 X-ray, CT 检查可表现为正常, 肺部的炎症阴影以及肺野阴影(47.93% 和 61.36%) 最多见, 但部分患者也可出现多肺野阴影的改变(10.19% 和 20.87%), 因此早期影像学检查无异常者还不能完全除外 SARS, 应定期复查, 有条件时行 CT 检查阳性率更高. 15% 的患者出现肝功能的异常; GLU 升高的阳性率 41.04%, 由于不好判断血糖的升高是否受基础病、治疗和饮食的影响, 故不好解释其升高的原因. 9.62% 和 7.60% 的患者出现 Cr、BUN 异常升高, 13.64-16.88% 的患者出现 LDH, CK, HBDH 的升高, 但 CK-MB 的异常率仅为 5.88 %, 而且出现心悸、胸痛、心律失常及心脏杂音的阳性率极少(0.24-0.52%), 考虑 SARS 早期心肌酶谱的异常特异性不高. 低血钾、低血钠、和低血氯的阳性率分别为 16.67%, 28.85%, 12.21%; 高血钾、高血钠、高血氯的阳性率为 15.36%, 4.92% 和 1.31%. 以上资料表明 SARS 病毒可累及肺脏外其他脏器.

总之, 我们发现 SARS 的早期(1-3 d) 临床表现有以下特点: SARS 早期, 绝大多数患者有发热, 部分患者可伴有感染中毒症状, 但卡他症状及淋巴结肿大等体征少见; 下呼吸道症状出现早(咳嗽约 1/3, 咳痰 14.62%), 但肺部体征少, 可出现轻度的低氧血症; 绝大多数患者 WBC 总数正常或降低, 36.43% 患者淋巴细胞明显减少; CD<sub>3</sub>, CD<sub>4</sub>, CD<sub>8</sub> 的改变更敏感(> 90%); 肺部炎症阴影出现早, 但部分患者 X-ray(19.93 %), CT(9.09%) 检查可表现为正常. 少数患者(10-16%) 患者可伴有肝、肾及心脏的损害及电解质的失衡.

“北京市 SARS 医疗救治指挥中心科技攻关组” 要参加单位及个人:

管理组: 北京市卫生局(韩德民、王月香、陈利、宋

玫)、北京市 SARS 救治指挥中心(张罗、田建).

设计组: 北京市首都儿科研究所(陈博文、肖峰)、北京协和医院(王仲)、北京医院(黄慈波)、北京大学第一附属医院(王广发、徐小元)、解放军 302 医院(赵敏)、地坛医院(李兴旺)、中日友好医院(林江涛).

质量控制组: 阜外心血管病医院(武阳丰、谢高强、贾宣)、首都儿科研究所(陈博文、肖峰)、北京大学第一附属医院(李楠)、北京医院(王钱)、地坛医院(雄号峰)、协和医院(田凌)、天坛医院(陆洋).

数据分析组: 阜外心血管病医院(武阳丰、谢高强、吕敏、张林峰、陈祚)、首都儿科研究所(陈博文、肖峰、吕岩玉、尹德卢).

#### 4 参考文献

- Nie QH, Luo XD, Zhang JZ, Su Q. Current status of severe acute respiratory syndrome in China. *World J Gastroenterol* 2003;9:1635-1645
- Zhang JZ. Severe acute respiratory of syndrome and its lesion in digestive system. *World J Gastroenterol* 2003;9:1135-1136
- Nie QH, Luo XD, Hui WL. Advances in clinical diagnosis and treatment of severe acute respiratory syndrome. *World J Gastroenterol* 2003;9:1139-1143
- Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM, Ahuja A, Yung MY, Leung CB, To KF, Lui SF, Szeto CC, Chung S, Sung JJ. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003;348:1986-1994
- Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, Yee WK, Wang T, Chan-Yeung M, Lam WK, Seto WH, Yam LY, Cheung TM, Wong PC, Lam B, Ip MS, Chan J, Yuen KY, Lai KN. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003;348:1977-1985
- Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA, Rachlis AR, Rose DB, Dwosh HA, Walmsley SL, Mazzulli T, Avendano M, Derkach P, Ephtimios IE, Kitai I, Mederski BD, Shadowitz SB, Gold WL, Hawryluck LA, Rea E, Chenkin JS, Cescon DW, Poutanen SM, Detsky AS. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA* 2003;289:2801-2809
- Poutanen SM, Low DE, Henry B, Finkelstein S, Rose D, Green K, Tellier R, Draker R, Adachi D, Ayers M, Chan AK, Skowronski DM, Salit I, Simor AE, Slutsky AS, Doyle PW, Krajden M, Petric M, Brunham RC, McGeer AJ. National microbiology laboratory, Canada; Canadian severe acute respiratory syndrome study team. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* 2003;348:1995-2005
- 聂青和, 罗新栋, 惠武利. 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征. *世界华人消化杂志* 2003;11:881-887
- Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. SARS study group. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1319-1325
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-1966
- Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V,



- Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1967-1976
- 12 陆海英, 霍娜, 王广发, 李海潮, 聂立功, 阙呈立, 李杰, 李永华, 高晓明, 赵振东, 庄辉, 徐小元. 影响SARS患者血特异性IgG抗体产生的因素. *世界华人消化杂志* 2004;12:723-725
- 13 国家SARS防治紧急科技行动北京组. 传染性非典型肺炎的血清学诊断研究. *中华结核和呼吸杂志* 2003;26:339-342
- 14 曾庆思, 陈苓, 蔡欣, 陈荣昌, 谢念危, 钟南山. SARS的胸部X线与CT诊断. *中华放射学杂志* 2003;37:601-603
- 15 杜湘珂, 郁万江, 王思伦, 朱奇志, 洪楠. SARS的临床与影像分析. *中华放射学杂志* 2003;37:780-783
- 16 王微, 马大庆, 赵大伟, 赵春惠, 郭雁宾, 吴昊, 袁春旺, 段勇, 朗振为. SARS的CT表现及动态变化. *中华放射学杂志* 2003;37:686-689
- 17 赵大伟, 马大庆, 王微, 吴昊, 袁春旺, 贾翠雨, 贺文, 陈疆红. SARS的早期X线及CT表现. *中华放射学杂志* 2003;37:597-599
- 18 赖日权, 冯晓冬, 王卓才, 赖晃文, 田野, 张伟, 杨传红. SARS尸检组织的临床病理和超微结构观察. *中华病理学杂志* 2003;32: 205-208
- 19 陈杰, 谢永强, 张宏图, 万建伟, 王德田, 卢朝辉, 王青峙, 薛新华, 司文学, 罗玉凤, 邱红梅. SARS尸检的肺部病理改变. *中国医学科学院学报* 2003;25:360-362
- 20 李太生, 邱志峰, 韩扬, 张宏伟, 王仲, 刘正印, 范宏伟, 吕玮, 于莺, 王焕玲, 张惠媛, 谢静, 周宝桐, 马小军, 倪安平, 王爱霞, 邓国华. 严重急性呼吸综合征急性期T淋巴细胞亚群异常改变. *中华检验医学杂志* 2003;26:297-299
- 21 尹炽标, 张复春, 唐小平, 陈伟烈, 陈燕清, 王健, 贾卫东. 93例传染性非典型肺炎患者外周血T淋巴细胞亚群变化及临床意义. *中华结核和呼吸杂志* 2003;26:343-346

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

• 消息 •

## World Journal of Gastroenterology 编辑

经《World Journal of Gastroenterology, WJG》编委审稿后, 非常优秀的论文可直接录用, 通知作者按照编委审稿意见及本刊的书写格式进行修改, 符合本刊要求的论文经第一和第二编辑语言处理后方可进行排版. 排版后校样由责任编辑审读全文, 无语法及拼写错误方可付印. WJG 为了确保其出版的每篇论文的编辑质量, 特制定了编辑要点.

### 1 题名

应简明扼要有特色, 突出主题, 不宜过长; 应直入主题, 避免使用“探讨、研究、分析、观察、调查、探索”等词语; 不用定冠词 The, 一般不使用缩写字(常用缩写字例外). 具体写作的要求见《科技论文英文题名的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/26.asp>.

### 2 摘要

采用结构式摘要. 目的部分应直入主题, 如 To investigate the, 可简要交代背景或该课题目前开展情况; 方法(包括材料)和结果(包括重要数据)部分使用过去时, 结论部分使用一般现在时. 人称和语态使用应自然, 避免使用“悬垂分词”. 摘要的第一句不要重复文章题名, 应增加变化, 补充一些细节. 具体写作要求见《科技论文英文摘要的撰写》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/25.asp>.

### 3 正文

(1) 短句子: 提倡使用短句子, 尽量避免一个句子使用多个从句. 拼写正确, 时态一致、准确. 方法及结果部分一般使用过去时. 讨论部分, 引用文献叙述一般使用过去时, 结论性语言使用一般现在时. 要注意主句和从句的时态呼应及文中上下文含意的呼应; 应尽量对照其中文稿以求如实表达其原意; 使用分词短语作状语和定语时, 一定要注意其语态的正确使用, 以求其前后呼应; 应注意用词的对照一致及词语的固定搭配等; 在编辑过程中, 一定要核对各基本数据及其百分比. 此外, 还应注意标点符号的正确使用与拉丁语名词的单复数. (2) 数字: 出现在句首的数字应写为: Sixteen cases... 或 A total number of 16 cases 而不能写为: 16 cases, 100 patients, 等. (3) 缩略词: 首次使用词语时, 应先写出全称然后在括号内写出其缩写词. (4) 斜体: 细菌、病毒、动植物的拉丁学名、统计学符号、基因符号、内切酶(前3个字符)、量符号、拉丁词如 *in vivo*, *in situ*, *et al* 等及参考文献中的刊名应使用斜体. (5) 图表: 不要重复使用, 已用图表示的内容不再使用表格. 表和图题的说明应与正文的文题一样, 文内图表的标注使用句子表示时应使用一般现在时而不使用过去时, 如 The data are shown in Table 1. 图表置正文内, 图表内注解首字母大写, 其余小写.

### 4 参考文献

应按先后顺序在正文内标出. 参考文献全体作者是否与首页一致, 题名与首页是否一致, 刊名与首页是否一致, 年与首页是否一致, 卷号与首页是否一致, 起页-止页与首页是否一致, PMID号是否与首页一致.

### 5 其他

(1) 注意字符间空格, 文稿要隔行打印. (2) 使用正式文体, 不用口语体和非规范缩写词. 如 isn't, aren't, hasn't, hadn't, haven't, don't, can't, wouldn't, a lot of, a bit, too (also), thru (through), exam (examination), lab (laboratory) 等. (3) 要客观地叙述方法和结果, 用词要质朴无华, 避免使用带感情色彩或广告式宣传的词语. (4) 可用动词时应尽量避免使用动词的名词形式. (5) 正确使用冠词, 对可数词应尽量使用复数形式. (6) 应多用预置短语分开或用连字符断开名词词组, 避免使用长系列形容词或名词修饰名词. (7) 尽量应用重要的事实开头, 避免短语或从句开头. (8) 涉及他人的工作或研究成果时, 尽量列出其姓名, 两名以上的作者一定要用“*et al*”. 具体写作要求见《科技论文的写作要点》<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/31.asp>.

# 上消化道黏膜下肿瘤的内镜超声随访研究

程 斌, 金震东, 邹晓平, 李兆申, 许国铭

金震东, 邹晓平, 李兆申, 许国铭, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科 上海市 200433  
程斌, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 200433  
程斌, 男, 1966-09-04, 湖北省天门市人, 汉族, 1989 年华中科技大学同济医学院本科毕业, 2002 年获德国波恩大学医学院医学博士学位, 现就职于华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。  
项目负责人: 金震东, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科。zhendjin@sohu.com  
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-01-12

## Endoscopic ultrasonography follow-up in patients with upper gastrointestinal submucosal tumours

Bin Cheng, Zhen-Dong Jin, Xiao-Ping Zou, Zhao-Shen Li, Guo-Ming Xu

Bin Cheng, Department of Digestive Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Dadao, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Zhen-Dong Jin, Xiao-Ping Zou, Zhao-Shen Li, Guo-Ming Xu, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Correspondence to: Dr. Zhen-Dong Jin, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, 174 Changhai Road, Shanghai 200433, China.  
zhendjin@sohu.com  
Received: 2003-12-10 Accepted: 2004-01-12

## Abstract

**AIM:** To observe the alteration of upper gastrointestinal submucosal tumor (SMT).

**METHODS:** The first diagnostic SMT patients ( $n=32$ ) were observed with endoscopic ultrasonography (EUS) and followed-up.

**RESULTS:** The second and the first EUS findings coincided in 90.1% of cases (29/32), 95.5% (21/22) of the SCT diagnoses were identical to the first EUS. In 21 SCT cases, which diagnosed with EUS in both times, 33.3% showed the alteration of growth type in the second time, and 47.6% showed difference between both EUS-examinations; 57.1% (12/21) of the double EUS showed different tumor size, 66.7% (8/12) of which ones were greater than the first EUS. The diameter was increased 3.5 (2-7) mm in a 9-month follow-up term.

**CONCLUSION:** EUS is very accurate for the diagnosis of upper gastrointestinal SMT, and long time follow-up with EUS is necessary to distinguish the benign from malignancy of SMT and to guide the therapeutic approach.

Cheng B, Jin ZD, Zou XP, Li ZS, Xu GM. Endoscopic ultrasonography follow-up in patients with upper gastrointestinal submucosal tumours. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1155-1158

## 摘要

**目的:** 观察上消化道黏膜下肿瘤(SMT)的动态变化。

**方法:** 对 32 例初次 EUS 诊断为 SMT 的患者进行 EUS 随访观察。

**结果:** 90.1% (29/32) 复查 EUS 与初次诊断一致, 间质瘤 95.5% (21/22) 与初次诊断相吻合。21 例 2 次 EUS 均诊断为间质瘤的患者中, 33.3% 第 2 次 EUS 显示的生长方式有变化; 47.6% 2 次 EUS 显示的形态不同; 57.1% (12/21) 2 次 EUS 大小有差异, 其中第 2 次 EUS 较首次增大者占 66.7% (8/12), 其直径在随访间期 9 mo 内平均增长 3.5 (2-7 mm)。

**结论:** EUS 诊断上消化道 SMT 的准确性很高, 定期随访复查 EUS, 对尽早确诊 SCT 并判断其良恶性, 选择合理治疗策略是必要的。

程斌, 金震东, 邹晓平, 李兆申, 许国铭. 上消化道黏膜下肿瘤的内镜超声随访研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1155-1158  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1155.asp>

## 0 引言

上消化道黏膜下肿瘤(submucosal tumor, SMT)并不少见, 常见的 SMT 包括间质瘤、脂肪瘤、息肉、异位胰腺和颗粒细胞瘤等<sup>[1-2]</sup>。内镜超声检查术(endoscopic ultrasonography, EUS)的问世极大地提高了 SMT 的诊断水平<sup>[3-7]</sup>。间质瘤(stromal cell tumor, SCT)是上消化道最常见的 SMT, 其中一部分为恶性或具有潜在恶性<sup>[8-10]</sup>。对上消化道 SCT 是行根治性手术治疗拟或内镜下摘除, 还是定期随访观察, 目前尚无定论<sup>[11-12]</sup>。为此, 我们采用 EUS 对上消化道 SMT 患者, 尤其是 SCT 进行了随访观察, 以了解其自然特性的变化。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 1998-11/2003-06, 我们对 32 例初次 EUS 诊断为 SMT 的患者进行了 EUS 随访观察, 中位数 EUS 随访间期为 9.5 (3-32 mo)。其中, 男 14 例, 女 18 例。平均年龄 54.5 (30-76 岁)。32 例 SMT 中位于食管 9 例(上段 1 例, 中段 4 例, 下段 4 例), 胃 19 例(贲门 3 例, 胃底 5 例, 胃体 7 例, 胃窦 4 例), 十二指肠 4 例(均于球部)。初次 EUS 显示最大直径达 42 mm, 最小为 4 mm。其中, 仅 1 例行手术治疗, 2 例行内镜活检。

**1.2 方法** EUS 采用 Olympus GF-UM200, GF-UM P

230, GF-UM2000 型超声内镜诊断仪或 UM-2R, UM3R 和 UM-BS20-26 微探头, 探头频率为 5, 7.5, 12 和 20 MHz 可调. 食管和十二指肠病灶采用微探头接触法加注水法或水囊法显示; 胃内病灶采用水囊法加脱气水充盈法显示<sup>[13-15]</sup>. 全部病例均行多倍放大图像比较观察并分别用两种以上频率对照显示, 取最大切面测量病灶直径, 由 3 位至少有 5 a 以上 EUS 操作经验的专家完成.

## 2 结果

**2.1 两次 EUS 诊断差异性比较** 我们共对 32 例初次 EUS 拟诊为 SMT 的患者在 3-32 mo 后进行了 EUS 随访观察, 包括间质瘤 22 例, 脂肪瘤 5 例, Brunner 腺瘤 1 例和息肉 4 例. 第 2 次复查 EUS 的结果 90.1% (29/32) 与初次诊断一致. 其中, 22 例间质瘤中 21 例(95.5%)仍诊断为间质瘤, 仅 1 例诊断为脂肪瘤; 5 例脂肪瘤中有 3 例(60%)仍诊断为脂肪瘤, 1 例诊断为间质瘤, 1 例诊断为壁外压迫(脾血管); 而 4 例息肉和 1 例 Brunner 腺瘤均和初次诊断一致(表 1). 2 次 EUS 检查任意一次诊断为间质瘤的 23 例患者中, 判断起源有差异者 3 例, 其中 1 例胃间质瘤初次判断起源于第 2 层(黏膜肌层), 第 2 次则判断为第 4 层(固有肌层); 另 2 例 2 次分别判断为第 3 层(黏膜下层)和固有肌层. 2 次判断回声不同的有 2 例, 1 例初次判定为低回声者, 第 2 次判断为高回声; 1 例相反, 初次判定为高回声者, 第 2 次却判断为低回声. 这 2 例起源和回声判断的差异直接导致了最后 EUS 诊断的颠倒. 2 例内镜活检标本中 1 例病理证实为息肉, 1 例 EUS 显示为 SCT 者病理未获阳性结果.

表 1 SMT 2 次 EUS 诊断比较( $n=32$ )

病变部位		首次	第 2 次
食管	间质瘤	8	8
	息肉	1	1
胃	间质瘤	13	13 (1*)
	脂肪瘤	4	3
	息肉	2	2
	壁外压迫	0	1
十二指肠	间质瘤	1	1
	脂肪瘤	1	1
	息肉	1	1 (1*)
	Brunner 腺瘤	1	1
合计		32	32

\* 经病理证实的例数.

**2.2 EUS 声像图特征的变化** EUS 可显示上消化道 SMT 的形态、大小和生长方式等生物学特征. 如间质瘤多呈椭圆形或梭形, 也可为圆形或亚铃形; 根据 EUS 显示的肿瘤与管壁的关系可将其生长方式分为腔内型、壁

内型、腔外型 and 腔内外型(混合型). 本组 21 例 2 次 EUS 检查均诊断为间质瘤的患者中, EUS 形态发生变化的有 10 例(47.6%); 生长方式不同的有 7 例(33.3%, 图 1, 2); 以 2 次测量最大直径相差 2 mm 以上算作大小有差异, 其大小有差异者占 12 例(57.1%), 其中第 2 次 EUS 检查较首次增大者占 66.7% (8/12), 其直径在中位数随访期为 9(3-18 mo)内平均增加 3.5(2-7 mm), 其中 1 例在 6 mo 内从 42 mm 增长到 47 mm 而行手术治疗, 病理证实为低度恶性间质瘤(图 3, 4). 在任意一次 EUS 诊断为脂肪瘤的 6 例患者中, 3 例起源判断有差异, 1 例初次判断为起源于黏膜下层, 第 2 次判断为壁外压迫; 另 2 例则 2 次分别判断为黏膜下层和固有肌层. 2 例回声判断不同者, 2 次分别相反地判断为高回声和低回声. 此外, 其 EUS 形态判断有差异者为 3 例, 生长方式判断有差异者 1 例, 而 6 例病灶大小判断则基本相同. 4 例息肉和 1 例 Brunner 腺瘤患者 2 次 EUS 检查其起源、回声、EUS 形态、生长方式和大小的判断均无差异(表 2).

表 2 SMT 2 次 EUS 声像图特征的差异分析

诊断	<i>n</i>	起源差异	回声差异	EUS 形态差异	生长方式差异	大小差异	EUS 诊断差异
间质瘤	23(21)*	3	2	11	8	12	2
脂肪瘤	6 (3)*	3	2	3	1	0	3
息肉	4	0	0	0	0	0	0
Brunner 腺瘤	1	0	0	0	0	0	0
壁外压迫	1(0)*	1	0	0	0	0	1

\* 任意一次 EUS 诊断的例数(两次 EUS 均诊断的例数)

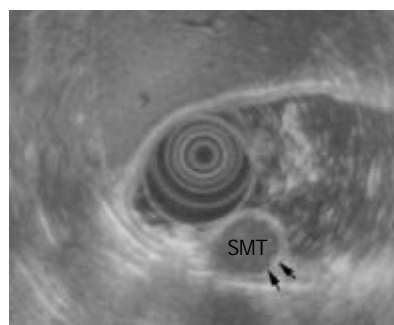


图 1 首次 EUS 显示 SCT 向腔内生长.

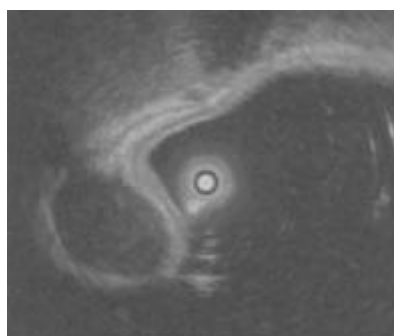


图 2 第 2 次 EUS 显示 SCT 向腔内外生长.

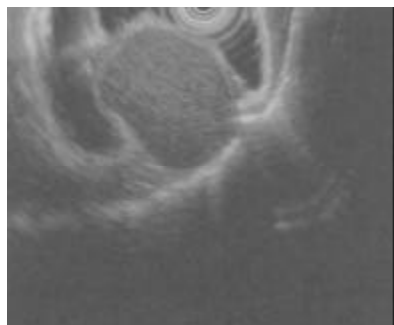


图3 首次EUS显示SCT的最大直径42 mm.

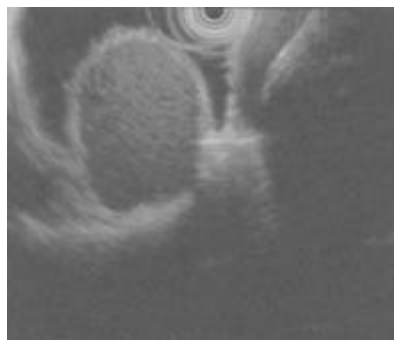


图4 6 mo后第2次EUS显示SCT的最大直径增至47 mm.

**2.3 两次EUS操作者及所用探头差异比较** 在4例2次EUS判断病变起源、回声及诊断有差异的患者中, 3例(75%) 2次EUS检查由2名不同的操作者完成. 2例(50%) 2次分别采用超声内镜和超声微探头检查. 而在28例2次EUS检查相同的患者中, 35.7%(10/28)是由2名不同的操作者完成2次检查, 28.6%(8/28) 2次分别采用超声内镜和超声微探头检查.

### 3 讨论

上消化道黏膜下肿瘤是源于黏膜下或肌层内组织的一类肿瘤, 以胃多见. 以往根据其病理特性分为良性或恶性非上皮性肿瘤(如平滑肌源性肿瘤和脂肪瘤等)、良性上皮性肿瘤以及炎症性肿瘤(如息肉)<sup>[16-18]</sup>. 近来随着免疫组织化学和电镜的研究应用, 临床和病理工作者逐渐加深了对胃肠道间叶源性肿瘤的认识, 发现间质瘤和平滑肌肿瘤的生物学特征和预后并不相同. 上消化道SCT是最常见的一种SMT, 与传统的“平滑肌瘤(leiomyomas, LM)”、“平滑肌肉瘤(leiomyosarcomas, LMS)”不同, 具有c-kit(CD117)基因突变与蛋白表达等特征性改变和一些特殊的形态学特征<sup>[19-20]</sup>. 很多研究显示, 在胃和十二指肠以SCTs为多见, 而真正的平滑肌肿瘤(LM与LMS)则相对少见<sup>[12, 21]</sup>, 在食管则仍以平滑肌瘤多见<sup>[22]</sup>. 而SCT中相当一部分为中、低度恶性或具有潜在恶性, 本组病例中1例手术标本经病理和免疫组化证实为低度恶性间质瘤, 故临床上必须与其他SMT进行鉴别.

无论是食管、胃还是十二指肠, EUS均能显示消化道管壁的层次结构及壁外情况, 根据其显示管壁层次结构的完整性、病灶的起源及大小、回声、形态

和边缘等声像学特征, EUS对SMT和壁外压迫可作出相当准确的判断. 通常间质瘤为低回声病灶, 呈椭圆形或梭形, 起源于固有肌层, 偶而起源于黏膜肌层. 病灶一般边界清楚, 内部回声均匀; 脂肪瘤则为高回声病灶, 起源于黏膜下层; 息肉为起源于黏膜层的稍高回声病灶; 黏膜下囊肿的EUS表现为黏膜下层内境界清楚、边缘光滑的无回声区, 透声性好, 其后方可见增强效应; 十二指肠Brunner腺瘤的EUS特征为起源于第1-3层的囊实性病变, 囊壁厚而不规则; 而壁外病变的共同声像图特征为消化道管壁的层次结构完整<sup>[23-24]</sup>. 本组病例第二次复查EUS, 90.1%(29/32)与初次诊断一致, 而间质瘤更是95.5%(21/22)与初次诊断相吻合. 可见, EUS通过显示相应的EUS声像特征, 可很准确、相当恒定地判断上消化道SMT. 本组病例中4例息肉和1例十二指肠Brunner腺瘤患者从病灶起源、大小、回声、形态到EUS诊断前后两次结果完全一致, 一方面说明息肉和Brunner腺瘤的EUS声像学特征稳定, EUS诊断准确性极高, 另一方面也反映这两种良性SMT病变的生物学特征相对稳定. 当然还有待于扩大样本量, 延长随访时间进一步观察. 而23例2次EUS检查任意一次诊断为间质瘤的患者中, 2例因其起源和回声判断的不同直接导致了2次EUS诊断的差异, 还有1例2次EUS检查层次判断出现差异. 而2次EUS检查任意一次EUS诊断为脂肪瘤的6例患者中, 除2例2次EUS检查在病灶起源、回声及EUS诊断上与间质瘤出现混淆外, 还有1例第2次EUS诊断为壁外压迫. 这表明, 尽管理论上间质瘤与脂肪瘤在起源层次、EUS回声特征上存在明显差异, 但实际工作中, 由于EUS扫描成像的不稳定及判断EUS声像图特征的主观性, 导致在二者相互间甚至与息肉、壁内囊肿和壁外压迫等隆起性病变鉴别时仍可能出现误判. 本组2次EUS出现判断差异的4例患者中3例(75%)由两名不同的操作者所检查. 因此, 规范、正确EUS操作手法对准确的显示和判断病变至关重要, 如调整适当的探头位置及其与病灶间的距离、水囊的大小和调节合适的灰度、对比度等均有利于正确地显示病变, 以利正确判断. 此外, 引入EUS声像图纹理分析技术可望为经验性判断找到理论依据, 避免受操作者主观因素的影响<sup>[25]</sup>. 当然, 同一种SMT病变在不同患者间因病变大小、病理类型等不同其EUS回声也可能存在差异. 对这种不符合一般规律, 一次EUS检查难以作出肯定判断, 甚至2次EUS检查结果存在差异者进行EUS随访观察, 拟或行EUS引导的细针针吸活检(EUS guided fine needle aspiration, EUS-FNA)是必要的.

EUS诊断上消化道SCT是基于其在扫描图像上显示为起自固有肌层或黏膜肌层的低回声病灶. 本组21例2次EUS均诊断为间质瘤的患者中, 47.6% 2次EUS形态不同; 33.3% 2次EUS显示的生长方式不同; 尤其引人注意的是, 57.1% 2次EUS大小有差异, 其中第2次EUS

检查较首次增大者占 66.7% (8/12), 其直径在随访问期 9 mo 内平均增长 3.5(2-7 mm). 而脂肪瘤、息肉和 Brunner 腺瘤两次 EUS 检查其形态、大小与生长方式均基本一致. 这提示上消化道 SCT 的生物学行为存在不稳定性, 其本身存在低度恶性, 或具有潜在恶性. 定期动态的 EUS 随访观察对发现具有恶性潜能的上消化道 SCT 及其变化极有帮助, 这与国内外有些通过一定的 EUS 声像学特征来判断 SCT 良恶性的报道是一致的. 如 Okai et al<sup>[26]</sup> 采用 EUS 对间质瘤的观察发现, 恶性 GIST 肿瘤的倍增时间为 9.3 mo, 良性 GIST 的倍增时间则可达 18.7 mo, 认为肿瘤分叶和较短的倍增时间是恶性 SCT 的特征. Chak et al<sup>[27]</sup> 采用逐步回归分析法观察分析了 35 例经手术切除的上消化道 SCT 的 EUS 声像学特征与其良恶性的关系, 发现肿瘤大于 4 cm、边缘不规则、内部回声不均和液性暗区的存在与其恶性状况显著相关. 如以边缘不规则、内部回声不均和液性暗区这三项声像学特征中出现两项来判断恶性 SCT, 其敏感性可达 80-90%. 台湾 Tsai et al<sup>[28]</sup> 也对 52 例经组织学证实的胃 SCT 的 EUS 声像特征与其良恶性间的关系进行了观察. 结果表明, 病灶边缘不规则和内有液性暗区对恶性胃 SCT 的诊断具有更好的敏感性与特异性. 病灶小于 5 cm 且边缘规则、内部无液性暗区存在者则多为良性病变. 国内金震东 et al<sup>[25]</sup> 也采用超声图像纹理分析技术观察研究了胃 SMT 的 EUS 声像图纹理特征, 发现纹理参数的测定也有助于提高 EUS 对 SMT 性质判断的准确性.

SCT 组织分化复杂, 形态多样, 组织学诊断仍是金标准. 很多研究业已证明, 术前 EUS-FNA 活检标本的组织细胞学及特异的免疫组化检查可更精确地诊断 SCT 并判断其良恶性<sup>[29]</sup>. 不过, 上消化道 SCT 具有不稳定的生物学特征, 即使组织病理学诊断为良性 SCT 也可能只是暂时性的. 对其严格的随访追踪仍是最好的保证. 本组资料虽然样本量不大, 但 EUS 也已初步显示了上消化道 SCT 在随访中其大小、形态和生长方式等生物学特征的变化. 因此, 定期复查 EUS 并仔细观察其大小和形态变化、边缘规则性及内部有无液性暗区存在等声像学特征, 对尽早确诊 SCT 并判断其良恶性有极其重要的价值.

#### 4 参考文献

- Kojima T, Takahashi H, Parra-Blanco A, Kohsen K, Fujita R. Diagnosis of submucosal tumor of the upper GI tract by endoscopic resection. *Gastrointest Endosc* 1999;50:516-522
- 陈桂荣, 王瑜萍, 江学良, 高同胜, 梁靓. 内镜对消化道黏膜肿瘤的诊断与治疗价值. *中国内镜杂志* 2000;6:45-48
- 苏鲁. 中国消化内镜治疗水平现状. *世界华人消化杂志* 2002;10:252-257
- 郭文. 超声内镜检查在胃肠疾病中的临床应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:643-645
- 金震东, 许国铭, 邹晓平, 牛燕陵. 经内镜微超声探头诊断胃隆起性病灶的价值. *中国超声医学杂志* 1997;13:35-37
- Sun S, Wang M, Sun S. Use of endoscopic ultrasound-guided injection in endoscopic resection of solid submucosal tumors. *Endoscopy* 2002;34:82-85
- Xu GQ, Zhang BL, Li YM, Chen LH, Ji F, Chen WX, Cai SP. Diagnostic value of endoscopic ultrasonography for gas-

- trointestinal leiomyoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2088-2091
- Emory T, Sobin LH, Lukes L, Lee DH, O' Leary TJ. Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle(stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am J Surg Pathol* 1999;23:82-87
- Ballarini C, Intra M, Ceretti AP, Prestipino F, Bianchi FM, Sparacio F, Berti E, Perrone S, Silva F. Gastrointestinal stromal tumors: a "benign" tumor with hepatic metastasis after 11 years. *Tumori* 1998;84:78-81
- Yu CC, Fletcher CD, Newman PL, Goodlad JR, Burton JC, Levison DA. A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region (AgNOR) staining, and histological grading in gastrointestinal tumors. *J Pathol* 1992;166:147-152
- Kim CJ, Day S, Yeh KA. Gastrointestinal stromal tumors: analysis of clinical and pathologic factors. *Am Surg* 2001;67: 135-137
- Trupiano JK, Stewart RE, Misick C, Appelman HD, Goldblum JR. Gastric stromal tumors: A clinicopathologic study of 77 cases with Correlation of features with nonaggressive and aggressive clinical behaviors. *Am J Surg Pathol* 2002;26:705-714
- Buscarini E, Stasi MD, Rossi S, Silva M, Giangregorio F, Adriano Z, Buscarini L. Endosonographic diagnosis of submucosal upper gastrointestinal tract lesions and large fold gastropathies by catheter ultrasound Probe. *Gastrointest Endosc* 1999;49:184-191
- 邹晓平, 吕瑛, 金震东, 许国铭. 超声内镜诊断胃底隆起性病变. *中华消化内镜杂志* 2001;18:344-345
- 金震东, 许国铭, 邹晓平, 牛燕陵, 李兆申. 微超声探头对上消化道疾病的诊断价值. *中华消化内镜杂志* 2001;18:42-43
- Xu GM, Li ZS, Zou DW. Upper gastrointestinal submucosal tumors: EUS diagnostic and endoscopic therapy. *J Med Coll PLA* 1995;10:79-82
- 许国铭, 金震东, 邹多武, 邹晓平. 超声内镜对上消化道黏膜下肿瘤的诊治. *中华超声医学杂志* 1995;4:241-244
- Gress F, Schmitt C, Savides T, Faigel DO, Catalano M, Wassef W, Roubein L, Nickl N, Ciaccia D, Bhutani M, Hoffman B, Affronti J. Interobserver agreement for EUS in the evaluation and diagnosis of submucosal masses. *Gastrointest Endosc* 2001;53:71-76
- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutation of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-580
- Frost D, Lasota J, Miettinen M. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas in the dog: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 50 cases. *Vet Pathol* 2003;40:42-54
- Miettinen M, Kopczynski J, Makhlof HR, Sarlomo-Rikala M, Gyorffy H, Burke A, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am J Surg Pathol* 2003;27:625-641
- 侯英勇, 朱雄增, 王坚, 谭云山, 孙孟红, 杜祥, 施达仁. 胃肠道间质瘤起源和分化的探讨. *中华病理学杂志* 2002;31:116-119
- 杨爱明, 陆星华, 鲁重美, 刘文平, 刘沙, 张明. 超声内镜在上消化道黏膜下肿瘤诊断中的应用. *中华消化内镜杂志* 2000;17:163-165
- 邹晓平. 上消化道超声内镜临床应用. 第 1 版. 山东: 山东科学技术出版社, 2002:30-33
- 金震东, 许国铭, 李平, 邹多武, 周康源. 胃黏膜下肿瘤超声内镜声像图的纹理分析价值. *中国医学影像技术杂志* 1998;14:483-485
- Okai T, Minamoto T, Ohtsubo K, Minato H, Kurumaya H, Oda Y, Mai M, Sawabu N. Endosonographic evaluation of c-kit positive gastrointestinal stromal tumors. *Abdom Imaging* 2003;28:301-307
- Chak A, Canto MI, Rosch T, Dittler HJ, Hawes RH, Tio TL, Lightdale CJ, Boyce HW, Scheiman J, Carpenter SL, Van Dam J, Kochman ML, Sivak MV Jr. Endosonographic differentiation of benign and malignant stromal cell tumors. *Gastrointest Endosc* 1997;45:468-473
- Tsai TL, Changchien CS, Hu TH, Hsiaw CM, Hsieh KC. Differentiation of benign and malignant gastric stromal tumors using endoscopic ultrasonography. *Chang Gung Med J* 2001; 24:167-173
- Fu K, Eloubeidi MA, Jhala NC, Jhala D, Chhieng DC, Eltoum IE. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumor by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy-a potential pitfall. *Ann Diagn Pathol* 2002; 6: 294-301



# 终末期肝病模型在评估肝硬化患者预后中的价值

熊伍军, 刘 菲, 赵中辛, 邱德凯

熊伍军, 刘菲, 同济大学附属东方医院消化内科 上海市 200120  
赵中辛, 同济大学附属东方医院普外科 上海市 200120  
邱德凯, 上海第二医科大学附属仁济医院 上海市消化疾病研究所  
上海市 200001  
熊伍军, 男, 1972-07-30 生, 湖北省崇阳县人, 汉族. 2001 年上海第二医科大学博士研究生毕业, 主治医师. 主要从事慢性肝炎的防治研究.  
项目负责人: 邱德凯, 200001, 上海市山东中路 145 号, 上海第二医科大学  
附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所. dekaiqiu@sh.163.net  
电话: 021-63260930-2001  
收稿日期: 2004-01-02 接受日期: 2004-02-01

## Application of an end-stage liver disease model in prediction of prognosis in patients with liver cirrhosis

Wu-Jun Xiong, Fei Liu, Zhong-Xin Zhao, De-Kai Qiu

Wu-Jun Xiong, Fei Liu, Department of Gastroenterology, Dongfang Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China  
Zhong-Xin Zhao, Department of General Surgery, Dongfang Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China  
De-Kai Qiu, Shanghai Institute of Digestive Disease, Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China  
Correspondence to: De-Kai Qiu, Shanghai Institute of Digestive Disease, Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China. dekaiqiu@sh.163.net  
Received: 2004-01-02 Accepted: 2004-02-01

## Abstract

**AIM:** To evaluate the short- and medium-term prognosis of liver cirrhotic patients by using the model for end-stage liver disease (MELD).

**METHODS:** The data of 199 cirrhotic patients were analyzed with a cohort method retrospectively and the follow-up period was at least one year. Both MELD score and Child-Pugh score were computed for each patient according to the original formula on admission day. Area under of receiver operating characteristic curve (ROC) was used to compare the value of MELD score with Child-Pugh's for predicting the prognosis. Kaplan-Meier survival curves were made using the cut-offs identified by means of ROC. MELD values were correlated with Child-Pugh scores.

**RESULTS:** Thirty-seven patients died in three months, MELD scores and Child-Pugh scores for non-survivors ( $23.4 \pm 9.90$ ,  $10.8 \pm 2.29$ ) were higher than those for survivors ( $14.3 \pm 4.66$ ,  $8.68 \pm 2.21$ ) significantly ( $P < 0.001$ ). Fifty-nine patients died within the first year, MELD scores and Child-Pugh scores for non-survivors ( $20.3 \pm 9.31$ ,  $10.3 \pm 2.32$ ) were higher than those for survivors ( $14.0 \pm 5.11$ ,  $8.43 \pm 2.23$ ) significantly ( $P < 0.001$ ). Area under the ROC of MELD for 3 months (0.826) was significantly ( $P < 0.05$ ) different from that of Child-Pugh (0.745), but there was no difference in area under the ROC for 1 year ( $P > 0.05$ ) between MELD value (0.758) and Child-Pugh score (0.724). Survival curves showed both MELD and Child-Pugh scores was clearly dis-

criminated between patients who survived and those who died in short term as well as in the medium term ( $P < 0.001$ ). MELD grading system showed significant correlation with Child-Pugh scores ( $r = 0.69$ ,  $P < 0.001$ ).

**CONCLUSION:** MELD grading is an objective predictive system for both short- and medium-term survival. It is more efficient than Child-Pugh score for short-term prognosis and is worth using in clinical setting.

Xiong WJ, Liu F, Zhao ZX, Qiu DK. Application of an end-stage liver disease model in prediction of prognosis in patients with liver cirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(5):1159-1162

## 摘要

**目的:** 评估终末期肝病模型(model for end stage liver disease, MELD)对肝硬化患者短期和中期生存预测的价值。

**方法:** 对 199 例肝硬化患者的生存率进行回顾性评估, 随访 1 a. 计算每例患者入院当天的 MELD 评分与 Child-Pugh 评分, 以受试者特征曲线(ROC)下的面积衡量各评分系统预测患者预后的能力, 依据 ROC 曲线截断值绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 分析 MELD 评分与 Child-Pugh 评分的相关性。

**结果:** 随访 3 mo 内有 37 例患者死亡, 死亡组 MELD 与 Child-Pugh 评分( $23.4 \pm 9.90$ ,  $10.8 \pm 2.29$ )与生存组( $14.3 \pm 4.66$ ,  $8.68 \pm 2.21$ )比较有显著差异( $P < 0.001$ ); 随访第 1 a 内有 59 例患者死亡, 死亡组 MELD 与 Child-Pugh 评分( $20.3 \pm 9.31$ ,  $10.3 \pm 2.32$ )与生存组( $14.0 \pm 5.11$ ,  $8.43 \pm 2.23$ )比较有显著差异( $P < 0.001$ ); MELD 评分与 Child-Pugh 评分对 3 mo 预后评估的 ROC 曲线面积分别为 0.826, 0.745 ( $P < 0.05$ ), 对 1 a 预后评估的 ROC 曲线下的面积分别为 0.758, 0.724 ( $P > 0.05$ ); 生存分析表明两评分系统在截断值均可有效地分辨 3mo 或 1a 内可能生存及死亡的患者 ( $P < 0.001$ ); MELD 评分与 Child-Pugh 评分呈显著相关 ( $r = 0.69$ ,  $P < 0.001$ )。

**结论:** MELD 评分及 Child-Pugh 评分均可有效地预测肝硬化患者的短期和中期预后, MELD 评分短期评估效率优于 Child-Pugh 分级, 能更准确反应病情危急程度, 值得临床应用。

熊伍军, 刘菲, 赵中辛, 邱德凯. 终末期肝病模型在评估肝硬化患者预后中的价值. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1159-1162  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1159.asp>

## 0 引言

预测肝硬化患者的生存期及评估患者的预后对确定有

效治疗方案十分重要。血白细胞计数、血清白蛋白及前白蛋白、凝血酶原时间、血清胆红素、载脂蛋白、胆固醇、血清钠、AST/ALT 比值、 $\beta 2$  微球蛋白、血清细胞因子水平等生化指标在一定程度上可反映慢性肝病患者肝功能状况<sup>[1-27]</sup>, 但均难以准确地判断预后。Child-Pugh 分级是目前广泛应用的肝功能评估系统, 基本上准确地反映了慢性肝病患者的预后, 并有助于手术危险性的评估, 但亦存在诸多缺陷。近来国外研究表明终末期肝病模型(model of end stage liver disease, MELD) 评分可有效评价各种中晚期肝脏疾病的严重程度, 并将其作为终末期肝病患者进行肝移植的器官分配标准<sup>[28-30]</sup>。目前国内尚无应用MELD评分对肝硬化患者的预后进行评估的报道, 我们应用MELD 评分回顾性分析了199例肝硬化患者的生存状况, 旨在评估MELD 评分对肝硬化患者短期和中期生存预测的价值, 并与Child-Pugh 评分系统比较, 明确二者评价肝硬化预后的优缺点。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院 1998-09/2002-09 住院肝硬化患者 199 例, 男 124 例, 女 75 例。诊断依据 1995 年全国传染病寄生虫病学术会议制定的标准。173 例为乙型肝炎, 1 例为丙型肝炎, 10 例为血吸虫肝病, 7 例为酒精性肝病, 自身免疫性肝病 4 例, 隐源性 4 例。

**1.2 方法** Child-Pugh 计分按文献(慢性肝病临床并发症现代诊治概念。上海: 上海科学技术出版社, 2001:25.) 计算。依照 Mayo 临床小组<sup>[28]</sup>, 根据血清胆红素水平、血清肌酐水平和凝血酶原时间国际标准化比(INR)计算 MELD 计分: MELD 计分 =  $3.8 \times \log_e(\text{血清胆红素}(\text{mg/dl})) + 11.2 \times \log_e(\text{INR}) + 9.6 \times \log_e(\text{血清肌酐}(\text{mg/dl})) + 6.4 \times \log_e(\text{病因: 胆汁淤积或酒精性为 0, 其他为 1})$ , 访问 <http://www.unos.org/resources>, 填入相应的参数得到评分。患者的 MELD 评分及 Child 评分指标为入院首日的检查结果。

**统计学处理** 采用 SPSS 统计软件进行, 3 mo 及 1 a 生存组与死亡组之间的临床及生化指标的比较用 t 检验, MELD 评分与 Child-Pugh 评分的相关性用 Spearman 等级相关检验, 两种评分方法区别死亡与存活能力的评价用分辨度(即 ROC 曲线下面积)来衡量, 依据 ROC 曲线的截断值绘制 Kaplan-Meier 生存曲线。以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 临床特征** 在肝硬化患者 199 例中, 随访 3 mo 内死亡 37 例, 2 例(5.4%)为 Child-Pugh A 级, 9 例(24.3%)为 Child-Pugh B 级, 26 例(70.3%)为 Child-Pugh C 级; 随访 1 a 内死亡 59 例, 其中 5 例(8.4%)为 Child-Pugh A 级, 17 例(28.8%)为 Child-Pugh B 级, 37 例(62.7%)为 Child-Pugh C 级, 死因均与肝病相关(表 1)。3 mo 生存组 MELD 及 Child-Pugh 评分分别为  $14.3 \pm 4.66$  和  $8.68 \pm 2.21$ ,

死亡组分别为  $23.4 \pm 9.90$  和  $10.8 \pm 2.29$ , 两组比较有显著差异( $P < 0.001$ ); 1 a 生存组 MELD 及 Child-Pugh 评分分别为  $14.0 \pm 5.11$  和  $8.43 \pm 2.23$ , 死亡组分别为  $20.3 \pm 9.31$  和  $10.3 \pm 2.32$ , 两组比较有显著差异( $P < 0.001$ )。

表 1 199 例肝硬化患者随访 3 mo 及 1 a 的临床特征

临床特征	随访 3 mo		随访 1 a	
	生存组	死亡组	生存组	死亡组
性别(男/女)	104/58	20/17	89/51	35/24
年龄(岁)	$61.1 \pm 13.3$	$64.3 \pm 14.5$	$60.5 \pm 13.3$	$63.6 \pm 13.6$
肝性脑病(有/无)	28/134	11/26 <sup>a</sup>	25/109	16/43 <sup>a</sup>
腹水(有/无)	105/57	32/5 <sup>a</sup>	69/65	51/8 <sup>a</sup>
胆红素( $\mu\text{mol/L}$ )	$36.6 \pm 35.2$	$93.2 \pm 98.5^b$	$36.6 \pm 36.8$	$72.0 \pm 83.4^b$
白蛋白( $\text{g/L}$ )	$27.1 \pm 6.12$	$23.1 \pm 4.73^b$	$27.8 \pm 6.04$	$23.9 \pm 5.12^b$
肌酐( $\mu\text{mol/L}$ )	$103.4 \pm 50.4$	$135.3 \pm 76.9^b$	$90.2 \pm 61.0$	$119.3 \pm 66.3^b$
INR	$1.62 \pm 0.49$	$2.58 \pm 1.65^b$	$1.61 \pm 0.49$	$2.25 \pm 1.41^b$
Child-Pugh 计分	$8.68 \pm 2.21$	$10.8 \pm 2.29^b$	$8.43 \pm 2.23$	$10.3 \pm 2.32^b$
MELD 计分	$14.3 \pm 4.66$	$23.4 \pm 9.90^b$	$14.0 \pm 5.11$	$20.3 \pm 9.31^b$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$ , vs 生存组。

**2.2 分辨度的比较** MELD 和 Child-Pugh 对肝硬化患者 3 mo 预后预测 ROC 曲线下面积分别为 0.826 (95% 可信区间 0.752-0.900), 0.745 (95% 可信区间 0.656-0.835), 两组比较有显著差异( $P < 0.05$ , 图 1); MELD 和 Child-Pugh 对肝硬化患者 1 a 预后预测 ROC 曲线下面积分别为 0.758 (95% 可信区间 0.687-0.830), 0.724 (95% 可信区间 0.646-0.802), MELD 评分分辨度在数值上要优于 Child-Pugh 计分, 但两组间比较无显著性差异( $P > 0.05$ )。

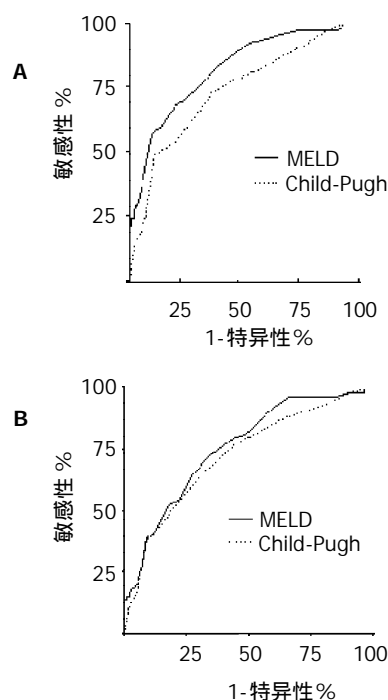


图 1 MELD 和 Child-Pugh 对肝硬化患者预后预测的 ROC 曲线。A: 3 mo; B: 1 a。

2.3 生存曲线 依据 ROC 曲线, MELD 及 Child-Pugh 计分对 3 mo 预后判断的截断值分别为 20 和 10; 对 1 a 预后判断的截断值分别为 18 和 9. 表明 MELD 与 Child-Pugh 计分评分均可有效分辨 3 mo 及 1 a 内可能生存及死亡的患者 ( $P < 0.001$ , 图 2). Spearman 等级相关分析表明 MELD 评分与 Child 评分显著相关, 相关系数为 0.69 ( $P < 0.001$ ).

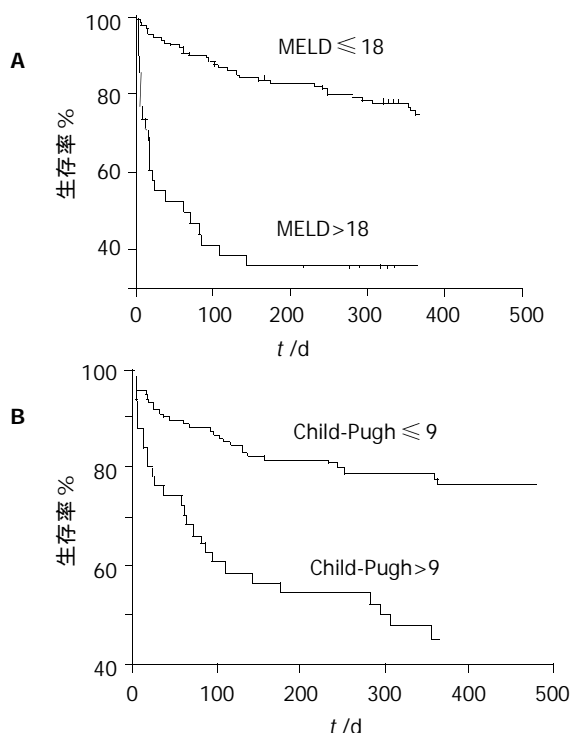


图2 Kaplan-Meier 1a 生存曲线. A: MELD; B: Child-Pugh.

### 3 讨论

Child-Pugh 计分可较准确地反映慢性肝病患者的预后, 并有助于手术危险性的估测. 近年来, 等待肝移植的患者急剧增加, 而肝移植供者十分短缺, 导致等待肝移植患者的死亡不断增加. 因此, 需要更好地评价患者疾病的严重程度和肝移植需要的紧急程度, 来决定供肝的分配. 随着经验的积累, 采用 CTP 积分的移植肝分配系统的许多缺陷逐渐暴露出来, 如他使用了诸如肝性脑病和腹水之类的主观标准, 所以学者们一直在探讨新的能客观反应肝硬化患者病情严重程度以决定肝移植器官分配优先权的预后判别模式. 2001 年 Mayo Clinic 的 Kamath et al<sup>[28]</sup>提出了一个新的评价系统, 称为终末期肝病模型(MELD), 他以血清胆红素、肌酐和 INR 等 3 个生化变量为依据, 具有简便可行、重复性好、客观性强等特点. 由于以上优点, 并且 MELD 评分系统可以较准确地反映终末期肝病患者病情严重程度, 2002 年美国器官分配网络开始应用 MELD 评分系统决定供肝的分配<sup>[30]</sup>.

Botta et al<sup>[31]</sup>报告 MELD 评分方法是预测欧洲肝硬化患者 6 mo 和 1 a 生存率的良好指标, MELD 评分方法至少不比 Child-Pugh 评分差, MELD 评分较高者肝功能较差. Giannini et al<sup>[32]</sup>研究表明 MELD 可用于病毒性

肝硬化患者预后的评估, 联合 AST/ALT 比值可提高 MELD 评分 3 mo 预后预测的准确性. Wiesner et al<sup>[33]</sup>进行了一项前瞻性研究, 采用 MELD 积分对患者超过 3 mo 以上的死亡风险进行评估, 发现 MELD 评分小于 9 的肝病患者 3 mo 死亡率为 1.9%, 而 MELD 评分大于或等于 40 的患者死亡率到达 71.3%, 采用 C 统计方法, 以 3 mo 死亡率为终点, MELD 积分的 ROC 曲线下面积为 0.83, 而 CTP 积分为 0.76, 二者存在显著性差异, 提示 MELD 积分在估计患者 3 mo 死亡危险上明显优于 CTP 积分, 认为 MELD 可为肝移植部门提供一个连贯的肝病严重程度积分评估方法, 因而可用于肝移植的供肝分配.

我们发现肝硬化患者 3 mo 及 1 a 死亡组的 MELD 评分与 Child-Pugh 评分均明显高于生存组, 与文献<sup>[28, 33]</sup>报道一致. ROC 分析表明 MELD 评分与 Child-Pugh 评分均有较大的曲线下面积, 表明其分辨度好, 能较好地区分可能死亡和可能存活的患者, 且 MELD 评分的短期分辨率显著优于 Child-Pugh 评分, 表明 MELD 评分较 Child-Pugh 评分更能反应疾病的危急程度. 生存曲线表明 MELD 评分与 Child-Pugh 评分均可有效地分辨 3 mo 及 1 a 内可能生存及死亡的患者. 对比传统的 Child-Pugh 分级而言, MELD 评分以血清胆红素等 3 个常用的生化变量为依据, 不仅考虑了肝功能状况, 而且兼顾了肾功能和不同的病因, 具有可动态观察及客观性强等特点, 避免了 Child-Pugh 分级中的主观因素, 其中期评估效率与 Child-Pugh 分级相似, 短期评估效率优于 Child-Pugh 评分, 能较好地预测终末期肝病死亡发生的危险度, 值得临床应用.

### 4 参考文献

- 1 刘建军, 智红, 吴晓英, 李楠. 肝硬化腹水并发肝肾综合征及低渗性脑病与限钠治疗关系的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:671-673
- 2 郑永平, 杨壁辉, 林奕芬, 黄东瑾, 丁少冰. 肝硬化患者载脂蛋白代谢紊乱的多因素分析及动态研究. 世界华人消化杂志 2002;10:730-731
- 3 徐学刚, 张美稀, 董惠芳, 杨协珍, 金树根, 陈建杰, 王灵台. 肝病患者血清肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平变化. 世界华人消化杂志 2003;11:856-858
- 4 张崴, 任万英, 张世兰, 王海滨. 肝硬化腹水患者血浆降钙素原与一氧化氮的变化. 世界华人消化杂志 2002;10:1353-1354
- 5 吴巍, 张曙, 吴云林, 叶静, 奚容平. 肝硬化血清胰岛素样生长因子 - I 肝功能和数字连接试验的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:1391-1394
- 6 王颖, 周卓, 王学清. 肝硬化患者血中一氧化氮及降钙素基因相关肽改变的初步研究. 世界华人消化杂志 2003;11:358-359
- 7 王学清, 张卫卫, 李岩. 肝硬化患者的血清瘦素水平. 世界华人消化杂志 2002;10:1177-1179
- 8 蒋道荣, 姚登福, 孟宪镛. 慢性肝病患者 HCV 与 HBV 重叠感染与预后. 新消化病学杂志 1996;4:454-455
- 9 顾公望, 周汉高. 肝癌病理与预后的关系. 华人消化杂志 1998;6:632-633
- 10 叶晟, 冯懿正, 刘友富, 袁政洪. P53, P21, nm23 和 PCNA 在原发性肝癌中的表达与预后的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:160
- 11 赵超, 陈少波, 周建平, 肖文, 范汉恭, 吴学威, 冯干忻, 何维雄. 影响肝硬化食管胃底静脉曲张破裂出血预后的分析. 世界华人消化杂志 2000;8:466-467
- 12 陈雪娟, 彭晓谋, 刘淑芳, 顾琳. 单项抗 - HBc 阳性患者预后的预测. 世界华人消化杂志 2001;9:718-719

- 13 龙波, 张岩. 重症肝炎 103 例临床预后及分析. 华人消化杂志 1998;6:728
- 14 敬长春, 付博, 程文峰. 肝硬变食管静脉曲张出血 42 例的预测和预后. 新消化病学杂志 1995;3:243
- 15 蒋道荣, 姚登福, 孟宪镛. 乙型肝炎患者外周血 T 细胞亚群和可溶性 IL-2R 的研究. 新消化病学杂志 1997;5:98-99
- 16 肖际东, 李瑞珍, 周平, 朱文晖. 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系. 世界华人消化杂志 2004;12:483-485
- 17 张卫卫, 王学清, 李岩. 肝硬化胰岛素抵抗及血清生长激素水平的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1180-1183
- 18 王秀艳, 游晓功, 施宝民, 穆庆岭, 吴泰璜. 脾脏体积、脾静脉血流及血细胞计数在门静脉高压症分期中的意义. 世界华人消化杂志 2003;11:861-862
- 19 邵静鸣, 俞丽芬, 张曙, 吴云林. 肝病者血清 IGF-I 和 IGF-II 的变化. 世界华人消化杂志 2003;11:1544-1546
- 20 唐宝璋, 燕奎华, 黄礼云, 庄林, 游晶, 陈红英. 慢性乙型肝炎患者血清内毒素、IL-4、IL-18 水平的变化. 世界华人消化杂志 2003;11:2041-2042
- 21 肖文斌, 刘玉兰. 肝硬化患者血清和腹水 CA125 升高. 世界华人消化杂志 2003;11:1720-1722
- 22 刘维新, 王炳元, 傅宝玉, 顾寿智. 酒精性肝病患者血清中 CA125 水平的改变及意义. 世界华人消化杂志 2003;11:1936-1938
- 23 Chen YD, Liu MY, Yu WL, Li JQ, Dai Q, Zhou ZQ, Tisminetzky SG. Mix-infections with different genotypes of HCV and with HCV plus other hepatitis viruses in patients with hepatitis C in China. *World J Gastroenterol* 2003;9:984-992
- 24 Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002;8:961-965
- 25 Zeng WJ, Liu GY, Xu J, Zhou XD, Zhang YE, Zhang N. Pathological characteristics, PCNA labeling index and DNA index in prognostic evaluation of patients with moderately differentiated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1040-1044
- 26 Hao XS, Chen KX, Wang PP, Rohan T. Changes in survival patterns in urban Chinese patients with liver cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1212-1215
- 27 Li XP, Chen Z, Meng ZQ, Huang WX, Liu LM. Concurrent hyperglycemia does not influence the long-term prognosis of unresectable hepatocellular carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:1848-1852
- 28 Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464-470
- 29 Forman LM, Lucey MR. Predicting the prognosis of chronic liver disease: an evolution from child to MELD. *Hepatology* 2001;33:473-475
- 30 Everson GT. MELD: the answer or just more questions? *Gastroenterology* 2003;124:251-254
- 31 Botta F, Giannini E, Romagnoli P, Fasoli A, Malfatti F, Chiarbonello B, Testa E, Risso D, Colla G, Testa R. MELD scoring system is useful for predicting prognosis in patients with liver cirrhosis and is correlated with residual liver function: a European study. *Gut* 2003;52:134-139
- 32 Giannini E, Botta F, Testa E, Romagnoli P, Polegato S, Malfatti F, Fumagalli A, Chiarbonello B, Risso D, Testa R. The 1-year and 3-month prognostic utility of the AST/ALT ratio and model for end-stage liver disease score in patients with viral liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2855-2860
- 33 Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R. United Network for organ sharing liver disease severity score committee. *Gastroenterology* 2003; 124:91-96

## World Journal of Gastroenterology 排版印刷

《World Journal of Gastroenterology, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献, 均制订了统一的字体及格式要求, 每篇文章结束后不再续接其他文章, 适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求. WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件, 可自动生成 ASP、XML、PDF, 为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用. WJG 出片为进口片, 黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷, 采用三面刀剪切. 北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务, 一条龙服务, 包括出片、打样、装订前书样, 全部送杂志社审核, 达到标准后才能印刷和装订. WJG 出版后, 赠送给国内外专家, 他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美.

# 胃底黏膜下肿瘤的腹腔镜手术治疗

柯重伟, 郑成竹, 邹晓平, 印 慨, 李际辉, 胡明根, 陈丹磊

柯重伟, 郑成竹, 印慨, 李际辉, 胡明根, 陈丹磊, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院微创外科 上海市 200433  
邹晓平, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433  
柯重伟, 男, 1965-06-17 生, 浙江省宁波市人, 汉族. 2000 年第二军医大学博士, 副教授, 副主任医师. 主要从事普通外科和微创外科的临床研究.  
项目负责人: 柯重伟, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院微创外科. weiz@miscenter.cn  
电话: 021-25072014 传真: 021-25074527  
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-21

## Laparoscopic resection of submucosal tumor in gastric fundus

Zhong-Wei Ke, Cheng-Zhu Zheng, Xiao-Ping Zou, Kai Yin, Ji-Hui Li, Ming-Gen Hu, Dan-Lei Chen

Zhong-Wei Ke, Cheng-Zhu Zheng, Kai Yin, Ji-Hui Li, Ming-Gen Hu, Dan-Lei Chen, Department of Minimally Invasive Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Xiao-Ping Zou, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Correspondence to: Dr. Zhong-Wei Ke, Department of Minimally Invasive Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, 174 Changhai Road, Shanghai 200433, China. weiz@miscenter.cn  
Received: 2004-02-03 Accepted: 2004-02-21

## Abstract

**AIM:** Laparoscopic resection of the submucosal tumors on the gastric fundus, especially when they are on the posterior wall and next to the esophagocardiac junction (ECJ), is both difficult and time-consuming. Furthermore, it can lead to the inadvertent esophagus stenosis and injury to spleen. In order to solve these problems, wedge gastrectomy was adopted for the submucosal tumor on the anterior wall and the greater curvature of the gastric fundus, and laparoscopically extraluminal resection of the gastric fundus was designed for the submucosal tumor on the posterior wall of the gastric fundus and next to ECJ.

**METHODS:** Retrospective analysis was made in 32 cases, including 23 male and 9 female with an average age of 55 (range 36-78). Laparoscopic wedge gastrectomy had been carried out in 11 cases of submucosal tumor on the anterior wall of the gastric fundus and 6 on the greater gastric curvature. And laparoscopically extraluminal resection of the gastric fundus had been carried out on 15 cases on the posterior wall.

**RESULTS:** The mean operative time and intra-operative bleeding and postoperative hospital stay were (56.3±19.4 min), (53.1±30.1 mL), (4.7±0.5 d) respectively. Within 36 hours post-operation, 78.1% of all the patients resumed their gastrointestinal function and began to eat something and ambulated. The pathological diagnosis included mesenchymoma of low malignancy (3 cases), leiomyoma (21 cases), mesenchymoma (7 cases), and neurofibroma (1

case). All the procedures were completed successfully with no apparent tumor focus left and no complication or conversion to open surgery happened.

**CONCLUSION:** The adopted and newly designed procedure can avoid the abdominal cavity contamination, the injury to spleen and the esophageal stenosis. And there is no limit to the range of gastric resection. Therefore, the procedure is both safe and effective.

Ke ZW, Zheng CZ, Zou XP, Yin K, Li JH, Hu MG, Chen DL. Laparoscopic resection of submucosal tumor in gastric fundus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1163-1167

## 摘要

**目的:** 腹腔镜切除胃底黏膜下肿瘤, 尤其当其位于胃底后壁、靠近食管贲门连接处(the esophagocardiac junction, ECJ)时, 既困难又费时, 稍不慎还会引起食管狭窄以及脾脏损伤. 为此, 我们采用腹腔镜局部胃楔形切除术来治疗胃底前壁和大弯侧的黏膜下肿瘤; 并设计了腹腔镜胃腔外胃底切除术(laparoscopically extraluminal resection of the gastric fundus)来治疗胃底后壁靠近 ECJ 的黏膜下肿瘤.

**方法:** 总结分析 32 例患者的临床资料. 男性 23 例, 女性 9 例; 平均年龄 55(36-78 岁). 其中, 胃底前壁黏膜下肿瘤 11 例, 胃底大弯侧黏膜下肿瘤 6 例, 分别行腹腔镜局部胃楔形切除术; 胃底后壁黏膜下肿瘤 15 例, 行腹腔镜胃腔外胃底切除术.

**结果:** 腹腔镜手术平均用时(56.3±19.4 min); 术中平均出血(53.1±30.1 mL); 术后平均住院(4.7±0.5 d). 78.1% 患者于术后 36 h 内恢复胃肠功能, 并开始进食和下床活动. 病理类型包括: 低度恶性间质瘤 3 例、平滑肌瘤 21 例、间质瘤 7 例以及神经纤维瘤 1 例. 本组手术均获成功, 无病灶遗漏, 也无并发症和手术中转.

**结论:** 我们采用的方法, 包括所设计的腹腔镜胃腔外胃底切除术完全可以做到避免腹腔污染、脾脏损伤以及食管狭窄的发生; 同时, 胃切除范围也不受限. 因此, 手术安全、有效.

柯重伟, 郑成竹, 邹晓平, 印慨, 李际辉, 胡明根, 陈丹磊. 胃底黏膜下肿瘤的腹腔镜手术治疗. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1163-1167

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1163.asp>

## 0 引言

虽然胃恶性肿瘤治疗仍然被认为是腹腔镜禁忌证之



一,然而,用腹腔镜代替剖腹手术来切除胃良性肿瘤已逐渐被认为是一种可行的术式<sup>[1-6]</sup>。当肿瘤位于胃底,尤其是位于后壁、靠近食管贲门连接处(the esophagocardiac junction, ECJ)时,腹腔镜手术切除既困难又费时,稍不慎还会引起食管狭窄以及脾脏损伤。此外,虽然大多数胃黏膜下肿瘤是平滑肌瘤,但仍需广泛切除,因为仅凭活检难以与平滑肌肉瘤相鉴别。因此,在行腹腔镜胃黏膜下肿瘤切除时,必须切除足够范围的周围正常组织<sup>[7-18]</sup>。为此,我们采用胃楔形切除术来治疗胃底前壁和大弯侧的黏膜下肿瘤;并设计了腹腔镜胃腔外胃底切除术(laparoscopically extraluminal resection of the gastric fundus)来治疗胃底后壁近 ECJ 的黏膜下肿瘤,收效良好。

## 1 材料和方法

1.1 材料 2000-09/2003-09采用腹腔镜治疗胃底黏膜下肿瘤 32 例。男 23 例,女 9 例;平均年龄 55(36-78 岁)。其中,胃底前壁黏膜下肿瘤 11 例;胃底大弯侧黏膜下肿瘤 6 例;胃底后壁黏膜下肿瘤 15 例。23 例(71.9%)患者以上消化道出血就治;8 例(25.0%)以腹痛就治;1 例(3.1%)体检发现。术前检查包括胃镜、超声胃镜和上消化道钡餐。所有检查均提示胃底黏膜下肿瘤,边缘整齐;黏膜下注射生理盐水不能将肿瘤完全提起,故不适合行胃镜局部肿瘤切除术;另外,胃镜发现 25 例肿瘤表面中央有溃疡存在;肿瘤直径 2.5-6.5(平均 4.1 cm)。图 1 显示的是 1 例胃底后壁近 ECJ 的黏膜下肿瘤的术前检查结果。

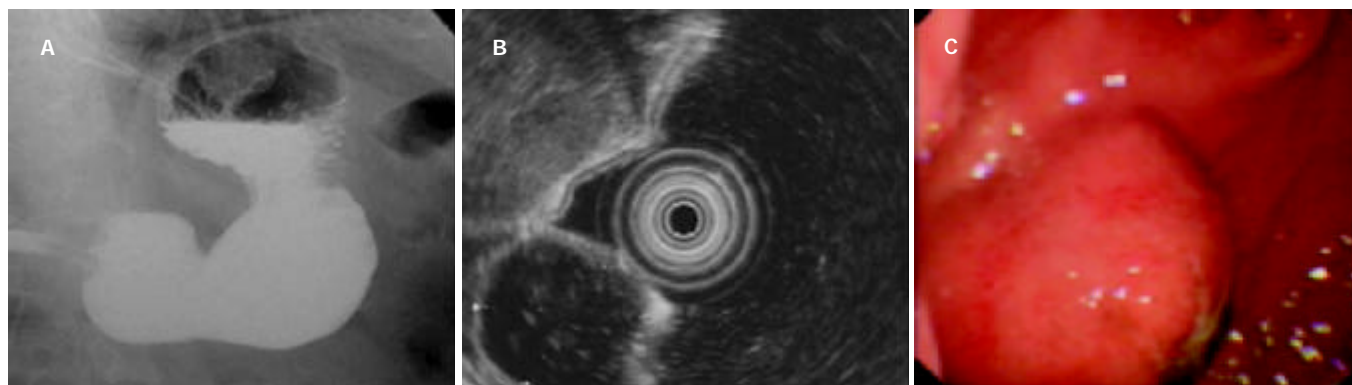


图 1 胃底后壁近 ECJ 的黏膜下肿瘤。A: 钡餐显示病灶临近 ECJ, 边缘整齐; B: 超声胃镜显示病灶边缘整齐, 向腔内突出; C: 胃镜显示胃底后壁半球状隆起, 中央有溃疡形成。

## 1.2 方法

1.2.1 腹腔镜胃底前壁楔形切除术 采用气管内插管全麻。患者取仰卧位、两腿分别外展 30°。术者站在患者两腿之间,持镜者和手术助手分别站在患者右侧和左侧。5 及 10-12 mm 穿刺套管分别放在脐部;左、右锁骨中线 and 剑突下(图 2)。其中, A 孔为观察孔; B、C 为操作孔,内视镜切割吻合器(Endo GIA)通过 C 孔置入腹腔; D 孔放置三抓钳,拨肝脏、显露胃底肿瘤。腔镜下病灶定位的方法有 3 种:肉眼检查、器械探查和术中胃镜检查<sup>[19]</sup>。胃前壁肿瘤的定位相对容易,本组通过肉眼观察和器械探查均可完成定位。一旦发现肿瘤,通常“8”字缝合瘤体中央,将肿瘤牵起以利操作。然后用 Endo GIA 行胃底前壁楔形切除术(图 3)。

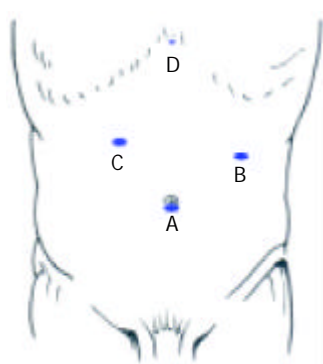


图 2 胃底黏膜下肿瘤腹腔镜手术治疗的穿刺孔位置。

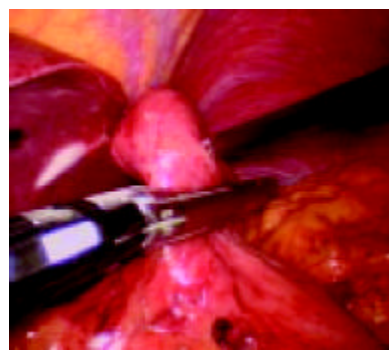


图 3 用 Endo GIA 行胃底前壁楔形切除术。

1.2.2 腹腔镜胃底大弯侧楔形切除术 本组有 1 例胃底大弯侧黏膜下肿瘤通过术中胃镜辅助、余 5 例通过肉眼观察和器械探查完成定位。分离脾胃韧带:用超声刀凝固、切割肿瘤所在部位及其附近的胃短动、静脉,目的是将肿瘤及其周围正常胃壁游离,以利肿瘤牵引和 Endo GIA 放置。肿瘤游离后,用丝线“8”字缝合瘤体中央,将肿瘤向前壁方向牵引。然后用 Endo GIA 行局部胃楔形切除术。

1.2.3 腹腔镜胃腔外胃底切除术 行腹腔镜胃腔外胃底切除术治疗胃底后壁肿瘤时,Endo GIA 通常从 B 孔置入腹腔。后壁肿瘤的定位相对困难,通常需要胃镜辅助和/或器械探查。本组有 4 例(26.7%)需术中胃镜辅助完成定位。在行腹腔镜胃底后壁黏膜下肿瘤切除时,肿瘤

定位的内容除确定肿瘤位置外, 还需进一步明确其与 ECJ 之间的距离. 从脾脏中下极开始, 在网膜血管弓外分离胃大弯侧网膜. 进入网膜囊后, 用三抓钳将胃后壁向右侧翻转. 继续向上分离, 用超声刀凝固、切割胃短动、静脉, 直至脾上极, 将胃底和脾上极完全分开(图 4). 游离贲门左侧, 显露 ECJ(图 5). 用 Endo GIA 行胃底切除术: 图 6A 显示的是 Endo GIA 切割线, 视肿瘤大小通常需用 Endo GIA 2-3 次. 靠近贲门左侧放置 Endo GIA 时, 必须仔细检查、确定 ECJ 不在其中, 以免引起术后食管狭窄(图 6B). 肿瘤切除后, 标本置入标本袋后从 B 孔取出, 常规送快速病理检查. 同时, 术后常规冲洗术野, 于左膈下放置腹腔引流管.

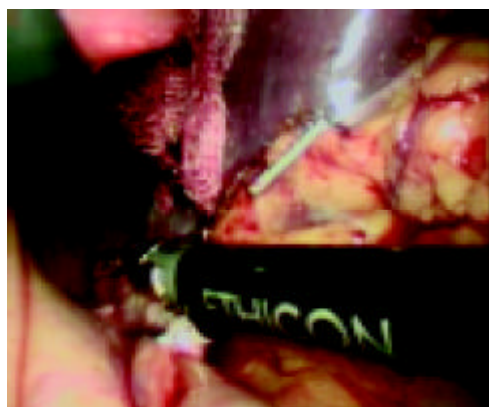


图 4 用超声刀将胃底和脾上极完全分离.

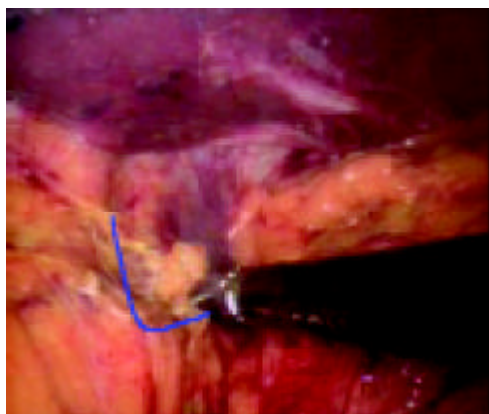


图 5 游离贲门左侧, 显露 ECJ.

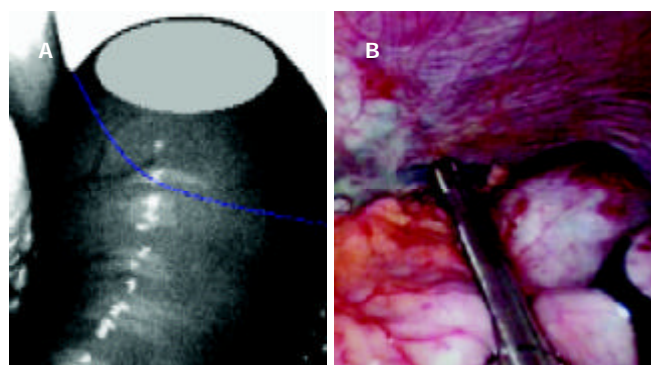


图 6 用 Endo GIA 行胃底切除术. A: 蓝线表示 Endo GIA 切割线; B: Endo GIA 放置后, 检查、确定 ECJ 不在其中.

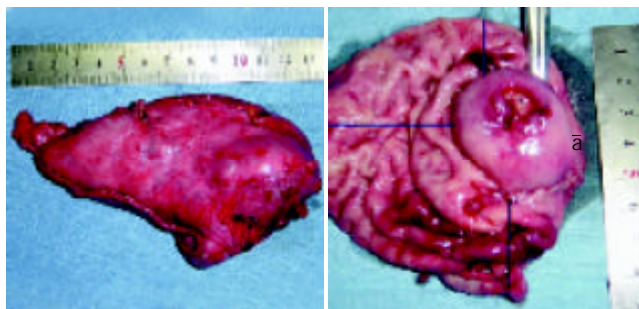


图 7 胃底后壁黏膜下肿瘤的手术切除标本. a 线表示肿瘤距 ECJ 的距离.

## 2 结果

本组腹腔镜手术用时、术中出血、术后住院天数以及术后 1 d 腹腔引流量见表 1. 78.1% 患者于术后 36 h 内恢复胃肠功能, 并开始进食和下床活动; 最慢 1 例术后 60 h 恢复. 胃底前壁和胃底大弯侧黏膜下肿瘤的手术切缘距离肿瘤的边距均大于 2.5 cm. 图 7 显示的是胃底后壁黏膜下肿瘤手术切除的标本, 切缘距肿瘤的距离: 与 ECJ 距离 1-1.5(平均  $1.1 \pm 0.3$  cm); 与另三面距离 2.5-6(平均  $3.9 \pm 1.2$  cm). 本组所有患者术中冰冻切片检查均提示为良性病变. 术后石蜡切片检查发现 3 例为低度恶性间质瘤: 1 例位于胃底前壁; 2 例位于胃底后壁; 切缘与 ECJ 距离分别为 1.3 cm 和 1.5 cm, 另三面距离均大于 3 cm; 这 3 例患者均未再行扩大切除手术; 已分别随访 18-28 mo. 另 29 中平滑肌瘤 21 例, 间质瘤 7 例, 神经纤维瘤 1 例. 32 例腹腔镜手术均获成功, 无病灶遗漏, 也无并发症和手术中转. 所有病例随访至今 3-39 mo, 无异常发现.

表 1 胃底黏膜下肿瘤腹腔镜手术情况(mean $\pm$ SD)

肿瘤位置	n	手术时间(min)	术中出血(mL)	术后 1 d 引流量(mL)	术后住院(d)
胃底前壁	11	42.7 $\pm$ 8.2	14.1 $\pm$ 5.4	16.8 $\pm$ 7.0	4.7 $\pm$ 0.8
胃底大弯侧	6	55.0 $\pm$ 7.1	50.8 $\pm$ 14.3	32.5 $\pm$ 10.8	4.8 $\pm$ 0.8
胃底后壁	15	66.2 $\pm$ 10.4	89.4 $\pm$ 21.7	60.7 $\pm$ 14.3	5.3 $\pm$ 1.1
合计	32	56.3 $\pm$ 19.4	53.1 $\pm$ 30.1	40.9 $\pm$ 15.3	4.7 $\pm$ 0.5

## 3 讨论

由于胃良性肿瘤在临床上不能完全排除恶性的可能, 即使为良性以后也可能恶变, 而且可以出现梗阻和出血等严重并发症, 所以, 应积极地予以手术切除治疗. 就胃壁切除深度而言, 近年来也更倾向行全层胃壁切除术<sup>[20-25]</sup>. 胃镜可以通过黏膜下注射生理盐水的方法切除部分胃肿瘤, 但主要用于黏膜层肿瘤, 而不适用于黏膜下肿瘤, 更无法做到切除全层胃壁. 相对于胃窦和胃体部而言, 胃底部的腹腔镜手术面临更多挑战. 目前, 国内已有不少医院能在腹腔镜下或腹腔镜辅助下完成胃切除术、结直肠切除术以及局部小肠切除术等. 但是, 客观上讲, 有些仅是开头或是尝试性质的. 尽管前景良好, 但仍需不断改进, 包括术式和器械的改进等. 同时, 也需要进一步分析统计和判断手术效果<sup>[26-29]</sup>.

胃底、贲门部的黏膜下肿瘤可以采用腹腔镜近端胃切除术治疗,但术后易并发反流性食管炎。而且,对大多数良性胃黏膜下肿瘤来说,手术损伤和切除范围也过大<sup>[30-34]</sup>。腹腔镜胃楔形切除术是治疗胃底黏膜下肿瘤最常用的术式<sup>[34-37]</sup>。当肿瘤位于胃底前壁时,通过应用 Endo GIA 很容易完成<sup>[20]</sup>。当肿瘤位于胃底大弯侧时,我们通过以下操作即可将侧壁肿瘤“改为”前壁肿瘤,然后按前壁肿瘤的方法予以切除:(1)分离肿瘤及其周围的血管和韧带;(2)用丝线缝合瘤体中央;(3)将肿瘤向前壁方向牵引。总之,位于前壁和大弯侧的胃底黏膜下肿瘤的腹腔镜手术切除并不非常困难。但是,位于胃底后壁的黏膜下肿瘤,尤其当肿瘤临近 ECJ 时,楔形切除并不容易完成:手术一方面要注意保护 ECJ,以免引起术后食管狭窄;另一方面又要注意避免脾脏,尤其是脾上极的损伤。

在早期,我们曾采用胃前壁开窗的方法来楔形切除胃底后壁的黏膜下肿瘤<sup>[38]</sup>。虽然方法简便,但术中胃液污染腹腔的情况严重。另外,由于不能很好显露 ECJ,因此该方法也不适用于切除近 ECJ 的胃底后壁肿瘤。Sekimoto et al<sup>[20]</sup>采用胃腔内全层胃后壁病灶切除 (intraluminal resection the full thickness of the posterior gastric wall lesion) 的方法来治疗胃底后壁近 ECJ 的黏膜下肿瘤,即:将带气囊 trocar 直接穿刺进入胃腔,并在胃腔内充气,然后在直视下用 Endo GIA 完成后壁肿瘤局部楔形切除。Sekimoto et al 认为:手术损伤以及腹腔污染均较胃前壁开窗法小;而且,由于 ECJ 一直处于术者的视野之中,因此损伤引起术后食管狭窄的可能性极小。但是,我们认为由于胃短血管未离断,尤其是脾上极与胃底未完全分离,上述二种方法都存在切除范围受限、易损伤脾脏的缺陷。胃腔内过分充气还有引起脾包膜撕裂之虑<sup>[15-18,20]</sup>。为此,我们设计了新的腹腔镜手术切除胃底后壁黏膜下肿瘤的方法。通过这些措施:(1)游离网膜,进入网膜囊,分离脾胃韧带,将胃底和脾上极完全分开;(2)游离贲门左侧,显露 ECJ;(3)用 Endo GIA 切割胃底等,我们设计的胃腔外胃底切除术完全可以做到避免腹腔污染、脾脏损伤以及食管狭窄的发生;同时,胃切除范围也不受限。虽然,操作步骤增加;2例低度恶性间质瘤的切除范围是否足够,仍需时间和病例数的检验。但是,只要通过适当的腹腔镜手术操作技能的训练,手术并不费事、费时,本组后壁肿瘤手术平均用时仅(66.2±10.4 min)。而且,由于:(1)胃底切割时,ECJ 和脾上极均一直处于术者视野之中;(2)允许更广泛切除。因此,手术也更安全、有效。

#### 4 参考文献

- Shimizu S, Noshiro H, Nagai E, Uchiyama A, Tanaka M. Laparoscopic gastric surgery in a Japanese institution: analysis of the initial 100 procedures. *J Am Coll Surg* 2003;197:372-378
- Cuschieri A. Laparoscopic gastric resection. *Surg Clin North Am* 2000;80:1269-1284
- Giger U, Schafer M, Krahenbuhl L. Technique and value of

- staging laparoscopy. *Dig Surg* 2002;19:473-478
- Croce E, Olmi S, Magnone S, Russo R. Laparoscopic surgery of the stomach: State of the art. *Chir Ital* 2003;55:811-820
- Ludwig K, Weiner R, Bernhardt J. Minimally invasive resections of gastric tumors. *Chirurg* 2003;74:632-637
- Saikawa Y, Kumai K, Otani Y, Yoshida M, Furukawa T, Kitagawa Y, Kubota T, Kitajuma M. Present status of laparoscopic surgery for gastrointestinal neoplasms. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* 2003;92:53-57
- 杨文, 吴云林, 栾晔, 盛红, 何建华, 熊锋宝, 王煜, 程时丹. 早期胃癌内镜下病灶范围估测与手术病理的比较. *世界华人消化杂志* 2003;11:51-53
- Avital S, Brasesco O, Szomstein S, Liberman M, Rosenthal R. Technical considerations in laparoscopic resection of gastric neoplasms. *Surg Endosc* 2003;17:763-765
- Yuan Y, Lin HZ, Zhang YC, Wang XJ, Wu YQ, Gao H, Wang L, Liu YH, Lu F, Lou SQ. Study on the pathogenetic effect of salted pork from a high risk area of stomach cancer in China. *China Nati J New Gastroenterol* 1997;3:93-94
- Qin D, Wang G, Wang Z. Double blind randomized control trial of occult blood bead test (OBB) and gastroscopy-pathology screening for upper digestive tract cancer. *World J Gastroenterol* 1998;4(Suppl 2):65
- Cheng YS, Li MH, Chen WX, Zhuang QX, Chen NW, Shang KZ. Follow-up evaluation for benign stricture of upper gastrointestinal tract with stent insertion. *World J Gastroenterol* 2003;9:2609-2611
- Hsieh CC, Shih CS, Wu YC, Huang BS, Hsu WH, Huang MH, Wang LS. Leiomyosarcoma of the gastric cardia and fundus. *Zhonghua Yixue Zazhi (Taipei)* 1999;62:418-424
- Alecu L, Costan I, Vitalariu A, Obrocea F, Pacuraru E, Gulinescu L. Gastric stromal tumor treated by laparoscopic surgery. *Chirurgia (Bucur)* 2002;97:297-304
- Pross M, Wolff S, Nestler G, Schubert D, Kahl S, Lippert H. A technique for endo-organ resection of gastric wall tumors using one intragastric trocar. *Endoscopy* 2003;35:613-615
- Motson RW, Fisher PW. A new technique for laparoscopic resection of a submucosal tumor on the posterior wall of the gastric fundus. *Surg Endosc* 2000;14:205-206
- Pross M, Wolff S, Schubert D, Meyer L, Lippert H. Combined minimal-invasive procedures for resection of benign gastric wall tumors. *Zentralbl Chir* 2003;128:191-194
- Bouillot JL, Bresler L, Fagniez PL, Samama G, Champault G, Parent Y. Laparoscopic resection of benign submucosal stomach tumors: A report of 65 cases. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27(3 Pt 1):272-276
- Moesta KT, Hunerbein M, Schlag PM. Treatment procedures for adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Chirurg* 2003;74:381-392
- 柯重伟, 郑成竹, 仇明, 李际辉, 印慨, 华积德. 腹腔镜小肠切除术的临床应用. *中华胃肠外科杂志* 2002;5:92-94
- Sekimoto M, Tamura S, Hasuike Y, Yano M, Murata A, Inoue M, Shiozaki H, Monden M. A new technique for laparoscopic resection of a submucosal tumor on the posterior wall of the gastric fundus. *Surg Endosc* 1999;13:71-74
- 吴阶平, 裘法祖. 黄家驷外科学. 中册. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 1999:1031-1052
- Tangoku A, Yamamoto K, Hirazawa K, Takao T, Mori N, Tada K, Oka M. Laparoscopic resection of large leiomyomas of the gastric fundus. *Surg Endosc* 1999;13:1050-1052
- Cheng H, Wang J, Zhang CS, Yan PS, Zhang XH, Hu PZ, Ma FC. Clinicopathologic study of mucosal-associated lymphoid tissue lymphoma in gastroscopic biopsy. *World J Gastroenterol* 2003;9:1270-1272
- Chen F, Ni YC, Zheng KE, Ju SH, Sun J, Ou XL, Xu MH, Zhang H, Marchal G. Spiral CT in gastric carcinoma: Comparison with barium study, fiberoptic gastroscopy and histopathology. *World J Gastroenterol* 2003;9:1404-1408
- Oliveira CP, Kassab P, Lopasso FP, Souza HP, Janiszewski M, Laurindo FR, Iriya K, Laudanna AA. Protective effect of



- ascorbic acid in experimental gastric cancer: reduction of oxidative stress. *World J Gastroenterol* 2003;9:446-448
- 26 Rohatgi A, Singh KK. Laparoendoscopic management of gastrointestinal stromal tumors. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2003;13:37-40
- 27 Tonouchi H, Mohri Y, Tanaka K, Konishi N, Ohmori Y, Kobayashi M, Watanabe Y, Matsumura K, Takeda K, Kusunoki M. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy during laparoscopic gastrectomy for early cancer. *Dig Surg* 2003;20:421-427
- 28 Kobayashi T, Kazui T, Kimura T. Surgical local resection for early gastric cancer. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2003;13:299-303
- 29 Nguyen NT, Jim J, Nguyen A, Lee J, Chang K. Laproscopic resection of gastric stromal tumor: a tailored approach. *Am Surg* 2003;69:946-950
- 30 Uyama I, Ogiwara H, Takahara T, Kikuchi K, Iida S. Laparoscopic and minilaparotomy proximal gastrectomy and esophagogastrostomy: technique and case report. *Surg Laparosc Endosc* 1995;5:487-491
- 31 Zhang G, Miao L, Zhang H, Lu J. Clinical study on reservation of part of stomach for patients with cardiac cancer of the gastric stump. *Chin Med J (Engl)* 1998;111:630-633
- 32 Usui S, Inoue H, Yoshida T, Fukami N, Kudo SE, Iwai T. Hand-assisted laparoscopic total gastrectomy for early gastric cancer. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2003;13:304-307
- 33 Dostalík J, Martinek L, Satinsky I, Richter V, Stigler J. Laparoscopic total gastrectomy-initial experience. *Rozhl Chir* 2003;82:353-356
- 34 Walsh RM, Ponsky J, Brody F, Matthews BD, Heniford BT. Combined endoscopic/laparoscopic intragastric resection of gastric stromal tumors. *J Gastrointest Surg* 2003;7:386-392
- 35 Jess P, Jensen KH. Laparoscopic wedge resection of stromal gastric tumor guided by laparoscopic ultrasonographic scanning. *Ugeskr Laeger* 2003;165:1038-1039
- 36 Ozmen MM, Zulfikaroglu B, Ozalp N, Ziraman I, Hengirmen S, Sahin B. Staging laparoscopy for gastric cancer. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2003;13:241-244
- 37 Onate-Ocana LF, Ochoa-Carrillo FJ. The role of minimal invasion surgery in the management of patients with gastric carcinoma. *Cir Cir* 2003;71:324-328
- 38 柯重伟, 郑成竹, 仇明, 沈炎明, 华积德. 腹腔镜胃手术的临床应用. *中华外科杂志* 2000;38:680-682

## World Journal of Gastroenterology 点击和下载次数

《World Journal of Gastroenterology, WJG》从2003年第4-9期电子版, 实现了动态网页制做, 记录每篇论文的点击和下载次数. 4-9期共发表论文322篇, 其中265篇有点击和下载次数的记录, 占82.29%, 无点击和下载次数记录的为57篇(17.70%). 2003-04-15/2003-10-13, 265篇论文的点击次数为35745, 平均每篇论文点击次数为134.89, 最高点击次数为1918, 最低点击次数为11. 其中每篇论文点击次数100次以上为131篇(49.43%); 30-99次为123篇(46.41%); 11-29次为11篇(4.15%). 最高下载次数1087, 最低下载次数10. 例如, 2003年第8期刊出的第四军医大学唐都医院感染科王全楚等撰写的“RNA interference: Anti-viral weapon and beyond. *World J Gastroenterol* 2003;9(8):1657-1661”一文的点击次数为1918, 下载次数为1087.

# 食管癌早期诊断的分子生物学标志物

黄 潇, 戴益民

黄潇, 中国人民解放军第二军医大学长征医院临床医学院 上海市 200001  
戴益民, 中国人民解放军第二军医大学长征医院病理科 上海市 200433  
项目负责人: 黄潇, 200001, 上海市黄浦区汉口路515号汇金大厦1906室, 中国人民解放军第二军医大学长征医院临床医学院. sophia\_xiaoer@hotmail.com  
电话: 021-25070766  
收稿日期: 2003-10-14 接受日期: 2004-01-15

## 摘要

肿瘤相关基因产物及肿瘤标志物的检测用于食管癌的早期诊断, 已显示出可喜前景. 核抗原 Ki67、P53、P21、p27、c-myc 蛋白和 Bcl-2 蛋白过量表达, cyclin D1 基因蛋白表达及 DNA 倍体的定量检测, 抑癌基因 FHIT 缺失、P16 基因点突变, 血清癌胚抗原(CEA)、鳞状上皮细胞癌相关抗原(SCC)、P53 抗体的联合检测, 微卫星不稳定性与 D3S4513、D5S2501 等标志物, iNOS, Cox-2 蛋白, TSGF, 端粒酶, Egr-1 mRNA 和蛋白, 脂肪酸合酶, TGFβ1 和 TGFβR II, 维甲酸受体 RAR β 等在食管癌的早期诊断中均不同程度的显示出自身的价值, 对食管癌早期诊断的研究有重要作用.

黄潇, 戴益民. 食管癌早期诊断的分子生物学标志物. 世界华人消化杂志 2004; 12(5):1168-1171  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1168.asp>

## 0 引言

我国食管癌发病率很高, 仅次于胃癌<sup>[1]</sup>. 在我国农村, 食管癌是发病率最高的肿瘤<sup>[2]</sup>. 现已证实食管癌早期发现手术治疗切除率可达100%, 5a生存率可达90%以上. 但目前就诊患者多数已达中、晚期, 远期疗效尚欠满意<sup>[1]</sup>. 因此, 治疗食管癌的关键在于早期发现、早期诊断、早期治疗. 早期诊断主要依靠健康普查. 目前食管癌的普查方法主要是食管拉网细胞学检查和复方碘溶液内镜下黏膜染色检查<sup>[3]</sup>. 其灵敏度、特异性都不理想, 因此人们十分关心肿瘤标志物的研究和开发, 寻找灵敏度高、特异性强、能早期发现的肿瘤标志物. 近年来国内外学者对有关食管癌早期诊断的分子生物学标志物作了大量有益的研究. 有些已应用于临床实践, 现将食管癌早期诊断的分子生物学标志物研究进展综述如下.

### 1 核抗原 Ki67 过表达与早期食管癌

Ki67 是在细胞 G<sub>1</sub> 中晚期、S 期、M 期、G<sub>2</sub> 期出现的核抗原, 其表达程度高低反映了细胞增生状态. 研究表明, Ki67 异常表达与食管癌癌变过程显著相关<sup>[4-7]</sup>. 靳玉兰 et al<sup>[4]</sup> 用免疫组化染色方法在正常组织中未发现 Ki67

的表达; 在轻度不典型增生的细胞中 Ki67 的阳性表达率为 40.5%, 多分布在内基底层和外基底层; 在原位癌细胞中其阳性表达率已上升到 90%, 且阳性表达 Ki67 的细胞逐渐增多并延伸到上皮的中层及浅层. Ki67 在正常黏膜中的表达与其在不典型增生及原位癌组织中的表达有显著性差异( $P < 0.001$ ). 等级相关分析结果显示, Ki67 表达程度与组织学分级之间呈正相关. 提示细胞增生活性的改变在轻度不典型增生阶段就已发生, 且增生活性的改变与癌变过程相关. Ki67 表达改变的时相分布, 有可能成为在食管癌癌前人群中确立高危个体和选择重点化学预防个体的分子生物学标志.

### 2 基因异常表达与食管癌早期诊断

2.1 抑癌基因 P53 的异常表达 P53 异常表达与食管癌癌变过程显著相关, 并且与食管上皮的早期癌变有关<sup>[4, 8-22]</sup>. 靳玉兰 et al<sup>[4]</sup> 的研究表明, P53 异常表达的阳性率在正常黏膜、轻度、中度、重度不典型增生及原位癌组织中分别为 4%、39.1%、57.5%、52.9% 和 67.9%, 其中异常表达程度在中度以上者分别占 0、10.1%、24.5%、39.2% 和 48.7%. P53 在正常黏膜中的表达与其在不典型增生及原位癌组织中的表达均有显著性差异( $P < 0.001$ ).

P53 突变可促使上皮细胞增生. P53 的突变在食管癌的癌变过程中起重要作用. P53 阳性细胞的分布情况与增生细胞分布相似: 轻度不典型增生中, P53 阳性细胞多在增生的基底层; 随着不典型增生程度的加重, 阳性表达 P53 的细胞逐渐增多并延伸到上皮的中层及浅层. 提示基底层细胞可能是食管癌变的最早期位点. P53 与 Ki67 的表达间有很强的正相关性( $r = 0.5432$ ,  $P < 0.001$ ), 这与 Sasano et al<sup>[23]</sup> 的报道结果一致. 表明异常增生的细胞中有 P53 的突变, 并可作为食管癌癌前人群中筛选高危个体的标志物.

李姗姗 et al<sup>[8]</sup> 研究提示, 在食管癌前病变期特别是良性增生阶段就存在 P53 的表达, 这可能由于损伤诱导了的细胞内野生型 P53 的表达. 所以, 不能认为所有表达 P53 的细胞都已经恶性转化.

食管黏膜内 P53 的沉积不但是食管癌早期诊断的标志物之一, 而且其可以诱发体内 P53 抗体的产生. 血清中 P53 抗体可以通过放射免疫的方法检测到, 可作为食管癌早期诊断的指标<sup>[19-21]</sup>.

2.2 癌基因 P21 的过表达 P21 是 ras 癌基因家族成员一种共同蛋白质表达产物, 在进化上具有高度保守性, 有类似 G 蛋白的作用. 已有研究表明在肺癌<sup>[24-28]</sup>、前



列腺癌<sup>[29]</sup>及胃肠道癌<sup>[30-36]</sup>细胞中存在 P21 过量表达. 有学者<sup>[9-10, 37-38]</sup>认为 P21 在食管癌前病变及癌变组织恶性程度区分过程中扮演了重要的角色. 赵振林 et al<sup>[39]</sup>对食管石蜡切片常规 HE 染色和免疫组化染色, 用 S-P 法检测发现, 食管肿瘤分化程度越低, P21 表达的阳性率越高; RAS-P21 在正常组织中无表达, 在良性增生性病变中阳性率为 33.33%, 在食管癌组织中阳性率为 85%, 由此表明 P21 的表达水平反映食管病变的严重程度. 通过检测 RAS-P21 的表达水平, 不仅可以了解食管癌组织的分化程度, 指导临床治疗和判断预后, 而且 P21 可以作为一种可靠的标志物, 对食管癌的早期诊断具有重要价值.

2.3 细胞周期蛋白 cyclin D1 的过表达及 DNA 倍体的定量检测 左连富 et al<sup>[40]</sup>应用流式细胞术(FCM)对 952 例样品进行了 DNA 倍体检测, 并对其中 100 例样品进行了 P16 及原癌基因 CCND1 蛋白产物 cyclin D1 蛋白表达的检测. 其中 cyclin D1 的表达在正常组为阴性, 在重度不典型增生组有 59.2% 阳性表达,  $FI = 1.21 \pm 0.22$ ; 在食管癌组 100% 阳性表达,  $FI = 1.84 \pm 0.18$ ; 组间差异非常显著( $P < 0.001$ ). 对 952 例 DNA 含量及倍体分析发现, 在可疑癌变组和癌变组 DI 分别为  $1.24 \pm 0.14$  和  $1.26 \pm 0.16$ , 异倍体率分别为 92.9%(13/14)和 84.2%(16/19), 与正常组及轻度不典型增生组比较, 差异非常显著( $P < 0.01$ ). 他们认为 cyclin D1 蛋白及 DNA 倍体是食管癌早期诊断的敏感指标. 牛韵韵 et al<sup>[41]</sup>、Zuo et al<sup>[42]</sup>、Shamma et al<sup>[43]</sup>、刘丽萍 et al<sup>[44]</sup>、战雪梅 et al<sup>[45]</sup>、Kohmura et al<sup>[46]</sup>的研究也支持上述观点.

2.4 P27 的异常表达 P27 是一种周期素依赖性蛋白激酶抑制剂, 调控细胞从 G1 期到 S 期的转变. Ohashi et al<sup>[47]</sup>认为 P27 的表达减少与食管鳞状细胞癌的生物行为之间有关, 并且很可能在癌变的早期阶段扮演重要角色. 魏俊飞 et al<sup>[48]</sup>报道 P27 基因表达异常在豫北地区食管鳞癌发生、发展过程中具有重要意义, 并与食管鳞癌的转移等恶性行为相关, 可用免疫组化染色, 采用 S-P 法检测, 作为食管鳞癌早期诊断和判断预后的重要分子指标.

2.5 c-myc 基因的过表达 王成裕 et al<sup>[49]</sup>研究报告, c-myc 在食管鳞状上皮单纯增生阶段就存在过度表达, c-myc 基因的过表达可能作为食管癌癌变的原因之一, 而非癌变的结果; c-myc 表达与食管鳞状细胞癌的组织学分级有关, c-myc 基因可能在食管癌组织的分化中具有一定作用. 李淳 et al<sup>[50]</sup>的研究支持上述观点.

2.6 凋亡相关基因 Bcl-2 的异常表达 刘丽萍 et al<sup>[51]</sup>赵志毅 et al<sup>[52]</sup>认为 Bcl-2 的异常表达在食管癌发生和发展中起重要作用.

### 3 基因突变与食管癌早期诊断

3.1 抑癌基因 FHIT 缺失 抑癌基因 FHIT 是脆性组氨酸三联体. 郭惠琴 et al<sup>[53]</sup>应用内窥镜 Lugol's 液双重染色

活检技术<sup>[54]</sup>发现食管癌细胞 cDNA 中 FHIT 基因缺失率为 64.2%, 在癌旁细胞中为 20%. 食管上皮高度不典型增生和 FHIT 基因在食管癌及其癌旁细胞中的缺失分别是早期食管癌诊断的病理学及分子生物学指标<sup>[55-56]</sup>, 后者也可作为食管癌切除范围的指标之一.

3.2 抑癌基因 P16 点突变 P16 是 1994 年发现的一种抑癌基因, 位于人染色体 9P21 区域, 有 3 个外显子和 2 个内含子. 其外显子编码的 P16 可与细胞周期蛋白 D 竞争性结合 CDK4, 抑制 Rb 蛋白的磷酸化, 使其不能释放延伸因子, 导致细胞分裂不能通过 G1 → S 调控点而被阻滞于 G1 晚期. P16 的任何变化都会使上述环路无限制的进行, 因而诱发癌症发生. 孙海军 et al<sup>[57]</sup>采用 PCR-SSCP 分析测序法发现食管癌中 P16 突变位点为 12、125、373、441, 突变频率为 16%, 且突变比率与性别、年龄以及肿瘤位置、肿瘤分期、组织分化程度及有无淋巴结转移无相关性. 这对食管癌早期诊断有一定帮助. 王柏春 et al<sup>[58]</sup>和 Kato et al<sup>[59]</sup>的研究支持上述观点.

### 4 早期食管癌的微卫星不稳定性分析

食管鳞癌的发生过程与基因的不稳定性有关, 而这种不稳定性可以在肿瘤转移之前用内镜活检发现<sup>[22, 60-62]</sup>. Lu et al<sup>[60]</sup>认为在癌前病变中微卫星不稳定的发生频率增加, D3S4513, D5S2501, D8S1106, D9S118, D9S910, D13S1493, D13S894, D13S796, D15S655 和 D17S1303 等 10 个标志高表达, 在低度不典型增生、高度不典型增生和鳞状上皮癌中表达频率分别为 22%、33%、59%. 这 10 个标志可用于食管鳞癌的早期诊断.

### 5 食管癌早期诊断的血清学标志物

目前已发现可用于食管癌诊断的血清标志物有癌胚抗原(CEA)、鳞状上皮细胞癌相关抗原(SCC)和 P53 抗体等. 用放射免疫的方法检测这些标志物, 对于食管癌的早期诊断和判断术后有无转移、复发有一定的临床意义<sup>[19, 63-65]</sup>.

### 6 食管癌早期诊断的其他分子生物学标志物

靳玉兰 et al<sup>[66]</sup>研究表明, 可激发的一氧化氮合酶(iNOS)可能与食管腺癌的发生有关, 而与鳞癌的发生、发展无关. van der Woude et al<sup>[67]</sup>、Wilson<sup>[68]</sup>支持其观点. Matsumoto et al<sup>[17]</sup>、Tanaka et al<sup>[69]</sup>则认为 iNOS 可能与食管鳞癌的发生有关. 王立峰 et al<sup>[70]</sup>认为环氧合酶 2 蛋白(Cox-2 蛋白)表达可能与食管腺癌的发生有关, 而与鳞状细胞癌的发生发展无关. Wilson<sup>[68]</sup>的研究支持其结论. Shamma et al<sup>[71]</sup>则报告 Cox-2 蛋白表达可能与食管鳞状细胞癌的形成有关. Kase et al<sup>[72]</sup>认为 Cox-2 在食管鳞癌早期与新血管发生和凋亡程序的启动相关. 彭世云 et al<sup>[73]</sup>报道, 恶性肿瘤相关物质(TSGF)是与恶性肿瘤生长相关的糖类物质和代谢物的统称, 其与肿瘤的生长、转

移有密切关系,可作为检测恶性肿瘤的基础标志物与CEA、SA、Scc-Ag联合使用应用于食管癌的早期诊断。端粒酶<sup>[7,74-79]</sup>,生长早期应答基因1(Egr-1)mRNA和蛋白<sup>[80]</sup>,脂肪酸合酶<sup>[81]</sup>,肿瘤生长因子TGFβ1及其受体TGFβR II<sup>[82]</sup>,维甲酸受体RARβ<sup>[83]</sup>都在食管癌的发生中起重要作用,可望成为检测食管癌发生和早期诊断的良好指标。

总之,食管癌的早期诊断是胸外科工作者面临的重要课题,是降低食管癌死亡率、提高患者生活质量的关键所在。Ki67、P53、P21等分子生物学标志的应用为食管癌的早期诊断开辟了新的途径,具有重要价值。但是,食管癌发生的机制尚未阐明,食管癌特异性基因和抗原也尚未发现,以上众标记物的敏感性、特异性还有待提高;而且,多数标记物的检测均需内镜活检才可进行,患者检查痛苦大、费用高。尚未发现行之有效的血清学标记物,不适用于普查。所以,在早期食管癌的分子生物学标志物这方面,我们还有很多工作要做,以便更好的服务于患者。

## 7 参考文献

- 吴孟超,李家顺. 外科学及野战外科学. 第1版. 上海: 第二军医大学出版社, 2002:1190
- 李连弟,饶克勤. 中国11市县肿瘤发病和死亡登记资料统计分析(1988年-1992年). 中国肿瘤 2000;9:435-447
- 蒋耀光. 食管癌的诊断及外科治疗现状. 中国胸心血管外科临床杂志 2001;8:147-149
- 靳玉兰,张伟,刘伯齐,王洪平,韩志楷,韩双廷,曲平,李莱,丁镇伟,林培中. 食管癌前病变及原位癌组织中Ki67、P53、iNOS的异常表达. 中华肿瘤杂志 2001;23:129-131
- 靳玉兰,张伟,刘伯齐,王洪平,韩志楷,金玉生,刘义,曲平,丁镇伟,王立峰,李莱,林培中. 食管原位癌及癌前病变组织中Ki67、P53蛋白异常表达的研究. 中华病理学杂志 2000;29:222-223
- van Sandick JW, Baak JP, van Lanschoot JJ, Polkowski W, ten Kate FJ, Obertop H, Offerhaus GJ. Computerized quantitative pathology for the grading of dysplasia in surveillance biopsies of Barrett's oesophagus. *J Pathol* 2000;190:177-183
- Hiyama T, Yokozaki H, Kitadai Y, Haruma K, Yasui W, Kajiyama G, Tahara E. Overexpression of human telomerase RNA is an early event in oesophageal carcinogenesis. *Virchows Arch* 1999;434:483-487
- 李珊珊,杨观瑞,张聚真,孙豫,赵立群,裴宋良. P53蛋白在食管癌前疾患及食管癌组织中的表达. 河南肿瘤学杂志 2000;13:313-314
- 张允清,谢立. P53、P21在食管癌和鼻咽癌中的表达及意义. 河南肿瘤学杂志 2002;15:287-288
- 牛韵韵,高巍,张云汉,晏梅,高冬玲. P53、P21与细胞周期调节蛋白在食管癌中的表达及意义. 中国民政医学杂志 2000;12:339-341
- 蓝斌,李木泉,沈金辉. P53蛋白与增生细胞核抗原在食管、贲门癌中的表达及临床意义. 中国胸心血管外科临床杂志 2000;7:71-72
- 陶仪声,宗永生. 食管癌旁上皮及原位癌中P53蛋白的表达及意义. 临床肿瘤学杂志 2002;7:168-169
- 张式暖,王亚利,王艳华,吕世军,魏志新,姜红心. 食管癌及癌前病变组织中癌基因的表达式. 中国现代医学杂志 2000;10:8-9
- 廖琼,杨霞,孙维纲,廖乘风. 食管鳞癌P53、c-erbB-2蛋白表达研究. 中国组织化学与细胞化学杂志 2000;9:175-177
- Chatelain D, Flejou JF. High-grade dysplasia and superficial adenocarcinoma in Barrett's esophagus: histological mapping and expression of P53, P21 and Bcl-2 oncoproteins. *Virchows Arch* 2003;442:18-24
- Sowa M, Nakata B. Genome analyses for precancerous lesions in the gastrointestinal tract. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000;27:335-340
- Matsumoto M, Furihata M, Kurabayashi A, Araki K, Sasaguri S, Ohtsuki Y. Association between inducible nitric oxide synthase expression and P53 status in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2003;64:90-96
- Chen H, Wang LD, Guo M, Gao SG, Guo HQ, Fan ZM, Li JL. Alterations of P53 and PCNA in cancer and adjacent tissues from concurrent carcinomas of the esophagus and gastric cardia in the same patient in Linzhou, a high incidence area for esophageal cancer in northern China. *World J Gastroenterol* 2003;9:16-21
- 毛友生,赵晓航,张德超,汪良俊. 食管癌肿瘤标志物研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:1321-1323
- Shimada H, Okazumi S, Takeda A, Nabeya Y, Matsubara H, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Ochiai T. Presence of serum P53 antibodies is associated with decreased in vitro hemolysis in patients with esophageal cancer. *Surg Today* 2001;31:591-596
- Shimada H, Takeda A, Arima M, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Kobayashi S, Ochiai T. Serum P53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000;89:1677-1683
- Fujiki T, Haraoka S, Yoshioka S, Ohshima K, Iwashita A, Kikuchi M. P53 Gene mutation and genetic instability in superficial multifocal esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2002;20:669-679
- Sasano H, Miyaxaki S, Goukon Y, Nishihira T, Sawai T, Nagura H. Expression of P53 in human esophageal carcinoma: an immunohistochemical study with correlation to proliferating cell nuclear antigen expression. *Hum Pathol* 1992;23:1238-1243
- 王小闯,李秀霞,孙润芹,赵世平. 细胞周期素D1和P21<sup>WAF1/CIP1</sup>蛋白在肺癌组织中的表达. 西安医科大学学报 2002;23:220-222
- 周俊,杨文铎,袁建华. 周围型肺腺癌CT表现与ras P21蛋白异常表达的关系. 实用医学影像杂志 2002;3:1-3
- 丁续红,杨炯,张旗,彭燕,吴小军,李清泉. P21<sup>WAF1</sup>、P53和PCNA在肺癌组织中的表达. 肿瘤 2001;21:363-366
- 丁续红,田素梅,李清泉,吴小军,杨炯,张旗. 肺癌组织P21waf1蛋白表达与细胞增生的关系. 武汉大学学报(医学版) 2001;22:14-17
- 丁续红,杨炯,胡苏萍,吴小军,李清泉. P53、P21waf1和增生细胞核抗原诊断肺癌的评估. 中华流行病学杂志 2001;22:54-57
- 杨力军,邵国兴,刘荣福,王禾,陈宝琦. 人前列腺癌中P21<sup>CIP1/WAF1</sup>, Rb的表达意义. 第四军医大学学报 2001;22:1108-1110
- 杜少陵,黄文斌,李树仁,陈斌. P27<sup>KIP1</sup>和P53及P21<sup>WAF1/CIP1</sup>表达与胃癌临床病理及预后的关系. 中华胃肠外科杂志 2002;5:41-44
- 苏琦,谢海龙,凌晖,梁晓秋,周建国,李一琴. P21<sup>WAF1</sup>基因在胃癌及癌前病变中表达的病理意义. 肿瘤防治研究 2002;29:43-45
- 张运贵,张钢锋,王桂荣,黄咏梅,薛强,宗传贞,姚桂芹. rasP21、GST-π在胃癌及癌前病变组织表达的研究. 临床消化病杂志 2001;13:264-266
- 孙哲,高鹤立. P21<sup>ras</sup>、P16在大肠癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1399-1403
- 王锡山,薛英威,董新舒,刘明,徐海涛,王艳颖,程慧,赵玉兰,赵家宏,刘立人. 结肠癌P21、nm23基因表达联合检测的意义. 实用肿瘤学杂志 2001;15:264-265
- 叶龙珍,董淑兰,杨玲芳,殷梅英,费绍华,黄照源,耿志坚,孙宏夫. 胃癌中生长抑素、P21基因蛋白的表达及意义. 青海医药杂志 2001;31:3-6
- 戴文斌,任占平,阮伶,陈蔚麟,石哲,唐德艳. 胃癌及癌前病变中P16、P21<sup>WAF1</sup>、CDK4、cyclin D1蛋白的表达及其意义. 癌症 2001;20:1074-1077
- Shirakawa Y, Naomoto Y, Kimura M, Kawashima R, Yamatsuji T, Tamaki T, Hamada M, Haisa M, Tanaka N. Topological analysis of P21WAF1/CIP1 expression in esophageal squamous dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000;6:541-550
- Hanas JS, Lerner MR, Lightfoot SA, Raczkowski C, Kastens DJ, Brackett DJ, Postier RG. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor P21(WAF1/CIP1) and P53 tumor suppressor in dysplastic progression and adenocarcinoma in Barrett esophagus. *Cancer* 1999;86:756-763
- 赵振林,李家成,唐进,马捷,王子林,李华瑞. P21蛋白在食管癌及食管良性增生性病变中的表达. 山西临床医药 2002;11:329-331
- 左连富,林培中,齐凤英,张林西,郭建文,刘江惠. 食管癌前细胞DNA含量及多基因表达的定量检测. 中华肿瘤杂志 2002;24:30-33
- 牛韵韵,李靖若,高巍,张蕾,高冬玲,张云汉. 食管鳞癌组织中P16、cyclinD1、CDK4的表达. 河南医科大学学报 2001;36:539-541
- Zuo L, Ling P, Qi F, Wang J, Ding Z, Guo J, Liu J. Flow

- cytometric DNA analyses of epithelial dysplasia of the esophagus. *Anal Quant Cytol Histol* 2000;22:175-177
- 43 Shamma A, Doki Y, Shiozaki H, Tsujinaka T, Yamamoto M, Inoue M, Yano M, Monden M. Cyclin D1 overexpression in esophageal dysplasia: a possible biomarker for carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2000; 16:261-266
  - 44 刘丽萍, 涂响安, 赵志毅, 张明, 左连富. 食管癌 Fas、bcl-2 蛋白和 DNA 含量的流式细胞定量研究. *中国医师杂志* 2002;4:621-623
  - 45 战雪梅, 王国新, 孙崇伟, 王家银, 李玲. 食管癌组织中 P16、P21、P53cyclinD1 表达及其意义. *实用癌症杂志* 2001;16:36-38
  - 46 Kohmura T, Hasegawa Y, Ogawa T, Matsuura H, Takahashi M, Yanagita N, Nakashima T. Cyclin D1 and P53 overexpression predicts multiple primary malignant neoplasms of the hypopharynx and esophagus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:1351-1354
  - 47 Ohashi Y, Sasano H, Yamaki H, Shizawa S, Shineha R, Akaishi T, Satomi S, Nagura H. Cell cycle inhibitory protein p27 in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19:1843-1848
  - 48 魏俊飞, 许春雷, 李盛磊. p27 基因在豫北地区食管鳞癌发生发展过程中的表达及意义. *河北医学* 2002;8:677-679
  - 49 王成裕, 付保进, 张云汉. 食管癌发生发展过程中 c-myc 蛋白与 GST- $\pi$  的表达. *郑州大学学报(医学版)* 2002;37:341-343
  - 50 李淳, 吴名耀, 吴贤英. 食管鳞癌变过程中 c-myc 蛋白表达的研究. *汕头大学医学院学报* 2001;14:169-171
  - 51 刘丽萍, 涂响安, 赵志毅, 张明, 左连富. 食管癌 bax 和 bcl-2 蛋白的定性和定量研究. *中国基层医药* 2002;9:198-199
  - 52 赵志毅, 张明, 涂响安, 刘丽萍, 黄春南, 骆学全, 张文, 冼国杰. 细胞凋亡、增生、DNA 倍体和相关基因 Fas、bax 和 Bcl-2 在食管癌中的表达和临床意义. *中国肿瘤临床与康复* 2001;8:6-9
  - 53 郭惠琴, 李泽坚, 张志庸, 孙成孚, 徐乐天, 李卫东, 王秀琴, 吴旻. 北京协和医院食管恶性肿瘤的外科治疗. *中国医学科学院学报* 2000;22:548-550
  - 54 王国清, 周美宏, 丛庆文, 崔红海. 碘染色在早期食管癌内镜诊断中的应用. *中华医学杂志* 1995;75:417-418
  - 55 Shimada Y, Sato F, Watanabe G, Yamasaki S, Kato M, Maeda M, Imamura M. Loss of fragile histidine triad gene expression is associated with progression of esophageal squamous cell carcinoma, but not with the patient's prognosis and smoking history. *Cancer* 2000;89:5-11
  - 56 Mori M, Mimori K, Shiraishi T, Alder H, Inoue H, Tanaka Y, Sugimachi K, Huebner K, Croce CM. Altered expression of Fhit in carcinoma and precarcinomatous lesions of the esophagus. *Cancer Res* 2000;60:1177-1182
  - 57 孙海军, 林乐岷, 薛东波, 宋纯, 许评, 宋春芳. 上消化道恶性肿瘤中 P16 基因突变的研究. *中国肿瘤临床与康复* 2002;9:10-11
  - 58 王柏春, 王胜发, 王巨, 王凯. 食管癌 P16 基因变异分析. *中国胸心血管外科临床杂志* 2000;7:35-37
  - 59 Kato H, Yoshikawa M, Fukai Y, Tajima K, Masuda N, Tsukada K, Kuwano H, Nakajima T. An immunohistochemical study of P16, pRb, P21 and P53 proteins in human esophageal cancers. *Anticancer Res* 2000;20:345-349
  - 60 Lu N, Hu N, Li WJ, Roth MJ, Wang C, Su H, Wang QH, Taylor PR, Dawsey SM. Microsatellite alterations in esophageal dysplasia and squamous cell carcinoma from laser capture microdissected endoscopic biopsies. *Cancer Lett* 2003;189:137-145
  - 61 赵雍凡, 张军航, 陈国弟, 辛军平. 中国人原发性食管癌微卫星 DNA 序列的不稳定性研究. *中国胸心血管外科临床杂志* 2000; 7:32-34
  - 62 Kagawa Y, Yoshida K, Hirai T, Toge T, Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Microsatellite instability in squamous cell carcinomas and dysplasias of the esophagus. *Anticancer Res* 2000; 20:213-217
  - 63 Brockmann JG, St Nottberg H, Glodny B, Heinecke A, Senninger NJ. CYFRA 21-1 serum analysis in patients with esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:4249-4252
  - 64 Ychou M, Khemissa-Akouf F, Kramar A, Sennesse P, Grenier J. A comparison of serum Cyfra 21-1 and SCC AG in the diagnosis of squamous cell esophageal carcinoma. *Bull Cancer* 2001;88:1023-1027
  - 65 Kawaguchi H, Ohno A, Miyazake M, Hashimoto K, Egashira A, Saeki H, Watanabe M, Sugimachi K. CYFRA 21-1 determination in patients with esophageal squamous cell carcinoma: clinical utility for detection of recurrences. *Cancer* 2000;89: 1413-1417
  - 66 靳玉兰, 张伟, 刘伯齐, 王洪平, 韩志楷, 王立峰, 刘义, 金玉生, 曲平, 李莱, 丁镇伟, 林培中. 食管癌及癌前病变组织中可激发的一氧化氮合成酶的表达. *中国医学科学院学报* 2000;22:570-572
  - 67 van der Woude CJ, Jansen PL, Tiebosch AT, Beuving A, Homan M, Kleibeuker JH, Moshage H. Expression of apoptosis-related proteins in Barrett's metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence: a switch to a more resistant phenotype. *Hum Pathol* 2002;33:686-692
  - 68 Wilson KT. Angiogenic markers, neovascularization and malignant deformation of Barrett's esophagus. *Dis Esophagus* 2002;15:16-21
  - 69 Tanaka H, Kijima H, Tokunaga T, Tajima T, Himeno S, Kenmochi T, Oshiba G, Kise Y, Nishi T, Chino O, Shimada H, Machimura T, Tanaka M, Makuuchi H. Frequent expression of inducible nitric oxide synthase in esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 1999;14:1069-1073
  - 70 王立峰, 张伟, 王吾如, 王洪平, 韩双廷, 曲平, 刘义, 李莱, 刘伯齐, 林培中. 食管癌发生发展过程中环氧合酶-2 蛋白表达的研究. *中华肿瘤杂志* 2001;23:14-16
  - 71 Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2000;6:1229-1238
  - 72 Kase S, Osaki M, Honjo S, Adachi H, Tsujitani S, Kaibara N, Ito H. Expression of cyclo-oxygenase-2 is correlated with high intratumoral microvessel density and low apoptotic index in human esophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 2003;442:129-135
  - 73 彭世云, 王梅, 杨虹, 宋非, 宋晓时. 恶性肿瘤相关物质的检测在肺癌及食管癌中的临床应用. *中华临床杂志* 2002;2:12-13
  - 74 张蕾, 温洪涛, 张云汉, 宋一民, 李靖若, 马冰. 食管黏膜不典型增生组织中端粒酶活性的定量及定性检测. *河南医科大学学报* 2001;36:531-532
  - 75 张蕾, 张云汉. 端粒、端粒酶与食管癌. *河南医科大学学报* 2001; 36:533-535
  - 76 于会生, 郑国升, 孙金珍, 郜群燕, 许迎霞, 刘红凌, 李华, 任冬霞, 李素敏, 黄明周. 食管癌前病变中端粒酶的检测及意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:342-343
  - 77 李淳, 吴名耀, 梁英锐. 食管鳞癌端粒酶活性、端粒酶逆转录酶及 Bcl-X/L 表达的研究. *实用癌症杂志* 2002;17:266-268
  - 78 Lord RV, Salonga D, Danenberg KD, Peters JH, DeMeester TR, Park JM, Johansson J, Skinner KA, Chandrasoma P, DeMeester SR, Bremner CG, Tsai PI, Danenberg PV. Telomerase reverse transcriptase expression is increased early in the Barrett's metaplasia, dysplasia, adenocarcinoma sequence. *J Gastrointest Surg* 2000;4:135-142
  - 79 Li C, Wu M, Liang Y, Xu L, Cai W. Analysis of telomerase activity in esophageal carcinoma using microdissection telomeric repeat amplification protocol assay. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:39-42
  - 80 Wu MY, Liang YR, Wu XY, Zhuang CX. Relationship between Egr-1 gene expression and apoptosis in esophageal carcinoma and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2002;8:971-975
  - 81 Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, Suzuki T, Gotoh M. Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. *Pathobiology* 2001;69:297-303
  - 82 Zhou Q, Dong Wang L, Du F, Zhou Y, Rui ZY, Liu B, Wei Feng C, Gao SS, Fan ZM, Yang CS, Zheng S. Changes of TGF $\beta$ 1 and TGF $\beta$ 2 expression in esophageal precancerous and cancerous lesions: a study of a high-risk population in Henan, northern China. *Dis Esophagus* 2002;15:74-79
  - 83 Zhang W, Rashid A, Wu H, Xu XC. Differential expression of retinoic acid receptors and P53 protein in normal, premalignant, and malignant esophageal tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:237-242

# 环氧合酶 - 2 与 Barrett 食管及其相关腺癌的关系

张 娟, 杜 昕, 戴益民

张娟, 杜昕, 戴益民, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科 上海市 200433  
项目负责人: 张娟, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科. zhanda79@yahoo.com.cn  
电话: 021-25071731  
收稿日期: 2003-06-27 接受日期: 2003-08-16

## 摘要

Barrett 食管与食管癌发生有关, 尤其是与食管腺癌密切相关, 而环氧合酶 -2(cyclooxygenase-2, COX-2) 的过表达与 Barrett 食管及其相关腺癌的发生、发展有关, 通过干预治疗有可能阻断其进一步向恶性肿瘤发展. 非甾体类消炎药抗肿瘤细胞增生和诱导肿瘤细胞凋亡的作用已引起广泛关注, 其抗肿瘤作用机制可能与抑癌基因失活、改变某些与增生及凋亡有关基因表达、影响免疫、促进肿瘤血管生成有关. 本文就 COX-2 与 Barrett 食管及其相关腺癌的研究进展进行综述.

张娟, 杜昕, 戴益民. 环氧合酶 - 2 与 Barrett 食管及其相关腺癌的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1172-1175

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1172.asp>

## 0 引言

近年来, Barrett 食管及其相关腺癌的早期诊断技术已有明显提高, 其治疗手段亦有多种, 但预后仍不容乐观, 面对治疗的诸多困扰, 应将研究的重点转移到积极探索有效化学预防措施上. 1980 年代以来, 西方数项大型流行病学调查发现, 长期使用非甾体类消炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 治疗的类风湿性关节炎患者结肠癌的发生率下降 40%-60%<sup>[1]</sup>. 此后一系列调查亦证实长期使用 NSAIDs 能减少和预防食管癌、胃癌、结肠癌等胃肠道肿瘤的发生, 应用阿司匹林或其他 NSAIDs 者每年食管癌发生率约低 40%<sup>[2]</sup>. 并且近来研究结果更增强了 NSAIDs 防治食管腺癌的可行性<sup>[3]</sup>, 对于降低食管腺癌的发病率和死亡率意义重大. NSAIDs 不仅有抗炎、解热、镇痛和抗血小板聚集作用, 还有抗肿瘤增生和诱导肿瘤细胞凋亡作用, 尤其在家族性腺瘤病<sup>[4]</sup>中的良好疗效已得到认可. 此类药物部分通过抑制环氧合酶 -2(cyclooxygenase-2, COX-2) 起到抗肿瘤作用, 此作用已逐渐引起研究者的关注, 研究范围也由最初集中于结直肠癌发展到现在对肝癌、胃癌、食管癌等恶性肿瘤的化学预防作用. 现就 COX-2 在 Barrett 食管及其相关腺癌的表达、在肿瘤发生发展中的作用机制及特异性 COX-2 抑制剂的临床应用等方面的研究进展综述如下:

## 1 环氧合酶的生物学特性

COX-2 又称前列腺素内氧化酶还原酶, 是一种双功能酶, 具有环氧合酶和过氧化氢酶活性. COX 是非甾体类消炎药的靶目标之一, 是催化花生四烯酸产生前列腺素(prostaglandin, PG) 的关键酶, 在人体内主要存在两种亚型: 结构型 COX-1 和诱导型 COX-2. COX-1 基因定位于 9 号染色体, 长度 22 kb, 由 11 个外显子和 10 个内含子组成, 是静止细胞合成基础 PG 的限速酶. COX-1 呈原生性表达, 几乎分布于体内所有正常组织, 但炎症时不表达<sup>[5]</sup>, 在保护胃黏膜细胞、扩张肾血管及控制血小板聚集等方面具有重要作用. COX-2 基因定位于 1 号染色体, 长度为 8 kb, 含 10 个外显子和 9 个内含子, 是迅速短暂的早期即刻基因, 呈诱导性表达, 即正常生理状态下, 多数组织不表达<sup>[6]</sup>, 而当受到包括生长因子、细胞因子、炎症递质、各种促癌因素、细菌内毒素和激素等刺激因素作用时, 其表达迅速上调<sup>[6]</sup>. 免疫组化证实, 癌细胞、炎症细胞、血管内皮细胞、纤维细胞均明显表达 COX-2 蛋白, 而 COX-1 蛋白表达很弱<sup>[7]</sup>. 事实上, 目前有大量研究证实 COX-2 可能参与人类多种肿瘤, 尤其是消化道肿瘤的发生、发展, 并且 COX-2 在诸如食管腺癌及其癌前病变 Barrett 食管炎中的作用正成为研究热点.

## 2 COX-2 在 Barrett 食管及食管腺癌中的表达

2.1 Barrett 食管及食管腺癌 Barrett 食管由慢性酸反流所致, 即正常的鳞状上皮被特定的柱状上皮替代. 食管癌的两种主要组织类型分别为食管腺癌及食管鳞癌, 近年来白种人中腺癌的发生率已超过鳞癌. Barrett 食管的演变过程为: 慢性胃食管反流→鳞状上皮增生→消化性食管炎和消化性食管溃疡→Barrett 食管→柱状上皮异型增生→腺癌<sup>[8]</sup>. 导致异型增生和癌变的关键病理事件是肠上皮化生, Barrett 上皮是由于慢性损伤造成的肠上皮化生, 被认为是癌前病变, 发生腺癌的几率要比正常情况高 30-125 倍<sup>[9]</sup>. 据估计此风险性约为近 1/250 人年, 而且在某些群体中风险性更高. 风险分级以前是依靠组织学上对异型增生的发现, 近些年来生物学标记物的研究发展对临床医生帮助很大. 虽然这些生物学标记物尚未在前瞻试验被证实能够预测癌的发生, 但其与癌的进展有关, 其中包括细胞增生的评价、COX-2 的表达、生长因子和癌基因、分泌因子、细胞周期蛋白、黏附分子、非整倍体及其他基因异常<sup>[10]</sup>.

2.2 COX-2 在 Barrett 食管及其相关腺癌中表达增高 Wilson et al<sup>[11]</sup>发现 15/19 Barrett 肠上皮化生、2/2 Barrett 异型增生、5/5 Barrett 相关食管腺癌中, COX-2 mRNA 水平升高, 表明 COX-2 的过度表达是癌变的重要调节因素. Kandil et al<sup>[12]</sup>观察到相对正常食管黏膜患者 COX-2 蛋白在 41% Barrett 食管患者中升高, 但在有或无不典型增生中无区别, 认为 COX-2 诱导可能是 Barrett 食管发生的早期事件. 另一研究<sup>[13]</sup>提出, 相比正常食管黏膜, Barrett 黏膜上皮表达 COX-2 蛋白增加, 91% Barrett 黏膜(无不典型增生)有 COX-2 表达, 出现不典型增生者 94%, 腺癌者 97%, 相对低分化肿瘤, 高分化肿瘤 COX-2 表达显著增高. 可见 COX-2 表达高低从 Barrett 黏膜到腺癌无明显差别, 与分化高的腺癌相关; COX-2 表达增高可以发生在 Barrett 相关肿瘤发展的早期. Morris et al<sup>[14]</sup>用免疫组化方法研究 COX-2 表达, 亦发现高度不典型增生和腺癌组的 COX-2 表达明显高于低度不典型增生和良性病变, 证实了 Barrett 上皮和腺癌中 COX-2 的表达增加, 且由低度到高度不典型增生过程中 COX-2 表达水平渐增.

Barrett 食管是慢性严重的食管反流的结果, 可能发展至食管腺癌. COX-2 参与慢性炎症和上皮细胞增生, 酸暴露和胆盐对 COX-2 水平有一定影响. Shirvani et al<sup>[15]</sup>研究了 COX-2 与化生或癌变的关系, 免疫印迹显示正常的食管和十二指肠 COX-2 有微量表达, 但在 Barrett 化生、不典型增生和腺癌中显著增加, 并受酸暴露和胆盐的调节. 酸、胆汁所致的过度增生与 PGE<sub>2</sub> 释放有关, 酸和胆盐诱导的 COX-2、蛋白激酶 C (PKC) 表达增加, 在 Barrett 食管相关肿瘤形成中可能有一定作用<sup>[16]</sup>.

### 3 COX-2 在肿瘤发生、发展过程中的作用机制

COX-2 在肿瘤发生、发展过程中起促进作用的机制尚未完全清楚, 其表达增高可能是起源于上皮细胞的恶性肿瘤发生和发展的共同机制. 有人认为与下列因素有关: (1)抑制肿瘤细胞凋亡, 增加肿瘤血管形成<sup>[17]</sup>: COX-2 在多种肿瘤组织中如食管癌、皮肤癌、结肠癌中表达增高, 他可通过激活 Bcl-2 或 Akt 活性而阻止癌细胞凋亡, 其代谢产物 PGE<sub>2</sub> 可促进细胞增生. 此外, COX-2 可提高 VEGF 表达, 其代谢产物 PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub> 能直接或间接刺激内皮细胞的生长及细胞因子诱导的肿瘤血管的形成. (2)延长细胞周期, 促进细胞突变, 抑制机体免疫功能<sup>[18-19]</sup>: COX-2 延长细胞周期 G1, 降低细胞蛋白 D1 水平, 细胞不能进入分裂期而持续增生, 使细胞发生突变而异常, 并使异常细胞生存期延长, 更增加了发生二次突变的几率; COX-2 高表达, 其催化产物 PGE<sub>2</sub> 和组胺增加, 通过 cAMP 介导, 抑制自然杀伤细胞(NK)、淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)、杀伤性 T 细胞(TCL)的活性, 抑制 IL-2 受体和 IFN- $\gamma$  受体的表达, 使免疫监视功能下降, 细胞杀伤能力降低, 导致肿瘤产生. (3)增加肿瘤细胞的侵袭

能力<sup>[20]</sup>: COX-2 促进肿瘤细胞转移的机制除通过促进肿瘤细胞增生和新生血管形成等间接因素外, 还与其直接上调肿瘤细胞基质金属蛋白酶(MMP)和尿激酶型纤溶酶原激活物( $\mu$ -PA)的表达等表型改变有关. (4)使前致癌物转变为致癌物: COX-2 具有过氧化物酶活性, 可使前致癌剂发生氧化反应, 从而导致前致癌剂激活.

4 COX-2 抑制剂与 Barrett 食管及其相关腺癌的化学治疗 Barrett 食管相关腺癌最近 20 a 增长较快. 流行病学和实验研究证实 NSAIDs 有预防肿瘤的作用. 由于 NSAIDs 对 COX-1 亦有抑制作用, 长期使用就难以避免胃肠道、肾脏等器官的不良影响, 从而限制了作为抗肿瘤药物的广泛应用. 目前临床大多应用的新型选择性 COX-2 抑制剂如 Celebrex 和 Rofecoxib 能显著降低不良反应的发生, 使得广泛应用成为可能. 消化道癌的发生与遗传、环境、感染及生活方式等因素有关, 这些肿瘤发生的最终途径有共同的特征. COX-2 的上调被认为是转变的共同阶段. COX-2 抑制剂对上皮癌变有预防作用, 其能改变表达 COX-2 的人食管腺癌细胞的生长速度并诱导凋亡, 此发现为应用选择性 COX-2 抑制剂预防和治疗食管腺癌提供了理论依据<sup>[21]</sup>. Barrett 食管相关腺癌的产生与 COX-2 表达增加有关. 动物模型中<sup>[22]</sup>选择性及非选择性的 COX-2 抑制剂抑制炎症、COX-2 的活性及由反流所致的腺癌的发展, 为 COX-2 抑制剂作为 Barrett 食管的化学预防制剂提供了直接证据, 但是其对肿瘤体积并无明显作用.

预防 Barrett 相关食管腺癌的策略集中在用药物或手术抗反流疗法, 或内镜下治疗, 从而逆转 Barrett 食管病理状态. 然而, 目前上述方法都尚未有确认, 而酸抑制剂联合 COX-2 抑制剂的化学预防不失为生物学上可行之策略. 数据表明联合治疗可能是最有效的化学预防策略, 越来越多的研究结果将证实这一点<sup>[23]</sup>.

非甾体类抗炎药的应用能减少消化道癌变的风险. Buskens et al<sup>[24]</sup>对 145 例由 Barrett 食管发展至食管腺癌的手术大体标本应用 COX-2 特异性单抗免疫组化法进行分析表明, 高 COX-2 表达的患者容易发生远处转移和复发, 生存率显著下降, 5 a 生存率分别为 35%、72%, 经多元分析 COX-2 表达水平高低是评价预后的独立因子. 此结果支持 COX-2 抑制剂用于 Barrett 食管相关腺癌的化学治疗. NS-398 使 Barrett 食管上皮细胞增生降低 55%, 并能降低 COX-2 的活性. 外源性 PGE<sub>2</sub> 的添加消除了 NS-398 的抗增生作用, 同样支持 COX-2 抑制剂对 Barrett 食管的化学预防作用<sup>[25]</sup>. Barrett 食管中 COX-2 表达高于正常食管和十二指肠 3 倍(P < 0.05), Barrett 食管经 Rofecoxib 治疗后 COX-2 表达降低 77% (P < 0.005); Barrett 食管中 PGE<sub>2</sub> 含量比正常食管和十二指肠高 2 倍, Rofecoxib 治疗后降低 59% (P < 0.01); Barrett 食管中 PCNA 表达亦比正常食管和十二指肠高 2 倍(P < 0.01), Rofecoxib 治疗后降低 62.5% (P < 0.01).



Rofecoxib 降低 Barrett 食管中 COX-2 的表达, PGE<sub>2</sub> 释放及细胞增生, 联合制酸治疗, 将是化学预防不典型增生及腺癌十分有前景的策略<sup>[26]</sup>.

但是要注意, 激活 COX-2 合成前列腺素类物质是炎症反应的组成部分, COX-2 在血管内皮的产物前列腺素有重要的生理作用: 增加受损组织血流, 减少白细胞的黏附, 抑制血小板凝聚等. COX-2 抑制剂可能增加急性血管事件的危险, 此风险在潜在炎症疾患包括冠状动脉疾病中会增加<sup>[27]</sup>.

## 5 COX-2 抑制剂的作用机制

由肠化生发展到腺癌, 抗凋亡表型占主导, Bcl-xl 表达升高, Bax 表达下降<sup>[28]</sup>, 在异型增生及癌变组织中凋亡配体 Fas(CD-95)表达下降, 此与 COX-2 的过度表达下调 Fas 配基的表达有关. 因此阿司匹林等 NSAIDs 可能通过抑制 COX-2 诱导凋亡发挥对食管腺癌的抑制作用. 已公布的 3 项流行病学研究结果表明阿司匹林等 NSAIDs 对食管腺癌有化学预防作用, 调节 COX-2 表达能影响参与恶性表型的细胞功能的许多方面, 包括保持凋亡、抑制血管生成, 通过 PPAR- $\delta$  降低 DNA 活性, 降低侵袭性, 保持细胞黏附功能<sup>[9]</sup>.

长期应用 NSAIDs 对食管及胃肠道肿瘤有化学预防的作用, 但其机制尚不明. 免疫组化显示 Barrett 食管上皮中有大量的 COX-2 表达, 但不同食管腺癌细胞中其表达成分显著不同. 吡哌美辛对三种食管腺癌细胞 Flo-1, Bic-1, Seg-1 均有诱导凋亡作用, Seg-1 中 COX-1 和 COX-2 有一定水平的表达, 而 Flo-1 中 COX-1 和 COX-2 几乎不表达. 吡哌美辛上调前凋亡蛋白 Bax, 后者的上调伴有线粒体细胞色素 C 向胞质易位, 激活 caspase 9. 应用 caspase 9 抑制剂或 caspase 抑制剂, 能拮抗吡哌美辛诱导凋亡的作用. 上述研究表明抑制 COX-2 是 NSAIDs 对肿瘤化学预防作用的途径之一, 尚有不依赖 COX-2 的途径<sup>[29]</sup>, 诸如 Ras 信号转导的调节<sup>[30]</sup>、NF- $\kappa$ B 激活<sup>[31]</sup>以及 p53 的表达<sup>[32]</sup>等.

总之, 食管腺癌的发生是一个多因素、多步骤的协同作用过程, 而 Barrett 食管的炎症损害则为食管腺癌的癌前病变. 二者关系密切, COX-2 过度表达则是这一癌变过程中的一种常见形式. 对于 COX-2 的深入研究有可能从另一角度揭示肿瘤的发生机制, 也可为抗肿瘤治疗开辟新途径, 但是其效果的可信度和安全性仍需进一步研究.

## 6 参考文献

- 1 Levy GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J* 1997;11:234-247
- 2 Vaughan TL, Kristal AR, Blount PL, Levine DS, Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Rabinovitch PS, Reid BJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use, body mass index, and anthropometry in relation to genetic and flow cytometric abnormalities in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:745-752
- 3 Hu KQ. Rationale and feasibility of chemoprevention of

- hepatocellular carcinoma by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Lab Clin Med* 2002;139:234-243
- 4 Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000;342:1946-1952
- 5 Yoshimura R, Sano H, Masuda C, Kawamura M, Tsubouchi Y, Chargui J, Yoshimura N, Hla T, Wada S. Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer* 2000;89:589-596
- 6 Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996;271:33157-33160
- 7 Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashimoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:3785-3789
- 8 房殿春. Barrett 食管与食管腺癌. *中华消化内镜杂志* 1999;16:253-254
- 9 Krishnan K, Brenner DE. Prostaglandin inhibitors and the chemoprevention of noncolonic malignancy. *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:981-1000
- 10 Krishnadath KK, Reid BJ, Wang KK. Biomarkers in Barrett esophagus. *Mayo Clin Proc* 2001;76:438-446
- 11 Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998;58:2929-2934
- 12 Kandil HM, Tanner G, Smalley W, Halter S, Radhika A, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 2001;46:785-789
- 13 Lagorce C, Paraf F, Vidaud D, Couvelard A, Wendum D, Martin A, Flejou JF. Cyclooxygenase-2 is expressed frequently and early in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Histopathology* 2003;42:457-465
- 14 Morris CD, Armstrong GR, Bigley G, Green H, Attwood SE. Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Am J Gastroenterol* 2001;96:990-996
- 15 Shirvani VN, Ouatu-Lascar R, Kaur BS, Omary MB, Triadafilopoulos G. Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: Ex vivo induction by bile salts and acid exposure. *Gastroenterology* 2000;118:487-496
- 16 Kaur BS, Triadafilopoulos G. Acid- and bile-induced PGE(2) release and hyperproliferation in Barrett's esophagus are COX-2 and PKC-epsilon dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G327-G334
- 17 Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:19-27
- 18 Watson AJ. Chemopreventive effects of NSAIDs against colorectal cancer: regulation of apoptosis and mitosis by COX-1 and COX-2. *Histol Histopathol* 1998;13:591-597
- 19 沈冰冰, 高善玲. 环氧合酶-2 与胃癌. *临床消化病杂志* 2003;15:40-42
- 20 Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:411-417
- 21 Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B, Spechler SJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000;60:5767-5772
- 22 Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002;122:1101-1112
- 23 Fennerty MB. Does chemoprevention of Barrett's esophagus using acid suppression and/or COX-2 inhibition prevent neoplastic progression? *Rev Gastroenterol Disord* 2002;2(Suppl 2):S30-S37
- 24 Buskens CJ, Van Rees BP, Sivula A, Reitsma JB, Haglund C, Bosma PJ, Offerhaus GJ, Van Lanschot JJ, Ristimaki A. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in patients with adenocarcinoma of the esophagus. *Gastroenterology* 2002;122:1800-1807

- 25 Buttar NS, Wang KK, Anderson MA, Dierkhising RA, Pacifico RJ, Krishnadath KK, Lutzke LS. The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition in Barrett's esophagus epithelium: an in vitro study. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:422-429
- 26 Kaur BS, Khamnehei N, Iravani M, Namburu SS, Lin O, Triadafilopoulos G. Rofecoxib inhibits cyclooxygenase 2 expression and activity and reduces cell proliferation in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002;123:60-67
- 27 Hennen JK, Huang J, Barrett TD, Driscoll EM, Willens DE, Park AM, Crofford LJ, Lucchesi BR. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition on vascular responses and thrombosis in canine coronary arteries. *Circulation* 2001;104:820-825
- 28 van der Woude CJ, Jansen PL, Tiebosch AT, Beuving A, Homan M, Kleibeuker JH, Moshage H. Expression of apoptosis-related proteins in Barrett's metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence: a switch to a more resistant phenotype. *Hum Pathol* 2002;33:686-692
- 29 Aggarwal S, Taneja N, Lin L, Orringer MB, Rehemtulla A, Beer DG. Indomethacin-induced apoptosis in esophageal adenocarcinoma cells involves upregulation of Bax and translocation of mitochondrial cytochrome C independent of COX-2 expression. *Neoplasia* 2000;2:346-356
- 30 Herrmann C, Block C, Geisen C, Haas K, Weber C, Winde G, Moroy T, Muller O. Sulindac sulfide inhibits Ras signaling. *Oncogene* 1998;17:1769-1776
- 31 Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB. Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 1999;274:27307-27314
- 32 Piazza GA, Rahm AK, Finn TS, Fryer BH, Li H, Stoumen AL, Pamukcu R, Ahnen DJ. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res* 1997;57:2452-2459

## 《胰腺疾病内镜诊断与治疗学》出版

由国家重点学科第二军医大学长海医院消化内科博士生导师李兆申教授和许国铭教授主编的《胰腺疾病内镜诊断与治疗学》一书由第二军医大学出版社 2004-01 出版, 全书 352 页, 700 千字. 共分 5 篇、37 章, 全面、系统地介绍胰腺疾病内镜诊断与治疗技术及临床应用价值. 第 1 篇选择性地叙述了胰腺解剖、组织胚胎、生理功能及胆胰管的汇流情况. 第 2、3 篇用 19 章的篇幅详细介绍了胰腺疾病内镜相关的诊断和治疗技术, 内容包括: 适应证、禁忌证、术前病人及器械准备、操作方法、术后处理及常见并发症等; 第 4 篇重点介绍胰腺常见疾病内镜治疗临床应用价值. 第 5 篇叙述了胰腺疾病内镜诊断与治疗中常见的并发症, 着重介绍了定义、相关危险因素、预防和处理的.

全书随文配有大量线条图、内镜图及 X 线照片图, 文字简明扼要, 图片清晰、真实, 均为作者在临床工作中所收集. 本书可供内、外科及内镜医师参考阅读, 既是一本临床工作中实用的参考书, 又是一本内容翔实丰富的专业教科书.

(江学良编委供稿)

# 应用微创技术治疗肝癌的进展

钟洪才, 方驰华

钟洪才, 方驰华, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院肝胆外科  
广东省广州市 510282  
项目负责人: 方驰华, 510282, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院肝胆外科. fch58520@sina.com  
电话: 020-61643211  
收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-03-24

## 摘要

近年来, 随着对肝癌临床的深入研究, 特别是多种微创技术的应用, 肝癌的疗效取得了令人瞩目的成绩. 腹腔镜肝切除术为肝癌患者提供了有效的微创手段; 多种肿瘤局部消融技术及肝动脉栓塞化疗术为中晚期患者提供了治疗机会及有效的治疗手段, 在部分小肝癌患者还能达到根治效果. 因此, 微创技术在肝癌的治疗中有广泛的应用前景. 但亦有很多问题有待进一步解决. 本文就近年来应用微创技术治疗肝癌的进展及今后努力的方向作一综述.

钟洪才, 方驰华. 应用微创技术治疗肝癌的进展. 世界华人消化杂志 2004; 12(5):1176-1178  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1176.asp>

## 0 引言

如何进一步延长肝癌患者生存时间和提高患者生活质量一直是肝脏外科专家努力追求的目标. 传统的肝切除术无疑在肝癌的治疗中做出了突出的贡献, 并且仍在发挥主要作用. 但因其创伤过大、晚期肝癌切除率低以及复发性肝癌再次手术较为困难等缺点, 其临床应用受到较大的限制. 因此, 近数十年来, 多种微创技术得到不断应用和改进, 由于微创治疗具有创伤小、安全有效、恢复快、痛苦小等优点, 深受广大患者青睐, 而且取得了令人鼓舞的效果. 为肝癌的治疗提供了新的有效的治疗途径. 本文就近年来应用微创技术治疗肝癌的进展作一综述.

## 1 腹腔镜肝切除术

Arii et al<sup>[1]</sup>回顾分析一组外科方法(肝切除组 8 010 例)和非外科方法(瘤内无水乙醇注射组 4037 例, 肝动脉栓塞组 841 例)治疗小肝癌的治疗结果显示: 肝切除组有更高的生存率, 为小肝癌的治疗决策提供了有价值的资料. Yang et al<sup>[2]</sup>报道 86 例巨大肝癌行肝切除的治疗结果. 1, 3, 5 a 生存率分别为 58.2%, 35.7%, 17.64%, 提示即使巨大肝癌, 只要患者条件许可, 仍应该行手术治疗. 可见肝切除术仍是达到理想治疗效果的最佳选择. 但传统的切肝术创伤大, 免疫功能受到较大的打击,

不利于患者术后恢复. 腹腔镜肝切除术(laparoscopic liver resection)因其微创的特点正好弥补了上述缺点.

1990 年代初即有人成功开展腹腔镜肝脏切除术<sup>[3-4]</sup>. 至今虽仅有十余年时间, 却已有很多成功治疗肝脏良性、恶性肿瘤乃至应用于肝移植方面的报道<sup>[3-7]</sup>, 术式包括肝脏局灶切除术、肝段切除、肝叶切除、半肝切除以及左、右三肝切除术<sup>[6-10]</sup>, 达到了较理想的治疗效果. Biertho et al<sup>[11]</sup>总结了近 200 例腹腔镜肝切除术的结果, 84 例肝良性肿瘤, 102 例肝恶性肿瘤. 转开腹率 7%(13/186), 并发症发生率 16.1%(其中 2 例可能为气栓), 死亡率 0.54%(1/186), 中位住院时间 7 d. 认为腹腔镜肝切除术是可行的, 可达到与开腹手术相同的治疗效果. Mala et al<sup>[12]</sup>证明腹腔镜肝切除术与传统的开腹肝切除术相比, 二组在手术时间、出血量、输血量及切缘阳性率方面并无差异, 而住院时间更短, 恢复更快, 疼痛更小. Lesuretel et al<sup>[10]</sup>通过对腹腔镜与开腹左肝叶切除的病例对照研究认为: 尽管腹腔镜组在手术时间及肝门阻断时间较开腹组长, 但并未引起不良临床后果, 出血量及并发症发生率较开腹组更低, 因此腹腔镜肝切除术安全可行. 可见腹腔镜肝切除术较开腹有更多的优点, 不仅安全可行, 患者亦明显受益.

对于腹腔镜肝切除术的适应证目前比较一致的看法是: II - VI 段浅表的肝脏占位性病变, 尤其是位于左肝外叶、右肝前段的边缘型肝脏病变<sup>[4, 6]</sup>. 但由于受肝脏的解剖生理特点、缺乏有效的适于腹腔镜下肝脏止血的设备以及个人技术因素等诸多制约, 腹腔镜肝切除术在肝脏外科治疗中的应用缓慢, 是难度最大的腹腔镜治疗技术. 目前尚缺乏大宗的病例报道, 尤其是经过严格设计的随机双盲病例对照研究. 因此, 其临床广泛应用仍虽经过长途跋涉.

## 2 肿瘤局部消融治疗

近年来, 具有微创特点的肿瘤局部消融技术(locoregional ablative procedure)不断应用于肝癌治疗, 不仅适于早中期的肝癌治疗, 晚期肝癌亦可达到较好的减症效果, 应用范围较广<sup>[13-14]</sup>. 其基本原理是利用热能(如射频消融、微波固化、激光消融)、冷冻(如液态冷冻、氩氦刀)或蛋白质变性(如瘤内药物注射)破坏肿瘤组织, 达到治疗效果. 目前应用较多的方法有射频消融、微波固化、氩氦刀冷冻治疗、瘤内无水乙醇注射等.

### 2.1 热消融(hyperthermia ablation)

#### 2.1.1 射频消融 射频消融(radiofrequency ablation)治疗肝

癌是近年国内外开展的新技术, 其原理是通过射频在电极针周围产生离子震荡导致发热, 使组织凝固坏死而达到治疗肿瘤的目的. 其破坏直径可达 3.5-5 cm, 破坏呈球形, 符合多数肿瘤形态<sup>[15]</sup>, 对肿瘤杀灭较为彻底. 小于 3 cm 的肝癌结节其消融率甚至可达 90-98%<sup>[16]</sup>. 可使小肝癌的局部治疗达到近乎根治水平. 肿瘤坏死程度高于瘤内无水乙醇注射<sup>[17]</sup>, 如联合瘤内无水乙醇注射可进一步扩大坏死范围<sup>[18]</sup>. 适应证: (1)肝实质深部的肿瘤, 特别是伴有重度肝硬化者, 射频仅使病灶破坏而尽量保存了正常肝组织; (2)巨块型肝癌的减瘤; (3)如肝癌破裂发生大出血行射频消融治疗, 可达到止血与破坏肿瘤双重效果. 甚至可作为肝移植前的治疗<sup>[19]</sup>.

### 2.1.2 微波固化

微波固化治疗(microwave coagulation therapy): 肝癌的原理是肿瘤组织被微波辐射后, 肿瘤吸收微波产生高速振荡, 进而转化为热能, 使肿瘤组织凝固. 凝固的肿瘤组织温度可达 60 °C, 能有效持久地杀灭肿瘤细胞. Dong et al<sup>[20]</sup>报道经超声引导微波固化治疗 234 例患者共 339 个癌结节, 术后活检证实 92.8% 治疗后的癌结节无瘤组织存活, 切除的 6 个病灶有 5 个完全坏死; 1-5 a 累积生存率分别为 92.7%, 81.6%, 72.8%, 66.4%, 56.7%. 获得了较理想的治疗效果和生存率. 其适应证同射频消融.

2.2 冷冻消融 氩氦刀冷冻治疗(Ar-He cryoablation therapy): 是传统冷冻治疗(cryoablation therapy)方法与现代航天高科技技术相结合的产物, 是近年新兴的一种冷冻治疗新技术. 其基本原理是: 氩氦刀为一有数个能单独或组合使用的热绝缘中空超导刀, 刀头中空, 高压氩气在刀尖形成快速低温(可达 -140 °C), 将细胞迅速冷冻成冰球, 然后通入氦气迅速回暖, 在温度从 -40 °C 回升到 -20 °C 的过程中, 冰球发生膨胀, 使在冷冻过程中形成的冰球爆裂. 骤冷骤热的过程使细胞内外冰晶形成、细胞脱水, 微血管破裂造成缺氧等联合作用导致靶区细胞死亡, 对肿瘤细胞产生杀灭作用<sup>[21-22]</sup>. 此外, 冷冻治疗后的免疫反应也可使瘤灶继发缩小. 在冷冻治疗中, 一般有四个关键因素: 最低温度、结冰温度、冷冻时间、冷冻次数. 而在氩氦刀治疗中, 降温速度也是一个至关重要的因素, 在接近超导刀的位置温度迅速下降至超低温, 细胞内外迅速形成冰晶, 而后快速解冻导致包膜破裂及再水化作用引起细胞死亡. 适应证主要为(1)一般状况差不能耐受手术切除者; (2)主瘤切除后有子灶或切缘有瘤残存者; (3)复发性肝癌不能再次手术者; (4)转移性多发小肝癌等. 与传统的冷冻治疗方法相比, 具有可精确控温、准确定位、创伤小、疗效高等优点. 但有术后出血及较高的复发率. Clavien et al<sup>[23]</sup>认为行冷冻消融前实行 TACE 可减少术后出血.

2.3 药物消融(drug ablation therapy) 瘤内无水乙醇注射(percutaneous ethanol injection): 肝癌局部无水乙醇注射可以使肝癌细胞脱水、凝固坏死. 乙醇弥散至肿瘤周边

血管可破坏血管内皮细胞致血栓形成, 血管闭塞, 导致癌细胞死亡. 具有操作简单、安全、经济, 对富血管型的肝癌效果好, 注射材料除可用无水乙醇外还可使用乙酸等. 日本多家医院采用瘤内无水乙醇注射治疗 4 037 例小肝癌, 达到了较好疗效, 仅次于肝切除术的效果<sup>[1]</sup>. 小于 3 cm 的单个肝癌, 效果较好, 完全消融率达 80%, 而并发症较小; 随着肿瘤的增大和结节增多, 其效果逐渐变差<sup>[16]</sup>. 也有作者报道瘤内无水乙醇注射治疗的患者其生存曲线较手术切除者更好<sup>[13]</sup>.

这些方法的共同特点是肿瘤局部消融, 可有效杀灭肿瘤组织而对全身影响较小, 具有微创、适应证宽, 花费少等诸多优点, 为不能切除或只能行姑息切除肝癌治疗增添了新的有效治疗手段<sup>[24-25]</sup>. 这些方法不仅可单独应用, 并可结合手术或 TACE 等多种方法使用, 可提高治疗效果并减少并发症的发生<sup>[18, 23]</sup>. 可经皮、经腹腔镜或开腹实施<sup>[19, 26]</sup>. Yokoyama et al<sup>[27]</sup>报道经皮及腹腔镜方法行射频治疗及微波固化治疗肝癌 32 例, 术后 7 d、30 d 行 CT 复查, 仅 1 例见残留瘤组织. 在 B 超、CT、MR 引导下可提高定位准确性<sup>[20, 28]</sup>, 治疗效果更为满意.

在肝癌的早期阶段, 肝移植、手术切除方法可达到根治目的, 但由于严格的外科切除原则及受供肝短缺的影响, 一定程度上促进了肿瘤消融技术的发展, 后者有微创、有效、重复使用、并发症发生率低、费用低等优点<sup>[16]</sup>. 甚至也能达到根治的要求<sup>[29]</sup>, 但目前仍有争议.

## 3 肝动脉栓塞化疗术(transarterial chemoembolization, TACE)

TACE 是不能切除的大肝癌和多发性肝癌治疗的首选方法. 肝癌结节富含血供, 其来源约 90% 为肝动脉供血, 肝动脉栓塞可致癌灶缺血坏死达到治疗目的, 栓塞时配合局部灌注化疗药物可杀伤更多癌细胞. 但由于癌结节周边由门静脉供血, 肿瘤有侧支血供, 单纯栓塞治疗难以达到根治目的. 肝动脉栓塞化疗术用途广泛, 不仅可作为术前术后的治疗措施, 也可与任何其他肿瘤消融方法合并使用<sup>[29]</sup>, 从而提高疗效; 单独应用也能明显改善患者生存率; 1, 2, 3 a 生存率分别为 85%, 38.6%, 18.1%, 多次栓塞较一次栓塞治疗的患者能达到更好的疗效<sup>[30-31]</sup>.

总之, 一方面, 随着腹腔镜技术的发展, 腹腔镜肝脏切除术不断得到应用并取得了令人振奋的结果, 极大地丰富了肝切除术治疗肝癌的内容. 另一方面, 由于能手术治疗的患者仅占有限的一部分, 肝移植治疗又受到供体来源的限制, 肿瘤局部消融及肝动脉栓塞化疗术等微创治疗方法在肝癌的现代治疗中越来越广泛地得到应用, 并取得了确切的疗效, 在部分小肝癌患者中可达到根治的效果. 为肝癌的综合治疗模式提供了极为重要的治疗手段. 如何进一步扩大腹腔镜肝切除术的应用范围, 提高其治疗效果, 减少并发症的发生; 以及在肿瘤局部消融、肝动脉栓塞化疗术等微创技术应

用上扬长避短,使其治疗作用得到互补,而避免各自的不良作用是下一步努力的方向。

#### 4 参考文献

- Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S, Inoue K, Kobayashi K, Kojiro M, Makuuchi M, Nakamura Y, Okita K, Yamada R. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The liver cancer study group of Japan. *Hepatology* 2000; 32:1224-1229
- Yang JM, Kan T, Chen H, Wu MC. Hepatectomy in the treatment of very big primary liver cancer: report of 86 cases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:42-45
- Rogula T, Gagner M. Current status of the laparoscopic approach to liver resection. *J Long Term Eff Med Implants* 2004; 14:23-32
- Descottes B, Glineur D, Lachachi F, Valleix D, Paineau J, Hamy A, Morino M, Bismuth H, Castaing D, Savier E, Honore P, Detry O, Legrand M, Azagra JS, Goergen M, Ceuterick M, Marescaux J, Mutter D, de Hemptinne B, Troisi R, Weerts J, Dallemagne B, Jehaes C, Gelin M, Donckier V, Aerts R, Topal B, Bertrand C, Mansvelt B, Van Krunkelsven L, Herman D, Kint M, Totte E, Schockmel R, Gigot JF. Laparoscopic liver resection of benign liver tumors. *Surg Endosc* 2003;17:23-30
- Hashizume M, Shimada M, Sugimachi K. Laparoscopic hepatectomy: new approach for hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000;7:270-275
- Gigot JF, Glineur D, Santiago Azagra J, Goergen M, Ceuterick M, Morino M, Etienne J, Marescaux J, Mutter D, van Krunkelsven L, Descottes B, Valleix D, Lachachi F, Bertrand C, Mansvelt B, Hubens G, Saey JP, Schockmel R. Laparoscopic liver resection for malignant liver tumors: preliminary results of a multicenter European study. *Ann Surg* 2002;236:90-97
- Cherqui D, Soubrane O, Husson E, Barshasz E, Vignaux O, Ghimouz M, Branchereau S, Chardot C, Gauthier F, Fagniez PL, Houssin D. Laparoscopic living donor hepatectomy for liver transplantation in children. *Lancet* 2002;359:392-396
- Costi R, Capelluto E, Sperduto N, Bruyns J, Himpens J, Cadiere GB. Laparoscopic right posterior hepatic bisegmentectomy (Segments VII-VIII). *Surg Endosc* 2003;17:162
- Huscher CG, Lirici MM, Chiodini S. Laparoscopic liver resections. *Semin Laparosc Surg* 1998;5:204-210
- Lesurtel M, Cherqui D, Laurent A, Tayar C, Fagniez PL. Laparoscopic versus open left lateral hepatic lobectomy: a case-control study. *J Am Coll Surg* 2003;196:236-242
- Biertho L, Waage A, Gagner M. Laparoscopic hepatectomy. *Ann Chir* 2002;127:164-170
- Mala T, Edwin B, Gladhaug I, Fosse E, Soreide O, Bergan A, Mathisen O. A comparative study of the short-term outcome following open and laparoscopic liver resection of colorectal metastases. *Surg Endosc* 2002;16:1059-1063
- Livraghi T, Meloni F. Treatment of hepatocellular carcinoma by percutaneous interventional methods. *Hepatogastroenterology* 2002;49:62-71
- Livraghi T. Radiofrequency ablation, PEIT, and TACE for hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10:67-76
- Rossi S, Buscarini E, Garbagnati F, Di Stasi M, Quaretti P, Rago M, Zangrandi A, Andreola S, Silverman D, Buscarini L. Percutaneous treatment of small hepatic tumors by an expandable RF needle electrode. *Am J Roentgenol* 1998;170:1015-1022
- Gaiani S, Celli N, Cecilioni L, Piscaglia F, Bolondi L. Review article: percutaneous treatment of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17(Suppl 2):103-110
- Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, Meloni F, Solbiati L, Gazelle GS. Small hepatocellular carcinoma: treatment with radio-frequency ablation versus ethanol injection. *Radiology* 1999;210:655-661
- Kurokohchi K, Watanabe S, Masaki T, Hosomi N, Funaki T, Arima K, Yoshida S, Miyauchi Y, Kuriyama S. Combined use of percutaneous ethanol injection and radiofrequency ablation for the effective treatment of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002;21:841-846
- Arch-Ferrer JE, Smith JK, Bynon S, Eckhoff DE, Sellers MT, Bland KI, Heslin MJ. Radio-frequency ablation in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Am Surg* 2003;69:1067-1071
- Dong B, Liang P, Yu X, Su L, Yu D, Cheng Z, Zhang J. Percutaneous sonographically guided microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma: results in 234 patients. *Am J Roentgenol* 2003;180:1547-1555
- Edmunds TB Jr, Schulsinger DA, Durand DB, Waltzer WC. Acute histologic changes in human renal tumors after cryoablation. *J Endourol* 2000;14:139-143
- Larson TR, Robertson DW, Corica A, Bostwick DG. In vivo interstitial temperature mapping of the human prostate during cryosurgery with correlation to histopathologic outcomes. *Urology* 2000;55:547-552
- Clavien PA, Kang KJ, Selzner N, Morse MA, Suhocki PV. Cryosurgery after chemoembolization for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *J Gastrointest Surg* 2002;6: 95-101
- Shiina S, Teratani T, Obi S, Hamamura K, Koike Y, Omata M. Nonsurgical treatment of hepatocellular carcinoma: from percutaneous ethanol injection therapy and percutaneous microwave coagulation therapy to radiofrequency ablation. *Oncology* 2002;62(Suppl 1):64-68
- Goldberg SN, Ahmed M. Minimally invasive image-guided therapies for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 2002;35(5 Suppl 2):S115-129
- Okano H, Shiraki K, Inoue H, Kawakita T, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Murata K, Nakano T. Laparoscopic microwave coagulation therapy for small hepatocellular carcinoma on the liver surface. *Oncol Rep* 2002;9:1001-1004
- Yokoyama T, Egami K, Miyamoto M, Watanabe H, Hasegawa H, Iida S, Suzuki S, Nakamura Y, Okawa K, Hagiwara N, Takashima Y, Yoshioka M, Tajiri T, Onda M. Percutaneous and laparoscopic approaches of radiofrequency ablation treatment for liver cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10: 425-427
- Vogl TJ, Mack MG, Balzer JO, Engelmann K, Straub R, Eichler K, Woitaschek D, Zangos S. Liver metastases: neoadjuvant downsizing with transarterial chemoembolization before laser-induced thermotherapy. *Radiology* 2003;229:457-464
- Qian J, Feng GS, Vogl T. Combined interventional therapies of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1885-1891
- Barone M, Ettorre GC, Ladisa R, Schiavariello M, Santoro C, Francioso G, Vinciguerra V, Francavilla A. Transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003;50:183-187
- Grieco A, Marcocchia S, Miele L, Marmiroli L, Caminiti G, Ragazzoni E, Cotroneo AR, Cefaro GA, Rapaccini GL, Gasbarrini G. Transarterial chemoembolization (TACE) for unresectable hepatocellular carcinoma in cirrhotics: functional hepatic reserve and survival. *Hepatogastroenterology* 2003;50:207-212



# 肝星形细胞的生物学特性和肝纤维化

施贵静, 赵金满

施贵静, 赵金满, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001  
项目负责人: 赵金满, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院  
消化内科. jinmanzhao@hotmail.com  
电话: 024-23212166  
收稿日期: 2003-11-22 接受日期: 2003-12-29

## 摘要

肝纤维化是多种慢性肝病晚期共有的组织学变化,其显著特征是细胞外基质的增加和成分的改变.肝纤维化的中心环节是肝星形细胞在组织炎症坏死区域向肌成纤维细胞转型的激活过程.本文综述了近年来关于肝星形细胞和肝纤维化的相关文献,综述主题包括肝星形细胞的活化过程、分子生物学机制、凋亡以及以肝星形细胞为靶向的肝纤维化治疗策略.肝星形细胞的激活过程包括至少两个阶段:(1)启动期和(2)持续期.以转化生长因子 $\beta$ 为例说明肝星形细胞活化的分子生物学机制,并深入探讨了活化的肝星形细胞的凋亡途径.由于肝星形细胞在肝纤维化中的中心作用,故最近的抗纤维化治疗集中以肝星形细胞为靶向,其治疗策略包括:(1)直接抑制肝星形细胞活化;(2)抑制肝星形细胞的增生、纤维生成、收缩和/或炎症前反应;(3)刺激肝星形细胞的凋亡;(4)通过刺激细胞产生基质蛋白酶类,下调他们的抑制剂,或直接服用基质蛋白酶以增强瘢痕基质降解.而所有有关肝星形细胞激活和凋亡的信号转导途径和调节均会导致肝纤维化治疗的新发展.

施贵静, 赵金满. 肝星形细胞的生物学特性和肝纤维化. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1179-1183

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1179.asp>

## 0 引言

肝纤维化是多种慢性肝病晚期共有的组织学变化,是多种类型细胞、氧化压力、细胞因子和生长因子等一系列复杂作用的结果<sup>[1-2]</sup>,其显著特征是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的增加和成分的改变<sup>[3]</sup>.研究表明,肝纤维化的中心环节是肝星形细胞(hepatic stellate cells, HSCs)在组织炎症坏死区域向肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)转型的激活过程.激活的星形细胞除能表达各种细胞外基质成分如胶原、蛋白多糖、纤维连接蛋白、层黏素外,还能表达各种炎症因子、纤维化因子和生长因子等.本文仅就肝星形细胞生物学特性和肝纤维化的关系予以阐述.

## 1 肝星形细胞的一般特征与功能

肝星形细胞又称 Ito 细胞、维生素 A 储存细胞、窦周

细胞等,在生理状态下,HSCs 位于肝索与肝窦壁之间的 Disse 间隙内<sup>[4]</sup>,与内皮细胞相对,细胞呈长圆形,具有多数带分支的长突起,包绕于肝窦外,突起与内皮细胞、肝细胞表面相接触,胞内富含维生素 A 和甘油三酯的脂质小泡.在正常肝组织中,HSCs 与肝细胞(hepatic cell, HC)数量之比为 1:20,其约占肝内细胞总数的 5-8%<sup>[5]</sup>.

在正常情况下,HSCs 主要有下列功能<sup>[6-7]</sup>:(1)贮存脂肪和维生素 A 的功能;(2)合成蛋白质,尤其是胶原蛋白,主要有 I、III、IV、VI 型,细胞培养表明,HSCs 合成胶原的量是肝细胞的 10 多倍,是窦状隙内皮细胞的 20 多倍<sup>[8]</sup>;(3)生成少量金属蛋白酶及其抑制剂;(4)HSCs 的伪足伸展在肝实质细胞和肝窦内皮细胞之间,对内皮细胞起支撑作用,同时调节肝窦膜大小;(5)HSCs 也是蛋白多糖和糖蛋白的主要分泌细胞.HSCs 功能正常,则胶原代谢处于动态平衡,ECM 就不会大量沉积,也就不会形成纤维化.

## 2 肝星形细胞的活化

当肝脏受到物理、化学及生物因素刺激时,通常静止的储存维生素 A 的 HSCs 经过表型转化成为肌成纤维细胞,称之为“激活”或“转移分化”<sup>[4]</sup>,同时拥有静止和激活状态特征的细胞称为“过渡期细胞”<sup>[9]</sup>.HSCs 激活过程包括至少两个阶段:(1)启动期:此期涉及初期旁分泌媒介的基因表达和表现型改变,致使细胞对其他细胞因子和刺激素发生应答.HSCs 的初期改变可能由所有周边细胞类型,包括窦状隙内皮细胞、枯否细胞、肝细胞、血小板和白细胞等的旁分泌刺激导致.(2)持续期:由上述刺激导致持续的激活表型并产生纤维化.此期可以进一步分成几个不连续的细胞行为改变<sup>[10]</sup>,包括增生、收缩功能、纤维生成、基质降解、化学趋化性、类维生素 A 消失和白细胞化学吸引力.

2.1 增生 在众多生长因子及其他激活物刺激下,HSCs 发生有丝分裂,其中血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是确定的最强的促分裂素,在 HSCs 激活初期 PDGF 受体对这种促分裂素的反应被诱导增强.另外,许多刺激素对 HSCs 也有促增生作用,包括凝血酶、血管内皮细胞生长因子(VEGF)和成纤维细胞生长因子(FGF)<sup>[11]</sup>.

2.2 收缩功能 虽然 HSCs 的收缩功能对正常肝血流调节的作用仍不清楚,但是其收缩功能是肝纤维化时门脉阻力增加的主要决定因素<sup>[12]</sup>.HSCs 的主要收缩性刺激素

是 ET-1(endothelin-1, ET-1). ET-1 受体在静止的和激活的 HSCs 均有表达, 但是他们的亚基组成不同, 当 HSCs 激活时, 由“A”型为主转为“B”型为主, 导致细胞对这种生长因子反应的改变. 枯否细胞产生前列腺素  $D_2(PGD_2)$ 、前列腺素  $E_2(PGE_2)$  和血栓素类, 其中, 血栓素类促进收缩, 而  $PGE_2$  调节松弛. 局部产生的血管舒张物质能抵消 ET-1 的收缩作用. HSCs 也能产生 NO, NO 是 ET-1 很好的内源性拮抗剂<sup>[9]</sup>.

**2.3 ECM 生成** 活化的 HSCs 可分泌 I、III、IV 型胶原、层粘蛋白、纤维连接蛋白、透明质酸等多种 ECM 成分. TGF- $\beta_1$  及其受体表达增加, 是最强的促胶原生成因子. 脂质过氧化物是 ECM 产生的重要刺激物, 他们的作用因 HSCs 激活时抗氧化能力的丧失而增强<sup>[9]</sup>. 有研究发现, 连接组织生长因子(connective growth factor, CTGF)是一种 TGF- $\beta_1$  刺激因子, 也能促进 HSCs 产生基质<sup>[13]</sup>.

**2.4 ECM 降解** 在肝内参与 ECM 降解的主要是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs), 包括明胶酶(MMP-2, -9)、间质型胶原酶(MMP-1, -8, -13)、基质溶解素(MMP-3, -7, -10, -11)、膜型基质金属蛋白酶(MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25)和金属弹性蛋白酶(MMP-12)五类. HSCs 是产生 MMP-2 的主要细胞, HSCs 的活化也是 MMP-2 升高的原因之一, HSCs 活化产生 MMP-2, 后者降解正常内皮下基质, 又促进 HSCs 活化, 造成恶性循环, 促进肝纤维化的发展. 有 4 种 MMPs 的特异性抑制剂金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs), 激活的 HSCs 分泌 TIMP-1 和 TIMP-2, 抑制 MMPs 的功能, 从而抑制胶原的降解, 促进肝纤维化的进展<sup>[14-15]</sup>. 肝纤维化的进程中, MMPs 与 TIMPs 调控机制的异常是胶原过多形成的原因<sup>[16]</sup>.

**2.5 化学趋化性** HSCs 能向细胞因子化学吸引剂移动, 是类似其他组织受损时, 间充质细胞浸润的一种特征性行为<sup>[17]</sup>. 活化的 HSCs 还释放单核细胞趋化蛋白(MCP-1)、IL-10 等炎症调节因子.

**2.6 类维生素 A 消失** 在 HSCs 激活期, 他们失去了特征性核周类维生素 A(VitA)小滴而获得更多的肌成纤维细胞的表型. 然而, 目前仍不清楚是否 VitA 的丧失是 HSCs 激活所必需的, 以及是否 VitA 能加速或抑制 HSCs 的激活.

**2.7 白细胞化学吸引性和细胞因子的释放** 细胞因子数量的升高和/或活性的增强对 HSCs 激活的持续很重要. HSCs 基质产量和收缩性受 TGF- $\beta$  和 ET-1 自分泌的直接影响. HSCs 能通过单核和多核白细胞的浸润进一步增强炎症反应.

### 3 HSCs 活化的分子生物学机制

**3.1 HSCs 活化的相关受体** 细胞因子如 TGF- $\beta$ 、TGF- $\alpha$ 、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor,

IGF)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、PDGF、EGF、FGF、ET-1、IL-6、IL-1 等与相应的特异性受体结合后可以激活 HSCs. HSCs 表面受体在肝纤维化的发生与发展中具有重要作用. HSCs 受体至少可分为 3 类: (1)整合素是由  $\alpha$ 、 $\beta$  2 个亚单位组成的异二聚体. 已知  $\alpha$  链有 16 种,  $\beta$  链有 8 种, 由此组成多种  $\alpha$ - $\beta$  组合. 不同组合以不同的 ECM 成分为配基, 体现不同的功能. 有人发现, 静止状态的 HSCs 除表达较多的  $\alpha_1$  亚单位外, 其余亚单位少量表达或不表达. 而在激活的 HSCs 可表达  $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_4$  等整合素类.  $\alpha_1\beta_1$  为 IV 型胶原、I 型胶原和层粘蛋白的受体,  $\alpha_2\beta_1$  为胶原的受体, 但也可与其他 ECM, 如纤维连接蛋白和层粘蛋白结合<sup>[18]</sup>. 配体与整合素受体结合, 可促进 HSCs 的激活, 引起细胞内发生一系列变化, 进而作用于核内转录因子, 启动其基因转录. (2)血管活性物质受体: 包括血管收缩物质受体, 如 ET、血管紧张素 II(angiotensin II)、血管加压素(vasopressin); 血管舒张物质受体, 如心房利尿钠肽(atrial natriuretic peptide)等. 内皮素受体(ETR)为 G 蛋白偶联受体, 可分为 ETA 受体(ETAR)和 ETB 受体(ETBR). 正常时 HSCs 具有 ETAR, ETBR, 但以 ETAR 为主, 激活的 HSCs 主要表达 ETBR<sup>[19]</sup>. ET1 经旁分泌和自分泌途径作用于激活的 HSCs 的 ETBR 和 ETAR, 导致细胞内钙释放和细胞外钙经二氢吡啶非敏感性钙通道进入细胞内, 引起钙的增加, 因而发生细胞收缩和增生. 血管紧张素 II 受体亦属于 G 蛋白偶联受体, 可分为 Ang II<sub>1</sub> 型受体(AT<sub>1</sub>R)和 Ang II<sub>2</sub> 型受体(AT<sub>2</sub>R). Ang II 作用于 AT<sub>1</sub>R, 可迅速引起细胞内钙增加, 细胞收缩, 刺激细胞增生, 而 Ang II 对静止的 HSCs 无收缩或增生作用<sup>[20]</sup>. 受体结合试验表明, 人 HSCs 存在血管加压素型受体(VIR), 刺激此受体, 可引起细胞内钙增加, 细胞收缩和增生. Gorbic et al<sup>[21]</sup> 证明人静止和激活的 HSCs 均有心房利尿钠肽受体(AVPR)的存在. AVP 与之作用后, 可导致剂量依赖性 HSCs 内环鸟苷酸浓度的增高, 减弱 ET 引起的细胞内钙增加和细胞收缩, 从而参加肝窦血流的调节. (3)酪氨酸激酶和丝-苏氨酸激酶类受体: 该类受体只在 HSCs 激活过程中表达, 其配体主要为生长因子, 包括 TGF- $\beta$ 、PDGF 等. 静止状态的 HSCs 不表达 TGF- $\beta$  受体, 经体外培养后活化的 HSCs 表达 TGF- $\beta$  受体, 并发挥功能. TGF- $\beta$  受体分 9 种, 其中受体 I 型、II 型和 III 型受体与 TGF- $\beta$  具有高亲和力. I、II 型受体属跨膜丝氨酸-苏氨酸激酶受体家族, 直接参与 TGF- $\beta_1$  的信号转导, TGF- $\beta_1$  与 HSCs 上 I 型受体结合后作用于转录因子, 增强前胶原  $\alpha_1(I)$  基因转录, 促进 ECM 合成并抑制其降解; II 型受体参与 TGF- $\beta_1$  对 HSCs 增生的抑制作用<sup>[22]</sup>. III 型为蛋白多糖, 其作用可能与 TGF- $\beta_1$  转运、贮存有关. PDGF 受体有  $\alpha$  和  $\beta$  亚单位, 属于酪氨酸激酶受体. PDGF 与 HSCs 相应受体结合后, 可激活羟基末端酪氨酸激酶和 3-磷酸肌醇, 促

进 HSCs 增生与移行, 并诱导 HSCs 合成 TGF- $\beta$  等细胞因子。

**3.2 HSCs 的细胞内信号转导** 各种细胞因子及 ECM 成分、过氧化产物等与相应 HSCs 膜受体结合后, 激活一系列细胞内信号传递结构和分子, 最终导致基因表达的变化。下面将主要讨论 TGF- $\beta$  的信号传导通路。

TGF- $\beta$  是目前已知最强力的促肝纤维化的细胞因子<sup>[23]</sup>。多年来, 对 TGF- $\beta$  在细胞内的 Smad 信号转导通路研究的比较透彻<sup>[22, 24-25]</sup>。TGF- $\beta$  在所有类型的细胞中均以无活性形式合成与分泌, 活化后才能与受体结合并表现出生物学活性。活化前的 TGF- $\beta$  包括 TGF- $\beta$  同源二聚体、潜态相关性多肽(latency-associated protein, LAP)与潜态 TGF- $\beta$  结合蛋白(latent TGF- $\beta$  binding protein, LTBP)<sup>[22]</sup>。研究证实, TGF- $\beta$  的作用最终是通过与细胞表面的受体结合, 诱导受体活化, 并通过胞内与活化受体级联的信号传导分子的激活而起作用。目前研究表明, TGF- $\beta$  通过与其效应细胞表面的 T $\beta$ R I 和 II 型受体形成的异源二聚体结合, 相继激活 T $\beta$ R II 磷酸化激酶使 T $\beta$ R I 磷酸化, 而激活 T $\beta$ R I<sup>[26]</sup>。当 T $\beta$ R I 激活后, 下游分子 Smad2 和 Smad3 与 T $\beta$ R I 发生短暂结合而直接发生磷酸化, 而 Smad4 则被活化的 T $\beta$ R I 间接激活。激活的 Smad2、Smad3 和 Smad4 聚集成共同复合体或形成数个异源二聚体复合物。其中 Smad4 是最关键和共同的信号传导分子, 所有的其他分子均通过与其结合后, 才能转入核内诱导靶基因转录<sup>[22, 27-29]</sup>。

Smad2/3-Smad4 调节转录的作用方式有以下 3 种: (1) 直接与 DNA 结合; (2) 与其他转录因子协同作用以调节转录, Smads 蛋白可与多种转录因子如 fos/jun、TFE3、ATF2、PEBP2/CBF 等相互作用, 这种相互作用的最最终效应可能决定基因表达的特异性; (3) 与转录复合物(coactivator)或复合抑制物(corepressor)结合, 以激活或抑制转录<sup>[30]</sup>。Smads 直接与 DNA 结合的亲和力及特异性均较低, 因而主要通过后两种方式调节转录。

#### 4 肝星形细胞的凋亡

肝受到损伤后, 表现为 HSCs 的激活和增生, 当肝损伤得到恢复, 数目巨大的激活增生的 HSCs 则可能发生如下两种结果: (1) 激活的 HSCs 回复至静止状态; (2) 细胞通过凋亡机制死亡<sup>[31]</sup>。近年研究发现, 活化的 HSCs 主要通过凋亡方式减少, 且有多种途径影响其凋亡。

Saile et al<sup>[32]</sup>报道, 培养的 HSCs 在 2 d 时不发生凋亡; 4 d 时凋亡率为  $8 \pm 5\%$ ; 7 d 后则为  $18 \pm 8\%$ 。而胆道结扎术后 21 d, HSCs 的自发凋亡率为  $1-3\%$ <sup>[33]</sup>。体内研究表明, 肝组织急性损伤阶段, HSCs 出现激活、增生而无凋亡现象; 恢复阶段的 HSCs 的凋亡与组织中 HSCs 总量的减少相平行<sup>[32, 34]</sup>。由此显示, 自发凋亡可能是机体清除过多活化 HSCs 的主要机制。目前了解的介导激活 HSCs 凋亡的受体有 Fas, p75, PBR 和整合素受体。Fas/Apo-1/CD95 是一重要的凋亡递质, 诱导

表达 Fas 的细胞对 Fas-1 发生反应性凋亡。Saile et al<sup>[32]</sup>发现 HSCs 在培养期间, FasL 表达水平上升, 并与自身 Fas 结合成为凋亡激动和起始因子, 这可能是诱导自发凋亡的基本途径。p75 是低亲和性的神经生长因子(NGF)的典型受体。Trim et al<sup>[35]</sup>发现在静止状态的培养大鼠 HSCs 不表达 p75, 培养 7 d(活化)和 14 d(高度活化)则能检测到 p75 的表达, 且数量呈进行性增加。100 ng/mL NGF 作用 24 h 使激活的 HSCs 凋亡数量比仅用单纯血清培养的自然凋亡数高 1.5 倍。Fisher et al<sup>[36]</sup>研究了一种 PBR(peripheral benzodiazepine receptor)/PBR-L 介导的新的凋亡机制, 他涉及到培养的 HSCs 激活过程中, 外周苯二氮卓类受体(PBR)时间依赖性的表达。整合素也可以通过细胞凋亡而影响细胞的生存。整合素介导的 HSCs 和细胞外基质之间的相互作用被破坏诱导 HSCs 凋亡。Kato et al<sup>[37]</sup>发现纤维连接蛋白抑制整合素介导细胞黏附到 ECM, 能抑制原代 HSCs 的表型改变及使激活的 HSCs 恢复到静止的表型。此外, 还有许多细胞因子参与 HSCs 凋亡。Saile et al<sup>[38]</sup>实验显示, TGF- $\beta$  与静止的大鼠 HSCs 共育, 可使凋亡率提高 2.5 倍, 但能使活化的 HSCs 的 FasL 表达显著下调, 自发凋亡率降低  $53 \pm 8\%$  ( $P < 0.01$ )。TGF- $\beta$  作用后, Fas 激动性抗体诱导的 HSCs 凋亡率也由  $96 \pm 2\%$  降至  $51.2 \pm 6.7\%$  ( $P < 0.01$ )。TNF- $\alpha$  可使活化大鼠 HSCs 自发凋亡率降低  $28 \pm 2\%$  ( $P < 0.05$ ), 并使 Fas 激动抗体诱导的 HSCs 凋亡率由  $96 \pm 2\%$  降至  $58 \pm 2\%$  ( $P < 0.01$ )。在 HSCs 活化过程中, NF- $\kappa$ B 的 DNA 结合活性及转录活性增高, 可阻止细胞凋亡。Wright et al<sup>[39]</sup>研究表明, 高选择性 NF- $\kappa$ B 抑制剂支霉黏素可显著减少活化的 HSCs 数量, 降低肝纤维化大鼠肝内纤维间隔的平均宽度。

#### 5 肝纤维化的治疗

由于 HSCs 在肝纤维化中的中心作用, 故最近的抗纤维化治疗集中以 HSCs 为靶向, 其治疗策略包括<sup>[17, 40-44]</sup>。(1) 直接抑制 HSCs 活化; (2) 抑制 HSCs 的增生、纤维生成、收缩和 / 或炎症前反应; (3) 刺激 HSCs 的凋亡; (4) 通过刺激细胞产生基质蛋白酶类、下调他们的抑制剂, 或直接服用基质蛋白酶以增强瘢痕基质降解。

**5.1 HSCs 的活化抑制剂** 由于 HSCs 在纤维生成中的中心作用, 所以抑制 HSCs 活化成为一种独特的方法。最实用的途径是降低氧化压力, 其被认为是 HSCs 活化的刺激剂, 特别在酒精性肝病、C 型肝炎和铁超载性肝病。在体实验表明, 使用抗氧化剂能减少 C 型肝炎患者的 HSCs 激活, 并且抑制实验性铁超载的纤维生成。

IFN- $\gamma$  是培养的和肝纤维化动物模型中主要的 HSCs 活化的下调剂。由于其下调纤维生成的活性, 所以在肺纤维化<sup>[45]</sup>和抗病毒失败的 HCV 感染的晚期肝纤维化患者中进行控制性实验。

PPARs (peroxisome proliferator activator receptors) 是重要的肝脏代谢功能调节分子, 其功能改变与一些肝疾病

有相关性<sup>[46]</sup>. PPARs 有 3 种异构体 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$  和 PPAR $\gamma$ . 在人的 HSCs 的细胞体外研究中证实静止状态人类 HSCs 表达 PPAR $\gamma$ , 而活化状态的 HSCs 表达明显减少<sup>[47]</sup>. 因此, PPAR $\gamma$  可能在维持 HSCs 作为静止状态的表型上具有重要作用, PPAR $\gamma$  表达减少与 HSCs 激活密切相关. PPAR $\gamma$  能有效阻止 PDGF 对 HSCs 的激活增生作用<sup>[48]</sup>. PPAR $\gamma$  激动剂 15-dPGJ2 和 BRL49653 能使下调 HSCs 的激活<sup>[47, 49]</sup>.

激活的 HSCs 产生 Leptin, 后者不仅能影响脂质代谢, 而且还直接影响损伤愈合<sup>[50]</sup>. 据报道, Leptin 缺陷的动物肝损伤和肝纤维化程度较轻<sup>[51-52]</sup>.

5.2 抑制 HSCs 的增生、纤维生成、收缩功能或炎症前反应 活化的 HSCs 的下游反应主要受 PDGF 和 ET 等细胞因子控制. 这些促增生的细胞因子如 PDGF, 配体的拮抗剂以及他们的受体都是潜在的治疗策略靶向. 目前 TGF- $\beta$ 1 拮抗剂正受到普遍关注, 因为这种重要的细胞因子在抑制基质产生和加速基质降解两方面均有作用. 日本学者经门静脉注入截短型的 TGF- $\beta$ 1 受体以阻断其信号传导, 结果发现 DMN 大鼠肝脏羟脯氨酸含量降低, 肝组织学上纤维化减轻<sup>[53]</sup>. 据实验研究 PDGF 受体酪氨酸激酶抑制剂 ST1571<sup>[54]</sup>、SU-5874<sup>[55]</sup> 和 AG1259<sup>[56]</sup> 可抑制 HSCs 趋化和增生. 近年来有发现 AT $_1$ R 拮抗剂 Candesartan<sup>[57]</sup> 对 HSCs 的激活和转化有抑制作用. ET-1 是 HSCs 媒介的伤口收缩和血流调节的重要因子. 实验证明在肝脏损伤过程中 ET-1 在局部增多<sup>[59]</sup> 和受体表达上调<sup>[19]</sup>, 从而 HSCs 收缩增强并导致肝窦收缩增强和肝内血流阻力增高, 加重肝纤维化的进展. 混合的 ETA 和 ETB 受体拮抗剂在实验性肝纤维化中有抗纤维生成活性和减少 HSCs 活化的作用. 运输至受损肝区的 NO 与 ET-1 抑制剂的作用相同<sup>[58-61]</sup>. Fiorucci et al<sup>[62]</sup> 实验证明能选择性地在活体肝脏释放 NO 的化合物 NCX-1 000 可以调节 HSCs 的收缩性, 降低肝脏的门静脉压力.

5.3 刺激 HSCs 凋亡 通过促进 HSCs 凋亡从受损肝区移走活化的 HSCs 是另一种治疗的潜在方向. 活化的 HSCs 的凋亡在不同的实验纤维化模型自行恢复过程中起重要作用(如应用 CCl $_4$  和胆管结扎所致的纤维化模型)<sup>[31]</sup>. 相反, 凋亡抵抗和随之而来的活化的 HSCs 生存期延长会导致肝纤维化不断进展. 在动物实验中观察到曲霉毒素能选择性促进 HSCs 凋亡, 使纤维化程度减轻<sup>[39]</sup>. 另外, TIMP-1 表达和凋亡抵抗有明显关系, 肝内 TIMP 活性下降有促进基质降解和 HSCs 凋亡的双重作用.

5.4 增强瘢痕基质降解 这种治疗非常重要, 因为在人类肝病中抗纤维化治疗除防止形成新瘢痕沉积之外, 也需要促进已存在的基质的吸收. HSCs 和周围 ECM 相互作用的药理学调节能限制肝纤维化. TGF- $\beta$  拮抗剂通过下调 TIMPs 和增强间质胶原酶的纯活性刺激基质降解. 在鼠肝硬化模型中, 单独静脉投给尿激酶型纤维蛋白溶解原活化剂, 可导致纤维化逆转及随后的肝细胞再生和肝功能改善.

总之, HSCs 的活化是肝纤维化形成的关键, HSCs 活化后合成的大量 ECM 是肝纤维化形成的最直接原因, 所有有关 HSCs 研究的最终目的是寻找治疗肝纤维化的有效疗法. 尽管目前对 HSCs 的研究已取得实质性进展, 但仍有许多问题尚未解答或有待进一步阐明, 如(1)肝纤维化的分子调节机制; (2)肝纤维化的基因治疗; (3)不同类型肝病的肝纤维化的具体发病机制; (4)肝纤维化逆转的控制因素; (5)特异性释放药物到达活化的 HSCs 的载体; (6)加速进行一些制剂的有效性和安全性的临床实验评估. 各国科学家从肝纤维化发生、发展的不同环节入手研制抗纤维化药物, 已相继找到不少有治疗前景的药物. 最有前景的治疗药物包括抗氧化剂、细胞因子调节剂和血管收缩剂, 中草药在抗肝纤维化治疗中具有一定优势, 多种复方及单药、单体的研究证明可有效抑制 HSCs 活化、增生、ECM 合成, 促进胶原分解. 未来还要加强这方面的努力, 以期最终攻克肝纤维化.

## 6 ■ 参考文献

- Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGF $\beta$ 1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* 1999;30:77-87
- Neubauer K, Saile B, Ramadori G. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. *Can J Gastroenterol* 2001;15:187-193
- Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d808-826
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250
- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:311-335
- Burt AD. Pathobiology of hepatic stellate cells. *J Gastroenterol* 1999;34:299-304
- Eng FJ, Friedman SL. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G7-G11
- 展玉涛, 展承英, 陈颖伟, 李定国. 肝星状细胞与肝纤维化. *临床肝胆病杂志* 2000;16:71-73
- Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation. *Med Gen Med* 2002;4:27
- Brenner DA, Waterboer T, Choi SK, Lindquist JN, Stefanovic B, Burchardt E, Yamauchi M, Gillan A, Rippe RA. New aspects of hepatic fibrosis. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):32-38
- Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:397-416
- Rockey DC. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 2001;21:337-349
- Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, Vidaud M, Segarini P, Bedossa P. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2002;82:767-774
- 谢彦华, 刘春荣. 基质金属蛋白酶抑制剂与肝纤维化. *临床荟萃* 2002;17:493-495
- Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
- Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245-249
- Albanis E, Safadi R, Friedman SL. Treatment of hepatic fibrosis: almost there. *Curr Gastroenterol Rep* 2003;5:48-56
- Pinzani M, Gentilini P. Biology of hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1999;19:397-410
- Yokomori H, Oda M, Ogi M, Kamegaya Y, Tsukada N, Nakamura M, Ishii H. Enhanced expression of endothelin receptor subtypes in cirrhotic rat liver. *Liver* 2001;21:114-122

- 20 Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbis MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;118:1149-1156
- 21 Gorbis MN, Gines P, Bataller R, Nicolas JM, Garcia-Ramallo E, Tobias E, Titos E, Rey MJ, Claria J, Arroyo V, Rodes J. Atrial natriuretic peptide antagonizes endothelin-induced calcium increase and cell contraction in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;30:501-509
- 22 赵俊芳, 刘成, 刘成海. 转化生长因子 $\beta$ 胞内信号转导与 Smads 蛋白. *中国病理生理杂志* 2002;18:321-325
- 23 Bauer M, Schuppan D. TGF $\beta$ 1 in liver fibrosis: time to change paradigms? *FEBS Lett* 2001;502:1-3
- 24 Zimmerman CM, Padgett RW. Transforming growth factor beta signaling mediators and modulators. *Gene* 2000;249:17-30
- 25 Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF- $\beta$  signaling. *J Cell Sci* 2000;113 ( Pt 7):1101-1109
- 26 Whitman M. Smads and early developmental signaling by the TGF $\beta$  superfamily. *Genes Dev* 1998;12:2445-2462
- 27 Correia JJ, Chacko BM, Lam SS, Lin K. Sedimentation studies reveal a direct role of phosphorylation in Smad3:Smad4 homo- and hetero-trimerization. *Biochemistry* 2001;40:1473-1482
- 28 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF- $\beta$  in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-807
- 29 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
- 30 Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- $\beta$ /Smad signaling system. *EMBO J* 2000;19:1745-1754
- 31 Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001;21:427-436
- 32 Saile B, Knittel T, Matthes N, Schott P, Ramadori G. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997;151:1265-1272
- 33 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
- 34 Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000;33:49-58
- 35 Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, Wilkins B, Iredale J. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 2000;156:1235-1243
- 36 Fischer R, Schmitt M, Bode JG, Haussinger D. Expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and apoptosis induction in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2001;120:1212-1226
- 37 Kato R, Kamiya S, Ueki M, Yajima H, Ishii T, Nakamura H, Katayama T, Fukai F. The fibronectin-derived antiadhesive peptides suppress the myofibroblastic conversion of rat hepatic stellate cells. *Exp Cell Res* 2001;265:54-63
- 38 Saile B, Matthes N, Knittel T, Ramadori G. Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;30:196-202
- 39 Wright MC, Issa R, Smart DE, Trim N, Murray GI, Primrose JN, Arthur MJ, Iredale JP, Mann DA. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2001;121:685-698
- 40 Bedossa P, Paradis V. Regression of hepatic fibrosis: physiological aspects and clinical reality. *Presse Med* 2003;32:704-710
- 41 Murphy F, Arthur M, Iredale J. Developing strategies for liver fibrosis treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:1575-1585
- 42 Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001;5:315-334
- 43 Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;277:11069-11076
- 44 Rockey DC. The cell and molecular biology of hepatic fibrogenesis. Clinical and therapeutic implications. *Clin Liver Dis* 2000;4:319-355
- 45 King TE Jr. Interferon gamma-1b for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2000;342:974-975
- 46 Everett L, Galli A, Crabb D. The role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. *Liver* 2000;20:191-199
- 47 Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF Jr, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000;275:35715-35722
- 48 Galli A, Crabb D, Price D, Ceni E, Salzano R, Surrenti C, Casini A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional regulation is involved in platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:101-108
- 49 Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, Bonacchi A, Caporale R, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;119:466-478
- 50 Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin Invest* 2000;106:501-509
- 51 Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002;35:762-771
- 52 Leclercq IA, Farrell GC, Schriener R, Robertson GR. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol* 2002;37:206-213
- 53 Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000;32:247-255
- 54 Kinnman N, Hultcrantz R, Barbu V, Rey C, Wendum D, Poupon R, Housset C. PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Lab Invest* 2000;80:697-707
- 55 Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo XZ, Baer HU, Buchler MW. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver* 2000;20:296-304
- 56 Iwamoto H, Nakamura M, Tada S, Sugimoto R, Enjoji M, Nawata H. Platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor AG1295 attenuates rat hepatic stellate cell growth. *J Lab Clin Med* 2000;135:406-412
- 57 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshiji I, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Fukui H. Angiotensin-II induces the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 through the protein kinase-C signaling pathway in rat liver fibrosis development. *Hepatol Res* 2003;27:51-56
- 58 Shao R, Rockey DC. Effects of endothelins on hepatic stellate cell synthesis of endothelin-1 during hepatic wound healing. *J Cell Physiol* 2002;191:342-350
- 59 Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000;105:741-748
- 60 Van de Casteele M, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, Fevery J. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetized carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 2002;51:440-445
- 61 Criado M, Flores O, Vazquez MJ, Esteller A. Role of prostanooids and nitric oxide inhibition in rats with experimental hepatic fibrosis. *J Physiol Biochem* 2000;56:181-188
- 62 Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, Palazzetti B, Tallet D, del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8897-8902



# $^{14}\text{C}$ -氨基比林呼气试验在肝脏疾病中的应用

唐恭顺, 匡安仁

唐恭顺, 匡安仁, 四川大学华西医院核医学科 四川省成都市 610041  
项目负责人: 匡安仁, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院核医学科.  
tgs028@hotmail.com  
电话: 028-85422400 传真: 028-85422696  
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

肝脏是药物代谢解毒器官, 药物介入肝功能试验包括肝细胞微粒体、线粒体和细胞质功能试验三类。 $^{14}\text{C}$ -氨基比林在肝细胞微粒体代谢,  $^{14}\text{C}$ -氨基比林呼气试验(ABT)定量反映肝细胞功能, ABT值与肝组织学损害严重程度和病情严重程度密切相关。肝炎、肝硬化、酒精性肝病、脂肪肝和肝癌时ABT值降低, 原发性胆汁性肝硬化早期ABT值正常。ABT可及早发现肝移植术后排斥反应, 可作为肝动脉栓塞化疗术、门腔分流术及药物治疗效果随访手段。ABT是门脉性肝硬化、酒精性肝病、肝移植术的预后因子。 $^{14}\text{C}$ -氨基比林呼气试验安全、价廉、方便、非侵入, 有望临床常规使用。

唐恭顺, 匡安仁.  $^{14}\text{C}$ -氨基比林呼气试验在肝脏疾病中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1184-1187

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1184.asp>

## 0 引言

肝脏代谢药物的能力可作为肝功能指标。 $^{14}\text{C}$ -氨基比林在肝细胞微粒体内代谢, 其代谢过程反映肝细胞微粒体功能。1975年便有人用口服 $^{14}\text{C}$ -氨基比林法, 测定呼出气 $^{14}\text{CO}_2$ , 获得肝病患者的药物定量肝代谢功能、诊断肝脏疾病、随访疗效、估计预后<sup>[1]</sup>。但目前临床上仍未普遍开展 $^{14}\text{C}$ -氨基比林呼气试验(ABT)。

同时, 肝脏疾病是危害人类健康的重要疾病群, 全世界约有3.5亿人呈乙肝病毒持续感染状态, 美国2000年死于肝硬化和肝癌者达26 552人, 居死因的第12位<sup>[2]</sup>。

因此, 本文以ABT或aminopyrine breath test为关键词, 从PubMed和OVID数据库收集筛选文献, 借助四川大学图书馆医学馆刊物, 综述ABT的临床研究成果和存在的问题。

## 1 原理和方法

1.1 药物定量肝功能试验 不同药物有不同代谢途径, 反映不同方面的肝细胞功能, 现有的药物定量肝功能试验可分为三类。

1.1.1 肝细胞微粒体功能 (1)非选择性细胞色素P450功能试验: 氨基比林呼气试验、安替比林呼吸试验、三

甲双酮试验。(2)选择性细胞色素P450功能试验: 氯唑沙宗呼吸试验、非那西丁呼吸试验、乙酰胺甲氧基苯呼吸试验、咖啡因呼吸试验、安定呼吸试验、红霉素呼吸试验、利多卡因呼吸试验、咪唑安定呼吸试验。1.1.2 肝细胞质功能 半乳糖呼吸试验和苯丙氨酸呼吸试验。代谢发生在细胞质, 因而反映细胞质功能。

1.1.3 肝细胞线粒体功能  $\alpha$ -酮戊二酸呼吸试验和蛋氨酸呼吸试验。常用于评价酒精导致的肝细胞线粒体损害。

## 1.2 ABT

1.2.1 氨基比林代谢 氨基比林体内过程和代谢已较清楚。口服氨基比林后, 血药峰时1.5 h, 生物半衰期2-3 h, 血浆蛋白结合率15%。氨基比林主要在肝细胞微粒体代谢, 经细胞色素P450同功酶系, 特别是UT-2、UT-4、PB-4和MC-5代谢, 原形排除很少<sup>[3]</sup>。 $^{14}\text{C}$ 标记在氨基比林的氮甲基上,  $^{14}\text{C}$ -氨基比林和氨基比林的化学性质、生物学行为完全相同。主要代谢途径: (1) N-去甲基化形成4-甲氨基安替比林、4-氨基安替比林和甲醛。甲醛又进一步氧化为重碳酸盐, 其中30%的重碳酸盐以 $^{14}\text{CO}_2$ 形式呼出, 其余储存于体内。(2)酰化形成4-乙酰氨基安替比林和4-甲酰氨基安替比林。N-去甲基化是氨基比林代谢的限速步骤<sup>[4]</sup>。

一般认为, 4-甲氨基安替比林MAA是微粒体产生的主要代谢物<sup>[3]</sup>。但也有证据表明口服氨基比林后24 h尿中4-乙酰氨基安替比林含量最高<sup>[5]</sup>。

1.2.2 ABT方法 (1)口服 $^{14}\text{C}$ -氨基比林(0.5-2  $\mu\text{Ci}$ )后, 30-120 min某时点令受试者向液闪瓶内(海胺2 mL, 乙醇2 mL)吹气。当2 mmol的 $\text{CO}_2$ 与海胺完全反应pH小于9时, 指示剂百里酚酞(thymolphthalein)由蓝色变为无色。(2)测定出每mmol  $\text{CO}_2$ 中 $^{14}\text{CO}_2$ 的放射性计数。(3)由每小时每公斤体重平均产生9 mmol内源性 $\text{CO}_2$ , 计算出累计2 h(或其他时段)呼出气的放射性计数。(4)求出累计2 h(或其他时段)呼出气放射性计数占给予量的百分比<sup>[1]</sup>。百分比法是目前最常用的计算方法, ABT值正常范围界于5-10%间, 各实验室应建立自己的正常值。

## 2 临床应用

2.1 慢性肝炎 ABT值降低是由于慢性肝炎时肝细胞损害、肝纤维化。肝组织病损越重, ABT值越低。慢性肝炎患者ABT值与肝组织炎症、纤维化分级和Child-Pugh评分明显相关<sup>[6]</sup>。慢性活动性肝炎较慢性迁延性肝炎ABT值降低更明显。

2.2 门脉性肝硬化

2.2.1 ABT与肝硬化严重程度 大量报道肝硬化患者ABT值明显低于正常人. 肝组织纤维化评分与ABT值呈负相关<sup>[7]</sup>.

肝硬化的确诊和组织学损害严重程度的判断以肝活检为金标准, 该法患者不易接受. 肝功能损害严重程度常用 Child-Pugh 评分表示, 临床医师又以有无腹水、肝性脑病、门脉高压将肝硬化分为代偿期和非代偿期. 寻找一种能诊断肝硬化、与肝硬化组织学损害程度平行、与 Child-Pugh 评分呈正相关, 代偿期和非代偿期有较大差异的无创性检查是临床医生的愿望. 门脉性肝硬化患者肝细胞数量减少, ABT值下降, 较好地满足了这一需求. 如果ABT与传统肝生化检查、超声检查相结合, 能更好地达到这一目的.

2.2.2 疗效评价 ABT反映术后肝功能变化比其他方法灵敏. Horsmans et al<sup>[8]</sup>报道, 门腔静脉分流术后 6-12 mo ABT值明显下降, 12-24 mo 间保持稳定. 而同期凝血酶原时间、血清白蛋白、胆红素无明显改变.

ABT可评价肝硬化经颈静脉肝内门体支架分流术疗效<sup>[9]</sup>. 如术后门静脉压力下降, ABT值没有明显变化, 说明疗效好、未损害肝功能.

2.2.3 预后评价 理想的预后分析模型是仅用几个主要因素正确判断患者预后, 并能通过观察这几个因素的变化, 研究某种处理方案的有效性. ABT反映肝硬化患者肝细胞残留数量, 是独立的预后因素, 是预后分析模型的理想指标<sup>[10]</sup>.

定期测定ABT对评价预后具有重要意义. 进展期肝硬化患者ABT值进行性下降, 到死前 1a, ABT下降更明显<sup>[10]</sup>. 建议每 4-6 mo 测定 1 次.

ABT值也用于评价门腔静脉分流术预后, 术后生存 1 a 以上者术前ABT值明显高于 1 a 以下者<sup>[8]</sup>.

2.3 慢性肝炎和肝硬化的鉴别诊断 慢性肝炎是否有肝硬化是临床医生面临的难题, 只有肝活检才能明确诊断. ABT可无创性提示慢性肝炎和肝硬化. 通常ABT值轻度降低时慢性肝炎可能性大, 明显降低时肝硬化可能性较大.

文献显示, 持续丙型肝炎病毒感染者, ABT值在肝组织学正常、炎变、硬化三组间有较大差距( $P < 0.005$ )<sup>[7]</sup>.

2.4 酒精性肝病 酒精使肝细胞线粒体损害. 长期饮酒使肝细胞脂肪变性, 继之酒精性肝炎、肝细胞坏死、纤维化、肝硬化, 重者出现肝功能衰竭.

2.4.1 酒精代谢过程 饮入酒精主要在小肠吸收, 经肝细胞质内乙醇脱氢酶作用生成乙醛, 再经胞质乙醛脱氢酶1和线粒体乙醛脱氢酶2作用生成乙酸, 最终生成 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ <sup>[11]</sup>. 一般认为乙醛脱氢酶2是限速酶, 但也有人认为乙醇代谢率决定于肝功能, 而不是乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶.

2.4.2 ABT用于诊断 长期饮酒无肝硬化者ABT值增加, 有酒精性肝硬化时ABT值降低<sup>[12]</sup>, 但血清酶学指标和血浆蛋白不能鉴别饮酒者有无肝硬化.

2.4.3 评价病损程度 ABT值与酒精性肝病组织学损害严重程度平行<sup>[13]</sup>.

2.4.4 评价预后 ABT值是预后因素, ABT值越高, 预后越好. ABT值小于 1%、1-2%、大于 2% 三组的 4 a 生存率分别是 17%, 35%, 68%. 酒精性肝硬化ABT值大于 2% 者 1 a 死亡率仅 11%, 小于 2% 者达 53.5%<sup>[14]</sup>.

2.4.5 评价疗效 戒酒改善肝功能可用ABT评价. 酒精性代偿性肝硬化者戒酒 1 wk 后, ABT值明显增加<sup>[13]</sup>. 戒酒数年后ABT值增加 0.14%<sup>[15]</sup>.

ABT可用于评价肝药物代谢能力. 苯巴比妥能诱导正常人氨基比林代谢, 不能使酒精性肝硬化ABT值回升, 因肝脏已耗尽对氨基比林的代谢储备能力.

双硫仑戒酒是因其抑制乙醛脱氢酶活性, 使血中乙醛增多. 乙醛导致正常人恶心、外周血管阻力下降使血压下降、心输出量增加出现心悸和面色潮红. 但服用双硫仑后的症状个体差异很大, 且通常不能使酒精性肝病患者出现上述症状, 误导用药. 乙醛增多使ABT值增高且二者相关性好, 双硫仑治疗中ABT值和血浆乙醛浓度呈正相关. 由于ABT简便、间接反映血浆乙醛浓度, 可用于指示双硫仑已用量、监测和预防双硫仑-乙醛中毒.

2.5 原发性胆汁性肝硬化 原发性胆汁性肝硬化是原因不明的肝内胆道疾病. 胆汁郁积不影响氨基比林代谢, ABT用于诊断胆汁淤积性疾病作用有限. 原发性胆汁性肝硬化早期ABT正常, 后期肝细胞衰竭时ABT值明显降低.

ABT可用于鉴别胆汁淤积和肝细胞疾病. 高胆红素血症时, 如果ABT值降低, 则说明是肝细胞疾病, 如果ABT正常则可能是胆汁淤积性肝病. ABT不是原发性胆汁性肝硬化的预后指标<sup>[16]</sup>.

2.6 脂肪肝 包括非酒精性脂肪肝炎(steatohepatitis)和非酒精性脂肪肝病(NASH). 肥胖、糖尿病、高甘油三酯血症等是脂肪肝的危险因素<sup>[17]</sup>. 脂肪肝肝功能可用ABT、血清胆红素、白蛋白、凝血酶原时间评价.

由于细胞色素P450酶系活性降低, 脂肪肝 $^{14}\text{C}$ 排出速度减慢,  $^{14}\text{CO}_2$ 排除率较正常人低<sup>[1]</sup>.

2.7 原发性肝癌 原发性肝细胞癌术前一般是依据CT进行分期, 再结合体征和症状进行综合考虑是否手术. 术前决策时有一部分患者处于“灰色区域”, 手术的风险是术后肝功能衰竭, 此时用ABT可以帮助决定是否手术.

ABT可用于评价肝动脉栓塞化疗术(TACE)安全性, Bianco et al<sup>[18]</sup>观察到15例肝硬化合并肝癌患者TACE术前和术后 1 d、7 d 的ABT值无明显改变, 因此认为TACE安全.

ABT反映肝细胞药物代谢能力, 一般认为TACE术后需待ABT正常才能行肝部分切除术.

2.8 肝移植

2.8.1 排异反应 肝移植术后无排异反应时, ABT值进行性增加; 发生排异反应时, ABT值降低<sup>[19]</sup>.

ABT 诊断排异反应比其他指标灵敏, 推荐术后连续检测 ABT 值<sup>[20]</sup>. 转氨酶、胆红素、凝血酶原时间、胆汁排出和体温变化无明显规律. 排异反应者用甲基强的松龙治疗好转后 ABT 值恢复正常. 因此 ABT 可用于监测排异反应的疗效.

2.8.2 预后 研究表明, ABT 预测移植术后与腹水和 Child-Puff 评分相当甚至更好<sup>[21-22]</sup>.

### 3 ABT 的影响因素

慢性肝病患者的近期用药情况、并发症有无、一般情况和基础代谢水平等因素影响 ABT, 解释结果时应注意如下因素.

3.1 近期用药 许多药物和环境因素干扰 ABT. 如苯巴比妥、导眠能、苯妥英、类固醇、螺内酯、双硫仑诱导氨基比林去甲基化, 使 ABT 值增加. 相反, 甲氟咪胍、别嘌呤醇、阿苯达唑、细胞增生抑制药、干扰素、流行性感胃接种、接触杀虫剂、外源性雌性激素抑制氨基比林去甲基化, 使 ABT 值降低<sup>[23]</sup>.

3.2 基础代谢率 ABT 受基础代谢率的影响较大. <sup>14</sup>C-氨基比林的终末代谢产物 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 将溶入机体 CO<sub>2</sub> 中央池, 因此机体实际内源性 CO<sub>2</sub> 产量影响 ABT 的结果. 例如强体力活动、发热、甲亢、进餐使 ABT 值增加, 睡眠不足、甲低、低温使 ABT 值降低.

3.3 并发症 肝硬化并发充血性心力衰竭和慢性肾功能不全时, ABT 值降低.

3.4 生活习惯 吸烟使 ABT 值增加. 酒精抑制氨基比林去甲基化, 饮酒后 ABT 值降低<sup>[24]</sup>. 作 ABT 前应当告诉患者禁烟酒.

3.5 年龄和性别 成人随年龄增长 ABT 值逐渐降低, 性别间 ABT 无差异. 婴儿 ABT 值与年龄呈正相关, 且男婴 ABT 明显高于女婴. 建议各实验室应建立不同年龄段儿童 ABT 正常值.

3.6 营养状况 慢性肝病伴营养不良者很常见, 其与 ABT 的关系尚不清楚. 有人认为营养不良, 特别是蛋白质摄入不足可使安替比林、茶碱清除率减低, 但目前文献数量有限<sup>[25-26]</sup>.

另外, 胃肠功能也影响口服给药法 ABT 值.

### 4 安全性

ABT 安全, 同一个受试者可以重复检查. 有报道长期服用氨基比林可导致 1/40 000 患者粒细胞缺乏. ABT 口服的氨基比林仅有  $5 \times 10^{-6}$  -  $1 \times 10^{-5}$  mmol/L, 未见引起粒细胞缺乏的报道. 一次 ABT, 每个受试者仅接受 0.5-2.5 mrem 照射, 低于 1 次胸透辐照量<sup>[15]</sup>.

肝脏疾病肝细胞损害时 ABT 值降低, ABT 值与病情严重程度、肝脏组织学损害程度密切相关. ABT 可用于随访疗效和评价预后. ABT 简便、无创、廉价、安全, 有望成为临床常规项目.

目前 ABT 临床应用不普遍的原因可能与如下因素

有关: (1) 支持依据研究数量不足: 作为诊断性试验, 缺乏前瞻性具有活检资料的大样本多中心研究结果; 作为评价药物、手术、戒酒后的疗效指标研究例数太少, 并缺乏与常规生化指标评价疗效时的对比研究和相关性研究; 作为预后因素, 应有依据支持 ABT 是各种预后因素中的最佳因素之一, 能准确估计预后, 并能反映病毒性或酒精性肝病的病理生理和病损程度. (2) 技术因素: 必须使用液闪仪; 受检者需等待 30 min-2 h.

我们面临如下问题: 药物定量肝功能试验种类多, 应选择哪一种进行深入研究? ABT 能否作为肝穿刺活检前的筛选试验? ABT 能否鉴别诊断肝硬化代偿期和失代偿期? ABT 可引用的近期研究文献较少, 我们应进一步丰富 ABT 用于各种肝病诊断、疗效随访、预后价值的研究, 为 meta 分析提供材料.

### 5 参考文献

- 1 Hepner GW, Vesell ES. Quantitative assessment of hepatic function by breath analysis after oral administration of (<sup>14</sup>C) aminopyrine. *Ann Intern Med* 1975;83:632-638
- 2 Minino AM, Arias E, Kochanek KD, Murphy SL, Smith BL. Deaths: final data for 2000. *Natl Vital Stat Rep* 2002;50:1-119
- 3 Imaoka S, Inoue K, Funae Y. Aminopyrine metabolism by multiple forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes: simultaneous quantitation of four aminopyrine metabolites by high-performance liquid chromatography. *Arch Biochem Biophys* 1988;265:159-170
- 4 Slusher LB, Park SS, Gelboin HV, Vesell ES. Studies on the metabolism of aminopyrine, antipyrine and theophylline using monoclonal antibodies to cytochrome P-450 isozymes purified from rat liver. *Biochem Pharmacol* 1987;36:2359-2367
- 5 Agundez JA, Martinez C, Benitez J. Metabolism of aminopyrine and derivatives in man: in vivo study of monomeric and polymorphic metabolic pathways. *Xenobiotica* 1995;25:417-427
- 6 Herold C, Heinz R, Niedobitek G, Schneider T, Hahn EG, Schuppan D. Quantitative testing of liver function in relation to fibrosis in patients with chronic hepatitis B and C. *Liver* 2001;21:260-265
- 7 Giannini E, Fasoli A, Chiarbonello B, Malfatti F, Romagnoli P, Botta F, Testa E, Polegato S, Fumagalli A, Testa R. <sup>13</sup>C-aminopyrine breath test to evaluate severity of disease in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:717-725
- 8 Horsmans Y, Lejeune D, Geubel AP, Otte JB, Pauwels S. Hepatic [<sup>14</sup>C]aminopyrine demethylation capacity after portocaval shunting. Comparative study in patients with and without arterialization of portal vein. *Dig Dis Sci* 1993;38:2177-2182
- 9 Baron A, Gulberg V, Sauter G, Waggenshauser T, Reiser M, Gerbes AL. Effects of transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) on quantitative liver function tests. *Hepatogastroenterology* 1998;45:2315-2321
- 10 Merkel C, Morabito A, Sacerdoti D, Bolognesi M, Angeli P, Gatta A. Updating prognosis of cirrhosis by Cox's regression model using Child-Pugh score and aminopyrine breath test as time-dependent covariates. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998;30:276-282
- 11 Li TK, Yin SJ, Crabb DW, O'Connor S, Ramchandani VA. Genetic and environmental influences on alcohol metabolism in humans. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:136-144
- 12 Lewis KO, Nicholson G, Lance P, Paton A. Aminopyrine breath test in alcoholic liver disease and in patients on enzyme-inducing drugs. *J Clin Pathol* 1977;30:1040-1043
- 13 Saunders JB, Lewis KO, Paton A. Early diagnosis of alcoholic cirrhosis by the aminopyrine breath test. *Gastroenterology* 1980;79:112-114

# 肿瘤标志物的蛋白质组学

翁永强, 邱双健, 刘银坤, 汤钊猷

翁永强, 邱双健, 刘银坤, 汤钊猷, 复旦大学肝癌研究所 上海市 200032  
项目负责人: 邱双健, 200032, 上海市医学院路, 复旦大学肝癌研究所.  
wyq1415@sh163.net  
电话: 021-64041990 传真: 021-64037181  
收稿日期: 2003-10-27 接受日期: 2004-01-08

## 摘要

随着蛋白质组学概念的提出及其技术的不断发展,人们可以从细胞蛋白整体水平研究肿瘤的发病机制,寻找肿瘤诊断和预后的特异性标志.蛋白质组学表达模式研究的技术包括用于蛋白质分离的双向凝胶电泳,用于鉴定的质谱分析及用于蛋白质对比研究的数据库,这些技术正应用于肿瘤标志物的寻找和鉴定.人们已在肾细胞癌中找到相关的诊断标志,并建立了膀胱癌相关蛋白数据库;在肝癌研究中也发现了大量可能用于早期诊断和肿瘤分型的蛋白;在肺癌早期可检测“恶性”蛋白信号,预测肿瘤发生和观察化疗效果;在卵巢肿瘤中联合应用筛选的肿瘤标志和CA125可明显提高肿瘤的检出率;另外蛋白质组学方法在乳腺癌、结肠癌、白血病等疾病研究中的应用也日益广泛.尽管这项技术仍有不足,但他在不断完善,使我们能发现更多敏感、特异的肿瘤标志物.

翁永强, 邱双健, 刘银坤, 汤钊猷. 肿瘤标志物的蛋白质组学. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1188-1190

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1188.asp>

## 0 引言

恶性肿瘤是一种多基因参与的复杂疾病.其基因表达分析涉及转录组及蛋白质组学方法.随着1994年Winkins提出蛋白质组学的概念和近期人类基因组计划的完成,生命科学已进入后基因时代,人们从组织和细胞蛋白整体水平研究肿瘤成为可能.因此用蛋白质组学方法从整体上研究肿瘤地发病机制,寻找肿瘤诊断和预后的特异性标记以及药物治疗的靶标已成为近期研究的热点<sup>[1-3]</sup>.

## 1 蛋白质组学研究的技术

蛋白质组学研究涉及蛋白质表达模式研究和功能模式研究,目前以前者研究较为集中.蛋白质表达模式研究的支撑技术主要有蛋白质的分离、鉴定技术和生物信息学.其中蛋白质的分离技术有O'Farrell于1975年创立的双向凝胶电泳(2DE),目前已发展到固相pH梯度(IPG)凝胶电泳、双向高效柱层析技术以及毛细管电泳法.2DE技术仍在不断地完善和改进中,如Pharmacia公司

的2DE-MS自动化系统及第二相电泳中,6-12块胶同时电泳的Ettan系统.

蛋白质的鉴定技术主要为质谱法(MS),即利用样品离子化后,离子间的质荷比(m/z)的差异来分析确定样品的分子质量.现最常用的有两种,即电喷雾质谱(ESI-MS)和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS).

近来出现所谓第二代蛋白质组学研究方法为蛋白质精确定量开辟了新的途径.这些方法包括荧光差异显示双向电泳(fluorescence 2D differential gel-electrophoresis, F-2D DIGE)、Gygi建立的同位素亲和标签(isotope-coded-affinity tag, ICAT)和蛋白芯片等.为克服2D-MS系统的局限性,还出现液质联用技术:液相色谱-电喷雾质谱联用(LC-MS-MS)、电喷雾串联质谱(ESI-MS-MS)、多维色谱技术和多维蛋白质鉴定技术.

生物信息学应用于构建和分析2D电泳图谱及数据库的搜索和构建.目前应用最为普遍的是SWISS-PROT和GENPETP等组成的NRDB数据库及由美国国家生物技术信息中心/欧洲生物信息学研究所(NCBI/EBI)共同编辑的dbEST数据库.

## 2 蛋白质组学技术在肿瘤标志物研究中的应用

2003-03在美国圣巴巴拉召开的“肿瘤标志物:从发现到应用”会议上,大会主席Herbert A回顾总结了近年来生物技术发展对新的肿瘤标志物发现的作用时,认为2D电泳结合MS、高压液相分析(HPLC)、表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS),LC-MS-MS等技术使人们可以从蛋白质水平分析潜在的肿瘤标志物,从而使新标志物的发现提升到一个更高的水平<sup>[4]</sup>.

应用差异蛋白质组学技术可以比较肿瘤和正常细胞之间的蛋白质组异同,从而发现肿瘤特异性蛋白,找到肿瘤标志物,这是近期研究中的热点.

Sarto et al<sup>[5]</sup>将10个肾细胞癌组织和10个正常肾组织的蛋白质双向电泳图谱进行对比分析,发现有4种蛋白质在肾癌中缺失,而谷胱甘肽过氧化物酶两种异构体、锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)单体只出现在正常组织中,Mn-SOD多聚体只出现在肿瘤组织中,通过生物信息学进一步分析发现,该蛋白质表达变化与染色体变化存在着相关性,认为这种蛋白可以作为肾细胞癌的诊断标志物.

Celis et al<sup>[6]</sup>采用2D电泳、微量蛋白质测序、MS、冰冻切片免疫荧光检测等方法对膀胱癌组织和原代培养的膀胱癌细胞进行研究, 从中发现20多个膀胱癌相关蛋白, 建立了膀胱癌蛋白质的数据库, 该库可以提供2D电泳凝胶图象、蛋白质的生物特性及与疾病进程的关系. 他们对膀胱鳞状细胞癌患者进行随访, 通过尿液中蛋白质组学变化判断有否肿瘤转移, 并发现特异性肿瘤标志物.

肝细胞肝癌(HCC)的肿瘤标志物研究较多, 除了临床最常用的甲胎蛋白(AFP)外<sup>[7]</sup>, 还包括癌胚抗原(CEA)、铁蛋白、 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶、 $\gamma$ -GT、组织多肽受体、肝细胞生长因子(HGF)等<sup>[8]</sup>. 目前肝癌标志物的蛋白质组学研究进展较快. Yu et al<sup>[9]</sup>对照正常肝细胞系L-02和肝癌细胞BEL7404, 发现了99种蛋白质点在表达的质和量上有显著差异; Seow et al<sup>[10]</sup>用蛋白质组学方法研究肝癌细胞株HCC-M蛋白, 分析了408个点, 除发现部分看家蛋白外, 还分析与癌变相关蛋白, 如14-3-3蛋白、连接素(annexin)、抑制素(prohibitin)等; Ou et al<sup>[11]</sup>对其中301个点进行MALDI-TOF-MS分析, 建立了HCC-M蛋白表达数据库; Poon et al<sup>[12]</sup>用全蛋白组表达谱(comprehensive proteomic profiling)方法分析肝细胞肝癌(HCC)患者及慢性肝病患者的血清, 发现在常见的2384个血清蛋白质组特征中, 有250个在肝癌和慢性肝病间有显著差异, 在进展期的肝细胞肝癌(包括有淋巴浸润和远处转移两种亚型)患者的血清中, 这些蛋白质聚集成簇, 由此认为通过蛋白质组学技术可以找寻特异的肿瘤标志物, 用于HCC的检测和分型. Le Naour et al<sup>[13]</sup>用蛋白质组学分析了37例HCC患者和31例HBV/HCV慢性感染患者的血清, 同时还分析了116例其他肿瘤患者血清及24例正常者对照, 发现10% HCC患者的血清中可以检测到8种蛋白的自身抗体, 而健康人群中却没有. 在慢性肝炎患者血清中可检测出其中4种自身抗体, 检出率与肝癌相当, 另4种蛋白: Careticulin异构体、细胞因子8、核苷酸二磷酸激酶A、F1-ATP合成酶 $\beta$ 亚单位的自身抗体只出现于HCC中, 与HBV/HCV状态无关, 其中Careticulin诱导的自身抗体在HCC中检出率为27%, 因此认为这些抗体的检测可以在HBV/HCV高危患者中早期诊断HCC. Steel et al<sup>[14]</sup>根据HCC高危因素将研究对象分成健康人群组、健康HBV携带者组、活动性HBV感染者组和HCC患者组, 进行血清多肽的蛋白质组学研究, 发现补体C3羧基片段和载脂蛋白A1的异构体在HCC组中显著降低, 作者认为由于患者总数较少, 尚难作出这两种蛋白与HCC疾病进展完全相关的结论, 但蛋白质组学的方法无疑可以提高用于早期诊断的肿瘤标志物的检出.

Zhukov et al<sup>[15]</sup>从肺癌筛选试验中获取的肺癌标本用激光捕获显微切割(LCM)获取纯细胞, 包括癌细胞、正常细胞及非典型腺瘤样增生(AAH)细胞, 进行SELDI-

MS分析, 建立每种细胞蛋白表达谱. 与正常细胞相比, 肿瘤细胞在17-23 kD质谱范围内有3个峰值, 在AAH中为低水平, 因此用SELDI-MS方法可以从肺癌或恶变前肺泡上皮中检出“恶性”蛋白信号. 这些蛋白信号可以从肺癌高危人群中检测肿瘤的发生, 监测肺癌化疗药物的疗效.

卵巢肿瘤在临床上仍缺乏敏感特异的肿瘤标志物, 因此蛋白质组学, 特别是高通量技术和生物信息技术在这方面应用较多, 以期发现有临床应用价值的肿瘤标志物. 有研究表明, 卵巢恶性肿瘤中调节细胞周期的PCNA、癌蛋白(Oncoprotein)18等表达增高. Rai et al<sup>[16]</sup>1998/2001收集了卵巢肿瘤患者术前的血清样本, 进行蛋白质组学研究, 在差异蛋白中筛选出7个标志蛋白, 并对其中3个进行纯化. 发现单独应用其中任一标志对卵巢肿瘤敏感性都不及CA-125, 而联用4个标志, 则明显优于CA-125. 如将特异性固定在94%时, 两个标志联合CA-125可使敏感性高达94%(单用CA-125时, 敏感性为81%), 因此认为用蛋白质组学方法可以筛选到敏感特异的肿瘤标志, 与现有的肿瘤标志物相结合可明显提高肿瘤的检出率. Petricoin et al<sup>[17]</sup>用生物信息学技术, 通过对50例卵巢癌患者和50例非卵巢肿瘤人群的血清蛋白质谱特征建立运算模型, 并将该模型以盲法检测临床116份血清标本, 发现其敏感性为100%, 特异性为95%, 阳性预检准确率达94%.

在乳腺癌肿瘤中, 核增生抗原和膜蛋白HS90、pHS60在侵袭性癌中高表达<sup>[10]</sup>; 应用SELDI-TOF-MS方法可以对乳腺癌细针穿刺的样品进行蛋白质组学分析, 完成临床肿瘤标志物的检测.

另外蛋白质组学技术在结肠癌、白血病、淋巴瘤的肿瘤标志物研究中的应用也有不少报道.

### 3 前景与展望

总之, 蛋白质组学本身正在迅速发展, 同时随着其在肿瘤标志物研究中的广泛应用, 新的肿瘤标志物不断被发现, 这些标志物临床应用的重要性日渐凸现. 由于肿瘤标志物的多样性及复杂性, 须有国际间研究组织的合作, 以期建立网络数据库. 美国国家癌症研究所(The National Cancer Institute)建立了早期检测研究网(Early Detection Research Network, EDRN), 目的在于加速新发现的肿瘤标志物临床应用, 同时评估其危险因素. 该网络建立了生物标志物发展评价的五阶段标准: (1)临床前探索期, 确定可靠方向. (2)临床分析和验证期, 分析评价标志物对疾病的检测能力. (3)回顾性纵向分析设定的指标, 对临床前疾病的检测能力, 制定阳性筛选标准. (4)前瞻性观察标志物对疾病的检出率及假阳性率. (5)设计前瞻性临床随机试验, 对普遍人群进行筛查<sup>[18]</sup>.

Wei<sup>[4]</sup>认为建立肿瘤的生物储备和组织库(biorepository and tissue bank)是非常必要的, 他可以成为发现新标志物的平台. 目前一项大规模的建库工作正在进行, 计划



收集 50 000 病例的完整的人口统计资料、临床数据和 3 a 随访分析结果。

尽管蛋白质组学技术仍有许多不足,但其本身的发展非常迅速,特别是高通量、自动化对大量基因及表达产物的大规模分析技术,使我们能够发现更有高度敏感性和特异性的肿瘤标志物用于临床。

#### 4 参考文献

- 1 Hanash SM, Bobek MP, Rickman DS, Williams T, Rouillard JM, Kuick R, Puravs E. Integrating cancer genomics and proteomics in the post-genome era. *Proteomics* 2002;2:69-75
- 2 Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol* 2001;2:698-704
- 3 Le Naour F. Contribution of proteomics to tumor immunology. *Proteomics* 2001;1:1295-1302
- 4 Wei WZ. Tumor markers: discovery to practice. *DDT* 2003;8:441-443
- 5 Sarto C, Frutiger S, Cappellano F, Sanchez JC, Doro G, Catanzaro F, Hughes GJ, Hochstrasser DF, Mocarelli P. Modified expression of plasma glutathione peroxidase and manganese superoxide dismutase in human renal cell carcinoma. *Electrophoresis* 1999;20:3458-3466
- 6 Celis JE, Ostergaard M, Rasmussen HH, Gromov P, Gromova I, Varmark H, Palsdottir H, Magnusson N, Andersen I, Basse B, Lauridsen JB, Ratz G, Wolf H, Orntoft TF, Celis P, Celis A. A comprehensive protein resource for the study of bladder cancer: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. *Electrophoresis* 1999;20:300-309
- 7 Birrer RB, Birrer DE, Klavins JV. Alphafetoprotein and hepatoma. *J Tumor Marker Oncol* 2001;16:403-468
- 8 Birrer RB, Birrer DE, Klavins JV. Markers of hepatocellular carcinoma. *J Tumor Marker Oncol* 2001;16:371-402
- 9 Yu LR, Zeng R, Shao XX, Wang N, Xu YH, Xia QC. Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21:3058-3068
- 10 Seow TK, Ong SE, Liang RC, Ren EC, Chan L, Ou K, Chung MC. Two-dimensional electrophoresis map of the human hepatocellular carcinoma cell line, HCC-M, and identification of the separated proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21:1787-1813
- 11 Ou K, Seow TK, Liang RC, Ong SE, Chung MC. Proteome analysis of a human hepatocellular carcinoma cell line, HCC-M: an update. *Electrophoresis* 2001;22:2804-2811
- 12 Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, Lee CC, Leung TW, Ho SK, Johnson PJ. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem* 2003;49:752-760
- 13 Le Naour F, Brichory F, Misek DE, Brechot C, Hanash SM, Beretta LA. A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:197-203
- 14 Steel LF, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer SH, Evans AA, London WT, Dwek R, Block TM. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2003;3:601-609
- 15 Zhukov TA, Johanson RA, Cantor AB, Clark RA, Tockman MS. Discovery of distinct protein profiles specific for lung tumors and pre-malignant lung lesions by SELDI mass spectrometry. *Lung Cancer* 2003;40:267-279
- 16 Rai AJ, Zhang Z, Rosenzweig J, Shih IeM, Pham T, Fung ET, Sokoll LJ, Chan DW. Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1518-1526
- 17 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-577
- 18 Sullivan Pepe M, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, Winget M, Yasui Y. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1054-1061

## World Journal of Gastroenterology 办刊宗旨

《World Journal of Gastroenterology, WJG》的任务是及时报道和刊登国内外、特别是我国消化病学者具有创造性的、有较高学术水平的基础和临床研究论文、研究快报等。对具有中国特色的研究论文,如食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合和基于作者自己研究工作为主的综述性论文,将优先发表,使 WJG 成为我国消化疾病临床和基础科学研究对外学术交流的窗口和我国优秀医务工作者走向世界的桥梁。

# 特发性门脉高压症

陈 陵, 杨仕明, 房殿春, 贾树蓉, 陈 飞, 孙浩平

陈陵, 杨仕明, 房殿春, 陈飞, 孙浩平, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 400038  
贾树蓉, 中国人民解放军第三军医大学西南医院B超室 重庆市 400038  
项目负责人: 杨仕明, 400038, 重庆市高滩岩, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心, shimingyang@yahoo.com  
电话: 023-68754678 传真: 023-68754124  
收稿日期: 2003-10-27 接受日期: 2004-01-15

## 摘要

特发性门脉高压症临床少见, 病因不明, 是导致门脉高压的第二大原因. 主要表现为门脉高压、显著脾肿大伴脾功能亢进及贫血, 肝功能基本正常. 病理改变主要表现为门静脉纤维化, 肝内门静脉终末支破坏, 以及肝实质萎缩, 但无肝硬化改变. 血流动力学改变为肝内窦前性门脉高压, 即肝门静脉压力显著升高而肝静脉楔压基本正常, 脾静脉及门静脉血流量增加. 治疗基本与肝硬化所致门脉高压相同, 预后主要取决于上消化道静脉曲张的严重程度及其处理.

陈陵, 杨仕明, 房殿春, 贾树蓉, 陈飞, 孙浩平. 特发性门脉高压症. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1191-1195

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1191.asp>

## 0 引言

特发性门脉高压症(idiopathic portal hypertension, IPH)在历史上称谓众多, 如班替氏综合征(Banti's syndrome)<sup>[1]</sup>、班替氏病(Banti's disease)<sup>[2]</sup>、良性肝内门脉高压(benign intrahepatic portal hypertension)<sup>[3]</sup>、肝门静脉硬化症(hepatoportal sclerosis)<sup>[4-5]</sup>、非硬化性门静脉纤维化(non-cirrhotic portal fibrosis, NCPF)<sup>[4-6]</sup>. 由于临床病理表现相似, 很难明确区分, 故目前认为是同一疾病, 普遍接受的名称是IPH<sup>[5]</sup>. 其病因及发病机制长期以来知之甚少. 在发病率较高的印度和日本研究很多, 我国报道很少.

## 1 流行病学

以印度与日本发病率较高, 西方国家很低. 整个印度次大陆都有报道<sup>[7]</sup>, 占因门脉高压而就诊患者的 1/6-1/4, 主要见于贫困人群, 男女之比为 2:1-4:1, 发病年龄为 30-35 岁. 日本 IPH 发病率为 0.75/10 000<sup>[5]</sup>, 约占因门脉高压而来就诊患者的 1/3, 男女之比为 1:3, 男、女患者平均年龄分别为 44.5 ± 15.8 岁和 51.8 ± 11.0 岁. 在美国和英国 IPH 患者占因门脉高压来就诊患者的 3-4%, 性别差异不显著. 各地 IPH 患者在性别和年龄分布上的差异原因尚不清楚, 可能与社会经济状态、生活卫生条件、寿命长短以及种族不同有关. 我国近年也有报

道, 但例数较少<sup>[8]</sup>, 可能是因为缺乏对本症的认识.

## 2 病因及发病机制

病因和发病机制至今仍不清楚. 最初怀疑接触有毒物质是引起 IPH 的重要原因. 如砷的慢性摄入可引起不同程度的肝脏损害, 常见的是肝内门静脉纤维化<sup>[9]</sup>, 发生率可高达 91.3%<sup>[10]</sup>. 进而出现窦前性门脉高压症, 无肝硬化表现. 铜中毒<sup>[11]</sup>及长期接触氯乙烯原料<sup>[12]</sup>也可能导致 IPH. 6- 巯基嘌呤, 硫唑嘌呤等免疫抑制剂在肾移植后的应用可能是肾移植后 IPH 的原因<sup>[13-16]</sup>. 但也有不少学者发现没有毒物接触史的 IPH 患者<sup>[17]</sup>, 故可能还有其他原因通过共同机制导致 IPH.

腹腔内感染引起的门静脉炎症可能是 IPH 的发病原因之一. 研究人员将已死亡的大肠杆菌(*Escherichia coli*)反复注射入兔与狗的肝门静脉内, 结果在短期内出现门静脉纤维化, 门静脉压力升高<sup>[18-20]</sup>. 腹腔内感染所致无症状的慢性门静脉内毒素血症可激活相关细胞因子, 引起凝血功能异常, 导致门脉内弥漫性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC), 进而导致门脉纤维化, 引起 IPH<sup>[21]</sup>. 这些相关细胞因子可能包括结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF), 体外可刺激成纤维细胞增长, 促进细胞外基质合成, 可能是引起 IPH 患者门脉纤维化的重要因子之一<sup>[22]</sup>. 近年印度与日本随着经济卫生条件的改善, 腹腔内感染减少, IPH 发病率明显下降<sup>[5, 23]</sup>, 间接提示感染可能是 IPH 病因之一.

凝血因子 V 的突变可能与 IPH 发病有关. Ishii et al<sup>[24]</sup>发现了 1 例伴凝血因子 V 突变的 IPH 患者. 现已知道这种突变可引起各处静脉内血栓形成, 而门静脉内血栓形成足以引起门脉高压, 且难以发现. 因而, 曾一度认为肝内门静脉血栓与 IPH 密切相关<sup>[25-26]</sup>. 但日本学者对此提出异议, 因为较大肝内门静脉分支内血栓均出现在 IPH 晚期<sup>[27]</sup>, 因而血栓更象是 IPH 的结果. Okudaira et al<sup>[5]</sup>详细罗列了不支持血栓致 IPH 的依据: (1) IPH 为隐袭发病, 病前无任何肝内血管血栓征兆; (2) 脾大并非继发于充血, 因为脾静脉血流量在 IPH 患者中是增加的; (3) IPH 患者中血液未见高凝状态; (4) 对 136 例 IPH 患者行肝活检, 仅发现 3 例有血栓形成; (5) 对早期 IPH 患者行经肝门静脉造影术, 未发现血栓; (6) 一些 IPH 尸检病例并未发现肝内血栓.

免疫因素在 IPH 发病机制上越来越受到重视. 临床上观察到 IPH 与其他免疫性疾病如系统性红斑狼疮

(systemic lupus erythematosus, SLE)<sup>[28]</sup>、进行性全身硬化症(progressive systemic sclerosis, PSS)<sup>[29]</sup>、系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)<sup>[24]</sup>、桥本氏甲状腺炎(hashimoto's thyroiditis)<sup>[30-31]</sup>、混合性结缔组织病(mixed connective tissue disease, MCTD)<sup>[32]</sup>、雷诺氏征(Raynaud's phenomenon)<sup>[33-34]</sup>、风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)<sup>[35]</sup>、I型糖尿病<sup>[36]</sup>以及硬皮病(scleroderma)<sup>[37]</sup>等同时存在。日本IPH研究委员会通过全国性调查发现69.2%的女性IPH患者抗DNA抗体阳性, 24.1%抗核抗体阳性, 21.5%抗线粒体抗体阳性, 17.2%抗甲状腺球蛋白抗体阳性<sup>[34]</sup>。除了这些自身抗体外, 在IPH患者中还发现了许多免疫异常。如自身混合淋巴细胞反应<sup>[38]</sup>, 以及异常的T-细胞基因库<sup>[39]</sup>。Kathayat et al<sup>[40]</sup>采用兔的脾提取物反复致敏兔, 得到非硬化性门脉纤维化的兔模型。这个动物模型表现为巨脾, 门脉压力持续升高, 但肝实质未见损害, 与人NCPF非常类似, 提示反复免疫刺激可能在NCPF中起重要作用。Tokushige et al<sup>[41-42]</sup>发现, IPH患者可溶性TNF受体-2明显升高, 外周血及脾内淋巴细胞Th1与Th2比率比对照组显著升高(主要是由于Th2 CD4 T细胞百分比下降), 血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)的血清水平也升高。他们可能都参与IPH的发病。

### 3 病理改变

IPH的病理改变为不同程度的门静脉纤维化以及门静脉硬化。然而, IPH的这些病理改变并无特异性<sup>[27]</sup>, 很可能是持续门脉血流灌注不足之后, 肝细胞凋亡, 肝实质损害、萎缩、纤维化<sup>[22]</sup>。因而, IPH的肝脏病理改变依据分期不同, 差异很大。(1)大体病理: IPH患者肝实质常发生萎缩, 重量一般比正常肝脏小<sup>[22]</sup>。Nakanuma et al<sup>[27]</sup>依据IPH患者肝脏大体及切片外观, 提出如下分期系统: 第一期: 整个肝脏无萎缩, 切面见肝包膜下也无实质萎缩; 第二期: 肝脏无萎缩, 肝包膜下实质可见萎缩; 第三期: 肝脏萎缩, 肝包膜下实质也见萎缩; 第四期: 门静脉内出现阻塞性血栓。第一期似乎常越过第二期发展到第三期。而第四期出现相对较晚, 预后也差。这一分期系统有助于我们理解IPH患者肝脏的形态学改变。肝脏切面上可见门静脉主干及其肝内主要分支有显著的血管周围纤维化改变, 比肝硬化明显得多。肝内门静脉分支扩张, 血管壁不同程度增厚和纤维化。肝切面肉眼可见的肝静脉分布不规则, 在肝萎缩明显处模糊不清。一些大的肝静脉有硬化改变。有时可见大面积缺血性坏死, 可能是终末期改变。(2)镜检: IPH肝脏没有特异的组织学改变。组织学检查发现不仅在不同时期有差异, 在同一肝脏的不同位置也有不同。Okudaira et al<sup>[6]</sup>总结了以下几点: (1)门静脉主干及其肝内大分支有显著的血管周围纤维化改变, 这些血管内膜增厚, 并伴中层平滑肌过度增生, 血管腔偶见狭窄。而一些门静脉管腔正常, 甚至扩张。尸检病例中门静脉主干内常可见到血栓形成。

围绕胆管周围常可见同心板层状纤维化, 以及大量胶原纤维及弹性纤维增生。门静脉末梢支观察到有2种纤维化形式。一种是IPH的特征改变, 即门脉末梢支管壁纤维化伴显著管腔狭窄。另一种是形成钉状纤维突起, 向肝实质延伸, 一些甚至连接到另一门脉末梢支和中央静脉。与门脉主干及大分支相关, 末梢支内极少见到血栓形成。肝内门脉末梢支大小及数量都有减少, 门脉分支常消失或被破坏, 取而代之的是弹性纤维样变。(2)中晚期病例常可见被膜下区肝实质塌陷。肝小叶内结构常可保存, 但门脉区及中央区结构紊乱。肝内假小叶少见。(3)在肝实质明显萎缩处可见肝静脉血管硬化及狭窄。这可能是因为长期门静脉血流异常的结果。

### 4 血流动力学改变

脾静脉及门静脉压力显著增加。但无肝内门体分流形成。肝静脉楔压(wedged hepatic vein pressure, WHVP)基本正常或轻度升高, 但显著低于门静脉压力(pressure of portal vein, PPV), 也比肝硬化患者低得多<sup>[43-46]</sup>。门脉系统内血流受阻的病理解剖位置有两处。一个在窦前, 压力梯度存在于脾(脾内门脉系统压力)与肝(肝内门脉压力), 另一个在窦周, 压力梯度存在于肝内门脉压力与WHVP之间<sup>[47]</sup>。曲张静脉内压力则与肝硬化门脉高压患者相近<sup>[47-48]</sup>。血流受阻是由于门静脉中小分支增厚和阻塞, 以及迪氏腔内胶原形成<sup>[6]</sup>。脾及门静脉明显扩张, 血流量显著增加, 门脉系统内血流循环呈高动力状态, 肝内可有门体静脉间侧副管形成, 这些侧副管的形成降低了患者曲张静脉出血的风险<sup>[4]</sup>。

### 5 临床表现、诊断和鉴别诊断

依据IPH临床表现, 在日本卫生福利部主持下, 日本IPH研究委员会制订了IPH的诊断要点<sup>[5, 49]</sup>。(1)不明原因的脾大、贫血、门脉高压, 可除外肝硬化、血液疾病、肝胆系统的寄生虫病、肝静脉及门静脉阻塞以及先天性肝纤维化等。也就是说, IPH的临床诊断可通过排除以上相关疾病而确立。(2)一种以上血液成分减少。(3)肝功能试验正常或接近正常。(4)B超、CT或脾脏同位素检查有门静脉及脾静脉扩张, 血流量增加, 脾肿大。肝表面光滑, 质地均匀, 无萎缩, 不提示有肝硬化。(5)内镜或X线证实有上消化道静脉曲张。(6)肝静脉插管检查显示肝静脉开放, WHVP正常或轻度升高, 直接门静脉测压大于20 mmHg。(7)腹腔镜提示肝表面无肝硬化表现; 肝活检显示门脉纤维化, 但无肝硬化。并非必须具备以上每一条标准才能诊断, 但是必须确有门脉高压并且可绝对排除肝硬化和其他原因引起的非肝硬化性门脉高压才可诊断。

肝外门静脉梗阻(extrahepatic portal vein obstruction, EHPVO)可通过检查门脾静脉内有无梗阻(超声, CT, 造影)而与IPH轻易区分, 但在门静脉主干内同时出现血栓的情况下则不易诊断。IPH大多发病隐匿, 而

EHPVO 多发病急骤, 可出现曲张静脉直径突然增大, 胃肠道突然出血, 腹痛及腹水. IPH 患者部分凝血活酶时间(partial thromboplastin time, PTT)及血中纤维蛋白原降解物水平均正常, 而 EHPVO 患者二者都升高<sup>[21]</sup>. 肝硬化患者在 Child A 级时临床症状可与 IPH 类似, 但肝功能、病毒学及组织学(肝小叶结构紊乱, 假小叶形成)的检查易于将二者区分. 另外由于 IPH 肝脏外周门静脉血流灌注相对内部更少<sup>[50-51]</sup>, 而肝硬化则无此特点, CT 检查中 IPH 患者在肝动脉造影时肝脏外周相对内部增强, 而肝硬化则内外一致, 这也有助于二者区别. 热带巨脾综合征(tropical splenomegaly syndrome, TSS)发生于热带地区, 表现为巨脾. 然而, 门脉高压并不常见于 TSS, WHVP 也在正常范围内<sup>[52]</sup>. 而且, TSS 患者血清 IgM 水平及疟疾抗体效价大多升高.

IPH 还可能引起一些并发症. 肝硬化门脉高压患者并发的舒张期功能障碍, 同样也可发生于 IPH<sup>[53]</sup>, 原因不明. 可能与门脉高压, 血浆肾素活性等有关. 肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)在 IPH 患者中发生率约为 13.3%<sup>[54-55]</sup>, 可使患者更易出现呼吸困难, 半卧位呼吸, 杵状指等. 肝性脊髓病(hepatic myelopathy)曾见于 1 例 IPH 患者<sup>[56]</sup>, 表现为痉挛步态, 可能与脊髓脱髓鞘或轴突损伤有关. 其他不常见的并发症还有自发性脾梗死<sup>[57]</sup>、肝衰竭<sup>[58]</sup>.

## 6 治疗与预后

正确及时地处理胃肠道出血及脾功能亢进是治疗 IPH 的关键. 对急性出血病例, 内镜下曲张静脉套扎术(endoscopic variceal ligation, EVL)及内镜下硬化剂治疗(endoscopic sclerotherapy, EST)非常有效, 控制急性出血成功率大于 95%<sup>[59]</sup>. 为消除上消化道曲张静脉所需硬化治疗的疗程次数, IPH 患者与肝硬化患者相近<sup>[60]</sup>. 治疗后曲张静脉复发率约为 20%, 但再出血发生率很少, 约为 3%<sup>[60-61]</sup>. 仅有不到 5% 的患者才必须行急诊分流手术<sup>[61]</sup>, 术后死亡率约为 10%, 术后分流道堵塞、明显的门体分流性脑病和再出血等并发症发生率大约为 10%<sup>[62-63]</sup>.

对非急性出血病例, 口服倍他乐克预防 IPH 所致出血与 EVL 术的疗效相当<sup>[64]</sup>. 介入放射治疗效果也很好, 即便曾做过分流或断流手术也可采用<sup>[65]</sup>. 介入放射治疗包括部分脾栓塞术(partial splenic embolization, PSE)、经皮经肝曲张静脉栓塞术(percutaneous transhepatic obliteration, PTO)以及经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS). Romano et al<sup>[66]</sup>对 6 例(2 男, 4 女, 平均年龄 30.3 岁)伴脾大、血小板减少和反复曲张静脉出血的 IPH 患者进行 PSE 治疗, 结果发现脾容积平均缩小 68%, 血小板平均增加  $120 \times 10^9/L$ , 在之后的随访中(最短 18 mo, 平均 28.2 mo), 无 1 例曲张静脉再出血, 未发现重大并发症, 疗效持久. 外科治疗曾被报道是除内镜治疗外的有效选择<sup>[67]</sup>, 尤其是内镜治疗无效、脾功能亢进伴自发性出血、严重贫血需要

反复输血以及反复脾梗死者. Lytkin et al<sup>[68]</sup>对 14 例 IPH 患者成功地进行了外科治疗(脾肾分流术 9 例, 脾切除术 3 例, 脾动脉结扎术 1 例), 并进行了长达 10 a 的随访. 2 例脾肾分流术分别于术后 6 a 及 10 a 反复出血死亡, 其他患者均未出现再次出血. 有 6 例行脾肾分流术患者术后 6-10 a 后出现了其他疾病(分流性脑病, 肾结石, 高血压, 十二指肠溃疡). 这表明外科治疗虽 5 a 存活尚可, 但远期疗效不佳, 不宜作为首选. 而且, 近来还有报道在 IPH 患者外科分流术后出现膜性增生性肾小球肾炎及其他肾脏疾病<sup>[69]</sup>. 在术式选择上, 一些日本及印度学者更倾向于断流术<sup>[70-72]</sup>. 与分流术相比, 断流术更简单、安全, 能有效控制出血, 改善生活质量, 并极少出现门体分流性脑病. 胃静脉曲张可见于大约 1/4 的 IPH 患者, 比肝硬化患者更常见<sup>[73]</sup>. 在诊断 IPH 后平均 12.8 mo 即可出现<sup>[74]</sup>, 在行食管曲张静脉闭塞术(EST, EVL)后, 会出现更早. 这些曲张静脉常可经过注射氰基丙烯酸酯凝胶来治疗, 很少需要外科干预<sup>[75]</sup>.

IPH 患者存活曲线几乎与相同年龄及同性别的普通人口类似<sup>[45]</sup>. 急性出血后死亡率明显低于肝硬化患者<sup>[71]</sup>. 在成功处理胃食管静脉曲张后, 2 a 及 5 a 存活率接近 100%. 如果选择外科分流术, 分流道阻塞和分流术后脑病会引起一些患者死亡, 但控制蛋白质摄入可以在很大程度上改善症状. IPH 女性患者可妊娠及生育<sup>[76-77]</sup>. 怀孕后最常见的并发症是曲张静脉破裂出血, 可通过内镜下硬化治疗有效地处理, 对母婴均很安全. 部分患者在接受以上治疗 3-10 a 后可能会出现进行性肝衰竭<sup>[58]</sup>, 此时原位肝移植术将是惟一选择.

## 7 参考文献

- Pickhardt PJ, Balfe DM. Portal vein calcification and associated biliary stricture in idiopathic portal hypertension (Banti's syndrome). *Abdom Imaging* 1998;23:180-182
- Tokushige K, Yamauchi K, Hayashi N, Futagawa S, Hirose S, Shirai T. The pathogenesis of idiopathic portal hypertension. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1996;97:21-26
- Levison DA, Kingham JG, Dawson AM, Stansfeld AG. Slow cirrhosis-or no cirrhosis? a lesion causing benign intrahepatic portal hypertension. *J Pathol* 1982;137:253-272
- Dhiman RK, Chawla Y, Vasishta RK, Kakkar N, Dilawari JB, Trehan MS, Puri P, Mitra SK, Suri S. Non-cirrhotic portal fibrosis (idiopathic portal hypertension): experience with 151 patients and a review of the literature. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:6-16
- Okudaira M, Ohbu M, Okuda K. Idiopathic portal hypertension and its pathology. *Semin Liver Dis* 2002;22:59-72
- Sarin SK, Kapoor D. Non-cirrhotic portal fibrosis: current concepts and management. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:526-534
- Basu AK, Boyer J, Bhattacharya R, Mallik KC, Sen Gupta KP. Non-cirrhotic portal fibrosis with portal hypertension: a new syndrome I. Clinical and function studies and results of operations. *Indian J Med Res* 1967;55:336-350
- 陈加, 吴俊超, 杨锦林. 特发性门脉高压临床分析. *华西医学* 2002;17:223
- Centeno JA, Mullick FG, Martinez L, Page NP, Gibb H, Longfellow D, Thompson C, Ladich ER. Pathology related to chronic arsenic exposure. *Environ Health Perspect* 2002;110 (Suppl 5):883-886
- Guha Mazumder DN. Arsenic and liver disease. *J Indian Med Assoc* 2001;99:311

- 11 Pimentel JC, Menezes AP. Liver disease in vineyard sprayers. *Gastroenterology* 1977;72:275-283
- 12 Thomas LB, Popper H, Berk PD, Selikoff I, Falk H. Vinyl-chloride-induced liverdisease. From idiopathic portal hypertension (Banti's syndrome) to Angiosarcomas. *N Engl J Med* 1975;292:17-22
- 13 Noel C, Hazzan M, Coppin MC, Bridoux F, Codaccioni MX, Pruvot FR. Idiopathic portal hypertension: an infrequent complication of renaltransplantation. *Transplant Proc* 1995;27:2437
- 14 Yanagisawa N, Sugaya H, Yunomura K, Harada T, Hisauchi T. A case of idiopathic portal hypertension after renal transplantation. *Gastroenterol Jpn* 1990;25:643-648
- 15 Nataf C, Feldmann G, Lebrec D, Degott C, Descamps JM, Rueff B, Benhamou JP. Idiopathic portal hypertension (perisinusoidal fibrosis) after renaltransplantation. *Gut* 1979; 20:531-537
- 16 Roland S, Delwaide J, Cornet G, Mahieu P, Jacquet N, Belaiche J. Clinical case of the month. Hepatoportal sclerosis in a patient treated withazathioprine. *Rev Med Liege* 1998;53:450-453
- 17 Zamora Davila E, Ramirez Mayans J, Cervantes Bustamante R, Cueva Carrillo J, Mora Tiscareno MA, Mata Rivera N, Cuevas Schacht F, Zarate Mondragon F. Hepatoportal sclerosis. 10 years of experience at the National Institute of Pediatrics. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1997;27:49-52
- 18 Sugita S, Ohnishi K, Saito M, Okuda K. Splanchnic hemodynamics in portal hypertensive dogs with portal fibrosis. *Am J Physiol* 1987;252(6 Pt 1):G748-754
- 19 Kono K, Ohnishi K, Omata M, Saito M, Nakayama T, Hatano H, Nakajima Y, Sugita S, Okuda K. Experimental portal fibrosis produced by intraportal injection of killed nonpathogenic *Escherichia coli* in rabbits. *Gastroenterology* 1988;94: 787-796
- 20 Sugita S, Ohnishi K, Iida S, Nomura F, Okuda K. Histological changes in the liver and portal hypertension subsequent to repeated intraportal injections of killed *E.coli* in the dog. *Liver* 1988;8:1-9
- 21 Bajaj JS, Bhattacharjee J, Sarin SK. Coagulation profile and platelet function in patients with extrahepatic portal vein obstruction and non-cirrhotic portal fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:641-646
- 22 Tsuneyama K, Kouda W, Nakanuma Y. Portal and parenchymal alterations of the liver in idiopathic portalhypertension: a histological and immunochemical study. *Pathol Res Pract* 2002; 198:597-603
- 23 Chawla Y, Duseja A. Non-cirrhotic portal fibrosis (NCPF) is a vanishing disease in India. *Trop Gastroenterol* 2003;24:45-46
- 24 Ishii M, Katada Y. Idiopathic portal hypertension in a systemic sclerosis patient heterozygous for factor V Leiden mutation. *Rheumatol Int* 2003;23:44-46
- 25 Boyer JL, Hales MR, Klatskin G. "Idiopathic" portal hypertension due to occlusion of intrahepatic portal veinsby organized thrombi. A study based on postmortem vinylite-injection corrosionand dissection of the intrahepatic vasculature in 4 cases. *Medicine (Baltimore)* 1974;53:77-91
- 26 Boyer JL, Sen Gupta KP, Biswas SK, Pal NC, Basu Mallick KC, Iber FL, Basu AK. Idiopathic portal hypertension. Comparison with the portal hypertension of cirrhosis and extrahepatic portal vein obstruction. *Ann Intern Med* 1967;66:41-68
- 27 Nakanuma Y, Tsuneyama K, Ohbu M, Katayanagi K. Pathology and pathogenesis of idiopathic portal hypertension with an emphasis onthe liver. *Pathol Res Pract* 2001;197:65-76
- 28 Inagaki H, Nonami T, Kawagoe T, Miwa T, Hosono J, Kurokawa T, Harada A, Nakao A, Takagi H, Suzuki H, Sakamoto J. Idiopathic portal hypertension associated with systemic lupus erythematosus. *J Gastroenterol* 2000;35:235-239
- 29 Watanabe Y, Mizukami T, Egawa T, Okamoto S, Sakauchi M, Takita T, Suzuki N, Sakuma M. A case of progressive systemic sclerosis complicated by idiopathic portalhypertension with severe anemia. *Ryumachi* 1999;39:586-590
- 30 Sasaki H, Joh K, Ohtsuka I, Ohta H, Ohhashi T, Hoashi S, Takahashi T, Tokuda T, Koyama K, Isogai Y. Interstitial nephritis associated with glomerulonephritis in a patient with Hashimoto's disease and idiopathic portal hypertension. *Intern Med* 1992;31:641-648
- 31 Imai Y, Minami Y, Miyoshi S, Kawata S, Saito R, Noda S, Tamura S, Nishikawa M, Tajima K, Tarui S. Idiopathic portal hypertension associated with Hashimoto's disease: report ofthree cases. *Am J Gastroenterol* 1986;81:791-795
- 32 Sekiguchi Y, Amano K, Takano Y, Saito K, Itoh I, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Portal and pulmonary hypertension in a patient with MCTD. *Ryumachi* 1999;39:657-663
- 33 Nakanuma Y, Nonomura A, Hayashi M, Doishita K, Takayanagi N, Uchida T, Obata Y, Noma K, Ikoma J, Yoshikawa K. Pathology of the liver in +ACI-idiopathic portal hypertension+ACI- associated withautoimmune disease. The ministry of health and welfare disorders of portal circulation research committee. *Acta Pathol Jpn* 1989;39:586-592
- 34 Saito K, Nakanuma Y, Takegoshi K, Ohta G, Obata Y, Okuda K, Kameda H. Non-specific immunological abnormalities and association of autoimmune diseases in idiopathic portal hypertension. A study by questionnaire. *Hepatogastroenterology* 1993;40:163-166
- 35 Makharia G, Dhiman RK, Chawla YK, Vasistha RK. Non-cirrhotic portal fibrosis in a patient with rheumatoid arthritis. *Indian J Gastroenterol* 2001;20:197-198
- 36 Hiyoshi T, Hisano N, Akasu F, Yoshitsugu M, Takemura T, Enomoto H. A case of type 1 diabetes mellitus in an elderly patient with a history of idiopathic portal hypertension. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2003;26:21-27
- 37 Tsuneyama K, Harada K, Katayanagi K, Watanabe K, Kurumaya H, Minato H, Nakanuma Y. Overlap of idiopathic portal hypertension and scleroderma: report of two autopsycases and a review of literature. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:217-223
- 38 Tokushige K, Komatsu T, Ohzu K, Yamauchi K, Obata H. A defective autologous mixed lymphocyte reaction in patients with idiopathicportal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 1992;7:270-273
- 39 Tokushige K, Hirose S, Nishimura H, Fujimori M, Yamauchi K, Obata H, Futagawa S, Shirai T. Abnormal T cell activation and skewed T cell receptor V beta repertoire usage inJapanese patients with idiopathic portal hypertension. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;75:206-213
- 40 Kathayat R, Pandey GK, Malhotra V, Omanwar S, Sharma BK, Sarin SK. Rabbit model of non-cirrhotic portal fibrosis with repeated immunosensitization by rabbit splenic extract. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1312-1316
- 41 Tokushige K, Yamauchi K, Komatsu T, Takasaki K, Hayashi N. Predominant T helper 1 cells in patients with idiopathic portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1312-1317
- 42 Yamaguchi N, Tokushige K, Haruta I, Yamauchi K, Hayashi N. Analysis of adhesion molecules in patients with idiopathic portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:364-369
- 43 Reynolds TB, Ito S, Iwatsuki S. Measurement of portal pressure and its clinical application. *Am J Med* 1970;49:649-657
- 44 Bosch J, Mastai R, Kravetz D, Navasa M, Rodes J. Hemodynamic evaluation of the patient with portal hypertension. *Semin Liver Dis* 1986;6:309-317
- 45 Okuda K, Kono K, Ohnishi K, Kimura K, Omata M, Koen H, Nakajima Y, Musha H, Hirashima T, Takashi M. Clinical study of eighty-six cases of idiopathic portal hypertension andcomparison with cirrhosis with splenomegaly. *Gastroenterology* 1984;86:600-610
- 46 Moriyasu F, Nishida O, Ban N, Nakamura T, Miura K, Sakai M, Miyake T, Uchino H. Measurement of portal vascular resistance in patients with portal hypertension. *Gastroenterology* 1986;90:710-717
- 47 Sarin SK, Sethi KK, Nanda R. Measurement and correlation of wedged hepatic, intrahepatic, intrasplenic andintravariceal pressures in patients with cirrhosis of liver and non-cirrhoticportal



- fibrosis. *Gut* 1987;28:260-266
- 48 El Atti EA, Nevens F, Bogaerts K, Verbeke G, Fevery J. Variceal pressure is a strong predictor of variceal haemorrhage in patients with cirrhosis as well as in patients with non-cirrhotic portal hypertension. *Gut* 1999;45:618-621
  - 49 Okuda K, Nakashima T, Okudaira M, Kage M, Aida Y, Omata M, Musha H, Futagawa S, Sugiura M, Kameda H. Anatomical basis of hepatic venographic alterations in idiopathic portal hypertension. *Liver* 1981;1:255-263
  - 50 Nishida T, Hayakawa K, Ogasawara H, Katsuma Y. Interesting RI accumulation in hepatic images with Tc-99m GSA SPECT scintigraphy in idiopathic portal hypertension. *Ann Nucl Med* 2001;15:53-55
  - 51 Waguri N, Suda T, Kamura T, Aoyagi Y. Heterogeneous hepatic enhancement on CT angiography in idiopathic portal hypertension. *Liver* 2002;22:276-280
  - 52 Raval N, Shah N, Vani SN. Tropical splenomegaly syndrome. *Indian J Pediatr* 1991;58:679-681
  - 53 De BK, Majumdar D, Das D, Biswas PK, Mandal SK, Ray S, Bandopadhyay K, Das TK, Dasgupta S, Guru S. Cardiac dysfunction in portal hypertension among patients with cirrhosis and non-cirrhotic portal fibrosis. *J Hepatol* 2003;39:315-319
  - 54 Kaymakoglu S, Kahraman T, Kudat H, Demir K, Cakaloglu Y, Adalet I, Dincer D, Besik F, Boztas G, Sozen AB, Mungan Z, Okten A. Hepatopulmonary syndrome in noncirrhotic portal hypertensive patients. *Dig Dis Sci* 2003;48:556-560
  - 55 Anand AC, Mukherjee D, Rao KS, Seth AK. Hepatopulmonary syndrome: prevalence and clinical profile. *Indian J Gastroenterol* 2001;20:24-27
  - 56 Obama R, Tachikawa H, Yoshii F, Takeoka T, Shinohara Y. A case of idiopathic portal hypertension (IPH) with hypermanganemia presenting as spastic gait. *Rinsho Shinkeigaku* 2002;42:885-888
  - 57 Vassia M, Curciarello JO, Corrons F, Viola M, Zamboni E, Castagno M, Jmelnitzky AC. Idiopathic portal hypertension with splenic infarct. An unreported complication. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2001;31:27-30
  - 58 Dumortier J, Bizollon T, Scoazec JY, Chevallier M, Bancel B, Berger F, Ducerf C, Claudel-Bonvoisin S, Paliard P, Boillot O, Trepo C. Orthotopic liver transplantation for idiopathic portal hypertension: indications and outcome. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:417-422
  - 59 Sarin SK, Govil A, Jain AK, Guptan RC, Issar SK, Jain M, Murthy NS. Prospective randomized trial of endoscopic sclerotherapy versus variceal band ligation for esophageal varices: influence on gastropathy, gastric varices and variceal recurrence. *J Hepatol* 1997;26:826-832
  - 60 Kochhar R, Goenka MK, Mehta SK. Outcome of injection sclerotherapy using absolute alcohol in patients with cirrhosis, non-cirrhotic portal fibrosis, and extrahepatic portal venous obstruction. *Gastrointest Endosc* 1991;37:460-464
  - 61 Sarin SK, Nanda R, Kumar N, Vij JC, Anand BS. Repeated endoscopic sclerotherapy for active variceal bleeding. *Ann Surg* 1985;202:708-711
  - 62 Warren WD, Henderson JM, Millikan WJ, Galambos JT, Bryan FC. Management of variceal bleeding in patients with noncirrhotic portal vein thrombosis. *Ann Surg* 1988;207:623-634
  - 63 Mathur SK, Shah SR, Nagral SS, Soonawala ZF. Transabdominal extensive esophagogastric devascularization with gastroesophageal stapling for management of noncirrhotic portal hypertension: long-term results. *World J Surg* 1999;23:1168-1174
  - 64 Sarin SK, Lamba GS, Kumar M, Misra A, Murthy NS. Comparison of endoscopic ligation and propranolol for the primary prevention of variceal bleeding. *N Engl J Med* 1999;340:988-993
  - 65 Hirota S, Ichikawa S, Matsumoto S, Motohara T, Fukuda T, Yoshikawa T. Interventional radiologic treatment for idiopathic portal hypertension. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1999;22:311-314
  - 66 Romano M, Giojelli A, Capuano G, Pomponi D, Salvatore M. Partial splenic embolization in patients with idiopathic portal hypertension. *Eur J Radiol* 2004;49:268-273
  - 67 Mitra SK, Rao KL, Narasimhan KL, Dilawari JB, Batra YK, Chawla Y, Thapa BR, Nagi B, Walia BN. Side-to-side lienorenal shunt without splenectomy in noncirrhotic portal hypertension in children. *J Pediatr Surg* 1993;28:398-401
  - 68 Lytkin MI, Zubarev PN, Kalashnikov SA. Idiopathic portal hypertension. *Vestn Khir Im II Grek* 2001;160:101-105
  - 69 Soma J, Saito T, Sato H, Ootaka T, Abe K. Membranoproliferative glomerulonephritis induced by portosystemic shunt surgery for non-cirrhotic portal hypertension. *Clin Nephrol* 1997;48:274-281
  - 70 Ohta M, Shimada T, Matsufuji H, Yukizane T, Yamada H, Sugimachi K. Surgical treatment of a patient with idiopathic portal hypertension and hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1461-1463
  - 71 Okuda K. Non-cirrhotic portal hypertension versus idiopathic portal hypertension. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S204-S213
  - 72 Sharma D, Agrawal S, Saxena A, Raina VK. A modified technique of devascularization for surgical management of portal hypertension in children. *Trop Doct* 2001;31:93-95
  - 73 Sarin SK, Lahoti D, Saxena SP, Murthy NS, Makwana UK. Prevalence, classification and natural history of gastric varices: a long-term follow-up study in 568 portal hypertension patients. *Hepatology* 1992;16:1343-1349
  - 74 Sarin SK, Jain AK, Lamba GS, Gupta R, Chowdhary A. Isolated gastric varices: prevalence, clinical relevance and natural history. *Dig Surg* 2003;20:42-47
  - 75 Sarin SK, Jain AK, Jain M, Gupta R. A randomized controlled trial of cyanoacrylate versus alcohol injection in patients with isolated fundic varices. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1010-1015
  - 76 Aggarwal N, Sawhney H, Vasishta K, Dhiman RK, Chawla Y. Non-cirrhotic portal hypertension in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2001;72:1-7
  - 77 Potzi R, Ferenci P, Gangl A. Endoscopic sclerotherapy of esophageal varices during pregnancy-case report. *Z Gastroenterol* 1991;29:246-247

# 信号传导及转录活化因子STAT与消化系统疾病的关系

俞丽芬, 吴云林

俞丽芬, 吴云林, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科 上海市 200025  
上海市科技发展基金资助项目, No. 024119114  
项目负责人: 俞丽芬, 200025, 上海市瑞金二路 197 号, 上海第二医科大学  
附属瑞金医院消化科. graceyu1028@sohu.com  
电话: 021-64370045 传真: 021-64150773  
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2004-01-12

## 摘要

信号传导及转录活化因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)家族包括 7 个成员, 他不仅参与正常的生理过程, 而且还存在于肿瘤组织中. 信号通常产生于细胞膜表面的受体, 酪氨酸激酶被组成性激活后再激活 STAT 分子并使之磷酸化, 然后进入细胞核内, STAT 在核内与特异性的 DNA 启动子结合, 调节相关基因的表达. 正常生理条件下各种 STAT 蛋白的活化过程是短暂的, 通常持续数分钟至几小时. 大多数人类肿瘤中都有 STAT 的组成性激活, 尤其是 Stat1、Stat3 和 Stat5. Stat1 的功能主要与生长抑制有关, 而 Stat3 和 Stat5 可通过抑制凋亡或诱导细胞增生作用参与肿瘤的发生和发展. 通过小分子抑制剂阻断酪氨酸激酶的信号传导, 可抑制不同肿瘤细胞株中 Stat3 或 Stat5 的组成性激活. 相对而言, 缺乏 STAT 活性作用的正常细胞或肿瘤细胞对药物的耐受能力更强, 如使用非显性 STAT 或反义寡核苷酸, 直接干预 STAT 信号时可获得相似的效应. 有关 STAT 信号途径的研究为人类肿瘤的干预治疗提供了新的分子靶. 目前国内外关于 STAT 在消化系统疾病中的研究才刚刚起步, 发展前景广阔, 本文就其研究进展作一综述.

俞丽芬, 吴云林. 信号传导及转录活化因子 STAT 与消化系统疾病的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1196-1201

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1196.asp>

## 0 引言

信号传导及转录活化因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)是细胞因子和生长因子受体信号的下游效应物. 相对正常的细胞和组织而言, 大多数人类原发癌灶及肿瘤细胞株中都有 STAT 的组成性激活. STAT 可被磷酸化的酪氨酸(包括 Src、上皮生长因子受体、Janus 激酶、Bcr-Abl 等)激活, 但这种激活通常是短暂的, 取决于酪氨酸激酶活性的持续时间. 具有致癌作用的酪氨酸激酶的活化通常与自分泌或旁分泌细胞因子和生长因子信号相关, 是受体/配体被激活的结果; 或者他们本身就是组成性激活的酶, 是肿瘤细胞基因改变的结果. STAT 特异性信号的持续, 尤其

是 Stat3 和 Stat5, 已被证明是通过刺激细胞的增生和抑制凋亡而直接与肿瘤的形成相关. STAT 能编码凋亡抑制剂和细胞周期调节剂, 通过上调 Bcl-x<sub>L</sub>、Mcl-1、cyclins D1/D2 和 c-myc 基因的作用参与肿瘤的形成. 通过抑制 STAT 信号途径的组成性激活, 可抑制体内外肿瘤细胞的生长, 为人类肿瘤的干预治疗提供了一种新方法. 本文综述了消化系统疾病中 STAT 组成性激活重要作用的新进展, STAT 对消化系统肿瘤转变过程中相关基因的调控作用以及干扰 STAT 信号的传导对人类肿瘤治疗的意义.

## 1 STAT 信号途径的结构和功能的关系

目前在哺乳动物中已鉴定出 STAT 家族的 7 个成员, Stat1、Stat2、Stat3、Stat4、Stat5a、Stat5b 和 Stat6<sup>[1]</sup>. 信号通常产生于细胞膜表面的受体, 然后传输至细胞核内, STAT 在细胞核内与特异性的 DNA 启动子结合, 调节相关基因的表达<sup>[2-6]</sup>.

关于 STAT 信号途径的基础研究, 揭示了许多参与转录因子活化作用的分子机制. STAT 与细胞表面的细胞因子同源性受体结合后, 受体发生二聚体化, 随后激活与受体相关的酪氨酸激酶如 JAKs<sup>[1, 7]</sup>; 而具有内源性酪氨酸激酶活性的受体, 如血小板衍生因子或 EGF 受体, 能自发地使受体磷酸化. 在某些情况下, Src 家族中非酪氨酸激酶受体也参与 STAT 的活化. 磷酸化的酪氨酸受体通过其 SH2 域为细胞质中的 STAT 蛋白单体提供停泊位点<sup>[8]</sup>. 与受体结合的 STAT 随后完成酪氨酸磷酸化<sup>[2, 7, 9-10]</sup>. 具致癌性的非酪氨酸激酶受体衍生物如 v-Src 或 Bcr-Abl 能独立完成 STAT 磷酸化而无需受体的参与<sup>[10-13]</sup>. 磷酸化后的 STAT 通过与 SH2 域的相互作用发生二聚体化<sup>[1, 14]</sup>. 在数分钟内, 二聚体移位于细胞核内, 与其他转录调节剂相互作用, 诱导基因的表达<sup>[1, 3]</sup>. 通过胞核内的酪氨酸磷酸酶和/或通过蛋白降解, STAT 脱磷酸化, 从而终止信号的传导.

尽管各种 STAT 蛋白功能不同, 但通过晶体照相术和序列对比以及诱变缺失试验对 Stat1 和 Stat3 的核心、Stat4 的 NH<sub>2</sub> 末端进行的研究揭示了 STAT 结构的共同特点<sup>[14-15]</sup>. STAT 的 NH<sub>2</sub> 末端为蛋白之间的相互作用提供了位点, 这也是二聚体之间相互作用所必需的. 相邻的螺旋区是与另一蛋白交互作用的位点, 他为转录因子和其他调节蛋白的联系提供了可能<sup>[3]</sup>. 位于分子中心的 DNA 结合区决定了各种 STAT DNA 序列的特异性<sup>[14-15]</sup>. 参与 DNA 结合的连接区位于 SH2 域的 COOH 末端, 能

募集 STAT 与磷酸化受体的结合, 从 STAT 单体转变为二聚体也需要 SH2 域的酪氨酸磷酸化作用<sup>[16]</sup>. 重要的酪氨酸残基是 SH2 域发生酪氨酸磷酸化所必需, 因此 STAT 的活化位于 SH2 域的附近. 转录激活区(TAD)位于分子的 COOH 末端, 参与转录复合物的联系, Stat1 和 Stat3 含有丝氨酸磷酸化的位点, 能增强转录活性<sup>[17]</sup>. TAD 区的主要氨基酸序列因不同的 STAT 而不同, 但缺失试验显示这些序列是 STAT 功能所必需. TAD 缺失的 STAT 仍能与 DNA 结合并发挥作用, 但通常是一个非显性的副本<sup>[18-19]</sup>. 这种缩短了的形式, 如 Stat3 $\beta$ <sup>[20]</sup>, 被认为是一种自然变异, 其正常生理功能未明. Stat3C 的组成性激活无需酪氨酸磷酸化作用, 常在恶性转化过程中发挥作用.

众多研究表明酪氨酸激酶可被组成性激活, 然后再激活 STAT 分子并使之磷酸化<sup>[21]</sup>. 具有致癌作用的酪氨酸激酶信号源于细胞因子和生长因子的持续刺激, 如多发性骨髓瘤和前列腺癌中白介素(IL)6 介导的 JAK 信号途径, 也可源自于头颈部肿瘤中转化生长因子 TGF 介导的 EGF 受体信号系统<sup>[22-23]</sup>. 另外, 某些肿瘤有基因的异常变化, 如 CML 中有 Bcr-Abl 融合蛋白, 表明酪氨酸激酶的活化还有其他机制存在<sup>[12, 24]</sup>. 作为酪氨酸激酶信号系统重要调节剂的 STAT 不仅参与正常生理过程, 而且还存在于有异常酪氨酸激酶活化的肿瘤组织中.

## 2 消化系统疾病中 STAT 的组成性激活及其作用

许多细胞因子和生长因子都能激活 STAT<sup>[7, 9, 25]</sup>, 生理条件下各种 STAT 蛋白的活化过程是短暂的, 通常持续数分钟至几小时. 大多数人类肿瘤中也有 STAT 的组成性激活, 尤其是 Stat1、Stat3 和 Stat5<sup>[10, 26-27]</sup>. 如恶性血液系统疾病(白血病, 淋巴瘤和多发性骨肉瘤)和实体瘤(如头颈部肿瘤、乳癌和前列腺癌)<sup>[10, 12, 24, 28-30]</sup>. 有证据表明, Stat1 在一些肿瘤组织和细胞株中有较高的活性, 他的功能主要与生长抑制有关, 因此被认为是一种潜在的肿瘤抑制剂<sup>[31]</sup>. 而 Stat3 和 Stat5 与之相反, 可通过抑制凋亡或诱导细胞增生作用参与肿瘤的发生和发展<sup>[10, 26-27]</sup>.

炎症性肠病(IBD)中有肿瘤坏死因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和干扰素(IFN) $\gamma$  等炎症细胞因子的过度表达, 以及核转录因子(NF) $\kappa$ B 等的激活. Schreiber et al<sup>[32]</sup>为了探讨 Stat1 在 IBD 患者中的激活和表达情况, 共研究了 60 例内镜结肠活检标本, 其中活动性 IBD 患者 42 例, 疾病特异性对照 8 例, 正常对照 8 例. 结果显示, 溃疡性结肠炎(UC)患者的黏膜标本中有 Stat1 的激活和表达增强, 而 Crohn 病患者则较少见. Crohn 病患者和正常对照组都有细胞因子信号抑制剂(suppressor of cytokine signaling, SOCS)3 的高水平表达, 而 SOCS-1 的表达无显著差异. 炎症黏膜的单核细胞和中性粒细胞中均有磷酸化的 Stat1(p-Stat1)表达. 系统给予糖皮质激素治疗可缓解症状并降低 p-Stat1 水平. 体外研究表明, 类固

醇治疗对 Stat1 的活化有直接作用, 因此认为 Stat1 的激活和表达增强主要见于 UC 患者, 他在结肠炎症的病理生理学中发挥了重要作用.

Starkel et al<sup>[33]</sup>分别将酒精性肝病(ALD)患者、正常人和原发性胆汁性肝硬化患者的肝脏组织移植于大鼠体内, 然后给予大鼠肝脏酒精刺激, 研究 ALD 患者中 Stat3 的表达、定位和活性. 结果 ALD 患者的 Stat3 蛋白表达显著增强, 主要见于肝细胞和增生的胆道上皮细胞核. 尽管 ALD 患者 Stat3 的酪氨酸和丝氨酸磷酸化水平没有变化, 但是未发现有 Stat3 DNA 结合的复合体; 而正常人和原发性胆汁性肝硬化患者的肝脏中 Stat3 的 DNA 结合力正常. ALD 患者中可见 IL-6 mRNA 表达增加, 而 Stat3 和 SOCS-3 的 mRNA 表达水平却减少了. 虽然 ALD 终末期患者有 Stat3 蛋白水平的上调, 但这时转录因子是无活性的. 减少 ALD 患者 Stat3 基因的转录会影响胞质对无活性 Stat3 的储留. 对 Stat3 活化和复活的干预将导致肝细胞损伤从而使 ALD 患者发生肝硬化.

Tacchini et al<sup>[34]</sup>对大鼠肝脏经热休克、缺血再灌注后 Stat3 的活化状态进行研究发现, 两种处理后 Stat3 的 DNA 结合力都被激活, 并且 Stat3 的 mRNA 和蛋白的表达也增强. 在这两种情况下, Stat3 的磷酸化是迅速的, 且先于 Stat3 蛋白表达的增强. Stat3 的活化也是有功能的, 其后有靶基因中  $\alpha$  酸性糖蛋白的转录. 经 IL-1 受体拮抗剂预处理后, 热休克条件下可强烈抑制 Stat3 的活化; 而缺血再灌注对 Stat3 活化的抑制作用较轻微. 部分活化的过程是通过细胞因子的级联反应介导的, 如 IL-6. 这一结果与不同处理可激活相同转录因子的假设一致.

目前有关 Crohn 病的发病机制尚不明确, 但肠道细胞因子内环境的稳定性受到干扰是其主要病因之一. Lovato et al<sup>[35]</sup>对健康志愿者和 Crohn 病患者肠道 T 细胞中 Stat3 的组成性激活进行研究发现, Crohn 病患者中有 Stat3 和 Stat4 的组成性激活, 并且这一激活作用是特异性的(未见其他 STAT 蛋白的组成性激活), 但在健康志愿者中却无此现象. 此外, Stat3 调节蛋白 SOCS-3 在 Crohn 病患者中也有组成性激活, 而健康志愿者亦无此表现. 上述结果表明, Crohn 病患者中存在异常的 STAT/SOCS 信号. 对 Crohn 病患者肠道 T 细胞中 Stat3 的组成性激活的研究, 有助于更深入地了解 Crohn 病的免疫发病机制.

Stat3 是胚胎早期发育所必需的. 有报道认为缺乏 Stat3 的小鼠在出生前就已死亡<sup>[36]</sup>. Welte et al<sup>[37]</sup>建立了一种独特的小鼠品系, 在造血过程中其骨髓细胞具有组织特异性 Stat3 缺失. 这种特异性 Stat3 缺失使小鼠在出生 4-6 wk 后死亡, 其小肠和大肠有 Crohn 病样的病理表现, 包括节段性的炎性细胞浸润、溃疡、肠壁增厚和肉芽肿形成. Stat3 的缺失显著提高了髓样细胞的自发增生. 更重要的是, 在血细胞生成过程中会导致先天免疫应答的假性激活. 虽然在这些小鼠中有炎性细胞因子

的过度产生, 包括 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ , 但是参与抗炎和先天免疫应答的NAPDH氧化酶的活性被抑制了. Stat3 的缺失使小鼠对脂多糖的信号应答发生改变, 引起NF- $\kappa$ B 活性的增强. 因此, Stat3 在先天免疫形成和调节过程中发挥了重要的作用, 造血过程中 Stat3 的缺失将导致髓样细胞的增生异常和 Crohn 病样的病理表现.

通过剔除 STAT 的小鼠和 / 或有组织特异性缺失的研究, 对各种 STAT 蛋白正常生理功能的认识取得了相当的进展<sup>[38-40]</sup>. Stat3 对上皮细胞凋亡、乳腺退化、皮肤的重塑、角质细胞的移行和巨噬细胞的失活有调节作用, 并且能下调 T 辅助细胞反应中炎性细胞因子的作用<sup>[41-43]</sup>. 这些实验表明 STAT 信号在正常细胞的演变进程中发挥了重要的作用, 如胚胎发育、器官的发生和功能、先天和获得性的免疫功能、细胞分化、生长和凋亡的调节等<sup>[44-53]</sup>.

Stat3 对细胞生长有正性调节作用, 并且在癌细胞中有高度的活性<sup>[10, 20, 54]</sup>. 梁斌 et al<sup>[55]</sup>探讨了人胃癌中 Stat3 的表达情况, 并分析了其表达与胃癌临床病理因素的关系. 结果发现, 胃癌 Stat3 蛋白表达水平明显高于正常胃黏膜, 平均为正常胃黏膜的 2.14 倍 ( $P < 0.05$ ); 低分化胃癌 Stat3 蛋白表达水平高于高分化胃癌 ( $P < 0.05$ ); III、IV 期胃癌 Stat3 蛋白表达水平高于 I、II 期胃癌 ( $P < 0.05$ ); 有淋巴结转移的胃癌 Stat3 蛋白表达水平高于无淋巴结转移胃癌 ( $P < 0.05$ ); 转移淋巴结 Stat3 蛋白表达水平高于阴性淋巴结. 认为 Stat3 的过度表达可能在胃癌的发生、发展过程中发挥重要作用, 其表达与胃癌组织分化程度、TNM 分期及淋巴结转移有关.

通过在已建立的细胞株、原代细胞培养、动物模型和临床肿瘤组织及相邻的正常组织标本中进行的研究推论, Stat3 和 Stat5 的组成性激活积极参与了肿瘤的发展<sup>[3, 10, 26-27]</sup>. 1995 年 Yu et al<sup>[56]</sup>在 v-Src 转型研究中发现有 Stat3 的组成性激活, 首次提出 Stat3 在恶性化进程中具有重要作用. 许多新近研究也证实了这一观点, Stat3 信号的激活是通过 v-Src 向肿瘤转变所必需的<sup>[57-60]</sup>. 冯德云 et al<sup>[61]</sup>检测了 55 例肝细胞癌 (HCC) 及其癌旁组织中磷酸化 Stat3 (p-Stat3)、c-fos 和 c-jun 蛋白的表达. 结果显示 HCC 中 p-Stat3、c-fos 和 c-jun 蛋白的阳性率和阳性强度均高于癌旁组织 ( $P < 0.01$ ), 且 p-Stat3 与 c-fos 和 c-jun 蛋白表达强度均呈明显正相关, 而在癌旁组织中 p-Stat3 仅与 c-jun 蛋白表达相关, 提示 Stat3 蛋白的磷酸化可能是 HCC 发生的早期事件, 并通过激活 c-fos 和 c-jun 基因使肝细胞发生恶性转化; 癌旁肝组织中 p-Stat3、c-jun 或 c-fos 呈阳性表达的肝细胞可能是一种具有恶性潜能的癌前细胞群.

采用反义寡核苷酸和非显性 Stat3 蛋白 Stat3 $\beta$  阻断 Stat3 的 DNA 结合, 进一步确定了 Stat3 在肿瘤形成过程中的重要作用<sup>[23, 28-29]</sup>. 分化诱导因子 (DIF) 1 对多种哺乳动物的肿瘤细胞具有抗肿瘤活性. Kanai et al<sup>[62]</sup>研究了 DIF-1 对胃癌细胞株的增生以及对 STAT 蛋白信号传导

途径的影响发现, DIF-1 通过依赖 MEK-ERK 的途径抑制胃癌细胞株 AGS 和 MKN28 中 Stat3 的活性. 通过非显性 Stat3 的异常表达可抑制 Stat3 的活性, 或通过两面神激酶 (Janus kinase) 抑制剂 tyrphostin AG490 抑制 AGS 细胞的生长, 提示 Stat3 的活性对 AGS 细胞的生长具有重要作用, 抑制 Stat3 的活性有助于提高 DIF-1 的抗肿瘤效果.

马向涛 et al<sup>[63]</sup>应用阳离子脂质体介导 Stat3 反义寡核苷酸转染人结肠癌 SW480 与 HCT116 细胞, 阻断其 Stat3 通路, 探讨了 Stat3 信号传导通路对结肠癌细胞 G<sub>1</sub>-S 期调控的可能机制. 结果发现, 转染 Stat3 反义寡核苷酸后结肠癌细胞增生受抑制, Stat3、p-Stat3、G<sub>1</sub> 期 Cyclins、CDK<sub>s</sub> 表达水平下降, p21 与 p27 表达水平上升. 认为 Stat3 信号传导通路可能通过调节 CDK/Cyclin 复合物与 CKI 成员之间的平衡而调节结肠癌细胞 G<sub>1</sub>-S 期的转换.

有关 Stat3 突变体 Stat3C 的遗传学证据表明, Stat3C 具有内源性致癌潜能. Stat3C 蛋白的稳定表达足以介导啮齿动物的成纤维细胞转变, Stat3C 引起的细胞转化在裸小鼠中能形成移植瘤<sup>[20]</sup>. 除了 v-Src 以外, v-Eyk, v-Ros, v-Fps, Etk/BMX, Lck 等酪氨酸激酶也具有向肿瘤转变的能力<sup>[10]</sup>.

3 STAT 对消化道肿瘤转化过程中相关基因的调控作用与其在肿瘤形成过程中所起的作用相同, Stat3 和 Stat5 信号的活化对参与控制生长和生存的数种基因的表达有调节作用<sup>[3, 10]</sup>. 众多研究显示凋亡抑制基因编码的 Bcl-x<sub>L</sub> 蛋白是 Stat3 和 Stat5 的下游靶目标<sup>[20, 30, 64-66]</sup>. 胰腺肿瘤由于确诊晚且患者对药物有高度的耐受性, 因而疗效甚微, 总体预后较差. Greten et al<sup>[67]</sup>等将 EL-TGF $\alpha$ -hGH 转基因小鼠与 p53 缺失的小鼠杂交, 通过胰腺转基因小鼠中 TGF- $\alpha$  的过度表达能引起胰腺导管的癌前病变和侵入性导管腺癌形成的作用, 建立了类似人类胰腺导管腺癌的动物模型, 探讨小鼠胰腺肿瘤形成过程中凋亡和凋亡抑制信号的调节作用. 研究发现, 在肿瘤形成早期 Bcl-x<sub>L</sub> 表达就有明显的上调, 并且持续贯穿于肿瘤的形成过程. 在癌前病变和肿瘤细胞中 Stat3 和 NF- $\kappa$ B 能诱导 Bcl-x<sub>L</sub> 表达的增加. 瞬时转染分析显示, 单独抑制上述任何一种转录因子都会下调 Bcl-x<sub>L</sub> 的表达. 功能分析显示, 同时阻滞 Stat3 和 NF- $\kappa$ B 可诱导小鼠胰腺肿瘤细胞的程序性死亡. 因此认为在侵入性胰腺癌形成前肿瘤细胞就有凋亡抑制的表现, 联合抑制 Stat3 和 NF- $\kappa$ B 可能是预防和治疗胰腺肿瘤的一种新方法.

另一个被 Stat3 和 Stat5 调节的细胞周期控制基因是细胞周期素 (cyclins). D 型 cyclins, 如 cyclin D1、D2 和 D3 在肝细胞的增生和转化过程中具有重要作用. 而致瘤素 M (OSM) 是一种 IL-6 家族的细胞因子, 他能诱导肝细胞分化, 并能下调原代培养的胎肝细胞中 cyclin D1 和 D2 的表达. Matsui et al<sup>[68]</sup>探讨了 Stat3 在肝脏发展中

对 cyclin D 表达的影响作用发现, 活化的 Stat3 或 SHP-2/Ras 中有受体的突变缺失, 提示 cyclin D1 和 D2 表达的下调作用是由于 Stat3 对 OSM 的介导作用, 而并非 SHP-2/Ras 的影响. 非显性 Stat3 的表达, 可缓解由 OSM 诱导的对 cyclin D 表达的抑制作用. 转基因小鼠胎肝细胞中 Stat3 活化后, 有 Stat3 雌激素受体融合蛋白的表达, 可使 cyclin D1 和 D2 的表达受到抑制. 因此, 胎肝细胞中 Stat3 的活化能下调 cyclin D1 和 D2 表达. 此外, 研究还发现 Stat3C 在胎肝细胞中对 cyclin D1 的启动子有转录抑制作用, 而对肝脏肿瘤细胞 huH7 和 HepG2 却有转录刺激作用.

最近研究显示, 组成性激活的 Stat3 信号能诱导 VEGF 的表达和肿瘤血管形成, 提示抑制肿瘤血管形成有助于提高 Stat3 抑制剂的治疗效应. 血管内皮生长因子(VEGF)是一种重要的血管生成素蛋白, 他的表达与胰腺肿瘤的进展有关. 胰腺肿瘤患者标本的免疫组织化学结果提示, VEGF 过度表达的同时有 Stat3 活性的增强. Wei et al.<sup>[69]</sup>研究发现, 超过 80% 的人胰腺癌细胞株中有 Stat3 的组成性激活, 并且与 VEGF 的表达水平相关. 通过非显性 Stat3 的异常表达抑制 Stat3 的活化, 也会降低 VEGF 的表达、血管形成、肿瘤生长和体内转移. 此外, Stat3 的组成性激活可直接激活 VEGF 的启动子, 而非显性 Stat3 对 VEGF 启动子有抑制作用. 因此 Stat3 对胰腺肿瘤中 VEGF 的表达、血管形成、生长和转移有直接调节作用, 提示 Stat3 信号可作为胰腺肿瘤治疗的靶目标.

#### 4 STAT 分子间的相互作用对自身活性的调节

由于 Stat1、Stat3 和 Stat5 通常被相同的配体和 / 或细胞内的酪氨酸激酶激活, 提示胞质和胞核蛋白能分别与各种 STAT 中的一般和独特的成分相互作用来调节 STAT 的特殊效应. 目前已开发了一部分 STAT 信号途径的调节剂<sup>[70-71]</sup>. SOCS 蛋白家族包含了一组细胞因子诱导基因, 通过与 JAKs 的结合抑制 STAT 信号的传导<sup>[72-73]</sup>. 这些蛋白中的一部分被 STAT 的自身转录所调节, 提示 STAT 能负性调节自身的磷酸化状况. 已知 SOCS-3 能抑制 Stat3 和 Stat5 的活化, 在负性调节胎肝血细胞发生中具有重要作用<sup>[74]</sup>. Tel-JAK2 融合蛋白的激酶活性与 Stat5 的活化相关<sup>[75]</sup>. SOCS-1 已被证实有阻断 Tel-JAK2 介导的造血细胞的转化作用<sup>[76]</sup>. 最近, 48% 的原发性肝细胞癌中发现有染色体 16p 的缺失, 包括 SOCS-1. 这些基因的失活增加了肝癌形成的可能性<sup>[77]</sup>. 由此推测, STAT 信号的负性调节在降低肿瘤的发病率和控制肿瘤的发展中有重要作用.

STAT 蛋白, 如 Stat1、Stat3 和 Stat5, 在 COOH 端都有重要的丝氨酸残基, 为 STAT 分子提供了另一个磷酸化位点. 丝氨酸磷酸化使 STAT 具有最大程度的转录活性. Stat1 中丝氨酸残基发生变异后, 只保留了 20% 野生型 Stat1 的活性, 并且对 IFN 的反应有缺陷<sup>[17]</sup>. STAT

磷酸化所需的丝氨酸激酶包括多种丝分裂素 - 活化蛋白激酶家族成员<sup>[78-79]</sup>. 目前对 STAT 丝氨酸磷酸化的重要性并未完全了解, 已知 STAT 与其他途径有交叉, 如丝分裂素 - 活化蛋白激酶, 提示 STAT 的作用已深入至信号网络的复合体中.

除丝氨酸激酶之外, 其他 STAT 信号活化剂也已被识别, 包括组蛋白乙酰转移酶( histone acetyl transferases) p300/CBP、转录因子 c-jun、Sp1 和糖皮质激素受体、共激活剂 Nmi 和 MCM、核易位蛋白 NPI-1 和 p48<sup>[3, 70]</sup>. 对上述 STAT 信号调节剂的生理作用仍需进一步研究. 由于 STAT 活性的下调作用与肿瘤的发生和进展密切相关, 所以 STAT 分子间的相互作用对自身活性的调节在肿瘤的发生和进展过程中也具有重要作用.

#### 5 STAT 信号与肿瘤的干预治疗

重要的基础研究不仅有助于确定与肿瘤进展相关的特殊癌基因, 而且有助于描绘整个信息通道的整体轮廓. 有关信号途径的认识对肿瘤药物的开发也具有广泛的影响. 通过小分子抑制剂阻断酪氨酸激酶的信号传导, 可抑制不同肿瘤细胞株中 Stat3 或 Stat5 的组成性激活, 这一作用与肿瘤细胞的生长抑制和诱导凋亡相关. 相对而言, 缺乏 STAT 活性作用的正常细胞或肿瘤细胞对药物的耐受能力更强<sup>[29-30, 80-81]</sup>. 如使用非显性 STAT 或反义寡核苷酸, 直接干预 STAT 信号时可获得相似的效应<sup>[29]</sup>. 目前进行的一些有关细胞培养和动物模型实验, 已确认 Stat3 和 Stat5 信号途径是多种人类肿瘤干预治疗的有效的分子靶<sup>[3, 10, 26, 28]</sup>. 今后对 STAT 蛋白仍需进一步探究, 除了发展酪氨酸激酶抑制剂、STAT 反义寡核苷酸和非显性 STAT 蛋白以外, 考虑选择性针对 STAT 信号靶点的方法也很重要<sup>[26, 82]</sup>, 这些方法包括: (1)开发受体 - 配体相互作用的拮抗剂, 如细胞因子拮抗剂和受体中和抗体; (2)改变与 STAT 有交互作用的蛋白, 如 SOCS 家族的成员; (3)抑制由 STAT 激活的丝氨酸激酶的活性; (4)激活 STAT 特异的磷酸酶; (5)以与恶性肿瘤进展相关的 STAT 调节基因为靶目标; (6)开发小分子抑制剂, 干扰 STAT 二聚体的形成和 / 或 DNA 的结合力.

#### 6 STAT 的发展前景

任何一种具有致癌特性的酪氨酸激酶的活化都会导致肿瘤的发生. STAT 为酪氨酸激酶信号的传导提供了一个汇集点, 为肿瘤药物的开发提供了富有前景的目标. 与众多的酪氨酸激酶相反, STAT 的一个引人注目的特征是只有两个分子靶 Stat3 和 Stat5. 此外, 许多研究显示单独阻断 Stat3 或 Stat5 的功能均能抑制肿瘤细胞的生长和诱导凋亡.

癌症患者可能会对任何一种单一的治疗如酪氨酸激酶抑制剂产生耐受, 因此需要更为有效的治疗措施. 在药物开发过程中, 通过对 STAT 结构和活性关系的研究, 需设计特异性的分子检测手段应用于药物的改进



中, 评估活化的 Stat3 和 Stat5 的 DNA 结合力以及基因调控能力. 临床上, 通过对肿瘤患者的活检, 应用免疫组织化学方法观察 Stat3 和 Stat5 的酪氨酸磷酸化形式的表达情况, 为监测 STAT 信号的有效抑制提供适宜的分子标志. 通过基因芯片技术描绘的基因表达谱有助于阐明与诊断和预后相关的 STAT 调节基因的分子标志.

总之, 对 STAT 蛋白的深入研究不仅为阐明酪氨酸激酶抑制剂的作用机制提供了可能, 而且还为肿瘤治疗提供了新的分子靶点. 开发 STAT 蛋白(尤其是作为肿瘤治疗分子靶点的 Stat3 和 Stat5)的抑制剂, 有助于进一步探究这些蛋白在人类肿瘤中所起的重要作用.

## 7 参考文献

- Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630-1635
- Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994;264:1415-1421
- Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 2000;19:2468-2473
- Darnell JE Jr. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:549-554
- Decker T, Kovarik P. Transcription factor activity of STAT proteins: structural requirements and regulation by phosphorylation and interacting proteins. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1535-1546
- Schindler C, Brutsaert S. Interferons as a paradigm for cytokine signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1509-1522
- Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:211-217
- Heim MH, Kerr IM, Stark GR, Darnell JE Jr. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 1995;267:1347-1349
- Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene* 2000;19:2532-2547
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474-2488
- Smithgall TE, Briggs SD, Schreiner S, Lerner EC, Cheng H, Wilson MB. Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene* 2000;19:2612-2618
- Lin TS, Mahajan S, Frank DA. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene* 2000;19:2496-2504
- Daniel NN, Rothman P. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* 2000;19:2523-2531
- Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr, Kuriyan J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 1998;93:827-839
- Becker S, Groner B, Muller CW. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 1998;394:145-1451
- Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE Jr. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 1994;76:821-828
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995;82:241-250
- Caldenhoven E, van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, de Groot RP. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem* 1996;271:13221-13227
- Sasse J, Hemmann U, Schwartz C, Schniertshauer U, Heesel B, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Heinrich PC, Horn F. Mutational analysis of acute-phase response factor/Stat3 activation and dimerization. *Mol Cell Biol* 1997;17:4677-4686
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell* 1999;98:295-303
- Garcia R, Jove R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J Biomed Sci* 1998;5:79-85
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999;10:105-115
- Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *J Clin Invest* 1998;102:1385-1392
- Coffer PJ, Koenderman L, de Groot RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene* 2000;19:2511-2522
- Herrington J, Smit LS, Schwartz J, Carter-Su C. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene* 2000;19:2585-2597
- Turkson J, Jove RH. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 2000;19:6613-6626
- Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer and activator of transcription. *Curr Opin Oncol* 1999;11:490-496
- Song JJ, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene* 2000;19:2489-2495
- Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:2499-2513
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999;10:105-115
- Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7673-7678
- Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, Kuhbacher T, Hamling J, Folsch UR, Seeger D. Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;51:379-385
- Starkel P, Bishop K, Horsmans Y, Strain AJ. Expression and DNA-binding activity of signal transducer and activator of transcription 3 in alcoholic cirrhosis compared to normal liver and primary biliary cirrhosis in humans. *Am J Pathol* 2003;162:587-596
- Tacchini L, Fusar-Poli D, Sironi M, Mantovani A, Bernelli-Zazzera A. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in rat liver after heat shock and reperfusion stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:316-323
- Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svegaard A, Eriksen KW, Woetmann A, Odum N. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:16777-16781
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3801-3804
- Welte T, Zhang SS, Wang T, Zhang Z, Hesslein DG, Yin Z, Kano A, Iwamoto Y, Li E, Craft JE, Bothwell AL, Fikrig E, Koni PA, Flavell RA, Fu XY. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:1879-1884
- Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 2000;19:2577-2584
- Akira S. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 2000;19:2607-2611

- 40 Levy DE. Physiological significance of STAT proteins: investigations through gene disruption in vivo. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55:1559-1567
- 41 Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke AR, Watson CJ. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in micewith a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* 1999; 13:2604-2616
- 42 Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, Yoshikawa K, Akira S, Takeda J. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J* 1999;18:4657-4668
- 43 Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999;10:39-49
- 44 Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature* 1995;377:591-594
- 45 Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* 2000;19:2619-2627
- 46 Kotenko SV, Pestka S. Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes. *Oncogene* 2000;19:2557-2565
- 47 Dearolf CR. JAKs and STATs in invertebrate model organisms. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1578-1584
- 48 Lin JX, Leonard WJ. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* 2000;19:2566-2576
- 49 Schindler C, Darnell JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 1995;64:621-651
- 50 Zeidler MP, Bach EA, Perrimon N. The roles of the drosophila JAK/STAT pathway. *Oncogene* 2000;19:2598-606
- 51 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
- 52 Smithgall TE, Briggs SD, Schreiner S, Lerner EC, Cheng H, Wilson MB. Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene* 2000;19:2612-2618
- 53 Mui AL. The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1547-1558
- 54 Garcia R, Yu CL, Hudnall A, Catlett R, Nelson KL, Smithgall T, Fujita DJ, Ethier SP, Jove R. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1997;8:1267-1276
- 55 梁斌, 王杉, 祝学光, 于永祥, 马向涛, 崔志荣. 转录信号传导子和激活子 3 在人胃癌组织中的表达意义. *中华实验外科杂志* 2001; 18:313-314
- 56 Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, Larner AC, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 1995;269:81-83
- 57 Cao X, Tay A, Guy GR, Tan YH. Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines. *Mol Cell Biol* 1996;16:1595-1603
- 58 Chaturvedi P, Sharma S, Reddy EP. Abrogation of interleukin-3 dependence of myeloid cells by the v-src oncogene requires SH2 and SH3 domains which specify activation of STATs. *Mol Cell Biol* 1997;17:3295-3304
- 59 Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, Lathem WW, Darnell JE Jr. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 1998;18:2553-2558
- 60 Turkson J, Bowman T, Garcia R, Caldenhoven E, De Groot RP, Jove R. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* 1998; 18:2545-2552
- 61 冯德云, 郑晖, 蒋海鹰, 颜亚辉, 谭怡, 程瑞雪. STAT3 磷酸化与 c-fos 和 c-jun 蛋白表达在肝细胞癌发生中的作用. *湖南医科大学学报* 2001;26:17-19
- 62 Kanai M, Konda Y, Nakajima T, Izumi Y, Kanda N, Nanakin A, Kubohara Y, Chiba T. Differentiation-inducing factor-1 (DIF-1) inhibits STAT3 activity involved in gastric cancer cell proliferation via MEK-ERK-dependent pathway. *Oncogene* 2003;22:548-554
- 63 马向涛, 王杉, 杜如昱, 叶颖江, 王殊, 严飞飞, 崔志荣. Stat3 信号传导通路对结肠癌细胞 G<sub>1</sub>-S 期的调控. *北京大学学报(医学版)* 2003;35:50-53
- 64 Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a<sup>-/-</sup> Stat5b<sup>-/-</sup> mice: adirect role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999;98:181-191
- 65 Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, Johnson DE, Huang L, He Y, Kim JD. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cellcarcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:4227-4232
- 66 Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* 2000;96:2269-2276
- 67 Greten FR, Weber CK, Greten TF, Schneider G, Wagner M, Adler G, Schmid RM. Stat3 and NF-kappaB activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology* 2002;123:2052-2063
- 68 Matsui T, Kinoshita T, Hirano T, Yokota T, Miyajima A. STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development. *J Biol Chem* 2002;277:36167-36173
- 69 Wei D, Le X, Zheng L, Wang L, Frey JA, Gao AC, Peng Z, Huang S, Xiong HQ, Abbruzzese JL, Xie K. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 2003;22:319-329
- 70 Shuai K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 2000;19:2638-2644
- 71 Greenhalgh CJ, Hilton DJ. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol* 2001;70:348-356
- 72 Starr R, Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* 1999;21:47-52
- 73 Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999;18:1309-1320
- 74 Marine JC, McKay C, Wang D, Topham DJ, Parganas E, Nakajima H, Penderville H, Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A, Ihle JN. SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* 1999;98:617-627
- 75 Levy DE, Gilliland DG. Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice. *Oncogene* 2000;19:2505-2510
- 75 Levy DE, Gilliland DG. Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice. *Oncogene* 2000;19:2505-2510
- 76 Frantsve J, Schwaller J, Sternberg DW, Kutok J, Gilliland DG. Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 2001;21:3547-3557
- 77 Koyama M, Nagai H, Bando K, Ito M, Moriyama Y, Emi M. Localization of a target region of allelic loss to a 1-cM interval on chromosome 16p.13.13 in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:951-956
- 78 Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000;19:2628-2637
- 79 Turkson J, Bowman T, Adnane J, Zhang Y, Djeu JY, Sekharam M, Frank DA, Holzman LB, Wu J, Sefti S, Jove R. Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Mol Cell Biol* 1999;19:7519-7528
- 80 Donato NJ, Wu JY, Zhang L, Kantarjian H, Talpaz M. Down-regulation of interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta-chain in BCR-ABL(+) human leukemic cells: association with loss of cytokine-mediated Stat-5 activation and protection from apoptosis after BCR-ABL inhibition. *Blood* 2001;97:2846-2853
- 81 Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP Jr. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* 2001;107:351-362
- 82 Seidel HM, Lamb P, Rosen J. Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway. *Oncogene* 2000;19:2645-2656

# 大肠癌早期诊断新技术

张渊智, 李世荣

张渊智, 李世荣, 北京军区总医院消化科 北京市 100700  
项目负责人: 张渊智, 100700, 北京市, 北京军区总医院消化科.  
jianming2000@163.com  
电话: 010-86357923  
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

早期发现大肠癌及癌前病变有助于降低大肠癌的发病率和死亡率. 大便潜血试验是最常使用的大肠癌筛检方法, 再水化愈创木酯试验可增加灵敏度, 但特异性较无再水化者低; 免疫化学法灵敏度和特异性均较高. 仿真结肠镜灵敏度和特异性类似结肠镜检查, 并能消除净化肠道带来的不适, 增加患者的依从性. 检查粪便大肠癌组织脱落的标准物是目前大肠癌筛检技术研究的热点. 直接寻找粪便脱落癌细胞、检测粪便脱落细胞DNA含量等均具有较高的灵敏度和特异性. 在大肠癌组织检出的基因突变, 同样可以在患者粪便脱落细胞内检出. 同时检测大肠脱落细胞内 K-ras、APC、p53 等多个基因突变和微卫星、凋亡等标准物对于筛检大肠癌及其癌前病变具有很好的灵敏度和特异性. 检测大肠肿瘤特异的蛋白标准物更能增加筛检的灵敏度和特异性. 粪便癌胚抗原、促衰变因子、STn 抗原等均具有较好的效果.

张渊智, 李世荣. 大肠癌早期诊断新技术. 世界华人消化杂志 2004;12(5): 1202-1206

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1202.asp>

## 0 引言

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是临床上常见的恶性肿瘤, 为西方国家第2位高发恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 死亡率位居美国癌症死因的第3位<sup>[2]</sup>; 在我国大肠癌死亡率位居癌症死因的第4-6位<sup>[3-17]</sup>, 并且发病率和死亡率均有逐年上升的趋势<sup>[9, 11-17]</sup>. 西方统计资料显示, 人一生中患大肠癌的危险度为5-6%, 50岁以后发病率急剧上升, 而且75%的病例发生于普通人群<sup>[18]</sup>. 大肠癌患者的生存率直接与诊断时疾病的严重程度相关, 进展期大肠癌患者5 a生存率约为7%, 而早期诊断的患者, 5 a生存率则可达92%<sup>[18]</sup>; 并且早期发现和切除癌变前的息肉更有助于降低大肠癌的发病率和死亡率<sup>[19]</sup>. 早期大肠癌一般指Dukes A期, 即TNM分期的T<sub>1-2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>. 大肠癌的早期诊断包括两方面: 一方面是有症状患者的早期诊断, 另一方面是无症状早期大肠癌患者的诊断. 众所周知, 相当多的早期大肠癌和癌前病变患者无任何症状, 欲检出这部分患者, 必须开展无症状人群的普查. 目前国内外普遍采用先以无创、低价、简便、有效

的方法筛检出大肠癌高危对象, 再继以精查的方法确诊. 近年来国内外开发或改良了许多大肠癌早期诊断新技术, 以下就大便潜血试验、仿真结肠镜、粪便脱落标志物检测等方面的研究作简要综述.

## 1 大便潜血试验

大便潜血是早期大肠癌的特征性表现之一. 大便潜血试验(fecal occult blood test, FOBT)是大肠癌临床检验和普查最常使用的方法, 分为五类: 放射分析法、物理法、化学法、免疫化学法和血红蛋白-卟啉试验. 放射分析法是静脉注射<sup>51</sup>Cr标记的红细胞后检测粪便放射活性, 用于定量分析, 但日常使用太复杂; 物理法是通过显微镜检测粪便红细胞和血色素晶体, 或分光仪鉴定血红蛋白及其衍生物, 主要用于学术研究; 血红蛋白-卟啉试验可检出任何形式的血红素如游离的血红素或与珠蛋白结合的血红素及其多种衍生物, 用于定量分析大肠癌的隐性出血, 但由于对上消化道出血的高灵敏性, 降低了筛检大肠癌的特异性<sup>[20]</sup>; 化学法和免疫化学法比较常用, 被美国胃肠病学会推荐用于普通人群筛检大肠癌<sup>[20]</sup>.

化学法以愈创木酯试验为代表, 原理是血红蛋白分子的高铁血红素部分具有假性过氧化物酶(pseudoperoxidase)活性, 可催化裂解过氧化氢, 其衍生物与指示剂反应偶联, 氧化显色剂的氧受体而形成有色产物, 从而判断粪便中是否含有血红蛋白或血红素. 显色剂常用联苯胺(benzidine), 但由于其致癌性, 最近有报道应用三环类抗抑郁药盐酸丙咪嗪(imipramine hydrochloride, IPH)和去甲丙咪嗪盐酸盐(desipramine hydrochloride, DPH)等代替联苯胺, 作为新的大便潜血检测显色剂<sup>[21]</sup>. 再水化愈创木酯试验可以增加反应的灵敏度, 但同时也可激活各种干扰因素的过氧化物酶活性而增加假阳性率<sup>[22-23]</sup>, 研究发现无再水化时假阳性率为2-4%, 再水化时则达8-16%<sup>[18]</sup>, 而且再水化愈创木酯试验可使肿瘤的预测价值从44%下降到19%<sup>[22]</sup>. 由于愈创木酯试验检测血红蛋白不具有人类特异性, 食用肉的非人类血红蛋白和其他具有过氧化物酶活性的膳食成分(如菠菜等)、过多的维生素C、非甾体抗炎药(NSAIDs)等均可引起假阳性, 检查前常需限制膳食. 但应用无再水化愈创木酯试验时, 食用红肉的假阳性率只有0.7%<sup>[24]</sup>, 检查前无须限制膳食<sup>[20]</sup>. 愈创木酯试验一般检测3次连续的大便, 每次取2个样本. 尽管单次试验的灵敏度很低(30-50%), 但每年1次的检测方案能够检出大约92%的大

肠癌患者<sup>[20]</sup>. 在美国明尼苏达州进行的一项随机对照试验显示大肠癌的累积死亡率, 应用每年一次的再水化 FOBT 时在 13 a 与 18 a 后均降低了 33%<sup>[25-26]</sup>, 2 a/次者在 18 a 后降低了 21%<sup>[26]</sup>; 而应用 2 a/次的无再水化 FOBT 时在 7.8 a 和 10 a 后分别降低了 15% 和 18%<sup>[27-28]</sup>. 因此美国癌症学会和胃肠病学会推荐使用每年一次的无再水化 FOBT 筛检大肠癌<sup>[20, 29]</sup>.

免疫化学法 FOBT 是利用抗原、抗体的特异性结合, 使用单克隆或多克隆抗体检测粪便内未受破坏的人血红蛋白的珠蛋白部分或其他血液产物. 由于珠蛋白通过上消化道时已被降解、代谢而失去免疫原性, 免疫化学法检测粪便潜血对于结肠和直肠出血更具特异性<sup>[30-31]</sup>, 明显优于愈创木酯试验, 后者对上、下消化道出血具有同等的灵敏度<sup>[22]</sup>. 免疫化学 FOBT 不与非人类血红蛋白反应, 不必限制膳食, 受上消化道出血的影响也最小, 但非甾体抗炎药和其他常见的大肠非肿瘤性出血仍可引起假阳性<sup>[21]</sup>. 免疫化学 FOBT 筛检大肠癌较愈创木酯试验更精确, 目前在日本已经广泛用于筛检大肠癌<sup>[32]</sup>. Nakama et al<sup>[33]</sup>采用 3 d 粪便收集法, 使用免疫化学 FOBT 检测大于 1 cm 的腺瘤, 结果显示灵敏度和特异性分别为 48% 和 97%. Wong et al<sup>[34]</sup>发现愈创木酯试验虽然是西方国家筛检大肠癌最常使用的 FOBT, 但用于检测中国人非常明显的肿瘤时特异性很低; 而使用人类血红蛋白特异的自动免疫化学法 FOBT 时, 检测明显的结肠肿瘤(癌和  $\geq 1.0$  cm 的腺瘤)的灵敏度、特异性及阳性预测值分别为 62%、93% 和 44%. 与愈创木酯试验相比较, 免疫化学法提高了检测的特异性和患者的依从性, 不足之处是仍然是检测大便潜血, 灵敏度有限<sup>[18]</sup>. 因为肿瘤是间歇性出血, 而且大多数腺瘤很少出血; 此外结肠或直肠的其他非癌或非腺瘤性病变如炎症或痔疮等也可引起出血.

FOBT 的基础是结肠和直肠内的癌和息肉出血, 灵敏度和特异性有限, 但由于他的非侵袭性、简单、有效、便宜等优点, 广泛用于高危人群和 50 岁以上的普通人群初步筛检大肠癌.

## 2 仿真结肠镜检查

仿真结肠镜检查(virtual colonoscopy)或 CT 结肠成像术(computed tomography colonography, CTC)是一种模拟传统结肠镜检查的成像技术, 通过使用结合多次螺旋 CT 扫描的计算机程序而产生患者结肠内部的二维或三维图像, 为新一代大肠评价技术<sup>[35-36]</sup>. CTC 同传统的结肠镜一样, 检查前需清洗大肠, 一般建议患者 48 h 内进少渣膳食; 此外还要求使用空气扩张大肠, 亦可使用二氧化碳代替空气, 以减少患者的不适感, 但同时也增加了操作的复杂性和费用<sup>[35]</sup>. 检查大于 1 cm 的息肉, CTC 的精确度与传统结肠镜检查相当, 很少出现假阳性, 对于经验丰富的放射学专家, 灵敏度和特异性均可达 90%; 而检查 0.5 cm 大小的息肉时灵敏度则下降到 50%<sup>[36]</sup>.

CTC 具有鉴别传统结肠镜检查无法鉴别的结肠癌如位于结肠袋折叠处等特殊位置内肿瘤的潜在优势, 同时也适用于各种主、客观原因无法完成结肠镜检查的患者; 此外, CTC 也为患者提供了是否进行大肠息肉切除术的选择, 因为比较小的增生性息肉, 近期内不可能演变为癌, 手术切除可能不会带来任何临床上的好处, 而 CTC 则可能会成为随访和监督这些患者的合适选择<sup>[35]</sup>. 与结肠镜检查和双重钡灌肠检查相比较, 患者对 CTC 具有更好的依从性<sup>[37]</sup>. CTC 也有许多不足之处<sup>[35]</sup>, 大约有 15% 的假阳性率, 原因可能是: (1)粪便储留; (2)憩室性疾病造成结肠扩张不充分; (3)误认增厚或复杂的结肠袋为息肉或包块; (4)体内金属植入或运动假象. 此外, 大肠扁平腺瘤虽然少见, 但较典型腺瘤性息肉更具侵袭性、更易恶变, 目前尚无 CTC 检查这种病变能力的报道; 增生性息肉较腺瘤性息肉更柔软, 在空气充分扩张大肠时呈扁平状, CTC 也不易检出; CTC 是非治疗性检查, 无法在检查期间同时进行息肉切除术, 而且所有阳性者必须随后进行结肠镜检查证实, 费用也较传统结肠镜检查高的多. 美国癌症学会大肠癌咨询小组认为, CTC 是一种相当有希望的新兴技术, 但目前尚未在普通人群大肠癌筛检中得到验证, 无法判断是否相当或优于传统的大肠癌筛检技术<sup>[35]</sup>.

磁共振结肠成像术(magnetic resonance colonography, MRC)是另一种新兴的大肠癌筛检技术. MRC 具有所有磁共振的优点如无放射性和多平面成像的能力, 作用类似于 CTC, 在大肠癌的诊断和筛检中具有较高的灵敏度和特异性, 与传统结肠镜检查相当, 优于双重对比钡灌肠造影检查<sup>[38]</sup>. 不足之处是检查前仍需净化大肠. 最近有使用粪便标签(fecal tagging)技术, 能很好地消除净化大肠时带来的不适, 增加患者的依从性<sup>[39]</sup>. 尽管仿真结肠镜检查的费用远高于传统的大肠癌诊断和筛检技术, 但随着未来智能计算机的发展, CTC 或 MRC 可能会代替传统的诊断性结肠镜检查, 成为现实的选择<sup>[38]</sup>.

## 3 粪便大肠脱落标志物检测

粪便筛检试验不同于其他大肠癌筛检技术, 具有非侵袭性和不需要导泻的优点. 然而目前广泛使用的 FOBT 假阳率和假阴率较高, 降低了筛检的有效性, 并增加了筛检的费用; 而且 FOBT 检测粪便潜血, 对于筛检大肠癌而言, 是一种固有的不灵敏和非特异性标志物. 选用更准确的粪便标志物, 能够极大地提高筛检的有效性和效率. 与血液标志物不同, 从大肠黏膜脱落的标志物本身来自于肿瘤, 并可持续释放, 检测这些标志物可同时增加筛检的特异性和灵敏度. 从理论上讲, 任何反映细胞发育异常的大肠黏膜上皮细胞成分均可成为这类标志物. 随着粪便脱落细胞分离和收集技术的发展<sup>[40-44]</sup>, 检测粪便大肠脱落标志物成为目前非侵袭性大肠癌筛检技术研究的热点.

3.1 粪大肠脱落细胞学检测 正常肠黏膜每 24 h 有  $10^{10}$

个上皮细胞脱落,而肿瘤上皮细胞更新速度更快,每天约有1%脱落入肠道并随粪便排出体外。不同的是,正常大肠黏膜脱落的主要是凋亡细胞,而大肠癌组织脱落的则主要是大量细胞角蛋白免疫染色阳性的健康结肠细胞和炎性细胞,并且脱落的健康结肠细胞仍保留表达肿瘤相关抗原的特性<sup>[45]</sup>。收集粪便中大肠脱落上皮细胞进行常规病理学检查,研究发现对于大肠恶性肿瘤的诊断具有较高的灵敏度和特异性<sup>[43, 46]</sup>。小染色体维持蛋白-2(minichromosome maintenance protein 2, MCM2)是DNA复制必需的复制前复合物成分之一,正常时表达局限于大肠隐窝基底1/3-1/2的增生带部分,但大肠腺瘤或腺癌时则可在表面大肠细胞表达<sup>[47]</sup>。Davies et al<sup>[48]</sup>应用免疫细胞化学法检测25例对照者和40例大肠癌患者粪便脱落细胞MCM2,对照组均未发现阳性细胞;大肠癌组37例MCM2阳性,而3例阴性者均为右半结肠癌。提示应用免疫细胞化学法检测粪便MCM2阳性细胞,能够精确地筛检大肠癌。

**3.2 粪大肠脱落细胞DNA标志物检测** 检测粪便内脱落肿瘤细胞的DNA标准物筛检大肠癌是很有发展前途的一种新兴非侵袭性筛检技术。DNA能够在粪便内稳定存在,并可持续从大肠黏膜脱落,使用PCR扩增技术可以检测粪便内微量的DNA<sup>[20, 35]</sup>。正常体细胞染色体倍数和核DNA含量恒定,而恶性肿瘤细胞多数情况下染色体数目增加,DNA含量增加。在正常大肠黏膜经腺瘤向腺癌发展过程中,DNA含量呈逐渐增加的趋势,一些学者检测粪脱落细胞DNA含量,发现对大肠癌的诊断和预测具有较高的灵敏度与特异性<sup>[42, 47, 49]</sup>。多项研究显示在大肠癌组织中检出的基因突变,同样可以在患者粪脱落细胞内检出,具有很高的致一致性<sup>[31, 35, 50]</sup>。检测粪脱落细胞的基因改变在非侵袭性大肠癌筛检技术的研究中具有重要的意义,但大肠癌在遗传学上是高度异质的,到目前为止尚未确定出所有大肠癌均发生的单一突变,而且并非所有的DNA突变都是肿瘤细胞特异的,如K-ras突变亦可来自于过度增生的腺瘤、增生反常的隐窝甚至正常的大肠黏膜组织<sup>[31]</sup>。目前研究的热点已由过去检测单个基因的改变转向同时检测多个基因突变预测大肠癌的发生<sup>[31, 35, 50-51]</sup>。Ahlquist et al<sup>[51]</sup>对22个大肠癌患者、11个恶性腺瘤患者和28个正常大肠黏膜受试者同时检测粪便脱落细胞K-ras、APC、p53等基因的15个热点突变和Bat-26(一种微卫星不稳定性标志物)、长片段DNA(“long” DNA)(大于200 bp)等标志物,结果显示每一标准物均参与结果分析时检测大肠癌的灵敏度是91%,恶性腺瘤的灵敏度和特异性分别是82%和93%;如果从分析中剔除K-ras(因为以前的研究显示K-ras突变能够在正常大肠黏膜检出),检测大肠癌的灵敏度没有变化,但检测恶性腺瘤的灵敏度下降到73%,而特异性则上升至100%。在同时进行的FOBT检查中,恶性腺瘤患者粪便未发现任何潜血试验阳性者。Tagore et al<sup>[52]</sup>对80个进展期大肠肿瘤患者

(遗传性非息肉病性大肠癌除外)和212个对照受试者进行的类似研究发现,侵袭性大肠癌的检出率为63.5%(33/52),其中无结节者(TNM分期I/II)为72.2%(26/36),进展期者(TNM分期III/IV)为43.7%(7/16);进展期腺瘤(包括高度不典型增生、绒毛状腺瘤或大于1cm的管状腺瘤)的检出率为57.1%(16/28),其中高度不典型增生为85.7%(6/7),其他进展期腺瘤为47.6%(10/21);在无结肠病变或仅有小息肉的患者,特异性为96.2%、提示DNA通过大肠全长时没有被降解,检测粪脱落细胞多个靶基因突变对于大肠任何位点的恶性肿瘤及癌前病变筛检均具有较高的灵敏度和特异性<sup>[31, 35, 50-52]</sup>。检测粪便脱落细胞的基因突变筛检大肠癌具有很多优点<sup>[35]</sup>:(1)所检测基因突变均为大肠癌特异性较高者;(2)标志物恒定,分析仅需一份大便标本;(3)具有很高的灵敏度和特异性;(4)依从性更好;(5)假阳性率低;(6)近端大肠癌检出率高。但同时亦有很多不足之处,如缺乏人群筛检资料的支持、基因检测数目和更特异基因的选择、费用过高等<sup>[35]</sup>。因此,在应用于人群筛检前仍有许多亟待解决的问题。

**3.3 粪大肠脱落细胞蛋白标志物检测** 粪便内大肠脱落细胞的蛋白质是另一类很有发展前途的生物标志物。粪便内脱落的蛋白标志物分为两类:一类是非大肠上皮细胞的蛋白成分,如钙卫蛋白(calprotectin)等。钙卫蛋白来源于中性粒细胞的钙结合蛋白,一些学者发现大肠炎症性疾病和结肠癌患者粪便钙卫蛋白明显升高,但无法鉴别这两种疾病<sup>[53-55]</sup>。最近Limburg et al<sup>[56]</sup>在普通人群进行的临床研究显示,大肠肿瘤患者与非肿瘤患者粪钙卫蛋白浓度没有显著性差异。提示该类蛋白标准物用于筛检大肠肿瘤时效果较差。另一类蛋白标志物是大肠上皮细胞本身的蛋白成分。由于mRNA的表达可能与细胞内活性蛋白的量不相关,同时基因序列并不能描述蛋白质翻译后的修饰,而这些过程对蛋白质的功能和活性可能是必需的<sup>[57]</sup>。分析细胞内的蛋白质,亦称蛋白组学(proteomics),有可能在蛋白水平对个体疾病过程(尤其是肿瘤)作出比较全面的判断。基于蛋白组学的试验有可能检出以蛋白质为基础的肿瘤特异性产物,并能够鉴别肿瘤患者与非肿瘤患者<sup>[58]</sup>。从理论上讲,检测肿瘤特异性抗原能够增加大肠癌筛检的灵敏度和特异性。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)是最早应用于临床的大肠癌相关抗原,广泛用于血清学检测大肠癌。早在1987年Shimano et al<sup>[59]</sup>应用抗CEA的抗血清检测大肠癌患者粪便CEA,显示较高的灵敏度和特异性,明显优于血清学检测。Kim et al<sup>[60]</sup>比较粪便CEA、血清CEA和FOBT等筛检大肠癌的灵敏度与特异性,发现86%(24/28)的大肠癌患者粪便CEA大于10 ng/mg粪便,而血清CEA(大于5 ng/mL)、FOBT检测大肠癌的灵敏度分别为39%和21%,并且粪CEA的特异性类似于FOBT和血清CEA,提示检测粪CEA是一项可供选择的非侵袭性大肠癌筛检技术。Mizuno et al<sup>[61]</sup>发现大肠癌



患者粪便促衰变因子(decay-accelerating factor, DAF)或CD55水平明显高于大肠息肉、上消化道癌等患者和无消化道疾病的受试者, 而且大部分小于2 cm的大肠肿瘤和早期或粪潜血试验阴性的大肠癌患者粪便DAF阳性, 筛检大肠癌的灵敏度和特异性分别为55%和85%。Iwagaki et al<sup>[62]</sup>应用抗DAF单克隆抗体包被的ELISA检测系统, 能够可靠地检出粪便内极低浓度的DAF, 极大地提高了筛检的灵敏度。大肠癌细胞能够产生一种具有STn(sialylated-Tn)抗原决定簇的异常粘蛋白, 在免疫学上明显不同于正常的大肠粘蛋白, 并可与抗结肠-卵巢肿瘤抗原(colon-ovarian tumor antigen, COTA)的单克隆抗体SP-21发生特异性免疫反应<sup>[63]</sup>。Pant et al<sup>[63]</sup>采用离心和乙醇沉淀的方法从粪便中分离出可溶性糖蛋白, 应用SP-21定量检测大肠脱落黏膜上皮细胞COTA的表达, 发现大肠癌、异型增生和腺瘤等患者COTA表达明显高于大肠黏膜正常的患者, 以COTA值大于15 μg/mL为肿瘤阳性判断标准时, 5/6的结肠癌、6/22的腺瘤、1/8的结肠炎患者和2/58的正常人结果阳性, 筛检大肠癌的灵敏度和特异性均优于目前的愈创木酯试验。

3.4 其他粪大肠脱落细胞标志物 除上述标志物外, 亦有关于检测粪大肠脱落细胞特异基因转录水平表达并用于大肠癌筛检的研究。人类大肠腺癌组织经常过度表达CD44外显子, Yamao et al<sup>[64]</sup>应用RT-PCR和Southern杂交技术检测25例大肠癌患者手术前、后及15名健康自愿者粪脱落细胞CD44标准型、变异体6和变异体10等mRNA表达, 发现大肠癌患者手术前、后及所有健康志愿者均可检出CD44标准型mRNA, 变异体6和变异体10在大肠癌患者手术前粪便检出率分别为68%(17/25)和60%(15/25), 术后检出率分别为12%(3/25)和28%(7/25); 其中术前CD44变异体6阳性者术后阴转率为88.2%(15/17), 变异体10阴转率为80%(12/15), 而健康受试者仅有1名变异体阳性, 提示粪脱落细胞CD44变异体表达分析可作为非侵袭性试验用于诊断和筛检大肠癌。

总之, 非侵袭性检查为目前大肠癌筛检技术研究的趋势, 包括大便潜血试验、仿真结肠镜检查、粪大肠脱落细胞标志物检查等。其中粪大肠脱落细胞标志物为目前研究的热点, 最具发展前景。相信随着分子生物学技术、生物信息学和功能蛋白组分析技术等的发展, 将会有更多、更特异的基因组合和肿瘤相关抗原应用于临床检测和普查, 在大肠癌即将形成或早期就能预测或诊断。

#### 4 参考文献

- Steinert R, Buschmann T, van der Linden M, Fels LM, Lippert H, Reymond MA. The role of proteomics in the diagnosis and outcome prediction in colorectal cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2002;1:297-304
- Price AS. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterol Nurs* 2003;26:73-81

- 贺立绩, 王桂芳, 黄瑞德, 田永虎. 1990年-1992年山西阳城居民恶性肿瘤死亡情况分析. *肿瘤研究与临床* 2000;12:430-431
- 陈建顺, 陈礼慈, 游建旺, 陈心聪, 谢国评. 长乐市中年人恶性肿瘤死亡分析. *中国肿瘤* 2001;10:514-515
- 王寒松, 江建华, 倪倬健, 朱国华. 海门市1999-2000年恶性肿瘤发病状况分析. *中国肿瘤* 2001;10:509-511
- 李安乐, 方顺源, 汪志强. 杭州市1993-2000年主要恶性肿瘤死亡情况. *中国肿瘤* 2001;10:711-712
- 刘曙正, 戴涤新, 李刚. 河南省2001年恶性肿瘤死亡率分布状况. *中国肿瘤* 2002;11:705-706
- 刘月华, 海东, 张志学, 夏季杰. 黑龙江省1994-1999年恶性肿瘤死亡监测分析. *疾病检测* 2001;16:145-146
- 林英姬, 戴旭东, 孙喜文, 韩惠丽, 卢爱梅, 卢彦, 陈丽君. 黑龙江省主要城市1995年和2000年恶性肿瘤发病与死亡分析. *中国肿瘤* 2002;11:29-30
- 马新源, 汪祥辉, 雷通海, 钱明富, 姚开颜, 李其龙. 嘉善县大肠癌发病特征及流行趋势分析. *中国肿瘤* 2001;10:375-376
- 于永礼, 鲁惠琴. 宁夏永宁县恶性肿瘤变动趋势分析. *肿瘤* 1999;19:368-369
- 徐晓初, 沈国英, 张霞, 戴克俊, 董淑丽, 白雪林, 刘海温. 上海市长宁区1997-2001年居民主要恶性肿瘤死亡动态分析. *上海预防医学杂志* 2003;15:86-87
- 金凡, 周淑贞, 陶蓉芳, 茹蓉, 项永兵, 孙璐, 高玉堂. 上海市区恶性肿瘤发病趋势1972-1994年. *肿瘤* 1999;19:255-258
- 陆应祖, 赵金扣, 武鸣, 王培桦. 苏北地区恶性肿瘤的死亡现状及分布. *中国肿瘤* 2001;10:512-514
- 罗晋卿, 苏辉民, 蒙唏. 梧州市区1981-2000年主要恶性肿瘤发病趋势. *中国肿瘤* 2002;11:278-279
- 魏矿荣, 王德坤, 余元龙, 钱峰, 郑爱昂, 梁智恒, 刘倩婷. 中山市30 a恶性肿瘤死因分析. *中国肿瘤* 2002;11:89-90
- 李玲, 王启俊, 祝伟星, 刑秀梅. 北京城区居民1982-1997年癌症发病趋势. *中国肿瘤* 2001;10:507-509
- Strul H, Arber N. Fecal occult blood test for colorectal cancer screening. *Ann Oncol* 2002;13:51-56
- Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA, Jemal A, Ward E, Anderson RN, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1276-1299
- Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmam C. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;124:544-560
- Syed AA, Khatoon BA, Silwadi MF. New reagents for detection of fecal occult blood. *J Pharm Biomed Anal* 2001;24:581-586
- Syed AA, Silwadi MF, Khatoon BA. Detection and diagnosis of blood in feces and urine:an overview. *Clinica Chimica Acta* 2002;318:1-17
- US Preventive Services Task Force. Screening for colorectal cancer: Recommendation and rationale. *Ann Intern Med* 2002;137:129-131
- Crespi M, Lisi D. Is colorectal cancer screening by fecal occult blood feasible? *Ann Oncol* 2002;13:47-50
- Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, Ederer F. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota colon cancer control study. *N Engl J Med* 1993;328:1365-1371
- Mandel JS, Church TR, Ederer F, Bond JH. Colorectal cancer mortality: effectiveness of biennial screening for fecal occult blood. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:434-437
- Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, James PD, Mangham CM. Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996;348:1472-1477
- Kronborg O, Fenger C, Olsen J, Jorgensen OD, Sondergaard O. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* 1996;348:1467-1471
- Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ, American cancer society. American cancer society guidelines for the early detection of cancer, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003;53:27-43
- Rockey DC, Auslander A, Greenberg PD. Detection of upper gastrointestinal blood with fecal occult blood tests. *Am J Gastroenterol* 1999;94:344-350

- 31 Ahlquist DA, Shuber AP. Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers. *Clinica Chimica Acta* 2002;315:157-168
- 32 Nakama H, Zhang B, Zhang B. Evaluation of the optimum cut-off point in immunochemical occult blood testing in screening for colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2001;37:398-401
- 33 Nakama H, Fattah A, Zhang B, Uehara Y, Wang C. A comparative study of immunochemical fecal tests for detection of colorectal adenomatous polyps. *Hepatogastroenterology* 2000; 47:386-389
- 34 Wong WM, Lam SK, Cheung KL, Tong TS, Rozen P, Young GP, Chu KW, Ho J, Law WL, Tung HM, Choi HK, Lee YM, Lai KC, Hu WH, Chan CK, Yuen MF, Wong BC. Evaluation of an automated immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia detection in a Chinese population. *Cancer* 2003;97:2420-2424
- 35 Levin B, Brooks D, Smith RA, Stone A. Emerging technologies in screening for colorectal cancer: CT colonography, immunochemical fecal occult blood tests, and stool screening using molecular markers. *CA Cancer J Clin* 2003;53:44-55
- 36 Taylor SA, Halligan S, Bartram CI. CT colonography: Methods, pathology and pitfalls. *Clin Radiol* 2003;58:179-190
- 37 Gluecker TM, Johnson CD, Harmsen WS, Offord KP, Harris AM, Wilson LA, Ahlquist DA. Colorectal cancer screening with CT colonography, colonoscopy, and double-contrast barium enema examination: prospective assessment of patient perceptions and preferences. *Radiology* 2003;227:378-384
- 38 Achiam MP, Bulow S, Rosenberg J. CT- and MR colonography. *Scand J Surg* 2002;91:322-327
- 39 Lauenstein TC, Goehde SC, Debatin JF. Faecal tagging: MR colonography without colonic cleansing. *Abdom Imaging* 2002; 27:410-417
- 40 Iyengar V, Albaugh GP, Lohani A, Nair PP. Human stools as a source of viable colonic epithelial cells. *FASEB J* 1991;5:2856-2859
- 41 Albaugh GP, Iyengar V, Lohani A, Malayeri M, Bala S, Nair PP. Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. *Int J Cancer* 1992;52:347-350
- 42 吴显文, 李世荣, 田玉旺, 王志红, 邢惠清. 肠道脱落细胞 DNA 含量图像分析诊断大肠癌的意义. *华人消化杂志* 1998;6:88-89
- 43 范如英, 李世荣, 吴霞, 武子涛, 晨智敏. 粪便中大肠脱落细胞形态学观察、DNA 定量及 p53 蛋白表达的初步观察. *中华消化杂志* 2000;20:269-270
- 44 Bandaletova T, Bailey N, Bingham SA, Loktionov A. Isolation of exfoliated colonocytes from human stool as a new technique for colonic cytology. *APMIS* 2002;110:239-246
- 45 Ahlquist DA, Harrington JJ, Burgart LJ, Roche PC. Morphometric analysis of the "mucocellular layer" overlying colorectal cancer and normal mucosa: relevance to exfoliated stool screening markers. *Hum Pathol* 2000;31:51-57
- 46 范如英, 李世荣, 武子涛, 吴霞, 晨智敏. 大肠脱落细胞及其核 DNA 含量分析在大肠癌诊断中的意义. *癌症* 2002;21:776-780
- 47 Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, Coleman N. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res* 1999;5:2121-2132
- 48 Davies RJ, Freeman A, Morris LS, Bingham S, Dilworth S, Scott I, Laskey RA, Miller R, Coleman N. Analysis of minichromosome maintenance proteins as a novel method for detection of colorectal cancer in stool. *Lancet* 2002;359:1917-1919
- 49 Loktionov A, O'Neill IK, Silvester KR, Cummings JH, Middleton SJ, Miller R. Quantitation of DNA from exfoliated colonocytes isolated from human stool surface as a novel noninvasive screening test for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:337-342
- 50 Rengucci C, Maiolo P, Saragoni L, Zoli W, Amadori D, Calistri D. Multiple detection of genetic alterations in tumors and stool. *Clin Cancer Res* 2001;7:590-593
- 51 Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, Thibodeau SN, Shuber AP. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: Feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000;119:1219-1227
- 52 Tagore KS, Lawson MJ, Yucatis JA, Gage R, Orr T, Shuber AP, Ross ME. Sensitivity and specificity of a stool DNA multitarget assay panel for the detection of advanced colorectal neoplasia. *Clin Colorectal Cancer* 2003;3:47-53
- 53 Kronborg O, Ugstad M, Fuglerud P, Johnsen B, Hardcastle J, Scholefield JH, Vellacott K, Moshakis V, Reynolds JR. Faecal calprotectin levels in a high risk population for colorectal neoplasia. *Gut* 2000;46:795-800
- 54 Tibble J, Sigthorsson G, Foster R, Sherwood R, Fagerhol M, Bjarnason I. Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma. *Gut* 2001;49:402-408
- 55 Summerton CB, Longlands MG, Wiener K, Shreeve DR. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:841-845
- 56 Limburg PJ, Devens ME, Harrington JJ, Diehl NN, Mahoney DW, Ahlquist DA. Prospective evaluation of fecal calprotectin as a screening biomarker for colorectal neoplasia. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2299-2305
- 57 Lawrie LC, Curran S, McLeod HL, Fothergill JE, Murray GI. Application of laser capture microdissection and proteomics in colon cancer. *Mol Pathol* 2001;54:253-258
- 58 Ransohoff DF. Cancer: Developing molecular biomarkers for cancer. *Science* 2003;299:1679-1680
- 59 Shimano T, Okuda H, Monden T, Inaji H, Mori T. Usefulness of carcinoembryonic antigen measurement in feces of patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1987;30:607-610
- 60 Kim Y, Lee S, Park S, Jeon H, Lee W, Kim JK, Cho M, Kim M, Lim J, Kang CS, Han K. Gastrointestinal tract cancer screening using fecal carcinoembryonic antigen. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33:32-38
- 61 Mizuno M, Nakagawa M, Uesu T, Inoue H, Inaba T, Ueki T, Nasu J, Okada H, Fujita T, Tsuji T. Detection of decay-accelerating factor in stool specimens of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 1995;109:826-831
- 62 Iwagaki N, Mizuno M, Nasu J, Mizuno M, Okazaki H, Hori S, Yamamoto K, Okada H, Tsuji T, Fujita T, Shiratori Y. Advances in the development of a reliable assay for the measurement of stool decay-accelerating factor in the detection of colorectal cancer. *J Immunoassay Immunochem* 2002;23:497-507
- 63 Pant KD, McCracken JD. Noninvasive colorectal cancer screening. *Dig Dis Sci* 2002;47:1236-1240
- 64 Yamao T, Matsumura Y, Shimada Y, Moriya Y, Sugihara K, Akasu T, Fujita S, Kakizoe T. Abnormal expression of CD44 variants in the exfoliated cells in the feces of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998;114:1196-1205

# 硫代乙酰胺致大鼠轻微型肝性脑病模型的建立

贾林, 张美华, 苏常青, 李泽

贾林, 张美华, 广州市第一人民医院消化内科 广东省广州市 510180  
苏常青, 李泽, 广州市第一人民医院神经内科 广东省广州市 510180  
项目负责人: 贾林, 510180, 广东省广州市, 广州市第一人民医院消化内科.  
电话: 020-81628877 传真: 020-81628809  
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

目的: 建立硫代乙酰胺(TAA)致大鼠轻微型肝性脑病(MHE)的动物模型.

方法: 24只♂SD大鼠随机分为TAA组和正常对照组, 各12只. TAA组应用TAA(每日200 mg/kg)隔日腹腔内注射, 共2次, 1d后行脑干听觉诱发电位(BAEP)和门静脉内毒素检测.

结果: TAA组的I波潜伏期为 $1.52 \pm 0.07$  ms, 显著高于正常对照组的 $1.29 \pm 0.09$  ms ( $P < 0.05$ ); TAA组内毒素水平为 $0.36 \pm 0.04$  pg/mL, 显著高于正常对照组的 $0.07 \pm 0.02$  pg/mL ( $P < 0.001$ ); 若以1.45 ms (正常对照组I波潜伏期均值 $\pm 1.96$ 标准差)为正常值, MHE发生率为83.3%(10/12).

结论: TAA致大鼠MHE模型研制成功, 适用于MHE实验治疗研究.

贾林, 张美华, 苏常青, 李泽. 硫代乙酰胺致大鼠轻微型肝性脑病模型的建立.  
世界华人消化杂志 2004;12(5):1207-1208  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1207.asp>

## 0 引言

轻微型肝性脑病(minimal hepatic encephalopathy, MHE)过去多称为亚临床型肝性脑病(SHE), 指某些肝病患者缺乏临床常规手段可检测的大脑功能失调, 但具有可计量的智力检测和脑诱发电位异常<sup>[1-2]</sup>, 迄今尚未见MHE动物模型的研究报道. 本文在预实验基础上, 采用小剂量硫代乙酰胺(TAA)腹腔内注射导致大鼠急性肝功能障碍, 以脑干听觉诱发电位(BAEP)为MHE诊断指标, 旨在首次建立大鼠的实验性MHE模型及其诊断标准, 为MHE实验治疗研究提供动物模型.

## 1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD♂大鼠24只, 质量220-250 g, 由中山大学实验动物中心提供. TAA(分析纯)和鲎试剂盒分别购自上海化学试剂公司和上海伊华临床医药科技公司. 应用丹麦丹迪公司生产的Keypoint型脑诱发电位仪检测大鼠BAEP.

## 1.2 方法

1.2.1 模型制备 根据Albrecht et al<sup>[3]</sup>方法改良制备. 24只SD大鼠随机分为TAA组和正常对照组, 每组12只.

TAA组采用每日200 mg/kg剂量的TAA隔日行腹腔内注射(ip), 正常对照组则采用生理盐水ip, 共2次, 注射结束后1d分别行BAEP和内毒素定量检测, 必要时辅以50 g/L葡萄糖盐水溶液5 mL ip进行补液.

1.2.2 BAEP检测及MHE的诊断 大鼠注射TAA后, 如出现嗜睡、反应迟缓、自主性活动减少、共济失调、昏迷等症状之一, 可诊断肝性脑病(HE); 无症状大鼠则需行BAEP检测以排除MHE(采用Shapiro et al<sup>[4]</sup>方法). 用20 g/L戊巴比妥40 mg/kg ip进行麻醉, 将其置于GS型金属组装机屏蔽隔音室内, 由神经功能检查室医师操作. 指标包括大鼠BAEP I-IV的潜伏期及其峰间期, 每项指标重复操作2次以上, 待波形重复性好之后进行描记, 以确保实验数据的可靠性.

预实验发现BAEP I波潜伏期较II-IV波潜伏期对药物治疗更为敏感和稳定, 因此把正常对照组BAEP I波潜伏期均值 $\pm 0.96$ 标准差作为正常值, 超过此值即可诊断MHE.

1.2.3 门静脉内毒素定量测定 采用鲎试验(偶氮显色法).

1.2.4 肝病理检查 取血后处死裸鼠, 留取鼠肝同一叶肝组织, 苏木素-伊红染色后光镜观察.

统计学处理 两组计量资料和率的比较分别采用t检验和 $\chi^2$ 检验.

## 2 结果

2.1 大鼠BAEP正常值及MHE发生率 正常组大鼠活动灵活, 反应敏捷. SD大鼠注射TAA后, 未见嗜睡、反应迟缓、共济失调、昏迷等HE症状, 也无大鼠死亡; TAA组的I波潜伏期为 $1.52 \pm 0.07$  ms, 显著高于正常对照组的 $1.29 \pm 0.09$  ms ( $P < 0.05$ ); 若以1.45 ms(正常对照组I波潜伏期均值 $\pm 1.96$ 标准差)为正常值, MHE发生率为83.3%(10/12).

2.2 血浆内毒素检测 TAA组的内毒素水平为 $0.36 \pm 0.04$  pg/mL, 显著高于正常对照组的 $0.07 \pm 0.02$  pg/mL ( $P < 0.001$ ), 提示TAA组存在显著的高内毒素血症.

2.3 肝病理检查 肉眼下见TAA组鼠肝普遍肿大, 表面较粗糙, 呈暗红色; 正常组鼠肝则未见异常. 光镜下见正常组鼠肝组织肝小叶结构完整, 肝细胞无变性、坏死; TAA组大部分肝脏有大面积空泡变和炎性细胞浸润; 部分肝脏呈现以中央静脉为中心的肝小叶坏死(条块状坏死和桥接坏死), 个别呈弥漫性片状坏死.

## 3 讨论

HE最新共识认为HE范畴为一连续阶段, 包含从MHE

(0期)到肝昏迷(IV期)等不同程度类型, MHE为HE广义概念的一部分<sup>[1-2]</sup>. HE动物模型的制备方法很多, 适合不同研究目的. 文献报道TAA致鼠急性肝衰竭模型具有良好的重复性和可行性, 已成为目前国内外最成熟和最常用的HE模型, 其中以TAA隔日腹腔内重复注射(2-3次)为公认的制备常规, TAA总量波动于500-1 200 mg/kg, TAA剂量-症状关系也未达成共识<sup>[3]</sup>.

脑诱发电位(EP)和智力检测为MHE患者的主要诊断手段, 由于动物难行智力检测, 因此EP成为MHE动物模型的惟一识别手段. 鉴于近年动物EP检测技术的广泛应用<sup>[4-5]</sup>, 建立动物MHE模型及其诊断标准的时机已日渐成熟, 国内外少数学者进行了初步尝试. Albrecht和Hilgier et al学者<sup>[3, 6]</sup>提出了MHE模型制备方法, 认为采用TAA(250 mg/kg)隔日ip大鼠2次后停药, 第21 d后即可制成鼠MHE模型, 由于未行EP检测致使动物MHE诊断不明, 仍为MHE假想模型. 2000年, 国内李瑞军 et al<sup>[7]</sup>首次把EP检测应用于乳果糖对TAA致免HE/MHE的防治研究, 但较粗略和笼统, 未建立MHE模型和确立动物MHE的诊断标准等.

本文前期研究显示TAA剂量与HE发生率呈正相关, 250 mg组(250 mg/kg隔日ip 2次)的临床HE发生率接近100%, 明显高于200 mg组(200 mg/kg体重隔日ip 2次), 因此, 本文采用小剂量TAA制备鼠MHE模型.

研究显示小剂量TAA(200 mg/kg体重隔日ip 2次)既可显著延长鼠BAEP I波的潜伏期和产生高内毒素血症, 又无临床HE和鼠死亡发生; 若以正常对照组BAEP I波潜伏期均值 $\pm 1.96$ 标准差作为MHE诊断标准, 本组SD大鼠的MHE确切发生率为83.3%, 适用于MHE疗效学的定量研究.

#### 4 参考文献

- 1 贾林, 张美华. 肝性脑病的定义、命名、诊断和定量标准修订方案的新进展. 世界华人消化杂志 2003;11:2008-2010
- 2 贾林. 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病. 世界华人消化杂志 2004;12:432-433
- 3 Albrecht J, Hilgier W, Zielinska M, Januszewski S, Hesselink M, Quack G. Extracellular concentrations of taurine, glutamate, and aspartate in the cerebral cortex of rats at the asymptomatic stage of thioacetamide-induced hepatic failure: modulation by ketamine anesthesia. *Neurochem Res* 2000;25: 1497-502
- 4 Shapiro SM. Somatosensory and brainstem auditory evoked potentials in the Gunn rat model of acute bilirubin neurotoxicity. *Pediatr Res* 2002;52:844-849
- 5 Morales-Martinez Jde J, Gonzalez-Pina R, Alfaro-Rodriguez A. Brainstem auditory response in the reserpinized rat. *Proc West Pharmacol Soc* 2002;45:68-70
- 6 Hilgier W, Zielinska M, Borkowska HD, Gadamski R, Walski M, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *J Neurosci Res* 1999; 56:76-84
- 7 李瑞军, 杨昭徐. 乳果糖对临床及亚临床肝性脑病预防作用的实验研究. 胃肠病学 2000;5:214-215

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

• 研究快报 •

## NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族炎症性肠病的相关性

瞿 艳, 郭秋莎, 夏 冰

瞿艳, 郭秋莎, 夏冰, 武汉大学中南医院综合医疗科 湖北省武汉市 430071  
国家自然科学基金资助课题, No. 30370638  
项目负责人: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院综合医疗科.  
bingxia@public.wh.hb.cn  
电话: 027-67812885  
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

### 摘要

目的: 研究我国湖北汉族人NOD2基因3020insC移码突变频率与炎症性肠病(IBD)的相关性.

方法: 采用特异性等位基因PCR方法对74例溃疡性结肠炎(UC)、15例克罗恩病(CD)患者以及172例正常对照者NOD2基因3020insC多态性进行检测.

结果: 正常对照者、UC以及CD患者NOD2基因3020等

位基因频率分别为0.29%、1.35%及3.33%, 均无显著性差异. 但CD对比健康对照组的 $P=11.828$ , 95% CI=0.7 205-194.17, 提示NOD2基因3020insC移码突变是CD的危险因素.

结论: NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族CD与UC患者无显著相关性.

瞿艳, 郭秋莎, 夏冰. NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族炎症性肠病的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1208-1210

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1208.asp>

### 0 引言

炎症性肠病(IBD)包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD)

(0期)到肝昏迷(IV期)等不同程度类型, MHE为HE广义概念的一部分<sup>[1-2]</sup>. HE动物模型的制备方法很多, 适合不同研究目的. 文献报道TAA致鼠急性肝衰竭模型具有良好的重复性和可行性, 已成为目前国内外最成熟和最常用的HE模型, 其中以TAA隔日腹腔内重复注射(2-3次)为公认的制备常规, TAA总量波动于500-1 200 mg/kg, TAA剂量-症状关系也未达成共识<sup>[3]</sup>.

脑诱发电位(EP)和智力检测为MHE患者的主要诊断手段, 由于动物难行智力检测, 因此EP成为MHE动物模型的惟一识别手段. 鉴于近年动物EP检测技术的广泛应用<sup>[4-5]</sup>, 建立动物MHE模型及其诊断标准的时机已日渐成熟, 国内外少数学者进行了初步尝试. Albrecht和Hilgier et al学者<sup>[3, 6]</sup>提出了MHE模型制备方法, 认为采用TAA(250 mg/kg)隔日ip大鼠2次后停药, 第21 d后即可制成鼠MHE模型, 由于未行EP检测致使动物MHE诊断不明, 仍为MHE假想模型. 2000年, 国内李瑞军 et al<sup>[7]</sup>首次把EP检测应用于乳果糖对TAA致免HE/MHE的防治研究, 但较粗略和笼统, 未建立MHE模型和确立动物MHE的诊断标准等.

本文前期研究显示TAA剂量与HE发生率呈正相关, 250 mg组(250 mg/kg隔日ip 2次)的临床HE发生率接近100%, 明显高于200 mg组(200 mg/kg体重隔日ip 2次), 因此, 本文采用小剂量TAA制备鼠MHE模型.

研究显示小剂量TAA(200 mg/kg体重隔日ip 2次)既可显著延长鼠BAEP I波的潜伏期和产生高内毒素血症, 又无临床HE和鼠死亡发生; 若以正常对照组BAEP I波潜伏期均值 $\pm 1.96$ 标准差作为MHE诊断标准, 本组SD大鼠的MHE确切发生率为83.3%, 适用于MHE疗效学的定量研究.

#### 4 参考文献

- 1 贾林, 张美华. 肝性脑病的定义、命名、诊断和定量标准修订方案的新进展. 世界华人消化杂志 2003;11:2008-2010
- 2 贾林. 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病. 世界华人消化杂志 2004;12:432-433
- 3 Albrecht J, Hilgier W, Zielinska M, Januszewski S, Hesselink M, Quack G. Extracellular concentrations of taurine, glutamate, and aspartate in the cerebral cortex of rats at the asymptomatic stage of thioacetamide-induced hepatic failure: modulation by ketamine anesthesia. *Neurochem Res* 2000;25: 1497-502
- 4 Shapiro SM. Somatosensory and brainstem auditory evoked potentials in the Gunn rat model of acute bilirubin neurotoxicity. *Pediatr Res* 2002;52:844-849
- 5 Morales-Martinez Jde J, Gonzalez-Pina R, Alfaro-Rodriguez A. Brainstem auditory response in the reserpinized rat. *Proc West Pharmacol Soc* 2002;45:68-70
- 6 Hilgier W, Zielinska M, Borkowska HD, Gadamski R, Walski M, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *J Neurosci Res* 1999; 56:76-84
- 7 李瑞军, 杨昭徐. 乳果糖对临床及亚临床肝性脑病预防作用的实验研究. 胃肠病学 2000;5:214-215

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

• 研究快报 •

## NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族炎症性肠病的相关性

瞿 艳, 郭秋莎, 夏 冰

瞿艳, 郭秋莎, 夏冰, 武汉大学中南医院综合医疗科 湖北省武汉市 430071  
国家自然科学基金资助课题, No. 30370638  
项目负责人: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院综合医疗科.  
bingxia@public.wh.hb.cn  
电话: 027-67812885  
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

### 摘要

目的: 研究我国湖北汉族人NOD2基因3020insC移码突变频率与炎症性肠病(IBD)的相关性.

方法: 采用特异性等位基因PCR方法对74例溃疡性结肠炎(UC)、15例克罗恩病(CD)患者以及172例正常对照者NOD2基因3020insC多态性进行检测.

结果: 正常对照者、UC以及CD患者NOD2基因3020等

位基因频率分别为0.29%、1.35%及3.33%, 均无显著性差异. 但CD对比健康对照组的 $P=11.828$ , 95% CI=0.7 205-194.17, 提示NOD2基因3020insC移码突变是CD的危险因素.

结论: NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族CD与UC患者无显著相关性.

瞿艳, 郭秋莎, 夏冰. NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族炎症性肠病的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1208-1210  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1208.asp>

### 0 引言

炎症性肠病(IBD)包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD)



两种临床类型,其免疫和遗传因素在发病机制中起重要作用.至今,NOD2基因是所发现的CD的第一个易感基因<sup>[1-2]</sup>.在大多数西方人群已被证实,然而,未被日本和香港人所证实<sup>[3-4]</sup>.NOD2是参与细胞凋亡调控的NOD1/APAF-1家族的成员,表达于外周血单核细胞和回肠黏膜,通过NF- $\kappa$ B信号转导通路激活一系列炎症细胞因子的转录与表达,在肠黏膜的炎症损伤中起重要作用<sup>[5]</sup>.目前,鲜见NOD2基因多态性在中国汉族人群中的分布及与IBD患者相关性的报道.本研究旨在探讨我国湖北汉族人中NOD2基因移码突变的频率及其与IBD的相关性.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2001/2003在武汉大学中南医院以及武汉市其他大型综合医院就诊的湖北汉族无亲缘关系的IBD患者89例(74例UC,15例CD)以及健康对照者172例. UC及CD诊断标准参照中华医学会消化病学分会2001“对炎症性肠病诊断治疗规范的建议”<sup>[6]</sup>.健康对照者来自正常体检者.

**1.2 方法** 基因组DNA提取:采血5 mL,EDTA抗凝,常规蛋白酶K消化,苯酚-氯仿提取.提取的DNA溶解于TE液中,-25℃保存. NOD2基因3020insC移码突变检测:采用特异性等位基因PCR (allele specific PCR)方法,检测NOD2基因3020insC移码突变.在25  $\mu$ L的反应体系中加入特异性引物(表1),引物设计参照文献<sup>[2]</sup>. 94℃预变性5 min. 变性94℃,45 s;退火59℃,45 s;延伸72℃,45 s;共35次循环.最后彻底延伸于72℃,7 min. PCR产物于20 g/L琼脂糖电泳,溴乙锭染色,在紫外分析仪下分析鉴定. PCR产生533 bp的非特异性产物及319 bp片段(野生型)和/或214 bp片段(3020insC突变型). 3020insC突变型DNA参考标本由荷兰阿姆斯特丹自由大学惠赠.

表1 NOD2基因3020insC突变特异性等位基因PCR引物

引物	序列
顺式引物	5' -CTGAGCCTTTGTTGATGAGC-3'
反式引物	5' -TCTTCAACCACATCCCCATT-3'
野生型顺式引物	5' -CAGAAGCCCTCCTGCAGGCCCT-3'
3020insC反式引物	5' -CGCGTGTCAATTCCTTCATGGGGC-3'

统计学处理 通过SPSS 11.5软件包,采用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

## 2 结果

对89例IBD患者(74例UC,15例CD)以及172例健康对照者的DNA样本进行检测,发现4例3020insC移码突变杂合子,其中正常对照者1例、UC 2例、CD 1例.正常对照者、UC以及CD患者NOD2基因3020等位基因频率分别为0.29%,1.35%及3.33%,均无显

著性差异(表2).但CD对比健康对照组的 $P = 11.828$ ,95% CI = 0.7 205-194.17,提示NOD2基因3020insC移码突变是CD的危险因素.

表2 健康对照者、UC和CD患者NOD2基因3020insC突变基因型和等位基因频率

基因型	健康对照者	UC	CD
<i>n</i>	172	74	15
野生型	171	72	14
3020insC突变杂合子	1	2	1
3020insC突变纯合子	0	0	0
3020insC等位基因频率	0.29	1.35	3.33

## 3 讨论

NOD2基因位于16q12,是近2 a发现的人类CD的第一个易感基因.1996年Hugot et al<sup>[7]</sup>通过对IBD患者家系的连锁分析,发现第16条染色体着丝点附近的CD易感位点,称位IBD1.2001年,Hugot et al<sup>[1]</sup>在IBD1区域,对含有D16S3136微卫星标记的细菌人造染色体克隆进行测序,发现在该序列上,R702W,G908R,1007fs单核苷酸多态性(分别以SNP8,12,13表示),与CD有显著相关性.在与人类白细胞cDNA库相比后,发现了人类的第一个CD易感基因NOD2,现命名为CARD15基因. NOD2蛋白质是调节细胞凋亡的超家族CED4/APAF1的成员,由1 013个氨基酸组成,包括两个N末端caspase补充区域(N-terminal caspase recruitment domains, CARD),一个核苷酸结合区域(a nucleotide-binding domain, NBD),一个由多个C末端富含亮氨酸的重复组成的区域(multiple C-terminal leucine rich repeats, LRR区域). NOD2在单核细胞表达,在细胞质中对来源于细菌的致病成分起作用. LRR区域具有结合细菌LPS的活性,激活NF- $\kappa$ B信号通道. NOD2基因LRR区域的3020insC移码突变,使NOD2蛋白LRR区域发生Leu1007Pro氨基酸互换,终止密码子提前,最后33个氨基酸丢失,导致NF- $\kappa$ B活性减弱.由于NOD2的缺失导致CD患者对细菌产物的先天性免疫反应减弱,从而过度激活特异性继发性免疫反应,导致CD发生<sup>[8]</sup>. CD患者小肠黏膜和潘氏细胞可检测到NOD2的表达,支持NOD2与CD相关的结论<sup>[9-10]</sup>. Ogura et al<sup>[2]</sup>同时发现这三个基因多态性与CD呈显著性相关,以3020insC移码突变与CD的相关性最为密切,而且在功能上证实是CD的易感基因.一些在英国和德国人等的研究<sup>[11]</sup>证实NOD2的3020insC移码突变与CD相关,但Yamazaki et al<sup>[3]</sup>以及Leong et al<sup>[4]</sup>对日本人和中国香港人CD患者、UC患者以及健康对照者的研究,未发现NOD2基因的突变. NOD2的3020insC移码突变在不同人群中频率不同,可能与种族差异有关.

本研究采用特异性等位基因PCR方法,检测中国湖北汉族74例UC、15例CD以及172例正常对照者

NOD2 基因的 3020insC 突变频率, 未发现正常对照组 3020insC 移码突变频率与 UC 及 CD 患者有显著性差异, 提示在中国湖北汉族人中 NOD2 基因 3020insC 移码突变与 UC 及 CD 无显著相关性, 不可能是 CD 的易感基因, 与日本人<sup>[3]</sup>及中国香港人<sup>[4]</sup>的结果一致. 但 CD 对比健康对照组的  $P=11.828$ , 95% CI=0.7 205-194.17, 提示 NOD2 基因 3020insC 移码突变是 CD 的危险因素. 由于本组 CD 患者病例较少, 有待进一步证实.

NOD2 作为所发现的人类第一个 CD 易感基因, 将 CD 的遗传易感性、机体的先天性免疫与细菌作用有机的联系起来, 在治疗 CD 的策略上重视细菌的作用. 目前, 尚未在亚洲人群中发现 NOD2 的基因突变与 CD 之间存在显著相关性的报道, 提示 IBD, 特别是 CD 涉及多基因的遗传模式, 在不同地区和人群具有明显的种族差异性.

#### 4 参考文献

- 1 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O' Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603
- 2 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606
- 3 Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet* 2002;47:469-472
- 4 Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1465-1470
- 5 Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2001;276:4812-4818
- 6 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001;21:236-239
- 7 Hugot JP, Laurent-puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Groupe d' Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires Digestives, Orholm M, Bonaiti-pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-823
- 8 夏冰, 邓长生, Pena AS. 克罗恩病的第一个易感基因, NOD2 (CARD15). *中华消化杂志* 2002;22:307-308
- 9 Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003;52:840-846
- 10 Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003;125:47-57
- 11 Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeier A, Macpherson AJ, Bridger S, Van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-1928

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

• 研究快报 •

## 高效液相色谱法测定人胃黏膜中 $\gamma$ - 氨基丁酸和谷氨酸含量

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 李 宁, 刘福坤

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 南京军区南京总医院消化内科 江苏省南京市 210002  
李宁, 刘福坤, 南京军区南京总医院普通外科 江苏省南京市 210002  
项目负责人: 朱人敏, 210002, 江苏省南京市中山东路 305 号, 南京军区南京总医院消化内科. wangf65@yahoo.com  
电话: 025-80861126  
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2004-02-01

### 摘要

目的: 建立一种可同时测定胃黏膜组织微量  $\gamma$ - 氨基丁酸 (GABA) 和谷氨酸 (Glu) 含量的高效液相色谱法.

方法: 用异硫氰酸苯酯 (PITC) 作衍生剂, 色谱柱为 Pico/Tag® 氨基酸专用柱, 梯度洗脱, 紫外检测波长 254 nm.

结果: GABA 在 0.125-6.25 nmol/mL 范围, Glu 在 0.025-

2.5  $\mu$ mol/mL 范围, 线性关系良好; GABA 和 Glu 加样回收率分别为 90.4-104%, 88.1-105.5%; 批内误差分别为 3.56%, 和 1.12%; 批间误差分别 7.47% 和 5.98%.

结论: 本法稳定、灵敏, 可用于胃黏膜组织 GABA 和 Glu 含量的检测.

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 李宁, 刘福坤. 高效液相色谱法测定人胃黏膜中  $\gamma$ - 氨基丁酸和谷氨酸含量. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1210-1213  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1210.asp>

### 0 引言

$\gamma$ - 氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 主要来源于三羧酸循环中的谷氨酸 (Glu), 是一种重要的抑制性神经

NOD2 基因的 3020insC 突变频率, 未发现正常对照组 3020insC 移码突变频率与 UC 及 CD 患者有显著性差异, 提示在中国湖北汉族人中 NOD2 基因 3020insC 移码突变与 UC 及 CD 无显著相关性, 不可能是 CD 的易感基因, 与日本人<sup>[3]</sup>及中国香港人<sup>[4]</sup>的结果一致. 但 CD 对比健康对照组的  $P=11.828$ ,  $95\% \text{ CI}=0.7 \text{ } 205-194.17$ , 提示 NOD2 基因 3020insC 移码突变是 CD 的危险因素. 由于本组 CD 患者病例较少, 有待进一步证实.

NOD2 作为所发现的人类第一个 CD 易感基因, 将 CD 的遗传易感性、机体的先天性免疫与细菌作用有机的联系起来, 在治疗 CD 的策略上重视细菌的作用. 目前, 尚未在亚洲人群中发现 NOD2 的基因突变与 CD 之间存在显著相关性的报道, 提示 IBD, 特别是 CD 涉及多基因的遗传模式, 在不同地区和人群具有明显的种族差异性.

#### 4 参考文献

- 1 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O' Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603
- 2 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606
- 3 Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet* 2002;47:469-472
- 4 Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1465-1470
- 5 Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2001;276:4812-4818
- 6 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001;21:236-239
- 7 Hugot JP, Laurent-puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Groupe d' Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires Digestives, Orholm M, Bonaiti-pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-823
- 8 夏冰, 邓长生, Pena AS. 克罗恩病的第一个易感基因, NOD2 (CARD15). *中华消化杂志* 2002;22:307-308
- 9 Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003;52:840-846
- 10 Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003;125:47-57
- 11 Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeier A, Macpherson AJ, Bridger S, Van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-1928

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

• 研究快报 •

## 高效液相色谱法测定人胃黏膜中 $\gamma$ - 氨基丁酸和谷氨酸含量

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 李 宁, 刘福坤

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 南京军区南京总医院消化内科 江苏省南京市 210002  
李宁, 刘福坤, 南京军区南京总医院普通外科 江苏省南京市 210002  
项目负责人: 朱人敏, 210002, 江苏省南京市中山东路 305 号, 南京军区南京总医院消化内科. wangf65@yahoo.com  
电话: 025-80861126  
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2004-02-01

### 摘要

目的: 建立一种可同时测定胃黏膜组织微量  $\gamma$ - 氨基丁酸 (GABA) 和谷氨酸 (Glu) 含量的高效液相色谱法.

方法: 用异硫氰酸苯酯 (PITC) 作衍生剂, 色谱柱为 Pico/Tag® 氨基酸专用柱, 梯度洗脱, 紫外检测波长 254 nm.

结果: GABA 在 0.125-6.25 nmol/mL 范围, Glu 在 0.025-

2.5  $\mu$ mol/mL 范围, 线性关系良好; GABA 和 Glu 加样回收率分别为 90.4-104%, 88.1-105.5%; 批内误差分别为 3.56%, 和 1.12%; 批间误差分别 7.47% 和 5.98%.

结论: 本法稳定、灵敏, 可用于胃黏膜组织 GABA 和 Glu 含量的检测.

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 李宁, 刘福坤. 高效液相色谱法测定人胃黏膜中  $\gamma$ - 氨基丁酸和谷氨酸含量. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1210-1213  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1210.asp>

### 0 引言

$\gamma$ - 氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 主要来源于三羧酸循环中的谷氨酸 (Glu), 是一种重要的抑制性神经

递质,广泛存在于脊椎动物脑内,外周组织中含量很低<sup>[1-3]</sup>.近年来研究表明:GABA除了作为胃肠神经递质,还有可能作为一种胃肠激素<sup>[4]</sup>,协同Glu,参与胃肠黏膜细胞分裂、分化、成熟的调节<sup>[5]</sup>,抑制胃癌的发生<sup>[4]</sup>.随着GABA、Glu与胃癌关系研究的不断深入,要求建立一种快速、精确定量胃黏膜组织GABA、Glu含量的方法.

国外已有文献报道,应用荧光分光光度法测定人胃黏膜组织GABA含量,但灵敏度较低,干扰因素较多<sup>[5]</sup>.本文首次采用异硫氰酸苯酯(PITC)柱前衍生,高效液相色谱(HPLC)-紫外检测法测定胃黏膜组织GABA、Glu含量.国内外未见此类报道.该法的优点是PITC与氨基酸反应生成能在254 nm下检测的PITC-氨基酸<sup>[6-11]</sup>,分析速度快,灵敏度高,结果令人满意.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Waters高效液相色谱仪系统(美国Waters公司),其中包括510泵两台,486紫外检测器,自动梯度控制器,控温仪及柱温箱;Pico/Tag<sup>TM</sup>工作台;7725 i进样阀(美国Rheodyne公司);色谱工作站(杭州英谱公司). $\gamma$ -氨基丁酸和谷氨酸:美国Sigma公司;衍生剂异硫氰酸苯酯(PITC):美国Pierce公司;乙腈、甲醇均为色谱纯;德国Merck公司;乙酸钠为分析纯;英国普尔BDH化学公司;其余试剂均为市售分析纯试剂,水为重蒸馏水.

**1.2 方法**

**1.2.1 色谱条件** 色谱柱:Pico/Tag<sup>®</sup>氨基酸专用柱,3.9 mm $\times$ 300 mm;流动相:流动相A为乙腈:70 mmol/L<sup>-1</sup>醋酸缓冲液(pH 6.5)=25:975,含0.25 mL/L<sup>-1</sup>的10 mmol/L<sup>-1</sup> EDTA;流动相B为乙腈:水:甲醇=450:400:150.梯度洗脱条件如表1.紫外检测波长254 nm;柱温45 $^{\circ}$ C;进样量20  $\mu$ L.

表1 梯度洗脱程序表

时间(min)	流动相(mL/min <sup>-1</sup> )	A%	B%	曲线
起始	1.00	100	0	-
13.50	1.00	97	3	11
20.00	1.00	96	4	8
20.50	1.00	20	80	5
22.50	1.00	0	100	6
23.00	1.00	100	0	6
30.00	1.00	100	0	6

**1.2.2 溶液配制** 样品稀释液:5  $\mu$ mol/L<sup>-1</sup>的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>缓冲溶液,pH 7.4.样品干燥液:甲醇:1.0 mol/L<sup>-1</sup>醋酸钠:三乙胺=2/2/1(v/v/v).衍生化试剂:异硫氰酸苯酯(PITC):甲醇:乙醇:三乙胺:水=1/6/1/1/1 (v/v/v/v);需新鲜配制.

**1.2.3 标本收集及样品前处理** 于手术当天取胃癌组织标本(约100 mg),同时取距癌组织边缘5 cm以上的胃

黏膜组织作为对照,并经病理证实为癌组织和正常组织,迅速放入液氮中冷冻,再转移至-70 $^{\circ}$ C冰箱保存至测定.测定时,称取100 mg左右的胃黏膜组织置小研钵中,倒入液氮,待组织冷却坚硬后进行研磨,粉碎后再加入液氮研磨,如此反复3次,使组织完全粉碎.加入400  $\mu$ L的样品稀释液将粉碎的组织完全转移到离心管中,1 000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心5 min,上清液转移到超滤管中,1 000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心30 min.

**1.2.4 样品衍生化** 取超滤液20  $\mu$ L注入0.5 cm $\times$ 5 cm的玻璃试管中,冷冻干燥,然后加入干燥液10  $\mu$ L,再一次冻干,再加入20  $\mu$ L衍生化试剂,室温衍生20 min后经冻干置冰箱4 $^{\circ}$ C保存.50  $\mu$ L样品稀释液复溶,10  $\mu$ L或20  $\mu$ L进样.

## 2 结果

**2.1 色谱行为** 图1为Glu与GABA标准色谱图,各自的保留时间分别为Glu=3.98 min, GABA=16.7 min.图2为样品色谱图,从色谱图可知,该方法能很好的分离Glu与GABA.

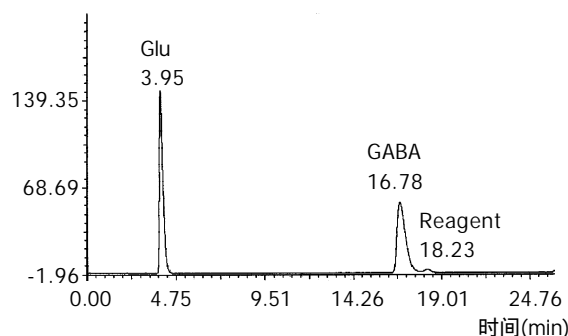


图1 标准品色谱图.

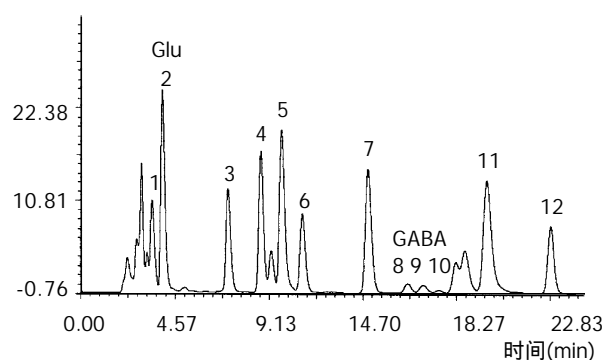


图2 样品色谱图.

**2.2 标准曲线** 分别精密配制Glu和GABA标准溶液,使其含量为Glu:0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5  $\mu$ mol/mL<sup>-1</sup>; GABA:0.125, 0.25, 0.625, 1.25, 2.5, 6.25 nmol/mL<sup>-1</sup>.按照样品衍生步骤衍生并HPLC测定,以峰面积对质量浓度作线性回归,其线性方程为:Glu  $Y=1.58 \times 10^6 C + 18027$ ,相关系数0.9998;最小检测浓度2.5 nmol/mL<sup>-1</sup>. GABA  $Y=3\,723.3C - 547.8$ ,相关系数0.9988;最小检测浓度0.01 nmol/mL<sup>-1</sup>.

**2.3 回收率** 在混合样品超滤液中加入Glu和GABA标

准溶液,用加样回收方法考察方法的准确度.  $\gamma$ -氨基丁酸和谷氨酸加样回收率分别为 95.4%, 93.5%(表 2).

表 2 方法回收率(mean $\pm$ SD)

	样品测定值	加入量	测定值	回收率(%)
GABA (nmol/mL <sup>-1</sup> )	0.318 $\pm$ 0.013	0.5	0.852 $\pm$ 0.014	106.8 $\pm$ 3.0
		0.75	1.057 $\pm$ 0.082	95.3 $\pm$ 5.3
Glu ( $\mu$ mol/mL <sup>-1</sup> )	0.310 $\pm$ 0.005	0.5	0.837 $\pm$ 0.049	105.5 $\pm$ 13.1
		1	1.234 $\pm$ 0.036	92.5 $\pm$ 4.4
		5	4.825 $\pm$ 0.134	92.1 $\pm$ 1.4

2.4 精密度 同时取某一样品超滤液三份,按衍生化法处理测定, GABA和Glu的批内误差分别为3.56%, 1.12%. 不同日取样三次, 如上处理求得 GABA 和 Glu 的批间误差分别 7.47%, 5.98%.

2.5 临床应用 用该法测定了 30 例胃癌手术患者癌组织和正常组织的 GABA 和 Glu 含量, 胃癌组织 GABA 和 Glu 含量显著高于正常组织( $P < 0.05$ , 表 3). 这一现象值得引起临床重视, 可以为胃癌的临床诊断和治疗提供参考.

表 3 胃癌组织与正常胃黏膜组织 GABA 和 Glu 含量(mean $\pm$ SD,  $n = 30$ )

氨基酸	癌组织	正常组织	t	P
GABA(nmol/g <sup>-1</sup> )	0.832 $\pm$ 0.576	0.362 $\pm$ 0.417	3.29	<0.05
Glu ( $\mu$ mol/g <sup>-1</sup> )	1.324 $\pm$ 0.596	0.907 $\pm$ 0.342	2.90	<0.05

### 3 讨论

GABA、Glu 在胃黏膜组织含量极低, 不具有紫外吸收, 也不发射荧光, 因此需将他们转变为能被检测的高灵敏度衍生化产物<sup>[6-11]</sup>. 本文用 PITC 作衍生剂与胃黏膜组织中的氨基酸反应, 衍生物经 HPLC 分离后紫外检测, 建立了一种更简便、更灵敏的方法, 适于检测胃黏膜组织的微量 GABA、Glu.

本法的优点: (1)组织样品处理时, 采用液氮冷冻碾磨法碾碎胃黏膜组织, 该法比电动匀浆或超声匀浆法使组织粉碎更加完全, 而且简单易行; 易于推广. (2)组织衍生前, 采用超滤法去除蛋白, 不但去除完全, 回收率高, 样品也没有被稀释, 对于含量极低的氨基酸分析是一个非常有效的手段, 但美中不足的是成本较高, 需要超速冷冻离心机. (3)组织衍生时, 采用 PITC 作为氨基酸衍生剂, 具有稳定, 不会产生水解反应, 也不会形成多级衍生物的优点<sup>[6-11]</sup>, 但有时过量试剂会产生干扰. 本法除了采用在衍生化后真空干燥除去过量试剂外, 还通过调节流动相梯度, 使试剂峰与样品峰分离完全. (4)色谱分析时, 采用 Pico/Tag® 氨基酸专用柱, 他是 Waters 公司的专利产品, 可非常好的分离 PTC- 氨基酸, 可同时分析 18 种常用氨基酸, 但有报道柱寿命短, 最多能分析 150 个 PITC 样品. 在我们实际工作中采用前

处理干燥完全, 乙腈冲洗再生方法, 实际分析样品可达到约 500 个. (5)实际操作时, 采用 40.0  $\pm$  0.5  $^{\circ}$ C 柱温, 提高柱温能缩短保留时间, 降低柱压, 但过高的柱温会减少分离度, 使  $\gamma$ -氨基丁酸与在其后出现的瓜氨酸以及衍生剂峰重合, 因此使柱温保持在 40.0  $\pm$  0.5  $^{\circ}$ C 为最佳.

生物样品中微量氨基酸的测定在医学领域中占重要地位, 经典的氨基酸分离方法是离子交换色谱法, 此法需特殊装置, 且分析时间较长, 而荧光分光光度法和氨基酸自动分析仪检测, 灵敏度较低, 干扰因素较多. 测定 GABA 和 Glu 的高效液相色谱方法, 多为用邻苯二甲醛在催化剂作用下与氨基酸发生衍生化反应, 衍生物经 HPLC 分离, 电化学检测或荧光检测器检测, 并且分析对象为含量较高的脑组织和血清<sup>[12-15]</sup>. 本文采用 PITC 为柱前衍生剂, 配合紫外检测仪, 建立了一种高效、稳定、简便、快捷的 HPLC 梯度洗脱方法. 该法条件简便、灵敏度高, 分离周期短, 适于检测胃黏膜组织中微量的 GABA、Glu, 应用前景广泛.

### 4 参考文献

- Hinoi E, Takarada T, Ueshima T, Tsuchihashi Y, Yoneda Y. Glutamate signaling in peripheral tissues. *Eur J Biochem* 2004; 271:1-13
- Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* 2002;213:1-47
- Kuroda E, Watanabe M, Tamayama T, Shimada M. Autoradiographic distribution of radioactivity from (14)C-GABA in the mouse. *Microsc Res Tech* 2000;48:116-126
- Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Nakaizumi A, Ichii M, Taniguchi H. Inhibition by gamma-amino-n-butyric acid and baclofen of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Res* 1990;50:4931-4934
- Matuszek M, Jesipowicz M, Kleinrok Z. GABA content and GAD activity in gastric cancer. *Med Sci Monit* 2001;7:377-381
- Rubio LA. Determination of diaminopimelic acid in rat feces by high-performance liquid chromatography using the Pico Tag method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;784:125-129
- Komarova NV, Kammentsev JS, Solomonova AP, Anufrieva RM. Determination of amino acids in fodders and raw materials using capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;800:135-143
- Dale Y, Mackey V, Mushi R, Nyanda A, Maleque M, Ike J. Simultaneous measurement of phenylalanine and tyrosine in phenylketonuric plasma and dried blood by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;788:1-8
- Yang J, Sun LG, Bai XZ, Zhou HT. Simultaneous determination of 18 amino acids by reversed-phase high performance liquid chromatography with precolumn phenylisothiocyanate derivatization. *Se Pu* 2002;20:369-371
- Woo KL, Hwang QC, Kim HS. Determination of amino acids in the foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a new precolumn derivative, butylthiocarbamyl amino acid, compared to the conventional phenylthiocarbamyl derivatives and ion-exchange chromatography. *J Chromatogr A* 1996;740:31-40
- Brennan JM, O' Dwyer PJ, Ozols RF, LaCreta FP. High-performance liquid chromatographic determination of the S- and R-diastereoisomers of L-buthionine (SR)-sulfoximine in human plasma and urine. *J Chromatogr* 1993;620:121-128



- 12 Rowley HL, Martin KF, Marsden CA. Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde-sulphite derivatisation. *J Neurosci Methods* 1995;57:93-99
- 13 Smith S, Sharp T. Measurement of GABA in rat brain microdialysates using o-phthalaldehyde-sulphite derivatization and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 1994;652:228-233
- 14 Naini AB, Vontzalidou E, Cote LJ. Isocratic HPLC assay with electrochemical detection of free gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1993;39:247-250
- 15 Bourdelais A, Kalivas PW. High sensitivity HPLC assay for GABA in brain dialysis studies. *J Neurosci Methods* 1991;39:115-121

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

• 研究快报 •

## 细胞凋亡蛋白在肝癌发生过程中的作用

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平, 中国人民解放军空军总医院消化内科北京市 100036

项目负责人: 白莉, 100036, 北京市海淀区阜成路 30 号, 中国人民解放军空军总医院. bai\_li@hotmail.com

收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-02-01

### 摘要

目的: 进一步探讨促凋亡蛋白 Bid 在肝癌发生、发展过程中的作用。

方法: 应用基因毒性化学剂二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)制备肝癌动物模型, 通过阻断肝细胞凋亡信号传导途径, 观察肝癌发生过程中肝细胞的增生指数(BrdU LI)与凋亡比率(AI)及与肿瘤发生的关系。

结果: (1)在 DEN 用药后的第 3 d 和第 10 d, 野生型小鼠肝细胞 BrdU 标记指数和凋亡细胞百分比分别明显高于 Bid 缺陷小鼠( $P < 0.05$ )。 (2)在 DEN 用药后的第 4 mo, 野生型小鼠肝内损伤性结节的数量和表面积明显多于 Bid 缺陷小鼠, 二者间具有统计学意义( $P < 0.001$ )。

结论: Bid 缺陷小鼠对 DEN 诱导的肝癌具有明显的抵抗作用, 这一作用可能与早期肝细胞凋亡有关。

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平. 细胞凋亡蛋白在肝癌发生过程中的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1213-1215

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1213.asp>

### 0 引言

细胞增生和凋亡之间的失平衡是肿瘤发生最根本的原因。细胞对任何包括化学、物理和生物的有害刺激的反应是通过自身修复、死亡、再增生等方式使机体恢复自身平衡, 细胞在损伤修复过程中的错误修复导致基因的突变使细胞获得了异常增生能力, 便发生了肿瘤。实际上, 肿瘤组织内细胞增生和凋亡比率均较正常状态的组织有明显增加, 而增生比率高于凋亡。Bid 是 Bcl-

2 家族成员中一个促凋亡蛋白, 通过死亡受体激活细胞凋亡, 尤其是肝细胞的凋亡过程。我们应用化学致癌模型和 Bid 缺陷小鼠研究细胞凋亡在肝癌发生的早期作用, 设想是早期凋亡刺激细胞增生, 发生基因变异的细胞较正常细胞具有明显的增生优势, 通过比较野生型和 Bid 缺陷鼠对 DEN 诱导致癌损伤的反应和观察细胞增生和凋亡的比率进一步探讨肝癌发生的机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 ♂ C57BL/6 小鼠, 野生型和 Bid 缺陷型各 14 只 (由美国匹兹堡大学病理系荫博士提供), 分别分为 DEN 组 and 对照组。DEN 组小鼠出生后第 14 d 腹腔内注射 DEN 15  $\mu\text{g/g}$ , 对照组注射同体积的生理盐水, 饲养 3、10 d 和 4 及 8 mo 分别杀鼠, 在杀鼠前 2 h 腹腔注射 30 mg/kg BrdU (Sigma, 美国), 收集肝组织标本分别放置液氮中或制备石蜡切片。

#### 1.2 方法

1.2.1 肝细胞凋亡和增生的检测 采用 TUNEL 试剂盒 (Roche, 美国) 检测肝细胞的凋亡, 操作按照说明。细胞增生的检测应用抗 BrdU 单克隆抗体 (Dako 公司, 美国) 进行免疫组化染色。

1.2.2 特殊酶学染色 葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase) 染色: 冰冻肝组织切片戊二醛固定后用 2 g/L 硝酸银和 0.53 g/L G-6-Pase 共同孵育 45 min, 然后用 75 g/L 硫酸铵孵育 2 min, 水洗后用戊二醛和冰醋酸按一定比例混合固定, HE 染色封片。GST-pi 染色: 采用兔抗鼠 GST-pi 多克隆抗体 (StressGen, 美国) 进行免疫组化染色。

1.2.3 肝细胞损伤结节或肝肿瘤 HE 染色的肝组织切片在显微镜下观察和计数肝损伤或肝肿瘤结节的数量, 应用 SPOT 软件计量结节的面积, 求结节面积与全肝面积的比值。

统计学处理 细胞增生及凋亡指数和肝损伤结节的数量及平均面积采用 Student t 检验,  $P$  值小于 0.05 为

- 12 Rowley HL, Martin KF, Marsden CA. Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde-sulphite derivatisation. *J Neurosci Methods* 1995;57:93-99
- 13 Smith S, Sharp T. Measurement of GABA in rat brain microdialysates using o-phthalaldehyde-sulphite derivatization and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 1994;652:228-233
- 14 Naini AB, Vontzalidou E, Cote LJ. Isocratic HPLC assay with electrochemical detection of free gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1993;39:247-250
- 15 Bourdelais A, Kalivas PW. High sensitivity HPLC assay for GABA in brain dialysis studies. *J Neurosci Methods* 1991;39:115-121

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

• 研究快报 •

## 细胞凋亡蛋白在肝癌发生过程中的作用

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平, 中国人民解放军空军总医院消化内科北京市 100036

项目负责人: 白莉, 100036, 北京市海淀区阜成路 30 号, 中国人民解放军空军总医院. bai\_li@hotmail.com

收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-02-01

### 摘要

目的: 进一步探讨促凋亡蛋白 Bid 在肝癌发生、发展过程中的作用。

方法: 应用基因毒性化学剂二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)制备肝癌动物模型, 通过阻断肝细胞凋亡信号传导途径, 观察肝癌发生过程中肝细胞的增生指数(BrdU LI)与凋亡比率(AI)及与肿瘤发生的关系。

结果: (1)在 DEN 用药后的第 3 d 和第 10 d, 野生型小鼠肝细胞 BrdU 标记指数和凋亡细胞百分比分别明显高于 Bid 缺陷小鼠( $P < 0.05$ )。 (2)在 DEN 用药后的第 4 mo, 野生型小鼠肝内损伤性结节的数量和表面积明显多于 Bid 缺陷小鼠, 二者间具有统计学意义( $P < 0.001$ )。

结论: Bid 缺陷小鼠对 DEN 诱导的肝癌具有明显的抵抗作用, 这一作用可能与早期肝细胞凋亡有关。

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平. 细胞凋亡蛋白在肝癌发生过程中的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1213-1215

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1213.asp>

### 0 引言

细胞增生和凋亡之间的失平衡是肿瘤发生最根本的原因。细胞对任何包括化学、物理和生物的有害刺激的反应是通过自身修复、死亡、再增生等方式使机体恢复自身平衡, 细胞在损伤修复过程中的错误修复导致基因的突变使细胞获得了异常增生能力, 便发生了肿瘤。实际上, 肿瘤组织内细胞增生和凋亡比率均较正常状态的组织有明显增加, 而增生比率高于凋亡。Bid 是 Bcl-

2 家族成员中一个促凋亡蛋白, 通过死亡受体激活细胞凋亡, 尤其是肝细胞的凋亡过程。我们应用化学致癌模型和 Bid 缺陷小鼠研究细胞凋亡在肝癌发生的早期作用, 设想是早期凋亡刺激细胞增生, 发生基因变异的细胞较正常细胞具有明显的增生优势, 通过比较野生型和 Bid 缺陷鼠对 DEN 诱导致癌损伤的反应和观察细胞增生和凋亡的比率进一步探讨肝癌发生的机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 ♂ C57BL/6 小鼠, 野生型和 Bid 缺陷型各 14 只 (由美国匹斯堡大学病理系荫博士提供), 分别分为 DEN 组 and 对照组。DEN 组小鼠出生后第 14 d 腹腔内注射 DEN 15  $\mu$ g/g, 对照组注射同体积的生理盐水, 饲养 3、10 d 和 4 及 8 mo 分别杀鼠, 在杀鼠前 2 h 腹腔注射 30 mg/kg BrdU (Sigma, 美国), 收集肝组织标本分别放置液氮中或制备石蜡切片。

#### 1.2 方法

1.2.1 肝细胞凋亡和增生的检测 采用 TUNEL 试剂盒 (Roche, 美国) 检测肝细胞的凋亡, 操作按照说明。细胞增生的检测应用抗 BrdU 单克隆抗体 (Dako 公司, 美国) 进行免疫组化染色。

1.2.2 特殊酶学染色 葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase) 染色: 冰冻肝组织切片戊二醛固定后用 2 g/L 硝酸银和 0.53 g/L G-6-Pase 共同孵育 45 min, 然后用 75 g/L 硫酸铵孵育 2 min, 水洗后用戊二醛和冰醋酸按一定比例混合固定, HE 染色封片。GST-pi 染色: 采用兔抗鼠 GST-pi 多克隆抗体 (StressGen, 美国) 进行免疫组化染色。

1.2.3 肝细胞损伤结节或肝肿瘤 HE 染色的肝组织切片在显微镜下观察和计数肝损伤或肝肿瘤结节的数量, 应用 SPOT 软件计量结节的面积, 求结节面积与全肝面积的比值。

统计学处理 细胞增生及凋亡指数和肝损伤结节的数量及平均面积采用 Student t 检验, P 值小于 0.05 为

有显著差异.

## 2 结果

2.1 肝损伤结节的形态学及酶学特点 在DEN暴露第4 mo时显微镜下有4种不同改变: (1)嗜碱性结节, 细胞体积小于正常, 核大, 核/浆比率增加, 糖原减少, 核糖体丰富. (2)空泡细胞, 细胞肿胀, 空泡变性, 体积稍大, 有脂肪积累和糖原丢失. (3)嗜酸细胞, 细胞内富含糖原, 浆内大量的嗜伊红染色. (4)储脂细胞, 胞质内较多脂滴. 此外, 可在癌变前结节发现较多卵圆细胞. 除嗜伊红结节外, 绝大部分结节呈GST-pi染色阴性, 所有结节G-6-Pase染色呈阴性. 在DEN处理8 mo后, 大部分结节周边有明显边界, 结节明显增大, 形成腺瘤样结构, 部分结节内肝细胞核深染, 可见有丝分裂征象, 细胞排列为多层结构, 具备了肝癌的形态学特征. 在对照动物未发现肝损伤结节或肿瘤.

2.2 肝损伤结节面积及数量的测定 肝内结节的面积单位为 $\mu^2$ , 全肝面积单位为 $\text{mm}^2$ , 分别将结节的数量及所占全肝面积比率在相同处理时间不同基因表型间进行统计学比较(表1). 在DEN处理4 mo后, 肝内结节数量及面积在野生鼠明显多于Bid缺陷鼠( $P < 0.05$ ), 但8 mo后, 肝结节在基因表型间的差异消失.

表1 DEN体内诱导肝损伤结节的效果

基因表型	<i>n</i>	DEN 暴露时间	平均结节面积 / 全肝面积( $\mu^2/\text{mm}^2$ )	平均结节数
野生型	10	4 mo	572 570.4 $\pm$ 63 242.6 <sup>a</sup>	3.6 $\pm$ 2.065 <sup>b</sup>
Bid 缺陷型	12	4 mo	79 723.6 $\pm$ 10 771.1	1.0 $\pm$ 0.577
野生型	11	8 mo	6.29e+07 $\pm$ 1.33e+0	10.27 $\pm$ 7.52
Bid 缺陷型	13	8 mo	2.14e+07 $\pm$ 2.14e+07	9.02 $\pm$ 4.23

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs Bid 缺陷型动物.

2.3 肝细胞增生及凋亡测定 DEN处理后第3、10 d和第4、8 mo, 肝组织标本分别进行BrdU和TUNEL染色, 显微镜下计数每1 000个细胞中的阳性细胞数, 得出细胞增生标记指数(BrdU LI)和凋亡比率(AI). 结果显示, DEN暴露后3 d, 野生鼠细胞凋亡数明显高于Bid基因缺陷鼠; 但BrdU标记指数在两组间无显著差异, 均接近于对照组; 10 d后细胞凋亡在野生鼠仍明显高于Bid基因缺陷鼠, 但与第3 d水平比较无明显改变, 而在Bid基因缺陷鼠则有显著下降, 接近对照组; 此时BrdU标记指数在野生鼠显著升高, 而Bid基因缺陷鼠仍接近对照组, 组间差异明显. 提示DEN暴露后, 肝脏对损伤的反应是发生细胞凋亡, 肝细胞数量的减少继发细胞大量增生. 在DEN处理后4和8 mo再次检测BrdU标记指数发现, 野生鼠肝结节外BrdU标记指数仍显著高于Bid缺陷型, 而在8 mo肝结节内比较, 两组则无明显差异(表2).

表2 DEN肝细胞增生及凋亡指数的测定(mean $\pm$ SD)

表型	<i>n</i>	DEN 暴露时间	AI	LI
Bid 缺陷型	3	3 d	11.04 $\pm$ 2.97	33.5 $\pm$ 8.89
野生型	3	3 d	19.83 $\pm$ 3.21 <sup>a</sup>	34 $\pm$ 6.66
Bid 缺陷型	3	10 d	7.71 $\pm$ 3.21	24.5 $\pm$ 5.47
野生型	3	10 d	16.21 $\pm$ 3.24 <sup>a</sup>	54.06 $\pm$ 11.99 <sup>a</sup>
Bid 缺陷型	11	4 mo	n.d.	1.42 $\pm$ 0.55
野生型	7	4 mo	n.d.	3.07 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>
Bid 缺陷型	8	8 mo	n.d.	1.05 $\pm$ 0.50(OF)
野生型	8	8 mo	n.d.	1.97 $\pm$ 0.47(OF) <sup>a</sup>
Bid 缺陷型	8	8 mo	n.d.	10.12 $\pm$ 5.60(IF)
野生型	8	8 mo	n.d.	11.61 $\pm$ 4.77(IF)

<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs Bid 缺陷型动物; n.d., 未测定; OF, 肝外结节; IF, 肝内结节.

## 3 讨论

普遍认为: 肿瘤的发生是异常细胞失去了对凋亡信号的反应, 使这部分细胞获得不死性或生存期明显延长, 细胞增生比例大于细胞死亡, 二者之间失去平衡. Schult-Hermann et al 少数人<sup>[1-3]</sup>近年提出了一些不同的观点, 癌前病变的细胞对细胞凋亡信号刺激是有反应的, 细胞增生和凋亡相互间有联系, 二者在肝肿瘤发生过程中均有增高, 二者间的比率调节着细胞向恶性变发展. Grasl-Kraupp et al<sup>[3]</sup>报道肿瘤细胞较周围正常细胞的增生和凋亡率分别高出24倍和7.5倍, 在肿瘤发生过程中伴有选择性细胞增生和死亡. 本文结果显示, 在DEN暴露的较早期, 野生小鼠肝细胞凋亡指数和增生率均高出Bid缺陷小鼠2倍; 在DEN暴露后4 mo, 野生小鼠肝内癌前损伤结节的平均数量和面积也较Bid缺陷小鼠明显增多, 从DEN暴露后4和8 mo的标本中可以观察到癌前结节向癌变进展的质变过程. 对于DEN暴露8 mo后, 野生和Bid缺陷型小鼠在肝内癌前结节和肿瘤数量及面积之间差异不再有明显区别的解析, 目前尚无一个客观明确的认识. 根据肝细胞凋亡特点分析, 在DEN刺激下, 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )受体首先被激活, 导致Caspase 8的活化, 后者水解Bid使之活化后诱导一系列参与凋亡的酶学反应, 最后发生肝细胞凋亡. 细胞的凋亡诱导了细胞增生, 而发生DNA损伤的肝细胞较正常肝细胞具有更大的增生潜力, 形成有遗传物质改变的、生长力旺盛的细胞克隆, 也就是癌前结节. 这一解释受到Knight et al<sup>[4]</sup>研究结果的支持, 他们发现在TNF受体1缺乏的鼠暴露于肝脏的致癌剂后, 肝脏卵圆细胞, 有人认为是具有增生潜力或癌变前的细胞受到损伤, 其致瘤性明显减弱. 因此他们认为TNF受体途径参与肝癌发生过程中癌前卵圆细胞的增生. TNF受体的作用是通过诱导凋亡还是其他机制有待于进一步证实. 然而, 在肝癌发生过程中由于细胞凋亡和增生均有增加, 因此他们之间的关系是十分复杂的, 在癌发生

的不同阶段他们之间的关系也可能会发生不同的改变. 我们的结果提示细胞凋亡对增生的刺激也许仅发生在肝癌发生的早期, 在肿瘤发展过程中其他因素参与, 或同一种蛋白还有其他功能, 如 Bid 是否还参与细胞周期的调节等, 有可能使其在肿瘤发生过程中的作用发生改变, 需进一步进行研究.

#### 4 参考文献

- 1 Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Mullaer L, Taper H, Huber W, Bursch W, Schult-Hermann R. Inherent increase of

- apoptosis in liver tumors: Implications for carcinogenesis and tumor regression. *Hepatology* 1997;25:906-912
- 2 Fausto N. Mouse Liver Tumorigenesis: Models, Mechanisms and relevance to human disease. *Seminars Liver Dis* 1999;19: 243-252
- 3 Grasl-Kraupp B, Rossmanith W, Ruttkay-Nedecky B, Mullaer L, Kammerer B, Bursch W, Schult-Hermann R. Levels of transforming growth factor beta and transforming growth factor beta receptors in rat liver during growth, regression by apoptosis and neoplasia. *Hepatology* 1998;28:717-726
- 4 Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, Rhim JA, Fausto N. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knock-out mice. *J Exp Med* 2000;192:1809-1818

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

• 研究快报 •

## 硒蛋氨酸对食管癌细胞株增生的影响

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 于皆平

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 鄱阳医学院附属太和医院消化内科 湖北省十堰市 442000

于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430000

项目负责人: 陈滋华, 442000, 湖北省十堰市, 鄱阳医学院附属太和医院消化内科. pollex001163@com

电话: 0719-8801431 传真: 0719-8883809

收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-01-08

### 摘要

目的: 探讨硒蛋氨酸对食管癌细胞系EC9706增生的影响.

方法: 通过MTT比色法、细胞生长曲线描绘研究硒蛋氨酸对食管癌细胞系EC9706增生的影响, 采用流式细胞仪观察硒蛋氨酸诱导EC9706细胞凋亡的作用及对细胞周期的影响.

结果: 硒蛋氨酸呈时间、剂量依赖性方式抑制EC9706细胞增生, 改变细胞周期分布, 增加G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例, 诱导细胞凋亡.

结论: 硒蛋氨酸可能通过影响细胞周期分布和诱导细胞凋亡, 来抑制EC9706细胞增生. 硒蛋氨酸可能是预防和治疗食管癌的一种新方法.

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 于皆平. 硒蛋氨酸对食管癌细胞株增生的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1215-1217

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1215.asp>

### 0 引言

食管癌在我国是常见病, 严重威胁着人类的生命健康, 其发生、发展涉及多个基因及分子水平的变化, 目前无论是传统手术还是化疗及放疗都未能取得满意的疗

效<sup>[1-13]</sup>. 因此, 有必要寻找新的防治方法. 大量流行病学和临床研究发现, 微量元素硒与肿瘤的发生呈负相关性. 硒是人体所必需的微量元素, 在生命过程中发挥着重要作用, 本研究的目的在于观察硒蛋氨酸对体外培养食管癌细胞系EC9706生长的影响, 为探讨其对食管癌防治作用提供理论依据.

### 1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂: RPMI-1640培养基, 小牛血清, 胰蛋白酶、蛋氨酸为Gibco公司产品; MTT、DMSO、硒蛋氨酸(selenomethionine)为sigma公司产品. 仪器设备: 恒温CO<sub>2</sub>培养箱(Sanyo 日本), 倒置显微镜(Olympus IX-70)、酶联免疫检测仪( $\Sigma$  960 美国), 流式细胞仪(Epics XL, Beckman coulter 公司). 细胞系: 人食管癌细胞系EC9706由中国医学科学院王明荣教授惠赠.

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 食管癌细胞EC9706常规培养于含10%小牛血清、100 U/mL青霉素及100 U/mL链霉素的RPMI-1640培养基中, 置于37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养.

1.2.2 硒蛋氨酸对食管癌细胞EC9706生长的影响 取对数生长期的食管癌细胞EC9706按每孔 $1 \times 10^4$ 个细胞/mL接种于96孔培养板中, 24 h后换液, 加入不同浓度硒蛋氨酸100、200、300、400、500  $\mu$ mol/mL设不接种细胞的空白对照组和只加入等体积溶剂DMSO的对照组. 每组浓度每个时间点设8个复孔, 继续培养, 于第24、48、72、96 h每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)10  $\mu$ L, 37℃孵育4 h后弃去上清液, 每孔加入100  $\mu$ L DMSO, 轻轻振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 在490 nm波

的不同阶段他们之间的关系也可能会发生不同的改变. 我们的结果提示细胞凋亡对增生的刺激也许仅发生在肝癌发生的早期, 在肿瘤发展过程中其他因素参与, 或同一种蛋白还有其他功能, 如 Bid 是否还参与细胞周期的调节等, 有可能使其在肿瘤发生过程中的作用发生改变, 需进一步进行研究.

#### 4 参考文献

- 1 Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Mullauer L, Taper H, Huber W, Bursch W, Schult-Hermann R. Inherent increase of

- apoptosis in liver tumors: Implications for carcinogenesis and tumor regression. *Hepatology* 1997;25:906-912
- 2 Fausto N. Mouse Liver Tumorigenesis: Models, Mechanisms and relevance to human disease. *Seminars Liver Dis* 1999;19: 243-252
- 3 Grasl-Kraupp B, Rossmanith W, Ruttkay-Nedecky B, Mullauer L, Kammerer B, Bursch W, Schult-Hermann R. Levels of transforming growth factor beta and transforming growth factor beta receptors in rat liver during growth, regression by apoptosis and neoplasia. *Hepatology* 1998;28:717-726
- 4 Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, Rhim JA, Fausto N. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knock-out mice. *J Exp Med* 2000;192:1809-1818

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

• 研究快报 •

## 硒蛋氨酸对食管癌细胞株增生的影响

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 于皆平

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 鄱阳医学院附属太和医院消化内科 湖北省十堰市 442000

于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430000

项目负责人: 陈滋华, 442000, 湖北省十堰市, 鄱阳医学院附属太和医院消化内科. pollex001163@com

电话: 0719-8801431 传真: 0719-8883809

收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-01-08

### 摘要

目的: 探讨硒蛋氨酸对食管癌细胞系EC9706增生的影响.

方法: 通过MTT比色法、细胞生长曲线描绘研究硒蛋氨酸对食管癌细胞系EC9706增生的影响, 采用流式细胞仪观察硒蛋氨酸诱导EC9706细胞凋亡的作用及对细胞周期的影响.

结果: 硒蛋氨酸呈时间、剂量依赖性方式抑制EC9706细胞增生, 改变细胞周期分布, 增加G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例, 诱导细胞凋亡.

结论: 硒蛋氨酸可能通过影响细胞周期分布和诱导细胞凋亡, 来抑制EC9706细胞增生. 硒蛋氨酸可能是预防和治疗食管癌的一种新方法.

陈滋华, 吴清明, 谢国建, 王晓虎, 于皆平. 硒蛋氨酸对食管癌细胞株增生的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1215-1217

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1215.asp>

### 0 引言

食管癌在我国是常见病, 严重威胁着人类的生命健康, 其发生、发展涉及多个基因及分子水平的变化, 目前无论是传统手术还是化疗及放疗都未能取得满意的疗

效<sup>[1-13]</sup>. 因此, 有必要寻找新的防治方法. 大量流行病学和临床研究发现, 微量元素硒与肿瘤的发生呈负相关性. 硒是人体所必需的微量元素, 在生命过程中发挥着重要作用, 本研究的目的在于观察硒蛋氨酸对体外培养食管癌细胞系EC9706生长的影响, 为探讨其对食管癌防治作用提供理论依据.

### 1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂: RPMI-1640培养基, 小牛血清, 胰蛋白酶、蛋氨酸为Gibco公司产品; MTT、DMSO、硒蛋氨酸(selenomethionine)为sigma公司产品. 仪器设备: 恒温CO<sub>2</sub>培养箱(Sanyo 日本), 倒置显微镜(Olympus IX-70)、酶联免疫检测仪( $\Sigma$  960 美国), 流式细胞仪(Epics XL, Beckman coulter 公司). 细胞系: 人食管癌细胞系EC9706由中国医学科学院王明荣教授惠赠.

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 食管癌细胞EC9706常规培养于含10%小牛血清、100 U/mL青霉素及100 U/mL链霉素的RPMI-1640培养基中, 置于37℃ 5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养.

1.2.2 硒蛋氨酸对食管癌细胞EC9706生长的影响 取对数生长期的食管癌细胞EC9706按每孔 $1 \times 10^4$ 个细胞/mL接种于96孔培养板中, 24 h后换液, 加入不同浓度硒蛋氨酸100、200、300、400、500  $\mu$ mol/mL设不接种细胞的空白对照组和只加入等体积溶剂DMSO的对照组. 每组浓度每个时间点设8个复孔, 继续培养, 于第24、48、72、96 h每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)10  $\mu$ L, 37℃孵育4 h后弃去上清液, 每孔加入100  $\mu$ L DMSO, 轻轻振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 在490 nm波

长酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(A值), 求其平均值, 对照组细胞存活率记为100%, 实验组按下列公式计算细胞存活率: 细胞存活率 = 实验组A值 / 对照组A值  $\times$  100%.

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡情况 根据MTT法测出的最佳药物浓度处理食管癌细胞EC9706, 取96 h后实验组、空白对照组及阴性对照组细胞用PBS洗涤后, 加入700 mL/L冷乙醇固定, 离心后PI染液(PI 5 mg、Rnase 2 mg、TritmX-100 1.0%, 生理盐水65 mL, 枸橼酸钠0.1 g, 加蒸馏水至100 mL) 4℃染色30 min, 用流式细胞仪检测. 选用488 nm激发波长测定样品.

1.2.4 细胞生长曲线 把细胞按 $1 \times 10^4$ 个/孔分别接种在24孔培养板中, 待细胞分别长到40-50%融合时, 按一定的MOI感染食管癌细胞EC9706, 定期消化收集细胞, 每个时间点设3个平行组, 计数取平均值及标准差, 连续计数4 d, 对照组包括加蛋氨酸阴性对照组和不加药物空白对照组.

统计学处理 所有数值均以mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS10.0统计分析软件进行t检验.

## 2 结果

2.1 MTT测定结果 各组浓度硒蛋氨酸对食管癌细胞EC9706的增生有较强的抑制作用, 与空白对照组比较差异显著( $P < 0.01$ ), 且呈现一定的浓度、时间依赖性, 结果见(表1). 当硒蛋氨酸浓度为400  $\mu$ mol/mL处理食管癌细胞96 h, 对癌细胞增生的抑制作用最明显, 所以以下实验均以此作用浓度进行.

2.2 流式细胞仪分析凋亡细胞的结果 食管癌细胞EC9706经400  $\mu$ mol/mL硒蛋氨酸处理96 h后行流式细胞仪分析, 在 $G_1$ 期前出现一个二倍体峰,  $G_2/M$ 期细胞减少. 400  $\mu$ mol/mL硒蛋氨酸致食管癌细胞凋亡百分率为52.3%, 与空白对照组及阴性对照组相比有非常显著差异( $P < 0.01$ ) (见图1).

2.3 细胞生长曲线 细胞生长曲线显示硒蛋氨酸组癌细胞计数随时间推移有明显降低趋势, 96 h癌细胞计数最少. 而空白对照组及阴性对照组癌细胞计数随时间推移有明显增多趋(见图2).

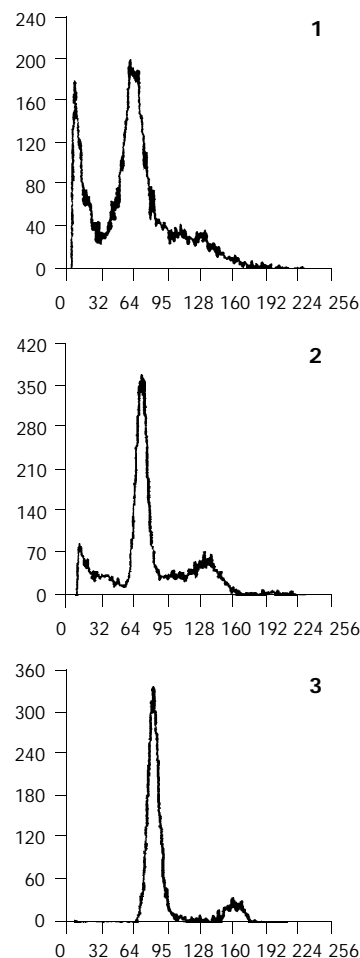


图1 流式细胞仪分析结果. 1: 硒蛋氨酸组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组.

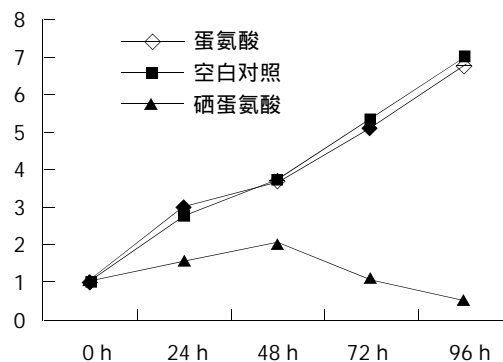


图2 细胞生长曲线.

## 3 讨论

硒是人体所必需的微量元素, 在生命活动过程中发挥

表1 硒蛋氨酸处理食管癌细胞EC9706后MTT法检测结果(mean $\pm$ SD,  $n=8$ )

组项	剂量 ( $\mu$ mol/mL)	$n$	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组		8	0.812 $\pm$ 0.124	0.843 $\pm$ 0.154	0.855 $\pm$ 0.186	0.886 $\pm$ 0.135
硒蛋氨酸组	100	8	0.725 $\pm$ 0.173	0.662 $\pm$ 0.165	0.605 $\pm$ 0.132	0.585 $\pm$ 0.118
	200	8	0.683 $\pm$ 0.112	0.627 $\pm$ 0.101	0.558 $\pm$ 0.148	0.455 $\pm$ 0.113
	300	8	0.598 $\pm$ 0.179	0.503 $\pm$ 0.128	0.406 $\pm$ 0.134	0.351 $\pm$ 0.116
	400	8	0.467 $\pm$ 0.148	0.382 $\pm$ 0.136	0.302 $\pm$ 0.111	0.157 $\pm$ 0.100
	500	8	0.465 $\pm$ 0.114	0.390 $\pm$ 0.132	0.314 $\pm$ 0.125	0.160 $\pm$ 0.118



着重要作用. 大量流行病学和临床研究发现, 微量元素硒与肿瘤的发生呈负相关. 在中国河南林县, 对大量食管鳞状细胞癌和胃贲门腺癌患者做微量元素硒测定, 发现其血清硒水平明显低于正常人<sup>[14]</sup>. 在美国, 科学家在硒缺乏地区, 补充硒化干酵母酶, 经追踪观察, 整个硒缺乏地区恶性肿瘤发生率明显减低. 有实验研究证实硒蛋氨酸对前列腺癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌等癌细胞均有生长抑制作用<sup>[15-23]</sup>.

本实验研究证实, 硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 的生长有明显抑制作用, 其有一定时间、浓度的依赖性, 随浓度的增加、时间的延长, EC9706 的生长明显受到抑制. MTT法测定显示各组浓度硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 增生均有较强的抑制作用, 最大抑制率可达 82.3%, 与空白对照组有显著性差异( $P < 0.01$ ), 与细胞生长曲线基本一致. 流式细胞仪检测发现, EC9706 细胞经硒蛋氨酸 400  $\mu\text{mol/mL}$  处理 96 h 后在  $G_1$  期前出现一个亚二倍体高峰, 硒蛋氨酸可诱导 EC706 细胞发生凋亡, 凋亡率为 52.3%, 与对照组比有显著性差异.

总之, 我们认为硒蛋氨酸对食管癌 EC9706 细胞增生的抑制作用可能机制之一在于改变细胞周期分布, 增加  $G_0/G_1$  期细胞比例, 诱发细胞凋亡. 由于细胞凋亡是一个多阶段、多系统参与极其复杂的过程, 本实验仅探讨了硒蛋氨酸对食管癌细胞系 EC9706 生长抑制及诱导凋亡的作用, 其具体作用机制还有待进一步研究. 本实验及国外大量研究证实硒蛋氨酸对恶性肿瘤的细胞生长有抑制作用; 在硒缺乏地区补充硒可减少整个恶性肿瘤的发生. 硒蛋氨酸作为硒的载体, 在许多动植物体内存在, 容易获取, 与其他硒化物相比, 毒性小, 相对安全<sup>[24]</sup>. 在硒缺乏地区补充硒预防肿瘤发生或把硒及其化合物用作治疗肿瘤的一种新手段, 其前景非常广阔.

#### 4 参考文献

- 1 Zhang LJ, Chen KN, Xu GW, Xiang HP, Shi XT. Con genital expression of mdr-1 gene in tissues of carcinoma and its relation with pathomorphology and prognosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:53-56
- 2 Wang LD, Zhou Q, Wei JP, Yang WC, Zhao X, Wang LX, Zou JX, Gao SS, Li YX, Yang C. Apoptosis and its relationship with cell proliferation, p53, Waf1p21, bcl-2 and c-myc in esophageal carcinogenesis studied with a high-risk population innorthern china. *World J Gastroenterol* 1998;4:287-293
- 3 Lin J, Deng CS, Sun J, Zhou Y, Xiong P, Wang YP. Study on the genetic susceptibility of HLA-DQB1 alleles in esophageal cancer of Hubei Chinese Hans. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:965-968
- 4 Liu J, Chen SL, Zhang W, Su Q. P21<sup>WAF1</sup> gene expression with p53 mutation in esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1350-1353
- 5 Gu HP, Shang PZ, Su H, Li ZG. Association of CD15 antigenexpression with cathepsin D in esophageal carcinoma tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:259-261
- 6 Qin HY, Shu Q, Wang D, Ma QF. Study on genetic polymorphisms of DCC gene VNTR in esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:782-785
- 7 Wu QM, Li SB, Wang Q, Wang DH, Li XB, Liu CZ. The expression of COX-2 in esophageal carcinoma and its relation to clinicopathologic characteristics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:11-14
- 8 Tan LJ, Jiang W, Zhang N, Zhang XR, Qiu DH. Fas/FasL expression of esophageal squamous cell carcinoma, dysplasia tissues and normal mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:15-19
- 9 Hao MW, Liang YR, Liu YF, Liu L, Wu MY, Yang HX. Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cells lines. *World J Gastroenterol* 2002;8:203-207
- 10 Xu M, Jin YL, Fu J, Huang H, Chen SZ, Qu P, Tian HM, liu ZY, Zhang W. The abnormal expression of retinoic acid receptor-beta, p53 and Ki67 protein in normal, premalignant and malignant esophageal tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:200-202
- 11 Wang AH, Sun CS, Li LS, Hang JY, Chen QS. Relationship of tobacco smoking CYP1A1 GSTM1 gene polymorphism and esophageal cancer in xi' an. *World J Gastroenterol* 2002;8:49-53
- 12 张卫国, 吴清明, 董强, 于皆平. 腺病毒介导的 p27kip1 对食管癌裸鼠模型抑制的作用. *世界华人消化病杂志* 2003;11:512-516
- 13 李胜保, 吴清明, 王强, 王小虎, 谢国建. 腺病毒介导的 cox-2 反义 RNA 对食管癌细胞株 DNA 和蛋白质合成的影响. *世界华人消化病杂志* 2003;11:517-521
- 14 Gerhard N. Nutrition selenium supplement: product types, quality, and safety. *J Am Coll Nutr* 2001;20:1-4
- 15 Miki K, Xu MX, Gupta A, Ba Y, Tan YY, Al-Refaie W, Bouvet M, Makuuchi M, Moossa AR, Hoffman RM. Methioninase cancer gene therapy with selenomethionine as suicide Prodrug substrate. *Cancer Res* 2001;61:6805-6810
- 16 Seo YR, Kelley MR, Smith ML. From the cover:Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism. *PNAS* 2002;99:14548-14553
- 17 Menter DG, Selenium AL. Effects on prostate cell growth cancer epidemiol. *Biomarkers Prev* 2000;9:1171-1182
- 18 Baines A, Taylor-Parker M, Goulet AC, Renaud C, Gerner EW, Nelson MA. Selenomethionine inhibits growth and suppresses cyclooxygenase-2(COX-2) protein expression in human colon cancer cell line. *Cancer Biol Ther* 2002;1:370-374
- 19 Chigbrow M, Nelson M. Inhibition of mitotic cyclin B and cdc2 kinase activity by selenomethionine in synchronized coloncancer cells. *Anticancer Drugs* 2001;12:43-50
- 20 Yamamoto N, Gupta A, Xu M, Miki K, Tsujimoto Y, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Hoffman RM. Methioninase gene therapy with selenomethionine induces apoptosis in bcl-2-overproducing lung cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2003;10:445-450
- 21 Redman C, Scott JA, Baines AT. Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. *Cancer Lett* 1998;125:103-110
- 22 Redman C, Xu MJ, Peng YM, Scott JA, Payne C, Clark LC, Nelson MA. Involvement of polyamines in selenomethionine induced apoptosis and mitotic alterations in human tumor cells. *Carcinogenesis* 1997;18:1195-1202
- 23 Duffield-Lillico AJ, Slate EH, Reid ME, Turnbull BW, Wilkins PA, Combs GF Jr, Park HK, Gross EG, Graham GF, Stratton MS, Marshall JR, Larry C. Clark for the nutritional prevention of cancer study group. Selenium supplementation and secondary prevention of nonmelanoma Skin cancer in a randomized. *Trial J Natl Cancer Inst* 2003;95:1477-1481
- 24 Mark SD, Qiao YL, Dawsey SM, Wu YP, Katki H, Cunter EW, Fraumeni JF Jr, Blot WJ, Dong ZW, Taylor PR. Prospective study of serum selenium levels and incident esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1753-1763

# 大肠癌组织中 Survivin 和 Cox-2 表达的相关性

金 玉, 林连捷, 郑长青

金玉, 林连捷, 郑长青, 中国医科大学附属第二医院消化科 辽宁省沈阳市 110004

项目负责人: 金玉, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院消化科. jinyu913@hotmail.com

电话: 024-83956416

收稿日期: 2003-12-23 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

目的: 检测大肠癌组织Survivin和环氧化酶(Cox-2)的表达情况, 并探讨二者之间的相关性.

方法: 应用免疫组织化学(S-P)方法分别检测 Survivin 和 Cox-2在40例大肠癌及34例正常大肠黏膜中的表达情况.

结果: Survivin 的阳性表达定位于细胞质, 在大肠癌组织中其阳性率为 67.5%, 正常大肠黏膜组织中阳性率为 0, 二者差异十分显著( $P < 0.01$ ); Cox-2的阳性表达定位于细胞质, 在大肠癌组织中其阳性率为 90%, 正常大肠黏膜组织中阳性率为 11.8%, 二者差异十分显著( $P < 0.01$ ). Survivin 和 Cox-2 的表达具有一定的相关性( $r = 0.39$ ,  $P < 0.05$ ).

结论: 大肠癌组织中Survivin过表达可能是最终导致大肠癌发生的突破点, Survivin 和 Cox-2 的协同表达表明大肠癌中的抑制凋亡是通过多种通路实现的.

金玉, 林连捷, 郑长青. 大肠癌组织中 Survivin 和 Cox-2 表达的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1218-1220

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1218.asp>

## 0 引言

凋亡的调节对人体组织保持内环境稳态及正常细胞形态至关重要, 这一过程受到干扰将使细胞的寿命无限延长或累积突变, 有利于肿瘤的发生. Survivin, 凋亡抑制蛋白家族(IAP)的新成员, 是一种最近才发现的抗凋亡基因, Survivin在胎盘和胚胎组织中高水平表达, 在正常组织中不表达, 已经证实 Survivin 在许多肿瘤中过表达<sup>[1-3]</sup>, 但 Survivin 在大肠癌中的作用所知甚少. 大肠癌发生、发展过程中环氧化酶(Cox)-2 表达增加<sup>[4-5]</sup>, 大量研究证实表达 Cox-2 的细胞株增加癌变潜能与抵抗凋亡有关, 但是关于 Cox-2 和 Survivin 的相关性还不清楚. 本实验通过检测 Survivin 在大肠癌中的表达说明 Survivin 在大肠癌发生、发展过程中的作用, 另外探讨大肠癌中 Survivin 和 Cox-2 表达的相关性.

## 1 材料和方法

1.1 材料 中国医科大学附属第二医院2002-06/2002-10手术切除和内窥镜活检后的大肠组织 74 例, 大肠癌组

织 40 例, 其中男 29 例, 女 11 例, 33-74 岁, 平均年龄  $61.4 \pm 10.7$  岁, 所有患者术前均未接受放疗和化疗. 选择 34 例正常大肠黏膜作为对照, 其中男 20 例, 女 14 例, 35-70 岁, 平均年龄  $60.5 \pm 19.4$  岁. Survivin 羊抗人多克隆抗体(sc-8806), Cox-2 单克隆抗体均为 Santa Cruz 公司产品, Survivin 一抗工作浓度 1:50, Cox-2 一抗工作浓度 1:75, SP 试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品.

1.2 方法 采用链霉卵白素-生物素-辣根过氧化物酶复合法(S-P法)进行免疫组化染色. 在400倍放大的显微镜下计数至少 5 个随机视野, 取平均值, 阳性细胞数小于 10% 计为阴性, 余下为阳性, 采用盲法计数.

统计学处理 采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  有统计学意义. Survivin 和 Cox-2 的相关性分析采用 Spearman 检验,  $P < 0.05$  有统计学意义.

## 2 结果

2.1 Survivin 和 Cox-2 在大肠癌中的表达 Survivin 阳性染色主要在大肠癌细胞的细胞质中(图 1), 大肠癌中其阳性率为 67.5%, 而正常大肠黏膜中未见到阳性表达(图 2), 二者差异十分显著( $P < 0.01$ )(表 1).

表 1 Survivin 在大肠癌组织及正常大肠黏膜中的表达

研究对象	n	Survivin	
		阳性	阴性
大肠癌组织	40	27	13
正常大肠黏膜	34	0	34

$P < 0.01$  vs 大肠癌组织.

Cox-2 的阳性表达定位于细胞质中, 大肠癌及正常大肠黏膜中均可见阳性表达, 阳性率分别为 90%(图 3)和 11.8%(图 4), 二者差异十分显著( $P < 0.01$ )(表 2).

表 2 Cox-2 在大肠癌组织及正常大肠黏膜中的表达

研究对象	n	Cox-2	
		阳性	阴性
大肠癌组织	40	36	4
正常大肠黏膜	34	4	30

$P < 0.01$  vs 大肠癌组织.

2.2 Survivin 和 Cox-2 表达的相关性 采用 Spearman 检验结果表明存在正相关( $r = 0.39$ ,  $P < 0.05$ ).

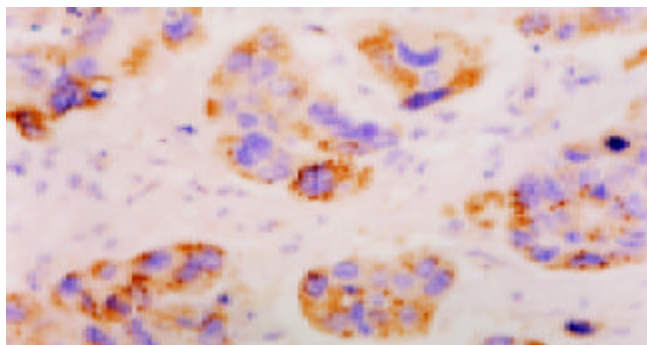


图1 大肠癌组织中Survivin的表达. 棕色染色的细胞为阳性细胞( $\times 400$ ).

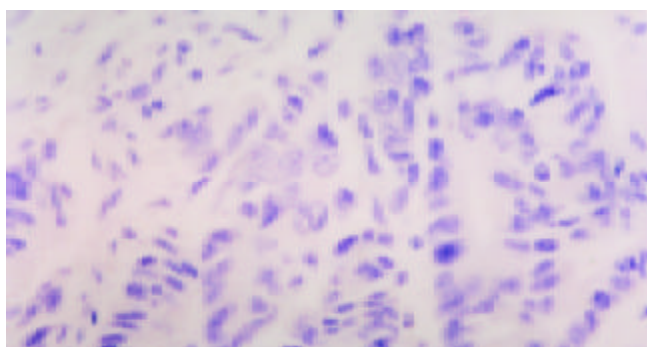


图2 正常大肠黏膜中无Survivin表达( $\times 400$ ).

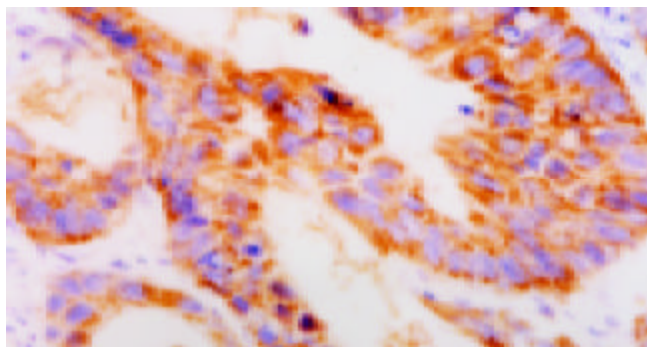


图3 大肠癌组织中Cox-2的表达. 棕色染色的细胞为阳性细胞( $\times 400$ ).

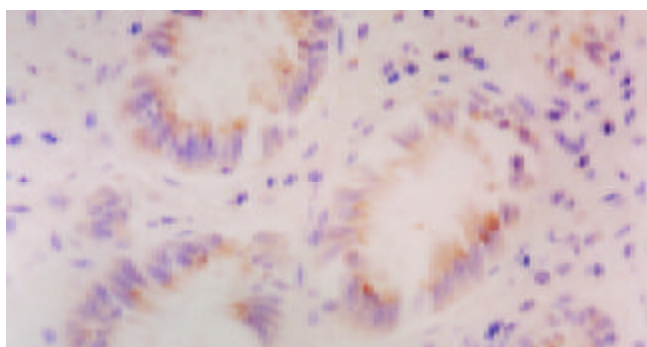


图4 正常大肠黏膜中Cox-2的表达. 棕色染色的细胞为阳性细胞( $\times 400$ ).

### 3 讨论

大肠癌的发展分多个阶段, 受多基因调控, 包括累积突变和细胞周期调节失衡, 在大肠癌的早期阶段检测出这些改变可以解释大肠癌的发展过程. IAP 家族是一种广泛表达的抑制凋亡的基因家族, Survivin 是人们

最近发现的凋亡抑制蛋白家族的新成员<sup>[6]</sup>, Survivin 基因定位于 17q25, 分子量 16.5 kD, Survivin 有保护细胞、维持微管结构完整性的作用, 他的表达特点是在胎盘和胚胎组织中强烈表达, 在终末分化良好的正常组织中不表达, 在许多恶性肿瘤组织胞质中重新出现高水平表达, 这样可以使肿瘤细胞免于凋亡, 促进有丝分裂的畸变, 加速多倍体的形成. 外界某些凋亡刺激因子激活 caspase<sup>[7-8]</sup>, 通过线粒体释放细胞色素 c 激活胞质内的 caspase 级联反应, 形成了由 procaspase-9, Apaf-1, 细胞色素 c 和 dATP 组成的凋亡小体, 最终激活 caspase-3 和 caspase-9 而导致凋亡, Survivin 调节线粒体内膜通过电压依赖的离子通道释放细胞色素 c, 比其他凋亡抑制基因如 bcl-2 的作用更强, 他可以直接与 caspase-3 和 caspase-7 结合, 使 caspase 的活性降低而抑制凋亡, 或者与 caspase 的启动子和效应子相互作用, 防止 caspase 蛋白水解酶活性成熟, 抑制细胞色素 c 的释放而保持线粒体的完整性; Survivin 还可以调节 G<sub>2</sub>/M 细胞周期<sup>[9, 25]</sup>. 本组实验得出这样的结果: Survivin 阳性染色主要位于细胞质, 大肠癌中其阳性率为 67.5%, 而正常大肠黏膜中未见到阳性表达, 二者差异十分显著 ( $P < 0.01$ ), Lin et al<sup>[28]</sup> 曾用免疫组化的方法检测 Survivin 蛋白在正常大肠黏膜、腺瘤及大肠癌中的表达情况时发现从正常大肠黏膜到腺瘤以及最终癌变的发展过程中 Survivin 表达逐渐增加<sup>[10]</sup>, 而且 Survivin 表达强度与大肠癌分化程度无关, 由此证明 Survivin 重新表达的时机为肿瘤发生的早期.

有研究表明大肠癌中 Survivin 的表达阳性率较高, 且与肿瘤的分化程度及淋巴结转移无关<sup>[11]</sup>, 在大肠癌的发生、发展过程中起重要作用, 这使得 Survivin 成为肿瘤特异性诊断指标, 并为大肠癌的治疗提供新的靶点. 实验<sup>[12]</sup>表明用磷酸化缺陷的 Survivin Thr34  $\rightarrow$  Ala 突变体防止 Survivin 蛋白第 34 位苏氨酸(Thr34)磷酸化, Thr34 磷酸化丢失导致 Survivin-caspase-9 复合体从有丝分裂结构中分离开, Survivin 的表达下降, Survivin 这种抗凋亡功能丢失使得依赖 caspase-9 的各种肿瘤细胞凋亡<sup>[25]</sup>. T34A 的抗癌特性最近在严重联合免疫缺陷鼠黑色素瘤异体移植动物模型中得到证实, Survivin T34A 的表达抑制肿瘤生长达 60-70%. Yamamoto et al<sup>[13]</sup> 将 EPR-1 导入结肠癌细胞株, 使 Survivin 表达下降, 降低细胞增生, 促进凋亡, 增加对抗癌药的敏感性.

研究表明 Survivin 干扰 caspase-9 的激活或直接与 caspase-3 和 caspase-7 结合而使凋亡的级联终止<sup>[25]</sup>, 而生物体内的凋亡是多步骤过程, 是多种因子相互作用的级联反应. Cox-2 是催化花生四烯酸转化为前列腺素的限速酶, 其过度表达与大肠癌的发生、发展密切相关, 大量研究已经证实在大肠癌的发生过程中 Cox-2 的表达增加<sup>[14]</sup>, 本研究结果表明大肠癌中 Cox-2 的阳性率为 90%, 而正常大肠黏膜中其阳性率为 11.8%, 二者差异十分显著 ( $\chi^2 = 45.29$ ,  $P < 0.01$ ). 以往的研究发现肠

上皮细胞内 Cox-2 过表达增加 IAP 水平, 而且前列腺素 E2, Cox-2 主要代谢产物, 可以增加人结肠癌细胞中另一种凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达<sup>[15-17]</sup>; 另外, Cox-2 抑制剂 NSAIDs<sup>[18-20]</sup> 阻断 Cox-2 通路, 使 Bcl-2 表达下调, 肿瘤变小, 癌前和癌性病变细胞数减少<sup>[15, 21-22]</sup>, 使癌细胞对放化疗更敏感<sup>[23-24]</sup>; NSAIDs 也可以通过诱导线粒体释放细胞色素 c、激活 caspase-3 和 caspase-9 而促进肿瘤细胞的凋亡<sup>[26-27]</sup>. Survivin 和 Cox-2 在大肠癌中均呈高水平表达, 二者之间是否存在某种联系? 目前关于 Survivin 和 Cox-2 的相互作用所知甚少, Yu et al<sup>[29]</sup> 研究 Survivin 在胃癌及其一级亲属中的表达时已证实 Survivin 和 Cox-2 有明显的相关性, Cox-2 过表达的细胞株可以减少细胞色素 c 的释放, 并抑制 caspase 的活性<sup>[26]</sup>, Cox-2 表达的细胞株中内皮细胞生长因子受体(EGFR)呈高水平表达, Cox-2 通过 EGFR 调节结肠癌细胞株的增生, 而 Survivin 也可以抑制 caspase 的活性, 调节血管内皮细胞的表达<sup>[30]</sup>, 实验经统计学分析大肠癌中 Survivin 和 Cox-2 的表达具有正相关性( $r=0.39$ ,  $P<0.05$ ), 说明 Survivin 和 Cox-2 协同表达通过多种方式抑制凋亡.

Survivin 作为凋亡抑制蛋白家族的新成员, 他的生物学特性及与多种生物因子的相互作用已得到共识, Survivin 在大肠癌组织中表达, 而在正常大肠黏膜中不表达, Survivin 和 Cox-2 的表达具有一定的正相关性, 这说明大肠癌中凋亡的抑制作用是通过多种通路实现的, 因此, 深入研究 Survivin 将对大肠癌的治疗、化疗药物的研制奠定理论基础.

#### 4 参考文献

- Kania J, Konturek SJ, Marlicz K, Hahn EG, Konturek PC. Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2003;48:266-271
- Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Hopfner M, Germer CT, Scherubl H. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;88:115-119
- Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Quantitative analysis of apoptosis-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;95:1938-1945
- Zhang H, Sun XF. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1037-1041
- Wu AW, Gu J, Ji JF, Li ZF, Xu GW. Role of COX-2 in carcinogenesis of colorectal cancer and its relationship with tumor biological characteristics and patients' prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1990-1994
- Altieri DC. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res* 2003;88:31-52
- McKay TR, Bell S, Tenev T, Stoll V, Lopes R, Lemoine NR, McNeish IA. Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases survivin transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, survivin T34A; a combination gene therapy strategy. *Oncogene* 2003;22:3539-3547
- Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin-an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit* 2003;9:PI25-PI29
- Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22:8581-8589
- Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, Shroyer KR. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol* 2001;32:119-125
- Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Tenjo T, Tanigawa N. Expression of Survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001;91:2026-2032
- Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 2003;63:230-235
- Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc* 2001;34:207-212
- Einspahr JG, Krouse RS, Yochim JM, Danenberg PV, Danenberg KD, Bhattacharyya AK, Martinez ME, Alberts DS. Association between Cyclooxygenase expression and colorectal adenoma characteristics. *Cancer Res* 2003;63:3891-3893
- Tang X, Sun YJ, Half E, Kuo MT, Sinicrope F. Cyclooxygenase-2 overexpression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:4903-4908
- Moran EM. Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002;21:193-201
- Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001;121:1339-1347
- Stoecklacher J, Lenz HJ. Cyclooxygenase-2 inhibitors in colorectal cancer. *Semin Oncol* 2003;30(3 Suppl 6):S10-S16
- Howe LR, Dannenberg AJ. A role for cyclooxygenase-2 inhibitors in the prevention and treatment of cancer. *Semin Oncol* 2002;29(3 Suppl 11):S111-S119
- Reddy BS, Rao CV. Novel approaches for colon cancer prevention by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002;21:155-164
- Saha D, Roman C, Beauchamp RD. New strategies for colorectal cancer prevention and treatment. *World J Surg* 2002;26:762-766
- Patrignani P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs COX-2 and colorectal cancer. *Toxicol Lett* 2000;112:493-498
- Crane CH, Janjan NA, Mason K, Milas L. Preoperative chemoradiation for locally advanced rectal cancer: emerging treatment strategies. *Oncology (Huntingt)* 2002;16(5 Suppl 5):S39-S44
- Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 2003;63:230-235
- Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltschendorf T, Reed JC. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-5320
- Sun Y, Tang XM, Half E, Kuo MT, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the cytochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:6323-6328
- Li M, Wu X, Xu XC. Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway. *Clin Cancer Res* 2001;7:1010-1016
- Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2003;9:974-977
- Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, Wang HB, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Increased expression of Survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 2002;87:91-97
- Yoshimoto T, Takahashi Y, Kinoshita T, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T. Growth stimulation and epidermal growth factor receptor induction in cyclooxygenase-overexpressing human colon carcinoma cells. *Adv Exp Med Biol* 2002;507:403-407



• 临床经验 •

# 老年消化道多原发癌患者的辅助化疗及转归

蔡昌豪, 吴本俨, 吴道宏, 邵勇, 王孟薇

蔡昌豪, 吴本俨, 吴道宏, 邵勇, 王孟薇, 中国人民解放军总医院老年消化科 北京市 100853

项目负责人: 蔡昌豪, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院老年消化科. chchai@sina.com

电话: 010-66937502 传真: 010-66939413

收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-12-29

## 摘要

目的: 探讨多原发消化道肿瘤辅助化疗对预后的影响及与第三原发癌发生的关系。

方法: 回顾分析老年消化道双原发癌术后辅助化疗与非化疗患者生存时间及5 a生存率。

结果: 26例消化道双原发癌共52个病灶, 早期诊断73% (35/52), 次癌5 a生存率61%。接受辅助化疗共12例16例次, 非化疗患者14例。全组共12例发生第三癌, 化疗组6例, 非化疗组6例。化疗组与非化疗组首癌、次癌生存时间无显著差异, 化疗组第三癌中位生存时间33 mo, 非化疗组患者生存时间14 mo ( $P > 0.05$ )。

结论: 化疗对首癌、次癌生存时间无影响, 但延长发生第三癌的间隔时间, 对第三癌生存时间有延长作用。

蔡昌豪, 吴本俨, 吴道宏, 邵勇, 王孟薇. 老年消化道多原发癌患者的辅助化疗及转归. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1221-1222

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1221.asp>

## 0 引言

消化道单发进展期癌术后辅助化疗已被广泛应用, 即便是黏膜癌也有转移<sup>[1-2]</sup>, 亦主张辅助化疗<sup>[3]</sup>。辅助化疗能延长患者的生存时间, 同时引起的后续肿瘤的危险性也随之增加已有共识<sup>[4-5]</sup>, 然而对消化道多原发癌(multiple primary carcinomas, MPC)的辅助化疗及发生后续癌却知之甚少。现将26例发生在老年人消化道的多原发癌报告如下, 其中16例接受辅助化疗, 并对辅助化疗后患者的生存时间、5 a生存率及后续肿瘤的发生进行探讨。

## 1 材料和方法

1.1 材料 消化道多原发癌患者26例, 均为男性住院病例, 60-89岁。其中第一原发癌(首癌)发病中位年龄71岁, 第二原发癌(次癌)发病中位年龄73.5岁。20例异时癌, 6例同时癌。间隔时间: 首癌与次癌中位间隔时间45 mo, 平均67 mo。肿瘤分布: 双原发大肠癌11例, 双原发胃癌7例, 双原发食管癌1例, 大肠癌-胃癌4例, 食管癌-胃癌1例, 大肠癌-食管癌2例。第三癌: 结直肠癌4例, 胃癌3例, 胆管癌2例, 肺

癌2例, 小肠癌1例。

1.2 方法 根据手术后是否进行化疗分成辅助化疗组、非化疗组, 计算每一种癌各自的生存时间、诊断满5 a以上的按其生存时间计算5 a生存率、第三肿瘤发生率。化疗患者其肿瘤均已侵及黏膜下层或肌层, 伴静脉癌栓、局部淋巴结转移。诊断: 26例消化道双原发癌, 共计52个病灶, 经病理组织学诊断。双发癌符合Warren<sup>[6]</sup>提出的多原发癌诊断标准。治疗: 26例双原发癌共52个病灶, 手术39例次, 内镜黏膜切除(EMR)治疗9例次, 共切除48个病灶。术后辅助化疗12人16例次, 其中大肠癌9例次, 胃癌7例次; 化疗组早期癌7例次, 进展期癌9例次。化疗方案: 5-氟尿嘧啶0.5 g 静脉点滴, 1-5 d/wk, 丝裂霉素6-8 mg 静脉点滴, 1次/wk, 21 d为1个周期, 平均化疗4个周期(2-6周期)。2例因肝功能损伤, 仅化疗2个周期。1例早期胃癌口服优福定, 0.648 g, 3次/d, 连服6 wk为1个周期, 化疗1个周期。

统计学处理 计数以中位数法计算, 生存时间以t检验法计算。

## 2 结果

2.1 化疗后状况 首癌状况: 首癌22例手术, 术后辅助化疗10例, 中位生存时间108 mo, 12例未进行化疗, 中位生存时间109.5 mo, 二者比较无差异。次癌状况: 次癌手术17例, 生存中位时间36 mo。其中接受辅助化疗患者6例, 另外1例患者EMR后辅助化疗, 共7例, 中位生存时间32 mo, 平均生存67 mo; 未接受辅助化疗11例, 中位生存时间36 mo, 平均生存66.8 mo。次癌5 a生存率61% (11/18), 10 a 35% (6/17)。

2.2 第三癌发生 26例消化道双原发癌, 随访中12例发生第三癌, 其中6例患者经辅助化疗, 其余6例未接受辅助化疗。中位年龄78.5岁。化疗组第三癌早期诊断50%(3/6), 胃癌2例, 肺癌1例; 未化疗组第三癌早期诊断50%(3/6), 直肠癌1例, 结肠癌1例, 原发性肝细胞癌1例。诊断次癌至第三癌之间隔时间, 化疗组中位间隔时间53.5 mo, 未做辅助化疗组中位间隔时间29 mo。12例三原发癌患者中位生存时间21.5 mo, 经化疗组患者中位生存期33 mo; 未化疗组中位生存时间14 mo, 无显著差异( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

3.1 辅助化疗的意义 辅助化疗是否延长患者的生存时间, 提高5 a生存率过去一直有争论, 但近几年文献[4, 5, 7-9]报告辅助化疗能延长生存时间、提高5 a

生存率<sup>[10-11]</sup>. 辅助化疗提高生存时间 9%, 提高 5 a 无病生存时间 17%<sup>[9]</sup>. 早期胃癌有下述情况可给辅助化疗<sup>[3]</sup>:

(1) 病理类型高度恶性; (2) 有脉管癌栓或淋巴结转移; (3) 多发病灶; (4) 面积大于 5 cm<sup>2</sup>. 本组结果显示, 化疗对自身肿瘤的生存时间无影响, 但是对后续肿瘤有影响, 化疗组比未化疗组生存时间长.

3.2 对当事肿瘤的作用 本组首癌 22 例手术后辅助化疗者与未进行化疗者中位生存时间无差异, 与文献<sup>[12]</sup>报告相符; 次癌手术 17 例, 接受辅助化疗者与未接受辅助化疗者中位生存时间无差异, 可见双癌术后辅助化疗对生存时间无影响. 文献<sup>[13]</sup>报道多原发癌早期诊断 41%, 5 a 生存率 43%, 本组次癌早期诊断 73%, 5 a 生存率 61%, 早期治疗及时, 可使次癌患者生存时间长(中位生存时间 33 mo, 平均生存时间 59.65 mo, 超过 63 mo 者 8 例, 占 44%(8/18)), 为第三癌发生提供了足够的生长时间<sup>[14-15]</sup>.

3.3 对后续肿瘤的作用 本组 12 例发生第三癌, 中位生存时间 21.5 mo, 从前一肿瘤是否接受辅助化疗看, 两组生存时间相差较大. 6 例经辅助化疗的患者, 中位生存期 33 mo; 而 6 例未化疗的患者, 中位生存时间仅 14 mo. 从现象上看, 前肿瘤辅助化疗对后续肿瘤的生存时间即延长期生存时间有影响. 原因: (1) 化疗后体内免疫功能增强, 口服中药扶正治疗; (2) 应用免疫增强剂. 另外, 辅助化疗组发生第三癌的间隔时间长于未化疗组, 化疗组第三癌来得晚, 67%(4/6) 发生在 3 a 以后, 未化疗组第三癌 67%(4/6) 在 3 a 以内, 提示辅助化疗延缓第三癌的发生时间, 同时提示对接受辅助化疗的患者要长期随访<sup>[16]</sup>, 以便发现早期癌.

#### 4 参考文献

- 1 Kobayashi M, Araki K, Matsuura K, Kawai S, Moriki T. Early gastric cancer giving rise to bone and brain metastases—a review of the Japanese literature. *Hepatogastroenterology* 2002; 49:1751-1754
- 2 Shimada S, Yagi Y, Honmyo U, Shiomori YN, Yoshida N, Ogawa M. Involvement of three or more lymph nodes predicts poor prognosis in submucosal gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 2001; 4:54-59
- 3 孙燕. 内科肿瘤学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:554-568
- 4 Bajetta E, Buzzoni R, Mariani L, Beretta E, Bozzetti F, Bordogna G, Aitini E, Fava S, Schieppati G, Pinotti G, Visini M, Ianniello G, Di BM. Adjuvant chemotherapy in gastric cancer: 5-year results of a randomised study by the Italian Trials in Medical Oncology (ITMO) Group. *Ann Oncol* 2002; 13:299-307
- 5 Kim R, Yamaguchi Y, Toge T. Adjuvant therapy for colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:2413-2418
- 6 Warren S, Gates O. Multiple primary malignant tumors: a survey of the literature and a statistical study. *Ann J Cancer* 1932;16:1358-1414
- 7 Neri B, Cini G, Andreoli F, Boffi B, Francesconi D, Mazzanti R, Medi F, Mercatelli A, Romano S, Siliani L, Tarquini R, Moretti R. Randomized trial of adjuvant chemotherapy versus control after curative resection for gastric cancer: 5-year follow-up. *Br J Cancer* 2001;84:878-880
- 8 Yao JC, Ajani JA. Adjuvant and preoperative chemotherapy for gastric cancer. *Curr Oncol Rep* 2002;4:222-228
- 9 Sakamoto J, Teramukai S, Nakazato H, Sato Y, Uchino J, Taguchi T, Ryoma Y, Ohashi Y. Efficacy of adjuvant immunotherapy with OK-432 for patients with curatively resected gastric cancer: a meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials. *J Immunother* 2002;25: 405-412
- 10 Baeza MR, Giannini TO, Rivera SR, Gonzalez P, Gonzalez J, Vergara E, del Castillo C, Madrid J, Vines E. Adjuvant radiochemotherapy in the treatment of completely resected, locally advanced gastric cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50:645-650
- 11 Kim JP, Yu HJ, Lee JH. Results of immunochemo-surgery for gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1227-1230
- 12 蔡昌豪, 王孟薇, 吴道宏, 邵勇, 吴本俨. 老年多原发癌早期诊断与治疗. 军医进修学院学报 2003;24:112-114
- 13 Kagei K, Hosokawa M, Shirato H, Kusumi T, Shimizu Y, Watanabe A, Ueda M. Efficacy of intense screening and treatment for synchronous second primary cancers in patients with esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32:120-127
- 14 蔡昌豪, 吴本俨, 吴道宏, 王孟薇. 18 例老年三原发癌临床分析. 中华老年多器官疾病杂志 2003;2:127-129
- 15 Hiyama T, Hanai A, Fujimoto I. Second primary cancer after diagnosis of stomach cancer in Osaka, Japan. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:762-770
- 16 Knast W, Strutynska KM, Rabczynski J. Surgical treatment of patients with multiple carcinomas. *Med Sci Monit* 2001;7: 1256-1262



# 腹腔镜胆总管切开术后胆道引流

魏琪, 蔡小燕, 李立波, 王观宇, 虞洪

魏琪, 蔡小燕, 李立波, 王观宇, 虞洪, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院普外科 浙江省杭州市 310016  
项目负责人: 魏琪, 310016, 浙江省杭州市, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院普外科. weiqi@hz.cnc.com  
电话: 571-86437761  
收稿日期: 2003-09-09 接受日期: 2004-01-08

## 摘要

目的: 腹腔镜胆总管切开(LCD)术后采用经胆囊管胆道减压(TCBD)替代放置T管引流, 可以保证胆总管切开术后一期缝合的安全和消除T管相关并发症. TCBD管采用Roeder结或者贯穿缝扎固定, 但是术后仍需留置3 wk. 我们介绍一种改进的TCBD(mTCBD)方法, 使用输尿管导管和Lapro-Clip固定, 并将其与T管引流作一比较.

方法: 2002-10/2003-06回顾性研究比较LCD应用mTCBD(mTCBD组,  $n=30$ )和T管引流(T管引流组,  $n=52$ )治疗胆总管结石的临床结果.

结果: 两组患者手术时间和残留结石无显著差异. mTCBD组平均胆汁引流量明显少于T管引流组( $306 \pm 141$  mL/24 h vs  $409 \pm 243$  mL/24 h,  $P < 0.01$ ); 引流管的拔除也显著早于T管引流组(median, 5 d vs 29 d,  $P < 0.01$ ). mTCBD组无与引流管有关的并发症, 而T管引流组的并发症发生率为11.5%, 其中拔管后胆漏5.8%.

结论: 我们的初步经验表明LCD术后应用mTCBD是安全、有效、简便、易行的. mTCBD可以减少术后并发症, 尤其是胆漏. 患者术后1 wk内出院, 无任何引流管. 我们推荐胆总管结石的患者选择应用mTCBD.

魏琪, 蔡小燕, 李立波, 王观宇, 虞洪. 腹腔镜胆总管切开术后胆道引流. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1223-1225

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1223.asp>

## 0 引言

腹腔镜胆总管切开术(Laparoscopic choledochotomy, LCD)一期治疗胆总管结石已被认为是安全、有效、性价比高的术式<sup>[1-3]</sup>. 然而, 其并发症相对较高, 主要与T管留置有关<sup>[4]</sup>. 为了消除T管相关并发症, 某些作者建议LCD术后应用经胆囊管胆道减压引流(transcystic biliary decompression, TCBD), 但TCBD术后仍需留置3 wk<sup>[5-6]</sup>, 腹腔镜治疗胆总管结石的价值受到了影响. 我们介绍一种改进的TCBD(modified TCBD, mTCBD)方法, 使用输尿管导管和Lapro-Clip固定, 并将其与T管引流作一比较.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2002-10/2003-06行LCD治疗胆总管结石的患者82例, 其中应用mTCBD30例(mTCBD组), T管引流52例(T管引流组). 术前临床情况见表1, 两组无显著性差异.

1.2 方法 Trocar置入位置同腹腔镜胆囊切除术, 另在左上腹置一10 mm Trocar. 术中常规胆道造影, 胆总管纵向切开, 采用挤压、冲洗和胆道镜网篮等方法取石. mTCBD: 胆总管取净结石后, 3-0 Vicryl连续缝合胆总管. 5Fr输尿管导管置入胆总管2-4 cm, 如位置合适用12 mm Lapro-Clip固定(图1). 应用Lapro-Clip时, 经输尿管导管持续推注生理盐水, 以防止上夹过紧. 再次胆道造影确认导管位置合适、胆管无渗漏. 术后3-7 d胆道造影, 透视下拔除输尿管导管. T管引流: 采用12-16 Fr乳胶T管置入胆总管, 位置合适后用3-0 Vicryl间断缝合胆总管. 术后7-10 d开始夹闭T管, 3-4 wk行胆道造影. 如造影结果正常, 拔除T管; 如发现残余结石, 则T管继续留置3-4 wk. 肝下间隙均放置Jackson-Pratt引流管, 多数术后第3 d拔除. 仅记录住院期间的胆汁引流量. “引流管并发症”指直接与引流管留置或拔除有关的并发症, 并且需要处理, 导致住院时间延长或再次住院.

统计学处理 使用SPSS统计软件包. 计量资料均数t检验, 率比较采用 $\chi^2$ 检验, 非参数数据比较采用Mann-Whitney检验, 显著性标准 $P < 0.05$ .

## 2 结果

2.1 mTCBD组的结果 平均手术时间 $178 \pm 34$  min(表2). 2例患者转开腹手术(6.5%), 其中1例为结石嵌顿, 1例为多发结石; 均应用mTCBD. 经输尿管导管的平均胆汁引流量 $306 \pm 141$  mL/24 h. 中位引流管拔除时间5(4-5 d). X线透视下输尿管导管拔除, 无胆漏或者Lapro-Clip的滑脱(图2), 也无输尿管导管阻塞. 中位术后住院时间5(4-6 d). 1例患者残余结石(3.3%), 行内镜括约肌切开取石(endoscopic sphincterotomy, ES). 2例患者输尿管导管移位, 术后胆道造影未显示胆道, 但无胆漏发生.

2.2 T管组的结果 平均手术时间 $173 \pm 45$  min(表2). 2例患者转开腹手术(6.5%), 均为较大结石嵌顿. 平均T管引流量 $409 \pm 243$  mL/24 h, 中位引流管拔出时间为29(22-32 d). 中位术后住院时间4(4-6 d). T管组7例患者(13.5%)残余结石(表3). 5例患者(9.6%)为已知残余结石, 2例肝内胆管结石, 1例多发性胆总管结石, 均为腹腔镜术中取石困难病例; 另2例为胆道镜器械故障. 未预

知的残余结石2例(3.8%).术后所有患者均取净残余结石,5例经T管窦道胆道镜网篮取石,2例计划取石前T管脱出,ES取净结石.术后并发症6例(11.5%)(表4).拔除T管后胆漏3例(5.8%),其中2例腹部剧痛、大汗、心动过速,为腹腔局限性胆汁积液.经T管窦道再次置入引流管等治疗,患者症状缓解.第3例患者出现胆汁性腹膜炎需要再次开腹引流.1例T管放置部位胆管狭窄,需要T管继续支撑3 mo.另1例术后第2 d T管被拔出,肝下引流管引流胆汁持续2 wk. T管相关并发症还包括1例管周胆汁渗漏.此外,1例患者T管移位,并经胆道造影证实,但无胆漏症状.

2.3 两组临床结果比较 mTCBD组和T管引流组手术时间和残余结石无显著性差异. mTCBD组平均胆汁引流量明显少于T管引流组( $P < 0.01$ );引流管的拔除也显著早于T管引流组( $P < 0.01$ ).与引流管有关的并发症 mTCBD组为零,而T管引流组的并发症为11.5%( $P < 0.05$ ),其中拔管后胆漏5.8%.而mTCBD组术后住院时间长于T管引流组( $P < 0.05$ )(表2).无术后患者死亡和胆总管结石复发.术后随访4-30 wk.

表1 患者术前临床情况

	mTCBD	T管引流
<i>n</i>	30	52
年龄(岁)	28-77	26-82
男/女	12/18	17/35
黄疸	12	16
急性胆囊炎	9	13
急性胰腺炎	3	5
确诊CBD结石	16	37
可疑CBD结石	11	13
CBD直径( $\geq 9$ mm)	18	35
胆道手术	2	3

表2 两组间临床结果比较

	mTCBD	T管引流	<i>t</i> or $\chi^2$ ( <i>z</i> )	<i>P</i>
手术时间(min)	178	173	-0.469	0.640
胆汁引流(mL/24 h)	306	409	2.118	0.037
术后住院(d)	5 (4-6)	4 (4-6)	(-2.060)	0.039
引流管拔除(d)	5 (4-5)	29 (22-32)	(-7.560)	0.000
并发症(%)	0	11.5	5.736	0.017
残留结石(%)	3.3	13.5	2.574	0.109
转开腹(%)	6.5	3.8	0.315	0.575

表3 T管组残余结石

	<i>n</i>
已知残余结石	5 (9.6%)
器械问题	2
肝内胆管结石	2
多发性结石	1
残余结石	2 (3.8%)
<i>n</i>	7 (13.5%)

表4 胆道引流的并发症和潜在问题

	T管引流	mTCBD
并发症		
<i>n</i>	6 (11.5%)	0
引流管原位		
管周胆汁渗漏	1	0
胆管狭窄	1	0
引流管拔出	1	0
引流管拔除	3 (5.8%)	
胆汁性积液	2	0
胆汁性腹膜炎	1	0
潜在问题		
<i>n</i>	3 (5.8%)	2 (6.7%)
引流管脱出	2	0
引流管移位	1	2



图1 5Fr输尿管导管插入胆道减压 12 mm Lapro-Clip 夹固定.

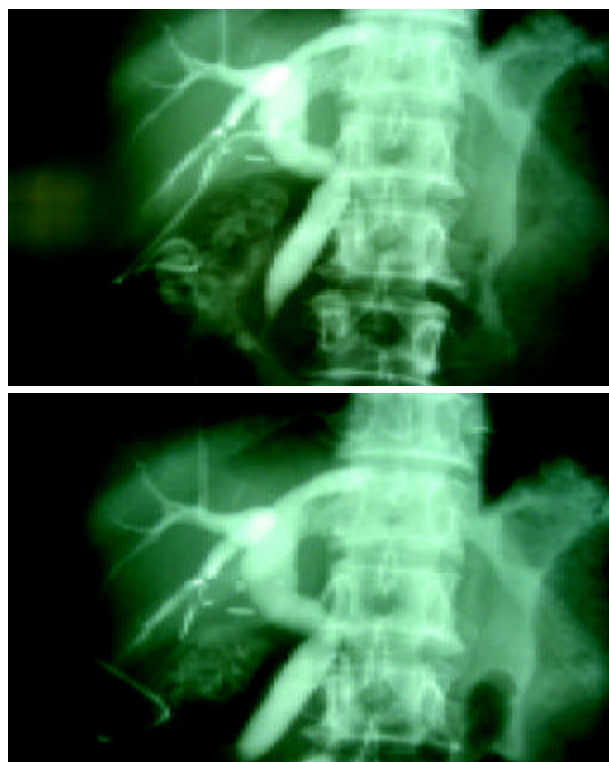


图2 拔除输尿管导管无胆漏 Lapro-Clip 夹闭胆囊管.

### 3 讨论

已有研究表明术后数天胆管内胆泥、纤维素的阻塞;取石操作引起的胆总管下端水肿以及胆管残留结石,均可导致胆总管下端暂时性梗阻,而临时性胆道减压引流有利于防止术后胆漏发生<sup>[5, 7-9]</sup>. TCBD 与 T 管引流一样,起胆道减压作用,并可以消除 T 管相关并发症.

2002-10 起我们应用 mTCBD 一期缝合胆管. Lapro-Clip 具有双层加压闭合机制,利用其弹性内轨环绕胆囊管及输尿管导管,而硬质外轨包绕内轨加压<sup>[10]</sup>. 输尿管导管容易拔除,无胆漏发生;一旦拔除输尿管导管,即可自动闭合胆囊管,即使输尿管导管移位也可避免胆漏的发生.

mTCBD 组引流管拔除后胆漏为零. 中位引流管拔除时间 5 (4-5 d). 2 例输尿管导管移位也无胆漏发生. 报道的 T 管相关并发症为 5-15.3%<sup>[4, 11-12]</sup>, 严重并发症为拔管后胆漏,发生率为 4.12-6.9%<sup>[12-13]</sup>. 而腹腔镜和开腹手术并发症(13.8% vs 15.5%)或者拔管后胆漏(6.9% vs 6.9%)<sup>[12]</sup>没有差异. 本研究 T 管组术后并发症 6 例(11.5%) (表 4), 3 例(5.8%)为拔管后胆漏, 3 例患者 T 管留置均为术后 3 wk. 由于腹腔镜手术创伤小,可能 T 管窦道的形成时间较长<sup>[14-15]</sup>. 中位 T 管拔除时间为 29(22-32 d),即使排除残余结石患者中位引流管拔除时间为 29(21-32 d). 我们的经验提示 T 管可能需要留置 4 wk 以上.

TCBD 管胆道引流和胆管一期缝合主要适用于术时取净结石的患者,腹腔镜术中常规胆道造影和胆道镜的应用,使胆管残余结石率已下降到可接受的程度. 术后 ES 是这些胆管残余结石的补救措施. 本研究 mTCBD 组中 1 例(3.3%)残余结石,术后 ES 取净结石.

如术中有胆管残余结石的可能,则需要放置 T 管以便术后行胆道镜取石. T 管引流组 5 例患者为已知残余结石(表 3). T 管需要再留置 3-4 wk,以利形成成熟的窦道. 术后胆道镜取石的优点是能够避免 Oddi 括约肌损伤,并且多能取净结石.

尽管 mTCBD 组患者的胆汁引流量显著低于 T 管引流组( $306 \pm 141$  mL/24 h vs  $409 \pm 243$  mL/24 h,  $P < 0.01$ ),但是其足够的胆汁引流量表明起到了降低胆道压力的作用. 因此,这一结果提示经 mTCBD 的胆汁引流和 T 管引流一样足以降低胆道压力. 然而, mTCBD 组中位术后住院时间长于 T 管引流组(5 d vs 4 d,  $P < 0.05$ ),可能与我们初步应用 mTCBD 主张住院期间拔除引流管有关.

mTCBD 不宜应用于胆囊管异常、肝内胆管结石、十二指肠乳头狭窄的患者.

需要关注的是 Lapro-Clip 过紧夹闭输尿管导管,经输尿管导管持续推注生理盐水,可防止上夹过紧. 我们

还认为防止输尿管导管的阻塞或者滑脱移位其管径是一个重要因素, 5Fr 输尿管导管管径最合适.

我们的初步经验表明 LCD 术后, mTCBD 的应用减少了术后并发症,尤其是胆漏的发生,而且操作简便易行,患者术后 1 wk 内出院没有任何引流管. 如果慎重选择应用胆道引流,患者术后即能获得较好的生活质量. 我们推荐胆总管结石的患者选择应用 mTCBD.

### 4 参考文献

- 1 Cuschieri A, Lezoche E, Morino M, Croce E, Lacy A, Tooouli J, Faggioni A, Ribeiro VM, Jakimowicz J, Visa J, Hanna GB. E.A. E.S. multicenter prospective randomized trial comparing two-stage vs single-stage management of patients with gallstone disease and ductal calculi. *Surg Endosc* 1999;13:952-957
- 2 Heili MJ, Wintz NK, Fowler DL. Choledocholithiasis: endoscopic versus laparoscopic management. *Am Surg* 1999;65:135-138
- 3 Wei Q, Wang JG, Li LB, Li JD. Management of choledocholithiasis: comparison between laparoscopic common bile duct exploration and intraoperative endoscopic sphincterotomy. *World J Gastroenterol* 2003;9:2856-2858
- 4 Martin IJ, Bailey IS, Rhodes M, O'Rourke N, Nathanson L, Fielding G. Towards T-tube free laparoscopic bile duct exploration: A methodologic evaluation during 300 consecutive procedures. *Ann Surg* 1998;228:29-34
- 5 Hensman C, Crosthwaite G, Cuschieri A. Transcystic biliary decompression after direct laparoscopic exploration of the common bile duct. *Surg Endosc* 1997;11:1106-1110
- 6 Paganini AM, Feliciotti F, Guerrieri M, Tamburini A, De Sanctis A, Campagnacci R, Lezoche E. Laparoscopic common bile duct exploration. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2001;11:391-400
- 7 Holdsworth RJ, Sadek SA, Ambikae S, Cuschieri A. Dynamics of bile flow through the choledochal sphincter following exploration of the common bile duct. *World J Surg* 1989;13:300-304
- 8 Tokumura H, Umezawa A, Cao H, Sakamoto N, Imaoka Y, Ouchi A, Yamamoto K. Laparoscopic management of common bile duct stones: transcystic approach and choledochotomy. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:206-212
- 9 Chen XP, Peng SY, Peng CH, Liu YB, Shi LB, Jiang XC, Shen HW, Xu YL, Fang SB, Rui J, Xia XH, Zhao GH. A ten-year study on non-surgical treatment of postoperative bile leakage. *World J Gastroenterol* 2002;8:937-942
- 10 Darzi A, Sooin B, Coleman J, Lirici NM, Angelini L. Initial experience with an absorbable laparoscopic ligation clip. *Brit J Surg* 1997;84:974-976
- 11 Moreaux J. Traditional surgical management of common bile duct stones: a prospective study during a 20-year experience. *Am J Surg* 1995;169:220-226
- 12 Wills VL, Gibson K, Karihaloo C, Jorgensen JO. Complications of biliary T-tube after choledochotomy. *ANZ J Surg* 2002;72:177-180
- 13 Gharabeh KI, Heiss HA. Biliary leakage following T-tube removal. *Int Surg* 2000;85:57-63
- 14 Tittel A, Treutner KH, Titkova S, Ottinger A, Schumpelick V. Comparison of adhesion reformation after laparoscopic and conventional adhesiolysis in an animal model. *Langenbecks Arch Surg* 2001;386:141-145
- 15 Polymeneas G, Theodosopoulos T, Stamatiadis A, Kourias E. A comparative study of postoperative adhesion formation after laparoscopic vs open cholecystectomy. *Surg Endosc* 2001;15:41-43

# 肝炎病毒感染的大肠癌患者较少发生肝转移

王凤山, 李桂臣, 梁 健, 孙宏治, 刘永锋, 何三光

王凤山, 李桂臣, 梁健, 孙宏治, 刘永锋, 何三光, 中国医科大学附属第一医院普外一科 辽宁省沈阳市 110001  
项目负责人: 王凤山, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属第一医院普外一科, wangfs@hotmail.com  
电话: 024-23256666-6235 传真: 024-25638965  
收稿日期: 2003-01-02 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

目的: 探讨肝炎病毒感染与大肠癌肝转移的关系。

方法: 我院 1994-01/1995-12 住院进展期大肠癌患者, 共 177 例。将病例分为肝炎病毒感染组及非肝炎病毒感染组, 比较两组大肠癌肝转移的发生率。大肠癌肝转移的判定依据术中探查结果及肝脏 CT 检查。

结果: 肝炎病毒感染组 35 例, 合并肝转移 1 例, 肝转移发生率为 2.86%。非肝炎病毒感染组 142 例, 合并肝转移 24 例, 肝转移发生率为 16.9%。两组肝转移发生率差异性显著 ( $P < 0.05$ )。肝炎病毒感染组与非肝炎病毒感染组分层比较结果如下: 年龄:  $52.9 \pm 14.4$  vs  $56.2 \pm 12.5$ ,  $P > 0.05$ ; 癌肿最大径超过 10 cm 者: 14.3% vs 19.0%,  $P > 0.05$ ; 癌肿浸透浆膜者: 45.7% vs 64.1%,  $P = 0.05$ ; 腹腔淋巴结转移者: 25.7% vs 30.0%,  $P > 0.05$ 。

结论: 肝炎病毒感染的大肠癌患者较少发生大肠癌肝转移。

王凤山, 李桂臣, 梁健, 孙宏治, 刘永锋, 何三光. 肝炎病毒感染的大肠癌患者较少发生肝转移. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1226-1227

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1226.asp>

## 0 引言

大肠癌肝转移临床比较常见, 在确诊大肠癌时已有 20-40% 的患者发生肝转移, 原发灶切除后, 异时性肝转移发生率仍高达 50%<sup>[1]</sup>。大肠癌合并肝转移病例预后较差, 如能寻找到大肠癌肝转移的规律, 预防大肠癌的肝转移, 则可明显延长大肠癌患者的生存时间。有报告肝硬化很少发生肝转移癌, 肝硬化时肝纤维化及微血管的变形不利于转移癌细胞的游走和增生<sup>[2]</sup>。也有报告肝硬化较少发生大肠癌肝转移, 但仍然常发生胆道系统癌肝转移<sup>[3]</sup>。研究表明, 肝炎病毒感染的肝脏处于高免疫反应状态。为探讨肝炎病毒感染与大肠癌合并肝转移的关系, 本研究对我院 177 例住院大肠癌患者进行了相关统计分析。

## 1 材料和方法

1.1 材料 我院 1994-01/1995-12 住院进展期大肠癌患者, 共 177 例, 其中男 98 例, 女 79 例, 年龄 16-

81 岁, 平均年龄 55.5 岁。按大肠癌部位分类, 盲升结肠癌 63 例, 横结肠癌 7 例, 降结肠癌 9 例, 乙状结肠癌 36 例, 直肠癌 64 例。按大肠癌病理分类, 腺癌 128 例, 黏液腺癌 17 例, 黏液癌 5 例, 其他 27 例。手术治疗 158 例, 未手术 19 例。

1.2 方法 (1) 将大肠癌病例分为 2 组, 即肝炎病毒感染组和非肝炎病毒感染组。肝炎病毒化验为肝炎八项, 包括: 抗甲型肝炎 IgM 抗体(HAV-IgM)、乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗体(HBsAb)、乙肝 e 抗原(HBeAg)、乙肝 e 抗体(HBeAb)、乙肝核心抗体-IgM(HBcAb-IgM)、抗丙型肝炎 IgG 抗体(HCV)、抗戊型肝炎 IgG 抗体(HEV)。肝炎病毒化验有一项及一项以上阳性者, 列为肝炎病毒感染组, 肝炎病毒化验全部阴性者列为非肝炎病毒感染组。凡未作肝炎化验的大肠癌病例不在统计之内。(2) 对肝炎病毒感染组和非肝炎病毒感染组的大肠癌肝转移发生率进行比较, 大肠癌是否合并肝转移依据术中探查结果以及肝脏 CT 判定。(3) 对肝炎病毒感染组与非肝炎病毒感染组病例的年龄构成、癌肿浸透浆膜者所占比例、腹腔淋巴结转移者所占比例以及癌肿最大径超过 10 cm 者所占比例进行分层分析。

统计学处理 使用 SPSS 统计软件对数据进行统计分析, 计量资料比较用非配对 t 检验, 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  认为组间差异显著。

## 2 结果

2.1 大肠癌合并肝转移情况 177 例大肠癌中合并肝转移 25 例, 肝转移总发生率为 14.1%。肝炎病毒感染组 35 例, 合并肝转移 1 例, 肝转移发生率为 2.86%; 非肝炎病毒感染组 142 例, 合并肝转移 24 例, 肝转移发生率为 16.9%。肝炎病毒感染组与非肝炎病毒感染组的肝转移发生率差异显著 ( $P < 0.05$ )。

2.2 肝炎病毒感染组与非肝炎病毒感染组分层分析结果 两组病例的年龄构成、癌肿浸透浆膜者所占比例、腹腔淋巴结转移者所占比例以及癌肿最大径超过 10 cm 者所占比例均无显著差异 ( $P \geq 0.05$ , 表 1)。

表 1 肝炎病毒感染组与非肝炎病毒感染组分层比较

	肝炎病毒感染组	非肝炎病毒感染组	P 值
年龄(岁, mean $\pm$ SD)	52.9 $\pm$ 14.4	56.2 $\pm$ 12.5	0.18
癌肿浸透浆膜	45.7%	64.1%	0.05
腹腔淋巴结转移	25.7%	30.0%	0.60
癌肿最大径超过 10 cm	14.3%	19.0%	0.52

2.3 不同部位大肠癌肝转移发生率 盲升结肠癌 15.9%, 横结肠癌 14.3%, 降结肠癌 22.2%, 乙状结肠癌 8.33%, 直肠癌 14.1%. 不同部位大肠癌肝转移发生率无显著差异( $P > 0.05$ ).

2.4 大肠癌进展程度与肝转移发生率 癌肿最大径超过 10 cm 者 32 例, 合并肝转移 4 例, 肝转移发生率为 12.5%; 癌肿最大径未超过 10 cm 者 145 例, 合并肝转移 21 例, 肝转移发生率为 14.5%. 癌肿侵透浆膜者 107 例, 合并肝转移 17 例, 肝转移发生率为 15.9%; 癌肿未侵透浆膜者 70 例, 合并肝转移 8 例, 肝转移发生率为 11.4%. 已有腹腔淋巴结转移者 52 例, 合并肝转移 8 例, 肝转移发生率为 15.4%; 没有腹腔淋巴结转移的 125 例, 合并肝转移 17 例, 肝转移发生率为 13.6%. 肿瘤的大小、癌肿是否侵透浆膜以及是否有腹腔淋巴结转移, 大肠癌肝转移发生率均无显著差异( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

细胞生物学研究证明, 癌转移到其他部位需经过如下过程: 首先, 癌细胞需从原发灶游离、浸润到间质, 进入脉管. 然后, 癌细胞在脉管内移动并到达转移器官, 癌细胞与转移器官的脉管内皮细胞或基底膜黏附. 最后, 癌细胞向转移器官脉管外游走并增生, 形成转移灶<sup>[4]</sup>.

大肠癌在我国较为常见, 大肠癌患者发生肝转移后, 其中 70% 因肝转移而死亡<sup>[5]</sup>. 各种肝炎也是我国常见多发病, 感染肝炎病毒的大肠癌患者在临床上也不少见. Utsunomiya et al<sup>[6]</sup>报告感染乙型或丙型肝炎病毒的肝脏很少发生大肠癌转移, 还有报道大肠癌转移至感染乙型肝炎病毒肝脏的概率很小<sup>[7-10]</sup>, 向仲素 et al<sup>[11]</sup>报告乙型肝炎表面抗原阳性胃癌患者较少发生肝转移. 因为各种肝炎病毒感染均可导致肝脏病理改变, 所以我们对所有肝炎病毒感染与大肠癌肝转移的关系进行了临床病例分析, 结果表明, 肝炎病毒感染者(包括肝炎病毒相关抗体阳性者)的大肠癌肝转移发生率明显低于非肝炎病毒感染的大肠癌患者. 产生这种现象的原因尚不清楚, 有待于进一步研究. 可能由于肝炎病毒感染, 增强了肝脏免疫调节作用, 抑制了癌细胞在肝脏向脉管外游走及增生, 从而抑制了癌细胞向肝脏的转移. 有报道肝炎病毒感染时, 免疫应答主要是由细胞毒性淋巴细胞(CD8+)介导的<sup>[12]</sup>, 细胞毒性淋巴细胞(CD8+)可以杀灭无抗原性异样细胞, 如漂浮在肝窦内的大肠癌细

胞<sup>[13]</sup>. 肝炎病毒感染引起的干扰素  $\gamma$  增加, 导致肝脏枯否氏细胞活性增强, 可以增加其对转移癌细胞的杀灭, 从而减少了大肠癌肝转移的发生<sup>[14]</sup>.

另外, 本研究表明, 不同部位大肠癌肝转移发生率无显著差异; 肿瘤的大小、癌肿是否侵透浆膜以及是否有腹腔淋巴结转移, 大肠癌肝转移发生率均无显著差异. 这与周正 et al<sup>[15]</sup>的报告不尽相同.

对肝炎病毒感染的大肠癌患者较少发生肝转移现象的进一步研究, 可能为寻找预防大肠癌肝转移策略提供帮助.

### 4 参考文献

- 1 夏振龙. 大肠癌肝转移的发生率及临床特点. 中国实用外科杂志 1999;19:579
- 2 Utsunomiya T, Matsumata T. Metastatic carcinoma in the cirrhotic liver. *Am J Surg* 1993;166:776
- 3 雷正明, 官德容, 张陪明, 何友钊, 刘宁, 李秋. 肝转移癌 186 例诊治分析. 中国实用外科杂志 1995;15:281-282
- 4 高桥俊雄. 癌转移の機序とその対策. 日外会誌 1995;8:539-546
- 5 郑英键. 结直肠癌肝转移诊治的有关问题. 腹部外科 2000;13:265-266
- 6 Utsunomiya T, Saitsu H, Saku M, Yoshida K, Matsumata T, Shimada M, Sugimachi K. Rare occurrence of colorectal cancer metastasis in livers infected with hepatitis B or C virus. *Am J Surg* 1999;177:279-281
- 7 Song E, Chen J, Ou Q, Su F. Rare occurrence of metastatic colorectal cancers in livers with replicative hepatitis B infection. *Am J Surg* 2001;181:529-533
- 8 薛福龙, 刘建伟, 黄时杰, 李梅, 高洁贤. 乙肝病毒感染与结直肠癌肝转移. 中华胃肠外科杂志 2001;4:55
- 9 刘金林, 肖谷欣, 何韵彬. 乙型肝炎表面抗原、癌胚抗原与结直肠癌肝转移和预后的关系. 实用癌症杂志 2001;16:501-503
- 10 刘金林, 肖谷欣, 何韵彬. HbsAg 与结、直肠癌肝转移的关系. 肝胆胰外科杂志 2001;13:10-11
- 11 向仲素. 乙型肝炎表面抗原与胃癌患者肝转移关系的初步探讨. 中国血流变学杂志 2002;12:321
- 12 Liaw YF, Lee CS, Tsai SL, Liaw BW, Chen TC, Sheen IS, Chu CM. T-cell-mediated autologous hepatocytotoxicity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1995;22:1368-1373
- 13 Ando K, Hiroishi K, Kaneko T, Moriyama T, Muto Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Imawari M. Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF- $\alpha$  pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL. *J Immunol* 1997;158:5283-5291
- 14 Schuurman B, Heuff G, Beelen RHJ, Meyer S. Enhanced human Kupffer cell-mediated cytotoxicity after activation of the effector cells and modulation of the target cells by interferon- $\gamma$ : a mechanistic study at the cellular level. *Cell Immunol* 1995;165:141-147
- 15 周正, 赵恭华, 王岩, 刘霞, 王文跃, 潘瑞芹. 大肠癌肝转移的临床病理学特点及临床意义. 中华外科杂志 1995;33:454-457

# 脂肪肝患者相关危险因素的调查和分析

王光助, 应光荣, 朱旭星, 金晓蓉, 洪小飞, 胡复兴, 金忠海, 李新平, 陈圣洁

王光助, 应光荣, 朱旭星, 金晓蓉, 洪小飞, 胡复兴, 金忠海, 李新平, 陈圣洁, 浙江省义乌市中心医院消化内科 浙江省义乌市 322000  
项目负责人: 王光助, 322000, 浙江省义乌市中心医院消化内科.  
收稿日期: 2003-10-24 接受日期: 2003-12-06

## 摘要

目的: 探讨脂肪肝的相关危险因素.

方法: 调查 400 例就诊脂肪肝患者, 记录性别、年龄、体重、身高、空腹血糖、血脂、HBsAg、饮酒量、腹部 B 超. 以 400 例非脂肪肝患者作为对照组.

结果: 单因素分析肥胖、高脂血症、嗜酒、糖尿病、HBsAg 阳性与脂肪肝发病显著相关, 经 logistic 回归分析, 肥胖、高脂血症、糖尿病、嗜酒 4 个自变量进入回归方程.

结论: 脂肪肝发病的主要相关危险因素依次为肥胖、高脂血症、糖尿病、嗜酒, 为防治脂肪肝提供了依据.

王光助, 应光荣, 朱旭星, 金晓蓉, 洪小飞, 胡复兴, 金忠海, 李新平, 陈圣洁. 脂肪肝患者相关危险因素的调查和分析. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1228-1229  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1228.asp>

## 0 引言

近年来, 随着我国的经济发展, 人民生活水平提高, 饮食结构改变, 脂肪肝的患病率呈现上升趋势, 是危害人群健康的疾病之一, 我院对 1998-12/2001-12 400 例脂肪肝患者的相关危险因素进行了调查, 现报告如下:

## 1 材料和方法

1.1 材料 调查 1998-12/2001-12 本院 20 岁以上就诊患者, 发现脂肪肝患者 400 例, 排除由妊娠、化学药物、小肠改道手术及静脉高营养等所引起的脂肪肝. 男 242 例, 女 158 例, 男女之比为 1.53:1, 年龄 25-82 岁, 平均  $42 \pm 15.3$  岁, 在同期住院患者中随机抽取 400 例非脂肪肝患者作为对照组, 其年龄、性别与脂肪肝组比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性.

### 1.2 方法

1.2.1 临床资料 就诊患者常规实验室检查包括血、尿、粪常规, 肝肾功能, 血糖、血脂、电解质, HBsAg 等检测, B 超检查包括肝、胆、胰、脾、肾等脏器, 记录体重、身高、饮酒等情况.

1.2.2 诊断标准 (1)脂肪肝: B 超检查肝脏不同程度增大, 表面光滑, 边缘钝, 左右叶呈弥漫性, 密集的细小光点, 肝区回声分布不均匀, 前段增强, 远区衰减, 整个肝区透声性差, 似云雾状, 肝内血管回声明显减

少, 肝静脉和门静脉分支回声减弱 (2)肥胖: BMI = 体重(kg)/身高(m<sup>2</sup>), 1997 年 WHO 公布, 大于或等于 30 为肥胖症. (3)嗜酒: 每日摄入乙醇 80 g 以上, 持续 5 a 以上为嗜酒. (4)糖尿病: 采用 1998-07 WHO 咨询委员会临时性报告提出的糖尿病诊断的标准. (5)高脂血症: 血清甘油三酯大于 1.70 mmol/L 或血清胆固醇大于 5.69 mmol/L.

统计学处理 采用 SPSS8.0 软件, 对各因素进行单变量分析和 logistic 多变量回归分析.

## 2 结果

2.1 单因素分析 以是否发生脂肪肝为因变量, 通过对肥胖、高脂血症、嗜酒、糖尿病、HBsAg 阳性 5 个自变量进行单因素分析, 结果肥胖( $\chi^2=47.66$ ,  $P < 0.01$ ), 高脂血症( $\chi^2=46.75$ ,  $P < 0.01$ ), 嗜酒( $\chi^2=10.09$ ,  $P < 0.01$ ), 糖尿病( $\chi^2=9.12$ ,  $P < 0.01$ ), HBsAg 阳性( $\chi^2=4.48$ ,  $P < 0.05$ ), 这 5 项因素与脂肪肝的发生均显著相关.

2.2 多因素分析 将单因素筛选出有显著性差异的 5 个自变量在  $\alpha=0.05$  水平进行 logistic 回归分析, 显示肥胖、高脂血症、嗜酒、糖尿病 4 个自变量进入回归方程, 与脂肪肝发病显著性相关(表 1).

表 1 脂肪肝患者危险因素的 logistic 回归分析

自变量	回归系数	标准误	Wald $\chi^2$ 值	自由度	P 值	相对危险度
肥胖	2.38	0.85	7.86	1	0.01	10.81
高脂血症	2.36	1.03	5.23	1	0.02	10.81
嗜酒	1.38	0.58	5.63	1	0.02	3.52
糖尿病	1.06	0.40	6.76	1	0.01	2.91
Constant	11.86	4.56	6.77	1	0.01	

## 3 讨论

脂肪肝是一种常见病, 我国发病率为 5%, 本文对住院的 34 688 例患者进行回顾分析, 发现脂肪肝患者 400 例, 患病率为 1.15%, 较以往文献报道低, 可能与选择人群有关, 因住院患者受其他疾病影响, 营养往往欠佳, 以脂肪肝为主的住院患者, 仍属少数. 本调查中单因素与多因素分析均发现脂肪肝的主要危险因素为肥胖、高脂血症、糖尿病、嗜酒. 与以往的报道类似<sup>[1-2]</sup>. 其机制主要与体内血脂代谢平衡失调有关. 肥胖者脂肪组织增多, 且脂肪细胞肥大, 细胞膜上胰岛素受体数目、密度、亲和力下降, 对胰岛素相对不敏感<sup>[3]</sup>, 故对脂肪酶的抑制作用减弱, 脂肪酸动员增加, 肝脏合成甘油三酯增高, 超过了肝脏以 VLDL 形式转运到血中的能力而沉积在肝细胞, 发生脂肪肝. 肝脏是酒精代谢降解的惟一



场所, 酒精会妨碍肝内脂肪酸的氧化, 长期或大量饮酒, 致使肝内脂肪酸合成增多, 超过肝脏的处理能力而形成脂肪肝<sup>[4]</sup>. 我们在调查中发现糖尿病合并高脂血症引起脂肪肝的患者较多. 我们认为合并高脂血症引起脂肪肝的主要机制是糖尿病患者周围组织对胰岛素敏感性降低(胰岛素抵抗), 摄取葡萄糖功能亦下降, 以致葡萄糖不能被充分利用, 过剩葡萄糖不断刺激胰岛细胞分泌大量胰岛素, 肝脏在胰岛素的作用下, 以葡萄糖和脂肪酸为原料, 合成大量甘油三酯, 继而发生内源性高脂血症, 故认为该类型危险因素关键在于糖尿病. 国内徐有青 et al<sup>[5-6]</sup>研究发现, 非酒精性脂肪肝常合并血脂、血糖、尿酸升高以及胰岛素抵抗现象, 故我们认为脂肪肝的发病机制中, 胰岛素抵抗占据了重要位置, 肥胖、高脂血症、糖尿病引起的脂肪肝可能是一种独立的代谢性疾病, 高脂血症可能为继发, 是代谢紊乱的表现. 因此, 进行糖耐量及胰岛素的测定来观察肥胖、高脂血症、糖尿病与脂肪肝的关系, 是

有待于进一步研究的课题.

我们在分析中还发现由脂肪肝引起谷丙转氨酶升高者 72 例, 系脂肪性肝炎, 有进一步发展为肝硬化的趋势, 应引起临床重视, 需积极治疗脂肪肝. 上述危险因素的调查和分析也为脂肪肝的治疗提供了方向和依据, 对于脂肪肝的治疗方法及其意义, 我们将在今后做进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 何旭, 韩永玲, 王影. 123 例脂肪肝病因分析. 安徽中医学院学报 2000;19:57-58
- 2 范建高, 曾民德, 李继强, 沈镭, 陈政绩, 罗国豪, 刘天舒. 脂肪肝的危险因素分析. 中华预防医学杂志 1998;32:189
- 3 余永谱, 王坚, 金稚英. 单纯性肥胖症 130 例口服葡萄糖耐量试验结果分析. 新医学 1981;12:64-66
- 4 林艳足, 凌志明, 陈维清, 曾庆民, 罗海倩, 汤济松. 海上石油职工脂肪肝患者情况调查. 广东医学 1998;19:517-518
- 5 徐有青, 陈秀华, 田自然, 刘凤旭. 脂肪肝患者肝功能、血糖和血脂的初步分析. 中华肝脏病杂志 1999;7:176
- 6 陈卫星, 虞朝辉, 厉有名, 蔡卫民. 非酒精性脂肪肝与胰岛素抵抗及糖代谢异常的关系. 中华肝脏病杂志 2000;8:76-77

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

• 临床经验 •

## 原发性小肠恶性肿瘤的 X 线诊断

陈留斌, 熊坤林

陈留斌, 熊坤林, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所影像诊断科 重庆市 400042  
项目负责人: 陈留斌, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所影像诊断科. ywhxl@yahoo.com.cn  
电话: 023-68757357 传真: 023-68813806  
收稿日期: 2003-09-08 接受日期: 2004-02-01

### 摘要

目的: 评价消化道钡餐、钡灌肠、CT、血管造影诊断原发性小肠恶性肿瘤的价值, 提高对小肠恶性肿瘤的认识.

方法: 回顾分析了 50 例经手术病理证实的原发性小肠恶性肿瘤影像资料. 50 例均行消化道钡餐检查, 其中 15 例行钡灌肠检查, 13 例行 CT 平扫, 3 例行肠系膜动脉造影(DSA).

结果: 病变包括腺癌 17 例, 平滑肌肉瘤 11 例, 恶性淋巴瘤 20 例, 小肠间质细胞瘤和回肠恶性纤维组织细胞瘤各 1 例. 消化道钡餐主要 X 线表现为肠腔狭窄, 肠腔内充盈缺损, 管壁僵硬, 黏膜破坏, 环形皱襞消失, 肠梗阻或肠套叠, 肠管扩张及溃疡形成. CT 平扫 7 例确诊为小肠肿瘤, 6 例拟诊为腹腔肿块, 血管造影 2 例拟诊为小肠平滑肌瘤, 1 例拟诊为小肠血管畸形.

结论: 凡临床疑有小肠恶性肿瘤通常首选胃肠造影法, 若

诊断不明或为手术前进一步明确病变的范围宜用 CT 检查, 对不明原因反复发生的消化道出血血管造影具有重要价值.

陈留斌, 熊坤林. 原发性小肠恶性肿瘤的 X 线诊断. 世界华人消化杂志 2004; 12(5):1229-1231

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1229.asp>

### 0 引言

原发性小肠恶性肿瘤很少见, 仅占全身恶性肿瘤的 0.4%, 占所有胃肠道恶性肿瘤的 1-5%. 早期缺乏典型的临床表现, 无较理想的有效检查方法. 因此诊断较困难, 误诊率较高<sup>[1]</sup>, X 线检查是确诊本病的重要方法, 现将我院 1960-05/2003-06 年手术病理及 X 线检查资料完整的 50 例小肠原发性恶性肿瘤报告如下:

### 1 材料和方法

1.1 材料 小肠原发性恶性肿瘤 50 例, 男 35 例, 女 15 例, 年龄 6-75 岁. 病变包括腺癌 17 例, 平滑肌肉瘤 11 例, 恶性淋巴瘤 20 例, 小肠间质细胞瘤和回肠恶性纤维组织细胞瘤各 1 例.

场所, 酒精会妨碍肝内脂肪酸的氧化, 长期或大量饮酒, 致使肝内脂肪酸合成增多, 超过肝脏的处理能力而形成脂肪肝<sup>[4]</sup>. 我们在调查中发现糖尿病合并高脂血症引起脂肪肝的患者较多. 我们认为合并高脂血症引起脂肪肝的主要机制是糖尿病患者周围组织对胰岛素敏感性降低(胰岛素抵抗), 摄取葡萄糖功能亦下降, 以致葡萄糖不能被充分利用, 过剩葡萄糖不断刺激胰岛细胞分泌大量胰岛素, 肝脏在胰岛素的作用下, 以葡萄糖和脂肪酸为原料, 合成大量甘油三酯, 继而发生内源性高脂血症, 故认为该类型危险因素关键在于糖尿病. 国内徐有青 et al<sup>[5-6]</sup>研究发现, 非酒精性脂肪肝常合并血脂、血糖、尿酸升高以及胰岛素抵抗现象, 故我们认为脂肪肝的发病机制中, 胰岛素抵抗占据了重要位置, 肥胖、高脂血症、糖尿病引起的脂肪肝可能是一种独立的代谢性疾病, 高脂血症可能为继发, 是代谢紊乱的表现. 因此, 进行糖耐量及胰岛素的测定来观察肥胖、高脂血症、糖尿病与脂肪肝的关系, 是

有待于进一步研究的课题.

我们在分析中还发现由脂肪肝引起谷丙转氨酶升高者 72 例, 系脂肪性肝炎, 有进一步发展为肝硬化的趋势, 应引起临床重视, 需积极治疗脂肪肝. 上述危险因素的调查和分析也为脂肪肝的治疗提供了方向和依据, 对于脂肪肝的治疗方法及其意义, 我们将在今后做进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 何旭, 韩永玲, 王影. 123 例脂肪肝病因分析. 安徽中医学院学报 2000;19:57-58
- 2 范建高, 曾民德, 李继强, 沈镭, 陈政绩, 罗国豪, 刘天舒. 脂肪肝的危险因素分析. 中华预防医学杂志 1998;32:189
- 3 余永谱, 王坚, 金稚英. 单纯性肥胖症 130 例口服葡萄糖耐量试验结果分析. 新医学 1981;12:64-66
- 4 林艳足, 凌志明, 陈维清, 曾庆民, 罗海倩, 汤济松. 海上石油职工脂肪肝患者情况调查. 广东医学 1998;19:517-518
- 5 徐有青, 陈秀华, 田自然, 刘凤旭. 脂肪肝患者肝功能、血糖和血脂的初步分析. 中华肝脏病杂志 1999;7:176
- 6 陈卫星, 虞朝辉, 厉有名, 蔡卫民. 非酒精性脂肪肝与胰岛素抵抗及糖代谢异常的关系. 中华肝脏病杂志 2000;8:76-77

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

• 临床经验 •

## 原发性小肠恶性肿瘤的 X 线诊断

陈留斌, 熊坤林

陈留斌, 熊坤林, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所影像诊断科 重庆市 400042  
项目负责人: 陈留斌, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所影像诊断科. ywhxl@yahoo.com.cn  
电话: 023-68757357 传真: 023-68813806  
收稿日期: 2003-09-08 接受日期: 2004-02-01

### 摘要

目的: 评价消化道钡餐、钡灌肠、CT、血管造影诊断原发性小肠恶性肿瘤的价值, 提高对小肠恶性肿瘤的认识.

方法: 回顾分析了 50 例经手术病理证实的原发性小肠恶性肿瘤影像资料. 50 例均行消化道钡餐检查, 其中 15 例行钡灌肠检查, 13 例行 CT 平扫, 3 例行肠系膜动脉造影(DSA).

结果: 病变包括腺癌 17 例, 平滑肌肉瘤 11 例, 恶性淋巴瘤 20 例, 小肠间质细胞瘤和回肠恶性纤维组织细胞瘤各 1 例. 消化道钡餐主要 X 线表现为肠腔狭窄, 肠腔内充盈缺损, 管壁僵硬, 黏膜破坏, 环形皱襞消失, 肠梗阻或肠套叠, 肠管扩张及溃疡形成. CT 平扫 7 例确诊为小肠肿瘤, 6 例拟诊为腹腔肿块, 血管造影 2 例拟诊为小肠平滑肌肿瘤, 1 例拟诊为小肠血管畸形.

结论: 凡临床疑有小肠恶性肿瘤通常首选胃肠造影法, 若

诊断不明或为手术前进一步明确病变的范围宜用 CT 检查, 对不明原因反复发生的消化道出血血管造影具有重要价值.

陈留斌, 熊坤林. 原发性小肠恶性肿瘤的 X 线诊断. 世界华人消化杂志 2004; 12(5):1229-1231

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1229.asp>

### 0 引言

原发性小肠恶性肿瘤很少见, 仅占全身恶性肿瘤的 0.4%, 占所有胃肠道恶性肿瘤的 1-5%. 早期缺乏典型的临床表现, 无较理想的有效检查方法. 因此诊断较困难, 误诊率较高<sup>[1]</sup>, X 线检查是确诊本病的重要方法, 现将我院 1960-05/2003-06 年手术病理及 X 线检查资料完整的 50 例小肠原发性恶性肿瘤报告如下:

### 1 材料和方法

1.1 材料 小肠原发性恶性肿瘤 50 例, 男 35 例, 女 15 例, 年龄 6-75 岁. 病变包括腺癌 17 例, 平滑肌肉瘤 11 例, 恶性淋巴瘤 20 例, 小肠间质细胞瘤和回肠恶性纤维组织细胞瘤各 1 例.

1.2 方法 采用岛津VS-10-800mA胃肠专用机和VS-20D数字多功能X线机。(1)腹部透视及立卧位平片检查。站立位腹部透视,钡餐检查前50例均做了此项检查,以了解肠内积液和积气情况。术前对20例有肠梗阻的患者摄有立卧位腹部平片。(2)消化道钡餐。其中上消化道钡餐11例,全消化道钡餐39例,其中8例加钡灌肠检查。(3)CT扫描:采用Siemens Somatom ARC型和螺旋型全身CT扫描机,层厚和层距为10 mm,扫描前30 min口服造影剂充盈胃肠道。13例患者做了CT扫描,其中3例进行了增强扫描。(4)3例患者采用了GE1250 mA机器做了肠系膜动脉数字减影血管造影(DSA)。

## 2 结果

2.1 腺癌 17例,发生于十二指肠7例,空回肠各5例。消化道钡餐检查其主要X线表现为肠管变细,呈环状狭窄、僵直,伴黏膜纹中断和蠕动波消失(图1)。病变局限在5 cm以内者9例,5-10 cm者6例,超过10 cm者2例。单发16例,多发1例。CT表现为:(1)局部软组织肿块6例,大小2.2-8.5 cm,平均4.5 cm,类圆形或分叶状,2例边界尚清,3例肿块密度均匀,CT值20-47 Hu,3例肿块内有斑片状低密度坏死区。(2)肠壁呈环形或不规则增厚6例,肠壁厚度1.1-2.1 cm,局部含造影剂或气体的肠腔狭窄、变形(图2)。(3)位于十二指肠的腺癌中2例与胰头分界不清,并见肝内外胆管扩张,其中1例伴胰管扩张而呈“双管征”。(4)2例肿块直接向周围血管浸润,3例有腹膜后淋巴结转移,2例见肝脏转移灶。

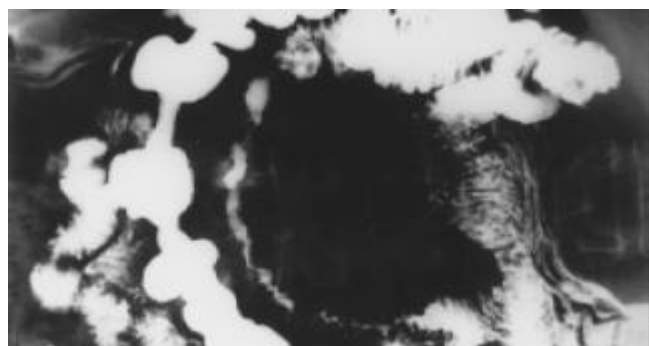


图1 空肠腺癌X线表现。空肠上段局限性肠管呈向心性环状狭窄,黏膜破坏,环状皱襞消失,钡剂尚可通过狭窄段,病变肠管长约15 cm。

2.2 平滑肌肉瘤 11例,空肠、回肠各5例,空肠、回肠同时多发1例。消化钡餐检查正面观号圆形或椭圆形充盈缺损,切面观呈偏心性半月切迹,肿瘤所在区域黏膜纹变平。本组中2例平滑肌肉瘤做了CT扫描,其特征为:病灶大小5.0 cm × 6.5 cm和13.0 cm × 12.5 cm,向腔外或偏心性生长,呈类圆形或不规则分叶状,CT值18-52 Hu,肿块边界清楚,其内密度均匀,未见腹膜后淋巴结及肝脏转移。

本组中3例以消化道出血入院,行全消化道钡餐均无异常发现而行肠系膜动脉造影检查,1例造影发现

1、2组小肠的供血动脉末端明显增多,呈云雾状,考虑肠系膜上动脉血管畸形。手术证实有5个肿块,空肠3个,回肠2个,大小为2 cm × 2 cm-4 cm × 4 cm。病理诊断为空回肠多发性上皮样平滑肌肉瘤。另2例造影发现回肠远段异常血管网,外侧有压迹(图3),考虑回肠血管瘤,病理诊断回肠平滑肌肉瘤。

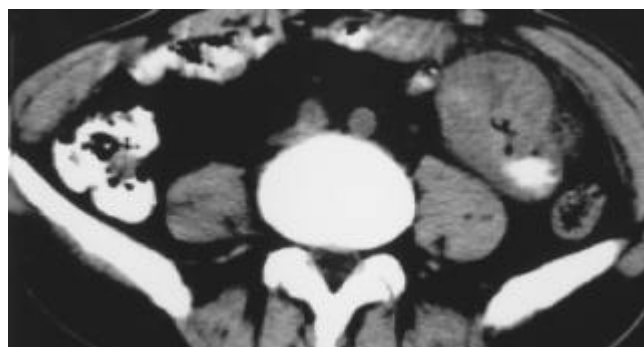


图2 空肠腺癌CT表现。左中腹一段肠曲明显增粗,管壁不规则增厚,肠腔狭窄,偏心。

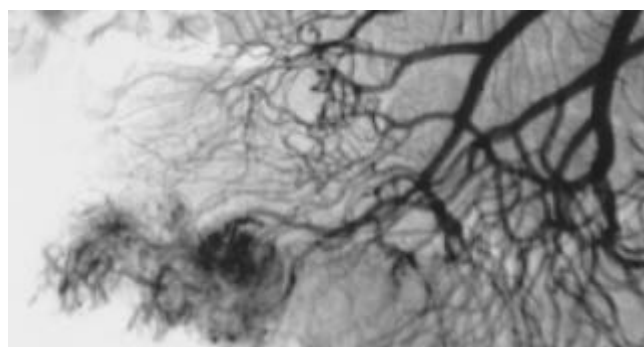


图3 回肠平滑肌肉瘤。肠系膜上动脉DSA显示回肠远段异常血管网,外侧有压迹。



图4 回肠末端何杰金氏病。回肠末端长约6 cm × 8 cm肠壁变硬,蠕动消失,边缘不规则,黏膜纹消失,管腔变窄,并一扁平龛影,大小4.5 cm × 1.5 cm。

2.3 淋巴瘤 20例,其中非何杰金氏淋巴瘤16例,何杰金氏病4例。发生在回肠16例,十二指肠和空肠各1例,同时侵犯空回肠的2例。消化道钡餐检查肠管扩张7例,病变肠管扩张达5-7 cm,被累及肠管的长度5-15 cm。肿块内龛影4例,此型肿瘤生长迅速,并形成巨大肿块,同时向肠腔内外突出,肿瘤不仅破坏肠壁,并可侵入肠系膜,附近肠曲常受压推移。扁平龛影,直

径1.5-5 cm, 边缘隆起, 底部凹凸不平, 周围指压迹明显(图4). 肠管狭窄5例, X线表现为肠管变细, 或呈环形狭窄, 边缘光滑或不规则僵直, 黏膜皱襞破坏和蠕动波消失, 受累肠管10-20 cm. 肠腔内充盈缺损4例, X线表现为向腔内突出的充盈缺损, 大小多在3-5 cm, 单发3例, 多发1例, 1例有蒂, 3例无蒂, 肠腔内出现圆形或不规则充盈缺损, 肿块表现凹凸不平, 可呈菜花样或分叶状改变. 本组中并发肠套叠3例. 3例行CT扫描, CT表现为软组织肿块, 病灶大小4.0-6.5 cm, 呈类圆形, 边界尚清, 密度均匀, CT值20-35 Hu, 增强后呈轻度强化. 肠壁不规则增厚, 2例伴腹膜后多发淋巴结肿大及肝脏转移灶.

### 3 讨论

原发性小肠恶性肿瘤很少见, 仅占全身恶性肿瘤的0.4%, 占所有胃肠道恶性肿瘤的1-5%<sup>[1]</sup>, 较常见的为腺癌、平滑肌肉瘤和恶性淋巴瘤. 原发性小肠恶性肿瘤的临床表现复杂多变, 术前诊断较困难, 误诊率一般为70-90%<sup>[2]</sup>, 目前主要的检查方法包括消化道钡餐、小肠双对比造影和内窥镜检查, 对近端小肠肿瘤有较大帮助, 对远端小肠肿瘤的检出率则较低, 而且他们主要观察黏膜病变, 对向腔外生长的平滑肌肉瘤不易发现. 与上述传统检查方法相比较, CT扫描能清楚显示病变的大小、形态, 向腔内、外侵犯的范围, 肿瘤与周围结构的关系和有无局部及远处转移等, 为临床治疗提供帮助.

腺癌主要发生在十二指肠和空肠近端(12/17). 消化道钡餐主要表现为肠管狭窄, 局限性或较广泛. CT扫描, 腺癌主要表现为局部软组织肿块, 伴相邻肠壁不规则或环形增厚, 肠管狭窄, 增强后肿块呈轻至中度强化, 可伴有淋巴结和肝脏转移, 少数腺癌可单纯表现为局限性肠壁增厚. 与小肠原发性腺癌相比较, 平滑肌肉瘤倾向于向腔外生长, 呈偏心肿块, 其内密度不均, 常有坏死, 肿瘤可直接侵犯周围结构, 较少发生淋巴结和肝脏转移. 本组中3例行肠系膜上动脉DSA检查, 1例诊断为血管瘤, 1例考虑为血管畸形, 另1例诊断为平滑肌肉瘤, 据文献[3]报道, 小肠平滑肌肉瘤血管增多、增粗、紊乱, 吻合丰富, 瘤体染色, 似“蜘蛛网”

状. 小肠平滑肌肉瘤中以造影剂池明显. 小肠腺癌血管变化多样, 但常见癌周血管明显增多、紊乱、瘤体血管较少. 小肠平滑肌肿瘤属多血管肿瘤, 血管造影有重要价值. 小肠腺癌变化较大, 血管造影难以确诊. 本组3例血管造影均为平滑肌肉瘤, 血管造影表现与文献报道相似.

小肠恶性肿瘤与肠梗阻, 文献报道小肠恶性肿瘤易并发肠梗阻<sup>[1]</sup>, 本组有8例X线检查有明确肠梗阻征象, 其中小肠腺癌2例, 平滑肌肉瘤和恶性淋巴瘤各3例. 小肠腺癌引起的肠梗阻主要因肠管狭窄、闭塞所致, 小肠平滑肌肉瘤和恶性淋巴瘤主要为肿瘤突入肠腔, 肠壁浸润较轻, 由于肠腔的部分梗阻, 促进肠蠕动增加, 肿瘤被推挤向前, 形成假蒂而发生肠套叠, 一旦发生肠套叠后, 肿瘤的真面目被掩盖, 导致诊断上的困难, 因此, 对不明原因发生的肠梗阻, 尤其是成人慢性肠套叠, 首先考虑小肠恶性肿瘤的可能.

郑祥武<sup>et al</sup><sup>[4]</sup>比较58例常规胃肠造影均可见肠道肿块患者的CT检查结果, 发现17例CT对诊断有帮助, 21例CT对病变范围作出更精确的估计, 包括发现肝转移、淋巴结转移、邻近结构受侵犯; 另20例CT与胃肠造影所见相似. 58例中, CT使19例患者改变了原定不合理的治疗方案. 尽管如此, 目前认为CT与常规胃肠造影尤其是双对比造影对原发性小肠恶性肿瘤检出的敏感性无显著差异, 均在70%以上. 常规胃肠造影对肠黏膜病变观察效果理想, 而且可动态连续性观察, 而CT则过多地依赖于肠内造影剂的良好充盈. 否则易漏诊或无法诊断. 因此, CT与常规胃肠造影应作为原发性小肠恶性肿瘤互补的影像学诊断工具, 凡临床疑有小肠恶性肿瘤通常首选胃肠造影法, 若其诊断不明或为进一步明确病变的范围则宜选用CT检查.

### 4 参考文献

- 1 郑芝田. 胃肠病学. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 2000:637-640
- 2 鲁重美, 王仲会. 小肠肿瘤. 现代胃肠病学. 第1版. 北京:科学出版社出版, 1994:1211-1220
- 3 鲁宏, 丁仕义. 小肠平滑肌肿瘤及小肠腺癌的血管观察(血管造影与血管铸型对比研究). 中国医学影像技术 2000;16:375-377
- 4 郑祥武, 吴恩福, 李铁一. 原发性小肠肿瘤的CT诊断. 国外医学临床放射学分册 1992;15:79-82

# 胃黏膜活检常规 HE 染色对幽门螺杆菌感染的诊断价值

徐世平, 李元, 吴本俨, 王殿军

徐世平, 李元, 吴本俨, 北京 301 医院南楼消化科 北京市 100853  
王殿军, 北京 301 医院病理科 北京市 100853  
项目负责人: 徐世平, 100853, 北京市复兴路 28 号, 301 医院南楼消化科.  
xusp@haoyisheng.com.cn  
电话: 010-6937512  
收稿日期: 2003-12-23 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

目的: 探讨胃黏膜活检常规染色(HE染色)对幽门螺杆菌(Hp)感染的诊断价值.

方法: 收集门诊行胃镜检查同时行<sup>13</sup>C尿素呼吸试验(UBT)的患者共262例, 胃镜检查同时取胃窦组织分别行PCR检测和HE染色进行Hp感染的诊断, 并以UBT和PCR的结果为标准评估HE染色对Hp感染的诊断价值.

结果: <sup>13</sup>C-UBT 和 PCR 检查结果均为阳性者 150 例, 均为阴性者 106 例, 其中常规 HE 染色发现 Hp 阳性 115 人, 阴性 141 人. HE 染色对 Hp 感染诊断的敏感性为 72.0% (108/150), 特异性为 93.4%(99/106), 阳性预测值(PPV)为 93.9% (108/115), 阴性预测值(NPV)为 70.2%(99/141), 诊断的准确性为 80.9%(207/256).

结论: 在行常规病理诊断的同时行Hp感染的诊断, 是一种值得推广的方法. 但由于此方法敏感性稍低, 因此对一些与Hp密切相关的上消化道疾病如果HE染色不能发现Hp感染, 则还需进一步行其他检查.

徐世平, 李元, 吴本俨, 王殿军. 胃黏膜活检常规 HE 染色对幽门螺杆菌感染的诊断价值. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1232-1233  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1232.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)与消化道疾病关系密切, 因此对 Hp 感染的诊断日益重要, 常用的诊断方法有快速尿素酶试验、组织学检查(特殊染色)、细菌分离培养、<sup>13</sup>C 或 <sup>14</sup>C 尿素呼吸试验(UBT)、血清学试验、PCR、粪便抗原检测等, 但不论用何种方法都需要多取胃黏膜组织或费用较高, 因此在进行常规胃黏膜组织病理检查(HE 染色)的同时直接进行 Hp 感染的诊断, 有较高的实用价值. 本研究以 <sup>13</sup>C 尿素呼吸试验和 PCR 检查结果作为标准对照, 探讨胃黏膜活检常规 HE 染色对 Hp 感染的诊断价值.

## 1 材料和方法

1.1 材料 所有患者均系我院门诊 1999-03/2001-09 因

上腹不适而行胃镜检查者, 共 262 例, 其中男 137 例, 女 125 例, 年龄 16-82 岁, 平均年龄 46.3 岁. 全部患者均行 <sup>13</sup>C-UBT, 并在胃镜检查时取胃窦黏膜组织 2-3 块. 所有患者在试验前 1 mo 内未服用抗生素, 2 wk 内未服用铋剂、H<sub>2</sub>受体拮抗剂和质子泵抑制剂.

## 1.2 方法

1.2.1 <sup>13</sup>C-UBT 受检者隔夜空腹, 将 75 mg <sup>13</sup>C-尿素溶于 100 mL 0.1 mol/L 的枸橼酸溶液. 饮用试剂前、后 30 min 留取呼气样本, 气体吹入 10 mL 玻璃管内, 呼气样本经核素比值质谱仪分析, <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> 丰度(δ‰)以所测得标本的 <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub> 值与国际标准 PDB(Pee Dee Belemnite)比较得出. 用 30 min 的 δ 值减去空腹的 δ 值即得出其差值(DOB). DOB 大于或等于 4‰ 为 Hp 阳性判定值.

1.2.2 PCR 检测 将胃黏膜活检组织用 1 mL 匀浆器研成匀浆, 经蛋白酶 K 消化过夜后, 煮沸灭活蛋白酶 K, 快速冷却, 取上清液扩增, 分别以标准模板和无菌去离子水作阳性和阴性对照. 取全部扩增水相进行凝胶电泳, 在与标准模板同一水平出现电泳带为阳性, 否则为阴性.

1.2.3 HE 染色对 Hp 感染的诊断 对胃窦黏膜活检组织甲醛固定后常规石蜡包埋, 连续切片 5 张, HE 染色, 由一名有经验的病理科医师在不知道 UBT 和 PCR 结果的情况下, 观察胃黏膜的黏液层、表面上皮、小凹上皮和腺管上皮, 根据能否看见 Hp 诊断有无 Hp 感染.

1.3 结果判断 以 <sup>13</sup>C-UBT 和 PCR 检测结果均为阳性作为 Hp 阳性, 二者均为阴性作为 Hp 阴性, 二者结果不一致者予以剔除, 以此结果为标准按经典方法计算 HE 染色诊断 Hp 感染的敏感性、特异性、阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV)、阳性似然比(+LR)、阴性似然比(-LR)、诊断的准确性和正确诊断指数(γ), 并进行 Kappa 分析.

## 2 结果

<sup>13</sup>C-UBT 检查和 PCR 检查结果均为阳性者 150 例, 均为阴性者 106 例, 另有 6 例结果不一致, 予以剔除. 256 例患者中, 常规 HE 染色发现 Hp 阳性 115 例, 阴性 141 例(表 1), HE 染色对 Hp 感染诊断的敏感性为 72.0% (108/150), 特异性为 93.4%(99/106), PPV 为 93.9% (108/115), NPV 为 70.2%(99/141), +LR 为 10.9, -LR 为 0.3, 诊断的准确性为 80.9%(207/256), γ=0.654. 所得结果进行 Kappa 分析, K 值为 0.624, 说明诊断的一致性良好.

表1 HE染色法检测Hp的结果

HE	实际		合计
	+	-	
+	108	7	115
-	42	99	141
合计	150	106	256

### 3 讨论

目前Hp感染诊断的方法无论是侵入性还是非侵入性,各有其优缺点<sup>[1-6]</sup>。细菌培养是诊断Hp感染的“金标准”,其特异性为100%,但其敏感性受到实验室条件、标本运送时间和条件、标本采集的部位和数量等条件的限制,只能达到70-92%,而且该方法所需时间长、价格昂贵,临床实用性不大<sup>[7]</sup>。UBT检测是目前公认抗Hp治疗后诊断的“金标准”,不受胃内Hp分布不均匀的影响,其特异性和敏感性均能达到90-100%,但该方法需要有专用设备,检测前2-4 wk内口服抗生素、铋剂或质子泵抑制剂可能导致假阴性结果,胃内出现其他尿素酶阳性细菌生长时可能导致假阳性结果<sup>[8-9]</sup>。PCR是目前诊断Hp感染敏感性和特异性(均能达到96-100%)均较高的方法,但由于操作复杂、费用贵,多用于科研<sup>[10]</sup>。临床上常用的方法为快速尿素酶实验(RUT)和病理形态学检查,RUT的敏感性为89-98%,特异性为93-98%;形态学检查的敏感性和特异性也能达到93-98%,目前常用的形态学检查方法有Warthin-Starry银染、Giemsa染色、改良甲苯胺蓝染色等<sup>[11-12]</sup>,HE染色对Hp感染的诊断价值各家报道不一致,李惠珍 et al<sup>[13]</sup>报道胃组织常规HE染色诊断准确率为95%、敏感性为96%,李子俊 et al<sup>[14]</sup>用组织涂片HE染色Hp检出率为63.85%,国外Fallone et al<sup>[15]</sup>报道HE染色诊断Hp感染的准确率为92%,敏感性为93%。为了准确评价HE染色对Hp感染的诊断价值,我们选用诊断敏感性和特异性均较高的PCR和UBT方法进行评估,结果表明,HE染色对Hp感染诊断的敏感性为72.0%,特异性为93.4%,PPV为93.9%,NPV为70.2%,诊断的准确性为80.9%,+LR为10.9,-LR为0.3,诊断的准确性为80.9%, $\gamma=0.654$ ,说明HE染色是一种良好的诊断Hp感染的方法。HE染色由于不增加患者的负担亦不需另取胃黏膜组织,在进行常规病理诊断的同时即可进行Hp感染的诊断,既评价感染,又评估组织学状况,因此是一种值得推广的诊断方法<sup>[16]</sup>,但由于取材的局限性、病理医师的诊断经验、胃内其他螺杆菌的影响等问题,可能造成一定的假阴性和假阳性,为了提高诊断的准确性,可根据情况适当增加活检的数量<sup>[17]</sup>,另外在其他染色方法中有作者<sup>[18]</sup>发现延长染色时间可提高诊断的阳性率,HE染色时间对Hp

的诊断有无影响尚有待进一步观察,同时由于Hp只定植于正常胃黏膜,如果活检组织有肠化生和/或不典型增生,势必对Hp诊断有一定影响,因此对一些与Hp密切相关的上消化道疾病如果常规病理检查不能发现Hp感染,则还需进一步行其他检查<sup>[19]</sup>。

### 4 参考文献

- 1 孙莉, 蒋义斌. 幽门螺杆菌感染4种检测方法的比较及评价. 中华消化杂志 2003;23:48
- 2 陆新良, 钱可大. 幽门螺杆菌感染检测方法的评价. 浙江医学 1999;21:573-575
- 3 陆翠华, 葛政举, 孟宪镛, 倪润洲, 姚登福, 施公胜, 肖明兵. 尿素酶比活性定量分析对Hp感染的诊断价值. 南通医学院学报 2001;21:113-115
- 4 Goel N, Sherwal BL, Patwari AK, Bajaj P, Choudhury M. Evaluation of invasive and non-invasive diagnostic modalities for *Helicobacter pylori* infection in children. *Indian Pediatr* 2003;40:141-146
- 5 De Korwin JD. Advantages and limitations of diagnostic methods for *H pylori* infection. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27 (3 Pt 2):380-390
- 6 Nunthapisud P, Lertpocasombat K, Hanvivatvong O, Tatiyakavee K, Thong-Ngam D, Kullavanijaya P, Gonlachanvit S, Treeprasertsuk S, Suwanagool P. Evaluation of inhouse rapid urease test for detection of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. *J Med Assoc Thai* 2002;85(Suppl 1): S355-359
- 7 Perez-Perez GI. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Culture, including transport. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29:879-884
- 8 段丽平, 段晓文, 叶嗣懋, 王晶桐, 金珠, 王志刚. <sup>13</sup>C-尿素呼气试验对幽门螺杆菌密度及胃黏膜炎症的判断价值. 中华内科杂志 1999;38:824-826
- 9 徐克强, 王继德, 陈阳述, 姜泊, 孙勇, 张亚历, 张万岱, 周殿元. 超微量<sup>14</sup>C-尿素呼气试验诊断幽门螺杆菌感染. 华人消化杂志 1998;6:894-896
- 10 Casazza S, Tunesi G, Marinaro E, Caruso F, Canepa M, Michetti P, Rovida S. Detection of *Helicobacter pylori* in 201 stomach biopsies using the polymerase chain reaction, histological staining (H and E/Giemsa) and immunohistochemistry. *Pathologica* 1997;89:405-411
- 11 Rotimi O, Cairns A, Gray S, Moayyedi P, Dixon MF. Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. *J Clin Pathol* 2000;53:756-759
- 12 Iwaki H, Sugiyama T, Asaka M. A modified McMullen's staining for *Helicobacter pylori*: a high-contrast, visibly prominent method. *Helicobacter* 1998;3:45-48
- 13 李惠珍, 袁福业, 侯晓华. 胃组织HE染色诊断幽门螺杆菌感染. 临床消化病杂志 1999;11:19-20
- 14 李子俊, 邹伟民, 蒋涛. 唾液抗幽门螺杆菌IgG检测诊断幽门螺杆菌感染的评价. 临床内科杂志 1999;16:88-89
- 15 Fallone CA, Loo VG, Lough J, Barkun AN. Hematoxylin and eosin staining of gastric tissue for the detection of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 1997;2:32-35
- 16 Ota H, Hosoda K, Kobayashi M, Genta RM. Histological diagnosis of *Helicobacter pylori* using biopsy specimens. *Nippon-Rinsho* 2003;61:61-65
- 17 Gur G, Boyacioglu S, Demirhan B, Gursoy M, Karaagaoglu E, Gungen Y, Telatar H. The importance of increasing the number of gastric biopsies in the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Hepatogastroenterology* 1998;45:2219-2223
- 18 Tazawa K, Tsutsumi Y. Effect of prolonged staining with hematoxylin on detecting *Helicobacter pylori* in hematoxylin-eosin-stained gastric mucosa. *Pathol Int* 1998;48:448-452
- 19 el-Zimaity HM. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori* with biopsy. *Gastroenterol Clin North Am* 2000;29:863-869



# 胆系感染病原菌及耐药性分析

万建华, 赵金满

万建华, 中国医科大学第一临床学院感染科 辽宁省沈阳市 110001  
赵金满, 中国医科大学第一临床学院消化科 辽宁省沈阳市 110001  
项目负责人: 万建华, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学第一临床学院感染科. jinmanzhao@hotmail.com  
电话: 024-23256666-6213 传真: 024-23263946  
收稿日期: 2003-11-26 接受日期: 2003-12-22

## 摘要

目的: 探讨胆系感染致病菌及其耐药性。

方法: 对160例胆汁细菌培养阳性者进行细菌鉴定和药物敏感性试验, 其判定依据美国国家临床实验室标准委员会(NCCLS) 1999年制定的标准, 统计学分析采用WHONEF-5软件。

结果: 160例胆系感染病原菌主要为G<sup>-</sup>杆菌83%, 其中大肠杆菌(31%)、肺炎克雷伯菌(21%), G<sup>+</sup>球菌以肠球菌为主(15%)。G<sup>-</sup>杆菌对亚胺培南, G<sup>+</sup>球菌对万古霉素100%敏感。G<sup>-</sup>杆菌和G<sup>+</sup>球菌对头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶敏感率高。

结论: 胆系感染主要病原菌为大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、肠球菌, 首选抗生素为: 亚胺培南、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶。

万建华, 赵金满. 胆系感染病原菌及耐药性分析. 世界华人消化杂志 2004; 12(5):1234-1235

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1234.asp>

## 0 引言

胆系感染是临床常见病, 有效控制感染十分重要, 了解胆系感染的致病菌以及耐药性, 为选择抗生素提供依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2003-01我院内科门诊及病房送检的胆汁培养标本, 男63例, 女97例。18-76岁, 平均51岁。细菌培养仪为美国BD公司的BACTEC9120, 细菌培养基采用Oxoid公司的Mueller-Hinton培养基。药敏纸片中的万古霉素、亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦、头孢噻肟、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶购于美国Oxoid公司; 其余药敏纸片均为中国药品生物制品检定所产品。

1.2 方法 细菌鉴定应用法国生物梅里埃API系统, 药敏纸片采用K-B纸片扩散法, 结果判定标准采用1999年版的NCCLS标准, 同时每周采用标准菌株ATCC25922、TCC27853、ATCC25923进行药敏试验的质量控制。

## 2 结果

致病菌分布及抗生素耐药性 160例胆汁细菌培养阳性者, G<sup>-</sup>杆菌132株(83%), G<sup>+</sup>球菌28株(17%), 本组未做厌氧菌培养, 未统计真菌。160例胆系感染致病菌分布及药敏情况(见表1)。

表1 胆系感染致病菌对21种抗生素的耐药情况

抗生素	大肠杆菌 n=49	肺炎克雷伯菌 n=33	肠杆菌属 n=17	假单胞菌属 n=13	沙门菌属 n=11	肠球菌属 n=17	其他 n=12
亚胺培南	0	0	0	1	0	2	0
头孢哌酮/舒巴坦	2	0	1	1	0	3	0
哌拉西林/他唑巴坦	2	0	1	1	0	3	0
头孢吡肟	2	0	1	1	0	3	0
头孢他啶	2	1	1	2	0	4	1
头孢曲松	3	2	2	4	1	4	2
头孢噻肟	3	2	2	4	1	4	2
头孢呋肟	3	2	3	5	2	5	2
丁胺卡那	2	1	2	2	1	-	1
氨基糖苷	3	2	3	5	2	-	3
奥格门丁	4	3	3	5	2	5	3
环丙沙星	9	5	4	5	3	12	5
庆大霉素	11	6	4	4	3	15	6
四环素	41	23	13	8	7	7	9
氨苄西林	40	24	13	9	8	12	9
苯唑西林	-	-	-	-	-	14	-
红霉素	-	-	-	-	-	12	-
万古霉素	-	-	-	-	-	0	-
氯霉素	39	21	11	9	8	4	8
茶啶酸	37	20	12	7	7	-	9
复方新诺明	40	23	13	9	8	-	9

### 3 讨论

胆系感染是常见感染性疾病<sup>[1]</sup>。胆道细菌都直接或间接来源于肠道,本组资料大肠杆菌占第一位(31%),肺炎克雷伯菌占第二位(21%),二者共占52%。但与以往文献[2]报告的胆系感染70%以上致病菌为大肠杆菌及肺炎克雷伯菌相比已明显改变。但与近期祝建军 et al<sup>[3]</sup>报告的:胆系感染病原菌大肠杆菌占27.4%,肺炎克雷伯菌16.2%相近;与何晓峰 et al<sup>[4]</sup>报告的:胆系感染需氧菌中大肠杆菌占32.9%,肺炎克雷伯菌占19.2%亦相近。近几年由于抗生素的广泛应用,不合理使用抗生素较为普遍,引发了肠道菌群的变化,同时胆系感染致病菌谱也发生了明显的变化。这一变化也表现在居第三位的肠球菌引起的胆系感染方面,以往认为肠球菌是肠道的正常菌种,不致病,由于抗生素的广泛应用,不易被杀灭的肠球菌被选择出来而成为致病菌,肠球菌所致胆系感染就是这样,有文献报告:G<sup>+</sup>细菌所致胆系感染中,肠球菌为主要病原菌<sup>[5-7]</sup>。

G<sup>-</sup>杆菌对亚胺培南敏感率接近100%,对头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、丁胺卡那总的敏感率在90%以上。G<sup>+</sup>球菌对万古霉素的敏感率为100%,对亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟的敏感率在80%以上,提示对于胆系感染临床可以首选这些抗生素。对G<sup>-</sup>杆菌及G<sup>+</sup>球菌耐药率较高的抗生素,氨基西林、苯唑西林、红霉素、环丙沙星、庆大霉素应避免使用。这一结果与焦宛 et al<sup>[6]</sup>报道胆系感染致病菌药敏实验结果

差别较大,但与何晓峰 et al<sup>[4]</sup>报告的胆汁细菌耐药性结果相近。这是由于不同地区、不同时期结果不同的原因。因此,临床医生应重视本地区、本医院致病菌及其耐药性的流行现状。

本组未做厌氧菌培养,根据国外报道胆系感染中厌氧菌是主要致病菌之一。厌氧菌可以单独引起胆系感染,更多的是混合感染。文献[8]报告胆系感染时厌氧菌培养阳性率在50%以上,反复感染病例中厌氧菌感染比例高达82%。最常见的厌氧菌是脆弱类杆菌,脆弱类杆菌对亚胺培南的敏感率为100%<sup>[8-9]</sup>,故亚胺培南对厌氧菌引起的胆系感染一样有效。提示对于重症、难治的胆系感染应选择亚胺培南治疗。

### 4 参考文献

- 1 杨春明.胆道感染.裘法祖.外科学.第4版.北京:人民卫生出版社,1997:558-561
- 2 黎沾良,顾万清.胆石症患者术中胆汁细菌培养225例分析.中华外科杂志 1985;23:229
- 3 祝建军,汤雅琴,宋秀兰,王宇军.胆道感染病原微生物学的研究与耐药性分析.中华外科杂志 2000;38:369-371
- 4 何晓峰,曹晋桂,焦力群,冯晓玲,吴锦.胆汁细菌学检验及其对抗生素的耐药性分析.空军总医院学报 2002;18:211-213
- 5 叶英,余鑫之,徐元宏,耿小平.胆道感染的致病菌变迁和耐药趋势.中国抗感染化疗杂志 2002;2:136-139
- 6 焦宛,刘厚玉,王炳生,胡必杰,王文娟.胆汁中需氧菌群的调查及药敏测试.中国实用外科杂志 1997;17:428
- 7 张晋湘,谢凤梅.胆道疾病的胆汁细菌培养及药敏试验结果分析.湖南医科大学学报 1998;23:508-509
- 8 黎沾良.厌氧菌与重症胆管炎.何三光.中国外科专家经验文集.第1版.沈阳:沈阳出版社,1993:265-266
- 9 郑德联.厌氧菌感染的治疗方法.何三光.中国外科专家经验文集.第1版.沈阳:沈阳出版社,1993:267-269

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

• 临床经验 •

## ELISA法与Hp SA免疫快检卡检测幽门螺杆菌粪便抗原的比较

王雷,李宜辉,张鹏彬,柏健鹰,达四平,郭红,樊超强,赵晓晏

王雷,李宜辉,张鹏彬,柏健鹰,达四平,郭红,樊超强,赵晓晏,中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化内科 重庆市 400037  
项目负责人:赵晓晏,400037,重庆市,中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化内科. zhaoxiaoyan@mail.tmmu.com.cn  
电话:023-68774604  
收稿日期:2003-11-13 接受日期:2003-12-16

### 摘要

目的:比较ELISA法(enzyme immunoassay)与Hp SA免疫快检卡(immuno Card STAT Hp SA)检测幽门螺杆菌粪便抗原(Hp SA)的准确性和可靠性。

方法:以<sup>14</sup>C呼吸试验和快速尿素酶(rapid urease test, RUT)阳性为“金标准”,ELISA法和HpSA免疫快检卡

检测HpSA阳性率和阴性率分别与“金标准”进行比较。

结果:与“金标准”相比,ELISA法敏感性为83.3%(5/6),特异性为88.3%(30/34);Hp SA免疫快检卡的敏感性为92.3%(12/13),特异性为92.6%(25/27)。

结论:无论是Hp SA免疫快检卡还是ELISA法检测Hp SA,都具备良好的敏感性和特异性。

王雷,李宜辉,张鹏彬,柏健鹰,达四平,郭红,樊超强,赵晓晏.ELISA法与Hp SA免疫快检卡检测幽门螺杆菌粪便抗原的比较.世界华人消化杂志 2004;12(5):1235-1237  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1235.asp>

### 3 讨论

胆系感染是常见感染性疾病<sup>[1]</sup>。胆道细菌都直接或间接来源于肠道,本组资料大肠杆菌占第一位(31%),肺炎克雷伯菌占第二位(21%),二者共占52%。但与以往文献[2]报告的胆系感染70%以上致病菌为大肠杆菌及肺炎克雷伯菌相比已明显改变。但与近期祝建军 et al<sup>[3]</sup>报告的:胆系感染病原菌大肠杆菌占27.4%,肺炎克雷伯菌16.2%相近;与何晓峰 et al<sup>[4]</sup>报告的:胆系感染需氧菌中大肠杆菌占32.9%,肺炎克雷伯菌占19.2%亦相近。近几年由于抗生素的广泛应用,不合理使用抗生素较为普遍,引发了肠道菌群的变化,同时胆系感染致病菌谱也发生了明显的变化。这一变化也表现在居第三位的肠球菌引起的胆系感染方面,以往认为肠球菌是肠道的正常菌种,不致病,由于抗生素的广泛应用,不易被杀灭的肠球菌被选择出来而成为致病菌,肠球菌所致胆系感染就是这样,有文献报告:G<sup>+</sup>细菌所致胆系感染中,肠球菌为主要病原菌<sup>[5-7]</sup>。

G<sup>-</sup>杆菌对亚胺培南敏感率接近100%,对头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、丁胺卡那总的敏感率在90%以上。G<sup>+</sup>球菌对万古霉素的敏感率为100%,对亚胺培南、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟的敏感率在80%以上,提示对于胆系感染临床可以首选这些抗生素。对G<sup>-</sup>杆菌及G<sup>+</sup>球菌耐药率较高的抗生素,氨基西林、苯唑西林、红霉素、环丙沙星、庆大霉素应避免使用。这一结果与焦宛 et al<sup>[6]</sup>报道胆系感染致病菌药敏实验结果

差别较大,但与何晓峰 et al<sup>[4]</sup>报告的胆汁细菌耐药性结果相近。这是由于不同地区、不同时期结果不同的原因。因此,临床医生应重视本地区、本医院致病菌及其耐药性的流行现状。

本组未做厌氧菌培养,根据国外报道胆系感染中厌氧菌是主要致病菌之一。厌氧菌可以单独引起胆系感染,更多的是混合感染。文献[8]报告胆系感染时厌氧菌培养阳性率在50%以上,反复感染病例中厌氧菌感染比例高达82%。最常见的厌氧菌是脆弱类杆菌,脆弱类杆菌对亚胺培南的敏感率为100%<sup>[8-9]</sup>,故亚胺培南对厌氧菌引起的胆系感染一样有效。提示对于重症、难治的胆系感染应选择亚胺培南治疗。

### 4 参考文献

- 1 杨春明.胆道感染.裘法祖.外科学.第4版.北京:人民卫生出版社,1997:558-561
- 2 黎沾良,顾万清.胆石症患者术中胆汁细菌培养225例分析.中华外科杂志 1985;23:229
- 3 祝建军,汤雅琴,宋秀兰,王宇军.胆道感染病原微生物学的研究与耐药性分析.中华外科杂志 2000;38:369-371
- 4 何晓峰,曹晋桂,焦力群,冯晓玲,吴锦.胆汁细菌学检验及其对抗生素的耐药性分析.空军总医院学报 2002;18:211-213
- 5 叶英,余鑫之,徐元宏,耿小平.胆道感染的致病菌变迁和耐药趋势.中国抗感染化疗杂志 2002;2:136-139
- 6 焦宛,刘厚玉,王炳生,胡必杰,王文娟.胆汁中需氧菌群的调查及药敏测试.中国实用外科杂志 1997;17:428
- 7 张晋湘,谢凤梅.胆道疾病的胆汁细菌培养及药敏试验结果分析.湖南医科大学学报 1998;23:508-509
- 8 黎沾良.厌氧菌与重症胆管炎.何三光.中国外科专家经验文集.第1版.沈阳:沈阳出版社,1993:265-266
- 9 郑德联.厌氧菌感染的治疗方法.何三光.中国外科专家经验文集.第1版.沈阳:沈阳出版社,1993:267-269

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

• 临床经验 •

## ELISA法与Hp SA免疫快检卡检测幽门螺杆菌粪便抗原的比较

王雷,李宜辉,张鹏彬,柏健鹰,达四平,郭红,樊超强,赵晓晏

王雷,李宜辉,张鹏彬,柏健鹰,达四平,郭红,樊超强,赵晓晏,中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化内科 重庆市 400037  
项目负责人:赵晓晏,400037,重庆市,中国人民解放军第三军医大学附属新桥医院消化内科. zhaoxiaoyan@mail.tmmu.com.cn  
电话:023-68774604  
收稿日期:2003-11-13 接受日期:2003-12-16

### 摘要

目的:比较ELISA法(enzyme immunoassay)与Hp SA免疫快检卡(immuno Card STAT Hp SA)检测幽门螺杆菌粪便抗原(Hp SA)的准确性和可靠性。

方法:以<sup>14</sup>C呼吸试验和快速尿素酶(rapid urease test, RUT)阳性为“金标准”,ELISA法和HpSA免疫快检卡

检测HpSA阳性率和阴性率分别与“金标准”进行比较。

结果:与“金标准”相比,ELISA法敏感性为83.3%(5/6),特异性为88.3%(30/34);Hp SA免疫快检卡的敏感性为92.3%(12/13),特异性为92.6%(25/27)。

结论:无论是Hp SA免疫快检卡还是ELISA法检测Hp SA,都具备良好的敏感性和特异性。

王雷,李宜辉,张鹏彬,柏健鹰,达四平,郭红,樊超强,赵晓晏.ELISA法与Hp SA免疫快检卡检测幽门螺杆菌粪便抗原的比较.世界华人消化杂志 2004;12(5):1235-1237  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1235.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)非侵入性检查因其无痛苦、便捷等优势越来越为临床医生及患者接受成为检测 Hp 的主要方法<sup>[1]</sup>。目前临床 Hp 非侵入性检查常用方法包括 Hp 血清抗体检测、<sup>13</sup>C 或 <sup>14</sup>C 呼气试验、幽门螺杆菌粪便抗原(Hp SA)检测等。其中<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>C 呼气试验准确可靠, 其与诊断 Hp 感染的“金标准”, 组织学检查、RUT 和细菌分离培养的准确性和可靠性相似<sup>[1-5]</sup>, 但是<sup>13</sup>C 呼气试验价格昂贵,<sup>14</sup>C 存在一定放射性<sup>[6]</sup>; Hp 血清抗体检测不能证实是否存在 Hp 现症感染, 因此, 其应用受到一定限制。Hp SA 检测安全性高、可操作性强, 比上述两种方法更易推广普及。本研究对比了 ELISA 法与 Hp SA 免疫快检卡检测 Hp SA 的准确性和可靠性, 旨在评价两种方法的临床价值。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2003-03/2003-08 月在我院消化科住院患者 80 例, 19-72 岁, 男 56 例, 女 24 例, 不考虑检查前是否服用过抗生素、铋剂或质子泵抑制剂, 随机分为两组。一组为 Hp SA 免疫快检卡法; 一组为 ELISA 法, 每组 40 例。所有病例常规<sup>14</sup>C 呼吸试验和胃镜检查并留取组织行 RUT 检查证实是否存在 Hp 感染并以此作为“金标准”, 同时留取大便标本。Hp SA 免疫快检卡法组留取的大便标本立即测定幽门螺杆菌抗原, ELISA 法组留取大便标本在 -70 °C 保存, 直至测定 Hp Ag。

**1.2 方法** 采用北京九强公司提供的美鼎生物有限公司(Meridian Bioscience, Inc)幽门螺杆菌检测酶联免疫试剂盒及 Hp SA 免疫快检卡(immunocard stat Hp SA)进行试验。(1)操作步骤: 留取患者胃镜检查、<sup>14</sup>C 呼气试验当日或次日早晨的粪便。(2)Hp SA 免疫快检卡法检测用试剂盒自带的涂抹棒移取直径在 5-6 mm 的粪便标本至稀释液, 震荡 15 s; 滴加 4 滴标本稀释液到试剂卡一端的圆孔, 5 min 后读取结果; 阳性、阴性判断结果参照试剂盒说明书。(3)ELISA 法检测: 取直径约 5-6 mm 充分混匀的粪便标本, 置入 12 mm × 75 mm 试管, 加入 50 μL 样本稀释液, 充分混匀, 振荡 15 s。在抗体包被的微孔板固定好微孔并标记固定, 在各微孔中加入 50 μL 已经稀释的粪便, 设阳性和阴性对照各一孔。随后加入酶结合物, 振荡 30 s, 用微孔条密封器封严, 22-27 °C 孵育 1 h。洗板 4 次, 加入两滴底物溶液, 振荡 30 s, 22-27 °C 孵育 10 min, 加入一滴终止液振荡 30 s 后在 Bio Rad Model 550 型酶标仪 450/630 nm 测定吸光光度值, 按试剂盒标准判定结果。

## 2 结果

**2.1 Hp SA 免疫快检卡检测粪便 Hp SA 与<sup>14</sup>C 呼气试验和 RUT 阳性率比较** 根据 Hp 检测“金标准”(即<sup>14</sup>C 呼气试验和 RUT 阳性者)诊断阳性病例 13 例, 阴性病例 27 例。Hp SA 免疫快检卡检测 Hp SA 阳性 14 例, 阴性 26 例,

与“金标准”比较, Hp SA 免疫快检卡检测粪便 Hp SA 的敏感性为 92.3%(12/13), 特异性为 92.6%(25/27); 其阳性预测值为 85.7%(12/14); 阴性预测值为 96.2%(25/26), 其准确度为 92.5%(37/40)。“金标准”的阳性率为 32.5%(13/40); Hp SA 免疫快检卡的阳性率为 35.0%(14/40), 二者阳性率比较无显著性差异( $P > 0.05$ )(表 1)。

表 1 40 例患者粪便抗原免疫快检卡检测结果

方法	Hp “金标准”检测		合计
	阳性	阴性	
免疫快检卡检测阳性	12	2	14
免疫快检卡检测阴性	1	25	26
合计	13	27	40

ELISA 法检测 Hp SA 与<sup>14</sup>C 呼吸试验和 RUT 阳性率比较“金标准”阳性病例及阴性病例选择参照上述方法。ELISA 法检测 Hp SA 阳性病例 9 例, 阴性病例 31 例, 与“金标准”比较, ELISA 法检测 Hp SA 的敏感性为 83.3%(5/6), 特异性为 88.3%(30/34); 其阳性预测值为 55.6%(5/9); 阴性预测值为 96.8%(30/31), 其准确度为 87.5%(35/40)。“金标准”的阳性率为 15.0%(6/40); Hp SA 免疫快检卡的阳性率为 22.5%(9/40)。二者阳性率比较无显著性差异( $P > 0.05$ )(表 2)。

表 2 40 例患者粪便抗原 ELISA 法检测结果

方法	Hp “金标准”检测		合计
	阳性	阴性	
ELISA 法阳性	5	4	9
ELISA 法阴性	1	30	31
合计	6	34	40

## 3 讨论

Hp 感染的实验诊断包括侵袭性和非侵袭性两类, 前者包括胃镜检查取活检组织标本作切片染色、细菌分离培养和 RUT, 这三项检查认为是 Hp 感染的“金标准”。此外活检组织 PCR 扩增法<sup>[6-8]</sup>。这类方法带有创伤性, 尤其不适合孕妇、老人、儿童, 且其结果受 Hp 感染灶在胃黏膜分布不均匀的影响, 易造成假阳性; 后者包括 Hp 血清抗体检测、<sup>13</sup>C 或 <sup>14</sup>C 呼气试验、Hp SA 检测等<sup>[6]</sup>。近年来随着<sup>13</sup>C 或 <sup>14</sup>C 呼气试验广泛开展, 已经证实呼气试验与“金标准”之间特异性及敏感性相似, 因此近来亦有研究将<sup>13</sup>C 或 <sup>14</sup>C 呼气试验作为“金标准”。粪便 Hp SA 检测的方法首先见于 1997 年美国胃肠病周会议报道, 1999 年 Chang et al 首先报道粪便中存在幽门螺杆菌特异性抗原成分, 并认为检测 Hp SA 是一种简便、精确、无创的诊断方法<sup>[1, 9-15]</sup>。Hp SA 免疫快检卡检测 Hp 其阳性率与“金标准”无显著差异, 但是 ELISA 法阳性率较“金标准”增高。我们认为这可能两种方法选用的 Hp 抗体有关, 前者为 Hp 特异性单克隆

抗体,而后者为多克隆抗体,因此,ELISA法更宜出现假阳性结果<sup>[9-10]</sup>。这也提示ELISA法更易于Hp的筛选,而Hp SA免疫快检卡则更易应用于Hp根除后的检测。无论是Hp SA免疫快检卡还是ELISA法检测Hp SA,都具备良好的敏感性和特异性。与已有文献报道的敏感度和特异性相似。两种方法之间比较,其特异性和敏感性无显著性差异。本研究中两种方法的阳性预测值偏低,阴性预测值偏高,考虑与所选择病例为几经就医患者,院外多数服用过PPI、铋剂或抗生素导致Hp的感染率太低有关。但是就两种方法比较而言,ELISA法的阳性预测值明显低于Hp SA免疫快检卡法,一定程度上说明Hp SA免疫快检卡法对辅助诊断Hp感染和治疗监测有更好的临床价值。但是,ELISA法价格相对便宜,材料更加节省,更有利于在相对贫困地区普及。

总之,这两种方法操作简单,标本来源方便,特别适合于儿童、孕妇、老年人等不宜行胃镜检查的患者。因此,ELISA法和Hp SA免疫快检卡法值得临床推广应用。

#### 4 ■ 参考文献

- 1 Chang PS, Ni YH, Chang MH. Household *Helicobacter pylori* antibody survey in children with upper gastrointestinal symptoms. *Acta Paediatr Taiwan* 2003;44:336-338
- 2 Coppola N, De Stefano G, Marrocco C, Scarano F, Scolastico C, Tarantino L, Rossi G, Battaglia M, Onofrio M, D' Aniello F, Pisapia R, Sagnelli C, Sagnelli E, Piccinino F, Giorgio A, Filippini P. *Helicobacter* spp. and liver diseases. *Infez Med* 2003;4:201-207
- 3 Abbasciano V, Sartori S, Trevisani L, Girometti R, Ranzini M, Nielsen I, Mazzotta D, Vecchiatti G, Bononi A, Guglielmini C. Comparison of magnesium concentration in serum, erythrocytes and gastric tissue in two groups of patients affected by chronic gastritis, *Helicobacter pylori* negative and positive. *Magnes Res* 2003;16:281-286
- 4 Mittal SK, Mathew JL. *Helicobacter pylori* infection in children: a review. *Trop Gastroenterol* 2003;24:106-115
- 5 Rieder G, Hofmann JA, Hatz RA, Stolte M, Enders GA. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in *Helicobacter pylori*-associated gastritis may represent an increased risk factor to develop gastric carcinoma of the intestinal type. *Int J Med Microbiol* 2003;293:403-412
- 6 Okuda M, Nakazawa T, Booka M, Miyashiro E, Yosikawa N. Evaluation of a urine antibody test for *Helicobacter pylori* in Japanese children. *J Pediatr* 2004;144:196-199
- 7 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
- 8 Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Nakamura H, Yoshikawa A, Yanaoka K, Arii K, Tamai H, Shimizu Y, Takeshita T, Mohara O, Ichinose M. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int J Cancer* 2004;109:138-143
- 9 Goto H. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *Nagoya J Med Sci* 2003;66:77-85
- 10 Wan Y, Xu YY, Jiang JH, Kong FS, Xue FB, Bai YX, Pan BR, Ren J, Fan DM. Chinese literature associated with diagnosis of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2004;10:231-233
- 11 Zhang H, Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Liu HF, Luo YH. Effect of *Helicobacter pylori* infection on expression of Bcl-2 family members in gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:227-230
- 12 Ohara T, Morishita T, Suzuki H, Masaoka T, Ishii H. Perforin and granzyme B of cytotoxic T lymphocyte mediate apoptosis irrespective of *Helicobacter pylori* infection: possible act as a trigger of peptic ulcer formation. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1774-1779
- 13 Kuniyasu H, Kitadai Y, Mieno H, Yasui W. *Helicobacter pylori* infection is closely associated with telomere reduction in gastric mucosa. *Oncology* 2003;65:275-282
- 14 Garrido Serrano A, Lepe Jimenez JA, Guerrero Igea FJ, Perianes Hernandez C. *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2003;95:788-790
- 15 Majumdar SR, Soumerai SB, Farraye FA, Lee M, Kemp JA, Henning JM, Schrammel P, LeCates RF, Ross-Degnan D. Chronic acid-related disorders are common and underinvestigated. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2409-2414

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

• 临床经验 •

## 伪膜性肠炎 10 例

王颖,田丰,李岩

王颖,田丰,李岩,中国医科大学第二附属医院消化内科  
辽宁省沈阳市 110004  
项目负责人:王颖,110004,辽宁省沈阳市和平区三好街36号,中国医科大学第二附属医院消化内科. wangyingyx@163.com  
电话:024-83956416 传真:024-23891793  
收稿日期:2003-12-23 接受日期:2004-02-01

### 摘要

目的:探讨伪膜性肠炎(PMC)的临床表现、诊断及治疗情况,提高对PMC的认识。

方法:对我院4 a来诊治的10例PMC患者进行回顾性分析。

结果:10例患者中8例为老年患者,全部患者均在应用抗生素过程中发生腹泻、腹痛、发热,7例有伪膜排出,7例做了结肠镜检查,均提示为PMC,应用万古霉素和甲硝唑治疗后症状消失,全部治愈。

结论:PMC多系在应用抗生素后发病,老年人、重症患者和外科大手术等患者为易感人群。结肠镜检查诊断PMC具有快速可靠的优点。对老年人及重症患者在使用抗生素过程中出现腹泻、腹痛、发热和白细胞升高现象,应高度怀疑PMC,及时行结肠镜检查,粪便细菌培养和艰难梭

抗体,而后者为多克隆抗体,因此,ELISA法更宜出现假阳性结果<sup>[9-10]</sup>。这也提示ELISA法更易用于Hp的筛选,而Hp SA免疫快检卡则更易应用于Hp根除后的检测。无论是Hp SA免疫快检卡还是ELISA法检测Hp SA,都具备良好的敏感性和特异性。与已有文献报道的敏感度和特异性相似。两种方法之间比较,其特异性和敏感性无显著性差异。本研究中两种方法的阳性预测值偏低,阴性预测值偏高,考虑与所选择病例为几经就医患者,院外多数服用过PPI、铋剂或抗生素导致Hp的感染率太低有关。但是就两种方法比较而言,ELISA法的阳性预测值明显低于Hp SA免疫快检卡法,一定程度上说明Hp SA免疫快检卡法对辅助诊断Hp感染和治疗监测有更好的临床价值。但是,ELISA法价格相对便宜,材料更加节省,更有利于在相对贫困地区普及。

总之,这两种方法操作简单,标本来源方便,特别适合于儿童、孕妇、老年人等不宜行胃镜检查的患者。因此,ELISA法和Hp SA免疫快检卡法值得临床推广应用。

#### 4 ■ 参考文献

- 1 Chang PS, Ni YH, Chang MH. Household *Helicobacter pylori* antibody survey in children with upper gastrointestinal symptoms. *Acta Paediatr Taiwan* 2003;44:336-338
- 2 Coppola N, De Stefano G, Marrocco C, Scarano F, Scolastico C, Tarantino L, Rossi G, Battaglia M, Onofrio M, D' Aniello F, Pisapia R, Sagnelli C, Sagnelli E, Piccinino F, Giorgio A, Filippini P. *Helicobacter* spp. and liver diseases. *Infez Med* 2003;4:201-207
- 3 Abbasciano V, Sartori S, Trevisani L, Girometti R, Ranzini M, Nielsen I, Mazzotta D, Vecchiatti G, Bononi A, Guglielmini C. Comparison of magnesium concentration in serum, erythrocytes and gastric tissue in two groups of patients affected by chronic gastritis, *Helicobacter pylori* negative and positive. *Magnes Res* 2003;16:281-286
- 4 Mittal SK, Mathew JL. *Helicobacter pylori* infection in children: a review. *Trop Gastroenterol* 2003;24:106-115
- 5 Rieder G, Hofmann JA, Hatz RA, Stolte M, Enders GA. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in *Helicobacter pylori*-associated gastritis may represent an increased risk factor to develop gastric carcinoma of the intestinal type. *Int J Med Microbiol* 2003;293:403-412
- 6 Okuda M, Nakazawa T, Booka M, Miyashiro E, Yosikawa N. Evaluation of a urine antibody test for *Helicobacter pylori* in Japanese children. *J Pediatr* 2004;144:196-199
- 7 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
- 8 Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Nakamura H, Yoshikawa A, Yanaoka K, Arii K, Tamai H, Shimizu Y, Takeshita T, Mohara O, Ichinose M. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int J Cancer* 2004;109:138-143
- 9 Goto H. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *Nagoya J Med Sci* 2003;66:77-85
- 10 Wan Y, Xu YY, Jiang JH, Kong FS, Xue FB, Bai YX, Pan BR, Ren J, Fan DM. Chinese literature associated with diagnosis of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2004;10:231-233
- 11 Zhang H, Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Liu HF, Luo YH. Effect of *Helicobacter pylori* infection on expression of Bcl-2 family members in gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:227-230
- 12 Ohara T, Morishita T, Suzuki H, Masaoka T, Ishii H. Perforin and granzyme B of cytotoxic T lymphocyte mediate apoptosis irrespective of *Helicobacter pylori* infection: possible act as a trigger of peptic ulcer formation. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1774-1779
- 13 Kuniyasu H, Kitadai Y, Mieno H, Yasui W. *Helicobacter pylori* infection is closely associated with telomere reduction in gastric mucosa. *Oncology* 2003;65:275-282
- 14 Garrido Serrano A, Lepe Jimenez JA, Guerrero Igea FJ, Perianes Hernandez C. *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2003;95:788-790
- 15 Majumdar SR, Soumerai SB, Farraye FA, Lee M, Kemp JA, Henning JM, Schrammel P, LeCates RF, Ross-Degnan D. Chronic acid-related disorders are common and underinvestigated. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2409-2414

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

• 临床经验 •

## 伪膜性肠炎 10 例

王颖,田丰,李岩

王颖,田丰,李岩,中国医科大学第二附属医院消化内科  
辽宁省沈阳市 110004  
项目负责人:王颖,110004,辽宁省沈阳市和平区三好街36号,中国医科大学第二附属医院消化内科。wangyingyx@163.com  
电话:024-83956416 传真:024-23891793  
收稿日期:2003-12-23 接受日期:2004-02-01

### 摘要

目的:探讨伪膜性肠炎(PMC)的临床表现、诊断及治疗情况,提高对PMC的认识。

方法:对我院4 a来诊治的10例PMC患者进行回顾性分析。

结果:10例患者中8例为老年患者,全部患者均在应用抗生素过程中发生腹泻、腹痛、发热,7例有伪膜排出,7例做了结肠镜检查,均提示为PMC,应用万古霉素和甲硝唑治疗后症状消失,全部治愈。

结论:PMC多系在应用抗生素后发病,老年人、重症患者和外科大手术等患者为易感人群。结肠镜检查诊断PMC具有快速可靠的优点。对老年人及重症患者在使用抗生素过程中出现腹泻、腹痛、发热和白细胞升高现象,应高度怀疑PMC,及时行结肠镜检查,粪便细菌培养和艰难梭



菌毒素检测,以早期明确诊断。

王颖,田丰,李岩.伪膜性肠炎10例.世界华人消化杂志 2004;12(5):1237-1239

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1237.asp>

## 0 引言

伪膜性肠炎(pseudomembranous colitis, PMC)是一种主要发生在结肠,也可累及小肠的急性黏膜坏死、纤维素渗出性炎症,黏膜表面覆有黄白或黄绿色伪膜。其多系在应用抗生素后导致正常肠道菌群失调,艰难梭菌(*Clostridium difficile*, CD)大量繁殖,产生毒素而致病<sup>[1]</sup>。该病多发生于老年人、重病患者、免疫力低下及外科大手术后等患者,病情比较严重,治疗不及时死亡率较高。近年来,随着抗生素的大量应用及人口的老龄化,PMC患者越来越多,应引起临床医生的高度重视。为总结经验教训,提高临床诊治水平,现将我院近4 a收治的10例PMC患者,报告如下:

## 1 材料和方法

1.1 材料 10例PMC患者系我院4 a来收治的内、外科重症患者,男3例,女7例;年龄45-75岁,平均64岁,小于50岁患者为8例(80%)。其中外科手术患者5例,内科感染5例。10例患者均应用抗生素,分别为:头孢类抗生素7例,克林霉素1例,奎诺酮类1例,青霉素1例,应用时间为4-20 d,平均为10 d。本组患者均在使用抗生素期间出现腹泻,均为水样便,大便次数为10-30次/天不等,持续时间为7-20 d,平均是15 d。7例便中有伪膜存在。全部有腹痛,腹痛主要在脐周和下腹部,多数为隐痛和胀痛。8例发热,2例高热,其余为低热。3例伴有周身水肿、腹水和低蛋白血症。

1.2 方法 10例患者均行血、便常规;便菌群、便细菌和霉菌培养;7例做了结肠镜和病理检查。10例患者被诊断为PMC后,均停用抗生素,补液、纠正离子紊乱、对症治疗;给予万古霉素1.0-2.0 g/d口服和甲硝唑0.5 g/d静脉滴注,加用微生态制剂:分别为金双歧、米雅BM片、整肠生。

## 2 结果

10例中7例WBC总数升高为 $10-20 \times 10^9/L$ 。便常规5例有少量红、白细胞;全部有菌群失调;便普通细菌培养均阴性。3例查到霉菌。7例做了结肠镜检查,表现为直肠和降结肠散在黏膜充血、水肿、浅表糜烂,病灶间黏膜基本正常,全部有黄白色苔样伪膜,其形状为斑片状或地图状,不易剥离。伪膜病理示:纤维素样物、炎症细胞、黏液和坏死细胞碎屑组成。10例患者用药48-72 h后腹泻明显减轻,5-10 d症状消失,临床治愈。

## 3 讨论

Finney于1893年首先描述了小肠的伪膜性病变,但在

1950年代以前PMC非常罕见,在临床广泛应用青霉素、四环素和氯霉素以后,这种PMC成了抗生素治疗的常见并发症。当时认为金黄色葡萄球菌可能是引起PMC的病原菌,所以也曾把PMC称为葡萄球菌肠炎。1970年代发现克林霉素与PMC有明显关系,又提出克林霉素相关性结肠炎。到1977年才确认克林霉素相关性肠炎与CD的关系,在PMC患者的粪便中检出CD及毒素,口服万古霉素对动物模型和患者都是有效的治疗方法。从此确定CD是医院获得性腹泻的主要病原菌<sup>[2]</sup>。CD是PMC的主要致病菌。该菌为厌氧革兰氏阳性杆菌,芽孢较大,主要产生2种毒素:A毒素(肠毒素)、B毒素(细胞毒素)。肠毒素是主要的致病因子,通过激活巨噬细胞、肥大细胞及其后的中性粒细胞,释放强效的炎症递质和细胞因子,引起局部黏膜血管通透性增加,黏液分泌,炎症细胞浸润、出血及绒毛损害,甚至黏膜坏死。细胞毒素在肠毒素的基础上加重黏膜损害<sup>[1-2]</sup>。抗生素,特别是林可霉素、氯林可霉素、氨苄西林、阿莫西林以及第三代头孢菌素等的应用,导致肠道正常菌群的改变,引起肠道菌群相互遏制机制的紊乱,使CD得以迅速繁殖并产生毒素而致病<sup>[1-2]</sup>。抗生素对肠道正常菌群有很大影响,其中口服广谱抗生素的影响最大。几乎所有抗生素都可以诱发CD相关的腹泻,其相对危险性与抗生素的使用频率、强度和使用时间有关<sup>[2-3]</sup>。

PMC主要侵犯结肠,以乙状结肠最多见,偶见小肠如回肠末端等部位。黏膜充血水肿、凝固性坏死,并覆有大小不一、散在的斑点状黄白色伪膜,从数毫米到30毫米不等。严重者伪膜可融合成片,并可见到伪膜脱落的大、小裸露区,伪膜界限分明,周边黏膜相对正常。病理见伪膜系由纤维素、中性粒细胞、单核细胞、粘蛋白及坏死细胞碎屑组成。黏膜固有层有中性粒细胞、浆细胞及淋巴细胞浸润,重者腺体破坏断裂、细胞坏死。黏膜下层因炎症渗出而增厚,伴血管扩张、充血及微血栓形成。坏死一般限于黏膜下层,偶尔累及肠壁全层导致肠穿孔<sup>[1]</sup>。

本病多发生于50岁以上人群,女性多于男性。患者多有胃肠手术或其他严重疾病史,并在近期内应用抗生素,尤其是广谱抗生素。症状的发生多见于抗生素治疗4-10 d内或在停用抗生素后1-2 wk内<sup>[1-3]</sup>。本文10例患者,7例为女性;50岁以上占80%;手术病例占50%;全部发生在应用抗生素期间,大多数为使用大量广谱高级抗生素老年患者;但也有2例分别为青霉素和克林霉素短期使用患者,前者为髋关节手术患者,后者为糖尿病患者。PMC主要表现为:(1)腹泻:是最主要的症状,腹泻程度和次数不一,轻者大便每日2-3次,停用抗生素后自愈;重者有大量水样泻,每日30次,部分患者可排出斑块状伪膜。(2)腹痛:多在下腹部,呈钝痛、胀痛或痉挛性疼痛,可伴有腹胀、恶心、呕吐。全身中毒症状。(3)发热。(4)白细胞升高。本组10例患者全部有腹泻且较重为10-30次/d,水样便或蛋花样便,7例有伪

膜排出.全部有腹痛存在,一半患者为胀痛,另一半为绞痛.多数伴有腹胀、恶心和呕吐.8例发热.7例有白细胞升高.其中3例伴有周身水肿、腹水和电解质紊乱及低蛋白血症.

便常规可见白细胞,肉眼血便少见.疑诊病例应送大便标本行CD培养,在厌氧条件下经37℃培养24-48h可出结果.CD培养采用CCFA培养基.确诊需要进行CD毒素鉴定,目前毒素A、B检测均比较复杂且结果出现较晚<sup>[2-3]</sup>,故对临床指导意义有限.PMC内镜下表现不一<sup>[1, 4]</sup>,轻者仅可见黏膜充血水肿,血管纹理不清,呈“非特异性肠炎”表现;稍重者可见黏膜散在浅表糜烂,伪膜呈斑点状分布,周边充血;严重病例伪膜呈斑片状或地图状,伪膜不易脱落,部分脱落区可见溃疡形成.结肠镜发现特征性黄色突起斑块-伪膜是PMC的特征之一<sup>[2-3]</sup>,对临床诊断有重要意义.本文10例患者,7例行结肠镜检查,全部符合上述表现;其余3例有典型临床表现,应用甲硝唑和万古霉素有效,诊断PMC成立.结肠镜可直观病变分布的范围、病变程度,还可追踪判断治疗效果,快速帮助临床诊断,意义不言而喻<sup>[4]</sup>.

临床诊断PMC后应立即停用引发CD感染的抗生素;补液和补充电解质等支持治疗;恢复肠道正常菌群,可选用的药物包括乳酸杆菌片,双歧杆菌制剂等.应用正常人的粪便灌肠来恢复患者肠道的正常菌群也是一种有效的方法,但操作繁杂、患者难于接受,临床现在很少采用<sup>[3]</sup>.抗生素治疗:甲硝唑一般用法为200-400mg,每天3-4次,餐后服用,7-10d,95%的病例治疗反应良好.重症频繁呕吐者可静脉给药,但疗效明显低于口服用药.万古霉素口服不吸收,对肾脏无损害,在肠道内可达到高浓度,静脉给药不宜采用.一般用法:0.25-0.5g,4次/d,疗程7-10d<sup>[1-3]</sup>.治疗48h应有效,4-7d内应恢复正常,但严重的病例可能需要更长时间的治疗<sup>[2]</sup>.关于甲硝唑与万古霉素疗效的问题,Bartlett et al<sup>[3]</sup>认为二者疗效相当,有效率为90-97%,甲硝唑比万古霉素价格便宜,故治疗PMC首选甲硝唑;Tabaqchali et al<sup>[2]</sup>认为万古霉素治疗CD感染比甲硝唑效果更好,这有经验和理论上的支持证据.我们治疗CD感染的体会是甲硝唑效果一般,万古霉素效果很好,一般1-2g/d,48h均有效,腹泻3-5d基本消失,故万古

霉素应作为治疗PMC的首选药,这与国内文献报道基本相符<sup>[5-8]</sup>.调整肠道菌群的微生态制剂剂量可适当加大.

轻症病例在停用抗生素之后可自愈,重者经及时诊断和积极治疗预后良好.约20-25%的患者在初治停药1-3wk后可再次出现症状<sup>[2-3]</sup>,原因可能是同一菌株或另一株CD感染,结肠中残留孢子的发芽繁殖,重新应用抗生素治疗<sup>[2]</sup>.复发病例轻者可应用调整肠道菌群药物,不需要抗生素治疗.多数复发病例再用甲硝唑或万古霉素仍然有效<sup>[2-3]</sup>.我们10例患者中有3例复发,其中2例无原因,1例是因为严重的尿路感染口服抗生素而再次复发.重症PMC可出现严重并发症如中毒性巨结肠、麻痹性肠梗阻和肠穿孔,此时死亡率可达到16-22%<sup>[1]</sup>.

随着抗生素在临床上的广泛使用及新型抗生素的不断研制、生产和使用;社会人口的老龄化,与抗生素相关的PMC的发病率会逐年升高.由于其易感人群的特殊性,临床表现的多样性,病情发展的凶险性及治疗上的复杂性,临床医生应提高对PMC的认识.对于老年人、重病患者、大手术后及曾大量使用抗生素的患者,如出现非特异性腹泻、腹痛、发热、白细胞升高等现象,且用一般抗生素及止泻药无效者,应考虑到PMC的可能,及早行结肠镜检查,条件允许行便CD培养、毒素测定.一旦确诊或高度怀疑时应立即停用原抗生素,可选用甲硝唑或万古霉素口服治疗,同时服用肠道微生态制剂如金双歧、米雅BM、整肠生等.积极对症治疗.以期做到对该病的早期诊断、早期治疗,从而降低死亡率.

#### 4 参考文献

- 1 罗忠芬,陈世耀.假膜性肠炎.陈灏珠.实用内科学.第11版.北京:人民卫生出版社,2002:1789-1791
- 2 Tabaqchali S, Jumaa P. Diagnosis and management of *Clostridium difficile* infection. *BMJ* 1995;310:1375-1380
- 3 Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002; 346:334-339
- 4 王一鸣,熊毅敏,郑国荣,许桦林.伪膜性肠炎的内镜与临床特征研究.中国内镜杂志 2003;9:89-90
- 5 郭智涛,李建昌,乔卉,陈曦.中西医结合治疗伪膜性肠炎.中国中西医结合外科杂志 2000;6:12-13
- 6 黄德旺,肖冰.伪膜性肠炎42例临床分析.中国中西医结合消化杂志 2001;9:298-299
- 7 李凤芹,赵金芝.腹部手术后伪膜性肠炎32例报告.中国临床医生 2001;29:31-32
- 8 杨洪芝,张海燕.老年伪膜性肠炎8例分析.泰山医学院学报 1999;20:51-52

• 临床经验 •

# 以恶心呕吐为首发症状的52例非消化系统疾病分析

丁祥武, 罗和生, 余保平

丁祥武, 襄樊市中心医院消化科 湖北省襄樊市 441021  
罗和生, 余保平, 武汉大学人民医院消化科 湖北省武汉市 430060  
项目负责人: 丁祥武, 441021, 湖北省襄樊市荆州街142号, 襄樊市中心医院消化科. xwding@hotmail.com  
电话: 0710-3524360 传真: 0710-3512850  
收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

目的: 提高临床医生对以恶心呕吐为主要表现的非消化系统疾病的认识.

方法: 回顾性调查以呕吐原因待查在消化科住院患者的完整资料, 并分析确诊为非消化系统疾病患者的临床表现.

结果: 确诊为非消化系统疾病者52例, 主要见于内分泌系统、代谢疾病、循环系统、泌尿系统、神经系统、结缔组织疾病和产科疾病等.

结论: 以恶心呕吐为首发症状者, 非消化系统疾病占有一定比例.

丁祥武, 罗和生, 余保平. 以恶心呕吐为首发症状的52例非消化系统疾病分析. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1240-1241  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1240.asp>

## 0 引言

为了提高对以恶心呕吐为主要表现的非消化系统疾病的认识, 对我院消化科诊断明确、资料完整的、以呕吐原因待查住院的非消化系统疾病共52例患者进行了分析.

## 1 材料和方法

1.1 材料 1995-01/2001-05我院消化科共收治呕吐原因待查患者265例, 确诊为非消化系统疾病者52例, 占19.6%, 其中男23例, 女29例, 年龄15-90岁, 平均 $54 \pm 2.5$ 岁.

1.2 方法 呕吐原因待查是指入院时以恶心呕吐为首发症状或主要表现, 发病3 d以上, 病因未明者; 呕吐次数为4-20次/d, 呕吐物为非咖啡色胃内容物. 52例患者中, 44例经过胃镜、50例经过腹部超声检查. 根据病史和临床表现, 选择T3、T4、TSH, 血糖、尿酮, 电解质, 肝肾功能, HCG, 心肌酶学, ECG, 头颅CT或MRI等检查后, 明确诊断. 起病到确诊时间多为4-10 d, 最长为1 a.

## 2 结果

52例非消化系统疾病患者的病因分布(见表1).

## 3 讨论

非消化系统疾病常可引起恶心呕吐. 本组中主要见于内分泌系统、代谢疾病、循环系统、神经系统、泌尿系统、结缔组织疾病和产科疾病等. 详细的病史调查和体检可以提供重要的诊断线索.

消化系统症状为甲状腺功能亢进症的常见首发表现<sup>[1]</sup>. 本组中多为老年人, 女性多于男性, 起病隐袭, 甲状腺不肿大或轻微肿大, 心动过速不明显, 可见心房颤动、心脏增大等, 临床表现不典型. 如老年人有呕吐、消瘦、厌食等症状, 尤其是伴有心血管系统表现时, 应考虑淡漠型甲状腺功能亢进症.

糖尿病由于植物神经病变、胃肠激素分泌异常、胃肠道细菌感染等因素, 常可引起胃肠道症状<sup>[2]</sup>. 本组中8例糖尿病患者均以恶心呕吐为首发症状, 尤其是3例酮症酸中毒患者, 呕吐频繁剧烈. 因此, 对于频繁恶心呕吐的患者, 应常规检查血糖、尿糖和/或尿酮体.

急性心肌梗死患者常有恶心呕吐、上腹胀痛等消化系统症状. 本组3例急性心肌梗死患者无明显胸痛, 但恶心呕吐明显, 伴血流动力学异常. 提示对于老年患者, 出现上腹不适、恶心呕吐, 尤其伴心悸和/或血流

表1 52例非消化系统疾病患者病因分析

	<i>n</i>	占总病例数的比例(%)	占非消化系统疾病病例数的比例(%)	
内分泌系统	16	6.0	30.8	甲状腺功能亢进症 16例
代谢疾病	8	3.0	15.4	糖尿病 8例, 其中酮症酸中毒 3例
循环系统	8	3.0	15.4	高血压病 4例, 急性心肌梗塞 3例, 心肌炎 1例
神经系统	6	2.3	11.5	脑出血 2例, 脑梗塞 2例, 蛛网膜下腔出血 1例, 脑囊肿 1例
泌尿系统	6	2.3	11.5	慢性肾功能衰竭 6例, 其中5例慢性肾小球肾炎、1例泌尿系结石
结缔组织	4	1.5	7.7	系统性红斑狼疮 4例
产科疾病	4	1.5	7.7	早期妊娠 4例, 其中1例工具避孕
合计	52	19.6	100	

动力学异常时,即使无胸痛,也应考虑心肌梗塞。

恶心、呕吐、纳差为尿毒症的常见症状,且随病情进展加剧。本组中6例均以恶心呕吐为首发症状,伴不同程度的高血压、贫血。如患者出现纳差、恶心、呕吐,尤其伴贫血和/或血压增高时,应考虑肾功能衰竭。

颅内压增高可直接或间接刺激呕吐中枢引起呕吐。本组中脑血管意外5例,脑囊肿1例,呕吐均为非喷射性,说明颅内压增高时出现的呕吐不一定为喷射性。对于老年人,尤其是伴有高血压或糖尿病者,突然出现呕吐,应考虑脑血管疾病。本组中脑囊肿患者为36岁男性,无头痛及异常神经系统症状和体征,每于输液约1000 mL后恶心呕吐明显加重,停止输液后稍缓解;提示对于输液后出现或加重的呕吐应警惕有无颅内高压。

系统性红斑狼疮患者常见消化系统症状,本组中4例以恶心呕吐为首发症状。以消化系统症状为首发或主

要表现的系统性红斑狼疮表现不具特异性,常误诊<sup>[3]</sup>。如恶心呕吐为主要表现,诊断不明确时,尤其是女性患者,应考虑系统性红斑狼疮。另外,育龄妇女如出现呕吐,应考虑早期妊娠,即使患者避孕。

总之,恶心呕吐为临床常见症状,其病因多为消化系统疾病,但临床上其他系统疾病引起者亦常见,部分以恶心呕吐为首发症状或主要表现而收治消化科。临床医生应思路广阔,把握恶心呕吐的鉴别诊断,以避免误诊。

#### 4 参考文献

- 1 余保平,李瑾,杨拓,董卫国,罗和生.甲状腺功能亢进症102例消化系统表现临床分析.中国临床医学 2000;7:345-346
- 2 叶蓉绍,高寅春,王仲祥,贺贤年.糖尿病胃肠功能异常的观察.中国实用内科杂志 1994;14:653-654
- 3 张煌,曾学军,董怡,陆星华,李明佳.系统性红斑狼疮的消化系统临床表现157例分析.中华消化杂志 1999;19:42-44

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

• 临床经验 •

## 重症急性胰腺炎并发腹腔出血的放射介入治疗

赵刚,王春友,熊炯炘,陈立波

赵刚,王春友,熊炯炘,陈立波,华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心 湖北省武汉市 430022  
项目负责人:王春友,430022,湖北省武汉市解放大道1277号,华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心. cywang52@hotmail.com  
电话:027-85726273 传真:027-85726830  
收稿日期:2003-12-23 接受日期:2004-02-01

### 摘要

目的:探讨介入治疗在重症急性胰腺炎并发腹腔出血时的应用价值。

方法:回顾性分析1999-02/2002-09本科收治的17例重症急性胰腺炎并发腹腔出血患者行血管介入治疗的临床资料及治疗结果。

结果:共有14例患者通过数字血管减影明确出血部位,用弹簧圈栓塞动脉近端后成功止血者12例,垂体后叶素灌注止血2例。3例患者未找到出血主支而行手术止血,3例患者反复出血进行多次栓塞。最后共有5例患者死亡,均死于多器官功能衰竭和严重感染。

结论:放射介入治疗可迅速明确出血部位并进行有效的栓塞止血,是重症急性胰腺炎合并腹腔出血时首选的紧急治疗方法。

赵刚,王春友,熊炯炘,陈立波.重症急性胰腺炎并发腹腔出血的放射介入治疗.世界华人消化杂志 2004;12(5):1241-1243

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1241.asp>

### 0 引言

随着外科重症监护和多器官功能不全(MODS)防治水平的提高,重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)早期死亡率明显降低,多数患者死于SAP的严重后期并发症,如出血、严重感染等。腹腔内出血是SAP的严重后期并发症,统计表明其死亡率高达50%<sup>[1-3]</sup>,因此积极防治SAP引起的血管破裂出血是进一步改善SAP治疗效果的关键之一。我科1999-02/2002-09对17例SAP合并腹腔内大出血的患者实施经皮出血动脉栓塞(percutaneous arterial embolism, PAE)介入治疗,取得较好疗效,现将治疗经验总结如下:

### 1 材料和方法

1.1 材料 本组共17例,其中男10例,女7例,出血时APACHE II评分平均为9.8±2.2。17例患者中10例(58.8%)为胆源性胰腺炎,4例(23.5%)为酒精性胰腺炎,3例(17.7%)为高脂血症引起的胰腺炎。胰腺坏死灶清除术前发生腹腔大出血者13例(76.4%),平均出血时间为发病后第32±4.7d。坏死灶清除术后发生腹腔大出血者4例(23.6%),平均出血时间为手术后第10±2.7d。多数患者主要以腹腔内出血为主要症状,其中合并消化道出血症状者3例(17.6%)。

1.2 方法 患者在通过输血、输液及抗休克治疗后,肌

动力学异常时,即使无胸痛,也应考虑心肌梗塞。

恶心、呕吐、纳差为尿毒症的常见症状,且随病情进展加剧。本组中6例均以恶心呕吐为首发症状,伴不同程度的高血压、贫血。如患者出现纳差、恶心、呕吐,尤其伴贫血和/或血压增高时,应考虑肾功能衰竭。

颅内压增高可直接或间接刺激呕吐中枢引起呕吐。本组中脑血管意外5例,脑囊肿1例,呕吐均为非喷射性,说明颅内压增高时出现的呕吐不一定为喷射性。对于老年人,尤其是伴有高血压或糖尿病者,突然出现呕吐,应考虑脑血管疾病。本组中脑囊肿患者为36岁男性,无头痛及异常神经系统症状和体征,每于输液约1000 mL后恶心呕吐明显加重,停止输液后稍缓解;提示对于输液后出现或加重的呕吐应警惕有无颅内高压。

系统性红斑狼疮患者常见消化系统症状,本组中4例以恶心呕吐为首发症状。以消化系统症状为首发或主

要表现的系统性红斑狼疮表现不具特异性,常误诊<sup>[3]</sup>。如恶心呕吐为主要表现,诊断不明确时,尤其是女性患者,应考虑系统性红斑狼疮。另外,育龄妇女如出现呕吐,应考虑早期妊娠,即使患者避孕。

总之,恶心呕吐为临床常见症状,其病因多为消化系统疾病,但临床上其他系统疾病引起者亦常见,部分以恶心呕吐为首发症状或主要表现而收治消化科。临床医生应思路广阔,把握恶心呕吐的鉴别诊断,以避免误诊。

#### 4 参考文献

- 1 余保平,李瑾,杨拓,董卫国,罗和生.甲状腺功能亢进症102例消化系统表现临床分析.中国临床医学 2000;7:345-346
- 2 叶蓉绍,高寅春,王仲祥,贺贤年.糖尿病胃肠功能异常的观察.中国实用内科杂志 1994;14:653-654
- 3 张煌,曾学军,董怡,陆星华,李明佳.系统性红斑狼疮的消化系统临床表现157例分析.中华消化杂志 1999;19:42-44

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

• 临床经验 •

## 重症急性胰腺炎并发腹腔出血的放射介入治疗

赵刚,王春友,熊炯炘,陈立波

赵刚,王春友,熊炯炘,陈立波,华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心 湖北省武汉市 430022  
项目负责人:王春友,430022,湖北省武汉市解放大道1277号,华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心. cywang52@hotmail.com  
电话:027-85726273 传真:027-85726830  
收稿日期:2003-12-23 接受日期:2004-02-01

### 摘要

目的:探讨介入治疗在重症急性胰腺炎并发腹腔出血时的应用价值。

方法:回顾性分析1999-02/2002-09本科收治的17例重症急性胰腺炎并发腹腔出血患者行血管介入治疗的临床资料及治疗结果。

结果:共有14例患者通过数字血管减影明确出血部位,用弹簧圈栓塞动脉近端后成功止血者12例,垂体后叶素灌注止血2例。3例患者未找到出血主支而行手术止血,3例患者反复出血进行多次栓塞。最后共有5例患者死亡,均死于多器官功能衰竭和严重感染。

结论:放射介入治疗可迅速明确出血部位并进行有效的栓塞止血,是重症急性胰腺炎合并腹腔出血时首选的紧急治疗方法。

赵刚,王春友,熊炯炘,陈立波.重症急性胰腺炎并发腹腔出血的放射介入治疗.世界华人消化杂志 2004;12(5):1241-1243

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1241.asp>

### 0 引言

随着外科重症监护和多器官功能不全(MODS)防治水平的提高,重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)早期死亡率明显降低,多数患者死于SAP的严重后期并发症,如出血、严重感染等。腹腔内出血是SAP的严重后期并发症,统计表明其死亡率高达50%<sup>[1-3]</sup>,因此积极防治SAP引起的血管破裂出血是进一步改善SAP治疗效果的关键之一。我科1999-02/2002-09对17例SAP合并腹腔内大出血的患者实施经皮出血动脉栓塞(percutaneous arterial embolism, PAE)介入治疗,取得较好疗效,现将治疗经验总结如下:

### 1 材料和方法

1.1 材料 本组共17例,其中男10例,女7例,出血时APACHE II评分平均为9.8±2.2。17例患者中10例(58.8%)为胆源性胰腺炎,4例(23.5%)为酒精性胰腺炎,3例(17.7%)为高脂血症引起的胰腺炎。胰腺坏死灶清除术前发生腹腔大出血者13例(76.4%),平均出血时间为发病后第32±4.7d。坏死灶清除术后发生腹腔大出血者4例(23.6%),平均出血时间为手术后第10±2.7d。多数患者主要以腹腔内出血为主要症状,其中合并消化道出血症状者3例(17.6%)。

1.2 方法 患者在通过输血、输液及抗休克治疗后,肌

注 654-210 mg, 全部患者均经股动脉常规行腹腔、肠系膜上、下三支动脉数字血管减影造影(digital subtraction angiography, DSA). 若出血部位与小肠气重叠, 可让患者转动体位或进行斜位 DSA. DSA 明确诊断后, 则行 PAE 治疗. 对于脾动脉或胃、十二指肠动脉出血, 需行超选择插管, 再用不锈钢弹簧圈或加明胶海绵栓塞. 对于肠道小血管破裂出血, 可在肠系膜上动脉或下动脉灌注垂体后叶素, 20 min 内灌注 6 U 后行 DSA 观察疗效. 若出血征象未消失, 则在 20 min 内继续灌注垂体后叶素 10 U 灌注, 同时监测血压.

## 2 结果

经 DSA 检查发现, 17 例患者中假性动脉瘤破裂出血者 12 例(70.6%), 弥漫性肠系膜血管分支出血 2 例(11.8%), 不能明确出血部位者 3 例(11.6%). 12 例假性动脉瘤患者中发生于脾动脉者 9 例(图 1), 其中 4 例合并胰腺假性囊肿形成; 胃十二指肠动脉及其分支破裂出血 3 例, 可见明显造影剂外渗. 12 例患者使用弹簧圈栓塞动脉近端后均成功止血(图 2), 但有 3 例(11.6%)患者反复出血进行多次栓塞, 最终均因合并严重感染和 MODS 而死亡. 2 例患者由于肠系膜动脉小分支无法进行栓塞, 于 20 min 内灌注垂体后叶素 6 U 后未观察到继续出血. 3 例患者未找到出血主支而行紧急手术, 2 例患者术中发现主要为腹膜后及胰床血管广泛破裂出血, 清除坏死组织后缝扎暂时止血; 另 1 例术中发现为广泛渗血, 即输注大量全血、血小板及冷沉淀后止血, 最后证实为血友病 A. 4 例患者因反复出血而多次进行栓塞治疗, 其中 3 例患者最终因多器官功能衰竭而死亡, 另 1 例患者经过两次栓塞后未再发生出血. 最后, 17 例患者中共有 12 例(70.6%)痊愈出院, 其余 5 例均因多器官功能衰竭而死亡.



图 1 DSA 造影后可见脾动脉假性动脉瘤形成并有造影剂泄露.

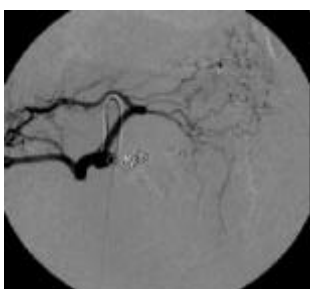


图 2 经 PAE 弹簧圈栓塞后未见到动脉瘤及造影剂泄露.

## 3 讨论

腹腔出血为 SAP 严重并发症之一, 尽管其发生率较低, 但常常危及患者生命. 腹腔动脉在胰液中胰蛋白酶和胰弹性蛋白酶的消化作用下, 管壁被腐蚀使管壁强度减弱而形成假性动脉瘤, 继而发生破裂出血, 当局部坏死组织和积液合并感染时破裂出血的可能性更大<sup>[4-6]</sup>. 此外, 胰腺炎症容易导致脾静脉、肠系膜静脉血栓形成并进一步造成胃短静脉、食管胃底静脉曲张. 当胰腺坏死、胰漏合并感染, 感染波及胃、十二指肠并形成坏死或穿孔时, 极易造成上消化道出血<sup>[7-9]</sup>. 本组资料结果表明, SAP 时动脉瘤破裂出血发生率依次为脾动脉、胃十二指肠动脉、胰十二指肠动脉, 而国外资料报道则是胃十二指肠动脉瘤发生率高于脾动脉瘤发生率<sup>[11]</sup>, 这可能与观察例数有关. 此外, 当 DSA 及手术中均未发现明显出血血管时, 一定要考虑到少见病因如血友病、DIC 等的可能, 本组资料中即有 1 例证实为血友病 A 患者.

腹腔出血的早期诊断对于 SAP 患者的预后极为重要, 当患者在病程中出现以下情况即可认为合并腹腔大出血需要行紧急治疗: (1)患者突然发生烦躁、神志模糊, 血压下降, 心率增快等休克前期症状; (2)患者出现大量呕血、便血或胃管、腹腔引流管引流大量血性液体; (3)患者血红蛋白含量下降超过 2 g/L; (4)经过紧急输液、扩容、抗休克治疗无明显好转或病情暂时稳定后再次恶化. 动态增强 CT 对于胰腺本身或者胰周急性出血有良好显示效果, 局部密度值较正常升高大于 30 HU 即可认为有急性出血, 可初步明确出血部位、出血量以及是否为假性囊肿内出血等, 而血管造影对于进一步明确出血部位则是十分必要的<sup>[10-12]</sup>.

SAP 时局部炎性渗出及粘连严重, 胰周血管丰富而解剖复杂. 若行手术止血难度较大, 风险较高, 不易找到明确的出血部位, 有资料报道手术止血死亡率高达 40% 左右<sup>[13]</sup>. PAE 的突出优势在于可以迅速明确出血部位, 同时可有效地进行栓塞止血, 同时 PAE 对患者的微创性可避免加重病情<sup>[14-16]</sup>. 但对于 PAE 止血失败或止血后复发出血者, 手术止血是非常必要的. 本组资料显示, PAE 止血近期成功率为 70.6%(12/17), 而出血多次行 PAE 治疗则预后较差, 本组 3 例患者全部死亡. 因此就紧急止血而言, 最有效的方法是 PAE. 我们的资料显示, 反复出血的 4 例患者均合并严重的感染, 表明 PAE 对于单纯腐蚀性动脉瘤止血效果较好, 但对感染性动脉瘤止血效果差, 局部病灶的感染及胰液的腐蚀相互作用可造成短期内再次出血. PAE 止血失败及并发症发生的原因除感染因素外, 主要包括: (1)动脉痉挛使导管不能置入选择动脉; (2)栓塞置管过程中动脉破裂或动脉穿孔; (3)栓塞剂如钢丝绕圈或海绵脱出; (4)缺乏侧枝循环造成缺血性并发症等.



#### 4 参考文献

- 1 Flati G, Andren-Sandberg A, La Pinta M, Porowska B, Carboni M. Potentially fatal bleeding in acute pancreatitis: pathophysiology, prevention, and treatment. *Pancreas* 2003; 26:8-14
- 2 Zhao G, Wang CY, Wang F, Xiong JX. Clinical study on nutrition support in patients with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2105-2108
- 3 Testart J, Boyet L, Perrier G, Clavier E, Peillon C. Arterial erosions in acute pancreatitis. *Acta Chir Belg* 2001;101:232-237
- 4 Sohn YH, Joo YE, Park CH, Lee WS, Choi SK, Rew JS, Kim SJ. A case of multiple bleeding pseudoaneurysms complicating acute pancreatitis. *Korean J Gastroenterol* 2003;42:436-439
- 5 Lin CK, Chen CH, Yeh CH, Lin SL, Tsang YM, Sheu JC. Intrahepatic hemorrhage and subcapsular hematoma developing in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2003;50:571-573
- 6 Maher MM, Lucey BC, Gervais DA, Mueller PR. The role of imaging and interventional radiology. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2004;18 Acute Pancreatitis:
- 7 Carr JA, Cho JS, Shepard AD, Nypaver TJ, Reddy DJ. Visceral pseudoaneurysms due to pancreatic pseudocysts: rare but lethal complications of pancreatitis. *J Vasc Surg* 2000;32:722-730
- 8 Muller CH, Lahnert U, Schafmayer A, Lankisch PG. Massive intraperitoneal bleeding from tryptic erosions of the splenic vein. Another cause of sudden deterioration during recovery from acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1999;26:49-52
- 9 Moll R, Debus S, Franke S, Schindler G. Pseudoaneurysm of the right gastric artery. *Vasa* 2002;31:205-208
- 10 Habib E, Elhadad A, Slama JL. Diagnosis and treatment of spleen rupture during pancreatitis. *Gastroenterol Clin Biol* 2000;24:1229-1232
- 11 Balthazar EJ, Fisher LA. Hemorrhagic complications of pancreatitis: radiologic evaluation with emphasis on CT imaging. *Pancreatology* 2001;1:306-313
- 12 Beattie GC, Hardman JG, Redhead D, Siriwardena AK. Evidence for a central role for selective mesenteric angiography in the management of the major vascular complications of pancreatitis. *Am J Surg* 2003;185:96-102
- 13 Dasgupta R, Davies NJ, Williamson RC, Jackson JE. Haemosuccus pancreaticus: treatment by arterial embolization. *Clin Radiol* 2002; 57:1021-1027
- 14 de Perrot M, Berney T, Buhler L, Delgadillo X, Mentha G, Morel P. Management of bleeding pseudoaneurysms in patients with pancreatitis. *Br J Surg* 1999;86:29-32
- 15 Sugiki T, Hatori T, Imaizumi T, Harada N, Fukuda A, Kamikozuru H, Yazawa T, Noguchi T, Takasaki K. Two cases of hemosuccus pancreaticus in which hemostasis was achieved by transcatheter arterial embolization. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:450-454
- 16 Bhansali SK, Shah SC, Desai SB, Sunawala JD. Infected necrosis complicating acute pancreatitis: experience with 131 cases. *Indian J Gastroenterol* 2003;22:7-10

## 肠源性内毒素血症与肝病 出版

多种肝炎与肝病大多伴有肠源性内毒素血症(IETM)。胆病患者的临床表现与 IETM 密切相关, 常与患者血浆细胞因子, 炎性介质, 自由基等相伴而生。韩德五教授领导的山西医科大学肝病研究所 20 年来围绕 IETM 与肝病进行了深入而系统的研究, 在大量动物实验与临床研究基础上提出了新的观点和理论(1)一般认为各种肝炎是通过各自的病因及其发病机制所造成的肝损伤(称之为“原发性肝损伤”)。我们发现原发性肝损伤往往伴有 IETM, 后者通过过度或持续激活枯否细胞所释放的细胞因子, 炎性介质, 自由基等又损伤了肝组织, 这种肝损伤称之为“继发性肝损伤”。肝炎, 肝病患者的临床表现是这两种肝损伤的叠和; (2)由于 IETM 过度或持续激活枯否细胞可促使肝炎重症化(如重型肝炎)和慢性化(急性肝炎→慢性肝炎→肝纤维化→肝硬化→肝癌), 故对肝炎的发展与转归有着重要影响; (3)严重的急、慢性肝病可因内毒素而诱发肝功能衰竭。因此, IETM 是多种肝病的危险因素。此理论为防治肝炎, 肝病提供了新的思路。显然, 降低肠源性内毒素水平和阻断内毒素生物学效应的发挥就成了防治肝炎的关键因素之一。

本书共 10 章 51 节, 约 120 万字, 并附有百余张图片。内容主要取材于 40 名研究生(包括博士生与硕士生)的学位论文, 以证实此学说的客观存在。为了便与国际交流在论文之前附有英文摘要。本书对多种肝炎, 肝病的发病机制进行了再认识, 故对消化内、外科, 感染科医师, 病理生理学教师及研究生均有重要参考价值。

本书已由中国科学技术出版社出版, 各地新华书店发行。购买者也可与山西医科大学肝病研究所直接联系, 电话: 0351-4135067。

• 临床经验 •

# 慢性重型肝炎院内感染与红细胞参数分析

靳雪源, 赵红, 罗生强, 楼敏

靳雪源, 罗生强, 楼敏, 中国人民解放军第302医院内科 北京市 100039  
赵红, 山西省太原市铁路医院传染科 山西省太原市 030001  
项目负责人: 靳雪源, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院内科. xueyuanjin@yahoo.com  
电话: 010-66874639 传真: 010-88211180  
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

目的: 探讨慢性重型肝炎发生院内感染与红细胞参数之间的关系.

方法: 随机抽取我院收治的慢性重型肝炎患者205例, 平均年龄  $44 \pm 8$  岁, 男145例, 女60例, 发生院内感染者117例, 未发生者88例. 应用U检验, 对两组红细胞参数(RBC、Hb、MCV、RDW-CV)与院内感染的发生及住院费用的关系进行分析.

结果: 慢性重型肝炎发生院内感染组红细胞参数RBC、Hb较无感染组明显降低, 差异显著( $P < 0.01$ ), MCV则明显升高, 有统计学意义( $P < 0.01$ ), RDW-CV无明显差异( $P > 0.05$ ).

结论: 在慢性重型肝炎中由于各种原因造成红细胞数量、质量的下降, 致使红细胞天然免疫功能障碍, 从而发生院内感染机会增多.

靳雪源, 赵红, 罗生强, 楼敏. 慢性重型肝炎院内感染与红细胞参数分析. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1244-1245

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1244.asp>

## 0 引言

慢性重型肝炎的死亡率与院内感染有明显关系, 而红细胞的天然免疫功能也越来越受到关注, 因此, 为了提高慢性重型肝炎的治愈率, 我们对205例慢性重型肝炎红细胞参数(RBC、Hb、MCV、RDW-CV)与院内感染之间的关系进行分析.

## 1 材料和方法

1.1 材料 随机抽取我院收治的慢性重型肝炎患者205例, 平均年龄  $44 \pm 8$  岁, 男145例, 女60例, 发生院内感染者117例, 未发生者88例.

1.2 方法 慢性重型肝炎诊断符合1995-05全国传染病与寄生虫病会议修订的《病毒性肝炎防治方案》的标准. 红细胞参数: 红细胞(RBC,  $\times 10^{12}/L$ )、血红蛋白(Hb, g/L)、红细胞平均体积(MCV, FL)、红细胞体积分布宽度变异系数(RDW-CV, %), 静脉抗凝血2 mL, 日本东亚 Sysmex K-4500 全自动血球分析仪检测.

统计学处理 采用 Windows SAS 6.12 软件进行统计

学分析. 计量资料表示为  $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 进行U检验, 计数资料进行  $\chi^2$  检验.

## 2 结果

2.1 两组均衡性比较 两组在病情基础的早、中、晚期构成比无显著性差异( $\chi^2 = 0.392$ ,  $P > 0.05$ ), 平均年龄也无显著性差异( $U = 1.65$ ,  $P > 0.05$ ), 故均衡性好, 有可比性(表1).

表1 两组均衡性比较

组别	病情分期			年龄(岁)
	早期	中期	晚期	
有院内感染	36	30	51	$36 \pm 15$
无院内感染	10	15	24	$39 \pm 11$

2.2 红细胞参数与院内感染及住院费用的关系 慢性重型肝炎发生院内感染组红细胞参数RBC、Hb较未发生院内感染组明显降低, 有显著性差异( $P < 0.01$ ), MCV则明显升高( $P < 0.01$ ), RDW-CV无明显差异( $P > 0.05$ ). 同时, 观察到在发生院内感染的患者中, 由此引起的住院费用明显增多( $P < 0.01$ )(表2).

表2 红细胞参数与院内感染及住院费用的关系

RBC参数	院内感染组	无院内感染组	U值	P值
RBC( $\times 10^{12}/L$ )	$2.49 \pm 0.76$	$3.0 \pm 0.93$	2.58	$< 0.01$
Hb(g/L)	$87.31 \pm 27.89$	$101.76 \pm 27.65$	6.7	$< 0.01$
MCV(FL)	$115.8 \pm 4.3$	$98.8 \pm 6.7$	13.5	$< 0.01$
RDW-CV(%)	$22.1 \pm 3.6$	$20.5 \pm 5.1$	1.6	$> 0.05$
住院费(元)	$45\ 132.9 \pm 1\ 937.0$	$1\ 270.8 \pm 1\ 214.6$	121.5	$< 0.01$

## 3 讨论

我国慢性重型肝炎占重型肝炎的绝大部分, 预后差, 死亡率高<sup>[1-11]</sup>, 而一旦发生院内感染, 病情往往急转之下, 加速肝衰竭. 本研究发现红细胞的数量、血红蛋白、红细胞平均体积等参数与慢性重型肝炎的院内感染发生率密切相关.

近来, 红细胞免疫与肝病的关系受到越来越多的重视<sup>[12-20]</sup>. 由于红细胞数量巨大, 在机体天然免疫中红细胞起着抗原“递呈”作用. 红细胞上有CR1、CR3、CD58、CD59、CD55(DAF)、CD44s、EckR、NKEF、肿瘤坏死因子的诱导因子等多种免疫物质, 红细胞是一种天然免疫刺激剂和免疫调节剂<sup>[12]</sup>. 肝病时红细胞免疫受损, 表现在膜表面的红细胞补体受体I型(CR1)数量

与活性下降、胞质中SOD酶活性下降、红细胞趋化因子受体(ECKR)活性明显低下<sup>[21-30]</sup>;慢性重型肝炎患者,由于营养不良、出血、溶血、脾功能亢进、自身免疫的参与、病毒引起骨髓抑制等多种原因造成贫血<sup>[31-37]</sup>,多为大细胞非均一性贫血<sup>[30]</sup>,与我们观察结果基本一致。由各种原因导致的贫血使红细胞数量、质量的下降,也造成红细胞天然免疫功能障碍;同时肝病白细胞免疫功能低下、紊乱和红细胞免疫功能异常也密切相关<sup>[12, 21]</sup>。正如我们也观察到:慢性重型肝炎发生院内感染的患者中红细胞参数:RBC、Hb较无感染组明显降低,差异显著( $P < 0.01$ ),MCV则明显升高,有统计学意义( $P < 0.01$ ),RDW-CV无明显差异( $P > 0.05$ ),存在大细胞性贫血。有研究也表明红细胞参数与胆碱脂酶、白蛋白成负相关,与凝血酶原时间成正相关,说明红细胞参数动态变化可做慢性重型肝炎预后的参考指标<sup>[30]</sup>。

因此,在慢性重型肝炎中重视红细胞相关参数的动态变化,对病情预后的判断、院内感染的控制等方面都有重要意义。在治疗原发病的基础上,针对不同原因积极纠正贫血是很必要的。适当补充维生素B<sub>12</sub>、叶酸,根据血清铁含量决定是否补铁,必要时给予输新鲜全血或红细胞。

#### 4 参考文献

- 1 沈宏辉, 邹正升, 陈菊梅, 辛绍杰, 邢汉前, 李建宇, 刘艳萍, 李保森. 慢性重型肝炎122例的死因比较分析. 世界华人消化杂志 2001;9:1084-1086
- 2 靳雪源, 张玲霞, 赵红, 楼敏, 谢建芳. 老年慢性重型肝炎的临床特点附79例病历分析. 世界华人消化杂志 2002;10:482-483
- 3 王宇明, 陈耀凯, 顾长海, 蒋黎, 向德栋. 重型肝炎命名和诊断分型的再认识 - 附447例临床分析. 中华肝脏病杂志 2000;8:261-263
- 4 顾长海. 重型肝炎诊断应与国际接轨. 中华肝脏病杂志 2000;8:307
- 5 Tandon B, Bernauau J, O' Grady J, Gupta SD, Krisch RE, Liaw YF, Okuda K, Acharya SK. Recommendations of the International Association for the study of the liver Subcommittee on nomenclature of acute and subacute liver failure. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:403-404
- 6 王宇明, 顾长海. 重型肝炎的概念和诊断 - 历史变迁、现状和展望. 中华肝脏病杂志 2000;8:5-8
- 7 江建宁, 周桂英, 黄高明, 苏明华, 李向红. 影响重型肝炎患者预后因素的COX模型分析. 中华肝脏病杂志 2000;8:245
- 8 赵敏, 王慧芬. 97例慢性重型肝炎生存分析. 临床肝胆病杂志 2000;16:50-51
- 9 Acharya SK, Panda SK, Saxena A, Gupta SD. Acute hepatic failure in India: A perspective from the East. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:473-479
- 10 Ostapowicz G, Lee WM. Acute hepatic failure: a western perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:480-488
- 11 Mas A, Rodes J. Fulminant hepatic failure. *Lancet* 1997;349:1081-1085
- 12 郭峰, 张乐之, 许育, 钱宝华. 肝脏疾病的红细胞免疫学研究. 世界华人消化杂志 2001;9:123-125
- 13 Maruyama S, Hirayama C, Yamamoto S, Koda M, Udagawa A, Kadowaki Y, Inoue M, Sagayama A, Umeki K. Red blood cell status in alcoholic and non-alcoholic liver disease. *J Lab Clin Med* 2001;138:332-337
- 14 郭峰, 赵书平, 叶芳耘, 张乐之. 肝病患者红细胞cr-1基因组密度多态性与红细胞免疫黏附肿瘤细胞能力的相关性. 华人消化杂志 1998;6:841-843
- 15 孙自勤, 王要军, 权启镇, 张志坚. 急性肝损伤时RBC免疫功能与脂质过氧化物改变及维生素E的影响. 新消化病学杂志 1996;4:6-8
- 16 席启辉, 余临州, 于强, 许永春, 李世旺, 傅颖媛. 乙肝患者细胞免疫及红细胞免疫功能的初步观察. 江西医药 1995;30:329-331
- 17 王海滨, 郭峰. HBV携带者红细胞C<sub>3b</sub>R和ICR的检测. 上海免疫学杂志 1999;19:113-114
- 18 郭峰, 郭伟秀, 李微. 中药天花粉对人红细胞免疫功能的影响. 解放军医学杂志 1998;23:455-456
- 19 王浩然. NIDDM患者红细胞膜脂质过氧化作用与红细胞免疫功能之间的关系. 中华微生物学和免疫学杂志 1995;15:188-190
- 20 郭峰, 钱宝华, 闵碧荷. 血液免疫学研究. 第1版. 上海: 第二军医大学出版社, 1998:3-11
- 21 Waitumbi JN, Opollo MO, Muga RO, Misore AO, Stoute JA. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe plasmodium falciparum anemia. *Blood* 2000;95:1481-1486
- 22 Rudd PM, Morgan BP, Wormald MR, Harvey DJ, Van den Berg CW, Davis SJ, Ferguson MA, Dwek RA. The glycosylation of the complement regulatory protein, human erythrocyte CD59. *Adv Exp Med Biol* 1998;435:153-162
- 23 Ernst M, Sonneborn HH. Flow cytometric investigation of non-specific erythrocyte antigens. *Transfus Clin Biol* 1997;4:149-152
- 24 Dervillez X, Oudin S, Liby MT, Tabary T, Reveil B, Philbert F, Bougy F, Pluot M, Cohen JH. Catabolism of the human erythrocyte C3b/C4b receptor (CR1,CD35):vesiculation and/or proteolysis. *Immunopharmacology* 1997;38:129-140
- 25 Shichishima T, Satoh Y, Terasawa T, Ogawa K, Maruyama Y. Relationship between the phenotypes of circulating erythrocytes and cultured erythroblasts in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1997;90:435-443
- 26 王海滨, 郭峰. 国内外红细胞免疫功能研究的现状与展望. 深圳中西医结合杂志 1999;9:3-4
- 27 张剑平, 徐道振. 肝病患者红细胞免疫研究的概况及意义. 深圳中西医结合杂志 1999;9:5-6
- 28 郭峰. 红细胞免疫研究重大进展的回顾与思考. 深圳中西医结合杂志 1999;9:1-2
- 29 郭峰, 姚广金, 孟祥英, 何铁牛, 方国恩. 血清中红细胞免疫黏附促进因子的测定. 上海免疫学杂志 1988;8:440-441
- 30 孙玉红, 杨春生, 王凤燕, 宋相英, 刘建敏. 慢性重型肝炎红细胞参数动态变化及临床意义. 中华肝脏病杂志 2000;8:121
- 31 卢书伟, 赵红心. 病毒性肝炎并发急性溶血性贫血16例. 新消化病学杂志 1997;5:503
- 32 侯振江, 张宗英, 赵勇, 安国瑞, 耿素敏. 肝硬变患者红细胞血小板参数与直方图分析. 华人消化杂志 1998;6:138-139
- 33 Palanduz A, Yildirmak Y, Telhan L, Arapoglu M, Urganci N, Tufekci S, Kayaalp N. Fulminant hepatic failure and autoimmune hemolytic anemia associated with Epstein-Barr virus infection. *J Infect* 2002;45:96-98
- 34 Ekanem EE, Etuk IS, Uniga AJ. Features of childhood hepatic failure in Calabar, Nigeria. *Niger Postgrad Med J* 2001;8:86-89
- 35 Pardi DS, Romero Y, Mertz LE, Douglas DD. Hepatitis-associated aplastic anemia and acute parvovirus B19 infection: a report of two cases and a review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1998;93:468-470
- 36 Otegbayo JA. Complications contributing to mortality in acute hepatitis at the University College Hospital, Ibadan, Nigeria. *Niger J Med* 2001;10:127-129
- 37 Srinivasan R. Autoimmune hemolytic anemia in treatment-naive chronic hepatitis C infection. *J Clin Gastroenterol* 2001;32:245-247

• 临床经验 •

# 传染性非典型肺炎患者不同病程粪便标本中SARS-CoV的分离与鉴定

田 薇, 邓亚军, 吴清发, 王绪敏, 杨 玲, 张 峰, 刘晨辉, 包其郁, 汪 建, 杨焕明, 刘明旭

田薇, 西安交通大学医学院卫生部法医学重点实验室 陕西省西安市710061  
邓亚军, 杭州华大基因研发中心 浙江省杭州市 310008  
吴清发, 王绪敏, 杨玲, 张峰, 刘晨辉, 汪建, 杨焕明, 刘明旭, 中科院北京基因组研究所, 北京华大基因研究中心 北京市 101300  
包其郁, 浙江大学沃森基因组科学研究院, 杭州华大基因研发中心 浙江省杭州市 310008  
项目负责人: 刘明旭, 101300, 北京市, 北京空港工业开发区 B-6, 北京华大基因研究中心. liumx@genomics.org.cn  
电话: 010-80481102 传真: 010-80498676  
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-01-13

## 摘要

目的: 从粪便标本中分离并鉴定SARS-CoV.

方法: 粪便浸出液接种 Vero-E6 细胞, 盲传至出现明显的细胞病变效应(CPE), 并能稳定传代. 采用电镜法和 RT-PCR 技术鉴定细胞培养物中的 SARS-CoV (本实验均在 BSL-3 实验室完成).

结果: 大部分样本用 Vero-E6 细胞盲传 3 代后发现明显的 CPE, 并能稳定传代. 电镜负染检查, 出现 CPE 的细胞可查见病毒颗粒; 培养物上清 RT-PCR 扩增均为阳性. 粪便样本直接用 RT-PCR 检测, 阳性率仅为 50%, 细胞培养的检出率为 73%.

结论: 采用细胞培养结合 RT-PCR 技术检测粪便标本 SARS-CoV 比粪便标本直接 RT-PCR 的阳性率高.

田薇, 邓亚军, 吴清发, 王绪敏, 杨玲, 张峰, 刘晨辉, 包其郁, 汪建, 杨焕明, 刘明旭. 传染性非典型肺炎患者不同病程粪便标本中 SARS-CoV 的分离与鉴定. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1246-1248

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1246.asp>

## 0 引言

SARS 冠状病毒(SARS-CoV)是一种新的冠状病毒<sup>[1-6]</sup>, 经呼吸道传播, 传染性强, 潜伏期短, 死亡率高, 主要分布在人体的肺、肝等器官及全身的淋巴组织, 同时也可存在于血液和粪便<sup>[3, 7]</sup>.

迄今为止, 关于 SARS-CoV 的分离培养, 主要见于对鼻咽拭子等呼吸道样本以及尸解组织器官的病毒培养, 尚未见对患者粪便标本进行 SARS-CoV 分离培养的报道. 我们采用体外病毒分离技术从北京佑安医院 2003-05-16/06-09 收集的 12 例患者 30 份标本中, 分离获得了 SARS-CoV 原始分离物. 电镜和 RT-PCR 技术均证实细胞培养物中含有 SARS-CoV. 现报道如下:

## 1 材料和方法

1.1 材料 病例与样品: 粪便标本由北京佑安医院提供,

时间 2003-05-16/06-09, 所有患者都符合 WHO 对 SARS 疑似病例的诊断定义 (<http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>). 12 例 SARS 患者中男 5 例, 女 7 例, 27-63 岁, 病程 12-65 d (从发病之日计算), 共 30 份粪便样本(部分样本来自同一患者的不同病程). 引物: 根据 SARS-CoV BJ01 株基因组序列(AY278488), 设计 4 对引物(其中 2 对为巢式引物), 序列如下: SARS73: 5' CA AAACCCCAACTTTGAAAT 3' 和 5' CAGAGGTGGC AACACTGTAA 3', 扩增产物长度为 226 bp, SARS73 巢式引物(SARS73N): 5' CTTTTATTGAGGACTTGCTCT 3' 和 5' ACTTCTGCGCACAAATGAG 3', 扩增产物长度 118 bp; SARS81: 5' AACTCCTGGAACAATGGAAC 3' 和 5' TAAGCCACATCAAGCCTACA 3', 扩增产物长度为 238 bp, SARS81 巢式引物(SARS81N): 5' TTCC TAGCCTGGATTATGTT 3' 和 5' AGCACAAAACAAG CAAGTGT 3' 扩增产物长度 120 bp. 上述引物分别位于 SARS 冠状病毒 S 糖蛋白和 M 蛋白基因的保守区.

## 1.2 方法

1.2.1 粪便样本处理 挑取少许样本至 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 生理盐水, 振荡混匀, 室温 5 000 rpm 离心 3 min. 取上清液 140  $\mu$ L 用来提取病毒 RNA, 其余上清通过 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 获得粪便浸出液, 用于病毒分离.

1.2.2 SARS-COV 分离 Vero-E6 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养传代, 细胞接合度达到 80-90% 时, 接种粪便浸出液 1 mL, 感染 2 h. 随后吸出粪便浸出液, 加 1 mL 上述 DMEM, 置 CO<sub>2</sub> 培养箱 37  $^{\circ}$ C 培养. 2 d 后每天在显微镜下观察细胞状态, 记录是否出现细胞病变效应(CPE). 如果不出现 CPE, 4-6 d 盲传 1 次. 传代至出现 90% CPE 时, 收集病毒液, 转到 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中放大增生. 富集足够的病毒, 保存毒种, 进行电镜鉴定.

1.2.3 电镜和 RNA 样本制备 用 QiAamp Viral RNA 提取试剂盒(GIAGEN 产品)分别从粪便浸出液和出现 CPE 的细胞培养上清液中提取 RNA, 用于逆转录 PCR. 出现 CPE 的培养细胞用 20-30 mL/L 戊二醛固定液固定 2 h, 用于电镜检查.

以上操作均在中国科学院北京基因组学研究所/北京华大基因研究中心的 BSL-3 实验室内进行.

1.2.4 电镜鉴定 以 30 g/L 磷钨酸溶液负染色, 透射电镜观察.

1.2.5 RT-PCR 检测 病毒 RNA 逆转录用 Promega 的 Reverse Transcription System, 按说明书操作. PCR 及巢

式 PCR 按常规方法进行<sup>[2, 8]</sup>.

1.2.6 血清抗体的测定 采用 ELISA 方法, 用酶标仪 (Multiskan Ascent, Finland) 测定 AD<sub>450</sub> (参考波长为 630 nm), IgG 大于 0.18, IgM 大于 0.16 判为阳性.

## 2 结果

2.1 病毒分离和电镜鉴定 从 12 例患者共 30 份标本中成功分离得到 19 株原始分离物, 多数标本用 Vero-E6 细胞盲传 3 代后即出现明显的 CPE (图 1), 并能稳定传

代. 电镜负染检查从粪便浸出液接种的病变 Vero-E6 细胞, 均未见病毒颗粒 (图 2).

2.2 RT-PCR 扩增结果 临床粪便样本 30 份直接用 RT-PCR 法扩增, 其中阳性 15 份, 阳性率为 50% (15/30); 细胞培养病毒阳性 19 份, 经 RT-PCR 检测全为阳性, 阳性率为 73% (19/26) (表 1). 对其中 12 例的粪便标本和细胞培养分离物同时进行 RT-PCR 和巢式 PCR (SARS73 和 SARS81 引物及其相应的巢式引物), PCR 反应产物的大小与预期结果完全相同.

表 1 12 例 SARS 患者粪便标本 SARS-COV 的不同方法鉴定结果

病例	年龄 / 性别	取样时间	病程(d)	临床样本 RT -PCR 结果	分离结果	分离后 RT -PCR 结果	IgG		IgM	
							5.24	6.3	5.24	6.3
1	63/女	03-5-16	24	+	+	+				
		03-5-20	28	+	+	+				
		03-5-23	31	+	+	+	0.489	ND	0.073	ND
		03-5-27	35	-	+	+				
		03-6-03	42	-	+	+				
2	48/女	03-5-16	27	+	+	+	0.242	ND	0.076	ND
3	56/女	03-5-16	32	+	+	+	ND	ND	ND	ND
		03-5-20	36	+	+	+				
4	60/男	03-5-16	58	-	+	+				
		03-5-20	62	+	NS	NS	ND	ND	ND	ND
		03-5-23	65	+	+	+				
5	35/女	03-6-06	53	+	+	+	0.352	0.462	0.112	0.150
6	41/女	03-5-16	33	+	+	+	ND	ND	ND	ND
		03-5-16	30	-	+	+				
		03-5-20	34	-	-	-				
		03-5-27	41	+	+	+	0.711	1.026	0.054	0.041
		03-6-3	48	-	-	-				
7	50/女	03-6-6	51	-	NS	NS				
		03-6-9	54	-	+	+				
		03-5-27	12	-	+	+				
		03-5-30	15	-	+	+	ND	0.127	ND	0.031
		03-6-6	22	-	-	-				
8	27/男	03-6-09	25	+	+	+				
		03-5-16	16	+	+	+				
		03-5-23	23	-	NS	NS	0.061	0.148	0.057	0.072
9	48/男	03-5-16	62	+	+	+	0.529	ND	0.041	ND
10	48/女	03-5-30	19	-	-	-	0.051	0.115	0.010	0.016
		03-5-30	19	-	NS	NS				
11	48/男	03-5-27	26	-	-	-				
		03-6-6	29	+	-	-	ND	0.118	ND	0.021

ND 未做, NS 无结果.

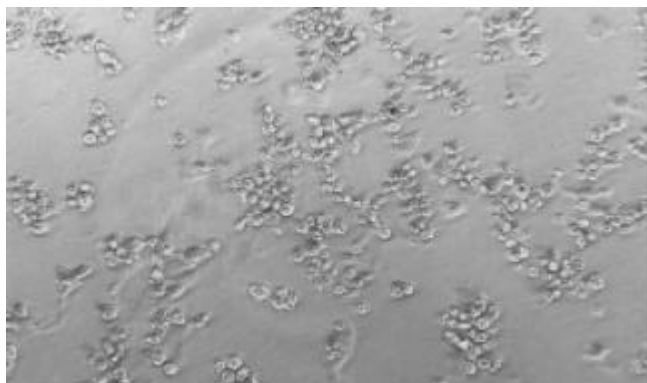


图1 粪便样本传第3代 Vero-E6 细胞.

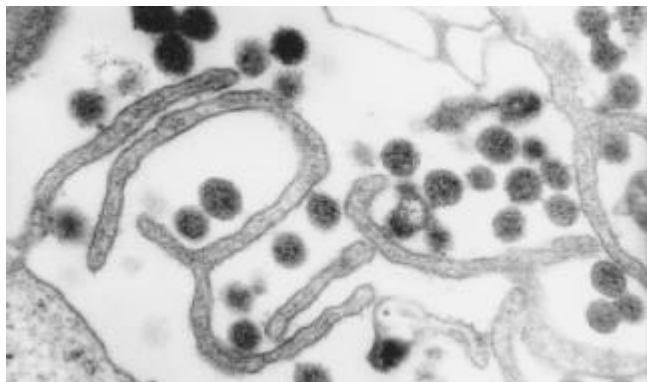


图2 粪便标本接种 Vero-E6 细胞培养液中的病毒颗粒.

### 3 讨论

在 SARS 患者体内的肺组织、肾脏、粪便中已发现冠状病毒<sup>[7, 9]</sup>, 可是从粪便中分离冠状病毒较为困难<sup>[10]</sup>, 至今为止没有报道从粪便分离病毒的例子. 我们对佑安医院 2003-05 住院的 12 例临床诊断 SARS 患者的粪便标本进行 SARS-CoV 检测, 从多数标本(19/26)中成功地分离出 SARS-CoV(其中包含病程长达 65 d 的 SARS 患者粪便标本), 并通过电镜形态学、血清学及 RT-PCR 扩增, 对分离的病原体予以鉴定. 所以 SARS-CoV 能否通过消化道传播, 值得进一步研究.

RT-PCR 是目前用来检测 SARS 病原体的重要方法之一, 在我们检测的 30 份标本中, 粪便标本直接 RT-PCR 的阳性率只有 50%(15/30), 经过病毒培养后阳性率为 73%(19/26), 表明病毒培养可提高粪便标本 SARS-CoV 的检出率.

由于标本来自多个患者的不同病程, 病毒载量不同, 出现 CPE 的时间也不同. 1 号患者 2003-05-20 的样本, 在传第二代 48 h 即出现 CPE, 第三代后即可接种到单层 Vero 细胞的培养瓶中稳定传代. 大多数样本由于病毒载量较低, 在盲传三代后方可观察到 CPE. 另外传代过程中收集的病毒培养液和细胞, 须在 -20℃ 反复冻融, 并吸附染毒 2 h, 这是成功分离病毒的关键.

### 4 参考文献

- 1 祝庆余, 秦鄂德, 王翠娥, 于曼, 司炳银, 范宝昌, 常国辉, 彭文明, 杨保安, 姜涛, 李豫川, 邓永强, 刘洪, 甘永华. 非典型肺炎病例标本中新型冠状病毒的分离与鉴定. 中国生物工程杂志 2003;23: 106-112
- 2 Ruan YJ, Wei CL, Ee AL, Vega VB, Thoreau H, Su ST, Chia JM, Ng P, Chiu KP, Lim L, Zhang T, Peng CK, Lin EO, Lee NM, Yee SL, Ng LF, Chee RE, Stanton LW, Long PM, Liu ET. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet* 2003;361:1779-1785
- 3 Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003; 361:1319-1325
- 4 Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348:1967-1976
- 5 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-1966
- 6 聂青和, 罗新栋, 惠武利. 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征. 世界华人消化杂志 2003;11:881-887
- 7 Holmes KV. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *J Clin Invest* 2003;111:1605-1609
- 8 Wang Y, Ma WL, Song YB, Xiao WW, Zhang B, Huang H, Wang HM, Ma XD, Zheng WL. Gene sequence analysis of SARS-associated coronavirus by nested RT-PCR. *Diyi Junyi Daxue Xuebao* 2003;23:421-423
- 9 田耕, 张泰昌, 杨惠青. 老年 SARS 患者 41 例消化系统损害的临床分析. 世界华人消化杂志 2004;12:233-235
- 10 陆海英, 霍娜, 童一帆, 王广发, 李海潮, 聂立功, 阙呈立, 李楠, 马静, 徐小元. SARS 伴腹泻病例的临床特点. 世界华人消化杂志 2003;11:1929-1931



• 临床经验 •

# 内镜下微创治疗良恶性胆管梗阻引流失败原因的分析及处理

刘变英, 雷宇峰

刘变英, 山西省人民医院内镜诊断治疗研究中心 山西省太原市 030001  
雷宇峰, 中国人民解放军第264医院消化科 山西省太原市 030001  
项目负责人: 刘变英, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院内镜诊断治疗研究中心. haiying@public.ty.sx.cn  
电话: 13603558158 传真: 0351-4935998  
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

目的: 探讨内镜下微创治疗良恶性胆管梗阻引流失败的原因及处理方法。

方法: 应用十二指肠镜行内镜下胆管引流术, 包括内镜鼻胆管引流术(endoscopic nasbiliary drainage, ENBD), 内镜胆管内置管引流术(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)和内镜胆管金属支架术(endoscopic metal biliary endoprosthesis, EMBE), 对其中失败的病例进行总结, 找出失败的原因及处理办法。

结果: 260例内镜下胆管引流术, 失败20例(不包括ERCP插管失败者)。其中ENBD失败15例, 经调整鼻-胆管位置, 更换鼻-胆管及重新ERCP插管均获得成功, ERBD失败4例, 经努力仍未成功, 改用PTCD; EMBE失败1例, 支架放置不到1 mo又出现胆管阻塞, 经原金属支架通道再放入塑料支架而恢复通畅引流。

结论: 经内镜胆管引流失败时, 应分析其原因, 采取相应的对策, 绝大多数失败是可以避免或补救的。

刘变英, 雷宇峰. 内镜下微创治疗良恶性胆管梗阻引流失败原因的分析及处理. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1249-1250

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1249.asp>

## 0 引言

近年来随着内镜诊疗技术的发展, 经内镜胆管引流术作为一项新的微创治疗技术, 给患者带来更好、更快的疗效和更少的创伤及痛苦, 其优越性是不言而喻的<sup>[1-3]</sup>。但是, 也有不少失败的教训, 为了总结经验, 减少操作失误, 提高成功率, 现将我们应用内镜胆管引流术失败的情况结合文献总结如下:

## 1 材料和方法

1.1 材料 自1997-07/2003-05共进行内镜胆管引流术260例, 男116例, 女144例, 年龄22-94岁, 平均64.7岁。急性胆管炎90例, 胆管炎合并结石81例, 急性胆源性胰腺炎17例, Oddi括约肌良性狭窄21例, 胆管恶性肿瘤32例, 壶腹部恶性肿瘤19例; 均有不同程度的黄疸。其中内镜鼻胆管引流术(endoscopic nasbiliary

drainage, ENBD)142例, 内镜胆管内塑料支架引流术(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)110例, 内镜胆管金属支架术(endoscopic metal biliary endoprosthesis, EMBE)8例。

1.2 方法 ENBD失败15例, 10例鼻-胆管打折者, 经调整其位置恢复通畅, 5例仍然不通或系鼻-胆管滑脱者, 重新行ENBD置管成功。ERBD失败4例, 1例因乳头水肿严重, 经多种方法再插管均无法成功而放弃内镜引流, 改用经皮肝穿刺胆管引流术(percutaneous transhepatic cholangio-drainage, PTCD)。其余3例均重新置管成功。EMBE失败1例, 因放置未超出肿瘤狭窄段而失败者, 经原金属支架通道再套置另一根金属支架而成功引流。

## 2 结果

260例中共失败20例(不包括ERCP插管失败者), 占7.7%。15例ENBD中13例(86.7%)经处理成功引流, 其中ENBD失败2例经处理全部通畅引流; ERBD 1例经努力仍未成功, 改用PTCD; EMBE 1例经处理通畅引流。

## 3 讨论

经内镜胆管引流时应强调预防失误, 一旦发生引流不理想, 应仔细分析原因, 及时处理, 以免延误病情, 造成不必要的麻烦。我们认为应当注意以下几点:

3.1 合理选择适应证 经内镜胆管引流术是近年来开展的一项新技术, 主要用于无手术适应证的恶性胆管梗阻、良性胆管梗阻、胆漏(瘘)及恶性黄疸手术前的减黄等, 其适应证很宽。但是, 当内镜方法不能达到缓解症状及有效治疗目的时, 不宜选择内镜胆管引流术<sup>[2]</sup>。如多发性肝内胆管癌、肝内广泛转移癌、肝内胆管型硬化性胆管炎、手术后胆管完全断离严重的凝血功能障碍、溶血性黄疸及肝细胞性黄疸、不能耐受内镜治疗或不合作者及生命垂危者。有重度食管静脉曲张者, ENBD应慎用, 以防术后引起曲张静脉破裂大出血。此外, 在选择术式时也应多方考虑, 例如因为金属支架不能取出, 且其端部可引起胆管壁的反复溃疡而致瘢痕再狭窄<sup>[3]</sup>, 多数学者将良性胆管疾病列为EMBE的禁忌证。

3.2 早发现引流不畅及早分析其原因 引流不畅的临床表现主要有黄疸进行性加重, 肝功能损害加重等; ENBD时可表现为注射造影剂或胆管冲洗不通畅、引流量骤减, 系引流管打折所致; 或造影剂直接注入肠腔、引流量突然增多而颜色变淡, 系引流管滑脱所致; ERBD及EMBE可表现为术时内镜下所見引流通而不

畅或不通, X线摄片可见支架未超出狭窄部或金属支架上端未膨开, 或发现胆管存在多发肿瘤等。

### 3.3 处理办法

3.3.1 ENBD时注意事项 (1)在置入鼻-胆管前应检查其是否损坏、老化及过期, 选择猪尾形的鼻胆管较易固定, 而直线形易移位; (2)保持导丝的引导作用, 防止导丝滑脱及打弯, 头部右侧成角的引流管通过其头端插入肝内胆管而不易移位。如能避免引流管在十二指肠内过度成袢, 预先定型十二指肠袢的引流管可防止移位; (3)鼻-胆管放置到位后, 应与助手密切配合, 退镜勿过快, 退出镜身与送入鼻-胆管应同步, 如在X线透视下退镜更为可靠, 合适的引流管应位于右上腹, 头部在肝曲, 与脊柱平行。移位的引流管会位于十二指肠的水平部, 与脊柱相交, 横位于腹部。必要时可在鼻-胆管后续接推送管, 直至十二指肠镜头退出口腔, 助手接牢引流管, 以防退镜过程中带出鼻-胆管; (4)在从鼻腔引出时, 防止鼻-胆管打折。用右手缓缓牵拉鼻-胆管, 用左手将鼻-胆管送至咽部, 并将其捋顺, 可防止鼻-胆管在口咽部打折; (5)在透视下牵出盘曲于胃腔的鼻-胆管, 注意牵引不要过快, 以防鼻-胆管打折及滑脱。引流管在胃内稍成袢可减少被牵拉的张力, 减少引流管由胆管滑入十二指肠的机会; (6)稳妥固定鼻-胆管, 以防意外脱出。

3.3.2 ERBD时注意事项 (1)根据胆管情况选择合适的内支架管, 主要包括支架的长度和直径。支架的长度=狭窄上端至乳头的长度+越过狭窄端的长度(2 cm)+乳头外留长度(1 cm)。一般10Fr支架可提供足够的引流作用, 更大的11.5Fr的支架, 因内径增大, 理论上可延缓支架的堵塞时间。 (2)ERBD置管的技术方面: 适当深插置管导管和导丝, 并关闭抬钳器, 调整大旋钮使镜端贴近乳头, 当引流管被推至镜端时, 完全打开抬钳器。适当用力将引流管推出内镜2-5 mm, 引流管出镜不宜太长, 否则由于反作用致置管失败的危险。此外, 应立即停止插入推进器, 合拢抬钳器, 调整大旋钮, 使镜端逼近乳头。如仍然无效, 可锁死抬钳器, 用右手持镜身, 边左右旋转边拉直内镜, 逐渐将引流管勾入胆管。当引流管尾翼进入视野, 插入深度满意后, 应保持推进器位置不变, 在X线透视下先抽出导丝后抽出推进器, 以防抽出导丝过程中将引流管带出。

3.3.3 EMBE时注意事项 (1)金属支架长度的选择应以

扩张后的长度为准, 有的金属支架释放后长度会缩短。在确定支架长度时应留有余地, 支架完全扩张后超出肿瘤两端的长度不宜小于2 cm, 以防肿瘤生长早期堵塞。 (2)支架的释放要根据所选种类而采取不同的方法。例如Wall-stent(Wilson-Cook的Z形支架, Schneider金属网状支架等), 由于支架释放过程中只能后拉不能前进, 所以, 可将支架送入略深处, 当支架端部张开后, 可慢慢后拉输送器。准备释放时, 须合适安置套管和支架的位置, 计算好支架扩张时缩短的长度(Z字形支架展开后, 长度不会缩短), 调整好支架位置后再完全释放支架。 (3)肝门肿瘤范围较广泛, 引流效果没把握或有严重的胆管炎时, 放置金属支架要慎重。应先行其他过渡性引流, 当引流效果满意。炎症控制后再改放金属支架较为稳妥<sup>[4]</sup>。 (4)EMBE失败者, 如支架放置未超出肿瘤狭窄的上端或胆管多发肿瘤当时未发现, 可尽早在其中央重新放置金属或塑料内支架超过梗阻的最高部位。如系肿瘤向支架内生长, 可采用单极电凝电极或电热电极进行肿瘤组织的烧灼, 可有效打开支架通道, 成功率较高<sup>[5-6]</sup>。有报道在金属支架覆盖一导聚氨基甲酸酯, 可有效阻止肿瘤向支架网眼内部生长, 延长支架的开放时间<sup>[7]</sup>。与其他综合治疗(如放疗)相结合, 亦可延长支架的开放时间<sup>[2]</sup>。

3.3.4 单纯十二指肠镜引流失败者, 可经胆管镜或PTC(PTCD)置入导丝, 用球囊对狭窄部进行扩张, 在内镜下定位, 并在透视下释放支架。

## 4 参考文献

- 1 龚彪, 周岱云. 经内镜鼻胆管引流375例评价. 中华消化内镜杂志 1997;14:77-80
- 2 刘后钰, 姚礼庆. 现代内镜学. 第1版. 上海: 复旦大学出版社, 2001:5
- 3 Eschelman DJ, Shapiro MJ, Bonn J, Sullivan KL, Alden ME, Hovsepian DM, Gardiner GA Jr. Malignant biliary duct obstruction: long-term experience with Gianturco stents combined modality radiation therapy. *Radiology* 1996;717-724
- 4 胡冰, 周岱云, 龚彪, 钱光相, 陈汉, 吴孟超. 内镜胆管引流术治疗301例肝门部恶性胆管梗阻的体会. 中华消化内镜杂志 1997;14:142
- 5 周平红, 姚礼庆, 高卫东, 何国杰, 徐美东, 秦新裕. 经内镜胆道引流治疗胆道梗阻. 中华消化内镜杂志 2002;19:284-287
- 6 雷宇锋, 刘变英. 内镜下胆管内、外引流术治疗梗阻性黄疸. 世界华人消化杂志 2002;10:1474-1475
- 7 Shim CS, Lee YH, Cho YD, Bong HK, Kim JO, Cho JY, Kim YS, Lee JS, Lee MS, Hwang SG, Shin KM. Preliminary result of a new covered biliary obstruction. *Endoscopy* 1998;30:345-350

• 临床经验 •

# 增强磁共振血管造影诊断肝细胞癌门静脉并发症

张水兴, 张雪林, 张玉娴, 张玉忠

张水兴, 张雪林, 张玉娴, 张玉忠, 中国人民解放军第一军医大学南方医院影像中心 广东省广州市 510515  
项目负责人: 张雪林, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学南方医院影像中心. shui@fimmu.com  
电话: 020-61642081  
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-22

## 摘要

目的: 探讨三维动态对比增强磁共振门脉血管造影(3D DCE MRP)诊断原发性肝细胞癌门脉血管并发症的影像表现及其诊断价值。

方法: 对33例原发性肝细胞癌患者行3D DCE MRP检查, 之后10 d内, 25例进行了数字减影血管成像(DSA)检查, 8例进行了外科手术治疗。以手术所见或DSA结果为标准, 对3D DCE MRP诊断门脉血管并发症的结果进行评价。

结果: 3D DCE MRP共诊断41条门脉主干或分支癌栓形成, 表现为梗阻端呈结节状24例, 不规则状17例, 伴有受累管腔扩张23例以及管壁的不连续光滑11例, 其诊断敏感性、特异性及诊断符合率分别为91.9%、88.7%及89.8%。同时检出12例门静脉海绵样变性, 表现为正常门静脉血管消失或中断, 代之以与门脉主干并行、迂曲扩张成蛇形的静脉网; 并提示6例肝动脉-门静脉瘘形成, 表现为“双轨征”(2例)或三级以上门静脉早显(4例)。

结论: 3D DCE MRP是诊断门脉癌栓、门脉海绵样变及肝动脉-门静脉瘘的有效方法, 可为临床采取正确的治疗方案提供必要依据。

张水兴, 张雪林, 张玉娴, 张玉忠. 增强磁共振血管造影诊断肝细胞癌门静脉并发症. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1251-1253  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1251.asp>

## 0 引言

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinomas, HCC)常易引起门脉分支或主干的癌栓, 继而可引起门静脉海绵样变性及肝动脉-门静脉瘘等血管并发症的形成。三维动态对比增强磁共振门脉血管造影(the three-dimensional dynamic contrast-enhanced magnetic resonance portography, 3D DCE MRP)是一种非损伤性血管成像检查方法, 已逐步应用于临床<sup>[1]</sup>。本研究通过与外科手术所见或DSA结果相对照, 进一步探讨3D DCE MRP诊断HCC门脉血管并发症的影像表现及其应用价值。

## 1 材料和方法

1.1 材料 HCC诊断明确, 所有病例均经过临床综合

检查(包括病史、体检、AFP、超声、CT、MRI、DSA或经皮肝穿), 符合1999年第四届全国肝癌会议制定的原发性肝癌诊断标准, 并经超声、CT或常规MRI诊为可疑门脉癌栓形成者。33例HCC患者, 其中男27例, 女6例, 年龄30-72岁, 平均43.3岁。有慢性乙型肝炎史17例, 合并肝硬化20例。巨块型15例, 多结节型9例, 弥漫型6例, 巨块+多结节型3例。所有病例均于3D DCE MRP检查后1-10 d(平均3 d)进行手术治疗, 其中行DSA并栓塞化疗25例, 外科手术治疗8例。

1.2 方法 采用仪器: SIEMENS公司1.5T magnetom vision plus VB33A超导型全身磁共振扫描仪, 相控阵体部线圈, SBP200型spectris MR专用压力注射器。扫描序列: 快速成像稳态进动序列(3D FISP)。扫描参数: TR/TE/FA/FOV/matrix分别为2 ms/5 ms/20°/35-40 cm/192 × 256, 3D块厚度70-90 mm, 有效层厚2 mm, 脂肪抑制, 采集时间18-21 s。对比剂: 选用Gd-DTPA, 剂量为0.4 mmol/kg, 速度2-3 mL/s, 注射完毕后20 mL生理盐水冲管。扫描前采用团注实验技术(bolus test)确定扫描延迟时间, 扫描均取冠状位, 范围包括门脉主干和肝内左右分支, 尽量同时包括肝静脉和下腔静脉, 扫描完毕后, 采用最大强度信号投影(maximum intensity projection, MIP)对原始图像进行三维重建。

## 2 结果

2.1 检查所见 (1) 门脉癌栓: 33例患者共可见41支门脉主干/一级分支内有癌栓形成。主要表现为门静脉主干和/或肝内分支突然中断或完全消失, 梗阻远端不显影。其中梗阻端呈不规则状17例(图1), 结节状24例(图3); 伴有受累管腔扩张23例以及受累管壁不连续光滑11例。(2) 门脉海绵样变12例(图1), 其中发生于门静脉主干8例, 发生于门静脉左右分支4例。主要表现为正常门静脉血管消失或中断, 代之以与门脉主干并行、迂曲扩张成蛇形的静脉网, 这些扩张静脉多位于有癌栓的门静脉旁, 沿着门脉系统分布, 且无肝动脉或胆管伴行。(3) 肝动脉-门静脉瘘6例(图2), 其典型表现为在动脉期癌肿内或其周围可见多发小草样门脉小分支显影或于肝外周出现与动脉平行的门静脉影称为“双轨征”, 此为周围型, 可见2例; 或表现为动脉期肝动脉未显示, 而三级以上门静脉早显, 此为中央型, 共见4例。

2.2 MRP影像表现与手术病理或DSA比较 外科手术探查或DSA证实有30例共37支门脉主干/一级分支内有癌栓形成, DSA同时检出14例门脉海绵样变及10

例肝动脉 - 门静脉瘘(中央型 4 例, 周围型 6 例). 将 33 例 HCC 患者手术病理或 DSA 检查结果与 3D DCE MRP 检查所见进行比较, 经统计学方法处理, 可得出 3D DCE MRP 对门脉主干及一级分支内癌栓诊断的敏感性、

特异性及诊断符合率分别为 91.9%、88.7%及 89.8%; 对门脉海绵样变的诊断敏感性为 85.7%; MRP 对肝动脉 - 门静脉瘘中央型的诊断与 DSA 基本符合, 远优于其对周围型的检出(表 1).

表 1 33 例 HCC 患者手术病理或 DSA 检查结果与 3D DCE MRP 检查结果比较

检查方法	门脉癌栓					门脉海绵样变	肝动脉 - 门静脉瘘	
	PV	RPV	LPV	PV+RPV	PV+LPV		中央型	周围型
3D DCE MRP	14	6	5	4	4	12	4	2
手术病理或 DSA	15	6	2	5	2	14	4	6

PV: 门脉主干; RPV: 门脉右支; LPV: 门脉左支.

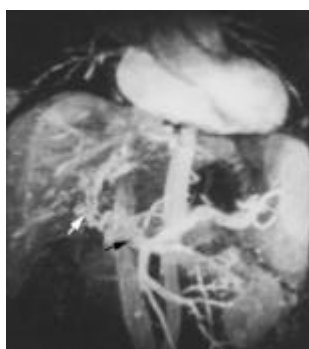


图 1 肝右叶肝细胞癌患者 3D DCE MRP 静脉期图像示门静脉主干及右支癌栓形成, 梗阻端呈不规则形状(细箭); 门脉主干海绵样变形成(粗箭); 门脉主干消失, 代之以迂曲成团的静脉网.

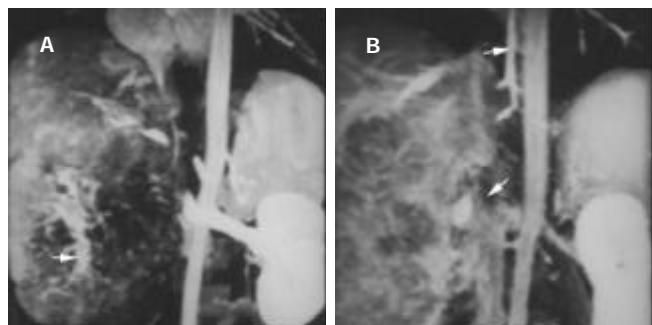


图 2 A: 肝右叶肝细胞癌患者 3D DCE MRP 动脉期图像示肝动脉 - 门静脉瘘(周围型)形成: 在癌肿内或其周围可见多发小草样门脉小分支显影(白箭); B: 同一患者 3D DCE MRP 静脉期图像示门静脉及下腔静脉癌栓形成: 表现为门静脉主干及其分支不显影, 下腔静脉突然中断, 梗阻端呈不规则形状(粗箭); 并可见奇静脉开放(细箭).

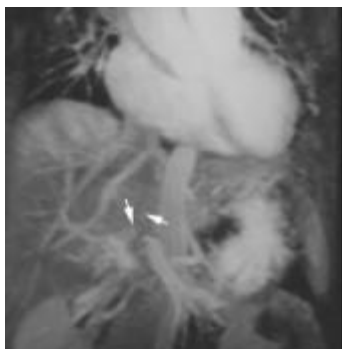


图 3 肝左叶肝细胞癌患者 3D DCE MRP 静脉期图像示门静脉左支癌栓形成: 门静脉主干突然中断, 左支不显影(粗箭); 梗阻端呈结节状(细箭).

### 3 讨论

根据尸检及影像学检查, 约 20-70% 的 HCC 伴有门静脉癌栓<sup>[2]</sup>. 正确认识门脉癌栓及其所致的门脉血管继发性改变对于 HCC 患者的预后及治疗方案的选择具有重要意义<sup>[3-4]</sup>. 3D DCE MRP 采集时间短且血管成像不依赖于血液流动效应, 无造影剂过敏反应和肾毒性, 具有很高的敏感性和特异性, 使门静脉血管成像技术发生了质的飞跃, 已逐渐成为门静脉血管造影的主流方法<sup>[1]</sup>.

在组织学上 80-91.8% 的肝癌患者可发现门静脉癌栓. 门脉癌栓在 MRP 上表现为门静脉突然中断不显影, 梗阻端见结节状或不规则形状, 并可见邻近门静脉分支增粗或增多, 常伴有受累管腔扩张以及管壁的不连续光滑. 林江 et al<sup>[5]</sup>认为 3D DCE MRP 显示门脉癌栓的准确性高于超声. 陈立波 et al<sup>[6]</sup>研究认为 3D DCE MRP 对门静脉癌栓诊断的敏感性、特异性分别为 94.3%、84.2%, 远远优于常规 MRI. 本研究 3D DCE MRP 可见 33 例患者共有 41 支门静脉主干/一级分支癌栓形成, 对门脉主干及一级分支内癌栓诊断的敏感性、特异性及诊断符合率分别为 91.9%、88.7%及 89.8%, 进一步验证了 3D DCE MRP 对门静脉癌栓的诊断具有极高的价值. 结合常规 MRI 还可对门脉癌栓及血栓进行有效鉴别(新鲜血栓表现为典型短 T1 长 T2 信号), 此点亦是 3D DCE MRP 较 DSA 更具优势之处. 对本组病例进一步统计得出, MRP 对门静脉右支及左支癌栓的诊断符合率分别为 96.9%、84.8%, 3D DCE MRP 在判定门静脉左支有无受累与侵犯时出现明显的假阳性结果, 这可能与门脉左支较细长、快速注射造影剂易引起湍流等有关. 癌栓所致的门脉栓塞中, 血管往往因为癌栓的膨胀性生长而扩张<sup>[7]</sup>; 并且由于血管壁受侵或血管内癌栓膨胀性生长对管壁造成的压迫, 栓塞的血管壁可以不连续光滑, 甚至形成外突性结节, 本组可见此征象 11 例, 为本研究首次报道.

Triger<sup>[8]</sup>通过血管造影和病理检查发现门脉海绵样变是门静脉阻塞后形成的向肝性侧支循环. 由于这些血管的大体标本切面观呈海绵状血管瘤样改变, 故被称为“门脉海绵变性”. 门脉海绵样变在 3D DCE MRP

上表现为正常门静脉血管消失或中断,代之以与门脉主干并行、迂曲扩张成蛇形的静脉网,在静脉期显影最为清晰,这些扩张静脉多位于有瘤栓的门静脉旁,沿着门脉系统分布,且无肝动脉或胆管伴行.本组病例共可见12例门脉海绵样变,发生于门脉主干8例,左右分支各见1例和3例,与DSA所见相比,其敏感性为85.7%,远优于CT或常规MRI,且3D DCE MRP能三维动态显示侧支血管网,其诊断价值较超声亦更具优势.每例患者MRP图像上均可见相应部位门脉癌栓形成,因此,笔者认为,HCC患者如出现门脉海绵样变可强烈提示门脉癌栓形成.

肝动脉-门静脉瘘在肝癌中的发生率较高<sup>[9]</sup>,最高可达肝癌患者的50%.本组3D DCE MRP共检出肝动脉-门静脉瘘6例.其中中央型4例,表现为门脉主干及一、二级大分支于动脉期早显,周围型2例,典型表现为在动脉期癌肿内或其周围可见多发小草样门脉小分支显影或于肝外周出现与动脉平行的门静脉影像称为“双轨征”.本组研究结果表明,3D DCE MRP对肝动脉-门静脉瘘中央型检出率与DSA相当,但对周围型其检出结果明显低于DSA,笔者认为其原因可能与3D DCE MRP显示门脉四级或以下分支能力有限有关.

3D DCE MRP具有扫描时间短、图像分辨率高、实用性等特点,可得到任何角度观察的门脉血管图像,准确率非常高<sup>[10]</sup>;并且可以比超声、CT提供更多有关侧支循环的信息<sup>[11-12]</sup>.总之,3D DCE MRP所提供的信息对中晚期肝癌患者的治疗及预后极具价值.

#### 4 参考文献

- 1 Suto Y, Kimura T, Kamba M, Sugihara S, Yoshida K, Takizawa O. Use of three-dimensional segmented FLASH sequence with magnetization transfer contrast to improve Gd-DTPA-enhanced intrahepatic MR portography. *J Magn Reson Imaging* 1997;7:286-291
- 2 Cedrone A, Rapaccini GL, Pompili M, Aliotta A, Trombino C, De Luca F, Caturelli E, Caputo S, Gasbarrini G. Portal vein thrombosis complicating hepatocellular carcinoma. Value of ultrasound-guided fine-needle biopsy of the thrombus in the therapeutic management. *Liver* 1996;16:94-98
- 3 Tanaka A, Morimoto T, Yamaoka Y. Implications of surgical treatment for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the portal vein. *Hepatogastroenterology* 1996;43:637-643
- 4 Saddik D, Frazer C, Robins P, Reed W, Davis S. Gadolinium-enhanced three-dimensional MR portal venography. *Am J Roentgenol* 1999;172:413-417
- 5 林江, 陈祖望, 周康荣, 王建华, 颜志平, 程洁敏, 龚高全, 沈继章, 陈财志, 施伟斌, 姜莺, 崔珊静, 樊佳, 吴志全. 三维动态增强磁共振血管成像诊断肝癌患者门脉受侵的价值. *中华放射学杂志* 1999;33:511-514
- 6 陈立波, 杨炼, 王国斌. 三维动态增强磁共振血管造影诊断门静脉癌栓等肝癌血管并发症的价值. *中华肝胆外科杂志* 2003;9:10-13
- 7 Tubin ME, Dodd GD 3rd, Baron RL. Benign and malignant portal vein thrombosis: differentiation by CT characteristics. *Am J Roentgenol* 1997;168:719-723
- 8 Triger DR. Extra hepatic portal venous obstruction. *Gut* 1987;28:1193-1197
- 9 Wu ZQ, Fan J, Qiu SJ, Zhou J, Tang ZY. The value of postoperative hepatic regional chemotherapy in prevention of recurrence after radical resection of primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6:131-133
- 10 Stafford-Johnson DB, Hamilton BH, Dong Q, Cho KJ, Turcotte JG, Fontana RJ, Prince MR. Vascular complication of liver transplantation: evaluation with Gadolinium-enhanced MR angiography. *Radiology* 1998;207:153-160
- 11 Okumura A, Watanabe Y, Dohke M, Ishimori T, Amoh Y, Oda K, Dodo Y. Contrast-enhanced three-dimensional MR portography. *Radiographics* 1999;19:973-987
- 12 Erden A, Erden I, Yagmurlu B, Karayalcin S, Yurdaydin C, Karayalcin K. Portal venous system: evaluation with contrast-enhanced 3D MR portography. *Clin Imaging* 2003;27:101-105

## World Journal of Gastroenterology 栏目设置

《World Journal of Gastroenterology, WJG》主要开设以下栏目. (1)文献综述: 基于作者自己研究为主的综述性论文. (2)特色栏目 如食管癌、胃癌、肝癌、病毒性肝炎、中医中药、中西医结合等, 具有我国特色及国际领先水平的原创性研究论文. (3)基础研究 报道学术价值高、实验数据完整、具有原始性和创新性的研究成果. (4)临床研究 报道安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验的临床研究论文. (5)研究快报 报道具有原始性和创新性的阶段性成果. (6)病例报告: 报道对临床工作者有指导意义的个案.

• 临床经验 •

# T淋巴细胞亚群及炎性细胞因子与慢性浅表性胃炎合并十二指肠球部溃疡的关系

戴建宜, 梁晓萍, 文锦丽, 李彩银

戴建宜, 梁晓萍, 文锦丽, 李彩银, 深圳市人民医院暨南大学附属二院消化内科, 临床研究中心 广东省深圳市 518020  
项目负责人: 戴建宜, 518020, 广东省深圳市东门北路3号大院, 深圳市人民医院消化内科, 临床研究中心.  
电话: 0755-25533018-3362 传真: 0755-25533497  
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-02-01

## 摘要

目的: 检测单纯慢性浅表性胃炎和胃炎合并十二指肠球部溃疡患者外周血T淋巴细胞亚群水平的变化及炎性细胞因子IL-6和IL-8的血清含量, 分析其与幽门螺杆菌(Hp)的关系, 探讨可能的发病机制。

方法: 收集91例经内镜检查证实慢性浅表性胃炎和十二指肠球部溃疡患者的血清标本, 其中单纯慢性浅表性胃炎75例, 胃炎合并十二指肠球部溃疡16例, 用流式细胞仪测T淋巴细胞亚群的值, 用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测IL-6和IL-8含量, 并分析其与(Hp)的关系。

结果: 胃炎合并十二指肠球部溃疡患者外周血CD<sub>8</sub>(%)细胞数较正常对照组显著升高, CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>(%)比值较正常对照组显著降低, 组间比较有显著差异(P<0.01)。单纯慢性浅表性胃炎外周血CD<sub>8</sub>(%)细胞数、CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>(%)比值与正常对照组比较无显著性差异(P>0.05)。胃炎合并十二指肠球部溃疡患者血清白介素-6、IL-8含量与正常对照组比较明显增高, 组间比较有显著性差异(P<0.01)。单纯慢性浅表性胃炎IL-8含量与正常对照组比较明显增高, 组间比较有显著性差异(P<0.01)。Hp阳性者IL-6含量低于Hp阴性者(P<0.01)。Hp阳性者IL-8含量高于Hp阴性者。

结论: 胃炎合并十二指肠球部溃疡患者CD<sub>8</sub>(%)细胞数较正常人显著升高, CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>(%)比值较正常人显著降低, 血清IL-6、IL-8含量明显增高。单纯慢性浅表性胃炎患者IL-8含量明显增高。Hp阳性者IL-8含量增高, 而IL-6含量下降。

戴建宜, 梁晓萍, 文锦丽, 李彩银. T淋巴细胞亚群及炎性细胞因子与慢性浅表性胃炎合并十二指肠球部溃疡的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(5): 1254-1256

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1254.asp>

## 0 引言

慢性浅表性胃炎和十二指肠球部溃疡是一种常见的肠道炎症性疾病, 其发病率有逐年升高的趋势。研究发现胃炎合并十二指肠球部溃疡患者抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)的阳性率为60-85%, 提示该病可能与自身免疫反应有关。研究者还发现消化性溃疡患者细胞免疫

调节异常。炎症递质和抗炎症递质失衡是溃疡形成的主要因素。胃炎合并十二指肠球部溃疡患者复发率高, 除基本病因未去除外, 不能及时清除由致病因素所致的炎症细胞因子可能起着更为重要的作用。本研究应用流式细胞仪检测T淋巴细胞亚群, 应用酶联免疫黏附法(ELISA)检测患者血清白介素(IL)-6和IL-8含量, 并与正常对照组进行比较, 以探讨慢性浅表性胃炎和胃炎合并十二指肠球部溃疡细胞免疫调节的变化及炎症细胞因子的血清含量, 并分析其与幽门螺杆菌(Hp)的关系, 探讨可能的发病机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 我院2003-02/07经内镜检查证实单纯慢性浅表性胃炎75例, 胃炎合并十二指肠球部溃疡16例, 年龄21-84岁, 平均37.5岁, 其中男51例, 女40例。胃镜下观察91例患者诊为慢性浅表性胃炎75例, 胃炎合并十二指肠球部溃疡活动期16例。91例患者全部分别进行胃黏膜活检尿素酶快速检测法及C<sup>14</sup>UBT(碳<sup>14</sup>呼气试验)二者符合率100%。Hp阳性判定采用两种方法:一种方法为:选用上海市原子核研究所产的S N-6918Hp测试仪, 患者于空腹状态下口服尿素胶囊, 25 min后检测C<sup>14</sup>, 正常值为小于100 dpm/mmol CO<sub>2</sub>。另一种方法为:福建三强生物化工有限公司生产的胃幽门螺杆菌PH指示剂法诊断试剂盒, 取材部位为胃镜下幽门胃窦侧3 cm以内的胃窦黏膜2块, 置于加入酶促反应液的小孔内, 采用目测法, 无显色反应呈黄色者为阴性;呈浅红色的玫瑰红色反应为阳性。IL-6、IL-8 ELISA试剂盒为晶美产品。试剂CD<sub>3</sub>-FITC/CD<sub>4</sub>-PE、CD<sub>3</sub>-FITC/CD<sub>8</sub>-PE及其同型阴性对照MslgG-FITC/MslgG-PE均购自苏州生物基因有限公司。流式细胞仪型号为ACTRA (Backman Coulter 公司)。自动酶联仪(Wellscan mk3)和自动洗板机为芬兰LANDYSTEMS公司产品。

1.2 方法 采集受检患者和正常对照组的外周静脉血, 以肝素管和干燥管各取2 mL, 取专用试管3支, 分别加入CD<sub>3</sub>-FITC/CD<sub>4</sub>-PE、CD<sub>3</sub>-FITC/CD<sub>8</sub>-PE及其同型阴性对照各20 μL, 立即加肝素抗凝血100 μL并充分混匀后, 室温下避光放置20 min, 每管内加溶血剂(7g/L氯化铵, 自配)2-3 mL, 充分混匀, 避光放置15 min, 离心去上清液, 用PBS洗涤2次后, 加PBS 1 mL 30 min后上机检测流式细胞仪计数。检测前常规对流式细胞仪进行质量监控和双色荧光补偿, 使其均在



允许范围内. 干燥管以 3 000 r/min 离心 15 min, 去沉淀, 吸取血清, 以 500  $\mu$ L/ 安瓿存储于 -20 $^{\circ}$ C 低温冰箱中, 避免反复冻溶, 测定时在室温下自融. 加入 100  $\mu$ L 待测血清、标准品和对照品; 加入 100  $\mu$ L 稀释后的生物素标记的 IL-8 抗体; 室温下孵育 1 h; 冲洗 3 遍; 加入 100  $\mu$ L 亲和素标记的 HRP; 室温下孵育 30 min; 冲洗 3 遍; 加入 100  $\mu$ L 待用的 TMB, 避光显色 15 min; 加入 50  $\mu$ L 硫酸终止反应; 测定 450 nm 处的光密度值.

统计学处理 两组间对比, 和治疗前后比较用组间 t 检验,  $P < 0.05$  为有显著性差异.

## 2 结果

慢性浅表性胃炎和十二指肠球部溃疡患者外周血 T 淋巴细胞亚群 CD<sub>3</sub>(%) 细胞数较正常人显著升高; CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub>

(%) 比值较正常人显著降低(表 1).

从表 1 可见: 胃炎合并十二指肠球部溃疡患者外周血 CD<sub>3</sub>(%) 细胞数为:  $37.15 \pm 5.21$ ; 慢性浅表性胃炎外周血 CD<sub>3</sub>(%) 细胞数为:  $26.05 \pm 8.22$ ; 正常对照组外周血 CD<sub>3</sub>(%) 细胞数  $25.66 \pm 6.49$ . 结果显示: 胃炎合并十二指肠球部溃疡患者外周血 CD<sub>3</sub>(%) 细胞数升高.

胃炎合并十二指肠球部溃疡组血清 IL-6 含量明显高于正常对照组  $404.86 \pm 353.9$  vs  $260.50 \pm 284.8$ ; 血清 IL-8 含量明显高于正常对照组 ( $1563.1 \pm 938.0$  vs  $750.5 \pm 122.3$ ,  $P < 0.01$ ). 慢性浅表性胃炎组血清 IL-8 含量明显高于正常对照组 ( $1327.0 \pm 542.0$  vs  $750.5 \pm 122.3$ ,  $P < 0.01$ ). 结果显示胃炎合并十二指肠球部溃疡组血清 IL-6 含量、IL-8 含量明显升高, 慢性浅表性胃炎组血清 IL-8 含量升高.

表 1 慢性浅表性胃炎和胃炎合并十二指肠球部溃疡患者外周血 T 淋巴细胞亚群水平变化(mean $\pm$ D)

组别	n	CD <sub>3</sub> (%)	CD <sub>4</sub> (%)	CD <sub>8</sub> (%)	CD <sub>4</sub> /CD <sub>8</sub> (%)
正常对照组	23	$65.38 \pm 8.50^b$	$33.56 \pm 6.45^b$	$25.66 \pm 6.49^{ab}$	$1.31 \pm 0.18^{ab}$
胃炎十二指肠球部溃疡组	16	$69.21 \pm 5.13^b$	$34.32 \pm 4.98^b$	$37.15 \pm 5.21^a$	$0.92 \pm 0.14^a$
慢性浅表性胃炎	75	$66.24 \pm 7.33^b$	$31.80 \pm 6.61^b$	$26.05 \pm 8.22^b$	$1.22 \pm 0.29^b$

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

Hp 阳性者 IL-6 含量为:  $248.02 \pm 283.22$ , 阴性者 IL-6 含量为  $530.5 \pm 344.2$  ( $P < 0.01$ ). Hp 阳性者 IL-8 含量为:  $1733.9 \pm 903.2$ , 阴性者 IL-8 含量为:  $1143.4 \pm 980.03$  ( $P < 0.01$ ). 结果显示幽门螺杆菌阳性者 IL-6 含量降低, IL-8 含量升高.

## 3 讨论

在慢性浅表性胃炎合并十二指肠球部溃疡的发病机制中, 免疫调节异常起着相当重要的作用, CD<sub>4</sub>T 细胞的激活在肠黏膜组织损伤中的作用尤为重要. CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 比值是反映 T 淋巴细胞功能状态的重要标志. 并且 CD<sub>4</sub> 和 CD<sub>8</sub> 还是传递递质机制的关键因素, 无论 T 淋巴细胞如何应答, 都可能在决定持续性黏膜免疫反应中起重要作用<sup>[1-2]</sup>. 本研究结果显示: 胃炎合并十二指肠球部溃疡患者外周血中 CD<sub>3</sub> 显著升高导致 CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 比值降低, 引起 T 淋巴细胞亚群间比例紊乱, 免疫调节异常. 胃炎合并十二指肠球部溃疡患者有一定的遗传易感性, 在外界感染等因素的刺激下, 患者的免疫反应发生异常, 核因子(NF)- $\kappa$ B 是这一反应的启动因子. 在 NF- $\kappa$ B 的作用下, 肥大细胞激活并释放肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ , 后二者则进一步激活辅助性 T 细胞, 释放细胞因子 IL-2、IL-3、IL-4、IL-6 和 IL-8 等<sup>[3-4]</sup>.

IL-6 是一种单链糖蛋白、多功能细胞因子, 分子量为 26 kD, 是细胞因子网络中的关键成分, 主要由 T、B 淋巴细胞和单核巨噬细胞、纤维母细胞合成. 正常情况下, 这些细胞不产生或很少产生 IL-6, 其主要作用是诱导激活 T、B 淋巴细胞和促进肝细胞合成血

浆蛋白等. 过量的 IL-6 产生与许多疾病有关. 有研究发现, Hp 阳性者胃黏膜活检组织培养上清液中 IL-6 含量显著高于 Hp 阴性者, 且 Hp 感染者胃窦黏膜 IL-6 mRNA 表达水平也明显高于对照组<sup>[5]</sup>. 本研究表明: 胃炎合并十二指肠球部溃疡患者的血清 IL-6 含量明显增高. Hp 阳性者 IL-6 含量较 Hp 阴性者低的原因可能与患者用药有关.

IL-8 主要由单核巨噬细胞产生, 其他如成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞等在一定的刺激条件下也可产生 IL-8. IL-8 的主要生物学活性是吸引和激活中性粒细胞. 中性粒细胞与 IL-8 接触后发生形态变化, 定向游走到反应部位并释放一系列活性产物, 这些作用可导致机体局部炎症反应, 达到杀菌和损伤细胞的目的. 此外, IL-8 对嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和淋巴细胞也有一定作用. Jones et al<sup>[6-8]</sup> 研究表明 IL-8 是溃疡性结肠炎发生过程中必不可少的炎症递质, 无论是在血清、粪便, 还是组织中, 患者 IL-8 含量均明显增高. 本研究表明慢性浅表性胃炎和胃炎合并十二指肠球部溃疡患者的血清 IL-8 含量均增高. Hp 阳性者 IL-8 含量增高.

细胞因子与慢性浅表性胃炎和十二指肠球部溃疡发病过程密切相关, 他们构成的复杂细胞因子网络相互促进或抑制, 从而在致病过程中发挥作用. 随着细胞因子研究的不断深入及与 Hp 关系的进一步阐明, 细胞因子有可能应用于 Hp 相关性疾病的诊断同时也可能应用某些细胞因子的拮抗剂来阻断 Hp 的致病过程或治疗 Hp 相关性疾病.

#### 4 参考文献

- 1 Weston AP, Biddle WL, Bhatia PS, Miner PB Jr. Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1993;38:1590-1595
- 2 王超, 王桂芬, 张兴文, 刘洪宝, 崔巧珍, 姜恩庆. T淋巴细胞亚群在消化性溃疡中的表现. *山东医药* 1996;36:325
- 3 Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Scholmerich J, Gross V. Nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998;115:357-369
- 4 Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477-484
- 5 Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Imanishi J. *Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology* 1996;110:1744-1752
- 6 Jones SC, Evans SW, Lobo AJ, Ceska M, Axon AT, Whicher JT. Serum interleukin-8 in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1993;8:508-512
- 7 Keshavarzian A, Fusunyan RD, Jacyno M, Winship D, MacDermott RP, Sanderson IR. Increased interleukin-8 (IL-8) in rectal dialysate from patients with ulcerative colitis: evidence for a biological role for IL-8 in inflammation of the colon. *Am J Gastroenterol* 1999;94:704-712
- 8 Katsuta T, Lim C, Shimoda K, Shibuta K, Mitra P, Banner BF, Mori M, Barnard GF. Interleukin-8 and SDF1-alpha mRNA expression in colonic biopsies from patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3157-3164

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

• 消息 •

### 《中文核心期刊要目总览》2004 年版收录世界华人消化杂志 为内科学类的核心期刊

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

该书已于 1992, 1996, 2000 年出版过三版, 在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书。为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 我们开展了新一版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况, 本版核心期刊定量评价, 采用了被引量、被摘率、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达 51 种, 统计文献量达到 943 万余篇次(1999-2001 年), 涉及期刊 1 万 2 千种。本版还加大了专家评审力度, 1873 位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出 1800 种核心期刊, 分属七大编 75 个学科类目。该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书。

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

(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)

# 以急性溶血性贫血为首发表现的 Wilson 病 1 例

刘新月, 游 泳, 黎纬民, 刘 诗

刘新月, 游泳, 黎纬民, 华中科技大学同济医学院血液病研究所  
湖北省武汉市 430022  
刘诗, 华中科技大学同济医学院协和医院消化科 湖北省武汉市 430022  
项目负责人: 刘新月, 430022, 武汉市汉口解放大道 1277 号, 华中科技大学同济医学院血液病研究所. yhy791026@tom.com.163.net  
电话: 027-85726175  
收稿日期: 2003-10-18 接受日期: 2003-09-22

## 摘要

目的: 认识 Wilson 病(WD)临床表现的多样性.

方法: 报告 1 例以急性溶血性贫血(溶贫)为首发表现的 WD, 并行文献复习.

结果和结论: 以急性溶血为首发症状是 WD 一种少见的起病形式, 常伴肝衰竭, 预后不佳; WD 误诊率较高主要与临床表现复杂多样有关, 对于年轻的不明病因的溶贫患者应注意排除 WD 的可能; 血清碱性磷酸酶活性下降对诊断有一定帮助.

刘新月, 游泳, 黎纬民, 刘诗. 以急性溶血性贫血为首发表现的 Wilson 病 1 例.  
世界华人消化杂志 2004;12(5):1257-1258

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1257.asp>

## 1 病例报告

女, 12 岁, 因上腹痛伴黄疸 1 wk 收治. 2003-04-11 无明显诱因出现上腹部阵发性疼痛, 初为隐痛, 2 d 后腹痛加剧, 为刺痛, 持续时间延长, 次日出现巩膜皮肤黄染, 尿色深黄, 伴头痛乏力. 患者既往体健, 父母非近亲婚配, 家族中无类似疾病患者. 在当地住院查总胆红素 206  $\mu\text{mol/L}$ , 直接胆红素 46  $\mu\text{mol/L}$ , Hb 65 g/L. 怀疑溶血性贫血, 治疗效果不佳, 于 2003-04-17 转入我科. 查体: T 36.8  $^{\circ}\text{C}$ . 神清, 全身皮肤及巩膜明显黄染, 角膜无异常, 皮肤无出血, 未见肝掌及蜘蛛痣, 浅表淋巴结未触及. 心肺无异常. 腹膨隆, 未见腹壁静脉曲张, 全腹压痛, 可疑反跳痛, 肝脾触诊不满意, 移动性浊音阳性. 双肾轻叩痛, 双下肢轻度凹陷性水肿. 神经系统检查无异常. 血 WBC  $17.7 \times 10^9/\text{L}$ , N 0.91, L 0.05, M 0.04. Hb 75 g/L, PLT  $142 \times 10^9/\text{L}$ . 网织红细胞(Ret)(17/4) 0.126, (20/4) 0.161. APTT 42 s (对照 36 s), PT 25.7 s (对照 12.9 s). 尿糖 3+, 尿胆原 4+, 尿胆红素 3+, ERY 3+, 镜检红细胞少许/HP. 总胆红素 912.9  $\mu\text{mol/L}$ , 直接胆红素 503.1  $\mu\text{mol/L}$ , ALT 233.4 nkat/L, AST 2017.1 nkat/L, ALP 未测出, r-GT 2133.8 nkat/L, 总蛋白 51.3 g/L 白蛋白 31.4 g/L, A/G 1.58. BUN 8.4 mmol/L, BUA 414.3  $\mu\text{mol/L}$ , Cr 115.0  $\mu\text{mol/L}$ . 血尿酸酶正常, 血氨正常, 空腹及餐后血糖正常. 腹水检查为漏出液. 甲、乙、丙、戊型肝炎病毒检查均为阴性. 骨髓细胞学检查: 增生性贫血

(溶贫可能性大). 溶贫的相关检查(Coombs test、Ham test、红细胞渗透脆性、血红蛋白电泳等)均未见异常. 腹部 B 超: 肝胆胰无异常, 脾长 12.9 cm, 厚 4.1 cm, 腹水征阳性. 上腹部 CT 检查: 肝脏形态大小未见异常, 肝实质密度欠均匀, 呈弥漫性小结节影, 肝内外胆管无狭窄及扩张. 初步诊断为急性溶贫, 肝硬化病因待定. 入院后给予地塞米松、护肝等治疗, 黄疸明显减轻, 贫血改善. 总胆红素 365.7  $\mu\text{mol/L}$ , 直接胆红素 242.1  $\mu\text{mol/L}$ , ALT 9018.5 nkat/L, AST 5767.8 nkat/L, ALP 750.2 nkat/L, r-GT 2217.1 nkat/L, 总蛋白 43.7 g/L, 白蛋白 26.1 g/L, A/G 1.48. 肾功能正常, 血 WBC  $21.7 \times 10^9/\text{L}$ , Hb 104 g/L, PLT  $138 \times 10^9/\text{L}$ , Ret 0.06. 裂隙灯下双眼角膜可见 Kayser-Fleischer (K-F) 环, 血清铜氧化酶活力 666.8 nkat/L (2 533.8-7 651.5 nkat/L), 血清铜蓝蛋白 0.06  $\mu\text{mol/L}$ , 脑部 CT 示基底节对称性低密度灶. 确诊为 Wilson 病 (WD). 给予青霉胺口服 0.25 g, 4 次/d, 辅以护肝利尿及支持疗法, 病情逐渐有所缓解, 于 2003-05-07 带药出院.

## 2 讨论

WD 属遗传性铜代谢障碍疾病, 1993 年位于染色体 13 长臂上的 WD 基因被克隆, 进一步的研究发现由于 WD 基因发生突变, 其编码的 P 型 ATP 酶(ATP7B)发生功能改变<sup>[1]</sup>, ATP7B 主要分布于肝细胞上, 负责铜转运, 若其功能部分或全部丧失, 多余的铜离子无法从细胞内转运出去, 便在特定的器官和组织沉积而致病. ATP7B 由 6 个功能区构成, 不同的突变可导致不同的临床表现<sup>[2]</sup>. 本病的病理生理过程是大量的铜首先堆积在肝脏, 然后沉积在中枢神经系统、眼、肾和其他器官. 因病理损害部位与严重程度不同, 起病症状亦复杂多样. 潜伏期一般均较长, 约 85% 病例发病在 10-25 岁之间, 男女比例约为 2-5:1. 多数人发病隐匿, 呈慢性进行性, 少数急性起病. 一组 150 例分析, 初起症状 42% 为肝病表现, 34% 为神经系症状, 10% 为精神症状, 12% 继发于内分泌或血液系症状. 以急性溶血为首发表现的 WD 国外已有报道<sup>[3-4]</sup>. 在发生溶血的同时, 常伴有暴发性肝炎, 呈进行性黄疸、腹水和肝衰竭. 溶血的机制与铜从坏死的肝细胞中急骤释出, 与红细胞膜结合, 引起非免疫性急性溶血性贫血有关. 病死率相当高, 患者常死于肝衰竭. 治疗措施除护肝对症外, 皮质激素因具有稳定溶酶体膜的作用而有一定的效果, 本病例也证实这一点.

WD 的诊断主要依据年龄、临床症状, 同时有 K-F 环和血清铜蓝蛋白小于 0.8  $\mu\text{mol/L}$  或铜氧化酶小于

0.15 光密度以下, 即可确诊. 肝铜增高是诊断 WD 的最重要指标. 如经体检及生化检查仍未能确诊的病例, 测定肝铜量是必要的, 据文献报道, 无论症状出现与否, 本病患者肝铜量均增高. 1990年后建立的基因诊断对症状前患者及杂合子诊断有重大突破. 多篇报道提到血清碱性磷酸酶活性(SAP)在WD伴或不伴溶贫时显著下降, 或测不出, 与明显增高的胆红素不成比例<sup>[5-6]</sup>, 且 SAP 与预后有一定联系. 本例患者在 04-18/04-29 期间共测 5 次肝功能, 第 1 次 SAP 未测出, 以后所测结果分别为 900.2、750.2、600.1、833.5(nkat/L)(参考值 666.8-2667.2 nkat/L). WD 时 SAP 活性下降的原因尚不清楚, 但对提示 WD 伴暴发性肝炎或许有一定帮助.

WD 是目前少数治疗效果较好的遗传性代谢病之一, 早期诊断以求得早期治疗是改善本病预后的关键. 然而, 本病的误诊却是较常见的现象. Gow et al<sup>[7]</sup> 总结该院 30 a 中收治的 30 例 WD, 70% 的患者在首诊后 6 mo 内确诊, 30% 的患者确诊时间平均为 9 a. 延迟诊断的原因主要与本病临床表现多样有关. 国内梁秀龄报告误诊疾病多达 32 种<sup>[8]</sup>. 本病例提示我们: 对于年轻的溶贫患者, 若 Coombs 试验阴性, 又非球型红细胞性贫血, 应注

意排除 WD 的可能.

### 3 参考文献

- 1 Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, Schilsky M, Cox D, Berr F. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int* 2003;23:139-142
- 2 Wu ZY, Wang N, Lin MT, Fang L, Murong SX, Yu L. Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of Arg778Leu mutation in chinese patients with Wilson disease. *Arch Neurol* 2001;58:971-976
- 3 Prella M, Baccala R, Horisberger JD, Belin D, Di Raimondo F, Invernizzi R, Garozzo R, Schapira M. Haemolytic onset of Wilson disease in a patient with homozygous truncation of ATP7B at Arg1319. *Br J Haematol* 2001;114:230-232
- 4 Michel M, Lafaurie M, Noel V, Pico L, Bastie A, Godeau B, Schaeffer A. Hemolytic anemia disclosing Wilson's disease. Report of 2 cases. *Rev Med Interne* 2001;22:280-283
- 5 Schilsky ML, Sternlieb I. Overcoming obstacles to the diagnosis of Wilson's disease. *Gastroenterology* 1997;113:350-353
- 6 Wilson RA, Clayson KJ, Leon S. Unmeasurable serum alkaline phosphatase activity in Wilson's disease associated with fulminant hepatic failure and Hemolysis. *Hepatology* 1987; 7: 613-618
- 7 Gow PJ, Smallwood RA, Angus PW, Smith AL, Wall AJ, Sewell RB. Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut* 2000;46:415-419
- 8 刘焯霖, 梁秀龄, 张成. 神经遗传病学. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 2002:150-189

## World Journal of Gastroenterology 影响因子

影响因子是国际通行的期刊评价指标之一, 是反映期刊重要性的宏观定量指标. 通常影响因子越大, 期刊的学术影响力和作用也越大. 总被引频次是指期刊自创刊以来所刊登的全部论文在统计当年被引用的总次数, 是一个非常客观实际的评价指标, 可以显示该刊被使用和重视的程度, 以及在科学交流中的作用和地位. 美国科学信息研究所(ISI)出版的期刊引证报告(JCR): 《World Journal of Gastroenterology, WJG》2002 年影响因子为 2.532, 被引频次为 1 535. WJG 2002 年影响因子在国际胃肠病学和肝病领域中的 45 种期刊中排名第 13 位, 在 SCI 收录的所有 5876 种国际科学期刊中排名第 797 位. WJG 2001 年影响因子 1.445, 被引频次为 722; WJG 2000 年影响因子 0.993, 被引频次 327 次. 1998 年以来发表的全文电子版(ASP, PDF) 已与 PubMed 中的文摘进行了链接, 全世界的读者在利用 PubMed 检索时即可免费阅读到 WJG 发表的全文, 使本刊作者发表的论文在全球得到及时广泛的传播, 期刊的影响因子逐年上升, 国际影响逐年扩大.

## 小肠脂肪瘤致肠套叠 1 例

张文辉, 屈昌民, 杨欣

张文辉, 屈昌民, 杨欣, 中国人民解放军306医院消化科 北京市 100101  
项目负责人: 张文辉, 100101, 北京市, 中国人民解放军306医院消化内科.  
电话: 010-66356729-2240  
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-08

### 摘要

近日我院收治 1 名中年女性, 以腹痛伴恶心、呕吐为主诉, 后经手术证实为小肠脂肪瘤所致肠梗阻。

张文辉, 屈昌民, 杨欣. 小肠脂肪瘤致肠套叠 1 例. 世界华人消化杂志 2004; 12(4):1259

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1259.asp>

### 1 病例报告

患者女, 49 岁, 因突发右下腹持续性隐痛伴恶心 2 d 就诊。体检: 腹软, 下腹部压痛, 右中下腹可触及约 10 cm × 4 cm 包块, 较固定, 质中, 轻压痛。盆腔 B 超提示子宫多发肌瘤, 子宫右后方可见一 11.7 cm × 4.0 cm 的腊肠样肿物, 形态不规则, 周边低回声, 中间强回声, 盆腔未见积液。第 2 d 出现频繁排暗红色稀便, 呕吐咖啡色胃内容物, 腹部 CT 上腹、右下腹未见异常, 左下腹小肠肠壁可疑增厚, 胃镜见食管、十二指肠球部糜烂, 结肠镜进至回盲部未见明显异常, 考虑出血为十二指肠球部、食管糜烂所致, 予静脉补液、抑酸等治疗后病情缓解, 饮食增加, 每餐可进食 150 g 流食, 自动出院。12 d 后再次出现腹痛, 于左中腹, 持续性烧灼样疼痛, 阵发性加重, 伴恶心、呕吐胃内容物, 每日排暗红色糊状血便, 腹部透视仅见中腹部 1 个小液平。行剖腹探查见腹腔中量透明积液, 升、横结肠膨大, 张力高, 肠壁受压变薄, 盲肠穿孔, 回肠末端 10 cm 套入盲肠、升结肠直至横结肠中部, 在横结肠中部、套叠

小肠末端可触及 3 cm × 4.0 cm × 4.0 cm 包块, 质硬, 活动不佳, 术中无法拉出套叠肠管, 按恶性肿瘤行末端回肠、盲肠、升结肠、横结肠右侧部、大网膜部分切除。病理报告: 回肠黏膜下脂肪瘤(腔内型), 4.5 cm × 4.0 cm × 2.5 cm, 并发肠套叠: 肠管自肿物处扭转, 肿物处小肠套叠后再一次套叠在回盲部及升、横结肠内。

### 2 讨论

成人肠套叠较少见, 常见原因为肠息肉、肠肿瘤或 Meckel 憩室, 脂肪瘤所致更为少见。笔者查阅 1994 年至今文献报道小肠脂肪瘤仅 10 篇, 伴小肠套叠 7 例, 未见结肠套叠, 均为手术明确诊断。小肠脂肪瘤常位于黏膜下, 一般不引起临床症状, 诊断较为困难, 瘤体直径超过 2 cm 可出现肠新生物的一般症状, 如机械性肠梗阻、黏膜溃疡形成、肠套叠、慢性失血等<sup>[1]</sup>。本例患者瘤体直径大, 造成机械性梗阻、套叠、肠管坏死, 术中考虑恶性病变, 送病理明确诊断。因此有肠梗阻症状, 而胃肠镜均未见病变时要考虑小肠病变可能, 单纯应用解痉、胃肠动力药物会引起肠套叠加重、病情进展的可能。腹部 B 超在本例有阳性结果, 亦可选择全消化道造影、腹部 CT, MRI 有较好的软组织分辨率, 脂肪瘤易被 MRI 确诊<sup>[2]</sup>, 但本例术前体征与 B 超相同, 与 CT 不同, 使之诊断更加困难, 应引起临床医生高度注意。

### 3 参考文献

- 1 叶宣光, 桂律. 小肠多发性脂肪瘤伴发肠套叠 1 例. 中华病理学杂志 2002;29:132
- 2 杨希中, 陈恩才, 郭家晨, 尹秀风. 小肠脂肪瘤致成人肠套叠. 中国肿瘤临床与康复杂志 1997;4:96

## World Journal of Gastroenterology 以国际最优秀的期刊为目标

《World Journal of Gastroenterology, WJG》将完全按照国际标准办刊, 从收稿到出版的管理, 已完全实现市场化, 以质量为本。从收稿到出版或退稿, 以公正科学的态度处理每一份稿件。在学术水平和编辑质量方面以国际最优秀的期刊为目标。WJG 争取在国家、作者、读者, 全体编委和社会的大力支持下, 办成一份国际本专业具有突出影响的学术期刊。