

功能基因组学中的功能缺失研究策略

成军

成军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

成军, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 男, 1963-08-17生, 山东省淄博市人, 汉族. 1986年毕业于第一军医大学军医系, 获医学学士学位, 1989年毕业于军医进修学院, 获传染病学硕士学位, 1994年毕业于北京医科大学, 获传染病学博士学位, 1994-11-17至1997-12-01在美国得克萨斯大学健康科学中心临床免疫与传染病学完成博士后研究. 回国后从事传染病特别是病毒性肝炎的临床工作和基础研究, 主要学术研究方向是肝炎病毒与肝细胞相互作用的分子生物学机制, 出版专著5部, 发表论文及综述300余篇. 现任中华医学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员、中华医学会热带病与寄生虫病学分会常委、解放军医学会传染病专业委员会委员, 《胃肠病学和肝病杂志》副主编、《传染病信息》杂志副主编、《热带病与寄生虫病杂志》副主编, 《中华传染病杂志》、《中华肝病杂志》、《世界华人消化杂志》编委等. 国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. c@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-04-28

成军. 功能基因组学中的功能缺失研究策略. 世界华人消化杂志 2004;12(10): 2269-2275

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2269.asp>

0 引言

在功能基因组学(functional genomics)研究中, 阐明各种蛋白的结构和生物学功能是其核心任务, 不仅是生物学的主要研究方向, 而且也是医学研究的主要内容, 毕竟细胞的功能和表型是由细胞中的蛋白来主导的, 许多疾病都是蛋白结构与功能、表达水平与调节的异常引起的. 研究蛋白的功能, 常常通过改变蛋白的表达水平, 观察细胞的生物学特性的变化, 来研究蛋白相应的生物学功能. 这种研究策略包括强制性地升高特定蛋白的表达水平, 也包括蛋白表达水平的缺失. 研究表明, 在功能基因组研究中, 功能缺失(loss of function, LOF)策略具有特殊重要地位.

1 反义寡脱氧核糖核苷酸和反义 RNA

反义分子包括反义寡脱氧核糖核苷酸 (oligodeoxynucleotide, ODN)和反义 RNA(antisense RNA)等. 反义技术(antisense technique)是指反义DNA/反义RNA分子作用及其机制研究的技术. 他是通过以碱基互补配对方式结合, 抑制、封闭或破坏目的基因结构及其表达的核酸分子, 利用反义技术可以了解特定基因的功能, 同样也可以利用反义技术抑制封闭某些有害或致病基因的表达, 在新一代抗病毒、抗肿瘤领域中具有巨大发展潜力^[1].

反义(antisense)的概念早在1967年即被提出. 如果这

核酸分子为DNA, 则称为反义DNA;如果这核酸分子为RNA, 则称为反义RNA. 反义DNA分子就是各种修饰或未经修饰的反义ODN片段. 1973年首先报道非离子型ODN及其衍生物, 能够特异性抑制细胞DNA复制、RNA的表达、转录、翻译功能. 1978年首次报道反义ODN可抑制劳氏肉瘤病毒(RSV)的复制. 当时应用的ODN是人工合成的未经修饰的反义ODN, 取得了意想不到的结果. 之后, 合成了多种反义ODN片段研究其对其他严重危害人类健康的病毒的抑制作用, 也取得了满意的结果. 目前认为, DNA双链其全长并不是从头到尾都处于双链结合状态, 这些非结合区域将可能成为反义ODN的结合部位. 另外反义ODN能与双链DNA结合形成局部三螺旋结构, 从而在转录水平抑制基因表达. 已有许多文献报道这种三螺旋结构在体外可抑制癌基因表达及猿猴病毒复制. 20 a来大量研究证实反义ODN特异性抑制基因表达的能力, 人们也逐渐认识到其在疾病治疗方面的巨大潜能^[2].

1.1 反义寡脱氧核糖核苷酸 反义ODN要发挥作用, 必须具备以下几个条件: (1)稳定性: 反义ODN容易被体内广泛存在的核酸酶破坏而失去活性, 故从策略上说, 反义ODN抗病毒治疗以基因表达途径更为有效. 因此反义ODN要发挥治疗作用必须通过化学修饰等以抵抗核酸酶的裂解增强其稳定性. 维持充分的细胞内浓度, 较长的细胞内半衰期; (2)透膜性: 自然反义ODN的不易透过细胞膜而达到作用靶位, 经过修饰的反义ODN可以增加透膜性, 增强治疗作用. 目前有许多载体系统用于增加反义ODN对细胞的通透性, 和其靶向mRNA结合位点的释放, 如反义ODN结合到胆固醇、多聚赖氨酸及阳离子脂质体中, 在提高细胞对反义ODN的摄取方面, 阳离子脂质体的应用最广泛. (3)特异性和亲和性: 影响特异性和亲和性的因素很多. 如反义ODN的序列、长度、作用环境中的温度离子等. (4)低毒性: 注意选择无毒或低毒的反义ODN. 注意观察其对人体细胞的毒性. (5)作用于病毒不同生活周期的多靶位反义ODN联合作用, 有可能比单靶位有更强的抑制作用, 可能提高抗病毒效果^[3].

为了满足以上条件, 反义ODN可以进行结构上的化学修饰, 包括ODN的骨架修饰, 磷酸基修饰, 糖环修饰, 碱基修饰. 常用的是磷酸基修饰. 在单核苷酸的磷酸基中4个氧原子, 可以由其他化学基团替代, 可以明显增强核酸酶的抗性, 和细胞膜通透性, 经过修饰后的反义ODN可以增强抗病毒的活性. 无论是自然状态下

的反义ODN还是化学修饰反义ODN,其骨架中的五碳糖都是其他构型.上述各种化学修饰反义ODN,其着眼点在于提高其核酸酶的抗性,增强其稳定性,但同时也产生了另外一个问题,这就是反义分子的过度累积,造成的细胞毒害.因此考虑到另外一种化学修饰的方式和类型.即在反义ODN的两端进行化学修饰.这样的目的是弥补DNA片段的不足之处,解决更好地进入细胞,更稳定,特异地和靶mRNA结合并破坏掉该mRNA的问题.如反义DNA 3' -端共价连接上胆固醇分子,大大提高了细胞摄取量,于是相应提高了反义DNA抗人类免疫缺陷病毒(HIV)的活性.将补骨脂分子接到反义DNA上,其目的是加强和靶mRNA结合的稳定性或进一步破坏掉mRNA,使其丧失功能.把反义RNA与核酶(ribozyme)串连成融和基因,可同时具有反义抑制及剪接功能,必定会提高反义ODN的抑制效率.另外,脂质体修饰能够明显增强硫代磷酸化ODN的反义抑制作用,其原因可能与下面两个因素有关:(1)脂质体使ODN的转染效率提高.(2)修饰后可避免核酸酶的裂解增强其稳定性.用硫代磷酸化、硫代磷酸化和硫代磷酸化等基团修饰,对丙型肝炎病毒(HCV)的复制均有较好的抑制作用,并认为经过化学修饰的ODN类似物能抵抗核酸酶的裂解,提高其生物活性^[4].

现阶段的反义技术还存在很多问题.(1)继续研究能高效抑制基因的复制和表达的靶序列,设计和合成相应的反义ODN,研究反义ODN的修饰,提高反义ODN对核酸酶的抗性,细胞膜的通透性,增强对基因靶位的特异性和亲和性,减少对细胞的毒性.(2)如果反义ODN没有封闭基因复制的原始模板,一旦停止治疗,将会引起复发,这是一个值得研究的重要问题.(3)反义ODN目前主要靠人工合成,合成量小.(4)反义ODN在应用人体前,必须进行动物实验研究,检验在活体中的有效性和安全性,但选择合适的动物模型也是一个难题.此外还面临其他方面基因治疗的共同问题,如目的基因的选择,病毒表达载体的安全性问题,基因的选择及基因转移靶细胞的选择,导入方法,靶器官的特异性及治疗后如何调控导入基因的表达等还需深入研究^[5].

由于反义技术能抑制基因的复制,并在不同水平上阻断其功能的发挥,因此是一种很有潜力的治疗方法,反义技术的体外实验已初步证明了这一点.也许在不久的将来,反义技术能够真正成为治疗某些疾病的突破口,如肿瘤、病毒性疾病、遗传病等.反义基因治疗应用于临床将预示着一个新时代的来临^[6-8].

1.2 反义RNA 1981年首次报道了天然反义RNA的存在及其生物学功能.1983年又发现反义RNA不仅可以抑制DNA的复制,而且可以调节基因的转录和翻译,可以抑制基因表达,是基因表达的调节因子.在生物体内存在反义RNA,由于反义RNA和mRNA互补,可以抑制mRNA的翻译功能.使基因的表达受到抑制.1984年首次提出反义RNA的概念,并用重组DNA技术设计和

制备出反义RNA.利用重组DNA技术将编码单纯疱疹病毒(HSV)胸腺嘧啶核苷激酶(TK)基因特异性反义RNA所对应的DNA的片段重组到一种真核表达载体中,再将这种重组的反义RNA表达载体,注射到细胞里,明显观察到反义RNA的表达,抑制了HSV的复制和表达活性及TK活性.此后开展了反义RNA表达载体的构建,以及转基因表达和抗病毒的研究.反义DNA分子不象反义RNA分子除了化学合成以外,别无其他来源,不能采取基因工程技术生产,或体内表达的基因治疗技术.但反义DNA分子比反义RNA分子较容易得到,也较稳定^[9-11].

2 核酶

核酶是一类独特的RNA分子,具有自我剪切和催化功能,其特异性序列通过碱基配对识别并结合靶RNA,催化裂解靶RNA,抑制基因表达,特别是抑制某些有害基因表达.1983年两位科学家Cech和Altman发现了核酶.核酶发现于对四膜虫以及一些植物病毒、类病毒等的观察.他们的核酸分子都具有自我剪切的功能.这些自我剪切反应都是可逆的,具有酶催化反应的性质.到目前为止,至少提出三种不同的核酶活性中心的结构形式,他们分别是锤头状,发夹状,斧头状结构.这三种主要类型的核酶RNA分子,其基本构成都是由活性中心及其侧翼序列组成,核酶RNA的活性中心决定了酶的催化活性,其侧翼序列决定了核酶RNA结合与裂解靶RNA的特异性.以后根据这些天然核酶的结构,人工合成具有催化活性的RNA片段(人工核酶).核酶具有序列特异性,不编码蛋白亦无免疫原性,又可重复利用等优点.此外还可以通过体外转录的方式获得核酶RNA分子的表达^[12].

核酶的发现及其研究不仅具有理论上的指导意义,而且也具有极大的实用价值.核酶的发现,使反义技术发展到一个新的高度,核酶RNA分子不仅为反义技术增添了新型分子,而且其作用效率更高,作用机制更复杂,同时核酶RNA分子也是基因调控的重要分子.结合一些基因的治疗手段,对遗传病、癌症和病毒性疾病,尤其对我国人民危害极大的病毒性肝炎开展基因治疗,具有十分诱人的应用前景^[13].

乙型肝炎病毒(HBV)为部分双链的DNA病毒.其复制过程中有一个从前基因组RNA到DNA的逆转录过程.如果以这段3.5 kb的前基因组RNA为靶子,设计核酶对其进行降解就可以打断他的生活周期.核酶能特异地切割HBV前基因组RNA,使其丧失模板活性.1992年Weizker *et al*针对HBV前基因组RNA的一些关键部位设计了3个锤头型核酶,与体外转录的全长RNA在50℃温育,聚丙烯酰胺凝胶电泳显示RNA被切割成不同长短的片段,与预测的长度相符.为了排除非特异性切割或RNA的降解作用,他们还把冷的RNA与核酶放在一起,此时就不会出现以上的片段.还发现3个核酶同时切割的效果明显大于单个核酶的效果,这可以用来对

抗病毒的变异. Beck *et al* 所设计的核酶针对 HBV 前基因组 RNA 的包装信号, 他是一个高度保守的、茎环结构的顺式因子, 在基因组中出现了 2 次, 他对病毒的包装及反转录都起着很重要的作用. 根据这些特点被认为是比较理想的靶子. 竺来发 *et al* 设计针对 HBeAg mRNA 编码序列的核酶, 在 Mg^{2+} 存在下, 将 137 nt 的核酸准确地了解得到 97 nt 和 40 nt 两个片段, 可有效的剪切 HBV mRNA. 王平 *et al* 针对 HBV 前 -C / C 区基因的锤头状核酶, 经体外转录后可定点切割靶 RNA, 在 HepG2 细胞亦可显著抑制 HBeAg、HBsAg 的表达和 HBV DNA 复制; Weizsacker *et al* 构建了串联的核酶, 针对 HBV mRNA 第 2029–2031 nt, 2044–2046 nt 和 2049–2051 nt 位点设计的 3 组锤头状核酶, 可有效的切割靶 RNA, 抑制或阻断 HBV 的复制, 并可减少变异病毒逃逸的机会. Beck *et al* 设计了针对 HBV 包装点的锤头状核酶, 体外切割靶 RNA, 用 U6 snRNA 表达核酶与 HBV 共转染, 也可有效切割靶 RNA. 国内体外合成核酶, 并对鸭 HBV S 基因体外转录物定点切割, 发现对病毒抗原表达的抑制作用. Welch *et al* 使用三个发夹状核酶, 在 Huh7 细胞中与 HBV 共表达, 使其 HBV 表达下降 66%, 对核酶修饰后则抑制率达 83%. 在真核细胞表达的成功, 预示对 HBV 基因治疗是有效的^[14–15].

和文超 *et al* 针对 HBsAg、HBeAg、HBcAg 设计了 5 种锤头型核酶, 不仅在细胞外, 而且在细胞内观察到了其对 HBV 的抑制, 各抗原及病毒颗粒都明显减少. 设计的核酶构建了带有 5' -、3' - 自身修剪的真核细胞核酶表达质粒, 包括含单个核酶和多个串联的鸟枪型核酶基因的质粒, 通过转染把他们同带有 HBV 基因组的质粒转入 HepG2 细胞. 用 Southern blot、ELISA、RNase 保护法等测定结果后, 显示 HBsAg、HBcAg、HBeAg 以及他们相应的 RNA、Dane 颗粒数都因为核酶的作用而明显地减少^[16].

Puttitz *et al* 学者用重组筛选的方法从一个发夹型核酶文库中 (5×10^9 个) 确定能有效地在转基因人肝癌细胞 (HCC) 中切割 HBV 前基因组 RNA 的核酶. 这个核酶文库包含了任意序列的底物结合位点. 通过实验发现 RNA 上有 40 个部位可以和核酶结合, 其中 17 个在 HBV 所有 4 个亚型中都存在. 然后他们根据这 17 个保守位点设计了 4 个发夹型核酶, 与一个有复制活性的 HBV DNA 二聚体同时转入 HCC 细胞系中. 结果核酶对 HBV 的抑制分别达到 80%、69%、66% 和 49%^[17].

HCV 是一种 RNA 病毒. 用目前的抗病毒手段非常容易诱导变异从而产生耐药性. HCV 基因组核心区高度保守, 其 5' -NCR 含有惟一的翻译起始点, 且全长 5' -NCR 对病毒复制和装配也必不可少, 因而抗 -HCV 核酶设计是针对 C 区和 5' -NCR 以及针对 mRNA 二级结构的单链间隙, 在细胞内外均能抑制 HCV 病毒 RNA 的复制. 对于 HCV 的感染, Welch *et al* 使用发夹式核酶作为抗 HCV 感染的有效治疗物质, 以阻碍病毒基因组复

制, 阻止病毒蛋白的表达. 保护细胞免受 HCV 感染. 该核酶针对 5' -NCR 及编码衣壳蛋白的区域. 由于 5' -NCR 区的二级结构相对复杂, 影响了核酶的结合. 使得编码 HCV 衣壳蛋白区域的核酶成为目前最有希望的抗 HCV 核酶. 首先使用的是 RNA 强子, 而非 DNA 增强子. 也曾有应用锤头状核酶清除肝细胞内 HCV RNA 的报道, 并在 HCV RNA 的 AUG 启动子附近发现了核酶的切割位点. 该方法是通过 HCV 感染的肝细胞培养建立的核酶文库选择合适的核酶切割位点, 因此可能对寻找 HBV 的核酶酶切位点也很有帮助. Welch *et al* 针对 HCV 正链与负链 RNA 高度保守的区域设计了多个核酶. 在体外比较了他们对 RNA 的切割活性. 挑选了其中几个最有效的核酶, 连接入腺相关病毒 (AAV) 载体和腺病毒载体. 发现他们在组织培养中对 HCV 病毒有非常明显的抑制作用. 这一结果为将来研制抗 HCV 药物带来了希望. Welch *et al* 还设想可以将这种核酶插入嗜肝病毒载体静脉注射入人体, 使其在人体肝细胞中不断地释放出来, 降解 HCV RNA 正链甚至负链. 贾战生 *et al* 研究抗 HCV 5' -NCR 双位点 213 和 260 核酶在细胞内对 HCV 翻译启动功能的抑制作用. 通过脂质体介导的基因转染方法, 转染核酶基因和带萤虫素酶的靶基因真核表达载体于人肝癌细胞, 检测报告基因的活性, 结果表明两种核酶均能在肝癌细胞内有效地抑制报告基因的表达, 其抑制率在 40–75% 之间. 国内刘克洲 *et al* 设计和合成 HCV 5' -NC 区和 C 区的特异性核酶基因并克隆入真核表达载体 pSV2-gpt、CD-Sra 中, 转染 HCV 感染的 MT-2 细胞, 用定量 PCR 方法检测核酶对 HCV 的抑制作用, 结果显示两种核酶对 HCV 均有抑制作用, 抑制率分别为 54% 和 62%, 二者联合作用时抑制率达 78%^[18–19].

丁型肝炎病毒 (HDV) 的基因链和抗基因链均具有核酶活性, 能催化自我切割和自我连接, 他最可能是导致核酶活性的结构. HDV 基因组自身裂解位点位于 688/689 nt 位置上, 斧头状核酶就是根据 HDV 核酶结构提出的. 抗 HDV 核酶技术包括阻断这种自身剪切过程, 另一方面, 设计其他核酶分子裂解 HDV RNA 基因组. 在抗 HIV 核酶研究中, 设计多靶位核酶切割病毒的 RNA, 到目前为止, 已设计出 HIV RNA 特异性的 9 个靶位的核酶 RNA 分子, 这样避免了单个核酶识别, 切割位点的基因突变造成的切割失败, 同时也提高了抗病毒效率^[20].

影响核酶催化活性的因素主要有: (1) 二价金属阳离子 (如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+}). 核酶的裂解反应, 至少要有 0.5 mmol/L 的 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 存在. Mg^{2+} 以一种独特的方式促进核酶的裂解反应, 当其浓度在 25 mmol/L 以上时, 裂解活性迅速增加. 有人认为在 Mg^{2+} 浓度较高时, 核酶可能变成了另一种构型. (2) 变性剂. 当低浓度变性剂存在时可以增强核酶的催化活性, 而高浓度变性剂 (> 2M 的尿素或 > 5M 的甲酰胺) 存在时可抑制核酶的催化活性. (3) 温度. 适当的温度可增强核酶的催化活性. (4) 酸碱度. 三种基因

结构类型的核酶 RNA 分子,其反应条件中的最佳 pH 值是 7.0,反应环境过酸,过碱都将影响核酶 RNA 活性中心的形成,进而影响催化效率.在所有的因素中,二价金属阳离子是绝对需要的. Beck *et al* 报告,在抽提的细胞而不是完整的细胞中,锤头状核酶能有效地切割 HBV 的壳膜信号.体外试验表明,经过蛋白 K 酶和酚抽提处理的细胞,随着 $MgCl_2$ 浓度的提高,胞外终浓度达 5–10 mmol/L(胞内 $MgCl_2$ 浓度为 1 mmol/L)时,该酶的切割效率是最高的.核酶—底物复合物活性是通过核酶结构的改变来实现的, $MgCl_2$ 浓度的高低是诱导核酶结构变化的关键,因此细胞内 $MgCl_2$ 浓度可影响靶 RNA(如 HBV 壳膜信号)的延伸.由于 HBV 前基因组转录的结果是使 HBV RNA 不断合成,因此在 HBV 前基因组内更容易找到核酶的切割位点^[21].

为了使核酶成功地用于临床,首先要从以下几方面进行研究.(1)设计最佳的核酶结构首先要确定核酶的类型.锤头状核酶对靶序列的要求稍低,且分子较小,易于获得较高产量,也较经济,是目前广泛使用和首选的类型,其次是选择靶 RNA,核酶的作用效率与其裂解的靶序列有关,不同的 NUH(N 为 A、C、G、U; H 为 A、C 和 U)序列能使其裂解效率改变 100 倍以上.锤头状核酶包括二个侧翼的臂,核酶可以借助该臂识别产底物的 NUH 序列,然后催化核酶裂解 RNA 3' 端的 NUH 三联子.发夹状核酶识别的裂解位点位于 GUC 的上游.发夹状核酶二级结构中某些碱基的变化,可导致核酶裂解活性的全部丧失.斧头状核酶裂解位点位于 GAU 的下游,是从研究 HDV 基因组复制过程中阐明的.核酶 RNA 分子活性中心及其侧翼序列的组成和数目对核酶 RNA 分子都有影响.设计核酶 RNA 分子要注意防止自身折叠成稳定的二级结构.裂解靶位的选择应尽量避免茎—环稳定的二级结构,而应选择较为松散的单链结构区,以达到理想的治疗效果,对核酶 RNA 的侧翼序列,从理论上讲,最好要保证侧翼序列的长度在 17 nt 以上,以保证其与底物 RNA 分子结合的特异性.(2)寻找有效的导入及表达系统最常用的载体是选择病毒载体系统,如腺病毒载体或逆转录病毒载体.在核酶表达载体的选择与构建中,要考虑启动子本身活性的强弱及其组织细胞特异性问题.(3)提高核酶在细胞内的稳定性,为了稳定核酶在细胞内的结构,可对核酶结构进行化学修饰.在体外许多研究针对 2' -OH 进行修饰,以增加核酶的稳定性.如 Taylor *et al* 设计的 DNA-RNA 杂合核酶,即与底物配对部分用脱氧核苷酸替代,结果其体外活性提高 6 倍,稳定性提高 2 倍. Heidenreich *et al* 则以 2' -氟替代,发现提高了稳定性但也降低了剪切活性,亦有以 2' -甲基,2' -脱氧基,2' -氨基,磷硫替代等修饰的报道.核酶在细胞内提高稳定性则通过装在 tRNA 反密码环或在核酶末端引入茎环结构来进行.(4)改善和提高核酶活力,减少影响核酶作用效率的因素.多位点核酶联合可以提高核酶的剪切率,

可以阻止病毒变异逃逸核酶的攻击,和减少空间构型的影响.如 Weizsacker *et al* 所用 3 个核酶的串联作用.核酶也可以与反义技术相结合,或与定向技术相结合,如 HBV 外膜蛋白包装含有 HDV 核酶的毒株,可使其定向作用于靶器官肝脏.日本学者设计抗 HCV 核酶,使用唾液粘蛋白定向等^[22].

目前核酶在体内应用研究已取得了很大的进展,但多数研究仍处于实验阶段,要使核酶真正用于疾病的防治,仍有很长的一段路要走.包括核酶如何导入细胞与表达,核酶引入细胞后的稳定性,核酶结构的设计,底物的选择以及如何提高核酶的活力及调控等方面均有待于进一步探索和解决.从基因水平探索治疗肝病有效途径是寻找新一代高效无毒药物的根本出路.研究根据靶基因模板序列,设计出高度特异的“基因封条”封闭病毒基因表达的特定部位,对细胞代谢无影响,是一个值得重视的探索方向.

3 RNA 干扰

从基因的分子生物学角度,病毒性肝炎也是一种基因病,相对于正常肝细胞来说,肝炎患者的肝细胞中获得了肝炎病毒的基因,因此,病毒性肝炎的治疗也可以采取像遗传病那样的基因治疗(gene therapy)策略^[23].与遗传病的基因治疗策略不同,遗传病往往是因为某一或某些基因发生缺陷,利用基因治疗技术进行补充或者校正;而病毒性肝炎的基因治疗,往往是需要采取另外的策略,即阻断有害的病毒的基因表达的策略.因为病毒性肝炎的发病机制,主要是进入肝细胞的肝炎病毒基因编码产生相应的肝炎病毒蛋白,作为靶抗原激活机体的免疫应答机制,这种原本是要清除肝细胞中肝炎病毒的正常的免疫应答机制,却造成了持续的肝细胞的免疫损伤,引起各种类型的肝脏疾病.特别是 HBV、HCV 感染引起的慢性病毒性肝炎,迁延不愈,释放的各种炎症因子导致肝脏内贮脂细胞(stellate cell)细胞的激活、转化、增生,分泌过量的细胞外基质(ECM),并造成肝脏纤维化的形成,某些情况下通过复杂的生物学机制导致肝细胞的恶性转化,引起肝细胞癌的发生^[24].因此,从肝炎病毒引起的一系列肝脏疾病谱来看,主要的源头就是肝细胞中肝炎病毒基因的存在,因此采用基因治疗技术阻断肝炎病毒基因在肝细胞中的复制和表达,是我们应该考虑的主要治疗靶点.最近研究表明, RNA 干扰(RNA interference)可能是进行抗肝炎病毒基因治疗的新的策略^[25].

3.1 RNA 干扰的机制与策略 1995 年 Guo 和 Kemphues *et al* 在研究美丽隐杆线虫(*C. elegans*)的 *par1* 基因功能时,将 *par1* 基因的反义 RNA 表达载体导入到美丽隐杆线虫中,引起 *par1* 基因的缺陷现象,同时发现导入 *par1* 基因的有义链基因进行表达时,也产生了 *par1* 基因的缺陷现象,表明反义和有义 RNA 的表达都有类似的抑制效应,但是机制却明显不同. Fire *et al* 对这一现象的

机制进行了细致深入的研究, 比较了反义 RNA、有义 RNA 和双链 RNA(dsRNA)在美丽隐杆线虫中的抑制效应, 发现 dsRNA 产生至少是 10 倍以上的抑制靶基因表达的效果, 并将 dsRNA 抑制同源基因的表达的现象称为 RNA 干扰, 从此 RNA 干扰现象得到了空前的重视, 并在各种病原微生物的基因表达抑制方面进行了许多有益的尝试^[26].

3.2 RNA 干扰与病原微生物基因表达的抑制 首先在美丽隐杆线虫中发现 RNA 干扰现象之后, 很快发现在许多类型的病原微生物中都存在同样的 RNA 干扰现象. 22–25 nt 大小 dsRNA 产生抑制或降解靶 RNA 分子的作用, 统称为小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA), 根据其发挥 RNA 干扰现象的 dsRNA 的具体长度又可以分成 2 类: 24–25 nt 的长 siRNA 和 21–23 nt 的短 siRNA. 这两种类型的 siRNA 都可以通过与靶 mRNA 分子进行序列特异性的结合、抑制与降解, 阻断或破坏靶基因的表达. 另外一种可能作用的机制就是 dsRNA 诱导同源基因的甲基化, 从而使目的基因表达关闭. 另外, 小分子的 dsRNA 同时也是很强的干扰素诱导酶如 PKR、RNase L 的激活剂, 可以产生类似干扰素的抗病毒效应^[27].

3.3 RNA 干扰与抗肝炎病毒治疗的应用前景 RNA 干扰策略在抗肝炎病毒治疗中首先在 HCV 的研究中获得了成功. McCaffrey *et al* 设计合成了针对 HCV NS5B 基因区的 dsRNA, 当与 NS5B 表达载体进行共转染时, 在鼠肝细胞中观察到 dsRNA 对于 NS5B 基因的表达水平抑制率达到 75%, 如果 dsRNA 与 NS5B 的表达载体进行共转染, 抑制率可以达到 98%. 说明 siRNA 策略在抗 HCV 基因治疗中的应用前景. 多年来由于缺乏合适的 HCV 感染/转染细胞模型, 因此对于抑制 HCV 的研究进展缓慢. 近年来关于 HCV 复制子(replicon)的建立, 使得在细胞系水平上研究 siRNA 的效果成为可能. Randall *et al* 就利用 HCV 的复制子细胞模型对于 dsRNA 抑制 HCV RNA 复制的效果进行了研究. 在 Huh-7 细胞系中, dsRNA 对于 HCV RNA 的复制水平具有显著的抑制作用, 而且是剂量依赖性的. 对于 dsRNA 作用的序列依赖性的特点进行研究, 2 株 HCV 变异株仅有 3 nt 的序列差别, 只有 dsRNA 与作用的靶 HCV RNA 序列完全同源时才具有抑制作用, 因此, dsRNA 对于靶基因的表达抑制是严格的序列特异性的特点. dsRNA 对于 HCV RNA 抑制的作用效果是指数性的, 在 4 d 之内, 就可以降低 HCV RNA 的复制水平达 80 倍. 导入 siRNA 之后, 可以使 98% 以上的有 HCV RNA 复制的细胞不再有 HCV RNA 的复制, 这些细胞中再也检测不到 HCV 的抗原表达和 HCV RNA 的复制. 这些研究结果表明, 基于 siRNA 的抗 HCV 治疗是十分有希望的^[28].

当然, 由于肝炎病毒 RNA 分子在体内的二级结构特点, 针对不同基因区段的 siRNA 的抑制作用效果也肯定有所差别, 因此针对 HBV、HCV 基因序列的特点,

还需要进行优化, 寻找最为有效的抑制靶点. 作为一种新型的抗肝炎病毒的可能的策略, siRNA 也具有其相当明显的局限性. 例如 HBV 和 HCV 基因序列高度变异, 存在明显的基因准种(quasispecies)群, 而 siRNA 对于靶 RNA 分子的识别, 又是以碱基配对方式进行的, 因此要向全面控制 HBV、HCV 的复制, 我们就需要无数种序列不同的 siRNA 分子, 显然是很难做到的. 因此, 我们还必须针对这一特点进行深入细致的研究, 克服这一困难, 使得 siRNA 抑制靶基因的表达的策略, 更能切合临床抗肝炎病毒治疗的需要^[29–33].

4 基因敲除

基因敲除(gene knock-out)模型是目前功能研究策略中的主要技术途径之一. 建立基因敲除的动物模型, 基本上通过 2 种策略: 一种是体外构建同源重组或基因打靶(gene targeting)的表达载体, 利用受精卵细胞核微注射的方法, 依靠受精卵细胞内的基因同源重组, 实现基因敲除. 这一策略的缺点就是效率太低. 随着体细胞核移植技术即克隆动物模型技术的研究进展, 目前采用体外构建同源重组或基因打靶载体, 在体外条件下对于实现同源重组的细胞系进行选择鉴定, 然后进行体细胞核移植, 将是基因敲除模型发展的主流技术方向^[34].

基因敲除是指对一个结构已知但功能未知的基因, 从分子水平上设计实验, 将该基因去除, 或用其他顺序相近基因取代, 然后从整体观察实验动物, 推测相应基因的功能. 这与早期生理学研究常用的切除部分—观察整体—推测功能的三部曲思想相似. 基因敲除除可中止某一基因的表达外, 还包括引入新基因及引入定点突变. 既可以用突变基因或其他基因敲除相应的正常基因, 也可以用正常基因敲除相应的突变基因^[35].

基因敲除是 1980 年代后半期应用 DNA 同源重组原理发展起来的一门新技术. 1980 年代初, 胚胎干细胞(ES 细胞)分离和体外培养的成功奠定了基因敲除的技术基础. 1985 年, 首次证实的哺乳动物细胞中同源重组的存在奠定了基因敲除的理论基础. 到 1987 年, Thompson *et al* 首次建立了完整的 ES 细胞基因敲除的小鼠模型. 此后的几年中, 基因敲除技术得到了进一步的发展和完善. 基因敲除的技术路线如下: (1) 构建重组基因载体; (2) 用电穿孔、显微注射等方法把重组 DNA 转入受体细胞核内; (3) 用选择培养基筛选已击中的细胞; 将击中细胞转入胚胎使其生长成为转基因动物, 对转基因动物进行形态观察及分子生物学检测^[36].

基因敲除的靶细胞目前最常用的是小鼠 ES 细胞. 基因敲除的技术路线虽不复杂, 但由于高等真核细胞内外源 DNA 与靶细胞 DNA 序列自然发生同源重组的机率非常低, 约为百万分之一, 要把基因敲除成功的细胞筛选出来是一件非常困难的工作. 因此, 同源重组的筛选和检测就成了基因敲除技术所要解决的关键问题. 目前已有多种筛选方法, 其中 1988 年犹他大学的 Capecchi

*et al*教授的研究组发展的"正负双向选择系统"适用范围宽且效率较高. ES细胞基因敲除途径建立转基因小鼠技术的成熟, 首次使体外精细的基因操作与小鼠的整个生长发育和生命过程得到了直接的结合, 为探讨高等动物基因组结构和功能提供了有效的方法. 由基因敲除技术产生出的特殊小鼠已经对哺乳类生物学的各领域, 包括发育生物学、癌生物学、免疫学、神经生物学和人类遗传学产生了极大影响. 理论上, 基因敲除可适用于任何能产生 ES 细胞的物种, 将来可在小鼠基因敲除成熟的基础上开展其他实验动物的基因敲除工作^[37].

基因敲除的应用领域主要有: (1) 建立人类疾病的转基因动物模型, 为医学研究提供材料. 基因敲除小鼠是研究疾病的发生机制、分子基础及诊断治疗的重要实验材料. 如1989年囊性纤维化病(CF)的致病基因(CFTR)被成功地克隆, 1992年成功建立了 CFTR 基因的基因敲除的 CF 小鼠模型, 为 CF 基因治疗提供了很好的动物模型, 得以顺利通过了通过了基因治疗的动物试验, 于1993年开始临床试验并获得成功. (2) 改造动物基因型, 鉴定新基因和/或其新功能, 研究发育生物学深入研究基因敲除小鼠在胚胎发育及生命各期的表现, 可以得到详细的有关该基因在生长发育中的作用, 为研究基因的功能和生物效应提供模式. 例如, 目前人类基因组研究多由新基因序列的筛选检测入手, 进而用基因敲除法在小鼠上观察该基因缺失引起的表型变化. 目前已报道了多种学习、记忆以及有缺陷的基因敲除动物, 发现多种基因在学习、记忆的形成过程中必不可少. (3) 治疗遗传病. 这包括去除多余基因或修饰改造原有异常基因以达到治疗的目的. (4) 改造生物、培育新的生物品种. 细菌的基因工程技术是本世纪分子生物学史上的一个重大突破, 而基因敲除技术则可能是遗传工程中的另一重大飞跃. 这项新技术在基础理论研究及实际应用中都将有着广阔的应用前景^[38-42].

基因敲除技术在国外已是成熟技术, 国内还仅仅是刚刚开始. 但是, 国内已有几家单位在这一领域开展了一些工作. 例如, 利用基因敲除系统, 国内研究了 Smad3 基因的功能, 成功地鉴定了 3 个与骨骼发育有关的新基因, 探讨了肿瘤坏死因子受体 II 在郎格罕细胞迁移中的作用、CD45 蛋白酪氨酸磷酸酶与小鼠表皮 $\gamma\delta$ T 细胞发育的关系, 研究了极低密度脂蛋白和中间密度脂蛋白与动脉硬化的关系, 将小鼠胚胎干细胞中凝血因子 IX(mF IX)基因定向敲除, 为建立血友病 B 的转基因小鼠模型奠定了基础^[43-44].

5 显负性突变体策略

蛋白以及蛋白之间的相互作用决定了蛋白的生物学功能及细胞的表型. 一种结构发生变化而失去其正常的生物学功能的蛋白质分子, 往往与其相应的野生型蛋白进行竞争性的抑制, 从而阻断野生型蛋白的生物学功能. 这种具有竞争性抑制野生型蛋白分子生物学功能的

突变体称为显负性突变体(dominant negative mutant). 显负性突变体在生物学研究中具有广泛的应用前景^[45-47].

HBV 基因组编码 2 种反式激活因子: HBxAg 和羧基末端截短型的表面抗原中蛋白(MHBst). 这 2 种反式激活蛋白都激活 c-Raf-1/MEK 激酶信号转导链. HBxAg 信号转导需要蛋白激酶 C(PKC)和 Ras 的共同参与, 但是 MHBst 仅需要 PKC, 而不需要 Ras. 单独阻断 HBxAg 或 MHBst 的信号转导途径, 并不能减少转染的 HepG2 细胞中的病毒的产量, 但是利用 c-Raf-1- 或 MEK 显负性突变体抑制剂将 2 种反式激活因子的共同信号转导通路进行阻断, 则可以阻断 HBV 的基因表达.

持续的 HCV 复制说明 HCV 具有抑制机体的防御体系的功能. 研究表明 HCV NS3/4A 蛋白酶可以阻断干扰素调节因子-3(IRF-3)这种抗病毒关键效应分子的磷酸化修饰和生物学功能. IRF-3 显负性突变体的表达可以提高肝癌细胞中的 HCV RNA 的复制水平. HCV NS5A 蛋白是一种具有催化多种蛋白磷酸化修饰的蛋白, 因而参与不同的细胞信号转导系统. 在其羧基末端高度保守的 II 型多脯氨酸结构位点 SH3 位点与 Src 蛋白酪氨酸激酶族以及有丝分裂原接头蛋白 Grb2 的结合, 产生多种生物学调节作用.

TNF α 可以诱导肝细胞的细胞凋亡, 也可以诱导肝脏的再生过程, 但是具体机制不清. 应用基因芯片技术对于 TNF α 有道德基因类型进行研究, 发现对白细胞素-8(IL-8)是诱导水平是最高的. 但是应用一种显负性突变体 I κ B、没有激酶活性的 Akt 突变体阻断 NF- κ B 和 PI3K/Akt 信号转导通路, 或应用 LY 294002 特一行阻断 PI3K 时, TNF α 对 IL-8 的上调作用消失. 提示负显性突变体的构建是研究信号转导的重要技术手段.

6 参考文献

- 1 Pierce EA, Liu Q, Igoucheva O, Omarrudin R, Ma H, Diamond SL, Yoon K. Oligonucleotide-directed single-base DNA alterations in mouse embryonic stem cells. *Gene Ther* 2003;10: 24-33
- 2 Gleason M. Targeting anti-apoptotic genes with antisense oligodeoxy-nucleotides to delay progression to androgen independence. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1999;2(S3):S15
- 3 Karle J. Antisense studies of brain GABAA receptors. *Dan Med Bull* 2002;49:130-144
- 4 Efferth T, Fabry U, Osieka R. Damage of the kinesin heavy chain gene contributes to the antagonism of cisplatin and paclitaxel. *Anticancer Res* 2000;20:3211-3219
- 5 Saeki T, Takashima S, Tachibana M, Koga M, Hiyama E, Salomon DS, Holland JF, Ohnuma T. Inhibitory effect of telomere-mimic phosphorothioate oligodeoxy nucleotides (S-ODNS) on human tumor cell lines. *Oncology* 1999;57(Suppl 2):27-36
- 6 Fearon KL, Hirschbein BL, Nelson JS, Foy MF, Nguyen MQ, Okruszek A, McCurdy SN, Frediani JE, DeDionisio LA, Raible AM, Cagle EN, Boyd V. An improved synthesis of oligodeoxynucleotide N3'-->P5' phosphoramidates and their chimera using hindered phosphoramidite monomers and a novel handle for reverse phase purification. *Nucleic Acids Res* 1998;26:3813-3824
- 7 Liedtke CM, Cole T. Antisense oligodeoxynucleotide to PKC-delta blocks alpha 1-adrenergic activation of Na-K-2Cl cotransport. *Am J Physiol* 1997;273:C1632-1640
- 8 Cleek RL, Rege AA, Denner LA, Eskin SG, Mikos AG. Inhibi-

- tion of smooth muscle cell growth in vitro by an antisense oligodeoxynucleotide released from poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microparticles. *J Biomed Mater Res* 1997;35:525-530
- 9 Salas PJ, Rodriguez ML, Viciano AL, Vega-Salas DE, Hauri HP. The apical submembrane cytoskeleton participates in the organization of the apical pole in epithelial cells. *J Cell Biol* 1997;137:359-375
- 10 Soldatenkov VA, Dritschilo A, Wang FH, Olah Z, Anderson WB, Kasid U. Inhibition of Raf-1 protein kinase by antisense phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide is associated with sensitization of human laryngeal squamous carcinoma cells to gamma radiation. *Cancer J Sci Am* 1997;3:13-20
- 11 Robinson CJ, Scott PH, Allan AB, Jess T, Gould GW, Plevin R. Treatment of vascular smooth muscle cells with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides directed against p42 and p44 mitogen-activated protein kinases abolishes DNA synthesis in response to platelet-derived growth factor. *Biochem J* 1996;320:123-127
- 12 Nadal A, Robertson HD, Guardia J, Gomez J. Characterization of the structure and variability of an internal region of hepatitis C virus RNA for M1 RNA guide sequence ribozyme targeting. *J Gen Virol* 2003;84:1545-1548
- 13 De Francesco R, Rice CM. New therapies on the horizon for hepatitis C: are we close? *Clin Liver Dis* 2003;7:211-242
- 14 Deschenes P, Ouellet J, Perreault J, Perreault JP. Formation of the P1.1 pseudoknot is critical for both the cleavage activity and substrate specificity of an antigenomic trans-acting hepatitis delta ribozyme. *Nucleic Acids Res* 2003;31:2087-2096
- 15 Ryu KJ, Kim JH, Lee SW. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol Ther* 2003;7:386-395
- 16 Nishikawa F, Kakiuchi N, Funaji K, Fukuda K, Sekiya S, Nishikawa S. Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Res* 2003;31:1935-1943
- 17 Circle DA, Lyons AJ, Neel OD, Robertson HD. Recurring features of local tertiary structural elements in RNA molecules exemplified by hepatitis D virus RNA. *RNA* 2003;9:280-286
- 18 Inoue K, Shoji Y, Kurane I, Iijima T, Sakai T, Morimoto K. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *J Virol Methods* 2003;107:229-236
- 19 Krishna NK, Marshall D, Schneemann A. Analysis of RNA packaging in wild-type and mosaic protein capsids of flock house virus using recombinant baculovirus vectors. *Virology* 2003;305:10-24
- 20 Huang ZS, Su WH, Wang JL, Wu HN. Selective strand annealing and selective strand exchange promoted by the N-terminal domain of hepatitis delta antigen. *J Biol Chem* 2003;278:5685-5693
- 21 Nishikawa F, Shirai M, Nishikawa S. Site-specific modification of functional groups in genomic hepatitis delta virus (HDV) ribozyme. *Eur J Biochem* 2002;269:5792-5803
- 22 Morrissey DV, Lee PA, Johnson DA, Overly SL, McSwiggen JA, Beigelman L, Mokler VR, Maloney L, Vargeese C, Bowman K, O'Brien JT, Shaffer CS, Conrad A, Schmid P, Morrey JD, Macejak DG, Pavco PA, Blatt LM. Characterization of nuclease-resistant ribozymes directed against hepatitis B virus RNA. *J Viral Hepat* 2002;9:411-418
- 23 Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K, Ichikawa T, Ishikawa H, Eguchi K. Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication. *FEBS Lett* 2003;543:51-54
- 24 Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003;4:602-608
- 25 McCaffrey AP, Nakai H, Pandkey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003;21:639-644
- 26 Stephenson J. Giving HIV the silent treatment and other strategies examined at conference. *JAMA* 2003;289:1494-1495
- 27 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003;37:764-770
- 28 Zamore PD, Aronin N. siRNAs knock down hepatitis. *Nat Med* 2003;9:266-267
- 29 Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, Sarangi F, Harris-Brandts M, Beaulieu S, Richardson CD. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2783-2788
- 30 Couzin J. RNA interference. Mini RNA molecules shield mouse liver from hepatitis. *Science* 2003;299:995
- 31 Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003;9:347-351
- 32 Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2014-2018
- 33 Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:235-240
- 34 Santoro N. Mechanisms of premature ovarian failure. *Ann Endocrinol (Paris)* 2003;64:87-92
- 35 Bettaieb A, Dubrez-Daloz L, Launay S, Plenchette S, Rebe C, Cathelin S, Solary E. Bcl-2 proteins: targets and tools for chemosensitisation of tumor cells. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2003;3:307-318
- 36 Champiaux N, Changeux JP. Knock-out and knock-in mice to investigate the role of nicotinic receptors in the central nervous system. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord* 2002;1:319-330
- 37 Berr SS, Roche JK, El-Rifai W, Smith MF Jr, Powell SM. Magnetic resonance imaging of gastric cancer in Tff1 knock-out mice. *Magn Reson Med* 2003;49:1033-1036
- 38 Reuter H, Henderson SA, Han T, Mottino GA, Frank JS, Ross RS, Goldhaber JJ, Philipson KD. Cardiac excitation-contraction coupling in the absence of Na(+)-Ca(2+) exchange. *Cell Calcium* 2003;34:19-26
- 39 Balakrishnan V, Becker M, Lohrke S, Nothwang HG, Guresir E, Friauf E. Expression and Function of Chloride Transporters during Development of Inhibitory Neurotransmission in the Auditory Brainstem. *J Neurosci* 2003;23:4134-4145
- 40 Chaperon F, Tricklebank MD, Unger L, Neijt HC. Evidence for regulation of body temperature in rats by dopamine D(2) receptor and possible influence of D(1) but not D(3) and D(4) receptors. *Neuropharmacology* 2003;44:1047-1053
- 41 Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res* 2003;52:95-100
- 42 Cho CH, Lee SY, Shin HS, Philipson KD, Lee CO. Partial rescue of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX1) knock-out mouse by transgenic expression of NCX1. *Exp Mol Med* 2003;35:125-135
- 43 Tsukahara K, Hata K, Nakamoto K, Sagane K, Watanabe NA, Kuromitsu J, Kai J, Tsuchiya M, Ohba F, Jigami Y, Yoshimatsu K, Nagasu T. Medicinal genetics approach towards identifying the molecular target of a novel inhibitor of fungal cell wall assembly. *Mol Microbiol* 2003;48:1029-1042
- 44 Jefferson KK, Cramton SE, Gotz F, Pier GB. Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the ica locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol Microbiol* 2003;48:889-899
- 45 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
- 46 Sartorato P, Lapeyraque AL, Armanini D, Kuhnle U, Khaldi Y, Salomon R, Abadie V, Di Battista E, Naselli A, Racine A, Bosio M, Caprio M, Poulet-Young V, Chabrolle JP, Naudet P, De Gennes C, Lecornec MH, Poisson E, Fusco AM, Loli P, Lombes M, Zennaro MC. Different inactivating mutations of the mineralocorticoid receptor in fourteen families affected by type I pseudohypoaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2508-2517
- 47 Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H(2)O(2) regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:615-622

蛋白质组学与肝脏疾病研究

成 军

成军, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、
全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

成军, 男, 1963-08-17 生, 山东省淄博市人, 汉族. 1994 年北京医科大学
传染病学博士, 1994-11-17/1997-12-01 美国得克萨斯大学健康科学中心
临床免疫与传染病学博士后. 教授, 主任医师, 内科传染病学博士生导师, 生
物化学与分子生物学专业博士生导师, 主要研究肝炎病毒与肝细胞相互作
用的分子生物学机制. 现任中华医学会传染病与寄生虫病学分会副主任委员、
《中华传染病杂志》副主编、《胃肠病学和肝病学杂志》副主编、《热带医学与
寄生虫病杂志》副主编、《传染病信息》杂志副主编、《World J Gastroenterol》
编委等.

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第
302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实
验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-08-20

成军. 蛋白质组学与肝脏疾病研究. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2276-2279
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2276.asp>

0 引言

蛋白质组学(proteomics)的概念是在 1995 年提出来的, 当时的含义是对于细胞系、组织以及生物中的全部蛋白进行大规模研究的一门科学^[1]. 目前有两种不同的蛋白质组学的定义: 第一种是较为经典的定义, 限于对基因编码产物进行大规模的分析, 研究内容仅限于蛋白质. 第二种定义包容性更大, 除了蛋白质的研究之外, 还包括遗传信息的流向, 即 mRNA、基因组学(genomics)以及研究蛋白-蛋白相互作用的酵母双杂交(yeast-two hybrid)分析等. 但是, 无论概念上怎么改变, 蛋白质组学的任务还是一样, 即通过对所有的蛋白, 而不是单一的蛋白进行整体、有机的研究, 阐明这些蛋白质的结构和生物学功能.

采用更加具有包容性的蛋白质组学的概念, 许多不同研究领域都可以归属在蛋白质组学的范围之内^[2-5]. 例如, 蛋白-蛋白之间的相互作用、蛋白的修饰、蛋白的功能、蛋白在细胞内的定位等. 蛋白质组学的任务不仅是要鉴定一个细胞内全部的蛋白成分, 而且要建立起各种蛋白之间相互关系的 3 维(3D)立体关系图, 这么庞大的计划当然需要许多专业的科学家的共同参与, 如分子生物学家、生物化学家、生物信息学家等. 在这项研究中, 生物信息学专家的作用尤其重要, 需要建立更为强大的数据库和相应的计算机分析技术, 对于研究过程中所产生的大量数据进行快速而准确的计算、分析和处理.

对于一个特定的细胞或生物类型来说, 其蛋白质的组成并不是一成不变的, 而是无时无刻不出在变化之中, 这是进行蛋白质组学研究必须考虑的一个重要的因素^[6-10]. 细胞所处的外环境因素的改变, 可导致细胞蛋白质组学参数的显著改变. 细胞外和细胞内刺激信号都可以诱导细胞内蛋白的翻译后修饰, 在细胞内发生转位, 或者有新蛋白的合成, 或者有蛋白进行降解. 因此, 任何一项蛋白质组研究的结果, 都只是反映了当时条件下的蛋白质的结构和功能.

1 蛋白质组学的基本概况

1.1 蛋白质组学的发展历程 可以称得上是蛋白质组学最早的研究当数 1975 年进行的蛋白质双向电泳(2-DE)分析. 利用双向电泳技术对于大肠杆菌、小鼠、豚鼠等的蛋白进行作图分析. 尽管利用双向电泳技术可以分离出一系列的蛋白质, 但是却不能进一步的鉴定^[11-14]. 尽管如此, 此后不久随着蛋白质双向电泳资料的不断累计, 建立了相应的蛋白质 2-DE 参数数据库, 对于人体中的各种蛋白进行分类.

2-DE 分析将蛋白质组学研究向前推进了一步, 但是一直到 Edman 降解法对于蛋白的序列进行测定出现之后, 与 2-DE 技术相结合, 才真正形成了新的突破. 在蛋白质组学研究中最为重要的技术突破是蛋白质的质谱分析(MS, mass spectrometer)技术的应用, 近 10 a 来, 应用质谱技术分析的蛋白种类增加了数个数量级. 蛋白质质谱分析技术非常敏感, 可以分析混合物中的蛋白成分, 而且可以进行高通量技术分析, 基本上可以替代 Edman 序列分析技术.

蛋白质组学的发展, 直接得益于表达序列标签(EST, expressed sequence tag)以及基因组 DNA 的大规模序列分析. 没有基因组计划的实施, 即使质谱分析和 Edman 测序技术再有效, 也不可能在如此之短的时间内将如此大量的蛋白进行鉴定. 基因序列和蛋白序列大部分都是在最近的 5-10 a 内完成的. 1995 年完成了第一个生物, 即流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)基因组的测序工作, 到 2002 年的第一季度已经完成了 45 种生物的全基因组测序, 另外 170 种生物全基因组的测序也在进行之中. 到目前为止, 已经有 5 种真核生物的基因组测序完成, 包括 *Arabidopsis thaliana*、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、*Schizosaccharomyces pombe*、美丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)、果蝇(*Drosophila*

malanogaster)等,小鼠和人的基因组测序工作已经接近完成。

1.2 蛋白质组学的主要研究内容 许多生物学信息仅仅研究基因的序列是得不到的,只有蛋白质分子才能赋予细胞特定的表型^[15-17]。只有基因组学的资料不足以阐明疾病、衰老、机体对于环境因素刺激的应答机制。发展蛋白质组学具有多方面的意义。(1)注解基因组信息。蛋白质组学的第一个任务就是鉴定基因组中所有的编码基因序列。基因组的功能注解是非常重要的,因为只有全基因组序列还不足以阐明其编码的功能。大部分的外显子(exon)和内含子(intron)序列,都不能通过生物信息学技术进行预测,只有将基因组序列和蛋白序列研究结果结合起来,才能真正有效阐明基因组中的编码基因组列。(2)蛋白表达研究。近年来对于mRNA表达的研究发展很快,特别是基因表达系列分析(SAGE, serial analysis of gene expression)和DNA芯片(DNA microarray)技术的应用,但是mRNA的分析并不能代替细胞内蛋白的分析,许多研究发现mRNA转录水平和细胞内蛋白的实际水平往往有很大的差别。从mRNA到蛋白质还需要经过一系列的转录后和翻译后修饰。因此不能简单解释“一个基因,一个蛋白”的理论,况且在血液和体液中只有蛋白,没有mRNA存在。(3)蛋白功能研究。在基因组研究中发现1/3的基因还没有对应的功能。对于细胞中所有蛋白进行研究,有助于建立细胞中蛋白之间的3D关系,必须对于蛋白的功能进行研究。(4)蛋白修饰研究。对于蛋白质翻译后的修饰研究是蛋白质组学的重要内容。细胞在受到细胞外、细胞内的刺激之后,细胞内的蛋白发生翻译后的修饰。蛋白激酶对于底物蛋白的磷酸化修饰、蛋白磷酸酶对于底物蛋白的去磷酸化修饰,都是调节蛋白生物学功能的重要机制和途径。(5)蛋白定位研究。研究表明蛋白的异常定位对于细胞的功能将产生显著的影响。(6)蛋白-蛋白相互作用研究。细胞生长、细胞凋亡、细胞周期等的调节,都是通过蛋白-蛋白之间的相互作用实现的。利用酵母双杂交技术对于幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)蛋白的结合蛋白进行研究,发现了1200种不同形式的蛋白-蛋白之间的相互作用。对于*Saccharomyces cerevisiae*蛋白结合蛋白的作图分析也正在进行之中。

2 蛋白质组学技术

2.1 蛋白质组学的分类 根据不同的目的和采用的不同的技术,蛋白质组学可以分成不同的类型^[18-20]。(1)蛋白表达蛋白质组学(protein expression proteomics):对于不同样品中的蛋白进行定量分析,以发现信号转导或疾病相关的蛋白类型,称为蛋白表达蛋白质组学。(2)结构蛋白质组学(structural proteomics):研究细胞器等特殊细胞内部位的蛋白及蛋白复合体中的蛋白质分子结构的研究,称为结构蛋白质组学。结构蛋白质组学的主要任务就是确定各种蛋白质的结构、亚细胞定位、结合蛋白

等。(3)功能蛋白质组学(functional proteomics):功能蛋白质组学具有多方面的含义。功能蛋白质组学的研究,有助于阐明信号转导的机制、疾病发生的机制、以及蛋白-药物之间的相互作用等。

2.2 蛋白质组学研究中的主要技术类型 蛋白质组学研究中主要涉及的技术主要包括蛋白的分离和鉴定、蛋白质结构研究、数据库的应用等方面^[21-22]。

在蛋白质的分离和鉴定中,聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),包括2-DE和质谱分析得到了广泛的应用。分析的蛋白样品可以是从小细胞或组织中提取的全部蛋白,也可以是组分;可以是原始状态的蛋白成分,也可以经过加工、初步分离纯化以后在进行分析。2-DE和MS技术还可以联合使用,以提高蛋白分离鉴定的效率和精确度。胰蛋白酶消化、质谱分析、液相层析、毛细管电泳(capillary electrophoresis)、多维蛋白鉴定、阳离子交换层析、反向层析等技术的相互组合,可以显著提高蛋白分离鉴定的工作效率。

蛋白质结构和序列的测定,较早应用的技术包括Edman末端测序分析、质谱分析(mass spectrometer)。蛋白质的质谱分析技术包括样品的制备、样品的离子化、质谱分析等过程。

在蛋白质组学研究中数据库的建立和应用也是一个关键。利用Edman末端测序分析、质谱分析技术获得了一系列的蛋白质结构数据,建立了庞大的数据库,并且相继建立了复杂的计算机分析技术。目前可以利用的蛋白质结构数据库包括肽谱指纹数据库(peptide mass fingerprinting database)、氨基酸序列数据库(amino acid sequence database)、新生多肽序列数据库(de novo peptide sequence database)、不能分子的质谱数据库(uninterpreted MS/MS database)等。

3 蛋白质组学的应用

蛋白质组学研究的用途十分广泛。

3.1 蛋白复合物的鉴定 目前许多实验室都致力于应用MS技术鉴定蛋白复合物。先将已知蛋白与谷胱甘肽S-转移酶(GST)基因融合,表达带有GST标签的融合蛋白作为诱饵,然后与特定细胞的蛋白进行混合,经过混合蛋白的序列测定,鉴定出已知蛋白的结合蛋白。Joberty *et al*^[1]将已知蛋白Borg3这种Cdc42效应分子与GST基因融合,在大肠杆菌中标出带有GST标签的融合蛋白,然后与小鼠成纤维细胞NIH 3T3的蛋白混合,对于结合的蛋白复合进行序列分析,证实与Borg3蛋白结合的蛋白包括热休克蛋白70(HSP70),3中sepin蛋白,包括Septin 6、Cdc10和Nedd5蛋白等。利用免疫共沉淀技术也证实了Borg3蛋白与Cdc10和Nedd5蛋白之间的结合能力。虽然利用这种pull-down技术可以很快鉴定与Borg3蛋白结合的蛋白,但是随后的研究证实他们之间的结合作用需要花费数个月的时间。

3.2 蛋白表达谱的研究 蛋白质组学技术应用最为广泛

的是蛋白表达谱的研究. 2-DE和同位素编码的亲标签(isotope-coded affinity tags)分析技术在2种蛋白样品中蛋白表达水平的比较分析中具有广泛的应用, 可以快速鉴定信号转导相关蛋白以及疾病相关蛋白. 目前大部分蛋白表达谱的研究都是采用2-DE技术完成的, 包括心脏病、肿瘤等. 2-DE技术特别适用于肿瘤的研究, 将肿瘤组织和相应的没有发生转化的正常组织进行对比研究就可以获得一系列的研究资料. 2-DE技术的应用可以发现肿瘤特异性的生物学标志物、肿瘤发生和发展相关的蛋白分子、抗肿瘤治疗的新的药物作用靶位. 除了2-DE技术之外, 将2种蛋白样品, 与1种或2种ICAT试剂通过分子结构中的半胱氨酸残基结合, 并产生一个生物素(biotin)基团, 利用亲和层析系统对于结合的蛋白进行纯化. 然后再利用MS技术进行进一步的分析. 蛋白芯片(protein array)技术也是蛋白表达谱研究的重要技术途径. 蛋白芯片技术在蛋白-蛋白结合、蛋白-配体结合的分析中也具有十分重要的应用前景.

3.3 蛋白翻译后修饰研究中的应用 蛋白的翻译后修饰是细胞调节的一种基本方式, 对于蛋白翻译后修饰是研究蛋白质生物学功能的关键环节. MS技术是研究蛋白质翻译后修饰的重要的技术途径, 因为MS可以分析蛋白分子中任何一种形式的修饰^[23-26]. 例如, 蛋白的磷酸化修饰就是蛋白翻译后修饰的一种重要类型. 分析蛋白的磷酸化修饰, 第一步是对于磷酸化修饰蛋白的富集, 通过富集, 可以对低拷贝的磷酸化蛋白进行分析. 对于磷酸化修饰的蛋白的分离有多种技术. 例如对于磷酸化的丝氨酸残基转变成成为生物素化的氨基酸残基, 利用亲和层析方法获得发生磷酸化修饰的蛋白, 对于发生磷酸化修饰的蛋白进行富集. 然后利用Edman降解法对于磷酸化的位点进行定位分析. 因为MS可以直接测定发生磷酸化修饰的氨基酸残基, 因此利用MS技术可以对磷酸化修饰的位点进行直接的测定.

3.4 结合蛋白的发掘 蛋白发掘(proteome mining)是功能蛋白质组学的一种研究策略. 理论基础是认为任何一种药物样的分子, 都是选择性地结合靶蛋白分子, 而且是与天然的配体分子进行竞争性的结合. 在蛋白发掘研究中, 首先将配体分子高密度固相化, 而且结合的方式的立体化学特点有利于结合蛋白靶分子. 然后将细胞或组织来源的蛋白与配体分子进行结合, 对于结合配体分子的蛋白进行序列分析, 就可以找到与配体结合的蛋白质分子.

4 蛋白质组学与肝脏疾病研究

蛋白质组学研究的历史还很短, 在肝脏疾病研究中的应用还不是十分广泛, 但是, 蛋白质组学技术在肝脏疾病的研究中肯定也具有十分重要的应用前景.

质谱分析技术是一种快速、敏感的研究蛋白质辅助因子立体化学的重要技术类型. Orsatti *et al*研究了丙型肝炎病毒(HCV)NS3蛋白酶及其辅助因子NS4A. NS3/

NS4A复合物中的2种蛋白是通过非共价键结合的. 质谱分析非常敏感, 样品的需要量仅仅是纳摩尔级. 高效液相色谱(HPLC)何止谱分析结果表明, NS3/NS4A复合物中2种蛋白成分的比例是1:1, 与其他研究方法所得出的结果一致. Orsatti *et al*对于HCV的NS2/3蛋白复合物进行分析, 在100 mMβ-巯基乙醇和变性条件下, 发现在半胱氨酸残基上出现修饰. 修饰后的蛋白复性之后活性下降. 液相色谱和质谱的联合分析发现在9个半胱氨酸残基位点有5个发生巯基化修饰. 但是所有修饰后的蛋白活性都有不同程度的下降. Anbar *et al*利用质谱技术对于病毒性肝炎患者尿液中的多种成分进行分析, 发现24种中性代谢产物中与正常人不同, 应用这些指标对于病毒性肝炎患者的诊断率达到100%. 这一结果显然优于对尿中的酸性物质的质谱分析, 病毒性肝炎患者尿液中仅9种酸性物质与正常人不同, 而且对于病毒性肝炎的诊断率只有91%.

Poon *et al*设计筛选慢性肝病患者中肝细胞癌(HCC)的蛋白芯片技术. 对20例AFP阳性的慢性肝病患者和38例HCC患者进行分析, 顺序进行阳离子交换层析、蛋白芯片和质谱分析. 结果表明蛋白质组学理论和技术在肝脏疾病的研究中具有十分重要的应用前景.

5 参考文献

- 1 Jorberty G, Perlungher RR, Sheffield PJ, Kinoshita M, Noda M, Haystead T, Macara IG. Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat Cell Biol* 2001;3:861-866
- 2 Soellick TR, Uhrig JF. Development of an optimized interaction-mating protocol for large scale yeast-two hybrid analyses. *Genome Biol* 2001;2:1-7
- 3 Lawrence DS. Functional proteomics: large-scale analysis of protein kinase activity. *Genome Biol* 2001;2:1-3
- 4 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:15-18
- 5 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 陆荫英, 夏小兵, 李莉, 杨继珍. 丙型肝炎病毒核心蛋白基因表达载体的构建及在酵母中的表达. *军医进修学院学报* 2002;23:1-3
- 6 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 李莉, 刘妍, 段惠娟. 丙型肝炎病毒NS2基因酵母双杂交“饵”载体构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:129-132
- 7 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 丙型肝炎病毒蛋白结合蛋白. *世界华人消化杂志* 2002;10:215-217
- 8 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 洪源, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒蛋白结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:213-215
- 9 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164
- 10 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S1基因酵母表达载体的构建及表达. *解放军医学杂志* 2002;27:341-342
- 11 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int* 2002;1:238-242
- 12 李克, 王琳, 成军, 陆荫英, 张玲霞, 牟劲松, 洪源, 刘妍, 段惠娟, 王刚, 李莉, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒核心蛋白与染色体转位蛋白的相互作用. *中华医学杂志* 2002;82:673-677
- 13 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 邵得志, 夏小兵, 王刚, 董菁, 李莉, 钟彦伟, 洪源, 陈菊梅. 筛选与克隆丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白6基因. *中华实验和临床病毒学杂志* 2002;16:351-354
- 14 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2基因酵母表达载体的构建及表达. *胃肠病学和肝病杂志* 2002;

- 11:222-224
- 15 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟, 段惠娟, 芮莉莉. 丙型肝炎病毒核心蛋白与载脂蛋白 A1 结合的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1018-1021
- 16 王琳, 李克, 成军, 陆荫英. 人肝再生增强因子表达载体的构建及其在酵母中的表达. 中华肝病杂志 2002;10:384
- 17 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 张玲霞, 王业东, 成军. 乙肝病毒表面抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 军医进修学院学报 2003;24:49-51
- 18 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 刘妍, 王刚, 洪源, 王贺, 芮莉莉. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2003;28:50-52
- 19 李克, 王琳, 成军, 张玲霞, 段惠娟, 陆荫英, 杨继珍, 刘妍, 洪源. 酵母双杂交技术筛选克隆丙型肝炎病毒 NS3 蛋白结合蛋白. 解放军医学杂志 2003;28:31-33
- 20 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 王业东, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前-S2 蛋白结合蛋白的筛选. 中华肝病杂志 2003;11:8-10
- 21 陆荫英, 王琳, 刘妍, 李克, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒核心抗原与金属硫蛋白相互作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:161-163
- 22 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003;9:300-303
- 23 陆荫英, 王琳, 刘妍, 李克, 成军, 张玲霞, 李莉. 乙型肝炎病毒 e 抗原与金属硫蛋白相互作用的研究. 解放军医学杂志 2003;28:451-453
- 24 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选 Hcsp6 结合的肝细胞蛋白编码基因. 世界华人消化杂志 2003;11:385-388
- 25 陆荫英, 王琳, 成军, 李克, 刘妍, 张玲霞. 酵母双杂交技术筛选 HBcAg 肝细胞结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2003;11:426-429
- 26 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBcAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425

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>.

食管癌及癌前病变组织中hTERT基因的表达

李娟, 王沁, 容渭德

李娟, 兰州医学院医学实验中心 甘肃省兰州市 730000
王沁, 兰州医学院第一附属医院消化科 甘肃省兰州市 730000
容渭德, 渭源县人民医院 甘肃省渭源县 748200
李娟, 女, 1973-04-06 生, 甘肃省渭源县人, 汉族, 1997 年兰州医学院本科毕业, 2003 年兰州医学院硕士研究生毕业, 现在兰州医学院医学实验中心从事医学科研工作。
项目负责人: 李娟, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州医学院医学实验中心。
收稿日期: 2003-01-15 接受日期: 2003-02-18

Expressions of human telomerase reverse transcriptase gene in cancer and pre-cancer tissues of esophagus

Juan Li, Qin Wang, Wei-De Rong

Juan Li, Centre for Experimental Medicine, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Qin Wang, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Wei-De Rong, Weiyuan People's Hospital, Weiyuan 748200, Gansu Province, China
Correspondence to: Juan Li, Centre for Experimental Medicine, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, Gansu Province, China.
Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-02-18

Abstract

AIM: To investigate the expressions of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in cancer and pre-cancer tissues of esophagus and its relation with cellular proliferation antigen Ki-67 and to investigate the value of hTERT in early diagnosis for esophageal cancer as well as predication of prognosis.

METHODS: *In situ* hybridization was adopted to detect the expressions of hTERTmRNA in tissues of esophageal cancer (42 cases), atypical hyperplasia (37 cases), and normal esophagus (12 cases). Ki-67 antigen was detected by immunohistochemical methods.

RESULTS: The positive rates of hTERTmRNA in tissues of normal mucosa, atypical hyperplasia and cancers were 0.0%, 48.6%, and 83.3% while rates of Ki-67 antigen were 0%, 56.8%, and 88.1% respectively. The expressions of hTERTmRNA and Ki-67 were significantly increased in tissues of hyperplasia and cancer, compared with those in the normal tissues ($P < 0.01$); Expressions of hTERTmRNA and Ki-67 antigen between hyperplasia and cancer also had significant differences ($P < 0.01$). Expressions of hTERTmRNA and Ki-67 antigen significantly related to clinical staging of esophageal cancer and metastasis of lymph node ($P < 0.05$). Meanwhile, there was significant relation between expression of hTERTmRNA and Ki-67 antigen ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Over-expression of hTERT gene may play an important role during carcinogenesis and progression of esophageal cancer; Expression of hTERTmRNA is rela-

tive to cellular proliferating activity. The detection of hTERT will be helpful for early diagnosis and prognosis evaluation of esophageal cancer.

Li J, Wang Q, Rong WD. Expressions of human telomerase reverse transcriptase gene in cancer and pre-cancer tissues of esophagus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2280-2282

摘要

目的: 探讨肿瘤相关基因端粒酶逆转录酶(hTERT)基因在食管癌及癌前病变组织中的表达及与细胞增生核抗原Ki-67的关系; 探讨hTERT基因对食管癌早期诊断及食管癌预后判定的价值。

方法: 采用原位杂交法检测食管癌组织42例、不典型增生组织37例及正常食管组织12例中hTERTmRNA的表达; 用免疫组化S-P法检测Ki-67抗原表达。

结果: 在正常食管黏膜、不典型增生、食管癌组织中, hTERTmRNA的阳性表达率分别为0%, 48.6%, 83.3%; Ki-67抗原的阳性表达率分别为0%, 56.8%, 88.1%; 癌组织与不典型增生组织中hTERTmRNA与Ki-67抗原阳性表达率较正常食管黏膜差异有显著性($P < 0.01$); 癌组织中hTERTmRNA与Ki-67抗原阳性表达率较不典型增生组织差异有显著性($P < 0.01$); 食管癌组织中hTERTmRNA与Ki-67抗原表达与临床分期、淋巴结转移有关($P < 0.05$); 结果还显示hTERTmRNA和Ki-67抗原表达具有显著相关性($P < 0.05$)。

结论: 端粒酶逆转录酶基因的异常表达在食管癌的发生、发展过程中具有重要作用, hTERTmRNA的表达与细胞增殖活性有关; hTERT基因表达的检测有助于食管癌的早期诊断以及食管癌预后的判定。

李娟, 王沁, 容渭德. 食管癌及癌前病变组织中hTERT基因的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2280-2282

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2280.asp>

0 引言

端粒酶(Telomerase)是一种核糖核蛋白复合物, 具有逆转录酶活性, 能以自身的RNA为模板合成端粒重复序列, 从而维持染色体的稳定和完整。端粒酶是迄今发现的一种最为广泛和特异的肿瘤标志, 与细胞恶变、肿瘤的发生、发展密切相关^[1]。端粒酶由RNA成分(hTR)、端粒酶相关蛋白1(TP1)和端粒酶逆转录酶

(hTERT)组成, 近来研究发现, hTERT 对端粒酶活性调节起重要作用^[2-3]. 我们采用原位杂交法检测hTERT基因在食管癌及癌前病变组织中的表达, 旨在探讨hTERT 基因在食管癌发生、发展中的表达意义以及与细胞增生的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 食管鳞癌组织 42 例(早期食管癌 9 例, 中晚期食管癌 33 例)、不典型增生组织 37 例(轻度不典型增生 15 例, 中度不典型增生 10 例, 重度不典型增生 12 例), 正常食管组织 12 例; 男 59 例, 女 32 例, 年龄 24 -68(平均 47 岁), 患者术前未行任何放疗及化疗. 所有组织均经 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 分别行 HE 染色及原位杂交 hTERTmRNA 和免疫组化 Ki-67 抗原检测.

1.2 方法 hTERTmRNA 检测采用原位杂交法, 试剂盒购自北京医科大学病理系, 为生物素标记的 hTERT-cRNA 探针. 以不加探针及 RNA 酶处理切片为空白对照. 切片要避免 Rnase 污染, 载玻片涂 APES 防脱胶, 4 μm 厚切片. Ki-67 抗原检测采用免疫组化法, 鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体, S-P 试剂盒购自福州迈新公司. 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 用已知阳性切片作阳性对照. 阳性信号为棕黄色颗粒, 每组每份标本随机选 10 个视野 × 400, 分级: 阴性(细胞不显色); 弱阳性(+ 阳性细胞

数<25%); 阳性(++ 阳性细胞数 25-50%);强阳性(+++ 阳性细胞数>50%).

统计学处理 采用χ² 检验、Bonferroni 法及 Fisher 精确概率法检验.

2 结果

2.1 hTERTmRNA 与 Ki-67 抗原的表达 正常食管黏膜组织中无 hTERTmRNA 及 Ki-67 抗原表达; 癌组织中 hTERTmRNA 阳性率为 83.3%, Ki-67 抗原阳性率为 88.1%, 多以阳性与强阳性表达为主; 不典型增生组织中 hTERTmRNA 阳性率为 48.6%, Ki-67 抗原阳性率为 56.8%, 多以弱阳性表达为主;在食管上皮不典型增生组织中, 随不典型增生程度的增加, hTERTmRNA 与 Ki-67 抗原的表达有增高趋势, 在轻度不典型增生组织中 hTERTmRNA, Ki-67 抗原阳性表达率分别为 26.6% 和 40%; 在重度不典型增生组织中 hTERTmRNA, Ki-67 抗原阳性表达率分别为 66.7% 和 75.0%, 且以弱阳性表达为主. 癌组织与不典型增生组织中 hTERTmRNA 及 Ki-67 抗原阳性表达率较正常食管黏膜差异有显著性 ($P < 0.01$); 癌组织中 hTERTmRNA 及 Ki-67 抗原阳性表达率较不典型增生组织差异有显著性 ($P < 0.01$); 轻度不典型增生与重度不典型增生组织间两指标差异有显著性 ($P < 0.01$, 表 1).

表 1 不同食管病变组织中 hTERTmRNA 及 Ki-67 抗原表达情况

分组	n	hTERTmRNA				Ki-67 抗原			
		+	++	+++	合计 (%)	+	++	+++	合计 (%)
正常食管黏膜	12	0	0	0	0 (0.0)	0	0	0	0 (0.0)
不典型增生	37	9	6	3	18 (48.6) ^b	10	7	4	21 (56.8) ^b
轻度	15	4	0	0	4 (26.6) ^d	5	1	0	6 (40.0) ^d
中度	10	3	2	1	6 (60.0)	4	1	1	6 (60.0)
重度	12	2	4	2	8 (66.7)	2	4	3	9 (75.0)
食管癌	42	4	16	15	35 (83.3) ^b	4	15	18	37 (88.1) ^b

^b $P < 0.01$ vs 正常食管黏膜; ^d $P < 0.01$ vs 食管癌; ^c $P < 0.01$ vs 重度.

表 2 hTERTmRNA 与 Ki-67 抗原表达的相关性

hTERTmRNA	Ki-67 抗原		合计
	阳性	阴性	
阳性	50	3	53
阴性	8	30	38
合计	58	33	91

2.2 hTERTmRNA 及 Ki-67 抗原表达的相关性与临床病理的关系 根据患者年龄、性别、肿瘤部位、分化程度、有无淋巴结转移及临床分期进行分组分析, 结果示hTERTmRNA 与 Ki-67 抗原表达与食管癌的临床分期、淋巴结转移有统计学意义 ($P < 0.05$), 而与其他食管癌临床病理特征无统计学意义 ($P > 0.05$) 在 53 例

hTERTmRNA 阳性的食管组织中有 50 例 Ki-67 抗原阳性, 而 hTERTmRNA 和 Ki-67 抗原均为阴性有 30 例, 经相关性分析: Ki-67 抗原与 hTERTmRNA 表达具有显著相关性 ($P < 0.05$, 表 2).

3 讨论

hTERT 对端粒酶活性调节起重要作用, hTERT 基因的表达与端粒酶活性密切相关, 提示 hTERT 是激活端粒酶的限速酶. 许多恶性肿瘤的发生、发展是一个多步骤、多阶段的过程, 我们发现正常食管黏膜组织中无 hTERTmRNA 的表达, 而不典型增生组织中及食管癌组织中均有 hTERTmRNA 的表达, 癌组织中 hTERTmRNA 的阳性表达率高于不典型增生组织, 多以阳性与强阳性表达

为主;在食管上皮不典型增生组织中,随不典型增生程度的增加,hTERTmRNA的表达有增高趋势,以上结果提示hTERTmRNA的表达上调发生于食管癌癌变过程的早期阶段,这与Lord *et al*^[4-5]的报道基本一致.因此对癌前病变进行hTERTmRNA的监测有助于食管癌的早期发现.关于端粒酶的活化是否与恶性肿瘤的临床病理因素和预后有关尚存争议.我们发现hTERTmRNA表达与食管癌的临床分期、淋巴结转移有关,此结果与苑昕 *et al*^[6-7]的研究相一致,提示:hTERT基因异常表达可能与肿瘤的演进一致,与肿瘤的生物学行为有一定关系.因此,我们认为端粒酶基因表达有望成为判定食管癌预后的分子生物学指标.

Ki-67抗原是存在于增生细胞核的一种非组蛋白性核蛋白,与细胞增生密切相关.Ki-67抗原在细胞周期的G₁、S、G₂、M期细胞核表达能很好的反映肿瘤增生活性.我们的结果表明,正常食管组织中Ki-67抗原无表达;随食管上皮不典型增生程度的增加,Ki-67抗原的表达逐渐增加,且以弱阳性表达为主;食管癌组织中Ki-67抗原表达显著高于不典型增生组织,以阳性及强阳性表达为主,具有较高增生活性.将91例食管组织中Ki-67抗原与hTERTmRNA表达情况进行分析发现,Ki-67抗原与hTERTmRNA表达具有显著相关性($r=0.975$, $P<0.05$),以上提示hTERTmRNA表达与细胞增生活性有关^[8].hTERT对端粒酶活性调节起重要作用,端粒酶能合成端粒序列使细胞无限增生,而细胞

无限分裂增生是细胞恶性转化的重要生物学特性.因此,认为端粒酶活化是细胞保持持续分裂增生的基础,与细胞的异常增生密切相关,在肿瘤的发生发展中起非常重要的作用.

4 参考文献

- 1 Hahn WC, Meyerson M. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. *Ann Med* 2001;33:123-129
- 2 Xu D, Erickson S, Szeps M, Gruber A, Sangfelt O, Einhorn S, Pisa P, Grander D. Interferon alpha down-regulates telomerase reverse transcriptase and telomerase activity in human malignant and nonmalignant hematopoietic cells. *Blood* 2000;96:4313-4318
- 3 Du H, Xin XY, Wang J. Attenuation of telomerase activity by an antisense oligonucleotide against hTERT mRNA in ovarian cancer cells. *Disi Junyi Daxue Xuebao* 2000;21:366-368
- 4 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
- 5 Suzuki K, Kashimura H, Ohkawa J, Itabashi M, Watanabe T, Sawahata T, Nakahara A, Muto H, Tanaka N. expression of human telomerase catalytic subunit gene in cancerous and precancerous gastric conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:744-751
- 6 Yuan X, Zhang B, Ying JM, Jin YY, Hou L. Expression of telomerase genes in human tumors. *ZhongHua Binglixue Zazhi* 2000;29:16-19
- 7 Fu WJ, Shao GX, Jiang YD, Yan YN, Wang H, Chen BQ. Expression of human telomerase reverse transcriptase gene in bladder transitional cell carcinoma and its significance. *Disi Junyi Daxue Xuebao* 2001;22:1412-1415
- 8 Chou SJ, Chen CM, Harn HJ, Chen CJ, Liu YC. In situ detection of hTERT mRNA relates to Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinoma. *J Surg Res* 2001;99:75-83

世界华人消化杂志 2005年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003年版):2002年度世界华人消化杂志总被引频次4151,影响因子1.926,即年指标0.424,他引总引比0.45,引用刊数173,扩散因子4.2,被引半衰期2.99,地区分布数26,机构数138,国际论文比0.03,基金论文比0.27.2002年度各学科影响因子较高的3种期刊排名:世界华人消化杂志影响因子1.926,临床医学排名第2位.2002年度总被引频次较高的20种期刊排名:世界华人消化杂志总被引频次4151,排名第1位.世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊,中国科技论文统计源期刊,2001年度第一届中国百种杰出学术期刊.世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,荷兰《医学文摘库/医学文摘》,俄罗斯《文摘杂志》收录.为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展,从2005年开始,世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊,大16开,160页,每月1,15日出版,50元/期,全年24期,邮发代号82-262,北京报刊发行局发行.(世界胃肠病学杂志2004-06-15)

胃癌发生和演进中maspin和Kai1表达的临床病理意义

王孟春, 杨艳敏, 李晓晗, 董芳, 李岩

王孟春, 杨艳敏, 李岩, 中国医科大学附属二院消化内科
辽宁省沈阳市 110004

李晓晗, 董芳, 中国医科大学附属二院病理科 辽宁省沈阳市 110004
王孟春, 女, 1965-04-06 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 2002 年中国医科大学医学博士, 主要从事消化道肿瘤和幽门螺杆菌相关性胃病的研究, 发表论文 15 篇。
项目负责人: 王孟春, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号, 中国医科大学附属二院消化内科, mengchunwang@hotmail.com
电话: 024-83956947
收稿日期: 2004-06-24 接受日期: 2004-08-05

Clinicopathological significance of maspin and Kail expressions in carcinogenesis and progression of gastric cancer

Meng-Chun Wang, Yan-Min Yang, Xiao-Han Li, Fang Dong, Yan Li

Meng-Chun Wang, Yan-Min Yang, Yan Li, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Xiao-Han Li, Fang Dong, Department of Pathology, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Meng-Chun Wang, Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province China. mengchunwang@hotmail.com
Received: 2004-06-24 Accepted: 2004-08-05

Abstract

AIM: To investigate the expressions of maspin and Kai1 in gastric cancer and to explore their roles in tumorigenesis and progression of gastric cancer.

METHODS: Normal gastric mucosa ($n=182$), gastric dysplasia ($n=69$), and gastric cancer ($n=113$) were detected for maspin and Kai1 expressions by immunohistochemical methods. The expressions were compared with clinicopathological parameters of the tumor. Relationship between maspin and Kai1 expressions was analyzed as well.

RESULTS: The positive rates of maspin expression were 79.8% (145/182), 75.4% (52/69), and 50.4% (57/113) in normal gastric mucosa, gastric dysplasia, and gastric cancer, while those of Kai1 expression were 81.9% (149/182), 65.2% (49/69), and 58.4% (66/113) in corresponding tissues, respectively. The gastric normal mucosa and dysplasia more frequently expressed maspin than primary gastric cancer did, ($P<0.01$), while the normal mucosa showed more frequent expression of Kai1 than dysplasia and primary cancer did ($P<0.01$). Maspin expression significantly related to invasive depth ($P=0.003<0.01$), metastasis ($P=0.027<0.05$), Lauren's ($P=0.015<0.05$) and histological classification ($P=0.024<0.05$), but not to tumor size, Borrmann's classification, growth pattern and TNM staging ($P>0.05$). Kai1 expression significantly

related to invasive depth ($P=0.043<0.05$), metastasis ($P=0.005<0.01$), growth pattern ($P=0.034<0.05$), Lauren's classification ($P=0.000<0.01$) and histological classification ($P=0.004<0.01$), but not to tumor size, Borrmann's classification and TNM staging ($P>0.05$). Maspin expression was significantly consistent with Kai1 expression in primary gastric cancer ($P=0.008<0.05$).

CONCLUSION: Down-regulated expressions of maspin and Kai1 play an important role in gastric carcinogenesis. They may have inhibitory effects on invasion and metastasis of gastric cancer. Abnormal expressions of maspin and Kai1 might be an objective indicator for pathobiological behaviors of gastric cancer.

Wang MC, Yang YM, Li XH, Dong F, Li Y. Clinicopathological significance of maspin and Kail expressions in carcinogenesis and progression of gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(10):2283-2286

摘要

目的: 观察 maspin 和 Kai1 在胃癌及癌前病变中的表达, 并探讨他们在胃癌发生和演进中的作用。

方法: 采用免疫组化方法检测 maspin 和 Kai1 在正常胃黏膜 ($n=182$)、胃异型增生 ($n=69$) 和胃癌 ($n=113$) 中的表达, 比较他们表达与胃癌临床病理特征的关系, 并探讨 maspin 和 Kai1 表达的关系。

结果: Maspin 在正常胃黏膜、胃异型增生和胃癌中的阳性率分别为 79.8%(145/182)、75.4%(52/69) 和 50.4%(57/113), Kai1 在相应组织中的阳性率分别 81.9%(149/182)、65.2%(49/69)、58.4%(66/113)。正常胃黏膜和胃异型增生中 maspin 表达高于胃癌 ($P<0.01$), 正常胃黏膜中 Kai1 表达高于胃异型增生和胃癌 ($P<0.01$)。maspin 表达与胃癌浸润深度 ($P=0.003<0.01$)、转移 ($P=0.027<0.05$)、Lauren 分型 ($P=0.015<0.05$) 和组织学分型相关 ($P=0.024<0.05$), 而与肿块大小、Borrmann 分型、生长方式和 TNM 分期无关 ($P>0.05$)。Kai1 表达与浸润深度 ($P=0.043<0.05$)、转移 ($P=0.005<0.01$)、生长模式 ($P=0.034<0.05$)、Lauren ($P=0.000<0.01$) 和组织学分型相关 ($P<0.05$), 而与肿块大小、Borrmann 分型和 TNM 分期无关 ($P>0.05$)。值得注意的是胃癌中 maspin 和 Kai1 表达显著一致 ($P=0.008<0.05$)。

结论: maspin 和 Kai1 表达下调在胃癌发生中起重要作用, maspin 和 Kai1 的表达可能对胃癌的浸润和转移具有抑制作用, 可作为反应胃癌病理生物学行为的有效的客观指标。

王孟春, 杨艳敏, 李晓璐, 董芳, 李岩. 胃癌发生和演进中maspin和Kai1表达的
临床病理意义. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2283-2286

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2283.asp

0 引言

细胞遗传学改变可导致细胞生长调控失衡, 结果使细胞增生失去控制, 但无限制的生长并不能引起癌细胞的浸润和转移, 后者的表型还需要转移抑制基因功能缺失等分子事件^[1]. 最近, maspin 和 Kai1 被确定为新的肿瘤转移抑制基因, 研究发现体外癌细胞转染 maspin 或 Kai1 后肿瘤的浸润和转移被显著抑制^[2-3]. maspin 基因定位于人染色体 18q21.3-q23, 其编码产物在结构上是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin), 大量事实提示 maspin 可在细胞表面阻止细胞运动、癌细胞浸润和新生血管形成^[2]. Kai1 定位于人染色体 11p11.2, 属于跨膜四超家族(TM4SF), 大量研究提示 Kai1 在细胞-细胞、细胞-基质相互作用中发挥作用, 进而影响癌细胞的浸润和转移能力^[3], 而 maspin 和 Kai1 在恶性肿瘤演进中表达下调^[2-3]. 胃癌是中国乃至世界的多发肿瘤之一, 然而其发生和转移的分子机制还不清楚^[4]. 我们研究了 maspin 和 Kai1 在正常胃黏膜、胃异型增生和胃癌中的表达, 比较他们表达与胃癌临床病理特征的关系, 并探讨了胃癌中 maspin 和 Kai1 表达的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 1997-09/2001-02 正常胃黏膜标本 182 例, 胃异型增生标本 69 例和胃癌标本 113 例. 均用 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m 厚切片, 利用 HE 染色的切片确定标本的组织学类型及其他镜下特征. 所有患者在术前均未经过放化疗. 胃癌临床病理分期采用反映肿瘤扩散程度的 TNM 系统, 肿瘤大体形态依据 Borrmann 分型进行分类, 组织形态结构分类依据 Lauren 和中村分型, 依据以往报道将胃癌生长方式分为团块型、巢型和弥漫型. 此外, 还确定了肿瘤直径、浸润深度和转移与否. SABC 试剂盒, 博士德生物技术有限公司, 抗 Kai1 和抗-maspin 抗体分别购至 Novocastra(英国)和 Santa crutz(美国)公司.

1.2 方法 免疫组化采用 SABC 免疫组化方法对有代表性的连续切片进行染色, 所有操作步骤依据产品说明进行, 利用 PBS (0.01 mol/L, pH7.4) 替代一抗作为阴性对照. Kai1 和 maspin 免疫反应定位于细胞质, 由两位观察者随机选取 5 个有代表性的视野分别计数 100 个细胞, 根据计数细胞的阳性百分率半定量将免疫染色分级如下: 阴性, $\leq 5\%$; 弱阳性(+), 5-30%; 中度阳性(++), 30-50%; 和强阳性(+++), $\geq 50\%$.

统计学处理 采用方差分析区别组间率的差异, Spearman 检验分析等级资料. $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义, 利用 SPSS10.0 软件处理所有数据.

2 结果

2.1 胃癌 maspin 和 Kai1 表达 maspin 和 Kai1 的免疫反应性定位胃上皮细胞、异型增生细胞和癌细胞质. maspin 在正常胃黏膜、胃异型增生和胃癌中的阳性率(弱阳性-强阳性)分别为 79.8%(145/182)、75.4%(52/69)和 50.4%(57/113), Kai1 在相应组织中的阳性率(弱阳性-强阳性)分别为 81.9%(149/182)、65.2%(49/69)和 58.4%(66/113). 胃癌中 maspin 表达低于正常胃黏膜和异型增生 ($P < 0.05$), 正常胃黏膜中 Kai1 表达高于胃癌和胃异型增生黏膜 ($P < 0.05$, 表 1).

2.2 maspin 和 Kai1 表达与胃癌临床病理的关系 maspin 表达与胃癌的浸润深度、转移、Lauren 和组织学分型相关 ($P < 0.05$), 即浸润程度越高、有转移、Lauren 分型为弥漫型、组织类型为未分化型的胃癌中 maspin 呈低表达; 但 maspin 表达与肿块大小、Borrmann 分型、生长方式和 TNM 分期无关 ($P > 0.05$). Kai1 表达与胃癌的浸润深度、转移、生长方式、Lauren 和组织学分型相关 ($P < 0.05$), 即浸润程度越高、有转移、呈弥漫型生长、Lauren 分型为弥漫型、组织类型为未分化型的胃癌中 Kai1 呈低表达; 但 Kai1 表达与肿块大小、Borrmann 分型和 TNM 分期无关 ($P > 0.05$, 表 2). 值得注意的是 maspin 和 Kai1 胃癌中呈协同表达 ($P < 0.05$, 表 3).

表 1 maspin 和 Kai1 在正常胃黏膜、胃异型增生和胃癌中的表达

分组	n	maspin			Kai1		
		-	+~+++	阳性率(%)	-	+~+++	阳性率(%)
正常黏膜	182	37	145	79.8 ^d	33	149	81.9 ^b
异型增生	69	17	52	75.4 ^d	20	49	65.2 ^b
原发癌	113	56	57	50.4	47	66	58.4 ^b

^b $P < 0.01$ vs 原发癌; ^d $P < 0.01$ vs 异型增生、原发癌.

表 3 胃癌中 maspin 和 Kai1 表达的关系

maspin 表达	n	Kai1 表达				
		-	+	++	+++	阳性率(%)
-	78	44	17	12	5	56.4
+	15	6	3	5	1	60.0
++	6	1	1	2	2	83.3
+++	14	5	3	3	3	64.3
合计	113	56	24	22	11	50.4

$P = 0.008$ ($r_s = 0.250$).

3 讨论

目前研究表明 maspin 在多种正常细胞中高表达, 而在癌细胞中低表达. 我们的数据显示在正常胃黏膜→异型增生→原发胃癌中其表达逐渐降低, 正常胃黏膜、胃异型增生黏膜的阳性表达率高于胃癌原发灶中的阳性率, 而正常胃黏膜和异型增生中的阳性率无显著差异.

表 2 maspin 和 Kai1 表达与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	maspin					P值	Kai1					P值
		-	+	++	+++	阳性率(%)		-	+	++	+++	阳性率(%)	
							0.999						0.790
肿块大小 < 4 cm	47	22	13	7	5	53.2		19	14	9	5	59.6	
≥ 4 cm	66	34	11	15	6	48.5		28	19	14	5	57.6	
Borrmann 分型							0.896						0.398
I, II	28	12	9	5	2			14	7	4	3	50.0	
III, IV	59	30	10	13	6			22	19	14	4	62.7	
浸润深度							0.003						0.043
黏膜及黏膜下层	26	10	4	6	6	61.5		6	8	6	6	76.9	
固有肌层	34	12	11	7	4	64.7		17	9	6	2	50.0	
浆膜及以外	53	34	9	9	1	35.8		24	15	12	2	54.7	
							0.027						0.005
转移 -	75	31	18	19	7	58.7		24	24	19	8	68.0	
+	38	25	6	3	4	34.2		23	8	5	2	39.5	
							0.967						0.431
TNM 分期 0, I	46	22	11	10	3	52.2		22	11	9	4	52.2	
II, III, IV	67	34	13	12	8	49.3		25	22	14	6	62.7	
							0.767						0.034
生长方式 团块型	23	13	4	5	1	43.5		8	7	6	2	65.2	
巢型	30	11	6	8	5	63.3		9	9	8	4	70.0	
弥漫型	34	18	9	5	2	47.1		19	10	4	1	55.9	
							0.015						0.000
Lauren 分型 肠型	36	12	8	11	5	66.7		8	12	13	3	77.8	
弥漫型	57	33	12	8	4	42.1		33	14	5	5	42.1	
混合型	20	11	4	3	2	45.0		6	7	5	2	70.0	
							0.024						0.004
分化 分化型	53	20	14	12	7	62.3		13	19	16	5	75.5	
未分化型	60	36	10	1	4	10.0		34	14	7	5	43.3	

这些结果提示 maspin 表达降低在胃上皮细胞的恶变过程中可能起重要作用, maspin 表达下调可被认为是胃癌发生过程中的晚期事件. 根据以往报道提示 DNA 甲基化、组蛋白去乙酰化或杂合性缺失将导致 maspin 基因表达“沉默”^[15-9], 因此, 我们推测在胃癌发生中 maspin 表达降低可能归因于上述遗传学改变. 我们研究显示 maspin 表达下调与胃癌的浸润和转移相关, 即胃癌浸润程度越高、有转移者 maspin 呈低表达, 提示 maspin 的表达下调可能参与了胃癌的浸润和转移, 说明 maspin 表达对胃癌演进具有抑制作用. 这与作为肿瘤转移抑制基因的 maspin 在其他肿瘤演进中的表现是吻合的^[10-14]. Biliran *et al*^[15]发现 maspin 可特异抑制细胞表面相关的尿激酶型血浆酶原激活剂(uPA)和纤维蛋白原结合组织型血浆酶原激活剂, 该效应与体外细胞浸润和运动潜能降低显著相关. Blacque *et al*^[16]报道重组 maspin 与一些胶原相互作用可参与细胞黏附、细胞游走和新生血管形成. Seftor *et al*^[17]说明 maspin 具有调节整合素表

达的能力, 提示 maspin 可以通过改变整合素的表形而减低癌细胞浸润表型. Zhang *et al*^[18]报道 maspin 可直接作用于血管内皮细胞, 阻止其向基底成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子方向运动, 限制其有丝分裂和管状形成, 该效应可显著降低肿瘤相关的 MVD. Jiang *et al*^[19]研究发现在乳腺癌细胞中内源性 maspin 表达可以提高细胞 DNA 断裂和 PARP 蛋白灭活, 并促进细胞中 Caspase-3 和 Caspase-8 激活, 进而上调细胞凋亡水平. 这些结果可以解释表达降低的 maspin 可能通过促进癌细胞迁徙、提高肿瘤新生血管形成和降低细胞凋亡促进胃癌演进.

自从 Kai1 被确定为前列腺癌转移抑制基因后大量报道曾显示其在多种肿瘤的恶性进展中表达下调^[20-23]. 本研究中, 我们发现 Kai1 在胃异型增生和胃癌中的表达低于正常胃黏膜, 提示 Kai1 表达下调可能作为早期事件参与胃癌发生过程. 研究表明 AP2、p53 和 AP1 与 Kai1 促进子特异基序结合是 Kai1 促进子活性增高所必

需的^[24], 这些因子的表达和功能缺失将导致 Kai1 表达缺失和下调. 此外, 本研究观察到 Kai1 表达与胃癌的浸润深度、转移和生长模式相关, 即在浸润程度越高、有转移和呈弥漫型生长的胃癌中 Kai1 表现为低表达, 提示 Kai1 可抑制胃癌的浸润和转移, 并反映胃癌的生长模式. 在对前列腺癌的研究中 Jee *et al*^[25]发现 Kai1 的表达依赖于 Src 途径诱导前列腺癌细胞同质性聚集. 以往报道也提示 Kai1 可参与细胞运动和转移, 整合素 $\alpha 3$ 与 MRP-1 和 Kai1 形成复合物的崩解能促进肿瘤的演进^[26]. 这些结果提示异常表达的 Kai1 可能通过提高细胞运动性和促黏附作用参与胃癌的演进. 但作为一个新的肿瘤转移抑制基因其在胃癌中的转移抑制作用机制有待进一步研究.

我们还发现 maspin 和 Kai1 表达与胃癌的 Lauren 和组织学分型相关, 二者在 Lauren 分型为弥漫型胃癌、组织类型为未分化胃癌中均呈低表达, 提示他们可能是胃癌分化过程的分子基础, 这一结果也支持肠型和弥漫型胃癌组织发生途径的不同. 值得一提的是我们的研究结果显示, 胃癌中 maspin 与 Kai1 呈协同低表达, 虽然他们定位于不同的染色体, 但他们在胃癌中协同表达下调可能说明: 在胃癌的浸润和转移中 maspin 和 Kai1 共同发挥作用; 共同调节他们表达的调节因子在结构和功能上丧失, 或者不同的调节机制同时失调.

总之, 我们的结果提示 maspin 和 Kai1 表达下调在胃癌发生和演进中起重要作用, 但二者是如何协同作用的有待进一步研究. maspin 和 Kai1 异常表达可作为反映胃癌病理生物学行为的指标, 他们对胃癌的演进具有抑制作用, 并可能构成胃癌分化和组织发生的分子基础.

4 参考文献

- Debies MT, Welch DR. Genetic basis of human breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:441-451
- Maass N, Hojo T, Zhang M, Sager R, Jonat W, Nagasaki K. Maspin-a novel protease inhibitor with tumor-suppressing activity in breast cancer. *Acta Oncol* 2000; 39:931-934
- 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
- Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9:35-39
- Maass N, Biallek M, Rosel F, Schem C, Ohike N, Zhang M, Jonat W, Nagasaki K. Hypermethylation and histone deacetylation lead to silencing of the maspin gene in human breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:125-128
- Spring P, Nakashima T, Frederick M, Henderson Y, Clayman G. Identification and cDNA cloning of headpin, a novel differentially expressed serpin that maps to chromosome 18q. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:299-304
- Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, Domann FE. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* 2002;31:123-124
- Primeau M, Gagnon J, Momparler RL. Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 2003;103:177-184
- Maass N, Teffner M, Rosel F, Pawaresch R, Jonat W, Nagasaki K, Rudolph P. Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumor progression in ductal carcinomas of the breast. *J Pathol* 2001;195:321-326
- Maass N, Hojo T, Rosel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasaki K. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clin Biochem* 2001;34:303-307
- Machtens S, Serth J, Bokemeyer C, Bathke W, Minssen A, Kollmannsberger C, Hartmann J, Knuchel R, Kondo M, Jonas U, Kuczyk M. Expression of the p53 and maspin protein in primary prostate cancer: correlation with clinical features. *Int J Cancer* 2001;95:337-342
- Reddy KB, McGowen R, Schuger L, Visscher D, Sheng S. Maspin expression inversely correlates with breast tumor progression in MMTV/TGF- α transgenic mouse model. *Oncogene* 2001;20:6538-6543
- Yasumatsu R, Nakashima T, Hirakawa N, Kumamoto Y, Kuratomi Y, Tomita K, Komiyama S. Maspin expression in stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001;23:962-966
- Domann FE, Rice JC, Hendrix MJ, Futscher BW. Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers. *Int J Cancer* 2000;85:805-810
- Biliran H Jr, Sheng S. Pleiotrophic inhibition of pericellular urokinase-type plasminogen activator? system by endogenous tumor suppressive maspin. *Cancer Res* 2001;61:8676-8682
- Blacque OE, Worrall DM. Evidence for a direct interaction between the tumour suppressor serpin maspin, and types I and III collagen. *J Biol Chem* 2002;277:10783-10788
- Seftor RE, Seftor EA, Sheng S, Pemberton PA, Sager R, Hendrix MJ. Maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:5681-5685
- Zhang M, Volpert O, Shi YH, Bouck N. Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med* 2000;6:196-199
- Jiang N, Meng Y, Zhang S, Mensah-Osman E, Sheng S. Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis. *Oncogene* 2002;21:4089-4098
- 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
- Si SH, Yang JM, Peng ZH, Luo YH, Zhou P. Effects of KAI1 gene on growth and invasion of human hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:2019-2023
- Wu DH, Liu L, Chen LH, Ding YQ. KAI1 gene expression in colonic carcinoma and its clinical significances. *World J Gastroenterol* 2004;10:2245-2249
- Wu ZL, Wu ZH, Guo X. Study on the expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Zhonghua Er Bi Yanhouke Zazhi* 2003;38:413-416
- Marreiros A, Czolij R, Yardley G, Crossley M, Jackson P. Identification of regulatory regions with the KAI1 promoter: a role for binding of AP1, AP2 and p53. *Gene* 2003;302:155-164
- Jee B, Jin K, Hahn JH, Song HG, Lee H. Metastasis-suppressor KAI1/CD82 induces homotypic aggregation of human prostate cancer cells through Src-dependent pathway. *Exp Mol Med* 2003;35:30-37
- 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

经导管选择性门静脉栓塞治疗肝癌的临床应用

李建军, 杨维竹, 江娜, 黄兢姚, 郑曲彬, 黄宁, 杨升

李建军, 杨维竹, 江娜, 黄兢姚, 郑曲彬, 黄宁, 杨升, 福建医科大学附属协和医院介入科 福建省福州市 350001
李建军, 男, 1978-05-28 生, 山西省晋城市人, 汉族. 2004 年福建医科大学硕士生, 现在首都医科大学攻读博士.
福建省卫生厅青年科研课题资助项目, No. 2004-1-5
项目负责人: 杨维竹, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院介入科. ywzjn@sina.com
电话: 0591-3357896-8255
收稿日期: 2004-07-28 接受日期: 2004-08-30

Transcatheter selective portal vein embolization in treatment of hepatocellular carcinoma: an analysis of 20 cases

Jian-Jun Li, Wei-Zhu Yang, Na Jiang, Jing-Yao Huang, Qu-Bing Zheng, Ning Huang, Sheng Yang

Jian-Jun Li, Wei-zhu Yang, Na Jiang, Jing-Yao Huang, Qu-Bing Zheng, Ning Huang, Sheng Yang, Department of Interventional Radiology, Affiliated Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Supported by Youth Scientific Research Fund of Fujian Health Department, No. 2004-1-5
Correspondence to: Wei-Zhu Yang, Department of Interventional Radiology, Affiliated Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. ywzjn@sina.com
Received: 2004-07-28 Accepted: 2004-08-30

Abstract

AIM: To evaluate the clinical value of transcatheter selective portal vein embolization (PVE) in treatment of hepatocellular carcinoma.

METHODS: Twenty patients, with unresectable advanced hepatocellular carcinoma, were treated with right PVE under fluoroscopic guidance. Left hepatic lobe volume was obtained by computerized tomography (CT) before and after PVE. Portal venous pressure, hepatic and thromboplastic functions were also detected before and after PVE.

RESULTS: Right portal vein were embolized successfully in 20 patients. Compensatory hypertrophy was observed in left hepatic lobe. The volume of left hepatic lobe increased significantly with a total percentage of 25% in 13 patients (65%) at 4 wk after PVE ($P < 0.01$). Right hepatic lobe was successfully resected in 1 patient. No patients had complications such as portal hypertension after PVE. Slight damage of liver function after PVE was observed.

CONCLUSION: PVE can induce compensatory hypertrophy of liver lobes, which provides another operation chance for patients with unresectable hepatocellular carcinoma.

Li JJ, Yang WZ, Jiang N, Huang JY, Zheng QB, Huang N, Yang S. Transcatheter selective portal vein embolization in treatment of hepatocellular carcinoma: an analysis of 20 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2291-2294

摘要

目的: 探讨经导管选择性门静脉栓塞(PVE)在肝癌治疗中的临床应用价值。

方法: 20例不能手术切除的晚期肝癌患者, 在电视透视引导下经导管行门静脉右支栓塞。栓塞前、后用CT测量左侧肝叶的体积, 并测量栓塞前后的门静脉压力, 监测肝功能和凝血功能的变化。

结果: 20例患者均成功行门静脉右支栓塞, PVE术后左侧肝叶代偿增生明显, 13例(65%)在PVE后4 wk内左侧肝叶占整个肝脏的百分比达到或几乎达到了25%, 为手术切除创造了条件, 其中1例PVE后顺利实行右肝切除术。PVE后未出现门静脉高压, 肝功能损害轻, 均无并发症出现。

结论: 经导管选择性门静脉栓塞能诱导肝叶代偿性增生, 增加手术切除率, 提高手术切除的安全性, 对于大量无法手术切除的肝癌患者的治疗, 具有广泛的临床应用价值。

李建军, 杨维竹, 江娜, 黄兢姚, 郑曲彬, 黄宁, 杨升. 经导管选择性门静脉栓塞治疗肝癌的临床应用. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2291-2294
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2291.asp>

0 引言

选择性门静脉栓塞术在肝癌治疗中的应用国外报道较多^[1-6], 其治疗原理主要是^[7-13]: 选择性栓塞载瘤侧门静脉支, 使非栓塞侧肝叶代偿增生, 使因肿瘤体积较大、正常肝叶体积较小而不能行手术切除的患者获得切除的机会, 并可保证切除术后仍有足够的维持正常肝功能的肝脏存在, 从而避免因切除术后维持正常生理需要的肝脏体积较小而出现肝功能衰竭。国内尚未见在电视透视引导下经导管选择性门静脉栓塞在肝癌治疗中的临床应用报道。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 不能手术的晚期肝癌患者 20 例, 原发性肝癌 19 例, 转移性肝癌(原发灶为小肠恶性间质瘤)1 例; 男 17 例, 女 3 例, 年龄 37-62(平均 49.4 ± 10.0 岁); 肿瘤直径 11-17(平均 14.0 ± 2.5 cm)。所选患者均满足以

下几个条件: (1)肿瘤集中位于肝右叶; (2)肝功能为Child-Push A级; (3)无造影剂过敏史; (4)无出血倾向; (5)门静脉主干及左右支无瘤栓。按肝癌的临床分型分期标准^[14], 单纯型 12 例, 硬化型 8 例; 临床 I 期 16 例, II 期 4 例。全部病例均经临床检查、甲胎蛋白(AFP)测定、CT、MRI、肝动脉造影或肝穿活检证实, 病理诊断 1 例, 临床诊断 19 例, 均符合全国肝癌协作会议制定的诊断标准。栓塞材料为明胶海绵、无水乙醇和不锈钢圈(美国 COOK 公司), 实验器械为 22G Chiba 针和 4.0 F 血管扩张器(COOK), 0.018 “微导丝、0.035” 黑泥鳅导丝、5 F Cobra 导管(日本 TERUMO 公司), 5 F 血管鞘(爱尔兰 AVE 公司)。

1.2 方法 门静脉插管的途径: 经皮经肝门静脉插管和经皮经脾门静脉插管。根据 CT 扫描(所有患者均在术前行 CT 增强扫描, 并作门静脉三维重建)及通过间接门静脉造影获得的门静脉系统情况, 确定穿刺点。Chiba 针于剑突下偏左侧区域穿刺肝内门静脉左支或经左侧腋后线第 7-9 肋间穿刺脾静脉分支, 成功后用微导丝从 Chiba 针进至门静脉主干或肠系膜上静脉内, 然后将针退出, 沿导丝送入血管扩张器, 再通过黑泥鳅导丝交换送入血管鞘, 置入 Cobra 导管于门静脉主干造影; 将导管插入门静脉右支, 根据门静脉右支大小、血流速度等情况选用合适的栓塞剂, 将门静脉右支完全栓塞, 栓塞后再次造影, 证实门静脉右支完全闭塞。栓塞前后各测一次门静脉主干压力。栓塞后均用明胶海绵、不锈钢圈将穿刺道栓塞以防止腹腔内出血。经皮经肝门静脉插管法适用于门静脉左支肝内部分较粗大、易于穿刺, 且门静脉左右支成角为钝角, 通过左支易于将栓塞剂导入右支的患者。经皮经脾门静脉插管法适用于门静脉左支肝内部分较细小, 不宜直接穿刺或门静脉左右支成角为锐角, 通过左支不易将栓塞剂导入右支及脾脏较大的患者。所有患者均在 PVE 术前或术后配合肝动脉化疗栓塞术(transhepatic arterial chemotherapy embolization, TACE)治疗。化疗药用 5-氟尿嘧啶 1 000 mg, 顺铂 80 mg, 表阿霉素 60 mg 或丝裂霉素 16 mg, 栓塞剂为超液态碘化油和明胶海绵条。

PVE 前后门静脉造影以了解门静脉栓塞效果; 门静脉压力测定, 以了解栓塞前后压力变化情况; PVE 前、PVE 后 2, 4, 8 wk 行 CT 增强扫描, 并作门静脉三维重建, 用 Volume 功能分别测量整个肝脏(total hepatic lobe, THL)、右侧肝叶(right hepatic lobe, RHL)和左侧肝叶(left hepatic lobe, LHL)的体积, 以了解栓塞后左叶代偿增生情况及门脉右支是否再通; 行食管吞钡检查, 观察是否有食管静脉曲张, 以判断栓塞前后是否出现门静脉高压; PVE 前、PVE 后 1, 3, 7 d 检查肝功能、凝血功能以了解其在栓塞前后的变化情况; PVE 后临床症状、体征的表现, 以观察 PVE 后是否有并发症出现。

统计学处理 对栓塞前后测定的左侧肝叶体积、左

侧肝叶占整个肝脏的体积比(LHL/THL)、门静脉压力、ALT、AST、TBIL、PT 通过 SPSS11.5 软件做方差分析, 门静脉压力采用配对 *t* 检验。

2 结果

所有患者均在电视透视引导下成功实现门静脉插管及门静脉右支栓塞, 其中 19 例行经皮经肝门静脉插管栓塞, 1 例行经皮经脾门静脉插管栓塞。随访期间 1 例于 PVE 术后 2 mo 发现肺部转移, 术后 3 mo 死亡, 其余病例均存活。存活病例中 1 例顺利实行右肝切除术, 随访 10 mo 未发现左肝内转移和远处转移, 2 例分别于 PVE 术后 3 mo 和 4 mo 发现左肝内转移灶而未能行肿瘤切除, 剩余病例拒绝行手术切除治疗。

2.1 造影和 CT 表现 栓塞前门静脉主干及左右支血流均通畅, 呈树枝状逐级变细, 门静脉右支肿瘤周围分支部分受推压, 未见门静脉分支进入肿瘤内, 所有病例均未发现类似动脉造影所见的迂曲、紊乱的肿瘤血管网和肿瘤染色等征象; 经门静脉注入超液态碘化油, 未见碘化油在瘤内停聚。门静脉右支栓塞后, 门静脉右支完全闭塞, 呈截断表现, 门静脉主干及左支血流仍通畅; 所有病例均未发生栓塞剂反流致异位栓塞(图 1A, B)。CT 扫描显示栓塞后门静脉右支完全闭塞, 未出现再通现象, 门静脉主干及左支血流仍通畅。

2.2 肝体积变化 左侧肝叶体积术前为 $461.5 \pm 108.2 \text{ cm}^3$, 术后 2, 4, 8 wk 分别为 $608.5 \pm 135.7 \text{ cm}^3$, $660.2 \pm 133.8 \text{ cm}^3$, $678.0 \pm 132.7 \text{ cm}^3$, 分别比术前增加 $33.5 \pm 22.1\%$, $45.4 \pm 23.8\%$, $49.5 \pm 24.0\%$ 。术前左侧肝叶占整个肝脏的体积百分比为 $18.4 \pm 5.1\%$, 术后 2, 4, 8 wk 分别为 $24.2 \pm 5.9\%$, $26.3 \pm 5.8\%$, $27.0 \pm 6.1\%$, 其中 PVE 后 4 wk 内左肝体积占整个肝脏体积百分比达到或几乎达到 25% 的有 13 例, 占总病例数的 65%。术后 2 wk 较术前体积增大显著($P < 0.01$), 术后 4 wk 与 2 wk 间、8 wk 与 2 wk 间、8 wk 与 4 wk 间体积增大均无显著性变化。本组 1 例肝转移癌患者因无基础肝病, 无肝硬化, 肝脏代偿增生最明显, 其 PVE 术前左侧肝叶体积为 396 cm^3 , PVE 后 2, 4, 8 wk 分别增至 650 cm^3 , 780 cm^3 , 790 cm^3 , 为手术切除巨大右肝转移癌创造了良好的条件, PVE 后 3 mo 行右肝切除术。切除术后未出现肝功能衰竭等并发症, PVE 后 5 mo 体积增至 $1 395 \text{ cm}^3$, PVE 后 7 mo 体积增至 $1 420 \text{ cm}^3$ 。切除标本中左肝部分行病理检查示: 肝细胞增生、肥大, 可见许多双核肝细胞(图 1C-G)。

2.3 门静脉压力变化 栓塞前门静脉压力为 $17.0 \pm 2.6 \text{ kPa}$, 栓塞后为 $19.6 \pm 2.8 \text{ kPa}$, 变化显著($P < 0.01$), 但均在正常值范围内($16-24 \text{ kPa}$), 未出现门静脉高压($>25 \text{ kPa}$)。栓塞术前钡透检查均显示食管黏膜光滑, 未见静脉曲张的表现, 术后均未出现食管静脉曲张。

2.4 肝功能变化和栓塞反应 PVE 后 1 d ALT, AST, TBIL 明显升高($P < 0.01$), 但多数仍在正常值范围内,

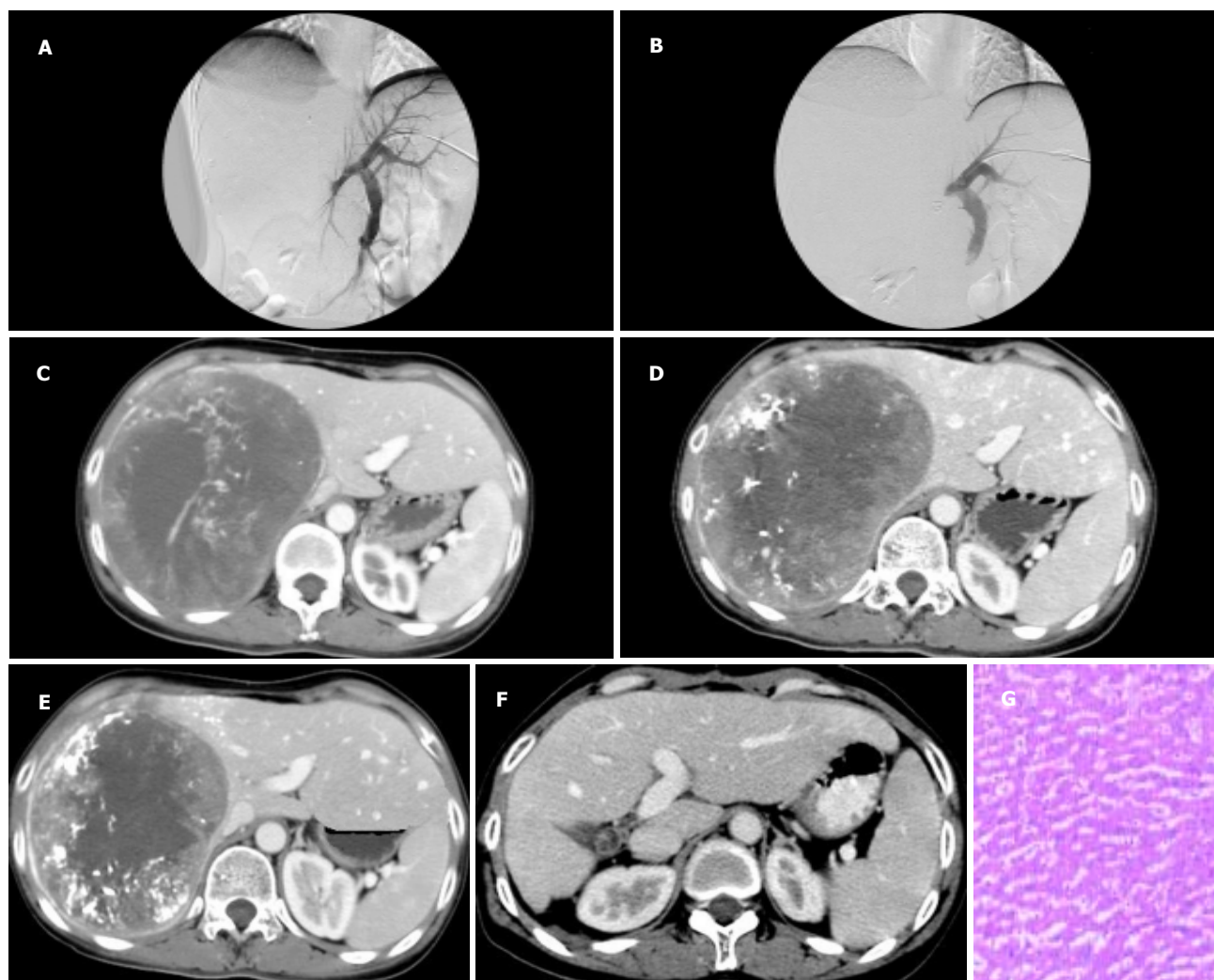


图1 女,肝转移癌(原发灶为小肠恶性间质瘤); A: PVE 前门静脉造影显示门静脉主干及左右支血流通畅,右支被肿瘤推压向下; B: PVE 后门静脉右支完全闭塞,主干及左支血流仍通畅; C: PVE 前左侧肝叶体积为 396 cm^3 ,占整肝的 12.5%; D: PVE 后 2wk 左侧肝叶增生,体积 650 cm^3 ,占整肝的 20.5%; E: PVE 后 8wk 左侧肝叶增至 790 cm^3 ,占整肝的 24.9%; F: PVE 后 5mo(切除术后 2mo),左侧肝叶继续增生至 1395 cm^3 ; G: 切除标本中左肝部分肝细胞增生、肥大显著,可见许多双核肝细胞(HE $\times 100$).

3~7 d 内逐渐恢复至术前水平; Child-Push 评分均为 A 级. PVE 后 PT 第 1 d 变化明显($P < 0.01$), 第 3 d 和第 7 d 无明显变化,但均在正常值范围内(11~15 s). PVE 后少数患者出现轻度腹痛、低热(不超过 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$)不适,无需特别处理,自行缓解;无恶心、呕吐、皮肤黄、尿黄等不适. 所有患者 PVE 术后均未出现消化道出血、腹腔内出血、胆汁瘘、腹膜炎、腹水、肝功能衰竭、休克等严重并发症.

3 讨论

手术切除是治疗肝癌的一种主要手段,临床上许多患者因肿瘤体积较大而失去手术机会,手术切除率低,约 20%~30%^[15],而且术后常会出现肝功能衰竭. 肝动脉化疗栓塞术(TACE)使晚期肝癌患者的预后有了很大进步,部分患者获得了二期手术的机会,取得了满意疗效^[16]. 但二期手术率仅为 8.4%~28.2%^[17]. 术前门静脉栓塞诱导肝叶代偿性增生可以扩大肝癌切除手术的适应证,提高手术的安全性^[18-19]. 肝叶增生的机制主要是:门静脉分支栓塞后,肝细胞分化和增生能力增强^[20];门静脉血流重分

配,非栓塞侧血流增加^[21],而门静脉中含有促进肝细胞再生的营养物质^[22];门静脉血流变化可促使 IL-6 从内皮细胞释放,进而促进非栓塞侧肝叶增生^[23]. 我们在电视透视引导下,经导管行经皮经肝或经皮经脾门静脉栓塞的方法,对 20 例肝癌患者成功实现门静脉右支栓塞,成功率 100%. 栓塞后左侧肝叶代偿性增生,体积较栓塞前显著增大. 对于切除术后能维持正常肝功能的残余肝脏体积最小比例,目前没有一致的观点^[4, 7, 24-25]. 本组有 13 例(65%)患者在 PVE 术后 4 wk 内左侧肝叶占整个肝脏的百分比达到或几乎达到了 25%,为手术切除创造了条件. 1 例患者行门静脉右支栓塞后,左叶代偿增生明显,术后行右肝手术切除,未出现肝功能衰竭等并发症,切除术后肝脏继续代偿增生. 术后均无并发症出现,少数患者出现轻度腹痛、低热不适,可自行缓解. 肝功能、凝血功能在 1 wk 内恢复至术前水平,Child-Push 评分术前、后均为 A 级,而且肝脏体积增大常伴随着肝功能的增强^[26-29]. 门静脉压力栓塞前后有显著性变化,但多数仍在正常值范围内,未出现门静脉高压. 经导管门静脉栓塞诱导肝叶代偿性增生在临床上的应用

也是安全的。

可用于门静脉栓塞的栓塞剂的品种很多, 常用氰基丙烯酸正辛酯、碘油、明胶海绵、凝血酶、无水乙醇、不锈钢圈、PVA 颗粒、纤维蛋白胶、Embol-78 等, 也有人混合使用上述材料。理想的栓塞剂应是门静脉末梢与近端均永久性栓塞, 而不发生再通; 安全、损伤轻、患者可忍受; 容易输送; 价格便宜。我们采用明胶海绵、无水乙醇、不锈钢圈三种价格便宜的物质联合栓塞取得了很好的效果。

总之, 门静脉右支栓塞确能诱导左侧肝叶代偿性增生, 可增加手术切除率, 提高手术切除的安全性, 对于大量无法手术切除的肝癌患者的治疗, 具有广泛的临床应用价值。选择性门静脉栓塞术应作为每一个外科医生治疗肝癌的一种选择。

4 参考文献

- Wakabayashi H, Ishimura K, Okano K, Karasawa Y, Goda F, Maeba T, Maeta H. Application of preoperative portal vein embolization before major hepatic resection in patients with normal or abnormal liver parenchyma. *Surgery* 2002;131:26-33
- Madoff DC, Hicks ME, Vauthey JN, Charnsangavej C, Morrello FA Jr, Ahrar K, Wallace MJ, Gupta S. Transhepatic portal vein embolization: anatomy, indications, and technical considerations. *Radiographics* 2002;22:1063-1076
- Abdalla EK, Barnett CC, Doherty D, Curley SA, Vauthey JN. Extended hepatectomy in patients with hepatobiliary malignancies with and without preoperative portal vein embolization. *Arch Surg* 2002;137:675-681
- Elias D, Ouellet JF, De Baere T, Lasser P, Roche A. Preoperative selective portal vein embolization before hepatectomy for liver metastases: long-term results and impact on survival. *Surgery* 2002;131:294-299
- Ko GY, Sung KB, Yoon HK, Kim JH, Weon YC, Song HY. Preoperative portal vein embolization with a new liquid embolic agent. *Radiology* 2003;227:407-413
- Doros A, Weszelits V, Puhl M, Fehervari I, Alföldy F. Percutaneous portal vein embolization before major hepatic resection. *Magy Seb* 2003;56:39-44
- Hemming AW, Reed AI, Howard RJ, Fujita S, Hochwald SN, Caridi JG, Hawkins IF, Vauthey JN. Preoperative portal vein embolization for extended hepatectomy. *Ann Surg* 2003;237:686-693
- Jaek D, Bachellier P, Nakano H, Oussoultzoglou E, Weber JC, Wolf P, Greget M. One or two-stage hepatectomy combined with portal vein embolization for initially nonresectable colorectal liver metastases. *Am J Surg* 2003;185:221-229
- Aoki T, Imamura H, Hasegawa K, Matsukura A, Sano K, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Sequential preoperative arterial and portal venous embolizations in patients with hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 2004;139:766-774
- Kim MJ, Choo SW, Do YS, Park KB, Han YH, Choo IW, Cho JM, Cho JW, Kim SJ, Sohn TS. Use of double-occlusion balloon catheter: preoperative portal vein embolization for induction of future remnant liver hypertrophy. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2004;27:16-20
- Adam R, Lucidi V, Bismuth H. Hepatic colorectal metastases: methods of improving resectability. *Surg Clin North Am* 2004;84:659-671
- Kokudo N, Makuuchi M. Current role of portal vein embolization/hepatic artery chemoembolization. *Surg Clin North Am* 2004;84:643-657
- Shimada H, Tanaka K, Masui H, Nagano Y, Matsuo K, Kijima M, Ichikawa Y, Ike H, Ooki S, Togo S. Results of surgical treatment for multiple (>or=5 nodules) bi-lobar hepatic metastases from colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2004;389:114-121
- 汤钊猷. 现代肿瘤学. 第2版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000: 750
- 吴孟超, 程树群. 原发性肝癌外科治疗中应注意的问题. *中华肝胆外科杂志* 2002;8:131-133
- Fan J, Tang ZY, Yu YQ, Wu ZQ, Ma ZC, Zhou XD, Zhou J, Qiu SJ, Lu JZ. Improved survival with resection after transcatheter arterial chemoembolization(TACE) for unresectable hepatocellular carcinoma. *Dig Surg* 1998;15:674-678
- 吴孟超. 肝脏外科学. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 347-348
- Lu MD, Chen JW, Xie XY, Liang LJ, Huang JF. Portal vein embolization by fine needle ethanol injection: experimental and clinical studies. *World J Gastroenterol* 1999;5:506-510
- Ji W, Li JS, Li LT, Liu WH, Ma KS, Wang XT, He ZP, Dong JH. Role of preoperative selective portal vein embolization in two-step curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1702-1706
- Harada H, Imamura H, Miyagawa S, Kawasaki S. Fate of the human liver after hemihepatic portal vein embolization: cell kinetic and morphometric study. *Hepatology* 1997;26:1162-1170
- Wakabayashi H, Nakano S, Ishimura K, Hagiike M, Okano K, Maeba T, Maeta H. Changes in arterial and portal perfusion in embolized and nonembolized hepatic lobes after portal vein embolization evaluated by helical computed tomography. *Surg Today* 2001;31:991-995
- Starzl TE, Francavilla A, Halgrimson CG, Francavilla FR, Porter KA, Brown TH, Putnam CW. The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. *Surg Gynecol Obstet* 1973;137:179-199
- Kawai M, Naruse K, Komatsu S, Kobayashi S, Nagino M, Nimura Y, Sokabe M. Mechanical stress-dependent secretion of interleukin 6 by endothelial cells after portal vein embolization: clinical and experimental studies. *J Hepatol* 2002;37:240-246
- Madoff DC, Hicks ME, Abdalla EK, Morris JS, Vauthey JN. Portal vein embolization with polyvinyl alcohol particles and coils in preparation for hepatobiliary malignancy: safety and effectiveness study in 26 patients. *Radiology* 2003;227:251-260
- Vauthey JN, Chaoui A, Do KA, Bilimoria MM, Fenstrmacher MJ, Charnsangavej C, Hicks M, Alsfasser G, Lauwers G, Hawkins IF, Caridi J. Standardized measurement of the future liver remnant prior to extended liver resection: methodology and clinical associations. *Surgery* 2000;127:512-519
- Sugai Y, Komatani A, Hosoya T, Yamaguchi K. Response to percutaneous transhepatic portal embolization: new proposed parameters by 99mTc-GSA SPECT and their usefulness in prognostic estimation after hepatectomy. *J Nucl Med* 2000;41:421-425
- Chijiwa K, Saiki S, Noshiro H, Kameoka N, Nakano K, Tanaka M. Effect of preoperative portal vein embolization on liver volume and hepatic energy status of the nonembolized liver lobe in humans. *Eur Surg Res* 2000;32:94-99
- Shimada R, Imamura H, Nakayama A, Miyagawa S, Kawasaki S. Changes in blood flow and function of the liver after right portal vein embolization. *Arch Surg* 2002;137:1384-1388
- Tominaga M, Ku Y, Iwasaki T, Fukumoto T, Muramatsu S, Kusunoki N, Suzuki Y, Fujino Y, Kuroda Y. Effect of portal vein embolization on function of the nonembolized lobes of the liver: Evaluation by first-pass hepatic lidocaine extraction in dogs. *Surgery* 2002;132:424-430

全反式维甲酸联合奥曲肽对肝癌细胞-HepG₂增生和凋亡的影响

叶红, 但自力, 唐望先

叶红, 唐望先, 华中科技大学同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
但自力, 华中科技大学同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030
叶红, 女, 1979-04-09 生, 山东省青岛市人, 汉族, 2002 年华中科技大学同济医院消化内科硕士生。
项目负责人: 叶红, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医院肝病研究所。 yueyaer1122@mail.china.com
电话: 027-83645986
收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-07-22

Effects of all-trans retinoic acid with octreotide on proliferation and apoptosis of hepatoma cell HepG₂

Hong Ye, Zi-Li Dan, Wang-Xian Tang

Hong Ye, Wang-Xian Tang, Institute of Liver Disease, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Zi-Li Dan, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Hong Ye, Institute of Liver Disease, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. yueyaer1122@mail.china.com
Received: 2004-06-16 Accepted: 2004-07-22

Abstract

AIM: To investigate the effects of all-trans retinoic acid combined with octreotide on proliferation and apoptosis of human liver cancer cell HepG₂.

METHODS: The human liver cancer cell HepG₂ cultured *in vitro* was designed into three groups: combined group, octreotide group and control group. For combined group, HepG₂ was treated with different concentrations of all-trans retinoic acid (1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 5×10^{-5} mmol/L) associated with octreotide (1 mg/L). MTT assays were adopted to determine their effects on cell growth. Cell apoptotic rate and cell cycle were detected by flow cytometry. The expression of tumor suppressing gene p^{21WAF1/CIP1} was detected by immunocytochemical methods. Cytotoxicity of the two drugs was observed with trypan blue staining.

RESULTS: After being treated with the concentration of 1×10^{-6} mmol/L of all-trans retinoic acid and 1 mg/L of octreotide, cells' viability was significantly inhibited compared with the octreotide group and controls ($P = 0.0087 < 0.01$). No significant difference existed between octreotide group and control group. The expression of the target gene p^{21WAF1/CIP1} was significantly increased after associated application of all-trans retinoic acid with octreotide. Apoptosis rate of liver cancer cells (17%) in combined group was also significantly higher than those in octreotide and con-

trol group. No death of great numbers was observed with trypan blue staining.

CONCLUSION: Proliferation of liver cancer cell HepG₂ is inhibited by combination of low concentration of all-trans retinoic acid (1×10^{-6} mmol/L) with octreotide (1 mg/L) while apoptosis is induced. Meanwhile, different periods of cell cycle were also influenced. The effect of the two drugs on proliferating inhibition and apoptotic facilitation may be achieved by increasing the expression of gene p^{21WAF1/CIP1}.

Ye H, Dan ZL, Tang WX. Effects of all-trans retinoic acid with octreotide on proliferation and apoptosis of hepatoma cell HepG₂. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2295-2298

摘要

目的: 探讨全反式维甲酸联合奥曲肽对肝癌细胞HepG₂增生和凋亡的作用。

方法: 将不同剂量的全反式维甲酸和奥曲肽(1 mg/L)直接作用于体外培养的人肝母细胞瘤株 HepG₂, 用 MTT 比色法分析两种药物联合作用对肝癌细胞生长的影响, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 细胞周期分布, 免疫细胞化学方法检测抑癌基因P^{21WAF1/CIP1}的表达, 台盼兰染色观察药物对细胞毒性作用。

结果: 小剂量全反式维甲酸(10^{-6} mmol/L)和奥曲肽(1 mg/L)连用后, 对细胞具有增生抑制作用, 与无增生抑制的奥曲肽作用组和对照组相比有显著性差异($P = 0.0087 < 0.01$)。细胞免疫化学: 全反式维甲酸和奥曲肽药物联合作用 48 h 后, 细胞中目的基因 P^{21WAF1/CIP1} 由胞膜, 胞质微弱表达转为核强烈表达。于作用 48 h 后药物合用组对细胞各周期均有影响, 奥曲肽作用组可使肝癌细胞 HepG₂ 阻滞于 S 期, 且药物合用组于作用 72 h 后, 凋亡率为 17%, 明显高于奥曲肽作用组与对照组。台盼兰染色未发现大片死亡细胞。

结论: 小剂量全反式维甲酸(10^{-6} mmol/L)联合生长抑素类似物奥曲肽(1 mg/L)对肝癌细胞 HepG₂ 具有增生抑制和诱导凋亡作用。抑癌基因表达增强说明二者的诱导凋亡和增生抑制作用可能是通过增强抑癌基因 P^{21WAF1/CIP1} 的表达实现的。从而为在临床上治疗肝癌提供了新的思路。

叶红, 但自力, 唐望先. 全反式维甲酸联合奥曲肽对肝癌细胞-HepG₂增生和凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2295-2298
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2295.asp>

0 引言

近年来,全反式维甲酸和生长抑素类似物奥曲肽由于其生长抑制和诱导凋亡作用日益受到人们重视^[1].全反式维甲酸在治疗白血病方面疗效显著^[2],而奥曲肽也已应用于临床胃肠肿瘤的治疗^[3-5].但是二者单独作用诱导凋亡作用皆较弱,皆需要和其他化疗药物连用^[6-8].如果两种较弱的诱导凋亡药物合用,能具有较好的肿瘤抑制作用,可大大降低肿瘤治疗的毒副作用.目前,此两种药物合用在国内外罕有报道,我们探讨小剂量全反式维甲酸^[1-2]和奥曲肽^[9]连用后,是否具有抑制体外肝癌细胞株增生及诱导凋亡作用.

1 材料和方法

1.1 材料 奥曲肽(octreotide 瑞士诺华制药公司),全反式维甲酸(无水乙醇配制成 10^{-2} mmol/L)储存液,无血清培养基稀释成 10^{-4} mmol/L工作液,塞唑蓝(MTT)及二甲基亚砜(DMSO Amresco 公司),胎牛血清(三利公司),DMEM(高糖 Gibco 公司),P21^{WAF1/CIP1} 抗体(美国 Neo Marker 公司),SP 试剂盒(北京中山生物技术有限公司),96孔,6孔培养板(Costar, Greiner 公司),酶联检测酶标仪(Fortune Multiscan EX),光学相差显微镜(日本 Olympus 公司),碘化吡啶,台盼兰, RNA 酶 A (Sigma 公司)FacSort (Becton Dickinson 公司),人 HepG₂ 肝母细胞瘤株由同济医学院临床免疫教研室和协和医院普外研究所惠赠,于含 50 mL/L 血清的 DMEM 高糖培养基中,37℃,5 mL/L CO₂ 条件下培养.每2,3 d 传代,取对数生长期细胞实验.

1.2 方法 细胞胰酶消化,成 8×10^7 /L 单细胞悬液 0.1 mL/孔种于 96 孔板,每组 8 个复孔,共 8 组,于含 5 mL/L 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中培养 24 h 贴壁后, D-Hanks 液洗两遍, 试验组培养基中加不同剂量药物(全反式维甲酸先加入, 4 h 后加入奥曲肽)使得全反式维甲酸终浓度为 10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} mmol/L, 奥曲肽为 1 mg/L. 对照组加不含药物等量培养基. 药物作用 24 h 后, 于每孔中加入 5 g/L MTT 20 μ L, 培养箱中继续培养 4 h, 弃上清, 加入 DMSO 100 μ L, 震荡 10 min, 结晶物充分溶解后, 酶联检测仪上 492 nm 波长, 测定各孔吸光度 A 值. 计算细胞增生抑制率 $=(1 - \text{试验组吸光度 } A \text{ 值} / \text{对照组吸光度 } A \text{ 值})\%$. 细胞胰酶消化, 成 3×10^7 /L 单细胞悬液 0.1 mL/孔种于 96 孔板, 每次同时接种 3 块, 50 mL/L 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中培养 24 h 贴壁后, 各个试验组换液, 培养基中加不同剂量药物, 对照组加不含药物等量培养基. 分别培养 24, 48, 72 h. 于 492 nm 波长处在酶联检测仪上测定不同浓度药物的吸光度 A 值, 并根据吸光度 A 值绘制药物作用下的生长曲线. 4×10^5 等量细胞接种于 100 mL 培养瓶, 50 mL/L 胎牛血清培养基培养 24 h 之后, D-Hanks 液洗 2 遍, 每瓶加入培养基 4 mL, 试验组加入相应药物, 对照组只加等量培养基. 分别培养 24,

48, 72 h 后, 消化后 0.1 mol/L PBS 4 mL(4℃)中止, 吹打成单细胞悬液, 收集上清及洗液, 连同消化细胞一并离心($1\,000 \text{ r/min} \times 5 \text{ min}$), 750 mL/L 乙醇 3 mL 固定, -20℃ 储存备用. 等量细胞种于六孔培养板玻片(0.1 g/L 多聚赖氨酸处理, 高温灭菌)上, 1×10^5 /孔, 24 h 细胞贴壁后, D-Hanks 液洗, 每孔加入培养基 2 mL, 试验组加入相应药物, 对照组只加等量培养基. 分别培养 24, 48, 72 h 后, 取出细胞, 0.01 mol/L PBS 洗, $2 \text{ min} \times 2$ 次, 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 7.5 mL/L H₂O₂ 37℃ 封闭 30 min, 正常羊血清封闭 37℃ 30 min, 一抗 4℃ 过夜 18 h, 二抗 37℃ 30 min, 三抗 37℃ 30 min, DAB 显色, 自来水终止, 脱水, 中性树脂封片. 另台盼兰染色.

统计学处理 增生抑制率采用方差分析 mean \pm SD, Stata 8.2, 生长曲线采用 t 检验.

2 结果

2.1 增生抑制率和细胞生长 全反式维甲酸 10^{-6} mmol/L、 5×10^{-6} mmol/L 和 10^{-5} mmol/L 的抑制率为 0%, 27.3% 和 33.5%; 如分别加入奥曲肽, 则抑制率为 35.5%, 27.1% 和 37.1%; 而单用奥曲肽和对照组增生抑制率皆为 0%, 1 mg/L 的奥曲肽对肿瘤细胞无增生抑制作用. 做方差分析, 药物合用 3 组之间没有显著性差异. 此 3 组与对照组有显著性差异. 奥曲肽组与药物合用组(全反式维甲酸先作用 4 h)有显著性差异($P=0.0087$, $P<0.01$), 与对照组没有显著性差异. 药物合用组与奥曲肽组的抑制率差别各组之间无明显变化. 三组的结果皆为全反式维甲酸的抑制效应随剂量增加而增加. 而药物合用组的增生抑制效应并不随全反式维甲酸的剂量变化而变化(图 1). 生长曲线可以看出, 随着时间的延长, 合用药组与奥曲肽组的细胞数量差距增大, 奥曲肽作用组细胞数量多于合用药组, 反映在吸光度 A 值上, 即吸光度随着时间延长而增加, 合用药组作用随时间延长而增加. 流式结果分析采用 Modifit LT 软件处理系统. 采用 PI 染色, 合用药组 72 h 之后, 细胞凋亡率与对照组及奥曲肽组相比出现显著性差异, 为 17% 左右, 说明合用药组的作用是随着时间的延长而增强的. 72 h 的作用效果强于 24 h(图 2). 细胞周期, 用药奥曲肽单用 72 h 后, 细胞凋亡率虽仍无明显增加, 周期 S 期自 48 h 起却已开始升高. 奥曲肽在 HepG₂ 肝母细胞瘤中可能是通过 S 期阻滞实现其作用的. 合用药组的各个细胞周期都有影响. 台盼兰染色后, 未发现大片死亡细胞, 各组之间结果无显著差异. 说明全反式维甲酸和奥曲肽导致细胞增生抑制不是依赖其毒性作用.

2.2 细胞免疫化学 抑癌基因 p21^{WAF1/CIP1} 在药物作用的细胞上表达强烈. 在无药物作用的各时间对照组中表达微弱, 以核, 膜表达为主, 但在药物作用后的细胞爬片上, 核表达增加明显, 膜表达微弱增加(图 3).

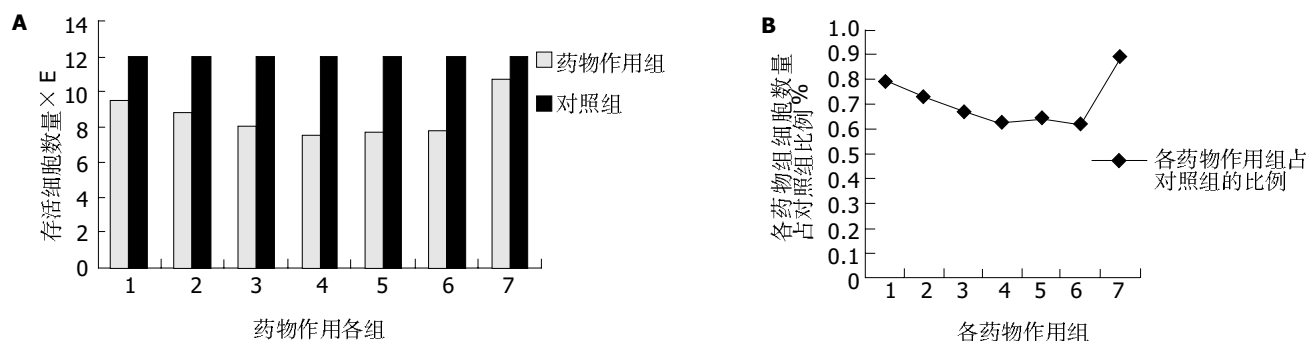


图1 A: 24 h不同剂量药物作用组与对照组细胞数量比较; B: 24 h不同剂量药物作用组细胞数量与对照组细胞数量之比值%。(1: 全反式维甲酸 10^{-6} mmol/L; 2: 全反式维甲酸 5×10^{-6} mmol/L; 3: 全反式维甲酸 10^{-5} mmol/L; 4: 全反式维甲酸 10^{-6} mmol/L+ 奥曲肽 1 mg/L; 5: 全反式维甲酸 5×10^{-6} mmol/L+ 奥曲肽 1 mg/L; 6: 全反式维甲酸 10^{-5} mmol/L+ 奥曲肽 1 mg/L; 7: 奥曲肽 1 mg/L。

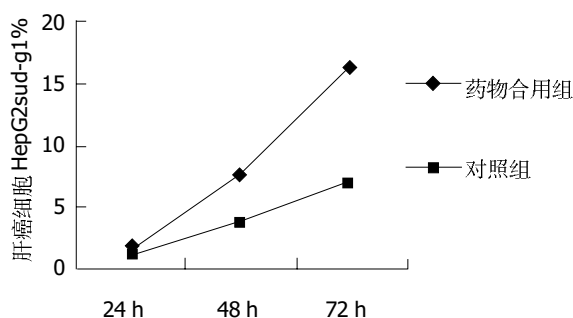


图2 流式细胞仪分析药物合用组及对照组细胞凋亡率。

3 讨论

全反式维甲酸由于其诱导分化引起细胞凋亡作用逐渐受到人们重视, 作为一种弱诱导凋亡剂, 人们将其与其他药物联合作用治疗肿瘤是一个很好的临床选择^[10-11]。奥曲肽对 HepG₂ 的作用, 可能是通过此种细胞上的生长抑素受体 SSTR 实现的^[12-17], 而全反式维甲酸在肝癌

细胞中的作用途径则不是十分明确^[18-26], 全反式维甲酸可降低肝癌细胞对生长因子的反应能力。在此方面, 可能与奥曲肽有相加作用。全反式维甲酸 10^{-6} mmol/L 可激活奥曲肽 (1 mg/L) 的作用通道, 剂量再增加, 无明显效果。在 72 h 生长曲线图形中可以看到, 随着药物作用时间的延长, 奥曲肽组和全反式维甲酸组两组间细胞数量差异日益显著, 说明两种药物合用, 效果具有时间依赖性。抑癌基因 p21^{WAF1/CIP1} 可以结合 cyclin/cdk 周期素复合物, 抑制周期素酶的活性, 从而阻止细胞周期进程, 并且还可以和增生细胞核抗原 (PCNA) 结合形成复合物, 抑制 DNA 的复制^[27-28]。在免疫组化中, 随着药物作用, 抑癌基因 p21^{WAF1/CIP1} 在细胞核内表达有着明显的增强, 这说明在其合用的过程中, 共同作用的结果之一是使得核抑癌基因 p21^{WAF1/CIP1} 增加, 来实现其肿瘤抑制作用。这与国内杂志上抑癌基因 p21^{WAF1/CIP1} 主要在细胞膜, 胞质表达也有所不同^[29]。流式结果表明奥曲肽在 48 h 出现 S 期阻滞, 在 48 h 奥曲肽作用的细胞爬片上,

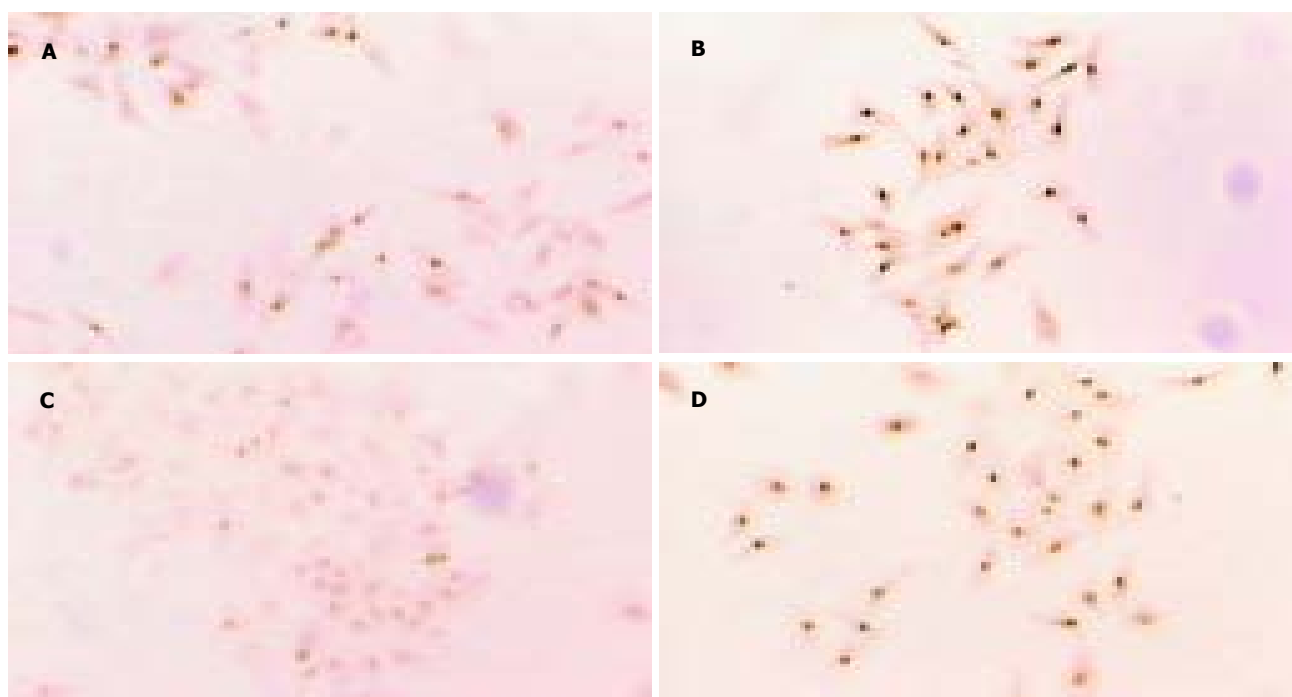


图3 HepG₂ 细胞抑癌基因 p21^{WAF1/CIP1} 的表达 × 400。A: 24 h 未用药对照组; B: 24 h 合用药组; C: 48 h 未用药对照组; D: 48 h 合用药组。

p21^{WAF1/CIP1}数量也略有增加,但对比不甚明显,在细胞全部表达且同一爬片有强有弱的情况下,无法判断是否具有显著差异。而有全反式维甲酸存在的合用药组, p21^{WAF1/CIP1}表达普遍强烈增加,可能是药物共同作用,使得核表达大大加强。但是尚不能肯定合用组 p21^{WAF1/CIP1}表达随时间延长而增加,但是却可以得出随着用药时间延长,各用药组与对照组之间的表达差异日趋强烈的结论。流式测量结果证明,药物合用对细胞的各个周期都有影响,并随作用时间延长, sub-G1期细胞增多,而凋亡率于72 h始出现显著性差异,说明两药合用效果具有时间依赖性。而奥曲肽对细胞影响是通过S期阻滞实现的,这与以前的奥曲肽作用肝癌细胞如SMMC-7721、BEL-7402^[30-31],而使G₀/G₁期阻滞有所不同。可能与不同细胞上受体表达不一致有关。在24 h的药物作用后,台盼兰染色发现,各组并无明显的死亡细胞,各组的存活率在93%以上,且无显著性差异,说明全反式维甲酸和奥曲肽导致肿瘤细胞增生抑制,导致细胞凋亡,并不是由于其毒性所致。

本实验证明了全反式维甲酸和奥曲肽联合应用有更强的抗肿瘤作用,小剂量的全反式维甲酸可以增强奥曲肽的肿瘤增生抑制和诱导凋亡的作用,他可能增强了奥曲肽的某种作用通道,并且这种通道的数量可能是有限的,且合用结果使得肿瘤细胞的各个周期都有所变化,说明两种药物作用于不同阶段,全反式维甲酸使得细胞停滞于G₀/G₁期,而奥曲肽则作用于细胞的S期。除了两种药物本身的作用途径之外,维甲酸也可能重新激活奥曲肽另外的通道来发挥作用,且这种通道的作用掩盖了全反式维甲酸本身的作用,但二者的确切作用机制尚需要进一步研究。我们是否可以借用小剂量的全反式维甲酸,在临床上消化道肿瘤与肝硬化患者需要用奥曲肽之类的生长抑素制剂时辅助应用,从而达到事半功倍的效果,尚有待我们探索。

4 参考文献

- 1 於葛华, 许志祥, 徐颖, 张学光. 全反式维甲酸对肺癌细胞株 SPCA-1 增生及黏附分子表达的影响. 癌症 2001;20:1069-1071
- 2 许培权, 龚建平. 全反式维甲酸对 HL-60 细胞分化和凋亡的影响. 癌症 2004;23:118-123
- 3 王春晖, 唐承薇. 奥曲肽对胃癌细胞转录活化蛋白-1 的抑制作用. 癌症 2002;21:850-854
- 4 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
- 5 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
- 6 朱兆华, 夏忠胜, 何守搞. 全反式维甲酸和 5-Fu 对胃癌细胞端粒酶活性和细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:669-673
- 7 钱群, 陈绪军, 刘志苏, 艾中立, 何跃明, 雷道雄. 奥曲肽与胰岛素对人肝癌细胞影响的体外实验研究. 中华消化杂志 2002;20: 383-386
- 8 Tang CW, Tang LP, Wang CH. Effects of combination of octreotide and aspirin on proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng* 2002;21:383-387
- 9 邓丽静, 张正. 奥曲肽对肝癌细胞 SMMC-7721 增生和凋亡的影响. 华西医学 2002;17:205-206
- 10 Piao YF, Shi Y, Gao PJ. Inhibitory effect of all-trans retinoic acid on human hepatocellular carcinoma cell proliferation. *World J Gastroenterol* 2003;9:2117-2120
- 11 Chen YQ, Wu Q, Chen ZM, Chen F, Su WJ. Effect of all-trans retinoic acid on growth of xenograft tumor and its metastasis in nude mice. *Chin Med J* 2000;113:345-349
- 12 Jia WD, Xu GL, Sun HC, Wang L, Xu RN, Xue Q. Effect of octreotide on angiogenesis induced by hepatocellular carcinoma in vivo. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:404-409
- 13 Mearadji A, Breeman W, Hofland L, van Koetsveld P, Marquet R, Jeekel J, Krenning E, van Eijck C. Somatostatin receptor gene therapy combined with targeted therapy with radiolabeled octreotide: a new treatment for liver metastases. *Ann Surg* 2002;236:722-728
- 14 Jia WD, Xu GL, Xu RN, Sun HC, Wang L, Yu JH, Wang J, Li JS, Zhai ZM, Xue Q. Octreotide acts as an antitumor angiogenesis compound and suppresses tumor growth in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma xenografts. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:327-334
- 15 Hu C, Yi C, Hao Z, Cao S, Li H, Shao X, Zhang J, Qiao T, Fan D. The effect of somatostatin and SSTR3 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2004;3: [Epub ahead of print]
- 16 Xidakis C, Kolios G, Valatas V, Notas G, Mouzas I, Kouroumalis E. Effect of octreotide on apoptosis-related proteins in rat Kupffer cells: a possible anti-tumour mechanism. *Anticancer Res* 2004;24:833-841
- 17 Pan DY, Qiao JG, Chen JW, Huo YC, Zhou YK, Shi HA. Tamoxifen combined with octreotide or regular chemotherapeutic agents in treatment of primary liver cancer: a randomized controlled trial. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:211-215
- 18 崔儒涛, 蔡淦, 程勇, 杨秋泓, 田涛. 全反式维甲酸对大鼠胃黏膜上皮异型增生细胞凋亡及调控基因(Bcl-2、Fas、ICE)蛋白表达的影响. 中华消化杂志 2000;20:82-84
- 19 Liu F, Qi HL, Chen HL. Effects of all-trans retinoic acid and epidermal growth factor on the expression of nm23-H1 in human hepatocarcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126:85-90
- 20 Atai W, Hiroyoshi K, Masashi A, Kenichi S, Tsuyoshi U, Ryoza N, Masahiko K. Retinoids induce the PAI-1 Gene expression through tyrosine kinase-dependent pathways in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Pharmacol* 2002;39:503-512
- 21 Johst U, Betsch A, Wiskirchen J, Schober W, Vonthein R, Rinkert N, Kehlbach R, Claussen CD, Duda SH. All-trans and 9-cis retinoid acids inhibit proliferation, migration, and synthesis of extracellular matrix of human vascular smooth muscle cells by inducing differentiation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:526-535
- 22 Feng Y, Wang LY, Cai T, Jin JW, Zhou GF, Cao LH, Zha XL. All-trans-retinoic acid increased the expression of integrin alpha5beta1 and induced "anoikis" in SMMC-7721 hepatocarcinoma cell. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:429-438
- 23 Rowling MJ, Schalinske KL. Retinoid compounds activate and induce hepatic glycine N-methyltransferase in rats. *J Nutrition* 2001;131:1914-1917
- 24 Sun SY, Wan H, Yue P, Ho WK, Lotan R. Evidence that Retinoic acid receptorb induction by Retinoids is important for tumor cell growth inhibition. *J Bio Chem* 2000;275:17149-17153
- 25 Hatoum A, El-Sabban ME, Khoury J, Yuspa SH, Darwiche N. Overexpression of retinoic acid receptors alpha and gamma into neoplastic epidermal cells causes retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis. *Carcinogenesis* 2001;22:1955-1963
- 26 Dragnev KH, Rigas JR, Dmitrovsky E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist* 2000;5:361-368
- 27 Zhang H, Rosdahl I. Expression profiles of p53, p21, bax and bcl-2 proteins in all-trans-retinoic acid treated primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 2004;25:303-308
- 28 Alisi A, Leoni S, Piacentani A, Conti Devirgiliis L. Retinoic acid modulates the cell-cycle in fetal rat hepatocytes and HepG2 cells by regulating cyclin-cdk activities. *Liver Int* 2003;23:179-186
- 29 司维柯, 高利宏, 刘斌, 陈安, 李鹏, 姚捷. 苦参碱诱导人肝癌细胞分化、凋亡时对 G1 细胞周期调节因子的调控. 癌症 2001;20: 848-851
- 30 王春晖, 唐承薇, 汤丽平. 奥曲肽抑制肝癌生长的实验研究. 中华医学杂志 2001;81:1194-1197
- 31 刘志苏, 陈绪军, 艾中立. 奥曲肽抑制人肝癌细胞生长机制的探讨. 中华肿瘤杂志 2000;22:294

肠癌细胞株 dynamin II 的差异表达

王新颖, 李恕军, 赖卓胜, 马文敏, 狄焱, 姜泊

王新颖, 赖卓胜, 马文敏, 狄焱, 姜泊, 中国人民解放军第一军医大学南方医院消化科全军消化病研究所 广东省广州市 510515

李恕军, 北京军区总医院消化科 北京市 100700

王新颖, 女, 1973-03-08 生, 汉族, 2002 年南方医院消化科硕士生, 主治医师, 主要从事大肠侧向发育型肿瘤的基因调控机制方面的研究。

广东省基金, No. 2002C30307

项目负责人: 姜泊, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学南方医院消化科. drjiang@163.com

电话: 020-61641541 传真: 020-61641541

收稿日期: 2004-06-19 接受日期: 2004-07-11

Different expressions of dynamin II between colorectal cancer cell lines

Xin-Ying Wang, Shu-Jun Li, Zhuo-Sheng Lai, Wen-Min Ma, Yan Geng, Bo Jiang

Xin-Ying Wang, Zhuo-Sheng Lai, Wen-Min Ma, Yan Geng, Bo Jiang, Department Of Gastroenterology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Shu-Jun Li, Department of Gastroenterology, General Hospital of Beijing Military Region

Supported by the Province Foundation, No.2002C30307

Correspondence to: Dr. Bo Jiang, Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. drjiang@163.com

Received: 2004-06-19 Accepted: 2004-07-11

Abstract

AIM: To detect different expressions of dynamin II between laterally spreading tumor (LST) and SW480 cell line as well as between LST and Lovo cell line.

METHODS: Different expressions were detected using semiquantitative polymerase chain reaction (PCR) method. Extraction of total RNA from LST, SW480 and Lovo cell lines, respectively, was performed to synthesize cDNA through reverse transcription. The conditions of PCR were optimized, including annealing temperature, cycle parameters and amount of template. UVI imaging was used to detect the PCR products.

RESULTS: Dynamin II and amplified segment of *beta*-actin were 475 bp and 239 bp respectively. The expression of dynamin II in colorectal LST cell line was twofold higher than that in both SW480 and Lovo cell lines. The genetic sequence we gained from targeted gene was the same as the sequence of L36983 and BC016045 in GeneBank.

CONCLUSION: Dynamin II is differently expressed in LST cell line compared with SW480 and Lovo cell lines. It may play an important role in the morphology and cancerogenesis of the tumor.

Wang XY, Li SJ, Lai ZS, Ma WM, Geng Y, Jiang B. Different expressions of dynamin II between colorectal cancer cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2299-2301

摘要

目的: 应用半定量 RT-PCR 方法检测 dynamin II 基因在大肠侧向发育型肿瘤细胞株同 SW480 细胞株及 Lovo 细胞株之间的差异表达。

方法: 以三种肠癌细胞株为标本, 分别提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 选择加入的模板量及循环数, 优化 PCR 反应条件, 确定适宜的反应体系, 凝胶图像分析结果。

结果: 在大肠侧向发育型肿瘤细胞株同普通隆起型肠癌细胞株之间存在着 dynamin II 基因的差异表达。

结论: 半定量 RT-PCR 方法具有简单, 方便, 经济的特点, 通过该方法, 我们发现在大肠侧向发育型肿瘤细胞株同 SW480 细胞株及 Lovo 细胞株之间存在 dynamin II 基因的差异表达, 此结果同我们基因芯片的筛选结果一致, 结合 dynamin II 基因的功能, 我们推测该基因可能在 LST 的形态学或癌变机制中发挥一定作用。

王新颖, 李恕军, 赖卓胜, 马文敏, 狄焱, 姜泊. 肠癌细胞株 dynamin II 的差异表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2299-2301

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2299.asp>

0 引言

定量检测基因表达水平常用 Northern 印迹等方法, 但常有同位素污染, 样品用量大及敏感性低的缺点。因此我们根据逆转录-多聚酶链反应的产量同 RNA 模板量及循环次数正相关的原理, 采用半定量 RT-PCR (semiquantitative polymerase chain reaction) 方法检测 dynamin II 基因在大肠侧向发育型肿瘤细胞株同 SW480 细胞株及 Lovo 细胞株之间的差异表达。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠侧向发育型肿瘤(laterally spreading tumor, LST)癌细胞株由我科建株并保存, SW480 购自武汉中国细胞培养物保藏中心; lovo 细胞株为我科保存. TRIZOL 为 Gibco 公司产品, RevertAid™ H Minus M-MuLV, dNTPs mix, 随机引物, Ribonuclease inhibitor 购自 MBI 公司, PCR 反应体系购自北京赛百盛基因技术有限公司. dynamin II 和 *beta*-actin 基因引物分别参照基因文库 L36983 及 BC016045 序列自行设计, 由上海博亚基因技术有限公司合成, 序列如下: dynamin2: F1 5' -GCCGAGTCACTGTCCTGG TA-3', R1 5' GGTCTGCCGAGGACTATAGGT-3', *beta*-actin: F2 5' -

ACGTTGCTA TCCAGGCTGTG-3', R2 5' - AATGTCACGCACGATCGATTCC-3', 3K30 高速低温离心机(Sigma 公司), UNO II PCR 扩增仪(Biometra 公司), UVI 凝胶成像系统。

1.2 方法 传代培养的LST癌细胞株、SW480细胞株及Lovo细胞株各一培养瓶(约 $1 \times 10^7/L$), 冰预冷的PBS液冲洗培养瓶3遍, 加入Trizol 1mL, 吹打细胞, 室温静置10 min, 按Trizol说明书操作, 提取3种细胞总RNA, 电泳分析其完整性, 测纯度, 定量。按逆转录酶试剂操作说明合成cDNA。目的基因与内参基因采用同管扩增, 参照标准PCR反应体系(94 °C 预变性 2.5 min, 94 °C 变性 45 s, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 共同 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 终止反应), 分别优化退火温度、循环参数, 建立适宜的半定量PCR反应体系。改变RNA模板量, 确定指数扩增范围。选择最适条件后, 3株细胞株的对比实验重复3次。将PCR产物用1×TAE缓冲液配制1.5%琼脂糖进行水平板电泳, 电压60V, 电泳45 min, 在紫外灯下观察电泳结果, UVI凝胶成像系统分析。PCR产物测序。

2 结果

目的基因dynamin II和内参beta-actin PCR条件的优化。采用同管扩增, 在一般反应环境不变条件下, 分别改变循环次数为20, 23, 26, 29, 32, 34; 退火温度为48, 50, 51, 53 °C。选出目的基因dynamin II和内参beta-actin均在直线增加阶段的条件是: 50 ul 反应体积中含dNTP 0.2 mmol/L, Taq DNA 聚合酶2U, dynamin2 和 beta-actin 的上下游引物均为 40 pmol, Mg^{2+} 2.0 mmol/L, cDNA 2 ul, 循环次数28次, 退火温度51 °C (图1)。dynamin II 半定量PCR循环参数的选择。(图2) dynamin II 相对表达量随着循环次数的增加而增加, 在20个至32个循环之间的相对表达量为线性范围, 我们选择28个循环。分别选RNA模板量为50, 200, 600, 1000 ng 呈良好线性关系, 选取600 ng 做为模板量(图3)。琼脂糖凝胶电泳显示dynamin II和beta-actin扩增片段分别为475 bp和239 bp(图1)。凝胶图像分析显示dynamin II基因在大肠侧向发育型肿瘤癌细胞株中的表达高于其他两株细胞, 实验重复三次结果相同(图4)。对目的基因PCR产物分析为475个碱基片段, 内参基因为239个碱基片段, 所获得的片段序列与Genebank中L36983及BC016045序列一致。

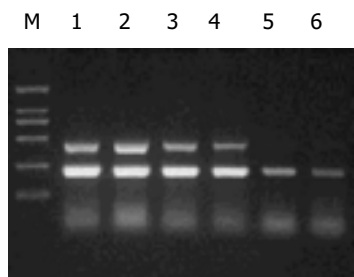


图1 SW480 细胞株 PCR 结果。M: Marker; 1: 34 个循环; 2: 32 个循环; 3: 29 个循环; 4: 26 个循环; 5: 23 个循环; 6: 20 个循环。

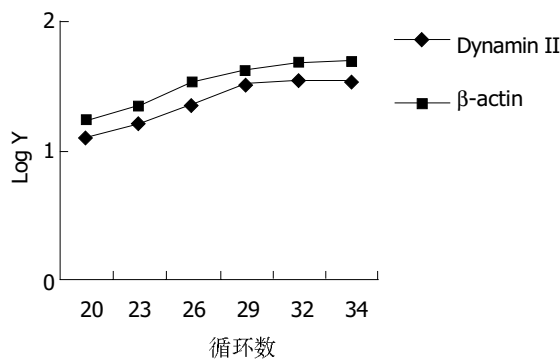


图2 LST 癌细胞株在不同循环数下 PCR 结果。

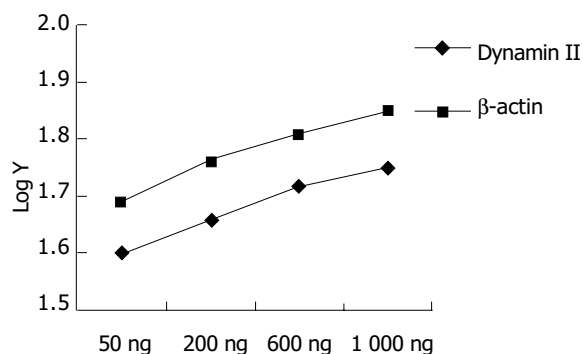


图3 不同RNA 模板量的结果。

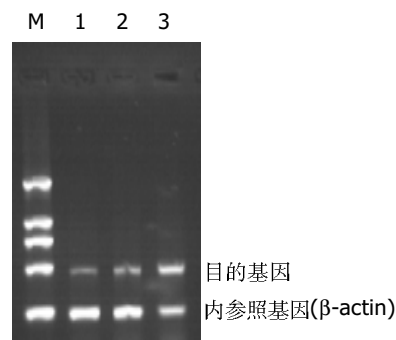


图4 三株细胞株对比的结果图。M: Marker; 1: Lovo; 2: SW480; 3: LST。

3 讨论

半定量 RT-PCR^[1]具有灵敏度高、所需样品量少、无同位素污染和快速等优点。尽管他不能像实时定量RT-PCR和竞争性 RT-PCR 能对 mRNA 进行真正准确定量^[2-3], 但由于其操作简便、耗费较低, 因而在临床及定量研究上仍不失为一种较好的方法^[4-5]。通常认为半定量 RT-PCR 的 RT 的效率是恒定的, 而 PCR 这一步中扩增片段是在 PCR 的第3个循环出现, 此后扩增产物呈指数增长, 即处于指数增长期, 若各实验组在相同循环数下, 扩增效率相同, 则扩增后的目的基因拷贝数与内参拷贝数的比值直接反映了他们起始拷贝数的比值。这即是半定量 RT-PCR 方法的理论基础^[6]。在本文中我们即采用这种方法, 对我科所建立的大肠侧向发育型肿瘤(laterally spreading tumor, LST)癌细胞株进行了基因表达方面的研究, 检测其与普通肠癌细胞株 dynamin II 基因的差异表达。

大肠侧向发育型肿瘤为一种新的类型的肠道肿瘤, 其病变形态和发生发展上有一定的特殊性, 呈侧向生长, 具恶变潜能, 有证据表明 LST 与大肠癌的发生有关^[7-8]。然而, 从 LST 概念的提出至今, 对该肿瘤的研究还停留在临床的内镜下诊断及治疗方面^[9-12]。有关 LST 病变与大肠癌发生的关系和确切机制及相关基因变化的研究, 现仅日本有流行病学及临床病理学的研究, 在分子水平上仅有与 K-ras, APC, COX-2, p53 等基因及细胞凋亡关系的初步研究^[13-15]。而我国 LST 病变的研究尚属空白, 但 LST 在我国的检出率并不低, 对此我科已有相关研究并且成功培养一株 LST 癌细胞株^[16-17]。由于其特殊的形态学表现且与大肠癌发生有关, 故从其形态学的异质性着手开展相关研究, 有可能对大肠癌的发生发展过程提供极有价值的资料及线索并在分子水平上找到早期诊断的可靠依据。

dynamin 基因分 I, II, III 三类, 为 GTPase 家族成员。在哺乳动物中以前二者研究较多, 其中 dynamin I 主要在脑中表达, 而 dynamin II (发动蛋白 2) 是 GTPase 家族成员之一, 普遍表达于各种组织中, 在心脏和骨骼肌中呈高表达。其具五个独特的蛋白域, 包括: N 末端 GTP 结合位点, 中间未知功能区 (middle unknown domain), PH 域 (a pleckstrin-homology domain), GTPase 活性位点 (GED), C 末端脯氨酸富集区 (PRD)^[18]。dynamin I 和 II 的 N 末端具高度同源性, 由于 C 末端的不同而具有不同的功能。dynamin II 最早发现其参与细胞内吞和分泌过程初期囊泡的形成, 继而研究表明其 PRD 区与 cortactin 蛋白等的 SH3 结合域相互作用而参与细胞的迁移、内吞、分泌过程及细胞形状的维持。近年来有人发现其具有促进细胞外基质降解作用及做为信号转导 GTPase 而影响转录调节, 激活 p53 而诱导凋亡, 故考虑其可能在肿瘤的发生中起到一定甚至重要作用而日益受到重视^[19-23]。

我们研究的结果表明 dynamin II 基因在 LST 癌细胞株中的表达高于其他两株细胞株, 这与之前我们基因芯片的筛选结果是一致的。故我们设想 dynamin II 基因可能在 LST 特殊的形态学表现及癌变机制中发挥一定甚至关键作用。故我们将对其做进一步的研究, 以期发现新的肿瘤相关基因。

4 参考文献

- Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 1988;333:858-860
- 张淑云, 刘伟, 谷鸿喜, 杜博, 常曼丽. 实时荧光定量 PCR 检测血清中 HCV-RNA. *世界华人消化杂志* 2004;12:1464-1465
- 付丽娟, 吕淑兰, 程险峰, 王晓燕. IFN 治疗慢性丙型肝炎患者外周血单个核细胞 HCV 的变化. *世界华人消化杂志* 2004;12:610-613
- 高毅, 黄宇琦, 王宇, 方石岗, 杨继震. 逆转录定量 PCR 检测实验

- 性肝纤维化组织中金属蛋白酶抑制因子 1 的表达. *世界华人消化杂志* 1999;7:993
- 夏建国, 丁永斌, 陈国玉. 胃癌候选抑癌基因 Syk 表达的意义. *世界华人消化杂志* 2004;12:767-769
- Halford WP. The essential prerequisites for quantitative RT-PCR. *Nat Biotechnol* 1999;17:835
- Ohno Y, Terai T, Ogihara T, Hirai S, Miwa H. Laterally spreading tumor: clinicopathological study in comparison with the depressed type of colorectal tumor. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:770-776
- Tanaka S, Haruma K, Oka S, Takahashi R, Kunihiro M, Kitadai Y, Yoshihara M, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathologic features and endoscopic treatment of superficially spreading colorectal neoplasms larger than 20 mm. *Gastrointest Endosc* 2001;54:62-66
- Nakagoe T, Ishikawa H, Sawai T, Tsuji T, Jibiki M, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T. Gasless, video endoscopic transanal excision for carcinoid and laterally spreading tumors of the rectum. *Surg Endosc* 2003;17:1298-1304
- Tamura S, Nakajo K, Yokoyama Y, Ohkawauchi K, Yamada T, Higashidani Y, Miyamoto T, Ueta H, Onishi S. Evaluation of endoscopic mucosal resection for laterally spreading rectal tumors. *Endoscopy* 2004;36:306-312
- Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, Tanaka K, Shibasaki S, Hidaka S, Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T. Minilaparotomy approach for the resection of laterally spreading tumors of the colon. *Surg Today* 2004;34:737-741
- Jiang B, Zhi FC, Liu SD, Han YJ, Pan DS, Zhou D, Wan TM, Zhou DY. Pit pattern and endoscopic mucosal resection in diagnosis and treatment of colorectal tumors. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:294-297
- Yamada H, Hasegawa H, Iino H, Eguchi HF, Fujii H, Matsumoto Y. Evaluation of apoptosis as a factor affecting the growth of non-polypoid colorectal adenomas. *J Int Med Res* 2001;29:516-522
- Yamashita K, Arimura Y, Shimizu H, Takahashi H, Endo T, Imai K, Yamano H. Increased cyclooxygenase-2 expression in large flat colorectal tumors (laterally spreading tumors). *J Gastroenterol* 2003;38:69-73
- Noro A, Sugai T, Habano W, Nakamura S. Analysis of Ki-ras and p53 gene mutations in laterally spreading tumors of the colorectum. *Pathol Int* 2003;53:828-836
- Han YJ, Lai ZS, Wang YD, Jiang B, Zhou ZT, Zhou DY. Electron microscopic observation of primary cultured laterally spreading tumor cell line. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao* 2004;24:79-80
- Jiang B, Liu SD, Zhi FC, Pan DS, Zhou D, Wan TM, Zhou DY. The diagnosis and treatment of 25 cases of laterally spreading tumor of the large intestine. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao* 2002;22:189-191
- van der Blik AM. Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol* 1999;9:96-102
- Thompson HM, Cao H, Chen J, Euteneuer U, McNiven MA. Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nat Cell Biol* 2004;6:335-342
- Cao S, Yao J, Shah V. The proline-rich domain of dynamin-2 is responsible for dynamin-dependent in vitro potentiation of endothelial nitric-oxide synthase activity via selective effects on reductase domain function. *J Biol Chem* 2003;278:5894-5901
- Zhang Z, DuBois RN. Detection of differentially expressed genes in human colon carcinoma cells treated with a selective COX-2 inhibitor. *Oncogene* 2001;20:4450-4456
- Baldassarre M, Pompeo A, Beznoussenko G, Castaldi C, Cortellino S, McNiven MA, Luini A, Buccione R. Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Mol Biol Cell* 2003;14:1074-1084
- Schlunck G, Damke H, Kiessens WB, Rusk N, Symons MH, Waterman-Storer CM, Schmid SL, Schwartz MA. Modulation of Rac localization and function by dynamin. *Mol Biol Cell* 2004;15:256-267

哈尔滨市南岗区 1992/2001 年结直肠癌发病死亡趋势

孙喜文, 吴树岭, 林英姬, 王 波, 韩慧丽, 戴旭东

孙喜文, 林英姬, 王波, 戴旭东, 黑龙江省肿瘤医院
黑龙江省哈尔滨市 150040
吴树岭, 韩慧丽, 哈尔滨市南岗区卫生防疫站 黑龙江省哈尔滨市 150001
孙喜文, 1955-03-10 生, 黑龙江省嫩江县人, 汉族, 1994 年哈尔滨医科大学
硕士, 研究员, 主要从事恶性肿瘤流行病学和病因学研究。
黑龙江省卫生厅医学课题项目资助, No. 2002-060
项目负责人: 林英姬, 150040, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号, 黑
龙江省肿瘤医院。hljcri@163.com
电话: 0451-86665003 传真: 0451-86665003
收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-08-05

Trend of morbidity and mortality of colorectal carcinoma in Nangang District of Harbin from 1992 to 2001

Xi-Wen Sun, Shu-Ling Wu, Ying-Ji Lin, Bo Wang, Hui-Li Han, Xu-Dong Dai

Xi-Wen Sun, Ying-Ji Lin, Bo Wang, Xu-Dong Dai, Institute of Cancer Research, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China
Shu-Ling Wu, Hui-Li Han, Sanitation and Epidemic Prevention Station of Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Supported by Medical Program Fundation of Health Department, Heilongjiang Province, No.2002-060
Correspondence to: Ying-Ji Lin, Institute of Cancer Research, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. hljcri@163.com
Received: 2004-06-16 Accepted: 2004-08-05

Abstract

AIM: To determine the epidemiological characteristics of colorectal carcinoma (CRC) morbidity and mortality in Nangang District, Harbin, and to indicate the harmful effect of CRC on the people in that community.

METHODS: The data on morbidity and mortality of CRC in Nangang District (1992-2001) were sorted and coded according to ICD-9 criteria. The crude morbidity and mortality, age-standardized morbidity and mortality (adjusted by the world population), truncated morbidity and mortality (35-64 years old) as well as cumulative rates (0-65 years old) were calculated respectively. Trend χ^2 -test and u -test were adopted to analyze the preceding data. The morbidity and mortality in the near future were predicted based on Gray Modeling (GM1, 1).

RESULTS: The CRC morbidity and mortality had been significantly increasing year by year ($u=2.45$, $P<0.05$; $u=1.97$, $P<0.05$ respectively). The morbidity increased from 13.06/100 000 (1992-1993) to 19.37/100 000 (2000-2001) with an average of 4.83% for each year. The mortality for males and females increased from 2.83/100 000, 3.61/100 000 (1992-1993) to 9.60/100 000, 7.90/100 000 (2000-2001) with an average of 23.92% ($u=1.47$, $P>0.05$) and 11.88% ($u=1.97$, $P<0.05$) respectively. The age-standardized morbidity (adjusted by the world population) for males and females increased with a rate of 3.24% and

1.19% respectively. And the corresponding rates for mortality were 17.31% and 7.69% respectively. The cumulative and truncated morbidities were also increasing. The cumulative and truncated mortalities increased at an annual rate of 26.00%, 24.95% for males and 11.67%, 10.87 for females. The predicted morbidity and mortality were 28.15/100 000, 13.43/100 000 for males and 24.16/100 000, 20.45/100 000 for females respectively in 2006.

CONCLUSION: The morbidity and mortality of CRC have increased in 1992-2001, and will keep on increasing in the future, which are expected to reach 26.12/100 000 and 17.43/100 000 in 2006, respectively.

Sun XW, Wu SL, Lin YJ, Wang B, Han HL, Dai XD. Trend of morbidity and mortality of colorectal carcinoma in Nangang District of Harbin from 1992 to 2001. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2302-2306

摘要

目的: 对哈尔滨市南岗区结直肠癌(CRC)发病、死亡流行分布特点进行统计分析,探讨结直肠癌对哈尔滨市南岗区人群的危害。

方法: CRC发病死亡资料来源于哈尔滨市南岗区肿瘤发病死亡登记报告,按 ICD-9 疾病分类进行编码,分别计算粗发病(死亡)率、世界人口调整发病(死亡)率、35-64 岁截缩发病(死亡)率和 0-64 岁累积发病(死亡)率。率的显著性差异用 u 检验,发病率、死亡率的发展趋势检验用趋势 u 检验法,采用灰色模型 GM(1,1) 对近期 CRC 发病率和死亡率进行预测。

结果: CRC 发病率呈显著的逐年增加趋势($u=2.45$, $P<0.05$),由 1992/1993 年的 13.06/10 万增加到 2000/2001 年的 19.37/10 万,发病率以平均每年 4.83% 的速度增加。男性平均以每年 5.83% 的速度增加,女性平均以每年 3.78% 的速度增加。CRC 发病以非体力劳动者所占比重最大。预测 2006 年 CRC 发病率将达到 26.12/10 万,男女 CRC 发病率将分别达到 28.15/10 万和 24.16/10 万。CRC 死亡率呈明显逐年增加趋势($u=1.97$, $P<0.05$),男性 CRC 死亡率从 1992/1993 年的 2.83/10 万增加到 2000/2001 年的 9.60/10 万,平均每年以 23.92% 的速度增加,但增加趋势不明显($u=1.47$, $P>0.05$)。女性则从 3.61/10 万增加到 7.90/10 万,年平均增加速度为 11.88%,增加趋势明显($u=1.97$, $P<0.05$)。预测 2006 年 CRC 死亡率将达到 17.43/10 万,男女性别死亡率将分别达到 13.43/10 万和 20.45/10 万。

结论: 哈尔滨市南岗区居民 CRC 发病率、死亡率呈逐年上

升趋势, 预计 2006 年 CRC 发病率和死亡率将分别达到 26.12/10 万和 17.43/10 万。

孙喜文, 吴树岭, 林英姬, 王波, 韩慧丽, 戴旭东. 哈尔滨市南岗区 1992/2001 年结直肠癌发病死亡趋势. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2302-2306

http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2302.asp

0 引言

结直肠癌(colorectal cancer CRC)是常见的恶性肿瘤之一, 2000 年全球有 945 000 例 CRC 新诊断病例, 发病率仅次于肺癌、乳腺癌, 居恶性肿瘤发病的第三位^[1]. 过去一直以北美、大洋洲等国家发病率最高, 而亚洲地区发病率相对较低. 近年来, 随着人民生活水平改善, 饮食结构的改变, 我国 CRC 的发病率呈上升趋势^[2-4]. 流行病学研究表明, CRC 主要与家族肿瘤史^[5-6]、饮食习惯^[7-10]和结直肠息肉病史^[11-14]等因素有关^[15-16]. 但总体看, CRC 病因和发病机制不明, 预后较差, 5 a 生存率较低^[1]. 对 CRC 发病率、死亡率进行流行病学变化趋势研究, 将有助于其病因因素的探索和合理防治策略的制定^[17-18].

1 材料和方法

1.1 材料 CRC 发病死亡资料来源于哈尔滨市南岗区肿瘤发病死亡登记报告. 发病死亡登记卡由哈尔滨市各大医院填写, 每月报登记处. 登记处由专人对卡片按 ICD-9 疾病分类进行编码并录入“恶性肿瘤发病、死亡登记统计系统”, 进行漏项和逻辑检查, 不合格者由登记处工作人员进行访问补填. 年终对该年度报告卡片进行查重、复核和剔重. 人口数据由南岗区公安分局户籍科提供每年年初和年终年龄组人口数据, 年人口数取年初和年终平均数.

1.2 方法 对发病死亡数据分别计算粗发病(死亡)率、世界人口调整发病(死亡)率(采用 1985 年世界卫生组织公布的世界人口年龄构成)、35-64 岁截缩发病(死亡)率和 0-64 岁累积发病(死亡)率, 截缩率和累积率的计算公式分别为: 截缩率(1/10 万) = \sum 截缩年龄段各年龄组发病(死亡)率 \times 各相应年龄组标准人口构成 $\div \sum$ 截缩年龄段各相应标准人口构成, 累积率(%) = $[\sum$ (年龄组发病(死亡)率 \times 年龄组距)] \times 100%. 为了观察 10 a 间 CRC 发病率和死亡率的变化情况, 将 10 a 资料分成 5 个年段计算相应统计指标并进行 1992/1993 年与 2000/2001 年的前后比较. 采用 SPSS 软件进行发病率和死亡率的变化趋势检验, 趋势性检验的方法是: 求出各观察值序数, 即位于该观察值之前且小于该观察值的观察值个数, 用以下公式进行假设检验: $u = |r - R| \div \sigma_r = [(4 \sum p \div n(n-1)) - 1 - R] \div [2(2n+5) \div 9n(n-1)]^{1/2}$. 式中, $\sum p$: 合计序数; n : 样本含量; r : 样本趋势性系数, $r = +1$, 表示有稳定上升趋势; $r = -1$, 表示有稳定下降趋势; R : 总体趋势性系数, 据假设检验, $R = 0$; σ_r : 总体标准差, 用

样本标准差 S 作为估计值. 取 $\alpha = 0.05$, $u_{(0.05)} = 1.96$. 1992/1993 年与 2000/2001 年发病(死亡)率的显著性差异用 u 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性. 采用灰色模型 GM(1, 1)对近期 CRC 发病率和死亡率进行预测.

2 结果

1992/2001 年 CRC 平均发病率男性为 18.19/10 万, 女性为 15.15/10 万. 经世界标准人口构成调整后男女发病率分别为 17.49/10 万和 13.78/10 万. 发病率性比值为 1.20:1. CRC 发病数占总恶性肿瘤发病数的 9.65% (男性为 9.32%, 女性为 10.08%), 男女分别居恶性肿瘤发病的第四位和第三位. 1992/2001 年 CRC 平均死亡率男女分别为 7.48/10 万和 5.99/10 万, 世界调整死亡率分别为 7.43/10 万和 5.57/10 万. 死亡率性比值为 1.25:1. CRC 死亡占总死亡的 5.42%, 男女分别为 5.05% (表 1) (第四位)和 5.99% (第三位).

CRC 发病率呈显著的逐年增加趋势($u = 2.45$, $P < 0.05$), 由 1992/1993 年的 13.06/10 万增加到 2000/2001 年的 19.37/10 万, 发病率平均每年增加 4.83%. 其中男性 CRC 发病率以平均每年 5.83% 的速度增加, 增加趋势显著($u = 2.45$, $P < 0.05$); 女性平均以每年 3.78% 的速度增加, 同样发病率具有显著的增加趋势($u = 1.97$, $P < 0.05$). 男女 CRC 世界人口调整发病率分别平均每年以 3.24% 和 1.19% 的速度增加. CRC 截缩发病率和 0-64 岁累计发病率均呈逐年增加的趋势(表 1, 3, 图 1).

表 1 结直肠癌发病死亡率性别年代分布 (10 万)

年代	发病率		世调率		累积发病率		截缩发病率	
	男	女	男	女	男	女	男	女
1992/1993	13.22	12.90	14.28	13.15	0.84	0.53	23.98	15.94
1994/1995	17.24	15.05	17.63	14.71	0.88	0.72	24.28	26.22
1996/1997	19.26	13.80	18.16	12.48	1.05	0.72	30.26	20.55
1998/1999	19.63	15.77	17.39	13.61	0.99	0.79	27.61	21.26
2000/2001	20.92	17.78	18.91	14.71	0.96	0.83	27.82	24.97
合计	18.19	15.15	17.49	13.78	0.94	0.72	26.83	21.03

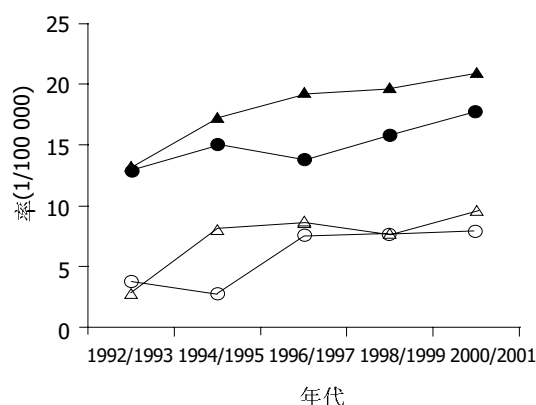


图 1 结直肠癌发病率、死亡率变化趋势. ▲: 男性发病率; ●: 女性发病率; △: 男性死亡率; ○: 女性死亡率.

1992/2001年CRC死亡率呈明显逐年增加趋势($u=1.97$, $P<0.05$). 男性CRC死亡率从1992/1993年的2.83/10万增加到2000/2001年的9.60/10万, 平均每年以23.92%的速度增加, 但增加趋势不明显($u=1.47$, $P>0.05$). 女性则从3.61/10万增加到7.90/10万, 年平均增加速度为11.88%, 增加趋势明显($u=1.97$, $P<0.05$). 男女世界人口调整死亡率均呈增加趋势, 男女分别以平均每年17.31%和7.69%的速度增加. 男女累积死亡率和截缩死亡率均呈增加趋势, 其中累积死亡率男女分别以平均每年26.00%和11.67%的速度增加, 截缩死亡率分别以每年24.95%和10.87%的速度增加(表2-3, 图1).

表2 不同性别、不同年代CRC死亡率、世界调整死亡率、累积死亡率和截缩死亡率(/10万)

年代	死亡率		世调率		累积死亡率		截缩死亡率	
	男	女	男	女	男	女	男	女
1992/1993	2.83	3.61	3.24	3.76	0.10	0.12	2.89	3.47
1994/1995	8.16	2.71	8.88	2.87	0.36	0.08	10.67	2.16
1996/1997	8.61	7.48	8.41	6.98	0.31	0.30	8.40	8.78
1998/1999	7.68	7.64	7.23	6.63	0.44	0.40	12.17	11.72
2000/2001	9.60	7.90	8.85	6.65	0.36	0.26	10.10	7.24
合计	7.48	5.99	7.43	5.57	0.31	0.24	8.86	6.93

表3 1992/1993年与2000/2001年不同性别结直肠癌发病率、死亡率增减(%)

性别	发病				死亡			
	发病率	世调率	累积率	截缩率	死亡率	世调率	累积率	截缩率
男	58.25	32.42	14.29	16.11	239.22	173.15	260.00	249.48
女	37.83	11.86	56.60	56.65	118.84	76.86	44.44	108.64
合计	48.32	20.88	29.41	31.34	172.89	120.06	172.73	162.58

CRC年龄组发病专率和年龄组死亡专率均随年龄的增加而上升. 男性发病率70岁达高峰, 之后稍有下降, 而女性发病率80岁及以上组达最高峰. 60岁前各年龄组发病率差别不大($u=0.89$, $P>0.05$), 60-69岁年龄组男性发病率明显高于女性($u=7.86$, $P<0.05$). 70-79岁年龄组男女发病率没有明显差别($u=1.21$, $P>0.05$), 而80岁及以上年龄组女性发病率高于男性, 但没有显著差别($u=0.64$, $P>0.05$). CRC20岁前没有发病者, 平均发病年龄为55.52岁, 其中男性平均发病年龄为55.50岁, 女性为55.56岁. CRC死亡率男女均在80岁以上组达死亡率高峰, 80岁组前男女死亡率没有明显差别($u=0.68$, $P>0.05$), 80岁以上年龄组死亡率男性显著高于女性($u=2.86$, $P<0.05$). CRC平均死亡年龄为58.10岁, 男女平均死亡年龄分别为58.34岁和57.74岁(图2).

将职业按劳动强度分为轻体力劳动(干部、知识分子和个体经商)和重体力劳动(工人), 从表4可以看出CRC发病主要以轻体力劳动者为主, 占CRC发病的

52.11%. 在男性中, 干部(机关办公室工作者)的CRC发病人数约占CRC发病总人数的1/3, 知识分子(教育、医疗、科研和各类设计院所等从业人员)所占比例最小(3.51%). 在女性中, 个体经商者CRC发病人数占女性CRC发病总人数的23.82%, 干部占不足1/5.

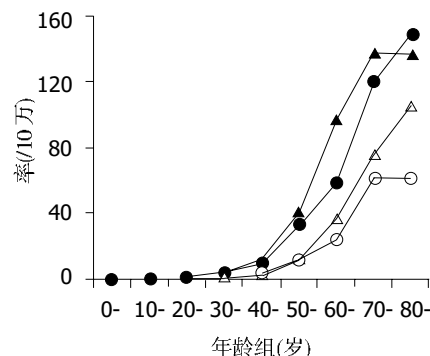


图2 1992/2001年结直肠癌年龄组发病率、死亡率变化趋势. ▲: 男性发病专率; ●: 女性发病专率; △: 男性死亡专率; ○: 女性死亡专率.

表4 CRC发病主要职业分布(%)

性别	工人	干部	知识分子	个体经商	其他
男	21.73	31.84	3.51	21.19	21.75
女	17.40	18.58	4.39	23.82	35.81
合计	19.77	25.82	3.91	22.38	28.12

采用灰色模型GM(1, 1)预测近期CRC发病率和死亡率, 发病率 $u=14.52>u(0.05)=1.96$, $P<0.05$; 死亡率 $u=5.54>u(0.05)=1.96$, $P<0.05$, 故认为CRC发病率和死亡率呈现一定的时间变化趋势. 该模型对原始资料的拟合效果很好, 说明如果没有其他因素的干预, CRC发病率和死亡率将保持持续上升的势头. 到2006年男女CRC发病率将分别达到28.15/10万和24.16/10万, 死亡率将分别达到13.43/10万和20.45/10万, 女性CRC死亡率将超过男性(表5).

表5 2002/2006年哈尔滨市南岗区CRC发病率、死亡率预测(/10万)

性别	发病率					死亡率				
	2002	2003	2004	2005	2006	2002	2003	2004	2005	2006
男	22.26	23.60	25.03	26.55	28.15	10.42	11.10	11.83	12.61	13.43
女	18.42	19.71	21.09	22.58	24.16	10.15	12.09	14.41	17.71	20.45
合计	20.34	21.65	23.05	24.54	26.12	10.31	11.93	13.53	15.36	17.43

3 讨论

CRC是常见的消化道恶性肿瘤, 严重危及患者生命或降低患者的生活质量. 世界各国CRC发病率差异较大, 工业发展程度越高的国家CRC发病率越高^[19-25]. CRC是西方发达国家常见恶性肿瘤, 其发病率居恶性肿瘤发病率的第二位, 而发展中国家CRC发病人数不足全部CRC人数的1/3^[2]. 北美、西欧、澳大利亚及新西兰是CRC高发地区, 发病率为30-50/10万. 东欧居中, 而

非洲、亚洲及南美发病率相对较低, 约为 10/10 万^[26-27]. 我国 CRC 发病率同样存在区域差别, 近年来发病率和死亡的上升趋势十分明显^[2]. 本资料显示, 21 世纪初与 1990 年代初相比 CRC 发病率增加了 48.32%, CRC 死亡率增加了 172.89%, 发病率和死亡率均有显著的增加趋势($P<0.05$). 这种不同地区 CRC 发病率有明显差异的状况提示 CRC 与环境、生活方式及遗传等因素有密切关系.

近年来, 亚洲、非洲、东欧和南欧一些国家的 CRC 发病率与西方国家 CRC 发病率持续降低或保持稳定不变不同的是, 这些国家的 CRC 发病率呈上升趋势. 日本^[28] CRC 发病率上升尤为显著, 从 1950-1995 年上升了 8 倍. 在韩国^[29]发病率每 10 a 上升 2 倍, CRC 占全部癌症的比例从 1982 年的 5.8% 上升到 1996 年的 8.4%. 本资料结果显示, 南岗区的 CRC 发病率由 20 世纪初的 13.06/10 万上升到 21 世纪初的 19.37/10 万, 其中男性发病率从 13.22/10 万上升到 20.92/10 万, 女性从 12.90/10 万上升到 17.78/10 万. 国内外学者认为 CRC 发病率的这种变化趋势与西方化生活方式和饮食习惯有关^[5-7, 9-13], 然而仍保持传统饮食习惯的埃及^[30]其发病率近年也呈上升趋势, 而且 40 岁以下的青年人约占 1/3. 另一作者发现埃及 CRC 患者体内有机氯化物或其他杀虫剂水平较高, 认为这与针对 CRC 的预防措施同工业化城市化进程不相适应有关. 以往移民流行病学研究结果发现, 从日本、中国及非洲等 CRC 低发病率国家移居至美国、澳大利亚等 CRC 高发病率国家的第一代人群即出现发病率的显著上升, 而从南欧移居至澳大利亚但仍保持其原有烹调方式的人群, CRC 发病率却无明显改变. 移民流行病学研究结果提示生活方式在 CRC 发病中起重要作用. 有研究提示, 大肠癌的发生可能与环境因素、生活习惯, 尤其是饮食结构和方式有关联^[31-34]. 高脂肪低纤维素饮食是 CRC 发病的重要危险因素^[35-38]. 研究报道, 高脂食谱的实验动物大肠癌的发生率增高, 武汉的研究结果证实大肠癌患者偏高脂肉类食物的比例明显高于非大肠癌患者^[39], 说明大肠癌的发生与饮食结构有一定的相关性. 其机制可能为: 高脂饮食, 特别是含有饱和脂肪酸的饮食, 可使肝中胆固醇和胆酸的合成增多, 进而排入肠腔的胆固醇和胆酸增加, 在肠腔细菌的作用下, 胆固醇和胆酸转变为其代谢物和次级胆酸等致癌物质. 嗜酒、吸烟与大肠癌发生也有相关性^[40-41]. 以上研究结果提示, 环境、饮食习惯在 CRC 发生中起着比遗传更为重要的作用.

Becker *et al*^[42]认为, 除家族肿瘤史外, 体力活动少是 CRC 的主要致病因素, 我们的资料与此研究结果一致. 在 1992/2001 年确诊的全部 CRC 病例中, 从事脑力劳动者约占 1/3, 而从事体力劳动者仅占近 1/5.

结直肠息肉与 CRC 的发生密切相关, 息肉切除可明显降低 CRC 发病率. Von Eyben *et al* 认为从结直肠息肉至形成肿瘤的时间约为 10 a, Lieberman *et al* 观察到息肉切除术自 1970 年广泛应用使 CRC 发病率下降约

70%, 这种 CRC 发病率下降出现在 1980 年代中后期. 息肉切除术的广泛应用导致美国 CRC 发病率从 1986 年开始持续下降与上述假设相一致^[14]. 黑人得到结直肠息肉切除术的机会明显低于白人^[14-15], 这与黑人发病率没有出现白人的持续下降相吻合. 国内的一项研究^[16]也证实息肉切除术可降低直肠癌发病率.

4 参考文献

- 1 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2:533-543
- 2 Zheng S, Cai S. Colorectal cancer epidemiology and prevention study in China. *Chin German J Clin Oncol* 2003;2:72-75
- 3 张振书, 张亚历. 中国大肠癌研究进展. *世界华人消化杂志* 2001; 9:489-494
- 4 米登海, 罗好增. 武汉市恶性肿瘤发病现状及趋势. *肿瘤防治研究* 2002;9:449-451
- 5 Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjonneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003;361:1496-1501
- 6 Hangen L, Bennink MR. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr Cancer* 2002;44:60-65
- 7 Senesse P, Boutron-Ruault MC, Faivre J, Chatelain N, Belghiti C, Meance S. Foods as risk factors for colorectal adenomas: a case-control study in Burgundy (France). *Nutr Cancer* 2002; 44:7-15
- 8 Ye W, Romelsjo A, Augustsson K, Adami HO, Nyren O. No excess risk of colorectal cancer among alcoholics followed for up to 25 years. *Br J Cancer* 2003;88:1044-1046
- 9 Shimizu N, Nagata C, Shimizu H, Kametani M, Takeyama N, Ohnuma T, Matsushita S. Height, weight, and alcohol consumption in relation to the risk of colorectal cancer in Japan: a prospective study. *Br J Cancer* 2003;88:1038-1043
- 10 Coates AO, Potter JD, Caan BJ, Edwards SL, Slattery ML. Eating frequency and the risk of colon cancer. *Nutr Cancer* 2002;43:121-126
- 11 Fung T, Hu FB, Fuchs C, Giovannucci E, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Major dietary patterns and the risk of colorectal cancer in women. *Arch Intern Med* 2003;163: 309-314
- 12 Norat T, Riboli E. Dairy products and colorectal cancer. A review of possible mechanisms and epidemiological evidence. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:1-17
- 13 Colangelo LA, Gapstur SM, Gann PH, Dyer AR. Cigarette smoking and colorectal carcinoma mortality in a cohort with long-term follow-up. *Cancer* 2004;100:288-293
- 14 Troisi RJ, Freedman AN, Devesa SS. Incidence of colorectal carcinoma in the U.S.: an update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994. *Cancer* 1999;85:1670-1676
- 15 Nelson RL, Persky V, Turyk M. Determination of factors responsible for the declining incidence of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1999;42:741-752
- 16 Zheng S, Liu XY, Ding KF, Wang LB, Qiu PL, Ding XF, Shen YZ, Shen GF, Sun QR, Li WD, Dong Q, Zhang SZ. Reduction of the incidence and mortality of rectal cancer by polypectomy: a prospective cohort study in Haining County. *World J Gastroenterol* 2002;8:488-492
- 17 Gonzalez EC, Roetzheim RG, Ferrante JM, Campbell R. Predictors of proximal vs distal colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 2001;44:251-258
- 18 Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:21-25

- 19 Marchand LL. Combined influence of genetic and dietary factors on colorectal cancer incidence in Japanese Americans. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1999;26:101-105
- 20 Hawk ET, Limburg PJ, Viner JL. Epidemiology and prevention of colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 2002;82:905-941
- 21 Peng J, Ganry O, Tramier B, Dubreuil A, Raverdy N, Thulliez A. Groupe de travail de URCAM-DRASS. Incidence and prevalence estimations for breast and colorectal cancer in the Picardy region. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2002;50:427-432
- 22 Swan J, Edwards BK. Cancer rates among American Indians and Alaska Natives: is there a national perspective. *Cancer* 2003;98:1262-1272
- 23 Registro de Cancer de Navarra, Seccion de Enfermedades no Transmisibles y Estadísticas Vitales. Incidence and mortality of cancer in Navarra, 1993-1997. Tendencies in the last 25 years. *An Sist Sanit Navar* 2001;24:339-362
- 24 Marrett LD, Chaudhry M. Cancer incidence and mortality in Ontario First Nations, 1968-1991 (Canada). *Cancer Causes Control* 2003;14:259-268
- 25 Anderson WF, Umar A, Brawley OW. Colorectal carcinoma in black and white race. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22:67-82
- 26 Kim DH, Shin MH, Ahn YO. Incidence pattern of colorectal cancer in Korea of origin. *J Korean Med Sci* 2000;15:675-681
- 27 Bonithon-Kopp C, Benhamiche AM. Are there several colorectal cancers? Epidemiological data. *Eur J Cancer Pre* 1999;(Suppl 1):S3-12
- 28 Takada H, Ohsawa T, Iwamoto S, Yoshida R, Nakano M, Imada S, Yoshioka K, Okuno M, Masuya Y, Hasegawa K, Kamano N, Hioki K, Muto T, Koyama Y. Changing site discription of colorectal cancer in Japan. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1249-1254
- 29 Kim DH, Shin MH, Ahn YO. Incidence pattern of colorectal cancer in Korea of origin. *J Korean Med Sci* 2000;15:675-681
- 30 Abou-Zeid AA, Khafagy W, Marzouk DM, Alaa A, Mostafa I, Ela MA. Colorectal cancer in Egypt. *Dis Colon Rectum* 2002;45:1255-1260
- 31 Willett WC. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:3-8
- 32 Bingham SA. Diet and colorectal cancer prevention. *Biochem Soc Trans* 2000;28:12-16
- 33 Steindorf K, Tobiasz-Adamczyk B, Popiela T, Jedrychowski W, Penar A, Matyja A, Wahrendorf J. Combined risk assessment of physical activity and dietary habits on the development of colorectal cancer. A hospital-based case-control study in Poland. *Eur J Cancer Prev* 2000;9:309-316
- 34 Slattery ML, Edwards SL, Ma KN, Friedman GD. Colon cancer screening, lifestyle, and risk of colon cancer. *Cancer Causes Control* 2000;11:555-563
- 35 Jia XD, Han C. Chemoprevention of tea on colorectal cancer induced by dimethylhydrazine in Wistar rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:699-703
- 36 Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detect Prev* 2003;27:55-66
- 37 Maynard M, Gunnell D, Emmett P, Frankel S, Davey Smith G. Fruit, vegetables, and antioxidants in childhood and risk of adult cancer: the Boyd Orr cohort. *J Epidemiol Community Health* 2003;57:218-225
- 38 Jarvinen R, Knekt P, Hakulinen T, Rissanen H, Heliovaara M. Dietary fat, cholesterol and colorectal cancer in a prospective study. *Br J Cancer* 2001;85:357-361
- 39 陈婕, 李君, 徐三平, 宋军. 湖北地区结直肠癌与生活习性的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:105-107
- 40 Slattery ML, Curtin K, Anderson K, Ma KN, Ballard L, Edwards S, Schaffer D, Potter J, Leppert M, Samowitz WS. Associations between cigarette smoking, lifestyle factors, and microsatellite instability in colon tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1831-1836
- 41 Slattery ML. Diet, lifestyle, and colon cancer. *Semin Gastrointest Dis* 2000;11:142-146
- 42 Becker N. Epidemiology of colorectal cancer. *Radiologe* 2003;43:98-104

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。

前药热化疗对转CD基因结肠癌细胞SW480的作用机制

黎成金, 王烈, 涂小煌, 宋京翔

黎成金, 王烈, 涂小煌, 宋京翔, 中国人民解放军南京军区福州总医院
普外科 福建省福州市 350025

黎成金, 男, 1964-10-23 生, 广西陆川人, 汉族, 2003 年第四军医大学博士
研究生毕业, 主治医师, 研究方向: 结肠癌的基因治疗。

项目负责人: 黎成金, 350025, 福建省福州市西二环北路 156 号, 中国人民
解放军南京军区福州总医院普外科。licheng_jin@yahoo.com.cn

电话: 0591-2859415 传真: 0591-3796885

收稿日期: 2004-07-05 接受日期: 2004-07-15

Mechanism of thermochemotherapy with 5-fluorocytosine on human colon cancer cell line SW480 transfected cytosine deaminase gene

Cheng-Jin Li, Lie Wang, Xiao-Huang Tu, Jing-Xiang Song

Cheng-Jin Li, Lie Wang, Xiao-Huang Tu, Jing-Xiang Song, Department
of General Surgery, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area,
Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Dr. Cheng-Jin Li, Department of General Surgery,
Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area, Fuzhou 350025,
Fujian Province, China. licheng_jin@yahoo.com.cn

Received: 2004-07-05 Accepted: 2004-07-15

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of thermochemotherapy with 5-fluorocytosine (5-FC) on human colon cancer cell line SW480 transfected carcinoembryonic antigen (CEA) tissue-specific cytosine deaminase (CD) *in vitro*.

METHODS: Recombinant retroviral vector G1CEACDNa, in which the CD gene was controlled under the CEA promoter, was introduced through liposome technique to human colorectal carcinoma cell line SW480, and then the cells were selectively cultured in G418. The proliferated colonies were treated with the combined therapy of 5-FC and hyperthermia at a temperature of 43 °C for 30 min, 3 times. RT-PCR was performed to detect the expression of CD gene in target cells after being heated. The cell survival rate was detected by MTT method. The ultrastructures of cells were observed by electron microscopy and apoptosis was verified by flow cytometry.

RESULTS: The expression of CD genes in target cells was detected after being heated. After transfection, SW480-CEACD cells were more sensitive than their parental cells ($P < 0.01$, $t = 5.620$, $n = 9$) to 5-FC, the killing effect of hyperthermia on SW480 cells was observed ($P < 0.05$, $t = 2.999$, $n = 9$). Furthermore, after being treated with thermochemotherapy of 5-FC at a temperature of 43 °C for 30 min, the killing effect on SW480-CEACD cells was more significant than that on SW480 cells ($P < 0.01$, $t = 4.356$, $n = 9$). Treatment with the combination of 5-FC and hyperthermia displayed a higher anti-tumor effect than that with 5-FC alone on SW480-CEACD cells *in vitro* ($P < 0.05$, $t = 2.376$,

$n = 9$). Apoptotic bodies in the field of electron microscope were observed. G1 blockage was confirmed and the increased rate of apoptosis cells was verified after hyperthermia with 5-FC by flow cytometry.

CONCLUSION: The combination of 5-FC and hyperthermia will result in G1 blockage of human colorectal carcinoma cell lines SW480 transfected with the CEA tissue-specific CD genes, which will improve the outcome of the anti-tumor effect on that cell line.

Li CJ, Wang L, Tu XH, Song JX. Mechanism of thermochemotherapy with 5-fluorocytosine on human colon cancer cell line SW480 transfected cytosine deaminase gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2307-2311

摘要

目的: 探讨 5- 氟胞嘧啶 (5-fluorocytosine, 5-FC) 热化疗对转染组织特异性胞嘧啶脱氨酶 (cytosine deaminase, CD) 基因的大肠癌细胞 SW480 的作用及机制。

方法: 脂质体法将 CEA 基因顺式转录调控序列 (TRS) 驱动 CD 基因的组织特异性逆转录病毒载体 G1CEACDNa 转入大肠癌细胞 SW480, 以 G418 筛选阳性克隆扩增后, 采用水浴加温法, 43 °C 作用 30 min 共 3 次, 同时给予前药 5-FC 进行敏感试验; RT-PCR 法检测目的基因的表达, MTT 法检测细胞存活率, 电镜检测细胞的形态学变化, 流式细胞术检测细胞周期变化及凋亡。

结果: SW480-CEACD 细胞在 43 °C 作用 30 min 共 3 次条件下, CD 基因能稳定表达; 热疗本身对 SW480 细胞有一定的杀伤作用 ($P < 0.05$), 转 CD 基因后, SW480 细胞对 5-FC 的敏感性明显提高 ($P < 0.01$), 热疗与前药 5-FC 合用, 对 SW480-CEACD 的杀伤作用显著大于对未转基因细胞的杀伤作用 ($P < 0.01$, $t = 4.356$, $n = 9$), 亦大于单独应用 5-FC 时对 SW480-CEACD 细胞的杀伤作用 ($P < 0.05$, $t = 2.376$, $n = 9$), 增加了 SW480-CEACD 细胞对 5-FC 的敏感性, 电镜及流式细胞术检测显示, 细胞死亡以细胞凋亡为主, 前药热化疗导致结肠癌细胞 SW480 产生 G1 期阻滞, 凋亡细胞比例增加。

结论: 热疗与前药 5-FC 联合应用, 导致结肠癌细胞 SW480 产生 G1 期阻滞, 细胞凋亡比例增加, 提高了 CEA 组织特异性 CD/5-FC 系统的靶向性杀伤作用。

黎成金, 王烈, 涂小煌, 宋京翔. 前药热化疗对转 CD 基因结肠癌细胞 SW480 的作用机制. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2307-2311

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2307.asp>

0 引言

在转移性肝癌中,大肠癌占50%以上,此类患者80–90%难以外科手术切除,其5 a存活率不到30%,少数患者即使能切除,其复发率也达40–70%,其中位生存期约6–12 mo,此类患者主要依赖非手术疗法如放疗、化疗及局部治疗来延长生命^[1–8], CD/5-FC系统作为前药转换基因系统之一,近年来对其在肿瘤治疗中的作用进行了广泛研究^[9–12],已进行了少量I期临床实验^[9, 13–14]. 研究表明,癌胚抗原(CEA)转录调控序列可控制CD基因在CEA阳性的大肠癌组织中高效表达,在前药5-FC作用下,产生选择性杀伤肿瘤细胞的作用. 然而,我们的研究显示,CEA启动子控制的CD基因对低表达CEA的大肠癌细胞SW480的靶向性杀伤作用并不理想^[15], 5-FC热化疗能增加对转基因细胞的靶向性杀伤作用探讨如下.

1 材料和方法

1.1 材料 CEA启动子调控CD基因表达的逆转录病毒载体G1CEACDNa由第二军医大学长海医院惠赠; 大肠癌SW480细胞株由第四军医大学动物研究所提供; 感受态菌由第四军医大学遗传与发育教研室制备; 脂质体lipofectamine™ 2000 (LF 2000)为Invitrogen公司产品; G 418, DMEM为Gibco公司产品; 5-FC, MTT为Sigma公司产品; RPMI 1640培养基, 胎牛血清, Access RT-PCR System为Promega公司产品; 总RNA提取试剂盒Trizol Reagent为Life Technologies Inc公司产品; RT-PCR引物由Biotech公司合成, CD基因(扩增产物1.5 kb)为: 正义链5' –ATA GAA TTC AGG CTA ACA ATG TCG AAT TAA CGC TT–3', 反义链5' –TAT GGA TCC TCA ACG TTT GTA ATC CAT GGC TT–3'. Tubulin(扩增产物410 bp): 5' –CTC ATC ACA GGC AAG GAA GAT–3', 5' –TTA AGG TAA GTG TAG GTT GCG–3'.

1.2 方法 质粒扩增、大肠癌细胞的转染见文献[17]. 分别收集加热前、加热3次24 h后的培养细胞 5×10^6 个, 采用Life Technologies Inc的总RNA提取试剂盒Trizol Reagent提取细胞总RNA, 见文献[17]. 用荧光成像系统扫描定量. 将转染G1CEACDNa之SW480细胞及未转基因之SW480细胞以 5×10^4 个/孔接种到96孔细胞培养板中, 接种同时加入含各种梯度浓度的前药5-FC, 每种浓度设3个复孔, 同时设置对照孔及调零孔. 在37℃, 50 mL/L CO₂ 孵箱中培养, 每天换液1次, 热疗组分别于加入5-FC的同时及第24, 48 h在43℃下热疗30 min, 对照组不热疗, 第8 d去除培养液, 以MTT法测定活细胞比率并计算杀伤率. 将 1×10^6 个转染G1CEACDNa之SW480细胞分别接种到7 cm的细胞培养皿中, 接种同时加入2 mmol/L 5-FC, 热疗组处理后, 每天换液1次, 培养72 h后分别收集培养上清备用. 24孔培养板中每孔接种 5×10^4 个未转基因SW480细胞, 每组各8孔, 实验组1用热疗组培养上清培养,

实验组2用非热疗组培养上清培养, 对照组常规培养, 每2 d换液1次, 第4, 8 d各取4孔细胞行MTT比色实验. 取200 mL玻璃培养瓶接种处于对数生长期的细胞, 以含2.0 mmol/L 5-FC的RPMI 1640完全培养基培养, 在37℃, 50 mL/L CO₂ 孵箱中培养, 热疗方法同上, 对照组不热疗, 每天换液1次, 第4 d去除培养液, 铀–铅双染色, 用JEM-2000EX型透射电镜观察细胞超微结构. 取对数生长期的细胞接种于玻璃培养瓶(12瓶), 以含2.0 mmol/L 5-FC的RPMI 1640完全培养基在37℃, 50 mL/L CO₂ 孵箱中培养, 热疗组(6瓶)处理方法同上, 非热疗组(6瓶)不热疗, 对照组(6瓶, 培养液不含5-FC)常规培养, 每天换液1次, 第4 d去除培养液, 处理后用Profile II型流式细胞仪在488 nm激发波长下测定细胞DNA含量, 并用Multicycle软件进行分析. PI和annexin V–FITC染色FCM检测方法: 各组细胞处理后, 取 1×10^6 细胞离心去上清后, 重新悬浮于1 mL的annexin V–FITC染色液, 室温下染色5 min; 在细胞悬液中加入10 μL的PI保存液, 室温下染色5 min后上机检测.

统计学处理 数据用均值±标准差(mean ± SD)表示, 在SPSS软件中输入药敏实验中各浓度前药下每组细胞生存率, 作线图并计算IC₅₀, 采用未配对计量资料的t检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 有显著性差异.

2 结果

2.1 目的基因在靶细胞中稳定表达 提取细胞总RNA后, 转G1CEACDNa之SW480细胞RT-PCR产物电泳可见1.5 kb片段(图1). 扫描定量灰度值分别为1.38和1.35.

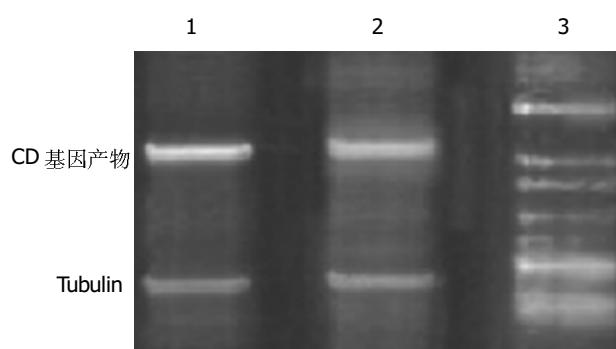


图1 RT-PCR检测CD基因在SW480细胞的表达. 1: 加热前; 2: 加热3次后24 h; 3: λ DNA Hind III Marker.

2.2 热疗加前药5-FC对转基因大肠癌细胞SW480的杀伤作用 热疗本身对SW480细胞有一定的杀伤作用($P < 0.05$, $t = 2.999$, $n = 9$), 转CD基因后, SW480细胞对5-FC的敏感性明显提高($P < 0.01$, $t = 5.620$, $n = 9$), 热疗与前药5-FC合用, 对SW480–CEACD的杀伤作用显著大于对未转基因细胞的杀伤作用($P < 0.01$, $t = 4.356$, $n = 9$), 亦大于单独应用5-FC时对SW480–CEACD细胞的杀伤作用($P < 0.05$, $t = 2.376$, $n = 9$)热疗提高了5-FC对转基因

因大肠癌细胞SW480对前期药5-FC的敏感性, 其IC₅₀分别为1.2 mmol/L和0.1 mmol/L(图2).

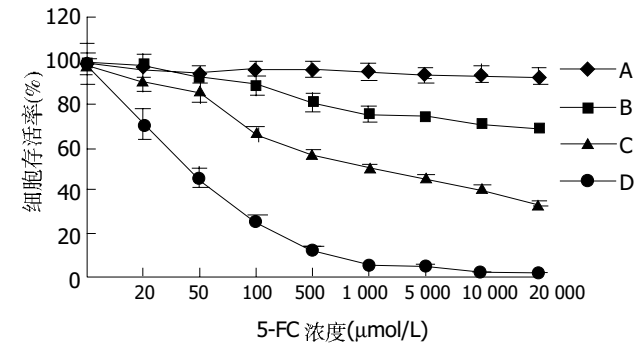


图2 前药5-FC加热疗对转CD基因SW480细胞的杀伤作用. A: 未转基因SW480细胞单独应用5-FC治疗; B: 未转基因SW480细胞联合应用5-FC及热疗; C: 转基因SW480细胞单独应用5-FC治疗; D: 转基因SW480细胞联合应用5-FC及热疗.

2.3 上清移换实验 实验组较对照组吸光度A值明显减低, 有统计学意义($P_{G1d4} < 0.05$, $t_{G1d4} = 2.867$, $n = 4$; $P_{G1d8} < 0.05$, $t_{G1d8} = 2.751$, $n = 4$; $P_{G2d4} < 0.01$, $t_{G2d4} = 6.305$, $n = 4$; $P_{G2d8} < 0.01$, $t_{G2d8} = 6.257$, $n = 4$), 但实验组1与实验组2吸光度A值无明显差异(表1).

2.4 电镜观察 热疗组及非热疗组均可见明显的凋亡表现: 表现为细胞核皱缩, 染色质聚集在核膜下以及凋亡小体形成(图3).

2.5 流式细胞仪检测 热疗组与对照组相比, PI和annexin V-FITC染色FCM检测显示凋亡细胞比例(4区)明显增多(图4), DNA含量分析则显示热疗组有明显的G1期

阻滞($P_{a1} < 0.01$, $t_{a1} = 4.619$, $n = 6$; $P_b < 0.05$, $t_b = 2.382$, $n = 6$; $P_{a2} < 0.01$, $t_{a2} = 3.381$, $n = 6$), 并在细胞周期前出现明显的凋亡峰(表2).

表1 上清移换实验结果(mean \pm SD, A, $n = 4$)

t/d	实验组1	实验组2	对照组
4	0.537 \pm 0.240 ^a	0.586 \pm 0.135 ^a	0.937 \pm 0.232
8	0.418 \pm 0.114 ^b	0.430 \pm 0.103 ^b	1.737 \pm 0.451

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

表2 前药热疗对SW480细胞周期的影响(mean \pm SD, %, $n = 6$)

分组	G1	S	G2
热疗组	69.5 \pm 13.4 ^{b,c}	27.4 \pm 6.5	6.7 \pm 1.1
非热疗组	58.6 \pm 9.8 ^{c2}	29.3 \pm 10.2	12.1 \pm 3.0
对照组	41.2 \pm 12.3	43.3 \pm 8.5	15.5 \pm 3.1

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 非热疗组.

3 讨论

胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)基因是来源于某些细菌和真菌的一种自杀基因, 其编码的CD酶能将对真核细胞相对无毒的5-氟胞嘧啶(5-FC)转换成细胞毒性化疗药5-氟尿嘧啶(5-FU), 抑制细胞RNA和DNA的合成而致细胞死亡^[16]. 5-FU作为结肠癌的一线化疗药物, 对机体正常组织的毒副作用限制了其在结肠癌化疗的临床应用^[17-19], 靶向基因治疗可将治疗基因在肿

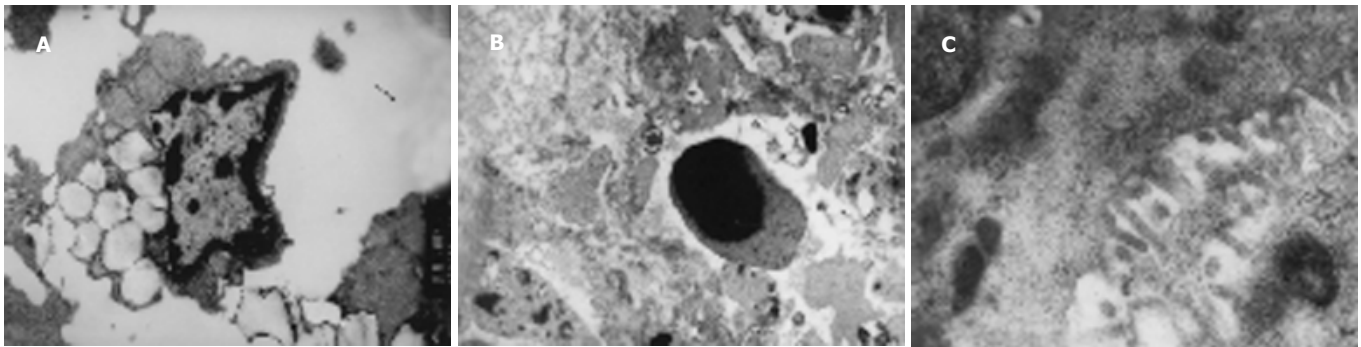


图3 热疗组与非热疗组细胞超微结构图TEM $\times 6\,000$. A: 非热疗组; B: 热疗组; C: 对照组.

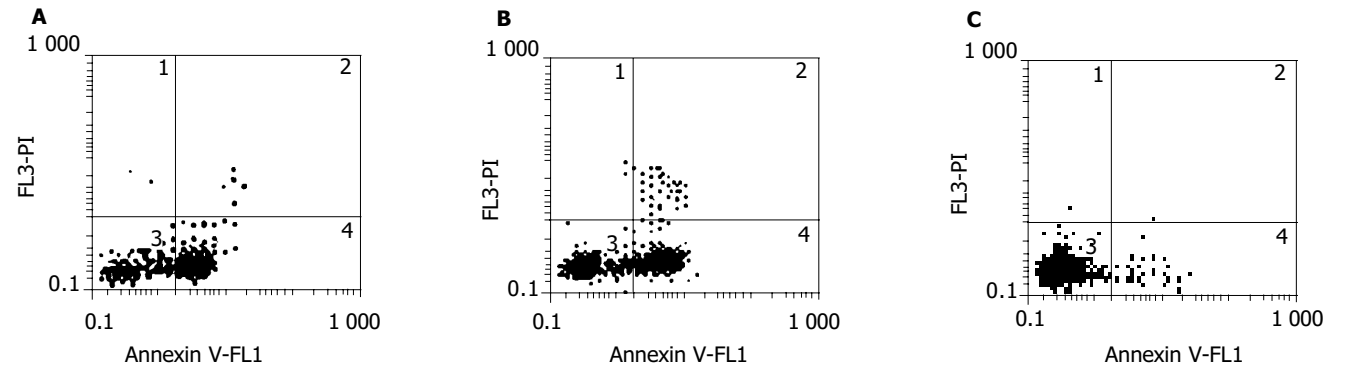


图4 PI-annexin V-FITC染色FCM分析图. A: 非热疗组; B: 热疗组; C: 对照组.

瘤组织中特异地表达,使正常组织免受损害.CEA基因属于组织特异性表达基因,利用CEA基因的转录调控序列来调控CD基因的表达,可特异性杀死CEA阳性分泌的大肠癌细胞^[20],对结肠癌肝转移也有特异性治疗作用及旁杀伤效应^[21-23].临床资料显示,在大肠癌患者中,近2/3血清CEA正常^[24],Dukes A期患者血清CEA水平仅 $5.3 \pm 1.8 \mu\text{g/L}$ ^[25],表明临床有相当一部分大肠癌患者其CEA表达水平较低.我们所用的SW480是低表达CEA的人大肠癌细胞株,CEA分泌水平为3.1 fg/cell.

热疗对肿瘤的治疗作用已研究多年,临床实验表明,术中或术后行局部热化疗,可明显提高患者的生活质量和生存期^[26],对结肠癌肝转移,热疗安全有效,与放疗或化疗联合应用,可使不能手术者获得手术机会^[27-30],热疗对肿瘤的治疗作用机制有:(1)乏氧的肿瘤细胞比正常的组织细胞对热更敏感,热疗可在不引起正常组织细胞功能损害时就导致肿瘤细胞蛋白质和DNA热变性;(2)热疗可使肿瘤细胞超微结构破坏;(3)加热促进了肿瘤细胞对化疗药物的吸收作用,使细胞内药物浓度增大,从而提高化疗药的细胞毒性;(4)加热启动了细胞凋亡机制,促进细胞凋亡^[31-37];(5)在转CD基因肿瘤细胞中,加热可提高目的基因在靶细胞的表达^[38].

我们用前药5-FC对转染G1CEACDNa的SW480细胞进行热化疗实验研究,结果显示,转G1CEACDNa基因SW480细胞在43℃作用30 min共3次条件下,CD基因能稳定表达,用前药5-FC热化疗增加了SW480-CEACD细胞对5-FC的敏感性,使其IC₅₀提高了12倍,我们对其作用机制进行了初步探讨,RT-PCR结果及上清移换实验提示,热疗本身并不增加目的基因的表达,亦不增加含5-FC代谢产物的细胞培养上清的细胞毒性,电镜观察显示,热化疗组细胞死亡机制与单独应用前药的细胞死亡机制相似,均以细胞凋亡为主,流式细胞检测实验提示,用前药5-FC热化疗可导致细胞G1期阻滞,明显增加细胞的凋亡比例,从而增加前药5-FC的杀肿瘤细胞作用.本实验表明,热疗与前药5-FC共同应用,提高了转基因SW480细胞对5-FC的敏感性,从而提高CEA组织特异性CD/5-FC系统对肿瘤细胞的靶向性杀伤作用.由于热疗副作用小,可以反复进行,并能明显增加化疗的效果,减少化疗药物的用量,从而降低化疗药物的细胞毒性,这将为低表达CEA大肠癌基因治疗,特别是结肠癌肝转移的治疗提供一新途径.

4 参考文献

- Vogelsang H, Haas S, Hierholzer C, Berger U, Siewert JR, Prauer H. Factors influencing survival after resection of pulmonary metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* 2004; 91:1066-1071
- Metcalfe MS, Mullin EJ, Maddern GJ. Choice of surveillance after hepatectomy for colorectal metastases. *Arch Surg* 2004; 139:749-754
- Barber FD, Mavligit G, Kurzrock R. Hepatic arterial infusion chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a concise

- overview. *Cancer Treat Rev* 2004;30:425-436
- Valencia J, Esco R, Polo S, Bascon N, Escudero P, Alonso V. Postoperative radiochemotherapy in rectal cancer: comparison of two combination schemes: alternating versus concomitant. *Tumori* 2004;90:216-224
- Scandolaro L, Cazzaniga LF, Bianchi E, Cagna E, Prina M, Valli MC, Barsacchi L, Frigerio M. Postoperative adjuvant radio(chemo)therapy for rectal cancer: an appraisal. *Tumori* 2004;90:208-215
- Wang HZ, Huang XF, Wang Y, Ji JF, Gu J. Clinical features, diagnosis, treatment and prognosis of multiple primary colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:2136-2139
- Pasetto LM, Rossi E, Paris MK, Lonardi S, Monfardini S. Common management of primary rectal carcinoma in patients with stage IV disease at the diagnosis. *Anticancer Res* 2003; 23:4999-5004
- Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004;239:818-825
- Greco O, Dachs GU. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives. *J Cell Physiol* 2001;187:22-36
- Sandalon Z, Fusenig NE, McCutcheon J, Taichman LB, Garlick JA. Suicide gene therapy for premalignant disease: a new strategy for the treatment of intraepithelial neoplasia. *Gene Ther* 2001;8:232-238
- Dilber MS, Gahrton G. Suicide gene therapy: possible applications in haematopoietic disorders. *J Intern Med* 2001;249: 359-367
- Beltinger C, Uckert W, Debatin KM. Suicide gene therapy for pediatric tumors. *J Mol Med* 2001;78:598-612
- Harvey BG, Maroni J, O'Donoghue KA, Chu KW, Muscat JC, Pippo AL, Wright CE, Hollmann C, Wisnivesky JP, Kessler PD, Rasmussen HS, Rosengart TK, Crystal RG. Safety of local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of morbid conditions. *Hum Gene Ther* 2002;13:15-63
- Crystal RG, Harvey BG, Wisnivesky JP, O'Donoghue KA, Chu KW, Maroni J, Muscat JC, Pippo AL, Wright CE, Kaner RJ, Leopold PL, Kessler PD, Rasmussen HS, Rosengart TK, Hollmann C. Analysis of risk factors for local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of comorbid conditions. *Hum Gene Ther* 2002;13:65-100
- 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
- Nakamura H, Mullen JT, Chandrasekhar S, Pawlik TM, Yoon SS, Tanabe KK. Multimodality therapy with a replication-conditional herpes simplex virus 1 mutant that expresses yeast cytosine deaminase for intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil. *Cancer Res* 2001;61:5447-5452
- Gennatas C, Mouratidou D, Androulakis G, Georgoulis V, Tsavaris N, Philippakis M, Michailakis E, Kalofonos C, Mpesmpeas S, Katsos J, Tsitoura M, Retalis G, Mallas E, Voros D, Andreadis C, Hatzistylanos G, Pisiotis C, Kamilaris D, Kakoliris S, Kompourzos V, Kannas D, Legakis N, Mpatakis T, Ntamtisios J, Papaevangelou E, Peros G, Photopoulos A, Pouli A, Prigouris S, Samanidis L, Sakellariou V, Smyrniotis V, Polymeneas G, Vasilou J, Athanasiou A, Papadimitriou J. Adjuvant systemic therapy protocol for Dukes' B2 and C resectable colon carcinoma. *Tumori* 2002;88:32-36
- Ravaioli A, Marangolo M, Pasquini E, Rossi A, Amadori D, Cruciani G, Tassinari D, Oliverio G, Giovanis P, Turci D, Zumaglini F, Nicolini M, Panzini I. Bolus fluorouracil and leucovorin with oxaliplatin as first-line treatment in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:2545-2550
- Baars A, Claessen AM, Wagstaff J, Giaccone G, Scheper RJ, Meijer S, Schakel MJ, Gall HE, Meijer CJ, Vermorken JB, Pinedo HM, van den Eertwegh AJ. A phase II study of active specific immunotherapy and 5-FU/Leucovorin as adjuvant therapy for stage III colon carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86:1230-1234

- 20 Shen LZ, Wu WX, Xu DH, Zheng ZC, Liu XY, Ding Q, Hua YB, Yao K. Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene. *World J Gastroenterol* 2002;8:270-275
- 21 Humphreys MJ, Ghaneh P, Greenhalf W, Campbell F, Clayton TM, Everett P, Huber BE, Richards CA, Ford MJ, Neoptolemos JP. Hepatic intra-arterial delivery of a retroviral vector expressing the cytosine deaminase gene, controlled by the CEA promoter and intraperitoneal treatment with 5-fluorocytosine suppresses growth of colorectal liver metastases. *Gene Ther* 2001;8:1241-1247
- 22 Nyati MK, Symon Z, Kievit E, Dornfeld KJ, Rynkiewicz SD, Ross BD, Rehemtulla A, Lawrence TS. The potential of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase enzyme prodrug gene therapy in an intrahepatic colon cancer model. *Gene Ther* 2002; 9:844-849
- 23 Baque P, Pierrefite-Carle V, Gavelli A, Brossette N, Benchimol D, Bourgeon A, Staccini P, Saint-Paul MC, Rossi B. Naked DNA injection for liver metastases treatment in rats. *Hepatology* 2002;35:1144-1152
- 24 Perez CA, Ravindranath MH, Gupta RK, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Wood TF, Soh D, Morton DL, Bilchik AJ. Serum total gangliosides and TA90-IC levels: novel immunologic markers in colorectal cancer. *Cancer J* 2002;8:55-61
- 25 Wichmann MW, Muller C, Hornung HM, Lau-Werner U, Schildberg FW. Results of long-term follow-up after curative resection of Dukes A colorectal cancer. *World J Surg* 2002;26:732-736
- 26 Bartlett DL, Libutti SK, Figg WD, Fraker DL, Alexander HR. Isolated hepatic perfusion for unresectable hepatic metastases from colorectal cancer. *Surgery* 2001;129:176-187
- 27 Wendtner CM, Abdel-Rahman S, Krych M, Baumert J, Lindner LH, Baur A, Hiddemann W, Issels RD. Response to neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia predicts long-term survival for adult patients with retroperitoneal and visceral high-risk soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 2002;20:3156-3164
- 28 Wendtner C, Abdel-Rahman S, Baumert J, Falk MH, Krych M, Santl M, Hiddemann W, Issels RD. Treatment of primary, recurrent or inadequately resected high-risk soft-tissue sarcomas (STS) of adults: results of a phase II pilot study (RHT-95) of neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia. *Eur J Cancer* 2001;37:1609-1616
- 29 Witkamp AJ, de Bree E, Kaag MM, Boot H, Beijnen JH, van Slooten GW, van Coevorden F, Zoetmulder FA. Extensive cytoreductive surgery followed by intra-operative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with mitomycin-C in patients with peritoneal Eur carcinomatosis of colorectal origin. *J Cancer* 2001;37:979-984
- 30 McQuellon RP, Loggie BW, Fleming RA, Russell GB, Lehman AB, Rambo TD. Quality of life after intraperitoneal hyperthermic chemotherapy (IPHC) for peritoneal carcinomatosis. *Eur J Surg Oncol* 2001;27:65-73
- 31 Nakahata K, Miyakoda M, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. Heat shock induces centrosomal dysfunction, and causes non-apoptotic mitotic catastrophe in human tumour cells. *Int J Hyperthermia* 2002;18:332-343
- 32 Urano M, Ling CC. Thermal enhancement of melphalan and oxaliplatin cytotoxicity in vitro. *Int J Hyperthermia* 2002;18:307-315
- 33 Elias D, Bonnay M, Puizillou JM, Antoun S, Demirdjian S, El OA, Pignon JP, Drouard-Troalen L, Ouellet JF, Ducreux M. Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis: pharmacokinetics and tissue distribution. *Ann Oncol* 2002;13:267-272
- 34 Ehlers EM, Kuhnel W, Wiedemann GJ. Hyperthermia and mafosfamide in a human-derived malignant pleural mesothelioma cell line. *Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:65-72
- 35 Asaumi J, Higuchi Y, Matsuzaki H, Murakami J, Kawasaki S, Kuroda M, Shibuya K, Konouchi H, Hisatomi M, Wakasa T, Kishi K, Hiraki Y. Thermochemotherapy of a human salivary adenocarcinoma cell line. *Oncol Rep* 2002;9:365-369
- 36 Abe T, Sakaguchi Y, Ohno S, Ikeda Y, Kitamura K, Maehara Y, Sugimachi K. Apoptosis and p53 overexpression in human rectal cancer; relationship with response to hyperthermochemo-radiotherapy. *Anticancer Res* 2001;21:2115-2120
- 37 Pestieau SR, Belliveau JF, Griffin H, Stuart OA, Sugarbaker PH. Pharmacokinetics of intraperitoneal oxaliplatin: experimental studies. *J Surg Oncol* 2001;76:106-114
- 38 Lee YJ, Lee H, Borrelli MJ. Gene transfer into human prostate adenocarcinoma cells with an adenoviral vector: Hyperthermia enhances a double suicide gene expression, cytotoxicity and radiotoxicity. *Cancer Gene Ther* 2002;9:267-274

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。

结肠癌患者癌组织中 CD44v6 和Ⅳ型胶原的表达及血清中 HA 和Ⅳ型胶原的定量检测

徐 钊, 张 霞, 房殿春, 晋华源, 罗元辉, 阎晓初, 王东旭

徐钊, 张霞, 房殿春, 晋华源, 罗元辉, 阎晓初, 王东旭, 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
项目负责人: 徐钊, 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.
电话: 023-68754678 传真: 023-68754124
收稿日期: 2004-06-21 接受日期: 2004-10-07

Expression of CD44v6 and type IV collagen in tissues, concentrations of serum hyaluronic acid and type IV collagen in patients with colorectal carcinoma

Zhao Xu, Xia Zhang, Dian-Chun Fang, Hua-Yuan Jin, Yuan-Hui Luo, Xiao-Chu Yian, Dong-Xu Wang

Zhao Xu, Xia Zhang, Dian-Chun Fang, Hua-Yuan Jin, Yuan-Hui Luo, Xiao-Chu Yian, Dong-Xu Wang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Correspondence to: Dr. Zhao Xu, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Received: 2004-06-21 Accepted: 2004-10-07

Abstract

AIM: To explore the role of CD44v6, type IV collagen expression in tissues and concentration of serum hyaluronic acid (HA) and type IV collagen in predication of prognosis of patients with colorectal carcinoma.

METHODS: Expression of CD44v6 and type IV collagen in the carcinoma tissues ($n=60$) and normal tissues ($n=10$) were detected by immunohistochemistry. Meanwhile, concentrations of HA and type IV collagen in serum were tested with radioimmunology.

RESULTS: Positive rate of CD44v6 in colorectal tissues was 75%, which was significantly higher than that in adjacent or normal tissues. Expression of CD44v6 in patients with lymph node metastasis was significantly higher than that without metastasis; expression of CD44v6 in Duke C or Duke D stage was significantly higher than that in Duke A or Duke B stage (62.5%, 66.7% vs 30.3%, 36.4% respectively, $P<0.01$). Expression of type IV collagen in poor or moderate differentiation tissues was significantly lower than that in well-differentiation ones (29.0%, 18.1% vs 61.1%; $P<0.01$). Expression of type IV collagen in Duke C, Duke D stage or in tissues with lymph node metastasis was significantly lower than that in Duke A, Duke B stage or that in tissues without lymph node metastasis (31.1%,

16.6%, 20.8% vs 70.0%; 54.5%, 58.3%, respectively; $P<0.01$). Concentrations of serum HA and type IV collagen in patients with colorectal cancer were significantly higher than those in normal group (200 ± 160 , 125 ± 42 $\mu\text{g/L}$ vs 61 ± 14 , 60 ± 15 $\mu\text{g/L}$, $P<0.01$) and they related to lymph node metastasis and Dukes staging. With the increased expression of CD44v6 and type IV collagen in tissues of patients with colorectal cancer, the concentration of serum HA increased, whereas the concentration of serum type IV collagen decreased.

CONCLUSION: Expression of CD44v6 and type IV collagen in tissues and concentrations of serum HA and type IV collagen are useful parameters in predication of prognosis of patients with colorectal carcinoma.

Xu Z, Zhang X, Fang DC, Jin HY, Luo YH, Yian XC, Wang DX. Expression of CD44v6 and type IV collagen in tissues, concentrations of serum hyaluronic acid and type IV collagen in patients with colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2312-2315

摘要

目的: 探讨结肠癌组织中CD44v6和Ⅳ型胶原的表达以及血清中透明质酸(HA)和Ⅳ型胶原的浓度在结肠癌预后判断中的作用。

方法: 采用免疫组织化学技术, 检测60例结肠癌组织以及10名正常组织中CD44v6和Ⅳ型胶原的表达, 同时采用放射免疫技术检测上述60例结肠癌及10名正常人血清中透明质酸(HA)和Ⅳ型胶原的含量。

结果: 结肠癌组织中CD44v6阳性率为75%, 明显高于癌旁对照及正常结肠组织, 有淋巴结转移组的结肠癌组织中CD44v6的表达明显高于无转移组(70.9% vs 33.3%, $P<0.01$), Duke A和Duke B期明显低于Duke C和Duke D期(30.3%, 36.4% vs 62.5%, 66.7%, $P<0.01$); 而Ⅳ型胶原在结肠癌组织中均有不同程度的减少, 其中高分化组结肠癌组织中明显高于中、低分化组(61.1% vs 29.0%, 18.1%, $P<0.01$), 有淋巴结转移组明显低于无淋巴结转移组(20.8% vs 58.3%, $P<0.01$), Dukes A和Duke B期明显高Duke C和Duke D期(70.0%, 54.5% vs 31.3%, 16.6%, $P<0.01$), 结肠癌患者血清中HA和Ⅳ型胶原含量明显高于正常对照组(200 ± 160 $\mu\text{g/L}$, 125 ± 42 $\mu\text{g/L}$ vs 61 ± 14 $\mu\text{g/L}$, 60 ± 15 $\mu\text{g/L}$, $P<0.01$), 且与有无淋巴结转移和Dukes分期相关, 随着组织中CD44v6和Ⅳ型胶原表

达逐渐增加, 血清中 HA 亦逐渐增加, 而 IV 型胶原则逐渐减少。

结论: 组织中 CD44v6 和 IV 型胶原的表达及血清中 HA 和 IV 型胶原的含量对判断结肠癌患者的预后具有重要意义。

徐钊, 张霞, 房殿春, 晋华源, 罗元辉, 阎晓初, 王东旭. 结肠癌患者癌组织中 CD44v6 和 IV 型胶原的表达及血清中 HA 和 IV 型胶原的定量检测. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2312-2315

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2312.asp>

0 引言

浸润和转移是恶性肿瘤患者死亡的主要原因之一, 他是一个复杂多步骤的主动过程, 包括肿瘤细胞脱离原发灶、局部浸润、进入宿主血液循环、出血管进入靶器官间质、在靶器官内增生等步骤. 其本质是肿瘤细胞与宿主细胞、肿瘤细胞与细胞外基质之间相互作用的过程. 基底膜成分的破坏及肿瘤细胞表面黏附分子表达异常是肿瘤浸润转移的两个重要环节. 我们采用免疫组织化学技术检测 60 例结肠癌患者 IV 型胶原及 CD44v6 的表达, 同时检测患者血清中 HA 和 IV 型胶原含量, 以探讨其对结肠癌浸润转移及预后判断的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠癌 60 例选自本院 1997-04/1998-01 行根治术的患者. 病例纳入标准: 均经手术病理证实, 无肝肾功能异常, 无内分泌疾病及其他部位恶性肿瘤, 无放化疗病史者. 其中男性 37 例, 女性 23 例, 年龄 22-76 岁 (平均 56.9 岁). 取少许手术切除的肿瘤组织常规 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 片厚 5 μ m. 其中 A 期 10 例, B 期 22 例, C 期 16 例, D 期 12 例; 有淋巴结转移 24 例, 无淋巴结转移 36 例. 另外 10 名正常大肠组织同时进行免疫组化染色。

1.2 方法 采用免疫组化 ABC 法. CD44V6 及 IV 型胶原单克隆抗体及 ABC 试剂盒购自中山生物技术公司, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 抗原经胰酶和/或微波修复后, 室温下操作: 切片脱蜡至水; 3 mL/L 过氧化氢阻断 10 min; 非免疫血清封闭 10 min; 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 二抗孵育 37 $^{\circ}$ C 30 min; 三抗 37 $^{\circ}$ C 30 min; DAB 显色, 镜下观察, 显出黄色颗粒后终止反应; 苏木素复染, 中性树胶封片. CD44v6 结果判定, 根据染色的程度和范围分为 4 级: 强阳性(+++): 阳性细胞占整个切片的 70% 以上; 阳性(++): 阳性细胞占整个切片的 30-70%; 弱阳性(+): 阳性细胞占整个切片的 10-30%; 阴性(-): 阳性细胞占整个切片的 10% 以下. IV 型胶原结果判定, 根据癌性腺体或癌巢周围基底膜完整程度分为 4 级: 完全缺如(-); 碎片状(+); 间断性(++); 变薄的连续状(+++). 于手术前清晨空腹抽取静脉血, 室温放置 2 h 后离心分离血清, -20 $^{\circ}$ C 保存备用. HA 及 IV 型胶原放免试剂盒购自上海海军医学研究所生物技术中心, 检测严格按试剂盒说明书进

行. 同批检测 10 名正常献血员血清中 HA 及 IV 型胶原的含量作为正常对照。

统计学处理 采用 χ^2 检测处理相关数据, $P < 0.05$ 为相差显著, $P < 0.01$ 为相差非常显著。

2 结果

2.1 大肠癌组织, CD44v6 表达阳性者 45/60 例, 占 75%, 而癌旁大肠黏膜及正常大肠组织未见有 CD44v6 表达(0/70), 两组相差非常显著($P < 0.01$, 图 1). CD44v6 的表达与淋巴结转移及 Dukes 分期明显相关, 有淋巴结转移组 CD44v6 的表达明显高于无淋巴结转移组($P < 0.01$); Dukes C、D 期 CD44v6 的表达明显高于 Dukes A、B 期($P < 0.01$, 表 1). 而 CD44v6 的表达与患者年龄、性别、分化程度和组织学类型无明显相关性($P > 0.05$). 正常结肠组织及癌旁组织 IV 型胶原表达是连续完整的, 呈现为清晰的棕黄色连续细线状分布或完整环绕腺体(图 2-3). 60 例结肠癌组织中 IV 型胶原的分布有不同程度减少, 其中 7 例为变薄的连续状(+++), 19 例为间断状(++), 21 例为碎片状(+), 13 例完全缺如(-).

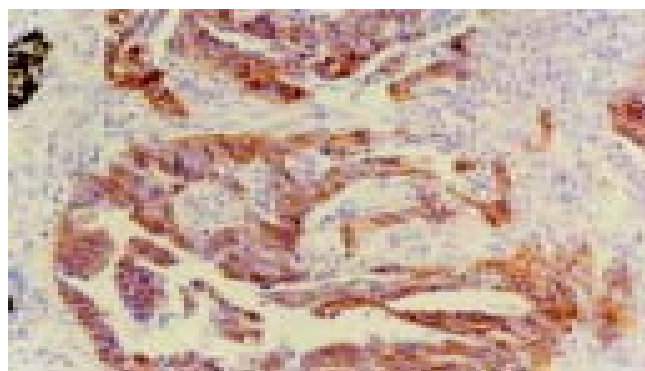


图 1 中分化结肠癌 CD44v6 强阳性表达, 细胞膜呈明显的棕黄色 ABC 法 $\times 200$.

表 1 大肠癌 CD44v6 表达与淋巴结转移及 Dukes 分期的关系

病理指标	n	CD44v6 的表达	
		-/+ (%)	++/+++ (%)
淋巴结转移 有	24	7 (29.1)	17 (70.9) ^b
无	36	24 (66.7)	12 (33.3)
Dukes 分期 A	10	7 (70.0)	3 (30.0)
B	22	14 (63.6)	8 (36.4)
C	16	6 (37.5)	10 (62.5) ^d
D	12	4 (33.3)	8 (66.7) ^d

^b $P < 0.01$ vs 无淋巴结转移; ^d $P < 0.01$ vs Dukes A, B.

低分化、有淋巴结转移及 Dukes C 和 D 期组 IV 型胶原表达以完全缺如及碎片状(-/+)为主, 明显高于高分化、无淋巴结转移及 Dukes A 和 B 期组($P < 0.01$, 表 2), IV 型胶原表达与肿瘤组织学类型无关($P > 0.05$).

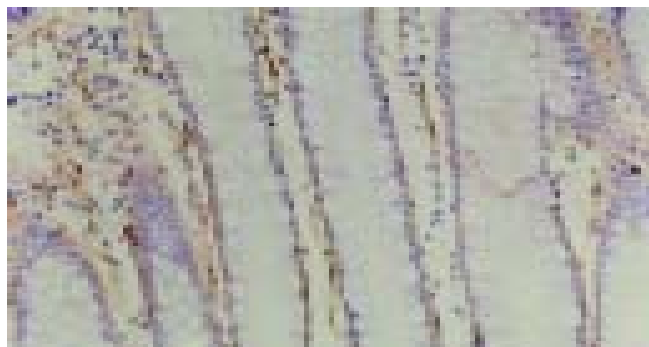


图2 正常结肠黏膜基底膜IV型胶原呈连续线条状ABC法×200.

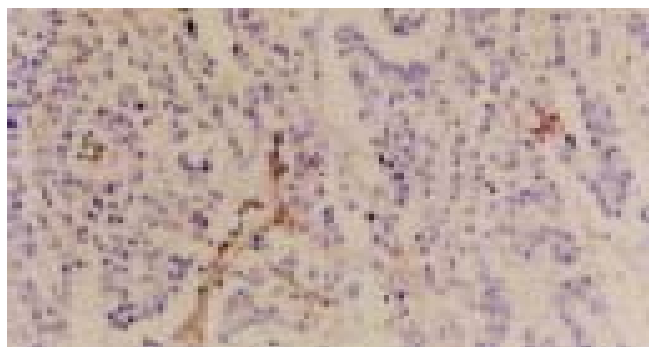


图3 结肠癌基底膜IV型胶原呈表达阳性, 呈碎片状ABC法×200.

表2 IV型胶原表达与临床病理指标的关系

病理指标	n	IV型胶原的表达	
		-/+ (%)	++/+++ (%)
分化程度	高	18	7 (38.8)
	中	31	22 (70.9)
	低	11	9 (81.8)
淋巴结转移	有	24	19 (79.1)
	无	36	15 (41.6)
Dukes 分期	A	10	3 (30.0)
	B	22	10 (45.5)
	C	16	11 (68.8)
	D	12	10 (83.3)

^b $P<0.01$ vs 高分化组; ^d $P<0.01$ vs 有淋巴结转移组; ^f $P<0.01$ vs Dukes C, D 组.

2.2 血清中HA、IV型胶原含量正常人分别为 $62 \pm 14 \mu\text{g/L}$, $60 \pm 15 \mu\text{g/L}$, 结肠癌患者血清中HA、IV型胶原含量分别为 $203 \pm 160 \mu\text{g/L}$, $125 \pm 42 \mu\text{g/L}$, 二者相差非常显著($P<0.01$). 进一步分析表明, 肿瘤患者血清中HA和IV型胶原含量与肿瘤大小、分化程度无明显相关性, 而与有淋巴结转移明显相关, 且HA含量与Dukes分期亦明显相关($P<0.01$), IV型胶原含量Dukes C、D期略高于A、B期, 但无统计学意义($P>0.05$, 表3). 本组60例大肠癌随着组织中CD44v6表达增高, 血清中HA的含量亦呈上升趋势, CD44v6强阳性表达的患者, 血清中HA含量明显高于CD44v6阴性的患者

($P<0.01$, 表4). IV型胶原的表达愈少, 血清中IV型胶原含量愈高(表5).

表3 大肠癌患者血清HA与临床病理指标的关系

病理指标	n	HA(mean \pm SD)($\mu\text{g/L}$)	IV型胶原(mean \pm SD)($\mu\text{g/L}$)
大小(cm) ≥ 5	24	247.5 ± 22.6	120.5 ± 52.2
	<5	169.4 ± 153.2	127.8 ± 42.3
分化程度	高分化	152.7 ± 116.2	115.9 ± 44.0
	中分化	216.3 ± 214.7	126.0 ± 42.8
	低分化	246.1 ± 214.6	135.1 ± 61.0
淋巴结转移	有	122.4 ± 127.7^b	109.0 ± 35.8^b
	无	323.0 ± 209.9	148.1 ± 51.6
Dukes 分期	A	92.6 ± 24.2	97.0 ± 25.2
	B	131.8 ± 157.1	115.5 ± 41.2
	C	265.6 ± 175.4^d	139.1 ± 40.4
	D	340.5 ± 240.6^d	145.2 ± 63.3

^b $P<0.01$ vs 无淋巴结转移; ^d $P<0.01$ vs Dukes A, B 期.

表4 大肠癌患者组织中CD44v6含量与血清中HA含量的关系(mean \pm SD, $\mu\text{g/L}$)

组织CD44v6	n	血清HA含量
+++	13	324 ± 229^b
++	16	203 ± 199
+	16	186 ± 196
-	15	117 ± 49

^b $P<0.01$ vs +, - 组.

表5 大肠癌患者组织中IV型胶原表达与血清含量的关系(mean \pm SD, $\mu\text{g/L}$)

组织IV型胶原	n	血清IV型胶原含量
+++	7	100 ± 36^b
++	19	104 ± 33^a
+	21	129 ± 45
-	13	152 ± 43

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs - 组.

3 讨论

IV型胶原是正常基底膜的主要组成成分之一, 其分布变化与各种癌肿转移潜能密切相关^[1-2]. Havenith *et al*^[3]报道IV型胶原在结肠癌中的表达与Dukes分期呈负相关, 有转移的结肠癌组织中IV胶原的表达亦明显减少. Offerhaus *et al*^[4]报道临床分期越晚的结肠癌患者其癌组织中IV型胶原的含量亦越少, 组织中IV型胶原的分布与其预后指标一致. 我们采用免疫组化法检测了10例正常结肠及60例结肠癌组织中IV型胶原的表达, 结果表明, 正常结肠组织中IV型胶原呈连续完整性, 而癌组

组织中 IV 型胶原分布有不同程度的减少, 进一步研究表明癌组织低分化、有淋巴结转移、Dukes C、D 期结肠癌患者, IV 型胶原表达以完全缺如及碎片状为主, 而高分化、无淋巴结转移、Dukes A、B 期结肠癌患者, IV 型胶原表达以间断性或连续变薄为主. 与组织中 IV 型胶原变化相一致, 结肠癌患者血清中 IV 型胶原的含量明显增高, 有淋巴结转移的肿瘤患者血清中 IV 型胶原含量明显高于无转移患者, 进一步研究发现, 随着肿瘤组织中 IV 型胶原表达逐渐减少, 血清中 IV 型胶原含量明显增加, 提示组织中 IV 型胶原表达的增加与血清中 IV 型胶原含量的减少可作为评价结肠癌患者预后良好指标.

CD44 是一种跨膜糖蛋白, 属细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAM)家族. 作为细胞黏附分子的一种, 参与了细胞与细胞之间、细胞与基质之间的特异性黏附, 人类 CD44 基因定位于 11 号染色体短臂上, CD44 基因的外显子按剪接方式的不同分为标准(CD44s)及变异型(CD44v), 而变异型按外显子拼接类型不同又分为许多亚型^[5]. 近年来的研究表明, CD44v 与许多肿瘤的生长、浸润、转移及预后密切相关^[6-13]. CD44v6 是 CD44 的一个拼接变异体(splice variants), 主要出现在机体的病理过程, 特别是肿瘤的发生发展过程中, CD44v6 的过量表达与结肠癌、胃癌、食管癌及恶性黑色素瘤等许多肿瘤的生长、浸润、转移及预后密切相关, 下调 CD44v6 的表达可以明显抑制结肠癌细胞的肝转移能力^[10]. 谷化平 *et al*^[14] 检测了 90 例大肠癌, 发现 CD44v6 的 mRNA 阳性表达分别为 62 例(68.9%), CD44v6 的 mRNA 高表达与大肠癌 Duke's 分期、浆膜浸润、淋巴结转移、肝脏转移均呈正相关. 陈冰 *et al*^[15] 采用免疫组织化学法检测 87 例结直肠癌中的 CD44v6 表达. 发现结直肠癌组织中 CD44v6 的阳性表达率为 58.6%, 结直肠癌中 CD44v6 的表达与肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移和 Dukes 分期密切相关($P < 0.05$), 认为检测结直肠癌组织中 CD44v6 的表达可反映肿瘤的生物行为. 我们采用免疫组化方法, 发现 CD44v6 与结肠癌淋巴结转移密切相关, 有淋巴结转移者 CD44v6 表达明显强于无淋巴结转移者, 并且发现 CD44v6 表达与结肠癌的 Dukes 分期明显相关, Dukes C、D 期 CD44v6 表达明显强于 Dukes A 期和 B 期, 与国外报道基本一致. 我们未发现 CD44v6 的表达与肿瘤分化、类型及大小相关.

透明质酸(HA)作为 CD44 的配体, 在肿瘤转移中亦具有重要的作用^[16]. 国内许洪卫 *et al*^[17] 的研究表明在结直肠癌患者中, Dukes C 期和 / 或有淋巴结转移的患者, 其血清 HA 水平与患者的 Dukes 分期及有无淋巴结转移密切相关. 进一步研究发现随着 CD44v6 表达的明显增

加, 患者血清中 HA 的含量亦明显增加. 提示血清中 HA 的水平可以反应其组织中 CD44 受体的水平.

总之, 结肠癌组织中 CD44v6 和 IV 型胶原表达及血清中 HA 和 IV 型胶原的含量可作为评价结肠癌患者预后的良好指标.

4 参考文献

- Galbavy S, Lukac L, Porubsky J, Cerna M, Labuda M, Kmet'ova J, Papincak J, Durdik S, Jakubovsky J. Collagen type IV in epithelial tumours of colon. *Acta Histochem* 2002;104:331-334
- Yantiss RK, Bosenberg MW, Antonioli DA, Odze RD. Utility of MMP-1, P53, E-cadherin, and collagen IV immunohistochemical stains in the differential diagnosis of adenomas with misplaced epithelium versus adenomas with invasive adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2002;26:206-215
- Havenith MG, Arends JW, Simon R, Volovices A, Wiggers T, Bosman FT. Type IV collagen immunoreactivity in clorectal cancer, prognostic value of basement membrane depositon. *Cancer* 1988;62:2207-2211
- Offerhaus GJ, Giardiello FM, Bruijn JA, Stijnen T, Molyvas EN, Fleuren GJ. The value of immunohistochemistry for collagen IV expression in colorectal carcinomas. *Cancer* 1991; 67:99-105
- 徐钊, 范维珂. CD44 与消化道肿瘤转移和预后评估的研究进展. 国外医学临床生物化学与检验学分册 1998;19:111-113
- Lewy-Trenda I, Omulecka A, Janczukowicz J, Papierz W. CD44 expression in human meningiomas: an immunohistochemical analysis. *Pol J Pathol* 2004;55:33-37
- Balaram P, Alex S, Panikkar B, Rajalekshmi TN. Adhesion-related proteins E-cadherin, P-cadherin, CD44, and CD44v6, and antimetastatic protein nm23H1 in complete hydatidiform moles in relation to invasion potential. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14:532-539
- 蔡崎, 陆洪芳, 孙孟红, 杜祥, 范月珍, 施达仁. 结直肠癌组织中 CD44v3, v6 蛋白的表达意义. 世界华消化杂志 2000;8:1255-1258
- 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
- Barshishat M, Levi I, Benharroch D, Schwartz B. Butyrate down-regulates CD44 transcription and liver colonisation in a highly metastatic human colon carcinoma cell line. *Br J Cancer* 2002;87:1314-1320
- Rall CJ, Rustgi AK. CD44 isoform expression in primary and metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995;55: 1831-1835
- Dong WG, Sun XM, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Role of VEGF and CD44v6 in differentiating benign from malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2003;9:2596-2600
- 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
- 谷化平, 倪灿荣, 詹榕洲. 大肠癌 CD44s, CD44v6 和 nm23H1 的 mRNA 表达与转移及预后的相关性. 世界华人消化杂志 2000; 8:887-891
- 陈冰, 黄文斌. CD44v6 在结直肠癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:471-472
- Vizoso FJ, del Casar JM, Corte MD, Garcia I, Corte MG, Alvarez A, Garcia-Muniz L. Significance of cytosolic hyaluronan levels in gastric cancer. *Eur J Surg Onco* 2004;30:318-324
- 许洪卫, 王元和, 高瀚. 结、直肠癌侵袭性和根治手术对血清透明质酸浓度的影响. 解放军医学杂志 1996;21:131-132

筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白4B转染细胞差异表达基因

刘妍, 王建军, 成军, 杨倩, 纪冬, 王春花, 党小艳, 徐志强

刘妍, 王建军, 成军, 杨倩, 纪冬, 王春花, 党小艳, 徐志强, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

刘妍, 女, 1973-01-15生, 辽宁省海城市人, 满族. 1995年北京医科大学毕业, 军事医学科学院免疫学专业2002级硕士学位研究生, 助理研究员. 主要从事肝炎病毒的分子生物学与病毒性肝炎发病机制的研究.

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-07-12 接受日期: 2004-08-16

Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with non-structural protein 4B of hepatitis C virus

Yan Liu, Jian-Jun Wang, Jun Cheng, Qian Yang, Dong Ji, Chun-Hua Wang, Xiao-Yan Dang, Zhi-Qiang Xu

Yan Liu, Jian-Jun Wang, Jun Cheng, Qian Yang, Dong Ji, Chun-Hua Wang, Xiao-Yan Dang, Zhi-Qiang Xu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Supported by National Natural Science Foundation No. C03011402, No. C30070689; Returned Scholar Fundation of General Logistics Department of PLA, No. 98H038

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn
Received: 2003-07-12 Accepted: 2004-08-16

Abstract

AIM: To screen genes differentially expressed in human hepatoblastoma cell line HepG2 transfected with non-structural protein 4B (NS4B) of hepatitis C virus (HCV), and to further elucidate the molecular biological mechanism of NS4B in chronic hepatitis C and carcinogenesis, and progression of hepatoma.

METHODS: Sequence-specific primers of HCV NS4B were designed and synthesized. The plasmid pBRTM3011, in which the full length of HCV-H cDNA genome was contained, was treated as the template to amplify the NS4B-coded DNA fragment with polymerase chain reaction (PCR) technique. The expressive vector of pcDNA3.1(-)-NS4B was constructed by routine molecular biological methods. The technology of cDNA microarray was adopted to detect the mRNA extracted from the HepG2 cells transfected with pcDNA3.1(-)-NS4B and pcDNA3.1(-) using lipofectamine, respectively. The expression of NS4B protein in the transfected vector was confirmed by Western blot with single

chain variable region antibody.

RESULTS: The expressive vector was constructed and confirmed after restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. The expression of NS4B protein in the transfected vector was confirmed by Western blot with single chain variable region antibody. High quality mRNA and cDNA were prepared. Among 1 152 genes of the DNA microarray, we found 56 genes were differently expressed in HepG2 cells transfected with NS4B, in which 22 genes were significantly up-regulated and 34 were significantly down-regulated.

CONCLUSION: Differently expressed genes are successfully screened in HepG2 cells transfected with NS4B by cDNA microarray, which may help to further elucidate the molecular mechanism of NS4B in HCV infection and development of hepatocellular carcinoma.

Liu Y, Wang JJ, Cheng J, Yang Q, Ji D, Wang CH, Dang XY, Xu ZQ. Screening of genes differentially expressed in HepG2 cells transfected with non-structural protein 4B of hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2316-2320

摘要

目的: 筛选丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白4B(NS4B)转染细胞差异表达基因, 进一步阐明NS4B蛋白在丙型肝炎慢性化及致肝细胞癌发生发展过程中的分子生物学机制。

方法: 根据HCV-H病毒株序列设计、合成HCV NS4B基因序列特异性的引物, 以含有HCV-H全基因组cDNA的质粒pBRTM3011作为模板, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增NS4B蛋白编码基因片段, 以常规的分子生物学技术将获得的HCV NS4B编码基因片段克隆到TA载体中进行核苷酸序列的测定, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS4B. 以脂质体转染肝母细胞瘤细胞系HepG2, 提取mRNA, 逆转录为cDNA, 与转染空白表达载体pcDNA3.1(-)的HepG2细胞进行DNA芯片分析。

结果: 构建的表达载体经过限制性内切酶分析和DNA序列测定, 证实准确无误. 以单链可变区抗体的Western blot杂交技术证实构建的表达载体转染HepG2细胞之后有NS4B蛋白的表达, 提取高质量的mRNA并逆转录成为cDNA, 进行DNA芯片技术分析. 在1 152个基因表达谱的筛选中, 发现有22个基因表达水平显著上调, 34个基因表达水平显著下调。

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了HCV NS4B转染细胞后差异表达基因, 为进一步阐明NS4B蛋白致病的分子

生物学机制提供依据.

刘妍, 王建军, 成军, 杨倩, 纪冬, 王春花, 党小艳, 徐志强. 筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白4B转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12(10): 2316-2320

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2316.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)非结构蛋白4B(NS4B)基因由783个核苷酸组成, 编码由261个氨基酸残基组成的疏水蛋白(分子量为27 kD)^[1]. 近年研究表明HCV NS4B蛋白定位于细胞内质网膜, 与细胞内膜结构的功能有关^[2]. 在体外实验中, 他和NS4A蛋白一起可以抑制宿主细胞的翻译, 在一定程度上可以减弱机体对抗病毒药物干扰素- α (INF- α)的反应, 同时使病毒逃避宿主的免疫作用. NS4B蛋白还可以与HCV其他非结构蛋白NS3、NS4A、NS5A、NS5B等相互作用, 对这些非结构蛋白的功能起协同、促进或是下调作用^[3-5]. 可见HCV NS4B蛋白是一种多功能的蛋白质, 在HCV病毒感染及致肿瘤发生过程中起着一定的作用. 基因芯片技术(cDNA microarray)是由大量目的基因片段有序、密集地固定于玻片或尼龙膜上而制成芯片, 将两组组织或细胞的mRNA逆转录成cDNA, 掺入荧光标记, 同时与芯片杂交, 通过扫描分析每一位置的荧光信息可以快速有效地检测到二者间差异表达的基因^[6-8].

本研究应用基因芯片技术, 筛选HCV NS4B基因转染细胞后差异表达的基因, 检测NS4B蛋白的表达对肝细胞基因表达谱的影响, 为深入了解HCV NS4B蛋白在HCV病毒慢性感染及致肿瘤发生过程中的作用机制提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞及含有HCV-H全基因组cDNA的质粒pBRTM3011(美国Rockefeller大学的Rice CM教授惠赠)由本室保存, 细胞培养相关试剂、总RNA提取试剂Trizol及真核表达载体pcDNA3.1(-)均购自Invitrogen公司. 人类基因组分类I芯片包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、细胞信号转导相关基因等1152个cDNA, 由上海联合基因有限公司提供. mRNA纯化试剂Oligotex mRNA Midi Kit购自Qiagen公司.

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体构建及细胞转染 根据HCV-H病毒株的基因序列设计、合成HCV NS4B基因序列特异性引物, 上下游引物序列分别为: 5' -GAA TTC ATG TCT CAG CAC TTA CCG TAC-3', 5' -GGA TCC TCA GCA TGG AGT GGT ACA CTC-3', 下划线部分为引物两端的酶切位点, *EcoRI*和*BamHI*. 以含有全长HCV-H株的cDNA质粒pBRTM3011作为模板, 应用聚合酶链反

应(PCR)技术扩增NS4B的全长编码基因. 先克隆到TA载体中进行序列测定, 然后再亚克隆到真核表达载体pcDNA3.1(-)中, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS4B. 在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞, 细胞生长至对数期时, 分别以脂质体转染试剂Lipofectamine PLUS将2 μ g pcDNA3.1(-)-NS4B和空载体pcDNA3.1(-)转染HepG2细胞, 48 h后收获细胞, 每 5×10^6 个细胞加入1 mL Trizol试剂, 立即于液氮中保存.

1.2.2 总RNA提取及mRNA纯化 使用Trizol试剂一步法提取转染pcDNA3.1(-)-NS4B和空载体pcDNA3.1(-)的细胞HepG2总RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度A值, 并行热稳定实验, 于-20 $^{\circ}$ C和70 $^{\circ}$ C保温1 h后, 经琼脂糖凝胶电泳检测28 S、18 S条带变化. 纯化mRNA并行电泳检测.

1.2.3 探针标记及芯片制备 常规方法逆转录标记cDNA探针并纯化. Cy3-dUTP标记对照组细胞mRNA(5 μ g), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在20 μ L 5 \times SSC+2 g/L SDS杂交液中. 芯片包含的1152个cDNA以通用引物进行PCR扩增, PCR产物长度为1 000-3 000 bp. 靶基因以0.5 μ g/ μ L溶解于3 \times SSC溶液中, 用Cartesian公司的Cartesian 7 500点样仪及TeleChem公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), UV交联, 再分别用0.2% SDS、水及硼氢化钠溶液处理10 min, 晾干备用.

1.2.4 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针在95 $^{\circ}$ C水浴变性5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于60 $^{\circ}$ C杂交15-17 h. 依次以2 \times SSC+2 g/L SDS、1 mL/L \times SSC+2 g/L SDS、1 mL/L \times SSC洗涤10 min, 室温晾干.

1.2.5 检测与分析 用General Scanning公司的ScanArray 3 000扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24条管家基因, 每个基因点2个点, 共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正. 用ImaGene3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度, 计算Cy5/Cy3比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>1.9, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3<0.6, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 HCV NS4B蛋白真核表达载体的构建 真核表达载体pcDNA3.1(-)-NS4B经过限制性内切酶作图分析和核苷酸序列的测定, 证实含有完整的开放读码框架, 序列准确无误. 以单链可变区抗体的Western blot杂交技术证实构建的表达载体转染HepG2细胞之后有NS4B蛋白的表达.

2.2 总RNA及mRNA的定性、定量分析 实验组和对照组总RNA的吸光度比值A260/A280分别为2.015和2.009, 热稳定实验70 $^{\circ}$ C保温1 h与-20 $^{\circ}$ C 1 h电泳条带比较, 显示28 S条带无明显降解, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA(图1). mRNA主要集中于0.9-4.0 kb的连续条带.

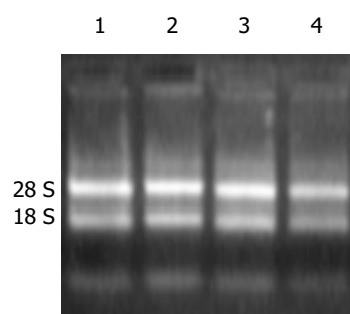


图1 总RNA琼脂糖凝胶电泳。1, 2: 对照组; 3, 4: 实验组。

2.3 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有1 152个cDNA。为了监控芯片杂交技术体系的整个过程,在芯片上设置了阴性对照(8条水稻基因,共8个点),这些点的杂交信号均很低,证实了数据的可靠性。由于实验组探针标记Cy5荧光素(呈红色),对照组探针标记Cy3荧光素(呈绿色),红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异,黄色代表表达水平无差异。按阳性标准,从1 152个基因中筛选出差异表达基因共56条,占4.86%,其中22条基因表达增强,34条基因表达降低。

2.4 差异表达基因分析 表达增强的基因主要有:细胞凋

亡相关基因,如凋亡相关的RNA结合蛋白,含有死亡效应域蛋白DEDD;细胞增生分化相关基因,如转化生长因子 β 受体1,肿瘤坏死因子受体超家族成员1 β ,肿瘤坏死因子配体超家族成员10;细胞信号转导相关蛋白,如cAMP依赖的蛋白激酶调节亚单位2 β ,cAMP应答元件结合蛋白,钾离子通道KQT样超家族成员3;细胞转录翻译相关蛋白,如核糖体蛋白S26,真核翻译延伸因子2。部分表达显著增强的基因(见表1)。表达降低的基因主要有:DEAD/H盒多肽21 DDX21,凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶胱冬肽酶(cysteine-aspartic acid protease, caspases)4,核糖核苷酸还原酶M2多肽等。部分表达显著降低的基因(表2)。

3 讨论

HCV基因组含有单一的开放读码框架,编码3 010-3 033个氨基酸残基的多肽前体,两侧是5'-非翻译区及3'-非翻译区,多肽前体至少被加工为10种结构蛋白和非结构蛋白^[9]。临床和实验研究显示,HCV核心蛋白,非结构蛋白3(NS3)、非结构蛋白5A(NS5A)具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长以及免疫调节等功能,分别在HCV感染及致肝细胞癌(HCC)发生发

表1 部分表达显著增强的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_004661	细胞分裂周期蛋白CDC23	1.918
2	NM_032998	含有死亡效应域蛋白DEDD	1.924
3	NM_004612	转化生长因子 β 受体1	1.928
4	NM_004519	钾离子通道KQT样亚家族成员3 KCNQ3	1.935
5	NM_001066	肿瘤坏死因子受体超家族成员1 β	1.946
6	NM_002736	cAMP依赖的蛋白激酶调节亚单位2 β	1.984
7	NM_003810	肿瘤坏死因子配体超家族成员10	1.987
8	AF090693	凋亡相关的RNA结合蛋白	2.004
9	NM_004904	CAMP应答元件结合蛋白CRE-BPa	2.028
10	NM_053274	FKBP相关蛋白FAP48	2.114
11	NM_001029	核糖体蛋白S26	2.165
12	NM_00196	真核翻译延伸因子2 EEF2	3.379

表2 部分表达显著降低的基因

序号	GenBank 登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_004728	DEAD/H盒多肽21-DDX21	0.463
2	NM_006754	神经囊泡蛋白Synaptophysin相关蛋白SYPL	0.470
3	NM_006415	丝氨酸辅酶A转移酶SPTLC1	0.472
4	NM_006437	ADP核糖转移酶	0.481
5	NM_002624	预折叠蛋白PFDN5	0.513
6	NM_002064	巯基转移酶GLRX	0.522
7	M73547	家族性息肉基因DPI	0.535
8	NM_033306	凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶caspase 4	0.537
10	NM_001034	核糖核苷酸还原酶M2多肽RRM2	0.549

展过程中扮演重要的角色^[10-12]. 而 HCV 非结构蛋白 4B (NS4B) 的功能至今为止尚不明确, 研究发现其定位于宿主细胞内质网, 通过“翻译阻断”的方式抑制宿主细胞蛋白的合成, 反之病毒本身的蛋白大量翻译, 进而有助于 HCV 病毒在宿主细胞内的感染及存活. 研究发现, HCV NS4B 蛋白仅存在于细胞质中, 特别是在细胞核周围区域^[13-16]. 令人感兴趣的是, HCV NS4B 蛋白与 Ha-ras 癌基因协同作用能够使 NIH 3T3 细胞发生恶性转化, 表现为细胞间缺乏接触抑制, 有形态学改变和独立生长, 表明 HCV NS4B 蛋白在肿瘤形成中具有一定功能^[17]. NS4B 蛋白还可与 HCV 其他非结构蛋白一起构成复制复合体, 并且与 NS5A、NS5B、NS4A 等有相互作用, 调节 HCV 在体内的复制^[18-21]. 可见 HCV NS4B 蛋白是一种多功能的蛋白质, 研究其基因转染细胞后表达的 NS4B 蛋白对肝细胞基因表达谱的影响, 对于深入分析该蛋白在肝细胞中的生物行为及在慢性 HCV 感染、肝细胞癌发生过程中的作用具有重要意义.

传统的 Northern blot 杂交或点杂交方法是以电泳为基础的方法, 一次只能研究一条或几条基因的表达, 其研究效率, 尤其是研究基因群之间相互作用和调控关系等方面受到极大的限制. 基因表达谱芯片技术是将大量的基因特异的探针或其 cDNA 片段固定在一块基因芯片上, 对来源不同的个体、不同组织、不同细胞周期、不同发育阶段、不同分化阶段、不同病变、不同刺激(包括不同诱导、不同治疗手段)下的细胞内的 mRNA 或逆转录产物 cDNA 进行检测, 从而大规模对这些基因表达的个体特异性、组织特异性、发育阶段特异性、分化阶段特异性、病变特异性、刺激特异性进行综合分析和判断^[22]. 本研究构建 HCV NS4B 真核细胞表达载体 pcDNA3.1(-)-NS4B, 应用基因表达谱芯片对 pcDNA3.1(-)-NS4B 转染的 HepG2 细胞和以空载体转染的相同细胞系的 mRNA 进行检测, 通过分析二者之间基因表达的差异信息, 寻找 NS4B 蛋白表达对肝细胞基因表达谱的影响. 在 1 152 个基因中筛选出 56 个差异表达的基因, 从表 1、2 列出的部分表达变化显著的基因中, 看出这些基因涉及细胞信号传导、细胞凋亡、肿瘤发生、能量代谢等生物过程, 说明 HCV NS4B 蛋白在肝细胞中的生物行为与细胞增生分化生长调节等密切相关.

分析表达增强的基因, 细胞分裂周期蛋白 CDC23 与酿酒酵母的 CDC23 高度同源, 是促进细胞分裂后期复合物(anaphase-promoting complex, APC)的成员, 对于细胞周期由 G2 期向 M 期过渡是必不可少的, APC 能够催化细胞周期蛋白 B 与泛素(cyclin B-ubiquitin)形成共轭复合物, 在泛素介导的细胞周期蛋白 B 的蛋白水解过程中起重要作用, HCV NS4B 通过上调 CDC23 的表达对细胞周期有调控作用^[23]. 含有死亡效应域蛋白 DEDD 是细胞程序性死亡通路中共享的蛋白-蛋白相互作用功能域, 该基因过表达预示诱导微弱的凋亡作用, 刺

激后, DEDD 蛋白从胞质转位至细胞核中, 与细胞核中 RNA 聚合酶 I 转录必需的基本转录因子 UBF 共同存在. 此外, 凋亡相关的 RNA 结合蛋白也是诱导细胞凋亡的蛋白, HCV NS4B 上调两种蛋白的表达, 诱导肝细胞凋亡^[24-27]. 转化生长因子 β 受体 I (TGF- β RI) 是丝氨酸/苏氨酸激酶膜受体家族的成员, TGF- β RI 激酶过表达, 能促进多种信号传导途径的激活, 对于肿瘤细胞的迁移, 以及重要的致癌事件如 Smad2/Smad3 的磷酸化是必需的^[28-29]. 肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族成员 1 β 可与 TNF 受体 1 形成杂合物, 介导两种抗凋亡蛋白 c-IAP1 和 c-IAP2 的功能, 其中 c-IAP1 通过 TNF 受体相关蛋白 2 (TNF-receptor-associated factor 2, TRAF2) 的泛素化和降解作用而增强 TNF 诱导的凋亡, 小鼠基因敲除实验也证实该蛋白能够通过刺激抗氧化途径而保护细胞, 防止细胞发生凋亡. 肿瘤坏死因子配体超家族成员 10 可与其受体结合, 引发 MAPK8/JNK、胱冬肽酶 8、胱冬肽酶 3 信号传导通路的激活, 具有选择性的优先诱导转化的细胞和肿瘤细胞凋亡, 而并不杀死正常细胞的特性. HCV NS4B 蛋白对上述基因表达有上调作用, 推测其在调控细胞凋亡的过程中处于动态平衡过程^[30-32]. 已知 cAMP 应答元件结合蛋白 CRE-BPa 是 CRE-BP1 家族的新成员, 含有推定的金属指状结构和由碱性氨基酸簇和亮氨酸拉链组成的 DNA 结合功能域, CRE-BPa 能特异性的与 CRE 结合形成同源二聚体, 与转录因子 c-JUN 或 CRE-BP1 结合成异源二聚体, 是 CRE 依赖的转录反式激活因子^[33]. 钾离子通道 KQT 样亚家族成员 3 KCNQ3 是细胞电信号传导途径中重要的调节因子^[34], HCV NS4B 蛋白对 CRE-BPa 及 KCNQ3 有上调作用, 暗示 NS4B 蛋白通过正调控细胞信号传导途径, 而促进某些与细胞转录调节密切相关的基因, 如癌基因的转录, 在 HCV 感染及肿瘤发生中发挥作用. 此外, 核糖体蛋白 S26 和真核翻译延伸因子 2 是与细胞转录翻译相关的蛋白, 可见, HCV NS4B 对细胞生长调节有一定作用.

分析表达降低的基因, DEAD/H 盒多肽 DDX21 是推定的重要的 RNA 解旋酶, 参与众多细胞的 RNA 二级结构加工过程, 如翻译起始、核糖体 RNA 合成及加工过程, DDX21 在肿瘤组织中低表达, 而在正常组织中有显著的高水平表达, HCV NS4B 对 DDX21 的表达有下调作用, 提示, NS4B 蛋白在一定程度上可能下调细胞核糖体 RNA 加工与合成^[35]. 预折叠蛋白是辅助其他蛋白正确折叠和有效组装的伴侣蛋白, 该蛋白的第五亚单位蛋白前折叠素 5(prefoldin)可与原癌基因 c-myc 相互结合, 抑制 c-myc 的转录活性, 被公认为是候选的肿瘤抑制基因. 可见, HCV NS4B 蛋白下调肿瘤抑制基因前折叠素 5 的表达, 间接激活原癌基因 c-myc 的转录, 推测这可能是 NS4B 蛋白参与肝细胞恶性转化的重要机制之一^[36]. 凋亡相关的半胱氨酸蛋白酶胱冬肽酶 4 是半胱氨酸-精氨酸蛋白酶家族成员, 胱冬肽酶家族酶的依次活化, 在细胞凋亡的各时相起着至关重要

要的作用。ADP核糖转移酶蛋白含有催化功能域,能够催化裂解多聚ADP核糖化反应,在DNA修复和细胞凋亡过程中起关键作用,HCV NS4B下调胱冬肽酶4和ADP核糖转移酶蛋白的表达,发挥其对抗细胞凋亡的作用,这可能是NS4B蛋白参与HCV慢性感染迁延不愈的主要机制之一。结合表1和表2的结果,发现HCV NS4B蛋白对细胞凋亡的调节是双向的。

总之,利用基因表达谱芯片分析了HCV NS4B蛋白对肝细胞基因表达谱的影响,NS4B蛋白能够上调或下调HepG2细胞中许多不同基因的表达,这些基因与细胞信号传导、细胞增生与分化、细胞凋亡等生物过程密切相关。本实验结果对于阐明HCV NS4B蛋白在慢性HCV感染及致肝细胞肿瘤发生中的作用具有重要意义。

4 参考文献

- Lee JC, Shih YF, Hsu SP, Chang TY, Chen LH, Hsu JT. Development of a cell-based assay for monitoring specific hepatitis C virus NS3/4A protease activity in mammalian cells. *Anal Biochem* 2003;316:162-170
- Lundin M, Monne M, Widell A, Von Heijne G, Persson MA. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol* 2003;77:5428-5438
- Flores RH, Nagano-Fujii M, Iwanaga Y, Hidajat R, Hotta H. Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res* 2002;90:119-131
- Piccininni S, Varaklioti A, Nardelli M, Dave B, Raney KD, McCarthy JE. Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. *J Biol Chem* 2002;277:45670-45679
- Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002;76:5974-5984
- Kaminski S. DNA microarrays-a methodological breakthrough in genetics. *J Appl Genet* 2002;43:123-130
- Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? *Nat Rev Cancer* 2001;1:151-157
- Borrebaeck CA, Ekstrom S, Hager AC, Nilsson J, Laurell T, Marko-Varga G. Protein chips based on recombinant antibody fragments: a highly sensitive approach as detected by mass spectrometry. *Biotechniques* 2001;30:1126-1130
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- 刘妍, 成军, 李刚, 李克, 段惠娟, 王琳, 董菁, 洪源, 张跃新, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因. *解放军医学杂志* 2001;26:880-883
- 刘妍, 成军, 牟劲松, 陆荫英, 王建军, 李克, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3反式激活SV40病毒早期启动子的研究. *解放军医学杂志* 2003;28:44-46
- 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因的克隆化研究. *解放军医学杂志* 2003;28:40-43
- Kato J, Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *J Med Virol* 2002;66:187-199
- Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55:133-159
- Hugle T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Krausslich HG, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology* 2001;284:70-81
- Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- Park JS, Yang JM, Min MK. Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Haras oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:581-587
- De Francesco R. Molecular virology of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999;31(Suppl 1):47-53
- Neddermann P, Clementi A, De Francesco R. Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polypeptide. *J Virol* 1999;73:9984-9991
- Kim JE, Song WK, Chung KM, Back SH, Jang SK. Subcellular localization of hepatitis C viral proteins in mammalian cells. *Arch Virol* 1999;144:329-343
- Koch JO, Bartenschlager R. Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J Virol* 1999;73:7138-7146
- 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463
- Zhao N, Lai F, Fernald AA, Eisenbart JD, Espinosa R, Wang PW, Le Beau MM. Human CDC23: cDNA cloning, mapping to 5q31, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. *Genomics* 1998;53:184-190
- Stegh AH, Schickling O, Ehret A, Scaffidi C, Peterhansel C, Hofmann TG, Grummt I, Krammer PH, Peter ME. DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. *EMBO J* 1998;17:5974-5986
- Leo CP, Hsu SY, McGee EA, Salanova M, Hsueh AJ. DEFT, a novel death effector domain-containing molecule predominantly expressed in testicular germ cells. *Endocrinology* 1998;139:4839-4848
- Zhan Y, Hegde R, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Death effector domain-containing proteins DEDD and FLAME-3 form nuclear complexes with the TFIIC102 subunit of human transcription factor IIC. *Cell Death Differ* 2002;9:439-447
- Alcivar A, Hu S, Tang J, Yang X. DEDD and DEDD2 associate with caspase-8/10 and signal cell death. *Oncogene* 2003;22:291-297
- Itoh S, Thorikay M, Kwanetz M, Moustakas A, Itoh F, Heldin CH, ten Dijke P. Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses. *J Biol Chem* 2003;278:3751-3761
- Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H, Zhou B. Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor beta receptor I in metastatic breast tumor cells. *J Biol Chem* 2002;277:39703-39712
- Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 1995;269:1424-1427
- Renshaw SA, Parmar JS, Singleton V, Rowe SJ, Dockrell DH, Dower SK, Bingle CD, Chilvers ER, Whyte MK. Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL. *J Immunol* 2003;170:1027-1033
- Kim YS, Schwabe RF, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. TRAIL-mediated apoptosis requires NF-kappaB inhibition and the mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells. *Hepatology* 2002;36:1498-1508
- Nomura N, Zu YL, Maekawa T, Tabata S, Akiyama T, Ishii S. Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *J Biol Chem* 1993;268:4259-4266
- Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ. Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K+ channels causes epilepsy. *Nature* 1998;396:687-690
- Valdez BC, Yang H, Hong E, Sequitina AM. Genomic structure of newly identified paralogue of RNA helicase II/Gu: detection of pseudogenes and multiple alternatively spliced mRNAs. *Gene* 2002;284:53-61
- Faucheu C, Diu A, Chan AW, Blanchet AM, Miossec C, Herve F, Collard-Dutilleul V, Gu Y, Aldape RA, Lippke JA. A novel human protease similar to the interleukin-1 beta converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *EMBO J* 1995;14:1914-1922

乙型肝炎病毒包膜大蛋白的自激活

纪冬, 成军, 陆荫英, 董菁, 郭江, 刘妍

纪冬, 成军, 陆荫英, 董菁, 郭江, 刘妍, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

纪冬, 男, 1975-12-05 生, 河北省怀来县人, 汉族. 2002 解放军军医进修学院传染病学硕士生, 医师. 从事病毒性肝炎的临床治疗及实验研究.

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队九五科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队十五科技攻关项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

Autonomous activation of hepatitis B virus large surface protein

Dong Ji, Jun Cheng, Yin-Ying Lu, Jing Dong, Jiang Guo, Yan Liu

Dong Ji, Jun Cheng, Yin-Ying Lu, Jing Dong, Jiang Guo, Yan Liu, Research Center of Gene Therapy, Institute of Infectious Diseases, Chinese PLA 302 Hospital, Beijing 100039, China

Supported by National Natural Science Foundation No. C03011402, No. C30070689, and Returned Scholarship of General Logistics Department of Chinese PLA, No. 98H038

Correspondence to: Jun Cheng, Research Center of Gene Therapy, Institute of Infectious Diseases, Chinese PLA 302 Hospital, 100 Xisihuan Zhonglu, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn

Received: 2004-05-28 Accepted: 2004-09-30

Abstract

AIM: To construct the yeast expression vector of hepatitis B virus large surface protein (LHBs), and to study its autonomous activation.

METHODS: The Matchmaker GAL4 two-hybrid technique was used. The LHBs, pre-S1, pre-S2 and SHBs genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with respective primers. The amplified PCR fragments were then subcloned into the *EcoR I/BamH I* sites (5'ends) of pGBKT7 vector to obtain the expression vectors including pGBKT7 (-)-LHBs, pGBKT7(-)-preS1, pGBKT7(-)-preS2 and pGBKT7 (-)-SHBs. This vectors were identified by PCR and digestion of *EcoR I/BamH I*. After the constructed vectors were transformed into yeast AH109, the yeast cells were plated on synthetic dropout nutrient medium (SD/-Trp and SD/-Trp-His-Ade) containing x- α -gal for testing their autonomous activation.

RESULTS: The yeast expression vectors were constructed. The yeast cells transformed with pGBKT7-LHB and pGBKT7-preS1 vectors could grow well on both of the media. However, cells transformed with pGBKT7-preS2 and pGBKT7-SHBs vectors could only grow on the SD/-Trp medium.

CONCLUSION: The LHBs functions as a transcriptional transactivator, and serves as the functional GAL4 activation domain (AD) to activate transcription of reporter genes (ADE2, HIS3, MEL1 and LacZ). The autonomous activation of LHBs roots in its pre-S1 domain.

Ji D, Cheng J, Lu YY, Dong J, Guo J, Liu Y. Autonomous activation of hepatitis B virus large surface protein. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(10):2321-2324

摘要

目的: 构建乙型肝炎病毒包膜大蛋白的酵母表达载体, 研究其自激活作用.

方法: 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBV包膜大蛋白(LHBs), 前-S1蛋白(pre-S1), 前-S2蛋白(pre-S2)及主蛋白(SHBs)的编码基因, 并在其5'端引入*EcoR I/BamH I*内切酶位点, 分别连接入酵母表达载体pGBKT7中, 构建酵母表达质粒, 转化酵母细胞AH109并在其内表达, 然后分别铺于含有X- α -半乳糖的营养缺陷型培养基SD/-Trp和SD/-Trp-His-Ade上进行自激活验证(蓝/白筛选).

结果: 成功克隆出编码各种HBV包膜蛋白的基因, 构建表达载体并在酵母细胞中表达, 转化了pGBKT7-LHBs和pGBKT7-preS1的AH109酵母细胞在两种营养缺陷型培养基上均可正常生长, 并且可以产生 α -半乳糖苷酶从而在铺有X- α -半乳糖的培养基上呈现蓝色, 而转化了pGBKT7-preS2和pGBKT7-SHBs的细胞只能在SD/-Trp的培养基上生长, 且没有变蓝.

结论: LHBs可以作为反式激活子发挥作用, 代替GAL4蛋白的激活域来激活GAL4上游激活序列(GAL UAS)和TATA盒, 从而激活了下游报告基因(ADE2, HIS3, MEL1和LacZ)的表达, 并且其自激活作用来自于前-S1结构域.

纪冬, 成军, 陆荫英, 董菁, 郭江, 刘妍. 乙型肝炎病毒包膜大蛋白的自激活. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2321-2324

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2321.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种嗜肝部分双链DNA病毒^[1-4], 不仅引起急、慢性病毒性肝炎^[5-6], 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关^[7-9]. HBV DNA的基因组具有4个主要的开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区, 其中S区通过三个框架(in-frame)起始密码子(ATG)分为三个结构区: 前-S1,

前-S2和S结构域,从这三个ATG开始编码产生三种大小不等的包膜蛋白^[10-12]:主蛋白(SHBs),中蛋白(MHBs:前-S2+S)和大蛋白(LHBs:前-S1+前-S2+S)^[13-15]. LHBs在肝细胞内表达最少,但对于HBV在细胞内的持续感染及细胞生长状态都有着重要的影响,介导HBV对于肝细胞的黏附,病毒颗粒的装配、释放,超螺旋DNA扩增的调节及转录的反式激活,参与了机体内广泛的信号途径^[16].我们运用酵母双杂交系统3的DNA结合域(BD)融合载体pGBKT7构建了LHBs及其组成部分前-S1,前-S2和SHBs的酵母表达质粒,转化酵母单倍体细胞AH109后进行自激活的研究,为进一步阐明HBV包膜蛋白的多重作用及HBV致病机制而提供理论基础^[17-19].

1 材料和方法

1.1 材料 工具酶、Tag DNA聚合酶、T4 DNA连接酶及限制性内切酶均购自Takara公司;中间载体pGEM-T购自Promega公司,玻璃奶纯化试剂盒购自博大公司,大肠杆菌(DH5 α)本室保存;酿酒酵母AH109酵母株、DNA-BD载体pGBKT7、酵母培养基(SD/-Trp、SD/-Trp/-His/-Ade),X- α -半乳糖苷(gal)、酵母蛋白提取试剂盒等购自Clontech公司,半硫酸腺苷、醋酸锂及其他试剂均购自Sigma公司;抗c-myc单克隆抗体本室自制,由购自ATCC的1-9E10.2杂交瘤产生;引物合成及DNA测序由上海博亚公司完成.

1.2 方法 根据董菁 *et al*^[20-23]发表的adr亚型HBV的基因序列,分别设计LHBs,前-S1,前-S2和SHBs编码区的上游和下游引物(表1),同时在引物两端引入EcoRI/BamHI内切酶位点.使用反应体系25 μ L,以G376-7(GenBank号:AF384371)质粒为模板,放入PE9600 PCR仪中扩增.9 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果.PCR产物将经玻璃奶回收后,与pGEM-T载体及T4 DNA连接酶混全,在16 $^{\circ}$ C连接过夜,随后转化入用氯化钙法制备的大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,在铺有IPTG及X-gal的氨苄青霉素琼脂糖(LB)平板上进行蓝白菌落筛选,挑取阳性菌落用碱裂解法提取质粒DNA进行酶切鉴定及测序正确.之后亚克隆至pGBKT7载体中,转化DH5 α 感受态,接种于卡那霉素LB平板上,随机挑取平板上生长的菌落,碱裂解法抽提质粒DNA,双酶切及PCR鉴定所得质粒正确,分别命名为pGBKT7-LHBs, pGBKT7-preS1, pGBKT7-preS2, pGBKT7-SHBs.酵母细胞中的表达,用醋酸锂法转化,按Clontech公司操作手册进行,转化后铺板于SD/-Trp进行筛选.挑取2-3 mm大小的菌落过夜培养后,提取酵母蛋白质,操作步骤按Clontech公司试剂盒说明书进行.表达产物的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和Western免疫印迹分析均按常规方法进行.将构建好的LHBs,前-S1,前-S2和SHBs酵母表达载体用醋酸锂法转入单倍体酵母细胞AH109,室温放置4 h

后平铺于含有X- α -gal的SD/-Trp和SD/-Trp-His-Ade的培养基上,30 $^{\circ}$ C,生长3-7 d验证自激活.

表1 引物序列及PCR产物

目的基因	引物	片段大小
LHBs	5' GAATTC AGC ATG GGA GGT TGG TCT TC 3'	1 218 bp
	5' GGATCC TCA AAT GTA TAC CCA AAG AC 3'	
前-S1	5' GAATTC AGC ATG GGA GGT TGG TCT TC 3'	375 bp
	5' GGATCC TTA GGC CTG AGG ATG ACT G 3'	
前-S2	5' GAATTC ATG CAG TGG AAC TCC ACC 3'	180 bp
	5' GGATCC TTA GTT CGG TGC AGG GTC 3'	
SHBs	5' GAATTC ATG GAG AAC ACA ACA TCA GG 3'	693 bp
	5' GGATCC TCA AAT GTA TAC CCA AAG AC 3'	

2 结果

2.1 诱饵质粒的构建及表达 利用自行设计的引物成功克隆出LHBs,前-S1,前-S2和SHBs基因(图1),连接pGEM-T载体后EcoRI/BamHI双酶切鉴定,与预期片段符合后,回收酶切产物连接到用相同酶所切的pGBKT7载体中.再次酶切鉴定结果正确.(图2)为DNA-BD载体pGBKT7结构图.(图3)为单倍体酵母细胞AH109报告基因结构图.

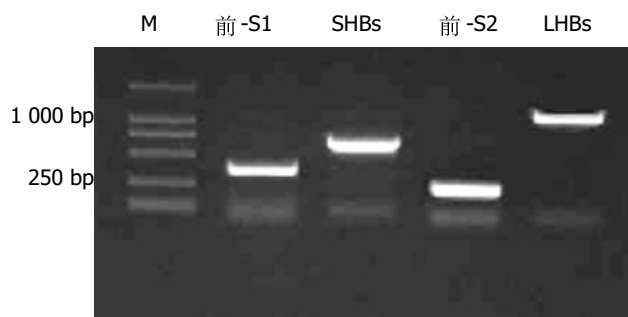


图1 琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增目的片段.

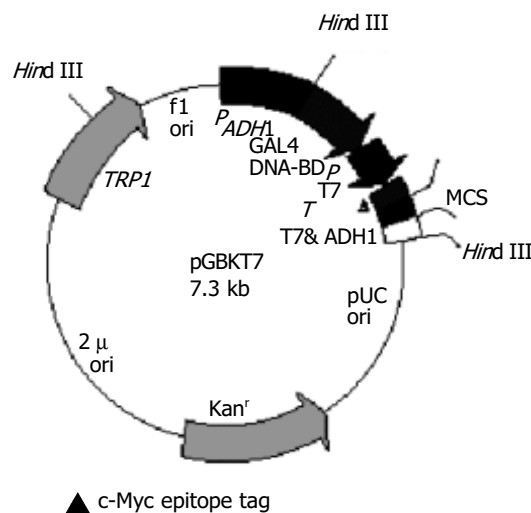


图2 pGBKT7质粒结构图.

AH109 Constructs

GAL1 UAS	GAL1 TATA	<i>HIS3</i>
GAL2 UAS	GAL2 TATA	<i>ADE2</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>lacZ</i>
MEL1 UAS	MEL2 TATA	<i>MEL 1</i>

图3 AH109 酵母细胞报告基因结构. (三个不同的异源 GAL4 反应性上游激活序列(UAS)和启动子元件控制其下不同的报告基因 *HIS3*、*ADE2*、*LacZ* 和 *MEL1*, 在自激活实验中, 如果诱饵蛋白具有自激活结构域, 就可以激活这三个启动子, 从而启动其下游的报告基因的表达, 可以在含有 $x-\alpha$ -gal 的 SD/-Trp-His-Ade 的缺陷型营养培养基上生长, 并且呈现蓝色).

2.2 酵母表达产物的 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹 提取转化 pGBKT7-preS1 和 pGBKT7-preS2 质粒的酵母蛋白质, 进行 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹分析. 结果显示对照无表达而转化了 pGBKT7-preS1 和 pGBKT7-preS2 的 Western 印迹分析可见明显目的条带且无杂带(图4).

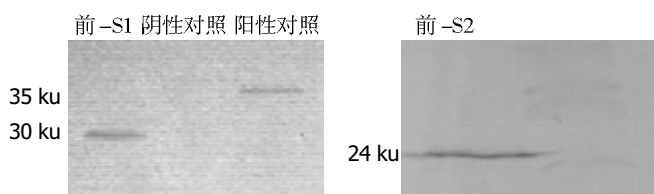


图4 酵母蛋白提取物 Western 免疫印迹分析结果.

2.3 自激活实验 转化了 pGBKT7-LHBs 和 pGBKT7-preS1 质粒的酵母细胞可以在含有 $x-\alpha$ -gal 的 SD/-Trp 和 SD/-Trp-His-Ade 的培养基上生长, 并呈现蓝色, 而转化了另外两种质粒的酵母细胞只在含有 $x-\alpha$ -gal 的 SD/-Trp 的培养基上生长(表2), 并且无蓝色菌落(图5).

表2 转化不同质粒的 AH109 在不同培养基上的生长情况

转化质粒	SD/-Trp	SD/-Trp-Ade-His	克隆颜色
pGBKT7-LHBs	+	+	蓝
pGBKT7-preS1	+	+	蓝
pGBKT7-preS2	+	-	白
pGBKT7-SHBs	+	-	白

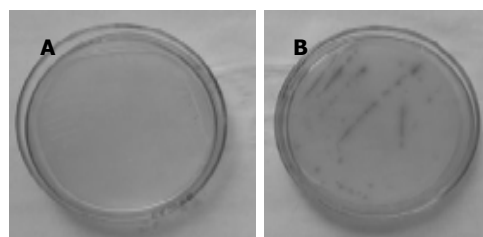


图5 酵母细胞 AH109 在不同缺陷性营养培养基上的生长情况. A: 表达 GAL4-前-S2、GAL4-SHBs 融合蛋白的 AH109 在铺有 $x-\alpha$ -gal 的 SD/-Trp 上可以生长, 但不显蓝色; B: 表达 GAL4-LHBs, GAL4-前-S1 融合蛋白的 AH109 在铺有 $x-\alpha$ -gal 的 SD/-Trp-Ade-His 上可以生长, 且呈现蓝色.

3 讨论

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白/蛋白相互作用的有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下的相互作用提供了一种新的遗传学方法^[24-26]. 酵母双杂交系统通过将两个推定有相互作用的蛋白 X 和 Y 分别融合到一酵母转录激活因子的 BD 和 AD 上, X 与 Y 的相互作用重构了激活因子, 从而导致下游报告基因的转录, 产生容易探测到的表型. 我们选用的是 Clontech 公司的 MATCH-MAKER 酵母双杂交系统 -3, 单倍体细胞 AH109 株带有 4 种报告基因分别为 *HIS3*(组氨酸), *ADE2*(腺苷), *MEL1*(α -半乳糖苷酶)和 *LacZ*(β -半乳糖苷酶), 加上两种载体中分别带有的 TRP1(色氨酸)和 LEU2(亮氨酸), 使得筛选后阳性菌落能在缺乏上述4种氨基酸营养的培养板上生长. 而且 MEL1 基因表达的 α -半乳糖苷酶为分泌型蛋白, 可以在固相培养基中直接与 $X-\alpha$ -gal 底物相互作用, 显示为蓝色, 相对于检测 β -半乳糖苷酶来说操作得到了极大的简化. 该系统由于增加了报告基因的种类, 使筛选结果阳性率达到 95%^[27-30].

LHBs 蛋白由 400 个氨基酸残基组成, 由前-S1, 前-S2 和主 S 结构域组成, 其中主 S 完全重叠于 HBV DNA 多聚酶的逆转录酶区, 前-S1/前-S2 区位于 HBV DNA 多聚酶的分隔区(spacer)内. LHBs 是公认的反式激活因子^[31-33], 其前-S1, 前-S2 结构域均具有反式激活功能. 前-S2 结构域可以与蛋白激酶 C(PKC) α/β 结合, 发生磷酸化反应触发了 PKC 依赖的 c-Raf-1/MPKKK(丝裂原激活蛋白激酶激酶激酶)信号转导系统, 从而激活转录因子, 如激活蛋白-1(AP-1), 细胞核因子- κ B(NF- κ B), AP-2、血清应答因子(SRF), Sp1 和 *c-myc*, *c-fos* 启动子, 参与病毒感染后的炎症反应和肝细胞癌的发生^[34-36], 根据致癌两步模型: 起始/促进, 前-S2 具有的肿瘤启动子样的功能: 具有关键性突变(起始)的细胞可以被阳性选择出来(促进), 这个过程也许可以用来解释 HCC 发展过程中潜伏期长的原因. 最近的研究表明前-S1 蛋白也具有反式激活作用. Sell *et al* 运用转基因小鼠来研究前-S1 蛋白的功能, 过度表达的前-S1 蛋白引起了持久的炎症, 从而导致了 DNA 损伤. Hildt *et al* 也报道了前-S1 的一小部分具有反式激活作用. HBV 所致的 HCC 细胞表现了转化生长因子 α (TGF- α)表达的上调, 但原因尚不清楚, Ono *et al* 研究说明了前-S1 具有反式激活区域, 并且上调了 HCC HuH6 细胞系的 TGF- α 约 2 倍, 说明前-S1 蛋白对于 TGF- α 的反式激活在肝癌发病机制中具有关键性作用. Kim *et al* 将不同长度的前-S1 结构域与 GAL4 蛋白的 DNA 结合域相连接, 转化酵母细胞后表达融合蛋白, 检测报告基因 *lacZ* 的 β -半乳糖苷酶活性; 将 GAL4-前-S1 基因构建入哺乳细胞表达载体 pREP8 中, 与 GAL4 反应性的氯霉素乙酰转移酶(CAT)报告载体 G5E1bCAT 共转染 HepG2 细胞, 检测 CAT 吸光度值, 这两各方法均显示出 GAL4-

前-S1(aa 1-90)融合蛋白具有强烈的反式激活作用,进一步的缺失突变分析及氨基酸序列分析显示了在21-56处的片段中正如许多酸性激活因子一样富含天冬氨酸,而在57-90之间没有酸性氨基酸残基,认为前-S1(aa 21-56)是反式激活必需的片段,而疏水区(aa 57-90)的结构可以增强反式激活作用.前-S1富含脯氨酸,可以形成一个框架协助其自身折叠为独特的结构与转录因子相互作用.总之,21到56残基包括了病毒中和表位以及肝细胞受体结合位点,这个片段具有多种功能.整合的病毒DNA发生了许多变化,整合的前-S1区基因可以与许多宿主转录因子编码基因重组,从而产生新的基因编码功能性的反式激活因子.

我们将LHBs蛋白进行分段研究,将LHBs,前-S1,前-S2,SHBs基因构建入DNA-BD载体pGBKT7中,转化AH109细胞表达融合蛋白,并进行诱饵蛋白的自激活实验.结果显示LHBs和前-S1具有自激活作用,而前-S2及SHBs无此作用,说明LHBs蛋白的自激活作用主要来自于其前-S1域,这与以前的研究结果相一致,也对Kim *et al*的研究进行了拓展,对于LHBs功能的多样性、复杂性有了更加深入的理解,从而为HBV的病毒学研究,HBV感染相关性疾病的诊断、治疗措施等方面提供了线索.

4 参考文献

- Huy TT, Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis B and C virus infections in Asia. *Pediatr Int* 2004;46:223-230
- Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor. *J Virol* 2001;75:8400-8406
- Liu ZW, Han QY, Zhang N, Kang W. Sequential changes of serum ferritin levels and their clinical significance in lamivudine-treated patients with chronic viral hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2004;10:972-976
- Doitsh G, Shaul Y. Enhancer I predominance in hepatitis B virus gene expression. *Mol Cell Biol* 2004;24:1799-1808
- Su GG, Pan KH, Zhao NF, Fang SH, Yang DH, Zhou Y. Efficacy and safety of lamivudine treatment for chronic hepatitis B in pregnancy. *World J Gastroenterol* 2004;10:910-912
- Assogba BD, Paik NW, Rho HM. Transcriptional activation of gammaherpesviral oncogene promoters by the hepatitis B viral X protein (HBx). *DNA Cell Biol* 2004;23:141-148
- Chen CH, Chen YY, Chen GH, Yang SS, Tang HS, Lin HH, Lin DY, Lo SK, Du JM, Chang TT, Chen SC, Liao LY, Kuo CH, Lin KC, Tai DI, Changchien CS, Chang WY, Sheu JC, Chen DS, Liaw YF, Sung JL. Hepatitis B virus transmission and hepatocarcinogenesis: a 9 year retrospective cohort of 13676 relatives with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004;40:653-659
- Sung VM, Lai MM. Murine retroviral pseudotype virus containing hepatitis B virus large and small surface antigens confers specific tropism for primary human hepatocytes: a potential liver-specific targeting system. *J Virol* 2002;76:912-917
- 纪冬, 成军, 王建军, 董菁, 郭江, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花. 应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒前-S1蛋白反式激活的相关基因. *胃肠病学和肝病杂志* 2004;13:3-8
- 纪冬, 成军, 郭江, 王建军, 刘妍, 杨倩, 王春花, 党晓燕. 乙型肝炎病毒前-S1蛋白反式激活蛋白1基因的克隆化研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2004;13:9-12
- Kondo J, Shimomura H, Fujioka S, Iwasaki Y, Takagi S, Ohnishi Y, Tsuji H, Sakaguchi K, Yamamoto K, Tsuji T. Mutations in the hepatitis B virus preS2 region and abrogated receptor activity for polymerized human albumin. *Acta Med Okayama* 2002;56:193-198
- Zuckerman JN, Zuckerman AJ. Mutations of the surface protein of hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2003;60:75-80
- Paran N, Cooper A, Shaul Y. Interaction of hepatitis B virus with cells. *Rev Med Virol* 2003;13:137-143
- Stockl L, Berting A, Malkowski B, Foerste R, Hofschneider PH, Hildt E. Integrity of c-Raf-1/MEK signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus gene expression. *Oncogene* 2003;22:2604-2610
- Foo NC, Ahn BY, Ma X, Hyun W, Yen TS. Cellular vacuolization and apoptosis induced by hepatitis B virus large surface protein. *Hepatology* 2002;36:1400-1407
- Hartmann-Stuhler C, Prange R. Hepatitis B virus large envelope protein interacts with gamma2-adaptin, a clathrin adaptor-related protein. *J Virol* 2001;75:5343-5351
- 陈天燕, 成军, 张树林. 酵母双杂交系统的原理及应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:451-455
- 邵清, 成军, 白雪帆, 王琳, 张健, 梁耀东, 刘敏, 李强. 酵母双杂交技术筛选白蛋白中HCV NS3蛋白结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:1897-1900
- 刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东. 应用酵母双杂交技术筛选白蛋白cDNA文库与NS5ATP1结合蛋白基因. *世界华人消化杂志* 2004;12:836-839
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 张健, 陈天艳, 洪源, 刘妍, 王刚, 钟彦伟. 酵母双杂交技术筛选HcbP6结合的肝细胞蛋白编码基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:385-388
- 陆荫英, 李克, 成军, 王琳, 刘妍, 段惠娟, 张玲霞. 乙型肝炎病毒X基因酵母表达载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2002;10:15-18
- 董菁, 成军, 杨倩. 乙型肝炎病毒基因组高变区界定的初步研究. *世界华人消化杂志* 2004;12:42-46
- 成军, 董菁, 洪源, 钟彦伟, 刘妍, 王刚, 王琳. 乙型肝炎病毒中国流行株全基因的克隆与序列分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:1083-1090
- 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:125-128
- 成军, 董菁, 刘妍, 李莉, 斯崇文, 王勤环, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒准种研究的临床意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:209-211
- 成军, 董菁. 乙型肝炎病毒基因组结构与功能复杂性的新认识. *世界华人消化杂志* 2003;11:1073-1080
- Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- Nagpal S, Ghosh CR, Chandraratna RA. Identification of nuclear receptor interacting proteins using yeast two-hybrid technology. *Methods Mol Biol* 2001;176:359-376
- Serebriiskii IG, Toby GG, Finley RL Jr, Golemis EA. Genomic analysis utilizing the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2001;175:415-454
- Gietz RD, Woods RA. Screening for protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system. *Methods Mol Biol* 2002;185:471-486
- Robek MD, Boyd BS, Wieland SF, Chisari FV. Signal transduction pathways that inhibit hepatitis B virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:1743-1747
- Cho EW, Park JH, Yoo OJ, Kim KL. Translocation and accumulation of exogenous hepatitis B virus preS surface proteins in the cell nucleus. *J Cell Sci* 2001;114:1115-1123
- Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活作用的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1245-1247
- Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002;21:525-535
- 刘妍, 成军, 王琳, 王建军, 陆荫英, 李克. 羧基末端截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式激活基因1的克隆化研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1102-1106

不同基因亚型幽门螺杆菌对大蒜素的敏感性

王莹, 孙丽萍, 袁媛

王莹, 孙丽萍, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三教研室 辽宁省沈阳市 110001

王莹, 女, 1970-07-08 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族. 2004 年中国医科大学硕士, 主要从事幽门螺杆菌基因分型及药敏研究.

国家重点基础研究发展规划项目(973), No. G1998051203

项目负责人: 袁媛, 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肿瘤研究所第三研究室. yyuan@mail.cmu.edu.cn

电话: 024-23256666-6153

收稿日期: 2004-07-28 接受日期: 2004-08-25

Susceptibility of *Helicobacter pylori* with diversified genotypes to allitridi

Ying Wang, Li-Ping Sun, Yuan Yuan

Ying Wang, Li-Ping Sun, Yuan Yuan, Cancer Institute, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by China State Key Basic Research Program, No.G1998051203

Correspondence to: Yuan Yuan, Cancer Institute, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yyuan@mail.cmu.edu.cn

Received: 2004-07-28 Accepted: 2004-08-25

Abstract

AIM: To study the susceptibility of *Helicobacter pylori* strains with diversified genotypes to allitridi.

METHODS: Fifty-one strains of *H pylori* were isolated and cultured from the fresh gastric mucosal specimens. CagA and vacA (s1, m1b, m2) genotypes of *H pylori* were determined by PCR method. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of allitridi on 51 *H pylori* strains were determined by agar dilution methods. MIC₅₀ was also calculated.

RESULTS: Fifty-one strains of *H pylori* were satisfactorily susceptible to allitridi. The gross bacteriostatic rate of allitridi on 51 *H pylori* strains was 92.2% (47/51), and MIC₅₀ was 7.97 mg/L. MIC was in a range of 1.25 mg/L to 40 mg/L. *H pylori* with vacAm1b⁺ genotype was more susceptible to allitridi than that with vacAm1b⁻ genotype (relative median potential = 0.55, 95% credible range from 0.30 to 0.89). *H pylori* with vacAm2⁺ genotype was more susceptible to allitridi than that with vacAm2⁻ genotype (relative median potential = 0.67, 95% credible range from 0.44 to 0.98). *H pylori* with cagA⁺ vacAs1⁺ m1b⁺, cagA⁺ vacAs1⁺ m2⁺ genotypes were more susceptible to allitridi than those with cagA⁺ vacAs1⁻ m1b⁻ genotypes (relative median potential = 0.38/0.37, 95% Credible Range from 0.10 to 0.78/from 0.11 to 0.81).

CONCLUSION: *H pylori* is satisfactorily susceptible to allitridi. The bacteriostatic effect increases with the concentration of allitridi. The MIC₅₀ is 7.97 mg/L and MIC range between 1.25 mg/L and 40 mg/L. Diversified genotypes or genotype combinations of *H pylori* show different susceptibilities

to allitridi.

Wang Y, Sun LP, Yuan Y. Susceptibility of *Helicobacter pylori* with diversified genotypes to allitridi. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(10):2325-2328

摘要

目的: 研究不同基因亚型幽门螺杆菌对大蒜素的敏感性.

方法: 从新鲜胃黏膜中分离、培养出 *H pylori* 共 51 株. 经聚合酶链反应(PCR)鉴定 *H pylori* 菌株的 cagA, vacA(s1, m1b, m2)基因亚型. 用琼脂稀释法测定 51 例 *H pylori* 分离株对大蒜素的最低抑菌浓度(MIC), 并计算 MIC₅₀ 值.

结果: 大蒜素对 51 株 *H pylori* 菌株表现出良好的抑菌效果, 总抑菌率达 92.2%(47/51), 其 MIC₅₀ 值为 7.97 mg/L, MIC 值范围在 1.25-40 mg/L. vacAm1b⁺ 基因亚型 *H pylori* 菌株较 vacAm1b⁻ 基因亚型 *H pylori* 菌株对大蒜素敏感(相对中位数潜力 0.55, 95% 可信区间 0.30-0.89); vacAm2⁺ 基因亚型 *H pylori* 菌株较 vacAm2⁻ 基因亚型 *H pylori* 菌株对大蒜素敏感(相对中位数潜力 0.67, 95% 可信区间 0.44-0.98). cagA⁺vacAs1⁺m1b⁺、cagA⁺vacAs1⁺m2⁺ 基因亚型组合 *H pylori* 菌株较 cagA⁺vacAs1⁻m1b⁻ *H pylori* 菌株对大蒜素敏感(相对中位数潜力 0.38/0.37, 95% 可信区间 0.10-0.78/0.11-0.81).

结论: 大蒜素对 *H pylori* 菌株有良好的抑菌效果, 其 MIC₅₀ 值为 7.97 mg/L, MIC 值范围在 1.25-40 mg/L. 并且其抗菌作用随着大蒜素浓度的增高而加强. 不同基因亚型及组合的 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性不同.

王莹, 孙丽萍, 袁媛. 不同基因亚型幽门螺杆菌对大蒜素的敏感性. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2325-2328

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2325.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关性淋巴瘤组织淋巴瘤(MALT)以及胃癌等的发生有密切的病因学联系^[1-7]. *H pylori* 致病相关基因包括细胞毒素相关基因(cagA)和空泡毒素基因(vacA)等, vacA 基因又可根据其中间区(m 区)和信号区(s 区)分为不同的基因亚型. 不同基因亚型的 *H pylori* 毒力不同, 致病性不同. 根除 *H pylori* 能使胃黏膜炎症消退、溃疡愈合、MALT 缓解, 预防及治疗 *H pylori* 感染是胃病防治领域的重要研究课题.

大蒜素是从天然大蒜中提取的有效成分,研究表明大蒜素可以抑制 *H pylori* 生长、繁殖,且无毒副作用. 但是其抑制 *H pylori* 的浓度范围没有统一的规范,不同基因亚型的 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性是否存在差异,值得进一步探索. 我们通过对 51 例 *H pylori* 分离株进行大蒜素体外药敏试验及 *cagA*, *vacA* 基因分型,探讨不同基因亚型 *H pylori* 菌株对大蒜素敏感性的差异,以期为大蒜素在临床 *H pylori* 根除治疗中的合理应用提供有价值的参考.

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* 菌株 51 株取自辽宁庄河及沈阳中国医科大学附属第一医院内窥镜中心胃镜活检新鲜胃黏膜组织,男 36 例,女 15 例;年龄 34–74(平均 49.3 岁). 大蒜素注射液(Allitridi, 上海禾丰制药厂,批号 020901). 脱纤维冻融羊血(沈阳市大东区前进生物试剂厂). BH 和 MH 琼脂(Becton Dickinson 公司,货号 241830 和 225250). Tag DNA 聚合酶、dNTPs 及 DNA 分子标准(大连宝生物公司),引物为上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 *H pylori* 培养及鉴定 将胃黏膜活检标本接种于含 70 mL/L 羊血的脑心浸液培养基,三气培养箱内微需氧条件(50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 850 mL/L N₂)培养 3–7 d 后观察,培养基上出现散在的针尖样、半透明菌落,刮取阳性菌落,将其接种到新鲜血平皿上,继续培养,直至菌落长满平皿,收集待用. *H pylori* 阳性菌株的鉴定方法包括培养基上生长典型菌落(图 1A);革兰染色阴性; *H pylori* 通用型引物 *ureB* 检测出现阳性条带;将培养病例胃黏膜活检标本石蜡切片 HE 染色,光学显微镜下观察,在胃黏膜表面黏液层及小凹上皮内见呈“S”型弯曲状、杆状细菌者为 *H pylori* 阳性(图 1B).

1.2.2 *H pylori* 基因亚型鉴定 提取 *H pylori* 菌株 DNA,按已知 *H pylori* 基因亚型特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增,产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,确定 *H pylori* 菌株的 *cagA*, *vacA*(s1, m1b, m2)基因亚型(图 2).

1.2.3 *H pylori* 菌株对大蒜素最低抑菌浓度(MIC)测定 按

照美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)制定的琼脂稀释法^[8–11]进行药敏试验. 用 MH 培养基将大蒜素注射液倍比稀释为 40–0.3125 mg/L 8 个浓度. 将受试菌在 *H pylori* 培养基血平板上转种 3 次以保证其纯度及活力,生理盐水制成菌悬液,浓度相当于 2.0 号麦氏标准比浊管(1×10^{10} – 1×10^{11} CFU/L 菌),直接点接种于含大蒜素的琼脂稀释法平板(每个点 1–3 μ L). 另做不含大蒜素的培养基接种菌悬液作阳性对照. 培养条件同前. 结果判定: *H pylori* 被完全抑制可见生长的最低大蒜素浓度值为其 MIC 值. 阳性对照培养基上应出现接近融合生长.

统计学处理 应用 SPSS 11.5 软件包进行概率单位(Probit)分析,计算大蒜素对 *H pylori* 的 MIC₅₀ 及组间相对中位数潜力,如果相对中位数潜力的 95% 可信区间包含 1,即认为两组结果对大蒜素的敏感性无显著差异;如果相对中位数潜力的 95% 可信区间不包含 1,即认为两组结果对大蒜素的敏感性有显著差异,如果 1/2 组相对中位数潜力值 < 1,则表示 1 组的 MIC₅₀ < 2 组的 MIC₅₀,即 1 组较 2 组对大蒜素敏感.

2 结果

2.1 *H pylori* 菌株不同基因亚型的分布 在 51 例 *H pylori* 菌株中, *cagA*+ 及 *cagA*- 分别占 90.2% 和 9.8%; *vacAs1*+ 及 *vacAs1*- 分别占 62.8% 和 37.2%; *vacAm1b*+ 及 *vacAm1b*- 分别占 64.7% 和 35.3%; *vacAm2*+ 及 *vacAm2*- 分别占 74.5% 和 25.5%.

2.2 大蒜素对 *H pylori* 菌株的抑菌作用 经概率单位(Probit)分析,大蒜素对 51 例 *H pylori* 菌株表现出良好的抑菌效果,总抑菌率达 92.2%(47/51),其 MIC₅₀ 值为 7.97 mg/L, MIC 值范围在 1.25–40 mg/L. 并且其抗菌作用随着大蒜素浓度的增高而加强(图 3).

2.3 不同基因亚型 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性 经概率单位(Probit)分析, *cagA*+/*cagA*-, *vacAs1*+/*vacAs1*- 基因亚型的两组 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性无显著差异; *vacAm1b*+/*vacAm1b*-, *vacAm2*+/*vacAm2*- 基因亚型的两组 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性有显著差异, *vacAm1b*+ 基因亚型的 *H pylori* 菌株较 *vacAm1b*- 菌株对大蒜素敏感, *vacAm2*+ 菌株较 *vacAm2*- 菌株对大蒜素

表 1 *H pylori* *cagA* 和 *vacA* 基因的 PCR 引物序列

扩增基因	引物	引物序列(5'–3')	PCR 产物长度(bp)	参考文献
<i>cagA</i>	CAGAF	GGCAATGGTGGTCCTGGAGCTAGGC	324	Pan ZJ ^[8]
	CAGAR	GGAAATCTTTAATCTCAGTTCGG		
<i>vacAs1</i>	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259	Atherton JC ^[9]
	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>vacAm1b</i>	VAm-F3	GGCCCCAATGCAGTCATGGAT	291	Atherton JC ^[10]
	VAm-R3	GCTGTTAGTGCCTAAAGAAGCAT		
<i>vacAm2</i>	VA4-F	GGAGCCCCAGGAAACATTG	352	Atherton JC ^[9]
	VA4-R	CATAACTAGCGCCTTGCAC		

敏感(表 2).

2.4 不同基因亚型组合的 *H pylori* 菌株对大蒜素敏感性的关系 经概率单位(Probit)分析, *cagA*+*vacAs1*+*m1b*+/*cagA*+*vacAs1*+*m2*+ 基因亚型组合的两组 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性无显著差异; *cagA*+*vacAs1*+*m1b*+/*cagA*+*vacAs1*-*m1b*-, *cagA*+*vacAs1*+*m2*+ / *cagA*+*vacAs1*-*m1b*- 基因亚型组合的两组 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性有显著差异, *cagA*+*vacAs1*+*m1b*+, *cagA*+*vacAs1*+*m2*+ 基因亚型组合的 *H pylori* 菌株较 *cagA*-*vacAs1*-*m1b*- *H pylori* 菌株对大蒜素敏感(表 2).

表 2 不同基因亚型及组合 *H pylori* 菌株对大蒜素敏感性的比较

基因亚型及组合	相对中位数潜力	95% 可信区间	
<i>cagA</i> + vs <i>cagA</i> -	1.39	0.81	2.50
<i>s1</i> + vs <i>s1</i> -	0.90	0.64	1.26
<i>vagA</i> <i>m2</i> + vs <i>m2</i> -	0.67	0.44	0.98 ¹
<i>m1b</i> + vs <i>m1b</i> -	0.55	0.30	0.89 ²
<i>cagA</i> + <i>s1</i> + <i>m1b</i> + vs <i>cagA</i> + <i>s1</i> + <i>m2</i> +	0.89	0.51	1.46
<i>cagA</i> + <i>s1</i> + <i>m1b</i> + vs <i>cagA</i> + <i>s1</i> - <i>m1b</i> -	0.38	0.10	0.78 ³
<i>cagA</i> + <i>s1</i> + <i>m2</i> + vs <i>cagA</i> + <i>s1</i> - <i>m1b</i> -	0.37	0.11	0.81 ⁴

¹ 相对中位数潜力的 95% 可信区间不包含 1, *m2*+ vs *m2*- 对大蒜素的敏感性有显著差异. ² 相对中位数潜力的 95% 可信区间不包含 1, *m1b*+ vs *m1b*- 对大蒜素的敏感性有显著差异. ³ 相对中位数潜力的 95% 可信区间不包含 1, *cagA*+*s1*+*m1b*+ vs *cagA*+*s1*-*m1b*- 对大蒜素的敏感性有显著差异. ⁴ 相对中位数潜力的 95% 可信区间不包含 1, *cagA*+*s1*+*m2*+ vs *cagA*+*s1*-*m1b*- 对大蒜素的敏感性有显著差异.

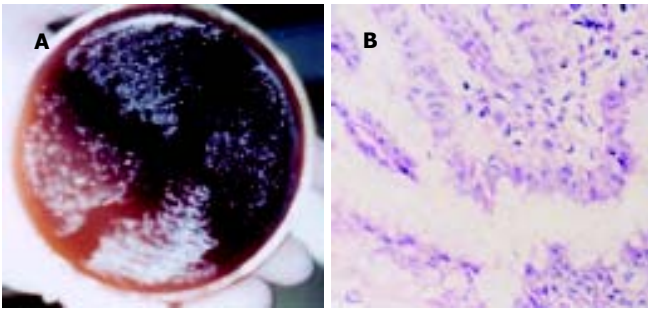


图 1 *H pylori* 鉴定. A: 培养 3 d 出现针尖样半透明状 *H pylori* 菌落; B: 胃黏膜表面黏液层内见到呈“S”型弯曲状 *H pylori*(HE × 400).

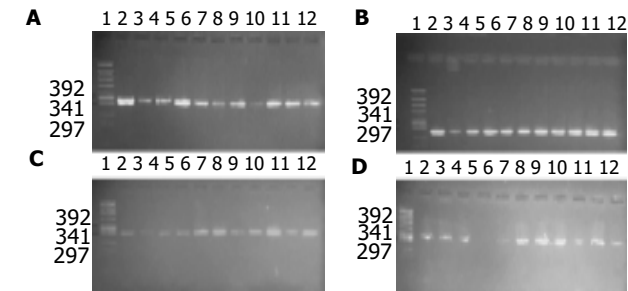


图 2 *H pylori* 基因分型鉴定(PCR 产物 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 1 为 DNA 分子标准). A: *cagA* 基因, 2-12 为 *cagA* 阳性(324 bp); B: *vacAs1* 基因, 2-12 为 *vacAs1* 阳性(259 bp); C: *vacAm1b* 基因, 2-12 为 *vacAm1b* 阳性(291 bp); D: *vacAm2* 基因, 5 为阴性; 其余为 *vacAm2* 阳性(352 bp).

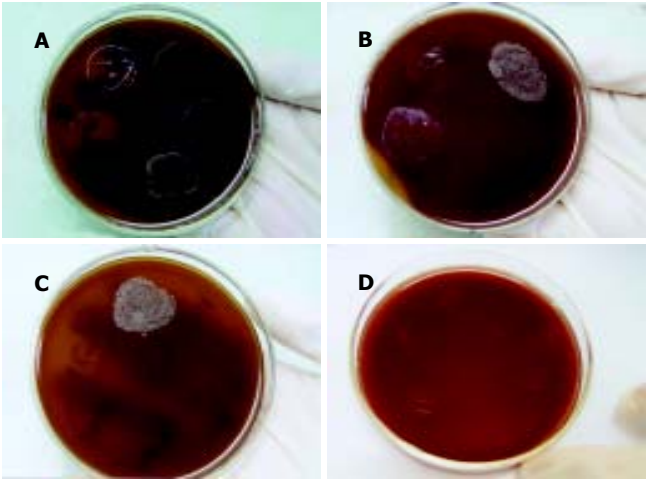


图 3 大蒜素对 *H pylori* 菌株的抑菌作用. A: 未加抗生素的阳性对照培养基上 5 株 *H pylori* 菌株出现接近融合生长; B: 2.5 mg/L 大蒜素, 部分 *H pylori* 菌株(3/5)被抑制的情况; C: 10 mg/L 大蒜素, 部分 *H pylori* 菌株(4/5)被抑制的情况; D: 40 mg/L 大蒜素, 全部 *H pylori* 菌株被抑制的情况.

3 讨论

目前普遍认为幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与多种胃肠道疾病的发生密切相关^[12-16]. *H pylori* 致病相关基因包括细胞毒素相关基因(*cagA*)和空泡毒素基因(*vacA*)等. *vacA* 基因又包括中间区(m 区)和信号区(s), 据此可将 *H pylori* 分为 *cagA*+/-, *vacAm1a*+/-, *vacAm1b*+/-, *vacAm1c*+/-, *vacAm2*+/-, *vacAs1a*+/-, *vacAs1b*+/- 及 *vacAs2*+/- 等多种基因亚型, 这些基因亚型又可以产生多种基因亚型的组合, 不同基因亚型与体外毒素活性水平及感染的临床结局密切相关^[17-23]. 根除 *H pylori* 可治疗 *H pylori* 相关性疾病^[24-28]. 目前使用的标准治疗方案存在着耐药率高、副作用大、患者依从性差、费用高等诸多问题. 如何进行抗 *H pylori* 药物的筛选, 寻找高效、低毒、廉价的抗 *H pylori* 疗法, 特别是挖掘祖国医学宝库、开发新型抗 *H pylori* 药物的研究等引人注目.

近年来发现大蒜素有抑制 *H pylori* 的作用. 但是其抑制 *H pylori* 的浓度范围没有统一的规范. 并且不同基因亚型的 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性是否存在差异则尚未见报道. 为研究 *H pylori* 对大蒜素的敏感性, 给患者提供较为理想的 *H pylori* 根除药物, 必须进行抗生素敏感性试验. 抗生素敏感性试验常使用最低抑菌浓度(MIC)这一指标, 较低的 MIC 表示此种抗生素更容易抑制此种微生物. 目前 *H pylori* 的抗生素敏感性试验方法很多, 琼脂稀释法在这些试验技术中是要求最高的, 也是惟一被美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)和美国食品及药品管理局(FAD)批准的试验方法本研究采用. 我们采用琼脂稀释法对 51 株 *H pylori* 分离株进行大蒜素体外药敏试验. 结果发现大蒜素对 51 株 *H pylori* 菌株表现出良好的抑菌效果, 总抑菌率达 92.2% (47/51), 其 MIC₅₀ 值为 7.97 mg/L, MIC 值范围在 1.25-40 mg/L, 并且其抗菌作用随着大蒜素浓度的增高而加强. 目前国际上尚无对大蒜素抗 *H pylori* 的体

外抑菌浓度范围的标准界定, 本尝试有可能为进一步的体内药敏试验用药剂量提供参考。

另外我们还利用目前广泛用于 *H pylori* 菌株基因型研究, 具有一定通用性和特异性的引物, 分别扩增 *cagA*, *vacAs*, *vacAm* 基因高度保守区域。然后研究不同 *cagA/vacA* 基因亚型 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性是否存在差异。结果发现, *cagA*+/*cagA*−, *vacAs*1+/*vacAs*1− 基因亚型的 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性无显著差异; *vacAm*1b+/*vacAm*1b− 及 *vacAm*2+/*vacAm*2− *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性组间差异有统计学意义: *vacAm*1b+ 基因亚型的 *H pylori* 菌株较 *vacAm*1b− 基因亚型的 *H pylori* 菌株对大蒜素敏感; *vacAm*2+ 基因亚型的 *H pylori* 菌株较 *vacAm*2− 基因亚型的 *H pylori* 菌株对大蒜素敏感; 不同 *cagA/vacA* 基因亚型组合的 *H pylori* 菌株对大蒜素敏感性不同: *cagA*+*vacAs*1+m1b+/*cagA*+*vacAs*1+m2+ 基因亚型组合的两组 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性无显著差异; *cagA*+*vacAs*1+m1b+/*cagA*+*vacAs*1−m1b−, *cagA*+*vacAs*1+m2+/*cagA*+*vacAs*1−m1b− 基因亚型组合的两组 *H pylori* 菌株对大蒜素的敏感性有显著差异; *cagA*+/*vacAs*1+m1b+, *cagA*+*vacAs*1+m2+ 基因亚型组合的 *H pylori* 菌株较 *cagA*+/*vacAs*1−m1b− *H pylori* 菌株对大蒜素敏感。此结果是否适用于其他抗 *H pylori* 药物还需在进一步的试验中得到验证。Doorn *et al* 报道, 兰索拉唑、胶体铋、四环素、大蒜素联合用药治疗不同 *cagA/vacA* 基因亚型 *H pylori* 菌株感染患者, 发现不同基因型的 *H pylori* 菌株对抗生素治疗具有不同的反应, s1/m1 和 s1/m2 型产毒素菌株(大多为 *cagA*+) 较 s2/m2 型非产毒素菌株(大多为 *cagA*−) 对治疗更为敏感。可能因为毒力不同的 *H pylori* 菌株能引起胃内不同的生理变化, 毒力强的菌株引起的炎症较重, 而抗生素在炎症黏膜可达到更高的浓度, 使之较易被根除。本试验中 *vacAm*1b+ 基因亚型的 *H pylori* 菌株较 *vacAm*1b− 基因亚型的 *H pylori* 菌株对大蒜素敏感; *vacAm*2+ 基因亚型的 *H pylori* 菌株较 *vacAm*2− 基因亚型的 *H pylori* 菌株对大蒜素敏感; *cagA*+*vacAs*1+m1b+, *cagA*+*vacAs*1+m2+ *H pylori* 菌株较 *cagA*+*vacAs*1−m1b− *H pylori* 菌株对大蒜素敏感, 可能因为这些亚型及组合的菌株毒力较强, 增生迅速, 因而对干扰细菌细胞的分裂、生长和代谢的大蒜素活性更为敏感。如果此型毒力强的 *H pylori* 菌株在宿主胃黏膜内定殖而未及时根治清除, 则有可能产生较严重的胃黏膜损伤, 进一步引起较严重的胃疾病, 甚至导致胃癌的发生。我们建议采取“因型施治”的原则, 充分发挥大蒜的药用价值, 有望为 *H pylori* 感染治疗开辟一条新的途径。

4 参考文献

- Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001;107:767-773
- 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
- Shirai Y, Wakatsuki Y, Kusumoto T, Nakata M, Yoshida M, Usui T, Iizuka T, Kita T. Induction and maintenance of immune effector cells in the gastric tissue of mice orally immunized to *Helicobacter pylori* requires salivary glands. *Gastroenterology* 2000;118:749-759
- 林三仁, 张莉. 幽门螺杆菌与胃癌关系的研究进展. 中华医学杂志 2004;84:1210-12112
- Locatelli A, Catapani WR, Junior CR, Silva CB, Waisberg J. Detection of anti-*Helicobacter pylori* antibodies in serum and duodenal fluid in peptic gastroduodenal disease. *World J Gastroenterol* 2004;10:2997-3000
- 周志韶, 马澄城, 廖赞豪, 赵毅, 郑永雄, 潘文雄, 黄盛宜. 广东潮阳地区海尔曼螺杆菌感染与食管疾病的相关性研究. 世界华人消化杂志 2004;12:1593-1595
- 陈世耀, 王吉耀. 从循证医学观点看胃食管反流病与幽门螺杆菌感染. 中华医学杂志 2004;84:1219-1220
- van der Ende A, Pan ZJ, Bart A, van der Hulst RW, Feller M, Xiao SD, Tytgat GN, Dankert J. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* populations in China and The Netherlands are distinct. *Infect Immun* 1998;66:1822-1826
- Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1995;270:17771-17777
- Atherton JC, Sharp PM, Cover TL, Gonzalez-Valencia G, Peek RM Jr, Thompson SA, Hawkey CJ, Blaser MJ. Vacuolating cytotoxin(*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. *Curr Microbiol* 1999;39:211-218
- 王辉, 高屹, 陈民钧. 简介美国 NCCLS 药敏试验法规(1999年1月版)的变动部分. 中华检验医学杂志 1999;22:318-320
- 张世强, 鲍勇, 祖茂衡. 幽门螺杆菌感染与原发肝癌关系的相关性研究. 中国肿瘤临床 2004;31:761-764
- 王伯军. 胆汁反流性胃炎的病因分析及与幽门螺杆菌关系. 中华消化杂志 2004;24:298-299
- 罗和生, 高振军, 操寄望, 余保平, 宋刘来, 周中银. 幽门螺杆菌感染与胃嗜酸性肉芽肿发病相关性的初步研究. 中华消化杂志 2004;24:247-248
- 郭继忠, 占强, 朱晓红, 夏敏, 尤一萍, 杜虎, 张国强, 严洁. 血清抗幽门螺杆菌热休克蛋白 60 抗体与慢性萎缩性胃炎的关系. 中华消化杂志 2004;24:246-247
- 陈星, 岑戎, 徐富星, 项平, 欧平安. 慢性胃炎结节状改变与幽门螺杆菌感染的关系研究. 中华消化内镜杂志 2004;21:89-91
- 钱可大, 朱永良. 幽门螺杆菌毒素相关蛋白 A 基因干扰细胞信息传导的机制. 中华医学杂志 2004;84:1217-1218
- 陶然, 方平楚, 刘海燕, 姜云水, 陈晶. 浙江地区幽门螺杆菌 *cagA* 基因 3' 区多态性研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2004;24:576
- Yang GF, Deng CS, Xiong YY, Gong LL, Wang BC, Luo J. Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: Association with *Helicobacter pylori cagA*(+) infection. *World J Gastroenterol* 2004;10:491-496
- Liu XL, Li SQ, Liu CJ, Tao HX, Zhang ZS. Antigen epitope of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin A. *World J Gastroenterol* 2004;10:2340-2343
- 朱永良, 杜勤, 钱可大, 方平楚, 郑树. 幽门螺杆菌 *CagA* C-端功能域特征及其生物学功能研究. 中华消化杂志 2004;24:278-281
- 魏金文, 张尤历, 吴莺, 许静. *CagA* 阳性幽门螺杆菌感染和血清胃泌素相关性探讨. 中华消化杂志 2004;24:245
- Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, de Thillot V, Just I, Ricci V, Solcia E, Van Obberghen E, Boquet P. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* 2000;19:6361-6370
- 郑宝轩, 赵东海. 雷尼替丁三联方案治疗幽门螺杆菌阳性十二指肠溃疡疗效观察. 中华消化内镜杂志 2003;20:417
- 何兴祥, 赵英恒, 郝元涛. CYP2C19 基因多态性对雷贝拉唑三联疗法根除幽门螺杆菌疗效的影响. 中华内科杂志 2004;43:13-15
- 吕宾, 王慧萍, 陈明涛, 范一宏, 孟立娜. 根除幽门螺杆菌对胃黏膜萎缩和肠化影响的随访研究. 中华内科杂志 2004;43:299-301
- 胡品津. 规范幽门螺杆菌感染的诊断和治疗. 中华内科杂志 2004;43:243
- 靖大道, 汪佩文, 陈洁, 周怡和, 王宁宁, 王兴鹏. 以雷贝拉唑为基础的短程三联或四联疗法根除幽门螺杆菌的随机对照研究. 中华消化杂志 2004;24:250-251

人血管能抑素 canstatin 基因的分子克隆

何小平, 李兆申, 屠振兴, 潘雪, 龚燕芳, 高军, 金晶

何小平, 李兆申, 屠振兴, 潘雪, 龚燕芳, 高军, 金晶, 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

何小平, 女, 1973-06-26 生, 江苏省灌南县人, 汉族. 主治医师, 2003 年第二军医大学博士生, 研究方向为肿瘤基因治疗.

上海市自然科学基金资助课题, No. 03JC14007

项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科. zsli@online.sh.cn

电话: 021-25070556 传真: 021-25074635

收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-19

Molecular cloning of human canstatin gene

Xiao-Ping He, Zhao-Shen Li, Zhen-Xing Tu, Xue Pan, Yan-Fang Gong, Jun Gao, Jing Jin

Xiao-Ping He, Zhao-Shen Li, Zhen-Xing Tu, Xue Pan, Yan-Fang Gong, Jun Gao, Jing Jin, Department of Gastroenterology, Affiliated Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China Supported by the Municipal Science Foundation of Shanghai, No. 03JC14007

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

Received: 2004-08-17 Accepted: 2004-09-19

Abstract

AIM: To clone human canstatin gene and to detect and analyze its coding sequence.

METHODS: The total RNA was extracted from human placenta. The canstatin gene fragment was synthesized and amplified from the total RNA by RT-PCR. pUCm-T vector was cloned into the RT-PCR product to obtain recombinant pUCm-T/canstatin. The pUCm-T/canstatin was then transformed into *E.coli* DH 5 α , and sequence of the gene was detected.

RESULTS: The extracted total RNA was separated into three clear bands indicating 28 S, 18 S, and 5 S after electrophoresis. The values of A_{260} and A_{280} were 0.879 and 0.410 respectively ($A_{260} : A_{280} = 2.095$). The concentration of total RNA was 1.8 g/L. The PCR product was the same as target gene canstatin. *Bam*HI and *Hind*III digestion proved the final product positive. The sequence of the cloned gene (684 bp) completely matched with that of canstatin gene in Genbank.

CONCLUSION: Human canstatin gene is successfully cloned, which establishes the foundation for further study of its anti-tumor activity.

He XP, Li ZS, Tu ZX, Pan X, Gong YF, Gao J, Jin J. Molecular cloning of human canstatin gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10): 2329-2332

摘要

目的: 克隆血管能抑素 canstatin 基因, 测定并分析其基因序列.

方法: 从人胎盘组织中提取总 RNA, 经逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增出 canstatin 基因, 克隆进载体 pUCm-T 获得重组质粒 pUCm-T/canstatin, 转化 *E.coli* DH 5 α , 挑选出阳性克隆, 测定基因序列.

结果: 从人胎盘组织中提取出 RNA, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示 3 条清晰条带, 分别对应 28 S, 18 S, 5 S. 分光光度计测定总 RNA 的 $A_{260}=0.879$, $A_{280}=0.410$, $A_{260} : A_{280} = 2.095$, 总 RNA 浓度为 1.8 g/L. RT-PCR 扩增产物与预期的目的基因 canstatin 长度一致. RT-PCR 产物与载体 pUCm-T 连接过夜后, 转化 *E.coli* DH 5 α , 在 LB 平板上生长出蓝色和白色菌落. 挑选 6 个白色菌落做酶切鉴定, 其中一个菌落经 *Bam*HI 酶切后, 只出现 1 条特异性条带, 位置与酶切前质粒相近, 而经 *Hind*III 酶切后, 出现 2 条特异性条带, 其中 1 条与酶切前质粒位置相近, 另 1 条与目的基因位置基本一致, 证实为阳性克隆. 测定该阳性克隆基因序列, 结果显示其与 Genbank 中公布的 canstatin 基因序列完全一致.

结论: 成功克隆了 canstatin 基因, 为进一步研究其抗肿瘤作用打下基础.

何小平, 李兆申, 屠振兴, 潘雪, 龚燕芳, 高军, 金晶. 人血管能抑素 canstatin 基因的分子克隆. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2329-2332

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2329.asp>

0 引言

新血管生成是肿瘤生长转移的关键步骤, 抗血管生成治疗以肿瘤新生血管为靶点, 目的是切断肿瘤生长转移所依赖的“命脉”, 已发展成重要抗癌策略^[1-5], 成为近年来肿瘤治疗领域的研究热点^[6-11]. Canstatin 是 2000 年由 Kamphaus *et al*^[12]发现的一种新的血管生成抑制素, 初步研究表明其具有抑制新生血管的形成, 抑制肿瘤生长作用, 受到广泛关注. 为深入研究 canstatin 抗血管生成和抗肿瘤作用, 我们克隆了其基因序列.

1 材料和方法

1.1 材料 *E.coli* DH 5 α 由本实验室保存. 克隆质粒 pUCm-T 购自上海申能博彩生物科技有限公司; 限制性内切酶

*Bam*HI, *Hind*III, T4 DNA 连接酶及 DNA 分子大小标准购于 NEB 公司(基因公司代理); Trizol 购自晶美公司; RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; 胶回收试剂盒购自上海宾国医疗科技有限公司; IPTG, X-gal, 质粒回收试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司. 胎盘组织自本院妇产科一剖腹产产妇获得. 引物根据 GenBank 中报告的 *canstatin* 序列设计而成. 上下游引物 5'-端分别携带 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切位点, 由上海生工生物工程公司合成. 上游引物: 5'-CGGGATCCTGTCAGCATCGGCTACCTC-3' 下游引物: 5'-CCCAAGCTTCAGGTTCTTCATGCACAC-3'.

1.2 方法 将液氮冻存的新鲜胎盘组织约 100 mg 放入研钵中, 倒入少许液氮, 尽力研磨使其成为粉末状. Trizol 一步法提取总 RNA, 分光光度法测定 RNA 纯度和量. 取胎盘组织总 RNA, 按照 RT-PCR 试剂盒提供的方法扩增 *canstatin* 基因. 反应体系为: 10 × 一步法 PCR 反应缓冲液 5 μL; 25 mmol/L MgCl₂ 10 μL; 10 mmol/L dNTP 5 μL; 40 MU/L 核糖核酸酶抑制剂 1 μL; 5 MU/L AMV 逆转录酶 1 μL; 5 MU/L AMV-Optimized Taq DNA 聚合酶 1 μL; 25 μmol/L 上下游引物各 1 μL; 1.8 g/L RNA 模板 1 μL; 无核酸酶双蒸水 24 μL. RT-PCR 反应条件: 50 °C 40 min, 94 °C 2 min, 94 °C 40 s, 52.6 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35 次循环后, 72 °C 延伸 5 min. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物. 按照胶回收试剂盒提供的方法, 回收目的基因片段. PCR 产物的克隆. 连接反应体系 10 μL, 为连接缓冲液 1 μL, pUCm-T 1.5 μL (50 ng), 纯化 PCR 产物 6.5 μL, T4 DNA 连接酶 1 μL, 16 °C 连接过夜, 得到连接产物 pUCm-T/*canstatin*. 取 3 μL 上述连接反应液电转化感受态 *E. coli* DH5 α. 涂布铺有 IPTG 及 X-gal 的含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板, 37 °C 培养过夜, 进行蓝白斑筛选. 挑取白色菌落 6 个, 接种于含 5 μL 0.1 g/L 氨苄青霉素的 5 mL LB 培养液中, 37 °C 振荡培养过夜. 用按试剂盒提供的碱裂解法制备质粒, 用 *Bam*HI, *Hind*III 分别做 2 次单酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定阳性克隆, 命名为 pUCm-T/*canstatin*. 取含有重组质粒的菌液 1 mL, 以 M13-/T7 为序列分析引物正反两端对 pUCm-T 中目的基因进行序列分析, 所测序列与 GenBank 中 *canstatin* 基因序列进行分析比较.

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增人 *canstatin* 基因 总 RNA 抽提产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪下见 3 条清晰条带, 分别为 28 S, 18 S, 5 S(图 1). 分光光度计测定 50 倍稀释的总 RNA $A_{260}=0.879$, $A_{280}=0.410$, $A_{260}:A_{280}=2.095$, 根据公式, 计算总 RNA 浓度 = $40 \times A_{260} \times$ 稀释倍数 / 1 000 = 1.8 g/L. RT-PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, PCR 产物长度与目的基因 *canstatin* cDNA 长度 684 bp 一致(图 2).



图 1 RNA 提取产物电泳分析.

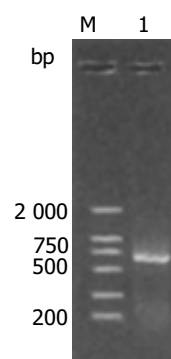


图 2 人 *canstatin* RT-PCR 扩增产物. M: DNA 标准; 1: RT-PCR 扩增产物.

2.2 PCR 产物的克隆及酶切鉴定 纯化的 PCR 产物在连接酶的作用下直接克隆到 pUCm-T 载体中, 经蓝白斑筛选后, 挑选 6 个白色克隆, 小量提取质粒, 分别经 *Bam*HI 和 *Hind*III 做两次单酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 其中一个克隆, 经 *Bam*HI 酶切后, 只出现 1 条特异性条带, 位置与酶切前质粒相近, 而经 *Hind*III 酶切后, 出现 2 条特异性条带, 其中 1 条与酶切前质粒位置相近, 另 1 条与目的基因大小基本一致, 证实扩增片段插入该菌落载体中, 且为反向连接(图 3).

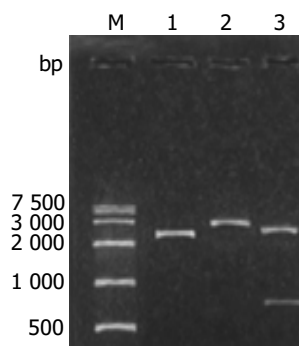


图 3 pUCm-T/*canstatin* 质粒的酶切鉴定. M: DNA 标准; 1: 质粒 pUCm-T/*canstatin*; 2: *Bam*HI 酶切质粒; 3: *Hind*III 酶切质粒.

2.3 人 *canstatin* cDNA 序列分析 挑选阳性克隆, 碱裂解法抽提重组质粒 pUCm-T/*canstatin*. 测序结果显示插入片段为 684 bp, 与 GenBank 中公布的 *canstatin* 基因序列进行匹配, 二者同源性为 100%(图 4, 5).

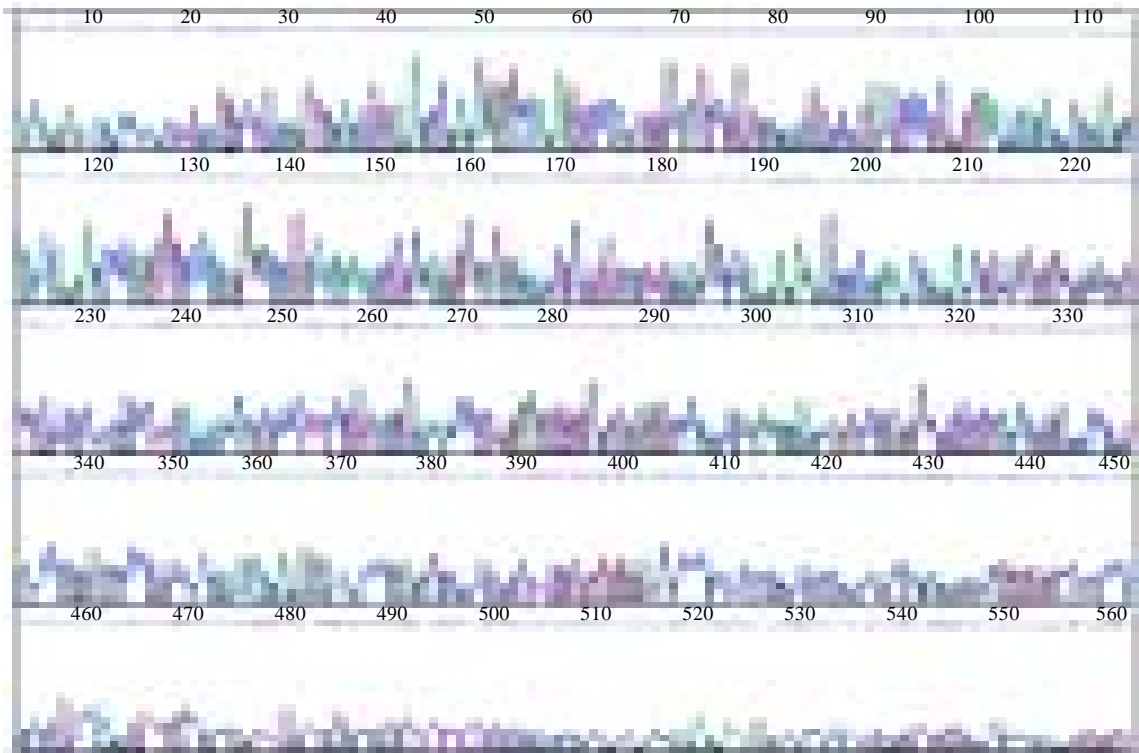


图4 正向引物 M13- 测序结果.

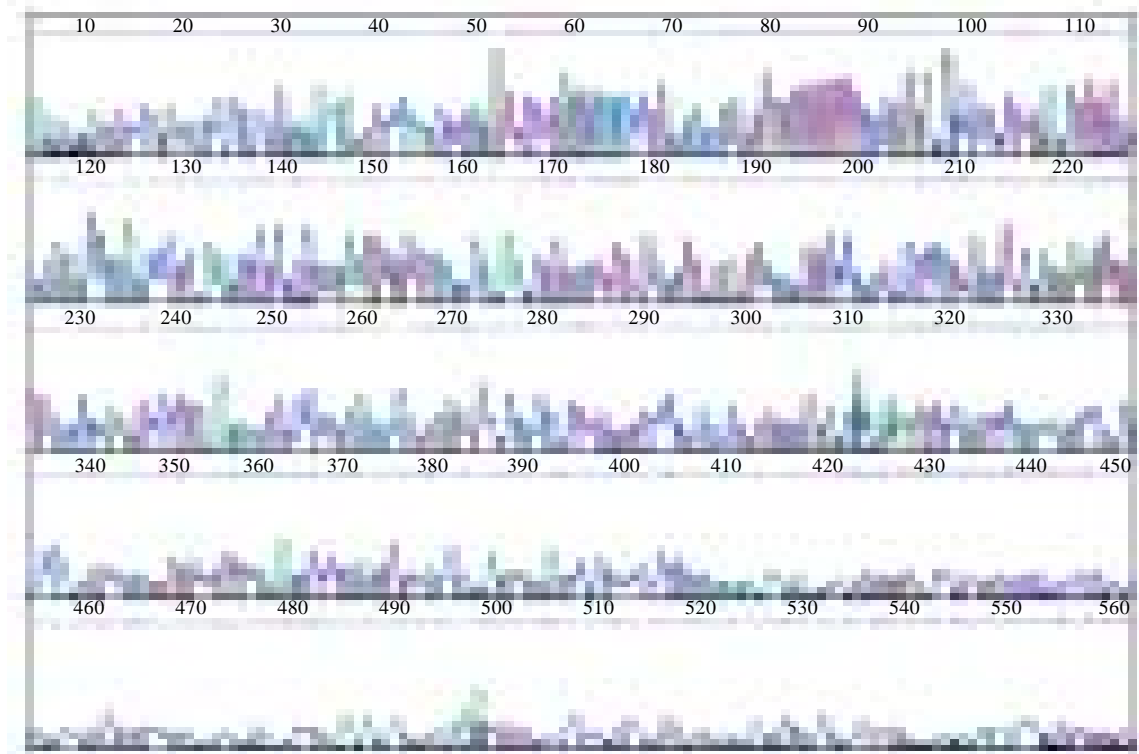


图5 反向引物 T7 测序结果.

3 讨论

随着对肿瘤血管生成分子机制认识的不断深入，抗血管生成治疗作为肿瘤治疗的新视野，引起医学界极大的热情和关注. 理论上，对多数实体瘤，该方法在多方面优于使用细胞毒药物^[13-14]: 首先是毒性低; 其次肿瘤内血管不成熟，对药物反应较敏感; 某一根毛细血管塌

陷使血流中断，可能会产生放大效应; 而且内皮细胞遗传性状稳定，不同于肿瘤细胞，产生耐药的机会少. 从 Lewis 肺癌小鼠的血清和尿液中分离得到血管抑素后^[15]，很快又发现了抗血管生成活性更强的内皮抑素^[16-19]. IV型胶原是血管基底膜的主要成分，可以促进细胞黏附，迁移，分化和生长，而 IV 型胶原网络的装配及基底膜

的组织主要由IV型胶原C端球形非胶原区(NC1)调控^[20-22]。Canstatin系IV型胶原 $\alpha 2$ 链NC1结构域,是继血管抑素和内皮抑素后新发现的又一内源性血管生成抑制因子。Kamphaus *et al*^[12]发现, canstatin可呈剂量依赖性地抑制体外培养的牛肺主动脉内皮细胞和人脐静脉内皮细胞的增生,而对肾癌细胞,前列腺癌细胞,人肾胚胎细胞等则无增生抑制作用。Canstatin还能抑制内皮细胞的迁移和管状结构的形成,诱导内皮细胞凋亡,抑制新生血管生成。此外, canstatin还抑制大鼠异种移植人前列腺肿瘤的生长,作用强于endostatin。我国学者贺国安 *et al*^[23-25]研究表明, canstatin C端片段能特异性抑制内皮细胞增生,从而抑制血管生成,抑制小鼠体内肿瘤生长,而其N端片段则有诱导内皮细胞凋亡的活性。Canstatin作用机制尚未完全明了, Panka *et al*^[26]研究表明其诱导细胞凋亡作用与抑制Akt磷酸化有关。Canstatin的生物学作用已引起广泛关注,有望成为抗肿瘤新药。

研究表明, RT-PCR中,以靶基因特异序列为反转录引物合成cDNA进行靶基因扩增,比Oligo dT为引物进行扩增有更好的特异性^[27-28]。因此,我们根据GenBank中报告的canstatin序列设计了上下游引物,顺利克隆出目的基因。我们选用pUCm-T作为克隆质粒,因为其具有如下优点: pUCm-T的多克隆位点和 β -半乳糖苷酶阅读框架大大方便了克隆和蓝白斑筛选;同时利用引物和质粒上的BamHI和HindIII酶切位点,通过2次单酶切不仅能做鉴定还可以明确PCR产物在载体上的连接方向;插入的PCR产物可以用M13通用引物和T7启动子引物进行测序。构建好的克隆质粒pUCm-T/canstatin,经酶切鉴定和序列分析测定,均证实克隆成功。Canstatin基因克隆的成功,为进一步深入研究canstatin作用及其机制,开发其临床应用价值奠定了基础。

4 参考文献

- Ranieri G, Gasparini G. Angiogenesis and angiogenesis inhibitors: a new potential anticancer therapeutic strategy. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2001;1:241-253
- Dudek AZ, Pawlak WZ, Kirstein MN. Molecular targets in the inhibition of angiogenesis. *Expert Opin Ther Targets* 2003;7:527-541
- Fishman M, Antonia S. Novel therapies for renal cell carcinoma-an update. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12:593-609
- Nesbit M. Abrogation of tumor vasculature using gene therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:45-49
- Wang ZQ, Li JS, Lu GM, Zhang XH, Chen ZQ, Meng K. Correlation of CT enhancement, tumor angiogenesis and pathologic grading of pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2100-2104
- Webb CP, Vande Woude GF. Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neurooncol* 2000;50:71-87
- Morioka H, Weissbach L, Vogel T, Nielsen GP, Faircloth GT, Shao L, Hornicek FJ. Antiangiogenesis treatment combined with chemotherapy produces chondrosarcoma necrosis. *Clin Cancer Res* 2003;9:1211-1217
- Camp-Sorrell D. Antiangiogenesis: the fifth cancer treatment modality? *Oncol Nurs Forum* 2003;30:934-944
- Qin RY, Fang RL, Gupta MK, Liu ZR, Wang DY, Chang Q, Chen YB. Alteration of somatostatin receptor subtype 2 gene expression in pancreatic tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004;10:132-135
- Caceres W, Gonzalez S. Angiogenesis and cancer: recent advances. *P R Health Sci J* 2003;22:149-151
- Shimamura M, Nagasawa H, Ashino H, Yamamoto Y, Hazato T, Uto Y, Hori H, Inayama S. A novel hypoxia-dependent 2-nitroimidazole KIN-841 inhibits tumour-specific angiogenesis by blocking production of angiogenic factors. *Br J Cancer* 2003;88:307-313
- Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, Hopfer H, Ramchandran R, Torre A, Maeshima Y, Mier JW, Sukhatme VP, Kalluri R. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* 2000;275:1209-1215
- Kieran MW, Billett A. Antiangiogenesis therapy: current and future agents. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001;15:835-851
- Davis DW, McConkey DJ, Abbruzzese JL, Herbst RS. Surrogate markers in antiangiogenesis clinical trials. *Br J Cancer* 2003;89:8-14
- Cao Y, Cao R, Veitonmaki N. Kringle structures and antiangiogenesis. *Curr Med Chem Anti Canc Agents* 2002;2:667-681
- Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:97-107
- Sim BK, MacDonald NJ, Gubish ER. Angiostatin and Endostatin: Endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:181-190
- Kirsch M, Schackert G, Black PM. Angiogenesis, metastasis, and endogenous inhibition. *J Neurooncol* 2000;50:173-180
- Ren B, Hoti N, Rabasseda X, Wang YZ, Wu M. The antiangiogenic and therapeutic implications of endostatin. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25:215-224
- Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi K, Volk R, Zamborsky ED, Herman S, Sarkar PK, Ericksen MB, Dhanabal M, Simons M, Post M, Kufe DW, Weichselbaum RR, Sukhatme VP, Kalluri R. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res* 2000;60:2520-2526
- Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, Holthaus KA, Grunkemeyer JA, Ericksen MB, Hopfer H, Xiao Y, Stillman IE, Kalluri R. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem* 2000;275:21340-21348
- Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, Holthaus KA, Hopfer H, Chandamuri BR, Kharbada S, Kalluri R. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem* 2001;276:15240-15248
- He GA, Luo JX, Zhang TY, Hu ZS, Wang FY. The C-terminal domain of canstatin suppresses in vivo tumor growth associated with proliferation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:354-360
- He GA, Luo JX, Zhang TY, Wang FY, Li RF. Canstatin-N fragment inhibits in vitro endothelial cell proliferation and suppresses in vivo tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:801-805
- He GA, Luo JX, Zhang TY, Hu ZS, Gu QL. Expression and purification of the N-domain of human canstatin and its bioactivity. *Shengwu Xue Yu Shengwu Xue Bao* 2003;35:483-487
- Panka DJ, Mier JW. Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:37632-37636
- Rak J, Filmus J, Kerbel RS. Reciprocal paracrine interaction between tumor cells and endothelial cells: the "angiogenesis progression" hypothesis. *Eur J Cancer* 1996;32:2438-2450
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumor-genesis. *Cell* 1996;86:353-364

地龙 2 号对大鼠肝纤维化 TGF- β 1, MMP-13 及 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达的影响

陈洪, 陆亚琴, 刘顺英, 张治国, 陈平圣

陈洪, 刘顺英, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009
陆亚琴, 广州卫生学校内科教研室 广东省广州市 510180
张治国, 南京农业大学生命科学学院 江苏省南京市 210095
陈平圣, 东南大学医学院病理生理学教研室 江苏省南京市 210009
陈洪, 男, 1964-05-08 生, 安徽省合肥市人, 1985 年南通医学院本科毕业, 1999 年东南大学医学院硕士研究生毕业, 副主任医师, 硕士生导师, 日本广岛大学研究生院客座研究员, 主要从事肝病研究。
江苏省中医药管理局科研项目, No. Z-019
项目负责人: 陈洪, 210009, 江苏省南京市丁家桥 87 号, 东南大学附属中大医院消化科。njchenhong66@yahoo.com.cn
电话: 025-83272034
收稿日期: 2004-06-19 接受日期: 2004-07-27

Effects of No.2 earthworm extract on expression of TGF- β 1, TIMP-1 and MMP-13 in rats with hepatic fibrosis

Hong Chen, Ya-Qin Lu, Shun-Ying Liu, Zhi-Guo Zhang, Ping-Sheng Chen

Hong Chen, Shun-Ying Liu, Department of Gastroenterology, Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Ya-Qin Lu, Department of Internal medicine, Guangzhou Health School, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China
Zhi-Guo Zhang, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China
Ping-Sheng Chen, Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Supported by Chinese Medical Bureau of Jiangsu Province, No.Z-019
Correspondence to: Dr. Hong Chen, Department of Gastroenterology, Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, 87 Dingjiaqiao, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. njchenhong66@yahoo.com.cn
Received: 2004-06-19 Accepted: 2004-07-27

Abstract

AIM: To investigate the effects of No.2 Earthworm extract (EE2) on the expression of TGF- β 1, TIMP-1 and MMP-13 of in rats with hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride.

METHODS: Fifty-two male Wistar rats were randomly divided into 6 groups: normal group (N group, 6 rats), normal control group (NC group, 6 rats), model group (M group, 10 rats), positive control group (PC group, 10 rats), high dose of EE2 group (Eh group, 10 rats) and low dose of EE2 group (El group, 10 rats). The rats in M, PC, Eh and El groups were given the mixture of CCl₄ and peanut oil (2 : 3 except the first dose) to induce liver fibrosis, 2 mL/kg sc twice a week. Eh and El groups were also treated with high (0.05 g/kg) and low (0.025 g/kg) doses of EE2, respectively, ig once a day; PC group was treated with colchicine, 0.1 mg/kg ig once a day; M and NC groups

were given distilled water, 10 mL/kg ig once a day; and NC group was only administrated with peanut oil, 2 mL/kg sc twice a week. At the end of 8 wk all the survived rats were killed. The expression of mRNA and proteins of TGF- β 1, MMP-13 and TIMP-1 were detected by RT-PCR and immunohistochemistry.

RESULTS: The levels of mRNA and protein of TGF- β 1 and TIMP-1 in liver were significantly reduced in Eh and El groups compared with those in M group (TGF- β 1 mRNA: 0.68 ± 0.16 vs 0.90 ± 0.29 , 0.66 ± 0.14 vs 0.90 ± 0.29 , the latter $P < 0.05$; TIMP-1 mRNA: 1.01 ± 0.22 vs 2.48 ± 1.18 , 1.21 ± 0.38 vs 2.48 ± 1.18 , $P < 0.01$. TGF- β 1 protein: 3.14 ± 2.67 vs 8.22 ± 2.99 , 3.60 ± 1.90 vs 8.22 ± 2.99 , $P < 0.01$; TIMP-1 protein: 3.57 ± 2.23 vs 7.56 ± 3.40 , 3.30 ± 2.67 vs 7.56 ± 3.40 , $P < 0.01$); while the levels of mRNA and protein of MMP-13 in liver significantly increased in Eh and El groups compared with those in M group (MMP-13 mRNA: 1.69 ± 0.75 vs 0.62 ± 0.21 , 1.82 ± 0.71 vs 0.62 ± 0.21 , $P < 0.01$; MMP-13 proteins: 7.71 ± 1.25 vs 4.67 ± 2.45 , 8.50 ± 2.88 vs 4.67 ± 2.45 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: EE2 significantly inhibit the development of liver fibrosis in rats induced by CCl₄, and its underlying mechanism might relate to decreasing the expression of TGF- β 1 and TIMP-1, and increasing that of MMP-13.

Chen H, Lu YQ, Liu SY, Zhang ZG, Chen PS. Effects of No.2 earthworm extract on expressions of TGF- β 1, TIMP-1 and MMP-13 in rats with hepatic fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(10):2333-2337

摘要

目的: 研究蚯蚓提取物地龙 2 号对实验性肝纤维化大鼠转化生长因子- β 1(TGF- β 1), 基质金属蛋白酶-13(MMP-13) 及基质金属蛋白酶组织抑制物-1(TIMP-1)mRNA 和蛋白表达的影响。

方法: 采用四氯化碳皮下注射诱导大鼠肝纤维化模型。♂ Wistar 大鼠 52 只随机分成 6 组: 正常组、阴性对照组、模型组、阳性对照组、地龙 2 号大剂量组和小剂量组; 8 wk 末, 用免疫组织化学染色法及 RT-PCR 检测肝组织中 TGF- β 1, MMP-13, TIMP-1 mRNA 和蛋白的表达。

结果: 地龙 2 号大、小剂量组肝组织内 TGF- β 1 及 TIMP-1 mRNA(TGF- β 1: 0.68 ± 0.16 vs 0.90 ± 0.29 , 0.66 ± 0.14 vs 0.90 ± 0.29 , 后者 $P < 0.05$; TIMP-1: 1.01 ± 0.22 vs 2.48 ± 1.18 , 1.21 ± 0.38 vs 2.48 ± 1.18 , $P < 0.01$)及蛋白表达均显著低于模型组(TGF- β 1: 3.14 ± 2.67 vs $8.22 \pm$

2.99, 3.60 ± 1.90 vs 8.22 ± 2.99 , $P < 0.01$; TIMP-1: 3.57 ± 2.23 vs 7.56 ± 3.40 , 3.30 ± 2.67 vs 7.56 ± 3.40 , $P < 0.01$, 而 MMP-13 mRNA (1.69 ± 0.75 vs 0.62 ± 0.21 , $P < 0.01$) 及蛋白表达则明显高于模型组 (7.71 ± 1.25 vs 4.67 ± 2.45 , $P < 0.01$, 8.50 ± 2.88 vs 4.67 ± 2.45 , $P < 0.01$).

结论: 地龙2号可下调 TGF- β 1, TIMP-1 mRNA 及蛋白的表达, 并上调 MMP-13 mRNA 及蛋白的表达, 从而抑制或减轻肝纤维化的形成.

陈洪, 陆亚琴, 刘顺英, 张治国, 陈平圣. 地龙2号对大鼠肝纤维化 TGF- β 1, MMP-13 及 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12(10): 2333-2337

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2333.asp>

0 引言

肝纤维化是肝纤维组织的生成超过了降解, 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝脏中过度沉积所致. 大量研究表明胶原酶、纤溶酶等参与了ECM的降解^[1-2]. 地龙2号是采用独特生物工程技术从地龙中提取的有效活性成分, 含有蚯蚓纤溶酶及蚯蚓胶原酶. 研究发现地龙2号可以抑制大鼠肝内纤维组织的形成, 减轻肝细胞的损害, 明显降低血中透明质酸和层粘连蛋白^[3]. 我们研究大鼠肝纤维化形成过程中地龙2号对肝组织内 TGF- β 1, MMP-13 及 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar 大鼠 52 只, 体质量 160 ± 10 g, 购自河南医科大学实验动物中心. 地龙2号由南京农业大学生命科学院张治国教授惠赠, 主要含有蚯蚓纤溶酶和蚯蚓胶原酶, 提取方法为: 赤子爱胜洗净、匀浆、生理盐水抽提、离心取上清, (NH₄)₂SO₄ 盐析、离心去杂蛋白和核酸, 上清超滤脱盐、DEAE-纤维素层析、洗脱液超滤浓缩, 通过 Sephadex G75 柱、第1峰系胶原酶活性峰、第二峰为纤溶酶活性峰、合并2个蛋白峰、超滤浓缩、冷冻干燥. 冻干粉含纤维蛋白溶解酶-尿激酶 35 U/mg, 含胶原酶 52 U/mg; CCl₄ 由上海四星医药科技工贸公司出品; 精制花生油由山东鲁花集团出品; 秋水仙碱系昆明制药有限公司产品(1 mg/片); 后两药临用前用单蒸水稀释. 兔抗大鼠 TGF- β 1 多克隆抗体、兔抗大鼠 MMP-13 多克隆抗体及兔抗大鼠 TIMP-1 多克隆抗体

均购自武汉博士德生物工程有限公司, 即用型 SP 免疫组化试剂盒购自福州迈新试剂公司, DAB 购自北京中山生物公司. RT-PCR 两步法试剂盒购自 TAKARA 公司. Trizol 购自 Sangon 公司, TGF- β 1, MMP-13, TIMP-1, G3PDH 基因序列(表 1), 由上海生工公司合成.

1.2 方法 ♂ Wistar 大鼠 52 只随机分成: 正常组(N) 6 只, 阴性对照组(NC) 6 只, 模型组(M) 10 只, 阳性对照组(PC) 10 只, 地龙2号大剂量组(Eh) 10 只, 地龙2号小剂量组(EI) 10 只共 6 组. M, PC, Eh, EI 组按 2:3(V:V) 的比例给予 CCl₄ + 花生油, 2 mL/kg, sc, 2 次/wk, 共 8 wk (其中首剂按 3:1, 3 mL/kg 给予, 后按 2:3, 2 mL/kg 给予); NC 组只给予花生油, 2 mL/kg, sc, 2 次/wk, 8 wk. 地龙2号和秋水仙碱溶于单蒸水, 每日 10 mL/kg 给药; Eh 和 EI 组同时用地龙2号灌胃, 每日 0.05 g/kg 和 0.025 g/kg. PC 组给予秋水仙碱每日灌胃 0.1 mg/kg. M 和 NC 组给予单蒸水每日灌胃 10 mL/kg. 所有动物都给予自来水及大鼠饲料喂养, 每 12 h 灯照及黑暗交替. 于 8 wk 末处死大鼠, 分别切除同一解剖部位的肝脏于 40 g/L 中性缓冲甲醛中固定 16 h, 3 d 内石蜡包埋备组织病理学检测; 余下肝脏于液氮中速冻, -70 °C 冰箱内保存, 备提取肝组织 RNA.

1.2.1 免疫组化检测 采用 SP 法, 组织常规脱蜡脱水, 30 mL/L H₂O₂ 去除内源性过氧化物酶, 0.1 mol/L 枸橼酸盐缓冲液微波处理, 马血清封闭非特异性抗原, 分别滴加兔抗大鼠多克隆抗体 TGF- β 1(1:100)、MMP-13(1:100)及 TIMP-1(1:150), 4 °C 过夜, 阴性对照以 PBS 代替一抗, 后依次加入羊抗兔抗体 IgG, 辣根酶标记的链霉卵白素工作液进行反应, 用 DAB 显色、脱水、透明, 中性树胶封片, 分别检测组织中 TGF- β 1, MMP-13 及 TIMP-1 的表达. 阳性片细胞胞质中出现棕黄色, 阴性片无着色. 免疫组化结果半定量判断参照^[4]略修改, 每张切片不同部位随机观察五个高倍镜视野分别记录显色程度和显色范围. 显色程度分弱+, 中++, 强+++ 表示. 显色范围分: 显色范围占高倍视野 <1/4 为 +, 占 1/4-2/4 为 ++, 占 2/4-3/4 为 +++, >3/4 为 +++++. 然后将每个高倍视野显色程度和范围换算成“显色指数”, 显色指数 = 显色程度 × 显色范围(+, ++, +++, +++++ 分别按 1, 2, 3, 4 分计算). 取均数为每一种类蛋白表达的最终显色指数.

1.2.2 TGF- β 1, MMP-13 及 TIMP-1 的 mRNA 表达 取 100 mg 冻存肝脏标本放入 0.5 mL 玻璃匀浆器中, 加

表1 引物序列及大小

Primers	Sense	Anti-sense	Length(bp)
TGF- β 1	5' -TATAGCAACAATTCCTGGCG-3'	5' -CATGGTGGTGAAGACGCCAG-3'	165
MMP-13	5' -TGACTATGCGTGGCTGGAA-3'	5' -AAGCTGAAATCTTGCCCTTGA-3'	355
TIMP-1	5' -CCACAGATATCCGGTTCGCCTACA-3'	5' -GCACACCCACAGCCAGCACTAT-3'	218
G3PDH	5' -CCCTTCATTGACCTCAACTACATGG-3'	5' -CATGGTGGTGAAGACGCCAG-3'	209

Trizol 1 mL 室温下匀浆, 抽提组织 RNA, 加氯仿 0.2 mL, 4 °C, 14 000 r 低温离心 15 min, 取上清 0.4 mL 等体积异丙醇放置 -20 °C 冰箱内 20 min, 4 °C, 14 000 r 低温离心 15 min, 750 mL/L 乙醇 0.7 mL 洗涤 2 次, 室温下晾干, 加灭菌的 1 g/L DEPC 水 25 μ L 和 0.5 μ L RNA 抑制酶, 紫外分光光度仪检测吸光度 A 值, -70 °C 冰箱内保存. 取 RNA 2 μ g, 70 °C 6 min, 0 °C 5 min 预变性, 加入 5 \times Buffer 4 μ L, Oligo(dT)18 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, Rnasin 0.5 μ L, AMV 1 μ L, 无 Rnase 酶水补至 20 μ L, 42 °C 1 h, 99 °C 5 min, 冰浴 10 min 进行逆转录. 分装每管 4 μ L, 加入 10 \times Buffer 2 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1-2 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L、Taq 酶 1 U、Pimer 1 μ L 加双蒸水至 25 μ L, 置于 PCR 仪内进行扩增(引物序列及大小见表 1, 各引物的扩增条件见表 2). PCR 产物经 18 g/L 脂糖凝胶, 60 mV, 30 mA 下电泳. 电泳结果经 FR-980 生物电泳图像分析仪进行 PCR 产物半定量分析. TGF- β 1, MMP-13, TIMP-1 mRNA 相对含量分别用积分光密度值与 G3PDH 的积分光密度值的比值表示.

统计学处理 用 SPSS10.0 软件包统计分析, 计量资料以 mean \pm SD 表示, 方差齐用多组间均数两两比较用单因素方差分析, LSD 法, 方差不齐用秩和检验, 多样本两两比较用 Nemenyi 法进行统计分析, 双侧 $\alpha=0.05$ 为显著性检验水准.

表2 PCR 扩增条件

mRNA	Enzyme	Denaturing temp (°C)	Annealing temp (°C)	No. of cycles	25 mmol/L MgCl ₂ (μ L)
TGF- β 1	Taq TM	95	52	35	1.8
MMP-13	DyNAzyme TM	94	52	30	1.2
TIMP-1	Taq TM	95	60	35	1.5
G3PDH	Taq TM	95	52	30	1.6

2 结果

2.1 TGF- β 1, MMP-13 和 TIMP-1 的 mRNA 表达 TGF- β 1 mRNA 表达在 M, PC, Eh, EI 组较 N, NC 组均明显升高, 与 M 组相比 Eh 和 EI 组均下降, 后者 $P<0.05$ (表 3, 图 1A). TIMP-1 mRNA 表达在 M, PC, Eh,

表3 TGF- β 1、MMP-13 及 TIMP-1 mRNA 在各组的表达

分组	<i>n</i>	TGF- β 1	MMP-13	TIMP-1	MMP-13/TIMP-1
N	6	0.38 \pm 0.09	0.52 \pm 0.14	0.44 \pm 0.07	1.17 \pm 0.25
NC	6	0.37 \pm 0.17	0.51 \pm 0.13	0.50 \pm 0.10	1.05 \pm 0.29
M	9	0.90 \pm 0.29	0.62 \pm 0.21	2.48 \pm 1.18	0.34 \pm 0.28
PC	8	0.79 \pm 0.2	0.60 \pm 0.16 ^d	1.48 \pm 0.64 ^c	0.45 \pm 0.17 ^d
Eh	7	0.68 \pm 0.16	1.69 \pm 0.75 ^b	1.01 \pm 0.22 ^b	1.69 \pm 0.71 ^b
EI	10	0.66 \pm 0.14 ^a	1.82 \pm 0.71 ^b	1.21 \pm 0.38 ^b	1.65 \pm 0.94 ^b

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs M 组; ^c $P<0.05$ vs Eh 组; ^d $P<0.01$ vs Eh 及 EI 组.

EI 组较 N, NC 组均明显升高, Eh 和 EI 组下降与 M 组相比 $P<0.01$, 与 PC 组相比 $P<0.05$ (表 3, 图 1B). MMP-13 mRNA 表达在 M, PC 组升高不明显, Eh, EI 组升高显著, 与 M, PC 组相比 $P<0.01$ (表 3, 图 1C). MMP-13/TIMP-1 mRNA 在 M, PC 组较 N, NC 组明显降低, Eh 和 EI 组则显著升高, 与 M, PC 组相比 $P<0.01$ (表 3).

2.2 TGF- β 1, MMP-13 和 TIMP-1 蛋白表达 N 及 NC 组 TGF- β 1 未见表达; M 组 TGF- β 1 在汇管区和纤维隔中染色明显加深, 主要见于肝脏星状细胞和炎性细胞中, 呈染色较深的棕黄色; Eh 及 EI 组在纤维隔内间质细胞和炎细胞阳性染色程度减轻, 阳性细胞数目减少, 与 M 组相比 $P<0.01$; PC 组与 M 组相比, 无显著性差异(表 4, 图 2A, B). N 及 NC 组 MMP-13 在汇管区的血管壁和胆管壁周围有阳性染色. M 组阳性染色多集中于纤维间隔、中央静脉周围、肝窦处的间质细胞胞质棕黄色着色明显可见, 而在 Eh 及 EI 组, 尤以纤维间隔及肝窦处的间质细胞胞质棕黄色着色明显增多, 与 M 组相比, MMP-13 的表达显著升高, 前者 $P<0.05$, 后者 $P<0.01$ (表 4, 图 2C, D). N, NC 组 TIMP-1 在汇管区的血管壁和胆管壁周围有少量阳性染色. M 组 TIMP-1 阳性染色表达部位和 MMP-13 组一致, M 组可见大量表达, 与 N 及 NC 组相比 $P<0.01$; Eh 及 EI 组仅见汇管区和纤维间隔中有少量较淡的阳性染色, 与 M 组相比表达明显下降, $P<0.01$. PC 组与 M 组相比无统计学意义(表 4, 图 2E, F).

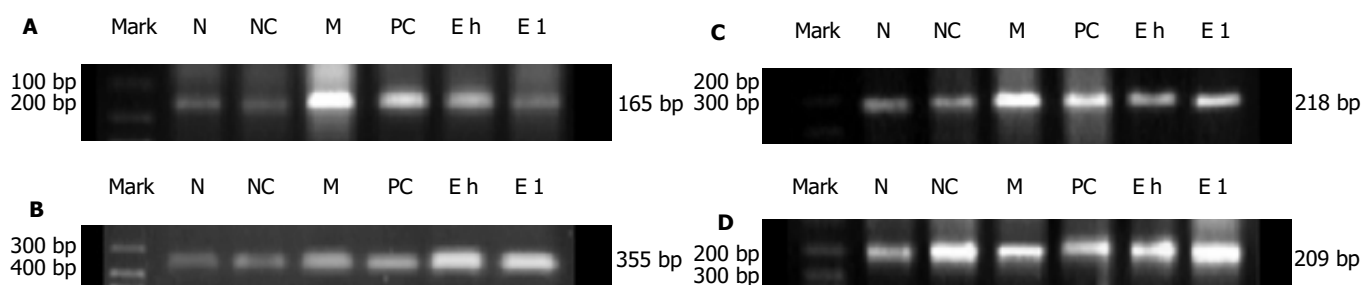


图1 TGF- β 1, MMP-13 和 TIMP-1 的 mRNA 在各组大鼠肝组织中的表达. A: TGF- β 1 mRNA 在各组的表达; B: MMP-13 mRNA 在各组的表达; C: TIMP-1 mRNA 在各组的表达; D: G3PDH mRNA 在各组的表达.

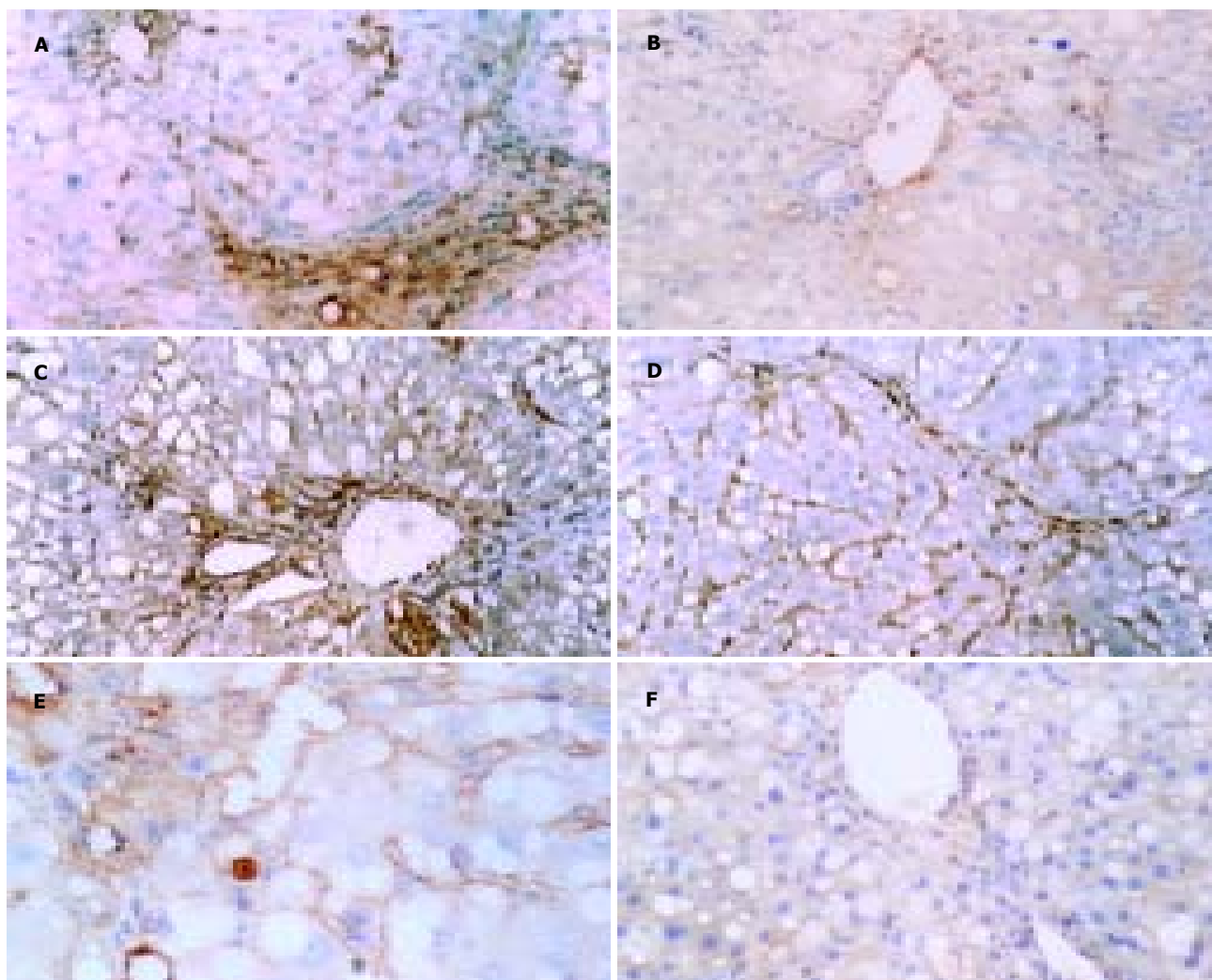


图2 TGF- β 1, MMP-13 和 TIMP-1 蛋白在各组大鼠肝组织中的表达. A: TGF- β 1 在 M 组的表达 $\times 200$; B: TGF- β 1 在 EI 组的表达 $\times 200$; C: MMP-13 在 M 组的表达 $\times 200$; D: MMP-13 在 EI 组的表达 $\times 200$; E: TIMP-1 在 M 组的表达 $\times 400$; F: TIMP-1 在 EI 组的表达 $\times 200$.

表4 肝组织 TGF- β 1, MMP-13 及 TIMP-1 蛋白表达显色指数

分组	n	TGF- β 1	MMP-13	TIMP-1
N	6	2.00 ± 1.26	3.67 ± 2.07	3.33 ± 1.75
NC	6	1.17 ± 0.75	4.50 ± 2.17	4.00 ± 1.67
M	9	8.22 ± 2.99	4.67 ± 2.45	7.56 ± 3.40
PC	8	5.88 ± 3.48	5.75 ± 3.11	6.13 ± 2.36
Eh	7	3.14 ± 2.67^b	7.71 ± 1.25^a	3.57 ± 2.23^b
EI	10	3.60 ± 1.90^b	8.50 ± 2.88^b	3.30 ± 2.67^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs M 组.

3 讨论

肝脏星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是肝纤维化发生过程中的中心环节. HSC可以产生纤溶酶, 后者能直接降解细胞外基质(ECM)^[5], 并有效激活 MMP-1(胶原酶-1)和 MMP-3(间质溶素-1)^[6], 纤溶酶通常被认为是 MMPs 的激活剂及血清蛋白酶级联反应通路与 MMP 介导的通路间的交换蛋白酶. MMP-13(胶原酶-3), 属于中性蛋白酶一族, 专门降解 I, III 型间质胶原酶, 参

与肝纤维化过程中新形成的 ECM 的降解^[6-7]. MMP-13 由正常或活化的 HSC 产生, 亦可由库氏细胞产生^[8]. 在肝纤维化发生发展过程中, TIMP-1 的表达增强, MMP-13/TIMP-1 比值下降, 基因不平衡表达增加了胶原纤维的累积并促进肝纤维的发展, 是肝硬化形成的重要决定因素^[9-10]. 我们发现模型组 MMP-13 mRNA 表达与正常组及正常对照组的基因表达相近, 而地龙 2 号组 MMP-13 mRNA 表达比模型组、阳性对照组升高了 2 倍多. TIMP-1 mRNA 表达在地龙 2 号组较模型组及阳性对照组明显降低. 我们也对 MMP-13/TIMP-1 mRNA 表达的比值进行了分析, 模型组及阳性对照组的比值只有正常 0.3-0.4 倍, 而用地龙 2 号药物干预后, MMP-13/TIMP-1 mRNA 则升高了, 并超过正常的比值, 表明地龙 2 号可以促进 MMP-13、抑制 TIMP-1 基因表达, 逆转肝纤维化时 MMP-13/TIMP-1 不平衡表达, 使其比值升高, 减轻肝纤维化程度. 我们的研究结果与用丹参治疗肝纤维化大鼠, 对 MMP-13、TIMP-1 mRNA 表达的影响结果类似^[11]. 这可能是地龙 2 号中含有蚯蚓胶原酶, 可以直接降解 ECM, 并促进 MMP-13 基因的表

达;另一方面,纤溶酶能有效激活 MMP-1 和 MMP-3,地龙2号中含有蚯蚓纤溶酶,后者很可能也能促进 MMP-13 mRNA 基因的表达,从而降解增生的 ECM。免疫组化实验表明:TIMP-1 在模型组于纤维间隔、中央静脉周围、肝窦处的间质细胞胞质可见大量棕黄色着色, MMP-13 于上述部位亦可见少量表达,应用地龙2号后, TIMP-1 的表达明显减轻,而 MMP-13 的表达则显著升高。因而,地龙2号可以从基因和蛋白水平降低 TIMP-1、提高 MMP-13 的表达,从而促进过多的 ECM 降解,减轻肝纤维化的程度。

TGF- β 1 由活化的肝脏星状细胞(HSC)分泌,为现知最强的肝纤维化促进因子^[12-15],是启动和调控胶原代谢的主要因子, TGF- β 1 具有抑制肝细胞增生、诱导肝细胞凋亡,反馈激活 HSC、促进其产生 ECM、减少 ECM 降解的作用^[16]。本实验中,我们发现地龙2号组大鼠肝组织 TGF- β 1 基因和蛋白表达均较模型组和阳性对照组明显降低,而且我们同时的研究发现地龙2号组 α -SMA 蛋白表达较模型组显著降低^[17],而 α -SMA 为 HSC 活化的标志^[18-19],所以我们认为,地龙2号通过抑制 HSC 的活化,降低 TGF- β 1 的表达,也是其发挥抗肝纤维化作用的可能机制之一。有文献^[20]曾提到纤溶酶激活 TGF- β 1 并加深肝纤维化,这与我们的实验结果相反。我们发现地龙2号组大鼠肝组织 TGF- β 1 的基因和蛋白表达均较模型组和阳性对照组明显降低。故我们推测,由于地龙2号抑制了 HSC 的激活 HSC 受抑,使得 TGF- β 1 释放减少,致纤维化因子释放减少,且激活的 HSC 凋亡亦可提高 MMP-13 并降低 TIMP-1 mRNA 的表达^[21];另一方面,亦有可能是地龙2号降解 ECM 的作用大于 TGF- β 1 致纤维化的作用,因而使肝纤维化程度减轻。

由于地龙2号含有多种有效成分,何种成分可以抑制 HSC 的激活,在本研究中尚未得知,有待今后更加深入研究。

4 参考文献

- 1 Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPAR α agonist, Wy-14 643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004; 39:1286-1296
- 2 Goldshmidt O, Yeikilis R, Mawasi N, Paizi M, Gan N, Ilan N, Pappo O, Vlodaysky I, Spira G. Heparanase expression during normal liver development and following partial hepatectomy. *J Pathol* 2004;203:594-602
- 3 陆亚琴,刘顺英,陈洪,张治国,赵成桂. 地龙2号抑制大鼠肝纤维化的研究. 胃肠病学和肝病杂志 2004;13:225-227
- 4 徐列明,刘平,吕刚,刘成,薛惠明,朱剑亮. I、IV型胶原及板层素在肝纤维化大鼠肝窦周围的变化. 中华消化杂志 1995;15:146
- 5 Arthur MJ. Matrix degradation in liver: a role in injury and repair. *Hepatology* 1997;26:1069-1071
- 6 Watanabe T, Niioka M, Hozawa S, Kameyama K, Hayashi T, Arai M, Ishikawa A, Maruyama K, Okazaki I. Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol* 2000;33:224-235
- 7 Bennett RG, Kharbanda KK, Tuma DJ. Inhibition of markers of hepatic stellate cell activation by the hormone relaxin. *Biochem Pharmacol* 2003;66:867-874
- 8 Hironaka K, Sakaida I, Matsumura Y, Kaino S, Miyamoto K, Okita K. Enhanced interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-13) production of Kupffer cell by gadolinium chloride prevents pig serum-induced rat liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:290-295
- 9 黄宇琦,高毅,陈泽洪,王宇,方石岗,杨继震,李朝龙. 间质胶原酶及其抑制因子-1不平衡表达与肝纤维化的关系. 第一军医大学学报 1999;19:208-210
- 10 Iredale JP, Goddard S, Murphy G, Benyon RC, Arthur MJ. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes. *Clin Sci (Lond)* 1995;89:75-81
- 11 Wasser S, Ho JM, Ang HK, Tan CE. Salvia miltiorrhiza reduces experimentally-induced hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* 1998;29:760-771
- 12 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807
- 13 Xu JW, Gong J, Feng XL, Chang XM, Luo JY, Dong L, Jia A, Xu GD. Effects of estradiol on type I, III collagens and TGF- β 1 in hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11: 1185-1188
- 14 Williams EJ, Gaca MD, Brigstock DR, Arthur MJ, Benyon RC. Increased expression of connective tissue growth factor in fibrotic human liver and in activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000;32:754-761
- 15 胡伟,时昭红,马庭芳,于皆平. 银杏叶提取物抗大鼠肝纤维化的作用. 世界华人消化杂志 2004;12:886-891
- 16 Sprenger H, Kaufmann A, Garn H, Lahme B, Gemesa D, Gressner AM. Induction of neutrophil-attracting chemokines in transforming rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 277-285
- 17 陈洪,陆亚琴,刘顺英,张治国,陈平圣. 地龙2号对大鼠肝纤维化 TGF- β 1, MMP-13 及 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:2333-2337
- 18 Guo SG, Zhang W, Jiang T, Dai M, Zhang LF, Meng YC, Zhao LY, Niu JZ. Influence of serum collected from rat perfused with compound Biejia Ruangan drug on hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1487-1494
- 19 Liu QH, Li DG, Huang X, Zong CH, Xu QF, Lu HM. Suppressive effects of 17 β -estradiol on hepatic fibrosis in CCl $_4$ -induced rat model. *World J Gastroenterol* 2004;10:1315-1320
- 20 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 TGF-beta. *Gastroenterology* 2001;120:1784-1800
- 21 Yuan GJ, Zhang ML, Gong ZJ. Effects of PPAR γ agonist pioglitazone on rat hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10:1047-1051

己酮可可碱对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织 Bcl-2, Bax 表达的影响

魏屏, 罗端德, 熊莉娟, 曾令兰

魏屏, 罗端德, 熊莉娟, 曾令兰, 华中科技大学同济医学院附属协和医院传染科 湖北省武汉市 430022
魏屏, 女, 1958-12-28 生, 湖北省武汉市人, 汉族. 1982 年武汉医学院本科毕业, 学士, 副教授. 主要从事传染病及热带病的临床与研究.
湖北省卫生厅科学研究基金资助项目, No. 200019
项目负责人: 罗端德, 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传染科. luoduande@hotmail.com
电话: 027-85726417 传真: 027-85727707
收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-08-20

Effects of pentoxifylline on expressions of hepatic Bcl-2 and Bax protein in schistosomiasis mice with liver fibrosis

Ping Wei, Duan-De Luo, Li-Juan Xiong, Ling-Lan Zeng

Ping Wei, Duan-De Luo, Li-Juan Xiong, Ling-Lan Zeng, Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by the Science Research Foundation of Health Department of Hubei Province, No. 200019
Correspondence to: Dr Duan-De Luo, Department of Infectious Diseases, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. luoduande@hotmail.com
Received: 2004-06-16 Accepted: 2004-07-15

Abstract

AIM: To study the effects of pentoxifylline (PTX) on the expressions of hepatic Bcl-2 and Bax proteins in schistosomiasis mice with liver fibrosis

METHODS: The model of schistosomiasis liver fibrosis in mice was established. The mice were divided into 4 groups: control group, high dose PTX group (360 g/kg Per day, $\times 8$ wk), low dose PTX group (180 g/kg Per day, $\times 8$ wk) and praziquantel treatment group (500 g/kg Per day, $\times 2$ d). Bcl-2 and Bax protein expressions were detected by immunohistochemistry. The pathological changes of liver were observed under microscope.

RESULTS: The levels of Bcl-2 expression in control group, high dose PTX group, low dose PTX group and praziquantel treatment group were $(0.574 \pm 0.488\%)$, $(1.681 \pm 0.963\%)$, $(0.768 \pm 0.188\%)$ and $(1.116 \pm 0.964\%)$ respectively. The level of Bcl-2 expression in liver tissues of schistosomiasis mice with liver fibrosis in high dose group was significantly higher than that in low dose group ($P < 0.05$) and controls ($P < 0.05$). The level of Bax expression showed significant difference among the four groups.

CONCLUSION: High doses of PTX could significantly increase expression of Bcl-2 in liver tissues of schistosomiasis mice with liver fibrosis by promoting Bcl-2 expression.

Wei P, Luo DD, Xiong LJ, Zeng LL. Effects of pentoxifylline on expressions of hepatic Bcl-2 and Bax protein in schistosomiasis mice with liver fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(10):2338-2340

摘要

目的: 观察己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织中凋亡相关基因Bcl-2, Bax表达的影响。

方法: 建立小鼠血吸虫肝纤维化模型, 将小鼠随机分为 4 组: (1)感染对照组, (2)高剂量PTX治疗组(360 g/kg/d), (3)低剂量PTX治疗组(180 g/kg/d), (4)吡喹酮治疗组(500 g/kg/d)。观察 4 组小鼠治疗 8 wk 后肝组织中 Bcl-2, Bax 的表达水平, 同时观察肝组织的病理学变化。

结果: 高剂量PTX治疗组和吡喹酮治疗组肝组织变性坏死及纤维化程度均较感染对照组和低剂量PTX治疗组轻。感染对照组、低剂量PTX治疗组、吡喹酮治疗组、高剂量PTX治疗组 Bcl-2 水平分别为 $(0.574 \pm 0.488\%)$, $(0.768 \pm 0.188\%)$, $(1.116 \pm 0.964\%)$, $(1.681 \pm 0.963\%)$ 。高剂量PTX治疗组 Bcl-2 水平明显高于感染对照组和低剂量PTX治疗组($P < 0.05$), 与吡喹酮组的表达水平相近($P > 0.05$)。Bax 水平分别为 $(0.372 \pm 0.291\%)$, $(0.351 \pm 0.249\%)$, $(0.465 \pm 0.356\%)$, $(0.79 \pm 0.642\%)$ 。4 组间 Bax 的表达水平无显著差异($P > 0.05$)。

结论: 高剂量PTX可能通过促进 Bcl-2 表达, 减少肝细胞的变性坏死, 阻断血吸虫肝纤维化的发生。

魏屏, 罗端德, 熊莉娟, 曾令兰. 己酮可可碱对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织 Bcl-2, Bax 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2338-2340
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2338.asp>

0 引言

己酮可可碱(pentoxifylline PTX)具有抗肝纤维化的作用^[1-5], 但其对血吸虫肝纤维化的防治少有报道. 而在我国近几年日本血吸虫病的发病率呈上升趋势, 特别是血吸虫病肝纤维化严重危害疫区人民的身体健康. 为探讨 PTX 抗血吸虫病肝纤维化的作用机制, 我们建立了小鼠血吸虫肝纤维化模型, 给予 PTX 治疗, 并观察治疗前后凋亡相关基因 Bcl-2, Bax 在血吸虫肝纤维化小鼠肝组织中的表达情况, 旨在了解 PTX 对血吸虫肝纤维化肝组织凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂, Wistar 小鼠, 4-6 周龄, 40 只, 体重 16-20 g, 购自同济医学院动物实验中心. 日本血吸虫尾蚴购自武汉市血吸虫病防治研究所. PTX 采用石家庄制药集团有限公司第一制药厂生产的舒安灵片剂. Bcl-2, Bax 试剂购自北京中山生物技术有限公司. 彩色病理图文报告分析系统, 型号 HPIAS-1000 为中国华海电子有限公司产品. 显微镜系日本 Olympus (VANOX).

1.2 方法 将小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只. (1)感染对照组: 每只小鼠人工感染日本血吸虫尾蚴 25 条, 感染后继续喂养 10 wk, 不作治疗. (2)高剂量 PTX 治疗组: 感染后 2 wk 用高剂量 PTX (舒安灵 360 g/kg 每日灌胃) 治疗 8 wk. (3)低剂量 PTX 治疗组: 感染 2 wk 后用低剂量 PTX (舒安灵 180 g/kg 每日灌胃) 治疗 8 wk. (4)吡喹酮治疗组: 感染 2 wk 后用吡喹酮 (500 g/kg 每日灌胃) 治疗 2 d. 最后杀鼠取肝组织, 常规固定, 石蜡切片, 分别用 HE 染色和 Masson 法胶原纤维染色, 光镜观察肝组织病变, 根据文献[6]进行肝纤维化程度分期. 用免疫组化法测定肝组织 Bcl-2 和 Bax 的表达, 免疫组织化学 SP 法染色. 一抗为鼠抗人抗体, 二抗为羊抗鼠抗体, Bcl-2 和 Bax 的工作滴度均为 1:80, 每次实验均设磷酸盐缓冲液 (空白对照) 和正常兔血清取代一抗 (阴性对照), 光镜观察 Bcl-2 和 Bax 的分布, 以细胞质膜或间质有棕黄色或深棕黄色颗粒为阳性. Bcl-2 和 Bax 定量采用 HPIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文报告分析系统在低倍镜下计算他们在整个肝组织中的阳性面积 [阳性目标总面积 / 统计场总面积 (面密度)], 每张切片选取 5 个视野, 求平均值.

统计学处理 用 SPSS 10.0 软件统计, 计量资料用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间均数比较用 t 检验, 各组小鼠纤维增生程度的比较用秩和检验.

2 结果

2.1 肝组织病理学变化 感染对照组小鼠部分肝细胞变性, 有的呈灶性坏死. 汇管区见较多的虫卵肉芽肿, 其周围有嗜酸性粒细胞, 中性粒细胞和巨噬细胞浸润, 或有纤维组织增生, 有的纤维组织增生明显并向肝小叶周围伸延成干线型分布. 低剂量 PTX 组的病理变化与感染对照组相似. 高剂量 PTX 组和吡喹酮组的肝细胞变性坏死的程度及肝纤维化程度较前者明显减轻 ($P < 0.05$), 汇管区可见少量的虫卵肉芽肿和纤维增生, 肝小叶结构正常 (表 1).

2.2 Bcl-2 和 Bax 的表达 Bcl-2 和 Bax 蛋白免疫组化染色呈棕黄色或深棕黄色. 在小鼠肝组织中分布广泛. Bcl-2 主要表达在肝细胞质, 其次在肝细胞膜、肝窦等表达, 偶有汇管区表达 (图 1). Bax 主要表达在肝细胞膜、肝窦, 呈线形 (图 2), 其次在肝细胞质表达, 偶有汇管区、虫卵结节中表达 (图 3). Bcl-2 检测结果: 与感染对照组比较, 高剂量 PTX 组及吡喹酮组的表达水平明

显增加 ($P < 0.05$), 低剂量 PTX 组差异不显著 ($P > 0.05$); 与吡喹酮组比较, 高剂量 PTX 组无显著差异 ($P > 0.05$), 低剂量组的表达水平明显下降 ($P < 0.05$); 高剂量 PTX 组与低剂量 PTX 组比较, 表达水平明显升高 ($P < 0.05$) (表 2). Bax 检测结果: 4 组之间的表达水平无显著性差异 ($P > 0.05$).

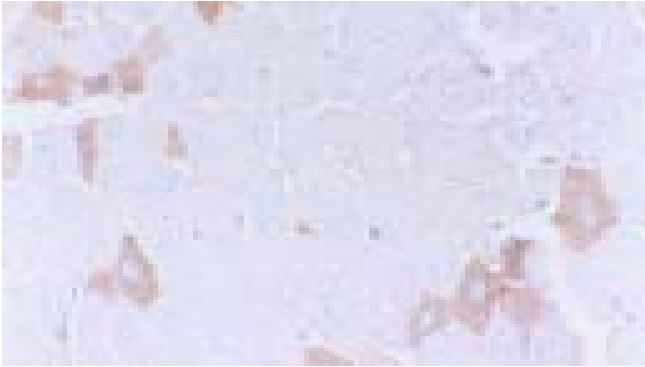


图 1 Bcl-2 在肝细胞质中的表达 (SP 法, DAB 显色 $\times 400$).

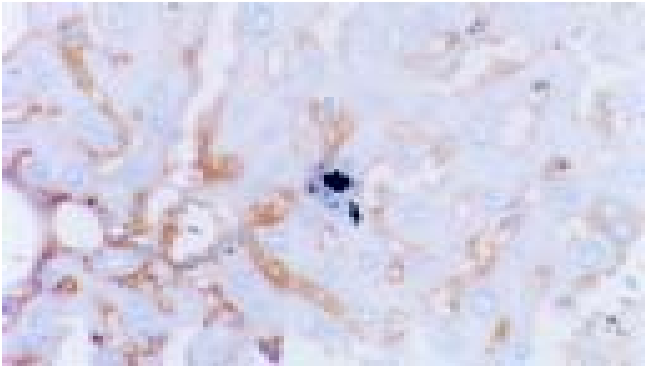


图 2 Bax 在肝细胞膜、肝窦中的表达 (SP 法, DAB 显色 $\times 400$).

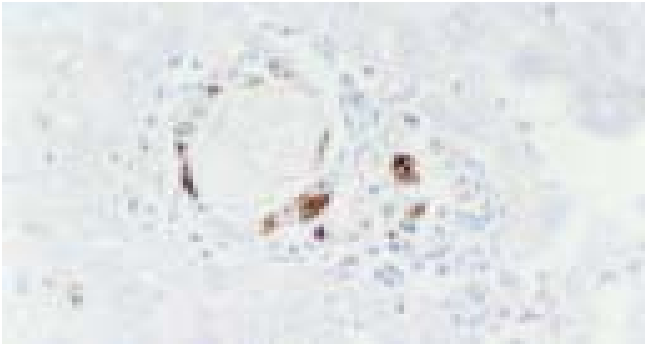


图 3 Bax 在虫卵结节中表达 (SP 法, DAB 显色 $\times 400$).

表 1 小鼠血吸虫肝纤维化程度的比较

分组	n	肝纤维化分级				
		S0	S1	S2	S3	S4
感染对照组	10	0	1	2	5	2
高剂量 PTX 组 ^a	10	0	7	2	1	0
低剂量 PTX 组	10	0	1	2	6	1
吡喹酮组 ^a	10	0	6	3	1	0

^a $P < 0.05$ vs 感染对照组.

表2 小鼠血吸虫肝纤维化肝组织 Bcl-2, Bax 的表达(mean±SD%, n=10)

分组	Bcl-2	Bax
感染对照组	0.574 ± 0.488	0.372 ± 0.291
高剂量 PTX 组	1.681 ± 0.963 ^{ac}	0.790 ± 0.642
低剂量 PTX 组	0.768 ± 0.188 ^c	0.351 ± 0.249
吡喹酮组	1.116 ± 0.964 ^a	0.465 ± 0.356

^aP<0.05 vs 感染对照组; ^cP<0.05 vs 吡喹酮组; ^eP<0.05 vs 低剂量 PTX 组。

3 讨论

各种肝病肝组织中可有不同程度的肝细胞凋亡, 其强弱与病情的轻重有明显的相关性。Bcl-2 是凋亡控制因子, Bax 是凋亡促进因子。Bax 为 Bcl-2 相关蛋白, 可与 Bcl-2 蛋白形成异二聚体并使之失活, 加强表达 Bax 形成同二聚体, 能加速细胞凋亡。乙肝患者肝组织中, Bcl-2 和 Bax 蛋白较正常对照组均有不同程度的增强, 且 Bcl-2 在增生区的表达显著高于各坏死区的表达。各类坏死区及周围, Bax 表达的阳性程度明显高于 Bcl-2 蛋白的表达^[7]。肝纤维化时大鼠肝组织 Bcl-2 和 Bax 表达加强^[8]。PTX 是甲基黄嘌呤 theobromine 的衍生物, 具有显著的抗肝纤维化作用^[9], 其机制有控制肝星状细胞(HSC)转化为激活的肌样成纤维细胞(MFB); 控制 HSC 和 MFB 增生; 减少胶原合成和分泌, 并可能促进其降解; 保护肝细胞等。为探讨 PTX 抗血吸虫病肝纤维化的作用机制, 我们建立了小鼠血吸虫肝纤维化模型, 给予 PTX 治疗, 并观察治疗前后凋亡相关基因 Bcl-2, Bax 在血吸虫肝纤维化小鼠肝组织中的表达情况, 本结果表明, 用高剂量 PTX 防治小鼠血吸虫病肝纤维化, 能明显改善肝脏的病理变化, 减轻肝纤维化程度, 且影响着 Bcl-2 的表达水平, 其表达水平明显高于感染对照组和低剂量 PTX 组, 与吡喹酮组的表达水平相近。但对 Bax 的表达水平无明显影响, 高剂量 PTX 组、低剂量 PTX 组、感染对照组、吡喹酮组等 4 组的 Bax 表达水平无显著性差异。提示高剂量 PTX 可能通过促进 Bcl-2 表达, 减少肝细胞的变性坏死, 阻断血

吸虫肝纤维化的发生。本研究在分子水平上为 PTX 抗血吸虫肝纤维化作用提供了一理论依据。PTX 抗血吸虫肝纤维化作用可能是多方面的, 有实验证实 PTX 可显著降低血吸虫病肝纤维化小鼠肝脏 TGF-β1 和 I、Ⅲ型胶原的含量^[10]。肝纤维化时 Bcl-2 在纤维间隔区表达高于其他区域^[8, 11], PTX 对纤维间隔 Bcl-2 和 Bax 的作用与整个肝组织是否不同、对纤维间隔中的 MFB 凋亡有无促进作用等还有待于进一步研究。目前认为肝纤维化发生的中心环节为肝星状细胞的激活, 因此, 抑制肝星状细胞的激活以及促进肝星状细胞的凋亡是防治肝纤维化的关键。总之 PTX 有良好的抗肝纤维化效果及其极低的副作用, PTX 也将可能成为临床预防和治疗血吸虫病肝纤维化的有用药物。

4 参考文献

- 1 伍严安, 高春芳, 万伟东, 仲人前, 孔宪涛. 己酮可可碱对人 α1(I) 前胶原基因启动子活性的影响. 中华肝脏病杂志 2001;9:70-72
- 2 Schuppan D, Porov Y. Hepatic fibrosis: From bench to bedside. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S300-S305
- 3 Aihara K, Azuma H, Ikeda Y, Akaike M, Abe M, Sugihara T, Matsumoto T. Successful combination therapy-flunarizine, pentoxifylline, and cholestyramine-for spur cell anemia. *Int J Hematol* 2001;73:351-355
- 4 Schuppan D, Koda M, Bauer M, Hahn EG. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets? *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:366-370
- 5 Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2000;35:665-672
- 6 中华医学会传染病与寄生虫分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000;8:324-327
- 7 张斌, 张定风, 马英, 任红, 秦波. 乙型肝炎患者肝组织中 Bcl-2、Bax、Bak 的表达及意义. 中华肝脏病杂志 1999;7:74-76
- 8 陶君, 蔡卫民, 卢良威, 陈群伟, 翁红雷, 张永生. 实验性肝纤维化 Bcl-2、Bax 的表达及干扰素-γ 对其的作用. 中华肝脏病杂志 2003;11:669-672
- 9 伍严安, 孔宪涛. 己酮可可碱的抗肝纤维化作用. 世界华人消化杂志 1999;7:265-266
- 10 Xiong LJ, Zhu JF, Luo DD, Zen LL, Cai SQ. Effects of pentoxifylline on the hepatic content of TGF-beta1 and collagen in Schistosomiasis japonica mice with liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:152-154
- 11 卢良威, 陈群伟, 蔡卫民, 陶君, 张永生, 刘清君, 包剑锋. 肝纤维化大鼠 Bcl-2、Bax 的表达及活血渗湿方对其的作用. 浙江中医学院学报 2003;27:51-53

腺病毒介导增强型绿色荧光蛋白基因在大鼠成体肝干细胞中的表达

钟晓刚, 何生, 殷舞, 邓靖宇, 陈波

钟晓刚, 何生, 邓靖宇, 陈波, 四川大学华西医院普外科
四川省成都市 610041

殷舞, 四川大学华西医院病理科 四川省成都市 610041

钟晓刚, 男, 1974-10-18 生, 四川省自贡市人, 汉族, 2002 年四川大学华西医院普外科博士生, 主要从事肝胆疾病的防治研究。

项目负责人: 何生, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院普外科。
zhongxiaogang@cscsco.org.cn

收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-08-30

Adenoviral-mediated efficiency expression of enhanced green fluorescence protein in adult liver stem cells of rats

Xiao-Gang Zhong, Sheng He, Wu Yin, Jing-Yu Deng, Bo Chen

Xiao-Gang Zhong, Sheng He, Jing-Yu Deng, Bo Chen, Department of General Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Wu Yin, Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Sheng He, Department of General Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. zhongxiaogang@cscsco.org.cn

Received: 2004-08-16 Accepted: 2004-08-30

Abstract

AIM: To investigate the feasibility of adenoviral-mediated exogenous gene expression in adult liver stem cells of rats and to establish a cell line that stably and efficiently express enhanced green fluorescence protein (EGFP).

METHODS: A pAd-CMV-EGFP vector under the control of CMV promoter was constructed by homologous recombination in *E. coli* BJ 5 183, and the recombinant virus was packaged in HEK 293 cell line. Hepatic adult stem cells cultured *in vitro* were infected with recombinant adenovirus. Expression of EGFP was observed by fluorescent microscopy and infection efficiency was analyzed. Adult liver stem cells were further cultured to establish a cell line that stably and efficiently expressed EGFP through cloning culture and the biological characteristics of the cell line were observed and analyzed by fluorescence microscopy, immunocytochemistry and differentiation-inducing experiment.

RESULTS: Adenovirus vector of pAd-CMV-EGFP was constructed and high titer recombinant virus were produced successfully. EGFP, mediated by adenovirus, could be transfected into hepatic adult stem cells with a high efficiency (about 40-70%). After cloning culture, WB-EGFP cell line was established, and it could stably express EGFP in 8-9 generations. Furthermore, biological characteristics such as marker of stem cells, proliferation speed and differen-

tiation capability had not been affected.

CONCLUSION: Target gene can be efficiently transfected into hepatic adult stem cells through adeno-vector system. EGFP can be stably and long-term expressed in transfected cells and their offspring. It can serve as a tracker in the research of stem cells.

Zhong XG, He S, Yin W, Deng JY, Chen B. Adenoviral-mediated efficiency expression of enhanced green fluorescence protein in adult liver stem cells of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2341-2344

摘要

目的: 研究腺病毒感染成体肝干细胞介导外源基因表达的可及性及建立稳定表达EGFP的成体肝干细胞。

方法: 采用细菌同源重组法构建CMV驱动的EGFP报告基因腺病毒载体pAd-CMV-EGFP, 在293细胞中包装制备腺病毒, 并用重组腺病毒感染体外培养的成体肝干细胞WB-F344, 观察腺病毒携带的外源基因EGFP在WB-F344细胞中的表达, 及分析病毒对肝干细胞的感染效率。进一步单克隆培养纯化建立稳定表达EGFP的细胞株(WB-EGFP), 并采用流式细胞技术、免疫细胞化学技术、诱导分化实验以观察其生物学特性。

结果: 成功构建腺病毒载体, 并包装制备高滴度的重组腺病毒Ad-EGFP。重组腺病毒有效的感染WB-F344细胞, 感染率约40-70%。建立WB-EGFP细胞株, 持续传代8-9代均较稳定表达EGFP及肝干细胞表面标记, 仍保持干细胞样的增生、分化等基本生物学特性。

结论: 腺病毒可高水平的介导外源基因表达于成体肝干细胞, 是有效的基因转移系统。稳定表达EGFP的肝干细胞株观察直观、可连续传代, 并保持干细胞的生物学特性, 可用于体内外肝细胞研究中的追踪、鉴定。

钟晓刚, 何生, 殷舞, 邓靖宇, 陈波. 腺病毒介导增强型绿色荧光蛋白基因在大鼠成体肝干细胞中的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2341-2344
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2341.asp>

0 引言

在大多数成年机体器官中有干细胞, 即成体干细胞。成年哺乳类动物肝脏中存在的肝干细胞, 又称肝卵圆细胞, 以小卵圆形细胞的形式分布于终末小胆管(Hering

管),具有双向分化增生潜力,可分化为肝细胞或胆管上皮细胞^[1-4]。然而,肝干细胞在肝脏的多种生理和病理过程中的作用还远未阐明。增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因是在GFP的基础上经碱基修饰改造而来,是一种较好的报告基因,广泛用于多种基因转移系统^[5-7]。采用EGFP标记成体肝干细胞,来探索其在体内分化、发育规律,以及与肝硬化、肝癌等肝脏疾病的关系有重要的意义。因此,我们采用重组腺病毒转染大鼠成体肝干细胞、克隆纯化,使其高效稳定表达EGFP,并对其生物学特性进行了观察研究,同时也为成体肝干细胞基因转移修饰提供可用的模式。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠成体肝卵圆细胞株WB-F344(简称WB细胞),由美国北卡罗来那大学 Grisham 教授建立^[8-9],购自中国医学科学院药物研究所。质粒 pAdEasy-1 为缺失 E1 区和 E3 区 5 型野生型腺病毒(Ad5dE1/3)基因组质粒,带有氨苄青霉素抗性基因。穿梭质粒 pAdTrack-CMV 在 CMV 启动子驱动下表达增强型绿色荧光蛋白(EGFP),带有卡那霉素抗性基因^[10]。E. Coli 菌种 BJ5183 由生化研究室李明博士惠赠, DH5 α 菌种及 293 细胞由病理研究室提供,引自美国典型生物物种保藏中心(ATCC)。限制性内切酶 *Pme* I、*Pac* I 购自 NEB 公司, *Lam* DNA/*Hind* III, *Bam*H I 购自 Takara 公司,小量质粒 DNA 抽提纯化试剂盒购自美国 Sigma 公司,转染脂质体 Lipofect AMINE, Opti-MEM(OMEM)购自美国 Invitrogen 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法 WB 细胞生长于含 100 mL/L 胎牛血清、25 mmol/L Hepes、100 ku/L 青霉素与 100 mg/L 链霉素的 DMEM/F-12(1:1)培养基,在 37 °C、50 mL/L CO₂、饱和湿度条件下培养。参照文献[11-12]用两步法构建重组腺病毒:超螺旋的腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 转化重组菌 BJ5183,经氨苄青霉素筛选鉴定后,用氯化钙法制备感受态细菌 BJ5183pAdEasy-1。将含有 EGFP 报告基因的穿梭质粒 pAdTrack-CMV 用限制性内切酶 *pme*I 酶切线性化,转化感受态细菌 BJ5183pAdEasy-1,线性化质粒 pAdTrack-CMV 与 pAdEasy-1 在细菌内发生同源重组。重组质粒经筛选及 *Pac*I 酶切鉴定正确后,转入大肠杆菌 DH5 α 扩增获得高拷贝重组质粒 pAd-CMV-EGFP。 *Pac*I 酶切线性化重组质粒 pAd-CMV-EGFP,用脂质体转染法转染人胚肾 293 细胞包装腺病毒。10-12 d 收获病毒,再感染扩增纯化提高病毒滴度。调整病毒滴度,以 0.1, 1, 10, 100, 200, 1 000 感染复数(MOI)感染 60-80% 融合的 WB 细胞,37 °C 孵育 24 h 后,换新的培养基培养。荧光显微镜下观察 EGFP 的表达,分析转染效率。采用有限稀释法选择荧光表达强的单克隆,传代培养,建立稳定表达 GFP 的细胞株 WB-EGFP^[13]。按 1.0×10^7 /L 接种细胞于 24 孔板,接种后 0-9 d,每天终止 3 孔,消化后用台盼蓝拒染

法计数,取均值,绘成生长曲线。收集对数生长期细胞,制备单细胞悬液,碘化丙啶(PI)染色,流式细胞仪作细胞周期分析。用丁酸钠(sodium butyrate, SB)或二甲亚砜(dexamethasone, DMSO)诱导肝细胞分化^[14-15]。按 1.0×10^8 /L 接种 WB, WB-EGFP 细胞于 6 孔板,24 h 后加入 2-4 mol/L 浓度丁酸钠或 1-4 μ mol/L 二甲亚砜,以等量 PBS 液代替丁酸钠或二甲亚砜作为对照,观察细胞形态学改变。制备细胞爬片,免疫细胞化学染色检测细胞中 c-kit, ck19, AFP, α 1-ATT 表达。

统计学处理 所有数据以(mean \pm SD)表示,采用 SPSS 医学统计学软件分析,两组间均数差异的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 EGFP 报告基因重组腺病毒 穿梭质粒 pAdTrack-CMV 和腺病毒质粒 pAdEasy-1 经同源重组生成重组质粒 pAd-CMV-EGFP, *Pac* I 酶切产生特异性酶切条带,表明重组腺病毒载体正确(图1)。 *Pac* I 酶切线性化重组质粒 pAd-CMV-EGFP,用脂质体转染法转染人胚肾 293 细胞包装腺病毒。转染后 4, 5 d, 293 细胞内可见明显绿色荧光表达(图2)。7-10 d 收集裂解细胞获得病毒,经再感染 293 细胞扩增、浓缩,病毒滴度可达到 10^9 nfu/L 原液。该病毒命名为 Ad-EGFP。

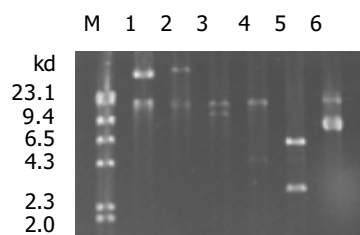


图1 重组腺病毒载体 pAd-CMV-EGFP 酶切鉴定。M: λ DNA/*Hind* III; 1: pAdEasy-1; 2: pAd-CMV-EGFP; 3: pAdEasy-1/*Bam*H I; 4: pAd-CMV-EGFP/*Pac* I; 5: pAdTrack-CMV/*Pac* I; 6: pAdTrack;

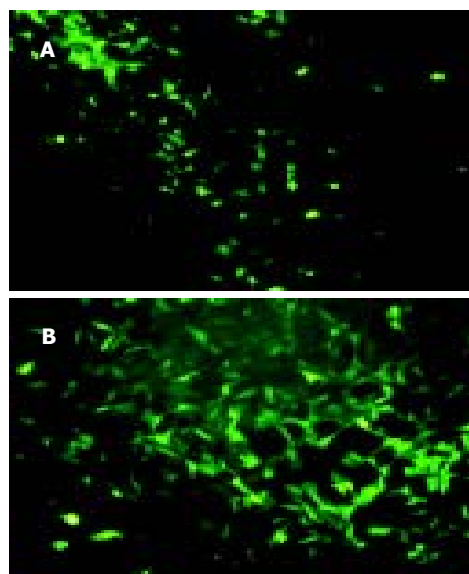


图2 脂质体法转染 293 细胞表达 EGFP IF $\times 200$ 。A: 脂质体法转染 4 d; B: 脂质体法转染 7 d。

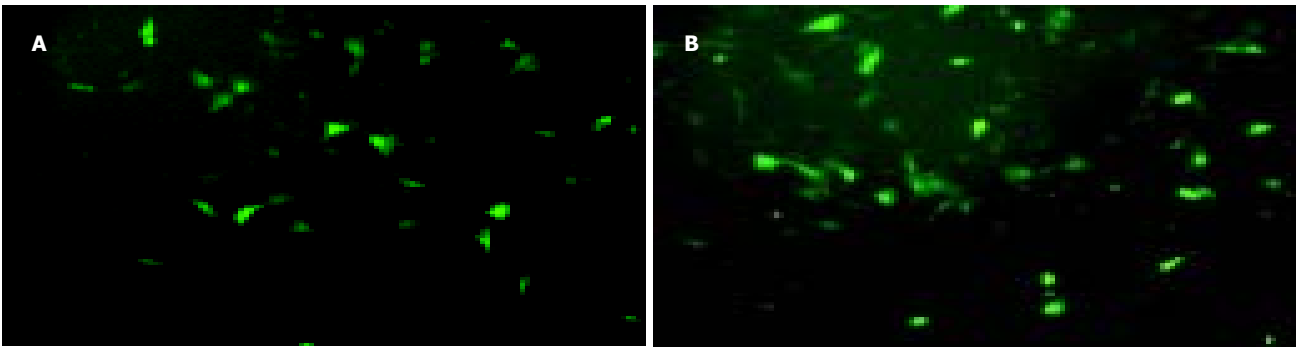


图3 腺病毒感染WB细胞后EGFP的表达 IF × 200. A: 腺病毒感染12 h; B: 腺病毒感染24 h.

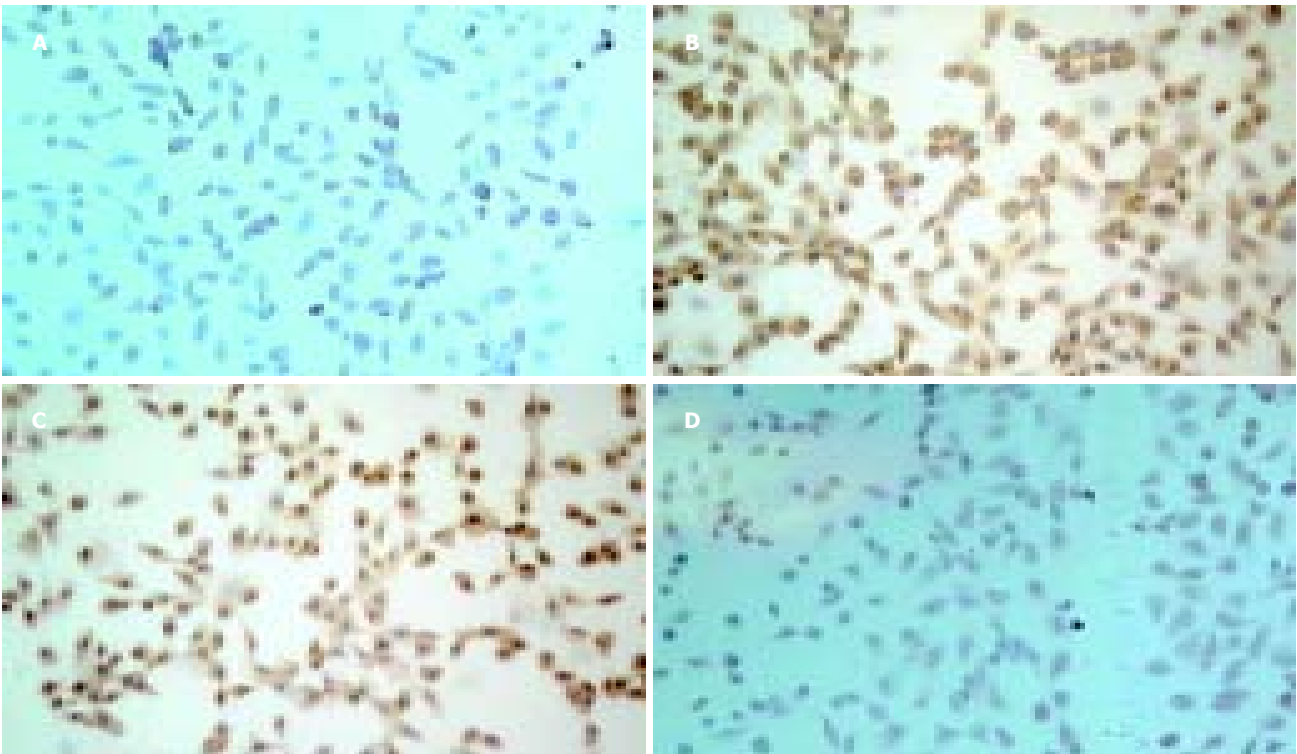


图4 WB-EGFP免疫细胞化学染色 SP × 200. A: c-kit(+); B: AFP(+); C: CK19 (+); D: 分化后 α₁-ATT(+).

2.2 表达EGFP的WB细胞 重组腺病毒Ad-EGFP均可感染WB细胞, 感染12 h后可见荧光表达, 24 h后明显(图3). 1, 10, 100感染复数(MOI)感染效率较高, 约40-70%, 荧光显微镜下细胞形态正常. 感染复数大于100时, 90%的WB细胞可表达绿色荧光蛋白, 但细胞出现明显的细胞病理现象, 细胞存活和贴壁功能严重受损. 采用有限稀释法挑取形态正常、表达EGFP强的单克隆细胞, 传代培养, 获得比较稳定表达EGFP的细胞株(WB-EGFP). 持续的传代培养, 细胞表达EGFP能够维持8-9代(42 d).

2.3 WB-EGFP细胞生长特性 有限稀释法单克隆培养得到转染细胞株WB-EGFP, 生长状态良好, 细胞形态一致, 生长曲线与WB细胞相似. 碘化丙啶(PI)染色, 流式细胞仪作细胞周期分析, 两种细胞均主要分布在G₁期, 统计学分析无显著差异($P>0.05$), 表明WB-EGFP细胞生长特性与WB细胞基本一致, EGFP的表达并不影响肝干细胞的生长、增生(表1).

表1 WB及WB-EGFP细胞周期分布(mean±SD, $n=6$)

组别	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
WB	61.7 ± 1.7	19.9 ± 4.1	18.6 ± 2.1
WB-EGFP	62.0 ± 2.1	19.6 ± 3.8	18.3 ± 2.3

^a $P>0.05$ vs WB组.

2.4 细胞分化潜能的比较 未分化的WB及WB-EGFP细胞, 均表达干细胞的生物标志, 免疫细胞化学染色c-kit(+), AFP(+), ck19(+), α₁-ATT(-). 2-3 mmol/L浓度丁酸钠(SB)或1-2 μmol/L二甲亚砜(DMSO)作用3-4 d, 均可诱导WB及WB-EGFP细胞向肝细胞分化, 卵圆细胞开始减少, 出现核大、核仁清晰、胞质丰富的多角上皮细胞. 更高浓度的丁酸钠或二甲亚砜导致细胞存活受损. 分化的细胞形态向肝细胞转变, 免疫细胞化学染色c-kit(-), AFP(-), ck19(-), α₁-ATT(+)(图4). 表明WB-EGFP细胞仍具有向特异性细胞分化的干细胞特性, 腺病毒转染并不影响干细胞的生物特性.

3 讨论

胚胎或成体肝干细胞被认为是一种理想的替代治疗细胞和外源基因转移的靶细胞,而成体肝干细胞因不涉及伦理问题,目前是干细胞研究的热点^[16-20]。成体肝干细胞移植不但可替代坏死肝组织,还可刺激肝组织再生修复。同时通过体外基因修饰肝干细胞作为基因治疗的良好载体为基因治疗提供新的可能^[21-22]。其在体内如何分布、分化、转归,如何参与肝损伤修复中肝小叶的重建,机体的微环境对移植肝干细胞的调控,以及肝干细胞在相关肝病中的作用均未阐明。

增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因是一种较好的报告基因,在紫外光或荧光的照射下能自发发出绿色荧光,观察直观,易于追踪^[23-24]。我们采用EGFP标记成体肝干细胞,可较好的在体内、外对其追踪、鉴定,EGFP表达强度高、时间较长,同时肝干细胞增生能力、特有的生物特性并未受到影响。

腺病毒不仅对分裂期细胞能进行基因转染,而且对一般非分裂细胞或增生缓慢的细胞也可进行有效的基因转染,转移的基因并不整合到细胞基因组中,而目的基因的表达水平高,持续时间也较长,近年来腺病毒载体在体内基因治疗中日益受到重视^[25]。与肿瘤细胞等分裂增生快的细胞相比,成体肝干细胞分裂增生速度相对更慢,一般的物理或化学转染的方法转移基因较为困难^[26]。转染后使成体肝干细胞较稳定表达转移基因产物而不影响干细胞的特性,也有待进一步研究。因而我们采用腺病毒作为基因转移的载体,观察到腺病毒载体Ad-EGFP对肝干细胞的转导效率高,MOI=1-100的重组病毒即可有效的转染,转染率在40-70%,稳定转染的肝干细胞连续传代8-9代仍有转移基因的表达,细胞增生、分化能力保持稳定。只有当MOI大于100时,可导致细胞出现病态改变。表明在一定的感染复数范围腺病毒可有效的对成体肝干细胞进行基因转导,重组腺病毒是一种有效转染肝干细胞的载体工具。

本转基因方法简单、高效,所克隆转染细胞具有连续传代、稳定性好、高水平表达EGFP,并可进行活细胞直接观察的优点,同时转染的肝干细胞仍具有干细胞的基本生物学特性,为肝干细胞体内外增生、分化调控、信号转导、基因修饰的研究提供一个有力的工具。

4 参考文献

- 1 Alison MR, Vig P, Russo F, Bigger BW, Amofah E, Themis M, Forbes S. Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? *Cell Prolif* 2004;37:1-21
- 2 Qin AL, Zhou XQ, Zhang W, Yu H, Xie Q. Characterization and enrichment of hepatic progenitor cells in adult rat liver. *World J Gastroenterol* 2004;10:1480-1486
- 3 Strain AJ, Crosby HA, Nijjar S, Kelly DA, Hubscher SG. Human liver-derived stem cells. *Semin Liver Dis* 2003;23:373-384
- 4 Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(Suppl 1):11881-11888

- 5 Le LP, Everts M, Dmitriev IP, Davydova JG, Yamamoto M, Curiel DT. Fluorescently labeled adenovirus with pIX-EGFP for vector detection. *Mol Imaging* 2004;3:105-116
- 6 Magness ST, Jijon H, Van Houten Fisher N, Sharpless NE, Brenner DA, Jobin C. In vivo pattern of lipopolysaccharide and anti-CD3-induced NF-kappa B activation using a novel gene-targeted enhanced GFP reporter gene mouse. *J Immunol* 2004;173:1561-157
- 7 Magin-Lachmann C, Kotzamanis G, D'Aiuto L, Cooke H, Huxley C, Wagner E. In vitro and in vivo delivery of intact BAC DNA-comparison of different methods. *J Gene Med* 2004;6:195-209
- 8 Muller-Borer BJ, Cascio WE, Anderson PA, Snowwaert JN, Frye JR, Desai N, Esch GL, Brackham JA, Bagnell CR, Coleman WB, Grisham JW, Malouf NN. Adult-derived liver stem cells acquire a cardiomyocyte structural and functional phenotype ex vivo. *Am J Pathol* 2004;165:135-145
- 9 Chramostova K, Vondracek J, Sindlerova L, Vojtesek B, Kozubik A, Machala M. Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196:136-148
- 10 Pan X, Li ZS, Xu GM, Cui L, Tu ZX. Adenovirus-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer. *Pancreas* 2003;26:274-278
- 11 Zheng Q, Huang ZH, Tang FX, Huang YY, Che XY. Highly efficient construction of recombinant adenovirus containing double suicide gene driven by cytomegalovirus promoter using two-step CaCl_2 transformation method. *Di Yi Jun Yi Daxue Xuebao* 2003;23:575-577
- 12 Green AP, Huang JJ, Scott MO, Kierstead TD, Beaupre I, Gao GP, Wilson JM. A new scalable method for the purification of recombinant adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2002;13:1921-1934
- 13 Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Shimosegawa T. Establishment and characterization of a rat pancreatic stellate cell line by spontaneous immortalization. *World J Gastroenterol* 2003;9:2751-2758
- 14 Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2003;12:1-11
- 15 Azuma H, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Fujikawa T, Yamaoka Y. Enrichment of hepatic progenitor cells from adult mouse liver. *Hepatology* 2003;37:1385-1394
- 16 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
- 17 Poulosom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 2002;197:441-456
- 18 Yin L, Sun M, Ilic Z, Leffert HL, Sell S. Derivation, characterization, and phenotypic variation of hepatic progenitor cell lines isolated from adult rats. *Hepatology* 2002;35:315-324
- 19 Zheng YW, Taniguchi H. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin Liver Dis* 2003;23:337-348
- 20 何念海, 赵文利, 王宇明. 成体干细胞可塑性及对肝脏的重建作用. *世界华人消化杂志* 2004;12:205-208
- 21 Weber A. Immortalization of hepatic progenitor cells. *Pathol Biol (Paris)* 2004;52:93-96
- 22 展玉涛, 任继萍. 肝脏干细胞. *世界华人消化杂志* 2003;11:1735-1737
- 23 Pierce EA, Liu Q, Igoucheva O, Omarrudin R, Ma H, Diamond SL, Yoon K. Oligonucleotide-directed single-base DNA alterations in mouse embryonic stem cells. *Gene Ther* 2003;10:24-33
- 24 Del Rio M, Larcher F, Serrano F, Meana A, Munoz M, Garcia M, Munoz E, Martin C, Bernad A, Jorcano JL. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther* 2002;13:959-968
- 25 Cheng K, Fraga D, Zhang C, Kotb M, Gaber AO, Guntaka RV, Mahato RI. Adenovirus-based vascular endothelial growth factor gene delivery to human pancreatic islets. *Gene Ther* 2004;11:1105-1116
- 26 Lakshminipathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL, Coucouvanis E, Kaufman DS, Verfaillie CM. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells* 2004;22:531-543

慢性应激大鼠结肠黏膜NO含量变化的意义

全巧云, 罗和生, 陈 敏

全巧云, 罗和生, 陈敏, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
全巧云, 女, 1968-10-25 生, 河南洛阳人, 汉族, 1992 年同济医科大学本科
毕业, 武汉大学医学院2003级硕士研究生, 研究方向胃肠道疾病基础与临床。
项目负责人: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市解放路 238 号, 武汉大学人民
医院消化内科, luotang @public.wh.hb.cn
电话: 027-88041919-2135
收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-08-05

Changes of nitric oxide in colonic mucosa of rats submitted to chronic stress

Qiao-Yun Tong, He-Sheng Luo, Min Chen

Qiao-Yun Tong, He-Sheng Luo, Min Chen, Department of
Gastroenterology, Renmin hospital of Wuhan University, Wuhan 430060,
Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology,
Renmin hospital of Wuhan University, 238 Jiefang Road, Wuhan 430060,
Hubei Province, China. luotang @public.wh.hb.cn
Received: 2004-06-16 Accepted: 2004-08-05

Abstract

AIM: To investigate the changes of nitric oxide (NO) in the colonic mucosa of rats submitted to chronic stress and to study the mechanism of chronic stress damage to colonic mucosa.

METHODS: Thirty Wistar rats were randomly divided into control group ($n=10$), stress group ($n=10$), stress and injection aminoguanidine group ($n=10$). The latter two groups were submitted to immobilization stress 2 h/d for 14 days. The numbers of the inflammatory cells and ultrastructural damage of colon epithelial cells were observed under light and electron microscopes respectively. The concentration of NO and iNOS were measured by chemical methods.

RESULTS: The concentrations of NO and iNOS in colonic mucosa of stress group were higher than those in control group (NO: 47.5 ± 7.9 vs 32.3 ± 4.7 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$; iNOS: 6.7 ± 1.0 vs 4.0 ± 0.6 nkat/g, $P < 0.01$). More neutrophils and mononuclear cells were observed in the stress group than in the control group (N: 70 ± 12 vs 30 ± 6 /mm², $P < 0.01$; M: 52 ± 9 vs 26 ± 8 /mm², $P < 0.01$). The damage of mitochondria and loosened tight junction were seen in stress group. have concentration of NO and iNOS concentrations were lower in Aminoguanidine group than those in stress group (NO: 27.7 ± 12.4 vs 47.8 ± 7.9 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$; iNOS: 3.8 ± 0.8 vs 6.7 ± 1.0 nkat/g, $P < 0.01$). Infiltration of inflammatory cells and ultrastructural damage of colon epithelial cells were slighter in aminoguanidine group than those in stress group.

CONCLUSION: Chronic stress brought damages to colonic mucosa and nitric oxide might play an important role in

these damages while aminoguanidine protected stress-induced colonic mucosa damaged.

Tong QY, Luo HS, Chen M. Changes of nitric oxide in colonic mucosa of rats submitted to chronic stress. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(10):2345-2348

摘要

目的: 观察慢性应激大鼠结肠黏膜一氧化氮(nitric oxide, NO)的含量变化, 探讨NO在慢性应激结肠黏膜损伤中的作用及意义。

方法: 采用慢性束缚应激模型。Wistar 大鼠 30 只, 随机分为对照组、应激组、应激 + 氨基胍组。应激组和应激 + 氨基胍组大鼠每天置于束缚笼内 2 h。氨基胍组腹腔注射氨基胍 150 mg/kg, 持续 14 d 处死动物。化学比色法测定肠黏膜组织 NO、诱导型 NO 合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的含量, 组织切片观察肠黏膜炎性细胞浸润情况, 电镜观察结肠上皮细胞超微结构的变化。

结果: 应激组结肠黏膜中 NO、iNOS 含量高于对照组(NO: 47.5 ± 7.9 vs 32.3 ± 4.7 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$; iNOS 6.7 ± 1.0 vs 4.0 ± 0.6 nkat/g, $P < 0.01$), 中性粒细胞、单核细胞数目增加(N: 70 ± 12 vs 30 ± 6 /mm² $P < 0.01$; M: 52 ± 9 vs 26 ± 8 /mm², $P < 0.01$), 并出现上皮细胞线粒体肿胀、细胞间紧密连接间隙加大等超微结构的变化。氨基胍组结肠黏膜 NO、iNOS 含量低于应激组(NO: 27.7 ± 12.4 vs 47.8 ± 7.9 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$; iNOS 3.8 ± 0.8 vs 6.7 ± 1.0 nkat/g, $P < 0.01$), 炎性细胞浸润及超微结构的变化较轻。

结论: 慢性应激大鼠结肠黏膜 NO 含量增加, 可能参与了应激诱导的肠黏膜损伤。氨基胍对应激诱导的肠黏膜损伤起保护作用。

全巧云, 罗和生, 陈敏. 慢性应激大鼠结肠黏膜 NO 含量变化的意义. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2345-2348

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2345.asp>

0 引言

慢性应激和紧张焦虑、抑郁等精神心理反应与胃肠道疾病关系密切^[1-2]。新近的研究表明: 慢性应激引起肠黏膜屏障的损伤, 可能是应激诱发肠道炎症性疾病的基^础^[3-4]。一氧化氮(NO)是参与肠黏膜屏障损伤的一个重要的递质^[5], 其在慢性应激大鼠肠黏膜中含量变化及与肠黏膜损伤的关系尚未见文献报道。我们采用慢性束缚

应激模型^[4], 观察大鼠肠黏膜组织 NO 含量变化及与上皮组织学变化的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康成年 Wistar 大鼠(200 ± 20 g)30 只, 由湖北省预防医学科学院实验动物中心提供, 雌雄不限。随机分为对照组 10 只; 应激组 10 只; 应激+氨基胍组 10 只。NO、iNOS 试剂盒(南京建成生物技术研究), 氨基胍(Sigma 公司), 其他为国产分析纯。低温离心机, 恒温水浴箱, 721 型分光光度计, 日立 H-600 透射电镜, 普通光学显微镜。

1.2 方法 将应激组及应激+氨基胍组大鼠置于特制的圆柱状束缚笼内(长 14–16 cm, 内径 3.5–4 cm, 根据体型大小适当调整), 限制活动, 每天 2 h。对照组动物自由活动。每天在 08:00–10:00 间进行实验, 连续 14 d。氨基胍组每日 ip 氨基胍 150 mg/kg, 分 2 次, 应激前 1 次, 应激结束 12 h 后再注射 1 次。最后 1 次应激结束后 4 h, 200 g/L 乌拉坦溶液 1 mL ip 麻醉, 腹中线切口取结肠组织。石蜡切片常规 HE 染色, 用 16D 目镜测微网(面积为 0.1024 mm^2) 在普通光镜 100 倍放大下计数肠黏膜炎性细胞数, 每张切片计数 10 个网格取平均值。结果以每 mm^2 含有的炎性细胞数表示。组织取材后, 立即放入 25 g/L 戊二醛溶液固定 15 min, 再切成 $1 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, 放回固定液固定 3 h, 蒸馏水冲洗, 置于磷酸盐缓冲液过夜。次日四氧化锇酸固定, 梯度酒精脱水, 丙酮脱水, Epon812 树脂包埋, 超薄切片, 醋酸铀, 枸橼酸铅染色, 电镜观察。动物处死后, 用电子天平称取结肠组织 300–400 mg, 按质量(g)/体积(mL)比 1:9 加生理盐水, 制备成 100 g/L 组织匀浆, 一式两份。一份经高速低温离心机 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 50 μL 测 iNOS 酶活力, 以 nkat/g 表示; 另取 50 μL 上清液, 再加 9 倍生理盐水制备 10 g/L 组织匀浆, 测定组织蛋白含量(考马斯亮兰法)。另一份为 1 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 500 μL 通过硝酸还原酶法测定 NO 含量, 结果以 $\mu\text{mol/g}$ 表示。离心后的上清液置于 -20°C 冰箱中保存待测, 按试剂盒说明书步骤进行。

统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行数据分析, 结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以

$P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 炎性细胞计数 应激组见肠黏膜固有层炎性细胞浸润(图 1A), 以中性粒细胞、单核细胞为主, 中性粒细胞平均为 $70 \pm 12/\text{mm}^2$, 单核细胞平均为 $52 \pm 9/\text{mm}^2$, 均明显多于对照组(图 1B)(30 ± 6 , $26 \pm 8/\text{mm}^2$, $P < 0.01$); 使用氨基胍组中性粒细胞和单核细胞分别为 32 ± 6 , $27 \pm 4/\text{mm}^2$ 与对照组比较无显著差异($P > 0.05$)(图 1C), 与应激组比较差异具有显著性($P < 0.01$)。

2.2 结肠组织蛋白 NO 含量 应激组明显高于对照组(47.5 ± 7.9 vs $32.3 \pm 4.7 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.01$); 使用氨基胍组 NO 平均为($27.7 \pm 12.4 \mu\text{mol/g}$), 与对照组比较无显著差异($P > 0.05$)。与应激组比较差异具有显著性($P < 0.05$)。iNOS 的活性应激组也明显高于对照组(6.7 ± 1.0 vs $4.0 \pm 0.6 \text{ nkat/g}$, $P < 0.01$), 使用氨基胍组与对照组比较无显著差异(3.8 ± 0.8 vs $4.0 \pm 0.6 \text{ nkat/g}$, $P > 0.05$)。与应激组比较差异具有显著性($P < 0.01$)。

2.3 结肠上皮细胞超微结构的改变 应激组大鼠肠上皮细胞部分区域线粒体肿胀、嵴减少、消失, 并见空泡变性; 局部溶酶体增多, 细胞间连接松弛, 紧密连接间隙增加, 上皮细胞表面微绒毛减少、稀疏、脱落(图 2A, B)。使用氨基胍组线粒体完整, 细胞间连接松弛情况较轻(图 2C), 与正常接近(图 2D)。

3 讨论

慢性应激指的是焦虑、抑郁、躯体不适或其他形式的行为变化, 常指人们日常工作和生活中所面临的各种压力。临床和实验研究表明, 慢性应激在炎症性肠道疾病的发生和症状加重中起重要作用^[6–7], 除通过影响胃肠激素分泌起作用外^[8–9], 是否存在其他其机制一直是人们感兴趣的问题。新近研究表明, 慢性应激能造成正常个体肠黏膜屏障的损伤^[3–4, 10]从而为肠道疾病的发生提供了可能。NO 是体内一个重要的信息分子, 参与了许多炎症性疾病的发生并与屏障系统的损伤密切相关^[11–13], 并与慢性应激导致的心、肝、脑细胞损伤有关^[14–17], 其是否参与慢性应激时肠黏膜的损伤尚未见文献报道。我们采用慢性束缚应激模型^[4]限制了大鼠活动而未造成

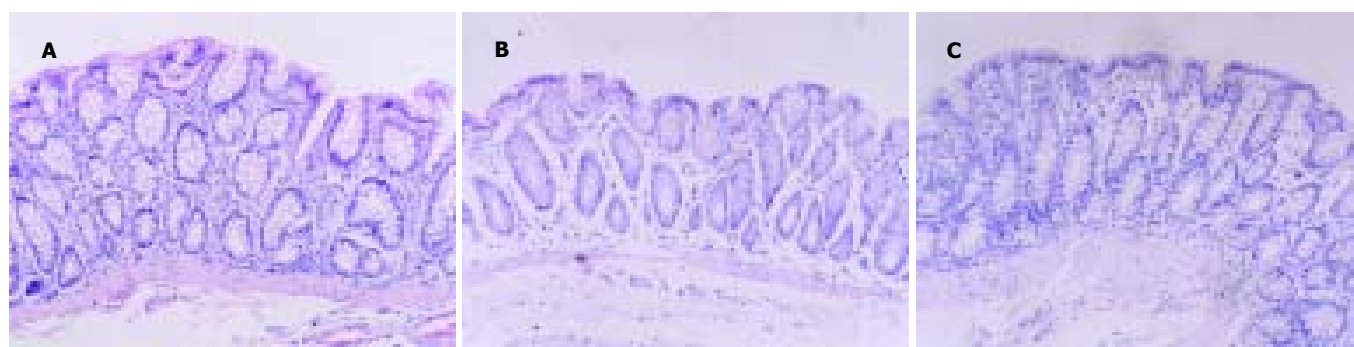


图1 结肠组织 HE 染色 $\times 100$ 。A: 应激组; B: 对照组; C: 应激+氨基胍组。

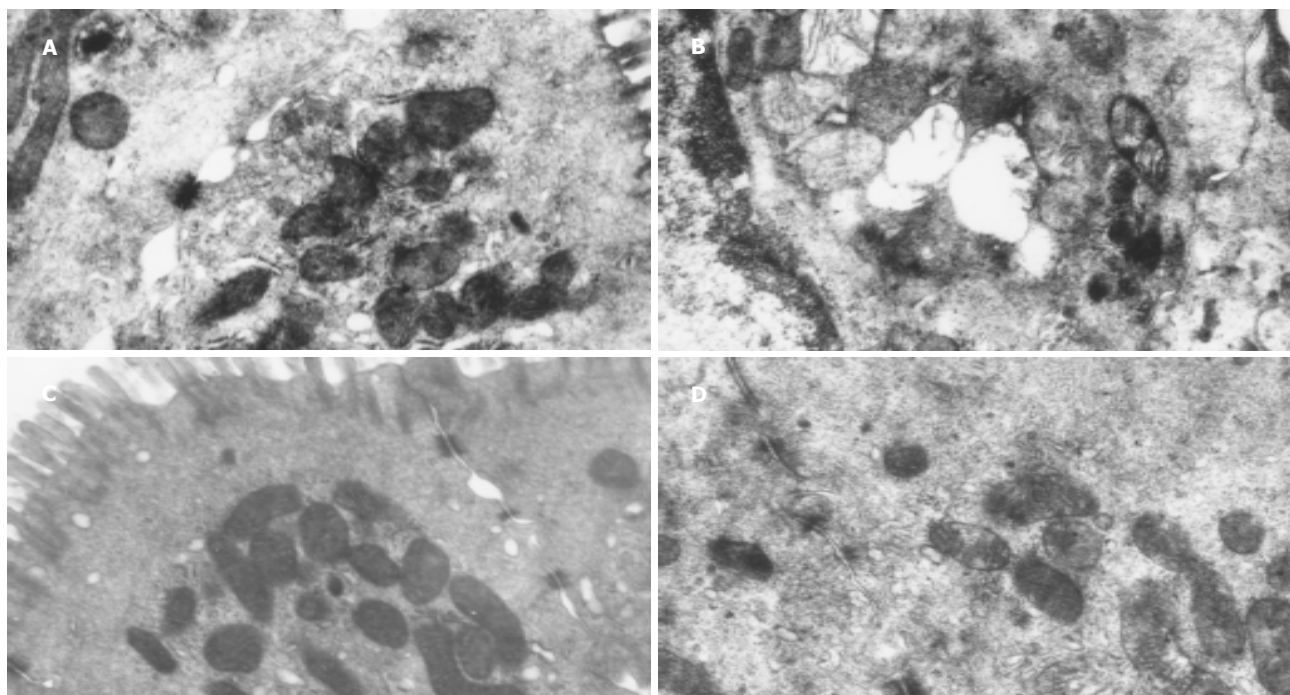


图2 结肠黏膜上皮细胞超微结构 TEM $\times 17\ 000$. A: 应激组(细胞间连接松散, 间隙增大, 胞质内见吞噬体.); B: 应激组(线粒体肿胀, 嵴减少消失, 线粒体空泡变性.); C: 使用氨基胍组(线粒体较为完整, 细胞间连接大部分正常.); D: 对照组(线粒体完整, 细胞间连接正常.)

生理上的创伤, 可以模拟人类日常生活应激. 实验结果表明, 经 14 d 束缚应激大鼠肠黏膜出现炎性细胞浸润, 尽管只是轻度的炎症, 但与对照组比较仍有显著性差异. 电镜观察肠上皮细胞发现线粒体肿胀、嵴减少、消失, 线粒体空泡变性及细胞间连接松散、微绒毛稀疏、脱落等改变. 同时结肠组织 NO 含量增高、iNOS 活性增加, 提示 NO 产物增加可能与慢性应激肠黏膜损伤有关.

NO 在病理情况下主要由活化的诱导型一氧化氮合酶(iNOS)合成. 在肠上皮细胞^[18]、肠黏膜下炎性细胞^[19-21]如中性粒细胞、单核细胞、肥大细胞、巨噬细胞均含有丰富的 iNOS. iNOS 的活化与缺氧、低 PH、细胞因子、内毒素刺激有关^[23]. 已经发现慢性束缚应激时结肠黏膜组织及血浆中有几种 iNOS 的诱导剂如 IFN- γ ^[3, 21]、IL-6^[22]等活性增高, 从而使 iNOS 活化. 慢性应激诱导的细菌黏附、移位、以及增高的内毒素^[22, 24]也有可能参与了 iNOS 的活化. 活化的 iNOS 产生大量 NO, 参与炎症细胞的趋化作用^[25-26], 启动肠黏膜炎症反应. 在应激源未解除, 刺激因素持续存在情况下, NO 与聚集的炎症细胞交互作用, 使炎症反应逐步放大, 导致肠黏膜炎症的持续和加重^[26]. Joan *et al*^[3]在 5 d 的慢性应激中未发现肠黏膜的炎症反应, 而延长应激时间达 10 d 时, 肠黏膜出现炎症反应, 证明了这个观点. 我们使用 iNOS 抑制剂抑制 NO 产生, 肠黏膜炎症细胞浸润减轻, 进一步证实 NO 参与了慢性应激肠黏膜炎症反应过程. 慢性应激时上皮超微结构的损伤也与 NO 含量增高、氮自由基生成有关. NO 与氧生成过氧化亚硝酸阴离子 ONOO⁻, ONOO⁻ 可诱导线粒体膜通道开放, 使线粒体去极化和肿胀, 释放内容物, 空泡变性^[27]. 同时, 还

直接影响 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶的活性, 从而减少 ATP 的生成^[23], 致细胞能量衰竭而凋亡. ONOO⁻ 尚可诱导脂质过氧化^[14, 27]导致线粒体膜和细胞膜的损伤. 实验研究还表明, NO 能抑制细胞间连接相关蛋白 ZO-1, ZO-2, ZO-3 的表达, 使细胞间连接变得松散, 渗透性增加^[28]. 对于慢性应激大鼠, 肠黏膜 NO 含量增加、上皮渗透性的增加有利于大分子抗原物质的摄入, 诱发肠黏膜炎症反应. 本实验中应激组出现线粒体的病变和细胞间连接的变化, 使用 iNOS 抑制剂后上述病变减轻, 证明 NO 参与了慢性应激导致的线粒体病变和上皮渗透性的变化.

氨基胍作为选择性的 iNOS 抑制剂^[29-30], 选择性地抑制 iNOS 活化, 而不影响其他型 NO 合酶的活性, 因而既抑制了 iNOS 活化生成过量 NO 造成的上皮细胞损伤, 又能够保留正常情况下少量 NO 的生理功能. 氨基胍还具有抗脂质过氧化的作用^[14], 这对于提高细胞抗氧化应激能力也是有益的. 本实验中使用氨基胍组肠黏膜组织 NO 含量减低, 组织损伤情况较轻, 证明氨基胍抑制 NO 生成, 减轻了应激诱导的肠黏膜损伤. 因此, 本实验结果表明, 慢性应激能够造成肠黏膜的损伤, NO 参与了这一过程. 氨基胍对应激诱导的肠黏膜损伤具有保护作用, 有可能用于应激状态下的肠黏膜保护治疗.

4 参考文献

- Collins SM. Stress and the gastrointestinal tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G315-318
- Levenstein S, Prantera C, Varvo V, Scribano ML, Andreoli A, Luzzi C, Arca M, Berto E, Milite G, Marcheggiano A. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of

- patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1213-1220
- 3 Soderholm JD, Yang PC, Ceponis P, Vohra A, Riddell R, Sherman PM, Perdue MH. Chronic stress induces mast cell dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 2002;123:1099-1108
- 4 Ferrier L, Mazelin L, Cenac N, Desreumaux P, Janin A, Emilie D, Colombel JF, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Bueno L. Stress-induced disruption of colonic epithelial barrier: role of interferon- α and myosin light chain kinase in mice. *Gastroenterology* 2003;125:795-804
- 5 刘少平, 董卫国, 罗和生, 余保平, 于皆平. 阿魏酸钠抗大鼠乙酸性结肠炎损伤的作用. *世界华人消化杂志* 2004;12:108-111
- 6 Guthrie E, Jackson J, Shaffer J, Thompson D, Tomenson B, Creed F. Psychological disorder and severity of inflammatory bowel disease predict health-related quality of life in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1994-1999
- 7 Gomez-Gil E, Vidal A, Panes J, Jaen J, Peri JM, Fernandez-Egea E, Pique JM. Relationship between patient's subjective stress perception and the course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol* 2003;26:411-416
- 8 陈芝芸, 严茂祥, 项柏康, 占宏伟. 慢性应激大鼠血和结肠黏膜胃肠激素的变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:59-61
- 9 李蕾, 许继田, 刘建中, 姚运伟, 伍忍. 慢性束缚应激和交感神经切除对大鼠胃酸分泌及血清促胃液素水平的影响. *河南医科大学学报* 1998;33:28-31
- 10 Barreau F, Ferrier L, Fioramonti J, Bueno L. Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut* 2004;53:501-506
- 11 Cho CH. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. *J Physiol Paris* 2001;95:253-256
- 12 睦建, 杨美青, 缪亦安. 电应激对十二指肠组织形态及氧化反应体系的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:397-399
- 13 Shah V, Lyford G, Gores G, Farrugia G. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2004;126:903-913
- 14 Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 2001;24:420-429
- 15 Li JM, Kong LD, Wang YM, Cheng CH, Zhang WY, Tan WZ. Behavioral and biochemical studies on chronic mild stress models in rats treated with a Chinese traditional prescription Banxia-houpu decoction. *Life Sci* 2003;74:55-73
- 16 尹艳茹. 应激性大鼠不同组织中 NO 浓度的变化与血压的关系. *中国临床药理学与治疗学* 2004;9:223-225
- 17 Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, Leza JC. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem* 2000;74:785-791
- 18 Perner A, Andresen L, Normark M, Rask-Madsen J. Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the normal human colonic epithelium. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:944-948
- 19 Bidri M, Feger F, Varadaradjalou S, Ben Hamouda N, Guillosson JJ, Arock M. Mast cells as a source and target for nitric oxide. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1543-1558
- 20 Santos J, Yang PC, Soderholm JD, Benjamin M, Perdue MH. Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* 2001;48:630-636
- 21 Gilchrist M, Savoie M, Nohara O, Wills FL, Wallace JL, Befus AD. Nitric oxide synthase and nitric oxide production in vivo-derived mast cells. *J Leukoc Biol* 2002;71:618-624
- 22 Witthöft T, Eckmann L, Kim JM, Kagnoff MF. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am J Physiol* 1998;275(3 Pt 1):G564-G571
- 23 Tache Y, Perdue MH. Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16(Suppl 1):137-142
- 24 Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 2003;384:1343-1364
- 25 Beck PL, Xavier R, Wong J, Ezedi I, Mashimo H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK, Podolsky DK. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G137-147
- 26 Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric Oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003;54:469-487
- 27 Vieira H, Kroemer G. Mitochondria as targets of apoptosis regulation by nitric oxide. *IUBMB Life* 2003;55:613-616
- 28 Han X, Fink MP, Uchiyama T, Delude RL. Increased iNOS activity is essential for the development of pulmonary epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L259-267
- 29 Sun GB, Huang ZH, Sun YG, Yang WY. Intervention with nitric oxide synthase inhibitors for traumatic shock in rats. *Di yi Junyi Daxue Xuebao* 2003;23:306-309
- 30 Zhang GL, Wang YH, Teng HL, Lin ZB. Effects of aminoguanidine on nitric oxide production induced by inflammatory cytokines and endotoxin in cultured rat hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2001;7:331-334

胰腺癌组织化学趋化因子表达与肿瘤相关巨噬细胞计数的相关性

杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 苗雄鹰, 刘栋才

杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 苗雄鹰, 刘栋才, 中南大学湘雅二医院肝胆疾病研究室 湖南省长沙市 410011

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

项目负责人: 杨竹林, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院肝胆疾病研究室。

收稿日期: 2004-06-08 接受日期: 2004-08-30

Relationship between expression of chemokines and tumor-associated macrophage counting in pancreatic cancer

Zhu-Lin Yang, Xing-Hui Deng, Le-Ping Yang, Xiong-Ying Miao, Dong-Cai Liu

Zhu-Lin Yang, Xing-Hui Deng, Le-Ping Yang, Xiong-Ying Miao, Dong-Cai Liu, Laboratory of Hepatobiliary Diseases, Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China
Correspondence to: Zhu-Lin Yang, Laboratory of Hepatobiliary Diseases, Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China.

Received: 2004-06-08 Accepted: 2004-08-30

Abstract

AIM: To investigate the relationship among the expression of IL-8, MCP-1, MIP-1 α and tumor-associated macrophage (TAM) counting in pancreatic cancer.

METHODS: Paraffin section of pancreatic cancer specimen was made using routine method. TAM was counted after staining. The expression of IL-8, MCP-1, MIP-1 α was detected by immunohistochemical method

RESULTS: The positive rates of IL-8, MCP-1 and MIP-1 α were 62.7%, 66.7% and 66.7%, and their scores were 2.9 ± 1.9 , 2.6 ± 1.8 and 2.4 ± 1.7 , respectively. Mean counting of TAM was 18.0 ± 6.0 in each pancreatic cancer specimen. The scores of IL-8 and TAM counting were significantly less in well-differentiated cancer than those in poorly-differentiated cancer (IL-8: 2.7 ± 1.7 vs 3.2 ± 1.2 , $P < 0.05$; TAM: 15.9 ± 6.4 vs 21.2 ± 5.2 , $P < 0.05$). The positive rates and levels of IL-8, MCP-1, MIP-1 α expression as well as TAM counting were significantly higher in metastatic cancer than those in the cancer without metastasis ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). TAM counting was significantly higher in IL-8, MCP-1 and MIP-1 α positive cancer than that in the negative one. The levels of IL-8, MCP-1, MIP-1 α expression positively related to TAM counting ($r_{IL-8} = 0.52$, $P < 0.01$; $r_{MCP-1} = 0.50$, $P < 0.01$; $r_{MIP-1\alpha} = 0.46$, $P < 0.01$). At the same time, positive relationship existed between expression of IL-8 and MCP-1 α ($r = 0.52$, $P < 0.01$), IL-8

and MCP-1 ($r = 0.54$, $P < 0.01$), MCP-1 and MCP-1 α ($r = 0.64$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The expression of IL-8, MCP-1, MIP-1 α and TAM counting may relate to the progression, angiogenesis, metastasis and prognosis of pancreatic cancer. Positive expression of IL-8, MCP-1, MIP-1 α and high TAM counting may indicate rapid progression and poor prognosis of pancreatic cancer.

Yang ZL, Deng XH, Yang LP, Miao XY, Liu DC. Relationship between expression of chemokines and tumor-associated macrophage counting in pancreatic cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(10):2349-2352

摘要

目的: 研究胰腺癌组织中 IL-8, MCP-1 和 MIP-1 α 表达特征及与 TAM 计数的相互关系及临床病理意义。

方法: 胰腺癌 ($n = 51$) 手术切除标本经 40 g/L 中性甲醛固定后常规制作石蜡包埋切片, IL-8, MCP-1 和 MIP-1 α 表达及 TAM 染色均采用常规 ABC 免疫组化法。

结果: 胰腺癌组织 IL-8, MCP-1 和 MIP-1 α 表达阳性率分别为 62.7%, 66.7% 和 66.7%, 其评分值分别为 2.9 ± 1.9 , 2.6 ± 1.8 和 2.4 ± 1.7 , TAM 计数均值为 18.0 ± 6.0 个/HP; 高分化腺癌 IL-8 评分及 TAM 计数明显低于低分化腺癌 ($P < 0.05$); 转移病例 IL-8, MCP-1, MIP-1 α 表达阳性率及其评分及 TAM 计数均明显高于未转移病例 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 化学趋化因子阳性表达病例 TAM 计数均明显高于阴性病例 ($P < 0.01$), 且其评分值与 TAM 计数均呈密切正相关 ($r_{IL-8} = 0.52$, $P < 0.01$; $r_{MCP-1} = 0.50$, $P < 0.01$; $r_{MIP-1\alpha} = 0.46$, $P < 0.01$), 同样 IL-8 与 MCP-1 ($r = 0.54$, $P < 0.01$) 和 MIP-1 α ($r = 0.52$, $P < 0.01$) 及 MCP-1 与 MIP-1 α ($r = 0.64$, $P < 0.01$) 之间也均呈密切正相关; 化学趋化因子表达和 TAM 计数与胰腺癌其他临床病理特征均无明显关系。

结论: 化学趋化因子及 TAM 计数与胰腺癌进展、血管生成、转移发生及预后有密切关系, 阳性表达者或 TAM 计数高者可能进展快和预后差。

杨竹林, 邓星辉, 杨乐平, 苗雄鹰, 刘栋才. 胰腺癌组织化学趋化因子表达与肿瘤相关巨噬细胞计数的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2349-2352
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2349.asp>

0 引言

化学趋化因子(chemokines)是一族具有趋化作用的细胞因子,分子量较小,对白细胞迁移有关键作用^[1-2].研究发现一些趋化因子表达与恶性肿瘤进展^[3-6]、血管生成^[7-10]、转移发生^[11-14]及预后^[15-18]有密切关系^[19-20].新近研究显示,恶性肿瘤内浸润的巨噬细胞分化成肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)数量与恶性肿瘤进展^[21-24]、血管生成^[25-28]及预后^[29-31]也密切相关^[32-33].胰腺癌组织趋化因子表达与TAM计数的关系研究,国内外未见文献报道.我们应用免疫组化方法研究胰腺癌组织中IL-8、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、巨噬细胞炎性蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 alpha, MIP-1 α)表达及TAM计数,并探讨其相互关系和临床病理意义.

1 材料和方法

1.1 材料 我院及湘雅医院胰腺癌手术切除标本51例,男38例,女13例,年龄21-73(51 ± 17 岁);均为胰腺导管上皮癌,包括高分化腺癌20例,中分化腺癌12例和低分化腺癌19例;临床病理证实胰腺外转移(包括区域淋巴结、网膜、邻近组织器官等)35例(68.6%).标本经40 g/L甲醛固定后常规制作石蜡包埋切片厚4 μ m. HE染色复述病理组织学特征,其他切片行免疫组化染色.兔抗人IL-8, MCP-1和MIP-1 α 多克隆抗体,鼠抗人CD68 mAb,生物素标记羊抗兔IgG,生物素标记羊抗

鼠IgG, ABC试剂以及DAB-HcI显色试剂盒均购自武汉博士德公司.

1.2 方法 TAM和IL-8, MCP-1, MIP-1 α 染色方法均为常规ABC免疫组化法,胞质内出现明显棕黄色颗粒者为阳性细胞.趋化因子表达评分标准^[34]:将癌细胞染色强度评分(无, 0分;弱, 1分;中度, 2分;强度, 3分)和阳性细胞率评分(小于5%, 0分; 5-10%, 1分; 10-20%, 2分; 20-50%, 3分; 大于50%, 4分)之和为该病例评分值,将评分值小于或等于2分定为阴性病例,大于2分定为阳性病例. TAM计数方法^[21, 25, 27, 29]:随机观察10个癌组织高倍视野,计数各视野内TAM数,求其均值为该病例TAM数.以博士德公司提供的阳性切片作为四项指标染色的阳性对照,以0.01 mol/L PBS液(pH7.4)替代-抗作为每次染色的阴性或替代对照.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件包进行 t 检验, χ^2 检验或Fischer精确概率法,检验水准 $\alpha=0.05$.

2 结果

IL-8, MCP-1, MIP-1 免疫反应产物定位于胞质, TAM免疫反应产物定位于胞质和/或胞核(图1-4). 胰腺癌51例TAM均值为 18.0 ± 6.0 个/HP, IL-8, MCP-1和MIP-1 α 表达阳性病例分别为32例(62.7%), 34例(66.7%)和34例(66.7%), 三者评分分别为 2.9 ± 1.9 、 2.6 ± 1.8 和 2.4 ± 1.7 (表1), 高分化腺癌和未转移癌TAM计数明显低于低分化腺癌和转移癌, 均有显著或高度显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 高分化腺癌IL-8表达



图1 TAM计数, 18个/HP, 胰腺中分化腺癌, ABC免疫组化法, $\times 200$.

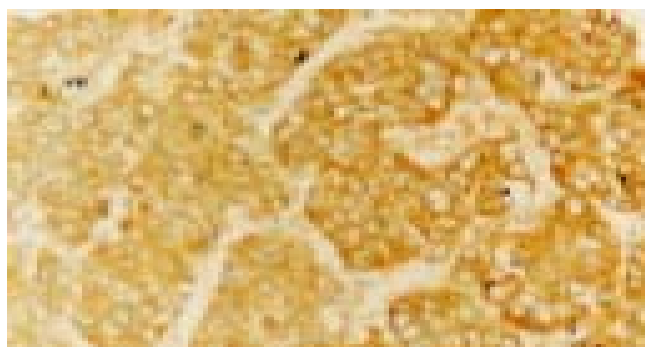


图2 IL-8阳性表达, 评分6分, 胰腺低分化腺癌, ABC免疫组化法, $\times 200$.

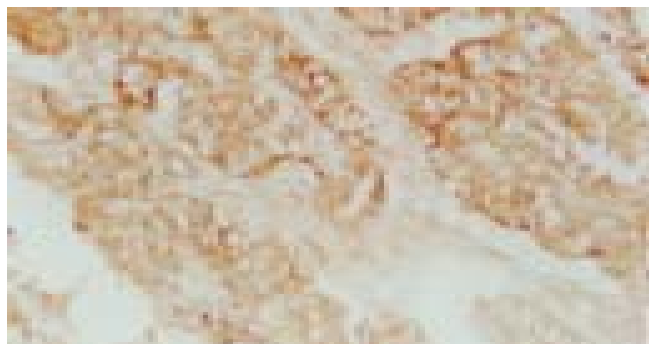


图3 MCP-1 阳性表达, 评分4分, 胰腺高分化腺癌, ABC免疫组化法, $\times 200$.



图4 MIP-1 α 阳性表达, 评分5分, 胰腺中分化腺癌, ABC免疫组化法, $\times 200$.

表1 胰腺癌组织 TAM 和 IL-8, MCP-1, MIP-1 α 表达与分化程度和转移状况的关系

胰腺癌组织	<i>n</i>	TAM	IL-8		MCP-1		MIP-1 α	
			阳性率	评分	阳性率	评分	阳性率	评分
高分化	20	15.9 \pm 6.4	45.0%	2.7 \pm 1.7	55.0%	2.3 \pm 1.8	60.0%	2.4 \pm 1.8
中分化	12	16.7 \pm 6.0	66.7%	2.6 \pm 1.5	66.7%	2.3 \pm 1.5	58.3%	2.1 \pm 1.6
低分化	19	21.2 \pm 5.2 ^a	78.9%	3.2 \pm 1.2 ^a	78.9%	3.1 \pm 1.8	78.9%	2.7 \pm 1.6
无转移	16	13.2 \pm 2.7	25.0%	1.4 \pm 1.4	37.5%	1.4 \pm 1.7	37.5%	1.5 \pm 1.8
有转移	35	20.2 \pm 5.8 ^b	80.0% ^b	3.2 \pm 1.2 ^b	80.0% ^b	3.1 \pm 1.5 ^b	80.0% ^b	2.9 \pm 1.5 ^b

^a $P < 0.05$ vs 高分化 vs ^b $P < 0.01$ vs 无转移.

评分明显低于低分化腺癌($P < 0.05$), IL-8 表达阳性率及 MCP-1, MIP-1 α 表达阳性率及评分高分化腺癌低于低分化腺癌, 但均无显著性差异($P > 0.05$); 未转移病例 IL-8, MCP-1, MIP-1 α 表达阳性率及其评分均明显低于转移病例, 均有显著或高度显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 2), IL-8, MCP-1 和 MIP-1 α 表达阳性病例 TAM 值明显高于阴性病例, 均有高度显著性差异($P < 0.01$); 经 Spearman 相关分析, TAM 计数与 IL-8($r = 0.52$, $P < 0.01$), MCP-1($r = 0.50$, $P < 0.01$)和 MIP-1 α ($r = 0.46$, $P < 0.01$), 评分值之间均存在密切正相关; IL-8 与 MCP-1($r = 0.54$, $P < 0.01$), MIP-1 α ($r = 0.52$, $P < 0.01$)评分值之间均存密切正相关; MCP-1 与 MIP-1 α 评分值之间也存在密切正相关($r = 0.64$, $P < 0.01$).

表2 胰腺癌组织趋化因子表达与 TAM 计数的关系

表达状况	<i>n</i>	TAM (mean \pm SD)
IL-8(+)	32	20.5 \pm 5.8
IL-8(-)	19	13.8 \pm 3.4 ^b
MCP-1(+)	34	20.0 \pm 5.8
MCP-1(-)	17	13.9 \pm 4.0 ^b
MIP-1 α (+)	34	20.0 \pm 6.0
MIP-1 α (-)	17	14.0 \pm 3.5 ^b

^b $P < 0.01$ vs 阳性.

3 讨论

化学趋化因子 IL-8, MCP-1 和 MIP-1 α 均为具有重要生理作用的化学趋化因子, 其表达水平与许多恶性肿瘤进展、血管生成、局部炎性细胞浸润、转移或侵袭能力及预后密切相关, 阳性表达者进展快^[1-4]、血管生成密度高^[5-8]、炎性细胞浸润量高^[9-12]、易发生转移^[13-16]、侵袭能力强^[17-18]及预后差^[19-20]. 肿瘤细胞分泌的趋化因子与相应受体或配体结合后能促进癌间质炎性细胞浸润、肿瘤血管生成、癌基质蛋白降解及影响癌细胞本身生物学行为(如增生活性增加、促血管生成因子合成增加等), 但其确切机制仍需进一步研究^[17-20]. 我们发现高分化和未转移胰腺癌三者表达阳性率及其评分明显高于低分化和转移病例, 阳性表达者 TAM 计数明显高于阴

性表达者, 且三者评分值与 TAM 计数均呈密切正相关及三者本身评分值之间也呈密切正相关. 提示 3 种趋化因子具有促进胰腺癌进展、转移发生及 TAM 浸润作用, 可能是反映胰腺癌进展、生物学行为及预后的重要生物学标记物, 且三者可能具有相互协同和共同促进作用.

巨噬细胞是单核巨噬细胞系统内某个时期的分化类型, 是肿瘤间质中炎性细胞浸润的一个关键成分, 单核巨噬细胞在癌间质通常分化为 TAM, 与肿瘤血管生成关系密切^[29-33]. 研究发现 TAM 可产生许多生长刺激因子和抑制因子、细胞因子及蛋白水解酶, 在肿瘤血管生成的级链反应中起重要作用, 除产生 VEGF, bFGF, TGF- α , PDGF 以及 IL-8, MCP-1, MIP-1 α 外, 活化的 TAM 还可产生 IL-1, TNF- α , 可提高 VEGF 和 bFGF 在血管内皮中表达水平, 从而促进肿瘤血管生成. 许多恶性肿瘤细胞分泌多种化学趋化因子, 已证实 IL-8, MCP-1, MIP-1 α 等趋化因子对 TAM 局部迁移、浸润及其活化起重要作用^[31-33]. 最近, 一些文献报道 TAM 除与肿瘤血管生成有关外, 与恶性肿瘤进展、转移及预后关系密切, TAM 数高者进展快, 易发生转移及预后差, TAM 可作为恶性肿瘤预后评估的客观指标^[31-33]. 本组资料显示, 高分化和未转移癌 TAM 计数明显低于低分化和转移病例, IL-8, MCP-1 和 MIP-1 α 阳性表达病例 TAM 明显高于阴性病例, 且其三者评分值与 TAM 计数呈密切正相关. 提示 TAM 与胰腺癌分化和转移发生关系密切, 胰腺癌细胞合成和分泌 IL-8, MCP-1 和 MIP-1 α 具有趋化巨噬细胞向肿瘤局部迁移、浸润和活化作用, 其结果与国外文献报道较一致.

4 参考文献

- Conti I, Dube C, Rollins BJ. Chemokine-based pathogenetic mechanisms in cancer. *Novartis Found Symp* 2004;256:29-41
- Pellegrino A, Nacca A, Scarelli C, Dammacco F. Chemokines and tumors. *Recent Prog Med* 2002;99:642-654
- Kassim SK, El-Salahy EM, Fayed ST, Helal SA, Helal T, Azzam Eel-D, Khalifa A. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Biochem* 2004;37:363-369
- Mathsuo Y, Sawai H, Funahashi H, Takahashi H, Sakamoto M, Yamamoto M, Okada Y, Hayakawa T, Manabe T. Enhanced angiogenesis due to inflammatory cytokines from pancreatic cancer cell lines and relation to metastatic potential. *Pancreas* 2004;28:344-352

- 5 Akiba J, Yano H, Ogasawara S, Higaki K, Kojiro M. Expression and function of interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2001;18:257-264
- 6 Li A, Varney ML, Singh RK. Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res* 2001;7:3298-3304
- 7 Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003;170:3369-3376
- 8 Kuwada Y, Sasaki T, Morinaka K, Kitadai Y, Mukaida N, Chayama K. Potential involvement of IL-8 and its receptors in the invasiveness of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2003;22:765-771
- 9 Berry KK, Varney ML, Dave BJ, Bucana CD, Fidler IJ, Singh RK. Expression of interleukin-8 in human metastatic endometrial carcinoma cells and its regulation by inflammatory cytokines. *Int J Gynecol Cancer* 2001;11:54-60
- 10 Wislez M, Philippe C, Antoine M, Rabbe N, Moreau J, Bellocq A, Mayaud C, Milleron B, Soler P, Cadrean J. Upregulation of bronchioloalveolar carcinoma-derived CXCL12 Chemokines by tumor infiltration inflammatory cells. *Inflamm Res* 2004;53:4-12
- 11 Konig JE, Senge T, Allhoff EP, Konig W. Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Prostate* 2004;58:121-129
- 12 Monti P, Leone BE, Marchesi F, Balzano G, Zerbi A, Scalerini F, Pasquali C, Calori G, Pessi F, Sperti C, Di Carlo V, Allavena P, Piemonti L. The CC Chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antitumorigenic activity. *Cancer Res* 2003;63:7451-7461
- 13 Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. Monocyte chemoattractant Protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2002;105:220-224
- 14 Ohta M, Kitada V, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. Monocyte Chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol* 2003;22:773-778
- 15 Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:3282-3289
- 16 Neumark E, Sagi-Assif O, Shalmon B, Ben-Baruch A, Witz IP. Progression of mouse mammary tumors: MCP-1-TNF alpha cross-regulatory pathway and clonal expression of promalignancy and antimalignancy factors. *Int J Cancer* 2003;106:879-886
- 17 Roodman GD, Choi SJ. MIP-1 alpha and myeloma bone disease. *Cancer Treat Res* 2004;118:83-100p
- 18 Fanti P, Nazareth M, Bucelli R, Mineo M, Gibb SK, Kumin M. Estrogen decreases chemokine levels in murine mammary tissues: implications for the regulatory role of MIP-1 alpha and MCP-1/JE in mammary tumor formation. *Endocrine* 2003;22:161-168
- 19 Wolf M, Clark-Lewis I, Buri C, Langen H, Lis M, Mazzucchelli L, Cathepsin D. Specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer. *Am J Pathol* 2003;162:1183-1190
- 20 Menten P, Saccani A, Dillen C, Wuyts A, Struyf S, Proost P, Mantorani A, Wang JM, Van Damme J. Role of the autocrine Chemokines MIP-1 alpha and MIP-1 beta in the metastatic behaviors of murine T cell lymphoma. *J Leukoc Biol* 2002;72:780-789
- 21 Ohno S, Inagawa H, Dhar DK, Fujii T, Ueda S, Tachibana M, Suzuki N, Inaoue M, Soma G, Nagasue N. The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients. *Anticancer Res* 2003;23:5015-5022
- 22 Zhang JM, Mizoi T, Shiiba K, Sasaki I, Matsunos A. Expression of thymidine phosphorylase by macrophages in colorectal cancer tissues. *World J Gastroenterol* 2004;10:545-549
- 23 Mantorani A, Schioppa T, Biswas SK, Marchesi F, Allavena P, Sica A. Tumor-associated macrophages and dendritic cells as prototypic type II polarized myeloid populations. *Tumori* 2003;89:459-468
- 24 Koga F, Kageyama Y, Kawakami S, Fujii Y, Hyochi N, Ando N, Takizawa T, Saito K, Iwai A, Masud H, Kihara K. Prognostic significance of endothelial per-Arnt-sim domain protein 1/hypoxia-inducible factor-2 alpha expression in a subset of tumor associated macrophages in invasive bladder cancer. *J Vrol* 2004;171:1080-1084
- 25 Tataroglu C, Kargi A, Ozkal S, Esrefoglu N, Akkoclu A. Association of macrophages, mast cells and eosinophil leukocytes with angiogenesis and tumor stage in non-small cell lung carcinomas (NSCLC). *Lung Cancer* 2004;43:47-54
- 26 Ohno S, Suzuki N, Ohno Y, Inagawa H, Soma G, Inoue M. Tumor-associated macrophages: foe or accomplice of tumor? *Anticancer Res* 2003;23:4395-4409
- 27 Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Okumura H, Matsumoto M, Miyazono F, Hokita S, Aikou T. Tumor-associated macrophage (TAM) infiltration in gastric cancer. *Anticancer Res* 2003;23:4079-4083
- 28 Chakraborty AK, Pawelek JM. G-CSF, macrophage and cancer metastasis: a common link. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:365-373
- 29 Heller DS, Hameed M, Cracchiolo B, Wiederkehr M, Scott D, Skurnick J, Ammar N, Lambert WC. Presence and quantification of macrophages in squamous cell carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:67-70
- 30 Nakayama Y, Nagashima N, Minagawa N, Inoue Y, Katsuki T, Onitsuka K, Sako T, Hirata K, Nagata N, Itoh H. Relationships between tumor associated macrophages and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:4291-4296
- 31 Ohno S, Inagawa H, Soma G, Nagasue N. Role of tumor-associated macrophage in malignant tumors: Should the location of the infiltrated macrophages be taken into account during evaluation? *Anticancer Res* 2002;22:4269-4275
- 32 Li C, Shintani S, Terakao N, Nakashiro K, Hamakawa H. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2002;9:1219-1223
- 33 Valkovic T, Dobril F, Melato M, Sasso F, Rizzardi C, Jonjic N. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch* 2002;440:583-588
- 34 胡淑玲, 喻伦银, 陈德基. 大鼠试验性肺癌癌变各阶段微血管密度及 VEGF, FIK-1 表达的动态变化. *癌症* 2001;20:713-717

p53 抑制剂 PFT- α 对热化疗诱导肠上皮细胞凋亡的保护作用

张安平, 刘宝华, 张连阳, 王亚旭, 熊仁平, 周 萍

张安平, 刘宝华, 张连阳, 王亚旭, 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通外科 重庆市 400042
熊仁平, 周萍, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物中心 重庆市 400042
张安平, 男, 陕西省汉阴县人, 汉族, 2002 年第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科博士, 主要从事胃肠肿瘤的分子机制研究。
项目负责人: 刘宝华, 400042, 重庆市大坪长江支路 10 号, 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通外科, lbh57268@163.com
电话: 023-68757248
收稿日期: 2004-08-31 接受日期: 2004-09-19

An inhibitor of p53 protects intestinal epithelial cells against apoptosis induced by hyperthermic chemotherapy

An-Ping Zhang, Bao-Hua Liu, Lian-Yang Zhang, Ya-Xu Wang, Ren-Ping Xiong, Ping Zhou

An-Ping Zhang, Bao-Hua Liu, Lian-Yang Zhang, Ya-Xu Wang, Department of Genenal Surgery, Daping Hospital, Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China
Ren-Ping Xiong, Ping Zhou, Center of Molecular Biology, Daping Hospital, Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China
Correspondence to: Dr. Bao-Hua Liu, Department of Genenal Surgery, Daping Hospital, Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, 10 Daping Changjiang Zhi Road, Chongqing 400042, China. lbh57268@163.com
Received: 2004-08-31 Accepted: 2004-09-19

Abstract

AIM: To investigate the effect of PFT- α (p53 inhibitor, PFT- α) on apoptosis and apoptosis-associated gene expression in intestinal epithelial cells (IECs) induced by hyperthermic chemotherapy.

METHODS: Primary cultured IECs were divided into control (CON), hyperthermic chemotherapy (HTC) and PFT- α plus hyperthermic chemotherapy group (PFT- α , HTC). IECs in HTC group were treated with hyperthermic (43 °C) cisplatin (terminal concentration 10 mg/L) for 30 min. IECs in PFT- α , HTC group were treated with different dosages (10, 20, 30, 40 μ mol/L) of PFT- α 4 h before treated the same as those in HTC group. The rate of apoptosis was detected using flow cytometry after double staining of annexin V-FITC and PI. The expression of p53 and Bax protein were detected by Western blotting, and the level of *bax* mRNA expression was detected using semi-quantitative RT-PCR.

RESULTS: PFT- α reduced apoptotic rate of IECs in a dose-dependant manner, from (14.83 \pm 1.51%) at the concentration of 10 μ mol/L to (3.75 \pm 0.33%) at 40 μ mol/L, which

were significantly lower than the rate in HCT group (27.03 \pm 2.07%, $P < 0.01$). The ratio of p53 in the nucleus and cytoplasm was 13.22 : 1 in HCT group. However, the ratio in PFT- α , HTC group decreased from 0.8 : 1 at the concentration of 10 μ mol/L to 0.4 : 1 at 40 μ mol/L, which were significantly lower than that in HCT group. Hyperthermic chemotherapy upregulated the levels of *bax* mRNA (128.85 \pm 2.38) and protein (14.29 \pm 0.43) in IECs, whereas PFT- α significantly reduced ($P < 0.01$) those levels in a dose-dependant manner, from 106.98 \pm 3.75 (mRNA) and 5.79 \pm 0.24 (protein) at the concentration of 10 μ mol/L to 4.79 \pm 0.31 (mRNA) and 1.36 \pm 0.09 (protein) at 40 μ mol/L respectively.

CONCLUSION: PFT- α effectively inhibits apoptosis of IECs induced by hyperthermic chemotherapy. The mechanisms may relate to its effect on changing the nuclear translocation of p53 and inhibiting the expression of *bax* gene.

Zhang AP, Liu BH, Zhang LY, Wang YX, Xiong RP, Zhou P. An inhibitor of p53 protects intestinal epithelial cells against apoptosis induced by hyperthermic chemotherapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2353-2355

摘要

目的: 探讨 PFT- α (p-fifty three inhibitor, PFT- α) 对热化疗诱导原代培养肠上皮细胞 (intestinal epithelial cells, IECs) 凋亡及其凋亡相关基因表达的影响。

方法: 原代培养 IECs 分为正常对照组、热化疗组和 PFT- α + 热化疗组, 运用顺铂联合温热 (43 °C) 处理 IECs 30 min, 对比加入不同浓度的 PFT- α 后, Annexin V-FITC /PI 染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡。Western blot 检测 IECs 的 p53 和 Bax 蛋白表达, RT-PCR 检测 Bax mRNA 的表达。

结果: 热化疗导致 IECs 发生凋亡, Bax 蛋白表达明显高于对照组。10, 20, 30, 40 μ mol/L PFT- α 作用于顺铂联合温热处理的 IECs 后, 细胞凋亡率下降且呈剂量依赖性, p53 在 IECs 胞核/胞质表达比例下降, Bax 蛋白和 mRNA 的表达随 PFT- α 的剂量升高而逐渐下降。

结论: PFT- α 对热化疗诱导肠上皮细胞凋亡具有抑制作用, 其机制可能与改变 p53 核转位和抑制促凋亡基因 Bax 的表达相关。

张安平, 刘宝华, 张连阳, 王亚旭, 熊仁平, 周萍. p53 抑制剂 PFT- α 对热化疗诱导肠上皮细胞凋亡的保护作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2353-2355
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2353.asp>

0 引言

温热化疗在杀伤肿瘤细胞的同时对增生活跃的IECs产生损伤,导致抗肿瘤副效应,p53在诱导IECs凋亡中可能起重要作用^[1-2].p53特异性抑制剂PFT- α 可以阻断阿霉素、紫杉醇、 γ 射线等诱导的p53激活,降低正常组织的凋亡^[3].我们探讨PFT- α 抑制顺铂联合温热诱导IECs的p53表达,以及对IECs损伤的影响及机制.

1 材料和方法

1.1 材料 参照文献^[4]进行结肠上皮细胞体外培养.PFT- α 为Calbiochem公司产品;顺铂,MTT,Tripure为Sigma公司产品,DNA Marker DL2000,Ex TaqTM,PCR试剂盒购自Takara公司;M-MLV反转录酶为Promega公司产品;Western Blot发光试剂盒,p53单抗,Bax单抗均购自Santa Cruz公司;Annexin-V-FITC购自BD公司.

1.2 方法 将培养的结肠上皮细胞分为3组:(1)正常对照组(control group, Con);(2)热化疗组(hyperthermic chemotherapy group, HTC):顺铂溶于DMSO中,终浓度为10 mg/L加入培养板中,在43℃恒温水浴箱中处理30 min后,用PBS洗细胞2次后,加入培养基将细胞放入孵箱培养2 h;(3)PFT- α +热化学组(PFT- α plus hyperthermic chemotherapy group, PFT- α + HTC):PFT- α 在临用前溶解于DMSO,以10, 20, 30, 40 μ mol/L在热化学处理前4 h加入培养板中,然后处理同热化学处理组,在热化学处理完毕后用PBS洗细胞2次,再重新加入上述PFT- α 后将细胞放入孵箱培养2 h.收集各组细胞,2 000 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 μ L和PI 2.5 μ L到100 μ L细胞悬浮液中,混匀后避光反应10 min,加150 μ L样品稀释液到样品中,混匀后上机检测细胞凋亡.提取IECs胞质、胞核和总蛋白,Bradford法测定蛋白浓度后上样,110 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后行半干转膜至PVDF膜上,封闭液封闭后依次加入p53单抗、Bax单抗(一抗1:400)和辣根过氧化物酶标记的IgG(二抗1:2 500)室温孵育,再加入化学发光试剂与PVDF膜共孵育后进行自显影.用扫描分析软件系统(Labwork4.0)测量Western blot积分吸光度值(LA),以正常对照组实际LA值为参照,其他组别的LA与之相比的相对积分吸光度(RLA)为蛋白的表达量.另用Tripure试剂提取总RNA,参照试剂盒取1 μ L RNA进行操作.Primer5.0软件进行引物设计.Bax上游引物:5'-GGATGCGTCCACCAAGAA-3',下游引物为5'-GCACTCCCGCCACAAAGA-3',产物长度为386 bp. β -actin为内参照,上游引物:5'-CCAAGGCCAACC GCGAGAAGATGAC-3',下游引物:5'-AGGGTACATGCTGTGCCGCCAGA-3',产物长度为587 bp.引物由上海生工生物公司合成.条件是94℃预变性5 min,然后94℃变性55 s,50℃退火1 min,72℃延伸1 min,30次循环后,最后72℃ 10 min.琼

脂糖凝胶电泳,用扫描分析软件系统(Labwork4.0)测量RT-PCR结果的积分吸光度值(LA).样本与内参照 β -actin的LA比值为样本的mRNA相对含量.

统计学处理 所有数据均以平均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,采用SPSS10.0统计软件进行分析.组间比较采用 t 检验, $P<0.01$ 为差异非常显著.

2 结果

2.1 PFT- α 对热化疗诱导IECs凋亡的影响 IECs的自然凋亡率在 $2.88 \pm 0.44\%$,热化疗损伤后其凋亡率达 $27.03 \pm 2.07\%$,PFT- α 抑制热化疗诱导IECs的凋亡,且呈剂量依赖性,凋亡率由 $14.83 \pm 1.51\%$ 逐渐下降至 $3.75 \pm 0.33\%$,与热化疗组相比凋亡率显著下降($P<0.01$).

2.2 PFT- α 对IECs胞核和胞质p53表达的影响 Western blot分析显示热化疗损伤后p53主要在细胞核表达,胞核/胞质比为13.22.10 μ mol/L PFT- α 作用后其胞质表达升高,胞核表达减少,胞核/胞质比下降至0.80,40 μ mol/L PFT- α 作用后这种变化更显著.与热化疗组相比p53胞核/胞质表达比存在差异显著性($P<0.01$)(表1).

表1 p53在IECs胞核和胞质表达变化(mean \pm SD, $n=6$)

分组	胞核	胞质	胞核/胞质
Con	1.35 ± 0.10	1.00 ± 0.00	1.35
HTC	3.97 ± 0.41	0.29 ± 0.01	13.22 ^b
10 μ mol/L PFT- α +HTC	1.70 ± 0.87	2.16 ± 0.13	0.80
40 μ mol/L PFT- α +HTC	1.29 ± 0.08	3.24 ± 0.25	0.40

^b $P<0.01$ vs 其他三组.

2.3 PFT- α 对IECs的Bax蛋白和mRNA表达的影响 与正常对照组比较,IECs在热化疗损伤后Bax的蛋白和mRNA表达显著升高($P<0.01$),在PFT- α 处理后IECs的Bax的蛋白和mRNA表达显著降低且呈剂量依赖性,与热化疗组相比存在差异显著性($P<0.01$)(图1, 2, 表2).

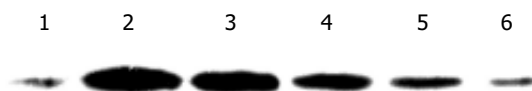


图1 IECs的Bax蛋白表达. 1: Con; 2: HTC; 3, 4, 5, 6: PFT- α +HTC (PFT- α 分别为10, 20, 30, 40 μ mol/L).

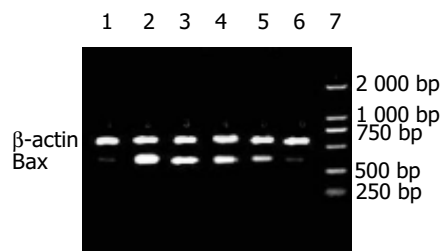


图2 IECs的Bax mRNA表达. 1: Con; 2: HTC; 3, 4, 5, 6: PFT- α + HTC (PFT- α 分别为10, 20, 30, 40, μ mol/L); 7: DNA Marker DL2000.

表2 IECs 的 Bax 蛋白和 mRNA 表达变化(mean \pm SD, 相对积分吸光度)

指标	Con	HTC	PFT- α (μ mol/L)+HTC			
			10 μ mol/L	20 μ mol/L	30 μ mol/L	40 μ mol/L
蛋白	1.00 \pm 0.00	14.29 \pm 0.43 ^b	5.79 \pm 0.24	3.67 \pm 0.38	2.36 \pm 0.15	1.36 \pm 0.09
mRNA	4.43 \pm 0.19	128.85 \pm 2.38 ^b	106.98 \pm 3.75	76.94 \pm 1.88	43.99 \pm 2.78	4.79 \pm 0.31

^b $P < 0.01$ vs Con 和 PFT- α + HTC.

3 讨论

腹腔低分化恶性肿瘤常导致肿瘤细胞的腹腔播散, 是术后肿瘤复发的主要原因之一, 而腹腔内温热灌注化疗是腹腔肿瘤播散有效的治疗措施^[5-7], 但同时对于增生活跃的正常组织如肠上皮细胞、毛囊细胞和造血干细胞等也产生损伤, 顺铂作为常用的抗肿瘤药物, 可以与 DNA 结合形成交链, 抑制 DNA 合成而导致细胞周期停滞和凋亡发生, 而温热可增加细胞对顺铂的摄取, 增强顺铂的抗肿瘤效应^[8-10]. p53 特异性抑制剂 PFT- α 是一种小分子化学合成物, 可使经 γ 射线致死剂量照射 C57BL 和 Balb/c 两系小鼠的存活达 60%, 在照射后 7 mo 并无新发肿瘤, 认为 PFT- α 通过抑制 p53 的激活而能够抑制抗肿瘤治疗的副效应^[11]. 我们采用原代结肠上皮细胞为研究对象, 顺铂联合温热处理可导致 IECs 发生凋亡, p53 蛋白向细胞核内聚集, Bcl-2 家族的促凋亡基因 Bax 的蛋白和 mRNA 表达显著升高. 通过运用 PFT- α 阻断 p53 由细胞质向细胞核转运, 降低 Bax 的表达, 使 IECs 的凋亡减少, 提高细胞的生存力. 在研究中发现热化疗损伤后立即去除 PFT- α , 则他对肠上皮细胞损伤的保护作用极其微弱, 而 PFT- α 继续保护 2 h, 其保护效应达高峰, 随后下降. Zhang *et al*^[12] 发现顺铂常引起耳蜗和前庭感觉毛细胞的损害而导致不可逆转的听力丧失和平衡障碍, 对新生小鼠的前庭和耳蜗进行器官培养, 在顺铂处理的耳蜗和前体中加入 PFT- α , 可以使毛细胞的生存率增加且呈剂量依赖性. 通过抑制 p53 的表达, 使顺铂诱导耳蜗和前庭毛细胞的 caspase-1, caspase-3 活性降低, 明显降低对毛细胞的损害, 为减轻顺铂引起的耳毒性、前庭毒性和神经毒性副作用提供新的方法. Javelaud *et al*^[13] 发现 PFT- α 可以减轻柔红霉素诱导的 HCT116p21^{WAF1-/-} 细胞的凋亡, PFT- α 抑制 p53 而使 Bcl-2 的表达水平升高, Bax 的表达水平下降, 恢复 Bax/Bcl-2 比率, 其作用与 p21^{WAF1} 反义寡核苷酸相似. Liu *et al* 报道了 PFT- α 对阿霉素诱导心肌细胞凋亡和心功能损害的保护效应. 阿霉素上调 Bax 和 MDM2mRNA 水平, 通过 p53 在丝氨酸 15 的磷酸化水平提高上调 p53 蛋白水平, 诱导心肌细胞凋亡导致阿霉素的毒性、超微结构改变和心功能障碍. 在给予阿霉素前 30 min 和给药后 3 h 使用 PFT- α , 则心肌细胞 Bax 和 MDM2mRNA 水平下降, 实验表明 PFT- α 可有效抑制阿霉素诱导的心肌细胞凋亡, 减轻阿霉素抗肿瘤治疗中对心脏的损伤.

我们发现 PFT- α 抑制热化疗诱导结肠上皮细胞凋亡, 降低对细胞的损伤, 为以后通过抑制 p53 而减轻抗肿瘤副效应提供了新的思路, 但是 PFT- α 发挥保护作用的机制还有待深入研究.

4 参考文献

- van der Vange N, van Goethem AR, Zoetmulder FAN, Kaag MM, van de Vaart PJM, ten Bokkel Huinink WW, Beijnen JH. Extensive cytoreductive surgery combined with intra-operative intraperitoneal perfusion with cisplatin under hyperthermic conditions (OVHIPEC) in patients with recurrent ovarian cancer: a feasibility pilot. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:663-668
- Shen P, Levine EA, Hall J, Case D, Russell G, Fleming R, McQuellon R, Geisinger KR, Loggie BW. Factors predicting survival after intraperitoneal hyperthermic chemotherapy with mitomycin C after cytoreductive surgery for patients with peritoneal carcinomatosis. *Arch Surg* 2003;138:26-33
- Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 1999;285:1733-1737
- Grossmann J, Walther K, Artinger M, Kiessling S, Steinkamp M, Schmautz WK, Stadler F, Bataille F, Schultz M, Scholmerich J, Rogler G. Progress on isolation and short-term ex-vivo culture of highly purified non-apoptotic human intestinal epithelial cells (IEC). *Eur J Cell Biol* 2003;82:262-270
- Xu DZ, Zhan YQ, Sun XW, Cao SM, Geng QR. Meta-analysis of intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:2727-2730
- 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
- Ye M, Pan HM, Wang HY, Lou F, Jin W, Zheng Y, Wu JM. Catheterization-associated complications of intraperitoneal chemotherapy in advanced gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:1372-1374
- Ryu KS, Kim JH, Ko HS, Kim JW, Ahn WS, Park YG, Kim SJ, Lee JM. Effects of intraperitoneal hyperthermic chemotherapy in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;94:325-332
- Piso P, Dahlke MH, Loss M, Schlitt HJ. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in peritoneal carcinomatosis from ovarian cancer. *World J Surg Oncol* 2004; 2:21
- Hall JJ, Loggie BW, Shen P, Beamer S, Douglas Case L, McQuellon R, Geisinger KR, Levine EA. Cytoreductive surgery with intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for advanced gastric cancer. *J Gastrointest Surg* 2004;8:454-463
- Komarova EA, Gudkov AV. Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy. *Biochemistry (Mosc)* 2000;65:41-48
- Zhang M, Liu W, Ding D, Salvi R. Pifithrin- α suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience* 2003;120:191-205
- Javelaud D, Besancon F. Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *J Biol Chem* 2002;277:37949-37954

¹³C- 美沙西丁呼气试验与非酒精性脂肪肝病理改变的相关性研究

郭秀丽, 张 磊, 杨昭徐

郭秀丽, 张磊, 杨昭徐, 首都医科大学附属天坛医院消化内科
北京市 100050

郭秀丽, 女, 生于 1979 年, 现为首都医科大学附属天坛医院消化内科 02 级
在读研究生。

项目负责人: 郭秀丽, 100050, 北京市天坛西里 6 号, 天坛医院消化内科。
guoxiliu@tom.com

电话: 010-67016611-2359, 010-67050530.

收稿日期: 2004-06-30 接受日期: 2004-07-27

Correlation between ¹³C-methacetine breath test and pathological changes of non-alcoholic fatty liver

Xiu-Li Guo, Lei Zhang, Zhao-Xu Yang

Xiu-Li Guo, Lei Zhang, Zhao-Xu Yang, Department of Digestion, Tiantan
Hospital, Beijing 100050, China

Correspondence to: Xiu-Li Guo, Department of Digestion, Tiantan
Hospital, Beijing 100050, China. guoxiliu@tom.com

Received: 2004-06-30 Accepted: 2004-07-27

Abstract

AIM: To investigate and assess ¹³C-methacetine breath test as a method to evaluate the degree of pathological lesion in liver of non-alcoholic steatohepatitis.

METHODS: High fat diet was adopted to establish an animal model. Forty male Wistar rats, weighing 200±20 g, were randomly assigned into two groups, high fat diet group (test group) and normal diet group (control group). Liver puncture biopsy was performed in two groups of mice at 2, 4, 6, 8 wk respectively. The pathological changes were observed and graded according to Brunt System. At the same time, the isotope-selective nondispersive infrared spectrometer (NDIRS), was applied to practice the ¹³C-methacetine breath test and peak value of breathing (DOB), the duration to peak (T), cumulative expiration within 60 min (CU/60 min) were determined. Then, correlation between the dynamic and pathological changes of all parameters in the breath test was analyzed.

RESULTS: The values of DOB in the test and control groups before the test were 34.9±3.9%, 35.4±3.8% respectively. The results in the test group at 2, 4, 6, 8 wk were 32.2±3.0%, 21.0±2.5%, 16.1±2.8%, 11.6±2.2% respectively, and 34.7±3.8%, 35.3±3.7%, 35.1±4.3%, 35.0±3.5% in the control group respectively. Significant differences existed among the different period of time in the test group ($P<0.01$), but not in the control group. The differences between the test group and the control group at the same period of time were also significant. The breath test (DOB) negatively related to the pathological scores ($r=0.89$, $P=0.00$, $P<0.01$).

CONCLUSION: ¹³C-methacetine breath test can be a non-invasive method to evaluate the pathological changes of non-alcoholic steatohepatitis.

Guo XL, Zhang L, Yang ZX. Correlation between ¹³C-methacetine breath test and pathological changes of non-alcoholic fatty liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2356-2359

摘要

目的: ¹³C-美沙西丁(methacetine)呼气试验评价非酒精性脂肪肝肝细胞损害程度的方法及意义。

方法: 自行设计大鼠 ¹³C-美沙西丁呼气试验检测程序与方法; 采用高脂饲料喂养方法建立脂肪肝模型; Wistar ♂ 大鼠 40 只, 重量 200±20 g, 随机分为高脂饲料喂养组(试验组)及普通饲料喂养组(正常对照组)。于实验的 2, 4, 6, 8 wk 分别对二组大鼠进行肝穿, 观察其病理改变, 根据 Brunt 积分系统评分; 同时应用红外线能谱分析仪(IRIS)进行 ¹³C-美沙西丁呼气试验检测, 观察呼气峰值(DOB)、达峰时间(T)和 60 min 累积呼气量(CU 60 min)各参数的动态变化, 并结合动物的生理学特征分析; 观察呼气试验中各参数的动态变化与病理变化的相关性。

结果: 试验组, 对照组实验前的 DOB 分别为 34.9±3.9% 和 35.4±3.8%, 试验组 2, 4, 6, 8 wk 的 DOB 分别为 32.2±3.0%, 21.0±2.5%, 16.1±2.8% 和 11.6±2.2%, 对照组 2, 4, 6, 8 wk 的 DOB 分别为 34.7±3.8%, 35.3±3.7%, 35.1±4.3% 和 35.0±3.5%; 试验组各时间段之间的差别有显著性意义($P=0.00$, $P<0.01$); 与同期正常对照组大鼠相比, 差别有统计学意义。而正常对照组各时间段之间差别无统计学意义($P>0.05$)。呼气试验结果(DOB)与同期的病理积分负相关($r=0.89$, $P=0.00$, $P<0.01$)。

结论: ¹³C-美沙西丁呼气试验有可能作为非酒精性脂肪肝病病变程度无创性评价方法。

郭秀丽, 张磊, 杨昭徐. ¹³C-美沙西丁呼气试验与非酒精性脂肪肝病理改变的相关性研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2356-2359

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2356.asp>

0 引言

目前, 脂肪肝的发病率呈上升趋势。在脂肪肝的早期阶段其临床表现不明显且缺乏特异性, 临床诊断有一定

困难^[1]. 肝脏的病理组织学检查是脂肪肝诊断的金标准, 但其属有创检查, 受检者的依从性差, 尤其是更难进行反复多次的检查. 生化检查、B超、CT是目前临床诊断脂肪肝有关的常用方法, 但这些检查均不能定量的反映肝细胞功能. 呼气试验可作为无创地、实时地反映肝细胞功能的检测方法^[2-5]他在肝病的临床应用已经有30 a的历史^[6], 主要用于终末期肝病、肝移植的预后评估^[7-9], 但在脂肪肝的临床应用报道很少. 本研究旨在评价 ^{13}C -美沙西丁(methacetin)呼气试验作为定量检测非酒精性脂肪肝肝细胞功能的方法及其意义.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂, Wistar大鼠, 40只, 质量 200 ± 20 g. 红外线能谱分析仪(IRIS)由德国瓦格纳公司生产, Menghini—秒钟肝穿由美国SFBSIDINARY of TROMES公司提供. ^{13}C -美沙西丁由德国瓦格纳公司生产. 以4 g/L的浓度用蒸馏水充分溶解.

1.2 方法 Wistar大鼠随机分为两组机分为高脂饲料喂养组(试验组), 用高脂饲料喂养8 wk及普通饲料喂养组(正常对照组). 高脂饲料配方 基础饲料加2%胆固醇, 10%猪油, 5%蔗糖, 0.5%胆酸钠^[10-11]. 将大鼠放入一个体积为1.5 L的玻璃瓶内, 瓶的两端均带有直径为1 cm的开口, 一端与IRIS相连, 一端与大气相通; 利用IRIS的软件系统^[12], 设置出符合大鼠生理特征的参数指标(Inlet time 200 s, Waiting time 35 s, Flushing time 35 s, measurement 60 s). 试验前将大鼠放入上述模型中30 min适应新环境, 然后取出含 ^{13}C -美沙西丁呼气试验用的底物药液灌胃, 按人体剂量(1.5 mg/kg)的6倍即4 mg. 并立即放回瓶中开始试验, 当DOB值降到本底时结束试验. 并于当天或第2 d对大鼠进行肝脏穿刺. 用

10%水和氯醛3 mL/kg腹腔内注射麻醉, 取剑突下, 右锁中线肋弓上缘, 右腋前线肋弓上缘3点进行穿刺, 取出肝脏组. 标本立即置于40 g/L甲醛液中固定, HE染色. 根据肝脏脂肪变性程度以及炎症程度的分级进行Brunt评分^[13-14]. 对两组大鼠于实验前, 2, 4, 6, 8 wk分别进行上述检查项目操作与观察. 观察呼气峰值(DOB)、达峰时间(T)和60 min累积呼气量(CU_{60 min})各参数的动态变化, 并分析呼气试验中各参数变化与肝组织病理变化的相关性^[15].

统计学处理 用SPSS11.5统计软件包进行分析. 数据用均数 \pm 标准差 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 各组数据之间的比较采用单因素方差分析, 与肝组织病理变化的关系采用Pearson相关分析.

2 结果

2.1 肝脏病理组织改变 实验组2 wk的病理显示肝小叶结构清晰, 肝细胞轻度浊肿, 可见少量脂滴浸润(图1A评分1分); 4 wk显示肝小叶结构欠清晰, 肝细胞内充满大小不等, 数量不一的脂滴, 以腺泡3区明显, 部分脂滴融合成片, 汇管区与肝窦内有少量中性粒细胞, 单核细胞浸润(图1B评分3分); 6 wk显示肝细胞变性较前严重, 并伴有部分肝细胞灶状坏死, 大量炎细胞浸润(图1C评分6分); 8 wk显示肝细胞坏死明显, 在汇管区少量纤维组织生成, 肝小叶结构不清, 部分肝界板消失. 尚未形成假小叶(图1D评分8分).

2.2 呼气实验结果 脂肪肝组4, 6, 8 wk各时间段与2 wk的DOB值比较有显著性差异; 脂肪肝组各时间段与同期正常对照组DOB值比较亦有显著性差异(表1). 但正常对照组各时间段之间DOB值之间的比较无显著性差异. 脂肪肝组4, 6, 8 wk各时间段与2 wk的CUM

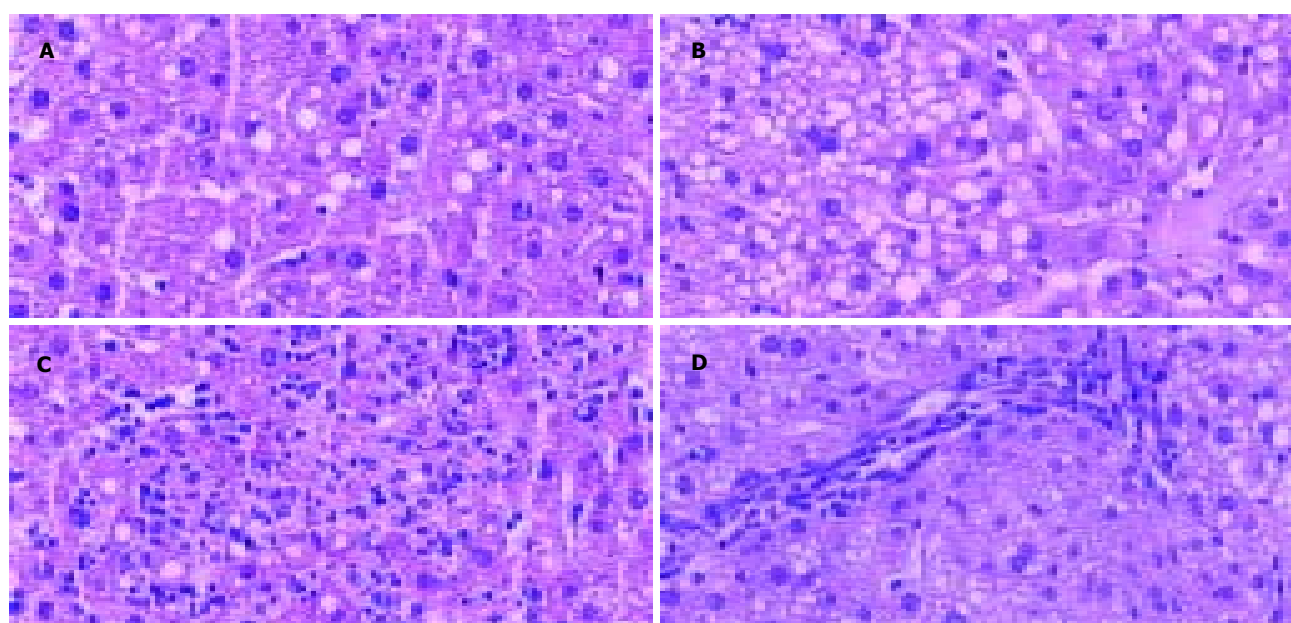


图1 A: 试验组2 wk的病理改变肝细胞内可见少量脂滴, HE染色 $\times 20$, 评分1分; B: 试验组4 wk的病理改变肝细胞内明显的脂滴浸润, HE染色 $\times 20$, 评分3分; C: 试验组6 wk的病理改变肝小叶内明显的炎细胞浸润, HE染色 $\times 20$, 评分6分; D: 试验组8 wk的病理改变可见少量纤维组织增生, HE染色 $\times 20$, 评分8分.

值比较有显著性差异:脂肪肝组各时间段与同期正常对照组 CUM 值比较亦有显著性差异(见表1). 但正常对照组各时间段之间CUM值之间的比较无显著性差异. 脂肪肝组, 正常组各时间段之间的达峰时间(T)差别均无统计学意义.

将肝穿标本的病理组织学检查脂肪肝严重程度分级积分统计, 与同期呼气实验的 DOB 值对照(见表2), 进行 Pearson 统计学分析, 二者呈显著负相关($r=0.89$, $P<0.01$).

3 讨论

我们成功地建立了高脂性脂肪肝的大鼠模型(如图1所示). 其病理改变显示处于肝硬化前期阶段的脂肪肝. 我们对模型病理变化的观察时限加以改良, 即通过定期肝穿取材而不处死动物(大鼠)的方法, 可连续动态观

察脂肪肝的病理变化进展过程, 有助于消除个体间的差异对病理变化结果观察的影响, 使对病理变化的观察更具有可比性, 也有利于同步进行呼气试验的相关检测. 高脂饲养组2 wk病理组织学检查仅见少量的脂肪浸润, 4 wk 时可见脂肪浸润, 6 wk 炎性细胞成灶状分布, 8 wk 已有少量纤维组织增生. 说明高脂饲料喂养组脂肪肝病理变化的严重程度与高脂饲料喂养的周期长短呈正相关. ^{13}C -methacetine 呼气试验原理为 ^{13}C -methacetine 标记在肝细胞微粒体细胞色素 P450 多种酶系统的作用下, 发生 O- 位脱甲基, 生成对乙酰氨基酚和甲醛, 后者在继续氧化生成 CO_2 , 用排出的速率及丰度来反映肝细胞的实时功能^[16-18]. 呼气试验对终末期肝病, 尤其在肝移植前后, 很有实用价值. 研究发现肝移植前呼气试验的丰度为 $3.3 \pm 1.6\%$ 无肝期降为 0.1% 而 1 mo 后则升为 $15.1 \pm 5.4\%$, 移植前丰度越低

表1 大鼠呼气实验检测

指标	组别	0 wk	2 wk	4 wk	6 wk	8 wk
DOB	正常对照	35.4 ± 3.8	34.7 ± 3.8	35.3 ± 3.7	35.1 ± 4.3	35.0 ± 3.5
	脂肪肝	34.9 ± 3.9	32.2 ± 3.0^a	21.0 ± 2.5^{ab}	16.1 ± 2.8^{bd}	11.6 ± 2.2^{cd}
CUM _{60 min}	正常对照	21.1 ± 2.0	20.5 ± 1.8	20.9 ± 1.9	20.9 ± 1.8	20.8 ± 1.9
	脂肪肝	21.0 ± 1.8	16.1 ± 2.1^a	11.4 ± 1.8^{ab}	7.1 ± 1.1^{bd}	4.7 ± 0.8^{bd}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 正常对照; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 脂肪肝组 2 wk.

表2 不同时间段 DOB 与病理积分关系

2 wk		4 wk		6 wk		8 wk	
DOB	病理积分	DOB	病理积分	DOB	病理积分	DOB	病理积分
32.5	1	25.9	3	15.8	7	10.5	8
30.2	0	21.5	4	20.2	6	12.6	8
35.8	1	23.5	5	16.5	8	15.8	8
36.2	1	19.5	3	14.8	6	14.6	8
35.1	1	18	2	21.5	7	12.5	8
32	1	24.5	5	22.3	7	9.5	8
32.7	1	21.6	5	15.4	8	8.7	7
31.5	1	19.1	6	12.6	7	12.6	8
34.5	1	19.8	4	11.5	5	10.3	8
37	1	20.4	5	15.6	4	7.9	7
30.1	1	19.6	3	15.8	5	10.6	8
27.8	1	18.7	5	16.3	6	14.6	8
34.2	1	20.5	4	17.8	7	13.5	7
26	1	19.8	5	12.9	7	11.5	7
30.5	1	25.8	3	14.9	6	9.5	8
30.5	2	24.5	5	17	7	10.6	7
31.5	2	20.6	4	12.6	6	14.6	8
27.9	1	21.5	5	14.6	7	11.3	7
35	1	17.5	3	15.9	8	9.8	8
32.8	1	18.6	5	17	7	10.6	7

的患者, 移植后死亡的危险性越大^[19]。我们将此项检查方法用于脂肪肝阶段肝细胞功能的判定。脂肪肝组呼气试验 2 wk 为 $32.2 \pm 3.0\%$, 而 8 wk 时就递减为 $11.6 \pm 2.2\%$, 而且其值的变化与同步病理组织学检查脂肪肝严重程度呈负相关($r=0.89$, $P<0.01$)说明呼气试验是一项较为敏感的检测方法。本研究结果表明, ^{13}C -美沙西丁呼气试验可以作为脂肪肝肝细胞功能无创的检测方法。可望对临床开展呼气试验用于脂肪肝肝功能定量评估, 药物疗效的评价, 脂肪性肝病的预后判断等有参考价值。

目前国内尚无有关呼气试验动物模型方面的研究报道, 而国外相关的动物模型均以静脉方式进行检测^[20], 试剂的质量要求高, 费用高, 操作复杂。我们采用了经口灌胃底物的途径改良呼气试验, 更符合药物的体内代谢特点; 为呼气试验更广泛的用于研究带来方便。

4 参考文献

- 1 韩萍, 成军, 李莉. 非酒精性脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1038-1040
- 2 Suzuki S, Ishii Y, Asai S, Kohno T, Mazaki T, Takahashi Y, Iwai S, Ishikawa K. [1-(13)C] breath test of galactose and fructose for quantitative liver function. *J Surg Res* 2001;96:90-95
- 3 Saadeh S, Behrens PW, Parsi MA, Carey WD, Connor JT, Grealis M, Barnes DS. The utility of the ^{13}C -galactose breath test as a measure of liver function. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:995-1002
- 4 Ishii T, Furube M, Hirano S, Takatori K, Iida K, Kajiwaru M. Evaluation of ^{13}C -phenylalanine and ^{13}C -tyrosine breath tests for the measurement of hepatocyte functional capacity in patients with liver cirrhosis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2001;49:1507-1511
- 5 Schneider AR, Caspary WF, Stein J. (13)C-breath tests for the assessment of liver function. *Z Gastroenterol* 2004;42:269-275
- 6 Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA, Andreoli A, De Lorenzo A, Nista EC, Miele L, Cremonini F, Cazzato IA, Grieco A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Review article: breath testing for human liver function assessment. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1977-1996
- 7 唐恭顺, 匡安仁. ^{14}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;12:1184-1187
- 8 骆子义, 谌取鼎, 关丽娟, 何清, 杨山麦. 碳 14 氨基比林呼气试验对肝硬化患者的肝储备功能及预后的评价. 中国中西医结合消化杂志 2001;9:5:277-278
- 9 Di Campli C, Angelini G, Armuzzi A, Nardo B, Zocco MA, Candelli M, Santoliquido A, Cavallari A, Bernardi M, Gasbarrini A. Quantitative evaluation of liver function by the methionine and aminopyrine breath tests in the early stages of liver transplantation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:727-732
- 10 戴宁, 曾民德, 李继强, 范竹萍, 茅益民, 彭延伸, 邱德凯. 非酒精性脂肪肝肝细胞色素 P450 II E1 的表达与氧化抗氧化的关系. 中华肝脏病杂志 1999;7:104-106
- 11 徐正婕, 范建高, 王国良, 丁晓东, 田丽艳, 郑晓英. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型. 世界华人消化杂志 2002;10:392-396
- 12 Mana F, Georges B, Reynaert H, Ham HR, Urbain D. Evaluation of the ^{13}C -aminopyrine breath test using nondispersive infrared spectrometry. *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:328-330
- 13 Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis* 2001;21:3-16
- 14 Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-2474
- 15 严惟力, 孙大裕, 林祥通, 蒋义斌, 孙旭, 卢洪洲, 刘兴党, 林海. L-[1- ^{13}C]苯丙氨酸呼气试验定量检测肝功能研究. 核技术 2003;5:362-366
- 16 Candelli M, Cazzato IA, Zocco MA, Nista EC, Fini J, Armuzzi A, Camise V, Santoro M, Miele L, Grieco A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. ^{13}C -breath test in the study of mitochondrial liver function. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004;8:23-31
- 17 Nista EC, Fini L, Armuzzi A, Candelli M, Zocco MA, Cazzato IA, Merra G, Finizio R, Miele L, Grieco A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. ^{13}C -breath tests in the study of microsomal liver function. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004;8:33-46
- 18 Perri F, Marras RM, Ricciardi R, Quitadamo M, Andriulli A. ^{13}C -breath tests in hepatology (cytosolic liver function). *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004;8:47-49
- 19 Petrolatit A, Festi D, De Berardinis G, Colaiocco-Ferrante L, Di Paolo D, Tisone G, Angelico M. ^{13}C -Methacetin breath test for monitoring hepatic function in cirrhotic patients before and after liver transplantation. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:785-790
- 20 Ishii Y, Asai S, Kohno T, Ito A, Iwai S, Ishikawa K. Recovery of liver function in two-thirds partial hepatectomized rats evaluated by L-[1- ^{13}C]phenylalanine breath test. *Surgery* 2002;132:849-856

动脉化疗栓塞治疗小儿肝母细胞瘤 15 例

陈 伟, 李家平, 杨建勇, 庄文权, 刘唐彬, 李桂生

陈伟, 李家平, 杨建勇, 庄文权, 中山大学附属第一医院介入放射专科 广东省广州市 510080
刘唐彬, 李桂生, 中山大学附属第一医院小儿外科 广东省广州市 510080
陈伟, 男, 1956-12-16 生, 广东省中山市人, 汉族, 1989 年中山医科大学硕士毕业, 副教授, 主要从事肿瘤及血管病介入治疗临床研究。
广东省卫生厅基金资助项目, No. 1997121
项目负责人: 陈伟, 510080, 广东省广州市中山二路 58 号, 中山大学附属一
院介入放射科。cw220@sina.com
电话: 020-87332200-8723 传真: 020-87333090
收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-08-20

Transcatheter arterial chemoembolization in treatment of hepatoblastoma in children: A report of 15 cases

Wei Chen, Jia-Ping Li, Jian-Yong Yang, Wen-Quan Zhuang, Tang-Bin Liu, Gui-Sheng Li

Wei Chen, Jia-Ping Li, Jian-Yong Yang, Wen-Quan Zhuang, Department of Interventional Radiology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
Tang-Bin Liu, Gui-Sheng Li, Department of Pediatric Surgery, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
Supported by Medical Research Fund of Guangdong Province, No.1997121
Correspondence to: Dr. Wei Chen, First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, 58 Zhongshan Er Road, Guangzhou 510080, China. cw220@sina.com
Received: 2004-06-16 Accepted: 2004-08-20

Abstract

AIM: To evaluate the clinical feasibility, therapeutic effect, applications and roles of transcatheter arterial chemoembolization (TACE) for the unresectable hepatoblastoma in children.

METHODS: Fifteen cases of unresectable hepatoblastoma were firstly treated with TACE for 18 times before secondary surgical resection. The changes of clinical symptoms, signs and AFP before and after TACE, and the conditions of operation were analyzed. The therapeutic effect in long term was followed up for all the cases.

RESULTS: Re-examinations were performed after several days to 1 month. Tumors treated with TACE shrank with 19-82% (average 58.6%)(Paired samples test, $t=3.171$, $P=0.007$), and the levels of AFP reduced significantly from 29% to 89%(mean 57.38%)(Paired samples test, $t=1.784$, $P=0.096$). No significant chemotherapeutic toxicity was observed. Twelve cases of hepatoblastoma were safely excised. Pathological examination showed massive necrosis (63.1% on average) in the resected tumor tissues. The 1-, 2-, and 3-year survival rates were 93.3% (14/15), 66.6% (10/15) and 40%(6/15) respectively by follow-up.

CONCLUSION: TACE is a safe, effective therapeutic method for unresectable hepatoblastoma in children. It is also effective in reducing hemorrhage and tumor cell pervasion during operation.

Chen W, Li JP, Yang JY, Zhuang WQ, Liu TB, Li GS. Transcatheter arterial chemoembolization in treatment of hepatoblastoma in children: A report of 15 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10): 2360-2363

摘要

目的: 探讨动脉化疗栓塞术(Transcatheter Arterial Chemoembolization, TACE)对估计不能切除的小儿肝母细胞瘤治疗的临床可行性、疗效及其在综合治疗中的作用。

方法: 常规估计不能切除的肝母细胞瘤 15 例经动脉化疗栓塞治疗 18 次, 再行 II 期外科手术切除, 比较分析治疗前后临床症状、体征和血 AFP 的变化、术中情况及随访远期疗效。

结果: TACE 术后数天至 1 mo 复查, 和术前相比, 肿瘤体积平均缩小 58.6%(配对 t 检验, $t=3.171$, $P=0.007$), 血 AFP 平均降低 57.4%(配对 t 检验, $t=1.784$, $P=0.096$), 无明显的化疗毒性反应, 肿瘤手术完整切除 12 例, 术后病理显示肿瘤明显坏死, 平均坏死区域面积为 63.1%。随访 6-30 mo, 1 a 生存率为 93.3%(14/15), 2 a 生存率为 66.6%(10/15), 3 a 生存率为 40.0%(6/15)。

结论: TACE 治疗肝母细胞瘤安全有效, 无严重并发症, 能使部分不能 I 期手术的患儿重新获得手术机会, 并对减少术中肿瘤细胞的扩散和术中出血、改善预后有较大作用。

陈伟, 李家平, 杨建勇, 庄文权, 刘唐彬, 李桂生. 动脉化疗栓塞治疗小儿肝母细胞瘤 15 例. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2360-2363

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2360.asp>

0 引言

肝母细胞瘤是小儿肝脏最常见的恶性肿瘤, 因难以完全切除而预后不良。术前放疗、全身化疗可使肝母细胞瘤病灶局限, 为手术创造条件, 但其效果欠佳且毒副作用较大, 而且仍有部分不能通过手术切除^[1-5]。我们自 1997 年开始对常规不能切除的 15 例肝母细胞瘤行经动脉化疗栓塞, 探讨患儿在较小毒副作用和并发症下获得 II 期外科手术切除的可行性, 并观察分析患儿 TACE 后临床变化、手术情况和远期疗效。

1 材料和方法

1.1 材料 我院 1997-2003 年收治的肝母细胞瘤 15 例,

男 12 例,女 3 例,年龄 50 d-2 岁 9 月;患儿均有腹部肿块,影像学提示肝内巨大占位病变,AFP 值异常升高(表 1)。

1.2 方法 氯胺酮基础麻醉后,心电监护下,采用 Seldinger 技术,使用小儿穿刺套针(Cook 公司)经皮穿刺股动脉,引入 4F Cobra 导管,先做患儿肝动脉造影,了解肿瘤血供情况,再作选择或超选择性插管,停留导管在肿瘤供血动脉内化疗灌注加栓塞。化疗常用药物为顺铂、阿霉素、长春新碱、5-Fu 二联或三联经导管注入;栓塞剂采用明胶海绵颗粒、超液化碘油。其中 2 次介入者 3 例,其余 1 次,介入治疗后 4-9 wk 行Ⅱ期外科切除术。从 CT 横断扫描的肿瘤中心层面测量肿瘤径线,利用公式 体积(V)=高度(L)×横径(D)²×1/2 计算肿瘤体积。肿瘤缩小率≥50%为显效;25-50%为有效;缩小或增大≤25%为稳定;增大≥25%者为恶化。手术中观察肿瘤包膜、血管形态与周围组织的关系、出血量,并按改良 Shamberg 标准评价手术结果,即完全切除:无肉眼肿瘤残留;部分切除:残留肿瘤≤20%;未切除:残留肿瘤≥50%。观察 TACE 后患者症状的变化、反应、血 AFP 值的变化及随访疗效。TACE 前后肿瘤体积及 AFP 值的变化采用配对 *t* 检验作统计学分析。

2 结果

TACE 后 1 mo 复查 CT,肿瘤体积缩小 29-82%,平均 58.6%,显效率 80%(12 例),有效率 13.3%(2 例),稳定 1 例(图 1-3);AFP 水平降低 29-89%,平均为 57.4%;TACE 4-9 wk 内 15 例患儿安全地施行Ⅱ期外科手术,

术中见肿瘤包膜形成及增厚,较易剥离,完整切除率达 80%(12/15),部分切除率为 20%(3/15),切除标本的病理改变肿瘤明显坏死,平均坏死区面积达 63.13%。TACE 前后肿瘤体积的改变有显著性差异(配对 *t* 检验, *P*<0.01),血 AFP 改变则无显著性差异(*P*=0.09)(表 1)。

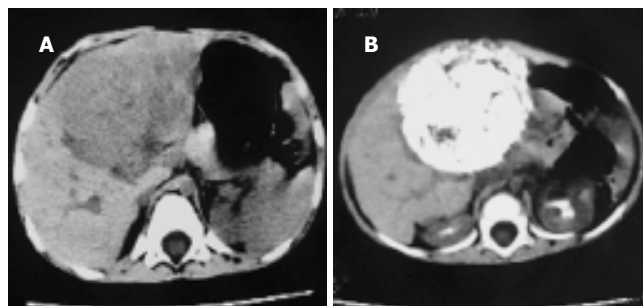


图 1 TACE 前后肝母细胞瘤的 CT。A: TACE 前,显示肝内巨大肿块。B: TACE 后栓塞剂碘油沉积在肿块中。

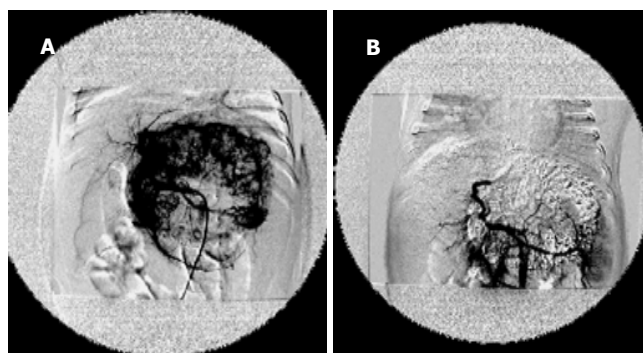


图 2 TACE。A: 肝动脉造影显示肿瘤染色;B: 碘油栓塞肿瘤后染色消失。

表 1 小儿肝母细胞瘤临床表现与 TACE 的效果

No	年龄	性别	肿瘤大小(L × D, cm)		AFP 值(μg/L)		肿瘤缩小 (%)	AFP 降低 (%)	肿瘤坏死 (%)
			TACE 前	TACE 后	TACE 前	TACE 后			
1	2 a 9 mo	M	18.6 × 14.4	9.2 × 9.8	3863 208	1725 300	78%	55%	90%
2	5 mo	M	13.0 × 12.0	10.9 × 7.6	1577 690	179 566	66%	89%	69%
3	7 mo	F	10.6 × 7.1	6.3 × 4.9	1 927	383	72%	80%	78%
4	50 d	M	7.0 × 6.0	5.0 × 6.0	839	372	41%	56%	58%
5	1 a 11 mo	M	8.0 × 7.3	7.0 × 5.2	156 000	84 000	56%	46%	39%
6	6 mo	F	9.0 × 7.0	7.0 × 5.5	301 000	153 000	52%	50%	41%
7	2 a 6 mo	M	10.5 × 6.7	8.0 × 6.3	34 200	4 000	51%	89%	81%
8	1 a 7 mo	M	16.0 × 12.0	7.5 × 6.0	24 358	17 400	82%	29%	18%
9	1 a	M	9.0 × 6.0	6.5 × 4.0	43 442	12 599	68%	71%	87%
10	2 a 5 mo	M	12.8 × 7.4	11 × 7.2	329 030	201 465	19%	39%	56%
11	2 a 6 mo	M	12.0 × 9.0	9.0 × 8.0	348	210	41%	40%	29%
12	8 mo	M	13.0 × 9.5	8.8 × 6.5	66 976	32 340	79%	52%	74%
13	1 a 7 mo	M	10.5 × 9.5	9.0 × 7.0	391 478	196 392	53%	50%	79%
14	1 a 5 mo	F	8.5 × 7.2	6.0 × 4.8	78 320	19 580	69%	75%	83%
15	2 a 3 mo	M	11.5 × 8.5	9.5 × 6.5	107 923	64 754	52%	40%	65%
平均			配对 <i>t</i> 检验,	配对 <i>t</i> 检验,					
	17.7 mo		<i>t</i> =3.171	<i>P</i> <0.01	<i>t</i> =1.784	<i>P</i> =0.09	58.6%	57.38%	63.13%



图3 TACE后手术切除标本高倍镜下显示肿瘤细胞大片坏死呈均质,间有碘油滴存在。

15例全部出现发热,为 $37.5\sim 39.5^{\circ}\text{C}$,持续2~3 d。恶心、呕吐、胃纳减低14例,经对症治疗后3~5 d恢复。口腔溃疡1例,腹泻2例,均短期好转。脱发2例,未见穿刺点血肿或过敏反应。

随访3 mo~3 a,平均30 mo。2例患儿分别于2 mo后肺转移和3 a后肺、脑转移死亡,1例手术切除1 a后再行肝移植后死亡,6例无瘤存活,其余死于复发引起的脏器功能衰竭。1 a生存率为93.3%(14/15),2 a生存率为96.6%(10/15),3 a生存率为40%(6/15)。

3 讨论

肝母细胞瘤发病率占小儿原发肝脏恶性肿瘤的首位(51~56%),约占儿童腹部肿瘤的9%^[6],而且还有上升的表现^[7~8],手术完整切除肿瘤是本病最主要的治疗方法,其预后取决于能否施行完整的手术切除,然而该病大多数由于肝内广泛侵犯而不能切除^[9~12]。在使用有效的术前化疗之前,临床对巨大肿瘤常使用广泛切除术,导致严重的致死率和致病率,首诊后肿瘤的完整切除率也只在50%左右。术前放化疗疗效较好,各种化疗方案因此被采用来缩小瘤体和提高切除率、控制微小的残余灶和转移灶^[13~15]。然而全身化疗的效果不好、毒副作用很大甚至导致患儿早亡^[16~20],曾有报道运用动脉灌注抗癌药物治疗难以切除的成人肝肿瘤,进而应用经动脉化疗栓塞及其他综合治疗^[21~27]。从1997年开始我们将Seldinger技术和选择性动脉内化疗栓塞技术运用于小儿肝母细胞瘤的治疗^[28]。本组结果显示TACE能有效地抑制肿瘤的迅速生长,缓解临床症状,被栓塞的肝动脉僵硬,呈条索状易于分离,瘤体表面血管大都萎陷,呈缺血性坏死外观,切除手术时出血少,视野清晰,操作方便,动脉的堵塞和静脉的萎陷有效地减少了术中因挤压瘤体导致肿瘤血行转移的机会。术时瘤体包膜多完整,易于剥离,破裂者少。切除瘤体的切面上显示肿瘤组织广泛的坏死区,而邻近的正常肝组织未受累及。介入治疗后出现短暂发热,与肿瘤坏死有关;本组没有因化疗毒副作用如骨髓抑制、脱发、呕吐、腹泻而引起的手术延迟。与同期我院全身化疗患者相比,介入治疗疗程短、毒副作用发生率低、程度

轻,没有严重并发症。本组栓塞化疗后肿瘤组织坏死纤维化平均达64.8%以上,与文献^[29~31]报道相似。而且碘油在平扫CT上易于观察,能发现其他的影像学检查所不能发现的肝内微小转移灶。

本组死亡率和复发率仍较高,我们考虑:(1)肝脏4叶8段本为一整体,各部分之间关系紧密,影响甚大,1例在二次介入治疗后行肝右叶切除,残余肝左叶随访时无肿瘤复发,但死于慢性肝功能衰竭。去除手术原因,考虑多次介入治疗对左叶影响较大,因此经动脉化疗栓塞时应尽可能超选择,加强对肿瘤的打击而减少对残肝的损害。介入治疗前也应严格掌握适应证,全面考虑肿瘤的大小、位置、数目、血供、病理分型、临床分期,如门脉通畅可尽量超选栓塞肝动脉,若有门脉癌栓应采用单纯肝动脉化疗灌注,必要时辅以适量栓塞。(2)肝母细胞瘤介入治疗常难以达到肿瘤完全坏死的程度,残存肿瘤细胞可能在手术时因分离和挤压、部分脱落血中,引起术后远处转移,值得注意的是TACE术对原发灶有效,但对远处转移灶影响甚微,本组有2例患儿死于广泛的远处转移,这些转移可能在术前化疗期间已经存在,为了防止微小转移灶的生长可以考虑结合全身化疗。(3)介入治疗与外科切除术的间隔时间应谨慎掌握,时间过短肝包膜水肿明显,解剖结构间隙粘连不清,这些因素都增加了手术难度,影响预后,过长肿瘤又重新增大,一般以TACE后2 wk左右较宜。(4)所谓“不能切除”常常是个相对概念^[5,10],很大程度与术者的经验有关,但最客观的评价方式是剖腹探查,1例介入治疗后1 wk复查肿瘤明显缩小,AFP降低,但6 wk后肿瘤又增大,几乎恢复到初诊时的体积,再次介入治疗后数天,仍成功行外科手术切除,患儿恢复良好已存活1 a,不应放弃积极手术的机会。另外,对肝母细胞瘤不同病理分型与药代动力学的关系,以及在动脉内用药的剂量和时间、速率等仍待进一步探讨。

介入治疗的方法与目前广泛应用的成人肝癌相同,由于小儿血管细小,介入器械和程序应更精细,对操作者有更高的要求,加上患儿大多体质较弱,手术风险较大以及社会和经济原因使得这项技术的普及受到一定影响。我们认为,对不能I期外科切除的肝母细胞瘤,TACE能创造II期手术切除肿瘤的机会,改善预后,提高生存质量,而且能对防止术中肿瘤细胞的扩散起到一定的作用,是一种较简便、安全、有效、实用的治疗方法。

4 参考文献

- 1 Cillo U, Ciarleglio FA, Bassanello M, Brolese A, Vitale A, Bocagni P, Zanusi G, Zancan L, D'Antiga L, Dall'igna P, Montin U, Gringer E, Carraro A, Cappuzzo G, Violi P, Baldessin M, Brida A, D'Amico DF, Perilongo G. Liver transplantation for the management of hepatoblastoma. *Transplant Proc* 2003; 35:2983-2985
- 2 Urata H, Hori H, Uchida K, Inoue M, Komada Y, Kusunoki M. Strategy for the treatment of unresectable hepatoblastoma: neoadjuvant chemotherapy followed by delayed primary

- operation or liver transplantation. *Int Surg* 2004;89:95-99
- 3 Perilongo G, Shafford E, Maibach R, Aronson D, Brugieres L, Brock P, Childs M, Czauderna P, MacKinlay G, Otte JB, Pritchard J, Rondelli R, Scopinaro M, Staalman C, Plaschkes J. International Society of Paediatric Oncology-SIOPEL 2. Risk-adapted treatment for childhood hepatoblastoma. Final report of the second study of the International Society of Paediatric Oncology-SIOPEL 2. *Eur J Cancer* 2004;40:411-421
- 4 Blouin P, Brugieres L, Tabone MD, Leverger G, Rubie H, Branchereau S, De Kraker J. Carboplatin-epirubicin regimen for the treatment of hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2004;42:149-154
- 5 Otte JB, Pritchard J, Aronson DC, Brown J, Czauderna P, Maibach R, Perilongo G, Shafford E, Plaschkes J; International Society of Pediatric Oncology(SIOP). Liver transplantation for hepatoblastoma: results from the International Society of Pediatric Oncology(SIOP) study SIOPEL-1 and review of the world experience. *Pediatr Blood Cancer* 2004;42:74-83
- 6 Hanif G. Intra-abdominal tumors in children. *J Coll Physicians Surg Pak* 2004;14:478-480
- 7 Reynolds P, Urayama KY, Von Behren J, Feusner J. Birth characteristics and hepatoblastoma risk in young children. *Cancer* 2004;100:1070-1076
- 8 von Schweinitz D. Neonatal liver tumours. *Semin Neonatol* 2003; 8:403-410
- 9 Town E, Kiely E, Pierro A, Spitz L. Outcome and complication after resection of hepatoblastoma. *J Pediatr Surg* 2004; 39:199-202
- 10 Dicken BJ, Bigam DL, Lees GM. Association between surgical margins and long-term outcome in advanced hepatoblastoma. *J Pediatr Surg* 2004;39:721-725
- 11 Abbasoglu L, Gun F, Tansu Salman F, Relik A, Saraq F, Unuvar A, Gorgun O, Aksoyek S. Hepatoblastoma in children. *Acta Chir Belg* 2004;104:318-321
- 12 Hadley GP, Govender D, Landers G. Primary tumours of the liver in children: an African perspective. *Pediatr Surg Int* 2004; 20:314-318
- 13 Suita S, Tajiri T, Takamatsu H, Mizote H, Nagasaki A, Inomata Y, Hara T, Okamura J, Miyazaki S, Kawakami K, Eguchi H, Tsuneyoshi M; Committee for Pediatric Solid Malignant Tumors in the Kyushu Area, Japan. Improved survival outcome for hepatoblastoma based on an optimal chemotherapeutic regimen-a report from the study group for pediatric solid malignant tumors in the Kyushu area. *J Pediatr Surg* 2004; 39:195-198
- 14 Begemann M, Trippett TM, Lis E, Antunes NL. Brain Metastases in hepatoblastoma. *Pediatr Neurol* 2004;30:295-297
- 15 Tsai HL, Liu CS, Chin TW, Wei CF. Hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma in children. *J Chin Med Assoc* 2004; 67:83-88
- 16 Iida T, Suenaga M, Takeuchi Y, Kobayashi T, Tobinaga J, Miwa T, Takenaka H, Nomura H, Hasegawa S, Oguma K. Successful resection of a ruptured hepatoblastoma prior to chemotherapy: report of a case. *Surg Today* 2004;34:710-714
- 17 Choudhury SR, Singh D. Advanced hepatoblastoma: successful liver resection following preoperative chemotherapy. *Trop Gastroenterol* 2004;25:32-33
- 18 Davies JQ, de La Hall PM, Kaschula RO, Sinclair-Smith CC, Hartley P, Rode H, Millar AJ. Hepatoblastoma-evolution of management and outcome and significance of histology of the resected tumor. A 31-year experience with 40 cases. *J Pediatr Surg* 2004;39:1321-1327
- 19 Cacciavillano WD, Brugieres L, Childs M, Shafford E, Brock P, Pritchard J, Maibach R, Scopinaro M, Perilongo G. Phase II study of high-dose cyclophosphamide in relapsing and/or resistant hepatoblastoma in children: a study from the SIOPEL group. *Eur J Cancer* 2004;40:2274-2279
- 20 Bertolini P, Lassalle M, Mercier G, Raquin MA, Izzi G, Corradini N, Hartmann O. Platinum compound-related ototoxicity in children: long-term follow-up reveals continuous worsening of hearing loss. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:649-655
- 21 汤利献. 肝癌外科治疗的进展. 世界华人消化杂志 2003;11:249-254
- 22 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
- 23 申宝忠, 刘岩, 李任飞, 杨光, 于友涛, 董宝玮, 梁萍. 经动脉化疗栓塞结合经皮微波凝固治疗肝癌的实验和临床研究. 世界华人消化杂志 2003;11:268-271
- 24 冯勇, 赵玲, 张爱华, 刘康达, 刘来村, 王彦辉, 尹进强, 杨秉辉. 肝细胞癌肝动脉化疗栓塞后 PCNA 和 nm23-H1/NDPK 的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:912-915
- 25 卢伟, 李彦豪, 何晓峰, 陈勇, 赵剑波. 肝癌患者不同剂量化疗药物经导管动脉化疗栓塞后肝功能的变化. 世界华人消化杂志 2004;12:38-41
- 26 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;12:1176-1178
- 27 冯勇, 刘君. 肝动脉化疗栓塞治疗肝癌. 世界华人消化杂志 2004; 12:1422-1426
- 28 庄文权, 刘均澄, 杨建勇, 陈伟, 张翎, 李家平, 李桂生. 小儿腹部恶性肿瘤的介入治疗. 癌症 1999;18:717-719
- 29 Xianliang H, Jianhong L, Xuewu J, Zhongxian C. Cure of hepatoblastoma with transcatheter arterial chemoembolization. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:60-63
- 30 Ohtsuka Y, Matsunaga T, Yoshida H, Kouchi K, Okada T, Ohnuma N. Optimal strategy of preoperative transcatheter arterial chemoembolization for hepatoblastoma. *Surg Today* 2004;34:127-133
- 31 Li L, Chen Y, Li YH, Zeng QL, He XF. Transcatheter arterial chemoembolization in the treatment of hepatoblastoma. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004;12:171-172

慢性丙型病毒性肝炎的诊断与治疗

聂青和

聂青和, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038

项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路1号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com

电话: 029-83377742 传真: 029-83537377

收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2364.asp>

编者按 自从发现丙型肝炎病毒(HCV)为非甲非乙型肝炎的病因之一以来, 已过15个春秋, 丙型病毒性肝炎对人民生命健康的危害仍在继续, 然而其本质也在逐渐被人们所认识. 当今HCV的基础和临床各方面研究已经有了很大进展. 但是在诊断、治疗、疫苗研制等方面还不尽如人意, 彻底控制丙型肝炎的危害还有很远的路程要走. 可以说, 在丙型肝炎临床与科研过程中充满了艰辛, 任重而道远. 因此临床医生对丙型肝炎密切相关的诊疗预防等进展需求显得十分迫切. 为了提高临床医生认识, 改善国内对丙型肝炎的诊断治疗相对落后的现状, 了解目前国内外最主要的研究动态. 借今年美国肝病研究协会制定《丙型肝炎的诊断、治疗处理策略-临床实践指南(AASLD Practice Guideline)》及中华医学会肝病学分会、中华医学会传染病与寄生虫病学分会制定《丙型肝炎防治指南》的机会, 我们组织一批国内研究丙型肝炎的资深专家和教授撰写了“焦点论坛-慢性丙型肝炎的诊断与治疗”, 这次“焦点论坛”主要面向临床医生, 故在组稿写作过程中注意“紧扣文题, 开门见山, 突出重点, 临床实用性为主, 兼顾相关研究进展”, 以进一步推动丙型肝炎的临床实用性研究. 希望能在控制丙型肝炎的工作中履行义务, 贡献一份薄力.

1	进一步加强慢性丙型肝炎的临床实用性研究.....	2365
2	慢性丙型肝炎的临床诊断及相关问题.....	2369
3	慢性丙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症.....	2371
4	丙型肝炎的实验室诊断和临床意义.....	2373
5	病理学检查在慢性丙型肝炎诊断治疗中的重要地位.....	2377
6	慢性丙型肝炎的规范性抗病毒治疗及研究进展.....	2379
7	慢性丙型肝炎抗病毒失败者再治疗探讨.....	2382
8	慢性丙型病毒性肝炎的免疫治疗.....	2385
9	丙型肝炎中医研究近况.....	2389
10	特殊人群的丙型肝炎特点及处理.....	2390
11	丙型肝炎病毒慢性感染与肝癌相关性研究.....	2395
12	慢性丙型肝炎与自身免疫性肝炎关联性研究.....	2400
13	慢性丙型肝炎的肝外表现及处理.....	2402
14	丙型肝炎疫苗研究及面临的挑战.....	2405

进一步加强慢性丙型肝炎的临床实用性研究

李梦东, 聂青和

李梦东, 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
聂青和, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心
陕西省西安市 710038
项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路 1 号, 中国人民解放军
第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心, nieqinghe@hotmail.com
电话: 029-83377742 传真: 029-83537377
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

李梦东, 聂青和. 进一步加强慢性丙型肝炎的临床实用性研究. 世界华人消化
杂志 2004;12(10):2365-2368
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2365.asp>

1 慢性丙肝危害人类健康的严重性及其潜在威胁

自从首次承认并证明有丙型肝炎病毒(HCV)以来15 a已经过去,对丙肝的研究已经取得惊人的成就,但是关于丙肝的诊断、治疗以及预防等课题的研究仍较欠缺.慢性丙肝对人类健康的潜在威胁仍在日益显现,这是当前医学界普遍关注的热门话题.目前,在世界范围内至少有1.7亿以上的人是HCV慢性感染者,这些人中约有20-50%经过20-30 a,会发展成肝硬化及肝细胞癌,除HCV因素外,年龄、性别、肝脏铁含量、HCV基因型及嗜酒等都是促进肝硬化的重要因素^[1-2].

在发达国家,HCV感染的发病率在一般人群中大约为1-2%.美国的一般人口中HCV的发病率为1.8%,大约有400万人已经成为HCV的感染者.埃及一般人群中HCV感染率可达10-30%,类似的情况也见于日本及意大利.在许多国家,HBV感染仍然是发生肝癌的主要原因.然而,在日本、朝鲜及欧洲南部,肝癌患者中50-75%伴有HCV感染.日本的报告提出HCV感染者肝癌的发生率比慢性HBV感染者增加3倍.意大利有报告指出HCV感染见于肝癌患者中的71%,而HBV感染者仅占15%.

我国的调查表明^[3],一般人群抗-HCV阳性率为3.2%,长江以北为3.6%,高于南方的2.9%.感染HCV者,病毒血症持续6 mo仍未清除者称为慢性感染,丙肝慢性化率为50-85%.感染后20 a,儿童及年轻妇女肝硬化发生率为2-4%;中年人因输血感染者为20-30%,一般人群为10-15%.HCV感染后肝癌发生率在30 a后为1-3%.一旦发展成肝硬化,肝癌的年发生率为1-7%.肝硬化患者10 a存活率约为80%,如出现肝功能失代偿,10 a的存活率仅为25%.早年关于丙肝的病理组织学研究已经发现,慢性HCV感染者中约50%以上都有不同程度的脂肪肝存在,而且认为脂肪肝的发生可能与肥胖、药物、酒精、2型糖尿病等有关联.近期的研究提示,相当多的慢性丙肝患者的脂肪肝可能是HCV特异性的直接致病作用,而且脂肪肝对肝纤维化的促进作用更不容忽视^[4].

慢性HCV感染者有脂肪肝更是非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)的重要因素,特别是体重指数(body mass index, BMI=体重kg÷身高公尺的平方时,此数应在10-50之间,<18.5属于过轻,18.5-24.9为健康体重,25-29.9为一级过重,30-39.9为二级肥胖,>40为三级肥胖即病理性肥胖-作者注释)过高以及胆固醇升高者.HCV基因1型感染者的脂肪肝似乎是由于NASH与HCV感染共同作用的结果,这些患者也常有肝小血窦的纤维化(subsinusoidal fibrosis)及BMI过高.

有学者证明脂肪肝与HCV基因3型及2型之间的关联,例如对除外肥胖、饮酒及糖尿病后的106例慢性HCV感染者进行分析,证明在基因3型及2型HCV感染者与基因1型感染者作比较,脂肪肝的发生率分别为80.1%及88.9%比37%($P=0.0001$)^[4],进而证明脂肪肝的程度与肝内HCV的含量及复制水平有关联,以及与HCV基因3型核心蛋白(core protein)的表达相关.转基因小鼠的实验研究已经证明这种蛋白的表达能引起肝脏的脂肪性变,这些资料均提示HCV感染所致脂肪肝可能是病毒的直接作用^[4-5].又如慢性HCV感染者大多有 β 脂蛋白降低,提示极低密度脂蛋白(VLDL)的组装集聚已受到干扰.这种干扰现象可能是HCV核心蛋白使微粒体甘油三酯传输蛋白(microsomal triglycerides protein)活性降低,并干扰肝脏VLDL产生,从而导致脂肪性变.不少研究均指明,慢性HCV感染者有氧化应激作用(oxidation stress)及脂质过氧化作用(lipid peroxidation)的发生.脂质过氧化作用可引起肝星状细胞(HSC)活化及1型胶原的合成,成为加速肝脏纤维化发展的重要辅助因素^[4-5].

不少研究也曾指出,HCV感染与2型糖尿病的关联密切.探讨HCV感染何以能导致对胰岛素的抗性并促进2型糖尿病的问题,是近年来研究的又一新领域.推测对胰岛素的抗性可能是脂肪贮积的后果;另一种设想是HCV蛋白对胰岛素信号传导途径的直接作用,即通过TNF- α 对胰岛素受体基质(insulin-receptor substrates即IRS-1, 2, 3),及其配基活化酪氨酸激酶(ligand-activated tyrosine kinase)的抑制作用而实现^[5].

以上资料不仅说明HCV慢性感染与肝纤维化、肝硬化以及肝癌的发生密切相关,而且这些严重并发症的发生发展过程与脂肪肝以及2型糖尿病也有密切的内在联系.

2 实验诊断方法有待充实及规范

HCV感染主要依靠实验检查才能肯定诊断,当前在临床上应用的方法是首先检测抗-HCV,然后再检测病毒核酸(RNA)以便证明有病毒血症.目前,主要应用第三代酶免疫测定(enzyme immunoassay, EIA)检测抗-HCV,其抗原性可覆盖:核心抗原(C22-3)、NS3区(C33c或C200)、NS4区(C100-3)、及NS5区,其敏感性可达97%,在感染HCV后6-8 wk可检测出抗-HCV^[6].

重组免疫印迹试验(recombinant immunoblot assay, RIBA)是美国FDA(the food and drug administration, 食品及药物管理局)已经批准的补充试验, 其抗原包括: C22-3、C33c、C100-3和克隆5-1-1共4种, 与EIA配合应用, 使抗-HCV的结果更加可靠而准确, 甚至可以代替HCV RNA的定性测定. 有些情况下HCV感染的患者, 抗-HCV可呈阴性, 例如急性HCV感染, 或处于免疫抑制状态者(HIV感染), 或慢性血液透析者, 此时HCV RNA检测阳性有助于确立诊断, 因在HCV感染后1-2 wk即可测出HCV RNA. HCV RNA定量测定对于了解治疗前病毒载量及治疗效果的判断是很有价值的, 但是大多数HCV感染者的HCV RNA水平较低, 加之定量测定并不一定敏感, 而且操作易受多种因素影响. 因此, 有些专家宁愿要HCV RNA的定性试验, 既作为初步检测, 也可作为抗-HCV阳性的佐证.

当前已被FDA批准的HCV RNA定性试验有两种PCR技术: (1)Amplicor Hepatitis C virus Test, version 2.0; (2) Cobas Amplicor Hepatitis C virus Test, version 2.0. 这两种试剂皆罗氏公司产品, 其检测范围较低, 大约为50 IU/mL. 另外还有一些尚未被批准的市售试剂也在一些实验室应用.

HCV RNA定量测定可以用转录介导的靶扩增(transcription-mediated target amplification, PCR, TMA)或信号扩增技术(signal amplification)如分支DNA测定(branched DNA assay). 当前已被FDA批准的仅有的定量试验是Versant HCV RNA version 3.0(拜耳公司). 然而, 目前各实验室所用的方法及试剂并不统一(表1), 很难把各家所得资料进行比较, 所以应将检测结果加以标准化, 均以国际单位报告为好. 例如用上述拜耳公司的Versant HCV RNA定量测定, 5.2 copies/mL相当于1 IU, 其检测值变动范围是615-700.000 IU/L. 国内一些学者^[3,7,8]仍习惯用IU/mL表示, 相差甚大, 可能是引用资料来源不同所致. 总之, 用同一种方法动态观察HCV RNA的变化, 远比单独一次报告的结果更有意义. 国内的实时荧光定量PCR法已获得正式批准并已广泛用于

临床, 其特异性好、价廉、防污染好, 灵敏度为 1×10^3 copies/mL.

至少有15%的急性HCV感染者其病毒血症为暂时性, 在感染后3-24 mo即被自然清除. 病毒的清除与临床上测定的抗-HCV应答并不相关, 表明这种抗体不是中和抗体^[9]. 能自然清除病毒的人很少发生肝硬化. 85%的急性HCV感染者, HCV RNA可持续存在多年, 但有些慢性感染者HCV RNA可能呈间歇性测不出来, 特别是在感染第1 a, 以及那些病毒血症水平基线较低的患者. 加之抗-HCV出现的时间较晚, 对急性以及慢性丙肝的诊断以及献血员的筛选都造成一定的困难和不便. 如果能加强对HCV中和抗体、抗-HCV-IgM、抗-HCV核心抗体的研究^[9-11], 进一步开发对血清及肝组织内HCV抗原的测定^[12], 可能会在丙肝的实验诊断方面取得更大进展.

3 对慢性丙肝患者的治疗手段仍有待进一步提高

美国肝病研究协会已经制定出丙型肝炎的诊断、治疗处理策略-临床实践指南(AASLD Practice Guideline)^[6], 其推荐的治疗方案见(表2).

对HCV感染者治疗的目标是防止HCV感染持续及其并发症, 最佳的成效是根除感染. 因此, 治疗应答常常以HCV RNA的检测结果为标志. 出现持续的病毒学应答(sustained virologic response, SVR)时, 认为病毒已被清除, 其标准是用敏感的检测方法, 在治疗结束时以及6 mo之后, 血清中HCV RNA已不存在. 在某些研究中, 将HCV RNA在治疗12 wk时或此前下降2-logs(对数级)或转为阴性, 定为早期病毒学应答(early virologic response, EVR), 在治疗结束时持续检测不出病毒称为治疗终末应答(end of treatment response, ETR). 虽出现SVR, 但终止治疗后, 再次测到HCV RNA称为复发. 有些患者治疗期间及治疗结束后HCV RNA水平恒定, 可考虑为无应答者(nonresponder), 而有些患者在治疗后HCV RNA水平下降(>2 logs), 但并未转阴者, 可认为是部分应答(partial response). 当前经FDA批准的方案(表2),

表1 血清中HCV RNA定量测定试剂^[6]

试剂	1 IU/L 转换形式	技术名称	检测值变动范围(IU/L)
Amplicor HCV Monitor version#2.0			
(HCV 监测扩增样本, 罗氏)	0.9 copies/mL	手动竞争性 rt-PCR	600-500 000
Cobas Amplicor Monitor HCV version#2.0			
(Cobas HCV RNA 监测扩增样本, 罗氏)	2.7 copies/mL	半自动竞争性 rt-PCR	600-500 000
Versant HCV RNA version#3.0	5.2 copies/mL	半自动分支 DNA 测定	615-700 000
Quantitation assay			
(Versant HCV RNA 定量测定样本, 拜耳)	3.8 copies/mL	半自动竞争性 rt-PCR	25-2 630 000
LCx HCV RNA 定量测定, 雅培			
SuperQuant	3.4 copies/mL	半自动竞争性 rt-PCR	30-1 470 000
(超级定量试剂, 国立基因研究所)			

表2 治疗慢性丙肝患者的药物及用法

药物名称	推荐剂量及用法
联合疗法-聚乙二醇干扰素(PEG interferon, 下称 PEG IFN)	
加利巴韦林(病毒唑, ribavirin, 下称 RBV)	180 μ g SQ(皮下注射), 1次/wk, 不计体重
PEG IFN- α -2a (40 kd)(PEGasys, 罗氏)	1.5 μ g/kg SQ 1次/wk
PEG IFN- α -2b (12 kd)(PEG-intron, 先灵)	800-1 200 mg/d 口服, 分两次服
RBV (先灵、罗氏)	(剂量取决于感染、体重及基因型)
临床应用方案	
PEG IFN- α -2a (40 kd)单一治疗	180 μ g SQ, 1次/wk, 不计体重
PEG IFN- α -2b (12 kd)单一治疗	1.0 μ g/kg SQ 1次/wk
IFN- α -2b (intron-A, 先灵) 加 RBV	IFN- α -2b SQ 3 mU/wk 分3次注射
IFN- α -2a (Roferon-A, 罗氏) 加 RBV	RBV \leq 75 kg 者 1 000 mg/d 分两次口服 \geq 75 kg 者 1 200 mg/d 分两次口服
Consensus(intergen, intermun, Brisbane, CA)	9 μ g SQ 3次/wk, 对无应答者 15 μ g SQ 3次/wk

在随机临床研究中已取得很高的 SVR 率。

美国 FDA 已批准两种 PEG IFN 应用于临床, 即 M_r 40 000 的 PEG IFN- α -2a (PEGasys, 罗氏公司)及 M_r 12 000 的 PEG IFN- α -2b(PEG-intron, 先灵公司)。这类产品皆将干扰素与无活性的聚乙二醇共价结合, 以增长其半寿期, 降低肾脏对他的廓清率, 故每周皮下注射一次即可。大量随机对照研究中均证明有较高的SVR率, 两种制剂中何者的效果更好, 目前尚无报道。所有前瞻性治疗研究均证明患者治疗前 HCV RNA 水平较低, HCV 基因型非 1 型(其中绝大多数为基因型 2 或 3, 少数患者为基因型 4、5 或 6)的感染者, 年龄较轻<40 岁者、体重未超标(<75 kg)者, 并且未发展成桥形纤维化及肝硬化者的疗效较好。在两组用 PEG IFN- α -2a 加 RBV 联合治疗研究中, 基因 1 型感染者的 SVR 为 42-46%, 基因 2 或 3 型者的 SVR 达 76% 及 82%。基因 1 型的患者及高病毒负荷量(> 2×10^6 copies/mL, 相当于 800 000 IU/mL)接受联合治疗后 SVR 为 41%, 而基因 1 型低病毒负荷量者($\leq 2 \times 10^6$ copies/mL)用同样方法治疗, 其 SVR 为 56%。反之, 基因 2 或 3 型感染者高病毒负荷量者的 SVR 为 74%, 低病毒负荷量者则为 81%。

用 PEG IFN- α -2a 加 RBV 联合治疗研究发现, 在治疗第 12 wk 时 HCV RNA 水平下降至少 2 logs 者为 EVR, 达到 EVR 者中有 65% 的患者以后可达到 SVR。反之, 在不具备 EVR 者中, 97% 的患者未达到 SVR。类似结果也见于 PEG IFN- α -2b 加 RBV 联合治疗研究中, 在治疗后出现 EVR 的患者中, 72% 最终达到 SVR, 未出现 EVR 者均未达到 SVR。

根据当前对慢性 HCV 感染的治疗方案, 不单可使部分患者的病毒得到清除, 而且对防止肝癌的发生也有远期的预防效果。例如在日本有 6 篇文章对近万例患者的观察表明, 在治疗后第 5 a 累积的肝癌发生率在 SVR 组为 0.9-4.3%, TBR(transient biochemical responder)组为 1.9-6.1%, 而无应答组者为 2.9-21.4%^[13]。

多数研究者均证明目前的治疗方法只能在不到 1/2

的慢性丙肝患者取得治疗效果, 可以清除病毒而不复发, 但对药物的耐受性较差^[1-6]。因此, 除进一步开发更有效而安全的治疗药物之外, 不少研究者已经注意到从宿主及病毒两方面探讨对药物无应答的原因^[2, 14]。已知可抑制 IFN- α 治疗效果的宿主细胞因子如 IFN- α 受体的亚单位 IFN AR 2c、IFN AR 2b 及 IFN AR 2a, TNF- α 诱导的 protein tyrosine phosphatases(PTPs), IL-10, IL-1 β , IFN- γ , IL-8 及 IL-6 等。并且已知年轻女性(≤ 39 岁)对 IFN- α 治疗的反应效果较好, 而非洲裔美国人, 肥胖者、每日饮酒者对 IFN- α 治疗的效果较差。特别值得重视的是宿主的遗传素质、病毒载量及基因型对治疗效果的影响^[2]。已有报告认为 HLA DR7、DRB1*0404、DRB1*0701、DRB1*11、DQA1*0201-DQB1*02 型的 HCV 感染者对 IFN- α 单一治疗或加用 RBV 治疗较易达到 SVR。

已知 HCV 基因组极易变异, 在较保守的 5' 非编码区(5' NC 区)已证明至少有 1-a、b、c, 2-a、b、c, 3-a、b, 4、5 及 6 等 6 个大的基因型。美国大多数分离株为基因 1a 型(60%)及 1b 型(20%)。王宇 *et al* 的调查证明我国北方地区(沈阳、哈密及兰州)3 型感染率为 30-50%, 南方地区(南京、南宁、成都)则以 2 型感染为主(91-100%)。而杜绍财 *et al* 的报告则认为北方(北京、西安)2 型感染者为 80-85%, 3 型感染者为 15-19%; 南方(重庆、武汉、广州、广西)2 型感染者为 80-100%, 3 型感染者为 0-13%^[15]。新近的结论认为我国 1b 型(约占 60-80%)和 2a 型较常见, 其中以 1b 型为主, 某些地区有 1a、2b 和 3b 型报道, 6 型主要见于香港、澳门地区及南方边境省份^[3]。这种研究方法的不统一, 所得结果的混乱局面, 使人很难进行评估。当前已经明确的是被 HCV 基因 1 型感染的患者, 经治疗后 SVR 率显然不如基因 2 型或 3 型感染者的治疗效果。深入研究影响 HCV 感染者治疗效果的宿主因素具有重要的实际意义。美国肝病研究协会制定的丙肝患者诊断、治疗指南中, 认为治疗最佳的适应证如(表 3)^[6]。

表3 应接受治疗的HCV慢性感染者的特征(HCV RNA均为阳性)

年龄至少18岁

ALT升高

肝活检证明有慢性肝炎,有明显纤维化(Metavir 计分 ≥ 2 , Ishak 计分 ≥ 3)

代偿性肝病(血清总胆红素 < 1.5 mg/dL, INR $< 1.5^1$, 白蛋白 > 3.4 g/dL, 血小板计数 $> 75\ 000/\text{mm}^3$,

无肝性脑病,无腹水)

血液及生化指标尚可(HB: 男性 > 13 g/dL, 女性 > 12 g/dL, 中性粒细胞计数不低, 肌酐 < 1.5 mg/dL)

有抑郁病史,但患者目前情况控制较好

愿意接受治疗,并遵守治疗规定

¹INR-国际正常化比值(international normalized ratio).

由于急性HCV感染而且症状明显者(例如有轻度黄疸),大约有52–85%的患者可于12 wk内自发地清除病毒,因此他们建议对急性HCV感染者的治疗应延迟到发病第12 wk之后^[6],此点与我国专家的意见^[3]是有差别的.美国的方案中明确提出对18岁以下慢性HCV感染者的治疗应个别慎重地加以权衡,对3岁以下儿童的治疗是禁忌的.

4 对HCV感染的预防策略亟待加强

加强对传染源的管理、切断传播途径对预防HCV感染显得特别重要.然而,由于抗-HCV的产生存在窗口期、抗-HCV检测试剂的质量不稳定及少数HCV感染者不产生抗-HCV,因此,目前尚无法完全筛除HCV RNA阳性者,大量或多次输血和血液透析仍有可能感染HCV.在发展中国家1986年以前,输血后丙型肝炎的发生率为5–13%,1990年开始对献血员实行抗-HCV筛选之后降至0.6–3%.但必须看到,目前在WHO所属的191个成员国中,仅70个国家执行了关于采血和输血的技术要求,每年仅有20%的鲜血未受污染.估计全球因输血而感染HCV者每年约有230–470万人^[16].

在美国献血员抗-HCV的阳性率大约少于0.5%,而且自1991年普遍筛选献血员以来,输血后丙型肝炎已大幅度减少,但丙肝的发生率仍很高,通过不洁的注射器传播者在丙型肝炎患者中约占到60%左右^[11,6].说明控制传染源的问题并未解决,也说明开发研制更简易、敏感的检测HCV抗原或其核酸的手段迫切需要^[3].

我们早年曾用HCV基因组的核心区和非结构区合成肽包被反应板称为EIA-3,检测不同人群的HCV核心抗体(抗-HCVc),并用美国RIBA试剂加以对照,发现541名献血员中有5%(27例)EIA-3阳性,用RIBA对照后单项抗-HCVc阳性者为2.8%(15例)^[11],提示这种血液仍有传染性.近年来用PCR技术对7 173份献血员的血液进行复查,规定HCV基因拷贝数 $\geq 10^3/\text{mL}$ 为阳性,发现有21份(0.29%)为阳性^[17],也说明HCV传染源并未能完全控制.

预防丙肝一方面应严格筛查出传染源,另一方面应进一步切断传播途径.已经证明HCV可以垂直传播以及宫内感染^[18–19],但是仍有10–30%的HCV感染者始

终不能明确其感染来源^[16],流行病学研究仍有待加强.虽然HCV的变异性较大,体外培养仍未成功,动物及细胞模型有限,但是公认HCV与黄病毒种系相关,包括:黄热病病毒、登革病毒及疫病毒(pestivirus)种系如:牛病毒性腹泻病毒、传统的猪瘟病毒(classic swine fever virus),甚至于与GBV-C/HGV也有亲缘关系.打破传统的研制疫苗的模式,HCV疫苗是有可能被研制成功的^[20].

5 参考文献

- 1 Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003;362:2095–2100
- 2 Gao B, Hong F, Radaeva S. Host factors and failure of interferon- α treatment in hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39:880–890
- 3 中华医学会肝病学会、中华医学会传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南. *中华传染病杂志* 2004;22:131–136
- 4 Ramalho F. Hepatitis C virus infection and liver steatosis. *Antiviral Research* 2003;60:125–127
- 5 Weinman SA, Belalcazar LM. Hepatitis C: A metabolic liver disease. *Gastroenterology* 2004;126:917–919
- 6 Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis Management and treatment of Hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1147–1171
- 7 陆志稼. 丙型肝炎诊断试验及其应用的解析. *中华传染病杂志* 2003;21:214–216
- 8 姚光弼. 丙型肝炎治疗的决策和选择. *中华传染病杂志* 2003;21:381–385
- 9 Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* 1999;29:908–914
- 10 郝飞, 李梦东. 输血后丙型肝炎早期抗体应答规律的观察. *中华内科杂志* 1994;33:593–594
- 11 郝飞, 李梦东, 陈国致. 不同人群血清单项丙型肝炎病毒核心抗体存在状态. *中华传染病杂志* 1996;14:141–143
- 12 王闯, 李梦东, 郝飞, 胡大荣, 姚仲寅, 崔大敷. 抗丙型肝炎病毒核心抗原单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及初步鉴定. *第三军医大学学报* 1995;17:289–291
- 13 Hino K, Okita K. Interferon therapy as chemoprevention of hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis C. *J Antimicrobiol Chemotherapy* 2004;53:19–22
- 14 聂青和, 李梦东, 胡大荣, 陈国致. HCV感染后机体保护性免疫缺陷原因探讨. *世界华人消化杂志* 2000;8:28–30
- 15 杨东亮, 郝连杰. 我国丙型肝炎病毒基因变异及分型研究现状. *中华传染病杂志* 1996;14:41–44
- 16 王耀宗. 正视我国丙型肝炎的严重性. *中华传染病杂志* 2003;21:211–213
- 17 邢文革, 徐宏艺, 马嵘. 聚合酶链反应技术对丙型肝炎病毒感染献血员的筛查. *中华肝脏病杂志* 2002;10:211–212
- 18 郝飞, 李梦东, 陈国致. 包膜糖蛋白序列分析鉴定丙型肝炎病毒宫内感染. *中华肝脏病杂志* 1996;4:74–77
- 19 聂青和, 王平忠, 周永兴. 丙型肝炎病毒感染孕妇羊水中丙型肝炎病毒RNA检测的临床意义. *中华妇产科杂志* 2002;37:19–21
- 20 聂青和. 基因疫苗的基础研究及应用现状. *世界华人消化杂志* 2003;11:125–129

慢性丙型肝炎的临床诊断及相关问题

周永兴

周永兴, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心
陕西省西安市 710038

项目负责人: 周永兴, 710038, 陕西省西安市新寺路 1 号, 中国人民解放军
第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心。zyxdfx@fmmu.edu.cn

电话: 029-83377852 传真: 029-83537377

收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

周永兴. 慢性丙型肝炎的临床诊断及相关问题. 世界华人消化杂志 2004;12
(10):2369-2371

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2369.asp>

0 引言

WHO 统计全球 HCV 的平均感染率为 3%, 共约 1.7 亿人感染, 而每年新感染者达 3.5 万。我国平均感染率为 3.2%, 北方稍高约 4.6%, 南方为 2.6-2.9%, 感染人数估计有 3 700 万^[1-2]。感染随年龄的增加而增多。感染 HCV 后的自然过程的研究表明^[1]: 急性感染后约经 1-3 wk 外周血中可检出 HCV-RNA, 但抗-HCV 的检出常在 3 mo 后, 即便出现肝炎的临床症状, 也仅 50-70% 的患者抗-HCV 阳性, 所以急性丙型肝炎漏诊率很高; 另外患急性丙型肝炎后约有 55-85% 的患者不能完全清除病毒, 变成慢性丙型肝炎, 其中 5-20% 的人在 20-25 a 后可发展为肝硬化, 肝硬化患者 10 a 内 30% 发展为终末期肝病; 每年约有 1-2% 转化为肝细胞癌。所以慢性丙型肝炎也是一个严重危害人民生命健康的疾病。

所谓慢性丙型肝炎是指不论有无临床症状, 只要 HCV 血症持续 6 mo 以上即要考虑慢性丙型肝炎的诊断^[1]。丙型肝炎的临床诊断由于感染 HCV 后个体反应的差异极大, 可以从无症状携带者到表现症状轻重不一、进展快慢不等的各种各样的肝脏炎症和纤维化, 所以给临床诊断带来很大的困难。

1 慢性丙型肝炎的临床诊断

根据我国中华医学会传染病寄生虫病学分会和肝病学分会 2000 年西安第十次全国病毒性肝炎与肝病会议修订的“病毒性肝炎防治方案”和 2004 年两学会公布的“丙型肝炎防治指南”^[2-3], 慢性丙型肝炎的诊断依据: (1)HCV 感染超过 6 mo; (2)发病日期不明, 也无肝炎病史, 但肝脏组织病理学检查符合慢性肝炎; (3)或据症状、体征、实验室及影像学检查结果综合分析。3 条任何 1 条符合均可作出诊断。

慢性肝炎病变程度判定参照“病毒性肝炎防治方案”中关于肝脏炎症分度和纤维化的分期的诊断标准确定^[2]。但目前国外学者多采用 Metarir 和 Ishak 肝组织学纤维化计分系统^[4-5], 后者更细致(表 1)。

表 1 肝组织学纤维化计分系统

分期	Metarir 系统	Ishak 系统
0	无纤维化	无纤维化
1	门脉周发生纤维化	某些门脉区发生纤维化, 伴或不伴有短间隔
2	P-P 间隔(> 1 个隔)	多个门脉区发生纤维化, 伴或不伴短纤维隔
3	P-C 间隔	纤维在多个门脉区, 偶伴有 P-P 桥状隔
4	肝硬化	门脉区纤维化产生伴明显桥状隔(P-P 或 P-C)
5		明显桥状隔(P-P 或 P-C)偶有假小叶(不完全肝硬化或早期肝硬化)
6		肝硬化

2 诊断的相关问题

慢性丙型肝炎病毒感染者由于病史不清, 症状轻重不一, 体征缺乏, 肝功能生化检测指标改变轻微, 具体判定中存在很多困难, 笔者认为专科医生首先应对于不明原因转氨酶升高者、对有输血或血液制品史、血液透析史者应高度警惕; 其次应熟悉该病的流行病学特点和临床特点; 再次对怀疑者必须据流行病学特点仔细询问病史; 然后根据流行病学资料, 临床表现的特点及实验室检测或肝穿刺组织学检查结果进行综合分析, 多可得出准确诊断。

2.1 流行病学特点

2.1.1 传染源 丙型肝炎的传染源是丙型肝炎病毒现症感染者。

2.1.2 传播途径 HCV 主要经血传播。自从 1989 年克隆出 HCV 的基因并建立 HC 的检测方法后, 不少国家相继对采血及输血技术采取了控制, 但在 WHO 所属 191 个成员国中仅 70 个国家执行了控制措施; 另一方面采用抗-HCV 筛检献血员也存在一些问题, 比如丙型肝炎病毒感染的早期抗-HCV 有一窗口期; 部分感染者抗-HCV 可始终为阴性; 在我国再加上各单位使用的检测试剂灵敏度不一, 这都造成了漏检, 使有传染性的血液被采集或被制成血液制品。所以经血传播仍是重要传播途径。经皮肤暴露传播: 这包括注射吸毒者; 不规范医疗操作, 创伤性操作; 纹身、眉、唇, 穿耳孔以及共用牙刷、剃须刀等。母婴传播: 血清 HCV-RNA 阳性的母亲可在围产期传给胎儿^[6], 传播的危险性为 2-7%; 而仅抗-HCV 阳性者则为 2%。性传播: 性传播阳性率不高, 但多个性伴侣或性乱史者可是一种传播方式。如血液透析, 器官移植也可通过被污染的仪器设备或感染者的器官与组织传播。此外尚有约 10-30% 的感染者不清楚感染来源, 说明可能还存在水平传播。

2.1.3 易感人群 人群普遍易感。感染后慢性化率与感染

时的年龄密切相关.有报道显示<20岁的人感染后慢性化率不到20%^[4],18岁以下感染有很高的病毒清除率;21-30岁期间感染慢性化率约50%,31-50岁时感染慢性化率约为60-80%,而50岁以上的人感染,慢性化率为100%.如(图1)^[7].

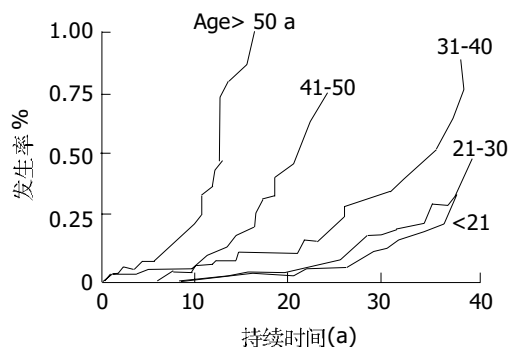


图1 感染HCV时的年龄及持续时间与发生肝硬化的关系。

2.2 临床特点 输血和血制品感染HCV后,潜伏期为2-16 wk(平均7 wk).感染后4-12 wk肝细胞受损可通过ALT值升高而表现,但多数感染者呈亚临床型.少数急性发病出现症状,其表现与其他类型病毒肝炎相类似,约10%伴有黄疸,症状维持2-12 wk恢复,过程中约25%的患者自限,HCV清除;但多数演变成慢性;罕有暴发性肝炎发生.其散发性丙型肝炎的潜伏期及其他途径感染者的潜伏期难以确定,因多呈无症状携带和亚临床表现,这些感染者等到就医时往往都是慢性.

2.2.1 影响自发清除的因素 影响自发清除、利于慢性化的因素^[8]: (1)感染病毒量大,血中病毒负荷载量高; (2)病毒的基因型,如1b型; (3)血中病毒准种的特性和差异等,均有促于肝病进展; (4)感染时年龄大者不易清除; (5)女性易于清除; (6)感染者MHC的类型,如非洲裔美国男性自发清除率极低; (7)感染者机体的免疫状态,如伴HIV感染,或伴HBV感染,或用免疫抑制剂者均易慢性化; (8)嗜酒者,即便低量的酒也能致肝损伤,如男性30 g/d(相当2瓶啤酒、2杯葡萄酒、或2种混合酒精饮料),女性20 g/d均有明显的影响; (9)另外铁沉积、非酒精性脂肪肝病、肝吸虫病感染、肝损伤药物的应用、以及环境污染等在丙型肝炎慢性化上都起着重要作用.

2.2.2 临床特点 慢性丙型肝炎感染者通常无症状或仅有一些非特异的症状,如轻微疲乏、纳差、偶感恶心、右上腹不适、饭后饱胀、少数精神差、睡眠不佳、肌痛或全身不适.这些症状由于经常被患者以为是工作忙碌,或休息不好而忽视,不少人是由于查体检测抗-HCV阳性才被考虑.还有出现肝外器官病变,甚或发生肝硬化时才检出.肝功能生化检测丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平可反映肝细胞损害程度,但其值与肝组织炎症分度和病情的严重程度不一定平行.急性丙型肝炎可较高,10%还可伴黄疸;而慢性丙型

肝炎患者两个转氨酶则有的正常,有的反复波动,有的持续异常;其异常者中近半数患者其值低于2倍正常上限.生化检测项目中血清白蛋白、 γ -转氨酶、碱性磷酸酶、胆碱酯酶活性,及凝血酶原活动度、血小板计数对于诊断慢性丙型肝炎病情程度很有帮助.通常 γ -转氨酶、碱性磷酸酶值越高,血清白蛋白、胆碱酯酶活性及凝血酶原活动度、血小板计数值愈低则病情越重,慢性化程度即越高.

2.3 肝穿刺检查 其不仅是诊断依据,也是治疗指针.虽血清学抗-HCV是慢性丙肝诊断的初筛标准,病原学HCV-RNA的检测则是本病的确诊标准(见本期另文),但慢性丙型肝炎病毒感染者随病程的推延往往HCV-RNA的检测由于病毒复制量低,检测手段的灵敏度不高,出现假阴性;或者由于该慢性感染者临床的不典型性,肝功能生化检测的不确定性,肝脏穿刺组织病理学检查就显得格外重要.

新近加拿大NIH丙肝协会推荐进行了一项多中心的研究^[9],由专门内科医师对81例未经治疗,ALT升高,HCV-RNA阳性的慢性丙型肝炎患者根据临床和实验资料进行精确诊断,与肝穿刺炎症分度和纤维化分期计分诊断比较,结果临床实验诊断预测炎症程度仅为55%(44/80),纤维化分期预测率为57%(46/81),肝硬化患者(9/17)预测的灵敏度为53%,特异性为56%.说明当前临床和实验室检测不能精确预测慢性丙型肝炎肝脏炎症和纤维化程度.

丙型肝炎病理不仅能准确反映丙型肝炎病情严重程度和肝组织炎症活动度,而且也有直接诊断丙型肝炎的作用.丙型肝炎的特征性病理改变如: (1)单核细胞增多多样病变,即单核细胞浸于肝窦中,有的形串珠状; (2)肝细胞大泡性脂肪变性; (3)胆管损伤伴汇管区大量淋巴细胞浸润,甚至淋巴滤泡形成;胆管细胞损毁,小叶内胆管量减少,类似自身免疫性肝炎的病变; (4)常见界面炎症.汇管区淋巴细胞浸润、聚集,肝细胞脂肪变性及胆管损伤.

肝穿刺病理炎症程度及肝纤维化的分度在CHC治疗的决策中也有重要作用.丙型肝炎肝纤维化发生早,程度往往较重,并且与肝功能生化检测不一致,判断肝纤维化至今尚无有效的血清学方法,当今也只有肝组织学检查能准确反映肝纤维化的情况.临床上约30%CHC感染者ALT正常,40%ALT低于两倍正常上限值,虽多数仅为轻度肝病,但其中确有一些进展到肝中、重度肝纤维化,乃至肝硬化者.一般ALT值正常或轻度升高者,治疗与否专家们尚有分歧^[10],但如肝组织学有门脉或桥状纤维化(Metavir>F2和Ishak>F3),并中等度炎症和坏死,则必须治疗^[11].治疗后疗效判定如肝组织炎症活动度和纤维化的改善肝穿刺病理检查也是最好的方法.所以肝穿刺病理检查对于确诊及疗效观察都有非常重要的作用,应大力提倡.

由于感染HCV后个体反应的差异极大,可以从无

症状携带者到表现为症状轻重不一、进展快慢不等的各种各样的肝脏炎症和纤维化,所以给临床诊断带来很大的困难.本文首先阐述了慢性丙型肝炎的概念及诊断依据,同时提出专科医生应对不明原因转氨酶升高者、对有输血或血液制品史者提高警惕;应熟悉该病的流行病学特点和临床特点;对怀疑者必须仔细询问病史;然后根据流行病学资料,临床表现的特点及实验室检测或肝穿刺组织学检查结果等相关问题进行综合分析,从而提高诊断率.

3 参考文献

- 1 Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. American association for the study of liver diseases. Diagnosis, Management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1147-1171
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病分会和肝病分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2004;8:324-329
- 3 中华医学会肝病分会、传染病与寄生虫病分会. 丙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志* 2004;12:194-198
- 4 Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The Metavir Cooperative study group. *Hepatology* 1996;24:289-293
- 5 Bruguera M. Histologic diagnosis of chronic hepatitis, grading and staging. *Gastroenterol Hepatol* 1997;20:190-192
- 6 程勇前, 聂青和, 周永兴. 丙型肝炎病毒母婴传播机制研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:445-447
- 7 Afdhal NH. Diagnosing fibrosis in hepatitis C: is the pendulum swinging from biopsy to blood tests. *Hepatology* 2003;37:972-974
- 8 Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatology* 2001;34:730-739
- 9 Bain VG, Bonacini M, Govindarajan S, Ma M, Sherman M, Gibas A, Cotler SJ, Deschenes M, Kaita K, Jhangri GS. A Multicentre study of the usefulness of liver biopsy in hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004;11:375-382
- 10 National Institutes of Health. National institutes of health consensus development conference statement: Management of hepatitis C: 2002-June 10-12: 2002. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl):S3-20
- 11 Bacon BR. Treatment of patients with hepatitis C and normal serum aminotransferase levels. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl):S179-184

慢性丙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症

江河清

江河清, 郑州大学第一附属医院感染科 河南省郑州市 450052
项目负责人: 江河清, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院感染科. jiangheqingem@hotmail.com
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

江河清. 慢性丙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症. *世界华人消化杂志* 2004; 12(10):2371-2373

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2371.asp>

0 引言

HCV 感染是全球性疾病,感染率 1-3% 左右,我国一般人群抗-HCV 阳性率为 3.2%. 输血、静脉药瘾或某些医学操作是 HCV 感染传播的主要途径,慢性丙型肝炎是其重要的临床转归形式之一.慢性丙型肝炎临床表现多样,除了有肝脏病变外,还会有多个肝外系统的损害,因此本文将对慢性丙型肝炎的鉴别诊断和并发症做一综述.

1 慢性丙型肝炎的鉴别诊断

1.1 慢性乙型肝炎 HBV 感染、HBV 合并 HDV 感染临床上均可以引起慢性肝炎,且其传播途径与 HCV 感染相似,鉴别诊断应根据血清学检查结果.还应注意 HBV 合并 HCV 感染.

1.2 自身免疫性肝炎 自身免疫性肝炎是慢性肝炎的一种,目前病因尚不清楚.其特点为: (1)大多发生在年轻女性当中; (2)临床大多数隐匿起病,逐渐出现疲乏无力、恶心、食欲不振、腹胀及体重减轻等肝炎症状,可伴有发热、关节酸痛或慢性关节炎症状.面部鼻翼两侧可出现像蝴蝶一样的对称红斑,红斑处皮肤有轻微肿胀,还伴有其他一些临床综合征. (3)有自身免疫性抗体 ANA(抗核抗体), SMA(抗平滑肌抗体), 抗 LKM-1(抗 I 型肝肾微粒体抗体)存在; (4)各型肝炎病毒指标均为阴性; (5)血清球蛋白,尤其是 γ -球蛋白增高; (6)容易反复发作; (7)对激素治疗效果显著.鉴别诊断应根据原发病的临床特点及血清学检查结果.

1.3 非嗜肝病毒引起的肝炎

1.3.1 巨细胞病毒肝炎 巨细胞病毒(CMV)感染可以引起肝炎表现. CMV 性肝炎主要表现为全身不适、低热、白细胞减少、血小板减少和肝功能异常. 消化道症状和血清转氨酶增高都不及病毒性肝炎明显. 发热是较显著的症状,可持续至黄疸后不退.偶尔发生致死性的大块肝细胞坏死,有时引起肉芽肿性肝炎. 可伴长期不明热,偶有胆汁淤滞. 巨细胞病毒可引起输血后肝炎,在免疫抑制患者则可引起播散性疾病. 慢性 HBV 混合感染巨细胞病毒的患者大多病变加重,可使病变活动,甚至发生活动性肝硬化. 单靠临床表现不能诊断 CMV 感染,从临床标本中分离出病毒,同时抗体呈出 4 倍以上增加或持续抗体滴度升高,有助于诊断. 也可采用 DNA 探针、PCR 分子生物学方法确定病原体.

1.3.2 EB 病毒肝炎 EB 病毒也可以引起肝炎表现,其临床特点为: 血清 ALT 多明显增高,但不及病毒性肝炎. 可伴有发热、咽峡炎、皮疹、全身性淋巴结肿大、脾肿大. 约半数患者有轻微黄疸. 外周血白细胞数正常或增高,异型淋巴细胞占 10-50%. EBV 抗 IgM 是特异性的血清标志物. 鉴别诊断应根据原发病临床特点和血清学检查结果.

1.3.3 其他非嗜肝性病毒肝炎 疱疹病毒、腺病毒等非嗜肝性病毒均可以引起肝炎表现,应根据原发病的临

症状携带者到表现为症状轻重不一、进展快慢不等的各种各样的肝脏炎症和纤维化, 所以给临床诊断带来很大的困难. 本文首先阐述了慢性丙型肝炎的概念及诊断依据, 同时提出专科医生应对不明原因转氨酶升高者、对有输血或血液制品史者提高警惕; 应熟悉该病的流行病学特点和临床特点; 对怀疑者必须仔细询问病史; 然后根据流行病学资料, 临床表现的特点及实验室检测或肝穿刺组织学检查结果等相关问题进行综合分析, 从而提高诊断率.

3 参考文献

- 1 Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. American association for the study of liver diseases. Diagnosis, Management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1147-1171
- 2 中华医学会传染病与寄生虫病分会和肝病分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2004;8:324-329
- 3 中华医学会肝病分会、传染病与寄生虫病分会. 丙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志* 2004;12:194-198
- 4 Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The Metavir Cooperative study group. *Hepatology* 1996;24:289-293
- 5 Bruguera M. Histologic diagnosis of chronic hepatitis, grading and staging. *Gastroenterol Hepatol* 1997;20:190-192
- 6 程勇前, 聂青和, 周永兴. 丙型肝炎病毒母婴传播机制研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:445-447
- 7 Afdhal NH. Diagnosing fibrosis in hepatitis C: is the pendulum swinging from biopsy to blood tests. *Hepatology* 2003;37:972-974
- 8 Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatology* 2001;34:730-739
- 9 Bain VG, Bonacini M, Govindarajan S, Ma M, Sherman M, Gibas A, Cotler SJ, Deschenes M, Kaita K, Jhangri GS. A Multicentre study of the usefulness of liver biopsy in hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004;11:375-382
- 10 National Institutes of Health. National institutes of health consensus development conference statement: Management of hepatitis C: 2002-June 10-12: 2002. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl):S3-20
- 11 Bacon BR. Treatment of patients with hepatitis C and normal serum aminotransferase levels. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl):S179-184

慢性丙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症

江河清

江河清, 郑州大学第一附属医院感染科 河南省郑州市 450052
项目负责人: 江河清, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院感染科. jiangheqingem@hotmail.com
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

江河清. 慢性丙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2371-2373

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2371.asp>

0 引言

HCV 感染是全球性疾病, 感染率 1-3% 左右, 我国一般人群抗-HCV 阳性率为 3.2%. 输血、静脉药瘾或某些医学操作是 HCV 感染传播的主要途径, 慢性丙型肝炎是其重要的临床转归形式之一. 慢性丙型肝炎临床表现多样, 除了有肝脏病变外, 还会有多个肝外系统的损害, 因此本文将对慢性丙型肝炎的鉴别诊断和并发症做一综述.

1 慢性丙型肝炎的鉴别诊断

1.1 慢性乙型肝炎 HBV 感染、HBV 合并 HDV 感染临床上均可以引起慢性肝炎, 且其传播途径与 HCV 感染相似, 鉴别诊断应根据血清学检查结果. 还应注意 HBV 合并 HCV 感染.

1.2 自身免疫性肝炎 自身免疫性肝炎是慢性肝炎的一种, 目前病因尚不清楚. 其特点为: (1) 大多发生在年轻女性当中; (2) 临床大多数隐匿起病, 逐渐出现疲乏无力、恶心、食欲不振、腹胀及体重减轻等肝炎症状, 可伴有发热、关节酸痛或慢性关节炎症状. 面部鼻翼两侧可出现像蝴蝶一样的对称红斑, 红斑处皮肤有轻微肿胀, 还伴有其他一些临床综合征. (3) 有自身免疫性抗体 ANA(抗核抗体), SMA(抗平滑肌抗体), 抗 LKM-1(抗 I 型肝肾微粒体抗体) 存在; (4) 各型肝炎病毒指标均为阴性; (5) 血清球蛋白, 尤其是 γ -球蛋白增高; (6) 容易反复发作; (7) 对激素治疗效果显著. 鉴别诊断应根据原发病的临床特点及血清学检查结果.

1.3 非嗜肝病毒引起的肝炎

1.3.1 巨细胞病毒肝炎 巨细胞病毒(CMV)感染可以引起肝炎表现. CMV 性肝炎主要表现为全身不适、低热、白细胞减少、血小板减少和肝功能异常. 消化道症状和血清转氨酶增高都不及病毒性肝炎明显. 发热是较显著的症状, 可持续至黄疸后不退. 偶尔发生致死性的大块肝细胞坏死, 有时引起肉芽肿性肝炎. 可伴长期不明热, 偶有胆汁淤滞. 巨细胞病毒可引起输血后肝炎, 在免疫抑制患者则可引起播散性疾病. 慢性 HBV 混合感染巨细胞病毒的患者大多病变加重, 可使病变活动, 甚至发生活动性肝硬化. 单靠临床表现不能诊断 CMV 感染, 从临床标本中分离出病毒, 同时抗体呈出 4 倍以上增加或持续抗体滴度升高, 有助于诊断. 也可采用 DNA 探针、PCR 分子生物学方法确定病原体.

1.3.2 EB 病毒肝炎 EB 病毒也可以引起肝炎表现, 其临床特点为: 血清 ALT 多明显增高, 但不及病毒性肝炎. 可伴有发热、咽峡炎、皮疹、全身性淋巴结肿大、脾肿大. 约半数患者有轻微黄疸. 外周血白细胞数正常或增高, 异型淋巴细胞占 10-50%. EBV 抗 IgM 是特异性的血清标志物. 鉴别诊断应根据原发病临床特点和血清学检查结果.

1.3.3 其他非嗜肝性病毒肝炎 疱疹病毒、腺病毒等非嗜肝性病毒均可以引起肝炎表现, 应根据原发病的临

床特点和血清学检查结果相鉴别。

1.4 血吸虫性肝硬化 血吸虫性肝硬化见于血吸虫病的晚期,是由血吸虫虫卵大量沉积引起,应与慢性丙型肝炎引起的肝硬化相鉴别。血吸虫性肝硬化多有门脉高压,可发生食管、胃底静脉曲张破裂出血,脾肿大程度较丙肝后肝硬化为重。患者曾到过血吸虫病流行区并有疫水接触史,B型超声检查表现为纤维网状图像,有长方形线性纤维结构。可从患者粪便或直肠黏膜活检中找到虫卵及进行血清学检查加以鉴别。

1.5 酒精性肝病 长期嗜酒可导致慢性肝炎、肝硬化,血清 γ -GT升高显著,ALT、AST轻度升高。可根据个人饮酒史和血清酶学检查加以鉴别。

1.6 药物性肝炎 由药物或其代谢产物引起的肝脏损害称药物性肝炎,目前有600多种药物可引起药物性肝炎,其表现与其他各种肝病的表现相同,可表现为胆汁淤积、慢性肝炎和肝硬化等。有用肝损害药物的历史,首发症状主要为发热、皮疹、关节痛、嗜酸性粒细胞增多等,偶然再次用此药时可再引起肝病。

1.7 先天性疾病

1.7.1 肝豆状核变性 又称Wilson病,是一种常染色体隐性遗传的铜代谢缺陷病,儿童期患者常以肝病为首发症状:食欲不振、呕吐、黄疸、浮肿、腹水等,成人患者常有肝炎病史。患者肝脏肿大,质较硬而有触痛,肝脏损害逐渐加重可出现肝硬化症状,应与慢性丙型肝炎引起的肝硬化相鉴别。鉴别要点如下:(1)本病好发于儿童和青年;(2)血清铜及铜蓝蛋白降低;(3)角膜色素环(K-F环)为本病重要体征,一般于7岁之后可见;(4)神经症状:成人多为动作减少,肌强直、慌张步态为主,儿童以舞蹈、手足徐动、肌张力减低为主,可有癫痫发作;(5)精神症状:注意力不集中记忆力差,情绪不稳,后期可有痴呆,可有幻觉,妄想;(6)可出现蛋白尿、糖尿、氨基酸尿、尿酸尿、肾性佝偻病、骨质疏松、骨骼变形、病理性骨折及溶血等。

1.7.2 血色病 为一种罕见的先天性代谢缺陷病,由于过多的铁质沉着在脏器组织所致,引起不同程度的基质细胞破坏、纤维组织增生及脏器功能障碍,患者可出现皮肤色素沉着和肝硬化表现,需与慢性丙型肝炎所引的色素沉着和肝硬化相鉴别。慢性丙型肝炎和血色病均可有皮肤色素沉着,但前者皮肤色素沉着为晦暗色,后者为青灰色或青铜色;前者一般先出现肝功能异常,待发展到慢性肝炎后期才出现面色晦暗,后者常先出现皮肤色素沉着,待大量铁在肝脏沉积后才造成肝功能异常。血色病除有色素沉着和肝硬化等临床表现外,还可引起糖尿病、内分泌紊乱、心脏和关节病变,实验室检查血清铁、血清铁饱和度和血清铁蛋白均增高。遗传性血色病可并发HCV感染,Diwakaran *et al*^[11]认为,与无HCV的血色病患者相比,并发HCV的遗传性血色病患者出现晚期纤维化较早、肝脏铁浓度较低。

1.7.3 α -抗胰蛋白酶缺乏综合征 是血中抗蛋白酶成分

α -抗胰蛋白酶(简称 α -AT)缺乏引起的一种先天性代谢病,通过常染色体遗传,可以引起新生儿肝炎,婴幼儿和成人的肝硬化、肝癌等。成人常以突发的门脉高压症状为首表现,常伴发肺气肿,有家族倾向。通过对 α -AT的检测可确诊。

2 慢性丙型肝炎的常见并发症

2.1 肝硬化和肝细胞癌 现代研究认为,从感染HCV到肝硬化发生约需20 a,到肝癌发生约需30 a,慢性丙型肝炎患者有20-30%的患者最终发展成肝硬化,少数发展为肝癌。Benvegnu *et al*^[12]报道HCV感染者在诊断丙肝后肝硬化的10 a内,原发性肝癌是导致患者死亡的最常见的并发症。

HCV与肝硬化在病因上的相关性日益受到关注。Al-Qaiz *et al*^[13]研究证实,慢性丙型肝炎发生硬化的相关危险因素是年龄、男性、饮酒、合并其他肝炎病毒感染等。肝硬化早期表现隐匿,晚期的临床表现可以归结为:(1)门脉高压所致的侧支循环、脾肿大,脾功能亢进,腹水等;(2)肝功能损害所致的蛋白合成功能降低、黄疸、内分泌失衡及皮肤表现等,除此外还有上消化道出血、自发型细菌性腹膜炎、肝肾综合征、肝肺综合征。

丙型肝炎是肝硬化的主要原因,从而也是肝癌的主要致病因素。HCV与肝癌的关系,近年受到重视。我国肝癌患者中HCV的感染率较低,近年有上升趋势。慢性丙型肝炎与肝细胞癌发生风险上升的相关因素为肝硬化或晚期纤维化(肝活检时)、年龄、男性、纵酒等。

肝癌发生的分子生物学基础包括:染色体畸变、癌基因的激活、生长因子及其受体的异常、抑癌基因的失活等。Machida *et al*^[14]研究表明HCV感染后,通过病毒的核心蛋白和NS3蛋白激活iNOS基因,从而使NO合成量大增。而NO可以诱导宿主基因断裂、发生突变,进一步可以激活前癌基因,产生原发性肝癌。

原发性肝癌起病多较隐匿,早期常缺乏明显的临床表现,出现典型的临床症状和体征时已属中晚期。临床上患者最常见的症状是肝区疼痛,多呈持续性胀痛或钝痛。此外,还可有消化道症状及消瘦、乏力、恶病质等恶性肿瘤的全身表现、伴癌综合征等。患者的预后取决于能否早期诊断和早期治疗。

2.2 慢性丙型肝炎和内分泌疾病 Shintani *et al*^[15]研究HCV感染和2型糖尿病之间的关系时发现,HCV可以使转基因小鼠产生胰岛素抵抗,最终导致2型糖尿病的发生。Caronia *et al*^[16]认为非胰岛素依赖糖尿病(NIDDM)可能与慢性HCV感染相关。研究结果提示HCV相关肝硬化引起糖尿病的发生率较HBV相关肝硬化高,并与Child分级和年龄相关。丙型肝炎患者胰岛素水平检测结果显示其胰岛素抵抗,急性胰岛素反应结果提示 β 细胞功能受损,因此HCV感染与NIDDM具有明确的相关性,(受体的或受体后的)胰岛素抵抗的机制不清。目前治疗HCV感染的主要方案是干扰素联合利巴韦林。

现代研究表明应用干扰素治疗丙肝可导致糖尿病的发生和糖耐量的减低. 临床上多数患者先有肝病症状, 继之出现糖尿病, 并随肝病的好转而好转乃至痊愈. 其临床表现很不一致, 多有肝病症状, 而缺乏糖尿病的症状及体征, 仅实验室检查有糖尿病改变. 少数患者多饮、多尿, 但多无食欲亢进. 即使糖尿病严重继发糖尿病血管改变也较罕见. 少数患者可发生酮症酸中毒甚至死亡.

慢性丙型肝炎患者还容易合并有甲状腺功能的改变. 有研究表明应用干扰素抗病毒治疗是引起甲状腺疾病的主要诱因, 常见的甲状腺功能异常有: 甲减、甲亢、桥本氏病、抗甲状腺抗体升高、自身免疫性甲状腺炎等, 多发生在开始治疗后的 6 wk-12 mo 后.

2.3 慢性丙型肝炎和肾脏疾患 HCV 感染和肾病相关, 最常见的是膜增生性和膜性肾小球肾炎. 通常情况下, 肾脏侵害无明显临床症状. 对于伴有膜增生性肾小球肾炎的患者, 镜下血尿和蛋白尿是最常见的表现. 平均来说, 50% 的患者会表现为轻到中度肾脏功能不全. 在伴有肾脏侵害的患者中, 25% 以肾病综合征为首发表现. 血凝固性过高、甲状腺功能障碍、维生素 D 缺乏和高脂血症也可能是其表现.

正相反, 绝大多数丙肝相关性膜性肾小球肾炎的患者表现为突出的肾病综合征. 在丙肝合并肾病表现的患者中, 约 75% 的患者血清转氨酶升高, 仅有 25% 的患者有慢性肝病的临床征象. 在已有 HCV 感染的情况下, 及早确定肾脏情况及经常监测肾功能非常重要, 及时的治疗能防止肾病的进一步发展.

2.4 皮肤并发症 慢性丙型肝炎可以导致皮肤并发症^[7], 如冷球蛋白血症、迟发性皮肤卟啉症、白细胞破碎性血管炎、网状青斑、荨麻疹、多形红斑、结节性红斑、白塞氏病等, 最常见的是冷球蛋白血症. 有研究显示^[8], 约 40-54% 慢性丙肝患者伴有冷球蛋白血症, 而在乙型肝炎中仅有 15%, 其他原因的肝脏疾病为 32%. 冷球蛋白血症典型症状是疲困、肌痛、关节痛、皮疹(紫癜、荨麻疹、过敏性血管炎)、神经病、肾炎(肾小球肾炎)等, 实验室检查可见类风湿因子、冷球蛋白(含丙肝抗体和 HCV RNA)升高、补体水平下降. 该症患者存在一种遇冷沉淀、温暖后又溶解的免疫球蛋白, 因此而得名. 冷球蛋白血症严重者可致末期肾病或严重神经疾病.

3 参考文献

- 1 Diwakaran HH, Befeler AS, Britton RS, Brunt EM, Bacon BR. Accelerated hepatic fibrosis in patients with combined hereditary hemochromatosis and chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2002;36:687-691
- 2 Benvegnu L, Gios M, Boccato S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut* 2004;53:744-749
- 3 Al-Qaiz MN, Madani TA, Karawi MA. The natural history of hepatitis C virus infection. *Saudi Med J* 2003;24(Suppl 2):S67-70
- 4 Machida K, Cheng KT, Sung VM, Lee KJ, Levine AM, Lai MM.

- Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. *J Virol* 2004;78:8835-8843
- 5 Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004;126:840-848
 - 6 Caronia S, Taylor K, Pagliaro L, Carr C, Palazzo U, Petrik J, O'Rahilly S, Shore S, Tom BD, Alexander GJ. Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999;30:1059-1063
 - 7 Nocente R, Ceccanti M, Bertazzoni G, Cammarota G, Silveri NG, Gasbarrini G. HCV infection and extrahepatic manifestations. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1149-1154
 - 8 Pawlotsky JM, Ben Yahia M, Andre C, Voisin MC, Intrator L, Roudot-Thoraval F, Deforges L, Duvoux C, Zafrani ES, Duval J. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology* 1994;9:841-848

丙型肝炎的实验室诊断和临床意义

魏 来

魏来, 北京大学人民医院肝病研究所 北京市 100044
项目负责人: 魏来, 100044北京市, 北京大学人民医院肝病研究所. weelai@163.com
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

魏来. 丙型肝炎的实验室诊断和临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2373-2376

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2373.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染的实验室诊断是丙型肝炎诊断的重要依据, 主要包括特异性抗体(抗-HCV)的检查、HCV 基因和 HCV 核心抗原的检测以及肝细胞损害的检查. 抗-HCV 阳性是感染的标记, 感染的间接证据; 而病毒基因和抗原检测阳性是病毒存在的直接证据. 肝细胞损害的检查往往以肝脏酶学检查, 特别是丙氨酸氨基转移酶(ALT)来反映, ALT、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平变化可反映肝细胞损害程度, 但 ALT、AST 水平与 HCV 感染引起的肝组织炎症分度和病情的严重程度不一定平行, 慢性丙型肝炎患者中, 约有 30% ALT 水平正常, 约 40% ALT 水平低于 2 倍正常值上限. 非侵袭性的肝纤维化评价非常困难, 也没有可靠的指标来预测肝纤维化的进展速度, 仅肝组织学检查是金标准. 高水平的 ALT 往往伴有高危险的肝纤维化. 常规实验室检查中血小板计数降低、AST/ALT 比值增高和凝血酶原时间延长是肝硬化和门静脉高压最早的标志. 此外, 有一些生物化学检查来间接反映肝脏的纤维化情况, 其可靠性需要进一步评价. HCV 感染者一旦发生肝硬化, 肝癌的年发生率为 1-4%, 对于这部分

现代研究表明应用干扰素治疗丙肝可导致糖尿病的发生和糖耐量的减低. 临床上多数患者先有肝病症状, 继之出现糖尿病, 并随肝病的好转而好转乃至痊愈. 其临床表现很不一致, 多有肝病症状, 而缺乏糖尿病的症状及体征, 仅实验室检查有糖尿病改变. 少数患者多饮、多尿, 但多无食欲亢进. 即使糖尿病严重继发糖尿病血管改变也较罕见. 少数患者可发生酮症酸中毒甚至死亡.

慢性丙型肝炎患者还容易合并有甲状腺功能的改变. 有研究表明应用干扰素抗病毒治疗是引起甲状腺疾病的主要诱因, 常见的甲状腺功能异常有: 甲减、甲亢、桥本氏病、抗甲状腺抗体升高、自身免疫性甲状腺炎等, 多发生在开始治疗后的 6 wk–12 mo 后.

2.3 慢性丙型肝炎和肾脏疾患 HCV 感染和肾病相关, 最常见的是膜增生性和膜性肾小球肾炎. 通常情况下, 肾脏侵害无明显临床症状. 对于伴有膜增生性肾小球肾炎的患者, 镜下血尿和蛋白尿是最常见的表现. 平均来说, 50% 的患者会表现为轻到中度肾脏功能不全. 在伴有肾脏侵害的患者中, 25% 以肾病综合征为首发表现. 血凝固性过高、甲状腺功能障碍、维生素 D 缺乏和高脂血症也可能是其表现.

正相反, 绝大多数丙肝相关性膜性肾小球肾炎的患者表现为突出的肾病综合征. 在丙肝合并肾病表现的患者中, 约 75% 的患者血清转氨酶升高, 仅有 25% 的患者有慢性肝病的临床征象. 在已有 HCV 感染的情况下, 及早确定肾脏情况及经常监测肾功能非常重要, 及时的治疗能防止肾病的进一步发展.

2.4 皮肤并发症 慢性丙型肝炎可以导致皮肤并发症^[7], 如冷球蛋白血症、迟发性皮肤卟啉症、白细胞破碎性血管炎、网状青斑、荨麻疹、多形红斑、结节性红斑、白塞氏病等, 最常见的是冷球蛋白血症. 有研究显示^[8], 约 40–54% 慢性丙肝患者伴有冷球蛋白血症, 而在乙型肝炎中仅有 15%, 其他原因的肝脏疾病为 32%. 冷球蛋白血症典型症状是疲困、肌痛、关节痛、皮疹(紫癜、荨麻疹、过敏性血管炎)、神经病、肾炎(肾小球肾炎)等, 实验室检查可见类风湿因子、冷球蛋白(含丙肝抗体和 HCV RNA)升高、补体水平下降. 该症患者存在一种遇冷沉淀、温暖后又溶解的免疫球蛋白, 因此而得名. 冷球蛋白血症严重者可致末期肾病或严重神经疾病.

3 参考文献

- 1 Diwakaran HH, Befeler AS, Britton RS, Brunt EM, Bacon BR. Accelerated hepatic fibrosis in patients with combined hereditary hemochromatosis and chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2002;36:687–691
- 2 Benvegnu L, Gios M, Boccato S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut* 2004;53:744–749
- 3 Al-Quaiz MN, Madani TA, Karawi MA. The natural history of hepatitis C virus infection. *Saudi Med J* 2003;24(Suppl 2):S67–70
- 4 Machida K, Cheng KT, Sung VM, Lee KJ, Levine AM, Lai MM.

- Hepatitis C virus infection activates the immunologic (type II) isoform of nitric oxide synthase and thereby enhances DNA damage and mutations of cellular genes. *J Virol* 2004;78:8835–8843
- 5 Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004;126:840–848
 - 6 Caronia S, Taylor K, Pagliaro L, Carr C, Palazzo U, Petrik J, O'Rahilly S, Shore S, Tom BD, Alexander GJ. Further evidence for an association between non-insulin-dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1999;30:1059–1063
 - 7 Nocente R, Ceccanti M, Bertazzoni G, Cammarota G, Silveri NG, Gasbarrini G. HCV infection and extrahepatic manifestations. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1149–1154
 - 8 Pawlotsky JM, Ben Yahia M, Andre C, Voisin MC, Intrator L, Roudot-Thoraval F, Deforges L, Duvoux C, Zafrani ES, Duval J. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology* 1994;9:841–848

丙型肝炎的实验室诊断和临床意义

魏 来

魏来, 北京大学人民医院肝病研究所 北京市 100044
项目负责人: 魏来, 100044北京市, 北京大学人民医院肝病研究所. weelai@163.com
收稿日期: 2004–09–20 接受日期: 2004–10–08

魏来. 丙型肝炎的实验室诊断和临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(10): 2373–2376

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2373.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染的实验室诊断是丙型肝炎诊断的重要依据, 主要包括特异性抗体(抗-HCV)的检查、HCV 基因和 HCV 核心抗原的检测以及肝细胞损害的检查. 抗-HCV 阳性是感染的标记, 感染的间接证据; 而病毒基因和抗原检测阳性是病毒存在的直接证据. 肝细胞损害的检查往往以肝脏酶学检查, 特别是丙氨酸氨基转移酶(ALT)来反映, ALT、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平变化可反映肝细胞损害程度, 但 ALT、AST 水平与 HCV 感染引起的肝组织炎症分度和病情的严重程度不一定平行, 慢性丙型肝炎患者中, 约有 30% ALT 水平正常, 约 40% ALT 水平低于 2 倍正常值上限. 非侵袭性的肝纤维化评价非常困难, 也没有可靠的指标来预测肝纤维化的进展速度, 仅肝组织学检查是金标准. 高水平的 ALT 往往伴有高危险的肝纤维化. 常规实验室检查中血小板计数降低、AST/ALT 比值增高和凝血酶原时间延长是肝硬化和门静脉高压最早的标志. 此外, 有一些生物化学检查来间接反映肝脏的纤维化情况, 其可靠性需要进一步评价. HCV 感染者一旦发生肝硬化, 肝癌的年发生率为 1–4%, 对于这部分

患者还应该监测AFP. 本文则主要介绍病毒学标志的检测和意义^[1-3].

1 病毒学检测的技术

病毒学检测的技术: 包括酶免疫技术和分子生物学技术. 酶免疫技术广泛用于血清中的病毒抗原和抗体的检测, 包括检测 HCV 核心抗原与抗-HCV 的酶免疫测定(EIA)或酶联免疫黏附实验(ELISA), 以及检测特异性抗体的免疫印迹测定. 酶免疫技术还可用于HCV的血清学分型. 分子生物学技术既有定性和定量测定病毒基因的靶扩增或信号扩增技术, 也有用于病毒基因分型的序列分析和反向杂交.

检测HCV 基因最常用的靶扩增技术是聚合酶链反应(PCR). 因为 HCV 是 RNA 病毒, 须先经过逆转录(RT)合成互补的双链 DNA, 然后在 DNA 聚合酶作用下, 使病毒某基因片段呈指数扩增, 获得大量的双链 DNA; 另一个靶扩增技术为转录介导的扩增(TMA), 依赖逆转录酶合成互补 DNA 链, 再以 RNA 聚合酶合成扩增产物单链 RNA. 以上两种方法都在获得有效扩增后, 通过特异性探针与扩增产物的杂交而显示. 如在扩增体系中加入标准对照, 即可通过竞争结合的原理, 根据标准对照扩增获得的标准曲线对病毒模板的相对数量进行定量. 近来发展起来的实时 PCR 可以在 PCR 扩增过程中对扩增模板, 可避免因过度扩增而造成的污染, 比传统的靶扩增更敏感, 且所测定的动态范围更宽. 信号扩增是对以特异性探针捕获 HCV 模板后对杂交探针的信号加以扩增, 病毒本身的模板不扩增, 依靠同时检测的标准品制备标准曲线进行定量. 反向杂交主要用于 HCV 基因分型, 其他基因分型的分子生物学技术因为难以标准化已较少使用. HCV RNA 的定量和定向检测敏感性和精确性还需要进一步改善和提高, 从而提高对应答的确定, 同时还加深深对抗病毒治疗拮抗的认识. 在技术上还需要进一步标准化和自动化.

2 HCV 感染标志的检测和意义

与HCV感染临床处理有关的病毒感染标志主要有HCV RNA、抗-HCV、HCV 核心抗原和HCV 基因型四种.

2.1 HCV RNA

是 HCV 活跃复制的可靠标志, 表示肝内有HCV存在和复制. 常常在感染后1-2 wk即可在外周血中测得, 在自然清除病毒的感染者中, 常在清除前达高峰; 而在慢性感染者, 常常在高峰后逐渐下降至较低水平而维持在稳态, 每天产生 10^{12} 个病毒颗粒, 半衰期3 h. 有时在持续感染中可能有短暂的低水平复制, 低于检测水平. HCV RNA复制水平与疾病严重性无关, 仅仅在终末期肝病因为有功能肝细胞的减少和纤维化而使病毒处于低水平或低于检测水平. 在肝移植后, HCV 可再次升高.

HCV RNA 的检测既可以定性也可以定量, 测定的意义在于确定感染、指导治疗和判断应答. 目前, 定性检测的敏感性高于定量检测试剂. PCR 与 TMA 定性检测试

剂的敏感性分别达到 50 国际单位(IU)/mL 和 10 IU/mL, 特异性均可达到 98-99%. 定量检测方法除了 PCR 和 TMA 外, 还有信号扩增的分支链DNA. 以往不同定量检测方法的单位不一致, 同一份临床样本不同检测方法所得结果不同. 为此, 世界卫生组织(WHO)近年建立了国际标准以 IU 来反映 HCV RNA 的量, 从而便于 HCV RNA 定量检测的全球标准化^[4]. 国际单位并不能真正反映样本中的病毒颗粒, 只是反映 HCV RNA 的量. 现行的 HCV RNA 测定都采用国际单位来表示检测值(表 1), 使现在的临床指南和各种诊断治疗推荐意见可比性强. 对于以往非标准化检测的结果也可以通过系数进行转换(表 2). 定量检测的敏感性低于定性检测, 最低检测阈值为 25-615 IU/mL. 线性检测范围的上限 500 000-7 700 000 IU/mL. 对于超过检测线形范围上限的样本应该稀释10-100倍后再检测, 方能获得准确定量. 定量检测的特异性为 98-99%, 不受基因型的影响.

表 1 血清 HCV RNA 定量测定的方法与动态范围^[1]

测定方法	测定技术	动态范围
Amlicor HCV monitor 2.0	手工操作, 竞争RT-PCR	600-500 000 IU/mL
Cobas Amlicor HCV monitor 2.0	半自动, 竞争RT-PCR	600-500 000 IU/mL
Versant HCV RNA 2.0	手工, 分支链DNA	200 000-120 000 000 基因/mL
Versant HCV RNA 3.0	半自动, 分支链DNA	615-7 700 000 IU/mL
LCx HCV RNA	半自动, 竞争RT-PCR	25-2630000 IU/mL
Superquant	半自动, 竞争RT-PCR	30-1470000 IU/mL

表 2 各种 HCV RNA 定量测定的基因拷贝与国际单位换算^[1]

测定方法	换算方法
Amlicor HCV monitor 2.0(手工操作)	1 IU/mL=0.9 拷贝/mL
Cobas Amlicor HCV monitor 2.0(半自动)	1 IU/mL=2.7 拷贝/mL
Versant HCV RNA 3.0	1 IU/mL=5.2 拷贝/mL
LCx HCV RNA	1 IU/mL=3.8 拷贝/mL
Superquant	1 IU/mL=3.4 拷贝/mL

2.2 抗-HCV

现在临床上常常使用第二代或第三代抗-HCV 试剂, 表 3 概括了国际上现行的第二代与第三代抗-HCV 诊断试剂及其所包被的 HCV 抗原. 现行抗-HCV 诊断试剂的特异性超过 99%, 但由于缺少金标准而难以明确其敏感性. 免疫功能正常的 HCV 感染者中 99%以上抗-HCV 阳性. HCV 感染后产生抗-HCV 的窗口期依不同患者而有所不同, 第三代诊断试剂的窗口期一般为 7-8 wk, 50-70%的感染者再出现症状时抗-HCV 阳性; 在感染自发清除的患者中, 抗-HCV 往往持续终生, 少数可能处于低水平并可能在几年后逐渐消失^[5]. 除了血液透析和免疫抑制患者以外, 慢性感染者抗-HCV 始终为阳性.

按照美国疾病控制中心2003年新的HCV抗体报告和实验室检测导则^[6], 抗-HCV 仅仅在重复检测滴度

≥ 3.8 时才可能是真正的抗-HCV 阳性, 而对于抗体滴度低于 3.8 者应该以免疫印迹试验来确认 EIA 检测的抗-HCV。近来, 由于抗-HCV 诊断试剂质量的改善, 免疫印迹试验在临床已很少应用, 但在血库低危人群中的筛查中, 由于抗-HCV 的阳性预测值远低于临床应用, 所以免疫印迹往往只应用于血库低危人群的筛查。在美国和欧盟, 曾有以病毒核酸检测替代免疫印迹试验的趋势, 但其成本-效益问题还有争论。所以, 2003 年的美国 CDC 导则又重新提出免疫印迹检测的应用。国内有关单位在国际科技攻关资金资助下进行了不同区抗原的 EIA 试剂研制, 发现不同区抗原片段抗体的检出率差异较大, 以 NS3 和核心区抗体检出率最高^[7]。该检测试剂在一定程度上可以完成免疫印迹类似的工作。对于低危人群, 则不需要常规进行抗-HCV 的筛查^[8]。

表3 抗-HCV 检测的酶免疫方法^[1]

检测试剂	检测技术	包被的HCV抗原
Ortho HCV 3.0(第三代)	EIA	核心, 非结构基因(NS)3, NS4, NS5
Vitros(第三代)	EIA	核心, 非结构基因(NS)3, NS4, NS5
Abbott HCV EIA 2.0(第二代)	ELISA	核心, 非结构基因(NS)3, NS4

2.3 HCV 核心抗原 20 面体的 HCV 核衣壳由多聚 HCV 核心蛋白组成。HCV 核心抗原在外周血中有游离抗原与总抗原两种状态, 前者存在于抗-HCV 阳转前, 晚于 HCV 阳性 1-2 d。在抗-HCV 出现后, 所测定的 HCV 抗原为总抗原, 与 HCV RNA 的水平相平行, 其含量可以作为 HCV 复制的标志, 以 pg/mL 表示, 从而可以作为病毒复制的替代检测标志, 1 pg HCV 总抗原相当于 8 000 IU 的 HCV RNA。在不同患者间检测结果略有差异。当 HCV RNA 低于 20 000 IU/mL 时, 现行 HCV 总抗原检测试剂不能检测到 HCV 抗原, 限制了其临床应用。此外, HCV 核心抗原检测对于早期病毒血症的检测是敏感的, 但不适宜用于病毒清除的实时监测^[9]。

2.4 HCV 基因分型 HCV 为单股正链 RNA 病毒, 其基因组易于变异。目前已发现 6 个基因型和数十个基因亚型。以 1a、2b、3c 等表示。分子进化分析可以鉴别不同的基因型和基因亚型。基因型、基因亚型和株间的序列异源性分别为 30%、20% 和 10%。

HCV 基因分型的金标准是包膜区(E1)或非结构基因(NS)5B 的序列分析与参考序列的比较以及分子进化分析。临床的基因分型可以通过直接序列分析, 型特异性寡核苷酸探针的反向杂交或限制性酶切长度多态性分析来确定。基于 5' 端非编码区(5' NTR)直接序列分析的基因分型和型特异性寡核苷酸探针的反向杂交均已标准化, 两种方法均能测定 HCV 的 6 个基因型和一系列基因亚型。对基因型的检测误差差不多, 但基因亚型的分型错误约为 10-25%。这些错误并非由技术造成的, 而是与所选择的测定基因区(5' NTR)有关。由于只有基因型与临床的关系密切, 基因亚型的分型检测错

误对临床影响不大。

检测不同基因型的特异性抗体也可以进行基因分型, 但不能区别不同的基因亚型。90% 免疫功能相对正常的慢性感染者可以通过血清学方法鉴别基因型, 与分子生物学方法的符合率达 95%, 对基因 1 型的检测效果优于其他基因型。对于血清学方法与分子生物学方法检测结果不一致的感染者, 以 E1 或 NS5B 区基因的序列分析往往与分子生物学分型结果一致。血清学分型的另一个不足是检测结果有时表现为混合反应, 此时, 不能区别是真正的混合感染抑或为交叉反应, 也可能为一个基因型感染的恢复而另一个基因型感染持续存在的结果。

3 不同感染过程与状态下各标志的变化和作用

3.1 HCV 感染的诊断 急性丙型肝炎、不明原因的急性肝炎都应该检测 HCV RNA 和抗-HCV。HCV RNA 阳性而抗-HCV 阴性强烈提示急性丙型肝炎, 并且抗-HCV 将在进一步随访中出现阳性。如果 HCV RNA 和抗-HCV 均阳性, 或仅仅抗-HCV 阳性, 则不会是急性丙型肝炎。但是, 由于 HCV 可能出现间隙性病毒血症, 对抗-HCV 阳性而 HCV RNA 阴性者应该在几周后再次检测 HCV RNA。应当指出 HCV RNA 和抗-HCV 均阳性时, 很难鉴别是急性丙型肝炎或慢性丙型肝炎, 也可能是慢性丙型肝炎合并其他肝炎。

慢性肝脏疾病患者 HCV RNA 和抗-HCV 阳性, 诊断为慢性丙型肝炎。HCV RNA 阳性而抗-HCV 阴性很少发生于免疫功能相对正常的患者中, 仅仅出现于血液透析和免疫抑制的患者中。献血员筛选和在高危人群检查中抗-HCV 阳性可以通过检测 HCV RNA 而确定。如果间隔 6 mo 以上 2 次检测 HCV RNA 均为阴性, 则很难区别是既往 HCV 感染后的抗-HCV 抑或假阳性。EIA 测定中 S/Co 比值超过 3.8 往往为真阳性或者通过免疫印迹方法加以确认, 而 EIA 测定中 S/Co 比值低于 3.8, 往往难以确定, 因为部分 HCV 感染自发清除后抗 HCV 逐渐降低。

因为抗-HCV 可以通过胎盘, 且在婴儿出生后不论是否有病毒的母婴传播, 抗-HCV 将持续数月甚至超过 1 a, 所以, 母婴传播的确定只能依靠 HCV RNA 的测定。HCV 的母婴传播一旦发生, 在分娩后几天或稍晚即可在新生儿血清中测到 HCV RNA, 此后可能持续存在也可能自发清除。母婴传播后的 HCV 自发清除率和清除时间都不太清楚, 可以肯定的是 HCV 母婴传播的自发清除率高于成年感染的自发清除率。出生后 HCV RNA 检测的时间不是很明确, 一般推荐时间是 6-12 mo。如果出生 1 a 后抗-HCV 仍持续高滴度, 应考虑感染的慢性化并检测 HCV RNA。

职业性非胃肠途径暴露 1-2 wk 后即可检测到 HCV RNA, 在暴露后 1 wk 即可以进行监测。HCV RNA 阳性是急性感染的标志, 但并不一定立即给予治疗, 仅在

ALT升高和出现症状时开始治疗。

3.2 疾病进展的预测 HCV病毒标志没有预测价值, HCV RNA复制水平和HCV基因型均与肝脏损害的严重程度及纤维化无关, 也不能预测感染的自然史和疾病预后。因此, 临床上患者常规处理和监测并不需要反复检测HCV RNA。

3.3 抗病毒治疗 仅HCV RNA阳性的患者才考虑抗病毒治疗。治疗前应该检测HCV的基因型, 目前慢性丙型肝炎抗病毒治疗最有效的方法是聚乙二醇干扰素联合利巴韦林, 基因型的测定有助于决定疗程和利巴韦林的剂量。基因2和3型感染仅需要治疗24 wk, 利巴韦林用量为800 mg/d即可达到70%~80%的持续病毒学应答。而基因1型感染需要48 wk疗程, 利巴韦林用量应达到1 000~1 200 mg/d。尽管如此, 其持续病毒学应答仅达到40%~45%^[10-13]。国外认为, 对于这部分感染者应该权衡抗病毒治疗的益处, 不治疗的危险性以及经济价值, 对于肝组织学检查有显著坏死炎症和纤维化者应予以治疗, 而仅有轻度炎症者则不需要治疗。国内对国人的临床研究发现, 单剂聚乙二醇干扰素 α 2a对基因1型感染的慢性丙型肝炎的治疗结束时应答和持续应答分别为76.8%和35.4%, 非基因1型感染的慢性丙型肝炎的治疗结束时应答和持续应答分别为81.0%和66.7%^[14]。

基线HCV RNA测定对基因2、3型感染者意义不大, 治疗结束时HCV RNA阴性提示获得病毒学应答, 应在24 wk再次检测以评价其持续应答; 而治疗结束时HCV RNA仍然阳性则可能出现复发。基因1型感染者接受聚乙二醇干扰素联合利巴韦林治疗时, 在治疗前和12 wk时测定HCV RNA可以评价早期病毒学应答, 12 wk时HCV RNA下降2个对数单位或阴性者应继续治疗至48 wk, 如果未获得早期病毒学应答, 即使治疗48 wk, 获得持续病毒学应答的几率也很低, 此时可以停药或者仅仅为了达到延缓疾病的进展而治疗, 但不能清除病毒。在48 wk疗程后再次测定HCV RNA阳性强烈提示复发。对48 wk疗程结束后HCV RNA阴性者应在24 wk后再次测定, 可以评价持续病毒学应答。

已有证据表明, 对急性丙型肝炎患者予以单剂常规干扰素治疗是有效的, 但是, 病毒学检测对于决定是否干扰素治疗、治疗的剂型、剂量和疗程都没有特殊价值。治疗结束后应测定HCV RNA, 阴性者在24 wk还需再测定一次。

在抗病毒治疗开始后1 wk和4 wk, HCV核心抗原与HCV RNA即降低^[15]; 在治疗过程中对这两个指标的监测均能反映抗病毒治疗的效果, 但HCV总抗原的检测不能确切反映病毒清除的时间^[9]。

4 未治疗患者的随访

由于HCV病毒学检测对于预后没有预测价值, 所以, 未治疗的患者不一定需要反复的病毒学检测, 但对ALT和肝组织学进行随访是有意义的。

5 参考文献

- 1 Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl 1):S65-S73
- 2 Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl 1):S47-S56
- 3 中华医学会肝病学会、传染病与寄生虫病学会。丙型肝炎防治指南。中华肝脏病杂志 2004;12:194-198
- 4 Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. Who collaborative study group. *Vox Sang* 1999;76:149-158
- 5 Lefrere JJ, Guiramand S, Lefrere F, Mariotti M, Aumont P, Lerable J, Petit JC, Girot R, Morand-Joubert L. Full or partial seroconversion in patients infected by hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1997;175:316-322
- 6 Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L. Centers for disease control and prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *Mmwr* 2003; 52:1-13
- 7 张贺秋, 王国华, 陈坤, 夏芳, 宋晓国, 孙科儿, 凌世淦, 马贤凯. 丙型肝炎病毒不同区抗原酶免疫试剂研究. 中华检验医学杂志 1999;22:330-333
- 8 Chou R, Clark EC, Helfand M. US preventive services task force. Screening for hepatitis C virus infection: a review of the evidence for the U.S. preventive services task force. *Ann Intern Med* 2004;140:465-479
- 9 Lorenzo J, Castro A, Aguilera A, Prieto E, Lopez-Calvo S, Regueiro B, Pedreira J. Total HCV core antigen assay; A new marker of HCV viremia and its application during treatment of chronic hepatitis C. *J Virol Methods* 2004;120:173-177
- 10 魏来. 聚乙二醇干扰素及在丙型肝炎治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2001;9:1296-1299
- 11 Manns MP, Mchutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 2001;358:958-965
- 12 Hadziyannis SJ, Cheinquer H, Morgan T, Diago M, Jensen DM, Sette H, Ramadori G, Bodenheimer HC, Marcellin P, Lee SD, Roberts PJ, Ackrill AM. Peginterferon alfa-2a(40 KD) (pegasys) in combination with ribavirin (RBV): efficacy and safety results from a phase III, randomized, double-blind, multicentre study examining effect of duration of treatment and RBV dose. *J Hepatol* 2002;36:S3
- 13 Fried MW, Shiffman ML, Reddy K, Smith C, Marinos G, Goncalves FL Jr, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-982
- 14 谢尧, 徐道振, 陆志檬, 骆抗先, 贾继东, 王宇明, 赵桂珍, 张树林, 张大志. HCV基因型对慢性丙型肝炎干扰素疗效的影响. 中华肝脏病杂志 2004;12:72-75
- 15 Muto H, Tanaka E, Matsumoto A, Yoshizawa K, Kiyosawa K. Nagano interferon treatment research group. Types of human leukocyte antigen and decrease in HCV core antigen in serum for predicting efficacy of interferon-Alpha in patients with chronic hepatitis C: analysis by a prospective study. *J Gastroenterol* 2004;39:674-680

病理学检查在慢性丙型肝炎诊断治疗中的重要地位

郎振为

郎振为, 北京佑安医院病理科 北京市 100054
项目负责人: 郎振为, 100054, 北京市丰台区右安门外西头条8号, 北京佑安医院病理科. langzw@21n.com
电话: 010-63055864 传真: 010-63293371
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

郎振为. 病理学检查在慢性丙型肝炎诊断治疗中的重要地位. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2377-2379

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2377.asp>

病理组织学检查对于慢性丙型肝炎的诊断、衡量炎症活动度、纤维化程度、评估药物疗效以及预后判断方面非常重要。通常情况下, 临床发现与肝功能检查结果密切相关, 然而二者与肝活检时的炎症坏死以及纤维化程度的相关性很差。有些患者血清转氨酶高达 500-600 IU/L, 肝活检病理仅查见轻度炎症改变; 而另一些患者血清转氨酶正常或稍高, 肝组织已有明显的肝纤维化甚至肝硬化。肝组织学异常而临床表现很轻或无症状的病例并不少见, 大约 50% 左右的 HCV 感染者(抗-HCV 和 PCR HCV RNA 阳性), 尽管肝功能检测值在正常范围内, 肝组织检查可观察到不同程度的炎症损伤及纤维化改变。Puoti *et al* 报道 691 例 ALT 持续正常的患者中, 17% 的患者肝组织正常, 34% 为轻微的慢性肝炎, 44% 为轻度肝炎, 4% 为中、重度肝炎, 1% 为肝硬化。另有一些学者的研究资料表明: 11-57% 的慢性活动性肝炎和肝硬化患者其 ALT 正常。Sookoian *et al* 对肝组织病变与转氨酶的相关关系进行了探讨, 28 例抗-HCV 阳性、转氨酶持续正常的患者中, 12 例肝组织正常(42.9%), 16 例(57.1%)为慢性肝炎。肝组织正常的患者中, ALT 的均值为 16.3 IU/L, 与慢性肝炎(25.6 IU/L)相比, 有显著性差别($P=0.000\ 089$)。认为肝组织正常者的 ALT 较慢性肝炎者低, 若以 18 IU/L 为新的上限, 有可能区别正常和慢性肝炎^[1-2]。研究资料同样表明, 反映肝组织损伤程度的组织学活动指数(HAI)与 HCV RNA 负荷量无相关性, 对于评估慢性丙型肝炎病变的严重程度, 肝活检是必须的。

HCV 感染后慢性化可达 50-80%, 并可进展到肝硬化。与慢性乙型肝炎的肝硬化的发生率(10-20%)相比, 慢性丙型肝炎患者发生肝硬化为 8-46%。对于慢性丙型肝炎至关重要的问题是须区分出患者是慢性肝炎还是已经进展到肝硬化。特别是在慢性丙型肝炎时, 往往肝小叶炎症坏死相对较轻, 而纤维化程度较重; Jarmay *et al* 采用 Desmet 的评估系统对 106 例慢性丙型肝炎肝活检组织进行了病理检查, 慢性肝炎轻微病变占 13.2%,

慢性肝炎轻度占 65.1%, 慢性肝炎中度为 21.7%; 纤维化 1-4 期分别占 41.5%、13.2%、34.9% 及 10.4%(肝硬化)。在预测肝纤维化方面, 肝脏的酶学检测没有价值。血清细胞外基质检测虽然有可能检测出一些肝硬化的病例, 但与慢性肝炎的组织学纤维化分期不相一致^[3]。Urbanek *et al* 对 139 例丙型肝炎的研究资料认为, 根据病史、体征和实验室检查的肝硬化区别计分, 只有 31% 的患者能准确的诊断出是肝硬化或慢性肝炎, 即使综合分析, 仍有 69% 的患者难以区分^[4]。

对于非肝硬化性患者个体来讲, 一次肝活检组织学难以预测肝病的进展速度, 然而, 如果有纤维组织的进行性沉积, 每隔 2-3 a 做一次肝活检对于纤维化的进展和预后是有裨益的。

此外, 只有肝活检才能提供铁颗粒、脂肪变的分布以及同时存在并能加速慢性丙型肝炎进展至肝硬化的酒精性肝病的信息。研究资料显示, 脂肪变的肝组织中 TNF- α mRNA 表达量较无脂肪变的肝组织相比增加了 50% ($P=0.03$), CYP 2E1 增加了 37% ($P=0.04$)。肝组织中脂肪变的出现加速了肝脏病理损伤及纤维化的进程^[5]。HCV 感染与肝细胞癌发生较 HBV 更为密切, 慢性 HCV 感染合并酒精性肝硬化则更具有发展成肝细胞癌的危险性, 一项研究认为, 3 a、5 a 和 10 a 肝癌的累积发生率分别为 7.3%、23.1% 和 56.6%。

同其他慢性肝炎相比, 尽管慢性丙型肝炎肝组织学没有特异性改变, 慢性丙型肝炎肝组织中可观察到一些相对的特征性病理改变, 这些较为特征性的组织学表现对于慢性丙型肝炎的诊断有一定的参考价值, 特别是原因不明性肝炎时的病原学探讨。

汇管区淋巴细胞聚集: 指汇管区有较密集的淋巴细胞浸润, 甚至淋巴滤泡形成。国内周侃 *et al* 报道出现率为 43% (21/49)^[6]。Lefkovich *et al* 比较了慢性丙型肝炎与慢性乙型肝炎的淋巴细胞集聚或 / 和淋巴滤泡形成, 其比值为 49.4%:27.2%, 有显著性差别。Scheuer *et al* 按半定量方法, 将汇管区的淋巴细胞集聚程度分为 4 级: 0 级, 无明显浸润; 1 级, 少量浸润; 2 级, 明显集聚但尚无生发中心形成; 3 级, 明显集聚伴生发中心形成。结果显示: 45 例慢性丙型肝炎患者的 54 份肝活检组织中, 42 份(78%)有汇管区淋巴细胞浸润, 其中多数为 2-3 级; 而对照观察的 27 例慢性乙型肝炎肝组织, 14 例(52%)中绝大多数为 1 级, 无 1 例为 3 级。

小胆管损伤: 组织学主要表现为小胆管上皮细胞肿胀, 空泡化, 嗜酸性变, 核不规则或失去极化, 凋亡、淋巴细胞浸润, 称之为肝炎性胆管损害, 小胆管的毁损消失极少见。慢性丙型肝炎肝组织中小胆管的损伤检出率为 12.3-53.7%, 个别文献报道高达 91%。若按损伤程度定为 0(无病变)、I(轻度)、II(中度)、III(重度)级, 慢性丙型肝炎病例中 \geq II 级占 65.1% (28/43), 而对照的慢性乙型肝炎占 18.9% (17/90), $P<0.01$ ^[7]。鉴于小胆管的损伤多见及病变明显, 可以被视为组织学诊

断的一项重要参考指标。

肝细胞脂肪变:近年来的一些研究表明,在慢性丙型肝炎患者出现的肝脏脂肪变是肝脏病理学中的一个重要的特征。国外的文献报道检出率可为54–68.9%,国内302医院报道检出率可达82.4%(131/159),其中轻度占29.5%,中度60.7%,重度9.8%;小泡型为47.3%,大泡型为3.8%,混合型占48.9%^[8]。脂变的肝细胞多呈片灶状,分布于肝小叶内。

肝窦细胞活化:表现为肝窦内T淋巴细胞, Kupffer细胞数量明显增多,集聚或呈串珠样排列于肝窦内,可见于34–78.4%的病例。

尽管文献认为慢性丙型肝炎多具有以上4项相对的特征,但这些“特征”也可见于慢性乙型肝炎。其次,上述4项病变的检出率各文献有时相差较大,可能与个体因素、HCV病毒亚型、病毒复制、机体免疫状态不同以及其他因素有关。如文献中胆管病变的发生率自12.3–91%不等,其中经输血途径传播的丙型肝炎胆管损伤较经静脉吸毒引起的胆管损伤要高;如明显或重度的肝细胞脂肪变性多见于基因3型患者。此外,当慢性丙型肝炎的病变较轻,如小叶内肝细胞坏死炎症不明显而汇管区的淋巴细胞反应轻微时,有时难以找到其相对特征性病变。因此慢性丙型肝炎的诊断要结合临床资料,也需要分子病理学的检测结果进行综合分析判断。

与慢性乙型肝炎相比,肝组织中丙型肝炎相关抗原的检出率低,各种抗原的表达相关性差,可能与肝组织中HCV抗原表达的量少、HCV的抗原性不强、各基因片段的抗原敏感性和特异性不同以及HCV的高度变异性有关,致使国内外各大公司或研究机构难以制备稳定可靠的特异性抗体,以至于检测结果重复性差,检出率差距较大,与血清学丙型肝炎病毒标记物不太吻合。国内翟为溶 *et al* 对51例血清抗-HCV阳性的慢性丙型肝炎患者进行了研究,其中血清HCV RNA阳性41例(80.4%);免疫组化检测肝组织中CP10、NS3、NS4和NS5的总检出率为60.8%,低于血清HCV RNA的检出率。而同期血清HCV RNA与肝组织中HCVAg的检出结果相比,二者关系并不密切,其相互重合者仅占50.98%;血HCV RNA阳性者,18例组织标本未检出抗原;而血HCV RNA阴性者,却有8份组织标本检出1–3种抗原。肝组织中CP10、NS3、NS4和NS5的检出率分别为54.9%、37.3%、21.6%和50%,4种抗原均阳性者仅18.8%^[9]。Naoki *et al* 也报道了慢性丙型肝炎患者肝组织中HCV核心抗原、表面抗原和NS3抗原免疫组化的检出率分别为23%、24%、24%,三者同时阳性率低。因此,在对肝组织进行免疫组化检测时,最好同时选用几种抗原,以提高肝组织内HCVAg的检出率。新近, Benkoel *et al* 采用了抗HCV C-100单克隆抗体以免疫组化方法对15例慢性丙型肝炎患者进行了检测,并与血清学,肝组织抽提的HCV核酸以及肝切片原位PCR结果进行了比较。血

清HCV的检出率为80%,组织抽提物HCV RNA的检出率为40%,免疫组化检出率为80%,肝组织原位PCR的检出率为60%。在血清HCV阳性的病例中,免疫组化、原位杂交、肝组织抽提物中的检出率分别为83%、67%及41%;肝组织抽提物呈阳性的病例中,免疫组化及原位PCR的检出率分别为25%及50%;免疫组化呈阳性的切片中,75%的病例原位PCR检出阳性^[10]。

尽管当前采用免疫组化检测肝组织中HCV抗原阳性检出率不高,但一些学者认为HCV免疫组化的研究有助于预测抗病毒治疗的疗效。一些学者认为治疗前肝组织中HCV抗原量较少者,经干扰素治疗疗效较好,远期显效者的二次肝活检HCV抗原可消失。另一篇报道了7例血清学HCV RNA阳性、肝组织免疫组化检测HCV NS3均阳性患者,经干扰素治疗后,3例血清和肝组织中病毒标记物阴转,另有1例血清HCV RNA转阴,但肝组织中NS3蛋白仍阳性,有可能更准确的反映出治疗后病毒的清除状况。

由于HCV的基因高度变异,不同探针的敏感性和特异性不同,检测的结果多不一致。张长法 *et al* 采用地高辛标记的HCV5'–NC区cDNA探针对24例慢性丙型肝炎肝组织中的HCV DNA进行了检测,17例同时HCV和HCV DNA均阳性患者中,14例原位杂交呈阳性;7例单项血清抗HCV阳性者均为阴性,总检出率为58.3%^[11]。采用地高辛标记HCV3'–NS5区cDNA探针(随机引物标记法),肝组织原位杂交阳性率为72.7%(24/33)。用PCR法扩增HCV C区基因标记地高辛,用制备的探针原位杂交检出阳性率可达到90%(21/24)^[12]。

病毒性肝炎的病理诊断包括三个基本内容:病理类型、病原学、根据炎症的程度分级、根据纤维化的程度分期。对于慢性丙型肝炎的分期、分级,可参照国内制订的病理标准^[13]。

若用于科研或评估治疗前后药物的疗效,也可根据不同需求选用国外的一些评估系统,其中最为广泛采用的是Knodell评分方法,该方法比较适用于判定小叶炎症坏死的组织学活动指数值,但对于纤维化的细微改变,则可采用Ishak或Chevallier的肝纤维化半定量记分系统^[14–15]。

参考文献

- 1 Puoti C, Castellacci R, Montagnese F, Zaltron S, Stornaiuolo G, Bergami N, Bellis L, Precone DF, Corvisieri P, Puoti M, Minola E, Gaeta GB. Histological and virological features and follow-up of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels: the Italian prospective study of the asymptomatic C carriers (ISACC). *J Hepatol* 2002;37:117–123
- 2 Sookoian S, Castano G, Frider B, Flichman D. How to distinguish normal liver from chronic hepatitis in anti-HCV positive individuals with normal alanine aminotransferase levels. *Medicina (B Aires)* 2002;62:226–230
- 3 National Institutes of Health. National institutes of health consensus development conference statement: Management of hepatitis C. *Hepatol* 2002;36(5 Suppl):S3–20
- 4 Urbanek P, Vedralova J, Marecek Z, Brodanova M, Prochazkova-Francisci E, Bruha R, Petrtyl J, Kalab M. Importance of liver biopsy in chronic hepatitis C virus infection.

- Vnitr Lek 2002;48:1025-1230
- 5 Gochee PA, Jonsson JR, Clouston AD, Pandeya N, Purdie DM, Powell EE. Steatosis in chronic hepatitis C: association with increased messenger RNA expression of collagen I, tumor necrosis factor- α and cytochrome P450 2E1. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:386-392
- 6 周侃, 姚光弼, 翟为溶. 慢性丙型肝炎的组织学特点和分类. *中华消化杂志* 1998;18:162
- 7 刘霞, 王泰龄, 郑丽红, 赵静波, 彭向欣, 张晶. 丙型肝炎的病理观察. *中华病理学杂志* 1995;24:292
- 8 成军. 丙型肝炎与肝脏脂肪变的相关性研究的临床意义. *临床肝胆病杂志* 2004;20:227-229
- 9 翟为溶, 周侃, 姚光弼. 肝组织内丙型肝炎病毒不同抗原的定位及比较. *中华传染病杂志* 1999;17:11-14
- 10 Benkoel L, Biagini P, Doderio F, De Lamberie X, De Micco P, Chamlian A. Immunohistochemical detection of C-100 hepatitis C virus antigen in formaldehyde-fixed paraffin-embedded liver tissue. Correlation with serum, tissue and in situ RT-PCR results. *Eur J Histochem* 2004;48:185-190
- 11 张长法, 周永兴, 王春杰, 姚志强. 地高辛标记探针原位杂交检测肝组织中丙型肝炎病毒 RNA. *肝脏病杂志* 1995;3:10-12
- 12 Tanaka Y, Enomoto N, Kojima S, Tang L, Goto M, Marumo F, Sato C. Detection of hepatitis C virus RNA in the liver by in situ hybridization. *Liver* 1993;13:203-208
- 13 Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-435
- 14 Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699
- 15 Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud JA. A histological semi-quantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994;20:349-355

慢性丙型肝炎的规范性抗病毒治疗及研究进展

宁 琴, 韩梅芳

宁琴, 韩梅芳, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科、感染免疫研究室 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 宁琴, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科. qning@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83662391
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

宁琴, 韩梅芳. 慢性丙型肝炎的规范性抗病毒治疗及研究进展. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2379-2382

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2379.asp>

0 引言

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)引起的一种以肝脏为靶器官的传染性疾病.我国肝炎患者为数众多,据1992-1995年全国病毒性肝炎血清流行病学调查表明,我国抗HCV阳性者占3.2%,约4 200万人,其中约70-80%的感染者将发展为慢性,即HCV感染后持续6 mo以上可以检测到HCV RNA.慢性患者由于进行性的

肝纤维化将导致在20 a内约有12.5%的人发展为肝硬化,部分发展为肝癌,严重影响了人们的生活质量.由于目前尚缺乏合适、有效的疫苗,远期危害更大.抗病毒治疗是慢性丙型肝炎(CHC)治疗的关键,其目的是根除或长期抑制病毒的复制,减轻肝内炎症和纤维化程度,从而抑制可能出现的肝硬化和肝癌的发生和发展.

1 抗病毒治疗及相关问题

1.1 IFN和利巴韦林抗病毒治疗 目前IFN是抗丙肝治疗的主要药物,根据细胞表面受体不同分为两型,1型IFN与表面受体IFNAR1/IFNAR2(一种异二聚体)结合,包括21种亚型如IFN α 、IFN β 等,而IFN γ 与一个独特的表面受体结合,属于2型.按制备来源IFN可分为天然和重组IFN两种,商品化IFN以重组IFN为主. IFN的抗病毒机制还不完全清楚,推测他可与靶细胞表面的特异性受体结合,诱导机体迅速合成具有抗病毒作用的功能蛋白质,如2',5'-寡腺苷酸合成酶(2',5'-AS)、dsRNA依赖蛋白激酶(RDPK),2',5'-AS可催化RNA降解,RDPK磷酸化起始因子eIF-2 α 可抑制HCV mRNA翻译的起始,阻断病毒进入靶细胞,抑制病毒复制;IFN促进HLA-I、II类分子及Fc受体、 β 2微球蛋白的表达,有助于杀伤性T细胞(Te)识别并杀伤靶细胞;IFN可激活免疫系统,提高Th/Ts比例,调整机体的免疫功能;靶细胞释放的细胞因子加强了NK细胞的活性而达到抗病毒作用.

治疗应答是指抗病毒药物被机体吸收后产生的一系列病理生理反应,包括临床症状和体征的改善,生化、病毒学及病理学的改变.常用的指标为持续病毒应答(SVR),是指IFN治疗完成后持续6 mo或6 mo以上HCV RNA仍为阴性.SVR代表抗病毒治疗成功.有报道,长期的肝脏组织病理学的改善与成功的抗病毒治疗有着密切的联系.SVR可减轻纤维化,有效降低肝细胞癌(HCC)的发生率,降低肝衰竭和与肝病有关的死亡等其他并发症的发生.2000年亚太肝病学会上,将SVR作为慢性肝炎抗病毒治疗的目标.生化和组织学应答仅作为次要目标.

IFN治疗CHC的适应范围:18-60岁,HCV RNA阳性、ALT轻中度(正常值的2-10倍)升高、肝组织轻中度炎症改变、无禁忌证、代偿良好的CHC患者,而伴有肝硬化、老年人、HCV抗体阴性而HCV RNA阳性患者对IFN疗效不佳.禁忌证包括:进展型肝硬化、自身免疫性肝炎(AIH)、自身免疫性甲状腺炎,甲状腺功能亢进、糖尿病、精神分裂症、严重的血小板减少($<30 \times 10^9/L$)、白细胞减少($<2 \times 10^9/L$)、妊娠、严重冠心病、恶性肿瘤、脑发作性疾病等.

自1990年代采用IFN治疗丙肝以来,用标准的IFN治疗(即IFN α ,300-500 mu/次,3次/wk,皮下或肌肉注射,疗程12 wk)可使1/3的丙肝患者HCV RNA转阴,单独使用IFN 12 wk,获得SVR的患者占10-15%,

- Vnitr Lek 2002;48:1025-1230
- 5 Gochee PA, Jonsson JR, Clouston AD, Pandeya N, Purdie DM, Powell EE. Steatosis in chronic hepatitis C: association with increased messenger RNA expression of collagen I, tumor necrosis factor- α and cytochrome P450 2E1. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:386-392
- 6 周侃, 姚光弼, 翟为溶. 慢性丙型肝炎的组织学特点和分类. *中华消化杂志* 1998;18:162
- 7 刘霞, 王泰龄, 郑丽红, 赵静波, 彭向欣, 张晶. 丙型肝炎的病理观察. *中华病理学杂志* 1995;24:292
- 8 成军. 丙型肝炎与肝脏脂肪变的相关性研究的临床意义. *临床肝胆病杂志* 2004;20:227-229
- 9 翟为溶, 周侃, 姚光弼. 肝组织内丙型肝炎病毒不同抗原的定位及比较. *中华传染病杂志* 1999;17:11-14
- 10 Benkoel L, Biagini P, Doderio F, De Lamberie X, De Micco P, Chamlian A. Immunohistochemical detection of C-100 hepatitis C virus antigen in formaldehyde-fixed paraffin-embedded liver tissue. Correlation with serum, tissue and in situ RT-PCR results. *Eur J Histochem* 2004;48:185-190
- 11 张长法, 周永兴, 王春杰, 姚志强. 地高辛标记探针原位杂交检测肝组织中丙型肝炎病毒 RNA. *肝脏病杂志* 1995;3:10-12
- 12 Tanaka Y, Enomoto N, Kojima S, Tang L, Goto M, Marumo F, Sato C. Detection of hepatitis C virus RNA in the liver by in situ hybridization. *Liver* 1993;13:203-208
- 13 Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-435
- 14 Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-699
- 15 Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud JA. A histological semi-quantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994;20:349-355

慢性丙型肝炎的规范性抗病毒治疗及研究进展

宁 琴, 韩梅芳

宁琴, 韩梅芳, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科、感染免疫研究室 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 宁琴, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科. qning@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83662391
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

宁琴, 韩梅芳. 慢性丙型肝炎的规范性抗病毒治疗及研究进展. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2379-2382

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2379.asp>

0 引言

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)引起的一种以肝脏为靶器官的传染性疾病.我国肝炎患者为数众多,据1992-1995年全国病毒性肝炎血清流行病学调查表明,我国抗HCV阳性者占3.2%,约4 200万人,其中约70-80%的感染者将发展为慢性,即HCV感染后持续6 mo以上可以检测到HCV RNA.慢性患者由于进行性的

肝纤维化将导致在20 a内约有12.5%的人发展为肝硬化,部分发展为肝癌,严重影响了人们的生活质量.由于目前尚缺乏合适、有效的疫苗,远期危害更大.抗病毒治疗是慢性丙型肝炎(CHC)治疗的关键,其目的是根除或长期抑制病毒的复制,减轻肝内炎症和纤维化程度,从而抑制可能出现的肝硬化和肝癌的发生和发展.

1 抗病毒治疗及相关问题

1.1 IFN和利巴韦林抗病毒治疗 目前IFN是抗丙肝治疗的主要药物,根据细胞表面受体不同分为两型,1型IFN与表面受体IFNAR1/IFNAR2(一种异二聚体)结合,包括21种亚型如IFN α 、IFN β 等,而IFN γ 与一个独特的表面受体结合,属于2型.按制备来源IFN可分为天然和重组IFN两种,商品化IFN以重组IFN为主. IFN的抗病毒机制还不完全清楚,推测他可与靶细胞表面的特异性受体结合,诱导机体迅速合成具有抗病毒作用的功能蛋白质,如2',5'-寡腺苷酸合成酶(2',5'-AS)、dsRNA依赖蛋白激酶(RDPK),2',5'-AS可催化RNA降解,RDPK磷酸化起始因子eIF-2 α 可抑制HCV mRNA翻译的起始,阻断病毒进入靶细胞,抑制病毒复制;IFN促进HLA-I、II类分子及Fc受体、 β 2微球蛋白的表达,有助于杀伤性T细胞(Te)识别并杀伤靶细胞;IFN可激活免疫系统,提高Th/Ts比例,调整机体的免疫功能;靶细胞释放的细胞因子加强了NK细胞的活性而达到抗病毒作用.

治疗应答是指抗病毒药物被机体吸收后产生的一系列病理生理反应,包括临床症状和体征的改善,生化、病毒学及病理学的改变.常用的指标为持续病毒应答(SVR),是指IFN治疗完成后持续6 mo或6 mo以上HCV RNA仍为阴性. SVR代表抗病毒治疗成功.有报道,长期的肝脏组织病理学的改善与成功的抗病毒治疗有着密切的联系. SVR可减轻纤维化,有效降低肝细胞癌(HCC)的发生率,降低肝衰竭和与肝病有关的死亡等其他并发症的发生. 2000年亚太肝病学会上,将SVR作为慢性肝炎抗病毒治疗的目标.生化和组织学应答仅作为次要目标.

IFN治疗CHC的适应范围:18-60岁,HCV RNA阳性、ALT轻中度(正常值的2-10倍)升高、肝组织轻中度炎症改变、无禁忌证、代偿良好的CHC患者,而伴有肝硬化、老年人、HCV抗体阴性而HCV RNA阳性患者对IFN疗效不佳.禁忌证包括:进展型肝硬化、自身免疫性肝炎(AIH)、自身免疫性甲状腺炎,甲状腺功能亢进、糖尿病、精神分裂症、严重的血小板减少($<30 \times 10^9/L$)、白细胞减少($<2 \times 10^9/L$)、妊娠、严重冠心病、恶性肿瘤、脑发作性疾病等.

自1990年代采用IFN治疗丙肝以来,用标准的IFN治疗(即IFN α ,300-500 mu/次,3次/wk,皮下或肌肉注射,疗程12 wk)可使1/3的丙肝患者HCV RNA转阴,单独使用IFN 12 wk,获得SVR的患者占10-15%,

将IFN延长使用时间至24 wk,则提高至15–22%^[1].将IFN和利巴韦林联合治疗可以大大提高SVR率,有报道证实加用利巴韦林后SVR可达到31–47%.Buti *et al*^[2]研究发现,对于单用IFN治疗无效的患者加用利巴韦林后HCV RNA明显降低,有50%的患者有病毒学应答,37.5%获得SVR.目前推荐采用的干扰素是聚乙二醇化干扰素(PEG-IFN),即IFN与聚乙二醇结合物,可使其免受酶的攻击,延长药物在体内作用时间.PEG-IFN分为两种:PEG-IFN α 2a(商品名PEGASYS),PEG-IFN α 2b(商品名PEG-INTRON).药代动力学显示IFN治疗后1 wk内体内浓度呈现波峰波谷状,而PEGASYS则呈现平缓的浓度曲线,在1 wk内保持了有效的药物浓度.几项大型开放性随机对照实验结果表明PEG-IFN可延长SVR至25–39%,与利巴韦林联用则将SVR提高至54–56%,其疗效比原来的IFN标准治疗及IFN和利巴韦林联合治疗都有明显的提高^[3–4].PEGASYS的推荐剂量为180 μ g/wk,而PEG-INTRON的推荐剂量为1.0–1.5 μ g/kg,疗程24–48 wk.

利巴韦林(Ribavirin)是一种核苷类广谱抗病毒药物,单独采用不能有效地持续清除病毒,但他与IFN联用后可显著提高持续病毒清除率.到目前为止尚不清楚利巴韦林增加IFN效应的机制,推测有几种可能:在宿主Th1/Th2平衡方面发挥免疫调节作用,Ning *et al*^[5]研究发现,利巴韦林可抑制巨噬细胞及Th2细胞因子的产生,而不影响Th1细胞因子的产生;抑制单磷酸次黄嘌呤核苷酸脱氢酶(IMPDH)活性;对RNA依耐的RNA聚合酶(RdRp)有轻微抑制作用.1 149例患者的临床实验证实:PEGASYS和利巴韦林联用、IFN和利巴韦林联用、PEGASYS和安慰剂联用,其SVR分别为56%、44%、29%^[6].可见PEG-IFN和利巴韦林联用的确是目前可行的最有效的抗病毒治疗方法.利巴韦林推荐剂量为800–1 200 mg/d.

1.2 影响抗病毒治疗效果的病毒和宿主因素 影响抗病毒药物疗效的因素除了药物方面还有病毒和宿主方面.HCV容易变异,基因型较多.Simmonds将其分为6个基因型,11个亚型,其中1型和2型主要见于北美、欧洲和亚洲,4、5、6型主要分别见于中东、南非及中国香港.我国以1b型多见.病毒基因型是影响抗病毒效果的重要因素.研究发现,1型患者对抗病毒治疗比2型和3型更具抵抗性.对1型患者采用PEGASYS和利巴韦林联用、IFN和利巴韦林联用、PEGASYS和安慰剂联用,其SVR分别为46%、36%和21%,而2型或3型患者采用相应的方法,其SVR分别为76%、61%和45%^[6–7].采用PEG-IFN α 2b和利巴韦林联用,1型患者SVR为41%,而2型或3型患者为80%^[8].Hadziyannis *et al*^[9]发现,用PEG-IFN α 2a和利巴韦林联用24 wk或48 wk,1型患者采用标准剂量(1 000–1 200 mg/d)和48 wk疗程的治疗组获得SVR的比例为52%,而2型或3型患者治疗24 wk和48 wk以及利巴韦林减少剂量(800 mg/d)的

组获得SVR的比例均为80%,说明2型或3型患者用更短疗程及更少量的利巴韦林就可获得良好的疗效.

早期病毒反应(EVR)是指治疗12 wk时患者HCV RNA转阴或低于初值2 Log值以上,常用来监测病情,并预测疗效.Fried *et al*^[6]报道453例患者联合治疗后12 wk,EVR阳性率为86%,阴性率为14%,EVR阳性患者治疗结束后获得SVR的占65%,EVR阴性患者获得SVR的仅占3%,而无反应者达97%.说明不能达到EVR的患者很多(约97%)都不能达到SVR.对于1型患者,EVR阴性则可考虑早期终止抗病毒治疗,因为他们获SVR的几率很小(约3%).而对于2型或3型患者则EVR几乎为100%.Davis *et al*^[10]报道PEG-IFN α 2a及PEG-IFN α 2b分别与利巴韦林联合治疗后12 wk,获得EVR的分别占69%和76%,在这部分患者中,获得SVR的分别占67%和80%.而没有获EVR的患者,继续治疗也没有获得SVR.因此,EVR可以作为一种早期预测疗效的指标.

影响抗病毒效果的宿主因素包括:患者的免疫学特性,患者对治疗的依从性以及患者对副作用的耐受性.患者依从性高,则可使机体长期保持有效药物浓度.用PEG-IFN α 2a和利巴韦林联合治疗的一项453例患者的随机对照实验表明,1型和2、3型患者的依从性没有明显区别,其中达到EVR的患者有390例,占86%,这部分患者又分为完全疗程组(服用了总药量的80%并至少达到38 wk)、部分疗程组(未达到完全疗程).后者又分为减量组和撤药组.研究发现,完全治疗组245例患者中,获SVR的占75%,减量组和撤药组分别为67%和12%^[11].说明依从性高的完全治疗组疗效高于减量组和撤药组.而减量组的SVR又明显高于撤药组.如果由于副作用等不能耐受治疗,最好是减量而不是撤药,这样获SVR的可能性会高一些.

1.3 抗病毒治疗的相关问题

1.3.1 肝硬化患者的抗病毒治疗 通常认为肝硬化患者不能耐受IFN和利巴韦林联合治疗的副作用.实际上,据美国器官获取和移植网站的消息,在美国等待肝移植的肝硬化患者中,93%的丙肝患者末期肝病模型(MELD)评分 \leq 18(相应的Child-Turcotte-Pugh(CTP)评分 \leq 7),其中62%的患者 \leq 10,31%的患者在11–18之间,根据Wiesner的研究,强烈推荐MELD评分 \leq 18的患者进行IFN为基础的抗病毒治疗.在这些等待肝移植的丙肝患者,绝大多数可以耐受抗病毒治疗,且可以从中受益.Forns *et al*的研究中有30例丙肝肝硬化患者,分别在5 mo内进行了肝移植,移植前均进行了IFN和利巴韦林的联合抗病毒治疗.由于副作用,有63%的患者进行了减量.治疗结束有9例患者达到治疗终末病毒应答(ETVR,即治疗结束HCV RNA阴性),6例患者移植后HCV RNA仍为阴性,提示移植前的抗病毒治疗有可能减少移植后丙肝再发的可能.而据报道,如不进行有效的抗病毒治疗,这类患者丙肝再发的可能性几乎为100%.尽管肝硬化代偿期患者比没有肝硬化的患

者其病毒应答率(指在治疗24 wk内HCV RNA 转为阴性)要低,但是确实有很多肝硬化的患者获得了ETVR及SVR.据Hadziyannis *et al*^[12]的研究报道,肝硬化患者用PEG-IFN α 2a和利巴韦林联合治疗48 wk,有50%获得SVR,其中,1型患者获得SVR的有41%,2型和3型为73%.必须指出的是:该实验的患者全部处于肝硬化代偿期,且没有其他并发症.一项大型研究报道了无肝硬化患者在IFN和利巴韦林联合治疗20 wk、治疗结束后48 wk及72 wk时HCV RNA 阴性的比例分别为40%、37%和23%,而肝硬化组相应的比例仅为26%、23%和11%^[13].虽然这类患者获得病毒持续清除的比例较低,且在治疗过程中由于基础疾病引起的血细胞减少再加上IFN和利巴韦林导致的骨髓抑制和溶血,加重了治疗难度,但抗病毒治疗仍可控制纤维化进展,减少并发症的发生.

1.3.2 副作用问题 采用IFN和利巴韦林联合治疗的主要副作用为溶血和骨髓抑制引起的贫血、白细胞减少、血小板降低以及流感样症状、皮疹、抑郁,极少患者出现甲状腺功能异常和视网膜病变自身免疫性疾病等.对于较常出现的血细胞减少,目前推荐在抗病毒治疗中,给予促红细胞生成素(EPO),粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等,给予上述治疗后仍不能改善病情,则考虑减量,甚至停药.

1.3.3 初次抗病毒治疗无应答患者的再次治疗 再次治疗的目的是获得SVR.但前提是患者曾经获得过EVR或者VR.没有病毒应答的、对IFN不敏感的患者,不考虑采用同样的方案进行再次治疗,而需要更有效的治疗,同样的治疗只会产生同样无效的结果.单独用IFN或者IFN与利巴韦林联合治疗不能获得SVR的患者,可采用PEG-IFN和利巴韦林联合治疗.据报道,对单独用IFN或者IFN与利巴韦林联合治疗均没有达到SVR的有进行性肝纤维化和肝硬化的患者,改用PEG-IFN α 2a(180 μ g/wk)和利巴韦林1 000–1 200 mg/d联合治疗,有35%的患者HCV RNA转阴,18%的患者达到SVR^[14].以下提示再次抗病毒治疗疗效较差:以前曾用过IFN与利巴韦林联合治疗不能获得SVR;1型患者;血清HCV RNA $>1.5\times 10^6$ IU/mL,肝硬化等.此外,一些常见的易引起治疗无应答的因素包括:正在使用其他静脉内用药,饮酒,没有正规服药,或者由于贫血而导致减量.以上因素改善后,可以再次进行抗病毒治疗.

1.3.4 关于减量的问题 有研究报道,对1型患者,采用联合治疗方案,服用利巴韦林量少于总量的80%,或者疗程短于标准疗程(48 wk)的80%为减量组,结果:未减量组和减量组的SVR分别为51%和34%^[15].有研究还证明,利巴韦林的减量特别是在治疗12 wk和24 wk之间的减量比PEG-IFN减量对SVR的影响更大.在24 wk以后予PEG-IFN或者利巴韦林减量,对于24 wk时已经HCV RNA转阴的患者其SVR没有多大影响.

2 抗病毒药物的研发及临床实验

HCV RNA结构和其编码的病毒蛋白在丙肝的生活周期中发挥重要作用,也代表了特异性抗病毒抑制剂的理想靶点.主要有5'端和3'端非编码区(UTR)、P7蛋白、NS3丝氨酸蛋白酶、NS3解旋酶和NS5B蛋白即RdRp.有些药物的靶点是攻击细胞表面受体或与病毒表面结构相关联的部位,阻止病毒进入细胞或者是中和病毒,或者通过宿主免疫反应加速感染细胞的死亡,有的是通过减缓或者逆转肝纤维化来阻止肝病的发展.

2.1 新的干扰素 现有的IFN治疗还需要优化,其药代动力学差,生物学活性有限,还缺乏最佳的治疗指数.有研究小组正在试图改善IFN的功能,包括改变原有的氨基酸序列,增加聚乙二醇,改变糖基化方式,制造融合蛋白等.据研究,IFN α con1是第二代IFN,他被巧妙的加入了IFN α 亚型的某些氨基酸序列,经研究证实在体外实验和临床实验中比天然1型IFN更有效.通过这种基因重组的方法,从人源20个IFN α 家族编码序列中产生的新的IFN α ,其抗病毒活性比IFN α 2b增加了285 000倍. IFN与聚乙二醇的结合可增加药物的血浆暴露率,增加病毒反应率.除了已批准用于临床的Peg IFN α ,一种Peg IFN β 已进入临床实验阶段.聚乙二醇化IFN α con1也进入临床评价阶段. IFN α z是IFN α 和人类血清白蛋白的融合蛋白,该分子具有与IFN α 2相似的抗病毒活性和抗增殖活性,且药代动力学上有更大的改善.新药的发现和发展为丙肝患者提供了新的希望.

2.2 口服干扰素诱导剂 他们能在感染位点通过诱导或调节细胞因子的反应而产生有效的免疫反应,代替或者补充目前IFN的胃肠外用,主要问题是如何将有效成分运输到肝脏.这方面的药物分子有咪唑喹诺酮、咪唑莫特及核苷类似物ANA245、ANA971(2003年美国肝病年会).

ANA245是一种低分子量的核苷类似物,可诱导产生多种细胞因子(包括IFN α),在一系列病毒感染模型中显示了免疫反应介导的抗病毒活性,然而较大剂量口服其生物利用度仍有限.

2.3 利巴韦林类似分子 溶血性贫血是限制利巴韦林剂量的常见副作用,提示需要某种其作用相似而毒性更少的分子. Levovirin是利巴韦林的左旋糖基类似物,既有相似的功能,因为是左旋异构体,他不参与磷酸代谢过程,不会抑制宿主的IMPDH,也就不会产生溶血性贫血,在前期临床实验和动物实验中都能很好的耐受,在常规的短期体内和体外实验中没有诱导突变的作用. Wiramidine是利巴韦林的脒基形式,并可经过腺苷脱氨酶转化为利巴韦林,首过效应将使该药运输到肝脏,而肝脏富含脱氨酶,可使其更多的聚集在肝脏,其临床实验正在进行.

2.4 某些特异性抗病毒抑制分子 功能性的病毒成分(包括病毒RNA结构和病毒酶),成为这类药物的靶点.反

义核苷酸、核酶及RNA干扰的方法都已用来探索丙肝的治疗。病毒基因组拥有许多不同于人类的核苷酸序列,因而可以作为基因治疗的靶点。有研究小组已经证实,反义核苷酸可以在体内和体外实验中抑制HCV RNA的翻译。其中ISIS14803是一种20个核苷酸的反义核苷酸,他能与翻译起始密码附近的核糖体进入位点(IRES)结合,从而抑制HCV RNA的翻译。他在体内和体外模型中均可减少HCV RNA的量及病毒蛋白量,该药已经进入临床研究阶段。其他抗病毒分子还包括P7抑制剂、HCV蛋白酶抑制剂、HCV NS3解旋酶抑制剂及HCV RdRp抑制剂等,都有不同的优缺点,与之相关的研究目前均有一定的进展。

总之,目前国内外对HCV患者推荐的治疗方案是PEG-IFN和利巴韦林联合治疗,大量的研究正在寻求治疗丙肝的更安全、更有效、更价廉的药物,他们的出现将为丙肝患者提供新的希望。

3 参考文献

- 1 Van Soest H, van Hattum J. Treatment of chronic hepatitis C: lessons from human immunodeficiency virus dynamics. *Scand J Gastroenterol* 2001;234:93-97
- 2 Buti M, Morral S, Sanchez F, Martell M, Stalgis C, Esteban R. High-Dose interferon- α 2b plus ribavirin for retreatment of interferon-nonresponsive patients infected with genotype 1 hepatitis C virus. *Dig Dis Sci* 2001;46:2396-2400
- 3 Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, Shiffman M, Everson G, Reindollar R, Fried MW, Purdum PP 3rd, Jensen D, Smith C, Lee WM, Boyer TD, Lin A, Pedder S, DePamphilis J. Efficacy and safety of pegylated(40-KD)interferon-2a compared with interferon-2a in non-cirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;33:433-438
- 4 Lindsay KL, Trepo C, Heintges T, Shiffman ML, Gordon SC, Hoefs JC, Schiff ER, Goodman ZD, Laughlin M, Yao R, Albrecht JK. Hepatitis interventional therapy group. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon α -2b to interferon α -2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;34:395-403
- 5 Ning Q, Brown D, Parodo J, Catral M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips MJ, Levy G. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* 1998;160:3487-3493
- 6 Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL Jr, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon α -2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-982
- 7 Fried MW, Peter J, Hoots K, Gaglio PJ, Talbut D, Davis PC, Key NS, White GC, Lindblad L, Rickles FR, Abshire TC. Hepatitis C in adults and adolescents with hemophilia: a randomized, controlled trial of interferon α -2b and ribavirin. *Hepatology* 2002;36:P967-972
- 8 Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon α -2b plus ribavirin compared with interferon α -2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-965
- 9 Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM; PEGASYS International Study Group. Peginterferon- α 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-355
- 10 Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J. Early virologic response to treatment with peginterferon α -2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:645-652
- 11 Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, Zachoval R, Wiedenmann B, Hopf U, Zeuzem S. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 2003;37:600-609
- 12 Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. Pegasys international study group. Peginterferon- α 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-355
- 13 Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon α -2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1303-1313
- 14 Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everson GT, Lok AS, Morgan TR, Bonkovsky HL, Lee WM, Dienstag JL, Ghany MG, Goodman ZD, Everhart JE. Hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial group. Peginterferon α -2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. *Gastroenterology* 2004;126:1015-1023
- 15 McHutchison JG, Manns M, Patel K, Poynard T, Lindsay KL, Trepo C, Dienstag J, Lee WM, Mak C, Garaud JJ, Albrecht JK. International hepatitis interventional therapy group. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;123:1061-1069

慢性丙型肝炎抗病毒失败者再治疗探讨

聂青和, 程勇前

聂青和, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038.

程勇前, 中国人民解放军解放军 302 医院感染五科 北京市 100039
项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com
电话: 029-83377742 传真: 029-83537377
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

聂青和, 程勇前. 慢性丙型肝炎抗病毒失败者再治疗探讨. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2382-2385

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2382.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)的基础和临床各方面研究已经有了很大进展,但是在诊断、治疗、疫苗研制等方面还不尽如人意,彻底控制丙型肝炎的危害还有很远的路程要走。慢性丙型肝炎目前常用的治疗方法是普通 α 干扰素, 300 wu, 3 次 /wk, 疗程 1 a. 但是用这种方法治疗的持

义核苷酸、核酶及RNA干扰的方法都已用来探索丙肝的治疗。病毒基因组拥有许多不同于人类的核苷酸序列,因而可以作为基因治疗的靶点。有研究小组已经证实,反义核苷酸可以在体内和体外实验中抑制HCV RNA的翻译。其中ISIS14803是一种20个核苷酸的反义核苷酸,他能与翻译起始密码附近的核糖体进入位点(IRES)结合,从而抑制HCV RNA的翻译。他在体内和体外模型中均可减少HCV RNA的量及病毒蛋白量,该药已经进入临床研究阶段。其他抗病毒分子还包括P7抑制剂、HCV蛋白酶抑制剂、HCV NS3解旋酶抑制剂及HCV RdRp抑制剂等,都有不同的优缺点,与之相关的研究目前均有一定的进展。

总之,目前国内外对HCV患者推荐的治疗方案是PEG-IFN和利巴韦林联合治疗,大量的研究正在寻求治疗丙肝的更安全、更有效、更价廉的药物,他们的出现将为丙肝患者提供新的希望。

3 参考文献

- 1 Van Soest H, van Hattum J. Treatment of chronic hepatitis C: lessons from human immunodeficiency virus dynamics. *Scand J Gastroenterol* 2001;234:93-97
- 2 Buti M, Morral S, Sanchez F, Martell M, Stalgis C, Esteban R. High-Dose interferon- α 2b plus ribavirin for retreatment of interferon-nonresponsive patients infected with genotype 1 hepatitis C virus. *Dig Dis Sci* 2001;46:2396-2400
- 3 Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, Shiffman M, Everson G, Reindollar R, Fried MW, Purdum PP 3rd, Jensen D, Smith C, Lee WM, Boyer TD, Lin A, Pedder S, DePamphilis J. Efficacy and safety of pegylated(40-KD)interferon-2a compared with interferon-2a in non-cirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;33:433-438
- 4 Lindsay KL, Trepo C, Heintges T, Shiffman ML, Gordon SC, Hoefs JC, Schiff ER, Goodman ZD, Laughlin M, Yao R, Albrecht JK. Hepatitis interventional therapy group. A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon α -2b to interferon α -2b as initial treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;34:395-403
- 5 Ning Q, Brown D, Parodo J, Catral M, Gorczynski R, Cole E, Fung L, Ding JW, Liu MF, Rotstein O, Phillips MJ, Levy G. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl2 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J Immunol* 1998;160:3487-3493
- 6 Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL Jr, Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon α -2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;347:975-982
- 7 Fried MW, Peter J, Hoots K, Gaglio PJ, Talbut D, Davis PC, Key NS, White GC, Lindblad L, Rickles FR, Abshire TC. Hepatitis C in adults and adolescents with hemophilia: a randomized, controlled trial of interferon α -2b and ribavirin. *Hepatology* 2002;36:P967-972
- 8 Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon α -2b plus ribavirin compared with interferon α -2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-965
- 9 Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM; PEGASYS International Study Group. Peginterferon- α 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-355
- 10 Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J. Early virologic response to treatment with peginterferon α -2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:645-652
- 11 Berg T, Sarrazin C, Herrmann E, Hinrichsen H, Gerlach T, Zachoval R, Wiedenmann B, Hopf U, Zeuzem S. Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 2003;37:600-609
- 12 Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. Pegasys international study group. Peginterferon- α 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004;140:346-355
- 13 Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon α -2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1303-1313
- 14 Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everson GT, Lok AS, Morgan TR, Bonkovsky HL, Lee WM, Dienstag JL, Ghany MG, Goodman ZD, Everhart JE. Hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial group. Peginterferon α -2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. *Gastroenterology* 2004;126:1015-1023
- 15 McHutchison JG, Manns M, Patel K, Poynard T, Lindsay KL, Trepo C, Dienstag J, Lee WM, Mak C, Garaud JJ, Albrecht JK. International hepatitis interventional therapy group. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1-infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;123:1061-1069

慢性丙型肝炎抗病毒失败者再治疗探讨

聂青和, 程勇前

聂青和, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038.

程勇前, 中国人民解放军解放军 302 医院感染五科 北京市 100039
项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com
电话: 029-83377742 传真: 029-83537377
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

聂青和, 程勇前. 慢性丙型肝炎抗病毒失败者再治疗探讨. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2382-2385

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2382.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)的基础和临床各方面研究已经有了很大进展,但是在诊断、治疗、疫苗研制等方面还不尽如人意,彻底控制丙型肝炎的危害还有很远的路程要走。慢性丙型肝炎目前常用的治疗方法是普通 α 干扰素, 300 wu, 3 次 /wk, 疗程 1 a. 但是用这种方法治疗的持

续病毒学应答率(SVR, 治疗结束后 24 wk 血清 HCV RNA 阴性)只有 12–16%^[1]. 随着对利巴韦林抗病毒作用机制研究的深入, 以及长效干扰素的出现并批准用于临床, 单用普通干扰素治疗失败者的再次抗病毒治疗引起了许多学者的关注.

联合利巴韦林, 或用长效干扰素进行抗病毒治疗可以提高丙型肝炎患者的 SVR, 但仍有一部分患者治疗无效. 因此, 许多学者针对如何选择合适的患者进行再次抗病毒治疗进行了大量研究, 认为首次治疗后的病毒学反应, 治疗前血清中病毒含量, 抗病毒治疗早期的病毒学反应, HCV RNA 基因型等因素对再次抗病毒治疗的 SVR 有一定影响.

1 首次治疗后的病毒学反应

首次抗病毒治疗后的病毒学反应形式可分为: 复发(relapse), 即治疗过程中 HCV RNA 转阴, 但停止治疗后 HCV RNA 再次转为阳性. 无应答(nonresponde)即在治疗过程中 HCV RNA 始终未转阴. 第三种类型为在治疗过程中 HCV RNA 先转阴, 但未停止治疗时 HCV RNA 再次出现. 在治疗无应答者中有两种不同类型的病毒学反应形式: 一部分在治疗中 HCV RNA 水平降低很少或没有降低(少于 2 个数量级); 另一部分血清 HCV RNA 水平降低至少 2 个数量级, 但在整个治疗过程中始终可检测到 HCV RNA(部分应答)^[2].

多家研究中采用不同方法^[3], 如: 加大干扰素剂量、延长疗程、干扰素诱导治疗、干扰素联合利巴韦林等方法对首次治疗后复发者以及无应答者进行再次抗病毒治疗, 结果均显示首次治疗后复发者最终所获得的 SVR 较无应答者为高(表1). 对复发者采用干扰素联合利巴韦林再次抗病毒治疗的 SVR 在 15–80% 之间, 对无应答者采用干扰素联合利巴韦林再次抗病毒治疗的 SVR

在 0–15% 之间. 因此认为, 对首次治疗后复发者进行再次抗病毒治疗的 SVR 较无应答者高.

2 治疗前血清中病毒含量

Iyoda *et al* 通过对影响再次抗病毒治疗 SVR 的有关因素进行多变量分析后认为, SVR 取决于再次治疗前 HCV 病毒载量, 病毒载量较低者(0.8 ± 0.7 MEq/mL), 比病毒载量较高者(9.1 ± 6.5 MEq/mL)更有可能获得 SVR. Arase *et al* 对 277 例首次治疗后血清 HCV RNA 阴性, ALT 正常, 但停止治疗 3 mo 后, HCV RNA 再次阳性, ALT 反跳(>100 U)的复发者进行回顾性研究发现, HCV RNA 阳性, ALT>100 U, 在 ALT 再次升高的最高峰时, 及 ALT 恢复过程中, HCV RNA 水平较治疗前有明显下降, 如果在复发后 ALT 的恢复过程中再次给予干扰素抗病毒治疗, HCV RNA 清除率为 47.1%(8/17), 明显高于未再次治疗者 1.5%(4/260). Watanabe *et al* 在治疗 1 名基因型为 1b 的慢性丙型肝炎患者过程中观察到, 在第一次抗病毒治疗前病毒载量为 1.2×10^6 copies/mL, 干扰素敏感决定区为中间型, 前两次抗病毒治疗均失败, 在第三次抗病毒治疗前, 病毒载量降为 1.5×10^4 copies/mL, 干扰素敏感决定区变为突变型, 第三次抗病毒治疗获得了 SVR. 提示在病毒载量降低和干扰素敏感决定区变为突变型时进行抗病毒治疗可以获得 SVR.

以上研究结果说明, 再次抗病毒治疗之前血清中病毒载量处于低水平的患者, 再次治疗后更有可能获 SVR^[4].

3 抗病毒治疗早期的病毒学反应

研究显示, 在治疗初期 12 wk 内 HCV RNA 水平下降 2 个数量级, 或 HCV RNA 降至 10^5 copies/mL 以下, 或 HCV RNA 转阴, 并且 ALT 恢复正常者预示治疗结束

表 1 不同治疗方法对首次抗病毒治疗后复发及无应答者的 SVR

资料来源	病例数	用药	治疗方案	病例特点	SVR
Kao JH(2001)	复发者 19 名	IFN α + RIB	(IFN500wu, 3/wk, + RIB 1200 mg/d, 24w)	复发者	67%
	无应答者 17 名		(IFN500wu, 3/wk, +RIB 1200 mg/d, 24 wk) + IFN300wu, 3/wk, 24 wk		80%
			(IFN500wu, 3/wk, + RIB 1200 mg/d, 24 wk)	无应答	45%
			(IFN500wu, 3/wk, +RIB 1200 mg/d, 24 wk) + IFN300wu, 3/wk, 24 wk		63%
Enriquez J (2000)	复发者 51 名	IFN α –2b+ RIB	IFN 300 wu, 3/wk, + RIB 1000–1200 mg/d, 24 wk	复发者	25%
	无应答者 69 名		IFN 300 wu, 3/wk, + RIB 1000–1200 mg/d, 48 wk		66.6%
		IFN α –2b+ RIB	IFN 300wu, 3/wk, + RIB 1000–1200 mg/d, 24 wk	无应答	14.3%
			IFN 300wu, 3/wk, + RIB 1000–1200 mg/d, 48 wk		8.8%
Cavalletto L (2000)	25	IFN α I	FN 600 wu, 3/wk, 8 wk IFN 300 wu, 3/wk, 24 wk	复发者	4 (16%)
	25	IFN α –2b+ RIB	IFN 600wu, 3/wk, 8 wk		
			IFN 300 wu, 3/wk, + RIB 1 000–1 200 mg/d, 24 wk		11 (44%)
	25	IFN α	IFN 600 wu, 3/wk, 8 wk		
			IFN 300 wu, 3/wk, 24 wk	无应答	0
	25	IFN α –2b+ RIB	IFN 600wu, 3/wk, 8 wk		
		IFN 300 wu, 3/wk, + RIB 1000–1200 mg/d, 24 wk		1 (4%)	

后可能获得SVR^[5]。在初治者中仅有2%的无早期病毒学应答的患者最终可以获得SVR,在所有SVR者中无早期病毒学应答的患者所占比例不足1%。再次抗病毒治疗者中,7%的治疗初期HCV RNA水平未下降2个数量级的患者,最终可以获得SVR,而41%的治疗初期HCV RNA水平下降2个数量级的患者,最终可以获得SVR。Cavalletto *et al*^[16]在第二次抗病毒治疗时对用IFN 600 wu, 3次/wk, 诱导治疗2 mo后有ALT, HCV RNA完全应答者,继续用干扰素IFN α -2b 300 wu, 3次/wk, 联合利巴韦林治疗6 mo, SVR为79%(11/14),继续单用干扰素IFN α -2b 300 wu, 3次/wk, 治疗6 mo, SVR为33%(4/12)。而诱导治疗后无ALT, HCV RNA完全应答者,继续用干扰素IFN α -2b联合利巴韦林治疗6 mo, SVR仅为3%(1/36),继续单用干扰素治疗SVR为0。Berg *et al*^[17]研究认为,在治疗第4 wk血清HCV RNA水平大于450 000 IU/mL和治疗12 wk大于30 000 IU/mL,预示将对治疗无应答。

由此可见,对抗病毒治疗早期有明显病毒学反应者,治疗后获SVR的可能性大^[18](图1),而对于在治疗早期HCV RNA水平无明显下降者,最终获SVR的可能性很小,应停止继续治疗。

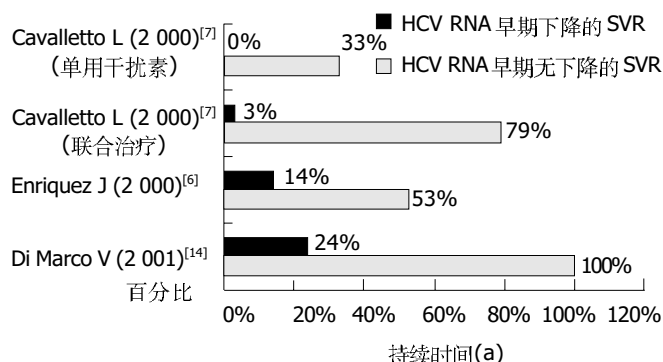


图1 HCV RNA早期变化对SVR的影响。

4 HCV RNA基因型

如(图2)所示,目前许多研究认为,HCV基因型影响抗病毒治疗的疗效,在采用不同的治疗方法再次抗病毒治疗中,SVR仍以基因型为2、3型,或非1型者为高,基因型为1(4)型者SVR较低^[19]。

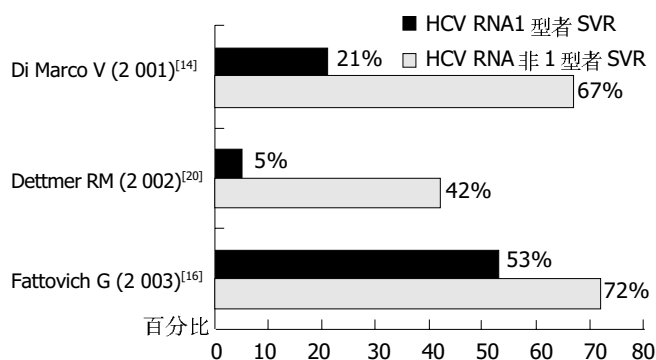


图2 基因型对SVR的影响。

5 前后两种治疗方法有效率的差别

多家研究显示,采用相同方法再次抗病毒治疗很少能获得满意的疗效,除非首次治疗失败是由于过早停药或用量不够。在有关这方面研究的meta分析中发现,在无应答者中,用相同方案再次抗病毒治疗获得持续应答率不到5%。也有一些研究显示,这种治疗持续应答率为0。尽管在治疗复发者中大约有一半人可观察到治疗结束时应答,在复发者中持续应答率也仅有10%左右^[10]。因此用于再次抗病毒治疗的方案比首次治疗时所用方案是否更为有效是再次治疗是否有效的重要因素。

Shiffman *et al*^[11]用如下公式预测再次治疗SVR:再次治疗SVR=(再次治疗结束时应答率-首次治疗结束时应答率)-再次治疗方法的复发率。例如:单用干扰素治疗的治疗结束时应答率为24-29%,干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗的治疗结束时应答率为50-61%,则单用干扰素治疗无应答者,用普通干扰素联合利巴韦林再次抗病毒治疗的治疗结束时应答率为21-37%;长效干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗的治疗结束时应答率为65-68%。那么,单用干扰素治疗无应答者,用长效干扰素联合利巴韦林再次抗病毒治疗的治疗结束时应答率为36-54%;用普通干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗无应答者,用长效干扰素联合利巴韦林再次抗病毒治疗的治疗结束时应答率为4-18%;SVR则为治疗结束时应答率减去该治疗方法的复发率。假如长效干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗的复发率为20%,则用长效干扰素联合利巴韦林,治疗用普通干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗无应答者的SVR为3-14%。有关这方面研究的meta分析也证实了这些推测结果。

新的治疗方案可以采用较高剂量的干扰素,或不同类型干扰素、长效干扰素,或延长治疗时间,或联合用药,如利巴韦林、金刚烷胺,以及联合用药的剂量、用药时间。美国FDA已于1998年批准INF- α (300 wu, 3次/wk)联合利巴韦林(1 000-1 200 mg)用于慢性丙型肝炎治疗,疗程24-48 wk, SVR 36-47%,比单用干扰素高2-3倍^[1-2]。2001年FDA批准长效干扰素 α -2b联合利巴韦林用于慢性丙肝的抗病毒治疗,SVR为54-56%,比普通干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗的SVR高7-12%^[12]。

6 其他因素

Puppo *et al*^[13]研究发现,可溶性 β 2-m结合型和游离型HLA I重链的血清水平在HCV感染患者较正常对照明显增高,在治疗第3 mo对治疗应答者其水平较无应答者增高明显,在治疗的6 mo,对治疗应答者其水平下降,而无应答者仍增高,在正常对照治疗前后无明显改变。因此,其作为一个免疫活性的标志,与HCV RNA水平有关,可以作为对IFN与利巴韦林联合再次抗病毒治疗反应的一个预测因素。饮酒也会影响SVR,戒酒可能会提高应答率,建议HCV患者应该戒酒,尤其是在

干扰素治疗过程中。

此外,患者治疗中的依从性和耐受性也是影响治疗效果的一个重要原因,治疗失败的一个重要原因是患者没能按治疗方案进行正规治疗。再次治疗时仍存在依从性和耐受性问题,依从性好才有可能获得成功。如果首次治疗中,即使患者正确处理副反应,仍不能耐受,或首次治疗中曾出现目前无法治疗的合并症,那么对再次治疗的副反应仍有可能不能耐受,这些患者也不宜再次治疗^[14]。以下提示再次抗病毒治疗疗效较差:曾用过 IFN 与利巴韦林联合治疗不能获得 SVR; 1 型患者;血清 HCV RNA $>1.5\times 10^6$ IU/mL,肝硬化等。加之,一些常见的易引起治疗无应答的因素包括:正在使用其他静脉内用药,饮酒,没有正规服药,或者由于贫血而导致减量。以上因素改善后,可以再次进行抗病毒治疗^[15]。采用长效干扰素或联合利巴韦林等较单用普通干扰素更为有效的治疗方法进行再次抗病毒治疗,更可获得持续病毒学应答。可以看出,对慢性丙型肝炎患者的治疗手段还有待进一步提高。

7 参考文献

- Hino K, Okita K. Interferon therapy as chemoprevention of hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis C. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:19-22
- Enriquez J, Gallego A, Torras X, Perez-Olmeda T, Diago M, Soriano V, Lujan MS, Garcia-Samaniego J. Retreatment for 24 vs 48 weeks with interferon-alpha2b plus ribavirin of chronic hepatitis C patients who relapsed or did not respond to interferon alone. *J Viral Hepat* 2000;7:403-408
- Hepburn MJ, Hepburn LM, Cantu NS, Lapeer MG, Lawitz EJ. Differences in treatment outcome for hepatitis C among ethnic groups. *Am J Med* 2004;117:163-168
- Shiffman ML. Retreatment of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S128-134
- Shiffman ML. Chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2004;24:S1-2
- Cavalletto L, Chemello L, Donada C, Casarin P, Belussi F, Bernardinello E, Marino F, Pontisso P, Gatta A, Alberti A. The pattern of response to interferon alpha (alpha-IFN) predicts sustained response to a 6-month alpha-IFN and ribavirin retreatment for chronic hepatitis C. *Tvvh study group. J Hepatol* 2000;33:128-134
- Berg T, Pascu M, Moller B. Prediction of spontaneous viral clearance in acute hepatitis C by viral load measurements. *Hepatology* 2003;37:1495-1496
- Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Saitoh S, Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Someya T, Hosaka T, Kobayashi M, Kumada H. Efficacy of interferon retreatment after relapse for chronic hepatitis C patients with biochemical response after first interferon therapy. *J Gastroenterol* 2004;39:455-460
- Fattovich G, Zagni I, Fornaciari G, Minola E, Fabris P, Boccia S, Giusti M, Abbati G, Felder M, Rovere P, Redaelli A, Tonon A, Montanari R, Paternoster C, Distasi M, Castagnetti E, Tositti G, Rizzo C, Suppressa S, Pantalena M, Lomonaco L, Scattolini C, Tagger A. Efficacy of prolonged 5 million units of interferon in combination with ribavirin for relapser patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2003;10:111-117
- Dettmer RM, Reinus JF, Clain DJ, Aytaman A, Levendoglu H, Bloom AA, Isaacson MP, Spinnell M, Meyer D, Sarabanchong V, Zhang Y, Garcia-Carrasquillo RJ, Markowitz DD, Magun AM, Worman HJ. Interferon-alpha-2b and ribavirin for retreatment of chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2002;49:758-763
- Shiffman ML, Hofmann CM, Gabbay J, Luketic VA, Sterling RK, Sanyal AJ, Contos MJ, Ryan MJ, Yoshida C, Rustgi V. Treatment of chronic hepatitis C in patients who failed interferon monotherapy: effects of higher doses of interferon and ribavirin combination therapy. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2928-2935
- Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. American association for the study of liver diseases. Diagnosis management and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1147-1171
- Puppo F, Torre F, Contini P, Ghio M, Brenci S, Brizzolara R, Sinelli N, Campo N, Indiveri F, Picciotto A. Soluble beta2-mu-associated and beta2-mu-free HLA class I heavy chain serum levels in interferon-alpha nonresponder chronic hepatitis C patients. Markers of immune activation, and response to antiviral retreatment. *J Clin Immunol* 2000;20:486-490
- Peters M, Terrault N. Alcohol use and hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S220-225
- Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everson GT, Lok AS, Morgan TR, Bonkovsky HL, Lee WM, Dienstag JL, Ghany MG, Goodman ZD, Everhart JE. Hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial group. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. *Gastroenterology* 2004;126:1015-1023

慢性丙型肝炎的免疫治疗

施光峰, 陈明泉

施光峰, 陈明泉, 复旦大学附属华山医院传染病科 上海市 200040
项目负责人: 施光峰, 200040, 上海市, 复旦大学附属华山医院传染病科。
qfshi2001@yahoo.com
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

施光峰, 陈明泉. 慢性丙型肝炎的免疫治疗. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2385-2388

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2385.asp>

0 引言

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)感染引起的一种重要的传染病,约70-85%的感染者发展为慢性肝炎,其中约10-20%的慢性丙型肝炎患者可发展成肝硬化,1-5%可发展成肝细胞性肝癌等终末期肝病,危害极大。目前,全球HCV感染者近2亿,在我国也有3 000-4 000万左右的HCV感染者,HCV感染引起的慢性丙型肝炎已经成为重大的世界卫生问题^[1]。

当前,慢性丙肝的治疗依然以干扰素作为标准治疗方法,尚未有其他突破性进展。目前尚无预防HCV感染的疫苗可用于临床。HCV感染后在体内持续存在和被清除的机制仍不明确。最近的研究提示^[2],强烈的多特异性细胞免疫,特别是CTL反应在病毒的清除过程中扮演了重要角色,因此开发治疗性疫苗用于治疗慢性HCV感染是完全可行的。下面就慢性丙型肝炎的免疫相关治疗作一综述。

干扰素治疗过程中。

此外, 患者治疗中的依从性和耐受性也是影响治疗效果的一个重要原因, 治疗失败的一个重要原因是患者没能按治疗方案进行正规治疗。再次治疗时仍存在依从性和耐受性问题, 依从性好才有可能获得成功。如果首次治疗中, 即使患者正确处理副反应, 仍不能耐受, 或首次治疗中曾出现目前无法治疗的合并症, 那么对再次治疗的副反应仍有可能不能耐受, 这些患者也不宜再次治疗^[14]。以下提示再次抗病毒治疗疗效较差: 曾用过 IFN 与利巴韦林联合治疗不能获得 SVR; 1 型患者; 血清 HCV RNA $>1.5\times 10^6$ IU/mL, 肝硬化等。加之, 一些常见的易引起治疗无应答的因素包括: 正在使用其他静脉内用药, 饮酒, 没有正规服药, 或者由于贫血而导致减量。以上因素改善后, 可以再次进行抗病毒治疗^[15]。采用长效干扰素或联合利巴韦林等较单用普通干扰素更为有效的治疗方法进行再次抗病毒治疗, 更可获得持续病毒学应答。可以看出, 对慢性丙型肝炎患者的治疗手段还有待进一步提高。

7 参考文献

- Hino K, Okita K. Interferon therapy as chemoprevention of hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis C. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:19-22
- Enriquez J, Gallego A, Torras X, Perez-Olmeda T, Diago M, Soriano V, Lujan MS, Garcia-Samaniego J. Retreatment for 24 vs 48 weeks with interferon-alpha2b plus ribavirin of chronic hepatitis C patients who relapsed or did not respond to interferon alone. *J Viral Hepat* 2000;7:403-408
- Hepburn MJ, Hepburn LM, Cantu NS, Lapeer MG, Lawitz EJ. Differences in treatment outcome for hepatitis C among ethnic groups. *Am J Med* 2004;117:163-168
- Shiffman ML. Retreatment of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S128-134
- Shiffman ML. Chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2004;24:S1-2
- Cavalletto L, Chemello L, Donada C, Casarin P, Belussi F, Bernardinello E, Marino F, Pontisso P, Gatta A, Alberti A. The pattern of response to interferon alpha (alpha-IFN) predicts sustained response to a 6-month alpha-IFN and ribavirin retreatment for chronic hepatitis C. *Tvvh study group. J Hepatol* 2000;33:128-134
- Berg T, Pascu M, Moller B. Prediction of spontaneous viral clearance in acute hepatitis C by viral load measurements. *Hepatology* 2003;37:1495-1496
- Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Saitoh S, Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Someya T, Hosaka T, Kobayashi M, Kumada H. Efficacy of interferon retreatment after relapse for chronic hepatitis C patients with biochemical response after first interferon therapy. *J Gastroenterol* 2004;39:455-460
- Fattovich G, Zagni I, Fornaciari G, Minola E, Fabris P, Boccia S, Giusti M, Abbati G, Felder M, Rovere P, Redaelli A, Tonon A, Montanari R, Paternoster C, Distasi M, Castagnetti E, Tositti G, Rizzo C, Suppressa S, Pantalena M, Lomonaco L, Scattolini C, Tagger A. Efficacy of prolonged 5 million units of interferon in combination with ribavirin for relapser patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2003;10:111-117
- Dettmer RM, Reinus JF, Clain DJ, Aytaman A, Levendoglu H, Bloom AA, Isaacson MP, Spinnell M, Meyer D, Sarabanchong V, Zhang Y, Garcia-Carrasquillo RJ, Markowitz DD, Magun AM, Worman HJ. Interferon-alpha-2b and ribavirin for retreatment of chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology* 2002;49:758-763
- Shiffman ML, Hofmann CM, Gabbay J, Luketic VA, Sterling RK, Sanyal AJ, Contos MJ, Ryan MJ, Yoshida C, Rustgi V. Treatment of chronic hepatitis C in patients who failed interferon monotherapy: effects of higher doses of interferon and ribavirin combination therapy. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2928-2935
- Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. American association for the study of liver diseases. Diagnosis management and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1147-1171
- Puppo F, Torre F, Contini P, Ghio M, Brenci S, Brizzolara R, Sinelli N, Campo N, Indiveri F, Picciotto A. Soluble beta2-mu-associated and beta2-mu-free HLA class I heavy chain serum levels in interferon-alpha nonresponder chronic hepatitis C patients. Markers of immune activation, and response to antiviral retreatment. *J Clin Immunol* 2000;20:486-490
- Peters M, Terrault N. Alcohol use and hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:S220-225
- Shiffman ML, Di Bisceglie AM, Lindsay KL, Morishima C, Wright EC, Everson GT, Lok AS, Morgan TR, Bonkovsky HL, Lee WM, Dienstag JL, Ghany MG, Goodman ZD, Everhart JE. Hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial group. Peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have failed prior treatment. *Gastroenterology* 2004;126:1015-1023

慢性丙型肝炎的免疫治疗

施光峰, 陈明泉

施光峰, 陈明泉, 复旦大学附属华山医院传染病科 上海市 200040
项目负责人: 施光峰, 200040, 上海市, 复旦大学附属华山医院传染病科。
gfshi2001@yahoo.com
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

施光峰, 陈明泉. 慢性丙型肝炎的免疫治疗. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2385-2388

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2385.asp>

0 引言

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)感染引起的一种重要的传染病, 约 70-85% 的感染者发展为慢性肝炎, 其中约 10-20% 的慢性丙型肝炎患者可发展成肝硬化, 1-5% 可发展成肝细胞性肝癌等终末期肝病, 危害极大。目前, 全球 HCV 感染者近 2 亿, 在我国也有 3 000-4 000 万左右的 HCV 感染者, HCV 感染引起的慢性丙型肝炎已经成为重大的世界卫生问题^[1]。

当前, 慢性丙肝的治疗依然以干扰素作为标准治疗方法, 尚未有其他突破性进展。目前尚无预防 HCV 感染的疫苗可用于临床。HCV 感染后在体内持续存在和被清除的机制仍不明确。最近的研究提示^[2], 强烈的多特异性细胞免疫, 特别是 CTL 反应在病毒的清除过程中扮演了重要角色, 因此开发治疗性疫苗用于治疗慢性 HCV 感染是完全可行的。下面就慢性丙型肝炎的免疫相关治疗作一综述。

1 干扰素治疗

2003-06 美国国立卫生研究院(NIH)和美国肝病学会(ALA), 对近 10 a 来慢性丙型肝炎的治疗研究作了全面的总结, 明确了 α -干扰素是目前慢性丙型肝炎的标准治疗, 具体用药方法为 3 MU, 3 次/wk, 连续用 52 wk. 常用的干扰素有干扰素 α -2a, α -2b, C-IFN(consensus interferon)以及Peg-IFN. 所有干扰素均需通过与靶细胞受体结合, 启动干扰素反应基因成分, 产生抗病毒蛋白及多种免疫调节因子^[3].

1.1 应用干扰素的指征 慢性丙型肝炎患者丙氨酸转氨酶(ALT)在正常上限值 1.5 倍以上, 抗 HCV 及 HCV RNA 阳性, 尤其是肝活检显示炎症者, 均需应用干扰素治疗. 干扰素治疗慢性丙型肝炎的禁忌证是失代偿性肝硬化、自身免疫性疾病或甲状腺炎、甲状腺功能亢进、内源性抑郁症、精神分裂症、严重血小板减少、白细胞减少、妊娠及严重冠状动脉性心脏病等. 干扰素治疗慢性丙型肝炎的疗效评价指标, 最早用 ALT, 后来多数研究者以 ALT 和 HCV RNA 为指标. 一般每隔 2-4 wk 检查一次, 尤其重要的是在第 12 wk 进行评定疗效, 这时如果 ALT 及 HCV RNA 仍无改变, 预示疗效不理想, 应考虑停药或调整治疗方法, 包括调整剂量及应用其他干扰素制剂等. 随机临床试验研究表明^[4], 干扰素对一些慢性丙型肝炎患者有效, 从生化方面来看, 经典的 6 mo 疗法结束时, 其有效率高达 40-50%. 治疗结束后 6 mo 持续有效者仍高达 20%, 肝组织学亦有所改善, 如果疗程延长到 12 mo, 持续有效率可提高到 20-30%.

1.2 影响干扰素疗效的因素 影响干扰素疗效的因素很多: (1)HCV 的基因型: HCV 有 6 种基因型, HCV 基因型不仅影响临床过程, 也影响干扰素的疗效, 研究表明 III 型 HCV 较 II 型和 I 型对干扰素敏感. (2)HCV RNA 水平: 资料表明, 治疗前 HCV RNA 低于 10^6 copies/mL, 对干扰素治疗有效率高. (3)HCV RNA 变异: HCV 以异质性群体存在于机体中, 其包膜基因组 E 区的快速变异, 不仅可逃避免疫监视, 且可能形成干扰素耐药株^[5]. (4)其他: 如年龄、疾病状态及治疗过程中出现干扰素抗体等, 均可影响干扰素的疗效. 干扰素治疗有许多副作用, 如头痛、乏力、不适、肌疼、关节疼、发热、厌食、消化不良、恶心、呕吐、腹痛、腹泻、焦虑、注意力不集中、情绪不稳、失眠、易激惹、咳嗽、呼吸困难、咽炎、脱发、瘙痒、皮疹、皮肤干燥、注射部位发炎等, 但通常并不严重, 严重或甚至威胁生命的副作用约占 0.1-1%, 副作用常与剂量相关, 有抑郁等精神障碍、免疫性甲状腺疾病及其他自身免疫性疾病时应充分注意.

1.3 干扰素和病毒唑联合治疗 干扰素尽管是目前治疗慢性丙型肝炎的标准治疗方法, 但其疗效仍不尽人意. 探讨与干扰素联合治疗能增加干扰素疗效的药物是目前慢性丙型肝炎治疗的研究热点之一^[6]. 病毒唑能抑制 DNA 和 RNA 病毒, 目前认为他与干扰

素, 尤其是长效干扰素联合是治疗慢性丙型肝炎最有前途的药物^[1]. 干扰素 + 病毒唑联合治疗慢性丙型肝炎的作用机制尚不明. 研究发现病毒唑能增加 T 细胞的 I 型细胞因子(IL-2、 α -干扰素及 γ -干扰素)反应, 抑制 II 型细胞因子(IL-4、IL-5 及 IL-10)反应, 病毒唑可能促进 I 型细胞因子介导的免疫反应增加 α -干扰素对慢性丙型肝炎的疗效^[7]. 干扰素 + 病毒唑联合治疗相对安全, 其副作用与单用干扰素治疗慢性丙型肝炎相似, 但联合治疗时呼吸困难、咽炎、黄疸、皮疹、恶心、失眠及焦虑更常见. 联合治疗较单用干扰素治疗更需减少剂量及中止治疗, 需减少剂量的主要原因是溶血性贫血. 病毒唑引起溶血的机制不明, 可能与其在红细胞内快速沉积有关. 需中止治疗的最常见副作用是精神障碍, 其中主要是抑郁.

2 细胞免疫治疗法

慢性丙型肝炎的发病机制是由于人体免疫系统存在一定缺陷, 主要是细胞免疫的缺陷, 表现为能够特异性地有效杀伤慢性丙型肝炎病毒的细胞毒 T 细胞数量不足或质量较差, 导致病毒不能被彻底清除. 细胞免疫疗法即是采用特殊的方法增加人体的特异性的细胞毒 T 细胞的数量, 使其能够有效地杀灭慢性丙型肝炎病毒. 具体步骤简述如下: 先提取患者的外周血中一定数量的淋巴细胞, 在体外培养, 同时加入一些特异性的细胞因子, 促使这些淋巴细胞转化为对慢性丙型肝炎病毒有较强杀伤作用的细胞毒 T 细胞. 经培养数日后细胞即可得到充分地活化并大量增生, 数量可增加数十倍至百倍, 然后再将活化的细胞回输至患者体内, 获得杀伤病毒的作用.

这种设想类似于十几年前治疗慢性乙型肝炎的 LAK 细胞回输方法, 是否适用于慢性丙型肝炎的治疗, 目前正在临床研究观测阶段, 但初步结果令人鼓舞: 在已经完成了两个疗程的 10 例患者中, 其 ALT 复常率和 HCV RNA 阴转率均达到 70% 以上, 且大多在第一个疗程结束后不久即出现病毒指标的阴转和肝功能的复常. 目前由于这些患者接受治疗的时间还比较短, 对其远期疗效还不能作出评价. 该方法将来也许不能完全取代干扰素治疗, 但作为不能应用干扰素的患者的一种替补疗法, 依然有着广阔的前景^[8].

3 糖皮质激素

HBV DNA 含有糖皮质激素反应成分(glucocorticoid responsive element, GRE), 而 HCV 与 HBV 感染具有相似性, 因此 HCV 也可能含有 GRE. 研究发现^[9], 糖皮质激素治疗期间血清 HCV 升高水平与转氨酶下降水平一致. 研究还发现, 糖皮质激素停用后血清 HCV 下降, 可能由于糖皮质激素停用后免疫抑制解除并继发免疫反跳, 从而杀伤表达 HCV 的肝细胞, 进而抑制病毒复制. 低水平 HCV RNA 是干扰素维持治疗的指标, 因此, 干扰素

治疗前使用短疗程糖皮质激素可能会使干扰素治疗取得较好的疗效. 但对乙肝先用激素后用抗病毒药治疗的效果并未得到公认, 故干扰素治疗前使用短疗程糖皮质激素治疗慢性丙型肝炎应慎重^[9].

4 丙型肝炎预防性疫苗

4.1 丙型肝炎预防性疫苗的研究简况 中和抗体在传染性疾病预防中具有重要的作用, 传统上以体液免疫的强弱评价疫苗是否有效. 由于 HCV 复制相关的 RNA 聚合酶无校对功能, HCV 复制时有很高的突变率. 因此, 根据 HCV 基因组保守区和非保守区序列间同源性的不同, 可将 HCV 分为 6 个主要的基因型, 各基因型进而又可分为不同的基因亚型, 而且在同一患者体内也常常存在有多种基因有微小差异的 HCV 毒株, 称为准种或变种(quantispecies). 针对一种 HCV 产生的中和抗体不能预防其他型 HCV 的感染, 使以刺激机体产生中和性抗体为目标的预防性疫苗的研制极为困难. 尽管现在已经明确 HCV 包膜糖蛋白 E2 区, 特别是位于 E2 氨基端的高变区 1(hypervariable region 1, HVR1)存在有中和性抗体表位, 但极可能为株特异性表位. 用重组 E2 蛋白和 HVR1 合成肽免疫黑猩猩, 诱生的抗体能保护黑猩猩耐受同株病毒的攻击, 但对异株病毒的攻击无任何保护作用^[10]. 但是, 近来新的研究表明^[11], HVR1 区具有一定的交叉反应性, Puntoriero *et al*^[14]通过将筛选 HVR1 噬菌体肽库获得的若干模拟表位组合合成复合抗原肽(multiple antigen peptides, MAP)免疫小鼠, 产生的抗血清可同高达 95% 的 HCV 患者血清发生交叉反应, 提示应用 MAP 作为免疫原可能是解决 HVR1 高变性的一条确实可行的新途径. 最近, Goto *et al* 现用 HCV-N2 株的 E1-E2 蛋白或 HCVH-#6 株的 HVR1 合成肽免疫黑猩猩后以 HCV-#6 攻击, 只有抗 HVR1 抗体滴度上升的黑猩猩获得了完全保护^[12]. 待抗 E1-E2 抗体滴度下降后以 10 倍半数黑猩猩感染量(CID₅₀)的 HCV 攻击, 免疫的黑猩猩仍旧不能感染, 而且其血清可中和 HCV 病毒. 经 Pin-ELISA 法研究表明, 抗 HVR1 抗体主要识别 C 末端的表位. 他们认为在 HVR1 部分序列保守的情况下, 即使该表位部分氨基酸序列被其他 HCV 毒株替代, 仍可诱导产生具广泛交叉反应性的抗体, 这为开发出具有广泛中和活性的 HCV 预防性疫苗展示了新的希望.

4.2 治疗性丙型肝炎疫苗研究新进展 在世界范围内治疗性疫苗的研究才刚刚起步, 大部分的研究还只是停留在对自限性 HCV 感染后机体的免疫反应上, 特别是细胞免疫反应在病毒清除中的地位与作用、T 细胞表位的筛选鉴定和动物实验阶段, 尚未见有候选治疗性疫苗应用于黑猩猩的研究报告. 为了设计基于 T 细胞免疫的疫苗, 筛选、鉴定可与多数人 MHC I 类分子结合的保守表位也十分重要. 因为 CD8⁺T 细胞在病毒的清除中也起着举足轻重的作用, 筛选多种 HLA I 类分子等位基因限制的 CTL 表位对构建可在广泛人群中激起有

效免疫反应的疫苗非常关键. 所幸近年研究表明^[13], 不同的 HLA 等位基因型具有相同的肽结合基序, 称为超型(supertype). 例如 HLA-A3 超型的成员(包括 HLA-A3, -A11, -A31, -A33 和 -A6801 等)可以结合第 2 位氨基酸残基是 A, V, I, L, M, S 或 T 及羧基端是 R 或 K 的短肽; HLA-B7 超型的成员(包括 HLA-B7, -B35, -B53, -B54 和 -B51 等)可结合第 2 位氨基酸残基是 P 但羧基端氨基酸残基是 A, I, L, M, V, F, W 或 Y 的短肽. 通过筛选 HCV 氨基酸序列就可鉴定、合成并检测这些肽表位与不同 HLA 单体型的结合亲和力以及他们体外抗原性和免疫原性. Chang *et al* 报道, 根据发表的不同 HCV 分离株的氨基酸序列, 筛选、鉴定了若干 HLA-A3 和 B7 超型限制的 T 细胞表位^[14]. 他们认为, 考虑到以前报道的 HLA-A2 限制性 CTL 表位, HLA-A2, -A3 和 B7 三个超家族的所有成员就已经覆盖了世界人口 80% 以上的基因型.

Schweitzer *et al*^[15]建立了一种基于流式细胞术和 MHC-肽四聚体的鉴定 HCV C 抗原 T 细胞表位的方法, 发现在氨基酸 35-44, 87-96, 131-140 和 167-176 处有与 HLA-A2 结合的表位, 这些表位同 SYFPEITHI 软件预测的和已知的表位是相符的. Urbani *et al*^[16]为了模拟自然感染时体内的天然抗原提呈过程, 以便在体外活化和扩增 CTL 细胞, 构建了 5 个携带 HCV 结构和非结构蛋白基因的缺陷型腺病毒感染体外培养的贴壁单核细胞, 使 HCV 蛋白在细胞内表达并被 MHC I 类分子提呈至细胞表面. 然后, 将 HLA-A2 阳性的 HCV 感染者的 PBMC 与之共培养后作为效应细胞, 以一系列具有 HLA-A2 结合基序的 HCV 合成肽冲击的或携带 HCV 基因的痘病毒感染的细胞作为靶细胞来评价 CTL 活性. 这是一个可重复性的、模拟体内抗原提呈过程的扩增 HCV 特异性 CTL 的良好方法, 通过这种方法鉴定了一系列 HLA-A2 限制性的免疫优势的 CTL 表位, 他们有可能成为治疗性疫苗设计的候选表位.

4.3 治疗性丙型肝炎疫苗研究策略 要研制开发一种具有现实意义的 HCV 疫苗, 必须澄清疫苗研制中的模糊认识, 即认为疫苗应该 100% 有效, 能保护所有受试者绝对不被感染或 100% 有效的疫苗实际上并不存在. 分析以往成功应用的人类疫苗可以看到, 能够提供 70-80% 保护率或仅能保护受试者免于发病就是很好的疫苗了, 当前应用的大部分针对人类细菌或病毒性疾病的疫苗都属此类. 因此, 即便研制出的 HCV 疫苗不能预防感染, 但能够通过感染后清除病毒降低 HCV 感染后的慢性化率, 也具有非常重要的公共卫生价值和重要的社会效益. HCV 与宿主相互作用的结果决定了病情的进展和转归, 治疗性疫苗研制必须在考虑到克服 HCV 病毒高变问题的同时充分考虑宿主因素, 即人群 HLA 基因型的差别而导致的对 HCV 免疫反应的差别. 由于人类 MHC 分子具有复杂的多态性, 往往导致一些抗原表位与某些个体的 HCV 分子不能有效结合, 造成抗原提呈

受阻和免疫个体无反应性。因此, HCV 感染在不同的感染者身上产生了不同的结果, 少数感染者仅发生急性丙型肝炎, 然后清除病毒而痊愈; 有些感染者发生急性肝炎后转为慢性丙型肝炎; 有些感染者根本不发病, 表现为无症状携带者。HLA II 类分子表型对机体感染 HCV 后免疫反应的强弱及病毒的清除均有重要影响, Thio *et al* 研究了不同种族之间 HLA II 类分子与 HCV 感染预后的相关性^[17]。结果表明, 考虑到种族因素, HLA-DQB1*0301 与病毒清除弱相关, 但在黑种人中显示为强相关。至于白种人, 病毒的清除与 DRB1*0101 及其单体型 DRB1*0501 相关, 而病毒在体内持续存位基因的表型在 HCV 感染机体后的免疫反应中扮演了重要的角色。Harcourt *et al* 的研究结果与 Thio *et al* 的结果类似, 发现 HLA-DQB1*0301 (与 HLA-DRB1*1101 紧密连锁不平衡) 的表型与多特异性 CD4⁺ Th 辅助细胞反应的保持密切相关^[18]。因此, 在选择候选疫苗的保护性肽时, 应该考虑到 HLA II 类分子基因型的影响。这也提示将来的 HCV 疫苗不可能在所有的接种者体内激起有效的免疫反应, 我们现阶段应该接受部分有效的 HCV 疫苗应用于人群接种的设想, 此类疫苗在实践中还将在疫苗的组成、形式或免疫途径方面不断完善。所以, 选择具有免疫优势性的、多适性的及高度保守的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞表位构建多表位嵌合疫苗, 以研发适合于不同种族、不同基因型的慢性 HCV 感染者的治疗性 CTL 疫苗是十分可行的。当然, 体液免疫反应的作用也不可忽视, 可能 HCV 感染后病毒的清除需要体液免疫与细胞免疫反应协同作用, 过分强调某一方面是不恰当的, 这还需要对 HCV 感染后机体免疫反应的质与量进行深入细致的研究。

5 问题与展望

干扰素尽管是目前治疗慢性丙型病毒性肝炎的标准治疗方法, 但其疗效仍不尽人意。如何提高干扰素治疗的疗效, 是一个重要问题。目前认为, 干扰素, 尤其是长效干扰素联合病毒唑治疗是比较可行的方案^[19], 既可以克服正规干扰素半寿期短的缺点, 又可方便患者应用, 增加治疗依从性。临床试验显示, 疗效较之于正规干扰素为优。是否联合其他免疫调节药物, 如胸腺肽、胸腺素、转移因子等, 尚需进一步临床试验来论证。

丙肝的疫苗方面, HCV 不能在培养细胞中有效复制, 也无感染 HCV 的小动物模型, 以及对疫苗的临床前研究只能在黑猩猩体内进行是疫苗研制中的主要困难。正在探讨并进行临床前期评估的 HCV 疫苗形式包括: 病毒样颗粒疫苗、合成肽疫苗、重组亚单位疫苗、DNA 疫苗以及病毒载体介导的基因转导疫苗等。研究显示^[20], DNA 疫苗可同时诱导抗体反应和 CTL 反应, 其

中 CTL 反应居于主导地位, 因此设计包含有多个保守 HCV 抗原表位及辅助性 T 细胞表位多价融合抗原基因的治疗性 DNA 疫苗, 可以在不同个体中激起广泛而强烈的对不同 HCV 基因型和分离株有交叉反应性的 T 细胞免疫反应, 有望应用于 HCV 感染者的治疗及健康人群的预防性接种。

6 参考文献

- Cohen J. The scientific challenge of hepatitis C. *Science* 1999; 285:26-30
- Lechman M, Liang TJ. Vaccine development for Hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2000;20:211-226
- Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2003;7:89-105
- Puntoriero. Viral factors affecting the outcome of therapy for chronic hepatitis C. *Rev Gastroenterol Disord* 2004;4:S8-S13
- Pradat P, Maynard M, Buti M, Berthillon P, Picchio G, Tillmann HL, Wiegand J, Voirin N, Manns MP, Esteban JI, Martinot M, Marcellin P, Trepo C. The predictive value of core antigen testing for the management of hepatitis C patients receiving pegylated interferon/ribavirin treatment. *J Med Virol* 2004; 73:392-396
- Shiffman ML. Side effects of medical therapy for chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 2004;3:5-10
- Migliorisi L, Bacosi M, Russo F, Patrizi F, Saccenti P, Ursitti A, Angelis AD, Ricci GL. Consensus interferon versus interferon-alpha 2b plus ribavirin in patients with relapsing HCV infection. *Hepatol Res* 2003;27:253-259
- Kakimi K. Immune-based novel therapies for chronic hepatitis C virus infection. *Hum Cell* 2003;16:191-197
- Martagon J, Gordon SM. Special management challenges in hepatitis C. *Cleve Clin J Med* 2003;70:S27-33
- Patel K, McHutchison JG. Current therapies for chronic hepatitis C. Drug combination achieves sustained response in more than half of patients. *Postgrad Med* 2003;114:48-52
- Smith C. Management of hepatitis C. *Minn Med* 2003;86:53-56
- Jiao X, Wang RY, Qiu Q, Alter HJ, Shih JW. Enhanced hepatitis C virus NS3 specific Th1 immune responses induced by co-delivery of protein antigen and CpG with cationic liposomes. *J Gen Virol* 2004;85:1545-1553
- Meschini A, Lucchetta MC, Fontana M, Nocchi S, Pace A, Grassi M. Recent trends in the therapy of hepatitis C. *Clin Ter* 2003;154:181-191
- Torresi J, Bharadwaj M, Jackson DC, Gowans EJ. Neutralising antibody, CTL and dendritic cell responses to hepatitis C virus: a preventative vaccine strategy. *Curr Drug Targets* 2004;5:41-56
- Hugle T, Cerny A. Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis C. *Rev Med Virol* 2003;13:361-371
- Poordad FF, Tran T, Martin P. Developments in hepatitis C therapy during 2000-2002. *Expert Opin Emerg Drugs* 2003;8: 9-25
- Park SH, Yang SH, Lee CG, Youn JW, Chang J, Sung YC. Efficient induction of T helper 1 CD4⁺ T-cell responses to hepatitis C virus core and E2 by a DNA prime-adenovirus boost. *Vaccine* 2003;210:4555-4564
- Puig M, Major ME, Mihalik K, Feinstone SM. Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis C virus infection. *Vaccine* 2004;22:991-1000
- Koff RS. Hepatitis vaccines: recent advances. *Int J Parasitol* 2003;33:517-523
- Rockstroh JK, Vogel M. Therapy of hepatitis C in HIV-coinfection. *Eur J Med Res* 2004;9:304-308

丙型肝炎中医研究近况

李秀惠

李秀惠, 首都医科大学附属北京佑安医院中医科 北京市 100054
项目负责人: 李秀惠, 100054, 北京市, 首都医科大学附属北京佑安医院中医科, lixiuhui@sohu.com
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

李秀惠. 丙型肝炎中医研究近况. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2389-2390
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2389.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染后慢性化、肝硬化和肝癌发生率高, 危害性甚于乙型肝炎. 干扰素(INF)是目前治疗丙型肝炎首选药, 但6 mo完全反应率(CR)为45%左右, 持久反应率(SR)仅为20%, 且副作用多. 近年来, 我国研究人员积极探索中医药治疗丙型肝炎的方法, 取得一定进展.

1 病因病机

中医认为丙肝的感染多是由湿热疫毒之邪所致, 湿热疫毒贯穿于疾病的自始至终. 病邪具有湿滞、阴凝、毒聚、阻络、伤气、碍阻的性质. 对于感邪之后疾病的演变经过, 众说各一. 陈立华^[1]认为毒邪直入血分, 汪承伯^[2]提出病机转化经过为急性丙肝湿热为主, 慢性轻型以气虚、阴虚或气阴两虚为主, 慢肝中型、重型则表现虚实夹杂, 既有气血两虚, 又有血瘀内存. 所以, 丙型肝炎病机转化是沿着实(湿热)-虚(脾肾)-瘀(气血)发展.

车念聪^[3]总结了近年来慢性丙型肝炎的中医病因病机研究, 结果大致可概括为三种学说: (1)湿热疫毒说; (2)阴邪湿毒说; (3)邪气伏藏说. 湿热疫毒说认为致病因子乃湿热疫毒, 留滞血脉, 聚于肝体, 导致肝郁, 进而脾虚或肝肾阴虚, 最终造成气滞血瘀、瘀血阻络. 这一病因病机概括为实→虚→瘀的演变过程. 阴邪湿毒说首先认为丙型肝炎的感染, 主要是因输不洁的血、血制品所致, 他是一种性质属阴的湿性毒邪, 容易形成毒、瘀、痰、湿交织的病理状态, 最终造成气滞、湿阻、痰聚而血瘀络阻, 因此分型调查时最多出现的是肝郁脾虚型、瘀血阻络型. 邪气伏藏说指明了丙肝病毒潜伏性感染方式和临床症状较轻, 但病邪潜伏较深、病势缠绵难愈的特点.

总之, 丙型肝炎的病因病机概括为: 湿热疫毒是发病之始因, 肝血瘀滞是病变之核心, 正气亏虚是疾病缠绵难愈的关键. 病位在肝、脾、肾为主, 病变过程中具有气滞、湿阻、血瘀、致虚早等病机特点. 有“血热毒邪内蕴之实, 肝肾阴液亏耗之虚”之说.

2 辨证论治

目前我国还没有推出丙型肝炎中医分型标准, 不少学

者通过研究丙肝临床症候学, 为建立丙肝辨证分型标准提供客观依据. 沈启明 *et al*^[4]临床分析 156 例丙肝病例得出临床特点有: (1)输血是传播丙肝的主要途径; (2)潜伏期长短不一; (3)起病缓慢, 症状以乏力、纳差、腹胀为主; (4)湿偏重者为多, 瘀血阻络证常见; (5)致虚较早; (6)肝功能恢复较快; (7)丙肝重叠感染乙肝者慢性化趋向明显. 金实^[5]对122例慢性乙肝和丙肝对比研究发现, 丙肝患者年龄较大, 病邪潜伏较深, 病理反应较缓和, 病势缠绵, 比乙肝更易邪毒瘀结, 耗伤正气, 因此更易于瘀毒阻络.

车念聪 *et al* 在北京地区开展了多中心随机取样收集病例 139 例. 采用 SPSS11.0 软件包, 对所有的患者症状、体征、舌脉进行 Kmeans 聚类分析, 再对每种类型进行主成分分析, 判定每种类型的代表症状, 归纳出证型. 结果在调查收集的 34 种症状中, 症状出现率较高的是乏力、脘闷腹胀、大便粘滞不爽; 症状出现率较低的是肢冷畏寒、盗汗、尿少. 辨证分型除有 1991 年全国中医肝胆病专业委员会制定的 5 型慢肝标准(试行)(湿热内蕴型、肝郁脾虚型、肝肾阴虚型、气滞血瘀型、脾肾阳虚型)外, 还有气阴两虚、湿毒阻滞及无证可辨三种情况存在. 上海中医药大学附属曙光医院^[6]收集来源于新疆、甘肃、云南、河北、江西、江苏、上海、台湾 8 个省 491 例丙肝病例进行症、舌、脉观察统计, 对所有症状出现的频率进行频数分析, 频数几率最高的是乏力(77.4%)、其次是纳差(43.3%)、小溲黄(30.5%), 脘痞腹胀(30.5%). 采用 K 类中心聚类法进行聚类分析和主成分分析, 参照《中医诊断学》第五版教材, 初步制定为湿热蕴结证、肝郁脾虚证、肝肾亏虚证、气虚血瘀证、正虚邪留证共五型. 综上所述, 有关证型规范的研究, 还有待深入.

对于丙肝的治疗, 也是各有千秋. 陈立华 *et al* 认为疫毒之邪侵入营血, 毒瘀久聚耗气成症, 据此提出了活血解毒, 疏肝化痰, 补益肝肾的治疗方法. 选用动而不守之药, 以活血通络为主, 解毒药也应选用具有解毒与活血通络双重作用者; 疏肝理气的药物与活血化痰解毒药合理配伍使用, 可防止药性阴凝, 粘滞而加重病情; 适时补益肝肾, 病情愈短愈重者, 补益肝肾之品愈宜多用. 金实 *et al* 根据 85 例分析, 提出清热解毒, 强调扶正托毒, 应重视化瘀和络以防结症成瘤.

苏进才^[7]认为实-虚-瘀是丙肝病理所在, 清热利湿、健脾化湿、健脾益肾、活血化瘀是治疗丙肝的关键所在. 汪承伯认为应辨证与辨病结合. 急性丙肝当以清热解毒为治, 选用茵陈、栀子、黄芩、虎杖、白花蛇舌草等; 慢性丙肝轻型, 以益气养阴疏肝为治, 选用黄芪、当归、丹参、枸杞、生地、麦冬、沙参、瓜蒌、甘草等; 慢性丙肝重型, 用丹参、赤芍、丹皮、当归、生山楂、川芎、瓜蒌、葛根、徐长卿、郁金等药; 确诊为肝硬化的, 则宜加用龟板、鳖甲、山甲、三七粉、水牛角等软坚散结之品. 苏进才^[7]自拟清退方(生黄芪、丹参、连

翘、赤芍各30 g,生首乌、生山楂、丹皮、炒栀子、蒲公英各15 g,柴胡10 g,水煎服,每日1剂分2次口服。3 mo为1疗程。治疗慢性丙型肝炎128例,结果:痊愈71例,显效36例,有效12例,无效9例,治愈率53.9%,总有效率为92.9%。

洪宁^[8]拟丙肝I号由黄芪、女贞子、何首乌、桑寄生、丹参、赤芍、板蓝根、白花蛇舌草等药物组成。针对丙型肝炎热、毒、瘀、虚的病机,采用清热解毒,活血化瘀,健脾益肾为处方原则,治疗组40例,对照组30例(用 α 干扰素)。治疗6 mo时,临床症状改善明显($P<0.05$, ALT、AST有显著性降低($P<0.01$)。治疗组治疗6 mo后HCV RNA阴转率为25%,随访6 mo后HCV-RNA阴转率维持在25%;对照组阴转率为23%。提示丙肝I号对慢性丙型肝炎有较好疗效,与 α 干扰素疗效相似。

近年来,多数医者采用的是中西医结合方法,西药干扰素加上中医辨证分型组方、中医一型一方治疗丙肝,提高了治疗效果,减少了干扰素的副作用。如孙学华^[9]用清肝冲剂治疗127例慢性丙型肝炎,并用干扰素(赛诺金)为对照用药,疗程均为6 mo,随访12 mo。结果患者症状消失,治疗6 mo时肝功能中ALT、AST复常率分别为60%和52.9%。1 a时随访,ALT、AST复常率达88%。血清HCV RNA阴转率为30.71%。殷杰^{et al}^[10]认为慢性丙型肝炎的主要病机是热毒瘀结,肝脾失调,既有邪实,又有正虚,治疗应以凉血解毒,调肝运脾为大法,据此研制的丙肝宁冲剂(由水牛角、虎杖、大黄、赤芍等组成)治疗慢性丙型肝炎32例取得较好效果。并与干扰素联合病毒唑30例及单用干扰素32例治疗慢性丙型肝炎进行了随机的分组对照研究,观察到祖国传统医学在治疗慢性丙型肝炎的疗效,其近期疗效和远期疗效与干扰素联合病毒唑方案相仿($P>0.05$)。临床观察发现,丙肝宁冲剂治疗慢性丙型肝炎时有明显抗病毒作用,且无严重毒副作用,耐受性好。

3 展望

丙型肝炎发病机制复杂,多数学者认为与湿、热、疫、毒有关,但湿、热、疫、毒之间的关系如何?他们带给感染者机体气血阴阳损耗变化机制如何?临床中医辨证分型标准确定的疑难点如何解决?如何应用随机双盲法提高临床研究结果的可信度等等,都是尚待研究解决的问题。大量实践证明,中西医结合治疗丙肝是有效的,应该给予高度重视,积极研究。

4 参考文献

- 1 陈立华. 丙型肝炎的特点及中医治法. 中医杂志 1994;35:621-622
- 2 汪承伯. 关于丙型肝炎治疗对策的探讨. 中医杂志 1995;36:69
- 3 车念聪. 北京地区慢性丙型肝炎中医证候学研究及辨证分型的初步调查. 北京中医 2002;21:300-304
- 4 沈启明, 高士卿, 李金中. 丙型肝炎156例临床分析. 全国中医肝病第六届学术会议论文汇编 1994:P43-46
- 5 金实. 丙型肝炎的临床表现及中医辨证的比较研究. 中医杂志 1994;35:538-540

- 6 上海曙光医院肝病科. 慢性丙型肝炎中医辨证方案. 全国第九届中医肝胆病学术会议论文汇编 2000:P17-25
- 7 苏进才. 丙型肝炎的中医论治. 陕西中医学院学报 2003;26:24-25
- 8 洪宁. 丙肝I号治疗慢性丙型肝炎临床研究. 福建中医学院学报 2004;14:10-11
- 9 孙学华. 清肝冲剂治疗慢性丙型肝炎的研究. 上海中医药杂志 2003;37:20-22
- 10 殷杰. 丙肝宁冲剂治疗慢性丙型肝炎的临床研究. 南京中医药大学学报·自然科学版 2002;18:21-23

特殊人群的丙型肝炎特点及处理

罗新栋, 聂青和

罗新栋, 聂青和, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038

项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路1号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com

电话: 029-83377742 传真: 029-83537377

收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

罗新栋, 聂青和. 特殊人群的丙型肝炎特点及处理. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2390-2395

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2390.asp>

1 儿童丙型肝炎

1.1 流行病学 我国健康体检儿童HCV感染率约为0.7%,曾多次接受输血的患儿HCV感染率可达到22.9%。近年来根据国内存在的HCV基因型研究报道,发现常见的基因型为1-3型。目前认为感染我国人群的HCV主要是1b/ II型和2a/ III型,1a/ I型和2b/ IV型少见。香港越南尚有基因6型发现。

台湾8例手术后发生的慢性丙型肝炎患儿中的4例呈现持续性的病毒复制,但没有肝炎的临床表现。另3例有病毒血症和慢性肝炎。5例病儿的HCV基因型为2型,2例病儿为3型。临床转归与性别、年龄、受血量及HCV基因型无关。4例在手术后1-3 mo肝功能异常,2例感染HCV,1例病儿经历急性而自限性肝炎过程。其他病儿虽然肝功能回归正常值范围内,但有持续性抗-HCV和HCV病毒血症。这两个病例的HCV均为基因2型。

美国和西欧丙型肝炎占输液(血)注射后肝炎的90-95%。儿童丙肝占急性病毒性肝炎的1.7%,占所有胃肠外肝炎的11.7%。通过观察住院的38例急性丙肝患儿(男11例,女27例),年龄半岁至14岁(半岁1例,1-3岁4例,3-7岁9例,7-14岁24例)。全部病儿均在血清中发现丙肝病毒特异性抗体(抗-HCV),排除甲肝、乙肝、丁肝和细胞肥大病毒感染。大多数病前45 d-5 mo有胃肠外操作史:13.2%病儿输过血或血浆,15.8%作过静注,34.2%作过肌注,2.6%作过口腔操作,10.5%作过手术^[1-3]。

翘、赤芍各 30 g, 生首乌、生山楂、丹皮、炒栀子、蒲公英各 15 g, 柴胡 10 g, 水煎服, 每日 1 剂分 2 次口服。3 mo 为 1 疗程。治疗慢性丙型肝炎 128 例, 结果:痊愈 71 例, 显效 36 例, 有效 12 例, 无效 9 例, 治愈率 53.9%, 总有效率为 92.9%。

洪宁^[8]拟丙肝 I 号由黄芪、女贞子、何首乌、桑寄生、丹参、赤芍、板蓝根、白花蛇舌草等药物组成。针对丙型肝炎热、毒、瘀、虚的病机, 采用清热解毒, 活血化瘀, 健脾益肾为处方原则, 治疗组 40 例, 对照组 30 例(用 α 干扰素)。治疗 6 mo 时, 临床症状改善明显($P < 0.05$, ALT、AST 有显著性降低($P < 0.01$)。治疗组治疗 6 mo 后 HCV RNA 阴转率为 25%, 随访 6 mo 后 HCV-RNA 阴转率维持在 25%; 对照组阴转率为 23%。提示丙肝 I 号对慢性丙型肝炎有较好疗效, 与 α 干扰素疗效相似。

近年来, 多数医者采用的是中西医结合方法, 西药干扰素加上中医辨证分型组方、中医一型一方治疗丙肝, 提高了治疗效果, 减少了干扰素的副作用。如孙学华^[9]用清肝冲剂治疗 127 例慢性丙型肝炎, 并用干扰素(赛诺金)为对照用药, 疗程均为 6 mo, 随访 12 mo。结果患者症状消失, 治疗 6 mo 时肝功能中 ALT、AST 复常率分别为 60% 和 52.9%。1 a 时随访, ALT、AST 复常率达 88%。血清 HCV RNA 阴转率为 30.71%。殷杰 *et al*^[10]认为慢性丙型肝炎的主要病机是热毒瘀结, 肝脾失调, 既有邪实, 又有正虚, 治疗应以凉血解毒, 调肝运脾为大法, 据此研制的丙肝宁冲剂(由水牛角、虎杖、大黄、赤芍等组成)治疗慢性丙型肝炎 32 例取得较好效果。并与干扰素联合病毒唑 30 例及单用干扰素 32 例治疗慢性丙型肝炎进行了随机的分组对照研究, 观察到祖国传统医学在治疗慢性丙型肝炎的疗效, 其近期疗效和远期疗效与干扰素联合病毒唑方案相仿($P > 0.05$)。临床观察发现, 丙肝宁冲剂治疗慢性丙型肝炎时有明显抗病毒作用, 且无严重毒副作用, 耐受性好。

3 展望

丙型肝炎发病机制复杂, 多数学者认为与湿、热、疫、毒有关, 但湿、热、疫、毒之间的关系如何? 他们带给感染者机体气血阴阳损耗变化机制如何? 临床中医辨证分型标准确定的疑难点如何解决? 如何应用随机双盲法提高临床研究结果的可信度等等, 都是尚待研究解决的问题。大量实践证明, 中西医结合治疗丙肝是有效的, 应该给予高度重视, 积极研究。

4 参考文献

- 1 陈立华. 丙型肝炎的特点及中医治法. 中医杂志 1994;35:621-622
- 2 汪承伯. 关于丙型肝炎治疗对策的探讨. 中医杂志 1995;36:69
- 3 车念聪. 北京地区慢性丙型肝炎中医证候学研究及辨证分型的初步调查. 北京中医 2002;21:300-304
- 4 沈启明, 高士卿, 李金中. 丙型肝炎 156 例临床分析. 全国中医肝病第六届学术会议论文汇编 1994:P43-46
- 5 金实. 丙型肝炎的临床表现及中医辨证的比较研究. 中医杂志 1994;35:538-540

- 6 上海曙光医院肝病科. 慢性丙型肝炎中医辨证方案. 全国第九届中医肝胆病学术会议论文汇编 2000:P17-25
- 7 苏进才. 丙型肝炎的中医论治. 陕西中医学院学报 2003;26:24-25
- 8 洪宁. 丙肝 I 号治疗慢性丙型肝炎临床研究. 福建中医学院学报 2004;14:10-11
- 9 孙学华. 清肝冲剂治疗慢性丙型肝炎的研究. 上海中医药杂志 2003;37:20-22
- 10 殷杰. 丙肝宁冲剂治疗慢性丙型肝炎的临床研究. 南京中医药大学学报·自然科学版 2002;18:21-23

特殊人群的丙型肝炎特点及处理

罗新栋, 聂青和

罗新栋, 聂青和, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038

项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com

电话: 029-83377742 传真: 029-83537377

收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

罗新栋, 聂青和. 特殊人群的丙型肝炎特点及处理. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2390-2395

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2390.asp>

1 儿童丙型肝炎

1.1 流行病学 我国健康体检儿童 HCV 感染率约为 0.7%, 曾多次接受输血的患儿 HCV 感染率可达到 22.9%。近年来根据国内存在的 HCV 基因型研究报道, 发现常见的基因型为 1-3 型。目前认为感染我国人群的 HCV 主要是 1b/ II 型和 2a/ III 型, 1a/ I 型和 2b/ IV 型少见。香港越南尚有基因 6 型发现。

台湾 8 例手术后发生的慢性丙型肝炎患儿中的 4 例呈现持续性的病毒复制, 但没有肝炎的临床表现。另 3 例有病毒血症和慢性肝炎。5 例病儿的 HCV 基因型为 2 型, 2 例病儿为 3 型。临床转归与性别、年龄、受血量及 HCV 基因型无关。4 例在手术后 1-3 mo 肝功能异常, 2 例感染 HCV, 1 例病儿经历急性而自限性肝炎过程。其他病儿虽然肝功能回归正常值范围内, 但有持续性抗-HCV 和 HCV 病毒血症。这两个病例的 HCV 均为基因 2 型。

美国和西欧丙型肝炎病毒性肝炎占输液(血)注射后肝炎的 90-95%。儿童丙肝占急性病毒性肝炎的 1.7%, 占所有胃肠外肝炎的 11.7%。通过观察住院的 38 例急性丙肝患儿(男 11 例, 女 27 例), 年龄半岁至 14 岁(半岁 1 例, 1-3 岁 4 例, 3-7 岁 9 例, 7-14 岁 24 例)。全部病儿均在血清中发现丙肝病毒特异性抗体(抗-HCV), 排除甲肝、乙肝、丁肝和细胞肥大病毒感染。大多数病前 45 d-5 mo 有胃肠外操作史: 13.2% 病儿输过血或血浆, 15.8% 作过静注, 34.2% 作过肌注, 2.6% 作过口腔操作, 10.5% 作过手术^[1-3]。

国内采用ELISA法检测输血组59例、非输血组161例、健康儿童217名血清抗HCV, 结果发现阳性18名, 其中输血组11名(18.64%), 非输血组4名(2.48%), 健康儿童组3名(1.38%), 表明输血是传播丙型肝炎病毒的主要途径。

1.2 检测及临床特点 血清HCV标志检测结果表明, HCV RNA是诊断HCV感染的可靠指标。特别是免疫功能尚不完善的婴儿、免疫抑制个体和急性感染早期, 此时, 抗体尚未产生或呈低水平, 单项抗体检测可致漏诊。此外, 在慢性丙肝患者抗体阴性而病毒血症阳性的“窗口期”基因检测更具诊断价值。另一方面, 慢性HCV感染时血清HCV RNA可呈间歇阳性, 故需多次监测才能确定HCV是否被清除。有症状者多见轻-中度肝肿大和肝酶升高, 黄疸和脾肿大少见。患者乏力、虚弱、头痛、呕吐、腹痛、发热、黄疸、肝脾肿大及生化变化等与乙肝相似。而丙肝100%有肝大, 且质地较致密, 麝香草酚试验滴度升高明显(乙肝滴度较低)是急性丙肝特点。急性丙肝52.8%痊愈, 47.2%形成慢性活动性肝炎, 慢性活动性丙肝出现肝硬化时间早^[2, 4-5]。

儿童感染HCV后, 少数急性发病, 多数起病缓慢, 缺乏典型的临床症状和体征, 临床上以急性无黄疸型、亚临床型和无症状感染多见, 前者亦仅见纳差、活动耐力下降等轻微症状, 易被家长忽略, 不利于早期诊断, 常因其他疾病就诊或体检时被发现。但当合并HAV/HBV感染时, 可使临床症状加重。其中, 慢性型和无症状HCV感染儿童中混合HBV感染最为多见, 故在慢性乙肝病毒感染儿童应常规筛查HCV标志, 以尽早发现二重感染。这种二重感染对患儿肝脏病变及预后的影响, 还有待进一步观测。

韩志启 *et al* 通过25例儿童慢性丙肝与33例成人慢性丙肝对照观察, 可以看出儿童慢性丙肝肝功能ALT、病毒含量、肝纤维化指标、组织学检查及评分、活性T淋巴细胞水平(CD4)与成人组相比有显著差异。说明儿童慢性丙肝以低ALT水平、低病毒含量和极轻微的慢性肝炎组织学改变为特点。其根本因素在于儿童慢性丙肝CD4水平明显减少, NK细胞活性下降, 细胞免疫功能降低, 清除病毒能力下降, 有关资料证明CD4细胞减少易形成免疫耐受^[2]。另外儿童期对HCV病毒特异性识别T淋巴细胞克隆缺失, HCV病毒不能形成有效的细胞免疫, 而处于免疫耐受状态。因此病毒不易被清除, 但病毒处于相对稳定的状态, 不至于因剧烈的免疫反应导致明显肝损害以及并发症的发生, 使患者的病情处于相对稳定状态。这就决定了儿童慢性肝炎的病程较为延缓和良性。至于进一步澄清病毒与宿主相互关系和儿童期肝脏疾病的结果(自然病程和发病机制), 还有待于进一步临床验证, 从而指导临床治疗。

英国一个儿童与成人慢性丙型肝炎的临床和免疫组织化学的对照研究显示, 儿童慢性丙型肝炎大多数有围产期输血史(15/24例, 占65%), 是病毒感染最

常见的原因。儿童组病毒感染延续期平均为 11 ± 4 a, 成人组为 11 ± 9 a, 二者较为相似, 无统计学差异。在有输血史病例, ALT水平在儿童组(15例)平均为 63 ± 58 U/L, 成人组则为 183 ± 151 U/L($P < 0.01$), 二者有显著差异。且HCV基因分布类型相近, 均以1b型HCV为主, 分别为在儿童组占80%, 成人组则占72%, 无统计学差异。但值得注意的发现是在做肝活检的同时做病毒血症的病毒含量检测, 儿童组明显低于成人组($365, 923 \pm 33, 483$ 病毒/mL vs $558, 875 \pm 512, 132$ 病毒/mL, $P < 0.05$)。在有输血史的慢性HCV感染病例, 组织病理学发现: 炎症程度在儿童组(15例)平均为 0.6 ± 0.7 , 成人组则为 3.2 ± 1.1 ($P < 0.01$)。肝纤维化改变在儿童组平均为 0.5 ± 0.5 , 成人则为 2.6 ± 1.2 ($P < 0.01$)。全面组织学评分儿童组为 1.1 ± 1.2 , 成人组为 5.8 ± 2.3 ($P < 0.01$), 按评分等于4或小于4定义为轻度肝脏损害, 儿童组轻度肝损害者占100%(15/15), 而成人组则为44%(14/32), 严重肝损害在儿童组为0, 成人组为56%(18/32), 统计学比较有显著差异。在单克隆抗体检测中, 结果是相对应的抗原如CD69(活性T淋巴细胞)、 β_2 -MG(β_2 -微球蛋白结构表位)、ICAM-1(细胞间黏附分子-1)、VCAM-1(血管细胞黏附分子-1)、PECAM-1(血小板内皮细胞黏附分子-1)等, 儿童组水平均显著低于成人组($P < 0.01$ 或 0.001), 明显提示在生命早期存在免疫耐受状态。儿童慢性HCV感染以低ALT和低病毒含量及很轻微的慢性肝炎组织学改变为特点。患儿较弱的肝内免疫学表型的发现, 可能反映了对HCV感染有一定程度的免疫耐受存在, 提示儿童病程较为延缓和良性^[6]。

一些肝组织病理检查结果表明, 100%标本呈慢性肝炎的病理改变, 41.6%为慢性活动性肝炎, 25%为肝硬化。随访还发现, 小儿发生HCV感染后, 自愈者不多, 多数病例有向慢性肝炎发展的现象。

1.3 对生长发育的影响 李风云 *et al* 对抗HCV阳性新生儿做10-12 mo随访, 观察HCV感染指标及新生儿喂养、患病、生长发育情况。抗HCV阴转率为69.23%(9/13), 实验组新生儿母乳喂养率57%明显低于对照组85%, 实验组儿童人均患病1.25次, 而对照组儿童为0.5次, 有非常显著性差异, 身高、体重指标明显落后于对照组。母婴间存在着HCV的垂直传播, HCVRNA的存在不但增加了母婴垂直传播的比率, 而且延缓了抗HCV的阴转。HCV的感染非常明显地影响了新生儿的体格发育。对24例抗-HCV阳性患儿随访1 a表明, 感染了HCV的新生儿在生长发育方面未达标准(54.76%)明显高于正常对照组(20%), 有显著性差异。随访中1例抗HCV和HCV RNA同时阳性的男婴12 mo时(ALT阴性, 无其他疾病记载), 体重仅9 kg、身高74.8 cm, 低于同月龄婴儿平均值2个标准差。感染HCV的新生儿患病率在5-6 mo随访中两组存在明显差异。感染了HCV的新生儿母乳喂养率低, 从而导致新生儿患消化不良、肠炎、

支气管炎、肺炎、上感、贫血、佝偻病等患病率高于对照组. 由于母乳喂养率低, 患病率高等客观影响, 感染了HCV的新生儿生长发育明显落后于对照组. 研究提示母乳喂养是新生儿生长发育的关键所在, 因此抗HCV阳性的孕妇在产前急需检测HCV RNA, 对检测HCV RNA阳性的孕妇要采取干预措施, 积极治疗^[6-9].

1.4 治疗 有关儿童慢性丙型肝炎的治疗经验尚不充分. 初步临床研究结果显示, IFN α 单一治疗后的缓解率似高于成人, 对药物的耐受性也较好. 但是还应根据患儿的年龄、对药物的耐受性、合并症及患者的意愿等因素全面衡量, 以决定是否给予抗病毒治疗. 美国的方案(AASLD Practice Guideline)中明确提出对18岁以下慢性HCV感染者的IFN治疗应个别慎重地加以权衡, 对3岁以下儿童的IFN治疗是禁忌的.

1.5 预防 小儿丙型肝炎对儿童的身体健康危害很大, 为防止小儿HC的发生, 应用HCV感染的特异检测方法筛选供血者, 对血液及血制品进行有效的灭毒处理, 严格掌握输血或使用血制品的适应证, 从而达到减少丙型肝炎的发生率是极为重要的. 儿科医师也应对有输血和应用血制品的小儿作肝功能及与丙肝有关的实验室检查, 并嘱家长仔细观察症状, 从而达到对小儿HC早期诊断, 适当治疗的目的.

在大多数地方学龄儿童体检或就医时, 检查丙肝抗原不作为常规检验项目, 因此发现丙肝病例数低于乙肝. 丙型肝炎与乙型肝炎相似, 主要通过输血、使用血液制品及器官移植等引起. 丙型肝炎更容易发展成为慢性肝炎, 危害很大. 目前尚无丙肝疫苗进行预防接种, 因而避免医源性感染、避免与慢性HCV携带者密切接触是主要的预防措施.

2 孕妇与丙型肝炎

2.1 流行病学 我国近期对中国90 000人调查丙肝流行情况, HCV的感染率为2.2%, 孕妇丙型肝炎流行与正常人群无差异. 北京对患性病的妇女进行HCV感染的调查, 其抗-HCV的阳性率为13.3%, 明显高于非性病妇女的抗-HCV阳性率(2.2%). 我国未发现患性病孕妇中丙型肝炎感染率的报道. 经过对广州地区3 028例临床健康的孕妇作抗-HCV调查. 结果5 a抗-HCV(+)平均13%, PCR HCV RNA(+)0.3%, 近年有下降趋势. 另检测1 941例孕妇中抗-HCV阳性率0.93%; HBsAg阳性率11.5%, 二者重叠感染率11.1%, 且HBsAg阳性率还有逐年增长的趋势. 故提倡对孕妇产前进行抗-HCV及HBV五项标志物筛查具有重要意义.

目前有许多资料对孕妇丙型肝炎的流行作了研究, 研究的样本大小、地域差异以及实验水平及标准的不同导致研究结果也有所不同. 综合多项研究结果表明, 抗-HCV阳性率平均为1%(0.1-2.4%). Nordbo *et al*筛查了29 433例孕妇的HCV抗体阳性情况, 0.21%的孕妇HCV抗体阳性, 其中又有61%的孕妇检测出HCV RNA.

美国Alter *et al*的研究则认为, HCV抗体在孕妇中的阳性率达2-5%, 近半数孕妇有应用血制品、多个性伴侣等高危因素. 日本长田郁夫 *et al*报道HCV抗体阳性率较低, 为0.57%, HCV抗体阳性的孕妇中56% HCV RNA阳性. 埃及Agha *et al*研究结果显示了异常高的HCV感染率, 其选择的孕妇中HCV抗体阳性率高达10-20%. 刚果Laurent *et al*研究了从事性服务的孕妇及其他孕妇的丙型肝炎流行情况, 其HCV抗体检出率分别为6.6%和4.3%. 从以上研究表明, 孕妇中HCV抗体阳性率与未妊娠妇女相比并没有明显增高. 在HCV抗体阳性的孕妇中, 大约2/3检测出HCV RNA, 显示其在丙型肝炎的活动期^[4-6, 9].

2.2 HCV的母婴传播 HCV母婴传播目前已经获得确认, 有关HCV母婴传播发生率的报道较多, 但研究结果差异较大, 其感染率各家报道不一. 目前多数研究认为单独HCV感染的母亲, 母婴传播发生率大约为4-7%左右. 也有研究认为HCV母婴传播率是较高的. 日本一项综合研究报道认为, HCV母婴感染的可能性大且比例高.

基因检测已经证实HCV的宫内传播途径. 理论上宫内途径至少包括羊水途径、胎盘途径. 胎盘途径的证实已如上述. 我们应用荧光定量PCR和RT-nPCR技术检测孕妇血清和羊水标本34例. 结果羊水中HCV RNA阳性率极低, 提示羊水不是HCV母婴传播的主要途径^[10-11].

我们开展的“滋养层细胞Fe受体介导丙型肝炎病毒跨膜转运研究”(国家自然科学基金资助课题, No. 39970767)^[11-16], 在试验中以不同方式处理的HCV RNA阳性血清对培养的滋养层细胞进行感染, 以定性RT-PCR法检测感染后21 d内细胞内和培养上清中HCV RNA正负链, 同时以免疫组化方法检测各组细胞内HCV NS5、NS3、C区抗原表达. 结果HCV RNA正链在对照组、血清补体灭活组、CD16 McAb组均未检测到, 全血清组细胞内外可以间断测得; HCV RNA负链仅在全血清组细胞内间断测到. 感染6 d后检测胞质内HCV表达的NS5、NS3、C区抗原, 也仅在全血清组中发现. HCV RNA负链及HCV多抗原在全血清组的短期检出, 表明HCV可以在滋养层细胞中复制, 但持续时间有限, 抗体依赖感染增强(antibody-dependent enhancement of infection, ADE)机制在其中可能起作用. 试验初步证实, HCV感染滋养层细胞的过程中存在ADE机制. 感染时缺乏补体或使用CD16 McAb, 明显影响HCV进入滋养层细胞, 提示抗体和补体均参与了HCV的跨膜转运过程, 二者可能是协同作用, 也可能是经过不同的途径分别作用.

Conte *et al*认为出生时检测脐血中HCV RNA不能作为筛选婴儿感染HCV的指标, 因为在取样过程中很难避免母血的污染, 但在他们的研究中发现一些感染了HCV的新生儿出生时脐血中HCV RNA阴性, 说明存在出生时婴儿通过与母血接触而感染HCV的可能.

目前有关HCV通过HCV RNA阳性母亲的密切接触如母乳喂养等途径垂直传播的危险性尚无定论.多数学者认为HCV感染的母亲进行母乳喂养是安全的.HCV母婴传播的影响因素有母亲病毒血症水平、是否合并HIV感染、肝功能、分娩方式等.

2.3 临床特点与检测 大多数妊娠期丙肝患者无症状,10%以下的患者有ALT升高.急性HCV感染发生在潜伏期30~60 d后,但75%病例无症状.如果有症状,多合并甲肝或乙肝,可能有黄疸、发热、腹痛、疲劳不适、肝肿大和血清转氨酶(ALT)升高,血清ALT高峰水平低于甲肝或乙肝患者,但75%患者持续12 mo左右,随时间变化而波动,肝衰竭、暴发性肝炎较罕见.HCV传播较持久,能导致慢性肝病的发生,大多数临床症状不明显.合并HIV感染的患者能加重肝病及肝硬化,增加HCV血症.HCV较顽固,有的患者出现意志薄弱和视物不清等症状.但围产期HIV患者合并HCV感染的比率较高,其HCV RNA水平高.HCV RNA阳性母亲可垂直传播给新生儿.HIV阴性的围产期丙肝妇女,其垂直传播的几率在0~33%,平均为5.2%,远远低于HIV阳性患者.

妊娠合并丙肝90%以上的病例肝功能检查转氨酶都处于正常的水平,仅少数(6.9%)的病例孕前已经肝脏活组织病理检查证实有轻度的慢性活动性肝炎者转氨酶高出正常妊娠1.3~3倍.多数病例转氨酶正常可能与HCV感染的孕妇产生内源性干扰素有关.胎盘是产生干扰素的部位之一,在人的羊水、脐血和胎盘均发现存有干扰素.免疫组织化学检查亦证实胎儿胎盘单位中存在着具有免疫活性的干扰素.这些生理产生或HCV诱导产生的干扰素可能有助于保护肝细胞,使转氨酶处于正常水平.

有关妊娠对慢性丙型肝炎的影响研究较少,研究病例也较少.现有的研究表明,慢性丙型肝炎孕妇在孕晚期ALT明显下降或保持不变,在产后3~6 mo回升到产前水平.而在孕晚期血清HCV RNA有所上升.孕晚期ALT的改善可能与妊娠引起的血容量增加、激素水平改变以及机体免疫反应有关.血清ALT的改善和HCV RNA上升看起来互相矛盾,也不能仅用血液稀释来解释.在1篇病例报道中,1例孕妇孕期ALT正常,血清HCV RNA水平下降,产后2 wk血清中检测不到HCV RNA,该结果可能与HCV感染的自然廓清有关.另一些患慢性丙型肝炎的孕妇妊娠期肝脏疾病恶化,其孕前和产后肝组织活检显示肝组织炎症和坏死均增加.可见妊娠对慢性丙型肝炎的影响根据个体差异而不同,机体孕前和孕期的自身免疫状态决定妊娠对肝脏疾病是起改善或恶化作用.临床研究结果表明血清HCV RNA浓度在不同孕妇中有很大的差异.50%以上慢性丙型肝炎孕妇孕晚期HCV RNA水平升高,少数孕妇孕期检测不到HCV RNA,但产后HCV RNA又恢复阳性.另一些孕妇孕期HCV RNA水平升高,产后下降.

慢性丙型肝炎对妊娠过程及新生儿体重影响不大.慢性丙型肝炎孕妇的自然流产率、胎膜早破发生几率同正常孕妇无明显差异,产科并发症如妊娠期糖尿病、妊高征无明显增加.早产率有所增加,但无显著性差异.剖宫产率增加2倍,剖宫产率增加多不是因为产科原因,主要与胎心率有轻度异常或社会因素放松剖宫产指征有关.但在HCV抗体阳性的孕妇中患妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)的几率上升.前瞻性研究5 840例产前检查孕妇丙肝病毒感染与ICP的关系,56例孕妇合并有ICP(0.96%),其中12例HCV RNA阳性,在HCV RNA阳性的孕妇中发生ICP的比例(20.33%)明显高于HCV RNA阴性的孕妇(0.78%).

2.4 治疗 目前丙型肝炎的有效治疗是干扰素与病毒唑联合使用,但是妊娠期间此两种药物都属于禁止使用.若无禁忌证,患者可分娩后按照标准治疗方案进行正规抗病毒治疗.需要指出,哺乳并非抗病毒治疗的禁忌.

3 HIV/HCV混合感染

HIV与丙型肝炎病毒(HCV)具有相同的传播途径即均可通过静脉注射、性接触、母婴垂直途径传播.所以HIV与HCV混合感染病例很多见.在欧洲和美国混合感染率可达30~33%.在静脉吸毒人群中,混合感染率高达20%以上.据我国云南地区报道,HIV阳性的静脉吸毒者抗-HCV阳性率为9.4%,而一般人群HCV感染率仅为3.2%,相比有明显差异.同时HIV感染造成人体免疫功能低下,也是促进各种感染,包括HCV感染的因素之一.研究显示,HIV感染可以加速HCV疾病的进程,妨碍HCV急性感染者体内HCV的清除,导致发展为慢性感染的危险性增加,并易导致肝硬化及出现各种并发症,可见HIV与HCV之间的密切关系^[17].

有关HIV合并HCV感染率的问题,不同作者的研究结果略有差异,从56.8~100%的结果均有报告,除样本大小不同所致的误差外,主要原因是感染途径的不同,经血传播的HIV感染者合并HCV的感染率明显高于其他途径.经血途径的HIV感染者是我国当前HIV感染人群的最主要构成部分,包括不洁输血、静脉吸毒、不洁注射等^[17-19].从预防角度看,切实阻断这些途径能有效减少类似感染的发生.那么,对于已经出现HIV/HCV合并感染者,着力研究HCV对HIV感染病程的影响及处理对策乃我国医务工作者的迫切任务之一.随着高效抗逆转录病毒治疗在艾滋病临床的广泛应用,HIV感染者的发展为艾滋病的时间明显延长、生活质量显著提高,而合并HCV感染带来肝损害问题更亟需关注.

通过注射针头或污染的血制品感染HIV的患者常见有慢性丙型肝炎.此类患者较快发展至终末期肝病,自从抗逆转录酶病毒疗法开展以来,艾滋病患者的生活质量得到明显改善.合并HIV和HCV感染者发展成肝硬化和肝细胞癌的概率大大增加.HIV和HCV感染后确诊的肝细胞癌7(男7例)为研究组,有HCV感染但无

HIV感染的肝细胞癌31(男21,女10例)作对照组,进行比较.本组研究发现,同时感染HCV和HIV较单纯感染HCV患者,其发展成肝细胞癌的时间缩短,且发病年龄较年轻.作者建议,注意HIV感染者合并慢性丙型肝炎,对丙型肝炎后肝硬化的患者应定期作甲胎蛋白和腹部超声检查.

丙型肝炎合并HBV或HIV感染者,会加速慢性丙型肝炎向肝硬化或肝细胞癌的进展.对于HCV RNA阳性/HBV DNA阴性者,先给予抗HCV治疗;对于两种病毒均呈活动性复制者,建议首先以 α 干扰素加利巴韦林清除HCV,对于治疗后HBV DNA仍持续阳性者可再给予抗HBV治疗.对此类患者的治疗尚需进行深入研究,以确定最佳治疗方案.合并HIV感染也可加速慢性丙型肝炎的进展,抗HCV治疗主要取决于患者的CD4⁺细胞计数和肝组织的纤维化分期.免疫功能正常、尚无即刻进行高效抗逆转录病毒治疗指征者,应首先治疗HCV感染;正在接受抗逆转录病毒治疗、肝纤维化呈S2或S3的患者,需同时给予抗HCV治疗.但要特别注意观察利巴韦林与抗HIV核苷类似物相互作用的可能性,包括乳酸酸中毒等.对于严重免疫抑制者(CD4⁺T淋巴细胞 $<2 \times 10^8/L$),应首先给抗HIV治疗,待免疫功能重建后,再考虑抗HCV治疗^[18].

4 血液透析患者HCV感染

随着献血员HBV标志物的检测及乙肝疫苗的广泛应用,血液透析(血透)患者的HBV感染明显减少.血透患者由于长期输血,抵抗力低下,以及医源性的交叉感染等极易并发肝炎病毒感染.目前丙型肝炎感染已成为血透患者一个突出问题.由于丙型肝炎慢性化、肝硬变及肝癌的发生率高,对血透患者的长期生存质量、肾移植成功率等将造成不良影响.因此,有效预防和治疗血透患者的丙型肝炎感染将成为当前和今后一定时期内肾脏病和传染病医务工作者共同关注的课题^[22].

目前国内外维持性血透患者丙型肝炎感染率各家报道不一,最低为3.3%,最高达80%.1995年,美国39%的血透单位报告接受血透的患者丙肝发病率(抗-HCV)为10.4%,工作人员2%,在欧洲HCV是引起慢性肝炎的主要感染源,1990-1997年HCV感染在血透患者中的流行率为10-30%,年发病率为3-7%,1993年罗马尼亚血透患者抗-HCV曾高达73-100%.几个相关的研究提示,透析时间增加是抗-HCV阳性率增高的最常见原因,随着透析时间增加,丙肝发病率从12%上升到37%,这种相关性甚至在没有输血史的患者中也会发现^[19].

国内维持性血透患者抗-HCV阳性率一般为30-60%,显著高于非透析对照组的2.4%,显著高于国外报道的10.4%.国内血透患者抗-HCV阳性率高可能与我国促红细胞生成素的应用相对较少,患者多次输血、透析器的复用等有关.有资料显示,在职业献血

员中供全血的献血员抗-HCV阳性率为10.2%,而义务献血员抗-HCV阳性率为0.5%.输血是丙型肝炎的主要传播途径,我们的资料显示,绝大多数抗-HCV阳性患者均有输血或血制品史,且随着输血次数的增加抗-HCV阳性率显著提高,输血小于10次者抗-HCV阳性率小于40%,而输血大于10次者则高达70.2%.

国内外研究还发现血透患者HCV感染明显高于腹透患者,无输血史的血透患者HCV感染高达25%左右,因此认为血透患者存在非输血的医源性传播途径.国外有人用分子流行病学的方法证实血透患者存在医源性感染途径.国内用PCR方法检测到血中HCV RNA阳性患者透析液中存在HCV RNA,推测为透析膜小破口(尚未被机器察觉)引起.他们认为透析液中的HCV RNA可能反渗入血而引起交叉感染.有资料显示,血透患者抗-HCV阳性率除总体上远远高于同期腹透患者外,输血次数相同的透析患者,血透组抗-HCV阳性率亦明显高于腹透组;随血透时间的增加抗-HCV阳性率明显增高,血透时间超过3 a者阳性率高于80%;有的无输血史的血透患者出现了抗-HCV阳性,表明血透患者亦存在非输血HCV感染途径,可能还占有不小的比例.

血透患者感染HCV可能的途径有因针刺伤而引起的传播、感染控制措施不严格、接触传播、共用透析机等^[23].

血透患者感染HCV后常无症状,HCV感染的临床表现与是否血透患者无明显差异.研究表明仅不到一半患者出现乏力、纳差等症状.临床上上述症状易被误诊为尿毒症及透析本身的表现.因此单靠临床表现血透患者感染HCV后很容易被漏诊或误诊.定期查抗-HCV及肝功能是诊断血透患者感染HCV的简便方法^[20].

对血透患者感染HCV的治疗可用 α -干扰素和利巴韦林常规剂量,持续6-12 mo,但患者对干扰素耐受性较差,出现利巴韦林导致的贫血可用大剂量的促红素或者输血来处理. $\alpha 2b$ 干扰素治疗HCV I的生化和血清学反应良好,对肾移植后肝病患者也非常有益,但耐受性较差,终止治疗达半数,准备做肾移植且有HCV I的透析患者用干扰素治疗还是明智的^[21].

加强献血员的抗-HCV筛选,提倡义务献血,广泛使用促红细胞生成素,减少输血是预防维持性血透患者丙型肝炎感染的一项重要措施.血透患者的丙型肝炎医源性传播途径的预防可以从以下几方面着手:(1)透析器、穿刺针和透析管路等有条件时应1次性使用.有资料表明透析器复用组抗-HCV阳性率为60%,而1次性使用组用17%.对于复用的管路等应严格消毒,避免同池清洗,透析器复用前应作破腹试验;(2)严格无菌操作.有人观察发现护士在操作中不带手套可导致患者感染;(3)对已明确抗-HCV阳性患者采取单机透析、病房隔离等^[22].

5 参考文献

- 1 Giotakos O, Bourtsoukli P, Paraskeyopoulou T, Spandoni P, Stasinou S, Boulougouri D, Spirakou E. Prevalence and risk factors of HIV, hepatitis B and hepatitis C in a forensic population of rapists and child molesters. *Epidemiol Infect* 2003;130:497-500
- 2 Newell ML, Pembrey L. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *Drugs Today* 2002;38:321-337
- 3 Foster GR, Tudor-Williams G, White J, Regan L. Effects of mode of delivery and infant feeding on the risk of mother-to-child transmission of hepatitis C virus. *BJOG* 2003;110:91
- 4 Chanpong GF, Laras K, Sulaiman HA, Soeprapto W, Purnamawati S, Sukri N, Sie A, Tan R, Campbell JR, Corwin AL. Hepatitis C among child transfusion and adult renal dialysis patients in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:317-320
- 5 Resti M, Azzari C, Galli L, Zuin G, Giacchino R, Bortolotti F, Marcellini M, Moriondo M, de Martino M, Vierucci A. Italian study group on mother-to-infant hepatitis C virus transmission. Maternal drug use is a preeminent risk factor for mother-to-child hepatitis C virus transmission: results from a multicenter study of 1372 mother-infant pairs. *J Infect Dis* 2002;185:567-572
- 6 Ferrero S, Lungaro P, Bruzzese BM, Gotta C, Bentivoglio G, Ragni N. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a 10-year survey (1990-2000). *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:229-234
- 7 Steininger C, Kundi M, Jatzko G, Kiss H, Lischka A, Holzmann H. Increased risk of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus by intrapartum infantile exposure to maternal blood. *J Infect Dis* 2003;187:345-351
- 8 Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002;36:S106-113
- 9 Dal Molin G, D'Agaro P, Ansaldi F, Ciana G, Fertz C, Alberico S, Campello C. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: rate of infection and assessment of viral load and IgM anti-HCV as risk factors. *J Med Virol* 2002;67:137-142
- 10 聂青和, 王平忠, 周永兴. 丙型肝炎病毒感染孕妇羊水中丙型肝炎病毒 RNA 检测的临床意义. *中华妇产科杂志* 2002;37:19-21
- 11 聂青和, 白雪帆, 程勇前. 妊娠合并乙型肝炎、丙型肝炎的母婴传播机制及预防进展. *中国实用妇科与产科杂志* 2004;20:72-75
- 12 程勇前, 聂青和, 周永兴, 杜德伟, 杨华光. 人胎盘滋养层细胞的分离培养及 IgGFcγR III 在人胎盘组织中的表达. *医学研究生学报* 2002;15:105-107
- 13 程勇前, 聂青和, 周永兴, 杨华光, 李谨革. 人滋养层细胞分离培养及 HCV 体外感染试验. *第四军医大学学报* 2002;23:1544-1547
- 14 程勇前, 聂青和, 周永兴, 黄晓峰, 杨华光. 外感染丙型肝炎病毒的滋养层细胞超微结构变化. *中华妇产科杂志* 2003;38:28-29
- 15 程勇前, 聂青和, 周永兴, 黄晓峰, 罗红, 杨华光. 透射电镜及激光共聚焦技术观察体外丙型肝炎病毒感染的人胎盘滋养层细胞. *世界华人消化杂志* 2003;11:151-156
- 16 程勇前, 聂青和, 周永兴. 丙型肝炎病毒母婴传播机制研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:445-447
- 17 Chung RT, Andersen J, Volberding P, Robbins GK, Liu T, Sherman KE, Peters MG, Koziel MJ, Bhan AK, Alston B, Colquhoun D, Nevin T, Harb G, van der Horst C. Aids clinical trials group A5071 study team. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. *N Engl J Med* 2004;351:451-459
- 18 Fabrizi F, Bunnapradist S, Lunghi G, Martin P. Kinetics of hepatitis C virus load during hemodialysis: novel perspectives. *J Nephrol* 2003;16:467-475
- 19 Sartor C, Brunet P, Simon S, Tamalet C, Berland Y, Drancourt M. Transmission of hepatitis C virus between hemodialysis patients sharing the same machine. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:609-611
- 20 Furusyo N, Kubo N, Nakashima H, Kashiwagi K, Etoh Y, Hayashi J. Confirmation of nosocomial hepatitis C virus infection in a hemodialysis unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:584-590
- 21 Tanaka M, Fujiyama S, Tanaka M, Itoh K, Matsushita K, Matsushita K, Matsuyama K, Kakuda H, Tomita K. Clinical usefulness of a new hepatitis C virus RNA extraction method using specific capture probe and magnetic particle in hemodialysis patients. *Ther Apher* 2004;8:328-334
- 22 Okuda K, Yokosuka O. Natural history of chronic hepatitis C in patients on hemodialysis: case control study with 4-23 years of follow-up. *World J Gastroenterol* 2004;10:2209-2212

丙型肝炎病毒慢性感染与肝癌相关性研究

聂青和

聂青和, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心
陕西省西安市 710038
项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com
电话: 029-83377742 传真: 029-83537377
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

聂青和. 丙型肝炎病毒慢性感染与肝癌相关性研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2395-2400
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2395.asp>

1 病毒感染与肿瘤

本世纪初病毒学家们就认识到病毒能引起癌症, 1911 年 Rous 发现一种滤过性因子能引起鸡的肿瘤, 这就是 Rous 肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV). 该病毒为一种 RNA 逆转录病毒. 大约 20 a 后, Shope 发现了另一种与肿瘤有关的 DNA 病毒-兔疣头瘤病毒. 但由于缺乏更多的资料说明其他病毒与各种肿瘤之间的关系, 尤其缺乏各种人类癌症与病毒相关的资料, 致使 Rous 放弃了他早先开始的病毒与肿瘤关系的研究.

第一个逆转录病毒-人类 T 细胞白血病病毒(HTLV)的发现, 再次激起了学者对病毒感染与肿瘤发生关系研究的兴趣. 初步结果显示, 病毒感染与 20% 以上的人类肿瘤的发生有关^[1]. 目前, 已知与人类肿瘤发生有关的重要病毒、相关肿瘤及相关强度(表 1).

表 1 与人类肿瘤发生有关的病毒

病毒	相关肿瘤	相关强度
DNA 病毒		
EBV	Burkitt	++++
	鼻咽癌	+++
	霍奇金病	+
HPV	宫颈癌	+++
	上皮黏膜癌	++
HBV	原发性肝癌	+++
RNA 病毒		
HTLV	白血病	+
HIV	卡波济肉瘤	++
	淋巴瘤	+
	非霍奇金病	±
HCV	原发性肝癌	+++

通过大规模的流行病学调查和分子生物学研究已证实乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、

5 参考文献

- 1 Giotakos O, Bourtsoukli P, Paraskeyopoulou T, Spandoni P, Stasinou S, Boulougouri D, Spirakou E. Prevalence and risk factors of HIV, hepatitis B and hepatitis C in a forensic population of rapists and child molesters. *Epidemiol Infect* 2003;130:497-500
- 2 Newell ML, Pembrey L. Mother-to-child transmission of hepatitis C virus infection. *Drugs Today* 2002;38:321-337
- 3 Foster GR, Tudor-Williams G, White J, Regan L. Effects of mode of delivery and infant feeding on the risk of mother-to-child transmission of hepatitis C virus. *BJOG* 2003;110:91
- 4 Chanpong GF, Laras K, Sulaiman HA, Soeprapto W, Purnamawati S, Sukri N, Sie A, Tan R, Campbell JR, Corwin AL. Hepatitis C among child transfusion and adult renal dialysis patients in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:317-320
- 5 Resti M, Azzari C, Galli L, Zuin G, Giacchino R, Bortolotti F, Marcellini M, Moriondo M, de Martino M, Vierucci A. Italian study group on mother-to-infant hepatitis C virus transmission. Maternal drug use is a preeminent risk factor for mother-to-child hepatitis C virus transmission: results from a multicenter study of 1372 mother-infant pairs. *J Infect Dis* 2002;185:567-572
- 6 Ferrero S, Lungaro P, Bruzzzone BM, Gotta C, Bentivoglio G, Ragni N. Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a 10-year survey (1990-2000). *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82:229-234
- 7 Steininger C, Kundi M, Jatzko G, Kiss H, Lischka A, Holzmann H. Increased risk of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus by intrapartum infantile exposure to maternal blood. *J Infect Dis* 2003;187:345-351
- 8 Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2002;36:S106-113
- 9 Dal Molin G, D'Agaro P, Ansaldi F, Ciana G, Fertz C, Alberico S, Campello C. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: rate of infection and assessment of viral load and IgM anti-HCV as risk factors. *J Med Virol* 2002;67:137-142
- 10 聂青和, 王平忠, 周永兴. 丙型肝炎病毒感染孕妇羊水中丙型肝炎病毒 RNA 检测的临床意义. *中华妇产科杂志* 2002;37:19-21
- 11 聂青和, 白雪帆, 程勇前. 妊娠合并乙型肝炎、丙型肝炎的母婴传播机制及预防进展. *中国实用妇科与产科杂志* 2004;20:72-75
- 12 程勇前, 聂青和, 周永兴, 杜德伟, 杨华光. 人胎盘滋养层细胞的分离培养及 IgGFcγR III 在人胎盘组织中的表达. *医学研究生学报* 2002;15:105-107
- 13 程勇前, 聂青和, 周永兴, 杨华光, 李谨革. 人滋养层细胞分离培养及 HCV 体外感染试验. *第四军医大学学报* 2002;23:1544-1547
- 14 程勇前, 聂青和, 周永兴, 黄晓峰, 杨华光. 外感染丙型肝炎病毒的滋养层细胞超微结构变化. *中华妇产科杂志* 2003;38:28-29
- 15 程勇前, 聂青和, 周永兴, 黄晓峰, 罗红, 杨华光. 透射电镜及激光共聚焦技术观察体外丙型肝炎病毒感染的人胎盘滋养层细胞. *世界华人消化杂志* 2003;11:151-156
- 16 程勇前, 聂青和, 周永兴. 丙型肝炎病毒母婴传播机制研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:445-447
- 17 Chung RT, Andersen J, Volberding P, Robbins GK, Liu T, Sherman KE, Peters MG, Koziel MJ, Bhan AK, Alston B, Colquhoun D, Nevin T, Harb G, van der Horst C. Aids clinical trials group A5071 study team. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. *N Engl J Med* 2004;351:451-459
- 18 Fabrizi F, Bunnapradist S, Lunghi G, Martin P. Kinetics of hepatitis C virus load during hemodialysis: novel perspectives. *J Nephrol* 2003;16:467-475
- 19 Sartor C, Brunet P, Simon S, Tamalet C, Berland Y, Drancourt M. Transmission of hepatitis C virus between hemodialysis patients sharing the same machine. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:609-611
- 20 Furusyo N, Kubo N, Nakashima H, Kashiwagi K, Etoh Y, Hayashi J. Confirmation of nosocomial hepatitis C virus infection in a hemodialysis unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:584-590
- 21 Tanaka M, Fujiyama S, Tanaka M, Itoh K, Matsushita K, Matsushita K, Matsuyama K, Kakuda H, Tomita K. Clinical usefulness of a new hepatitis C virus RNA extraction method using specific capture probe and magnetic particle in hemodialysis patients. *Ther Apher* 2004;8:328-334
- 22 Okuda K, Yokosuka O. Natural history of chronic hepatitis C in patients on hemodialysis: case control study with 4-23 years of follow-up. *World J Gastroenterol* 2004;10:2209-2212

丙型肝炎病毒慢性感染与肝癌相关性研究

聂青和

聂青和, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心
陕西省西安市 710038
项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com
电话: 029-83377742 传真: 029-83537377
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

聂青和. 丙型肝炎病毒慢性感染与肝癌相关性研究. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2395-2400
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2395.asp>

1 病毒感染与肿瘤

本世纪初病毒学家们就认识到病毒能引起癌症, 1911 年 Rous 发现一种滤过性因子能引起鸡的肿瘤, 这就是 Rous 肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV). 该病毒为一种 RNA 逆转录病毒. 大约 20 a 后, Shope 发现了另一种与肿瘤有关的 DNA 病毒-兔疣头瘤病毒. 但由于缺乏更多的资料说明其他病毒与各种肿瘤之间的关系, 尤其缺乏各种人类癌症与病毒相关的资料, 致使 Rous 放弃了他早先开始的病毒与肿瘤关系的研究.

第一个逆转录病毒-人类 T 细胞白血病病毒(HTLV)的发现, 再次激起了学者对病毒感染与肿瘤发生关系研究的兴趣. 初步结果显示, 病毒感染与 20% 以上的人类肿瘤的发生有关^[1]. 目前, 已知与人类肿瘤发生有关的重要病毒、相关肿瘤及相关强度(表 1).

表 1 与人类肿瘤发生有关的病毒

病毒	相关肿瘤	相关强度
DNA 病毒		
EBV	Burkitt	++++
	鼻咽癌	+++
	霍奇金病	+
HPV	宫颈癌	+++
	上皮黏膜癌	++
HBV	原发性肝癌	+++
RNA 病毒		
HTLV	白血病	+
HIV	卡波济肉瘤	++
	淋巴瘤	+
	非霍奇金病	±
HCV	原发性肝癌	+++

通过大规模的流行病学调查和分子生物学研究已证实乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、

Epstein-Barr病毒(EBV)和人乳头瘤病毒(HPV)等与肿瘤的发生有关.近十几年来又相继发现了两种人类逆转录病毒-HTLV和人类免疫缺陷病毒(HIV)与人类肿瘤的发生关系密切.病毒引起肿瘤的详细研究有助于揭示肿瘤的发生机制以及开辟治疗和预防的新途径^[2].

2 流行病学资料

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是人类最常见的恶性肿瘤之一.在世界范围内居男性最常见恶性肿瘤的第7位,居女性第9位;在中国被列为男性恶性肿瘤的第3位,仅次于胃癌和食管癌.全世界每年大约43.7万人被诊断为HCC,其中约50%发生在中国.多数HCC在发现时已进入进展期,恶性程度高,其5a存活率小于3%.近年来的流行病学和实验室研究表明,HCC的主要发病因素有HBV或HCV慢性感染、黄曲霉素B1(aflatoxin B₁, AFB₁)的摄入以及酗酒^[2-3].在我国,HBV、HCV慢性感染是一种最常见的致病因素,在启东和广西地区还有AFB₁摄入这一因素同时存在.

HBV在肝癌病因学中的重要作用已众所周知^[4],然而在肝癌高发区日本,自积极开展乙型肝炎的免疫预防以来,乙型肝炎的发病率已逐渐下降.可与预期相反,肝癌的发病率和死亡率反而上升,特别是在男性人群.Okuda *et al*报道大阪地区男性肝癌的发病率,1966-1968年为16.3/10万人群/年,1981-1982年上升至34.2/10万人群/年.肝癌占尸检恶性肿瘤的构成比,1958-1959年为5.7%,1982年上升至14.0%.同期另一个显著的变化,是单纯肝硬化向合并肝癌的肝硬化的转变.1958-1961年单纯肝硬化与合并肝癌的肝硬化之比在尸检时大致相等,1980-1983年合并肝癌的肝硬化则是单纯肝硬化的两倍以上.

进一步调查发现,HBsAg阴性肝癌病例的增加是日本肝癌发病率和死亡率上升的主要原因.HBsAg阳性肝癌在全部肝癌中的构成比,1970年代以免疫沉淀技术检测占40%,1980年代以较敏感的方法检测却不到20%.每年每10万人群中肝癌的死亡率,在HBsAg阳性组于1968-1977年为3.9,1984-1985年为4.0,肝癌的死亡率并无明显增加.但HBsAg阴性的肝癌多不存在隐匿性HBV感染,如1988年Sakamoto *et al*报道,以斑点杂交技术检测日本国立癌症中心医院于1970-1987年手术切除的肝癌标本79例,结果血清HBsAg阴性的肝癌,92.5%(49/53)的病例在其肝组织中检不出HBV DNA.

在肝癌低发区如美国和西欧,也有与日本类似的一些发现.HBV免疫标志物阳性的肝癌占全部肝癌的比例不到1/4.HBV免疫标志物阴性的肝癌,除其中部分与酒精性肝硬化和血色病等有关外,多数病例缺乏明确的致癌因素.美国和意大利的调查也发现,伴肝硬化肝癌的发病率在升高.最近,对HBV血清免疫标志物阴性

肝癌患者的肝组织,以分子杂交法检测,有75-100%病例测不到HBV DNA;以PCR法检测,也有50-90%病例测不到HBV DNA.

临床流行病学调查发现的另一现象是输血史与肝癌的发生有着一定联系^[2,5].如Tsukuma *et al*统计分析大阪地区299例肝癌和266例非肝癌对照,经年龄、性别及其他重要因素调整后,发现输血与肝癌有显著关联性,相对危险度为4.3(95%可信区间为1.9-9.6).日本肝癌研究组于1990年公布的资料表明,23%(777/3377)的肝癌病例曾有输血史,其中63.2%的病例是在肝癌诊断10a以前输的血.因此,认为HBsAg阴性肝癌发病率的上升,可能与第二次世界大战期间由于众多伤员接受大量输血PT-NANBH发病率增高有关.继后的调查发现,抗-HCV阳性肝癌病例的输血史远较抗-HCV阴性肝癌病例多见,进一步证实了既往输血与肝癌发生有关(表2).

表2 不同慢性肝病诊断前输血史的出现率(%)

组别	HBV-M(+)	HCV-M(+)	HBV & HCV-M(+)	HBV & HCV-M(-)
慢性肝炎	2.9(7/242)	49.0(98/200)	50.0(6/12)	45.2(28/62)
肝硬化	5.5(6/110)	42.5(45/106)	23.3(3/13)	26.4(14/53)
肝癌	4.7(3/64)	38.8(31/80)	50.0(6/12)	20.0(5/25)
合计	3.8(16/416)	45.1(174/386)	40.5(15/37)	33.6(47/140)

大量血清流行病学调查发现,抗-HCV在肝癌中的检出率很高,与其在健康人群(0.5-2.1%)形成鲜明的对比.肝癌中抗-HCV的阳性率,以乙型肝炎的低发区如日本和欧洲国家较高(58-76%),而在美国、南非和乙型肝炎的高发区以及我国大陆以及台湾则相对较低(20-53%).同时发现,相当部分(12-75%)HBsAg阳性的肝癌同时抗-HCV也阳性,从而使人们考虑HCV和HBV存在协同致癌作用的可能性.为增加调查结果的准确性,继后应用新一代的检测方法作了些深入研究,使从免疫学和分子生物学两方面进一步证实HCV感染和肝癌的发生存在流行病学相关性(表2-4).

一些应用病例对照和危险度分析方法的研究表明,HCV和HBV均是肝癌的独立危险因素,HCV的作用似更强,HCV和HBV可能具有协同致癌效应^[6].意大利一项研究提示,抗-HCV阳性和HBsAg阳性的经多元回归调整之后的相对危险度,肝癌患者是对照组的77倍.

酒精被认为是肝癌的间接致病因素,他能增加机体对肝脏致癌物的敏感性.近年欧洲等工业化国家的调查发现,抗HCV的阳性率在继发于酒精性肝硬化的肝癌中也很高(56-77%),且高于酒精性肝硬化(36-39%)和酒精性肝炎(18%).这一现象提示,酒精性肝炎的病因在于酗酒,而饮酒者肝硬化和肝癌的发生则可能与HCV感染有关.

表3 血清抗-HCV在不同地区肝癌患者和献血员中的检出率(%)

国家地区	报告年份	肝癌患者		合计	献血员
		HBsAg(+)	HBsAg(-)		
意大利米兰	1989	54 (22/41)	70 (64/91)	65 (86/132)	—
意大利巴勒摩	1989	58 (18/31)	79 (134/169)	76 (152/200)	0.87
意大利罗马	1991	28 (15/53)	72 (82/114)	58 (97/167)	—
法国巴黎	1991	75 (9/12)	57 (20/35)	58 (32/55)	0.68
西班牙巴塞罗那	1989	56 (5/9)	77 (67/87)	75 (72/96)	0.50
美国迈阿密	1990	61 (11/18)	49 (20/41)	53 (31/59)	0.5–1.4
美国洛杉矶	1992	—	30 (9/30)	50 (23/46)	—
美国洛杉矶	1990	45 (10/22)	17 (5/29)	29 (15/51)	—
南非约翰尼斯堡	1990	26 (47/184)	32 (63/169)	29 (110/380)	0.7
日本长野	1990	35 (10/29)	94 (51/54)	73 (61/83)	1.3
日本大阪	1992	32 (12/28)	88 (78/89)	71 (90/127)	—
日本福岛 / 山梨	1992	17 (4/23)	74 (43/58)	58 (47/81)	1.3
中国台北	1990	17 (7/42)	63 (15/24)	33 (22/66)	0.95
中国高雄	1992	12 (12/99)	45 (13/29)	20 (25/128)	—
中国北京	1992	43 (15/35)	29 (5/17)	38 (20/52)	2.10
中国西安	1995	32 (24/756)	28 (15/53)	30 (39/129)	1.9

①献血员均为大样本资料; ②为自然人群。

表4 血清 HCV RNA 在不同地区肝癌患者中的检出率(%)

国家地区	报告年份	HBsAg(+)组	HBsAg(-)组	合计
意大利巴勒摩	1992	31(5/16)	78 (38/49)	66(43/65)
法国巴黎	1993	—	50 (12/24)	—
西班牙帕普罗那	1992	—	—	62 (42/68)
美国洛杉矶	1992	—	—	52 (24/46)
日本长野	1992	20 (4/20)	100 (20/20)	60 (24/40)
日本福岛 / 山梨	1992	35 (8/23)	86 (50/58)	75 (58/81)
中国台北	1992	—	61 (19/31)	—
中国北京	1992	64 (14/22)	50 (5/10)	59 (19/32)
中国北京	1993	—	—	49 (66/135)
中国重庆	1992	29 (20/68)	56 (14/25)	37 (34/93)
中国成都	1993	17 (4/24)	58 (14/24)	38 (18/48)

表5 不同国家和地区的 HCC 患者血清 HCV 抗体阳性率比较

<20%	20–50%	>50%
英国	莫桑比克	日本
希腊	突尼斯	意大利
中国大陆	马达加斯加	西班牙
中国香港	南非	塞内加尔
泰国	卢旺达	沙特阿拉伯
中国台湾	法国	
印度南部	葡萄牙	
巴基斯坦	奥的利	
	瑞士	
	瑞典	
	朝鲜	
	巴西	
	美国	

表6 不同地区 HCC 患者血中 HCV 抗体的阳性率

来源	抗 HCV 阳性率(%)
欧洲	28–75
美国	29–41
日本	60–80
远东	6–55
非洲	29–58
献血员	0.5–2.2

3 临床研究

在丙型肝炎的特异性检测方法建立之前, 临床随访观察就发现PT-NANBH(非甲非乙型肝炎)较乙型肝炎的慢性化机率高、预后差^[7]. 1982年 Kiyosawa *et al*对70例PT-NANBH和20例输血后乙型肝炎, 以ALT水平、

判断病程并随访1 a以上. 结果在急性PT-NANBH中, 病程超过6 mo者占65.7%(46/70), 超过1 a者占45.7%(32/70). 而输血后乙型肝炎, 除2例死于暴发性肝炎以外, 其余18例均于3 mo内恢复. 1988年瑞典Mattsson *et al*随访37例由输血或注射丙种球蛋白所致的NANBH, 发现初发肝炎时有35%(13/37)病例出现早期肝硬化组织学改变, 5 a后肝活检的5例中就有3例存在肝硬化.

迄至1989年, 继发于HANBH的肝癌全球已有6例个案报道. 因为当时没有特异性检测方法, 这些NANBH的诊断是依据血清ALT升高、HBV免疫标志物阴性, 并排除其他已知原因的肝炎. 其中, 1984年日本Kiyosama *et al*报告的1例资料较为完整, 患者第5-15 a内先后做过5次肝活检, 死后进行了尸检, 完整地观察到急性PT-NANBH向慢迁肝、慢活肝、肝硬化和肝癌转各阶段的病理改变. 1987年美国Cohen *et al*报告的1例, 则较可靠地除外了隐匿性HBV感染. 患者为48岁男性, 于慢性NANBH之后第8 a发生肝癌, 经Southern杂交检测血清、肝癌及非癌组织中的HBV DNA, 结果均为阴性.

丙型肝炎的特异性检测方法建立之后, 长期临床随访资料尽管迄今尚不多, 但是可以有力说明HCV自然清除少见, 有易向肝硬化和肝癌演变趋势, 如日本Yousuf *et al*选择符合下列条件的慢性丙型肝炎111例: (1)肝活检证实为慢性肝炎; (2)血清抗C₁₀₀和抗HCV-2 (ELA-2和RIBA-2法)均为阳性; (3)血清HBsAg和自身抗核抗体均为阴性; (4)无酒精中毒; (5)随访期间未行抗病毒治疗. 对此111例进行平均8.8(5-15 a)的生化、血清学和组织学等随访, 对其中20例同时以PCR法检测了血清HCV RNA. 至随访结束时, 抗-HCV-2无1例转阴, 抗-C₁₀₀仅4例(3.6%)转阴(其中2例仍有病毒血症). 血清ALT抗C₁₀₀和HCV-RNA均转阴的2例恢复正常, 对全部HCV标志持续阳性的62例反复做过肝活检. 结果, 组织病理改善者仅4例(6.5%), 无变化者占19例(30.6%), 恶化者39例(62.9%), 有6例(9.7%)和16例(25.8%)分别发展成肝硬化和肝癌, 慢性肝炎发展至肝硬化平均为5.6 a, 发展至肝癌平均为9.5 a. Yano *et al* 1993年报告慢性丙型肝炎(慢丙肝)和慢性乙型肝炎(慢乙肝)的对比随访研究, 经平均8.7 a的观察, 发现155例慢丙肝中分别有29.7%、14.8%的病例发展成肝硬化和肝癌, 仅2.6%的病例可被认为临床治愈. 173例慢乙肝中则只有17.3%和4.6%的病例发展成肝硬化和肝癌, 而却有38.2%的病例被临床治愈. 表明慢丙肝较慢乙肝的预后差, 更易发展成肝硬化和肝癌^[8]. HCV携带者与HCC关系(表5-7).

但是, 上述统计学数据仅说明在HCC患者中HCV感染较为集中, 提示HCV感染与HCC发生有某种关联, 但不能作为这种嗜肝病毒致癌性的确切证据. 长期的追踪随访研究, 包括转基因动物在内的实验室研究以及未来的应用病毒疫苗进行临床干预研究将提供更有价值的资料.

表7 HCV携带者HCC的相对危险性

地区	病例数 / 对照数(n)	相对危险性(%)
美国		
迈阿密	87/200	134.0
洛杉矶	51/128	10.5
非洲		
南非	380/152	61.5
塞内加尔	80/136	19.8
欧洲		
意大利	212/212	68.1
希腊	185/467	6.3
亚洲		
日本	91/410	52.3
中国台湾	128/384	6.9

4 分子生物学研究

不同基因型的HCV在肝癌病因学中所起的作用有无差别, 目前尚未肯定. 流行病学资料显示, 虽然日本和美国自然人群中的HCV感染率大致相同, 但日本HCV相关性肝癌的发生却显著高于美国. Kaneko在1991年日美两国召开的HCV与肝癌会议上提出, 这种差异可能与HCV的异质性有很大关系. 最近, 对不同地区、不同肝病人群中HCV基因分型的一些初步研究, 也提示不同基因型HCV的临床效应并不相同, 与肝癌的发生似也有一定内在联系, 如Yamada *et al*应用5' -NC区引物的分型PCR法研究, 表明HCV的基因型与疾病的转归有关联, 感染II型HCV患者的预后可能性较差. Takada *et al*应用NS5区引物的PCR-RFLP和PCR-SB法研究, 发现52例肝癌患者中的HCV有41例(79%)均为K1(相当于II)型, 其中来自中国的2例和西班牙的7例均为K1型. Honda *et al*从5例肝癌组织中分别克隆出5株HCV部分CDNA(5' -NC、C、E₁和E₂/S₁区)片段, 核苷酸序列同源性比较表明此5株均属于II型. 国内北京医科大学以5' -NC区引物的PCR-RFLP法研究, 14例广西有癌患者中的HCV, 也均属于II型. Okamoto *et al*应用区引物的分型PCR法调查献血员和不同肝病共250例中的HCV基因型, 结果17例肝癌虽以II型感染多见(47%), 但I型(11%)、III型(18%)也占相当的比例, 与献血员及其他肝病比较似无多大差别. 这种差异或许与分型方法不同有关, 今后亟需统一分型标准, 广泛开展国内外协作, 进行多中心的临床分子流行病学联合调研, 和不同基因型HCV感染的临床随访等研究, 进一步阐明这一问题^[9].

从血清HCV浓度来看, 不同慢性肝病和献血员之间的病毒复制水平似有量的差异. 如Hagiwara *et al*报道血清HCV RNA的对数变换拷贝数, 肝癌(7.9 ± 0.7, n=15)、肝硬化(7.8 ± 0.7, n=12)、慢活肝(7.9 ± 0.8, n=48)和慢迁肝(7.3 ± 1.1, n=20)明显高于无症状献血员

(5.4 ± 2.0 , $n=9$)($P<0.01$). 说明晚期肝病的 HCV 复制水平较高, 而病毒复制水平增高在肝损伤和肝病的进展过程中可能起着重要作用. 肝癌患者不仅血清中持续存在 HCV RNA, 而且肝癌和癌旁组织中均可检出 HCV 基因组 RNA 和复制中间体 RNA(负链 RNA), 证明肝癌组织中确有 HCV 复制. 血清 HCV RNA 与同病例的癌与癌旁的 HCV 序列(C/E, NS₃)比较, 并无差别.

晚近资料表明, HCV II(1b)型与肝癌相关性更密切. 有人通过调查表方式研究 14 个医院中慢性肝炎、肝硬化及肝癌患者 HCV 亚型. 在每个医院中, 除个别外, 肝硬化及肝癌患者中 1b 相关亚型(包括 1b 和 2a 或 2b 混合型)的流行率高于慢性肝炎患者. 在所有 14 个医院的总结资料中, 发现有慢性肝炎的 1 922 例, 伴有 HCV 1b 相关亚型的有 1 370 例(占 71.2%). 在 356 例肝硬化及 426 例肝癌病例中, 伴有 1b 相关亚型的分别占 79.8%、80.5%. 肝硬化及肝癌患者 HCV 1b 亚型发生率显著高于慢性肝炎患者, 而在肝硬化及肝癌患者中无显著差异. 这些结果提示, 虽然还不很清楚 HCV 1b 亚型特性, 但其致癌性比 2a、2b 亚型更强. 有人发现, 与 HCV I 型相比, II 型感染显著增加了肝癌危险性(RR=3.8, 95% CI=1.0–11.9).

5 HCV 与其他致癌因素协同作用

HCV 与 HBV 协同致癌作用报道. 有人对台湾省 128 例肝癌患者和 384 例年龄、性别、配对的对照组进行了研究. 肝癌患者中 HBsAg 和抗-HCV 的阳性率明显高于对照组($P<0.001$). HBsAg 和抗-HCV 是肝癌重要的危险因子(相对危险性分别为 13.96、27.12). 当 HBsAg 和抗-HCV 同时存在时, 肝癌的危险性显著加至 40.05. 有人在南非收集了 231 例黑人肝癌患者血样, 并与 4 家医院中对照患者进行了配对比较. 结果与无 HBV 或 HCV 感染血清学证据的人群相比较, 仅 HBsAg 阳性者发生肝癌的危险性增加达 6.6 倍. 乙肝与丙肝标志物同进存在时, 在增加肝癌危险性方面有一个协同作用(RR 为 82.5). 有人报道, HBV 和 HCV 重叠感染引起的肝硬化患者发生肝癌的机率比非病毒所致的肝硬化患者高 6.3 倍. 研究表明, HCV 与酒精协同作用^[10]. 有人发现, 抗-HCV 阳性率在有或无肝癌的酒精性肝硬化患者中显著的差异(76.6% vs 38.7%, $P<0.01$), 在原因不明肝硬化的肝癌患者抗-HCV 阳性率为 81.4%, 与单纯性肝硬化 77.5% 相似, 因此认为 HCV 可能是酒精性肝硬化患者发展为肝癌的关键因子. 有人检测了 204 例 HBsAg 阴性, 而抗-HCV 阳性的肝硬化患者, 发现酗酒者肝癌发生率(10 a、20 a、30 a 分别为 4.8%、49.4%、74.8%)比非酗酒者明显低(0%、21%和 23.3%, $P<0.01$). 酗酒者进展成肝硬化时间为 22.4 ± 4.4 a, 明显短于非酗酒者(28.4 ± 3.9 a, $P<0.01$). 在法国由酗酒所致的 HCC 伴肝硬化患者中, 41% 存在抗-HCV 阳性, 而未发生肝癌的肝硬化患者中为 23% 阳性, 提示 HCV 感染与酗酒有协同致癌作用.

6 HCV 致癌机制

HCV 的致癌机制尚不明确, HCV 在体内不断变异的意义不可能仅在于逃避宿主免疫清除, 而在体内长期贮存与复制, 造成持续的慢性感染, 肝细胞变性坏死与再生的反复发生. 一些证据提示还可能与 HCV 的直接细胞毒作用和宿主介导的免疫损伤有关. 反复再生的肝细胞可能不断积累细胞基因的突变, 最终发生恶性转变^[11].

在实验动物及人类中发现的胰岛素样生长因子 II (IGF II) 与肝癌发生有关. Rosmorduc *et al* 通过半定量 RT-PCR 方法分析了 HCV 相关的慢性肝炎、肝硬化、肝癌患者肝脏中成人 P1 和胚胎 P3、P4、IGF II 促进子转录体水平. 从正常到 CAH 和肝硬化, 成人 P1 促进子转录体逐渐增加, 但 5/7 例肝癌患者肿瘤区未能检出 P3 促进子的转录体, 而却在 CAH 的所有肝硬化患者中大量表达. 3/9 例 CAH 和大多数肝硬化患者中胚胎 P4 促进子水平高. 尽管从转录体中所获促进子表达水平在肝癌中比肝硬化中低, 但也能检出. 肝癌患者中胚胎型 P3、P4 促进子活性在非癌组织高于癌组织. 通过增生细胞核抗原(PCNA)基因表达发现, IGF II 转录体表达与细胞有丝分裂活性相关. 从正常到 CAH 到肝硬化 PCNA, mRNA 水平逐渐增加, 肝癌患者的癌组织及非癌组织中 IGF II 转录体持续高水平, 显示 CAH 及肝硬化中 IGF II 转录体的增加, 伴随这些样本中细胞有丝分裂活化^[12]. Shimizu *et al* 研究表明, HCV 复制可介导 TGF α 、IGF II 共同表达, 可作为肝癌起始因子. 并且, HCV 致癌作用可能与 HCV 核心蛋白与肿瘤坏死因子受体(TNF-R)结合有关.

研究表明, HCV 核心蛋白可激活 Fas 介导的细胞凋亡机制而引起肝实质损伤, 继而导致肝细胞修复性增生^[13]. 肝细胞更新的加速为其他致癌因子的作用提供了更多机会, 这可能是 HCV 促进肝硬化中 HCC 发生的重要机制之一^[14]. 此外, HCV 核心蛋白分子中含有 2 个保守的核定位信号和 1 个 DNA 结合位点, 提示其具有基因调节功能. 已有报道指出, HCV 核心蛋白具有协同 H-ras 各 c-myc 转化大鼠胚胎原代成纤维细胞的能力及抑制 p53 蛋白及其下游基因表达的活性, 应用 HCV NS-3 序列转染 NIH3T3 细胞也能使其转化. 此研究工作将会是 HCV 致 HCC 发生机制研究的热点之一^[15].

最近 Moriya *et al* 成功地建立 HCV C 蛋白转基因小鼠肝癌模型. 对转 HCV-C 基因的小鼠进行长期的观察发现, 早期可观察到与丙型肝炎肝组织改变相一致的肝脂肪变性, 到 16 mo 时则可观察到肿瘤. 起初为含脂肪小滴的腺瘤, 进而在腺瘤中发生低分化肝细胞癌结节, 不含脂肪小滴, 形态也和 HCV 引起的肝癌相一致. Chang *et al* 用 HCV-C 及 NS3 转染 NIH3T3 细胞, 当 C 蛋白及 NS3 高表达时, 可使细胞转化并发现 HCV NS5A 在肝细胞内可发挥转录活化功能, 通过破坏 PKR(RNA-dependent protein kinase)抑制 PKR 抗病毒和抗肿瘤作用, 以及影响细胞正常生长, 出现细胞过度增生. 因此 HCV 的致癌作用可能是多种 HCV 蛋白参与, 在漫长炎症过程中形成的结果^[16–17].

7 参考文献

- 1 胡大荣. 病毒感染与肿瘤. 见: 李梦东. 实用传染病学. 第二版, 北京: 人民卫生出版社, 1998:874-880
- 2 苏勤. 病毒性肝炎致癌机制. 见: 刘泽富, 聂青和. 病毒性肝炎的诊断与治疗. 北京: 人民军医出版社, 2001:221-240
- 3 Omata M, Yoshida H. Prevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2004;10:S111-114
- 4 Kirk GD, Lesi OA, Mendy M, Akano AO, Sam O, Goedert JJ, Hainaut P, Hall AJ, Whittle H, Montesano R. The gambia liver cancer study: Infection with hepatitis B and C and the risk of hepatocellular carcinoma in West Africa. *Hepatology* 2004; 39:211-219
- 5 Sarbah SA, Gramlich T, Younoszai A, Osmack P, Goormastic M, Grosso L, Cooper JN, Di Bisceglie A, Seneca R, Younossi ZM. Risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2004;49:850-853
- 6 Trevisani F, Cantarini MC, Labate AM, De Notariis S, Rapaccini G, Farinati F, Del Poggio P, Di Nolfo MA, Benvegnu L, Zoli M, Borzio F, Bernardi M. Surveillance for hepatocellular carcinoma in elderly Italian patients with cirrhosis: effects on cancer staging and patient survival. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1470-1476
- 7 聂青和. 丙型肝炎病毒感染无关的非甲非乙型肝炎. 见: 郝飞. 丙型肝炎—基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 1998:223-240
- 8 Suriawinata A, Xu R. An update on the molecular genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2004;24:77-88
- 9 Lee JS, Chu IS, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, Durnez A, Demetris AJ, Thorgeirsson SS. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004;40:667-676
- 10 Watabe H, Shiratori Y, Tateishi R, Fujishima T, Akamatsu M, Koike Y, Obi S, Hamamura K, Sato S, Teratani T, Shiina S, Omata M. Clinical features of patients with HCC who are negative for both HBV and HCV markers. *Hepatogastroenterology* 2003;50:2157-2160
- 11 Kulesza P, Torbenson M, Sheth S, Erozan YS, Ali SZ. Cytopathologic grading of hepatocellular carcinoma on fine-needle aspiration. *Cancer* 2004;102:247-258
- 12 Morishita A, Masaki T, Yoshiji H, Nakai S, Ogi T, Miyauchi Y, Yoshida S, Funaki T, Uchida N, Kita Y, Funakoshi F, Usuki H, Okada S, Izuishi K, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S. Reduced expression of cell cycle regulator p18(INK4C) in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004;40:677-686
- 13 聂青和, 李梦东. 肝病中的肝细胞凋亡. 中华传染病杂志 1997; 15:122-124
- 14 聂青和, 李梦东, 胡大荣, 陈国致. HCV感染后机体保护性免疫缺陷原因探讨. 世界华人消化杂志 2000;8:28-30
- 15 Narimatsu T, Tamori A, Koh N, Kubo S, Hirohashi K, Yano Y, Arakawa T, Otani S, Nishiguchi S. p16 promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma with or without hepatitis virus infection. *Intervirology* 2004;47:26-31
- 16 Samonakis DN, Koutroubakis IE, Sfiriadaki A, Malliaraki N, Antoniou P, Romanos J, Kouroumalis EA. Hypercoagulable states in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2004;49:854-858
- 17 Marotta F, Vangieri B, Cecere A, Gattoni A. The pathogenesis of hepatocellular carcinoma is multifactorial event. Novel immunological treatment in prospect. *Clin Ter* 2004;155:187-199

张绪清. 慢性丙型肝炎与自身免疫性肝炎关联性研究. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2400-2402

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2400.asp>

0 引言

慢性丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)感染所致的一种慢性肝脏炎症性疾病, 易发展成肝硬化, 并与原发性肝癌的关系密切. 据估计, 全球约有1.7亿慢性HCV感染者. 在日本和欧美等国家, 慢性HCV感染是慢性肝炎、肝硬化和原发性肝癌的主要病因. 自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种原因不明的肝脏持续性炎症性疾病, 是由于机体免疫系统对自身抗原的免疫耐受性丧失致使其攻击自身的肝组织抗原而导致肝组织炎症坏死. 自身免疫性肝炎多见于成年女性, 其他人群也可发生. 不同国家和地区报告的自身免疫性肝炎的发病率存在较大差异, 挪威为160-170/10万、意大利为0.01-0.02%、北欧为1.9/10万^[1-2]. 近年, 我国自身免疫性肝炎的发病率也呈增加趋势. 宿主遗传易感性、病毒感染、环境污染、疫苗预防接种及药物等都与自身免疫性肝炎的发生存在某种关联^[1, 3-4]. 自从1989年证实HCV感染存在后, 就发现慢性HCV感染者伴有混合冷丙种球蛋白血症、膜增生性肾小球肾炎、Sjögren综合征等自身免疫现象存在^[5]. 有关慢性HCV感染与自身免疫性肝炎的关系更是引起国内外学者的关注, 现将有关的研究进展综述介绍如下.

1 自身免疫性肝炎的分型^[6]

目前国际上通常根据血清中自身抗体的类型将自身免疫性肝炎分为三种类型: AIH-1、AIH-2和AIH-3. 血清中存在平滑肌抗体(SMA)和/或抗核抗体(ANA)者为AIH-1, 存在抗肝肾微粒体抗原的自身抗体(抗-LKM-1或抗-LKM-3)者为AIH-2, 存在抗可溶性肝抗原(抗-SLA)或抗肝胰抗原(抗-LP)的自身抗体者为AIH-3. AIH-1在临床上最常见, 多见于中年女性. AIH-2常发生于2-14岁的儿童, 在成人自身免疫性肝炎中, 仅4%属于此型. 与AIH-1相比, AIH-2患者血清总胆红素、转氨酶水平更高, 肝组织炎症更重, 且更容易进展到肝硬化. AIH-3很少见, 且常具有AIH-1的部分特征, 因此有人认为AIH-3仅仅是AIH-1一个不常见的变异形式而不是一个独立的亚型.

2 自身免疫性肝炎的发病机制^[1-2, 6]

自身免疫性肝炎的发病机制相当复杂, 且并未完全阐明, 现简要介绍如下: (1)宿主遗传易感性与自身免疫性肝炎的发生存在某种关联, 如AIH-1常发生于HLA-DR3(DRB1*0301)和/或DR4(DRB1*0401)阳性的人群; AIH-2的基因倾向性尚未完全明了, 其在欧洲和南美洲某些国家比在美国更常见, 其易感性也可能与DRB1*0701存在某种关联; (2)针对肝组织中无唾液酸糖蛋白受体

慢性丙型肝炎与自身免疫性肝炎关联性研究

张绪清

张绪清, 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

项目负责人: 张绪清, 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. xueqing651005@tom.com

收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

7 参考文献

- 1 胡大荣. 病毒感染与肿瘤. 见: 李梦东. 实用传染病学. 第二版, 北京: 人民卫生出版社, 1998:874-880
- 2 苏勤. 病毒性肝炎致癌机制. 见: 刘泽富, 聂青和. 病毒性肝炎的诊断与治疗. 北京: 人民军医出版社, 2001:221-240
- 3 Omata M, Yoshida H. Prevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2004;10:S111-114
- 4 Kirk GD, Lesi OA, Mendy M, Akano AO, Sam O, Goedert JJ, Hainaut P, Hall AJ, Whittle H, Montesano R. The gambia liver cancer study: Infection with hepatitis B and C and the risk of hepatocellular carcinoma in West Africa. *Hepatology* 2004; 39:211-219
- 5 Sarbah SA, Gramlich T, Younoszai A, Osmack P, Goormastic M, Grosso L, Cooper JN, Di Bisceglie A, Seneca R, Younossi ZM. Risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2004;49:850-853
- 6 Trevisani F, Cantarini MC, Labate AM, De Notariis S, Rapaccini G, Farinati F, Del Poggio P, Di Nolfo MA, Benvegnu L, Zoli M, Borzio F, Bernardi M. Surveillance for hepatocellular carcinoma in elderly Italian patients with cirrhosis: effects on cancer staging and patient survival. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1470-1476
- 7 聂青和. 丙型肝炎病毒感染无关的非甲非乙型肝炎. 见: 郝飞. 丙型肝炎—基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 1998:223-240
- 8 Suriawinata A, Xu R. An update on the molecular genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2004;24:77-88
- 9 Lee JS, Chu IS, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, Durnez A, Demetris AJ, Thorgeirsson SS. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004;40:667-676
- 10 Watabe H, Shiratori Y, Tateishi R, Fujishima T, Akamatsu M, Koike Y, Obi S, Hamamura K, Sato S, Teratani T, Shiina S, Omata M. Clinical features of patients with HCC who are negative for both HBV and HCV markers. *Hepatogastroenterology* 2003;50:2157-2160
- 11 Kulesza P, Torbenson M, Sheth S, Erozan YS, Ali SZ. Cytopathologic grading of hepatocellular carcinoma on fine-needle aspiration. *Cancer* 2004;102:247-258
- 12 Morishita A, Masaki T, Yoshiji H, Nakai S, Ogi T, Miyauchi Y, Yoshida S, Funaki T, Uchida N, Kita Y, Funakoshi F, Usuki H, Okada S, Izuishi K, Watanabe S, Kurokohchi K, Kuriyama S. Reduced expression of cell cycle regulator p18(INK4C) in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004;40:677-686
- 13 聂青和, 李梦东. 肝病中的肝细胞凋亡. 中华传染病杂志 1997; 15:122-124
- 14 聂青和, 李梦东, 胡大荣, 陈国致. HCV感染后机体保护性免疫缺陷原因探讨. 世界华人消化杂志 2000;8:28-30
- 15 Narimatsu T, Tamori A, Koh N, Kubo S, Hirohashi K, Yano Y, Arakawa T, Otani S, Nishiguchi S. p16 promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma with or without hepatitis virus infection. *Intervirology* 2004;47:26-31
- 16 Samonakis DN, Koutroubakis IE, Sfirdaki A, Malliaraki N, Antoniou P, Romanos J, Kouroumalis EA. Hypercoagulable states in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2004;49:854-858
- 17 Marotta F, Vangieri B, Cecere A, Gattoni A. The pathogenesis of hepatocellular carcinoma is multifactorial event. Novel immunological treatment in prospect. *Clin Ter* 2004;155:187-199

张绪清. 慢性丙型肝炎与自身免疫性肝炎关联性研究. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2400-2402

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2400.asp>

0 引言

慢性丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)感染所致的一种慢性肝脏炎症性疾病, 易发展成肝硬化, 并与原发性肝癌的关系密切. 据估计, 全球约有1.7亿慢性HCV感染者. 在日本和欧美等国家, 慢性HCV感染是慢性肝炎、肝硬化和原发性肝癌的主要病因. 自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种原因不明的肝脏持续性炎症性疾病, 是由于机体免疫系统对自身抗原的免疫耐受性丧失致使其攻击自身的肝组织抗原而导致肝组织炎症坏死. 自身免疫性肝炎多见于成年女性, 其他人群也可发生. 不同国家和地区报告的自身免疫性肝炎的发病率存在较大差异, 挪威为160-170/10万、意大利为0.01-0.02%、北欧为1.9/10万^[1-2]. 近年, 我国自身免疫性肝炎的发病率也呈增加趋势. 宿主遗传易感性、病毒感染、环境污染、疫苗预防接种及药物等都与自身免疫性肝炎的发生存在某种关联^[1, 3-4]. 自从1989年证实HCV感染存在后, 就发现慢性HCV感染者伴有混合冷丙种球蛋白血症、膜增生性肾小球肾炎、Sjögren综合征等自身免疫现象存在^[5]. 有关慢性HCV感染与自身免疫性肝炎的关系更是引起国内外学者的关注, 现将有关的研究进展综述介绍如下.

1 自身免疫性肝炎的分型^[6]

目前国际上通常根据血清中自身抗体的类型将自身免疫性肝炎分为三种类型: AIH-1、AIH-2和AIH-3. 血清中存在平滑肌抗体(SMA)和/或抗核抗体(ANA)者为AIH-1, 存在抗肝肾微粒体抗原的自身抗体(抗-LKM-1或抗-LKM-3)者为AIH-2, 存在抗可溶性肝抗原(抗-SLA)或抗肝胰抗原(抗-LP)的自身抗体者为AIH-3. AIH-1在临床上最常见, 多见于中年女性. AIH-2常发生于2-14岁的儿童, 在成人自身免疫性肝炎中, 仅4%属于此型. 与AIH-1相比, AIH-2患者血清总胆红素、转氨酶水平更高, 肝组织炎症更重, 且更容易进展到肝硬化. AIH-3很少见, 且常具有AIH-1的部分特征, 因此有人认为AIH-3仅仅是AIH-1一个不常见的变异形式而不是一个独立的亚型.

2 自身免疫性肝炎的发病机制^[1-2, 6]

自身免疫性肝炎的发病机制相当复杂, 且并未完全阐明, 现简要介绍如下: (1)宿主遗传易感性与自身免疫性肝炎的发生存在某种关联, 如AIH-1常发生于HLA-DR3(DRB1*0301)和/或DR4(DRB1*0401)阳性的人群; AIH-2的基因倾向性尚未完全明了, 其在欧洲和南美洲某些国家比在美国更常见, 其易感性也可能与DRB1*0701存在某种关联; (2)针对肝组织中无唾液酸糖蛋白受体

慢性丙型肝炎与自身免疫性肝炎关联性研究

张绪清

张绪清, 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

项目负责人: 张绪清, 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. xueqing651005@tom.com

收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

(ASGPR)等自身抗原的抑制性T细胞(Ts)功能存在缺陷,宿主免疫系统对肝组织抗原等自身抗原的免疫耐受丧失,致使其对肝组织等产生持续的细胞免疫应答和体液免疫应答(产生自身抗体);(3)外界因素如病毒感染等启动宿主免疫系统对ASGPR等自身抗原产生T细胞和B细胞应答并持续存在;(4)CD8⁺的细胞毒性T细胞(CTL)攻击肝组织中的ASGPR、肝肾微粒体抗原等自身抗原导致肝组织炎症损伤,血中的自身抗体与肝组织中相应的自身抗原结合产生抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用,从而引起肝组织的炎症坏死.另外,细胞黏附分子(如细胞间黏附分子-1, ICAM-1)、细胞因子等在自身免疫性肝炎的发生中也起一定的作用.

3 慢性丙型肝炎血中与自身免疫性肝炎相关的自身抗体^[7-8]

过去10 a有关慢性丙型肝炎与自身免疫性肝炎关联性研究的文献不断涌现,文献资料显示慢性HCV感染者血中可检测到许多与自身免疫性肝炎相关的自身抗体.在慢性HCV感染者血清中,与AIH-1相关的ANA检出率为9-38%,SMA检出率为5-91%、多数报告为20%左右;与AIH-2相关的抗-LKM-1检出率为2-30%,Beland *et al*报告与AIH-2相关的针对1型肝胞质溶胶的抗体(抗-LC1)在慢性HCV感染者中的检出率为12%.

4 慢性丙型肝炎相关的自身免疫^[9]

在临床上,经常见到慢性丙型肝炎伴有自身免疫现象存在.一组资料显示慢性丙型肝炎患者中,36%伴有混合冷丙种球蛋白血症,70%类风湿因子阳性,41%组织自身抗体(包括ANA、SMA、抗-LKM及抗甲状腺抗体)阳性,49%伴有唾液腺损害,5%伴有扁平苔癣.

混合冷丙种球蛋白血症是一种免疫复合物介导疾病,一般分为I、II、III三型,常伴有由多克隆IgG和单克隆IgM组成的冷沉淀免疫球蛋白,血补体C3、C4降低.混合冷丙种球蛋白血症常由于免疫复合物沉积而出现损害的表现.近年研究证实,HCV感染与II、III混合冷丙种球蛋白血症的发生密切相关.HCV是一种嗜淋巴细胞病毒,病毒对免疫系统的持续刺激可能是慢性HCV感染者出现混合冷丙种球蛋白血症的主要原因.在混合冷丙种球蛋白血症患者中,90%以上的人血清HCV RNA阳性,而且发现HCV RNA是冷沉淀的重要组成部分.此外,混合冷丙种球蛋白血症患者用 α 干扰素治疗有效也提示HCV感染是其病因之一.

另外,膜增生性肾小球肾炎、Sjögren综合征、自身免疫性甲状腺疾病及迟发性皮肤卟啉症等自身免疫性疾病也与慢性HCV感染存在关联.如Fargion *et al*报告迟发性皮肤卟啉症患者血清抗-HCV阳性率高达76%、对照组仅为1-4%,Navas *et al*报告西班牙迟发性皮肤卟啉症患者血清HCV RNA阳性率为45%、肝组

织HCV RNA阳性率为100%.

5 慢性丙型肝炎与自身免疫性肝炎相关性的根据

自身免疫性肝炎的发病可以是急性的、甚至是暴发性的.对此类患者的病理组织学检查,可发现严重的小叶性肝炎或多个小叶的塌陷,这些“急性”的表现提示了病毒作为疾病起因的可能.既往的一些研究证实急性甲型肝炎病毒(HAV)或EB病毒(EBV)感染与自身免疫性肝炎的发生关系密切,近年的研究结果进一步提示HAV、EBV、麻疹病毒、乙型肝炎病毒(HBV)等病毒感染可能是某些自身免疫性肝炎的始动因子^[1].自HCV发现后,已有人类免疫缺陷病毒(HIV)感染后发展为自身免疫性肝炎的报告,特别是有患者自身免疫性肝炎发生在HIV与HCV共同感染后,由此联想到HCV感染是否也可能与自身免疫性的发生存在关联.近10 a的研究结果显示慢性丙型肝炎可能与自身免疫性肝炎的发生存在某种关联,多数学者认为慢性丙型肝炎与AIH-2的发生关系较为密切.现将有关慢性丙型肝炎与自身免疫性肝炎相关性的根据归纳介绍如下.

在临床上,20%的自身免疫性肝炎患者病程自限,还有部分患者治疗结束后发生不可预测的加重等表现都与慢性丙型肝炎相似.还发现患者的配偶也会出现免疫学标志,提示他们可能暴露于一个共同的病毒或环境因素.

慢性丙型肝炎患者血清中与自身免疫性肝炎相关的自身抗体(ANA、SMA、抗-LKM-1、抗-LC1)检出率较高,并存在许多其他自身免疫现象,也支持HCV感染为自身免疫性肝炎起因的假说,最有力的证据为Mackie所报告的1例患儿,该患儿因抗 α 1胰蛋白酶缺乏症行肝移植术时感染了HCV,HCV感染后继发出现抗-LKM-1阳性^[7-8].Vento *et al*^[9]也报告了1例HCV感染引起的AIH-2.该患者为一名29岁的护士,感染了HCV并最终清除病毒,在急性HCV感染期间血中检测到IgM型抗-LKM-1,随后转为IgG型抗-LKM-1,而且这些自身抗体能与细胞色素P450 II D6(CYP2D6)抗原257-269位氨基酸序列发生反应,作者认为这是1例真正由HCV感染所引发的自身免疫性肝炎(AIH-2).

在AIH-1和AIH-2患者中确实存在着明确的HCV感染,很可能HCV感染刺激了HLA在肝细胞表面的表达,从而增加了组织对免疫攻击的敏感性,或者HCV感染刺激了内源性干扰素的产生,以此促进了HLA在靶组织表面的表达和抑制了Ts细胞的功能.所以,除了自身免疫性肝炎外,HCV感染还可并发其他自身免疫现象.

AIH-2患者血清中的抗-LKM-1攻击的靶抗原是CYP2D6.现有的研究证实HCV E1蛋白310-324位氨基酸序列与CYP2D6抗原254-271位氨基酸序列存在同源性.另有学者研究发现,HCV蛋白多个区段(C、E1、NS5)氨基酸排列与细胞色素P450抗原呈不连续性同源

性.进一步用按照 HCV 蛋白和细胞色素 P450 抗原序列合成的多肽建立 ELISA 检测相应抗体,证实二者间有交叉免疫反应. Manns *et al* 报告 85% 的 AIH-2 患者血中的抗-LKM-1 能与 HCV E1 蛋白 310-324 位氨基酸序列及 CYP2D6 抗原 254-271 位氨基酸序列发生免疫沉淀反应. 上述研究表明, HCV 蛋白与细胞色素 P450 间存在抗原的分子模拟, 这为 HCV 感染易并发自身免疫寻找客观依据. 由于 HCV 蛋白与细胞色素 P450 抗原存在交叉免疫, 这样 HCV 感染后可以通过一系列机制激活 T 细胞和 B 细胞, 引起自身免疫性肝炎^[1-2].

然而, 临床上也有一些资料并不支持 HCV 感染与自身免疫性肝炎的相关性. 首先不能完全排除 HCV 感染和自身免疫性肝炎同时存在的偶然性; 其次病毒感染的动物模型也未发现并发自身免疫性肝炎. 尽管 HCV 蛋白与细胞色素 P450 间存在抗原的分子模拟, 但这些交叉反应能否引起自身免疫性肝病还存在争议. Lenzi *et al*^[10] 第一个报告抗-LKM-1 阳性的慢性肝病患者中存在令人难忘的高 HCV 感染发生率, 认为 HCV 感染在诱导 AIH-2 发生中起一定作用, 但未能提供直接证据. 对英国 25 例血清抗-LKM-1 阳性的患者进行调查后也未能证实 HCV 感染与 AIH-2 存在任何联系^[11].

总之, 慢性丙型肝炎存在自身免疫现象, 与自身免疫性肝炎(尤其是 AIH-2) 存在某种关联. 然而自身免疫性肝炎是由于 HCV 感染所诱发, 还是与慢性丙型肝炎重叠存在的一种现象, 目前尚无定论.

6 参考文献

- 1 Vento A, Cainelli F. Is there a role for viruses in triggering autoimmune hepatitis? *Autoimmunity Reviews* 2004;3:61-69
- 2 Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, Gatselis N. Autoantibodies and defined target autoimmune hepatitis: an overview. *European J Internal Medicine* 2002;13:293-303
- 3 Ravel G, Christ M, Horand F, Descotes J. Autoimmunity, environmental exposure and vaccination: is there a link? *Toxicology* 2004;196:211-216
- 4 Pelli N, Setti M. Atorvastatin as a trigger of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2004;40:716
- 5 Manns MP, Rambusch EG. Autoimmunity and extrahepatic manifestation in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999;31:39-42
- 6 Diamantis I, Boumpas DT. Autoimmune hepatitis: evolving concepts. *Autoimmunity Reviews* 2004;3:207-214
- 7 Zauli D, Cassani F, Bianchi FB. Auto-antibodies in hepatitis C. *Biomed Pharmacother* 1999;53:234-241
- 8 Beland K, Lapierre P, Marceau G, Alvarez F. Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Autoimmunity* 2004;22:159-166
- 9 Vento S, Cainelli F, Renzini C, Concia E. Autoimmune hepatitis type 2 induced by HCV and persisting after viral clearance. *Lancet* 1997;350:1298-1299
- 10 Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, Cassani F, Sella L, Volta U, Zauli D, Bianchi FB. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet* 1990;335:258-259
- 11 Gregorio GV, Bracken P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Prevalence of antibodies to hepatitis C and herpes simplex virus type 1 is not increased in children with liver kidney microsomal type 1 autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996;23:534-535

慢性丙型肝炎的肝外表现及处理

张继明

张继明, 复旦大学附属华山医院传染科 上海市 200040
项目负责人: 张继明, 200040, 上海市, 复旦大学附属华山医院传染科.
jmzhang@fudan.edu.cn
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

张继明. 慢性丙型肝炎的肝外表现及处理. 世界华人消化杂志 2004;12(10): 2402-2405

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2402.asp>

0 引言

自从发现丙型肝炎病毒(HCV)以来, 丙型肝炎患者的许多肝外表现(extrahepatic manifestation)被认为与HCV感染有关. 第一个由 312 例慢性丙型肝炎患者参与的大规模多中心调查研究的结果显示, 39% 的患者因至少一种肝外表现而到医院就诊. HCV 感染与一些肝外表现, 如混合性冷球蛋白血症 MC(mixed cryoglobulinemia, MC)、迟发性皮肤卟啉症(porphyrria cutanea tarda, PCT)、膜增生型肾小球肾炎(membranoproliferative glomerulonephritis, MPGN)等之间的关系已被认可, 但 HCV 感染与其他肝外表现之间的关系仍存在争论^[1-2]. 本文就HCV感染常见的肝外表现、可能的发生机制及治疗等作简要概述.

1 HCV 感染肝外表现的发生率

目前已经报道的与HCV感染有关的肝外表现至少有 36 种(表 1), 其中, 主要是自身免疫性疾病^[3]. 以往报道的与HCV感染相关的及与HCV感染可能相关的肝外表现的发生率(表 2)^[4].

表 1 已报道的可能与 HCV 感染相关的肝外疾病

抗磷脂综合征	MALT 淋巴瘤
再生障碍性贫血	膜增生型肾小球肾炎
自身免疫性溶血性贫血	膜型肾小球肾炎
自身免疫性甲状腺炎	混合性冷球蛋白血症
慢性疲劳综合征	莫伦氏角膜溃疡
白塞氏病	多发性骨髓瘤
颈动脉硬化症	NHL
CRST 综合征	感觉神经损伤
皮炎	胰腺炎
糖尿病	结节性多动脉炎
纤维性肌痛	多发性肌炎
格林-巴利综合征	PCT
肥厚性心脏病	风湿性关节炎
血胆固醇减少症	涎腺炎
特发性肺纤维化	Sjogren 氏综合征
特发性血小板减少性紫癜	系统性红斑狼疮
IgA 缺乏症	葡萄膜炎
扁平苔藓	瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症

性.进一步用按照 HCV 蛋白和细胞色素 P450 抗原序列合成的多肽建立 ELISA 检测相应抗体,证实二者间有交叉免疫反应. Manns *et al* 报告 85% 的 AIH-2 患者血中的抗-LKM-1 能与 HCV E1 蛋白 310-324 位氨基酸序列及 CYP2D6 抗原 254-271 位氨基酸序列发生免疫沉淀反应. 上述研究表明, HCV 蛋白与细胞色素 P450 间存在抗原的分子模拟, 这为 HCV 感染易并发自身免疫寻找客观依据. 由于 HCV 蛋白与细胞色素 P450 抗原存在交叉免疫, 这样 HCV 感染后可以通过一系列机制激活 T 细胞和 B 细胞, 引起自身免疫性肝炎^[1-2].

然而, 临床上也有一些资料并不支持 HCV 感染与自身免疫性肝炎的相关性. 首先不能完全排除 HCV 感染和自身免疫性肝炎同时存在的偶然性; 其次病毒感染的动物模型也未发现并发自身免疫性肝炎. 尽管 HCV 蛋白与细胞色素 P450 间存在抗原的分子模拟, 但这些交叉反应能否引起自身免疫性肝病还存在争议. Lenzi *et al*^[10] 第一个报告抗-LKM-1 阳性的慢性肝病患者中存在令人难忘的高 HCV 感染发生率, 认为 HCV 感染在诱导 AIH-2 发生中起一定作用, 但未能提供直接证据. 对英国 25 例血清抗-LKM-1 阳性的患者进行调查后也未能证实 HCV 感染与 AIH-2 存在任何联系^[11].

总之, 慢性丙型肝炎存在自身免疫现象, 与自身免疫性肝炎(尤其是 AIH-2)存在某种关联. 然而自身免疫性肝炎是由于 HCV 感染所诱发, 还是与慢性丙型肝炎重叠存在的一种现象, 目前尚无定论.

6 参考文献

- 1 Vento A, Cainelli F. Is there a role for viruses in triggering autoimmune hepatitis? *Autoimmunity Reviews* 2004;3:61-69
- 2 Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, Gatselis N. Autoantibodies and defined target autoimmune hepatitis: an overview. *European J Internal Medicine* 2002;13:293-303
- 3 Ravel G, Christ M, Horand F, Descotes J. Autoimmunity, environmental exposure and vaccination: is there a link? *Toxicology* 2004;196:211-216
- 4 Pelli N, Setti M. Atorvastatin as a trigger of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2004;40:716
- 5 Manns MP, Rambusch EG. Autoimmunity and extrahepatic manifestation in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999;31:39-42
- 6 Diamantis I, Boumpas DT. Autoimmune hepatitis: evolving concepts. *Autoimmunity Reviews* 2004;3:207-214
- 7 Zauli D, Cassani F, Bianchi FB. Auto-antibodies in hepatitis C. *Biomed Pharmacother* 1999;53:234-241
- 8 Beland K, Lapierre P, Marceau G, Alvarez F. Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Autoimmunity* 2004;22:159-166
- 9 Vento S, Cainelli F, Renzini C, Concia E. Autoimmune hepatitis type 2 induced by HCV and persisting after viral clearance. *Lancet* 1997;350:1298-1299
- 10 Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, Cassani F, Sella L, Volta U, Zauli D, Bianchi FB. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Lancet* 1990;335:258-259
- 11 Gregorio GV, Bracken P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Prevalence of antibodies to hepatitis C and herpes simplex virus type 1 is not increased in children with liver kidney microsomal type 1 autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996;23:534-535

慢性丙型肝炎的肝外表现及处理

张继明

张继明, 复旦大学附属华山医院传染内科 上海市 200040
项目负责人: 张继明, 200040, 上海市, 复旦大学附属华山医院传染内科.
jmzhang@fudan.edu.cn
收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

张继明. 慢性丙型肝炎的肝外表现及处理. 世界华人消化杂志 2004;12(10): 2402-2405

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2402.asp>

0 引言

自从发现丙型肝炎病毒(HCV)以来, 丙型肝炎患者的许多肝外表现(extrahepatic manifestation)被认为与HCV感染有关. 第一个由 312 例慢性丙型肝炎患者参与的大规模多中心调查研究的结果显示, 39% 的患者因至少一种肝外表现而到医院就诊. HCV 感染与一些肝外表现, 如混合性冷球蛋白血症 MC(mixed cryoglobulinemia, MC)、迟发性皮肤卟啉症(porphyrria cutanea tarda, PCT)、膜增生型肾小球肾炎(membranoproliferative glomerulonephritis, MPGN)等之间的关系已被认可, 但 HCV 感染与其他肝外表现之间的关系仍存在争论^[1-2]. 本文就HCV感染常见的肝外表现、可能的发生机制及治疗等作简要概述.

1 HCV 感染肝外表现的发生率

目前已经报道的与HCV感染有关的肝外表现至少有 36 种(表 1), 其中, 主要是自身免疫性疾病^[3]. 以往报道的与HCV感染相关的及与HCV感染可能相关的肝外表现的发生率(表 2)^[4].

表 1 已报道的可能与 HCV 感染相关的肝外疾病

抗磷脂综合征	MALT 淋巴瘤
再生障碍性贫血	膜增生型肾小球肾炎
自身免疫性溶血性贫血	膜型肾小球肾炎
自身免疫性甲状腺炎	混合性冷球蛋白血症
慢性疲劳综合征	莫伦氏角膜溃疡
白塞氏病	多发性骨髓瘤
颈动脉硬化症	NHL
CRST 综合征	感觉神经损伤
皮炎	胰腺炎
糖尿病	结节性多动脉炎
纤维性肌痛	多发性肌炎
格林-巴利综合征	PCT
肥厚性心脏病	风湿性关节炎
血胆固醇减少症	涎腺炎
特发性肺纤维化	Sjogren 氏综合征
特发性血小板减少性紫癜	系统性红斑狼疮
IgA 缺乏症	葡萄膜炎
扁平苔藓	瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症

表2 与HCV感染相关或可能相关的肝外疾病的发生率

HCV相关的肝外表现	%	可能与HCV相关的肝外表现	%
MC	40~80	淋巴增生性疾病	5~35
肾小球肾炎	4~6	系统性血管炎-多动脉炎	1~2
PCT	3~6	自身免疫性血小板减少症	10~15
Sjogren氏综合征	10~20	关节痛和肌痛	20~30
自身抗体过度产生	20	Ⅱ型糖尿病	

%表示HCV感染患者中肝外表现的发生率。

以往关于HCV肝外表现的报道存在许多问题: (1)有些研究所包括的病例数太少; (2)无对照组, 或对照组人数不足; (3)许多研究仅在具有一种或几种肝外表现的患者中调查HCV感染的发病率, 没有在人群基础上对HCV感染的肝外表现的发病率进行调查; (4)所报道的肝外表现不能与伴随的疾病相区别, 即不能确定HCV感染与这些肝外表现之间的因果关系。因此, 很多肝外表现的发生率明显偏高, 或结论相互矛盾, 或为假性相关。

2002年, 一项大规模、随机对照的关于HCV肝外表现发病率的临床流行病学调查研究在美国完成^[5]。该项研究对1992~1999年之间曾在172家医院住院的30万男性退伍军人HCV感染的发病率进行了调查, 结果发现, 共有34 204例为慢性HCV感染者, 住院男性退伍军人HCV感染的发病率为1.7%。进一步将HCV慢性感染者作为研究对象, 按1:4配对, 将同期住院的136 816例非HCV感染者作为对照组, 观察两组病例在常见肝外表现发生率方面的差别。研究结果发现, 在HCV感染者中, 有6种肝外疾病的发病率显著高于对照组, 即膜型肾小球肾炎(0.33%)、MPGN(0.36%)、扁平苔藓(0.30%)、白癜风(0.17%)、PCT(0.77%)、MC(0.57%)等。成人期发病的糖尿病的发病率却低于对照组, 而甲状腺炎、Sjogren氏综合征、淋巴瘤等疾病的发病率在两组之间无差别(表3)。从以上的发现可以看出, HCV感染的肝外表现的发病率要远远低于以往的报道, 如远低于表2中的各种肝外表现的发病率。多变量Logistic回归分析的结果显示, 在HCV感染者中, 除MPGN、扁平苔藓、白癜风、PCT、MC等5种疾病的发病率仍显著高于对照组外, 非何杰金氏淋巴瘤(NHL)的发病率也高于对照组, 而膜型肾小球肾炎、Sjogren氏综合征、何杰金氏淋巴瘤、甲状腺炎等疾病的发病率在两组之间无显著差异。尽管多变量Logistic回归分析的结果仍提示HCV感染组成人期发病的糖尿病的发病率仍低于对照组, 但HCV感染组患者的年龄要明显低于对照组, 在控制年龄的影响之后, 两组患者糖尿病的发病率并无区别。该项研究是迄今为止病例数最多的、在人群基础上进行的临床流行病学调查。

表3 美国住院退伍军人中HCV感染者与非HCV感染者的肝外表现的比较

	HCV感染组(%) (n=34 204)	对照组(%) (n=136 816)	未校正的 odds ratio	P
MPGN	123 (0.36)	64 (0.05)	7.71	<0.0001
膜型肾小球肾炎	112 (0.33)	262 (0.19)	1.71	<0.0001
成人期发病的糖尿病	6 622 (19.36)	35 922 (26.26)	0.67	<0.0001
扁平苔藓	104 (0.30)	178 (0.13)	2.34	<0.0001
白癜风	58 (0.17)	130 (0.10)	1.79	0.0002
PCT	265 (0.77)	87 (0.06)	12.27	<0.0001
甲状腺炎	51 (0.15)	270 (0.20)	0.76	0.0652
冷球蛋白血症	196 (0.57)	73 (0.05)	10.80	<0.0001
Sjogren氏综合征	31 (0.09)	155 (0.11)	0.80	0.2555
NHL	421 (1.23)	1 669 (1.22)	1.01	0.8689
何杰金氏淋巴瘤	92 (0.27)	323 (0.24)	1.14	0.2688

2 肝外表现的发病机制

HCV感染引起肝外表现的机制仍不清楚, 但许多研究提示, HCV本身的作用和肝外表现的发生有密切的关系。(1)虽然HCV主要为嗜肝性, 但也可在非肝组织内复制。许多研究已经在外周血细胞(包括B淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞等)、唾液腺、肾、皮肤、骨髓、胃黏膜、脑脊液中发现HCV的存在和复制, 肝移植后HCV感染的复发也支持HCV可在肝外复制^[6-8]。由于HCV除主要表现为肝细胞嗜性之外, 还有一定的淋巴细胞嗜性, 这在一定程度上可以解释HCV感染的大多数肝外表现具有淋巴增生或自身免疫性疾病的特点。(2)HCV的包膜蛋白E2可以与一种细胞膜蛋白CD81结合^[9]。在B细胞上, CD81与CD19、CR2、MHC II类分子存在联系, 当HCV与CD81结合后, 可激活上述分子形成的复合物, 降低抗体产生所需的抗原阈, 使B细胞反应性增高, 导致在骨髓和肝脏中形成产生Ⅱ型冷球蛋白的优势B细胞克隆, 这可能是HCV感染易合并MC的机制。(3)HCV基因组上的一些位点可以与一些细胞内的蛋白结合^[10]。这些证据提示, HCV本身的复制可能在肝外表现的发生中起重要作用, 但确切的机制仍需进一步阐明。

3 HCV感染的主要几种肝外表现

3.1 MC 冷球蛋白血症是指血液中出现了一种异常的免疫球蛋白, 在37℃或低于37℃条件下, 这种球蛋白可形成可逆性的沉淀。目前仍采用Brouet的关于冷球蛋白的分类方法^[11], 此方法根据免疫球蛋白(Ig)的组成和冷球蛋白血症患者的冷球蛋白的特性将冷球蛋白分为3型: I型由单一的单克隆Ig组成; II型由单克隆的IgM和多克隆的IgG组成; III型由多克隆的IgM和多克隆的IgG组成, 单克隆和多克隆IgM具有RF活性。II型和III型冷球蛋白血症又称为MC。与HCV感染相关的主要是II型冷球蛋白血症。免疫复合物中的冷球蛋白成分可介导

血管和肾脏损害。

MC 与 HCV 感染的关系已经明确, HCV 感染者与非 HCV 感染者相比发生 MC 的危险性要高 10 倍以上。长期以来, 文献报道的 HCV 感染者 MC 的发生率差别较大, 发生率在 0-59% 之间, 南部欧洲的发病率要高于北欧和北美洲。造成这种差异的原因除了前面已经提及的之外, 还可能包括: (1) 在评估 MC 发病率时, 多数研究中 HCV 病例是选择性的, 这种病例选择的偏差导致较高的 MC 发病率; (2) 各个地区 HCV 感染的流行率有较大差异; (3) 与检测冷球蛋白的技术相关。因为采用较好的诊断技术可提高冷球蛋白血症的检出率, 冷球蛋白血症流行率高于 50% 的研究一般采用了最敏感的检测方法远高于实际发生率^[3]。

Meltzer *et al*^[12] 首先于 1966 年报道了 MC 临床表现, 即表现为可触及的紫癜、关节痛、虚弱三联征。但此定义已不再适用, 因为 MC 患者还有其他临床表现。

MC 的临床表现呈多样性, 其主要表现为系统性血管炎和可触及的紫癜。许多 HCV 感染者可从血液中检出冷球蛋白而无任何相应的症状, 因此, 上述三联征仅见于少数冷球蛋白血症患者。这种可触及的紫癜偶尔可发展为坏死性皮肤损害, 严重的系统性血管炎很少见。MC 相关的关节炎常累及单个关节, 如近端指间关节、掌指关节和膝关节, 呈间歇性发病, 一般不引起关节破坏性损害。有些病例遇冷后可出现关节疼痛和僵硬。HCV 感染者虽然可常有关节疼痛, 但如不合并 MC, 关节炎并不常见。多数患者存在虚弱, 但很难区分是 HCV 感染引起或由 MC 引起。肾脏累及较常见, 表现为 MPGN。外周神经病变和雷诺氏现象也不少见。当出现持续发热和淋巴结肿大时, 要警惕已发展至 NHL。

HCV 感染合并 MC 患者和非 HCV 相关性冷球蛋白血症相比, 其发热、淋巴结肿大、关节累及、雷诺氏现象等表现相对少见, 并且前者 RF 阳性率较高, C4 和 CH50 水平较低, 而后者 ANA 阳性率较高。由于仅有少数 MC 患者有肝外表现, 因此, 无症状的冷球蛋白血症对肝外症状的出现和肝硬化发生的重要性仍需要明确。最近的一项涉及 19 个临床研究、2 323 例慢性丙型肝炎患者的荟萃分析的结果显示, 冷球蛋白血症的流行率为 44%, 并与肝硬化的发生密切相关, 该文作者建议, 可把冷球蛋白血症作为 HCV 感染者发生肝硬化的危险因素^[13]。但该文的结论可能存在偏差, 因为先前的多中心临床研究提示, 有症状的 II 型冷球蛋白血症患者发生肝硬化的比例较低^[14]。为了明确冷球蛋白的病理意义, 必须对冷球蛋白的特性及其在相关损害中的作用进行研究。至于是否存在一种与肝硬化相关的特殊类型的冷球蛋白, 迄今为止尚无研究报道。但已经报道, 单克隆 IgM 型 RF 与丙型肝炎合并 II 型冷球蛋白血症患者出现 MPGN 和皮肤损害有关。

50% 以上的病例在用 α 干扰素治疗后症状得到缓解, 但如果未取得持久性病毒学应答, 几乎所有病例

在停止治疗后复发^[15]。长期 α 干扰素治疗可有效控制症状, 尤其是对有皮肤血管炎的患者。不主张与类固醇(强的松)合用。对合并严重肾脏疾病者, 可采用抗病毒和免疫抑制剂联合治疗。利巴韦林与 α 干扰素联合有可能提高对 MC 的治疗效果, 但对于已有肾功能不全者, 要慎用, 因为可增加利巴韦林的副作用, 且患者的肾功能不全也不能被逆转^[16-17]。聚乙二醇 α 干扰素对 MC 的疗效尚无报道。

3.2 肾脏疾病 最常见的是 MPGN。在美国, 10-20% 的 MPGN 与 HCV 感染有关^[18], 在日本, 60% 的成人 MPGN 与 HCV 感染有关^[19]。大多数 HCV 相关的肾脏疾病与 MC 有关。

HCV 相关性肾病在初次就诊时常表现为肾病综合征(71%)。血清白蛋白常低于 30 g/L, 伴轻微肾功能不全。少数病例已发展到需要透析治疗的阶段。几乎所有病例可检测到 HCV RNA 和抗-HCV 抗体, 85% 的患者可检出冷球蛋白。但仅有 44% 有 MC 的肾外表现。肝脏疾病常呈隐匿性, 82% 无肝脏疾病的临床表现, 44% 的患者肝功能正常, 但 88% 的患者肝组织检查呈现慢性活动性肝炎的表现, 且 50% 已进展至肝硬化阶段。肾穿刺活检检查可呈现与免疫复合物疾病类似的特点。肾小球沉积物中主要是 IgG、IgM 和 C3, 且 IgM 具有 RF 活性。

初步研究表明, α 干扰素治疗可减少蛋白尿, 但肌酐水平无明显降低。 α 干扰素与利巴韦林联合可能提高疗效。作为一种姑息性治疗措施, 类固醇脉冲治疗是有效的, 但应注意副作用。抗病毒与免疫抑制剂联合应用适合于严重的 MPGN 患者以及对单用 α 干扰素治疗无效的患者。

3.3 淋巴瘤 尽管有关 HCV 感染与 NHL 之间关系的研究报道很不一致, 但目前认为, HCV 感染可增加 NHL 的发病率, 在所有 NHL 中, HCV 相关的 NHL 占重要的比例, 约 10% 的 II 型 MC 可在确诊数年后发展至恶性淋巴瘤^[20]。HCV 相关的 NHL 易出现淋巴结外累及, 常见累及部位为肝脏和唾液腺。不常见的部位还有胃黏膜, 即所谓的黏膜相关淋巴组织淋巴瘤(mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas, MALT 淋巴瘤)^[6]。HCV 相关淋巴瘤的发生机制可能是 HCV 诱导的 B 细胞的克隆增生。低度恶性的 B 细胞淋巴瘤在 α 干扰素治疗后可得到缓解, 但高度恶性淋巴瘤患者需要进行全身化疗。

3.4 PCT PCT 与 HCV 感染的关系已经明确, 但 PCT 是 HCV 感染的一种少见并发症。PCT 的临床表现仅限于皮肤, 表现为皮肤脆性增加、淤斑、小水泡或大小水泡, 在暴露部位, 后者可变成出血性损害。PCT 的出现与尿卟啉原脱羧酶(Uro-D)的活性降低有关(<50%), PCT 分为 2 型, I 型呈散发性, 较常见, 仅肝细胞内的 Uro-D 活性降低; II 型呈家族性, 较少见, 多种细胞内的 Uro-D 活性均有降低。Uro-D 的活性降低是 PCT 出现临床症状的必须条件, 但不是惟一条件。大多数 II 型 PCT 患者的 Uro-D 活性低于 50%, 但几乎都没有临床症状。目

前倾向认为, HCV 对 Uro-D 的活性没有影响, 不直接引起卟啉代谢紊乱^[21]. PCT 患者本身可能存在潜在的 Uro-D 活性的缺陷, HCV 感染单独或与其他因素, 如嗜酒、雌激素、铁负荷过度等一起触发了 PCT 的临床表现. 目前尚没有发表 α 干扰素治疗 HCV 感染合并 PCT 的临床试验报道. 一些病例报告显示, 在用 α 干扰素治疗后, PCT 患者的症状得到改善. 目前的观点是, 无论 PCT 患者有无症状、有无肝功能损害, 抗病毒治疗是必要的. 3.5 扁平苔藓 HCV 感染者扁平苔藓的发病率可达 35%, 临床流行病学调查也支持 HCV 感染可增加扁平苔藓的发病率. 少数病例报告提示, 在用 α 干扰素治疗后扁平苔藓可消失, 但也有加重的报告. 因此这类病例在用 α 干扰素治疗时应特别注意副作用.

总之, HCV 通常影响除肝脏以外的多个器官, 慢性 HCV 感染可引起许多肝外症状, 其中 HCV 感染与 MPGN、扁平苔藓、白癜风、PCT、MC、NHL 之间的因果关系已较为明确, 但 HCV 感染与大多数肝外表现之间的因果的关系尚有待证实. α 干扰素治疗对 HCV 相关的肝外表现有较确切的疗效.

4 参考文献

- 1 Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Louri I, Loustaud-Ratti V, Yamamoto AM, Camproux AC, Hausfater P, Musset L, Veyssier P, Raguin G, Piette JC. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection: a prospective multi-center study of 321 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:47-56
- 2 Mayo MJ. Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. *American J Medical Sci* 2002;325:135-148
- 3 Agnello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: Some current issues. *J Hepatol* 2004;40:341-352
- 4 Zoulim F, Chevallier M, Maynard M, Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol* 2003;13:57-68
- 5 El-Serag HB, Hampel H, Yeh C, Rabeneck L. Extrahepatic manifestations of hepatitis C among United States male veterans. *Hepatology* 2002;36:1439-1445
- 6 De Vita S, De Re V, Sansonno D, Sorrentino D, Corte RL, Pivetta B, Gasparotto D, Racanelli V, Marzotto A, Labombarda A, Gloghini A, Ferraccioli G, Monteverde A, Carbone A, Dammacco F, Boiocchi M. Gastric mucosa as an additional extrahepatic localization of hepatitis C virus: viral detection in gastric low-grade lymphoma associated with autoimmune disease and in chronic gastritis. *Hepatology* 2000;31:182-189
- 7 Zhu Q, Guo JT, Seeger C. Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol* 2003;77:9204-9210
- 8 Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspe G, Bain C. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infectious Diseases* 2003;187:1951-1958
- 9 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941
- 10 Inoue Y, Miyazaki M, Ohashi R, Tsuji T, Fukaya K, Kouchi H, Uemura T, Mihara K, Namba M. Ubiquitous presence of cellular proteins that specifically bind to the 3' terminal region of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:198-203
- 11 Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann M. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 1974;57:775-788
- 12 Meltzer M, Franklin EC, Elias K, McCluskey RT, Cooper N. Cryoglobulinemia—a clinical and laboratory study. II Cryoglobulins with rheumatoid factor activity. *Am J Med* 1966;40:837-856
- 13 Kayali Z, Buckwold VE, Zimmerman B, Schmidt WN. Hepatitis C, cryoglobulinemia, and cirrhosis: A Meta-analysis. *Hepatology* 2002;36:978-985
- 14 Monti G, Galli M, Invernizzi F, Pioltelli P, Saccardo F, Monteverde A, Pietrogrande M, Renoldi P, Bombardieri S, Bordin G. Cryoglobulinaemias: a multi-centre study of the early clinical and laboratory manifestations of primary and secondary disease. GISC. Italian group for the study of cryoglobulinaemias. *QJM* 1995;88:115-126
- 15 Cresta P, Musset L, Cacoub P, Frangeul L, Vitour D, Poynard T, Opolon P, Nguyen DT, Golliot F, Piette JC, Huraux JM, Lunel F. Response to interferon alpha therapy and disappearance of cryoglobulinemia in patients infected by hepatitis C virus. *Gut* 1999;45:122-128
- 16 Misiani R, Bellavita P, Baio P, Caldara R, Ferruzzi S, Rossi P, Tengattini F. Successful treatment of HCV associated cryoglobulinaemic glomerulonephritis with a combination of interferon alpha and ribavirin. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1558-1560
- 17 Zuckerman E, Keren D, Slobodin G, Rosner I, Rozenbaum M, Toubi E, Sabo E, Tsykounov I, Naschitz JE, Yeshurun D. Treatment of refractory, symptomatic hepatitis C virus related mixed cryoglobulinemia with ribavirin and interferon- α . *J Rheumatol* 2000;27:2172-2178
- 18 Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H, Hart J, Bacchi CE, Hartwell P, Couser WG, Corey L, Wener MH, Alpers CE. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993;328:465-470
- 19 Yamabe H, Johnson RJ, Gretch DR, Fukushi K, Osawa H, Miyata M, Inuma H, Sasaki T, Kaizuka M, Tamura N. Hepatitis C virus infection and membranoproliferative glomerulonephritis in Japan. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:220-223
- 20 Rasul I, Shepherd FA, Kamel-Reid S, Krajden M, Pantalony D, Heathcote EJ. Detection of occult low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma in patients with chronic hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. *Hepatology* 1999;29:543-5547
- 21 Moran MJ, Fontanellas A, Brudieus E, Hombrados I, de Ledinghen V, Couzigou P, de Verneuil H, De Salamanca RE. Hepatic uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda patients: the influence of virus C infection. *Hepatology* 1998;27:584-589

丙型肝炎疫苗研究及面临的挑战

聂青和 罗新栋

聂青和, 罗新栋, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038

项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com

电话: 029-83377742 传真: 029-83537377

收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

聂青和, 罗新栋. 丙型肝炎疫苗研究及面临的挑战. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2405-2409

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2405.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是引起人类慢性肝炎的主要病原体

前倾向认为, HCV 对 Uro-D 的活性没有影响, 不直接引起卟啉代谢紊乱^[21]. PCT 患者本身可能存在潜在的 Uro-D 活性的缺陷, HCV 感染单独或与其他因素, 如嗜酒、雌激素、铁负荷过度等一起触发了 PCT 的临床表现. 目前尚没有发表 α 干扰素治疗 HCV 感染合并 PCT 的临床试验报道. 一些病例报告显示, 在用 α 干扰素治疗后, PCT 患者的症状得到改善. 目前的观点是, 无论 PCT 患者有无症状、有无肝功能损害, 抗病毒治疗是必要的. 3.5 扁平苔藓 HCV 感染者扁平苔藓的发病率可达 35%, 临床流行病学调查也支持 HCV 感染可增加扁平苔藓的发病率. 少数病例报告提示, 在用 α 干扰素治疗后扁平苔藓可消失, 但也有加重的报告. 因此这类病例在用 α 干扰素治疗时应特别注意副作用.

总之, HCV 通常影响除肝脏以外的多个器官, 慢性 HCV 感染可引起许多肝外症状, 其中 HCV 感染与 MPGN、扁平苔藓、白癜风、PCT、MC、NHL 之间的因果关系已较为明确, 但 HCV 感染与大多数肝外表现之间的因果的关系尚有待证实. α 干扰素治疗对 HCV 相关的肝外表现有较确切的疗效.

4 参考文献

- Cacoub P, Renou C, Rosenthal E, Cohen P, Louri I, Loustaud-Ratti V, Yamamoto AM, Camproux AC, Hausfater P, Musset L, Veyssier P, Raguin G, Piette JC. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection: a prospective multi-center study of 321 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:47-56
- Mayo MJ. Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. *American J Medical Sci* 2002;325:135-148
- Agnello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: Some current issues. *J Hepatol* 2004;40:341-352
- Zoulim F, Chevallier M, Maynard M, Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol* 2003;13:57-68
- El-Serag HB, Hampel H, Yeh C, Rabeneck L. Extrahepatic manifestations of hepatitis C among United States male veterans. *Hepatology* 2002;36:1439-1445
- De Vita S, De Re V, Sansonno D, Sorrentino D, Corte RL, Pivetta B, Gasparotto D, Racanelli V, Marzotto A, Labombarda A, Gloghini A, Ferraccioli G, Monteverde A, Carbone A, Dammacco F, Boiocchi M. Gastric mucosa as an additional extrahepatic localization of hepatitis C virus: viral detection in gastric low-grade lymphoma associated with autoimmune disease and in chronic gastritis. *Hepatology* 2000;31:182-189
- Zhu Q, Guo JT, Seeger C. Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol* 2003;77:9204-9210
- Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspe G, Bain C. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infectious Diseases* 2003;187:1951-1958
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-941
- Inoue Y, Miyazaki M, Ohashi R, Tsuji T, Fukaya K, Kouchi H, Uemura T, Mihara K, Namba M. Ubiquitous presence of cellular proteins that specifically bind to the 3' terminal region of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:198-203
- Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann M. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 1974;57:775-788
- Meltzer M, Franklin EC, Elias K, McCluskey RT, Cooper N. Cryoglobulinemia—a clinical and laboratory study. II Cryoglobulins with rheumatoid factor activity. *Am J Med* 1966;40:837-856
- Kayali Z, Buckwold VE, Zimmerman B, Schmidt WN. Hepatitis C, cryoglobulinemia, and cirrhosis: A Meta-analysis. *Hepatology* 2002;36:978-985
- Monti G, Galli M, Invernizzi F, Pioltelli P, Saccardo F, Monteverde A, Pietrogrande M, Renoldi P, Bombardieri S, Bordin G. Cryoglobulinaemias: a multi-centre study of the early clinical and laboratory manifestations of primary and secondary disease. GISC. Italian group for the study of cryoglobulinaemias. *QJM* 1995;88:115-126
- Cresta P, Musset L, Cacoub P, Frangeul L, Vitour D, Poynard T, Opolon P, Nguyen DT, Golliot F, Piette JC, Huraux JM, Lunel F. Response to interferon alpha therapy and disappearance of cryoglobulinemia in patients infected by hepatitis C virus. *Gut* 1999;45:122-128
- Misiani R, Bellavita P, Baio P, Caldara R, Ferruzzi S, Rossi P, Tengattini F. Successful treatment of HCV associated cryoglobulinaemic glomerulonephritis with a combination of interferon alpha and ribavirin. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1558-1560
- Zuckerman E, Keren D, Slobodin G, Rosner I, Rozenbaum M, Toubi E, Sabo E, Tsykounov I, Naschitz JE, Yeshurun D. Treatment of refractory, symptomatic hepatitis C virus related mixed cryoglobulinemia with ribavirin and interferon- α . *J Rheumatol* 2000;27:2172-2178
- Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H, Hart J, Bacchi CE, Hartwell P, Couser WG, Corey L, Wener MH, Alpers CE. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1993;328:465-470
- Yamabe H, Johnson RJ, Gretch DR, Fukushi K, Osawa H, Miyata M, Inuma H, Sasaki T, Kaizuka M, Tamura N. Hepatitis C virus infection and membranoproliferative glomerulonephritis in Japan. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:220-223
- Rasul I, Shepherd FA, Kamel-Reid S, Krajden M, Pantalony D, Heathcote EJ. Detection of occult low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma in patients with chronic hepatitis C virus infection and mixed cryoglobulinemia. *Hepatology* 1999;29:543-5547
- Moran MJ, Fontanellas A, Brudieux E, Hombrados I, de Ledinghen V, Couzigou P, de Verneuil H, De Salamanca RE. Hepatic uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda patients: the influence of virus C infection. *Hepatology* 1998;27:584-589

丙型肝炎疫苗研究及面临的挑战

聂青和 罗新栋

聂青和, 罗新栋, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038

项目负责人: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路 1 号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心. nieqinghe@hotmail.com
电话: 029-83377742 传真: 029-83537377

收稿日期: 2004-09-20 接受日期: 2004-10-08

聂青和, 罗新栋. 丙型肝炎疫苗研究及面临的挑战. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2405-2409

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2405.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是引起人类慢性肝炎的主要病原体

之一,呈世界流行,感染率为1-3%,约60%的急性丙型肝炎(HC)患者转化为慢性,而慢性患者中分别有8-46%和11-19%发展成肝硬化和肝细胞癌^[1].到目前为止,以干扰素为主的抗病毒治疗只能使30%左右的患者得到根治,尚未发现令人满意的治疗药物. α 干扰素和病毒唑对治疗丙肝有一定的效果,但是副作用很大.因此,HCV感染的防治工作更应以预防为主.HCV疫苗的研究对预防HCV感染和阻止病程进展十分重要,HCV疫苗的研究就成为当务之急的前沿课题.

1 HCV 基因结构与疫苗研制

HCV是一种单股正链的RNA病毒,基因组长度为9500个核苷酸(Nucleotide, nt),其5'端有一个319-341 nt结构较为保守的非翻译区(untranslated region, 5' -NTR).后面为一个连续的开放阅读框架(open reading frame, ORF),几乎占据HCV整个基因组,编码长度大约为3 008到3 037aa的多聚蛋白前体,其在宿主和病毒编码蛋白酶的联合作用下,生成3种结构蛋白C、E1、E2,以及6种非结构蛋白NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a、NS5b.结构蛋白参与病毒颗粒装配,非结构蛋白参与基因的复制.HCV的3'端为27-55nt的3' -NTR,3' -NTR末端由一结构可变的poly(U-C)尾及一段极为保守的含98nt的序列(称为X区)组成.5'末端和3'末端的高度保守提示其可能在病毒复制或翻译水平上起重要调节作用.研究表明,3' -NTR末端的X区形成的茎环结构可与多聚结合蛋白(PTB)结合,后者通过5' -NTR基因组中的内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)增强对病毒RNA的翻译作用.

HCV的一个主要特点及发展疫苗的一个首先要考虑的因素就是他的基因组的异源性.目前认为,造成HCV变异性是由于HCV RNA病毒复制所依赖的RNA指导的RNA聚合酶(RNA-directed RNA polymerase, RDRP)缺乏“校读”(proof heading)功能,加上病毒为适应环境和逃脱宿主的免疫清除而易发变异,逐渐形成新的HCV变异株,并各自独立演化,从而形成一定的型、亚型和准种.

对来自全球的多株HCV序列同源性比较分析,HCV基因组遗传变异性并不一致,最保守的区域为5' -NTR和3' -NTR ORF区中,最保守的区域为核心区(C区),编码病毒膜蛋白的基因区(E1、E2)变异较大,其中又以E2 N端的变异最大,有两个高变部位(high variable region, HVR),即HRV1、HRV2.其意义在于所有的HCV分离株在此部位上均不相同.HRV1 C末端表位可有病毒株依赖性和非依赖性抗体同时存在,随病程变化亦出现抗原表位的变化,一般为N端向C末端的漂移.进一步研究提示,早期针对于HVR1 N末端抗体的出现伴随着HCV急性自限性感染,主要针对于HCV1 C末端的病毒株非依赖性抗体存在于HCV感染慢性化的患者,他们并不能有效清除病毒.

由于依赖RNA的RNA聚合酶链反应的校对功能不完善,易出现基因突变,以及宿主免疫压力的存在,所以宿主体内的HCV会聚集成一个复杂的称之为准种(quasispecies)的病毒群体.准种的存在可能是一个用来逃避宿主免疫的机制.这些准种的性质及复杂性也影响预防和治疗的成功率.深入的系统进化分析可将HCV分成至少6个主要的基因型和至少70个不同的亚型.其中基因型1、2、3型在我国分布最广.

大多数HCV感染者都有抗HCV核心蛋白、NS3和NS4的抗体,但是这些抗体的中和作用不明显,并且感染了HCV后抗-HCV阳性的黑猩猩受到同源或异源HCV株攻击后,仍可再次发病.临床也发现丙型肝炎可以多次复发.感染HCV后缺乏足够免疫力的原因可能是:(1)体内HCV病毒量很低,可能没有足够的免疫原刺激产生稳定的免疫保护力;(2)HCV RNA和病毒蛋白变异性很大,至少存在6个基因型和3个血清型,彼此间可能没有交叉保护力;(3)可能与免疫选择和进化有关的HCV E区基因变异较大,很容易形成免疫逃逸突变株.世界各地分离的部分HCV株E基因的变异率高达20-40%,甚至抗HCV-E抗体之间也没有交叉免疫反应,这是疫苗研制的一个重要障碍.另外HCV体外复制能力差,缺乏较敏感的组织培养方法,理想的动物模型亦难寻找,这些因素使HCV疫苗研制更面临巨大挑战.目前研究的方向有蛋白疫苗和核酸疫苗^[2-3].

2 蛋白疫苗

2.1 肽疫苗 诱导出针对多个HCV表位的特异性的细胞免疫反应对开发有效的HCV疫苗是很重要的.在抗原设计与表达不同的HLA I类或者II类分子的转基因小鼠模型的研究中取得的重要进展使合成肽疫苗的发展成为可能.联合运用单个或者多个HCV抗原及不同的HLA分子的抗原表位的不同多肽是令人鼓舞的.但是对此感兴趣的人不多.现今绝大部分工作都在确定具有免疫原性的肽而不是测试最有希望的肽疫苗.

在肽疫苗研究中,一个经典的方法是用HCV感染患者的血清来筛选噬菌体表达的肽文库,然后选择出与患者血清特异反应的肽段.用HCV感染的患者血清来筛选在噬菌体文库中表达的数目巨大的HVR 1的所有肽段,可以选择出既有抗原性又有免疫原性的肽段作为那些HVR 1发生变异的数目巨大的变异体的类似物^[4].现在知道如果肽序列包含CD8及CD4表位,那么经他免疫诱导的特异性CTL将十分理想.最近有研究确定了一个序列,包含E1糖蛋白的121-135位氨基酸残基,他能在被注射的小鼠中诱导出CD4+Th1细胞及CD8+CTL.

2.2 包膜蛋白疫苗 黄病毒和瘟病毒包膜糖蛋白能诱导机体产生中和性抗体.在疫苗研制初期,研究者把注意力投向HCV包膜糖蛋白,Choo *et al*对此进行了深入研究.从感染重组痘苗病毒表达载体的HeLa细胞中得到HCV包膜蛋白E1和E2,并将E1和E2复合物注入黑

猩猩体内. 结果证实7只黑猩猩中5只能抵抗10个半数黑猩猩感染量HCV的攻击. 而对照组则出现急、慢性感染, 证明抗HCV-E抗体有保护作用. 但值得注意的是这种疫苗为“单特异性”, 对不同基因型和血清型的HCV不一定适用. 而且是在加强免疫后抗体达到最高滴度时才能抵抗HCV的攻击. 因此如何使抗体维持在较高水平, 如何克服HCV高度变异性这些HCV疫苗研究的难点仍然没有得以解决^[1, 5].

Farci *et al*用HCV H 77株E2区合成肽免疫兔, 产生了抗同源性合成肽的高活性抗体. 将抗体与等体积含有64个CID 50的H 77株中和后再分别注射2只黑猩猩. 研究表明, H 77株至少有19种不同来源病毒株同时存在, E2中的HVR 1具有关键的抗体中和表位, 从该区产生的合成肽能激发中和抗体产生并能保护黑猩猩对同源性HCV的攻击, 但对HCV基因有变异的突变体没有中和作用. 一些研究显示, E2中抗HVR1与中和HCV感染有关, 有人从急性肝炎患者分离的H 77株, 用其HVR1区合成的21个多肽免疫家兔, 用ELISA法证实该免疫血清能防止H 77株感染HPBMA细胞, 但不能阻断对H 77株的突变株H 90株的感染, 该结果表明, 抗HVR1抗体的中和作用具有高度特异性. Rosa *et al*用多种E1和E2重组蛋白与人T细胞淋巴瘤细胞孵育, 结果只有哺乳细胞表达的E2重组蛋白能与T细胞淋巴瘤细胞结合, 并发现E2免疫的兔血清能中和E2对靶细胞的结合作用, 此种抗体叫作中和结合抗体, 对HCV感染有一定的防护作用^[6].

2.3 问题与展望 HCV E1、E2蛋白疫苗免疫黑猩猩后, 在抗体达到高峰时, 可预防同源性HCV感染, 但能否预防异源性HCV感染以及当抗体滴度下降时是否还能预防同源性感染, 这些问题尚待研究^[7]. 抗E2抗体, 特别是抗HVR1抗体(NOBI)具有中和HCV对靶细胞的结合作用, 预示着有中和同源性HCV感染作用, 但这一中和抗体具有高度特异性, 对突变的HCV及HCV准种株没有中和作用, 而且蛋白类疫苗诱导产生的抗体浓度随时间而下降.

尽管目前取得了一些进展, 但是HCV蛋白疫苗的发展还是处于一个早期阶段. 许多策略也证实对小鼠能诱导出强烈的长时间的T细胞介导的免疫反应, 对灵长类也取得了一些进展. 对于这些候选疫苗解决诸如诱导反应的记忆以及对他们的交叉反应能力这些问题是十分重要的. 认真选择合适的佐剂或者使用细胞因子、化学因子及协同刺激分子可能也很重要. 目前使用的所有疫苗都是防止急性感染. 急性HCV感染通常是轻微的不显著的, HCV带来的问题主要是持续性感染, 并通常导致临床上显著的慢性肝脏疾病. 另外, 慢性感染患者通常又是HCV的主要传播者.

由于HCV具有多个基因型及血清型, 膜蛋白区同源性小, 加之基因突变率高, 容易形成没有逃逸病毒株, 缺乏具有交叉免疫保护效应的中和抗体, 这些诸

多因素给HCV免疫研究带来了极大困难, 我们必须突破常规研究策略, 探索新的疫苗技术, 才能推动和促进HCV疫苗的研制^[4, 8].

3 核酸疫苗

HCV基因疫苗是将HCV上某一片段目的基因克隆入适当的表达载体中再接种到体内, 以使目的基因得以表达, 来诱导机体产生特异的体液免疫和细胞免疫达到清除HCV病毒感染的目的. 由于HCV结构的变异, 目前尚未确定特异性的抗原决定簇, 为此国内外学者对HCV结构区的不同基因片段构建的疫苗进行大规模动物试验^[9-11].

1990年Wolff *et al*发现质粒DNA直接肌肉注射可诱发特异性免疫应答, 拉开了疫苗研究“第3次革命”的序幕. DNA疫苗又称基因疫苗, 核酸疫苗、基因免疫等, 是一种新型的亚单位疫苗, 可直接将重组质粒注射到动物细胞中, 通过T小管和细胞膜“穴样凹陷”摄入质粒, 利用宿主的复制、转录与表达系统, 在肌纤维细胞等表达出接近天然构像的抗原, 经抗原提呈细胞的处理, 多肽与MHC分子形成复合物被提呈到细胞表面, 诱发特异性CTL效应及体液免疫应答. 与传统蛋白质疫苗相比, 这种DNA疫苗明显优于传统疫苗. DNA疫苗克服了传统病毒减毒疫苗、灭活疫苗或多肽疫苗所造成的抗原决定簇的改变, 保持了完整的免疫原性; DNA疫苗既可诱导体液免疫又可诱导细胞免疫, 而以后者为主要特征; DNA疫苗可在体内长期、稳定表达外源蛋白, 这为研制和开发利用多基因型与基因突变率高的病毒性疫苗提供了理论依据.

3.1 C区DNA疫苗 在整个基因组中, C区基因型相对保守. 1995年Lagging *et al*构建了C基因(第1-191aa)重组质粒pCDNA3 HCV corE, 0.2 mg质粒肌肉注射免疫BALB/c小鼠2-3次后, 于第6 wk处死小鼠, 可检测到较高水平的抗C抗体, 免疫2次或3次的抗体滴度相似. 免疫小鼠中还可检测到针对C蛋白一个保守10肽LMGYIPLVGA(第133-142 aa, C7 A10)的淋巴细胞增生反应, 增生刺激指数为7.5-10.5. 用痘苗病毒表达载体vv/HCV1-967感染pCDNA3 HCV corE重组质粒免疫小鼠的脾细胞后, 37 °C培养7 d, 制备效应细胞. 靶细胞选用BALB/c3T3细胞, 同样用vv/HCV1-967刺激, 当效应细胞: 靶细胞=100:1时, 靶细胞的溶解率为22-26%, 而对照载体组只约为4%, 证实免疫小鼠脾细胞中存在特异性CTL前体, C蛋白免疫后可诱发特异性CTL效应. 用表达C蛋白的载体pHCV2 2(C基因)及pHCV4 2(5' UTR+C基因)分别转染人肝癌细胞株HuH7、人横纹肌肉瘤细胞株RDJ及鼠成肌细胞株G8后, 在胞内表达了M_r 100的C蛋白, pHCV2 2表达效率高于pHCV4 2. 0.1 mg质粒DNA免疫BALB/c小鼠后, 只有40%诱发了低水平的抗C抗体, 这与Lagging *et al*报道的C蛋白可诱发较高水平抗体反应有所不同, 可能与他

们各自使用的抗原检测系统的敏感性不同有关。

1997年 *saito et al* 构建了多种 pRC/CNN 真核表达载体, 分别编码 HCV 核心-(pC)、E1(pE1)、E2(pE2)、C 与 E1 和 E2 的复合体(pCE1E2)、E1 和 E2 的嵌合体(pE1E2)、以及除去 N 端的 HVR 的 E2 载体(pE1-HVR)。这些载体在大肠杆菌内扩增, 纯化后转染 293 细胞, 然后将质粒 DNA 注射到 BALB/c 小鼠骨骼肌内, 结果这些重组质粒能够激发抗 HCVC、E1 和 E2 的特异性抗体应答。pE2-HVR 也可激发抗 E2 抗体应答, 而且注射编码 C 区及其他结构区组的质粒还可检出特异 CTL 应答。这些结果提示 HCV C 区将有助于 HCV 疫苗的研制。有国内学者在 HCV DNA 疫苗方面做了不少实验, 也得到了类似的结果。以上实验说明, HCVC 区构建的重组质粒均能在真核细胞中表达, 且能诱导出特异性体液免疫和细胞免疫, 加上 C 区相对保守, 是研制 HCV DNA 疫苗的主要靶抗原之一。

3.2 E 区 DNA 疫苗的构建及免疫反应 由于 E 抗体具有中和作用, 故 E 蛋白在 DNA 疫苗中的作用受到重视。Tedeschi *et al* 构建了重组 E2DNA 表达载体, 免疫 12 只 Balb/c 小鼠, 通过免疫荧光法检测到 E2 蛋白的表达, 于免疫后第 2 wk 开始可检测到抗-E2 抗体, 并且确定 E2 至少有两个线性抗原表位。Lee *et al* 构建了不同的含有 HCV/E 基因的表达式质粒, 其中有 HCV/E 和 GM-CSF 融合基因质粒, 结果显示 GM-CSF 基因也得到表达, 并可加强 HCV/E 的体液免疫和细胞免疫反应, 提示 GM-CSF 可增强 HCV/E 的免疫效果。现已证明, HCV E 区 E2 上至少有 2 个中和位点, 与病毒的清除有关。由以上结果可以推断, HCV E 可能是今后 HCV DNA 疫苗的重要研究方向, 但 E 区的高度变异给疫苗的研制带来了一定的难度。

Fournillier *et al* 以 HCV 1a 基因型 E2 区不同基因片段构建了 3 种不同重组体, 用 im 或 im 加 iE 等不同途径免疫小鼠, 抗体阳性率在 60-100% 之间, 其中以 im 加 iE 方法效果最好, iE 方法其次, 主要是 IgG2a、IgG2b, 没有检出 IgG1, 显示出 Th1 样抗体反应。免疫鼠脾细胞还可分泌 IFN γ , 但未检出 IL4。可见 HCV DNA 免疫, im 加 iE 是最有效的方法。

3.3 HCV C+E 区 DNA 疫苗的构建 1997 年 Saito *et al* 将编码结构区(C+E1+E2)基因片段(341-2449nt)克隆入含 CMV 启动子的 PRC 载体中, 构建 HCV 结构区 DNA 疫苗, 通过哺乳细胞体外表达和免疫小鼠研究证实, 其不仅能在 Human293、BALB/3T3、cos1 中表达 C、E1、E2 蛋白, 而且还能诱导 BALB/c 小鼠产生抗体和特异性 CTL 的活性。另有人用 HCV C+E2 序列构建的质粒 DNA 疫苗免疫小鼠能诱导特异性的 CTL 活性、抗 C 和抗 E2 抗体应答, 和 Th1 为主的增生有关。

3.4 NS 区 DNA 疫苗的构建 1996 年 Kurokohchi *et al* 证实 HCV NS3 区存在一个 CTL 表位, 其最小单位由 10 肽组成, 推测其可作为 HCV DNA 疫苗构建的有效。但近来对 HCV NS 区疫苗构建的报道研究较少, 可能与 NS

区编码的非结构蛋白抗原性及诱导宿主产生特异性免疫应答反应较弱有关。

3.5 HBV/HCV 嵌合核酸疫苗 有学者在先前研究基础上用 HCV C 区和 HBV 前 S1、前 S2、S 构建了 9 种不同重组体, 转染不同细胞系, 然后再免疫小鼠。结果显示, HCV C 区蛋白及不同嵌合蛋白均可在转染细胞中表达, 并可激发和增强小鼠 CD4+ T 和 CD8+CTL 对 HBV 和 HCV 融合蛋白反应, 免疫强度与 CD4+ T 淋巴细胞产生的 Th1 样细胞因子水平有关。这种 HBV/HCV 联合核酸疫苗正在研究中, 推广及应用也符合今后疫苗发展的方向。对于一些低免疫原性的多肽, 插入到其他蛋白质中则可能诱发理想的免疫应答。因此, 嵌合表达的 HBV/HCV 融合蛋白质的免疫原性可能更好。

3.6 存在问题及展望 与传统的蛋白质疫苗相比, DNA 疫苗有诸多优点: (1)可激发机体全面的免疫应答; (2)可表达接近天然构象的抗原, 抗原性强; (3)能联合免疫, 既可将编码不同抗原的基因构建在同一个质粒中, 又可将不同抗原基因的多种质粒联合应用制成多价疫苗; (4)制备简单, 成本低, 易运输; (5)既有预防又有治疗作用^[11]。

但是仍有许多实际问题阻碍了 HCV 疫苗的发展^[11-12]。主要体现在: (1)HCV 属 RNA 病毒, 具有高度的变异性; (2)难以体外培养; (3)只对人及黑猩猩易感; (4)缺乏有效的体外复制系统; (5)此外 HCV DNA 疫苗的安全性仍有许多方面值得探索, 比如外源 DNA 与染色体整合、免疫耐受、自身免疫及激活癌基因、抑癌基因失活以及产生抗-DNA 抗体等。虽然目前在动物实验中未出现此类现象, 但仍需进一步观察。

目前, 从国内外学者在 HCV DNA 疫苗的构建、免疫效应及安全性方面做的大量研究来看, 虽未发现因使用 DNA 疫苗而引发肿瘤和自身免疫功能紊乱的报道, 但也有若干问题值得关注: (1)HCV DNA 疫苗引起的机体免疫应答能否起到预防和清除 HCV 感染作用; (2)鉴于细胞免疫应答可介导组织病理学损伤, HCV DNA 疫苗诱发的 CTL 反应能否引起肝脏的病理学变化; (3)由于免疫对抗作用的限制, 尚不能构建来自多个不同 HCV 基因型的融合 DNA 疫苗; (4)HCV DNA 疫苗能否引起机体产生免疫耐受; (5)由于目前的研究大多仅局限于小鼠, 其作用机制和灵长类动物之间还有很大的差异等等。所以, 在 HCV DNA 疫苗研制方面还有大量的理论和实验工作要做^[11, 13]。

总之, 丙型肝炎疫苗虽然还未有突破性进展, 但随着对 HCV 免疫机制的进一步了解, 通过对体外复制模型的进一步完善及增强免疫效果的研究, 相信在不远的将来, HCV 疫苗的研制会有一定的突破。

4 参考文献

- 1 罗新栋, 聂青和, 何云, 罗红, 程勇前. 检测抗-HCV IgG κ/λ 轻链比值及其临床意义. 中国医师杂志 2004;6:178-180
- 2 Torresi J, Bharadwaj M, Jackson DC, Gowans EJ. Neutralising antibody, CTL and dendritic cell responses to hepatitis C virus: a preventative vaccine strategy. Curr Drug Targets 2004; 5:41-56

- 3 Inchauspe G, Feinstone S. Development of a hepatitis C virus vaccine. *Clin Liver Dis* 2003;7:243-259
- 4 聂青和, 李梦东. 丙型肝炎疫苗研究现状及策略. 中华流行病学杂志 1998;19:47-49
- 5 Forns X, Bukh J, Purcell RH. The challenge of developing a vaccine against hepatitis C virus. *J Hepatol* 2002;37:684-695
- 6 Leroux-Roels G, Depla E, Hulstaert F, Tobback L, Dincq S, Desmet J, Desombere I, Maertens G. A candidate vaccine based on the hepatitis C E1 protein: tolerability and immunogenicity in healthy volunteers. *Vaccine* 2004;22:3080-3086
- 7 刘荷中. 基于E2糖蛋白的丙型肝炎疫苗的研究进展与展望. 军事医学科学院院刊 2002;26:143-147
- 8 聂青和. 基因疫苗的研究进展. 见: 李梦东, 王宇明. 实用传染病学. 第三版, 北京: 人民卫生出版社, 2004:282-291
- 9 Puig M, Major ME, Mihalik K, Feinstone SM. Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis C virus infection. *Vaccine* 2004;22:991-1000
- 10 Duenas-Carrera S, Vina A, Martinez R, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez-Obregon JC, Marante J, Perez A, Mosqueda O, Martinez G, Morales J. Immunization with a DNA vaccine encoding the hepatitis-C-virus structural antigens elicits a specific immune response against the capsid and envelope proteins in rabbits and Macaca irus (crab-eating macaque monkeys). *Biotechnol Appl Biochem* 2004;39:249-255
- 11 聂青和. 基因疫苗的基础研究及应用现状. 世界华人消化杂志 2003;11:125-129
- 12 聂青和, 李梦东, 胡大荣, 陈国致. HCV感染后机体保护性免疫缺陷原因探讨. 世界华人消化杂志 2000;8:28-30
- 13 Rollier C, Depla E, Drexhage JA, Verschoor EJ, Verstrepen BE, Fatmi A, Brinster C, Fournillier A, Whelan JA, Whelan M, Jacobs D, Maertens G, Inchauspe G, Heeney JL. Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine-induced peripheral T-helper immune response. *J Virol* 2004;78:187-196

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

WJG 和世界华人消化杂志全文网站免费开通

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

1 本系统的功能

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

2 网址

WJG (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>) 世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)

3 论文摘要格式

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

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

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

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

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

论文目次

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

4 全文

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

5 投稿查询

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

COX-2 及其抑制剂在 Barrett 食管及食管腺癌发生发展中的作用

林 晴, 王 雯

林晴, 南京军区福州总院消化内科 福建省福州市 350025
王雯, 南京军区福州总院消化内科 福建省福州市 350025
项目负责人: 林晴, 350025, 福建省福州市, 南京军区福州总院消化内科.
收稿日期: 2004-06-08 接受日期: 2004-07-22

摘要

大约有 10-30% Barrett 食管发展成食管腺癌, 其危险性与 Barrett 食管上皮不典型增生程度相关. 大量研究表明环氧合酶-2(COX-2)的过度表达与胃肠道肿瘤发生发展密切相关. Barrett 食管发展成食管腺癌的 COX-2 免疫活性较未发展成食管腺癌的高. 试验指出选择性的 COX-2 抑制剂可降低 Barrett 食管上皮的增生, 减低 COX-2 的活性, 减少食管腺癌的发生率. 本文就 COX-2 在 Barrett 食管及食管腺癌发生发展中的作用及选择性的 COX-2 抑制剂在降低二者发生率的机制做一综述.

林晴, 王雯. COX-2 及其抑制剂在 Barrett 食管及食管腺癌发生发展中的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2410-2412
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2410.asp>

0 引言

食管腺癌死亡率很高, 大部分来自 Barrett 食管上皮. Barrett 食管即正常的食管鳞状上皮被化生的柱状上皮替代, 他经过不同程度的不典型增生可逐渐转变为食管恶性肿瘤, 患食管腺癌的危险性与 Barrett 食管上皮不典型增生程度相关. 近年食管腺癌的发病率显著上升^[1], 已占有食管癌的 50%^[1]. 手术切除是目前惟一的治疗方法, 但手术后死亡率和复发率仍然很高, 手术后的 5 a 生存率仅 25%^[1]. 环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是催化花生四烯酸转化为前列腺素的一个重要的限速酶, 有 COX-1 和 COX-2 两种异构酶, 具有不同的生物学功能. COX-1 是一种结构酶, 稳定表达于许多组织, 产生具有生理作用的前列腺素(PGs), 维护人体的正常生理功能. 而 COX-2 是一种诱导酶, 正常生理情况下在多数组织中不表达, 但可被广泛的血管外激活物如肿瘤坏死因子、白介素、表皮坏死因子、血小板激活因子等诱导表达, 将花生四烯酸代谢为各种介导机体的病理生理过程的 PGs 产物. 近年大量研究表明, COX-2 的过度表达与胃肠道肿瘤的发生发展密切相关, 流行病学研究表明选择性 COX-2 抑制剂能降低家族性腺瘤样息肉病的发生, 但 COX-2 在 Barrett 食管及食管腺癌发生发展

中的作用以及选择性 COX-2 抑制剂能否降低食管腺癌的发生尚不明确. 现就近几年来此方面的研究做一综述.

1 COX-2 在 Barrett 食管及食管腺癌发生发展中的作用及机制

研究表明 70-80% 的食管、胃、结肠的肿瘤表达 COX-2 的 mRNA 和蛋白^[2]. Wilson *et al*^[3] 用 RT-PCR 的方法证明 80% 的 Barrett 食管 COX-2 mRNA 表达增加. 研究发现 COX-2 持续表达于正常食管和十二指肠上皮, 但在正常的基底细胞和鳞状食管上皮 COX-2 免疫活性较低, 而在肿瘤细胞和溃疡后的基底细胞中表达高活性的 COX-2. 将 Barrett 食管发展为食管腺癌的患者手术切除的腺癌标本进行 COX-2 免疫组化, 仅少数标本(20%)的 COX-2 免疫活性低, 而大部分(80%)免疫活性较高, COX-2 免疫活性高的患者较 COX-2 免疫活性低者更容易发生远处转移和原位复发^[4]. 在 Barrett 食管中 COX-2 表达的提高可出现于不同程度的不典型增生, 而处于良性化生阶段的标本仅少量表达或不表达 COX-2^[5-7]. 因而 COX-2 的过度表达可看作为 BE 柱状上皮向食管肿瘤转变的早期事件^[1]. 但另有研究还发现 COX-2 表达的增加是一个病变区域的变化, 而并非只在高度不典型增生的细胞内, 即与肿瘤或高度不典型增生相连的良性或轻度不典型增生的区域也表达相当水平的 COX-2^[6].

用 Barrett 食管细胞进行细胞培养发现无论是胃酸和胆汁酸的单独还是混合使用都能使食管上皮 COX-2 蛋白表达增高, 以单独使用胆汁酸作用最明显^[5]. 胆酸中脱氧胆酸和鹅脱氧胆酸这两种二羟基胆汁酸最能诱导 COX-2 mRNA 的转录, 其机制可能是作用于依赖蛋白激酶 C/活化蛋白 1 的通道. 胆汁酸同样能促进食管腺癌细胞表达 COX-2. COX-2 是调节细胞连接的一个重要因素. 过度表达 COX-2 可以减少细胞中的 E-钙粘连素的表达, 这样就改变了细胞连接中的一些结构蛋白. Bailey *et al* 研究发现 E-钙粘连素的水平的降低预示 Barrett 食管向着化生-不典型增生-腺癌这一过程发展, 同时也改变着 COX-2 的表达^[8]. 大量的证据表明 COX-2 出现在癌前病变组织及恶性肿瘤中. 在体和细胞培养已经证实组织 COX-2 的过度表达可造成细胞增生与凋亡的失衡, 他能促进细胞的增生, 并可能通过降低化生四烯酸的水平、调节 Bcl-2 基因或 TGF β ₂R 的

表达途径抑制细胞凋亡, 导致细胞过度生长而不能正常凋亡以去除DNA突变的细胞, 从而促进肿瘤的生长. Murata *et al*发现肿瘤中COX-2过度表达与肿瘤侵袭淋巴管和发生淋巴结转移显著相关, 且患者的预后较差, 而转变为侵袭性组织的可能性与COX-2改变细胞表面糖抗原的表达、细胞基质中金属蛋白酶的活性与形式的转变以及上调CD44、促进细胞间的黏附有关. Wilson *et al*研究表明COX-2在Barrett食管组织中的升高与其他的炎症前细胞因子的变化无关, 由此表明COX-2的变化是一种特殊现象, 而不是炎症的一部分^[3]. 野生型的p53基因能抑制COX-2的转录, 该基因转录水平的降低, 可使COX-2表达增高, 他可能是COX-2表达的决定性因素之一^[9]. 敲除Apc老鼠(一种家族性腺瘤样息肉病的动物模型)的COX-2基因, 肠息肉的数量和大小都明显的减少^[10]. 其原因可能是COX-2与神经鞘磷脂转变为神经酰胺减少有关, 或作用于产生PGs的控制细胞周期的过氧化酶激动剂受体^[11]. 若Apc基因发生突变, 可导致该老鼠DNA中 β 链不能降解, 使COX-2转录增加, 则引起腺瘤样肠息肉.

2 选择性COX-2抑制剂预防Barrett食管及食管腺癌的作用

COX-2在炎症和肿瘤中诱导性的高表达, 表明COX-2可能是预防和治疗上的一个靶点. 目前已经证实用选择性的COX-2抑制剂(celecoxib)能有效地治疗家族腺瘤样肠息肉病. 动物研究、活体细胞培养试验和近来人体研究都表明COX-2与癌基因的克隆有关, 选择性的COX-2抑制剂有抗肿瘤的作用^[10-13]. 流行病学研究表明常规服用NSAIDs药物的患者发生食管肿瘤的危险性明显降低, Funkhouse *et al*经过12-16 a对14 407例患者进行观察, 服用阿司匹林的人患食管肿瘤的比未服用的降低80-90%^[14]. 这为NSAIDs抑制了COX-2的活性提供了佐证. 但是NSAIDs对COX-1的抑制, 使PGE₁、PGE₂产生减少, 降低了对细胞的保护作用, 因而选择性COX-2抑制剂将来在预防和治疗Barrett食管及食管腺癌可能有效.

使用NS-398(一种选择性的COX-2抑制剂)可以明显的抑制Barrett食管上皮细胞的增生: 在活检标本的细胞培养中使用NS-398 50 μ mol 6 d后, 食管上皮细胞增生约减少50%, COX-2的活性被完全抑制. NS-398对于表达COX-2的HCA-7的癌细胞克隆有抑制作用, 而对不表达COX-2的HCT-15人癌细胞克隆没有作用. COX-2的终产物PGE₂的水平可代表COX-2的活性, 研究中发现PGE₂可以反过来抑制NS-398在Barrett食管上皮细胞的增生中的作用. 由此看来COX-2与Barrett食管上皮细胞的增生以及Barrett食管上皮肿瘤形成过程有关^[15]. 但选择性的COX-2抑制剂不能促进Barrett食管上皮细胞的凋亡, 这可能与COX-2在Barrett食管形成肿瘤的早期阶段产生的作用中对细胞增生比凋亡具

有更重要的影响有关^[16]. 此外在细胞培养中还发现, 食管成纤维细胞的COX-2的活性显著高于食管上皮细胞. 虽然IL-1 β 和TNF- α 不直接作用于Barrett食管上皮细胞的COX-2的活性, 但COX-2的活性在未受刺激的细胞培养的上清液和细胞因子刺激后的食管成纤维细胞中明显增高^[15]. 炎症前细胞因子的刺激使食管成纤维细胞可以调节上皮细胞的COX-2的活性, 并使Barrett食管的炎症和肿瘤形成关联.

体内研究显示患者口服另一种选择性的COX-2抑制剂Rofecoxib(25 mg, 1次/d)共10 d, 检测每位患者的Barrett食管的上皮、正常的食管和十二指肠上皮的COX-2和PGE₂, 发现治疗前Barrett食管的上皮的COX-2和PGE₂显著高于正常食管上皮、十二指肠上皮, 治疗后Barrett食管的COX-2和PGE₂明显降低. COX-2表达的降低可减少PGE₂的生成, 从而降低细胞增生. 细胞的增生与不典型增生直接相关, 因而抑制COX-2的表达, 可以降低肿瘤形成的危险性^[17]. 此外—外国研究人员用SD大鼠做Barrett食管的模型后使用选择性COX-2抑制剂MF-Tricyclic及Sulindac进行随机对照试验, 证明使用该选择性COX-2抑制剂后不典型增生的程度以及食管腺癌的发生率低于对照组^[18].

总之, COX-2与Barrett食管及其腺癌的发生发展密切相关, COX-2的过度表达可促进Barrett食管及其腺癌的发生发展, 由此选择性的COX-2抑制剂将来可能会在临床上来有效地进行化学预防, 治疗和控制Barrett食管及食管腺癌的发生, 但实际的临床应用还很少, 还需要大量临床试验来证实.

3 参考文献

- 1 Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001;51:15-36
- 2 Van Rees BP, Ristimaki A. Cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of the gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* 2001;36: 897-903
- 3 Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meliaer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer* 1998;85:2929-2934
- 4 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
- 5 Shirvani VN, Ouatu-Lasdar 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
- 6 Morris CD, Armstrong GR, Bogley G, Green H, Attwood SE. cyclooxygenase-2 expression in Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Am J Gastroenterology* 2001; 96:990-996
- 7 van Rees BP, Saukkonen K, Ristimaki A, Polkowski W, Tytgat GN, Drilenburg P, Offerhaus GJ. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol* 2002;196:171-179
- 8 Bailey T, Biddlestone L, Shepherd N. Altered cadherin complexes in the Barrett's esophagus-dysplasia-adenocarcinoma sequence: Correlation with disease progression and dedifferentiation. *Am J Pathol* 1998;152:135-144

- 9 Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 1999; 274:10911-10915
- 10 Mestre JR, Chan G, Zhang F, Yang EK, Sacks PG, Boyle JO, Shah JP, Edelstein D, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression. An approach to preventing head and neck cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999;889:62-71
- 11 Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:681-686
- 12 Zhang Z, DuBois RN. Par-4, a proapoptotic gene, is regulated by NSAIDs in human colon carcinoma cells. *Gastroenterology* 2000;118:1012-1017
- 13 Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000;342:1946-1952
- 14 Kandil HM, Tanner G, Smalley W, Halter S, Radhika A, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in Barrett's esophagus. *Dis Sci* 2001;46:785-789
- 15 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
- 16 Whittles CE, Biddestone LR, Burton A, Barr H, Janlowski JA, Warner PJ. Apoptotic and proliferative activity in the neoplastic progression of Barrett's esophagus: a comparative study. *J Pathol* 1999;187:535-540
- 17 Naruse M, Tanabe A, Sato A, Takagi S, Tsuchiya K, Imaki T, Takano K. Aldosterone breakthrough during angiotensin II receptor antagonist therapy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2002;40:28-33
- 18 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

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

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

1 本系统的功能

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

2 网址

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

3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体

3p21 区域一个表达下调的 **EST** 的鉴定. 癌症 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 **3p21** 区域一个表达下调的 **EST** 的鉴定

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

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

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

中医药治疗胃肠动力紊乱性疾病进展

骆云丰, 郑立升

骆云丰, 福建中医学院 福建省福州市 350003
郑立升, 福州中医医院 福建省福州市 350001
项目负责人: 郑立升, 350001, 福建省福州市, 福州市中医医院消化内科.
juquanshuiwen@hotmail.com
电话: 0591-87678576
收稿日期: 2004-04-28 接受日期: 2004-08-21

摘要

胃肠动力紊乱是目前胃肠病学研究的热点之一. 传统中医学虽没有胃肠动力紊乱这一概念, 但对于相似病症的治疗却积累了丰富的经验. 近年来, 随着相关概念的提出, 中医学开始介入到胃肠动力紊乱性疾病的治疗与研究当中, 并且取得了较好的临床疗效和科研成果, 随着该课题研究的不断深入, 又涌现出许多新理论、新方法、新成果. 笔者选择功能性消化不良(FD)、反流性食管炎(GERD)、肠易激综合征(IRS)、糖尿病性胃轻瘫(DGP)4种最为常见的胃肠动力紊乱性疾病为综述对象, 将近5、6 a来中医药在该领域的研究给予全面的总结和回顾.

骆云丰, 郑立升. 中医药治疗胃肠动力紊乱性疾病进展. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2413-2419
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2413.asp>

0 引言

近10多年来, 随着胃肠动力学的不断深入, 中医药治疗胃肠动力紊乱性疾病已经成为一热门的前沿课题, 并受到国内外消化界的广泛关注. 胃肠动力紊乱所表现的各种临床症状, 虽然在中医学的相关疾病中早有记载, 但中医学真正切入胃动力学概念及其现代化研究却比较晚, 就目前而论, 尚缺乏从基础理论到临床实践较为系统的认识和研究, 本文试将近年来中医学对胃肠动力学的认识作一简要的回顾和分析.

1 理论探讨

1.1 对胃肠动力的认识 西方医学认为胃肠动力功能是消化系统重要的生理功能之一, 其功能正常与否同各种胃肠激素、脑肠肽以及中枢神经系统、肠神经系统密切相关. 功能紊乱常会引起腹胀、腹泻、腹痛等症, 临床中以胃食管反流病(GERD)、功能性消化不良(FD)、糖尿病性胃轻瘫(DGP)、肠易激综合征(IRS)最为常见. 中医学无胃肠动力之说, 但中医学同样的认为脾胃在机体正常生理功能中发挥着不可替代的作用, 脾胃的正常运转不仅与自身的气血阴阳有关, 而且与其他脏腑如肝、胆、肺等密切相关, 当气血不和、阴阳失衡时, 常会引起呕吐、腹胀、泄泻等症状,

临床中以呕吐、痞满、腹痛、泄泻等病最为常见. 比较而言, 中西医对“胃肠动力学”的认识, 在发病原因、病理机制等方面完全不同, 具体的两个疾病也决不同, 如IBS实际包涵了中医学的腹胀、腹痛、泄泻等病的一部分, 而中医的腹胀可能涉及到西医的IBS、FD以及假性肠梗阻. 虽然, 两种医学在胃肠动力学的认识上属于两种不同的理论, 但两种认识并非毫不相关, 而是在许多方面存在相似性, 沈舒文 *et al*^[1]认为现代医学对胃肠消化运动的认识与中医脾胃纳运, 在形式上具有一致性, 其运动的动力与脾胃气机的升降所产生的动力具有类似性, 动力障碍所表现的症状与气机阻滞的征候特征具有相似性. 笔者认为这些相似性恰是中医学介入胃肠动力学的切入点, 他为中医学开展胃肠动力学的研究提供了依据和思路.

1.2 对传统理论比较 周吕 *et al*^[2]将胃肠动力紊乱总结为八大临床症状: 吞咽困难、胸痛、恶心呕吐、腹痛、腹胀、腹泻、便秘、大便失禁. 以此为切入点, 以《中医内科学》第六版教材为参考, 笔者发现中医学的噎膈、胃脘痛、呕吐、腹痛、痞满、泄泻、便秘这7种病(腹泻与大便失禁统属泄泻)的主要临床表现与之存在相似性. 在病因病机认识上, 中医学认为: 噎膈是由于七情内伤、饮食所伤、年老肾虚引起; 胃脘痛是寒邪客胃、饮食伤胃、肝气犯胃、脾胃虚弱等引起; 呕吐是由外邪犯里、饮食不节、情志失调、脾胃虚弱、命门火衰等引起; 腹痛是由于外感时邪内传于里、饮食不节肠胃受伤、情志失调气滞血瘀、阳气素虚脏腑失煦等引起; 痞满是由于表邪入里、食滞中阻、七情失和、脾胃虚弱等引起; 泄泻是感受外邪、饮食所伤、情志失调、脾胃虚弱、命门火衰等引起; 便秘是由于肠胃积热、气机郁滞、阴寒积滞、气虚阳衰、阴亏血小等引起. 将以上7种疾病的病因病机做横向比较, 不难发现: 外邪犯胃、饮食不节、气机瘀滞、脾胃虚弱为7种病所共有. 传统认识上的异同为我们的研究提供了两个重要的思路: (1)中医学胃肠动力紊乱可以从以上7种疾病入手进行相关研究; (2)对于病因病机的研究可以从共同的4个方向考虑.

1.3 对新理论的研究 《素问·灵兰秘典》言“脾胃者仓廪之官, 五味出焉”《素问·经脉别篇》“饮入于胃, 游溢精气, 上输于脾, 脾气散精, 上归于肺, 通调水道, 下输膀胱, 水精四布, 五经并行”可见, 脾胃是消化系统的主要脏器, 处于主导地位, 是受纳食物运化精微的根本, 而其他脏腑则居于从属地位, 协助脾胃发

挥正常的生理功能. 近年来, 对胃肠功能的研究大部分仍宗脾胃, 部分学者从脾胃气机升降失调、阴阳亏虚的角度对胃肠动力紊乱进行了探索, 如吴致中^[3]认为胃动力障碍有虚实之别, 中焦气虚、脾胃阳虚、胃阴不足常致胃动力低下; 陈文渊 *et al*^[4]认为脾胃之功在于运, 脾胃升降运动所产生的动力是一个中医胃肠动力的生理概念, 认为“脾宜升则健, 胃宜降则和”, 把脾胃升降失调作为胃肠动力紊乱的因机. 但实际临床中阴阳的失衡与气机的紊乱很少单独发生, 往往同时存在, 如张小萍^[5]认为脾气虚弱清阳不升, 胃阴不足气无阴濡, 就会造成脾胃气当升不升、当降不降或当升反降或降而太过而为病. 除了对作为主要脏腑的脾胃进行研究外, 李涯松 *et al*^[6]还从肝肺的角度探讨了肝肺气机升降与胃动力的关系, 他认为肝主疏泄, 调畅气机, 肺主气, 司呼吸, 肝主升, 肺主降, 肝肺的生理功能决定了其对整个机体气机升降调节的重要作用, 脾胃正常运化须依赖肝肺疏之, 肝肺升降失常, 则导致脾胃升降失常而出现胃动力障碍. 另外, 张亚声 *et al*^[7]从血的方面考虑, 认为胃气不和, 胃络受伤, 脾胃运化无力, 久则气血运行不畅而见瘀血. 严光俊 *et al*^[8]认为胃气不和, 胃络受伤, 脾胃运化无力, 久则气血运行不畅, 故见血瘀.

近年来, 对胃肠动力紊乱因机的探讨主要体现在以下3个方面: (1)以脾胃亏虚、气机不调两个方面的研究为主且程度较深, 不仅涉及脾胃本身的阴阳失衡、气机失调而且探讨了其他脏腑如肝、肺等对胃肠动力的影响; (2)对“瘀血至病”的重新认识. 中医脾胃病瘀血理论早已有之, 《脾胃论》曾言“脾胃不足皆为血病”, 但从近年来的研究来看, 从瘀血探讨胃肠动力的文献报道并不多, 该方向的研究值得进一步的深入; (3)脾主运化, 喜燥恶湿, 故食滞脾胃、湿困中州均碍脾运而致胃肠动力紊乱, 但目前对此两方面的理论研究尚缺乏较为系统的论述.

2 辨证论治

2.1 灵活的辨证 左振素 *et al*^[9]总结了54例胃动力障碍者, 认为肝郁是基础, 临床辨证上常分为肝郁气滞、肝郁湿阻、肝郁脾虚3型. 吕汉华 *et al*^[10]以胃热炽盛型、脾胃虚寒型、肝胃气滞型、胃阴亏虚型4型, 对106例胃动力障碍胃痛的患者进行了辨证治疗. 在具体各疾病的治疗中, 庞龙 *et al*^[11]参考历代医学家相关疾病的辨证经验, 对97例24 h食管PH值动态监测和胃镜检查确诊为GERD的患者进行总结和分析, 最终确立本病有肝胃郁热、肝胃不和、脾胃虚弱、胃热气逆、痰气郁阻五型; 陈洪利^[12]认为GERD的发生与痰、气、热、瘀结于食管有关, 临证上分为脾胃湿热型、肝郁化火型、气滞血瘀型、脾胃阴虚型、痰气交阻型、痰瘀胶结型、脾虚痰湿型、脾胃虚寒型8型; 朱生梁 *et al*^[13]将之统计为肝胃郁热、中虚气逆. 臧军现 *et al*^[14]对219

例FD患者进行观察, 将之分为脾胃虚弱型、湿阻脾胃型、肝胃不和型3型; 刘力 *et al*^[15]将IBS分为肝旺脾虚证、湿困脾胃证、湿滞气机证、水湿下注证、脾虚乏运证、肝肾两虚证等6个证型进行治疗. 吴成胜 *et al*^[16]从肝脾论治腹泻型肠易激综合征将腹泻型IBS分为肝脾失调型、肝郁脾虚型、脾虚肝乘型、肝脾湿热型4个证型进行治疗. 袁小琴^[17]从国家级和省级中医杂志中收集有关IBS中医辨治的文章共40篇, 将南北地域所共有的证型进行了比较分析, 发现其共同的证型为肝木乘脾、脾胃湿热、寒湿困脾、脾胃阴虚, 脾肾阳虚. 徐涟 *et al*^[18]将93例DGP患者按照湿热中阻、脾胃气虚、胃阴亏虚3型进行治疗. 刘志勤 *et al*^[19]以饮食停滞型、脾胃虚寒型、肝气犯胃型、胃阴不足型4型对214例DGP患者进行了治疗总结. 作为中医学最具诊疗特色的辨证论治, 始终以人为本, 认为人异病异, 证随病变, 故辨证论治最能体现“个体化”的治疗思想, 近年来有关胃肠动力紊乱疾病的辨证分型的研究也证明了这一观点, 辨证的灵活性决定了实际临床中各证名的纷杂各异, 但总的原则仍未离开脾、胃、肝、痰、湿、气6个方面.

2.2 规范化的证型 由于辨证的灵活多变, 导致中医证型难以规范化, 所以中医证型的精确化、规范化、量化的研究一直为中西医界密切关注的热门话题, 近年, 一些学者将西医学的诊疗检测手段引进到中医辨证当中, 力求从这些物理、化学的量化指标中为中医证型的规范化寻求客观依据. 黄穗平 *et al*^[20]选择动力障碍型FD患者30例(肝郁气滞型16例、脾胃虚弱型14例)均予X线钡条法测试胃排空, 同步进行胃窦十二指肠消化期间移动性运动复合波和胃电图的检测, 并在测压当天清晨空腹抽取静脉血以检测血浆胃动素, 以此来探求中医证型与胃肠动力及胃内激素之间的关系, 结果显示: FD两型的胃排空、MMC III相的收缩波幅、空腹胃电图主功率均较正常下降. 两个证型之间比较发现, 脾胃虚弱组的各项指标比肝郁气滞组有显著性降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$). 陈芝芸 *et al*^[21]将94例IBS患者, 按中医分型标准分为肝郁脾虚组、脾胃虚弱组、脾胃阴虚组, 采用放免法检测血浆神经肽Y(NPY)、P物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)、胰高糖素(Glu)的含量, 结果显示, 3组的VIP, Glu的含量都高于健康的对照组, 脾胃阴虚组的SP含量较其他两组为高, 肝郁脾虚组的NPY变化不显著但比脾胃阴虚组高. 这一研究表明: 不同患者的血浆胃肠激素含量存在差异. 何以蓓 *et al*^[22]观察了IBS不同中医证型的肛管直肠动力学的变化, 结果肝郁脾虚、脾胃虚弱、脾胃阴虚3组中: 肝郁脾虚组的直肠耐受性降低, 脾胃阴虚组排便反射不协调, 直肠敏感性降低, 但耐受性增高. 孙维峰 *et al*^[23]探讨了DGP中医证型与血浆胃动素(MOT)及体表心电图(ECG)改变关系, 结果显示: DGP中医证型不同, MOT含量及胃电参数不同, 胃肠动力功能存在明显的差异. 庞龙 *et*

al^[11]将确诊为 GERD 的 97 例患者分为五型并观察了各证型的 GERD 患者与食管酸反流各指标的关系, 结果显示 GERD 的中医辨证分型与某些食管酸暴露参数之间存在明显差异. 近年来关于中医证型客观化的研究虽然取得了可喜的成果, 但从中医发展的长远来看, 该方向的研究特别是胃肠动力学的证型客观化的研究仍处于起步阶段, 其研究所选择的各项指标、仪器有待斟酌.

2.3 多样性的治法 叶仁群 *et al*^[24]系统的阐述了疏肝调气治疗 FD 的因机、治法; 何琳^[25]用温脾化湿法治疗 42 例 FD 患者, 结果总有效率 90.5%; 张燕 *et al*^[26]以益气活血法治疗 35 例 FD 患者, 结果治愈 10 例, 显效 12 例, 总有效率为 94% 远远高于对照组的 70.0%; 王耀^[27]以疏导宁神法治疗 76 例 IBS 患者, 其中治愈 43 例、有效 26 例、无效 7 例, 总有效率 90.8% 与丽珠肠乐组的 73.3% 有显著性差异 ($P < 0.05$); 朱生梁 *et al*^[28]用降气和胃法治疗 GERD 患者 33 例, 结果: 治愈 11 例, 显效 13 例, 有效 14 例, 无效 5 例, 总有效率为 84.9%; 叶庆莲 *et al*^[29]用降气和胃法治疗 GERD 患者 32 例, 结果: 痊愈 14 例 (占 43.7%), 显效 12 例 (占 37.5%), 有效 4 例 (占 12.5%), 无效 2 例 (占 6.2%). 王小超 *et al*^[30]以益气养阴活血法治疗 DGP 患者 32 例, 结果显效 29 例, 有效 2 例, 无效 1 例, 总有效率 96.9%, 显著高于对照组的 80.0%. 庄玉刊 *et al*^[31]以健脾养阴法为主治疗 DGP 患者 20 例, 结果 8 例痊愈, 6 例好转, 总有效率 70.0%. 辨证的灵活性必然导致治法的多样性, 从近年来中医药治疗胃肠动力紊乱的方法来看, 有以下两方面的特点: (1) 以四诊合参为依据, 遵循“有是证则用是药”的原则, 体现了个体化、多样化的原则, 但从临床的报道来看, 大多数的治法的范围仍未离开脾、胃、肝、气、血几项. (2) 治法的确立比证型更加灵活, 如在因机、证型的探讨中尚未见有脾气亏虚、湿浊中阻、气机郁滞、心神不安的报道, 而治疗中却出现了温脾化湿、疏导宁神等方法.

3 药物研究

3.1 新理论的创新与发展 1993 年沙建飞^[32]第一次提出胃肠动力中药的新概念, 并将行气疏肝类 (枳实、枳壳、厚朴等)、消食类 (山楂、神曲、谷芽等)、补气健脾类 (人参、党参、白术等)、芳香化湿类 (藿香、佩兰、白豆蔻等)、利胆类 (茵陈、郁金、金钱草等)、降下类 (大黄、芒硝、番泻叶等)、活血化痰化痰类 (三棱、莪术、莱菔子等) 中药, 根据其功效定为胃肠动力药并列举一些有效方剂. 1995 年全小林 *et al*^[33]即以“胃动力中药的临床应用体会”为题, 谈了自己通过临床实践对胃动力药的认识及体会. 继之, 李惟芳^[34]从理论上探讨和证实了胃肠动力中药治疗痞满的有效性, 认为“通过健运、升降、疏泄、补消、温化等法调理机体的失衡, 使之顺畅和通, 此乃胃肠动力

中药在临床运用之法”. 葛涓菲 *et al*^[35]通过腹痛 1 号敷脐治疗小儿食积腹痛的 130 例的对比观察证实了胃肠动力中药的有效性. 以中医基础理论为基础, 拿用西医学医学名词来发展中医新理论, 不失为发展中医的一种方法. 笔者认为沙氏这一理论的创立不仅为中医消化界提供了典范而且为整个中医理论的发展提供了一新思路.

随着国内外医学界特别是西医学界对中药及其提取物研究的增多, 近年来, 在西医学界, 涌现出许多新的与中药有关概念及理论, 杨奎 *et al*^[36]首次提出中药胃肠动力学的新概念, 魏睦新 *et al*^[37]对近年来胃肠动力中药的调节机制的研究作了系统的总结, 发现白术、木香、丹参、槟榔等药物是通过兴奋胆碱能神经受体来达到对胃肠神经的调节, 而旋覆代赈汤、力胃颗粒则是通过抑制肾上腺能神经受体来对胃肠神经进行调节; 对于脑肠肽的研究方面, 有研究表明大黄、藿香、牛蒡子是通过胃动素进而对脑肠肽进行调节, 而大腹皮、大承气汤、桂枝汤则是通过调节血管活性肽以及 P 物质, 从而调节脑肠肽. 另外, 朱金照^[38]还总结了大黄、砂仁、枳实等 20 味中药与六君子汤、五苓散等 7 个方剂的胃肠动力的研究情况. 中医界对于创立的新理论新模式的想法, 从肇始至今, 一直争论不休, 部分学者认为这种理论是全盘西化, 他将中医研究引向歧途, 应给予全面否认; 另一部分学者则认为这是中药现代化与国际接轨的最佳方式. 综观近年来的研究成果, 笔者认为有关胃动力中药的研究, 特别是理论的研究, 目前还处于初始阶段, 故而对于其日后的发展及作用不可武断的予以否决, 目前的理论和成果虽然还不能为传统中药学所接纳, 但仍可作为中药学发展中的重要一支而予以保留和发展.

3.2 单味药的功效与应用

3.2.1 木香 能行气、调中止痛. 张元素言其能“散滞气、调诸气、和胃气、泄肺气”《本草汇言》言其“和胃气”、“快脾气”、“消积气”、“顺逆气”, 张景岳认为“行肝脾肺气如神, 止心腹胁痛甚捷, 和胃气止吐泻霍乱, 散冷气除胀满呃逆”. 运用上《太平惠民和剂局方》中的木香分气丸,《医学发明》中的木香顺气丸,《内外伤辨惑论》中的木香化滞汤以及《杂病源流犀烛》中的木香调气饮均为理气除胀、化滞止痛的良方. 药理研究表明木香能通过迷走神经的作用, 使大肠兴奋, 收缩力加强, 蠕动加快. 朱金照 *et al*^[39]通过在体动物实验, 观察了木香对大鼠胃排空及肠推进的影响, 结果显示不同剂量的木香煎剂对胃排空及肠推进均有促进作用, 并呈剂量依赖关系.

3.2.2 莪术 功能行气破血, 消积止痛, 用治血气瘀痛, 饮食积滞, 脘腹胀痛.《日华子本草》言其“主心腹痛”,《会约医镜》“治气滞膨胀”, 缪希雍则言“心腹痛者, 非血气不得调和即是邪居中焦所致……茂气香烈, 能调气通窍, 窍利则邪无所容而散矣.”《杨氏护

命方》中治疗小肠脏气非时痛不可忍以及孙用和的正元散,皆以莪术为主.现代药理表明,莪术能够直接兴奋平滑肌,低浓度莪术,能使肠管紧张度升高,魏兰福 *et al*^[40]用 250 g/L 莪术水提液给大鼠灌胃,结果显示:莪术能够使胃动力障碍大鼠的胃排空恢复接近正常.

3.2.3 白术 补脾益气,燥湿利水,《药性论》“主心腹胀痛,破消宿食,开胃”《本草从新》“甘补脾、温和中、苦燥湿……补脾则能进食,……和中则能止呕吐……燥湿则能利小便,生津液,止泄泻”,《金匱要略》以之配枳实治疗脾虚饮停,脘腹胀满,《丹溪心法》用之伍芍、陈、防共组痛泻要方,治疗肝脾不和,腹泻腹痛.现代药理研究表明该药能兴奋胃、十二指肠平滑肌,朱金照 *et al*^[41]通过动物实验探讨了白术促进胃肠运动的机制,即通过增加空肠肌间神经丛中AChE阳性神经分布及空肠黏膜下和肌间神经丛中SP阳性神经的含量来促进肠道运动.

3.2.4 大黄 攻积导滞,泻火解毒,活血化瘀.《神农本草经》言“主留饮宿食,荡涤胃肠,推陈致新,通利水谷,调中化食”《名医别录》言“平胃、下气、除痰实,肠间结热,心腹胀满”,《伤寒论》治疗阳明府实之大承气汤,《千金要方》治疗脾虚腹满之温脾汤均以大黄为主.药理研究表明大黄含苦味质,小剂量可促进胃液分泌,还可以通过刺激大肠局部增加大肠张力而促进运动.朱金照 *et al*^[42]探讨了大黄促进肠道运动的机制认为其大鼠小肠传输的机制可能与促进肠道的MTL、SP,抑制VIP疗效有关.

3.2.5 藿香 功能祛暑解表,化湿和中,行气止痛,《本草图经》言之:“治脾胃吐逆,为最要之药”张元素谓之能“助胃气、开胃口、进饮食”《脾胃论》用藿香安胃散治脾胃不和,饮食少进;《温病条辨》5个加减正气散皆以藿香为主,治疗不同病因引起的脘闷腹胀等症.现代药理表明藿香含有挥发油,可抑制胃肠道过激蠕动,促进胃液分泌,增强消化力.朱金照 *et al*^[43]用藿香提取液给大鼠灌胃,以观察藿香对大鼠小肠一氧化氮合酶分布的影响,从而研究藿香促进小肠运动的机制,结果显示,灌提取液1h后,空回肠NOSI阳性神经明显减少($P < 0.01$),证明了藿香对小肠促动作用与空回肠NOSI分布降低的相关性.

3.2.6 砂仁 辛温,归脾胃心经,功能化湿行气,温肾下气,安胎止泻.《玉楸药解》中言“和中调气,行郁消滞,降胃阴而下食,达脾阳而化气,呕吐与泻泄皆良.”《本草求真》“其言醒脾调胃,快气调中,则于腹痛痞胀有功”张元素言其“治脾胃气结滞不散”,杨士瀛言其能“和中、行气、止痛、安胎”,《幼活新书》中“和胃气,消宿食,理腹痛”之缩砂饮,《小儿卫生总微证方》中治“小儿滑泄,肛头脱出”之缩砂散,皆以砂仁为主.现代药理表明,木香对离体平滑肌具有兴奋作用,能够加强肠道推进运动.朱金照 *et al*^[44]对砂仁促进大鼠胃肠运动的机制进行了探讨,发现其机制可

能与砂仁增加血及胃肠道中MTL、SP含量有关.

3.2.7 槟榔 苦辛,温.功能杀虫,破积,下气,行水.《用药心法》言其“苦以破滞,辛以散邪,专破滞气下行”;《本草汇言》言其能“治诸气,祛瘴、破滞气、开郁气、下痰气、去积气、解蛊气、消谷气、逐水气、散脚气、杀虫气、通上气、宽中气、泄下气之药也”.《方脉正宗》用之配白术、麦芽、砂仁,治疗脾胃两虚,水谷不能以时消化,腹中胀满疼痛.现代药理研究表明该药具有兴奋M胆碱受体的作用,嚼食槟榔可使胃肠平滑肌张力升高,增加肠蠕动,消化液分泌旺盛,食欲增加.邹百仓 *et al*^[45]通过观察槟榔对正常大鼠和功能性消化不良模型大鼠胃肠激素分泌的影响来探索其促胃肠运动的机制,结果表明模型大鼠胃肠组织中胃动素(MTL)和血管活性肽(VIP)均升高.灌服槟榔后两组大鼠胃肠组织中的MTL含量明显升高,VIP含量明显降低,揭示槟榔促进胃肠运动和调节胃肠激素的分泌有关.

近年来关于中药胃肠动力机制探讨的研究和报道不断增多,除上述中药外对大腹皮、丹参、莱菔子、枳实等的研究亦有报道.但综观各种药物,都未离开沙建飞所提及的几大类药,这一事实提示我们:中医传统药理学与现代药理学具有相关性,可以相互启发,互为参考.

3.3 复方研究

3.3.1 传统经时方的研究 (1)旋覆代赭汤:《伤寒论》用治“伤寒发汗,若吐,若下,解后,心下痞硬,噎气不除者”,《吕同杰中医学术经验集》有用之治疗幽门梗阻、肠梗阻伴肠粘连所致的顽固性呕吐的验案,《寓意草》用治疗噎膈反胃.李月岚 *et al*^[46]用旋覆代赭汤加减治疗胃肠动力不足30例,其中治愈5例,显效14例,总有效率90.3%.王长洪 *et al*^[47]通过大鼠实验证实了旋覆代赭汤具有确切的促胃动力作用,党参、旋覆花、代赭石对大鼠胃底条肌收缩具有显著的促进作用.代二庆 *et al*^[48]通过大鼠实验观察了旋覆代赭汤对反流性食管炎模型大鼠食管黏膜一氧化氮的影响,发现旋覆代赭汤能改善模型大鼠食管黏膜的病理状况,并推测其作用机制可能为降低模型大鼠食管黏膜NO浓度,减轻炎症反应,减少下食管括约肌松弛.(2)半夏泻心汤:功能和胃降逆,开结消痞,《伤寒论》用之治痞,149条言:“但满而不痛者,此为痞,柴胡不中与之,宜半夏泻心汤.”《李克绍学术经验辑要》有用半夏泻心汤治疗外邪入肝以至神识昏狂、胸腹按痛、微呕、渴饮的验案.刘国强^[49]用半夏泻心汤治疗胆汁反流性胃炎60例,结果,治愈46例,占76.7%,好转9例,占15.0%,总有效率91.7%,麻春杰^[50]观察了半夏泻心汤对实验性大鼠胃运动的影响,证实了半夏泻心汤不仅能增强大鼠胃运动具有胃动力作用,而且对胃运动具有双向调节作用.刘晓霓 *et al*^[51]以100只SD大鼠为对象观察了半夏泻心汤及其类方对大鼠食管中MDA、SOD、

GSH-PX 的含量, 结果表明, 半夏泻心汤及其类方具有减轻食管黏膜的损伤, 抑制食管黏膜的增生, 减轻食管局部炎症细胞浸润的作用, 为半夏泻心汤治疗反流性食管炎提供理论依据. (3) 香砂六君子汤: 出自《古今名医方论》, 用之治呕吐、痞闷、脘腹胀痛, 《中医内科学》[6]版) 用治“脾胃虚弱”之呕吐. 陈亮^[52]用香砂六君子汤治疗 68 例 FD 患者, 结果治愈 57 例, 好转 7 例, 总有效率 94.1%, 与对照组 68.8% 有显著性差异 ($P < 0.01$), 张英福 *et al*^[53]通过实验观察了香砂六君子汤对大鼠离体胃平滑肌条运动的影响, 结果显示, 香砂六君子汤能增高胃底肌条的张力, 对胃底具有兴奋作用, 对胃体、窦、幽门具有抑制作用. (4) 枳实消痞丸: 出自《兰室秘藏》, 东垣言其能“治右关脉弦, 心下虚痞, 恶食, 懒倦, 开胃进饮食”, 《中医内科学》[6]版) 用之治疗饮食停滞之腹痛, 《曹仁伯医案》有用枳实消痞丸治疗脾气久虚的大便溏薄不调的验案. 彭文洪 *et al*^[54]用枳实消痞丸治疗 FD 患者 54 例, 结果显效 31 例, 有效 19 例, 总有效率为 92.6% 与对照组的 74.0% 之间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 窦丹波 *et al*^[55]通过大鼠实验探讨了枳实消痞丸对大鼠胃排空及血浆胃动素的影响, 结果显示, 枳实消痞丸具有促进 MOT 释放, 促进排空的作用.

3.3.2 自拟方药的研究 在实验研究方面, 李涯松 *et al*^[56]通过大鼠实验探讨了和胃胶囊(百合、枳壳、桔梗、莱菔子等)对胃排空的促进作用, 结果: 和胃胶囊能够加快小鼠胃排空, 明显快于生理盐水, 但与吗丁琳、西沙必利作用相当, 在观察其作用机制时, 李涯松 *et al*^[57]给大鼠腹腔注射盐酸左旋精氨酸(L-Arg)造成胃电、胃肠激素的异常, 同时给予和胃胶囊以观察和胃胶囊对 L-Arg 所致大鼠胃电、胃肠激素异常的改善作用. 结果显示和胃胶囊能有效抑制 L-Arg 引起大鼠血清及胃黏膜一氧化氮含量的升高, 对 L-Arg 所致的大鼠胃电波幅对血浆胃动素水平下降和血清胃泌素水平升高有明显的对抗作用, 从而揭示和胃胶囊的多途径作用机制. 在临床应用方面, 王立春 *et al*^[58]以疏肝悦脾汤(柴胡、枳壳、绿萼梅、川朴花、元胡、白术、茯苓、半夏、黄芩、藿香、神曲、陈皮)治疗 FD 122 例, 结果痊愈 52 例, 显效 35 例, 有效 28 例, 无效 7 例, 总有效率 94.3% 与对照组(91.7%)相比, 痊愈率有显著性差异 ($P < 0.01$), 有效率存在显著性差异 ($P < 0.05$), 但总有效率无显著性差异 ($P > 0.05$). 陈更新 *et al*^[59]以胃祺 II 号方(炙黄芪、党参、枳壳、白术、降香)治疗 37 例 FD 患者, 结果中药组总有效率 89.2%, 对照组(西沙比利组)为 83.9%, 二者之间无显著性差异 ($P > 0.05$); 在症状改善方面, 除在厌食(实验组为 92.3%, 对照组为 64.7%)的改善上有显著性差异 ($P < 0.05$) 外, 其他症状如: 上腹痛或不适、餐后饱胀、早饱、嗝气、恶心呕吐, 都未见明显差异; 在不良反应方面, 对照组有便溏 3 例, 肠鸣 2 例, 腹部隐痛 1 例, 共为 9.7%, 实验组未见不良反应, 但是二者无显著性差异; 在远期疗效方面实验组无复发

病例与对照组的 33.3% 有显著性差异 ($P < 0.05$). 在对胃祺 II 号方作用机制的研究中, 陈更新 *et al*^[60]发现用胃祺 II 号方对 FD 模型大鼠进行治疗后, 其 NO 含量明显降低, 恢复到接近正常水平, 提示胃祺 II 号治疗 FD 的机制可能与降低 NO 水平有关. 周福生 *et al*^[61]应用顺激合剂(白术、白芍、元胡、合欢皮)对 IBS 患者进行治疗并进行疗效观察, 结果治疗组总有效率为 90.0% 高于对照组 73.3%, 但二者无显著性差异. 熊文生 *et al*^[62]用疏肝舒肠汤(柴胡、郁金、乌药、元胡、香橼、白芍、枳壳、白术、夜交藤、防风、珍珠末、生甘草)治疗 IBS 60 例, 在肠道症状的改善上, 二者无明显差异 $P > 0.05$ (治疗组为 91.2%, 舒特组为 93.3%), 但在肠外症状的改善上存在明显差异 $P < 0.05$ (治疗组为 90.0%, 舒特组为 53.3%). 李兰芳 *et al*^[63]运用消化 II 号方(苏叶、香附、鱼古、陈皮、党参、茯苓、白术、黄连、甘草)对 112 例 GERD 患者进行治疗, 结果治愈 25 例, 显效 22 例, 有效 40 例, 总有效率 77.5%, 与吗丁啉组(总有效率为 67.5%)存在显著性差异 ($P < 0.01$). 邵丽黎^[64]用四逆健脾导滞汤(黄芪、柴胡、槟榔、丹参、山药、石斛、厚朴、白术、白芍、枳实、大黄、甘草)治疗 30 例 DGP 患者, 结果总有效率为 90.0%, 高于吗丁啉组的 76.9%, 二者之间存在显著性差异 ($P < 0.05$).

从一些权威杂志发表的有关自拟方疗效的报道来看, 虽然自拟方在症状改善上有一定的优势, 但大多数没有统计学意义. 这一点提示我们: 传统方药比自拟方药更具研究前景.

3.3.3 中成药的研究 (1) 六味能消胶囊: 是西藏自治区藏药厂生产的一种中成药, 由大黄、藏木香、诃子、干姜、寒水石、碱花六味药材组成, 具有宽中理气、健脾和胃、润肠通便的功效. 用法: 每次 1-2 粒, 3 次/d. 罗锡彬 *et al*^[65]应用六味能消胶囊对 30 例 FD 患者进行了临床观察, 结果有效率为 84.3%, 明显高于多潘立酮组的 60.4%; 陈广焕 *et al*^[66]运用六味能消胶囊治疗反流性食管炎 138 例结果治愈 82 例, 显效 36 例, 有效 16 例, 无效 1 例, 治愈率为 59.4%, 总有效率 97.0% 高于吗丁啉组的 96.3%. 杨成俊 *et al*^[67]应用六味能消胶囊配合西药雷尼替丁治疗反流性食管炎 30 例, 结果痊愈 18 例, 有效 11 例, 无效 1 例, 总有效率 97.0% 远远高于单纯雷尼替丁组的 75.0%. (2) 六味安消胶囊: 由贵州信邦制药股份有限公司生产, 其组成成分为土木香、大黄、山奈、诃子、寒水石等. 功用能和胃健脾, 降逆导滞, 主治胃痛胀满, 消化不良, 大便不畅, 便秘等症. 用法: 每次 6-8 粒, 1 日 3 次. 方英杰 *et al*^[68]运用六味安消胶囊治疗功能性消化不良 87 例, 结果显效 45 例, 有效 38 例, 无效 4 例, 总有效率 97.0% 高于西沙比利组的 87.4%. 杨扩美^[69]运用六味安消胶囊治疗糖尿病性胃轻瘫 52 例, 结果治愈 33 例, 显效 10 例, 有效 7 例, 无效 2 例, 总有效率 96.8%; 高成英 *et al*^[70]运用六味安消胶囊治疗胆汁反流性胃炎 40 例, 其中治愈 16 例, 有效 19 例, 无效 5 例, 总有

效率为87.5%。(3)刺五加注射液:是传统中药刺五加的提取物,具有益气健脾、补肾安神的功效。现代药理表明其能调节和补充脑中神经递质含量,加强中枢神经的抑制等作用。周青^[71]用之治疗肠易激综合征,结果106例患者中,显效56例,有效32例,无效18例,总有效率达83.0%。(4)胃苏颗粒:扬子江制药股份有限公司生产,由紫苏梗、香附、陈皮、香橼、佛手、枳壳、槟榔、鸡内金组成,功能理气消胀,和胃止痛,主要治疗胃脘胀痛。用法:每次1袋,3次/d。叶松^[72]应用胃苏颗粒治疗功能性消化不良50例,1个疗程后即刻症状缓解率84.0%。吕瑛^[73]用之与西沙比利作对照,观察50例动力障碍型FD患者的临床疗效,结果治疗组30例中显效12例,有效5例,无效3例,总有效率85.0%,疗效与对照组的西沙比利相似。

综观最近10a中医胃肠动力学的发展,笔者认为其方向不外乎传统中医、现代中医、中西医结合、中药现代化4个方面,针对这4个方向结合近年来的研究情况,笔者谈以下几点看法:(1)在传统中医学认识的基础上不断研究和发展新的理论是中医学以及中医脾胃学发展的一个重要方向,但从建国至今,尚未见到中医基础理论的研究有突破性的进展。(2)以西医学各种先进的诊断手段为补充,进一步精确简化中医学具体的证,力求中医证型的客观化、准确化,并致力于专方专病的研究,是中西医界一直以来关注的焦点。近年来,消化方面的许多学者也尝试从胃肠激素、胃排空等角度进行探索,但从研究的结果来看,虽然某一证型与某一种或几种激素具有相关性,但目前还未发现针对某一种固定证型的特异性指标,这一方面的研究是否能够最终达到目的,令人质疑。(3)以光、电等物理学原理为依据的X线、CT、MRI、胃镜、胃电图,在反应患者客观症状上较化学检验指标更加稳定、客观,从两种医学在某两种具体疾病症状上存在相似性这一角度出发,将这些能够间接反映客观症状的先进物理学检验手段纳入中医基础论特别是四诊理论中去,以之为突破口,发展理论,精确诊断,提高疗效,从而发展成为一种全新的现代中医,不失为一个很好的发展思路。但目前除少数学者如姚保泰的《中医舌像与胃镜像对照图谱》做一些尝试外,还未见到能够涵概这些检查结果的中医理论。(4)从中医学常用的行之有效的天然药物中遴选提取有效成分,进行药代、药动、药效学研究,以期研究开发更具临床疗效的新药。从近年来国内外的报道来看,这个方向的研究早已开展并且成绩显著,其研究成果日益增多并且广泛运用到临床当中,但目前中医界对于这一方向的研究还存在争论,意见褒贬不一。这是因为,作为一种新剂型,这些胃肠外给药的中药制剂目前还不能被现有的中医理论所接纳而回归到中医临床,迄今为止尚未见到有运用中医基础理论指导这些药物进行临床运用的相关理论研究。

4 参考文献

- 1 沈舒文,曹海涛,宇文亚.胃肠动力与脾胃气机的相关性探讨.陕西中医学院学报 2002;25:1-2
- 2 周吕,柯美云.胃肠动力学第一版,北京:科技出版社,1999:587
- 3 吴致中.胃动力障碍中虚证辨证施治.中国中西医结合脾胃杂志 1999;7:35-36
- 4 陈文渊,倪元芳,林勤.脾胃升降与胃肠动力的探讨与运用.中国中西医结合脾胃杂志 1999;7:235-236
- 5 张小萍.气机升降与胃肠动力关系的理论探讨.江西中医学院学报 1999;11:145-146
- 6 李涯松,单兆伟.肝肺升降与胃动力障碍性疾病的关系.中国中西医结合脾胃杂志 1999;7:32-33
- 7 张亚声,刘小弟,翁雪松,张镜人,王福祺.慢性胃炎用调气活血法治疗后的胃动力变化-附86例患者胃排空功能疗效分析.上海中医药杂志 2001;35:18-19
- 8 严光俊,桂壮.活血化瘀法治疗功能性消化不良临床观察.湖北中医杂志 2002;24:20
- 9 左振素,闫汝茂,王启秀.分型辨治胃动力障碍54例.辽宁中医杂志 1996;23:117
- 10 吕汉华,李桂贤.胃动力障碍胃痛与中医证型的关系探讨.广西中医药 2001;24:263
- 11 庞龙,段国勋,熊天琴,周德瑞.胃食管反流病中医分型与酸反流的关系.世界华人消化杂志 2000;8:139-142
- 12 陈洪利.分型辨治反流性食管炎.中华现代中西医杂志 2004;2:159-160
- 13 朱生梁,李勇,朱晓燕,马淑颖.胃食管反流病证型研究.上海中医药杂志 2002;36:12-13
- 14 臧军现,李克强.中医辨证治疗功能性消化不良219例.辽宁中医杂志 2003;30:36-37
- 15 刘力,沈舒文.肠易激综合征中医辨证论治.实用中医内科杂志 2002;16:157-158
- 16 吴成胜,苏良.从肝脾论治腹泻型肠易激综合征探微.山东中医药大学学报 2004;28:25-26
- 17 袁小琴.肠易激综合征辨证施治南北地域差异的比较.海南医学 2003;14:77
- 18 徐涟,易小玲.辨证治疗糖尿病性胃轻瘫93例.中国中西医结合消化杂志 2002;10:236-237
- 19 刘志勤,吕蕾.辨证论治糖尿病性胃轻瘫214例.河北中医 2003;25:738-739
- 20 黄穗平,李叶,罗云坚,尚文王,余绍源.功能性消化不良中医证型与胃动力及激素的相关性.广州中医药大学学报 2002;19:265-268
- 21 陈芝芸,严茂祥,项柏康.肠易激综合征中医证型与胃肠激素关系的探讨.中国中西医结合杂志 2002;22:664-666
- 22 何以蓓,陈芝芸,严茂祥,项柏康.肠易激综合征中医证型与肛管直肠动力学的相关性研究.中国中西医结合消化杂志 2003;11:73-75
- 23 孙维峰,孙桂华,毛婷丽,董哲,徐伟,王小春.糖尿病胃轻瘫中医证型与胃动力改变关系的研究.安徽中医学院学报 2003;22:17-19
- 24 叶仁群,张光奇.疏肝调气法治疗功能性消化不良的探讨.吉林中医药 2003;23:1-2
- 25 何琳.温脾化湿法治疗功能性消化不良42例.国医论坛 2002;17:43
- 26 张燕,高秀芬,于晓宏.益气活血法治疗老年功能性消化不良35例.光明中医 2001;16:51-52
- 27 王耀.疏导宁神法治疗肠易激综合征76例.浙江中医杂志 2003;38:190
- 28 朱生梁,王晓素,方盛泉,李勇.降气和胃方治疗胃食管反流病33例.上海中医药杂志 2001;35:24
- 29 叶庆莲,蒙木荣,臧知明.扶脾抑肝法治疗慢性反流性食管炎32例.四川中医 2004;22:35-36
- 30 王小超,冯栋年,陈世敬.益气养阴活血法治疗糖尿病胃轻瘫32例.江苏中医 2000;21:30-31
- 31 庄玉刊,卢君仁.健脾养阴法为主治疗糖尿病性胃轻瘫20例疗效观察.新中医 2002;34:31
- 32 沙建飞.胃动力中药初探.中国医药学报 1993;8:5-7
- 33 全小林,崔新育.胃动力中药的临床应用体会.中医杂志 1995;36:463-464
- 34 李惟芳.从痞满证治认识治疗胃动力之中药.辽宁中医杂志 1999;26:163-164
- 35 葛湄菲,曲素欣.胃动力中药的临床研究.临床消化病杂志 2000;12:74-75
- 36 杨奎,蒲旭峰.论“中药胃肠药动力学研究”的意义及对策.中国实验方剂学杂志 1998;4:36-39

- 37 魏睦新, 邹百仑. 胃肠动力中药的调节机制研究进展. 浙江中西医结合杂志 2002;12:456-457
- 38 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
- 39 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;8:236-236, 238
- 40 魏兰福, 邹百仑, 魏睦新. 莪术对大鼠胃动力影响的实验研究. 湖南中医杂志 2003;19:58-59
- 41 朱金照, 冷恩仁, 张捷, 许其增. 白术对大鼠肠道乙酰胆碱酯酶及P物质分布的影响. 中国现代应用药学杂志 2003;20:14-16
- 42 朱金照, 冷恩仁, 史洪涛, 张捷. 大黄促进肠道运动的机制探讨. 解放军药学报 2002;18:339-340
- 43 朱金照, 张捷, 张志坚. 藿香提取液对大鼠小肠一氧化氮合酶分布的影响. 福建医药杂志 2002;24:99-100
- 44 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
- 45 邹百仑, 魏睦新, 原景龙. 槟榔对胃肠激素的影响与其促胃肠运动的关系. 中医药学刊 2004;22:1040-1041
- 46 李月岚, 周云彪, 韩友芳. 旋覆代赭汤治疗胃肠动力不足 30 例. 江西中医药 2002;33:21
- 47 王长洪, 陈多, 吴春福, 陆宇平. 旋覆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
- 48 代二庆, 李海英, 刘子泉, 王义和, 赵占考, 袁红霞. 旋覆代赭汤对反流性食管炎模型大鼠食管黏膜一氧化氮的影响. 现代中西医结合杂志 2004;13:1425-1428
- 49 刘国强. 半夏泻心汤治疗胆汁反流性胃炎 60 例. 四川中医 2003;21:38-38
- 50 麻春杰. 半夏泻心汤对实验性大鼠胃运动的影响. 实用中医药杂志 1996;12:31-32
- 51 刘晓霓, 高艳青, 司银楚, 牛欣. 半夏泻心汤及类方治疗反流性食管炎作用机理的研究. 中医药学刊 2004;22:423
- 52 陈亮. 香砂六君子汤治疗功能性消化不良 68 例. 江西中医药 2003;34:25
- 53 张英福, 郑天珍, 李伟, 瞿颂义, 丁永辉, 卫玉玲. 香砂六君子汤及其成分对大鼠离体胃平滑肌条运动的影响. 兰州医学院学报 1999;25:1-4
- 54 彭文洪, 费志勇, 陈兴田, 沈玉法, 王瑞武. 枳实消痞丸治疗功能性消化不良 54 例. 中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:253
- 55 窦丹波, 王松坡, 蔡淦, 唐静芬, 林江. 枳实消痞丸方及其拆方对大鼠胃排空及血浆胃动素的影响. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:279-281
- 56 李涯松, 单兆伟, 沈洪, 吴静. 和胃胶囊对正常小鼠胃排空的影响及拆方研究. 中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:287-289
- 57 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;6:327-329
- 58 王立春, 程军, 陈孔斌, 危北海, 郭培元. 疏肝悦脾汤治疗功能性消化不良 122 例. 中国中西医结合消化杂志 2003;11:45-46
- 59 陈更新, 马贵同, 胡鸿毅, 龚雨萍, 陆雄. 胃祺 II 号方治疗功能性消化不良疗效观察及对大鼠胃排空的影响. 中国中西医结合消化杂志 2003;11:80-82
- 60 陈更新, 马贵同, 胡鸿毅. 胃祺 II 号方对大鼠胃窦和胃底一氧化氮含量的影响. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:89-90
- 61 周福生, 吴文江, 黄志新. 顺激剂治疗肠易激综合征综合疗效观察. 广州中医药大学学报 2002;19:269-271
- 62 熊文生, 唐锡军. 疏肝舒肠方治疗肠易激综合征 60 例. 新中医 2002;34:56-57
- 63 李兰芳, 喻清和. 消化 II 方治疗胃食管反流病 112 例. 中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:315-315
- 64 邵丽黎. 四逆健脾导滞汤治疗糖尿病性胃轻瘫 30 例. 四川中医 2003;21:26-27
- 65 罗锡彬, 廖云彪, 熊全波. 六味能消胶囊治疗功能性消化不良的临床研究. 临床医药实践杂志 2004;13:101-103
- 66 陈广焕, 倪雪莉, 吴炳坤. 六味能消胶囊治疗反流性食管炎 138 例. 中国中医药信息杂志 2002;9:93
- 67 杨成俊, 王娟. 六味能消胶囊配合西药治疗反流性食管炎 30 例. 现代中西医结合杂志 2004;13:775-776
- 68 方英杰, 赵颖. 六味安消胶囊治疗功能性消化不良 135 例分析. 中医药学刊 2004;22:704
- 69 杨扩美. 六味安消胶囊治疗糖尿病性胃轻瘫 52 例. 现代医药卫生 2003;19:205
- 70 高成英, 焦连清. 六味安消胶囊治疗胆汁反流性胃炎 40 例. 中国中西医结合消化杂志 2002;1:243
- 71 周青. 刺五加注射液治疗肠易激综合征的疗效观察. 海南医学 2003;14:63
- 72 叶松. 胃苏颗粒治疗功能性消化不良 50 例. 医药导报 2002;20:792-793
- 73 吕瑛. 胃苏冲剂治疗动力障碍型功能性消化不良的研究. 河北医药 1999;21:313

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 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.

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.

胰岛素信号转导与肝胰岛素抵抗

祝 炼,袁 莉

祝炼,袁莉,华中科技大学同济医学院附属协和医院内分泌科
湖北省武汉市 430022
电话: 027-85726082
项目负责人: 祝炼, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属
协和医院内分泌科. zhulian2003cn@yahoo.com.cn
电话: 029-83374879 传真: 029-83374879
收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-08-20

摘要

主要阐述胰岛素信号转导缺陷与肝胰岛素抵抗的关系。IRS-2是肝胰岛素信号转导核心介子, IRS-2基因的缺失或IRS-2信号网络上一些关键信号分子的异常改变, 都将导致肝胰岛素信号转导能力减弱, 出现肝胰岛素抵抗。研究发现诸多因素, 如蛋白和脂类磷酸酶, 脂源性细胞因子、游离脂肪酸均可影响肝胰岛素信号转导。肝胰岛素信号转导缺陷参与胰岛素抵抗综合征有关的非酒精性脂肪肝的发生, 其分子机制成为目前研究的重点之一。

祝炼, 袁莉. 胰岛素信号转导与肝胰岛素抵抗. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2420-2423

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2420.asp>

0 引言

肝脏是能量代谢的重要器官, 也是胰岛素作用的主要靶器官, 维持空腹状态下的内生性糖的产生和输出及进食后糖的吸收、利用和存储, 胰岛素/胰高血糖素通过调节糖代谢相关酶的表达丰度来控制这两种状态的转换。肝糖代谢受复杂的新陈代谢信号网络的影响, 这些信号强度的改变增加或减少肝胰岛素敏感性。近年来随着对胰岛素信号转导的深入研究, 人们对胰岛素抵抗的分子机制有了更进一步的了解, 在胰岛素信号转导的诸多环节中任何部分的异常都有可能参与胰岛素抵抗的发生。研究发现 IRS-2/PI₃-K 信号是胰岛素在肝脏发挥生理效应的主要信号转导通路, IRS-2 信号转导异常与肝胰岛素抵抗的发生关系密切。由肝胰岛素信号转导异常导致的肝胰岛素抵抗参与肥胖、非酒精性脂肪肝、代谢综合征的发病。动物模型已经揭示了胰岛素/胰岛素样生长因子信号途径对外周组织糖脂代谢重要作用, IRS 信号系统损害将导致肝胰岛素抵抗。

1 IRS 与胰岛素信号转导途径

胰岛素和胰岛素受体结合后, 胰岛素受体发生自身磷酸化而使胰岛素受体具有了酪氨酸激酶的活性, 他引起胰岛素受体底物(IRS), 如 IRS-1 和 SHc 等磷酸化,

由此把胰岛素的信号逐级传递下去。胰岛素受体底物(IRS)家族是胰岛素/胰岛素样生长因子(Insulin/IGF)受体酪氨酸激酶的底物, 连接 IR/IGF 信号转导途径上下游的信号分子。IRS 作为 insulin/IGF 信号途径的核心介子对细胞的生长、发育及新陈代谢的调节起关键作用。磷酸化的 IRS 募集下游含 SH2 功能域的信号分子如磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3-K)、GRB-2 等, 激活细胞内的 PI3-K 信号转导途径和 Ras 信号转导途径, 分别调控多种不同的胰岛素的代谢生物效应(葡萄糖转运, 糖原的合成, 葡萄糖的利用以及脂肪与蛋白的合成等)和基因表达, 细胞生长和繁殖。目前已发现至少有 9 种胰岛素受体底物(IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, Gab-1, SHc 和他的 3 个异构体以及 p62^{dok})。前 4 种作为 IRS 蛋白家族主要成员和 Insulin/IGF 信号转导关系密切, 他们拥有各自不同的组织分布和亚细胞定位。IRS-1 是首先发现的胰岛素受体底物, 人类的 IRS-1 基因定位于染色体 2q36-37, 他包含有 22 个酪氨酸磷酸化位点和至少 40 个丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点, 在未被激活的情况下, IRS-1 的丝氨酸处于磷酸化状态, 被胰岛素激活后酪氨酸磷酸化增强。人类 IRS-2 基因定位于染色体 13q36, 表达的产物是一个 M_r190 000 的蛋白质, 与 IRS-1 的氨基酸序列有 45% 的同一性。IRS-2 含有一段独特的长为 591-786 bp 的氨基酸序列, 与胰岛素受体 β 亚基的酶调环状结构域(KRLB)相作用, 这一序列在 IRS-1 中不存在, 可能与 IRS-2 信号转导的特异性有关。另外, IRS-1 和 IRS-2 信号通路的独特性与不同的组织分布, 亚细胞定位, 酶的激活/失活, 以及下游效应分子有关。IRS-2 分布广泛, 主要在肝脏和胰岛 β 细胞表达。研究显示 IRS-1 及 IRS-2 在胰岛素通过其特异性受体发挥生理效应上都起重要作用, 在胰岛素代谢效应方面, 促进肌肉、脂肪组织摄取、利用葡萄糖, 以 IRS-1 为主, IRS-2 为次; 而促进肝脏糖原合成和抑制肝葡萄糖输出, 则以 IRS-2 为主, IRS-1 为次。IRS-3 和 IRS-4 可以引起 IRS-1 和 IRS-2 表达的减少, 并抑制其酪氨酸磷酸化。因此, IRS-4 和 IRS-3 可能作为一个负性调节因子作用于胰岛素/IGF-1 信号系统。

2 胰岛素信号转导与肝胰岛素抵抗

肝胰岛素抵抗的特征性表现为胰岛素抑制内源性葡萄糖生成的能力减弱和肝糖原合成减少, 一旦高分泌量的胰岛素亦无法代偿, 即出现空腹血糖升高。研究发现胰岛素信号级联的 IRS-2 分支信号与肝细胞胰岛素敏

感性密切相关, IRS-2^{-/-}小鼠肝细胞 PI₃-K 活性相对于野生型鼠减低 50%, 导致下游信号分子(Akt、GSK-3)磷酸化障碍, 并且无法通过增加 IRS-1 蛋白含量或提高酪氨酸磷酸化来代偿^[1]. IRS-2/PI₃-K 信号是胰岛素在肝脏发挥生理效应的主要信号转导通路, 目前发现诸多因素均可通过影响 IRS-2 信号转导而导致肝胰岛素抵抗.

2.1 蛋白和脂类磷酸酶 蛋白和脂类磷酸酶(GSK-3 α/β 、PTP1B、SHIP2、PTEN 等)活性增高可导致肝胰岛素抵抗, 机制是通过磷酸化/去磷酸化 IRS 信号途径的磷酸化位点或者是与 IRS 密切相关的酶, 下调信号转导. 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(PTP1B)是一种在胰岛素敏感组织广泛表达的磷酸酯酶, 与 IR 结合后使之去磷酸化, 抑制胰岛素信号转导. 无论是在体内还是体外, PTP 的抑制剂都具有类似胰岛素的作用. 研究发现在 MSG(谷氨酸钠)所致胰岛素抵抗小鼠, PTP1B 在肝细胞的表达是增加的, 运用 PTP1B 反义寡核苷酸减少 ob/ob 小鼠肝细胞 PTP1B 的表达, IRS-2 的酪氨酸磷酸化作用增加 4 倍, PI₃-K 活性提高 3 倍, 显著上调 IRS-2 信号转导, 提示 PTP1B 在肝胰岛素抵抗中可能起重要作用^[2-3]. 第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶 - 张力蛋白基因(phosphatase and tension homologue deleted on chromosome 10, Pten)其编码的蛋白质与磷脂酶和细胞张力蛋白同源, 并在许多肿瘤中伴有第 10 号染色体的同源性丢失. 抑癌基因 Pten 由 1209 个核苷酸编码 403 个氨基酸组成一条多肽链, 在第 122-133 位的氨基酸序列(IHCKAGKGRTG)符合蛋白酪氨酸磷酸酶及双特异性磷酸酶催化区核心基序(HCXXGXGRXG), 是迄今为止发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因, PTEN 将磷酸根从酪氨酸去除, 抑制酪氨酸磷酸化从而负性调节 PI₃-K/Akt 信号途径. 研究发现选择性的删除鼠类肝脏的 Pten, 虽然导致小鼠的游离脂肪酸合成增加并有肝肿大和脂肪肝的发生, 但肝脏的胰岛素敏感性增强, 肝糖原合成增加, 空腹血糖水平降低, 提示 Pten 是潜在的干预治疗肝胰岛素抵抗或 2 型糖尿病的分子靶点^[4]. 糖原合酶激酶-3(GSK-3 α/β)通过磷酸化糖原合酶抑制肝糖原的合成, 增加肝糖的产生和输出. IRS-2/PI₃-K 信号激活蛋白激酶 C(PKC ζ/λ), PKC 又可磷酸化糖原合酶激酶-3 从而使之失活, 减少肝糖输出, Zucker 肥胖大鼠这一信号调节下调, 予以 GSK 抑制剂后可增加肝糖原合成及胰岛素刺激的葡萄糖转运^[5]. 2 型糖尿病空腹血糖升高现被认为是肝糖异生增加的结果, 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)是糖异生的主要限速酶, 胰岛素可能通过 IRS-2 信号途径抑制磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)基因的表达而降低空腹血糖, PEPCK 过度表达的转基因小鼠出现选择性的 IRS-2 蛋白表达下调, 胰岛素抑制糖异生相关基因表达的能力减低, 肝糖输出增加, IRS-2 蛋白表达下调又使 PI₃-K 活性减低加重肝胰岛素抵抗^[6].

JNK 是一种因炎症而产生的应激激酶, 可磷酸化多种细胞蛋白包括 IRS-1 和 IRS-2, JNK 磷酸化 IRS-2 PTB 结构域中的丝氨酸残基, 导致 IRS-2 和 IR 结合的解离, 可短时间阻碍信号转导.

2.2 脂源性细胞因子 脂肪组织不仅是能量储存器官, 而且是一个内分泌器官, 在脂肪细胞分泌的脂肪细胞因子及蛋白质因子中, 肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白介素 6(IL-6)、瘦素(leptin), 脂联素(Adiponectin)与肝胰岛素抵抗相关. TNF α 能促进 IRS-1/IRS-2 的丝氨酸/苏氨酸位点磷酸化而抑制信号转导, 降低葡萄糖转运体-4(GLUT-4)的基因表达、降低脂蛋白脂酶的活性、刺激肝脏的脂肪分解, 破坏 TNF 受体则能部分恢复胰岛素的敏感性和糖耐量. IL-6 可能通过升高游离脂肪酸, 促进脂质氧化、抑制脂肪组织脂蛋白脂酶活性来对抗胰岛素的作用. 脂联素(adiponectin)是脂肪细胞分泌的一种激素蛋白, 可通过激活 AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)促进肝脏的脂肪酸氧化和减少肝糖异生, 改善肝胰岛素敏感性^[7]. 脂联素基因剔除小鼠出现严重的胰岛素抵抗伴有 PI₃-K 活性降低, 脂肪酸转运蛋白(fatty-acid transport protein 1, FATP-1) mRNA 表达减少及血浆 TNF α 浓度升高^[8], 提示脂联素可直接和或间接通过抑制 TNF α 而促进肝胰岛素信号转导. 瘦素在胰腺可抑制胰岛素的释放, 在肝脏瘦素直接影响肝糖代谢, 对糖原合成的作用类同胰岛素, 对糖异生的作用类同胰高血糖素. 瘦素主要通过双向激活 Janus 酪氨酸蛋白激酶(JAK)或信号转导和转录激活蛋白(STAT)途径进行信号转导. JAK/STAT 途径与 IRS-2/PI₃-K 可能存在信号交联. Kim *et al*^[9]研究发现, 瘦素可通过其受体促进脂肪、肝脏及肌肉组织内 STAT3、STAT1 的酪氨酸磷酸化、脂肪与肝组织内 MAPK 的磷酸化及升高肝组织内与 IRS-2 相关的 PI₃-K 的活性. Masashi *et al* 发现运用腺病毒介导的基因转染法修复 IRS-2^{-/-}小鼠的 IRS-2 基因^[10]. 可减少内生性葡萄糖的生成, 阻止糖尿病的发生. 但高胰岛素血症却不能完全改善, 进一步予以中心静脉瘦素持续输注, 可使小鼠的胰岛素和血糖水平恢复到正常野生型小鼠水平, 因此得出胰岛素信号缺陷和瘦素抵抗共同促成 IRS-2^{-/-}小鼠的肝胰岛素抵抗的发生发展.

2.3 过氧化物酶体增生物激活受体(PPAR) 有 α , δ , γ , 3 种类型, 其中 PPAR α/γ 与糖脂代谢密切相关. 研究发现胰岛素抵抗状态下为增加胰岛素敏感性, 肝脏 PPAR γ 的表达代偿性增加, 且与胰岛素抵抗指数呈正相关. PPAR γ 活化可增加 IRS-2、PI₃-K、GLUT-2 等基因的表达, 上调肝胰岛素信号转导^[11]. 但也有研究发现 PPAR γ 抑制也可改善肝胰岛素敏感性, 所以 PPAR γ 调节肝胰岛素信号转导的确切机制还有争议. 过氧化物酶体增生激活受体 γ 协同刺激因子(peroxisome proliferators activated receptor- γ coactivator-1, PGC-1)调节饥饿状态下肝糖异生, PGC-1 可激活肝细胞整个糖异生的关

键酶组,包括磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶,从而导致肝糖输出增加.有报道胰岛素可通过IRS-2信号下游分子Foxo1抑制PGC-1的表达,从而减少肝糖输出^[12].

3 脂毒性与肝胰岛素抵抗

胰岛素通过抑制激素敏感性脂酶(hormone-sensitive lipase, HSL)减少脂肪分解产生的FFA;同时胰岛素还能促进血糖进入脂肪细胞进行代谢,增加脂肪组织中甘油三酯合成,有利于FFA再酯化,减少FFA释放入血,从而使血清FFA维持正常水平.在胰岛素抵抗状态下,由于HSL活性增强使脂肪组织释放大量的脂肪酸,这种游离的非酯化的脂肪酸不能转化为酮体,而是作为一种原料使VLDL、TG、胆固醇在肝脏合成增加.同时,脂蛋白脂酶(LPL)活性和LDL受体功能减退或负荷加重,从而导致富含甘油三酯脂蛋白清除时间延长,在胆固醇酯转运蛋白(CETP)的作用下,HDL、LDL的胆固醇与VLDL和乳糜微粒(CM)间的TG交换加速,使HDL-TG增加,为肝脏甘油三酯脂酶(HTL)提供底物,HDL中的胆固醇成分降低,明显促进肝细胞合成脂肪酸,抑制线粒体脂肪酸 β -氧化.脂毒性学说认为当进入组织的脂肪酸超过了组织氧化脂肪酸时,过多的脂肪酸转向对机体有害的非氧化代谢.脂质在骨骼肌、胰腺胰岛、心肌和肝脏内沉积过多可分别导致胰岛素抵抗^[14].胰岛素抵抗使内脏脂肪组织脂解速率明显增加,导致动员至门静脉的游离脂肪酸选择性增加,后者对肝组织具损伤作用,从而使脂肪肝和胰岛素抵抗之间形成恶性循环^[15].研究表明FFA升高可促使肝糖异生和肝糖输出增加,增加肝糖合成,主要原因是损伤胰岛素介导的肝糖产生的抑制和全身糖的消耗,从而引起血糖升高.肝内脂肪的聚集与血浆FFA水平提高引起胰岛素抑制肝糖产生的缺陷呈正相关,并独立于体重指数^[17].肝胰岛素抵抗发生与肝内脂肪积聚的具体机制目前尚不清楚.Iozzo *et al*^[18]对两组受试者输注荧光标记的长链FFA类似物,体外通过正电子发射断层扫描发现糖耐量异常组较对照组肝FFA摄取率显著减低,且发现肝FFA摄取率与血糖、糖化血红蛋白,血乳酸水平呈负相关,其原因可能源于肝细胞内的底物竞争.大鼠肝癌细胞(hepatoma)与富含FFA的培养液一起温育,和正常培养液中的细胞相比,胰岛素受体酪氨酸激酶活性显著降低,高游离脂肪酸还可降低靶组织细胞的胰岛素受体数量,抑制胰岛素与受体的结合,FFA可增强大鼠肝脏和骨骼肌细胞中蛋白酪氨酸磷酸酶家族成员PTIB蛋白的表达,PTIB可抑制胰岛素信号传递.游离脂肪酸抑制ob/ob小鼠、Zucker *et al*肥胖大鼠肝脏细胞的IRS-2的蛋白表达及胰岛素刺激后的酪氨酸磷酸化,从而降低了肝脏胰岛素的敏感性.因此,高FFA血症能导致及加重胰岛素抵抗.而Anai *et al*发现高脂喂养的SD大鼠肝脏IRS-2mRNA表达量为对照组的55%,而IRS-2

蛋白的表达高脂组与对照组比较虽显著差异,Insulin刺激的IRS-2酪氨酸磷酸化水平为对照组的85%亦无差异,并且与IRS-2相关的PI₃-K活性高脂组较对照组显著增高,提示FFA引起的肝胰岛素信号转导障碍可能源于PI₃-K下游的信号分子^[19].此外,研究发现循环中的甘油二酯、脂酰辅酶A、神经酰胺可促进IRS-2的丝氨酸位点磷酸化而抑制IRS-2信号转导,并直接促进PKC基因的表达,PKC活性升高使胰岛素信号通路中的蛋白丝氨酸磷酸化从而造成IRS-2信号转导障碍.

4 胰岛素信号转导与脂肪肝

发病率日益增高的非酒精性脂肪肝(NAFLD)是胰岛素抵抗综合征的一部分.NAFLD的主要的危险因素有肥胖、2型糖尿病和高脂血症等^[16].胰岛素抵抗在NAFLD的发生、发展中可能起着决定性作用.目前发现脂肪肝的发病环节有:(1)运输至肝脏的FFA增多.(2)肝内的FFA合成增加.(3)FFA的 β 氧化受损.(4)极低密度脂蛋白合成或分泌障碍.众多研究在NAFLD中均观察到外周胰岛素抵抗,脂肪酸的 β 氧化和肝脏的氧化应激异常.脂肪分解FFA增加及FFA再酯化减少所导致的血清FFA水平升高可能是NAFLD发生的前提.有部分脂肪肝可以发展成脂肪性肝炎,其原因可能是氧化应激及随后的脂质过氧化损伤对肝脏进行的二次打击.肝细胞内存在两组脂肪调控基因,一组为脂质合成基因,调控脂肪酸和甘油三酯的合成.另一组基因为脂肪酸氧化基因,调控脂肪酸的氧化.肝细胞脂质合成基因均受固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding protein, SREBP)的调控,已发现肝脏有3种SREBP:SREBP-1, -1c, -2,调节血浆中脂蛋白的生成或将后者释放入胆汁.SREBP-2参与乙酰辅酶A合成胆固醇,SREBP-1c在甘油三酯和磷脂形成中起关键作用.研究表明,SREBP-1c高表达使肝细胞脂肪酸合成量增加,并进展成脂肪肝.相反,抑制SREBP-1c可下调脂质合成基因的表达.研究表明SREBP-1c的表达受到胰岛素的调控,胰岛素可持续刺激SREBP-1c的表达,Matsumoto *et al*发现IRS-1/PI₃-K途径介导胰岛素刺激的SREBP-1c表达.IRS-2^{-/-}小鼠肝SREBP-1c表达显著增高,机制可能与IRS-1/PI₃-K信号代偿性上调有关.Ide *et al*^[13]发现SREBPs通过替代或妨碍IRS-2DNA与反式作用元件的结合,直接抑制IRS-2的转录,从而下调其下游PI₃-K/Akt信号转导,导致肝糖原合成减少.NAFLD与肝胰岛素抵抗的因果关系仍是颇为争议的问题.脂肪肝时肝细胞对胰岛素的敏感性降低,同时伴有胰岛素抵抗综合征的多种异常,如低HDL-C、高血压、肥胖、糖代谢异常、乃至糖尿病,因此可认为脂肪肝导致肝胰岛素抵抗.不过,另一些研究的结果则反过来证明肝胰岛素抵抗可引起NAFLD,肝胰岛素抵抗时脂解加速、FFA增高,造成肝细胞脂质异位沉着,产生脂肪肝.NAFLD与肝胰岛素抵抗的关系正如2型糖尿病中胰岛

素分泌缺陷和胰岛素抵抗的因果关系一样有待进一步的研究去阐明。

总之, 肝胰岛素抵抗在肥胖, 非酒精性脂肪肝, 2型糖尿病的发生发展中的作用日益受到重视. 非酒精性脂肪肝病(NAFLD)所致的病理生理改变可诱发严重肝脏及全身系统性胰岛素抵抗, 可能为2型糖尿病的发病基础. 因此, 近年来脂肪肝与肝胰岛素抵抗成为脂代谢病及胰岛素抵抗综合征最活跃的研究领域之一. 改善肝胰岛素抵抗确可逆转实验动物肝脂肪浸润; 另一方面, 肝内脂肪沉积本身可诱发胰岛素抵抗和促进胰岛分泌胰岛素, 从而形成胰岛素抵抗→葡萄糖毒性和脂肪肝→脂质毒性之间的恶性循环. IRS-2信号是肝胰岛素的主要信号转导通路, IRS-2信号途径涉及复杂的多分支的信号网络, 任一信号级联出现调节紊乱都将导致肝胰岛素抵抗的发生发展, 机体的代谢产物、细胞因子及一些蛋白和脂类磷酸酶均参与肝脏IRS-2信号调节, 还有一些重要的信号分子突变可能尚未发现, 对IRS-2/PI₃-K信号途径进一步的深入研究将为肝胰岛素抵抗的病因和治疗提供理论依据。

5 参考文献

- Valverde AM, Burks DJ, Fabregat I, Fisher TL, Carretero J, White MF, Benito M. Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes. *Diabetes* 2003;9: 2239-2248
- Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Carvalheira JB, Carvalho CR, Dolnikoff MS, Abdalla Saad MJ. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sci* 2003;8:1369-1381
- Gum RJ, Gaede LL, Sandra L. Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice. *Diabetes* 2003;1:21-28
- Stiles B, Wang Y, Stahl A. Live-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;2:2082-2087
- Cline GW, Johnson K, Regittnig W, Perret P, Tozzo E, Xiao L, Damico C, Shulman GI. Effects of a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor on insulin-stimulated glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Diabetes* 2002;10: 2903-2910
- Sun Y, Liu S, Ferguson S, Wang L, Klepcyk P, Yun JS, Friedman JE. Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J Biol Chem* 2002;6:23301-23307
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002;11:1288-1295
- Maeda N, Funahashi T. Adiponectin knockout mice. *Nippon Rinsho* 2004;6:1067-1076
- Kim YB, Uotani S, Pierroz DD, Flier JS, Kahn BB. In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology* 2000;7:2328-2339
- Suzuki R, Tobe K, Aoyama M, Inoue A, Sakamoto K, Yamauchi T, Kamon J, Kubota N, Terauchi Y, Yoshimatsu H, Matsuhisa M, Nagasaka S, Ogata H, Tokuyama K, Nagai R, Kadowaki T. Both insulin signaling defects in the liver and obesity contribute to insulin resistance and cause diabetes in Irs2^{-/-} mice. *J Biol Chem* 2004;6:25039-25049
- Ye JM, Iglesias MA, Watson DG, Ellis B, Wood L, Jensen PB, Sorensen RV, Larsen PJ, Cooney GJ, Wassermann K, Kraegen EW. PPAR α / α ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat2 fed rats in the absence of hepatomegaly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;3:531-540
- Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M, Fukamuzi A. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* 2003;3: 642-649
- Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Fukamizu A, Yamada N. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol* 2004;4:351-357
- Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 2001;8:1771-1777
- 高志强, 陆付耳. 游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎. *世界华人消化杂志* 2003;7:1043-1045
- 孟二红, 赵景民. 非酒精性脂肪性肝炎的研究进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:1206-1209
- Bajaj M, Berria R, Pratipanawatr T, Kashyap S, Pratipanawatr W, Belfort R, Cusi K, Mandarino L, DeFronzo RA. Free fatty acid induced peripheral insulin resistant arguments splanchnic glucose uptake in healthy human. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;8:E346-352
- Iozzo P, Turpeinen AK, Takala T, Oikonen V, Bergman J, Gronroos T, Ferrannini E, Nuutila P, Knuuti J. Defective liver disposal of free fatty acids in patients with impaired glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;7:3496-3502
- Anai M, Funaki M, Ogihara T, Kanda A, Onishi Y, Sakoda H, Inukai K, Nawano M, Fukushima Y, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. Enhanced insulin-stimulated activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the liver of high-fat-Fed rats. *Diabetes* 1999;1:158-169

HBx对肝细胞凋亡的双向调控及机制

张生君, 王小众

张生君, 王小众, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001

项目负责人: 王小众, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院 消化内科. drwangxz@pub6.fz.fj.cn

电话: 0591-3357896-8482

收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-08-21

摘要

近年研究发现HBV基因组中的X基因及其产物X蛋白(HBx)能够对肝细胞的凋亡起双向调控作用,在HBV感染相关疾病的发生发展中起重要作用.一方面,HBx可通过调节Caspases家族成员活性,抑制p53的促凋亡活性,激活Rel家族成员,上调Survivin的表达等途径抑制肝细胞凋亡,导致HCC发生.另一方面,HBx可通过拮抗c-FLIP的抑凋亡作用,抑制p53的抗凋亡活性,调节Bcl-2家族蛋白的表达,上调c-myc及TGF- β 1等的表达,直接或间接作用于Fas-FasL, TNF或线粒体死亡途径,增强死亡信号而促进细胞凋亡.总之,HBx可能是通过多途径,多环节和多因子参与的复杂机制对肝细胞的凋亡进行调节.

张生君, 王小众. HBx对肝细胞凋亡的双向调控及机制. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2424-2428

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2424.asp>

0 引言

近年来随着对HBV基因结构与功能的深入研究,发现HBV基因组中的X基因及其产物X蛋白(HBx)能够对肝细胞的凋亡起调控作用,在HBV感染所致的肝癌的发生发展中起重要作用^[1].一方面,HBx能抑制肝细胞凋亡,从而促进HCC的发生发展;另一方面,近年来多项研究表明HBx还具有诱导或促进肝细胞凋亡的作用,该作用在HBV相关疾病中的具体作用还不甚清楚,其中的具体机制也尚未阐明.现对HBx对肝细胞凋亡的双向调控及其机制作一综述.

1 HBx与肝细胞凋亡

HBx是一种多功能蛋白,能与多种蛋白相互作用,表现出复杂多样的生物学活性.在对肝细胞凋亡的调控方面,HBx表现出双向作用.HBx抑制肝细胞凋亡使具有潜在转化能力的突变获得积累,细胞过度增生,从而导致HCC发生.然而,近年来多项研究表明HBx能诱导^[2-5]和促进凋亡^[6-9],且HBx表达量与凋亡率有量效关系^[10].HBx促进肝细胞凋亡在HBV感染相关疾病的发病机制中的具体作用还不甚清楚.目前认为该作用可能促进肝炎的发展,并在逃避宿主免疫反应时促进病毒向临近

细胞播散.据推测,HBV x基因可能通过促进肝细胞凋亡而诱导肝细胞再生和基因突变的积累,最后导致细胞转化和HCC的发生^[7].还有人认为,HBx对肝细胞凋亡的双向调控作用可能与HBV感染发展至HCC的长期性有关^[2].HBx引起肝细胞凋亡有可能存在着细胞的特异性和阶段性.即对于不同的肝细胞以及HBV感染的不同阶段,HBV x基因可能在肝细胞凋亡方面发挥着不同的作用.在早期阶段,HBx可能抑制凋亡,促进HBV的增生.在后期,HBx促进凋亡,这种促凋亡效应可加速HBV的复制与播散.Koike *et al*^[11]则认为HBx不管抑制还是促进细胞凋亡均可能导致肝细胞恶性转化,从而有利于癌前期肝细胞的选择和克隆性增生.

2 HBx抑制肝细胞凋亡

2.1 死亡受体途径 Fas-FasL死亡受体途径和TNF死亡受体途径是诱导细胞凋亡的主要信号转导途径.Diao *et al*^[12]将HBx(来自HBV慢性携带者)转染入人原代肝细胞、Chang肝细胞及大鼠胚胎成纤维细胞,发现HBx能使这些细胞免受Fas介导的凋亡,对血清缺乏产生耐受性,并且对TNF介导的凋亡也有一定抵抗保护作用.其可能机制包括抑制caspase8和caspase3的活性,抑制细胞色素C的释放,上调SAPK/JNK活性而通过SEK1依赖的SAPKs/JNKs途径抑制细胞凋亡.

2.2 Caspases家族 Caspases是一个日益增大的半胱氨酸蛋白酶家族,是细胞凋亡的必要因子,通常以酶原的形式存在,包括死亡受体信号转导等在内的多种凋亡刺激均可引起caspases的活化,形成信号转导级联反应,最终导致细胞凋亡.参与诱导凋亡的caspases分成两大类,即启动酶和效应酶,分别在死亡信号转导的上游和下游发挥作用.经FADD(Fas-associated death domain protein)激活的caspase8属于启动酶,在Fas和TNFR1诱导的细胞凋亡信号途径中皆发挥重要的作用.其他的启动酶还有参与线粒体介导凋亡的caspase9及与颗粒酶诱导的凋亡有关的caspase10等.下游的各种效应酶包括caspase3, caspase6, caspase7等.Cottlob *et al*^[13]用含HBV x基因的质粒PCMV-X/F微注射或转染给REV2细胞或肝癌细胞,发现他可以通过抑制caspase3而抑制细胞凋亡,其抑制作用可被抗-HBx阻断.

2.3 P53 Elmore *et al*^[14]发现,X蛋白可以与p53形成复合物,有效抑制p53介导的细胞凋亡,从而为表达该病毒整合基因的肝细胞提供克隆选择优势,导致肝细胞癌变.其可能机制是X蛋白使p53对Fas的正调控失

效, 使应凋亡的肝细胞不能凋亡. p53 与 ERCC3 结合是诱导细胞凋亡的机制之一. p53-HBX 结合可使 p53 与 ERCC3 结合能力大大下降, 影响细胞凋亡. 将 HBx 与 p53 质粒一起微注射到人原代纤维瘤细胞核内, 24 h 后可观察到 p53 表达水平并未由于 HBx 的存在而受影响, 但凋亡细胞从单独注射 p53 的 19% 降到 1%, 这可能与 HBx 抑制 p53 下游基因 p21 的表达有关. Huo *et al*^[15] 研究发现, 突变后的 HBx 仍具有抑制 p53 介导的细胞凋亡的作用. 另有报道 HBx 突变后失去了其促凋亡活性^[16], 因此 HBx 基因突变引起的对细胞凋亡的调节变化可能在 HCC 的发生发展中起重要作用. Lee *et al*^[17] 研究发现, HBx 并不是通过使 p53 失活而抑制细胞凋亡的, 而是通过 HBx-PI3K-Akt-Bad 途径和 caspase3 的失活来实现的. Diao *et al*^[12] 也发现将 HBx 转入不表达 P53 的 DP-16 仍能抑制 Fas 介导的细胞凋亡. 这说明 HBx 对细胞凋亡的抑制作用至少部分是经由非 p53 依赖途径的.

2.4 NF- κ B NF- κ B 是真核细胞转录因子 Rel 蛋白质家族成员. Rel 蛋白质家族成员包括 p50/p105, p52/p100, Rel A(p65), Rel B 和 c-Rel 等. 其中 Rel A(p65), Rel B 和 c-Rel 含有反式激活功能域, 能被 HBx 反式激活, 并参与对炎症反应、细胞增生与凋亡等的调控. 研究发现大多数激活的 NF- κ B 表现为抗凋亡^[18-22]. HBx 能激活包括 Rel A(p65), c-Rel, p52, p50 等各种形式的 NF- κ B, 使 NF- κ B 从胞质易位至核内, 作用于不同的靶基因, 从而抑制细胞凋亡^[18, 23-25]. Su *et al*^[18] 研究发现, 用大量 I κ B α 抑制各种形式的 NF- κ B 能增强 HBx 的促凋亡作用, 认为 HBx 在激活各种形式 NF- κ B 的同时掩盖了其本身的促凋亡作用.

2.5 Survivin Survivin 是凋亡抑制蛋白(IAP)家族的新成员, 与凋亡抑制成正相关, 能抑制 Fas, Bax, caspases 等促凋亡因子诱导的凋亡^[26-27]. 研究发现 HBx 能通过上调 survivin 的表达而抑制肝癌细胞凋亡^[28].

2.6 其他 周卫平 *et al*^[29] 发现 HBx 可上调 HepG2 细胞端粒酶活性, 使较多细胞进入 S 期, 表明 HBx 能通过上调细胞端粒酶活性而抑制宿主细胞凋亡. 研究还发现 HBx 可拮抗 TGF- β 1 的生长抑制作用^[30], 并能通过 PI 3/Akt 途径使细胞免受 TGF- β 1 诱导的凋亡^[31].

3 HBx促进肝细胞凋亡

3.1 HBx与死亡信号转导途径

3.1.1 Fas-FasL死亡受体途径 Fas-FasL途径是细胞凋亡最重要的途径之一. 靶细胞表面的 Fas 与 FasL 结合, 诱导 Fas 分子三聚体化, 形成由 Fas/FADD(Fas 相关蛋白)/pro-caspase-8 组成的死亡诱导信号复合物(DISC), pro-caspase-8 活化, 继而激活下游的 pro-caspase, 再通过一系列 caspases(半胱-天冬氨酸蛋白酶)的级联激活反应诱导凋亡的发生. 有证据表明, HBV 感染的肝细胞表面 Fas 蛋白表达增加^[32]. 研究发现 HBx 可增强肝癌细胞中 FasL 的表达, 其机制包括上调 IL-18 的表达

和增强 Egr-2 和 Egr-3(early growth response factor)的转录活性等^[33-35]. 因此, HBx 可能通过上调肝细胞表面 Fas 及 FasL 的表达, 加强死亡信号而通过 Fas-FasL 死亡受体途径促进表面表达 Fas 的肝细胞凋亡. 但是, Wang *et al*^[36] 认为 HBx 诱导 Fas/FasL 的表达并不能作为肝癌细胞凋亡的可靠标志. 此外, FasL 表达的增高能促进表达 Fas 的 T 细胞凋亡, 这是肝癌细胞逃脱机体免疫监视的重要机制之一.

3.1.2 TNF死亡受体途径 TNF 途径是细胞凋亡的另一重要途径. TNF- α 与 TNFR 结合形成死亡诱导信号复合物(DISC), 后者募集无活性的 caspase-8 前体或 FLICE, 使其裂解成活性形式, caspase-8 启动下游 caspase 的级联激活导致靶细胞的凋亡. c-FLIP 为细胞 FLICE 抑制蛋白, 是 DISC 最重要的调节因子. c-FLIP 的稳定表达能保护细胞免受 Fas, TNF 和 TRAIL(TNF 相关凋亡诱导配体)受体等诱导的凋亡^[37-39]. Kim *et al*^[40] 研究发现, HBx 能与 c-FLIP 的死亡效应区域 1(DED1)结合形成复合体, 从而阻断了 c-FLIP 的抑凋亡作用, 使细胞对凋亡信号敏感. 因此, HBx 能通过 DISC 相关途径直接干预死亡信号而诱导凋亡, 而 c-FLIP 是其最重要的靶位. 此外, 他们还发现当用 TNF- α 和 Fas 抗体处理细胞时, HBx 的表达能使 caspase-8 和 caspase-3 过度激活, 这种激活可能与细胞对凋亡信号的敏感性有关. 研究发现, TNF 基因的启动子上有 HBx 反式激活的靶序列, 故 HBx 能上调 TNF- α 的表达^[41]. HBx 还能通过下调 Sep 蛋白的表达而提高 TNF- α 的浓度^[42]并降低其敏感阈值^[40], 从而在促凋亡中起协同作用. 但 HBx 即使在无 TNF- α 处理时也能诱导凋亡^[2, 41]. 因此上调 TNF- α 的表达并不是 HBx 促进肝细胞凋亡的主要途径.

3.1.3 线粒体死亡途径 传统观点认为线粒体内膜是产生能量的主要位点, 而外膜仅是第二层“皮肤”. 近年来的研究揭示了线粒体外膜在细胞凋亡中的重要作用. 正常情况下, Bcl-2 家族成员作用于线粒体外膜并维持其稳定性. 线粒体外膜的破坏可导致两种关键的细胞凋亡调节物(细胞色素 C 和线粒体因子 Smac(又称 Diablo))的渗出, 从而启动和促进凋亡的发生. 因此, HBx 可能通过对 Bcl-2 家族成员的调节而经由该途径诱导和促进凋亡^[43-44]. 研究发现 HBx 定位于线粒体^[45], 能直接作用于线粒体, 引起线粒体聚集和膜电位的丢失而引发线粒体依赖性的细胞凋亡^[15, 46-47]. VDAC 是线粒体膜上渗透转换孔复合体中的成分, 能调节线粒体膜电位和细胞色素 C 的释放. HBx 就是通过与 VDAC 相互作用而影响线粒体膜电位和细胞色素 C 的释放, 从而引导线粒体依赖性细胞凋亡的^[46].

3.2 HBx与凋亡调节因子

3.2.1 p53 p53 是典型的抑癌基因, 其产物分野生型和突变型两种形式. 野生型 p53 诱导细胞凋亡, 而突变型 p53 则抑制细胞凋亡. Elmore *et al*^[14] 研究 HBV 与 p53 在细胞凋亡调节中的作用显示: HBV X 的 C 端, 不依赖

其反式激活活性,在细胞质中与 p53 形成复合物,部分防止其进入细胞核并能诱导凋亡.目前研究认为HBx与p53之间的相互作用在HCC的发病中起重要作用,而HBx与p53对凋亡的调控作用是其中最重要的机制之一. HBx促进肝细胞凋亡可由p53依赖途径^[9]和非p53依赖途径^[2-3]两种不同途径. Chirillo *et al*^[9]用MMTV-X表达质粒转染 NIH-3T3 细胞后, DNA 合成增加, 培养 48-72 h 后, 60% 的细胞死亡, 表明 HBx 可诱导细胞从 G₀ 期到 S 期, 并促进细胞凋亡. 他们还发现这些表达 HBx 的克隆对 p53 介导的细胞凋亡敏感性增加. 由于依赖 p53 诱导细胞凋亡包括多种途径, HBx 不可能阻断所有 p53 介导的凋亡途径, 以及 p53 基因突变体或 p53 蛋白的失活. 因此 p53 的状态可能影响 HBV 感染的肝细胞中 HBx 诱导凋亡的结果. Lassus *et al*^[48] 和 Chen *et al*^[49] 研究表明, 正常水平的 p53 具有抗凋亡作用, 而高表达的 p53 则促凋亡. 所以当 p53 表达处于正常水平时, HBx 可能因拮抗 p53 的抗凋亡作用而表现为促凋亡^[4]; 当 p53 的表达处于高水平时, HBx 则拮抗 p53 的促凋亡作用而表现为抑凋亡^[50]. 然而, HBx 诱导和促进凋亡也可以是经由 p53 非依赖途径^[2-3]. 因此, p53 也只是 HBx 促进凋亡过程中的重要调节因子之一.

3.2.2 Bcl-2 家族 Bcl-2 家族蛋白是体内调控细胞生存与凋亡最重要的调节因子, 促凋亡蛋白和抑凋亡蛋白在细胞中的比例将决定细胞对死亡信号的反应及细胞的命运^[51-53]. 他包括 Bcl-2, Bax, Bid, Bcl-x, bcl-1 等成员. 目前认为 Bcl-2, Bcl-xL 等为抑凋亡因子, Bax, Bid 则促凋亡. Bcl-2 是一种重要的凋亡抑制蛋白, 能抑制多种因素引起的凋亡. Terradillos *et al*^[43] 研究发现, HBx 能消除 Bcl-2 对 Fas 引导的凋亡的抑制作用, 且这种作用与 HBx 的表达量有关. 在成年的 HBx/Bcl-2 双转基因鼠中, HBx 的低水平表达使细胞恢复了对 Fas 诱导的肝损伤的敏感性. 但酵母双杂体系分析显示, HBx 并不与 Bcl-2 家族的任何成员直接结合, 而且 HBx 的表达并不影响 Bcl-2 在细胞中的表达, 也不能阻断其与线粒体膜的结合. 新近研究表明 HBx 定位于线粒体, 通过与电压依赖的阴离子通道 VDAC3 相互作用而改变其膜电位^[46]; 而 Bcl-2 家族蛋白能与 VDAC 结合而调节细胞色素 C 的释放. 因此推测是 VDAC3 与 HBx 的相互作用引起线粒体形态变化, 从而减弱了 Bcl-2 对离子通道活性的调节作用. 当然, HBx 也可能通过激活 Bcl-2 的自然抑制因子如 Bax 或 BH₃ 单一性 Bcl-2 家族成员而抵消 Bcl-2 的作用. 有研究发现在未分化的 4pX-1 细胞中, HBx 能促进 Bax 的表达^[44]. 也有研究表明, HBx 能使 Bid 的表达减少而阻断细胞凋亡^[54]. 因此, HBx 对 Bid 的调节作用可能也参与了其促进凋亡的复杂过程. 已知 Fas 诱导的凋亡与细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质有关, 且 Bcl-2 能阻断细胞色素 C 的释放. Terradillos *et al*^[43] 发现 HBx 能解除 Bcl-2 对 Fas 作用后的细胞中细胞色素 C 的释放和 caspase-3 活性的抑制作

用. 因此, 在 Fas 诱导的凋亡中, HBx 可能是通过不被 Bcl-2 阻断的途径来激活细胞色素 C 的转运和 caspase-3 前体的裂解, 从而起到促进细胞凋亡的作用. Schuster *et al*^[55] 则发现共转染凋亡抑制物 crmA 和 p35 不会影响 HBx 的促凋亡活性, 因此认为 HBx 可能是通过特异性激活 Bcl-2 敏感性途径来诱导和促进细胞凋亡的.

3.2.3 C-myc c-myc 属原癌基因. 他对细胞具有双重作用: (1) 参与细胞的增生、转化. (2) 促进或诱导细胞凋亡的发生. C-myc 的表达使细胞进入细胞周期, 若在同时存在其他细胞因子的情况下, 则细胞存活, 增生, 否则发生凋亡. HBx 能诱导某些细胞系中 Myc 基因的表达^[9,56]. 而 C-myc 能使经 TNF- α 或其他因子处理的细胞对凋亡信号的敏感性增加或与其他促凋亡因子协同作用而促进细胞凋亡^[57-59]. Chirillo *et al*^[9] 在 X 基因促进 p53 诱导细胞凋亡的研究中发现, 表达 HBx 的细胞中 c-myc 的表达显著增加, 认为 C-myc 可能也是 HBx 介导的凋亡中的重要递质. Su *et al*^[6] 用 HBx 表达载体转染 HepG2 和 Chang 肝细胞, 发现低水平表达的 HBx 能使细胞对 TNF- α 诱导的凋亡敏感性增加, 认为可能与激活 C-myc 和加强促分裂原活化蛋白激酶 1 (MAPKK1) 有关. 他们还发现 HBx 和 C-myc 共表达使 WT 3T3 细胞对 TNF- α 介导的凋亡敏感性显著增高, 且这种促凋亡作用超过了 NF- κ B 的抗凋亡作用^[18].

3.2.4 NF- κ B 如前述 NF- κ B 多表现为抗凋亡, 但新近研究发现 NF- κ B 具有促进细胞凋亡的作用^[60-61]. 其机制可能是通过上调促凋亡基因的表达^[62-63], 并与刺激信号的差异和细胞类型有关^[64]. 因此, HBx 诱导的 NF- κ B 的激活可能也参与了 HBx 促进肝细胞凋亡的复杂过程.

3.2.5 其他 HBx 反式激活 iNOS 的启动子能使 NO 产生增多, 导致肝细胞损伤^[65-66]. HBx 的增强胞质中 Ca²⁺ 信号的作用也可能是 HBx 诱导细胞凋亡的途径之一^[67]. HBx 能通过与 UV-DDB 相互作用而抑制受损 DNA 的修复并诱导凋亡^[68-69]. 在感染早期, HBx 能诱导 TGF- β 1 的表达, 可能也是感染早期肝细胞凋亡增多的机制之一^[70]. 此外, HBx 还可与热休克蛋白 60 协同作用促进细胞凋亡^[71].

总之, HBx 可能是通过多途径, 多环节和多因子参与的复杂机制对肝细胞的凋亡进行调节, 可能因其自身的表达水平、HBV 感染的阶段、细胞的类型(癌细胞或正常肝细胞)、细胞的内环境、细胞因子及干预因素等的不同而表现出促进或抑制凋亡两种不同的作用. 致力于 HBx 调节细胞凋亡的机制研究必将为包括肝细胞癌在内的 HBV 感染相关疾病的防治提供有利的理论依据.

4 参考文献

- 1 Birrer RB, Birrer D, Klavins JV. Hepatocellular carcinoma and hepatitis virus. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33:39-54
- 2 Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kanegae Y, Kimura S, Saito I, Koike K. Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP recombination system. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 12):3257-3265

- 3 Terradillos O, Pollicino T, Lecoeur H, Tripodi M, Gougeon ML, Tiollais P, Buendia MA. P53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro. *Oncogene* 1998;17:2115-2123
- 4 Kim H, Lee H, Yun Y. X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J Biol Chem* 1998;273:381-385
- 5 Shirakata Y, Koike K. Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem* 2003;278:22071-22078
- 6 Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8744-8749
- 7 Pollicino T, Terradillos O, Lecoeur H, Gougeon ML, Buendia MA. Pro-apoptotic effect of the hepatitis B virus X gene. *Biomed Pharmacother* 1998;52:363-368
- 8 Bergametti F, Prigent S, Lubet B, Benoit A, Tiollais P, Sarasin A, Transy C. The proapoptotic effect of hepatitis B virus HBx protein correlates with its transactivation activity in stably transfected cell lines. *Oncogene* 1999;18:2860-2871
- 9 Chirillo P, Pagano S, Natoli G, Puri PL, Burgio VL, Balsano C, Leviero M. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:8162-8167
- 10 Chen HY, Tang NH, Li XJ, Zhang SJ, Chen ZX, Wang XZ. Transfection and expression of hepatitis B virus x gene and its effect on apoptosis in HL-7702 cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:959-964
- 11 Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Kyoji M. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* 2002;62 (Suppl 1):29-37
- 12 Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001;276:8328-8340
- 13 Gottlob K, Fulco M, Leviero M, Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* 1998;273:33347-33353
- 14 Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, Geller DA, Will H, Harris CC. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:14707-14712
- 15 Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20:3620-3628
- 16 Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremsdorf D, Brechot C. Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene* 1999;18:4848-4859
- 17 Lee YI, Kang-Park S, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2001;276:16969-16977
- 18 Su F, Theodosis CN, Schneider RJ. Role of NF-kappaB and myc proteins in apoptosis induced by hepatitis B virus HBx protein. *J Virol* 2001;75:215-225
- 19 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
- 20 Vasudevan KM, Gurumurthy S, Rangnekar VM. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol* 2004;24:1007-1021
- 21 Santoro MG, Rossi A, Amici C. NF-kappaB and virus infection: who controls whom. *EMBO J* 2003;22:2552-2560
- 22 Yang P, McKay BS, Allen JB, Jaffe GJ. Effect of NF-kappa B inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2438-2446
- 23 Sirma H, Weil R, Rosmorduc O, Urban S, Israel A, Kremsdorf D, Brechot C. Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene* 1998;16:2051-2063
- 24 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 25 Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol* 2001;82 (Pt 1):171-182
- 26 Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf 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
- 27 Zangemeister-Wittke U, Simon HU. An IAP in action: the multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy. *Cell Cycle* 2004;3[Epub ahead of print]
- 28 Li D, Chen X, Zhang W. The inhibition of apoptosis of hepatoma cells induced by HBx is mediated by up-regulation of survivin expression. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003;23:383-386
- 29 Zhou WP, Shen Q, Gu B, Ren H, Zhang D. Effects of hepatitis B virus X gene on apoptosis and the activity of telomerase in HepG(2) cells. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2000;8:212-214
- 30 Oshikawa O, Tamura S, Kawata S, Ito N, Tsushima H, Kiso S, Matsuda Y, Yamada A, Tamai S, Matsuzawa Y. The effect of hepatitis B virus X gene expression on response to growth inhibition by transforming growth factor-beta 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222:770-773
- 31 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000;275:25858-25864
- 32 Sejima T, Miyagawa I. The evaluation of Fas/Fas ligand system in renal cell carcinoma—the effect of preoperative interferon-alpha therapy. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1999;90:826-832
- 33 Shin EC, Shin JS, Park JH, Kim H, Kim SJ. Expression of fas ligand in human hepatoma cell lines: role of hepatitis-B virus X (HBX) in induction of Fas ligand. *Int J Cancer* 1999;82:587-591
- 34 Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002;37:380-386
- 35 Yoo YG, Lee JS, Lee MO. Hepatitis B virus X protein induces expression of fas ligand gene through enhancing transcriptional activity of early growth response factor. *J Biol Chem* 2004 [Epub ahead of print]
- 36 Wang XZ, Chen XC, Chen YX, Zhang LJ, Li D, Chen FL, Chen ZX, Chen HY, Tao QM. Overexpression of HBxAg in hepatocellular carcinoma and its relationship with Fas/FasL system. *World J Gastroenterol* 2003;9:2671-2675
- 37 Rippo MR, Moretti S, Vescovi S, Tomasetti M, Orecchia S, Amici G, Catalano A, Procopio A. FLIP overexpression inhibits death receptor-induced apoptosis in malignant mesothelial cells. *Oncogene* 2004 [Epub ahead of print]
- 38 Mezzanzanica D, Balladore E, Turatti F, Luisson E, Alberti P, Bagnoli M, Figini M, Mazzoni A, Raspagliesi F, Oggionni M, Pilotti S, Canevari S. CD95-mediated apoptosis is impaired at receptor level by cellular FLICE-inhibitory protein (long form) in wild-type p53 human ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5202-5214
- 39 Aggarwal BB, Bhardwaj U, Takada Y. Regulation of TRAIL-induced apoptosis by ectopic expression of antiapoptotic factors. *Vitam Horm* 2004;67:453-483
- 40 Kim KH, Seong BL. Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J* 2003;22:2104-2116
- 41 Lara-Pezzi E, Majano PL, Gomez-Gonzalo M, Garcia-Monzon C, Moreno-Otero R, Leviero M, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes. *Hepatology* 1998;28:1013-1021
- 42 Yi YS, Park SG, Byeon SM, Kwon YG, Jung G. Hepatitis B virus X protein induces TNF-alpha expression via down-regulation of selenoprotein P in human hepatoma cell line, HepG2.

- Biochim Biophys Acta* 2003;1638:249-256
- 43 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
 - 44 Lee S, Tarn C, Wang WH, Chen S, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially regulates cell cycle progression in X-transforming versus nontransforming hepatocyte (AML12) cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:8730-8740
 - 45 Henkler F, Hoare J, Waseem N, Goldin RD, McGarvey MJ, Koshy R, King IA. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 2001;82(Pt 4):871-882
 - 46 Rahmani Z, Huh KW, Lasher R, Siddiqui A. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. *J Virol* 2000;74:2840-2846
 - 47 Takada S, Shirakata Y, Kaneniwa N, Koike K. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. *Oncogene* 1999;18:6965-6973
 - 48 Lassus P, Ferlin M, Piette J, Hibner U. Anti-apoptotic activity of low levels of wild-type p53. *EMBO J* 1996;15:4566-4573
 - 49 Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. P53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 1996;10:2438-2451
 - 50 Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW, Hoeijmakers JH, Harris CC. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res* 1995;55:6012-6016
 - 51 Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2:647-656
 - 52 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-1911
 - 53 Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 8):1567-1574
 - 54 Chen GG, Lai PB, Chan PK, Chak EC, Yip JH, Ho RL, Leung BC, Lau WY. Decreased expression of Bid in human hepatocellular carcinoma is related to hepatitis B virus X protein. *Eur J Cancer* 2001;37:1695-1702
 - 55 Schuster R, Gerlich WH, Schaefer S. Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* 2000;19:1173-1180
 - 56 Balsano C, Avantiaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Will H, Perricaudet M, Levrero M. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the c-myc proto-oncogene at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176:985-992
 - 57 You Z, Madrid LV, Saims D, Sedivy J, Wang CY. C-Myc sensitizes cells to tumor necrosis factor-mediated apoptosis by inhibiting nuclear factor kappa B transactivation. *J Biol Chem* 2002;277:36671-36677
 - 58 Juin P, Hueber AO, Littlewood T, Evan G. C-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* 1999;13:1367-1381
 - 59 Juin P, Hunt A, Littlewood T, Griffiths B, Swigart LB, Korsmeyer S, Evan G. C-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22:6158-6169
 - 60 Glasgow JN, Wood T, Perez-Polo JR. Identification and characterization of nuclear factor kappaB binding sites in the murine bcl-x promoter. *J Neurochem* 2000;75:1377-1389
 - 61 Grilli M, Memo M. Nuclear factor-kappaB/Rel proteins: a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochem Pharmacol* 1999;57:1-7
 - 62 Shou Y, Li N, Li L, Borowitz JL, Isom GE. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-X(S) and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis. *J Neurochem* 2002;81:842-852
 - 63 Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, Mizuno T, Tohyama M. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem* 1999;274:8531-8538
 - 64 Lin YZ, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 1995;270:14255-14258
 - 65 Majano P, Lara-Pezzi E, Lopez-Cabrera M, Apolinario A, Moreno-Otero R, Garcia-Monzon C. Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology* 2001;34:1218-1224
 - 66 Amaro MJ, Bartolome J, Carreno V. Hepatitis B virus X protein transactivates the inducible nitric oxide synthase promoter. *Hepatology* 1999;29:915-23
 - 67 Chami M, Ferrari D, Nicotera P, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R. Caspase-dependent alterations of Ca²⁺ signaling in the induction of apoptosis by hepatitis B virus X protein. *J Biol Chem* 2003;278:31745-31755
 - 68 Arbuthnot P, Capovilla A, Kew M. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:357-368
 - 69 Bontron S, Lin-Marq N, Strubin M. Hepatitis B virus X protein associated with UV-DDB1 induces cell death in the nucleus and is functionally antagonized by UV-DDB2. *J Biol Chem* 2002;277:38847-38854
 - 70 Yoo YD, Ueda H, Park K, Flanders KC, Lee YI, Jay G, Kim SJ. Regulation of transforming growth factor-beta 1 expression by the hepatitis B virus (HBV) X transactivator. Role in HBV pathogenesis. *J Clin Invest* 1996;97:388-395
 - 71 Tanaka Y, Kanai F, Kawakami T, Tateishi K, Ijichi H, Kawabe T, Arakawa Y, Kawakami T, Nishimura T, Shirakata Y, Koike K, Omata M. Interaction of the hepatitis B virus X protein (HBx) with heat shock protein 60 enhances HBx-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:461-469

茶多酚的生物活性及其对实验性肝损伤的保护作用

刘少锋, 韩 真

刘少锋, 韩真, 皖南医学院附属弋矶山医院消化科 安徽省芜湖市 241001
项目负责人: 韩真, 241001, 安徽省芜湖市赭山西路, 皖南医学院附属弋矶山医院消化科. lsflsf@ah163.com
电话: 0553-5738856-2316
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-07-27

摘要

茶多酚是茶叶中一种主要的活性成分, 具有清除自由基和抗氧化作用等重要的生物活性, 以及抑癌抗癌等药理学作用. 茶多酚对 CCl_4 、阻塞性黄疸、急性镉中毒、酒精等所致实验性肝损伤和肝癌癌前病变动物模型均有保护或抑制作用.

刘少锋, 韩真. 茶多酚的生物活性及其对实验性肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2429-2431

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2429.asp>

0 引言

茶多酚(tea polyphenols, TP)是从茶叶中提取的多酚类化合物, 由多种酚性物质组成, 其中儿茶素类含量最多, 约占TP的60-80%. 茶多酚具有清除自由基和抗氧化作用等重要的生物活性, 另外近来研究显示, TP具有一定的保肝和抑制肝脏肿瘤的功效. 现就TP的生物活性及其对实验肝损伤的保护作用综述如下.

1 生物活性和药理作用

清除自由基和抗氧化作用是TP最重要的生物活性, 抑癌抗癌是TP重要的药理作用之一, 以上作用与防治肝损伤密切相关.

1.1 清除自由基 在机体的新陈代谢过程中常出现活性氧或自由基过剩, 其中氧自由基占有重要地位. TP具有多个邻位酚羟基结构, 极易被氧化成为醌类而提供质子 H^+ , 故具有较强的供氢能力, 使其能够显著地清除体内的有害自由基. 同时TP自身生成稳定的自由基中间体, 抑制原来的自由基链锁反应, 从而保护细胞成分不受损伤. 与其他抗氧化剂相比, TP清除氧自由基具有高效性. 与自由基清除剂超氧化物歧化酶(SOD)相比, 1 mg TP清除 O_2^- 的效能相当于 9 μg Cu, Zn-SOD; 与强抗氧化剂 VitC, VitE 相比, 其清除 O_2^- , $\cdot\text{OH}$ 效能要高几倍甚至几十倍以上^[1].

TP清除氧自由基的化学构效关系表现在^[2]: (1)邻位取代效应; (2)氢键的相互作用; (3)质子氢首过效应作用: 指TP第一步有效地阻止 O_2^- 的形成继而阻截其他氧自由基的衍生. (4)TP清除氧自由基的生物化学修饰作用:

TP对 H_2O_2 生成的 $\text{HO}\cdot$ 自由基的直接清除作用较差, 但TP能提高机体内抗氧化酶系的谷胱甘肽过氧化酶(GSH-PX)和SOD活力, 间接抑制 $\text{HO}\cdot$ 的生成而互补.

1.2 抗氧化作用 抗氧化作用是一种综合效应, 除了通过直接清除自由基途径之外, 还与以下几点有关.

1.2.1 抑制氧化酶减少自由基生成 已有较多的动物或临床实验证明, TP对生物体内多种和自由基生成相关的氧化酶有抑制作用. 如TP对体内、外脂氧化酶, 黄嘌呤氧化酶, 环氧酶, 细胞色素 P 450 酶系, 髓过氧化物酶, 均有抑制作用^[3].

1.2.2 提高抗氧化酶的活性 协同增强效应机体的各种抗氧化酶如SOD, CAT, GSH-Px和谷胱甘肽硫转移酶, 不但协同地防止活性氧的损伤, 而且相互间起保护作用, 如SOD能保护GSH-Px免受 O_2^- 的灭活, GSH则保护SOD不被 H_2O_2 灭活^[3]. 同样, TP不但通过灭活自由基保护抗氧化酶, 还能提高体内抗氧化酶的活性. TP具有SOD样活性, 可直接升高过氧化物酶、GSH-Px等抗氧化酶活力^[4], 进而提高机体的抗脂质过氧化能力, 显著降低其丙二醛的含量, 但对血清SOD的含量却无明显影响^[5]. 另外, 张晓刚 *et al*^[6]的研究表明TP和肝脂酶相互协调, 减轻脂质过氧化物对肝细胞损害, TP通过清除自由基改善肝细胞合成肝脂酶的功能, 而后者又可以减轻肝细胞脂肪变性.

1.2.3 螯合金属离子 金属离子常常促进或引起新的脂质过氧化反应, 通过螯合金属离子TP能更为显著地发挥抗氧化作用. 如 Fe^{2+} 可催化Fenton反应; Cu^{2+} 介导LDL的氧化修饰, 生成 Ox-LDL , 同时SOD活性下降^[7]. 众多体内外实验均已证明TP通过螯合 Fe^{2+} 而减轻自由基对机体的损伤^[8], 并且TP不抑制食物中铁的吸收^[9], 也不会争夺络合态 Fe^{2+} ; 还可以通过螯合 Cu^{2+} 而抑制黄嘌呤氧化物的生长, 起抗氧化作用.

1.2.4 与 VitC, VitE 的协同作用 TP可以再生和保护体内 VitC, VitE, 提高体内 VitC, VitE 的含量, 而后者分别是体内水溶性和脂溶性强抗氧化剂. 在TP抗LDL氧化过程中, TP可提供电子使 α -VitE 部分再生和循环利用, 并且TP可能同时以水溶性和脂溶性两种方式清除自由基, 比单一的还原剂更有效地保护 α -VitE^[10]. 刘英莉 *et al*^[11]发现TP联合 VitC、VitE 应用后, 能显著降低染尘大鼠肺泡巨噬细胞DNA损伤率(拖尾率), 缩短损伤细胞拖尾的长度.

1.3 抗肿瘤的作用 目前有关TP抑癌、抗肿瘤的报道较多, 其作用机制与以下几方面有关.

1.3.1 诱导肿瘤细胞凋亡 茶多酚可诱导多种肿瘤细胞凋亡^[12-15], 包括裸鼠体内肠癌 PC-9 细胞、TRAMP 鼠体内前列腺癌 CaP 细胞、人类表皮状癌 A431 细胞、人类胃癌 KATO III 细胞、人类结肠癌细胞。焦酚型结构是儿茶素诱导细胞凋亡最基本的条件。迟万好 *et al*^[16]报道在不同的细胞系中 EGCG 诱导其凋亡可能有不同的作用途径。EGCG 在体外诱导肿瘤细胞凋亡的途径有可能有通过对拓扑异构酶的抑制、通过引起多种蛋白激酶 C 同工酶水平的下调调控、通过影响 P53 的表达, 也可能是通过活化 caspase-3/CPP32 样蛋白酶介导的。Suganuma *et al*^[17]证明了 TP 和其他抗肿瘤药(tamoxifen 等)一起使用会产生协同诱导凋亡的作用。另外 TP 诱导细胞凋亡具有选择性^[15], 如 EGC 可诱导亚 G1(sub-G1)期白血病细胞凋亡, 却不能诱导 low S, high G 和 G2/M 期白血病细胞凋亡。

1.3.2 阻滞信号传导通路 TP 对信号传导通路有选择性阻断作用, 从而抑制肿瘤生长^[13]。TP 可干预激活蛋白-1(AP-1)和核转录因子 B(NF- κ B)为主的信号传导通路: 通过作用于 MAPK/JNK 通路抑制促癌物诱导的 AP-1 活性; 通过降低抑制蛋白 I κ B 磷酸化从而调节 NF- κ B 的活性; 抑制上皮生长因子(EGF)与相应受体的结合和受体的磷酸化等。如 Suganuma *et al*^[17]报道了 EGC 的抗肿瘤作用与 MAPKs 有关, EGC 对 MAPK 的三个亚家族 -Erk, JNK/SAPK 及 P38 有细胞疏醇依赖性的刺激作用。

1.3.3 调控细胞周期/抑制肿瘤细胞 DNA 合成与复制 抑制肿瘤细胞生长的机制可能有: 抑制肿瘤细胞 DNA 合成与复制^[14]; 通过诱导细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制物(cki)表达, 抑制细胞周期(cyc-lin)和细胞周期素依赖性蛋白激酶(cdk)表达使细胞周期停滞于某一时期^[18]; 干预与细胞增生有关的信号转导通路^[20]。如 Ahmad *et al*^[19]的实验用人类表皮状癌 A431 细胞研究了 EGCG 对 cki-cyclin-cdk 表达的抑制作用。

此外, 茶多酚还能抑制癌基因/诱导抗癌基因的表达^[21]; 抑制致癌物前体的代谢活化; 逆转肿瘤细胞的多药耐药性(MDR)^[22]; 抑制端粒酶: 端粒酶的活化是在肿瘤的晚期, 而且是细胞永生的关键一点, 黎丹戎 *et al*^[23]的体外实验证明茶多酚在一定浓度下能诱导肝 BEL-7404 细胞凋亡, 其抗癌机制与抑制端粒酶活性有关。

2 TP 对实验性肝损伤的保护作用

2.1 CCl₄ 致肝损伤 CCl₄ 致肝损伤主要是 CCl₄ 经过肝微粒体细胞色素 P450 代谢生成的自由基 CCl₃ 产生脂质过氧化损伤。李建祥 *et al*^[24]观察了儿茶素类化合物对 CCl₄ 致大鼠慢性肝损伤的保护作用。中、高剂量给药组(100, 200 mg/kg)均能降低血清 ALT 的活力以及脂质过氧化产物 MDA 和肝组织羟脯氨酸的含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 抗膜脂质过氧化作用优于联苯双酯, 并且有减轻肝脏病理损伤的作用, 给药组的肝纤维化程度也轻于 CCl₄ 模型组(对照组)。肖继平 *et al*^[25]的实验表明不仅绿茶取

物抑制四氯化碳所致的肝纤维化, 并且显著降低肝组织 TGF- β_1 mRNA 的表达, 而 TGF- β_1 介导的肝纤维在肝硬化的发展发挥重要的作用。张清俊 *et al*^[26]的实验也表明, 在 CCl₄ 诱发的肝自由基损伤体中, TP 和 VitC 对脂质过氧化均有明显的抑制作用, 但二者之间无显著差异。

2.2 阻塞性黄疸肝脏过氧化损伤 阻塞性黄疸时产生肠源性毒血症, 引起枯否细胞激活, 产生大量氧自由基, 消耗 SOD, 并使其活性下降, 导致组织过氧化反应增强, 同时具有抗氧化功能的 VitE, VitC 明显减少。窦若兰 *et al*^[27]用胆总管结扎的方法制备阻塞性黄疸大白兔模型, 观察了 TP 对阻塞性黄疸肝脏过氧化损伤的保护作用, 结果表明 TP 对阻塞性黄疸肝损伤的保护, 主要是由于减少氧化应激, 阻断氧化应激产物对肝细胞的毒性影响, 达到抗氧化、保肝作用, 并且保护了体内自身抗氧化能力。

2.3 急性镉中毒致肝损伤 肝脏、肾脏是镉毒性作用的主要靶器官, 镉引起的氧化反应已被看作镉毒性损伤的一个重要机制^[28]。陈慧中 *et al*^[29]研究了 TP 和 VitC 预处理对急性镉中毒所致的肝损伤的预防作用, 结果表明 TP 和 VitC 预处理后急性染镉大鼠血清中的 ALT 和 LDH 活性及肝脏中 GSH, MDA 含量明显低于单纯染镉组, 而 GSH-Px 活性高于单纯染镉组, 并提示其机制与清除氧自由基和螯合金属离子有关。

2.4 酒精性肝损伤 林春兰 *et al*^[30]采用了离体和整体实验的方法, 研究了 TP 对酒精性致肝损伤的防治作用。乙醇和乙醛的直接毒性作用是导致酒精性肝损伤的主要因素。乙醇在代谢过程中, 使 NAD⁺ 转变为 NADH, 使 NADH/NAD⁺ 的比值增高, 影响糖代谢, 乙醛可通过黄嘌呤氧化酶系统产生氧自由基, 使膜脂质过氧化增强, 进而损伤肝细胞, 并促进肝纤维化的形成。预先给予 TP, 能阻止自由基对肝细胞膜中不饱和脂肪酸的氧化损伤, 保护肝细胞, 减少了 ALT 的释放、抑制肝脏 MDA 含量的升高。张幸国 *et al*^[31]研究表明, TP 可能通过抗氧化作用和降低体内内毒素水平而抑制 SD 大鼠酒精性肝纤维化的发展。

2.5 抑制肝癌癌前病变和癌细胞生长 宫芸芸 *et al*^[32]报道了茶多酚对以二甲基亚硝胺启动、切除部分肝组织、腹腔注射 CCl₄(DEN/PH/CCl₄)方法制备的肝癌癌前病变模型的抑制作用。实验结果提示茶多酚主要通过有效调节大鼠体内 II 相代谢酶(GSH 家族)的活性, 提高后者对脂质过氧化产物的清除能力、对环氧化物的解毒能力, 从而减少致癌物及其中间活性产物、氢过氧化物等对机体的损伤, 对大鼠肝癌癌前病变发挥抑制作用。并且 TP 和茶色素能够在不同水平上拮抗谷胱甘肽硫转移酶(GST-Pi)的过度表达^[33]。另一项 DEN/PH/CCl₄ 肝癌癌前病变模型的研究^[34]进一步表明抑制细胞增生、诱导细胞凋亡可能是 TP 抗癌的重要机制。并观察到 TP 抑制细胞增生标志物 p21^{WAF} 的表达, 抑制 Bel-2 蛋白的表达,

诱导 Bax 蛋白的表达(后二者与细胞凋亡密切相关)。

此外, 詹皓 *et al*^[35] 观察了重复 +10Gz 暴露对大鼠脑脂质过氧化反应和肝肾功能的影响以及天然抗氧化剂 TP 的防护作用。结果表明重复高 + Gz 作用可损害肝肾功能, 而 TP 具有明显的保护作用。饶光宇 *et al*^[36] 的研究显示 TP 在四氯化碳、硫代乙酰胺、醋氨酚、氯化镉、乙醇、dl- 乙硫氨酸等多种毒物致肝脏损伤中, 均具有保护作用。

总之, 茶多酚对肝损伤具有保护作用, 从理论、动物实验和流行病学调查等方面均已得到证实, 对不同原因造成的肝损伤茶多酚发挥保护作用的机制也不完全相同。但以上机制还不完全明了, 目前尚缺乏可靠的临床资料。茶多酚具有多种生物活性和药理作用, 有关研究已引起国内外医学界, 药学界和茶叶界等各方面的极大关注, 但当前对除儿茶素外的其他有效成分(茶多糖, 茶黄酮等)的药理作用和相互作用方面的研究较少, 需要广泛地从分子、细胞、组织、器官等各个层次进行研究。

3 参考文献

- 1 李叶云, 江昌俊, 王秀丽. 茶多酚的生物活性及药理学研究进展. 安徽中医学院学报 2002;21:57-59
- 2 艾寒松, 梁仕声, 艾长荣. 茶多酚清除氧自由基的化学和药理作用的研究. 现代诊断与治疗 1998;9:314-315
- 3 胡秀芳, 沈生荣, 朴宰日, 杨贤强. 茶多酚抗氧化机制研究现状. 茶叶科学 1999;19:93-103
- 4 刘淑红, 李莹, 王美, 秦筱梅. 茶多酚对 Lewis 肺癌的生长抑制、抗氧化及免疫调节作用的研究. 中国肿瘤生物治疗杂志 2003;10:206-209
- 5 彭章平, 程普新, 葛瑶, 白菁. 茶多酚对血清超氧化物歧化酶和丙二醛水平影响的临床研究. 中国疗养医学 2001;10:36-37
- 6 张晓刚, 陈运贞, 雷寒, 王周碧. 实验性兔脂肪肝肝脂酶活性变化及茶多酚的作用. 中华肝脏病杂志 2003;11:77-80
- 7 刘忠民, 张华征. 茶多酚和维生素 E 对血浆脂蛋白氧化修饰的比较观察. 上海医学 1997;20:578-580
- 8 Guo Q, Zhao B, Li M, Shen S, Xin W. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synap-tosomes. *Biochim Biophys Acta* 1996;1304:210-222
- 9 沈新南, 陆瑞芳, 吴岷. 茶多酚对老龄大鼠血脂及体内抗氧化能力的影响. 中华预防医学杂志 1998;32:34-37
- 10 吴文华, 吴镇洲. 茶多酚的抗低密度脂蛋白氧化作用. 中国茶叶 2002;24:6-7
- 11 刘英莉, 张艳淑, 王广增, 姚林, 赵伯阳. 茶多酚联合维生素 C、维生素 E 对染尘大鼠肺泡巨噬细胞 DNA 损伤的保护实验研究. 中国职业医学 2000;27:21-22
- 12 Li HC, Yashiki S, Sonoda J, Lou H, Ghosh SK, Byrnes JJ, Lema C, Fujiyoshi T, Karasuyama M, Sonoda S. Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:34-40
- 13 刘刚, 陆劲松. 茶多酚对肿瘤防治作用的研究进展. 中国癌症杂志 2002;12:265-268
- 14 陈清勇, 钱利生, 郭勇, 郑筱洋. 茶多酚抗肿瘤的分子生物学研究进展. 中国现代应用药学杂志 2001;18:175-178
- 15 Smith DM, Dou QP. Green tea polyphenol epigallo-catechin inhibits DNA replication and consequently induces leukemia cell apoptosis. *Int J Mol Med* 2001;7:645-652
- 16 迟万好, 曹明富, 朱睦元. 茶多酚诱导肿瘤细胞凋亡的作用. 杭州师范学院学报(自然科学版) 2001;18:46-48
- 17 Suganuma M, Okabe S, Kai Y, Sueoka N, Sueoka E, Fujiki H. Synergistic effects of (—)-epigallocatechin gallate with (—)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung can-cer cell line PC-9. *Cancer Res* 1999;59:44-47
- 18 Opare Kennedy D, Kojima A, Hasuma T, Yano Y, Otani S, Matsui-Yuasa I. Growth inhibitory effect of green tea extract and (-)epigallocatechin in Ehrlich ascites tumor cells involves a cellular thiol-depend-ent activation of mitogenic-activated protein kinases. *Chem Biol Interact* 2001;134:113-133
- 19 Ahmad N, Cheng P, Mukhtar H. Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:328-334
- 20 Chung JY, Huang C, Meng X, Dong Z, Yang CS. Inhibition of activator protein 1 activity and cell growth by purified green tea and black tea poly-phenols in H-ras-transformed cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Cancer Res* 1999;59:4610-4617
- 21 Okabe S, Fujimoto N, Sueoka N, Suganuma M, Fujiki H. Modulation of gene expression by (-)-epi-gallocatechin gallate in PC 9 cells using a cDNA expression array. *Biol Pharm Bull* 2001;24:883-886
- 22 冉铁成, 王毅, 刘新起, 褚泰伟, 魏雄辉, 王祥云, 郭振泉, 魏冰. 茶多酚主要成分对肿瘤多药耐药性的逆转作用. 核化学与放射化学 2003;25:74-80
- 23 Li DR, Zhang W, Tang DP, Zhang LS. Inhibitory effects of tea polyphenols on telomerase and its ability to induce apoptosis of BEL-7404 human hepatocellular carcinoma cell. *Chin Pharmacol Bull* 2003;19:934-939
- 24 李建祥, 陈跃进, 章瑜, 周立人. 儿茶素类化合物对四氯化碳致大鼠慢性肝损伤的保护作用. 工业卫生与职业病 2003;29:20-23
- 25 肖继平, 陆瑞芳, 沈新南, 吴岷. 绿茶提取物对四氯化碳所致大鼠肝硬化的保护作用. 中华预防医学杂志 2002;36:243-246
- 26 张清俊, 李彤, 詹皓, 辛益妹. 茶多酚和维生素 C 对 FeSO₄- 半胱氨酸诱发离体人血浆脂质过氧化及 CCL₄ 诱发肝自由基损伤的抑制作用. 航天医学与医学工程 2001;14:50-53
- 27 窦若兰, 刘书德, 胡若梅, 孙志慧, 杨宏伟, 沈伟. 茶多酚对阻塞性黄疸肝脏过氧化损伤的保护作用. 营养学报 2000;22:328-332
- 28 Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced Hepatotoxicity and renal toxicity and protection by anti-oxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;154:256-263
- 29 陈慧中, 徐兆发, 裴秀丛, 郑霄, 李晶, 李北利. 茶多酚、维生素 C 对镉急性毒性影响的实验研究. 中国工业医学杂志 2003;16:12-14
- 30 林春兰, 蒋建伟, 严玉霞, 周羽竝, 赵迎社, 吴美玉. 茶多酚对酒精诱导的小鼠肝脂质过氧化和血清 ALT 活性变化的影响. 中国病理生理杂志 2003;19:110-112
- 31 张幸国, 虞朝辉, 秦玉娥, 张宇, 陈韶华, 厉有名. 茶多酚抗大鼠肝纤维化及其机制研究. 中国中药杂志 2003;28:1070-1072
- 32 宫芸芸, 韩驰, 陈君石. 茶多酚、茶色素对肝癌癌前病变大鼠肝脏 II 相解毒酶的诱导及其在化学预防中的作用. 卫生研究 2000;29:159-162
- 33 宫芸芸, 韩驰, 陈君石. 茶多酚、茶色素对大鼠肝癌癌前病变抑制作用的研究. 卫生研究 1999;28:294-296
- 34 贾旭东, 韩驰, 陈君石. 茶多酚、茶色素对大鼠肝癌癌前病变抑制作用及机制研究. 卫生研究 2001;30:168-169
- 35 詹皓, 陈立敏, 辛益妹, 唐桂香, 温静. 茶多酚对重复 +Gz 暴露大鼠脑脂质过氧化反应和肝肾功能的影响. 航天医学与医学工程 1999;12:1-5
- 36 饶光宇, 陈秀芬, 于燕妮. 茶多酚对小鼠实验性肝损伤的保护作用. 中国中药杂志 2001;26:191-193

拉米夫定在肝移植患者抗病毒治疗中的应用

白桂芹, 成军, 刘妍, 黄燕萍, 杨媛, 张树林

白桂芹, 成军, 刘妍, 黄燕萍, 杨媛, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室
北京市 100039
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-06-11

摘要

肝移植是目前治疗终末期乙型肝炎病毒(HBV)相关肝脏疾病的有效方法. 拉米夫定在肝移植患者防治术后HBV再感染的疗效是肯定的, 他在移植器官短缺时为肝移植提供时间, 但只有更深入探讨用药策略才能提高肝移植的成功率, 提高HBV相关疾病的远期治疗效果.

白桂芹, 成军, 刘妍, 黄燕萍, 杨媛, 张树林. 拉米夫定在肝移植患者抗病毒治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2432-2434
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2432.asp>

0 引言

肝移植是目前治疗终末期乙型肝炎病毒(HBV)相关肝脏疾病有效的治疗方法, 尤其对暴发性乙型肝炎更为首选. 然而, 在不采取积极病毒防治措施情况下, 术后HBV再感染率高达80%以上^[1-4], 且多数经历急、慢性肝炎而发展成为肝硬化、肝功能衰竭, 对合并肝癌的患者, 术后容易复发和转移. 以及随之而来的移植物丧失功能和死亡, 从而导致肝移植失败, 须行再移植手术. 而拉米夫定能有效地预防和治疗移植术后HBV再感染, 为HBV感染相关终末期肝病患者接受肝移植治疗带来了福音. 美国的FDA在1998年批准拉米夫定用于临床. 我们就国内外的研究进展进行简要的综述.

1 拉米夫定的药理作用

肝移植手术病肝切除后, 只是降低了病毒的绝对负荷量, 此时体内还存在少量病毒, 肝移植术后大剂量抗排异药的应用严重抑制了机体的免疫功能, 特别是肾上腺皮质激素可直接促进HBV DNA的复制. 另外, 目前还不能完全排除供体肝及血液携带乙肝病毒. 术后在没有预防措施的情况下, 乙肝相关肝移植术后在6 mo内HBV再感染率高达约40%, 2 a内再感染率高达约

60%, Samuel *et al*的资料也表明HBV再感染的平均时间在术后3.2 mo^[2]. 一旦发生HBV再感染或复发, 平均2 a左右即可形成肝硬化、肝功能衰竭, 从而导致移植失败, 远期疗效不佳^[5]. 因此抗病毒治疗防止再感染是肝移植成功与否的关键.

拉米夫定是核苷类抗病毒药, 可在HBV感染细胞和代谢生成拉米夫定三磷酸盐, 是拉米夫定的活性形式, 既是HBV聚合酶的抑制剂, 亦是此聚合酶的底物. 拉米夫定三磷酸盐渗入到病毒DNA链中、阻断病毒DNA的合成. 拉米夫定对线粒体的结构、DNA含量及功能无明显的毒性. 拉米夫定能迅速抑制HBV复制, 其抑制作用持续于整个治疗过程, 同时使血清氨基转移酶降至正常. 拉米夫定口服吸收迅速, 成人口服拉米夫定0.1 g约1 h左右达血药峰浓度, 生物利用度为80-85%, 拉米夫定主要以药物原型经肾脏排泄, 机体耐受性良好, 费用适中, 术后最长随访1 a, 均无明显对该药明显不适的表现.

2 拉米夫定能防治肝移植患者HBV再感染的发生

国内外研究表明拉米夫定预防肝移植疗效是肯定的, 有学者对7例乙型肝炎病毒感染相关终末期肝病患者行同种肝移植, 5例于肝移植前后予拉米夫定预防乙型肝炎病毒再感染, 2例予普通抗病毒药物阿昔洛韦治疗. 比较后提示拉米夫定能有效地预防肝移植术后乙型肝炎病毒再感染^[6]. 在动物模型和临床实验中拉米夫定能快速抑制病毒复制, 在原位肝移植患者他体现了完全的持续的病毒抑制作用^[7]. 因此对肝移植术后近期乙肝复发有较好的作用, 肝移植术前即开始服用效果更好^[8]. Mutimer *et al*^[9]报道11例肝移植术前应用拉米夫定预防HBV再感染, 术后均无再感染. 卢实春 *et al*研究HBV活跃复制(HBV DNA阳性)肝移植受体, 术前口服拉米夫定约2 wk能使80%的受体HBV DNA阴转, 便于安全地接受肝移植手术. 对于术后乙肝复发者, 继续用拉米夫定、泛昔洛韦、苦参素等治疗仍然有效^[10]. Perrillo *et al*^[11]也报道了3例术后HBV再感染患者, 经拉米夫定治疗6 wk后, 血清HBV DNA消失. Perrillo *et al*^[12]及 Grellier *et al*^[13]报道, 术前、术后给予拉米夫定能有效预防和治疗肝移植术后乙型肝炎的复发.

小剂量乙肝免疫球蛋白(HBIG)加拉米夫定的联合用药方案, 是一更有效的抗病毒方法^[14-15]. 有报道^[16]13例患者肝移植后联合用药1 a均无复发. 郑树森 *et al*^[17]对18例患者肝移植术后联合使用小剂量HBIG和拉米夫

定治疗,其中17例无HBV再感染^[17]。朱建平 *et al*^[18]对5例患者于术前开始服用拉米夫定,术后联合使用HBIG,结果术后出现了较高的HBsAb滴度,也说明术前开始服用拉米夫定和术后联合预防效果将更好。有学者研究表明拉米夫定和小剂量HBIG联合应用阻止移植后HBV复发的有效性达100%^[19]。肝移植术后没有用HBIG的受者中,术后早期体内出现不同滴度的HBsAb,随访后发现血清HBsAb均逐渐消失。只有联合使用HBIG,血清HBsAb才能被长期保持。高剂量无限制性HBIG单一治疗能阻止65%~80%患者复发,但是由于HBIG价格昂贵,且国内供应的HBIG仅供皮内或肌肉注射,没有静脉注射。并且长期应用HBIG带来的免疫压力会造成基因变异,出现免疫逃逸现象,导致预防失败^[20-22],使HBIG用于预防HBV再感染受到很大的限制。但是移植前患者出现拉米夫定抵抗可导致HBV活跃复制,增加移植后病毒血症的危险,从而发展为HBV感染复发^[23-24]。HBIG可能是惟一的治疗选择。

值得注意的是新肝术后早期可免于HBV再感染,亦称新肝的“安全期”,其主要原因为:(1)术前用拉米夫定使病毒量减少;(2)切除病肝致大量HBV清除;(3)术中大量输液输血进一步稀释了受体体内减少的病毒含量;(4)术后部分病例早期(9/15)出现的抗-HBs被动免疫亦为新肝免于病毒侵入的主要原因之一,并且患者在切除病肝后已经最大程度地减少了HBV病毒的负荷量,病毒的复制和蛋白质转录等都处于相对较低的水平,如果术后立即应用抗病毒药物,可以收到更好的效果。

3 肝移植患者拉米夫定的治疗方案

拉米夫定应用改变了HBV DNA阳性的活跃复制受体为手术禁忌的传统看法。如果受体表现HBV DNA阳性,现在倾向于术前应用拉米夫定等使HBV DNA转阴^[25],抑制HBV DNA使患者临床状态改善在器官短缺时增加原位肝移植的机会^[26]。如果供体和受体HBV DNA均为阴性,在给和不给预防措施的选择依据是HBsAg和抗-HBs的出现与否^[27]。在拉米夫定预防的基础上,术后HBV再感染可以产生YMDD区变异,此时应继续使用拉米夫定,并可加大剂量为150 mg/d,或加用泛昔洛韦、更昔洛韦等其他抗病毒药物^[9]。

1.1 预防性术前用药 在决定进行肝移植后立即给药,尽量满足2 wk以上、6 mo以内。(1)HBs(+)、HBeAg(+),患者,给予拉米夫定100 mg/d。(2)HBsAg(+),HBeAg(-),HBV DNA(+)患者,给予拉米夫定100 mg。(3)HBs(+),HBeAg(-),HBV DNA(-)患者,术前可不用拉米夫定。

1.2 术中术后用药 (1)手术日晨常规清洁灌肠后拉米夫定100 mg口服或胃管注入。术后拉米夫定100 mg/d胃管注入或口服,持续时间6 mo以上。超过6 mo,改100 mg/d为75 mg/d,以后每3 mo减量25 mg/d,至25 mg/d维持。自术后6 mo,逐渐减量处理,减量梯度每3 mo为25 mg,

至25 mg维持。减量给药是否会引起病毒再感染,有待作进一步的观察。(2)HBIG的使用:术中无肝期HBIG肌注2 000 IU(避免血肿,分多点注射),如遇大出血,止血后再补注射1次,术后1~7 d给予HBIG肌注1 000 IU,1次/d,使抗HBs \geq 500 U/L;术后第2 wk,HBIG肌注1 000 IU,2次/wk;第3~4 wk,HBIG肌注1 000 IU,1次/wk;第5 wk起,HBIG肌注1 000 IU,每2 wk注射1次;3 mo后,HBIG肌注1 000 IU,每3~4 wk注射1次;6 mo后,HBIG肌注400~800 IU,1次/mo。术后用药达到以下治疗窗:(1)术后3 mo内,血清抗HBs \geq 500 U/L;(2)术后3~6 mo,血清抗HBs \geq 300 U/L;(3)术后6 mo以上,血清抗HBs \geq 100 U/L(长期保持)。在每次注射前定量测定血清抗-HBs水平,由此来调整HBIG的用量及时间间隔。为检测抗病毒治疗的效果并及时发现可能出现的YMDD变异,应每月化验肝功能指标。

4 影响拉米夫定疗效的因素

主要的影响因素有:(1)用拉米夫定治疗HBV感染复发所发生的拉米夫定抵抗的肝移植患者似乎主要被D基因型感染。(2)在拉米夫定治疗过程中,野生型重现发生。(3)基因型抵抗先于表型抵抗,尽管表型抵抗不总是发生于基因型抵抗^[28]。(4)拉米夫定与YMDD:预防乙肝病毒复发国内外均有单纯使用拉米夫定导致HBV DNA聚合酶活性区基因突变(YMDD变异)的报告,YMDD编码区的突变,可导致编码蛋白M转换为I(M552I)或V(M552V),该区为病毒编码的DNA聚合酶的核苷酸结合位点,其变异会导致病毒对拉米夫定治疗的敏感性下降。郑树森 *et al*^[17]研究发现肝移植3例变异的患者均发生第743位核苷酸G \rightarrow T点突变,均在拉米夫定应用后7 mo左右导致YMDD的发生,其变异发生时间要比拉米夫定治疗的肝硬化患者早。有人推测这可能是因为肝移植患者中使用糖皮质激素。激素的应用可以增强HBV的复制,增加了病毒变异的可能性。YMDD变异多于长期应用抗病毒药物期间发生,并且其耐药性随着时间的延长发生率逐渐增高。也有人认为在应用抗病毒药物的治疗前就已存在,当予抗病毒治疗后野生型病毒复制能力下降,而变异株复制数量增加,致使血液中的可检测出变异的病毒株。YMDD变异株最早可产生于抗病毒治疗后第6 mo,其发生率各家报道不一。香港玛丽医院42例肝移植术后存活的病例长期予拉米夫定治疗,仅有2例发现YMDD变异体,发生率为5%。英国伊丽莎白女皇医院报道了19例接受拉米夫定治疗的肝移植受体,术前应用拉米夫定预防,术后长期服用拉米夫定,结果有4例发生了YMDD变异,发生率21%^[9]。美国多中心研究资料显示,52例接受肝移植术后长期使用拉米夫定的患者中,14例发生了YMDD变异,发生率为27%^[11]。而国内陈长宏 *et al*^[6]研究表明3例肝移植患者尚无YMDD变异发生。郑树森 *et al*^[17]研究证实4例患者中3例出现YMDD区基因变异(YMDD \rightarrow YIDD)。因

此目前多不主张单纯用拉米夫定预防乙肝感染的复发,联合应用不同的抗病毒药也许可以降低突变的发生^[29]。

总之,拉米夫定在肝移植患者防治术后HBV再感染的疗效是肯定的,他在移植器官短缺时为肝移植提供时间,只有更深入探讨用药策略才能提高肝移植的成功率,提高HBV相关疾病的远期治疗效果。

5 参考文献

- Terrault NA, Vyas G. Hepatitis B immune globulin preparation and use in liver transplantation. *Clin Liver Dis* 2003;7: 537-550
- Samuel D, Muller R, Alexander G, Fassati L, Ducot B, Benhamou JP, Bismuth H. Liver transplantation in European patients with the hepatitis B surface antigen. *N Eng J Med* 1993;329:1842-1847
- VanThiel DH, Wright HI, Faginoli S. Liver transplantation for hepatitis B virus associated cirrhosis: a progress report. *Hepatology* 1994;20:S20-S23
- Dodson SF, Issa S, Bonham A. Liver transplantation for chronic viral hepatitis. *Surg Clin North Am* 1999;79:131-145
- Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology* 1999; 30:567-572
- 陈长宏,董家鸿,王曙光.拉米夫定预防肝移植术后乙型肝炎病毒再感染的研究. *解放军医学杂志* 2001;26:531-532
- Gutfreund KS, Fischer KP, Tipples G. Lamivudine results in a complete and sustained suppression of hepatitis B virus replication in patients requiring orthotopic liver transplantation for cirrhosis secondary to hepatitis B. *Hepatology* 1995;22:328A
- 朱建平,张同琳,袁炯.肝移植术后乙型肝炎病毒再感染的防治. *中华器官移植杂志* 2003;24:788-791
- Mutimer D, Pillay D, Shields P, Cane P, Ratcliffe D, Martin B, Buchan S, Boxall L, O'Donnell K, Shaw J, Hubscher S, Elias E. Outcome of lamivudine resistant hepatitis B virus infection in the liver transplant recipient. *Gut* 2000;46:107-117
- Benari Z, Shmueli D, Mor E. Beneficial effect of Lamivudine in recurrent hepatitis B after liver transplantation. *Transplantation* 1997;63:393-396
- Perrillo R, Rakela J, Dienstag J, Levy G, Martin P, Wright T, Caldwell S, Schiff E, Gish R, Villeneuve JP, Farr G, Anschuetz G, Crowther L, Brown N. Multicenter study of lamivudine therapy for hepatitis B after liver transplantation. *Hepatology* 1999;29:1581-1587
- Perrillo R, Rakela J, Martin P. Lamivudine for suppression and prevention of hepatitis B when given pre-post liver transplantation (OLT). *Hepatology* 1997;26:260A
- Grellier L, Mutimer D, Ahmed M, Brown D, Burroughs AK, Rolles K, McMaster P, Beranek P, Kennedy F, Kibbler H, McPhillips P, Elias E, Dusheiko G. Lamivudine prophylaxis against refection in liver transplantation for hepatitis B cirrhosis. *Lancet* 1996;344:1212-1215
- Ben-Ari Z, Mor E, Tur-Kaspa R. Experience with lamivudine therapy for hepatitis B virus infection before and after liver transplantation, and review of the literature. *J Intern Med* 2003;253:544-552
- Terrault NA. Treatment of recurrent hepatitis B infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2002;8(10 Suppl 1): S74-81
- 卢实春,李波,严律南. HBV 活跃复制肝移植受体在拉米夫定预防下HBV标志物动态变化的研究. *中华肝脏学杂志* 2002;7:76-78
- 郑树森,吴健,王伟林,卢安卫.拉米夫定预防肝移植术后乙型肝炎病毒再感染的作用. *中华医学杂志* 2002;82:445-448
- 朱建平,张同琳,袁炯.肝移植术后乙型肝炎病毒再感染的防治. *中华器官移植杂志* 2003;24:78-79
- Albeniz Arbizu E, Barcena Marugan R, Oton Nieto E, Mateo Lindeman M, Garcia Gonzalez M, de Vicente Lopez E, Moraleda Garcia G. Use of combined treatment of hepatitis B immune globulin and lamivudine as prevention of hepatitis B virus recurrence in liver allograft. *Transplant Proc* 2003;35: 1844-1845
- Sawyer RG, McGory RW, Gaffey MJ, McCullough CC, Shephard BL, Houlgrave CW, Ryan TS, Kuhns M, McNamara A, Caldwell SH, Abdulkareem A, Pruett TL. Improved clinical outcomes with liver transplantation for hepatitis B induced chronic liver failure using passive immunization. *Ann Surg* 1998;227:841-850
- Markowitz JS, Martin P, Conrad AJ, Markmann JF, Seu P, Yersiz H, Goss JA, Schmidt P, Pakrasi A, Artinian L, Murray NG, Imagawa DK, Holt C, Goldstein LI, Stribling R, Busuttil RW. Prophylaxis against hepatitis B recurrence following liver transplantation using combination lamivudine and hepatitis B immunoglobulin. *Hepatology* 1998;28:585-589
- Dikici B, Ozgenc F, Kalayci AG, Targan S, Ozkan T, Selimoglu A, Doganci T, Kansu A, Tosun S, Arslan N, Kasirga E, Bosnak M, Haspolat K, Buyukgebiz B, Aydogdu S, Girgin N, Yagci RV. Current therapeutic approaches in childhood chronic hepatitis B infection: A multicenter study. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:127-133
- Terrault NA, Vyas G. Hepatitis B immune globulin preparations and use in liver transplantation. *Clin Liver Dis* 2003;7: 537-550
- Kim KH, Lee KH, Chang HY. Evolution of hepatitis B virus sequence from a liver transplant recipient with rapid breakthrough despite hepatitis B immune globulin prophylaxis and lamivudine therapy. *J Med Virol* 2003;71:367-375
- 卢实春,李波,严律南. HBV 活跃复制肝移植受体在拉米夫定预防下HBV标志物动态变化的研究. *肝脏* 2002;7:76-78
- Honaker MR, Shokouh-Amiri MH, Vera SR, Alloway RR, Grewal HP, Hardinger KL, Kizilisik AT, Bagous T, Trofe J, Stratta RJ, Egidi MF, Gaber AO. Evolving experience of hepatitis B virus prophylaxis in liver transplantation. *Transpl Infect Dis* 2002;4:137-143
- Nery JR, Nery-Avila C, Reddy KR, Cirocco R, Weppler D, Levi DM, Nishida S, Madariaga J, Kato T, Ruiz P, Schiff E, Tzakis AG. Use of liver grafts from donors positive for antihepatitis B-core antibody (anti-HBc) in the era of prophylaxis with hepatitis-B immunoglobulin and lamivudine. *Transplantation* 2003;75:1179-1186
- Ben-Ari Z, Daudi N, Klein A, Sulkes J, Papo O, Mor E, Samra Z, Gadba R, Shouval D, Tur-Kaspa R. Genotypic and phenotypic resistance: longitudinal and sequential analysis of hepatitis B virus polymerase mutations in patients with lamivudine resistance after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:151-159
- Khan TS, Rizvi F. Hepatitis B seropositivity among chronic liver disease patients in Hazara division Pakistan. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2003;15:54-55

骨髓源性肝干细胞的研究进展

钟晓琳, 李昌平

钟晓琳, 李昌平, 四川省泸州医学院附属医院消化内科
四川省泸州市 646000
四川省教育厅资助课题, No. 2003-A027
项目负责人: 李昌平, 646000, 四川省泸州市, 四川省泸州医学院附属医院
消化内科, lichangping88@hotmail.com
电话: 0830-2392753 传真: 0830-2392753
收稿日期: 2004-07-09 接受日期: 2004-08-25

摘要

骨髓干细胞的横向分化/转分化是近年来研究的热点, 骨髓源性肝干细胞是在一定条件下能向肝细胞横向分化/转分化的骨髓干细胞, 他的发现为肝病治疗带来了新的希望. 近年来对骨髓源性肝干细胞的分化机制、分化环境及条件、分离和培养的研究进一步深入, 使其在细胞移植、基因治疗等方面有广阔的前景. 现就骨髓源性肝干细胞的研究进展及其在临床治疗中应用前景综述如下.

钟晓琳, 李昌平. 骨髓源性肝干细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2435-2437
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2435.asp>

0 引言

干细胞是一种具有多向分化潜能和自我复制功能的早期未分化细胞, 其在医学领域应用是国内外研究的热点, 由于胚胎干细胞的应用存在伦理道德上的争议, 使得科研的方向转向了成体干细胞的研究. 骨髓干细胞是迄今研究最多、最易获得并已经用于临床治疗的成体干细胞之一. 骨髓干细胞在一定条件下能向肝细胞分化, 国内外对其分化的条件及其应用于肝病的治疗作了一些研究, 现综述如下.

1 骨髓源性肝干细胞的发现与证实

肝干细胞包括内源性和外源性肝干细胞. 卵圆形细胞 (oval cell, OC) 是内源性肝干细胞的主要成分, 在肝脏严重受损时, 能大量增生并分化为肝细胞和胆管上皮细胞, 但是这种细胞属于短期增生细胞, 其修复能力有一定限度, 对于慢性持续性刺激引起的肝损伤的价值不大, 自从 Petersen *et al*^[1] 提出了卵圆细胞可以由骨髓细胞分化而来的假设, 并用一系列骨髓移植和肝移植的研究以及激活卵圆细胞的方案研究证实了这一假设后, 骨髓作为外源性肝干细胞的来源备受关注.

Theise *et al*^[2] 将 δ 小鼠的骨髓移植到致死剂量 X 射线放射后的同系 ϕ 小鼠体内, 并在移植后通过荧光原位杂交 (FISH) 证明受体小鼠肝脏内存在即表达白蛋白也

表达 Y 染色体 *sry* 基因的供体来源细胞. 在人体, 也得出了相似的结论^[3]. 这些研究证实了肝脏中存在骨髓来源的肝样细胞. 但是, 仅根据形态学的研究并不能说明这种骨髓干细胞来源的肝样细胞是否是真正的肝实质细胞, 因此, 许多学者对骨髓细胞进行体外培养, 并检测其分化细胞的表面特异性标志物. Oh *et al*^[4] 最早将加大量的肝细胞生长因子 (HGF) 的骨髓细胞在体外培养, 发现骨髓细胞可分化为表达白蛋白、AFP、CK8、CK18、c-Met 的一类细胞. Miyazaki *et al*^[5] 用加有 HGF、EGF 的 HGM 培养大鼠的骨髓细胞发现有肝细胞表型出现. Fiegel *et al*^[6] 用 CD34+Thy-1+ 骨髓细胞在体外培养表达白蛋白、CK19. 这些检测指标都具有肝系细胞特异性, 从而证实了骨髓干细胞向肝细胞的分化. 为明确骨髓干细胞转分化的肝细胞的功能, Lagasse *et al*^[7] 将正常小鼠骨髓干细胞移植到延胡索酰已酰乙酸羟化酶 (Fah) 基因缺陷 (即致死性遗传性高酪氨酸血症) 模型小鼠体内, 使得肝功能明显改善, 从而通过体内实验证实了由骨髓干细胞分化而来的肝细胞具有正常的功能.

2 骨髓源性肝干细胞的治疗前研究

2.1 骨髓源性肝干细胞分化机制 骨髓干细胞的转分化已经得到证实^[8-10], 但是要将他应用于临床治疗, 首先要明确骨髓干细胞是通过细胞裂解还是通过细胞融合实现其分化的. Schwartz *et al*^[11] 从人、大鼠、小鼠的骨髓中提取出 CD44⁺, CD45⁺, HLA⁻ I⁻, HLA⁻ II⁻, cKit⁻ 的干细胞, 命名为多能成体祖细胞 (MAPCs), 发现他能直接分化为肝细胞. Wang *et al*^[12] 通过异性不同基因型小鼠的移植, 移植后通过 Southern 印迹杂交测定各基因型的比例、FISH 染色检测其核型证明骨髓干细胞产生肝细胞不是通过直接分化, 而是通过与宿主肝细胞进行细胞融合实现的. Vassilopoulos *et al*^[13] 也证实了这一结论. 融合后的细胞是具有骨髓干细胞和肝细胞的遗传学标志的杂种细胞, 肝脏是这类杂种细胞适宜的生存环境, 但只有该环境中的肝细胞发生变性坏死时才能发挥作用, 同时, 实验中发现肝细胞的再生不是骨髓干细胞移植后就立即出现, 而是发生在移植后 2 mo, 提示参与细胞融合的供体细胞不是骨髓干细胞本身, 而是其分化的后代, 这恰好解释 MAPCs 可以不通过与肝细胞融合而直接产生各种成熟细胞, 因为他可能是已经与受体细胞发生融合后才进入血液的细胞. 这一机制的提出为骨髓干细胞体外培养、移植时机、移植方式及部位提出了新的研究方向.

2.2 骨髓源性肝干细胞转分化的环境及条件 干细胞具有多向分化潜能和可塑性,骨髓干细胞只有在肝脏中才能分化为肝细胞.过去研究认为,骨髓干细胞的迁徙和成熟并不限于严重肝损伤时,在轻度肝损伤甚至正常的肝脏更新过程中也存在,但是近来的研究发现骨髓干细胞只有在特定的病理微环境中才能发生转分化. McTaggart *et al*^[14]将绿色荧光蛋白(GFP)标记的骨髓干细胞移植给正常组和 CCl₄ 诱导的肝纤维化组小鼠,再与未行骨髓移植的 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠进行对比研究,结果证实只有持续性肝损伤的微环境能有效诱导骨髓干细胞来源的正常肝细胞产生,而正常肝脏则不能.骨髓源性肝干细胞向成熟肝细胞分化是一个非常复杂的过程,需要多种细胞因子和体液因子的协同作用, HGF, SCF, IFN, ECF, IL-6, 胰岛素等细胞因子都有促进肝脏干细胞的增生和分化的作用^[5, 15-16], TGF- β 等则有负性调节作用^[17].此外,一些药物通过对这些因子的调节影响肝干细胞的分化.

2.3 骨髓源性肝干细胞的分离和培养 通过全骨髓移植的肝干细胞数量太少,不能达到有效的治疗效果.因此,骨髓源性肝干细胞的分离和培养是临床应用细胞替代治疗的基础.目前对于骨髓源性肝干细胞的分离多采用荧光激活细胞筛选法(FACS)、免疫磁珠分离法等,而这些方法都需要较高特异性的细胞膜表面标志.因此,大量学者在这方面做了研究: Theise *et al*^[12]在小鼠实验中发现移植 CD34+lin- 的骨髓亚系出现 Y 染色体阳性肝细胞的效率是全骨髓移植的 100 倍. Fiegel *et al*^[6]在体外培养中发现 CD34+ 骨髓干细胞能表达 CK19、白蛋白等肝细胞特异性标志. Avital *et al*^[18]在人及鼠的骨髓中都证实了 β_{2m} -Thy+ 细胞在体内外均可分化为具有肝细胞表型和功能的细胞. Danet *et al*^[19]又认为 Lin-CD45+CD38-CD34+/- 细胞中表达的 C1qRp 标志的可以作为从骨髓细胞中选择具有肝细胞分化潜能细胞的阳性标志.以上众多研究表明,造血干细胞具有横向分化潜能.而 Fang *et al*^[20]发现 FLK1+ 间质干细胞可诱导自体肝组织再生,且前述 Schwartz *et al*^[11]发现的 MAPCs 也是一种基质干细胞.可见,骨髓中不同表型的造血干细胞和基质干细胞均可转化为肝细胞,究竟哪一种骨髓干细胞最具有治疗潜能至今都没有统一的认识.为此,又有学者设想在体外全骨髓细胞的培养体系中模拟体内肝脏损伤的病理微环境,提供特异的肝干细胞增生信号,使其中的肝干细胞选择性地扩增,从而避免亚群分选所造成的肝干细胞资源的损失.蔡云峰 *et al*^[21]就采用含淤胆血清的病理条件培养基培养全骨髓细胞,结果发现,在筛选培养的第 1-3 d,大部分细胞脱落凋亡,仅少量残留细胞呈克隆样生长,在 4 d 适时加入肝细胞生长因子,这些细胞快速增生,2 wk 时出现大量肝细胞样集落形成单位(H-CFU),并证实 H-CFU 即为肝干细胞集落.可见适宜的病理微环境能够提供骨髓源性肝干细胞选择性增生的信号,同时“删除”骨髓中的非肝干细胞,从

而达到纯化肝干细胞的效果.这不仅为骨髓源性肝干细胞的分离与纯化提供了一条新的有效途径,而且为解决临床肝细胞替代治疗的种子细胞来源问题提供了新思路.

3 骨髓干细胞移植在肝病治疗中的应用前景

骨髓干细胞移植在肝病的治疗作用,已有部分报道. Kumar *et al*^[22]报道,1 例 AL 淀粉样变患者在肝移植后复发,并出现肝功能衰竭,之后的肝干细胞移植使病情得以控制. Lagasse *et al*^[7]利用正常小鼠骨髓干细胞治疗 Fah 基因缺陷小鼠,使受体小鼠产生供体源造血和肝细胞的再生,肝脏的生化功能得以恢复.同时,其对现在尚无确切治疗方法的终末期肝病如肝纤维化、肝癌等也有良好的治疗前景.

3.1 肝纤维化的治疗 McTaggart *et al*^[14]发现肝纤维化的环境是骨髓干细胞适宜的分化环境,使通过骨髓干细胞移植治疗肝纤维化成为可能. Yasukane *et al* 又通过骨髓干细胞移植到小鼠肝纤维化模型证实骨髓干细胞移植能明显的减轻肝纤维化.其可能的机制为:一方面,骨髓源性肝干细胞具有强大的增生分裂能力,能够在肝纤维化的环境中转分化为肝实质细胞,补充肝纤维化时减少的肝细胞.另一方面,骨髓干细胞移植还很好地解决了肝再生时 ECM 的堆积造成的肝纤维化加重的问题.展玉涛 *et al*^[23]通过移植 Thy+CD3-CD45RA- 的骨髓干细胞到 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化模型未发现体外标记的骨髓干细胞在肝纤维化形成的肝脏中表达肌成纤维样细胞的检测标志 α -SMA,结果提示移植的骨髓干细胞在肝纤维化形成过程中不分为肌成纤维样细胞,避免了 ECM 堆积,逆转肝纤维化的进程.可见,利用自体骨髓干细胞进行移植,可以避免用肝移植造成的供体的紧缺、移植后免疫排斥反应、来源于供体的病毒感染、高额的治疗费用限制.同时他有强大的分化潜能,提供良好的细胞来源,是治疗肝纤维化最有前景的治疗方法.此外,骨髓源性肝干细胞是转基因治疗较为理想的靶细胞^[24],导入了抗纤维化、抗病毒基因^[25-27]的自体骨髓源性肝干细胞既可以避免免疫排斥反应,又有增生潜能,在补充正常的肝细胞的同时发挥其抗纤维化、抗病毒等作用,具有较好的应用前景.

3.2 肝癌的病因研究与治疗 在肝脏再生过程中,由肝脏干细胞增生分化而成的上皮细胞,他们的寿命很长,存在于从癌细胞最初形成到其发展为肝癌的全过程,因此极有可能就是致癌的靶目标.目前原发性肝癌的细胞起源学说认为他由肝卵圆细胞成熟受阻、异常分化而来,其间有多个癌基因和(或)抑癌基因共同调控使肝卵圆细胞向肝癌细胞转化^[28].对骨髓源性肝干细胞的分化研究有助于我们明确肝癌的病因.骨髓源性肝干细胞对肝癌的治疗不仅在于可以提供肝细胞的来源,也可以通过基因导入技术,导入抑癌基因、抗肿瘤的的生长因子等进行基因治疗.是临床细胞移植最佳的细胞来源,在

未来, 利用骨髓源性肝干细胞制造出供移植使用的肝脏也是有可能的。

总之, 骨髓源性肝干细胞在肝脏疾病治疗中有广阔的应用前景, 但是, 要将其应用于临床仍然存在很多问题, (1)骨髓源性肝干细胞的提纯是通过继续寻找特异性表面标志, 还是通过在体外病理微环境中培养, 使其选择性扩增更好; (2)进行体外培养及诱导分化时, 培养基质的组成、接种的细胞密度、加入的生长因子种类及培养时间长短都还不确切; (3)移植的时机、方式、部位的选择; (4)进行移植治疗时, 对移植细胞生长的调控等。因此, 对骨髓源性肝干细胞的研究还需要进一步深入。

4 参考文献

- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170
- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31:235-240
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16
- Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:500-504
- Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:24-30
- Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003;21:98-104
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234
- Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 2000;95:3620-3627
- Davies JC, Potter M, Bush A, Rosenthal M, Geddes DM, Alton EW. Bone marrow stem cells do not repopulate the healthy upper respiratory tract. *Pediatr Pulmonol* 2002;34:251-256
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-1530
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cell from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897-901
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-904
- McTaggart RA, Feng S. An uncomfortable silence em leader while we all search for a better reporter gene in adult stem cell biology. *Hepatology* 2004;39:1143-1146
- Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:691-695
- Li CY, Baek JY. Mastocytosis and fibrosis: role of cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:123-126
- 刘芳, 刘金星. 转化生长因子 β_1 在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:86-88
- Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:156-164
- Danet GH, Luongo JL, Butler G, Lu MM, Tenner AJ, Simon MC, Bonnet DA. ClqRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10441-10445
- Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004;78:83-88
- 蔡云峰, 闵军, 何劲松, 魏菁, 莫隽全, 陈积圣. 骨髓源性肝干细胞的确认及定向分化的实验研究. 中国普通外科杂志 2003;12:287-290
- Kumar KS, Lefkowitz J, Russo MW, Hesdorffer C, Kinkhabwala M, Kapur S, Emond JC, Brown RS Jr. Successful sequential liver and stem cell transplantation for hepatic failure due to primary AL amyloidosis. *Gastroenterology* 2002;122:2026-2031
- 展玉涛, 魏来, 陈红松, 丛旭, 费然, 王宇. 骨髓干细胞在大鼠肝纤维化形成环境中的分化. 中华肝脏病杂志 2003;11:673-675
- Elwood NJ, Smith CA. Current status of retroviral vector mediated gene transfer into human hematopoietic stem cells. *Leuk Lymphoma* 2001;41:1-18
- Iimuro Y, Fujimoto J. Strategy of gene therapy for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:45-47
- Song E, Chen J, Wang K, Zhang H, Su F, Wang M, Heemann U. Intrasplenic transplantation of syngenic hepatocytes modified by IFN-gamma gene ameliorates hepatic fibrosis in rats. *Transpl Int* 2002;15:472-478
- Abriss B, Hollweg G, Gressner AM, Weiskirchen R. Adenoviral-mediated transfer of p53 or retinoblastoma protein blocks cell proliferation and induces apoptosis in culture-activated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003;38:169-178
- 马俊勋, 方驰华. 卵圆细胞及其与原发性肝癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:448-451

干细胞与胰腺疾病

江学良, 李兆申

江学良, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化科
上海市 200433

项目负责人: 李兆申, 200433, 上海市长海路 174 号, 中国人民解放军第二
军医大学长海医院消化科. jiangxueliang678@126.com

收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-04

摘要

干细胞研究无疑是当今生命科学研究最活跃的领域之一, 但目前遇到的一系列问题和挑战也是前所未有的. 随着干细胞研究的深入和技术的发展, 干细胞治疗必将为胰腺疾病治疗开辟新的途径. 本文针对干细胞的定义、干细胞的来源和类型、胰腺干细胞及干细胞与胰腺疾病的关系作一介绍.

江学良, 李兆申. 干细胞与胰腺疾病. 世界华人消化杂志 2004;12(10):
2438-2441

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2438.asp>

0 引言

1998-11, 美国生物学家 Thomson 与 Gearhart 分别从流产胎儿和经体外受精技术得到的多余胚胎中分离得到多能干细胞, 并成功地在体外进行了培养^[1]. 这些干细胞在体外具有无限或者较长期地进行自我更新和多向分化的潜能, 这使得他们不仅成为很多生物医学领域的重要研究工具, 而且用干细胞移植来治疗各种难治性疾病也成为可能. 由于这些新的研究课题可以使人类直接受益, 1999 年和 2000 年连续两次被美国《Science》杂志评为世界十大科技成果之一, 成为当今生命科学研究最活跃的领域之一. 关于干细胞的定义, 目前尚不统一, 但多数研究者认为, 干细胞是一类具有自我更新和多向分化增生能力的原始细胞, 能产生表现型和基因型与自己完全相同的子细胞, 既具有生理性的更新能力, 又具有对损伤与疾病导致的反应与修复功能的细胞^[2]. 根据这一定义, 在个体发育的不同阶段及成体的不同组织中都存在着干细胞, 只是随着年龄的增长, 干细胞的数量逐渐减少, 其分化潜能也逐渐变窄. 在干细胞的发育过程中, 还有一种中间类型的细胞称为祖细胞, 也具有有限的增生和分化能力, 但没有自我更新的能力, 在经过几轮细胞分裂周期后产生的两个分裂细胞均为终末分化细胞.

干细胞有 2 个重要的特点: 一是通过分裂在很长一段时间内可以自我区分和进行自我更新; 二是在正常的生理或实验条件下, 能被诱导分化成具有特殊功能的细胞, 如: 胰岛分泌细胞、肝细胞、肌细胞、神经

细胞、心肌细胞和血细胞等^[3-5], 但目前对引起干细胞分化的细胞内和细胞外的信号研究还有很多未知, 比如这些信号如何检测? 各种信号的相互关系和作用如何?

1 干细胞的分类和特点

1.1 干细胞的分类 目前常用的干细胞分类方法有 2 种, 一种是按其分化潜能的差异来分类, 可分为 3 种类型: 一类是全能干细胞, 可分化形成机体所有细胞类型, 如胚胎干细胞; 第二类是多能干细胞, 可以产生两种以上不同类型的分化细胞, 如间充质干细胞通常只能分化形成骨、肌肉、软骨、脂肪及其他结缔组织; 第三类是单能干细胞, 只能分化一种细胞, 如神经干细胞只能分化成神经元, 不能分化成显形胶质或少突胶质. 另一种是根据干细胞的来源分类, 可分为胚胎性干细胞和特定组织的干细胞(即成体干细胞). 胚胎性干细胞通常指来源于囊胚内细胞团的 ES 细胞(embryonic stem cells), 他们可以分化成成年机体所需的数百种特定的细胞, 在发育过程中, 可以分化成诸多特殊类型的细胞, 形成各种组织器官, 如: 心、肺、皮肤及其他组织器官^[6]. 成体干细胞来源于一些成体组织, 如骨髓、肌肉、脑、肝等^[7-9], 他们可连续不断地分化, 以补充正常损耗、损伤和疾病所引起的细胞消耗.

1.2 胚胎性干细胞与成体干细胞的异同 虽然成体干细胞与胚胎性干细胞一样, 都可在体外进行自我更新, 并且在适宜条件下, 都可分化成具有特殊形态和特定功能的子代细胞, 但二者之间有许多不同. 首先是来源不同, 这是最根本的区别. 胚胎性干细胞起源清楚, 多来自囊胚的内细胞团或胎儿的生殖嵴, 因此分离、纯化都比较容易进行, 但存在伦理学上的巨大争议; 成体组织中的干细胞数量很少, 很多成体干细胞尚未找到特有的细胞表面标志, 分离、纯化相对困难得多, 但不存在伦理问题. 其次, 成体干细胞与胚胎干细胞相比, 除了来源的不同和成体干细胞可以避免伦理之争外, 另一个优点是易于管理, 成体干细胞体外培养时不象胚胎性干细胞那样容易自发分化^[10], 后者植入免疫缺陷小鼠的皮下或肾囊肿中可形成畸胎瘤, 而成体干细胞参与病理情况下细胞的适度更新, 不会癌变. 另外, 应用成体干细胞的一大潜在优点是细胞来源于患者, 在体外扩增再移入患者的体内, 不会产生免疫排斥, 而胚胎性干细胞从供者引入患者, 可引起移植排异, 受者是否对胚胎性干细胞产生排异在人类的研究中尚

未被很好的解决^[11-12]. 当然, 胚胎性干细胞与成体干细胞在他们能分化的细胞的类型数量也是不同的. 因此, 胚胎性干细胞与成体干细胞在细胞再生治疗方面各有优缺点, 二者均需进行进一步研究, 取长补短.

1.3 成体干细胞的可塑性 传统观点认为, 成体组织干细胞是组织特异性干细胞, 即只能分化为所在组织的多种细胞类型, 如造血干细胞只能分化为各种血液细胞, 但最近研究发现, 组织中干细胞的分化潜能比人们预想的大得多, 如神经、肌肉组织中的成体干细胞还可以分化为血液细胞等, 许多报道证明存在于成年机体组织中的干细胞不仅向该组织细胞类型分化, 以不断补充修复该组织器官, 而且可向其他不相关细胞类型分化, 因而认为成体干细胞的分化具有可塑性^[13-14]. 但目前对各种组织干细胞的确切定位和分化标志仍知之甚少. 每种组织器官都需要进行生理更新和病理损伤后的修复, 但每种组织都拥有自身的干细胞吗? 他们在分化为成熟组织细胞之前各不相同吗? 可以在体内循环吗? 这些问题目前尚无定论.

2 胰腺干细胞

2.1 胰腺干细胞存在的证据 在更新较快的组织(如皮肤的上皮组织、肠上皮组织)中有干细胞存在已经得到证实, 但更新较慢的组织和器官(如胰腺)中是否存在干细胞, 过去一直有争议. 现在认为成年人胰腺存在胰腺干细胞, 主要证据有: (1)切除 90% 的胰腺组织后有自发的 β 细胞产生、复制^[15], β 细胞来源于导管前体细胞. (2)利用链脲霉素破坏鼠胚胎胰岛 β 细胞后发现胚胎胰岛胰十二指肠同源异型基因盒基因-1(PDX-1)阳性细胞出现^[16], 而 PDX-1 是干细胞的标志之一, 提示胰岛内部可能有干细胞存在.

2.2 胰腺干细胞的鉴别与分子标记 尽管胰腺干细胞表达某些细胞分子, 但至今尚未发现十分特异的胰腺干细胞标志, 以下是一些研究较多的鉴定胰腺干细胞的方法: (1)形态学方法. 胰腺干细胞是一种嗜碱性的单核细胞, 直径 8 μm , 呈圆形, 细胞核圆形或肾形, 胞核较大, 多含 2 个核仁, 染色质细腻而分散, 胞质中不含颗粒, 在形态上与小淋巴细胞相似, 单体积较小, 染色质浓染, 核仁不明显且有细胞器. (2)TH(tyrosine hydroxylase)是一种神经元标志物, 在大鼠胰腺发育中表现出发育依赖性变化. 成年大鼠胰腺中仅在 β 细胞中表达, 提示可用 TH 来鉴别内分泌前体细胞. (3)GLUT-2(glucose transporter)可在大鼠胚胎的胰芽细胞中检出. (4)CK20(cytokeratin)是成熟导管细胞的特异标志. (5)PDX-1 是胰腺干细胞发育过程中表达的第一个分子标志, PDX-1 阳性细胞可分化为胰腺组织的 3 种细胞: 内分泌细胞、外分泌细胞和导管细胞. 成年人及鼠的胰腺导管上皮细胞表达 PDX-1, 经诱导可分化成胰腺的内分泌细胞, 被认为是胰腺干细胞^[17-20]. (6)Bcl-2 是一种线粒体原癌蛋白, 又称凋亡抑制因子, 表达于胚胎和成人胰

腺导管上皮细胞, 说明这些细胞可能是胰腺干细胞. (7)波形蛋白在胰岛形态发生过程中与 CK20 短暂同时表达于胚胎导管上皮细胞, 也是组织再生和胚胎发生中上皮干细胞的一种标志蛋白. 在胚胎发生期, 定位在人胰腺上皮细胞基底层的上皮干细胞通过向导管腔壁移动形成导管细胞, 通过出芽方式游离于导管之外形成胰岛细胞. CK20, Bcl-2 和波形蛋白可看作是胰岛干细胞的标记蛋白. (8)nestin 系一种高分子质量中间丝蛋白, 是中枢神经系统神经干细胞的标志之一, 胰腺内 nestin 阳性细胞经体外培养诱导可分化形成胰岛 β 细胞, 胰腺内 nestin 阳性细胞还可分化为胰腺的其他细胞, 因此, 胰岛 nestin 阳性细胞被认为是胰腺干细胞, nestin 是胰腺干细胞的重要标志之一^[21-24]. (9)Ngn 是 bHLH 转录因子家族的成员之一, 研究发现 PDX-1 阳性细胞同时表达 Ngn3, 因此, Ngn3 可能是胰腺干细胞标志物之一^[25]. (10)MSX-2 是同源异型转录基因盒家族的成员之一, 而 β -gal 即 β -半乳糖苷酶, 在人胚胎胰腺导管上皮细胞高水平表达, 且 β -gal 阳性未分化细胞有很强的增生、分化能力.

2.3 胰腺干细胞的来源与定位 现已证明, 内胚层既产生内分泌组细胞又产生外分泌组细胞, 在肠上皮形成中, 有些内皮细胞优先形成胰腺壶腹, 胰腺的形态发生和分化就从这里开始. 胰岛细胞来源于个体发生期的胰腺导管干细胞, 通过胰腺导管上皮出芽和内分泌细胞积聚, 最终形成胰岛. 胚胎期胰腺再生来自于未分化的祖细胞或者干细胞, 在特定条件下, 成年胰腺的导管细胞能够被刺激分化成胰岛细胞, 然而, 仍不清楚是否所有的导管细胞都保留有干细胞的潜能. 关于胰腺干细胞在成人胰腺中的定位存在着争议, 但多数研究认为胰腺干细胞来源于胰腺导管上皮的基底层, 因为: (1)胰腺导管上皮细胞表达干细胞标志基因 PDX-1^[26]; (2)分离的胰腺导管上皮细胞经体外培养可分化为胰岛的各种细胞, 并可生成成熟的胰腺组织^[27-28]; (3)将人或鼠胰腺导管上皮细胞体外培养产生的胰腺移植到糖尿病鼠可使鼠血糖水平降至正常. Zulewski *et al*^[17]发现给鼠应用胰岛营养因子(糖或胰高血糖素样肽)后 1-48 h 胰岛数量增加一倍, 他们还发现鼠和人的胰岛均存在一种表达 nestin 的细胞, 体外培养的 nestin 阳性细胞可不断增生克隆, 且具有向多种细胞分化的潜能, 在一定条件下能分化为肝细胞和胰腺细胞, 因此胰岛内可能存在干细胞.

2.4 胰腺干细胞与其他细胞的关系 肝脏和胰腺细胞的相互转化^[29]. 肝脏和胰腺不仅有相似的组织结构和相同的起源, 而且他们的细胞可以发生相互转化. 动物实验发现, 肝脏干细胞能发育成胰腺和小肠等其他内脏器官, 如把鼠肝脏干细胞大量的移植到老鼠的胰管里, 3 mo 后, 肝脏干细胞变成了胰腺细胞, 并能分泌特有的消化酶, 甚至能形成可分泌胰岛素的细胞. 通过将鼠胰腺上皮细胞前体细胞移植到肝或者注入到肝门静脉, 移植

后6 wk和3 mo分别取材检验发现,胰腺上皮细胞前体细胞转变成了肝细胞,表达肝脏特异性蛋白质,细胞完全融入肝实质中^[30]. 2001年Shen *et al*^[31]在体外采用地塞米松、制瘤素M将分泌性胰腺肿瘤细胞诱导为表达肝细胞表型的细胞. 2002年Tosh *et al*^[32]将小鼠胚胎期胰腺细胞或者分泌胰多肽的胰腺细胞系AR42J-B13诱导分化为肝细胞,后者表达白蛋白、运铁蛋白、甲状腺运载蛋白等肝细胞标志. 胰腺干细胞和神经细胞的关系^[29]. 二者在分化过程中显现相同的基因表达程序,一些胰腺干细胞能够表达nestin,这是神经细胞发生的特征,暗示两类细胞可能有起源上的类似关系.

3 干细胞与胰腺疾病

3.1 干细胞与胰腺肿瘤 尽管胰腺癌的组织发生过程还不清楚,但实验表明,大部分胰腺癌发生在胰岛,可能从干细胞发生. 对发生在导管细胞之间的肿瘤来说,肿瘤细胞可能起源于祖细胞,而且实验也证实,胰岛干细胞有转化成恶性细胞的潜能^[29]. 胰腺干细胞在胰腺肿瘤的发生发展过程中起十分重要的作用^[33-34]. 应用免疫组织化学技术对57例胰腺内分泌肿瘤进行上皮膜抗原(EMA)的染色并对肿瘤中外分泌细胞成分的存在和分布进行观察,结果发现21例(36.8%)胰腺内分泌肿瘤中具有EMA阳性染色,阳性细胞多为导管或腺泡样组织学结构,部分阳性细胞具有与正常外分泌细胞不一致的组织学形态和EMA染色特征,提示胰腺内分泌肿瘤中具有一些胰腺外分泌组织学结构和细胞成分,胰腺肿瘤可能起源于同一种细胞—胰腺多能干细胞. 尽管胰腺肿瘤干细胞目前还没有被分离鉴定,但是肿瘤干细胞研究对阐明胰腺肿瘤发生机制、发现新的治疗靶点等都具有重要意义.

3.2 干细胞治疗糖尿病 近年来干细胞研究为糖尿病治疗带来了新的希望. 尽管尚未发现胰腺干细胞的确切的特异标志,但人们就几种候选的胰腺干细胞进行了不断的探索和研究. Ramiya *et al*从尚未发病的糖尿病小鼠的胰腺导管中分离出胰岛干细胞,并在体外诱导分化为能产生胰岛素的 β 细胞,他们将这些细胞移植到糖尿病小鼠的肾背膜下,经过55 d的观察发现,接受细胞移植的糖尿病小鼠血糖控制良好,而对照小鼠死于糖尿病^[29]. 胚胎干细胞在体外可被成功诱导分化成为胰腺组织,为胚胎干细胞移植治疗糖尿病提供了依据. Lumelsky *et al*^[35]以小鼠胚胎 nestin 阳性细胞为研究对象,先用无血清培养,再以碱性成纤维细胞生长因子干预,然后应用碱性成纤维细胞生长因子进行终止,结果发现31.5%的细胞分泌胰岛素,将这些细胞移植到糖尿病小鼠的皮下,定期测定该小鼠的血糖水平及体重,分别于细胞移植后7, 12, 28及42 d收集并检测标本,结果12 d移植部位细胞开始出现毛细血管化并产生胰岛素,而且产生胰岛素的细胞不断增加.可以预测,随着干细胞技术的不断发展和完善,将成为治疗糖尿病的

最有效手段.

3.3 干细胞与胰腺再生 胰腺损伤、急、慢性胰腺炎等导致组织和器官修复性再生,一般会有两种结果,一是损伤细胞被新的同类细胞所取代,功能和结构完全恢复;二是损伤细胞不能再生,组织损伤被纤维瘢痕代替,功能和结构都不能完全恢复到损伤前水平,导致纤维化. 由于成体胰腺细胞分裂增生困难,要想在胰腺损伤后功能和结构都获得理想修复,胰腺组织中必须有成体的多能干细胞或者类似细胞,这才能从根本上解决再生问题. 遗憾的是,目前这方面的研究还没有突破^[29].

总之,随着干细胞研究的深入和技术的发展,干细胞治疗必将为胰腺疾病治疗开辟新的途径.

4 参考文献

- 1 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147
- 2 Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50-56
- 3 Fiegel HC, Kluth J, Lioznov MV, Holzhtuter S, Fehse B, Zander AR, Kluth D. Hepatic lineages isolated from developing rat liver show different ways of maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:46-53
- 4 Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JJ, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:691-695
- 5 Austin TW, Lagasse E. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev* 2003;120:131-135
- 6 Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002;91:501-508
- 7 McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1341-1346
- 8 Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-904
- 9 Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542-545
- 10 Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* 2002;20:146-154
- 11 Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 2001;155:733-738
- 12 Capron AM. Stem cell politics: the new shape to the road ahead. *Am J Bioeth* 2002;2:35-37
- 13 Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000;288:1660-1663
- 14 Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. Insulin secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000;49:157-162
- 15 Plachot C, Movassat J, Portha B. Impaired beta-cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki

- rat, a spontaneous model of type II diabetes. *Histochem Cell Biol* 2001;116:131-139
- 16 Fernandes A, King LC, Guz Y, Stein R, Wright CV, Teitelman G. Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets. *Endocrinology* 1997;138:1750-1762
 - 17 Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001;50:521-533
 - 18 McKinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 2001;44:1203-1214
 - 19 Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3⁺ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2002;129:2447-2457
 - 20 Herrera PL, Nepote V, Delacour A. Pancreatic cell lineage analyses in mice. *Endocrine* 2002;19:267-278
 - 21 Huang H, Tang X. Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. *Lab Invest* 2003;83:539-547
 - 22 Lechner A, Leech CA, Abraham EJ, Nolan AL, Habener JF. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:670-674
 - 23 Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 2000;127:3533-3542
 - 24 Hunziker E, Stein M. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:116-119
 - 25 Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P. Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 2000;49:163-176
 - 26 Taguchi M, Yamaguchi T, Otsuki M. Induction of PDX-1-positive cells in the main duct during regeneration after acute necrotizing pancreatitis in rats. *J Pathol* 2002;197:638-646
 - 27 Drach KM, Wientzen J, Ricci LR. The diagnostic utility of sexual behavior problems in diagnosing sexual abuse in a forensic child abuse evaluation clinic. *Child Abuse Negl* 2001;25:489-503
 - 28 Schmied BM, Ulrich A, Matsuzaki H, Ding X, Ricordi C, Weide L, Moyer MP, Batra SK, Adrian TE, Pour PM. Transdifferentiation of human islet cells in a long-term culture. *Pancreas* 2001;23:157-171
 - 29 章静波, 宗书东, 马文丽. 干细胞. 第1版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003:170-179
 - 30 Dabeva MD, Hwang SG, Vasa SR, Hurston E, Novikoff PM, Hixson DC, Gupta S, Shafritz DA. Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7356-7361
 - 31 Shen CN, Slack JM, Tosh D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* 2000;2:879-887
 - 32 Tosh D, Shen CN, Slack JM. Conversion of pancreatic cells to hepatocytes. *Biochem Soc Trans* 2002;30:51-55
 - 33 Kamisawa T, Tu Y, Egawa N, Ishiwata J, Tsuruta K, Okamoto A, Hayashi Y, Koike M, Yamaguchi T. Ductal and acinar differentiation in pancreatic endocrine tumors. *Dig Dis Sci* 2002;47:2254-2261
 - 34 Argani P, Rosty C, Reiter RE, Wilentz RE, Murugesan SR, Leach SD, Ryu B, Skinner HG, Goggins M, Jaffee EM, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression: prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:4320-4324
 - 35 Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001;292:1389-1394

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

CAB Abstracts 和 Global Health 收录 World Journal of Gastroenterology

本刊讯 CAB International 对 WJG 仔细评阅, 发现 WJG 报到的范围与 CAB International 兴趣范围一致, 因此 CAB International 将 WJG 收录在 CAB Abstracts 和 Global Health 的索引内. CAB International 是一个非盈利的政府之间的组织, 致力于全球范围传播知识. CAB 覆盖全球的优秀杂志, 全球数据库的用户能够获得全文.(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 收录 World Journal of Gastroenterology

本刊讯 在 2004 年 11 月, Nature Publishing Group 将会出版一系列杂志, 题为自然临床实践, 包括肿瘤、心血管、泌尿、胃肠病学和肝脏病学, 这些文章会应用于临床患者和医生. Nature Publishing Group 收录非常有影响的杂志, *World Journal of Gastroenterology* 也被收录. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 为非常繁忙的胃肠病学家和肝脏病学家提供其专业的概况和其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为他们患者提供进一步的帮助. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 提供电子和印刷版, 其主编为 Stephen Hanauer. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

胰腺癌抗肿瘤血管生成治疗

何小平, 李兆申, 屠振兴

何小平, 李兆申, 屠振兴, 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

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

电话: 021-25070556 传真: 021-25074635

收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-09-19

摘要

胰腺癌是消化系统常见恶性肿瘤, 恶性程度高, 侵袭性强, 预后差, 死亡率接近于发病率。尽管近 50 a, 各种传统的治疗手段如手术, 放疗, 化疗或这些方法的联合应用取得较大进展, 但并未明显改善胰腺癌患者的预后。近 30 a 研究证实血管生成是许多肿瘤包括胰腺癌生长转移过程中的关键步骤, 抗血管生成治疗, 尤其是抗血管生成基因治疗作为胰腺癌治疗新视野, 为改善胰腺癌预后带来了新的希望, 成为研究的热点。本文就该方面的研究进展做一综述。

何小平, 李兆申, 屠振兴. 胰腺癌抗肿瘤血管生成治疗. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2442-2445

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2442.asp>

0 引言

胰腺癌发病率和死亡率位居全部恶性肿瘤的前 10 位, 侵袭性强, 且缺乏有效的早期诊断方法, 确诊时往往已经发生转移, 诊断后中位生存期不到 6 mo。近 50 a, 各种传统的治疗手段如手术, 放疗, 化疗或这些方法的联合对胰腺癌患者的预后几乎无影响, 胰腺癌死亡率依然接近于发病率, 因此迫切需要寻找新的治疗途径。1971 年 Folkman 首次提出肿瘤的生长浸润依赖于肿瘤内新生血管的形成, 后被大量的研究所证实, 揭开了肿瘤研究的新领域, 为治疗肿瘤提供了新的靶点。抗肿瘤血管生成治疗目的是切断肿瘤生长转移所依赖的“命脉”, 已发展为重要的抗癌策略, 成为胰腺癌治疗领域研究热点^[1-4]。

1 肿瘤血管生成与肿瘤生物学行为的关系

肿瘤生长依赖于新生血管的形成。肿瘤生长存在两个阶段, 血管前期和血管期。肿瘤聚集体生成后首先进入无血管生长期, 此期肿瘤通过弥散作用获得足够的营养和氧并运走代谢产物。当肿瘤体积增至 1-2 mm³ 以上时, 如果没有新生血管长入, 肿瘤组织将保持休眠状态或发生退化^[5-6]。一旦血管长入肿瘤, 新生血管不仅为肿瘤提供必需的氧和营养物质, 还提供大量的促生长

因子, 肿瘤将快速生长并达到难以控制的体积。因此, 新血管生成被誉为肿瘤生长的“开关”。

新血管生成还是肿瘤转移的关键步骤。肿瘤内微血管密度与肿瘤的恶性表型密切相关, 新生血管为肿瘤细胞提供了转移通道。肿瘤新生血管不成熟, 结构缺乏完整性, 缺乏细胞间连接, 管壁薄弱, 仅排列一层内皮细胞, 缺乏平滑肌细胞, 基底膜不完整, 因此穿透性较高。此外, 肿瘤血管化使间质内压力增高, 加快了淋巴回流。血管丰富的肿瘤有更高的转移率, 肿瘤内微血管密度(MVD)已成为预测肿瘤转移, 复发和判断预后的重要指标^[7]。胰腺癌MVD与肿瘤恶性程度直接相关, MVD高者预后差^[8-9]。

2 肿瘤血管生成的影响因素

2.1 肿瘤新血管生成触发机制(图1) 肿瘤细胞以及一些宿主衍生的非肿瘤细胞如纤维母细胞, 巨噬细胞和浸润的粒细胞能分泌促血管生成因子和抑制因子, 当两种因子的作用失平衡, 前者超过后者时, 便触发了新生血管的形成。导致这种失衡的原因是缺氧和/或基因改变^[10-16]。肿瘤生长到一定阶段, 当氧的需求超过供给或肿瘤内不成熟血管因间质内压力上升而塌陷时, 局部微环境处于缺氧状态。缺氧直接刺激肿瘤细胞和宿主细胞合成分泌多种促血管生成因子, 主要是 VEGF(血管

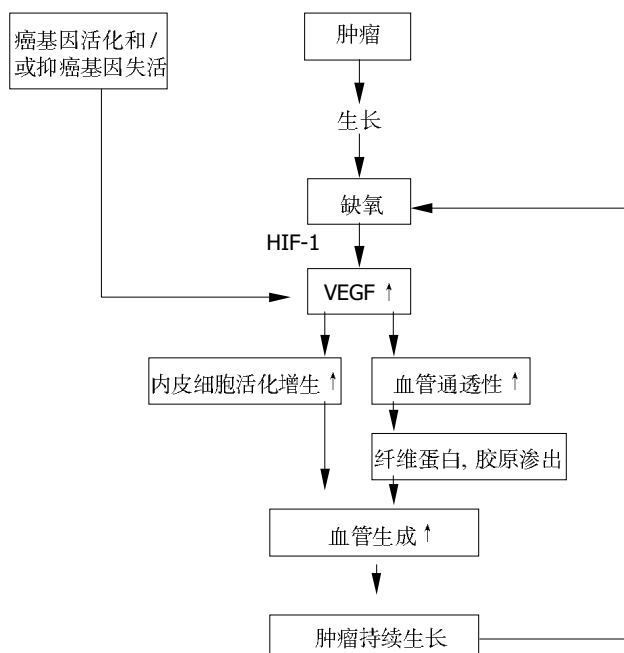


图1 肿瘤新血管生成触发机制。

内皮细胞生长因子), 促进局部新生血管形成. 缺氧还通过缺氧诱导因子 1(hypoxia-induced factor-1, HIF-1) 上调 VEGF 及其受体的表达. 另外, 癌基因如 *ras*, *raf*, *HER2/erbB2*, *src* 等的活化或抑癌基因如 *VHL*, *p53*, *p16INK4 α* 等的失活亦可导致 VEGF 表达增高, 促进新血管生成. 晚近, Yamanaka *et al* 报道人 12 号染色体有一能抑制血管生成的抑癌基因, 其缺失与胰腺导管癌的发生有关^[17]. 在胰腺癌细胞系导入缺失的生长抑素受体 -2 亚型基因, 则能通过下调 Bcl-2 而上调 Bax 基因表达, 抑制血管生成, 抑制肿瘤细胞生长^[18].

2.2 促血管生成因子 促血管生成因子主要是一些经典的肽类生长因子, 如: 血管内皮细胞生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管生成素(Ang)、基质金属蛋白酶(MMP)、血小板衍生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)、TNF- α 、IL-8 等, 其中最重要的是 VEGF, bFGF 和 Ang. (1)VEGF 亦称血管通透性因子(vascular permeability factor, VPF)是一种有肝素亲和性的同源二聚体多肽, 由于 mRNA 的不同拼接方式形成 5 种异构体, 即 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E 和胎盘生长因子(placenta growth factor). VEGF 有 3 种酪氨酸激酶受体, VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2(Flk-1/KDR), VEGFR-3(Flt-4), 均只存在内皮细胞上. 不同受体功能不同, 促进新血管生成的主要是 VEGFR-2, VEGFR-1 负相调节 VEGF 的功能, 而 VEGFR-3 主要调控淋巴管的发生^[19]. VEGF 与 VEGFR-2 结合, 诱导其磷酸化, 通过一系列级联反应, 引起血管内皮细胞增生, 诱导血管生成, 同时使血管通透性增高, 导致血浆中大分子物外渗, 为肿瘤细胞快速增长提供营养. 多种其他促血管生成因子, 如: bFGF, PDGF, TNF α 等能通过直接或间接影响 VEGF 和/或其受体信号传导起作用. 患者血清和尿液 VEGF 水平是判断部分肿瘤预后的可靠指标^[20]. 研究表明, VEGF 表达增高与胰腺癌 MVD 密切相关, 是判断患者预后差的指标^[21]. (2)bFGF 是最早被明确的促血管新生因子, 由 155 个氨基酸组成, *M*_r 18 000 bFGF 主要存在于细胞外基质, 在金属蛋白酶(MMP)作用下释放出来, 通过刺激其酪氨酸激酶受体起作用. bFGF 具有多种功能, 能诱导内皮细胞在内的多种细胞的增生分化, 还影响内皮细胞的迁移, 促进管腔形成, 刺激内皮细胞分泌胶原酶, 降解基底膜, 以利于新生血管生长^[10]. 越来越多的证据表明 VEGF 与 bFGF 在体内外血管生成显示出协同作用. 研究表明肿瘤患者血清和尿液 bFGF 浓度的增高和肿瘤血管生成有关, 脑肿瘤患者脑脊液 bFGF 水平是判断预后的有效指标. (3)Ang 是新发现的一族生长因子, 有 4 个成员, Ang1-4, 特异性作用于内皮细胞, 具有很强的促血管生成活性. Ang 家族并非在血管生成的早期阶段起作用, 而是在后期的血管重建和稳定中发挥关键作用^[7]. 激活 Tie-2/Ang-1 信号通路能诱导毛细血管出芽形成分支, 募集血管周细胞和平滑肌细胞, 维持血管

稳定性, 同时活化内皮细胞磷脂酰肌醇激酶(PI3), 使凋亡抑制剂 survivin 生成增多, 对抗内皮细胞凋亡^[19]. 有趣的是, Ang-1 促进血管生成, 而 Ang-2 拮抗此作用^[19]. Ang-2 通过诱导内皮细胞凋亡促使新生血管发生退化. Ang-1, Ang-2 和 VEGF 的水平共同决定了血管发展方向是增生(高水平 VEGF, Ang-1 和 Ang-2 作用平衡), 成熟(高水平 VEGF, Ang-1, 低水平 Ang-2), 还是退化(低水平 VEGF 和 Ang-1, 高水平 Ang-2). 阻断 Tie2 信号通路, 能有效抑制肿瘤小鼠血管生成.

2.3 血管生成抑制因子

2.3.1 血管抑素(angiotatin) 1994 年 O' Reilly *et al* 首次从 Lewis 肺癌小鼠的血清和尿液中分离得到了血管抑素, 系纤溶酶原降解产物, *M*_r 38 000, 由 350 个氨基酸残基组成, 特异性作用于内皮细胞, 抑制血管生成. 研究表明, Kringle 区是血管抑素的抗血管生成作用的关键结构. 所谓 Kringle 区为三个二硫键组成的环状区域, 纤溶酶原有 5 个串联的 Kringle 区, 除 Kringle 4 外, Kringle 1, 2, 3, 5 的产物都分别有程度不同的抑制血管生成活性^[20]. 血管抑素具有前 4 个 Kringle 区^[22]. 血管抑素的作用机制可能包括^[17, 20, 23]: (1)抑制内皮细胞表面 ATP 合成酶的活性; (2)抑制 VEGF 和 bFGF 活化内皮细胞细胞外信号调节酶(ERK-1, ERK-2), 抑制内皮细胞迁移; (3)抑制内皮细胞的增生; (4)抑制纤溶酶活性, 阻止内皮细胞迁移; (5)诱导内皮细胞凋亡; (6)抑制血管生成素的产生. 血管抑素已成功治疗多种肿瘤动物模型, 如: 纤维肉瘤, 黑色素瘤, 前列腺癌, 卵巢癌等^[24].

2.3.2 内皮抑素(endostatin) 继血管抑素后, 很快又发现了抗血管生成活性更强的内皮抑素. 内皮抑素系胶原 X VIII C 末端酶切产物, *M*_r 20 000, 含 184 个氨基酸, 对肝素有极高的亲和力, 存在于血管壁和基底膜. 内皮抑素特异性作用于内皮细胞, 抑制内皮细胞增生和迁移, 诱导其凋亡, 显著抑制肿瘤的生长与转移^[24]. 该药在美国已进入 II 期临床试验阶段, 但其具体作用机制尚不清楚, 可能包括^[23, 25]: (1)抑制 Bcl-2 和 Bcl-X2 的表达, 诱导内皮细胞凋亡; (2)抑制 VEGF 和 bFGF 活化内皮细胞 ERK-1, ERK-2, 抑制内皮细胞迁移; (3)抑制内皮细胞增生.

除血管抑素和内皮抑素, 肿瘤还能分泌多种抑制因子, 如组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP), 血小板因子-4(PF-4), 白介素-12(IL-12), 血小板反应蛋白-1(Thrombospondin-1, TSP-1)等.

3 胰腺癌抗肿瘤血管生成治疗

VEGF 及其信号传导通路在许多实体瘤包括胰腺癌的新血管生成中都起关键性作用. VEGF 及其受体在胰腺癌患者体内过度表达, VEGF 通过旁分泌和自分泌途径促进胰腺癌细胞生长. 人和动物模型的研究证实 VEGF 高表达与胰腺癌病理分期, 术后复发, 淋巴结和远处转移, 以及短生存期密切相关^[26]. 因此, VEGF 及其信号

传导通路成为胰腺癌抗血管生成治疗研究主要靶点。VEGF抑制剂包括抗VEGF抗体,可溶性VEGF受体,抗VEGF受体抗体,核酶,小分子VEGF受体抑制剂等。体外实验和动物模型已证实这些药物能有效抑制胰腺癌的生长和转移^[27-31]。VEGF中和性抗体抑制了异体移植小鼠PANC-1肿瘤生长;核酶介导的VEGF裂解抑制了胰腺癌细胞系肝脏转移;白喉毒素-VEGF融合蛋白抑制裸鼠胰腺癌生长等。另外,联合应用健择能增强对肿瘤的抑制作用,减少转移,延长生存期^[32]。这些临床前资料为抗VEGF治疗人胰腺癌提供了有力依据。

目前,已有多种抗VEGF药物进入临床试验阶段,如以VEGF受体为靶点的药物CEP-7055, SU6668, PTK787, ZD4190等^[1, 33-34]。其中,研究较多的是bevacizumab(商品名Avastin),系重组人抗VEGF单克隆IgG1抗体,2004-02获得美国食品和药品管理局(FDA)的批准上市,用于一线治疗晚期结直肠癌,这是世界上第一个批准上市的VEGF抑制剂。该药治疗胰腺癌的初步临床资料亦令人鼓舞。一项多中心II期临床试验表明,健择联合Bevacizumab治疗进展期胰腺癌较单用健择有效率高,病程进展慢,患者生存期延长,6 mo生存率为70%,1 a生存率为53%,且耐受性较好,但这一结果尚需进一步的研究证实。该药联合应用内皮细胞生长因子抑制剂,联合应用放疗及其他细胞毒药物的研究也正在进行,以进一步明确其治疗局部进展期和伴转移胰腺癌作用。理想抗血管生成治疗的关键是将足量治疗药物传送到肿瘤内,药物作用时间足够长以抑制肿瘤血管生成而不干扰正常生理过程,这也一直是该领域研究难题。基因治疗与抗肿瘤血管生成治疗相结合,使抗血管生成治疗更具靶向性,在很大程度上能满足上述要求。抗血管生成基因治疗在肿瘤局部表达高浓度抗血管生成蛋白,血循环中药物浓度较低,因而干扰正常生理性血管生成的风险小。只要基因在表达就会对局部产生持续的抗血管生成作用,避免经常注射外源性药物。动物实验表明重组腺病毒介导的反义VEGF能抑制裸鼠胰腺癌皮下种植瘤的生长,II-8反义治疗在胰腺癌裸鼠模型中同样能抑制肿瘤血管的生成^[35]。但目前基因治疗主要停留在实验室水平,仍面临许多难题,如重组基因的安全性,高效特异靶向载体的构建及基因转染率低等,离临床实际应用尚有较大距离。

总之,血管生成是胰腺癌生长转移过程中的关键步骤,抗血管生成治疗,尤其是抗血管生成基因治疗作为胰腺癌治疗新视野,为改善胰腺癌预后带来了希望,具有广阔的应用前景,但仍面临着许多问题和挑战,需要进一步深入研究和探讨。

4 参考文献

- Ranieri G, Gasparini G. Angiogenesis and angiogenesis inhibitors: a new potential anticancer therapeutic strategy. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2001;1: 241-253
- Dudek AZ, Pawlak WZ, Kirstein MN. Molecular targets in the inhibition of angiogenesis. *Expert Opin Ther Targets* 2003;7: 527-541
- Pino SM, Xiong HQ, McConkey D, Abbruzzese JL. Novel therapies for pancreatic adenocarcinoma. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:119-125
- Onizuka S, Kawakami S, Taniguchi K, Fujioka H, Miyashita K. Pancreatic carcinogenesis: apoptosis and angiogenesis. *Pancreas* 2004;28:317-319
- Kong HL, Crystal RG. Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:273-286
- Nesbit M. Abrogation of tumor vasculature using gene therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:45-49
- Webb CP, Vande Woude GF. Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J Neurooncol* 2000;50:71-87
- Zhongqiu W, Guangming L, Jieshou L, Xinhua Z, Ziqian C, Kui M. The comparative study of tumor angiogenesis and CT enhancement in pancreatic carcinoma. *Eur J Radiol* 2004;49: 274-280
- Wang ZQ, Li JS, Lu GM, Zhang XH, Chen ZQ, Meng K. Correlation of CT enhancement, tumor angiogenesis and pathologic grading of pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2100-2104
- Cavallaro U, Christofori G. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression. *J Neurooncol* 2000;50: 63-70
- Conti CJ. Vascular endothelial growth factor: regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. *Oncologist* 2002;7:4-11
- Bandoh N, Hayashi T, Takahara M, Kishibe K, Ogino T, Katayama A, Imada M, Nonaka S, Harabuchi Y. VEGF and bFGF expression and microvessel density of maxillary sinus squamous cell carcinoma in relation to p53 status, spontaneous apoptosis and prognosis. *Cancer Lett* 2004;208:215-225
- Kitada T, Seki S, Sakaguchi H, Sawada T, Hirakawa K, Wakasa K. Clinicopathological significance of hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human pancreatic carcinoma. *Histopathology* 2003;43:550-555
- Lee KT, Lee YW, Lee JK, Choi SH, Rhee JC, Paik SS, Kong G. Overexpression of Id-1 is significantly associated with tumour angiogenesis in human pancreas cancers. *Br J Cancer* 2004;90:1198-1203
- Kasper HU, Wolf H, Drebbler U, Wolf HK, Kern MA. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in pancreatic adenocarcinoma: correlation with microvessel density. *World J Gastroenterol* 2004;10:1918-1922
- Qin RY, Fang RL, Gupta MK, Liu ZR, Wang DY, Chang Q, Chen YB. Alteration of somatostatin receptor subtype 2 gene expression in pancreatic tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004;10:132-135
- Yamanaka S, Sunamura M, Furukawa T, Sun L, Lefter LP, Abe T, Yatsuoka T, Fujimura H, Shibuya E, Kotobuki N, Oshimura M, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Matsuno S, Horii A. Chromosome 12, frequently deleted in human pancreatic cancer, may encode a tumor-suppressor gene that suppresses angiogenesis. *Lab Invest* 2004;84:1339-1351
- Kumar M, Liu ZR, Thapa L, Wang DY, Tian R, Qin RY. Mechanisms of inhibition of growth of human pancreatic carcinoma implanted in nude mice by somatostatin receptor subtype 2. *Pancreas* 2004;29:141-151
- Kieran MW, Billett A. Antiangiogenesis therapy: current and future agents. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001;15:835-851
- Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:97-107
- Kuwahara K, Sasaki T, Kuwada Y, Murakami M, Yamasaki S, Chayama K. Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival. *Pancreas* 2003;26:344-349
- Cao Y, Cao R, Veitonmaki N. Kringle structures and antiangiogenesis. *Curr Med Chem Anti Canc Agents* 2002;2:667-681
- Sim BK, MacDonald NJ, Gubish ER. Angiostatin and Endostatin: Endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer*

- Metastasis Rev* 2000;19:181-190
- 24 Kirsch M, Schackert G, Black PM. Angiogenesis, metastasis, and endogenous inhibition. *J Neurooncol* 2000;50:173-180
 - 25 Ren B, Hoti N, Rabasseda X, Wang YZ, Wu M. The antiangiogenic and therapeutic implications of endostatin. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25:215-224
 - 26 Niedergethmann M, Hildenbrand R, Wostbrock B, Hartel M, Sturm JW, Richter A, Post S. High expression of vascular endothelial growth factor predicts early recurrence and poor prognosis after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Pancreas* 2002;25:122-129
 - 27 Tsuzuki Y, Mouta Carreira C, Bockhorn M, Xu L, Jain RK, Fukumura D. Pancreas microenvironment promotes VEGF expression and tumor growth: novel window models for pancreatic tumor angiogenesis and microcirculation. *Lab Invest* 2001;81:1439-1451
 - 28 Bockhorn M, Tsuzuki Y, Xu L, Frilling A, Broelsch CE, Fukumura D. Differential vascular and transcriptional responses to anti-vascular endothelial growth factor antibody in orthotopic human pancreatic cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2003;9:4221-4226
 - 29 Hotz HG, Gill PS, Masood R, Hotz B, Buhr HJ, Foitzik T, Hines OJ, Reber HA. Specific targeting of tumor vasculature by diphtheria toxin-vascular endothelial growth factor fusion protein reduces angiogenesis and growth of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 2002;6:159-166
 - 30 Tokunaga T, Abe Y, Tsuchida T, Hatanaka H, Oshika Y, Tomisawa M, Yoshimura M, Ohnishi Y, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Nakamura M. Ribozyme mediated cleavage of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor inhibits liver metastasis of a pancreatic cancer cell line. *Int J Oncol* 2002;21:1027-1032
 - 31 Hotz HG, Hines OJ, Hotz B, Foitzik T, Buhr HJ, Reber HA. Evaluation of vascular endothelial growth factor blockade and matrix metalloproteinase inhibition as a combination therapy for experimental human pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 2003;7:220-227
 - 32 Bruns CJ, Shrader M, Harbison MT, Portera C, Solorzano CC, Jauch KW, Hicklin DJ, Radinsky R, Ellis LM. Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody DC101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. *Int J Cancer* 2002;102:101-108
 - 33 Diaz-Rubio E. New chemotherapeutic advances in pancreatic, colorectal, and gastric cancers. *Oncologist* 2004;9:282-294
 - 34 Ruggeri B, Singh J, Gingrich D, Angeles T, Albom M, Yang S, Chang H, Robinson C, Hunter K, Dobrzanski P, Jones-Bolin S, Pritchard S, Aimone L, Klein-Szanto A, Herbert JM, Bono F, Schaeffer P, Casellas P, Bourie B, Pili R, Isaacs J, Ator M, Hudkins R, Vaught J, Mallamo J, Dionne C. CEP-7055: a novel, orally active pan inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models. *Cancer Res* 2003;63:5978-5991
 - 35 Shi Q, Abbruzzese JL, Huang S, Fidler IJ, Xiong Q, Xie K. Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clin Cancer Res* 1999;5:3711-3721

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 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 HTM、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.

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.

组织蛋白酶B与结肠腺瘤和结肠癌的关系

乔 镇, 汪丽燕, 关景明

乔镇, 汪丽燕, 关景明, 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
省科技厅攻关项目, No. GB01C12403
项目负责人: 关景明, 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: 0451-86686695
收稿日期: 2004-08-31 接受日期: 2004-09-19

摘要

组织蛋白酶B(cathepsin B, CB)是一种溶酶体蛋白水解酶,参与肿瘤的浸润和转移.现公认结肠腺瘤是结肠癌的癌前病变.CB在结肠癌演变过程中,尤其在浸润和转移中发挥重要作用.现介绍CB的活化作用,表达特点,抑制剂及其分子生物学特征等,重点对CB与结肠腺瘤和结肠癌发生关系的研究进展做一综述.

乔镇, 汪丽燕, 关景明. 组织蛋白酶B与结肠腺瘤和结肠癌的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2446-2449
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2446.asp>

0 引言

结肠癌是临床上常见的一种疾病,在国外内有较高的发生率和死亡率,结肠癌的发生发展机制一直是学者们研究的热点.半胱氨酸蛋白酶包括组织蛋白酶B、L、H、D(CL、CH、CD)等,CB是其中研究较多的一种.CB不仅存在于正常组织和体液中,也存在于多种肿瘤组织,如肺癌,乳腺癌,结肠癌,胃癌^[1],前列腺癌等中.因CB可以通过多种机制降解细胞外基质,破坏宿主屏障,在结肠癌发生发展演变过程中,尤其在浸润和转移中发挥重要作用.

1 CB活性

1.1 CB酶原的活化 CB的存在形式有两种,一种为无活性的前体形式(procathepsin B)或称为酶原形式,另一种为有活性的成熟CB形式.通过体内和体外的研究发现CB的酶原形式需要通过激活才能转变为有活性的成熟CB,他的激活条件需要一定的pH值,或其他酶的存在,而只有成熟的CB才具有恶性潜能,参与肿瘤浸润和转移.正常细胞在酸性条件下CB活性最高,而恶性结肠癌细胞分泌无活性的类CB蛋白酶,即CB酶原形式,在中性或碱性有最佳活性.研究认为组织蛋白酶原D(procathepsin D)也参与CB酶原的激活^[2],参与肿瘤浸润和转移过程中细胞外基质的反应.经过胃蛋白酶处理过的CB,活性平均可增加7.3倍,表明酶在递质中

主要是以无活性的形式存在的^[3].这是由于肿瘤分泌的CB缺乏6-磷酸甘露糖受体识别标志,故不能被摄入溶酶体,而以酶原的形式存在于胞质和细胞外.结肠癌患者的腹水中也发现无活性的类CB,这种酶的分子质量为40 ku,经过胃蛋白酶处理,可以转化为分子质量为28 ku的活性形式,这种无活性的类CB酶是一种酶前体形式,而不是酶-抑制剂的混合物^[4].

1.2 活性CB的作用 肿瘤的恶性行为主要表现为浸润和转移,此过程需要肿瘤细胞与细胞外基质(ECM)和基底膜成分的黏附,细胞对ECM和基底膜的降解,以及细胞移行几个基础过程.层粘连蛋白(LN),纤维连接蛋白(FN)是ECM和基底膜的主要成分和细胞黏附蛋白.生理条件下,CB只在溶酶体中起作用,而在肿瘤组织中,CB可以由肿瘤细胞和基质细胞分泌,降解蛋白聚糖, LN, FN和IV型胶原蛋白等多种细胞外基质成分,破坏黏膜屏障,促进肿瘤细胞一系列降解过程,此外,CB还能通过激活胶原酶等其他蛋白水解酶而间接参与细胞外降解过程. Satoh *et al*^[5]发现,结肠腺瘤中的CB活性要明显高于肿瘤周边的组织,有趋向表明,浸润到浆膜或绒毛的癌中的CB活性要高于浸润到肌层的癌中CB活性.表明CB尤其是细胞膜中的CB在结肠肿瘤中呈较高表达,这使肿瘤细胞更易降解细胞外基质,引起肿瘤细胞的浸润和转移. Chabowski *et al*^[6]研究表明结肠癌组织的细胞溶质和匀浆中的CB活性要明显高于临近的正常组织,且癌和正常组织的组织匀浆中的CB活性有高于细胞溶质的趋势. LN是基底膜的主要成分,主要参与细胞基质的相互作用和肿瘤的浸润,CB可以降解LN.研究发现LN在腺瘤中是连续分布的,而在高度不典型增生/原位癌和结肠癌中是不连续或呈片段分布的,而且后二者的染色程度明显高于腺瘤,证明CB的染色强度与LN的破坏程度相关,因此有理由认为CB表达的增加和与肿瘤相关的层粘连蛋白的减少可能参与从腺瘤到结肠癌的进展过程^[7]. Mckerrow *et al*^[8]采用自动操作微量测定模板分析形式,测得CB的活性在原发结肠肿瘤中明显升高,而在伴有转移的肿瘤中CB活性最高. Talieri *et al*^[9]研究CB、CD参与人类几种肿瘤的进展过程时,对比了64个结肠癌和同一患者的正常结肠组织中CB、CD抗原水平和他们的免疫组织化学染色,结果显示癌组织中的抗原水平明显高(平均CB为35.79 μg/g, CD 3.97 μg/g)于周围正常黏膜(平均CB为24.62 μg/g, CD 2.69 μg/g). CB抗原水平和分化等级、Dukes分期明显正相关,但和淋巴结无关. CD抗原水

平和上述的参数指标无关. CB、CD抗原的染色密度从腺瘤到腺癌逐渐增高. CB、CD的染色程度和分化等级、Dukes分期、淋巴结有关. 还有研究表明CB可以和FasL相互作用参与结肠癌的转移^[10].

1.3 细胞膜定位与CB活性 在腺瘤和转移癌细胞中CB呈弥漫性胞质染色, 正常黏膜中呈粗颗粒状染色. Mckerrow *et al*^[8]通过免疫组化法进行定位, 发现CB主要是由有浸润的肿瘤顶端的巨噬细胞表达的. 在研究CB在结肠癌中的定位和活性关系时, Hazen *et al*^[11]发现在正常结肠黏膜中, 隐窝上皮包含有CB蛋白, 但其无活性, 基质中CB蛋白呈中等量表达, 且一般在结肠表皮下的区域才有活性. 在腺瘤组织中, 大部分CB蛋白呈颗粒状分布于管状腺瘤上皮的基底部, 且这部分CB是有活性的, 而基质中CB几乎不表达活性. 在低分化癌上皮内包含有低水平的CB蛋白, 弥漫分布于癌细胞内, 而基质内却包含有高水平的CB蛋白. 与中、高度分化癌比较, 低分化癌细胞中CB活性明显降低, 只有癌细胞的类卫星突起内才显示有CB的高度活性, 此外, 还观察到在血管增生, 炎症反应, 坏死的地方CB活性表达也增高, 这从组织学定位上证明CB参与恶性肿瘤的浸润, 与炎症细胞, 细胞凋亡和坏死有关.

1.4 CB糖蛋白形式 成熟CB有2种形式, 一种为30 ku的单链形式, 一种为双链形式, 为5 ku轻链和25 ku的重链. 在正常结肠黏膜和癌前病变腺瘤中, CB的表达主要是以非糖基化的27 ku形式存在的双链蛋白质. 大多数结肠癌CB的过度表达是在Dukes A、B期, 测得的CB蛋白大多为非糖基化27 ku的成熟双链形式和糖基化的28 K成熟双链形式的蛋白混合物. 癌提取物中的糖基化的CB蛋白对PNGase F(即分解高甘露糖的天冬酰胺连接的多糖又可以分解复杂形式的天冬酰胺连接的多糖)敏感, 而与Endo H(优先水解高甘露糖寡糖)不发生反应, 表明癌中糖基化为一种复杂形式, 而不是单纯高甘露糖形式的糖基化^[12].

2 CB与结肠肿瘤

2.1 CB与新生血管 CB降解细胞外基质和基底膜, 参与肿瘤细胞的浸润和转移, 而肿瘤浸润和转移需新生血管的形成作为前提条件, 血管生成和肿瘤生物学行为紧密相关. 目前认为, 新生血管形成受很多因素影响, 蛋白水解酶在肿瘤的血管生成中起重要作用. 肿瘤血管生成的第一步是血管基底膜的降解, 然后是内皮细胞向肿瘤细胞区移行. 由肿瘤基质中毛细血管和成纤维细胞分泌的CB可能参与降解血管基底膜和细胞外基质, 促使内皮细胞移行和血管生成. 王娅兰 *et al*^[13]发现CB表达只有在强阳性组和阴性组对比时, 微血管密度(MVD, microvessel density)才有统计学意义, 结果表明可能是CB影响血管生成, 也可能是CB降解的产物能促进血管生成. 新生血管的形成是肿瘤生长、转移发展所必须的, 他的形成不仅使肿瘤生长, 而且由于新生血

管基底膜的缺损而提供了癌细胞进入血管的途径, 从而促进肿瘤细胞的血行扩散. 研究表明在结肠癌中, 有血管增生的地方, CB活性表达量也增高^[11]. 说明CB对肿瘤血管的生成具有一定的作用. Kruszewski *et al*^[14]采用免疫组织化学法分析了90例被切除的结肠癌中CB蛋白的过度表达和血管生成强度(angiogenesis density)的联系, 及对预后的影响, 规定: 如果显微镜观察范围内, 有超过50%的癌细胞显示有抗CB的免疫反应性就为CB的过度表达; 3个具有最高血管数量范围的平均值为血管生成强度. 结果显示: 有36例(40%)可见CB的过度表达; 血管生成的增加和CB的过度表达明显相关; 血管密度较高和区域性的淋巴结转移有关; CB的过度表达在较大的年龄组中较常见(年龄大于中位年龄65岁); 按单变量分析时, 区域淋巴结中的转移、血管生成的增加、远处转移对预后有影响. 在原发结肠腺瘤的多变量分析中揭示, 只有当有区域淋巴结中的转移, 以及有远处转移而无血管生成增加时, 具有独立的预后价值. 由此, 可以认为在结肠腺瘤中, 血管生成强度和CB蛋白的过度表达之间有紧密联系, CB和血管生成强度与结肠癌的浸润和转移有关.

2.2 CB mRNA CB表达的调节不仅仅停留在蛋白水平上, 可能从转录或翻译时就发生了. 虽然以往的研究发现CB酶的活性在癌中增高, 但实际上CB mRNA水平的增加要比CB活性增加的更多、更稳定. 癌组织中CB mRNA平均约比正常对照组高3.7倍^[15], 表明结肠癌中CB表达的调节可能存在着转录后或者翻译后的调节. 此外, CB mRNA与Dukes分期呈负相关. 这与研究CB活性时发现CB活性与Dukes分期呈负相关一致. 但有研究^[15]发现Dukes A期表现出最高的CB mRNA水平, Dukes D期表达出较高的mRNA水平, Dukes B、C期的水平相对较低, 认为CB的分泌可能和结肠癌早期浸润和晚期远处转移有关. 肿瘤中CB表达增加这种特异性质存在局部浸润组织和已有远处转移的组织中. Northern blot 数据表明结肠癌中CB mRNA的增加主要是由于2.2-kilobase和4.0-kilobase转录体数量发生改变(正常组中也可见), 此外还有另外两种CB mRNA转录体(1.5和3 kilobase大小)也存在于肿瘤组织中. 人类肿瘤中CB mRNA主要是缺乏 exon2(外显子2), 乳腺癌、结肠癌和黑色素瘤中包含一种CB转录体, 这种转录体还缺少 exon3(外显子3), 其编码信号肽和7个活性前肽片断. 体内的转录/翻译分析表明这种信息片断将从内部的蛋氨酸密码子开始翻译, 并产生一个32 ku的缺乏信号肽和大半前肽的产物. 同时这种转录/翻译分析还发现: 缺乏 exon2, exon3 CB mRNA: 缺乏 exon2 CB mRNA: 包含5'末端全长的mRNA的翻译后的相对比率为8:2:1. 这些结果表明组织中CB表达在某种程度上是在mRNA水平上进行处理调控的. 在乳腺癌和结肠癌中, CB有12个 exon和11个 intron 组成, 正常时, 其启动于 exon3, 而肿瘤中由于 exon 2、exon3 都缺失, 形成了一特殊的

CB mRNA 产物, 因其缺失信号肽, 所以 CB 蛋白质合成后不能经内质网途径进入溶酶体, 而弥散于胞质中.

2.3 CB 与 ras 基因 结肠癌的发生是多步骤多基因调节的过程. 结肠癌的发生最初是 APC 抑癌基因的突变, 开始有息肉生成; 然后 K-ras 癌基因的突变激活, 形成良性二级腺瘤; 抑癌基因 DCC 的失活, 三级腺瘤的形成; p53 基因失活, 肿瘤开始恶化, 形成癌^[16]. ras 转染的细胞具有转移潜能. 肿瘤的转移过程有很多影响因素, 包括: 细胞间的联系, 细胞-基质相互作用和细胞内外的微环境改变. 肿瘤细胞需要通过蛋白酶的不正常表达克服宿主屏障, 如基底膜, 从而有助于局部浸润或远处转移. 当恶性肿瘤细胞浸润周围连接组织时, 基质蛋白酶对局部基底膜和其他结构蛋白的降解是必需的 (基质蛋白酶包括金属蛋白酶 MMP, 丝氨酸蛋白酶, 天冬氨酸蛋白酶, 半胱氨酸蛋白酶). ras 基因有 H-ras, K-ras, N-ras 三种, ras 可以通过点突变或过度表达来激活: 约 40-50% 结肠癌有 ras 突变, 主要位于 K-ras 基因的 12 或 13 位密码子 (codons); 约 70% 的结肠癌中都有 N-ras 的过度表达, 但单独的 N-ras 过度表达并不能诱导 CB 或 CL 活性水平. 与具有正常 N-ras 蛋白组织相比, 只有当 K-ras 或 N-ras 突变时产生的变异的 (altered) N-ras 蛋白存在于结肠癌中时, 才可表达较高的 CB, CL 活性. 此结果表明, 伴有 K-ras 突变或伴有变异形式 (altered forms) N-ras 蛋白时的结肠癌可能诱导 CB 或 CL 表达水平来增加肿瘤发生的潜能. Cavallo-Medred *et al*^[17] 采用免疫荧光和亚细胞分离技术对人类结肠癌细胞系 HCT116 (有 K-ras 突变) 和其子系 HKh-2 研究发现, CB 定位于结肠癌细胞的表面上的细胞膜穴样内陷 (caveolae) 内, 分布于 HCT116 细胞膜穴样内陷中的 CB 要比 HKh-2 中的要多, CB 定位受 K-ras 的突变调节. 这是由于 HKh-2 中活性 K-ras 的缺失, 减少了处于稳定状态的 p11 和 caveolin-1, 从而减少了 p11 在细胞膜穴样内陷中的分布 (p11 是肿瘤细胞表面 CB 结合部位). 可见, 在肿瘤进展时, CB 参与细胞膜表面尤其是 CB 结合部位蛋白水解反应.

2.4 CB 与预后 CB 参与肿瘤的浸润和转移, 因此 CB 的表达是否与患者的预后有关也是研究的热点之一, 这对判断患者生存期的长短具有一定的指导意义. Padilla *et al*^[18] 用 COX 和 Kaplan-meier 法进行生存分析发现, 结肠癌术前患者血清 CB 水平为 6.94 (3.57-11.6 $\mu\text{g/L}$), 而免疫组化法测得的 CB 阳性率为 66.9 (10-90%). 和对照组相比, 结肠癌血清中的 CB 和免疫组化值都有显著的升高, 并且发现血清中 CB 水平越高, 患者的生存时间越短. 可见, CB 可以作为一个独立的结肠癌的肿瘤预后标志物, 术前血清 CB 水平超过 6.94 $\mu\text{g/L}$, 提示预后不好, 生存时间缩短. 而 Kos *et al*^[19] 在 COX 单变量比例风险模型分析中 (univariate cox proportional hazards model) 也有类似结果, 但 CB 最佳截点值 (cutoff value) 为 9.4 $\mu\text{g/L}$ 时, 相对危险比率 (relative hazard ratio) 为 1.8,

中点观察时间为 4.4 (3.2-5.5 a). 在多变量分析中, Dukes 分期对其影响最强, 其次是年龄. 血清中 CB, CEA 分子水平都高的患者比二者都低的患者生存期缩短, 相对危险比率 2.2. 此外, CB, CL 活性越高, 患者生存期越短, 二者呈负相关^[20]. 肿瘤上皮细胞中 CB 高水平表达的患者, 生存期也明显缩短.

3 CB 和抑制剂

组织蛋白酶 B 的抑制剂主要包括 stefin A, stefin B, cystatin C (CC), 其中 cystatin C 是对 CB 抑制最强的抑制剂, kininogens 也是 CB 的抑制剂, 但作用较弱. 抑制剂广泛存在于人体的体液中, 在结肠癌患者的血清, 癌细胞提取物, 及腹水中都可以测到抑制剂的存在, 在不同体液中, 抑制剂的含量也存在明显差异. Kos *et al*^[21] 测得结肠癌患者血清中 stefin A, cystatin C 中等程度增加 (各为 1.4 倍和 1.6 倍), 而 stefin B 并没有明显改变, 这与各个抑制剂发挥不同的调节机制和功能有关. 虽然抑制剂的含量增加, 但增加的 CB 酶活性并未被相应增加的抑制剂平衡, 即 CB 和抑制剂处于失衡状态, 最终结果是 CB 浸润作用依然存在, 故有人把 CB 与抑制剂的比值作为诊断肿瘤恶性程度的指标. 在分析抑制剂和患者预后时, Kos *et al*^[21] 发现, 只有 stefin B 和 cystatin C 与生存有关, 高水平的 stefin B, cystatin C 患者死亡风险明显增高, 结果显示高水平的半胱氨酸蛋白酶抑制剂与结肠癌患者生存期缩短有关. Zore *et al*^[22] 发现结肠癌患者血清的 CB/CC 在处于 Dukes C, D 期的水平明显低于 Dukes A, B 期时的水平. 此结果显示, 结肠癌患者的血清中 CB 并没有被其抑制剂 cystatin C 所削弱, 说明随着肿瘤的进展, CB 和 cystatin C 二者失衡, 可能是 cystatin C 表达减少和 (或) CB 表达增多, 在肿瘤进展时, 抑制剂的表达相对受到抑制. 当 CB 和抑制剂之间的失去平衡, 将促进结肠癌发生发展, 有可能为 CB 表达的增多或者是抑制剂表达减少, 或者为二者同时发生变化. stefin A 与 LN, FN 分子结构上有高度的同源形, 尤其是与细胞结合的片段, 故 stefin A 可抑制癌细胞的黏附力, 从而阻断了肿瘤转移的始动因素, 阻止了 CB 对 LN, FN 的降解, 还可以间接的抑制 MMP 等的激活, 抑制 CB 降解过程.

在体外条件下, 有研究表明 CB 单克隆抗体可以特异的和 CB 结合, 封闭酶活性中心, 对抑制肿瘤细胞扩散有一定作用^[23], 但因其为鼠源性异种蛋白, 限制了其在人体的应用. 制备 CB 嵌合抗体, 则可以大大降低抗体用于人体引起的排斥反应. 在体外条件下, 已有人研究如何抑制 CB 的分泌. 樊晓辉 *et al*^[24] 利用基因工程方法, 将构建的人-鼠嵌合抗体基因转染中国仓鼠卵巢细胞, 并得到表达, 体外能抑制 Ras-transformed MCF-10A neo T 细胞株. 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的嵌合抗体对癌细胞浸润的抑制率就可达 23%, 这提示该人-鼠嵌合抗体在抗 CB 异常分泌的疾病如癌症方面具有良好的应用前

景. 是否这种嵌合抗体对结肠癌也有相应的一直作用还有待进一步研究. 有研究表明, 具有活性的 cystatin C 能够有效的减缓结肠癌细胞的浸润生长^[25].

总之, 初分泌的无活性的 CB 必须在一定的 pH 值或其他酶的存在下才能激活为有蛋白水解活性的 CB, 从而发挥其在结肠癌中的恶性潜能: 在结肠癌组织中表达增加, 细胞膜中的特异定位, 降解细胞外基质, 基底膜, 促进肿瘤的浸润和转移, 由于 CB 在腺瘤和结肠癌的表达差异可以把 CB 作为区别二者的敏感标志. CB 还可能参与肿瘤新生血管的形成, 促进肿瘤的生长. 从分子生物角度来看, CBmRNA 的水平在早期结肠癌中增加的更明显, 比蛋白更具稳定性, 推测可能存在转录或翻译后的调节, 具体机制尚待进一步研究. 在结肠癌组织中还发现抑制剂与 CB 的平衡作用也参与肿瘤的发生发展过程. 如何应用 CB 抗体或抑制剂抑制结肠癌的浸润生长成为近年来研究热点.

4 参考文献

- 1 沈洁, 陈向荣. 胃癌组织组织蛋白酶活性测定的临床意义. 世界华人消化杂志 1999;7:147-149
- 2 van der Stappen JW, Williams AC, Maciewicz RA, Paraskeva C. Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. *Int J Cancer* 1996;67:547-554
- 3 Corticchiato O, Cajot JF, Abrahamson M, Chan SJ, Keppler D, Sordat B. Cystatin C and cathepsin B in human colon carcinoma: expression by cell lines and matrix degradation. *Int J Cancer* 1992;52:645-652
- 4 Matsuoka Y, Tsushima H, Koga Y, Mihara H, Hopsu-Havu VK. An inactive cathepsin B-like enzyme and cysteine proteinase inhibitors in colon cancer ascites. *Neoplasma* 1992;39:107-114
- 5 Satoh Y, Higashi T, Nouse K, Shiota T, Kinugasa N, Yoshida K, Uematsu S, Nakatsukasa H, Nishimura Y, Tsuji T. Cathepsin B in the growth of colorectal cancer increased activity of cathepsin B in human colorectal cancer. *Acta Med Okayama* 1996;50:305-311
- 6 Chabowski A, Skrzydlewska E, Sulkowska M, Famulski W, Sulkowski S, Chrzanowska A. The activity of cathepsin B in colorectal adenocarcinoma. *Pol Merkuriusz Lek* 2001;11:330-333
- 7 Khan A, Krishna M, Baker SP, Banner BF. Cathepsin B and tumor-associated laminin expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:704-708
- 8 McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, Kuwahara T, Matley M, Coussens L, Warren R. A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. *Mol Med* 2000;6:450-460
- 9 Talieri M, Papadopoulou S, Scorilas A, Xynopoulos D, Arnogiannaki N, Plataniotis G, Yotis J, Agnanti N. Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. *Cancer Lett* 2004;205:97-106
- 10 左富义, 李世拥, 安萍, 于波, 蔡慧芸. 蛋白质酵母双杂交系统的建立及其在大肠癌肝转移研究中的意义. 中华外科杂志 2004;42:672-674
- 11 Hazen LG, Bleeker FE, Lauritzen B, Bahns S, Song J, Jonker A, Van Driel BE, Lyon H, Hansen U, Kohler A, Van Noorden CJ. Comparative localization of cathepsin B protein and activity in colorectal cancer. *J Histochem Cytochem* 2000;48:1421-1430
- 12 Iacobuzio-Donahue CA, Shuja S, Cai J, Peng P, Murnane MJ. Elevations in cathepsin B protein content and enzyme activity occur independently of glycosylation during colorectal tumor progression. *J Biol Chem* 1997;272:29190-29199
- 13 Wang YL, Lin X. Cathepsin B expression and its relationship with microvessel density and biological behaviour of colorectal carcinoma. *Chine J Cancer Res* 2002;14:293-296
- 14 Kruszewski WJ, Rzepko R, Wojtacki J, Skokowski J, Kopacz A, Jaskiewicz K, Drucis K. Overexpression of cathepsin B correlates with angiogenesis in colon adenocarcinoma. *Neoplasma* 2004;51:38-43
- 15 Hirai K, Yokoyama M, Asano G, Tanaka S. Expression of cathepsin B and cystatin C in human colorectal cancer. *Hum Pathol* 1999;30:680-686
- 16 陈诗书, 汤雪明. 医学细胞与分子生物学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2003:702
- 17 Cavallo-Medved D, Dosescu J, Linebaugh BE, Sameni M, Rudy D, Sloane BF. Mutant K-ras regulates cathepsin B localization on the surface of human colorectal carcinoma cells. *Neoplasia* 2003;5:507-519
- 18 Padilla D, Cubo T, Molina JM, Garcia M, De la Osa G, Palomino T, Pardo R, Martin J, Arevalo E, Hernandez Calvo J. Prognostic significance and clinic utility of serum and immunohistochemical cathepsin B levels in colorectal cancer. *An Med Interna* 2003;20:521-525
- 19 Kos J, Nielsen HJ, Krasovec M, Christensen IJ, Cimerman N, Stephens RW, Brunner N. Prognostic values of cathepsin B and carcinoembryonic antigen in sera of patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Res* 1998;4:1511-1516
- 20 Troy AM, Sheahan K, Mulcahy HE, Duffy MJ, Hyland JM, O'Donoghue DP. Expression of cathepsin B and L antigen and activity is associated with early colorectal cancer progression. *Eur J Cancer* 2004;40:1610-1616
- 21 Kos J, Krasovec M, Cimerman N, Nielsen HJ, Christensen IJ, Brunner N. Cysteine proteinase inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in sera from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Clin Cancer Res* 2000;6:505-511
- 22 Zore I, Krasovec M, Cimerman N, Kuhelj R, Werle B, Nielsen HJ, Brunner N, Kos J. Cathepsin B/cystatin C complex levels in sera from patients with lung and colorectal cancer. *Biol Chem* 2001;382:805-810
- 23 Fan X, Kopitar-Jerala N, Premzl A, Bestagno M, Burrone O, Kos J. Molecular cloning and chimerisation of an inhibitory anti-cathepsin B antibody and its expression in Chinese hamster ovary cells. *Biol Chem* 2002;383:1817-1820
- 24 樊晓辉, Natasa KJ, Ales P, Janko K. 抗人组织蛋白酶B人-鼠嵌合抗体的表达及体外对癌细胞浸润的抑制效应. 中华微生物学和免疫学杂志 2003;23:910-913
- 25 Ogawa M, Jing H, Kitts DD, Nakai S, Nakamura S. In vitro anti-cancer activities in Caco-2 and HCT-116 cells of recombinant cystatin C prepared by a Pichia expression system. *J Med Food* 2003;6:317-322

p53 抑制剂 PFT- α 研究进展

张安平, 刘宝华, 张连阳

张安平, 刘宝华, 张连阳, 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通外科 重庆市 400042

项目负责人: 刘宝华, 400042, 重庆市大坪长江支路 10 号, 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通外科. lbh57268@163.com
电话: 023-68757248

收稿日期: 2004-08-31 接受日期: 2004-09-19

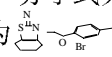
摘要

p53 是最重要的肿瘤抑制基因之一, 各种应激反应损伤后 p53 短期内即可在细胞内累积, 并作为转录因子调节许多下游的凋亡相关基因表达, 诱导凋亡的发生. 研究表明在抗肿瘤治疗过程中, 放化疗在杀伤肿瘤细胞的同时损伤增殖活跃的淋巴、造血及肠上皮细胞, 产生抗肿瘤的副效应, 而 p53 介导的凋亡是产生这种副效应的关键因素. 一种新的 p53 特异性抑制剂 PFT- α (p-fifty three inhibitor, PFT- α), 可以暂时的可逆性抑制 p53 介导的凋亡发生, 因此成为克服抗肿瘤治疗副效应和研究 p53 功能的有效工具.

张安平, 刘宝华, 张连阳. p53 抑制剂 PFT- α 研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2450-2453

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2450.asp>

0 引言

自 1999 年 Komarova *et al*^[1] 报道发现一种 p53 特异性抑制剂 PFT- α (p-fifty three inhibitor, PFT- α , pifithrin- α) 以来, PFT- α 抑制 p53 依赖的凋亡, 从而抑制抗肿瘤治疗副效应, 以及他在研究 p53 功能中的作用得到深入研究. PFT- α 是一种白色粉状的化学合成物, 分子式为 C₁₆H₁₈N₂O₅·HBr, *M_r* 367.3, 分子结构为 . 在 -20 °C 避光下稳定保存 3 a, 溶解于 DMSO 在 -20 °C 避光下稳定保存 3 mo. PFT- α 对光非常敏感, 其分解产物主要有碳氧化物, 氮氧化物, 硫氧化物以及卤化物.

1 PFT- α 在抑制 p53 依赖凋亡中的应用

1.1 PFT- α 抑制抗肿瘤治疗副效应 抗肿瘤治疗的常用策略化疗和放疗, 在杀伤肿瘤的同时可以损害正常细胞而产生副效应, 降低抗肿瘤效应, 这与 p53 诱导的凋亡相关. Komarova *et al*^[1-3] 突破常规思维试图寻找阻断 p53 在不产生新发肿瘤的同时又可抑制抗肿瘤副效应. 通过药物筛选发现了 PFT- α , 它具有特异性和可逆性抑制 p53 的功能. 体外研究发现 PFT- α 可使 Ela+ras 转化的鼠成纤维母细胞避免紫外线、 γ 射线、多种抗肿瘤药物诱导的凋亡. PFT- α 能够使经致死剂量 γ 射线照射 C57BL 和 Balb/c 两系小鼠的存活率达 60%, 在照射后

7 mo 无新发肿瘤. PFT- α 主要通过抑制 p53 的核转运, 以及 p53 下游靶基因如 Bax, p21^{WAF1}, MDM2 和 cyclin G 的表达. Zhang *et al*^[4] 发现顺铂常引起耳蜗和前庭感觉毛细胞的损害而导致不可逆转的听力丧失和平衡障碍, 这种损害是顺铂诱导 p53 依赖的凋亡而引起. 对新生小鼠的前庭和耳蜗进行器官培养, 在顺铂处理耳蜗和前体时运用 PFT- α , 可以使毛细胞的生存率增加且呈剂量依赖性. 通过抑制 p53 的表达, 使顺铂诱导耳蜗和前庭毛细胞的 caspase-1, caspase-3 活性降低, 明显降低对毛细胞的损害, 为减轻顺铂引起的耳毒性、前庭毒性和神经毒性副作用提供了新方法. 在病理生理状态下调节血管内皮的内环境是血管重塑和生成的关键, 阿霉素可启动人脐静脉内皮细胞 p53 的聚集, 诱导细胞的 CD95 表达和凋亡. PFT- α 可阻断启动子的激活、降低 CD95 蛋白表达水平, 减轻对血管内皮损伤有利于血管内膜修复^[5]. Liu *et al*^[6] 评价了 PFT- α 对阿霉素诱导心肌细胞凋亡和心功能损害的保护效应. 阿霉素上调 Bax 和 MDM2 mRNA 的表达水平, 通过 p53 在丝氨酸 15 的磷酸化水平提高而上调 p53 蛋白表达水平, 诱导心肌细胞凋亡导致阿霉素的心脏毒性、超微结构改变和心功能障碍. 在给予阿霉素前 30 min 和给药后 3 h 使用 PFT- α , 则心肌细胞 Bax 和 MDM2 mRNA 表达降低. 实验表明 PFT- α 可有效抑制阿霉素诱导的心肌细胞凋亡, 减轻阿霉素抗肿瘤治疗中对心脏的毒副作用. Bassi *et al*^[7] 运用 DNA 拓扑异构酶 II 抑制剂依托泊甙作用淋巴瘤细胞系: 野生型 p53 的 TK₆ 和变异 p53 的 WTK₁, 发现 WTK₁ 出现染色体畸变而 TK₆ 出现凋亡, 在运用 PFT- α 阻断 p53 后 TK₆ 细胞的凋亡明显减少, 通过暂时抑制 p53 降低依托泊甙诱导的正常细胞凋亡而起到保护作用, 这与 Vukicevic *et al*^[8] 报道基本一致. Javelaud *et al*^[9] 发现 PFT- α 可以减轻柔红霉素诱导的 HCT116p21^{WAF1-/-} 细胞的凋亡, PFT- α 抑制 p53 而使 Bcl-2 的表达升高, Bax 的表达降低, 恢复 Bax/Bcl-2 比率, 其作用与 p21^{WAF1} 反义寡核苷酸相似. 当哺乳类胚胎细胞的脱扑异构酶 II α 失活时导致胚胎发育停滞, 实验发现 PFT- α 抑制脱扑异构酶 II 抑制剂 ICRF-193 诱导胚胎细胞的凋亡且呈剂量依赖性, PFT- α 也可抑制羟基脲诱导的胚胎细胞凋亡而保护胚胎细胞^[10].

1.2 PFT- α 抑制 p53 依赖的肝细胞凋亡 Schafer *et al*^[11] 发现细菌内毒素诱导 p53 依赖的肝细胞凋亡, 导致肝组织损伤. 将 PFT- α 进行 Sprague-Dawley 鼠腹腔注射后, 可抑制 LPS 诱导的肝细胞凋亡, 减少白细胞的聚

集和微血管功能障碍. PFT- α 降低 p53 胞核与胞质表达比, 抑制 NF- κ B 的活性和 procaspase-3 的裂解. 认为 PFT- α 可减轻细菌内毒素导致的肝细胞损伤, 保护肝功能. Begum *et al*^[12]报道 PFT- α 显著降低重金属砷、镉对鼠肝细胞的毒性, 减少重金属诱导 p53 依赖的肝细胞凋亡, 使肝细胞对砷的耐受能力提高 46 倍, 对镉的耐受力提高 8 倍. 另外 PFT- α 可抑制多环芳香烃类致癌剂诱导的鼠肝脏上皮干细胞 WB-F334 的 DNA 合成和凋亡, 而发挥保护 WB-F334 的作用^[13].

1.3 PFT- α 对器官缺血再灌注损伤的保护效应 在近期的研究中发现 PFT- α 对心脏、肝、肾等器官的缺血再灌注损伤也具有保护作用, 缺血再灌注损伤常导致 p53 介导的凋亡发生. Mocanu *et al*^[14]在心脏缺血预处理前和再灌注时给予 PFT- α , 发现心脏的梗塞范围和程度均有减轻, 显著降低缺血再灌注对心脏的损伤, 有利于心功能的恢复. 在肝移植中由于缺血再灌注损伤而导致移植肝功能障碍是临床的难题之一, 肝功能障碍主要是肝细胞在缺血再灌注后发生凋亡. 实验发现在冷贮存和灌注液中加入 PFT- α 后, 其肝细胞的 caspase 活性降低, 细胞凋亡和坏死减少, 提高移植供肝的质量、维持肝脏的新陈代谢和完整性, 提高移植成功率^[15]. 肾脏缺血再灌注损伤的特点是谷氨酰转氨酶的耗竭和肾小管细胞发生坏死或凋亡, p53 是谷氨酰转氨酶耗竭诱导凋亡的关键. 运用鼠双侧肾动脉夹闭再灌注模型, 腹腔内注射 PFT- α 后发现, PFT- α 尽管使 p21^{WAF1} 下降, 但抑制了 p53 和 Bax 的表达, 减少细胞的凋亡从而保护肾功能, 仍能保护肾脏免受缺血再灌注损伤^[16]. 缺血性脑卒中可使脑细胞发生 p53 介导的凋亡, 在脑缺血损伤后给予 PFT- α 可抑制 p53 下游靶基因 p21^{WAF1} 的表达, 而逆转脑缺血性损伤, 减轻脑细胞的凋亡^[17].

1.4 PFT- α 对神经细胞凋亡的保护效应 研究发现 p53 在神经细胞凋亡中起重要作用, 并且与人类神经细胞退行性疾病的发生有关. 如海马和皮质神经变性导致 Alzheimer 病, 控制运动的多巴胺神经死亡导致 Parkinson 病. Culmsee *et al*^[18]发现 PFT- α 通过降低喜树碱诱导神经元的 p53 结合活性和 Bax 表达, 而完全抑制喜树碱诱导的神经元凋亡. 在依托泊甙处理神经元时加入 PFT- α 可明显减轻其对神经元的损伤, caspase-3 活性降低使神经元存活明显升高. 而且在大脑中动脉阻断前 1 h 腹腔内注射 PFT- α , 可减轻缺血导致的脑梗塞. Gilman *et al*^[19]也发现 PFT- α 可使野生性 p53 小鼠的神经元突触体免受氧化作用和兴奋毒性的损害, 可以使海马神经元在受到依托泊甙损伤后仍能维持前联合末端的功能. Duan *et al*^[20]运用 Parkinson 病小鼠腹腔内注射 PFT- α , 发现 PFT- α 明显改善小鼠的运动功能, 降低多巴胺及其代谢物耗竭, 减轻黑质纹状体神经元的损害, 认为 PFT- α 通过抑制 p53, 能够减轻多巴胺神经细胞的凋亡而保护其运动功能, 延迟或阻断 Parkinson 病神经元的退行性病变. Parkinson 病的另一主要病因是蛋白酶体

活性降低, 蛋白酶体抑制剂 MG132 作用于多巴胺能 SH-SY5Y 细胞后激活 p53, 使 Bax 表达升高, 使蛋白酶体抑制导致线粒体功能障碍, 诱导细胞凋亡. 运用 PFT- α 阻断 MG132, 可部分阻断线粒体的去极化, Bax 表达降低, 使 SH-SY5Y 细胞的凋亡减少^[21]. 淀粉样 β 肽诱发 Alzheimer 病, 淀粉样 β 肽诱导神经细胞凋亡主要通过线粒体调控途径如 p53, Bcl-2 等, PFT- α 可阻断 50-60% 的淀粉样 β 肽诱导神经细胞的凋亡^[22]. 当神经元 DNA 受到损害使 p53 激活, 而 NF- κ B 活性降低, 神经元发生凋亡, 研究表明在 DNA 损害诱导后 p53 与转录共因子 p300 的结合增强, 而 p300 与 NF- κ B 的结合活性降低. PFT- α 阻断 p53 和共因子的相互作用后, p300 与 NF- κ B 的结合活性增强. 在神经元中存在 p53 和 NF- κ B 与转录共因子 p300 之间相互作用的竞争平衡, 由于 PFT- α 阻断了 p53 介导的细胞凋亡, 同时使 NF- κ B 信号通路激活, PFT- α 以剂量依赖的方式减轻脑组织的损害, 解除缺血诱导的 NF- κ B 活性抑制, 而发挥神经元保护效应^[23].

2 PFT- α 在研究 p53 功能中的应用

Camphausen *et al*^[24]在研究放疗抗肿瘤的“远位效应”(abscopal effect)时, 运用 PFT- α 作用于野生型 p53 小鼠后进行照射, 不能观察到抗肿瘤的“远位效应”, 而未经 PFT- α 作用的小鼠则可观察到这种效应, 从而认识到 p53 在放疗诱导的“远位效应”中的作用. Pecere *et al*^[25]研究 p53 在芦荟大黄素杀伤神经外胚层肿瘤细胞作用时, 发现 PFT- α 抑制芦荟大黄素诱导 SJ-N-KP (野生型 p53) 细胞的凋亡, 而对 SK-N-BE(2c) 无影响. 在青霉胺诱导成纤维细胞 MSU1.0 细胞同时加入 PFT- α 作用 24 h 后, 随着 PFT- α 浓度升高, caspase 的活性逐渐降低, 其细胞凋亡明显减少, 表明青霉胺诱导的成纤维细胞的凋亡主要通过 p53 依赖途径^[26]. 钒酸盐诱导 C141 (野生型 p53) 细胞使细胞生长停滞, p21^{WAF1} 的表达升高. 运用 PFT- α 可抑制钒酸盐导致的细胞生长停滞, 减少细胞的凋亡. 通过运用 PFT- α 可以明确钒酸盐是通过 p53 依赖途径诱导 p21^{WAF1} 的表达而导致的细胞生长停滞^[27]. Perfettini *et al*^[28]报告包膜蛋白在诱导 HIV-1 的凋亡过程中 NF- κ B, p53 和 AP1 均被激活, PFT- α 可阻断 85% 的 HIV-1 包膜蛋白基因的转录效应, 显示 p53 在包膜蛋白诱导的凋亡过程起主要作用. Ostrakhovitch *et al*^[29]在研究铜锌离子诱导雌激素受体和 p53 不同状态的乳腺癌细胞凋亡和敏感性的作用机制时, 运用 PFT- α 分别作用与雌激素受体阳性和野生性 p53 的乳腺癌细胞 MCF7 及雌激素受体阴性和变异 p53 的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞, 发现 PFT- α 使铜锌离子诱导 MCF7 细胞的 AKt 磷酸化作用增强, 抑制 MCF7 细胞中 p53 在丝氨酸 15 的磷酸化及 p21^{WAF1} 的表达, 使铜锌离子诱导的 MCF7 凋亡减少, 证实金属离子诱导 MCF7 凋亡是 p53 依赖, 而 MDA-MB-231 由于 p53 功能缺失、

AKt 激活从而对金属离子产生耐受. Gorgoulis *et al*^[30]为了阐明 NF- κ B 和 p53 在应激损伤时细胞间粘连分子 ICAM-1 表达调控中的作用, 在 γ 射线照射人表皮成纤维细胞前给予 PFT- α , 发现 PFT- α 使放射诱导表皮成纤维细胞的 ICAM-1 和 p21^{WAF1} mRNA 表达下降, 表明 p53 直接参与 ICAM-1 的诱导表达, 并以 NF- κ B 依赖方式诱导 ICAM-1 的表达. Paitel *et al*^[31]在观察细胞癌病毒蛋白对稳定转染 TSM1 的神经元细胞死亡控制的影响. 通过运用 PFT- α 抑制 p53, 发现 TSM1 在转录后水平控制 p53, 并以 p53 依赖方式的介导 caspase-3 的激活, 调控神经元的凋亡过程. Inoue *et al*^[32]发现大鼠肝细胞再生过程中 p53 mRNA 表达升高, 并且启动 TGF- α . 运用 PFT- α 阻断 p53 后其作用如同 p53 反义寡核苷酸, 使肝细胞 DNA 合成受阻, TGF- α 表达水平下降. 因此肝细胞生长因子激活 p53 有利于大鼠肝细胞的增生. 另外 Vollmar *et al*^[33]在研究早期伤口愈合过程中发现在体内 PFT- α 抑制 p53, 可促进皮肤伤口的上皮形成和新血管形成、增加白细胞的聚集和减少细胞的凋亡, 而对后期伤口愈合无影响. 该研究一方面证实 p53 在伤口早期愈合中的作用, 同时发现暂时性抑制 p53 具有促进早期伤口愈合的作用.

总之, PFT- α 不但能够抑制 p53 依赖的凋亡, 而且成为研究 p53 功能的有效手段. 但应警惕 PFT- α 阻抑 p53 使凋亡减少, 存活的细胞可能发生基因修饰^[7], 影响 DNA 修复^[34], 并且 PFT- α 抑制凋亡存在细胞选择性^[35-37]. 新近报道认为 PFT- α 并非只能特异性抑制 p53, 可能抑制体内外萤火虫荧光素酶^[38], 还可能对热休克蛋白和糖皮质激素信号通路具有抑制作用^[39-40]. 因此对于 PFT- α 的认识有待进一步深入研究.

3 参考文献

- Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 1999;285:1733-1737
- Komarova EA, Gudkov AV. Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy. *Biochemistry (Moscow)* 2000;65:41-48
- Ferber D. A new way to combat therapy side effects. *Science* 1999;285:1651-1653
- Zhang M, Liu W, Ding D, Salvi R. Pifithrin- α suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience* 2003;120:191-205
- Lorenzo E, Ruiz-Ruiz C, Quesada AJ, Hernandez G, Rodriguez A, Lopez-Rivas A, Redondo JM. Doxorubicin induces apoptosis and CD95 gene expression in human primary endothelial cells through a p53-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2002;277:10883-10892
- Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CLC, Hamdy R, Chua BHL. Pifithrin- α protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:933-939
- Bassi L, Carloni M, Fonti E, Palma de la Pena N, Meschini R, Palitti F. Pifithrin-alpha, an inhibitor of p53, enhances the genetic instability induced by etoposide (VP16) in human lymphoblastoid cells treated in vitro. *Mutat Res* 2002;499:163-176
- Vukicevic V, Kampfinger K, Stopper H. Influence of altered apoptosis in human lymphoblastoid cell lines on micronucleus frequency. *Toxicol Lett* 2004;147:187-195
- Javelaud D, Besancon F. Inactivation of p21^{WAF1} sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14^{ARF} and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *J Biol Chem* 2002;277:37949-37954
- Akimitsu N, Kamura K, Tone S, Sakaguchi A, Kikuchi A, Hamamoto H, Sekimizu K. Induction of apoptosis by depletion of DNA topoisomerase IIalpha in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;307:301-307
- Schafer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B. Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. *FASEB J* 2003;17:660-667
- Begum RA, Farah IO, Ishaque AB. Pifithrin-alpha (PFT-alpha) caused differential protection of rat liver cells and HepG2 cell line in response to the selective cytotoxicity of arsenic and cadmium. *Biomed Sci Instrum* 2002;38:41-46
- Chramostova K, Vondracek J, Sindlerova L, Vojtesek B, Kozubik A, Machala M. Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196:136-148
- Mocanu MM, Yellon DM. p53 down-regulation: a new molecular mechanism involved in ischaemic preconditioning. *FEBS Lett* 2003;555:302-306
- El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B. Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-alpha-mediated inhibition of hepatocyte necrapoptosis. *Hepatology* 2004;39:1553-1562
- Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC. P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:128-138
- Leker RR, Aharonowiz M, Greig NH, Ovadia H. The role of p53-induced apoptosis in cerebral ischemia: effects of the p53 inhibitor pifithrin alpha. *Exp Neurol* 2004;187:478-486
- Culmsee C, Zhu X, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z, Greig NH, Mattson MP. A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 2001;77:220-228
- Gilman CP, Chan SL, Guo Z, Zhu X, Greig N, Mattson MP. p53 is present in synapses where it mediates mitochondrial dysfunction and synaptic degeneration in response to DNA damage, and oxidative and excitotoxic insults. *Neuromolecular Med* 2003;3:159-172
- Duan W, Zhu X, Ladenheim B, Yu QS, Guo Z, Oyler J, Cutler RG, Cadet JL, Greig NH, Mattson MP. p53 inhibitors preserve dopamine neurons and motor function in experimental parkinsonism. *Ann Neurol* 2002;52:597-606
- Nakaso K, Yoshimoto Y, Yano H, Takeshima T, Nakashima K. p53-mediated mitochondrial dysfunction by proteasome inhibition in dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2004;354:213-216
- Tamagno E, Parola M, Guglielmotto M, Santoro G, Bardini P, Marra L, Tabaton M, Danni O. Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2003;35:45-58
- Culmsee C, Siewe J, Junker V, Retiounskaia M, Schwarz S, Camandola S, El-Metainy S, Behnke H, Mattson MP, Krieglstein J. Reciprocal inhibition of p53 and nuclear factor-kappaB transcriptional activities determines cell survival or death in neurons. *J Neurosci* 2003;23:8586-8595
- Camphausen K, Moses MA, Menard C, Sproull M, Beecken WD, Folkman J, O'Reilly MS. Radiation abscopal antitumor effect is mediated through p53. *Cancer Res* 2003;63:1990-1993
- Pecere T, Sarinella F, Salata C, Gatto B, Bet A, Dalla Vecchia F, Diaspro A, Carli M, Palumbo M, Palu G. Involvement of p53 in specific anti-neuroectodermal tumor activity of aloe-emodin. *Int J Cancer* 2003;106:836-847
- Havre PA, O'Reilly S, McCormick JJ, Brash DE. Transformed and tumor-derived human cells exhibit preferential sensitivity to the thiol antioxidants, N-acetyl cysteine and penicillamine. *Cancer Res* 2002;62:1443-1449
- Zhang Z, Huang C, Li J, Shi X. Vanadate-induced cell growth

- arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells. *J Inorg Biochem* 2002;89:142-148
- 28 Perfettini JL, Roumier T, Castedo M, Larochette N, Boya P, Raynal B, Lazar V, Ciccocanti F, Nardacci R, Penninger J, Piacentini M, Kroemer G. NF-kappaB and p53 are the dominant apoptosis-inducing transcription factors elicited by the HIV-1 envelope. *J Exp Med* 2004;199:629-640
 - 29 Ostrakhovitch EA, Cherian MG. Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc. *Arch Biochem Biophys* 2004;423:351-361
 - 30 Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kletsas D, Mariatos G, Zoumpourlis V, Ryan KM, Kittas C, Papavassiliou AG. p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner. *EMBO J* 2003;22:1567-1578
 - 31 Paitel E, Fahraeus R, Checler F. Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. *J Biol Chem* 2003;278:10061-10066
 - 32 Inoue Y, Tomiya T, Yanase M, Arai M, Ikeda H, Tejima K, Ogata I, Kimura S, Omata M, Fujiwara K. p53 May positively regulate hepatocyte proliferation in rats. *Hepatology* 2002;36:336-344
 - 33 Vollmar B, El-Gibaly AM, Scheuer C, Strik MW, Bruch HP, Menger MD. Acceleration of cutaneous wound healing by transient p53 inhibition. *Lab Invest* 2002;82:1063-1071
 - 34 Lin Y, Waldman BC, Waldman AS. Suppression of high-fidelity double-strand break repair in mammalian chromosomes by pifithrin-alpha, a chemical inhibitor of p53. *DNA Repair (Amst)* 2003;2:1-11
 - 35 Proietti De Santis L, Balajee AS, Lorenti Garcia C, Pepe G, Worboys AM, Palitti F. Inhibition of p53, p21 and Bax by pifithrin-alpha does not affect UV induced apoptotic response in CS-B cells. *DNA Repair (Amst)* 2003;2:891-900
 - 36 Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem* 2004;279:25535-25543
 - 37 Bonini P, Cicconi S, Cardinale A, Vitale C, Serafino AL, Ciotti MT, Marlier LN. Oxidative stress induces p53-mediated apoptosis in glia: p53 transcription-independent way to die. *J Neurosci Res* 2004;75:83-95
 - 38 Rocha S, Campbell KJ, Roche KC, Perkins ND. The p53-inhibitor pifithrin-alpha inhibits firefly luciferase activity in vivo and in vitro. *BMC Mol Biol* 2003;4:9-16
 - 39 Komarova EA, Neznanov N, Komarov PG, Chernov MV, Wang K, Gudkov AV. p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 2003;278:15465-15468
 - 40 Murphy PJM, Galigniana MD, Morishima Y, Harrell JM, Kwok RPS, Ljungman M, Pratt WB. Pifithrin-alpha inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *J Biol Chem* 2004;279:30195-30201

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 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.

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、研究院所, 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%.

TNF- α 基因启动子单核苷酸多态性的功能意义

张佃良, 于宝军

张佃良, 青岛大学医学院附属医院普通外科 山东省青岛市 266003
于宝军, 南京军区南京总医院普通外科研究所 江苏省南京市 210002
项目负责人: 张佃良, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院
附属医院普通外科. phdzdl@yahoo.com
电话: 0532-2911324 传真: 0532-2911111
收稿日期: 2004-06-24 接受日期: 2004-07-27

摘要

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是主要的致炎细胞因子, 在许多炎症性疾病中起了非常重要的作用. 其基因启动子单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 在炎症性疾病中的作用一直是近几年来研究的热点, 有研究证实 TNF- α 基因启动子单核苷酸多态性 (SNP) 影响 TNF- α 的表达, 并且与某些炎症性疾病的发生或疾病的严重程度有关, 而有些报道却没有发现甚至得出相反的结论. 目前对于 TNF- α 基因启动子多态性的研究, 大多数集中于-308位点. 一般认为, -308G/A 多态性可能对转录产生影响, A 等位基因能够增强 TNF- α 的转录, 并且与疾病的严重程度或患者的预后相关联, 而G等位基因可能与低水平的TNF- α 表达有关. 其他位点的启动子SNPs研究的较少, 对TNF- α 转录水平的影响及与其疾病发生和严重程度关系还需要进一步探讨.

张佃良, 于宝军. TNF- α 基因启动子单核苷酸多态性的功能意义. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2454-2456
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2454.asp>

0 引言

在当今医学研究领域, 一个新的课题是探讨与疾病易感性有关的基因定位. 目前, 有不少基因多态性已经被证明与人类某些疾病的易感性或疾病的危重状态相关联^[1-6]. TNF- α 是主要由单核巨噬细胞和T淋巴细胞分泌的细胞因子, 在许多炎症性疾病中起了重要的作用^[7-9]. 已经有研究证实 TNF- α 基因启动子单核苷酸多态性 (SNP) 影响 TNF- α 的表达, 并且与某些炎症性疾病或疾病的严重程度有关, 而有些报道却没有发现甚至得出相反的结论.

1 TNF- α 基因启动子 SNP 影响 TNF- α 产生

TNF- α 基因长约 2 676 bp, 包含 4 个外显子和 3 个内含子, 位于 6 号染色体 p21 区域内, 包含于 HLA III 基因中. 由于 TNF- α 不是预先储存在细胞内而是在受到刺激时合成的, 因此, 基因启动子区域中的 SNP 具有重要的意义. 研究 TNF- α 基因启动子多态性对转录影响的

方法有 2 种: 一是利用细胞系作为靶细胞, 通过报告基因来评估多态性对转录功能的影响; 二是用人体内的单个细胞作为对象, 研究 TNF- α 基因启动子上的不同核型对 TNF- α 表达的影响.

目前对于 TNF- α 基因启动子多态性的研究, 大多数集中于 -308 位点. 用人体内的单个细胞作为对象, 通过比较 -308G 和 -308A 在 TNF- α 水平上的产生差异, 来研究 TNF-308 多态性的功能意义, 但其结论往往是相左的. 一般认为 TNF- α 基因启动子多态性影响 TNF- α 的产生, 但也有否定的结论. 仔细分析上述论文不难发现, 6 篇文章中的 5 篇观察到 -308G/A 杂合子产生的 TNF- α 比 -308G/G 纯合子产生的 TNF- α 量大, 其程度在 20-40% 之间^[10]. 根据统计学推论, 如果样本量足够大的话, 20-40% 的量的增高就可能带来统计学差异^[10]. 2 篇有否定结论的报道中, 有 6 个是 TNF-308G/A 杂合子^[11-12], 而在 2 篇有肯定结论的报道中有 12 个 G/A 杂合子^[13-14]. 值得注意的是, 上述研究所用的 LPS 刺激浓度有很大的差异: 在 1 ng 到 10 μ g 之间. 惟一的一篇没有报道 TNF- α 高表达的文章, 研究者是用高浓度的 LPS 来刺激外周血单核细胞的 (所用量是另外 5 篇文章所用量的 10 倍)^[15]. 如此高浓度的 LPS 刺激所引起的 TNF- α 高表达, 可能超过了 TNF-308 多态性本身所导致的 TNF- α 表达变化. 另外, 这 6 个研究的样本量都比较小, 在 6-16 个之间, 如此小的样本量在很大程度上可能影响结果的稳定性.

在 TNF- α 表达水平上 308G/A 和 -308G/G 的差异, 似乎不可能是 MHC 连锁不平衡造成的. 有研究报道, -308A 纯合子和 HLA-DR3 处于连锁不平衡状态时, 造成了 TNF- α 分泌的差异^[10]. 但也有人报道, 无论 HLA-DR3(+) 组还是 HLA-DR3(-) 组, -308G/A 杂合子个体 TNF- α 的分泌都是升高的^[16], 结果提示 HLA-DR3 本身不可能引起 -308G/A 杂合子 TNF- α 的高表达, 而与 HLA-DR3 有关的 TNF- α 高表达, 可能是由于和 -308A 纯合子连锁的原因.

用报告基因来研究 TNF- α 基因启动子多态性对转录的影响, 结论也是相互矛盾的. 1999 年 Allen 报道, 有 3 项独立的研究发现 -308G/A 影响 TNF- α 的转录, 而相继进行的另外 3 项研究却得出否定的结论. 在得出否定结论的研究中, 有 2 篇是用小鼠细胞系做研究对象, 而得出肯定结论的 3 项研究中, 无一项是用小鼠细胞系做研究对象的. 然而, Higuchi *et al* 在研究对象、研究方法等方面, 和得出肯定结论的研究完全相

同, 但是他们的研究却得出否定的结论^[17], 这提示细胞系不是造成结论不一致的惟一因素. 造成结论不一致的因素也许还出自扩增的基因启动子片段长度上.

对于 TNF- α 基因启动子上其他的 SNPs, 目前研究报道的很少, 得出的结论也极不一致^[17-18]. -237G/A 能够降低 TNF- α 的转录^[12], 而另外一个试验却没有观察到相同的结果. 然而这 2 个实验的检测条件不一致, 用的 LPS 浓度也不相同, 所以对他们进行比较缺乏说服力. 另一个较为常见的基因启动子区域中多态性是 -376, 如 -376G 变为 A, 则 TNF- α 表达显著升高, 但目前关于这个位点的研究报道很少. 关于启动子 SNP 对循环中 TNF- α 浓度的影响, 也有报道: -863A 可导致低水平的外周血浆 TNF- α 浓度^[10]. 用基因报告来研究 TNF- α 基因启动子其他部位的 SNPs, 得出结论也不尽相同. 1998 年, 有 2 个不同的研究均发现 -375G/A、-237SNP、-575SNP 均对 TNF- α 的转录没有影响, 但在 -875 和 -863SNP 对 TNF- α 的转录的影响上, 得出结论是相矛盾的^[17]. 可能的原因之一是, 如果这些 SNP 是通过修饰 DNA 结构来发挥作用的话, 那么基因报告在检测中的作用就大打折扣.

由此可见, -308G/A 多态性可能对转录产生影响, A 等位基因能够增强 TNF- α 的转录, 而别的 SNPs 对转录的影响还需要进一步探讨. 但是, 目前尚未解决的问题是: -308G/A 多态性对转录的影响达到什么程度才能产生相关的生物学活性改变呢? 也许局部 TNF- α 的浓度有 5% 的差异就足够了, 这种差异就能在关键时刻改变机体的免疫反应. 有证据表明, TNF- α 通过正反馈来增加他的分泌^[11]. 因此, 在不同个体内较小 TNF- α 浓度的差异, 就可能通过自身放大效应来影响各自最终炎性反应的结果. 基于这个现象, 有理由认为, 启动子多态性必须对转录产生大的影响才能导致机体免疫反应改变的观点是不正确的.

2 TNF- α 基因启动子多态性影响疾病的发生

评价 TNF- α 基因启动子多态性是否有功能意义的另一个指标是观察他是否影响疾病的发生率或严重程度. 这很难分析, 因为启动子部分的 SNPs 靠近 MHC, 他们处于连锁不平衡状态, 而后者对某些疾病有重要的影响. 同样困难的是, 疾病的易感性或严重性仅仅用一个 SNP 来判断似乎是不够的. 实际上, 在极其复杂的生物体内, 一个基因多态性对细胞因子的影响很有可能被其他的因素所掩盖^[19-20]. 因此, 如果一个基因多态性不能对某疾病的易感性产生影响, 我们也不能得出这个多态性与这个疾病易感性无关的结论.

目前研究最多的是 TNF-308 多态性, 不少研究发现 TNF-308 多态性与大多数自身免疫性疾病的易感性无关, 但与某些感染性疾病的严重程度有关. 1994/1997 年之间, 人们相继发现 TNF-308 多态性可影响脑性疟疾的易感性, 影响脑膜炎的严重程度, 并与结节

性麻风病的进展程度有关. 也有研究报道, 利什曼原虫或衣原体感染性疾病也与 TNF-308G/A 有关. 并且, 研究发现 TNF-308 多态性与感染性疾病的关系不是由于 TNF- α 和 MHC 的连锁不平衡性造成的^[21]. 对非洲人群研究表明, -308 和 -376 基因多态性均可作为预测脑性疟疾患者危重状态的独立因素; 在严重的中枢性后遗症或死亡率方面进行比较发现, -308A 纯合子患者的发生率是 -308G 纯合子的 7 倍^[22]. Mira *et al* 对一组严重感染患者研究发现, -308A 在严重脓毒症组出现的频率为 39%, 在正常对照组只有 18% ($P < 0.01$). -308A 和脓毒症休克的易感性密切相关, 并且 -308A 患者的死亡率是 -308G 患者的 3.7 倍 (95% CI, 1.37-10.24)^[23]. 在对外科手术后出现感染的患者研究中发现, -308A 患者和 -308G 患者在严重脓毒症发生率上无明显差异, 前者也并不比后者有更高的死亡率; 但在脓毒症出现后, -308G/A 患者的死亡率比 -308A 纯合子患者明显增高 (92% vs 62%, $P < 0.05$)^[24]. 但另一个报道也令人关注: Stuber *et al* 的报道 -308G/A SNP 与外科手术后严重脓毒症患者的预后没有任何关系^[25]. 为什么出现这样矛盾的现象呢? 研究人群不同, 核型的检测准确程度不同可能是其中的原因. 通过对我国汉族人的研究, 我们发现: -308G/A 重症胰腺炎患者的重度脓毒症或脓毒性休克的发生率远比 -308G/G 患者高, 死亡率也有显著的差别^[26-30]. 因此一般认为, TNF-308 多态性可能与大多数自身免疫性疾病的易感性无关, 但可影响感染性疾病的严重程度.

对于 -806SNP, 有人研究发现他和血浆中低水平的 TNF 浓度有关, 但与疾病的易感性等方面的报道较少. -237G/A 多态性可能与自身免疫性疾病有关, 也有人发现他和某些感染性疾病有联系. 而 -376A, Mira *et al*^[23] 在研究中发现, 他仅在死亡患者中才能被检测到. TNF 启动子区域中其他的 SNPs 与疾病易感性及严重程度之间的关系, 目前研究的还较少.

3 讨论

总之, 对功能性基因多态性的寻找是当今医学的崭新的课题, 近几年来得到了迅猛发展. TNF 基因启动子区域上的多态性可能有更重要的生物学功能, 能够在转录水平上对细胞因子的产生发挥作用, 并影响到疾病的易感性、疾病的严重程度甚至患者的预后. 对人类基因组多态性的研究, 将使我们达到完整意义上的个体化治疗. 他使我们明白为什么有些患者会出现脓毒症, 为什么另一些患者不会出现脓毒症, 甚至使我们了解, 为什么有些脓症患者死亡而另一些患者能够治愈. 通过对基因多态性与细胞因子浓度的关系的深入了解, 将有可能改变我们治疗脓毒症的策略. 对基因决定的高浓度 TNF- α 进行检测, 我们来筛选哪些患者可能对给予抗 TNF- α 治疗有益. 另一方面, 对于那些低浓度的 TNF- α 脓症患者, 给予免疫抑制剂如糖皮质激素治疗可能是无益甚至有害的.

4 参考文献

- 1 Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: Role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 2003;124:1103-1115
- 2 Keen LJ. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transpl Immunol* 2002;10:143-146
- 3 Stuber F. Effects of genomic polymorphisms on the course of sepsis: Is there a concept for gene therapy? *J Am Soc Nephrol* 2001;12(Suppl 17):S60-64
- 4 Andreotti F, Porto I, Crea F, Maseri A. Inflammatory gene polymorphisms and ischaemic heart disease: review of population association studies. *Heart* 2002;87:107-112
- 5 Csaszar A, Abel T. Receptor polymorphisms and diseases. *Eur J Pharmacol* 2001;414:9-22
- 6 Kwok PY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today* 1999;5: 538-543
- 7 陈剑群, 许统俭, 安侠, 王营, 陈玉林. 胃癌患者血清 TNF- α 的水平及意义. 世界华人消化杂志 2003;11:668-669
- 8 宋红丽, 吕斌, 马力, 李颖, 刘沛. TNF- α 影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004;12:1303-1306
- 9 杨生, 岳桂英. 2型糖尿病合并脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- α 水平增高与胰岛素抵抗指数相关分析. 世界华人消化杂志 2004; 12:1485-1487
- 10 Allen RD. Polymorphism of the human TNF- α promoter-random variation or functional diversity? *Mol Immunol* 1999; 36: 1017-1027
- 11 Danis VA, Millington M, Hyland V, Lawford R, Huang Q, Grennan D. Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Dis Markers* 1994;12:127-133
- 12 Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, Garcia-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Pena AS. TNF- α promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 1997;72:149-153
- 13 Braun N, Michel U, Ernst BP, Metzner R, Bitsch A, Weber F, Rieckmann P. Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor- α (TNF- α) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF- α production. *Neurosci Lett* 1996;215:75-78
- 14 Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences aTNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998;113:401-406
- 15 Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M, Buenafe AC, Szymanska B, Tronczynska E, Plucienniczak A, Selmaj K. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. *J Neuroimmunol* 1998; 84:198-206
- 16 Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SG, Pena AS. Secretion of tumour necrosis factor α and lymphotoxin- α in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996;43:456-463
- 17 Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, Itoh K. Polymorphism of the 5'-fanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)- α gene in Japanese. *Tissue Antigens* 1998;51:605-612
- 18 Kaijzel EL, van Krugten MV, Brinkman BM, Huizinga TW, van der Straaten T, Hazes JM, Ziegler-Heitbrock HW, Nedospasov SA, Breedveld FC, Verweij CL. Functional analysis of a human tumor necrosis factor α (TNF- α) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 1998;4:724-733
- 19 Zhang DL, Li JS, Jiang ZW, Yu BJ, Tang XM, Zheng HM. Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor genewith acute biliary pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9:824-828
- 20 Powell JJ, Fearon KC, Siriwardena AK, Ross JA. Evidence against a role for polymorphisms at tumor necrosis factor interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist gene loci in the regulation of disease severity in acute pancreatitis. *Surgery* 2001;129:633-640
- 21 Conway DJ, Holland MJ, Bailey RL, Campbell AE, Mahdi OS, Jennings R, Mbena E, Mabey DC. Scarring trachoma is associated with polymorphism in the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene promoter and with elevated TNF- α levels in tear fluid. *Infect Immun* 1997;65:1003-1006
- 22 Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 1999;22:145-150
- 23 Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999; 282:561-568
- 24 Tang GJ, Huang SL, Yien HW, Chen WS, Chi CW, Wu CW, Lui WY, Chiu JH, Lee TY. Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection. *Crit Care Med* 2002;28:2733-2736
- 25 Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- α concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996;24:381-384
- 26 Zhang D, Li J, Jiang ZW, Yu B, Tang X. Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor gene with acute severe pancreatitis. *J Surg Res* 2003;112:138-143
- 27 Dianliang Z, Jieshou L, Zhiwei J, Baojun Y. Association of plasma levels of tumor necrosis factor (tnf)-alpha and its soluble receptors, two polymorphisms of the TNF gene, with acute severe pancreatitis and early septic shock due to it. *Pancreas* 2003;26:339-343
- 28 张佃良, 黎介寿, 江志伟, 于宝军, 唐星明. TNF- α 基因多态性在重症急性胰腺炎中的意义. 中华医学杂志 2002;82:1529-1531
- 29 张佃良, 江志伟, 于宝军, 黎介寿. 肿瘤坏死因子基因启动子多态性与重症急性胆源性胰腺炎及其脓毒症休克的关系. 中国急救医学 2003;23:694-696
- 30 Zhang D, Li J, Jiang Z, Yu B, Tang X, Li W. The relationship between tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms and acute severe pancreatitis. *Chin Med J (Engl)* 2003;116: 1779-1781

对幽门螺杆菌若干问题共识意见

张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 徐智民, 成 虹

张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 徐智民, 成虹, 中华医学会消化病学分会 北京市 100710
项目负责人: 胡伏莲, 100034, 北京市西什库大街8号, 北京大学第一医院消化内科. hufu@263.net
电话: 010-66551122 传真: 010-66518195
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-06-09

摘要

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*或*Hp*)与上胃肠道疾病关系密切而复杂, 对许多问题尚未达到共识. 由于对*Hp*感染的处理还存在不少争议或分歧, 所以全国*Hp*学组成员及有关专家50余名于2003年10月在安徽桐城开会, 就*Hp*若干问题进行了探讨并达成共识, 共识意见包括: *Hp*感染及相关疾病; *Hp*感染的诊断; *Hp*感染的治疗及如何避免*Hp*耐药菌株的产生. 为了便于全国的临床医务工作者更好的了解或实施, 现将共识有关内容介绍如下.

张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 徐智民, 成虹. 对幽门螺杆菌若干问题共识意见. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2457-2458
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2457.asp>

0 引言

1999年海南会议提出并经全国消化大会确认的“我国对幽门螺杆菌若干问题的共识意见”^[1]于2000年发表至今已3 a. 3 a来, 对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*或*Hp*)的一些重要问题又有了新的认识, 2000年欧洲Maastricht-2共识报告具有重要的指导意义, 2002年第三届全国*Hp*会议上广泛听取了大家对“共识”的意见, 又经2003年安徽桐城中华全国*Hp*共识会议(简称桐城会议)审核修订, 现提出新的*Hp*共识意见, 以便在推广应用充实和完善.

1 *Hp*感染及其相关疾病

流行病学调查证实*Hp*在有些国家或地区的人群中, 感染率仍很高. 胃是*Hp*在人体内定植的主要部位, 我国不同地区、不同民族人群胃内*Hp*检出率在30-80%之间, 有很大差别.

*Hp*是慢性胃炎和消化性溃疡(PU)的重要致病因子. *Hp*与胃癌的发生有关: (1) *Hp*可增加胃癌发生的危险性. (2) *Hp*根除后可阻断或延缓萎缩性胃炎和肠化的进一步发展, 但是否能使两种病变逆转尚需进一步研究. (3) *Hp*根除后可降低早期胃癌术后的复发率. (4) 在亚太地区如日本、韩国和中国, 绝大多数*Hp*菌株均为cagA阳性菌株, 其在消化性溃疡、胃癌和慢性胃炎中的阳性率无显著差异, 这与西方国家不同. 单一cagA毒力基

因与胃癌发生缺乏相关性; 目前尚未发现明确与胃癌发生相关的*Hp*毒力基因. (5) 胃癌的发生是一个多步骤过程, 从慢性胃炎经过萎缩、肠化生和不典型增生, 最后到胃癌. 胃癌的发生是*Hp*感染、宿主因素和环境因素共同作用的结果. 宿主因素研究中发现, 宿主白介素-1 β 等基因多态性和*Hp*感染后的胃酸状态与胃癌发生危险性相关.

*Hp*是胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤重要的致病因素, *Hp*感染是MALT淋巴瘤产生的原因, 胃MALT淋巴瘤在*Hp*高发区常见、多发. 根除*Hp*可以治愈早期胃MALT淋巴瘤, 染色体分析提示胃MALT淋巴瘤的发生可能具有遗传性.

*Hp*与非甾体类抗炎药(NSAID)是消化性溃疡发生的两个重要独立危险因素, 单纯根除*Hp*不足以预防NSAID溃疡, 初次使用NSAID前根除*Hp*可降低NSAID溃疡的发生率, 使用NSAID过程中根除*Hp*不能加速NSAID溃疡的愈合.

*Hp*与胃食管反流性疾病(GERD)的关系尚无肯定结论. 对常规治疗效果不好者可考虑根除*Hp*治疗. 根除*Hp*与多数GERD发生无关, 一般不加重已存在的GERD. 研究表明, 胃窦为主的*Hp*相关性胃炎患者胃酸分泌增加或无变化, 但胃体为主的*Hp*相关性胃炎胃酸分泌减少. 根除*Hp*后胃酸可恢复正常, 胃黏膜炎症消退. 胃体为主的*Hp*相关性胃炎根除*Hp*治疗后, 发生GERD的危险性可能会增加, 但该型胃炎所占比例很小. *Hp*阳性GERD患者长期服用质子泵抑制剂(PPI)可能会诱发或加重胃体胃黏膜萎缩, 从而可能增加胃癌发生的危险性. 因而对GERD患者可予根除*Hp*治疗.

*Hp*感染和功能性消化不良(FD)的关系仍未明确. 有活动性*Hp*感染的FD患者胃黏膜组织学检查几乎均有不同程度的慢性活动性胃炎, 根除*Hp*可使绝大多数患者胃黏膜炎症消退, 并降低胃癌前期病变发展成胃癌的危险性. 但仅能使少部分患者的消化不良症状得到缓解. 个别报道显示, 胃黏膜炎症程度重或溃疡型FD根除*Hp*后症状缓解率较高. 根除*Hp*的效益与费用相比显然利大于弊.

2 *Hp*感染的诊断

*Hp*感染诊断标准原则上要求可靠、简单, 以便于实施和推广.

2.1 诊断方法 (表1).

2.2 诊断标准 临床诊断: 任一项现症感染诊断方法阳性可诊断为*Hp*阳性; 科研诊断: 细菌培养阳性或其他

任两项阳性. 单独血清学检查可用于大样本的流行病学调查.

2.3 根除 *Hp* 疗效判断 用于明确是否根除时, 建议选用非侵入性尿素呼气试验、粪便抗原检查或内镜下快速尿素酶试验, 复查应在 *Hp* 根除治疗结束至少 4 wk 后进行. 内镜下活检最好同时取胃窦、胃体黏膜各一块.

表 1 常用 *Hp* 检测方法的敏感性及其特异性对比

检测项目	敏感性(%) ¹	特异性(%) ¹
现症感染的诊断方法		
细菌培养	70-92	100
组织学检查(Warthin-Starry 银染或改良 Giemsa 染色)	93-99	95-99
尿素呼气试验 ²	90-98.9	89-99
快速尿素酶试验 ²	75-98	70-98
粪便抗原检测	89-96	87-94
曾经感染的诊断方法		
血清 <i>Hp</i> 抗体	88-99	86-99

¹ 部分文献资料报告的结果, 临床中可因技术方法不同有很大差异; ² 二者均为尿素酶依赖性试验.

3 *Hp* 感染的治疗

Hp 感染的治疗首先需确定根除治疗的适应证, 实施根除治疗时, 应选择根除率高的治疗方案, 以免引起全国范围 *Hp* 及其他细菌对抗生素的普遍耐药性.

3.1 *Hp* 感染治疗适应证 (表 2)

3.2 *Hp* 根除推荐的治疗方案 一线方案: (1) PPI/RBC(标准剂量)+A (1.0)+C (0.5), Bid × 7 d; (2) PPI/RBC(标准剂量)+M (0.4)+ C (0.5), Bid × 7 d; (3) PPI/RBC(标准剂量)+ A(1.0)+ F (0.1)/M(0.4), Bid × 7d; (4) B(标准剂量)+ F(0.1)/M (0.4)+C (0.5), Bid × 7 d; (5) B(标准剂量)+ M (0.4)+ T (0.75-1.0), Bid × 14 d; (6) B(标准剂量)+ M (0.4)+ A (0.5) Bid × 14 d. 代号说明: PPI (质子泵抑制剂): 目前有埃索米拉唑 (E) 20 mg、雷贝拉唑(R)10 mg、兰索拉唑(L)30 mg、奥美拉唑(O)20 mg; RBC(枸橼酸铋雷尼替丁)350 mg; A 阿莫西林; C 克拉霉素; M 甲硝唑; T 四环素; B 铋剂(枸橼酸铋钾、果胶铋等); F 呋喃唑酮. 也可以 H₂ 受体阻断剂(H₂RA)替代 PPI(如: 西米替丁 400 mg、

雷尼替丁 150 mg、法莫替丁 20 mg). 但根除率可能会有所降低. 二线方案: (1) PPI(标准剂量)+B(标准剂量)+M(0.4 Tid)+T(0.75-1.0), Bid × 7-14 d; (2) PPI(标准剂量)+B(标准剂量)+F(0.1)+T(0.75-1.0), Bid × 7-14 d.

表 2 *Hp* 感染治疗适应证

<i>Hp</i> 阳性的下列疾病	必须	支持	不明确
消化性溃疡 ¹	v		
早期胃癌术后	v		
胃 MALT 淋巴瘤	v		
明显异常的慢性胃炎 ²	v		
计划使用 NSAIDs		v	
部分 FD ³		v	
GERD ³		v	
胃癌家族史		v	
个人强烈要求治疗者			v
胃肠道外疾病			v

¹PU: 无论活动或非活动, 无论有无并发症. ² 明显异常: 指合并糜烂, 中 - 重度萎缩, 中 - 重度肠化生, 轻 - 中度不典型增生. 重度不典型增生应考虑癌变. ³FD 和 GERD 应根除 *Hp* 的理由如前所述.

3.3 如何避免耐药株的产生 (1) 严格掌握 *Hp* 根除的适应证, 选用正规、有效的治疗方案. (2) 联合用药, 避免使用单一抗生素或抗菌药. (3) 加强基层医生对 *Hp* 治疗知识的普及与更新. (4) 对根除治疗失败的患者, 有条件的单位再次治疗前先做药物敏感试验, 避免使用对 *Hp* 耐药的抗菌药. (5) 不断开发治疗 *Hp* 的新药, 包括中西医结合治疗. (6) 由于 *Hp* 的耐药性, PPI 三联方案必要时可以使用 2 wk. (7) 对一线治疗失败者, 改用补救疗法时, 尽量避免使用硝基咪唑类药物, 应改用其他药物, 如呋喃唑酮、胃内滞留型庆大霉素缓释片等. (8) 努力研究开发 *Hp* 疫苗, 让 *Hp* 感染的免疫防治成为现实^[2].

4 参考文献

- 中华医学会消化病学分会. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. 中华消化杂志 2000;20:117-118
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. European *Helicobacter pylori* Study Group (EHpSG). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht 2-2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther 2002;16:167-180

乙型肝炎患者外周血单个核细胞分泌 IFN- γ 的实验研究

徐新前, 段永强, 何昭新, 吴继权

徐新前, 段永强, 何昭新, 吴继权, 黄石市第一医院内科
湖北省黄石市 435001
项目负责人: 徐新前, 435001, 湖北省黄石市西塞山区医院街 293 号, 黄石市第一医院内科
收稿日期: 2004-05-27 接受日期: 2004-07-22

摘要

目的: 探讨外周血单个核细胞(PBMC)分泌 γ 干扰素(IFN- γ)水平在慢性乙型肝炎发生、发展中的意义。

方法: 采用ELISA法测定20名正常人和44例HBV感染者的PBMC经植物血凝素(PHA)刺激前后IFN- γ 在上清液中的表达水平。

结果: 正常及患者组PBMC上清液中IFN- γ 有低水平的活性表达; 经PHA刺激后其活性明显升高(对照组 23.7 ± 12.7 升高至 117.2 ± 64.7 pg/mL, $n=20$, $t=10.41$, $P<0.01$; 轻度组 24.6 ± 9.3 升高至 57.4 ± 27.1 pg/mL, $n=21$, $t=4.92$, $P<0.01$; 中度组 30.1 ± 15.5 升高至 81.6 ± 42.2 pg/mL, $n=15$, $t=4.45$, $P<0.01$; 重度组 35.6 ± 17.9 升高至 114.5 ± 49.3 pg/mL, $n=8$, $t=4.26$, $P<0.01$), 但患者组IFN- γ 水平显著低于正常对照组(177.2 ± 64.7 vs 57.4 ± 29.1 、 81.6 ± 42.2 、 114.5 ± 49.3 pg/mL, t 值分别为7.50、5.28和2.77, $P<0.01$); 患者组IFN- γ 与血清HBV-DNA水平呈明显负相关($r=-0.49$, $P<0.01$)。

结论: 乙型肝炎慢性化以及高复制状态可能与PBMC分泌IFN- γ 活性降低有关。

徐新前, 段永强, 何昭新, 吴继权. 乙型肝炎患者外周血单个核细胞分泌IFN- γ 的实验研究. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2459-2461
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2459.asp>

0 引言

原始辅助性T细胞(Th0)根据其分泌细胞因子的功能不同, 可分为I型辅助性T细胞(Th1)和II型辅助T细胞(Th2). Th1分泌 γ -干扰素(IFN- γ)为主并介导细胞免疫, 而Th2以分泌白介素4(IL-4)等细胞因子并介导体液免疫. IL-18能够刺激Th1细胞产生IFN- γ ^[1], 促进Th1增生及Fas介导的NK细胞的细胞毒作用^[2]. 检测IFN- γ 活性水平, 可以反映Th1细胞和细胞因子IL-18的功能以及抗病毒作用^[3]. 为研究IFN- γ 在慢性乙型肝炎发生、发展中的意义, 我们检测外周血单个核细胞(PBMC)分泌IFN- γ 的水平及其诱生活性。

1 材料和方法

1.1 材料 正常对照组20例, 年龄20-51岁, HBV-M阴性. 慢性乙型肝炎患者44例(诊断符合1995年第五次全国传染病寄生虫病学术会议制定的诊断标准), 年

龄20-55岁, 其中轻度组21例, 中度组15例, 重度组8例. HBsAg、HBeAg和抗-HBc阳性, HbsAg、抗-HBe和抗-HBc阳性, HBsAg和抗-HBc阳性. ALT为40-800 U/L. 实验仪器有西安二六二厂的FJ-2021型 γ -计数器, 上海精密仪器公司的722s型分光光度器, 北京普朗公司的DNM-9602型酶标仪, 珠海黑马公司的Hema 800型扩增仪, 法国ABX Micros型全自动血球分析仪等。

1.2 方法 无菌采取静脉血10 mL, 其中4 mL分离血清, 6 mL肝素抗凝. 抗凝血用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂产品)常规分离PBMC, PBMC用pH7.4 PBS洗涤细胞2次, 细胞计数后用于实验. 加入2 mL RPMI 1640培养液, 加入约2 mL PBS调整细胞密度为 $10^6/L$. 一组为PBMC悬液; 另一组为PBMC+植物血凝素(PHA, 上海伊华医学科技公司产品), PHA终浓度30 $\mu g/mL$. 两组置于37 $^{\circ}C$, 50 ml/L CO₂恒温箱培养48 h, 离心后取上清液置于-20 $^{\circ}C$ 备用. 用双抗体夹心ELISA法测定IFN- γ (试剂为上海森雄公司进口分装产品), 严格按说明书操作. 血清用PCR-ELISA技术定量检测乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV-DNA), 试剂为广州蓝星公司产品. 数据以mean \pm SD表示, 采用配对 t 检验。

2 结果

正常及患者组PBMC上清液中IFN- γ 有低水平的活性表达, 经PHA刺激后其活性明显升高($P<0.01$); 正常及患者组PBMC经PHA刺激后, 患者组IFN- γ 水平显著低于正常对照组($P<0.01$, 表1). 慢性乙型肝炎患者组PBMC经PHA刺激后, IFN- γ 表达水平与血清HBV-DNA水平呈明显负相关($r=-0.49$, $P<0.01$).

表1 慢性乙型肝炎患者PBMC分泌和IFN- γ 活性

分组	<i>n</i>	PBMC	PBMC+PHA
对照组	20	23.7 ± 12.7	177.2 ± 64.7^b
轻度组	21	24.6 ± 9.3	57.4 ± 29.1^{bd}
中度组	15	30.1 ± 15.5	81.6 ± 42.2^{bd}
重度组	8	35.6 ± 17.9	114.5 ± 49.3^{bd}

^b $P<0.01$ vs PBMC组比较; ^d $P<0.01$ vs 对照组比较。

3 讨论

ELISA法检测IFN- γ 简单、实用、快捷、灵敏. PHA激活PBMC成功获得IFN- γ 的活性表达. 实验的关键是分离PBMC和选择刺激物的浓度. 用淋巴细胞分离液所获的PBMC, 但以淋巴细胞为主, 有T淋巴细胞、B

淋巴细胞、单核细胞、K细胞和NK细胞等。

免疫功能紊乱是慢性乙型肝炎的主要发病机制,其主要表现有CD₄细胞减少,CD₈细胞增高,CD₄/CD₈比值降低;Th₁和Th₂免疫应答失衡;淋巴细胞凋亡增加等。由于免疫功能受损,使乙型肝炎患者不能清除HBV易成为慢性感染。Th₁细胞分泌的IFN- γ 能在转录后水平抑制肝炎病毒,又能通过免疫调节来增强机体防御能力^[4]。Xing *et al*^[5]应用ELISA和RT-PCR方法研究Th₁和Th₂表达与IFN- γ 治疗作用之间关系时,发现乙肝患者PBMC上清液中的IFN- γ 水平比正常人稍低,而在应用IFN- γ 治疗后,IFN- γ 水平稍升高,与治疗前相比,IFN- γ 水平在治疗24 wk后明显升高。因此,Th₂细胞因子表达在慢性乙肝患者中占优势,IFN- γ 能够调节Th₁和Th₂之间的平衡,因而与临床效应有关,而Th₁和Th₂水平可能是预测干扰素治疗期间临床反应的重要因素。Th₁细胞分泌IFN- γ 的功能,是通过IL-18, IL-12等的调节,促进Th₁细胞应答,维持Th₁, Th₂细胞平衡,促进IFN- γ 的表达与合成。否则导致Th₂细胞占优势而抑制细胞免疫,并导致HBV的持续感染^[6]。Jiang *et al*^[7]也发现Th₁细胞不仅随着肝炎活动性增强而显著升高,而且在慢性乙肝活动期也明显升高。因此,Th₁细胞就与慢性乙肝的肝炎活动性呈正相关,而Th₂细胞则与乙肝病毒感染慢性化有关。

HBV感染的清除需要活性T辅助细胞和T淋巴细胞反应的参与。Manigold *et al*^[8]应用ELISA和RT-PCR方法测定急性和慢性乙型肝炎及健康人PBMC中HbcAg介导的IL-18产物的调节时,发现血清IFN- γ 水平与慢性乙型肝炎患者病毒血症呈反相关。

树突细胞是最有效的抗原传递细胞,而在诱发抗病毒免疫反应中起重要作用。Beckebaum *et al*^[9]应用体外繁殖和用HBV颗粒接种方法,探讨Mo-DC功能障碍机制时,发现HBV感染会遭致T辅助细胞I型反应减少,同时,由T细胞产生的IFN- γ 水平亦明显降低,因此引起乙肝病毒逃避免疫治疗,从而导致乙型肝炎出现慢性化。自体树突细胞刺激能力不足可能是T细胞能力降低的原因,也因此导致乙型肝炎病毒感染患者慢性化。Lohr *et al*^[10]的研究也发现,T细胞刺激能力不足会导致慢性乙型肝炎患者抗病毒免疫能力减弱,而IL-12免疫刺激可保存HBV抗原物异性T细胞反应,在对克服HBV慢性化的治疗上有益。

Hodgson *et al*^[11]研究发现急性病毒性肝炎恢复后的患者,其IFN- γ 水平可能会升高,而且,肝脏中这样的IFN- γ 水平升高可能会持续多年,因此,他们认为抗病毒因子,特别是IFN- γ 可能在肝脏中的潜伏性肝DNA病毒的长期控制治疗上起着重要作用。

HBV慢性化会导致潜在的破坏性极大的严重后果,而且,这种慢性化乙肝治疗起来难度极大。但应用干扰素,特别是IFN- γ 治疗可能会有所效果。但是,为了保持肝脏中干扰素水平达到治疗效果,又常会引起严重

的不良反应,而应用基因治疗则可能会解决此问题。Matskevich *et al*^[12]通过基因转染方法,将HBV全部基因组转染至肝细胞模拟成HBV感染时,发现IFN表达被激活,同时分泌和产生IFNs,从而保护肝细胞免受HBV的感染。而且,他还能保护周围未受转染的肝细胞免受HBV的感染。因此,应用基因载体表达的IFN治疗慢性乙型肝炎,可能是预防乙型肝炎慢性化的一个非常有吸引力的治疗选择。

由于IL-12可通过T细胞和NK细胞诱发产生并激活IFN- γ 在抗肿瘤免疫反应中起重要作用,因此,Imanishi *et al*^[13]在研究肝细胞癌、肝硬化、慢性肝炎及健康人PBMC中由IL-12诱发产生的IFN- γ 水平活性时,发现肝细胞癌患者IFN- γ 水平活性明显低于肝癌的癌前病变-肝硬化患者以及慢性肝炎患者的IFN- γ 水平。因此,他们认为测定IFN- γ 水平有利于从免疫学角度上评价慢性肝脏疾病的严重性。Watson *et al*^[14]也发现丙型肝炎患者PBMC中IFN- γ 水平活性是其疾病严重性的一个有效判别因子。因此,研究HBV感染者IFN- γ 的诱生活性,有助于了解机体的免疫状态,对治疗有一定的指导意义。我们所用的PHA终浓度能激活PBMC分泌IFN- γ 到一个较高水平。而且,我们观察到正常人和慢性乙型肝炎患者PBMC均有低水平的IFN- γ 活性表达,被PHA激活后IFN- γ 的表达水平显著升高,但慢性乙型肝炎患者的IFN- γ 水平显著低于对照组。轻度患者的IFN- γ 表达水平最低,这类患者临床症状较轻,肝功能损害不明显,对HBV感染呈现免疫耐受,可能与HBV的持续感染有关。重度患者的IFN- γ 表达水平最高,这类患者临床症状较重,肝功能损害明显,对HBV感染有强烈的免疫反应,可能与HBV的免疫清除有关^[3,15]。

总之,IFN- γ 的活性水平降低可能是乙型肝炎慢性化的机制之一,了解IFN- γ 在慢性乙型肝炎病毒感染不同阶段的水平变化有助于了解和观察病情演变及预后,评价慢性肝脏疾病的严重性,并为进一步探讨IFN- γ 的抗病毒作用及研究开发慢性乙型肝炎的基因治疗等新的途径和方法提供重要的理论依据。

4 参考文献

- 1 孙颖,陈焕永,王菲,张新,姜宏齐,邵凤娟,朱思和.白细胞介素-18对慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞的作用及意义.中华肝脏病杂志 2003;11:470-473
- 2 Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, Okamura H, Nakanishi K. IL-12 synergizes with IL-18 of IL-1 β for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunol* 2000;12:151-160
- 3 Duan YQ, He SX, Xu XQ, Yu H, Wang ZB, Wu JQ, Mei YQ, He HR, Chen Q. The expression level of IL-18 in PBMC of HBV infectors and its significance. *Asian J Nucl Med* 2003;3: 78-81
- 4 Tsuji H, Mukaida N, Harada A, Kaneko S, Matsushita E, Nakanuma Y, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Tagawa Y, Iwakura Y, Kobayashi K, Matsushima K. Alleviation of lipopolysaccharide induced acute liver injury in propionibacterium acnes-primed IFN-gamma-deficient mice by a concomitant reduction of TNF-alpha, IL-12, and IL-18 production. *J Immunol* 1999;162:1049-1055

- 5 Xing T, Zhang L, Lu Q, Hou J, Feng X, Luo K. Th1/Th2 type cytokines in hepatitis B patients treated with interferon-alpha. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:921-924
- 6 文维群, 张广亮, 戴琳. 肝炎患者外周血单个核细胞 IL-18 mRNA 和蛋白水平与 HBV 感染的关系. *上海免疫学杂志* 2002;22:417-420
- 7 Jiang R, Feng X, Guo Y, Lu Q, Hou J, Luo K, Fu N. T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:422-424
- 8 Manigold T, Bocker U, Chen J, Gundt J, Traber P, Singer MV, Rossol S. Hepatitis B core antigen is a potent inducer of interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells of healthy controls and patients with hepatitis B infection. *J Med Virol* 2003;71:31-40
- 9 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003;109:487-495
- 10 Lohr HF, Pingel S, Bocher WO, Bernhard H, Herzog-Hauff S, Rose-John S, Galle PR. Reduced virus specific T helper cell induction by autologous dendritic cells patients with chronic hepatitis B—restoration by exogenous interleukin-12. *Clin Exp Immunol* 2002;130:107-114
- 11 Hodgson PD, Michalak TI. Augmented hepatic interferon gamma expression and T-cell influx characterize acute hepatitis progressing to recovery and residual lifelong virus persistence in experimental adult woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 2001;34:1049-1059
- 12 Matskevich AA, Cordelier P, Strayer DS. Conditional expression of IFN-alpha and IFN-gamma activated by HBV as genetic therapy for hepatitis B. *J Interferon Cytokine Res* 2003;23:709-721
- 13 Imanishi H, Cheng J, Ikeda N, Saito M, Ohno M, Hara N, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Fujiwara H, Hada T. Evaluation of interleukin-12-induced interferon- γ production in vitro by peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic liver disease. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1502-1505
- 14 Watson MW, Jaksic A, Price P, Cheng W, McInerney M, French MA, Fisher S, Lee S, Flexman JP. Interferon-gamma response by peripheral blood mononuclear cells to hepatitis C virus core antigen is reduced in patients with liver fibrosis. *J Infect Dis* 2003;188:1533-1536
- 15 于乐成, 顾长海. 介导肝脏损害的细胞因子白细胞介素 18. *中华肝脏病杂志* 2001;9:379-380

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 •

野生型 P53 基因对肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响

曲波, 潘海乐, 吕志武, 关景明

曲波, 吕志武, 关景明, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

潘海乐, 哈尔滨医科大学附属二院骨科 黑龙江省哈尔滨市 150086

项目负责人: 曲波, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路 157 号, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科.

收稿日期: 2004-04-15 接受日期: 2004-05-24

摘要

目的: 观察野生型 p53 基因对昆明鼠肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响, 探讨 p53 基因的抑瘤机制.

方法: δ 5 周龄昆明鼠 30 只, 随机分类肝癌组(I)和 p53 基因治疗组(II). 每只鼠于后肢股部皮下接种 Hep-A-22 肝癌细胞悬液 0.2 mL, 建立动物模型. 接种后 24 h, II 组实验动物于荷瘤局部皮下注射介导野生型 p53 基因的复制缺陷型重组腺病毒液 0.2 mL, 14 d 后处死实验动物. PCR-ELISA 定量检测肝癌组织端粒酶活性, 免疫组化观察肝癌细胞中 Bcl-2 蛋白的表达情况.

结果: 腺病毒介导的野生型 p53 基因能够显著抑制肝癌的生长(肿瘤直径 23.32 ± 1.45 cm vs 5.13 ± 0.37 cm, $P < 0.001$), 明显降低端粒酶的活性表达(A 值 2.46 ± 0.35 vs 0.78 ± 0.06 , $P < 0.01$), 下调 Bcl-2 基因蛋白的生成(表达阳性率 67.8% vs 25.9%, $P < 0.05$).

结论: 野生型 p53 基因从抑制肝癌细胞增生, 促进肿瘤细胞凋亡两个方面发挥抑癌功能.

曲波, 潘海乐, 吕志武, 关景明. 野生型 P53 基因对肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2461-2463

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2461.asp>

0 引言

肿瘤细胞的无限增生与细胞端粒酶激活有关, 是正常细胞转变为恶性细胞的初始信号, 是恶性肿瘤发生发展的重要机制. p53 是研究最为广泛和深入的肿瘤抑制基因之一, 他在多种肿瘤中的高突变率是人们认识到其用于肿瘤基因治疗的潜在价值.

1 材料和方法

1.1 材料 含野生型 p53 基因的复制缺陷型重组腺病毒, 由尹新华博士惠赠. 病毒滴度为 8.2×10^{13} pfu/L. TRAP-PCR-ELISA 端粒酶检测试剂盒和 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒, 购自宝灵曼公司. Bcl-2mAb 购自博士公司. 鼠 Hep-A-22 肝癌细胞株, 由黑龙江省肿瘤研究所提供. 昆明鼠, δ , 体质量 28-30 g, 购自黑龙江省肿瘤研究所.

1.2 方法 复苏 Hep-A-22 肝癌细胞株, 接种到小鼠腹腔中, 2 wk 后取腹水, 离心, 用 RPMI1640 营养液调细胞密度为 1×10^{10} /mL, 每只鼠于后肢股部皮下接种 0.2 mL 细胞悬液, 7d 后长出实体瘤. 小鼠随机分为 2 组, 肝癌组(I)和 p53 基因治疗组(II), 每组 15 只. 带 p53 基

- 5 Xing T, Zhang L, Lu Q, Hou J, Feng X, Luo K. Th1/Th2 type cytokines in hepatitis B patients treated with interferon-alpha. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:921-924
- 6 文维群, 张广亮, 戴琳. 肝炎患者外周血单个核细胞 IL-18 mRNA 和蛋白水平与 HBV 感染的关系. *上海免疫学杂志* 2002;22:417-420
- 7 Jiang R, Feng X, Guo Y, Lu Q, Hou J, Luo K, Fu N. T helper cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:422-424
- 8 Manigold T, Bocker U, Chen J, Gundt J, Traber P, Singer MV, Rossol S. Hepatitis B core antigen is a potent inducer of interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells of healthy controls and patients with hepatitis B infection. *J Med Virol* 2003;71:31-40
- 9 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003;109:487-495
- 10 Lohr HF, Pingel S, Bocher WO, Bernhard H, Herzog-Hauff S, Rose-John S, Galle PR. Reduced virus specific T helper cell induction by autologous dendritic cells patients with chronic hepatitis B-restoration by exogenous interleukin-12. *Clin Exp Immunol* 2002;130:107-114
- 11 Hodgson PD, Michalak TI. Augmented hepatic interferon gamma expression and T-cell influx characterize acute hepatitis progressing to recovery and residual lifelong virus persistence in experimental adult woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 2001;34:1049-1059
- 12 Matskevich AA, Cordelier P, Strayer DS. Conditional expression of IFN-alpha and IFN-gamma activated by HBV as genetic therapy for hepatitis B. *J Interferon Cytokine Res* 2003;23:709-721
- 13 Imanishi H, Cheng J, Ikeda N, Saito M, Ohno M, Hara N, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Fujiwara H, Hada T. Evaluation of interleukin-12-induced interferon-gamma production in vitro by peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic liver disease. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1502-1505
- 14 Watson MW, Jaksic A, Price P, Cheng W, McInerney M, French MA, Fisher S, Lee S, Flexman JP. Interferon-gamma response by peripheral blood mononuclear cells to hepatitis C virus core antigen is reduced in patients with liver fibrosis. *J Infect Dis* 2003;188:1533-1536
- 15 于乐成, 顾长海. 介导肝脏损害的细胞因子白细胞介素 18. *中华肝脏病杂志* 2001;9:379-380

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 •

野生型 P53 基因对肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响

曲波, 潘海乐, 吕志武, 关景明

曲波, 吕志武, 关景明, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

潘海乐, 哈尔滨医科大学附属二院骨科 黑龙江省哈尔滨市 150086

项目负责人: 曲波, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路 157 号, 哈尔滨医科大学附属二院消化内科.

收稿日期: 2004-04-15 接受日期: 2004-05-24

摘要

目的: 观察野生型 p53 基因对昆明鼠肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响, 探讨 p53 基因的抑瘤机制.

方法: 5 周龄昆明鼠 30 只, 随机分类肝癌组(I)和 p53 基因治疗组(II). 每只鼠于后肢股部皮下接种 Hep-A-22 肝癌细胞悬液 0.2 mL, 建立动物模型. 接种后 24 h, II 组实验动物于荷瘤局部皮下注射介导野生型 p53 基因的复制缺陷型重组腺病毒液 0.2 mL, 14 d 后处死实验动物. PCR-ELISA 定量检测肝癌组织端粒酶活性, 免疫组化观察肝癌细胞中 Bcl-2 蛋白的表达情况.

结果: 腺病毒介导的野生型 p53 基因能够显著抑制肝癌的生长(肿瘤直径 23.32 ± 1.45 cm vs 5.13 ± 0.37 cm, $P < 0.001$), 明显降低端粒酶的活性表达(A 值 2.46 ± 0.35 vs 0.78 ± 0.06 , $P < 0.01$), 下调 Bcl-2 基因蛋白的生成(表达阳性率 67.8% vs 25.9%, $P < 0.05$).

结论: 野生型 p53 基因从抑制肝癌细胞增生, 促进肿瘤细胞凋亡两个方面发挥抑癌功能.

曲波, 潘海乐, 吕志武, 关景明. 野生型 P53 基因对肝癌组织端粒酶活性及 bcl-2 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2461-2463

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2461.asp>

0 引言

肿瘤细胞的无限增生与细胞端粒酶激活有关, 是正常细胞转变为恶性细胞的初始信号, 是恶性肿瘤发生发展的重要机制. p53 是研究最为广泛和深入的肿瘤抑制基因之一, 他在多种肿瘤中的高突变率是人们认识到其用于肿瘤基因治疗的潜在价值.

1 材料和方法

1.1 材料 含野生型 p53 基因的复制缺陷型重组腺病毒, 由尹新华博士惠赠. 病毒滴度为 8.2×10^{13} pfu/L. TRAP-PCR-ELISA 端粒酶检测试剂盒和 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒, 购自宝灵曼公司. Bcl-2mAb 购自博士公司. 鼠 Hep-A-22 肝癌细胞株, 由黑龙江省肿瘤研究所提供. 昆明鼠, ♂, 体质量 28-30 g, 购自黑龙江省肿瘤研究所.

1.2 方法 复苏 Hep-A-22 肝癌细胞株, 接种到小鼠腹腔中, 2 wk 后取腹水, 离心, 用 RPMI1640 营养液调细胞密度为 1×10^{10} /mL, 每只鼠于后肢股部皮下接种 0.2 mL 细胞悬液, 7d 后长出实体瘤. 小鼠随机分为 2 组, 肝癌组(I)和 p53 基因治疗组(II), 每组 15 只. 带 p53 基

因的腺病毒液于接种 Hep-A-22 肝癌细胞株后 24 h 注入, 每只鼠 0.2 mL, 14 d 后, 测量肿瘤大小.

统计学分析 所有数据均用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 以 t 检验计算组间差异, $P < 0.05$ 表示显著差异.

2 结果

Hep-A-22 细胞转染带 p53 的重组腺病毒后在小鼠体内成瘤性降低, 到 14 d 时, 接种带野生型 p53 基因小鼠, 与单纯接种肿瘤细胞的鼠作比较, 肿瘤明显变小. 注射 p53 基因后, 治疗组端粒酶活性明显低于肝癌组 ($A: 2.46 \pm 0.35$ vs 0.78 ± 0.06 , $P < 0.01$), 差异有显著性 (图 1). II 组肝癌组织中可见较多的核呈棕褐色的凋亡细胞, I 组则偶见凋亡细胞 (图 2). I 组中凋亡指数 (%) 显著低于 II 组, 两组差异极为明显 (3.2 ± 0.8 vs 15.6 ± 3.6 , $P < 0.01$) 说明在外源野生型 p53 注射后, 促进了肝癌细胞凋亡的发生. Bcl-2 蛋白是膜蛋白, 经免疫组化染色后, 在细胞胞质可见到棕褐色颗粒. 转染带 p53 腺病毒

的肝癌组织, Bcl-2 蛋白表达较单纯肝癌组织明显减少 (图 3).

3 讨论

绝大多数的恶性肿瘤细胞具有端粒酶活性, 而除生殖细胞以外的正常人体组织大多为端粒酶阴性^[1-9], 因此端粒酶可能成为肿瘤治疗的新靶点^[10-12]. 采用端粒酶抑制剂进行肿瘤治疗具有广谱性, 适合所有的恶性肿瘤治疗, 已有一些小分子合成物被证明有端粒酶抑制作用^[13-14], 但其特异性和安全性值得怀疑. 当前关于恶性肿瘤发病机制方面的一个重要观点认为: 肿瘤不仅仅是一种异常“增生”性的疾病^[15], 而且和机体的另外一个重要生理调控机制—凋亡过程和紊乱关系密切^[16]. 细胞凋亡在胚胎发育过程中既不断进行, 是细胞的自主性死亡操作, 具有级连效应, 受多种基因的精细调节, 对维持机体内环境的稳定具有重要意义^[17]. 凋亡减弱是肿瘤发生的重要机制^[18], 有研究表明在肿瘤发生

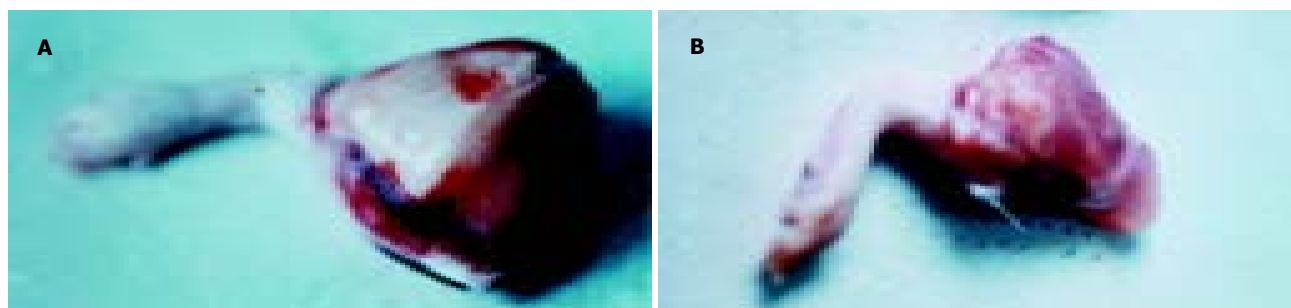


图 1 昆明鼠肿瘤大体照片. A: 肝癌组肿瘤明显形成; B: 治疗组肿瘤体积明显缩小.

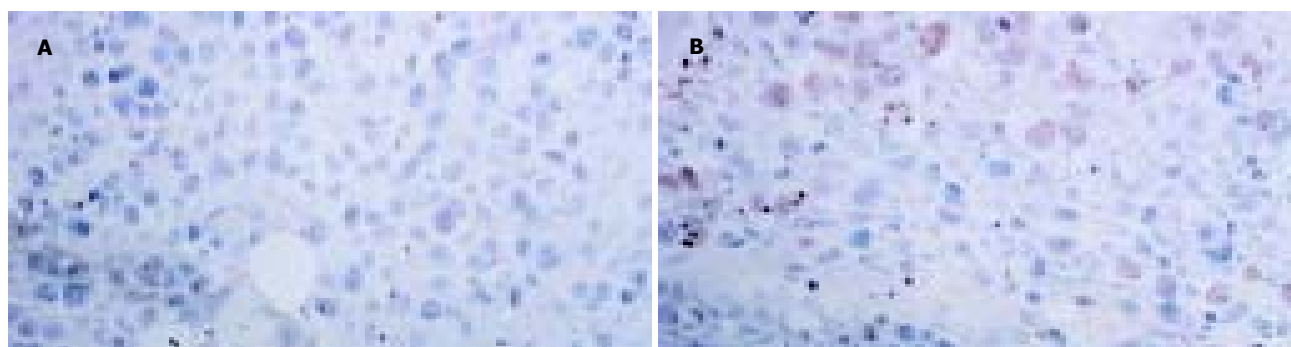


图 2 肿瘤细胞凋亡 $\times 40$. A: 肝癌组偶见凋亡细胞; B: 治疗组凋亡细胞增多.

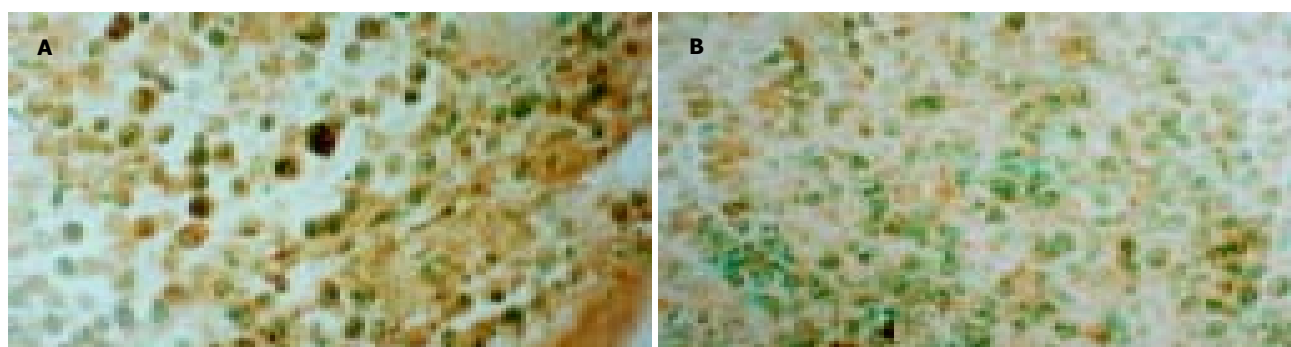


图 3 肿瘤细胞 Bcl-2 免疫组化 $\times 40$. A: 肝癌组 Bcl-2 强阳性表达细胞; B: 治疗组 Bcl-2 表达减弱.

过程中多种凋亡基因发生变异^[19-20]. p53基因迄今为止发现的与肿瘤发生关系最为密切的基因, 有野生和突变两种构型. 野生型p53的抑癌基因, 并且为有DNA损伤的细胞凋亡过程所必需. p53基因与是否对肿瘤组织的端粒酶存在影响, 各家报道并不一致. 我们认为可能与p53基因下调Bcl-2基因的表达有关. 从本实验的结果可以看出, 在p53基因注射之后, 治疗组动物的Bcl-2蛋白表达强度明显减弱, 并且这种减弱的水平与端粒酶活性的降低具有明显的平行关系. 此外, 我们还发现, 治疗组动物, 端粒酶阴性的肝癌组织也多同时有Bcl-2表达产物强度的下降, 这一方面说明表达与端粒酶活性之间的密切关系, 另一方面也显示端粒酶阳性的肿瘤细胞多处于凋亡抑制状态, 即恶性肿瘤的增生与凋亡都发生了异常. 而野生型p53基因则通过阻断肿瘤细胞永生的关键环节, 即降低端粒酶活性和下调凋亡抑制基因Bcl-2的表达, 这两个方面发挥其抑癌作用.

4 参考文献

- 奚伟红, 倪晓谦, 沈玉琴, 黄琴梅. 胃癌端粒酶活性临床研究. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):113
- 朱芮, 肖卫东, 熊永炎, 邹典定, 王莉, 陈新煜. 胃腺癌组织中端粒酶及nm23的表达与预后. 世界华人消化杂志 2000;8:1305-1306
- Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res* 1997;57:326-331
- 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. 胃肠道黏膜下肿瘤端粒酶表达的意义. 华人消化杂志 1998;6:765-767
- 王维, 罗和生, 余保平. 端粒酶与大肠癌. 世界华人消化杂志 2000;8:800-802
- 仇生龙, 黄锦秋, 王裕发, 彭志海. 大肠癌前病变与癌及脱落细胞端粒酶分析. 华人消化杂志 1998;6:992-993
- 贾林, 李瑜元. 结肠灌洗脱落细胞端粒酶活性诊断结肠癌的价值. 华人消化杂志 1998;6:955-957
- 赵东兵, 张伟, 金顺钱, 刘毅, 常邵静, 邵永孚. 大肠癌组织中端粒酶活性的研究. 中华肿瘤杂志 1998;20:199-201
- Wang Q, Wu QM, Li SB. Detection of telomerase activity and cytology in diagnosis of cardiac cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):29
- Zhang FX, Zhang XY, Fan DM, Deng ZY, Yan Y, Wu HP, Fan JJ. Antisense telomerase RNA induced human gastric cancer cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:430-432
- 夏志胜, 朱兆华, 何守搞. 全反式维甲酸和5-Fu对裸鼠胃癌移植瘤生长和端粒酶活性的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:674-677
- 朱兆华, 夏志胜, 何守搞. 全反式维甲酸和5-Fu对胃癌细胞端粒酶活性和细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:669-673
- 许兰涛, 马力. 端粒酶反义寡聚脱氧核苷酸对肝癌细胞影响的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:1065-1066
- 孟志强, 郭伟剑, 于尔辛, 宋明志, 黄雯霞. 健脾理气方药物血清对肝癌细胞端粒酶活性及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2000;8: 879-882
- 李宝杰, 王新红, 曲波. 肝细胞癌变过程中cyclin D₁的异常表达与端粒酶活性的相关分析及意义. 世界华人消化杂志 2003;11: 1682-1689
- 郭光云, 徐少勇, 邓长生. 酒石酸锶钾诱导人胃癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004;12:520-522
- 廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪. 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:344-346
- Ameisen JC. Programmed cell death(apoptosis)and cell survival regulation: relevance to aids and cancer. *AIDS* 1994;8: 1197-1212
- Sugamura K, Makino M, Shirai H, Kimura O, Maeta M, Itoh H, Kaibara N. Enhanced induction of apoptosis of human gastric carcinoma cells after preoperative treatment with 5-fluorouracil. *Cancer* 1997;79:12-17
- 杨文字, 黄宗海. 自杀基因治疗恶性肿瘤的载体效率及基因表达. 世界华人消化杂志 2004;12:194-198

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 •

应用抑制性消减杂交技术筛选 rhALR 调节基因

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江, 张黎颖

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江, 张黎颖, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队九五科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十五科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-03-26 接受日期: 2004-08-28

摘要

目的: 筛选与克隆重组人肝再生增强因子激活基因, 了解其在体内的调节功能线索及机制.

方法: 应用大肠杆菌系统, 表达、纯化重组人肝再生增强

因子蛋白. 刺激 HepG2 细胞, 以溶剂 PH7.8 的磷酸盐缓冲液为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取 mRNA 并逆转录为 cDNA, 经 Rsa I 酶切后, 将实验组 cDNA 分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组 cDNA 进行两次消减杂交及两次抑制性聚合酶链反应(PCR), 将产物与 T/A 载体连接, 构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆 PCR 扩增后进行测序及同源性分析.

结果: 成功构建重组人肝再生增强因子激活基因差异表达的 cDNA 消减文库. 文库扩增后得到 30 个阳性克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 200-1000 bp 插入片段. 对插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序列, 结果共获得 19 种编码基因, 包括 15 种已知基因和 4 种未知基因.

过程中多种凋亡基因发生变异^[19-20]. p53基因迄今为止发现的与肿瘤发生关系最为密切的基因, 有野生和突变两种构型. 野生型p53的抑癌基因, 并且为有DNA损伤的细胞凋亡过程所必需. p53基因与是否对肿瘤组织的端粒酶存在影响, 各家报道并不一致. 我们认为可能与p53基因下调Bcl-2基因的表达有关. 从本实验的结果可以看出, 在p53基因注射之后, 治疗组动物的Bcl-2蛋白表达强度明显减弱, 并且这种减弱的水平与端粒酶活性的降低具有明显的平行关系. 此外, 我们还发现, 治疗组动物, 端粒酶阴性的肝癌组织也多同时有Bcl-2表达产物强度的下降, 这一方面说明表达与端粒酶活性之间的密切关系, 另一方面也显示端粒酶阳性的肿瘤细胞多处于凋亡抑制状态, 即恶性肿瘤的增生与凋亡都发生了异常. 而野生型p53基因则通过阻断肿瘤细胞永生的关键环节, 即降低端粒酶活性和下调凋亡抑制基因Bcl-2的表达, 这两个方面发挥其抑癌作用.

4 参考文献

- 奚伟红, 倪晓谦, 沈玉琴, 黄琴梅. 胃癌端粒酶活性临床研究. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):113
- 朱芮, 肖卫东, 熊永炎, 邹典定, 王莉, 陈新煜. 胃腺癌组织中端粒酶及nm23的表达与预后. 世界华人消化杂志 2000;8:1305-1306
- Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res* 1997;57:326-331
- 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. 胃肠道黏膜下肿瘤端粒酶表达的意义. 华人消化杂志 1998;6:765-767
- 王维, 罗和生, 余保平. 端粒酶与大肠癌. 世界华人消化杂志 2000;8:800-802
- 仇生龙, 黄锦秋, 王裕发, 彭志海. 大肠癌前病变与癌及脱落细胞端粒酶分析. 华人消化杂志 1998;6:992-993
- 贾林, 李瑜元. 结肠灌洗脱落细胞端粒酶活性诊断结肠癌的价值. 华人消化杂志 1998;6:955-957
- 赵东兵, 张伟, 金顺钱, 刘毅, 常邵静, 邵永孚. 大肠癌组织中端粒酶活性的研究. 中华肿瘤杂志 1998;20:199-201
- Wang Q, Wu QM, Li SB. Detection of telomerase activity and cytology in diagnosis of cardiac cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):29
- Zhang FX, Zhang XY, Fan DM, Deng ZY, Yan Y, Wu HP, Fan JJ. Antisense telomerase RNA induced human gastric cancer cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:430-432
- 夏志胜, 朱兆华, 何守搞. 全反式维甲酸和5-Fu对裸鼠胃癌移植瘤生长和端粒酶活性的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:674-677
- 朱兆华, 夏志胜, 何守搞. 全反式维甲酸和5-Fu对胃癌细胞端粒酶活性和细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:669-673
- 许兰涛, 马力. 端粒酶反义寡聚脱氧核苷酸对肝癌细胞影响的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:1065-1066
- 孟志强, 郭伟剑, 于尔辛, 宋明志, 黄雯霞. 健脾理气方药物血清对肝癌细胞端粒酶活性及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2000;8: 879-882
- 李宝杰, 王新红, 曲波. 肝细胞癌变过程中cyclin D₁的异常表达与端粒酶活性的相关分析及意义. 世界华人消化杂志 2003;11: 1682-1689
- 郭光云, 徐少勇, 邓长生. 酒石酸锶钾诱导人胃癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004;12:520-522
- 廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪. 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:344-346
- Ameisen JC. Programmed cell death(apoptosis)and cell survival regulation: relevance to aids and cancer. *AIDS* 1994;8: 1197-1212
- Sugamura K, Makino M, Shirai H, Kimura O, Maeta M, Itoh H, Kaibara N. Enhanced induction of apoptosis of human gastric carcinoma cells after preoperative treatment with 5-fluorouracil. *Cancer* 1997;79:12-17
- 杨文字, 黄宗海. 自杀基因治疗恶性肿瘤的载体效率及基因表达. 世界华人消化杂志 2004;12:194-198

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 •

应用抑制性消减杂交技术筛选 rhALR 调节基因

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江, 张黎颖

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江, 张黎颖, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心 北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队九五科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十五科技攻关面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-03-26 接受日期: 2004-08-28

摘要

目的: 筛选与克隆重组人肝再生增强因子激活基因, 了解其在体内的调节功能线索及机制.

方法: 应用大肠杆菌系统, 表达、纯化重组人肝再生增强

因子蛋白. 刺激 HepG2 细胞, 以溶剂 PH7.8 的磷酸盐缓冲液为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取 mRNA 并逆转录为 cDNA, 经 Rsa I 酶切后, 将实验组 cDNA 分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组 cDNA 进行两次消减杂交及两次抑制性聚合酶链反应(PCR), 将产物与 T/A 载体连接, 构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆 PCR 扩增后进行测序及同源性分析.

结果: 成功构建重组人肝再生增强因子激活基因差异表达的 cDNA 消减文库. 文库扩增后得到 30 个阳性克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 200-1000 bp 插入片段. 对插入片段测序, 并通过生物信息学分析获得其全长基因序列, 结果共获得 19 种编码基因, 包括 15 种已知基因和 4 种未知基因.

结论: 筛选到的 cDNA 全长序列, 包括一些与细胞生长调节、肿瘤免疫发生及物质代谢密切相关的蛋白编码基因, 推测了重组人肝再生增强因子在体内可能存在的调控机制的线索, 尚需进一步的实验证明。

刘蔚, 成军, 张连峰, 纪冬, 刘妍, 郭江, 张黎颖. 应用抑制性消减杂交技术筛选 rhALR 调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2463-2466

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2463.asp>

0 引言

近年来对于肝细胞再生的研究主要集中于几种调节因子上, 从胰岛素开始^[1], 至今已发现参与调节肝再生的刺激和抑制因子共20多种. 肝再生增强因子是一种多肽调节因子, 具有重要的生物学功能, 与高等生物线粒体的生成、细胞分裂周期调节及肝脏、睾丸等重要脏器发育有关, 最主要是能特异的刺激肝源细胞的增生^[2-5]. 对于 ALR 的产生、分泌、体内转运的过程都存有诸多疑问. 因此为了进一步研究该蛋白质的功能, 我们应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH), 构建 rhALR 激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 筛选相关的靶基因片段, 并应用生物信息学(Bioinformatics)技术获得其基因全长序列, 为研究 rhALR 在体内的调节功能机制提供一定的线索。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存); FuGENE6 转染试剂(Roche), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim).

1.2 方法

1.2.1 重组人肝再生增强因子的制备 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增人 ALR 的 cDNA 基因片段, 克隆到大肠杆菌表达载体 pBV220 中, 转化大肠杆菌 JM109, 制备工程菌. 发酵后, 分离纯化包涵体, 经过包涵体的变性和复性, 然后利用阴离子交换层析、阳离子交换层析和分子筛等技术, 纯化重组人肝再生增强因子, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测显示, 制备的重组人肝再生增强因子纯度在 98% 以上, 具有促进肝细胞再生的生物学活性。

1.2.2 细胞刺激及细胞 mRNA 提取 用 FuGENE6 转染试剂将 rhALR 终浓度为 0.01 g/L 及 pH7.8 的溶剂磷酸盐缓冲液分别刺激 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 24 h 后收获细胞. 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取经 rhALR 及磷酸盐缓冲液刺激的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析。

1.2.3 双链 cDNA(dscDNA)合成 用 Clontech 公司的 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 中的试剂, 以获得的 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA。

1.2.4 消减杂交文库的建立 采用 Clontech 公司的 PCR-

Select™ cDNA Subtraction Kit, 常规 SSH 方法按说明书进行: 经 rhALR 及磷酸盐缓冲液刺激的 HepG2 细胞 cDNA 分别标记为 Tester 和 Driver, 经 *Rsa* I (一种识别 4 碱基序列的内切酶) 消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将 Tester 的 cDNA 分为两份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 然后与过量的 Driver cDNA 进行杂交; 合并两种杂交产物后再与 Driver cDNA 作第 2 次杂交; 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。

1.2.5 克隆鉴定分析 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37℃ 培养 18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段后(200-1 000 bp), 测序(上海博亚公司). 应用生物信息学技术将测得序列与 GenBank 数据库进行同源性分析。

2 结果

2.1 mRNA 的定性定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提. 紫外分光检测显示, 经 rhALR 及溶剂磷酸盐缓冲液刺激的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 6.5 μg 和 4.6 μg, $A_{260}/A_{280}=1.87$. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带。

2.2 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增, 产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定. 结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当, 说明 dscDNA 已与接头高效率连接。

2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 分别取抑制性及非抑制性 PCR 产物 1 μL 为模板, 用看家基因 G3PDH 引物进行 PCR 扩增, 分别在 18, 23, 28, 33 次循环结束时从体系中吸取 5 μL 进行电泳鉴定. 结果显示, 与非抑制性 PCR 产物相比, 抑制性 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 1)。

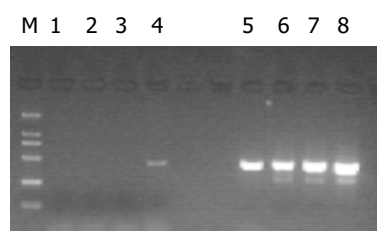


图 1 消减效率分析结果. 1-4. 消减组, 5-8. 未消减组.

2.4 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮 PCR 扩增后, 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 转化 JM109 感受态细菌后有较多菌落生长, 以 pGEM-

Teasy载体多克隆位点两端T7/SP6引物进行菌落PCR扩增,结果显示为200–1 000 bp大小不等的插入片段,所获得的克隆中几乎均含有插入片段,这些条带可能代表差异表达的基因片段(图2)。

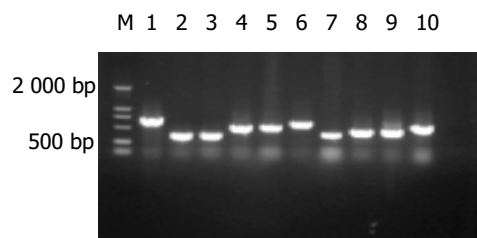


图2 部分克隆菌落PCR鉴定电泳图。

2.5 cDNA测序与同源性分析初步结果 随机选择30个克隆测序,与GenBank数据库进行初步比较,发现其中含有4个克隆未检索到任何对应的相似序列,可能代表了某些新基因,进一步的分析和功能鉴定正在进行中。有15个与已知基因的部分序列高度同源(96–100%,表1)。

表1 阳性克隆与GenBank同源序列比较结果

同源蛋白基因	同源菌株	同源性
线粒体	4	99–100%
线粒体膜易位酶	1	100%
肿瘤蛋白翻译调节因子1 (TPT1)	1	100%
酪氨酸磷酸酶IV A	1	97%
核糖体蛋白S21	1	100%
核糖体蛋白L9	1	100%
乳酸脱氢酶	1	100%
硫氧还蛋白	1	96%
载脂蛋白H	1	99%
细胞周期蛋白依赖激酶1,Cdk1	1	99%
XTP5	1	97%
蛋白酶体26S亚基	1	100%
人染色体克隆	4	99–100%

3 讨论

人和动物血清中存在着促进肝再生的蛋白质因子,早期的研究中统称为肝刺激物质(HSS)^[6–7]。研究表明,肝再生增强因子(ALR)是HSS的主要成分^[8]。关于ALR蛋白的生物学功能,Lisowsky *et al*^[9–10]首先发现的是scERV1对于细胞的存活以及线粒体的生物学生成过程有关,进一步的研究结果表明scERV1基因对于酵母细胞的细胞周期具有重要的调节功能。Lee *et al*^[11]的研究发现,酵母细胞的ERV1的编码产物由189个氨基酸残基组成,这种蛋白对于线粒体功能和细胞的存活是必不可少的。这种蛋白具有黄素相关性巯基氧化酶的催化活性,与二硫键的形成有关。ERV1p蛋白氨基末端序列的缺失研究表明,这种蛋白质酶学催化活性位点位于羧基末端的15 kDa的部位。ERV1p羧基末端部分保留了与FAD

结合和催化二硫键形成的能力,但不能象完整蛋白那样形成二聚体形式。这种蛋白的羧基末端具有CXXC结构域,从酵母到人的同源基因中都有这段保守结构。因此ERV1p代表了酵母细胞中具有FAD结合功能的第一种巯基氧化酶,并首次证实其与线粒体的形成有关。酵母细胞scERV1基因的编码产物与其线粒体的发生、细胞生存和细胞周期的调节有密切的联系。哺乳动物细胞中的同源基因是肝再生增强因子,与肝再生、精子细胞形成过程有关。此外,肝再生增强因子与干扰素 γ 的调节关系密切。外源性ALR可以通过诱导转录因子和翻译相关因子的表达调节线粒体的功能,或者通过抑制NK细胞的细胞毒性。Polimeno *et al*^[12]的研究结果表明,ALR对于干扰素 γ (IFN γ)基因表达有影响。IFN γ 由激活的NK细胞所产生,对于线粒体转录因子A的表达具有显著的调控作用。外源性ALR对于NK细胞IFN γ 的表达具有显著的下调作用,70%肝切除动物模型如果施以外源性IFN γ ,则可以抑制线粒体转录因子A的表达活性,同时抑制肝再生的过程。这一结果表明ALR是通过生长因子和免疫因子调节的双重调节机制,影响肝再生的过程。另外,肝再生增强因子与自然杀伤细胞活性调节有关。Tanigawa *et al*^[13]的研究结果表明,肝脏中的NK细胞对再生的肝细胞的细胞毒作用可能是爆发性肝炎不能进行有效的肝再生的重要机制。ALR就是通过抑制肝脏内NK细胞的细胞毒活性,来实现促进肝再生的。对于各种类型的急性肝脏疾病肝脏的ALR mRNA、血清中ALR蛋白以及外周血NK细胞毒活性进行检测,以阐明肝再生不力与肝内NK细胞活性之间的关系。结果表明,肝脏内ALR mRNA的表达水平显著提高,血清中ALR水平与肝内ALR mRNA表达水平呈正相关。在急性肝损伤期,血清中ALR水平与NK细胞活性呈显著负相关的关系。ALR由肝脏产生,在肝脏损伤时释放。研究结果表明,肝脏产生的ALR通过抑制肝内NK细胞的细胞毒活性,促进肝再生。总之,ALR基因家族从酵母这种低级的真核细胞到哺乳动物都是高度保守的,甚至在一些双链DNA病毒的基因组中也存在ALR的同源基因序列。不同生物种属的ALR都有重要的生物学功能,与高等生物的线粒体的生成、细胞分裂周期调节以及肝脏、睾丸等重要脏器的发育有关^[14]。最重要的生物学功能就是促进肝脏的再生。

抑制性消减杂交方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术,能有效地分离扩增低丰度特异表达的基因,可以在较短的时间内获得较理想的实验结果。我们将rhALR刺激肝母细胞瘤细胞系HepG2,并以加入PH7.8磷酸盐缓冲液的不同细胞系作为对照,以这2种细胞系提取的mRNA为起始材料,应用SSH方法成功地构建了rhALR激活相关基因差异表达的cDNA消减文库,随机挑选30个克隆测序分析,结果主要包括2种类型,第一种是已知基因的序列,共15个克隆,与GenBank中数据高度同源(96–100%)。这些克隆中,我

们筛选到的有细胞周期蛋白依赖激酶 1(cyclin-dependent kinase 1, Cdk1), 细胞的复制由细胞周期蛋白依赖激酶(Cdks)调控, Cdks 通过调控蛋白底物的磷酸化而实现对细胞周期的控制^[15]. 细胞周期蛋白B1-Cdk1复合物是有丝分裂起始的关键, 研究发现, B1-Cdk1 复合物首先在细胞质中起作用, 中心体通过对细胞周期蛋白 B1 的整合, 进而引发有丝分裂^[16]. 线粒体、乳酸脱氢酶、蛋白酶体、酪氨酸磷酸酶在体内物质及能量代谢中起重要作用. 载脂蛋白 H 与脂类代谢、血液凝固密切相关, 载脂蛋白 H 基因的多态性与高血压以及脑出血的发病机制相关^[17]. 线粒体中含硫氧还蛋白和相关的黄素酶, 硫氧还蛋白是二硫化蛋白, NADP 及硫氧还蛋白, 在细胞器中与 NADPH 相连^[18], 在氧化还原反应中起重要作用. 线粒体膜易位酶与蛋白质进入线粒体密切相关, 蛋白质进入线粒体必须经过两个易位接触位点, 包括与线粒体外膜易位酶(translocase of the outer membrane, TOM)形成复合物, 以及与线粒体内膜易位酶(translocase of the inner membrane, TIM)形成复合物^[19]. 肿瘤蛋白翻译调节因子 1(TPT1)是一种高度保守, 在大部分真核生物中可以表达的基因, 其功能与细胞的生长发育相关^[20]. 近来有研究认为抑制其表达可以使肿瘤的恶性程度逆转, 其表达的增高可能与肿瘤的发生相关. 核糖体蛋白为细胞内结构蛋白. 在已知的 15 个克隆中, 4 个是编码线粒体的基因片段.

通过对上述 rhALR 激活相关基因差异表达文库部分基因的分析, 我们发现 rhALR 在细胞内表达后, 与线粒体合成关系密切, 部分涉及细胞生长周期调节、物质和能量代谢、肿瘤发生等方面的基因表达增加, 提示 rhALR 对体内的多个系统可能有影响. 我们只是对 rhALR 对人细胞激活相关基因进行了初步的筛选分析, 为研究 rhALR 在体内的致病机制提供了新的线索. 有关激活基因的具体作用方式, 仍需要进一步的实验来证实.

4 参考文献

- Kogut KKA, Nifong LW, Witt MJ, Krusch DA. Hepatic insulin extraction after major hepatectomy. *Surgery* 1998;123:415-420
- Hygiya M, Francavilla A, Polimeno L, Ihara I, Sakai H, Seki T, Shimonishi M, Porter KA, Starzl TE. Cloning and sequence analysis of the rat augments of liver regeneration (ALR) gene expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:3076
- Lisowsky T, Weinstat-Saslow DL, Barton N, Reeders ST, Schneider MC. A new human gene located in the PKD1 region of chromosome 16 is a functional homologue to ERV1 of yeast. *Genomics* 1995;29:690-697
- 杨晓明, 谢玲, 吴祖泽, 贺福初. 肝部分切除后肝再生增强因子信使核糖核酸(mRNA)表达增加. *生理学报* 1997;49:599-601
- 成军, 陈菊梅. 肝再生增强因子研究进展. *国外医学病毒学分册* 2000;7:123-127
- Francavilla A, Hagiya M, Porter KA, Polimeno L, Ihara I, Starzl TE. Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* 1994;20:747-757
- 成军, 陈菊梅. 肝再生增强因子研究进展. *肝脏* 1999;4:117-118
- Francavilla A, Vujanovic NL, Polimeno L, Azzarone A, Iacobellis A, Deleo A, Hagiya M, Whiteside TL, Starzl TE. The in vivo effect of hepatotrophic factors augmenters of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions. *Hepatology* 1997;25:411-415
- Lisowsky T. Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet* 1992;232:58-64
- Lisowsky T. ERV1 is involved in the cell-division cycle and the maintenance of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 1994;26:15-20
- Lee J, Hofhaus G, Lisowsky T. Erv1p from *Saccharomyces cerevisiae* is a FAD-linked sulphydryl oxidase. *FEBS Lett* 2000; 477:62-66
- Polimeno L, Margiotta M, Marangi L, Lisowsky T, Azzarone A, Ierardi E, Frassanito MA, Francavilla R, Francavilla A. A Molecular mechanisms of augmenters of liver regeneration as immunoregulator: its effect on interferon-gamma expression in rat liver. *Dig Liver Dis* 2000;32:217-225
- Tanigawa K, Sakaida I, Masuhara M, Hagiya M, Okita K. Augmenters of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases. *J Gastroenterol* 2000;35:112-119
- Polimeno L, Lisowsky T, Francavilla A. From yeast to man--from mitochondria to liver regeneration: a new essential gene family. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31:494-500
- Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 2003;425:859-864
- Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 2003;5:143-148
- Xia J, Yang QD, Yang QM, Xu HW, Liu YH, Zhang L, Zhou YH, Wu ZG, Cao GF. Apolipoprotein H Gene Polymorphisms and Risk of Primary Cerebral Hemorrhage in a Chinese Population. *Cerebrovasc Dis* 2004;17:197-203
- Balmer Y, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP, Manieri W, Schurmann P, Droux M, Buchanan BB. Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2642-2647
- Chacinska A, Rehling P, Guiard B, Frazier AE, Schulze-Specking A, Pfanner N, Voos W, Meisinger C. Mitochondrial translocation contact sites: separation of dynamic and stabilizing elements in formation of a TOM-TIM-preprotein supercomplex. *EMBO J* 2003;22:5370-5381
- Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP, Cra-ven CJ. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat Struct Biol* 2001; 8:701-704

RNAi 重组体抑制胃癌细胞 AGS 中 DNMT1 基因的表达

陈道荣, 王丕龙, 黄爱龙

陈道荣, 王丕龙, 重庆医科大学附属第一医院消化内科 重庆 400016
黄爱龙, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 重庆 400010
项目负责人: 陈道荣, 400016, 重庆市友谊路 1 号, 重庆医科大学附属第一医院消化内科, cdcrcn@yahoo.com.cn.
电话: 023-66828224, 023-68122549
收稿日期: 2004-05-29 接收日期: 2004-06-10

摘要

目的: 利用 RNA 干扰(RNA interfering, RNAi)技术, 以 DNMT1(DNA methyltransferase 1)为靶基因, 设计构建重组体, 研究其对胃癌细胞 AGS 中 DNMT1 表达的抑制作用。

方法: 设计有小发夹结构的两条 DNA 序列, 经退火成互补双链, 再克隆至载体 pTZU6+1 中构建重组体, 经鉴定正确后, 转染胃癌细胞 AGS, 最后使用 RT-PCR 法定性分析 DNMT1 的 mRNA 水平和 Western blot 法分析 DNMT1 的蛋白表达水平。

结果: 成功地构建了靶向 DNMT1 基因 RNAi 的重组体, 将其有效转染到胃癌细胞 AGS 中去后, 出现了 DNMT1 的蛋白和 mRNA 水平的明显下降, 转染后 48h 的相对抑制率为 73% 左右。

结论: DNMT1 靶向 RNA 干扰重组体转染到胃癌细胞中可抑制 DNMT1 的表达。

陈道荣, 王丕龙, 黄爱龙. RNAi 重组体抑制胃癌细胞 AGS 中 DNMT1 基因的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2467-2469
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2467.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的消化道肿瘤, 其死亡率居各种恶性肿瘤之首^[1-3]. 随着细胞生物学与分子生物学的发展, 越来越多的研究表明部分基因启动子区域的超甲基化状态严重影响了该基因的表达, 尤其是一些抑癌基因的失活在肿瘤的发生中起着极其关键的作用, 这已得到了国内外学者的公认^[4]. 而特异性 DNA 甲基转移酶就负责往 DNA 启动子区域的特定胞嘧啶残基上添加甲基, 其中 DNMT1 在成人细胞基因组 DNA 甲基化的维护中有着极其关键性的作用. 我们构建了 DNMT1 靶向 RNA 干扰重组体, 并将其转染到胃癌细胞 AGS 中观察对 DNA 甲基转移酶基因的表达抑制作用如下。

1 材料和方法

1.1 材料 克隆用大肠杆菌 Jm109 和载体 pTZU6+1 由重庆医科大学附属第二医院病毒性肝炎研究所保存. 胃癌细胞 AGS 购自于中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库. 限制性内切酶 *Sal*I, *Hind* III, *Eco*R I, *Xba* I, T₄ DNA 连接酶和 DMSO 均为 Promega 公司产品; 核酸分

子质量标准、酚/氯仿购自上海生工公司; 柱离心式质粒抽提试剂盒和柱离心式胶回收试剂盒均购自上海华舜公司. 胎牛血清购自于美国 Hyclone 公司. 转染试剂 Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司. RNA 提取试剂盒为 Qiagen 公司产品; RT-PCR 二步法试剂盒为 TaKaRa 公司产品. 兔抗人 DNMT1 及羊抗人 beta-actin 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 及兔抗羊 IgG (二抗) 购于北京中山生物技术有限公司. 根据 Genbank 中报道的 DNMT1 的核苷酸序列 (No. NM001379), 参考小干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA) 的设计策略, 设计短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 序列如下 (正义链带有 *Xho* I 的酶切位点, 反义链带有 *Xba* I 的酶切位点): 正义链: 5'-TCGAGCAGCGGCTCAAAGATTTGTTCCGAAATCTTTGAGCCGCCTGCTTTTT-3' 反义链: 5'-CTAGAAAAAGCAGCGGCTCAAAGATTTGCGAACAATCTTTGAGCCGCCTGC-3' 根据 Genbank 中报道的 DNMT1 的核苷酸序列 (No. NM001379), 参考 RT-PCR 引物设计原则设计引物如下: P1: 5'-TGCAGAAGGATGGAACGGAG-3'; P2: 5'-GCTTTTCCTTGTAATCCTGG-3'. 另外同时设计 β -actin 基因的引物序列如下: P1: 5'-TGGCACCACACCTTCTACAA-3'; P2: 5'-GCAGCTCGTAGCTCTTCTCC-3'.

1.2 方法 采用化学合成方法合成单链寡核苷酸. 取等量 100 mmol/L 的 DNA 合成片段, 在退火缓冲液中于 95℃ 保温 2 min 后, 缓慢降至室温得到退火双链 DNA^[5-7]. 将乙醇沉淀过夜纯化的双链 DNA 片段与 *Sal*I 和 *Xba*I 双酶切的转录载体 pTZU6+1 进行连接, 转化大肠杆菌 JM109, Amp 抗性筛选, 阳性克隆分别以 *Sal*I, *Xba*I 单酶切和 *Hind* III + *Eco*R I 双酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 将筛选的阳性克隆质粒送上海申友生物技术有限公司进行序列分析, 以证实目的 DNA 片段克隆入 pTZU6+1 载体, 将测序正确的 shRNA 表达载体命名为 DNMT1-pTZU6+1. 本试验共分为 5 组: 第 1 组为空白对照组, 不加任何的干预措施; 第 2 组为脂质体对照组, 仅予以脂质体; 第 3 组为重组质粒对照组仅予以重组质粒; 第 4 组为空载体对照组, 予以脂质体加空载体; 第 5 组为试验组予以重组质粒和脂质体的混合物. AGS 细胞常规培养于含 100 mL/L 灭活的胎牛血清, 100 ku/L 青霉素, 100 ku/L 链霉素的 DMEM 培养液中, 培养条件为 37℃, 饱和湿度 50 mL/L CO₂; 每 1-2 d 用 2.5 g/L 胰酶消化传代. 将对数生长期的胃癌细胞 AGS 消化离心后, 加入适量的只含胎牛血清, 而无抗生素的 DMEM 培养基计数, 按 2×10^8 /L 接种于 24 孔板中. 种板后 24 h 左右, 细胞长至培养板的 95-100% 时进行转染. 具体

的转染步骤参见 Invitrogen 公司的转染操作手册. 将转染前、转染后 24, 48, 72 h 的各组细胞用胰酶消化下来, PBS 洗 3 次. Western blot 杂交按《分子克隆》实验操作指南进行, 一抗为兔抗人 DNMT1, 羊抗人 β -actin 多克隆抗体; 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 兔抗羊 IgG. 最后用 DAB 检测系统检测. 另将转染前、转染后 24, 48, 72 h 的各组细胞用胰酶消化下来, PBS 洗 3 次, 按试剂盒说明分别提取各组细胞的总 RNA. RT-PCR 反应体系中加入两对引物, 第 1 对是内源对照 β -actin 基因的引物, 第 2 对是被沉默的 DNMT1 基因的引物, 具体操作见说明书. 反应条件是 94°C 4 min; 94°C 30 s; 60°C 30 s; 72°C 50 s; 72°C 10 min, 共 30 个循环. 根据凝胶电泳中 β -actin 基因片段条带的强弱判断模板的量, 进而判断靶基因的 mRNA 被 shRNA 沉默的程度.

2 结果

重组质粒 DNMT1-pTZU6+1 的 *Sal* I 酶切位点丢失, 但可以被 *Xba* I 酶切开. 而空载体可被 *Sal* I 和 *Xba* I 双酶切形成约 3.1 kb 的 DNA 片段. 用 *Hind* III 和 *Eco*RI 双酶切后重组质粒和空载体均产生 2 个条带, 但重组质粒的小片段比空载体的大一些, 实验结果与预期相符 (图 1). 进一步用 DNA 测序方法证实重组载体序列完全正确.

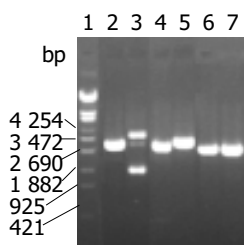


图 1 重组载体酶切鉴定图. 1: Marker; 2-3: *Sal*I 酶切图; 4-5: *Sal*I 和 *Eco*RI 酶切图; 6-7: *Hind* III 和 *Eco*RI 酶切图. 2,4,6: 空载体; 3,5,7: 重组载体.

2.1 DNMT1 蛋白的 Western blot 检测 与对照组相比, 重组载体被转染到胃癌细胞 AGS 中去后引起细胞中的 DNMT1 蛋白表达量减少. 并且随时间的推移, 这种现象更加明显 (图 2).

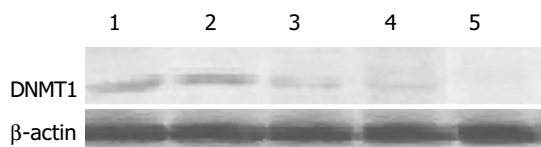


图 2 转染前后胃癌细胞 AGS 中 DNMT1 蛋白的 Western blot 结果. 1: 空白对照; 2: 空载体对照; 3: 转染后 24 h; 4: 转染后 48 h; 5: 转染后 72 h.

2.2 DNMT1 基因的 RT-PCR 检测 针对 DNMT1 基因构建的 RNA 干扰重组体对胃癌细胞 AGS 中 DNMT1 基因的转录有明显的抑制作用. 这种抑制作用随时间的延长有逐步增强的趋势.

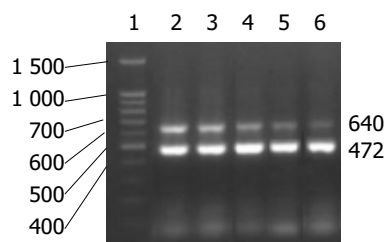


图 3 重组体转染前后 AGS 细胞中 DNMT1 基因的 mRNA 表达. 1: Marker; 2: 空白对照; 3: 空载体对照; 4: 转染后 24 h; 5: 转染后 48 h; 6: 转染后 72 h.

3 讨论

10 a 前科学家们就发现 DNA 甲基化和肿瘤的发生之间有着密不可分的关系. DNA 甲基化可以在转录水平调控基因表达 (主要是在转录起始阶段), 通过基因启动子及其附近区域内 CpG 岛胞嘧啶的甲基化关闭某种组织或细胞不必用的基因, 而去甲基化作用则可指导组织特异性或阶段特异性基因的活化, 使基因表达具有时空特点. 正常组织细胞中, 广泛表达的基因启动子区域 CpG 岛常处于非甲基化状态; 肿瘤细胞中, 这些 CpG 岛常变为甲基化状态, 其相关基因的表达亦被关闭^[4]. 这些基因包括: 肿瘤抑制基因、细胞周期凋亡调节基因、抑制肿瘤转移和浸润基因、DNA 修复基因、激素受体基因和抑制血管形成基因等. 所以说启动子区域 CpG 岛超甲基化使肿瘤抑制基因沉默在肿瘤的发生中起着举足轻重的作用. 抑制基因表达的方法比较多, 现在最热门的是 RNA 干扰法 (RNA interfering, RNAi). 他是 Fire *et al*^[8] 在 1998 年研究 *Caenorhabditis elegans* 基因组计划时, 发现并命名的新技术: 通过导入双链 RNA (double strand RNA, dsRNA) 而产生对宿主特异性 RNA 转录的抑制, 从而抑制特异目的基因的表达. 随后此技术在全球得以广泛的开展和应用, 特别是 Elbashir *et al*^[9] 在《Nature》上发表文章证实在哺乳动物细胞中可以应用 RNAi 技术高效阻断某个特定基因的表达, 揭开了 RNAi 应用于哺乳动物细胞研究的新篇章.

科学家们已提出了 RNAi 的可能作用机制: dsRNA 或能转录产生 shRNA 的载体进入细胞被 Dicer RNase III 和其他的 dsRNA 结合因子剪切为 21 - 23 nt 的 siRNA, siRNA 双链和一些蛋白和酶如 MUT-7、RED-1、PAZ 蛋白、DNA/RNA 螺旋酶结合形成 RISC 复合物 (RNAi Inducing Silencing Complex), siRNA 引导此复合物去寻找、识别与之互补的 mRNA, siRNA 的反向 RNA 链通过 RNAi 复合物的螺旋结构域与目的 mRNA 结合, 剪切目的 mRNA, 从而阻止目的基因的表达, 而 RISC 复合物又可参加下一个 RNAi 的作用循环^[10]. 我们根据 DNMT1 基因的特点, 参照 shRNA 设计原则, 构建靶向 DNMT1 基因的 RNAi 重组载体 DNMT1-pTZU6+1. 将其转入胃癌 AGS 细胞中后发现: 该重组载体可明显抑制细胞中 DNMT1 的 mRNA 转录和蛋白表达. 该结果不仅再次证实了 RNA 干扰对特定基因表达的抑制作用, 而且还成功构建了靶向 DNMT1 基因的 RNAi 重组载体 DNMT1-

pTZU6+1, 从而为研究 DNMT1 基因和胃癌致病发病之间的关系以及为探索胃癌乃至多种肿瘤的治疗途径打下了基础。

致谢: Tong-Chuan He, 刘杞教授, 唐霓副教授, 闫歌博士, 张秉强博士, 蒲丹博士, 陶鹏博士, 卢年芳硕士等。

4 参考文献

- 1 吴汉平, 吴开春, 李玲, 么立萍, 兰梅, 王新, 樊代明. 人环氧化酶-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
- 2 邓大君, 鄂征. 胃癌病因:人 N-亚硝酰胺暴露. 世界华人消化杂志 2000;8:250-252
- 3 薛绪潮, 方国恩, 华积德. 胃癌与细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:359-361
- 4 Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management

of cancer. *Lancet Oncol* 2003; 4: 351-358

- 5 闫歌, 黄爱龙, 唐霓, 张秉强, 蒲丹, 向明确, 兰英华, 吴刚. 短发夹状 RNA 抑制 survivin 基因在肝癌细胞中的表达. 中华肝脏病杂志 2003;11:712-715
- 6 唐霓, 黄爱龙, 张秉强, 闫歌, He TC. 应用 RNA 干扰技术抑制乙型肝炎病毒抗原表达的实验研究. 中华医学杂志 2003;83:1309-1312
- 7 唐霓, 黄爱龙, 张秉强, 闫歌, 向明确, 蒲丹, 郭晖. 1.3 倍乙型肝炎病毒全基因真核表达载体的构建及在 HepG2 细胞中的表达. 中华肝脏病杂志 2003;11:464-466
- 8 Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391:806-811
- 9 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 10 Sui G, Soohoo C, Affar EB, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5515-5520

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 •

氯沙坦对肝纤维化模型鼠 Smad2/3, Smad7 表达的影响

李 乾, 张桂英, 孟燕妮

李乾, 张桂英, 孟燕妮, 中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410008 湖南省卫生厅课题资助项目, No. Y02-010

项目负责人: 李乾, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 87 号, 中南大学湘雅医院消化内科. liqian0816@hotmail.com

电话: 0731-4327106

收稿日期: 2004-07-31 接受日期: 2004-09-09

Smad7 的表达有关。

李乾, 张桂英, 孟燕妮. 氯沙坦对肝纤维化模型鼠 Smad2/3, Smad7 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2469-2471
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2469.asp>

摘要

目的: 探讨 CCl₄ 诱导的肝纤维化模型鼠肝组织 Smad2/3, Smad7 的表达及氯沙坦干预后对其表达的影响。

方法: Wistar 大鼠 40 只, 随机分成正常对照组、模型组、氯沙坦预防组和治疗组, 采用 CCl₄ 皮下注射构建肝纤维化模型. 行 HE 和 VG 染色, 判断肝组织炎症和纤维化的程度. 免疫组化方法检测各组 Smad2, 3 和 Smad7 的表达。

结果: 氯沙坦预防组和治疗组的肝组织炎症和纤维化程度明显低于模型组; Smad2/3 在氯沙坦预防组和治疗组的阳性表达均明显低于模型组(分别为 1.0900 ± 0.2767 , 1.3222 ± 0.2279 , 2.6000 ± 0.3500 $P < 0.05$); Smad7 在氯沙坦预防组和治疗组的阳性表达高于模型组(分别为 2.5000 ± 0.3464 , 2.2111 ± 0.5926 , 0.4667 ± 0.2598 ; $P < 0.05$). Smad2/3, Smad7 在氯沙坦预防组和治疗组的表达无差异性 $P > 0.05$ 。

结论: 氯沙坦抗肝纤维化作用可能与抑制 Smad2/3 和促进

0 引言

已有研究证实血管紧张素 II (Ang II) 受体拮抗剂具有抗肝纤维化作用^[1-2], 认为其可以抑制转化生长因子 $\beta 1$ (transfer growth factor beta 1, TGF $\beta 1$) 合成. Smad 家族是 TGF- $\beta 1$ 细胞内传导的通道, 有研究发现^[3-4] TGF β -Smad 信号转导通路在肝纤维化的发生发展中起着重要的作用, 同时也为肝纤维化的防治研究提供了新的有效途径. 那么 Ang II 受体拮抗剂抗肝纤维化作用是否影响 Smad 的表达? 本研究以氯沙坦干预肝纤维化模型鼠, 探讨其对 Smad2, 3 和 Smad7 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 同一品系清洁级健康 Wistar 大白鼠 40 只, 雌雄各半, 质量 (180 ± 40 g) 及普通饲料均由中南大学湘雅医学院动物学部提供; CCl₄ 购自湖南师范大学生化试剂厂。

1.2 方法 40 只大鼠按雌雄随机分成 4 组: (1) 正常对照组 10 只, 普通饮食饮水, 皮下注射 3 mL/kg 的石蜡

pTZU6+1, 从而为研究 DNMT1 基因和胃癌致病发病之间的关系以及为探索胃癌乃至多种肿瘤的治疗途径打下了基础。

致谢: Tong-Chuan He, 刘杞教授, 唐霓副教授, 闫歌博士, 张秉强博士, 蒲丹博士, 陶鹏博士, 卢年芳硕士等。

4 参考文献

- 1 吴汉平, 吴开春, 李玲, 么立萍, 兰梅, 王新, 樊代明. 人环氧化酶-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
- 2 邓大君, 鄂征. 胃癌病因:人 N-亚硝酰胺暴露. 世界华人消化杂志 2000;8:250-252
- 3 薛绪潮, 方国恩, 华积德. 胃癌与细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1999;7:359-361
- 4 Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management

of cancer. *Lancet Oncol* 2003; 4: 351-358

- 5 闫歌, 黄爱龙, 唐霓, 张秉强, 蒲丹, 向明确, 兰英华, 吴刚. 短发夹状 RNA 抑制 survivin 基因在肝癌细胞中的表达. 中华肝脏病杂志 2003;11:712-715
- 6 唐霓, 黄爱龙, 张秉强, 闫歌, He TC. 应用 RNA 干扰技术抑制乙型肝炎病毒抗原表达的实验研究. 中华医学杂志 2003;83:1309-1312
- 7 唐霓, 黄爱龙, 张秉强, 闫歌, 向明确, 蒲丹, 郭晖. 1.3 倍乙型肝炎病毒全基因真核表达载体的构建及在 HepG2 细胞中的表达. 中华肝脏病杂志 2003;11:464-466
- 8 Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391:806-811
- 9 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 10 Sui G, Soohoo C, Affar EB, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5515-5520

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 •

氯沙坦对肝纤维化模型鼠 Smad2/3, Smad7 表达的影响

李 乾, 张桂英, 孟燕妮

李乾, 张桂英, 孟燕妮, 中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410008 湖南省卫生厅课题资助项目, No. Y02-010

项目负责人: 李乾, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 87 号, 中南大学湘雅医院消化内科. liqian0816@hotmail.com

电话: 0731-4327106

收稿日期: 2004-07-31 接受日期: 2004-09-09

Smad7 的表达有关。

李乾, 张桂英, 孟燕妮. 氯沙坦对肝纤维化模型鼠 Smad2/3, Smad7 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2469-2471
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2469.asp>

摘要

目的: 探讨 CCl₄ 诱导的肝纤维化模型鼠肝组织 Smad2/3, Smad7 的表达及氯沙坦干预后对其表达的影响。

方法: Wistar 大鼠 40 只, 随机分成正常对照组、模型组、氯沙坦预防组和治疗组, 采用 CCl₄ 皮下注射构建肝纤维化模型. 行 HE 和 VG 染色, 判断肝组织炎症和纤维化的程度. 免疫组化方法检测各组 Smad2, 3 和 Smad7 的表达。

结果: 氯沙坦预防组和治疗组的肝组织炎症和纤维化程度明显低于模型组; Smad2/3 在氯沙坦预防组和治疗组的阳性表达均明显低于模型组(分别为 1.0900 ± 0.2767 , 1.3222 ± 0.2279 , 2.6000 ± 0.3500 $P < 0.05$); Smad7 在氯沙坦预防组和治疗组的阳性表达高于模型组(分别为 2.5000 ± 0.3464 , 2.2111 ± 0.5926 , 0.4667 ± 0.2598 ; $P < 0.05$). Smad2/3, Smad7 在氯沙坦预防组和治疗组的表达无差异性 $P > 0.05$ 。

结论: 氯沙坦抗肝纤维化作用可能与抑制 Smad2/3 和促进

0 引言

已有研究证实血管紧张素 II (Ang II) 受体拮抗剂具有抗肝纤维化作用^[1-2], 认为其可以抑制转化生长因子 $\beta 1$ (transfer growth factor beta 1, TGF $\beta 1$) 合成. Smad 家族是 TGF- $\beta 1$ 细胞内传导的通道, 有研究发现^[3-4] TGF β -Smad 信号转导通路在肝纤维化的发生发展中起着重要的作用, 同时也为肝纤维化的防治研究提供了新的有效途径. 那么 Ang II 受体拮抗剂抗肝纤维化作用是否影响 Smad 的表达? 本研究以氯沙坦干预肝纤维化模型鼠, 探讨其对 Smad2, 3 和 Smad7 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 同一品系清洁级健康 Wistar 大白鼠 40 只, 雌雄各半, 质量 (180 ± 40 g) 及普通饲料均由中南大学湘雅医学院动物学部提供; CCl₄ 购自湖南师范大学生化试剂厂。

1.2 方法 40 只大鼠按雌雄随机分成 4 组: (1) 正常对照组 10 只, 普通饮食饮水, 皮下注射 3 mL/kg 的石蜡

油, 1 wk 2次, 共12 wk; (2)实验模型组10只, 普通饮食饮水, 按3 mL/kg 计量, 皮下注射400 mL/L的CCl₄(CCl₄:石蜡油为2:3)油剂, 2次/wk. 生理盐水灌胃2 mL 1次/d, 共12 wk; (3)氯沙坦预防组10只, 造模条件同模型组, 造模开始即用氯沙坦按10 mg/kg(溶于2 mL 稀释液中)灌胃, 1次/d, 共12 wk; (4)氯沙坦治疗组10只, 造模条件同模型组, 造模12 wk, 从周5起给予氯沙坦, 给药剂量, 方法均同预防组, 至造模结束. 动物均在环境温度20℃左右, 明暗各12 h的清洁动物实验室内饲养. 石蜡切片予以HE染色和van Gieson (VG)染色. Smad2, 3和Smad7的免疫组化测定按试剂盒说明操作.

1.3 免疫组化半定量判断指标 采用Bresalier^[5]半定量公式稍加修改判断染色结果. 切片在10倍物镜视野下观察, 随机计数5个视野中各染色强度细胞数的百分比. 根据细胞染色强度分为四级, 并分别计分: 阴性, 细胞无着色(0分); 弱阳性, 细胞着色为浅黄色(1分); 中度阳性, 细胞着色为棕黄色(2分); 强阳性, 细胞着色为棕褐色(3分), 计算每一强度的视野数, 根据下列公式计算每张切片的平均染色强度: IS(intensity score) = $\sum \{ (0 \times F_0) + (1 \times F_1) + (2 \times F_2) + (3 \times F_3) \}$, $F_i = \%10 \times \text{视野数}$ ($i=0, 1, 2, 3$).

统计学处理 免疫组化为计量资料结果用Mean ± SD表示, 经方差齐性检验后, 用 *t* 检验对数据进行统计分析. 使用统计软件 spss10.0, 取检验水准 $\alpha=0.05$

2 结果

2.1 各组大鼠肝组织HE和VG染色 光镜下正常对照组大鼠肝组织HE染色显示肝板以中央静脉为中心条索状向四周呈放射样排列, 肝小叶内网状纤维支架完整, 分布规律; VG胶原染色仅见少许纤细纤维分布于血管壁. 实验对照组大鼠肝组织HE染色显示明显炎症, 表现为广泛的肝细胞气球样变性、脂肪变性及坏死、炎性细胞浸润, 纤维间质细胞呈束状增生, 肝细胞体积增大, 肝窦变窄、堵塞, 肝索断裂, 肝板离解, 肝小叶结构破坏; VG胶原染色见汇管区大量胶原纤维和网状纤维沉积, 相互连接形成纤维间隔, 部分重新分割肝小叶形成假小叶. 氯沙坦预防组、治疗组大鼠肝组织HE染色肝细胞坏死、脂肪变性、炎性细胞浸润等较实验组明显减轻; VG胶原染色仅于汇管区可见轻度增生的胶原纤维和网状纤维及纤维间隔吸收后的残留.

2.2 各组大鼠肝组织Smad2, 3和Smad7的表达 正常对照组肝组织可见少量Smad2, 3弱阳性表达, 主要分布于血管壁; 实验模型组Smad2, 3强阳性表达细胞数明显增多, 主要分布于纤维化汇管区及纤维间隔里的梭型细胞间质和部分肝实质细胞的胞质; 氯沙坦预防组、治疗组肝组织中仅梭型细胞间质的Smad2, 3呈中度阳性表达. 其中实验模型组阳性表达细胞的平均染色强度积分明显高于氯沙坦预防组和治疗组, 二者比较

均. $P<0.05$; 氯沙坦预防组和治疗组smad2, 3阳性表达细胞平均染色强度积分比较, $P>0.05$ 二者无显著性差异(表1).

表1 Smad2, 3和Smad7蛋白在各组间表达 (mean ± SD)

组别	<i>n</i>	Smad2/3 IS	Smad7 IS
模型组	9	2.6 000 ± 0.3 500	0.4 667 ± 0.2 598
预防组	10	1.0 900 ± 0.2 767 ^a	2.5 000 ± 0.3 464 ^a
治疗组	9	1.3 222 ± 0.2 279 ^{ac}	2.2 111 ± 0.5 926 ^{ac}
对照组	9	0.4 556 ± 0.2 068	0.2 889 ± 0.1 692

^a $P<0.05$ 预防组、治疗组 vs 模型组; ^c $P>0.05$ 预防组 vs 治疗组.

Smad7在正常对照组大鼠肝脏组织仅少量阳性表达; 实验模型组肝实质细胞呈弱阳性表达, 氯沙坦预防组、治疗组大鼠肝脏实质细胞广泛表达Smad7. 其中实验模型组Smad7阳性表达细胞平均染色强度积分明显低于氯沙坦预防组和治疗组, 分别比较二者均 $P<0.05$; 氯沙坦预防组和治疗组阳性表达细胞平均染色强度积分比较, $P>0.05$ 无显著性差异(表1).

3 讨论

目前认为TGFβ1是影响活化肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)、促进胶原等细胞外基质合成, 加剧纤维化形成的主要生物因子^[6-7]. Smad蛋白家族是TGFβ受体后信息分子, 参与调控细胞的增生、转化、合成、分泌和凋亡^[8]. TGFβ1信号传导通过Smad2和Smad3^[9]介导. Smad2与Smad3的氨基酸序列高度同源, 因此他们介导类似的信号. TGFβ1型受体(TGF beta receptor I, TβR I)激活后, Smad2和Smad3通过与TβR I短暂结合而直接发生磷酸化, 激活的Smad2, Smad3和被TβR I间接激活的Smad4聚集成共同复合物或形成数个异源二聚体. 其后, Smad复合物进入细胞核内与特异的DNA连结蛋白结合, 直接使靶基因转录^[10-12], 产生细胞生物学效应. Smad7是TGFβ信号的拮抗因子, 能够牢固的与TβR I结合, 使之无法将Smad2磷酸化, 从而阻断TGFβ信号的转导途径, 具有与其他信息分子不同的负性调节作用^[13]. 在肝脏, 他表现为抑制HSC的转化和胶原等细胞外基质的合成与分泌^[14-16].

Hayashi *et al*^[13]对肝炎后肝纤维化的肝组织石蜡块检测发现, HSC中Smad2/3和Smad7的表达明显高于正常对照组. 国内CCL₄诱导的大鼠肝纤维化模型的研究显示^[17], 随着肝纤维化病程进展, 检测HSC的Smad3 RNA含量显著高于正常肝脏HSC, 但肝纤维化各个时期之间比较差异无显著性. 而在此过程中, Smad7 RNA表现为先高后低的特征, 即在肝纤维化初期, Smad7 RNA明显高于正常肝脏; 随后, Smad7 RNA的表达不断降低^[18].

有关氯沙坦抗纤维化的作用机制目前已有不少实

验依据。Ang II可引起HSC收缩,促进其增生,是HSC的分裂原之一^[19-20]。Ang II是通过其I型受体(ATR1)作用于HSC而产生作用的^[21]。同时,Ang II还能刺激TGF β 1的合成和分泌,通过TGF β 1间接刺激HSC分泌细胞外基质^[22]。氯沙坦作为ATR1阻断剂,就是通过阻断上述途径从而延缓肝纤维化的发展。

我们发现,氯沙坦预防及治疗组与模型组比较,大鼠肝组织坏死程度及空泡变性均有明显改善,纤维间隔增生受到抑制。Smad2/3蛋白在肝脏细胞表达水平明显降低($P<0.05$),而Smad7蛋白表达却显著性增加($P<0.05$),提示氯沙坦通过阻断纤维化肝组织中TGF β 1信号传导途径,即抑制Smad2/3蛋白表达,增加Smad7蛋白表达,从而在一定程度上延缓肝纤维化的发展。预防组与治疗组相比,Smad2/3、Smad7蛋白表达均无显著差异($P>0.05$),可能与样本量小有关。我们的研究为氯沙坦防治肝纤维化提供了一定的实验依据,其更深层的作用机制有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Tuncer I, Ozbek H, Ugras S, Bayram I. Anti-fibrogenic effects of captopril and candesartan cilexetil on the hepatic fibrosis development in rat. The effect of AT1-R blocker on the hepatic fibrosis. *Exp Toxicol Pathol* 2003;55:159-166
- 2 Nie L, Imamura M, Itoh H, Ueno H. Pitavastatin enhances the anti-fibrogenesis effects of candesartan, an angiotensin II receptor blocker, on CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *J UOEH* 2004;26:165-177
- 3 Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis in vivo and hepatic stellate cell line in vitro. *Pathol Int* 2003;53:18-26
- 4 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. TGF β -Smad 信号转导通路与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2003;11:1601-1605
- 5 Bresalier RS, Ho SB, Schoeppner HL, Kim YS, Sleisenger MH, Brodt P, Byrd JC. Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology* 1996;110:1354-1367
- 6 Kondou H, Mushiaki S, Etani Y, Miyoshi Y, Michigami T, Ozono K. A blocking peptide for transforming growth factor-beta1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo. *J Hepatol* 2003;39:742-748
- 7 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-807
- 8 Ungefroren H, Lenschow W, Chen WB, Faendrich F, Kalthoff H. Regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta requires MKK6-p38 mitogen-activated protein Kinase signaling downstream of Smad signaling. *J Biol Chem* 2003;278:11041-11049
- 9 Mori S, Matsuzaki K, Yoshida K, Furukawa F, Tahashi Y, Yamagata H, Sekimoto G, Seki T, Matsui H, Nishizawa M, Fujisawa J, Okazaki K. TGF-beta and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* 2004;23:7416-7429
- 10 Roberts AB, Russo A, Felici A, Flanders KC. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci* 2003;995:1-10
- 11 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
- 12 Lee DK, Park SH, Yi Y, Choi SG, Lee C, Parks WT, Cho H, de Caestecker MP, Shaul Y, Roberts AB, Kim SJ. The hepatitis B virus encoded oncoprotein pX amplifies TGF-beta family signaling through direct interaction with Smad4: potential mechanism of hepatitis B virus-induced liver fibrosis. *Genes Dev* 2001;15:455-466
- 13 Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associated with the TGF-beta receptor and functions as an antagonist of TGF beta signaling. *Cell* 1997;89:1165-1173
- 14 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003;125:178-191
- 15 Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002; 35:49-61
- 16 Weinstein M, Monga SP, Liu Y, Li C, Brodie SG, Tang Y, Li C, Mishra L, Deng CX. Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development. *Mol Cell Biol* 2001;21:5122-5131
- 17 张国, 王天才, 唐望先, 王颖, 李勤, 梁扩寰. Smad3、Smad7 基因表达与肝纤维化发病关系研究. *中华消化杂志* 2002;22:647-650
- 18 吴建新, 孟祥军, 陈源文, 程计林, 李定国, 陆汉明. Smad7 与转化生长因子 β 1 受体后信息调控. *中华肝病杂志* 2003;11:315-317
- 19 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
- 20 Zhang YJ, Yang XS, Wu PS, Li X, Zhang XF, Chen XQ, Yu ZX. Effects of angiotensin II and losartan on the growth and proliferation of hepatic stellate cells. *Diyi Junyi Daxue Xuebao* 2003;23:219-221
- 21 Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Cheng JL, Xu QF. The regulatory role of AT 1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl₄(4). *World J Gastroenterol* 2000; 6:824-828
- 22 Dixon JB, Bhathal PS, Jonsson JR, Dixon AF, Powell EE, O'Brien PE. Pro-fibrotic polymorphisms predictive of advanced liver fibrosis in the severely obese. *J Hepatol* 2003;39:967-971

抗纤复方 I 号对肝星状细胞细胞外基质及其降解酶表达的影响

林 红, 张义侠, 李异玲, 崔 巍, 王炳元, 傅宝玉

林红, 张义侠, 李异玲, 崔巍, 王炳元, 傅宝玉, 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: 傅宝玉, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化内科. linhong69@hotmail.com
电话: 024-23266384
收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-08-25

摘要

目的:研究乙醛对肝星状细胞(HSC)细胞外基质(ECM)及其降解酶表达的影响及中药抗纤复方 I 号(KXI)的干预作用。

方法:大鼠 HSC 体外原代及传代培养, 大鼠灌以 KXI 制备药物血清, 用乙醛及药物血清处理 HSC. 以放射免疫分析法及 RT-PCR 分别检测培养上清中层粘连蛋白(LN)及 HSC 中 $\alpha 1(I)$, $\alpha 1(IV)$ 型胶原及基质金属蛋白酶-1, 2(MMP-1, 2) mRNA 的表达。

结果:培养上清中 LN 含量在 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙醛处理 24 h 后显著增加 (52.0 ± 12.1 vs 10.0 ± 0.3 , $P < 0.01$), 100 mL/L 药物血清起抑制作用 (19.2 ± 7.8 vs 52.0 ± 12.1 , $P < 0.01$); 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙醛刺激 HSC $\alpha 1(I)$ 型胶原及 MMP-2 mRNA 的表达明显增强, 100 mL/L 药物血清抑制其作用; 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙醛减弱 HSC $\alpha 1(IV)$ 型胶原及 MMP-1 mRNA 的表达, 100 mL/L 药物血清则使二者表达有所增强。

结论:KXI 能抑制乙醛刺激的 HSC 中 LN 的分泌, $\alpha 1(I)$ 型胶原及 MMP-2 mRNA 的表达; 而增强乙醛所抑制的 HSC 中 $\alpha 1(IV)$ 型胶原及 MMP-1 mRNA 的表达。

林红, 张义侠, 李异玲, 崔巍, 王炳元, 傅宝玉. 抗纤复方 I 号对肝星状细胞细胞外基质及其降解酶表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2472-2475
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2472.asp>

0 引言

在酒精性肝纤维化和肝硬化形成过程中, 肝星状细胞(HSC)起重要作用, 中药复方的多途径、多层次、多靶点的综合药理作用在抗肝纤维化治疗中显示出独特的优势. 我们观察了抗纤复方 I 号(KXI)对乙醛刺激的大鼠 HSC 分泌 LN, $\alpha 1(I)$, $\alpha 1(IV)$ 型胶原及合成 MMP-1, 2 的影响, 以期阐述 KXI 抗酒精性肝纤维化的部分作用机制, 为临床酒精性肝病 (ALD) 的中药治疗提供更多的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 中药 KXI(由丹参、黄芪、红花、汉防己、葛根、桃仁、甘草等 10 味药物组成)购于省医药公司; 大鼠肝脏原位灌流消化所需的链霉蛋白酶、IV 型胶原

酶及密度梯度递质 Nycodenz 均为 Sigma 产品; Desmin 抗体、免疫细胞化学试剂盒购自华美公司; LN 放射免疫测定试剂盒购于上海海军医学研究所; RT-PCR 试剂盒购于大连宝生物工程有限公司; $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 1(IV)$ 型胶原、MMP-1、2 及 β -actin 引物均由北京奥科公司合成. 用 2.7 kg/L KXI 生药 11 mL/kg 给大鼠灌服, 每天 1 次, 持续给药 1 wk, 末次给药后 1 h 无菌条件下由下腔静脉取血, 取血清, 56 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 30 min, 分装 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存. 另选正常大鼠喂以等量生理盐水, 以同样方法制备正常血清作对照用. 肝星状细胞分离、培养及鉴定参照宋少刚 *et al*^[1] 报道的大鼠肝脏原位灌流消化的方法分离 HSC. 细胞得率约为 1×10^7 /肝, 经台盼蓝染色细胞存活率 90% 以上. 将细胞爬片用兔抗人 Desmin 抗体、SP 法作免疫细胞化学染色以鉴定 HSC, 胞质阳染者为 HSC, 传代的 HSC 纯度 >98%. 本次实验采用传 2-4 代 HSC.

1.2 方法 放免法测定 LN 含量以 1×10^6 /瓶浓度接种在培养瓶(25 cm^2)中的传代的 HSC 长满单层后, 分为正常血清对照组、正常血清 + 乙醛组及药物血清 + 乙醛组. 正常血清及药物血清加入无血清 DMEM 培养液中, 制成浓度为 100 mL/L 的正常血清及药物血清孵育液, 乙醛组加入乙醛后使终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, 培养瓶均用封口膜封严, 培养 24 h 后收集培养上清, 严格按说明操作. JC-1200 放射免疫 γ 计数仪上直接测定 LN 含量($\mu\text{g/L}$), 取均值. HSC 处理后, 提取 6 h 和 24 h 的总 RNA 并逆转录成 cDNA. 引物序列及扩增产物片段(见表 1). 总体积 25 μL , $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 1(IV)$ 型胶原反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 变性 \rightarrow 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s \rightarrow $\alpha 1(I)$ 62 $^{\circ}\text{C}$ 1 min ($\alpha 1(IV)$ 65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min) \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min 终止反应; MMP-1

表 1 PCR 引物序列

引物名称	引物序列	PCR 产物位置
MMP-1-F	5' -TGGAGCCCTGATGTTTCCCATCTA -3'	753 bp
MMP-1-R	5' -CGTAACCCTAATAGTCTTTGTCCATA -3'	
MMP-2-F	5' -TCAACGGTCGGGAATACA -3'	307 bp
MMP-2-R	5' -CCCACAGTGGACATAGCG -3'	
$\alpha 1(I)$ -F	5' -CCGTGGTGACAAGGCTGAGACAG -3'	471 bp
$\alpha 1(I)$ -R	5' -TCAGGGCTGCGGATGTTCTCA -3'	
$\alpha 1(IV)$ -F	5' -CAGGTCTCTGCTCAGAGCCACCG -3'	222 bp
$\alpha 1(IV)$ -R	5' -CGGCTGCGCTCCTCGTGG -3'	
β -actin-F	5' -GATTGCTCAGGACATTTCTG -3'	690 bp
β -actin-R	5' -GATTGCTCAGGACATTTCTG -3'	

反应条件: 94 °C 3 min 变性→94 °C 30 s→55 °C 1 min→72 °C 2 min, 共 35 个循环, 72 °C 5 min 终止反应; MMP-2 反应条件: 94 °C 3 min 变性→94 °C 45 s→52 °C 1 min→72 °C 1 min, 共 35 个循环, 72 °C 7 min 终止反应. PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳、摄影、密度扫描(1D Kodak 成像分析系统), 然后用其表达量与对应的 β -actin 表达量进行比较.

统计学处理 各组数据以均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 两两均数的比较用 *t* 检验.

2 结果

2.1 药物血清对 HSC 分泌 LN 的影响 100 μ mol/L 乙醛及 100 mL/L 药物血清对 HSC 形态和生长无影响. 正常血清对照组 LN 分泌量为(10.0 \pm 0.3 μ g/L), 正常血清 + 乙醛组为(52.0 \pm 12.1 μ g/L)(与对照组比 $P < 0.01$, $t = 4.53$),

药物血清 + 乙醛组为(19.2 \pm 7.8 μ g/L)(与正常血清 + 乙醛组比 $P < 0.01$, $t = 4.61$).

2.2 药物血清对 HSC $\alpha 1$ (I)、 $\alpha 1$ (IV)型胶原 mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示, 乙醛浓度为 100 μ mol/L 时, 刺激 HSC 6 h $\alpha 1$ (I)型胶原 mRNA 表达显著增加, 至 24 h 仍有较强的信号, 100 mL/L 药物血清能明显抑制 $\alpha 1$ (I)型胶原 mRNA 表达(图 1); 而乙醛刺激 HSC 6 h 后, $\alpha 1$ (IV)型胶原 mRNA 表达明显减弱, 100 mL/L 药物血清则使其表达有所增强(图 2).

2.3 药物血清对 HSC MMP-1 及 MMP-2 mRNA 表达的影响 MMP-1 在对照组 HSC 中有弱表达, 乙醛处理 6 h 后表达明显减弱, 而 100 mL/L 药物血清使其表达信号有所增强(图 3); HSC 中 MMP-2 mRNA 信号在乙醛刺激 6 h 后显著增高, 持续至 24 h, 药物血清能明显抑制其表达的增高(图 4).

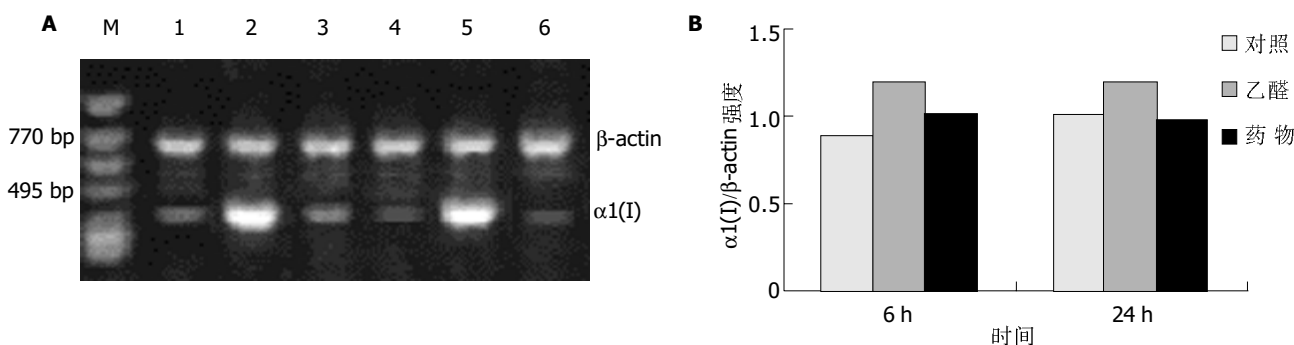


图1 HSC 中 $\alpha 1$ (I)型胶原 mRNA 表达. A: M 为 Marker, 1、2、3 分别为 6 h 时对照组, 乙醛组和药物 + 乙醛组, 4、5、6 分别为 24 h 时对照组, 乙醛组和药物 + 乙醛组; B: $\alpha 1$ (I)型胶原及 β -actin PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳、密度扫描后的强度比.

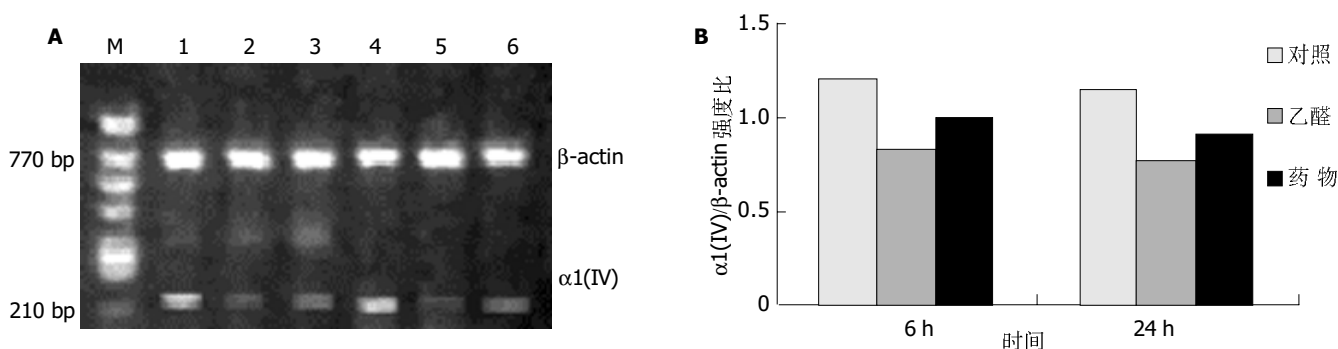


图2 HSC 中 $\alpha 1$ (IV)型胶原 mRNA 表达. A: M 为 Marker, 1、2、3 分别为 6 h 时对照组, 乙醛组和药物 + 乙醛组, 4、5、6 分别为 24 h 时对照组, 乙醛组和药物 + 乙醛组; B: $\alpha 1$ (IV)型胶原及 β -actin PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳、密度扫描后的强度比.

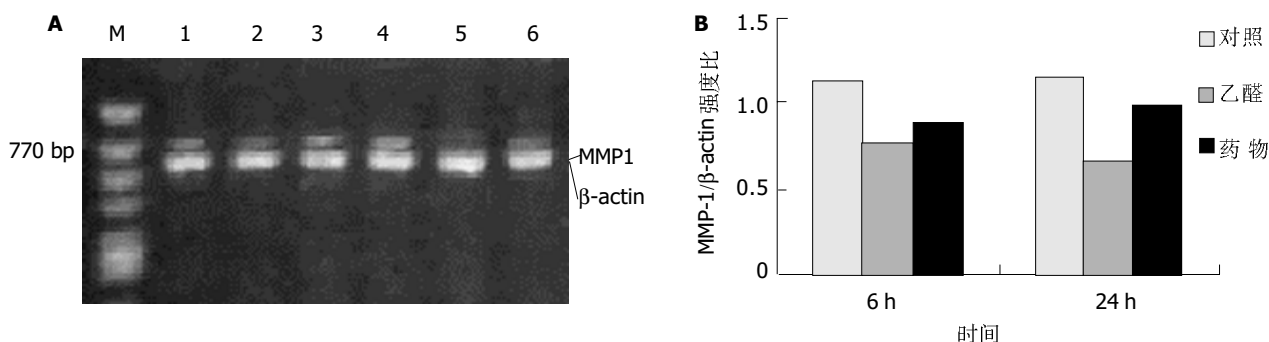


图3 HSC 中 MMP-1 mRNA 表达. A: M 为 Marker, 1、2、3 分别为 6 h 时对照组, 乙醛组和药物 + 乙醛组, 4、5、6 分别为 24 h 时对照组, 乙醛组和药物 + 乙醛组; B: MMP-1 及 β -actin PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳、密度扫描后的强度比.

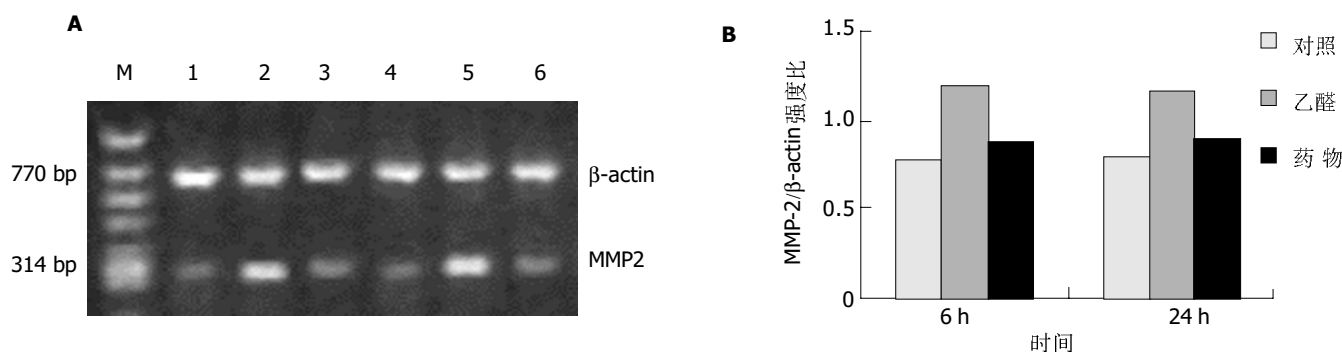


图4 HSC中MMP-2mRNA表达. A: M为Marker, 1、2、3分别为6h时对照组, 乙醇组和药物+乙醇组, 4、5、6分别为24h时对照组, 乙醇组和药物+乙醇组; B: MMP-2及 β -actin PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳、密度扫描后的强度比.

3 讨论

ECM合成增加、降解减少导致肝纤维化的发生和发展^[2-3]. ECM包括胶原、非胶原糖蛋白及蛋白多糖等, 胶原是ECM的主要成分. HSC的活化是肝纤维化发生的中心环节, 是分泌合成胶原的主要细胞^[4]. LN为非胶原蛋白, 与IV型胶原相连构成非连续性的功能性基底膜. 对维持肝脏正常结构、微循环及肝脏细胞功能有重要作用, 亦使HSC处于静止状态. DMN诱导的大鼠肝纤维化^[5], LN和I型胶原明显增加; ALD者I型胶原表达增加^[6-7], PIIINP, HA及LN表达亦增加^[8-12], 戒酒后LN明显下降^[13]. 尽管也有相反的报道^[14-15]. MMPs是体内生理或病理条件下降解ECM的主要酶系, 其在肝纤维化发生和发展中起重要的作用^[16-17]. MMPs可分成间质胶原酶(MMP-1)、明胶酶又称IV型胶原酶(包括MMP-2和MMP-9)及基质分解素三大类, MMP-1主要降解I、III型胶原, IV型胶原酶主要降解IV型胶原. 目前已发现有三种MMPs可以降解正常内皮下基质: MMP-2, MMP-9和MMP-3, 若他们活性增高, 同时MMP-1活性下降, 可引起胶原纤维沉积于Disse腔, 导致肝窦“毛细血管化”, 血液交换发生障碍, 肝细胞功能受损, 并活化HSC, 产生大量ECM, 引起肝纤维化. 研究表明, 肝硬化患者MMP-2, 9及胶原表达明显增加^[18-20], 有人提出PIIINP及MMP-1, 2可作为评价肝硬化轻重的指标^[21]. ALD者肝窦周出现纤维化, 肝窦毛细血管化^[22], 肝脏MMP-2, 9表达增加^[23].

在ALD发病机制中, 乙醇在肝细胞内代谢产生的毒性代谢产物乙醛、乙醛蛋白加合物及引起的代谢紊乱是导致酒精性肝损伤的主要原因^[24]. 应用ALD动物模型^[25]研究发现, 随着ALD的进展, MMP-2及MMP-9水平呈进行性增加^[26], TIMP-1表达亦随病变进展而逐渐增加^[27]; 乙醛能刺激HSC增生, PCIII分泌明显增加^[28]; 随着给大鼠乙醇灌胃时间的延长, 肝窦内皮细胞窗孔数减少, 直径减小, 进而消失, 成为肝窦毛细血管化的基础^[29]. 本结果表明, MMP-1在对照组HSC中表达较弱, 而MMP-2则表达相对较强, 100 μ mol/L乙醛能上调MMP-2 mRNA表达, 抑制MMP-1 mRNA表达; 与之相反, 经乙醛刺激后 α 1(IV)型胶原 mRNA表达减弱, α 1(I)型胶原 mRNA表达增强, 这与国外研究结

果基本一致^[30]; 同时乙醛能增加LN的分泌. 由此提示乙醛通过增加HSC中MMP-2表达, 减少MMP-1表达, 促进ECM中I型胶原积聚、LN的分泌及Disse腔中IV型胶原的降解, 破坏正常基底膜, 加速肝窦“毛细血管化”及肝纤维化的发生. 而活血化瘀类中药在酒精性肝病动物模型及人肝硬化防治中表现出一定作用, Zhu *et al*^[31]报道861合剂能抑制实验鼠肝纤维化中MMP-2mRNA表达, 但其活性增高; 另有研究表明^[32], 中药能通过减少HSC中TIMP表达而提高MMP-2及IV型胶原的表达. 我们的研究显示^[33-34], 由活血化瘀类药物组成的KXI有良好的抗大鼠ALD的作用, 他能抑制血清中HA的增高, 减少肝组织中丙二醛的产生, 并保持超氧化物歧化酶高水平不降, 抑制HSC结构的破坏及肝脏纤维条索的形成. 我们发现KXI可能通过上调MMP-1表达, 下调MMP-2表达, 从而减少I型胶原积聚、LN的分泌及IV型胶原的降解, 从而减缓或抑制ECM的积聚、肝窦“毛细血管化”及ALD的发生和发展.

4 参考文献

- 1 宋少刚, 杨雁, 陈敏珠. 大鼠肝贮脂细胞、枯否细胞的同时分离和培养. *中国临床药理学与治疗学* 2000;5:351-353
- 2 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
- 3 Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001;21:351-372
- 4 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250
- 5 Wang XB, Liu P, Tang ZP, Lu X, Liu CH, Hu YY, Xu LM, Gu HT, Liu C. The role of changes of MMP-2, 9 activity in the development of liver fibrosis in rats. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2004;12:267-270
- 6 Nieto N, Greenwel P, Friedman SL, Zhang F, Dannenberg AJ, Cederbaum AI. Ethanol and arachidonic acid increase alpha 2(I) collagen expression in rat hepatic stellate cells overexpressing cytochrome P450 2E1. Role of H₂O₂ and cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000;275:20136-20145
- 7 Lieber CS, Leo MA, Cao Q, Ren C, DeCarli LM. Silymarin retards the progression of alcohol-induced hepatic fibrosis in baboons. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:336-339
- 8 Castera L, Hartmann DJ, Chapel F, Guettier C, Mall F, Lons T, Richardet JP, Grimbirt S, Morassi O, Beaugrand M, Trinchet JC. Serum laminin and type IV collagen are accurate markers of histologically severe alcoholic hepatitis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2000;32:412-418

- 9 Kato J, Sato Y, Inui N, Nakano Y, Takimoto R, Takada K, Kobune M, Kuroiwa G, Miyake S, Kohgo Y, Niitsu Y. Ethanol induces transforming growth factor- α expression in hepatocytes, leading to stimulation of collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27(8 Suppl):58S-63S
- 10 Nojgaard C, Johansen JS, Christensen E, Skovgaard LT, Price PA, Becker U; EMALD Group. Serum levels of YKL-40 and PIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2003;39:179-186
- 11 Gutierrez-Ruiz MC, Bucio L, Correa A, Souza V, Hernandez E, Gomez-Quiroz LE, Kershenovich D. Metadoxine prevents damage produced by ethanol and acetaldehyde in hepatocyte and hepatic stellate cells in culture. *Pharmacol Res* 2001; 44:431-436
- 12 Stickel F, Urbaschek R, Schuppan D, Poeschl G, Oesterling C, Conradt C, McCuskey RS, Simanowski UA, Seitz HK. Serum collagen type VI and XIV and hyaluronic acid as early indicators for altered connective tissue turnover in alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 2001;46:2025-2033
- 13 Ponomarenko Y, Leo MA, Kroll W, Lieber CS. Effects of alcohol consumption on eight circulating markers of liver fibrosis. *Alcohol Alcohol* 2002;37:252-255
- 14 Cheng ML, Wu J, Zhang WS, Wang HQ, Li CX, Huang NH, Yao YM, Ren LG, Ye L, Li L. Effect of Maotai liquor on the liver: an experimental study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:93-98
- 15 Cheng ML, Wu J, Wang HQ, Xue LM, Tan YZ, Ping L, Li CX, Huang NH, Yao YM, Ren LZ, Ye L, Li L, Jia ML. Effect of Maotai liquor in inducing metallothioneins and on hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:520-523
- 16 Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245-249
- 17 Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Arai M, Maruyama K. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):D26-32
- 18 Kuyvenhoven JP, Verspaget HW, Gao Q, Ringers J, Smit VT, Lamers CB, van Hoek B. Assessment of serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 after human liver transplantation: increased serum MMP-9 level in acute rejection. *Transplantation* 2004;77:1646-1652
- 19 Kuyvenhoven JP, van Hoek B, Blom E, van Duijn W, Hanemaaijer R, Verheijen JH, Lamers CB, Verspaget HW. Assessment of the clinical significance of serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in patients with various chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Thromb Haemost* 2003;89:718-725
- 20 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000;113:443-453
- 21 Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, Morel F, Zarski JP. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004;99:271-279
- 22 Xu GF, Wang XY, Ge GL, Li PT, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes of capillarization and peri-sinusoid fibrosis in alcoholic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2004; 10:238-243
- 23 Kwon OS, Lim do Y, Kwon KA, Chung MG, Park DK, Kim SS, Kim YS, Kwon SY, Koo YS, Kim YK, Choi DJ, Kim JH, Hwang YJ, Byun KS, Lee CH. Clinical usefulness of plasma activities of gelatinase (matrix metalloproteinase-2 and 9) in chronic liver disease. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003;9:222-230
- 24 Li CJ, Nanji AA, Siakotos AN, Lin RC. Acetaldehyde-modified and 4-hydroxynonenal-modified proteins in the livers of rats with alcoholic liver disease. *Hepatology* 1997;26:650-657
- 25 林红, 吕淼, 张义侠, 王炳元, 傅宝玉. 酒精性肝病大鼠模型的建立. *世界华人消化杂志* 2001;9:24-28
- 26 Lu X, Wang B, Xie Y, Liu C, Fu B. Dynamic change and expression of matrix metalloproteinase-2, -9 in alcoholic liver disease in rats. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:268-270
- 27 吕晓辉, 谢艳华, 傅宝玉, 刘春荣, 王炳元. 基质金属蛋白酶抑制剂-1 在实验性酒精性肝病中的动态表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:29-33
- 28 林红, 傅宝玉, 王炳元, 傅伟昕, 李异玲, 崔巍. 抗纤复方 I 号对乙醛刺激的肝星状细胞增生、胶原合成的干预. *中华肝脏病杂志* 2003;11:693-694
- 29 王炳元, 傅宝玉, 张健, 鞠晓华, 曹艳雪. 乙醇对大鼠肝窦内皮细胞窗孔的影响. *中华肝脏病杂志* 2004;12:479-481
- 30 Casini A, Ceni E, Salzano R, Milani S, Schuppan D, Surrenti C. Acetaldehyde regulates the gene expression of matrix metalloproteinase-1 and-2 human fat-storing cells. *Life Science* 1994;55:1311-1316
- 31 Zhu Y, Yin C, Ma X, Ma H, Jia J, Wang B. The effect of herbal compound 861 on mRNA levels of MMP-2 and its activities in experimental rats liver fibrosis. *Zhonghua Shiyao He Linchuangbingduxue Zazhi* 2002;16:348-350
- 32 Sakaida I, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Yamasaki T, Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell. *Life Sci* 2004;74:2251-2263
- 33 崔巍, 李芳久, 王炳元, 曹艳雪, 傅宝玉. 抗纤复方 I 号对实验性酒精性肝病大鼠 HA、IV-C 的影响. *中国医科大学学报* 2001;30 (增刊):64-65
- 34 崔巍, 苏晓林, 傅宝玉. 抗纤复方 I 号抗酒精性肝病的实验研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1245-1249

5- 氟尿嘧啶联合 L- 精氨酸治疗裸鼠人肝癌移植瘤及其机制

尹晓燕, 姜军梅, 朱菊人

尹晓燕, 姜军梅, 朱菊人, 山东大学山东省立医院消化内科
山东省济南市 250021
山东省优秀青年科学家奖励基金资助项目, No. 2000BB2DBA1
项目负责人: 姜军梅, 250021, 山东省济南市, 山东大学山东省立医院消化内科. jiangjunm@hotmail.com
电话: 0531-7938911-2355
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 观察5-FU联合L-Arg对裸鼠人肝癌移植瘤的作用并探讨其作用机制。

方法: 采用BEL-7402细胞株建立裸鼠人肝癌移植瘤模型, 分

- 9 Kato J, Sato Y, Inui N, Nakano Y, Takimoto R, Takada K, Kobune M, Kuroiwa G, Miyake S, Kohgo Y, Niitsu Y. Ethanol induces transforming growth factor- α expression in hepatocytes, leading to stimulation of collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27(8 Suppl):58S-63S
- 10 Nojgaard C, Johansen JS, Christensen E, Skovgaard LT, Price PA, Becker U; EMALD Group. Serum levels of YKL-40 and PIIINP as prognostic markers in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2003;39:179-186
- 11 Gutierrez-Ruiz MC, Bucio L, Correa A, Souza V, Hernandez E, Gomez-Quiroz LE, Kershenovich D. Metadoxine prevents damage produced by ethanol and acetaldehyde in hepatocyte and hepatic stellate cells in culture. *Pharmacol Res* 2001; 44:431-436
- 12 Stickel F, Urbaschek R, Schuppan D, Poeschl G, Oesterling C, Conradt C, McCuskey RS, Simanowski UA, Seitz HK. Serum collagen type VI and XIV and hyaluronic acid as early indicators for altered connective tissue turnover in alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 2001;46:2025-2033
- 13 Ponomarenko Y, Leo MA, Kroll W, Lieber CS. Effects of alcohol consumption on eight circulating markers of liver fibrosis. *Alcohol Alcohol* 2002;37:252-255
- 14 Cheng ML, Wu J, Zhang WS, Wang HQ, Li CX, Huang NH, Yao YM, Ren LG, Ye L, Li L. Effect of Maotai liquor on the liver: an experimental study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:93-98
- 15 Cheng ML, Wu J, Wang HQ, Xue LM, Tan YZ, Ping L, Li CX, Huang NH, Yao YM, Ren LZ, Ye L, Li L, Jia ML. Effect of Maotai liquor in inducing metallothioneins and on hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:520-523
- 16 Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245-249
- 17 Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Arai M, Maruyama K. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15(Suppl):D26-32
- 18 Kuyvenhoven JP, Verspaget HW, Gao Q, Ringers J, Smit VT, Lamers CB, van Hoek B. Assessment of serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 after human liver transplantation: increased serum MMP-9 level in acute rejection. *Transplantation* 2004;77:1646-1652
- 19 Kuyvenhoven JP, van Hoek B, Blom E, van Duijn W, Hanemaaijer R, Verheijen JH, Lamers CB, Verspaget HW. Assessment of the clinical significance of serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in patients with various chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Thromb Haemost* 2003;89:718-725
- 20 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000;113:443-453
- 21 Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, Morel F, Zarski JP. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004;99:271-279
- 22 Xu GF, Wang XY, Ge GL, Li PT, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes of capillarization and peri-sinusoid fibrosis in alcoholic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2004; 10:238-243
- 23 Kwon OS, Lim do Y, Kwon KA, Chung MG, Park DK, Kim SS, Kim YS, Kwon SY, Koo YS, Kim YK, Choi DJ, Kim JH, Hwang YJ, Byun KS, Lee CH. Clinical usefulness of plasma activities of gelatinase (matrix metalloproteinase-2 and 9) in chronic liver disease. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003;9:222-230
- 24 Li CJ, Nanji AA, Siakotos AN, Lin RC. Acetaldehyde-modified and 4-hydroxynonenal-modified proteins in the livers of rats with alcoholic liver disease. *Hepatology* 1997;26:650-657
- 25 林红, 吕淼, 张义侠, 王炳元, 傅宝玉. 酒精性肝病大鼠模型的建立. 世界华人消化杂志 2001;9:24-28
- 26 Lu X, Wang B, Xie Y, Liu C, Fu B. Dynamic change and expression of matrix metalloproteinase-2, -9 in alcoholic liver disease in rats. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9:268-270
- 27 吕晓辉, 谢艳华, 傅宝玉, 刘春荣, 王炳元. 基质金属蛋白酶抑制剂-1 在实验性酒精性肝病中的动态表达. 世界华人消化杂志 2001;9:29-33
- 28 林红, 傅宝玉, 王炳元, 傅伟昕, 李异玲, 崔巍. 抗纤复方 I 号对乙醛刺激的肝星状细胞增生、胶原合成的干预. 中华肝脏病杂志 2003;11:693-694
- 29 王炳元, 傅宝玉, 张健, 鞠晓华, 曹艳雪. 乙醇对大鼠肝窦内皮细胞窗孔的影响. 中华肝脏病杂志 2004;12:479-481
- 30 Casini A, Ceni E, Salzano R, Milani S, Schuppan D, Surrenti C. Acetaldehyde regulates the gene expression of matrix metalloproteinase-1 and-2 human fat-storing cells. *Life Science* 1994;55:1311-1316
- 31 Zhu Y, Yin C, Ma X, Ma H, Jia J, Wang B. The effect of herbal compound 861 on mRNA levels of MMP-2 and its activities in experimental rats liver fibrosis. *Zhonghua Shiyao He Linchuangbingduxue Zazhi* 2002;16:348-350
- 32 Sakaida I, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Yamasaki T, Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell. *Life Sci* 2004;74:2251-2263
- 33 崔巍, 李芳久, 王炳元, 曹艳雪, 傅宝玉. 抗纤复方 I 号对实验性酒精性肝病大鼠 HA、IV-C 的影响. 中国医科大学学报 2001;30 (增刊):64-65
- 34 崔巍, 苏晓林, 傅宝玉. 抗纤复方 I 号抗酒精性肝病的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1245-1249

5- 氟尿嘧啶联合 L- 精氨酸治疗裸鼠人肝癌移植瘤及其机制

尹晓燕, 姜军梅, 朱菊人

尹晓燕, 姜军梅, 朱菊人, 山东大学山东省立医院消化内科
山东省济南市 250021
山东省优秀青年科学家奖励基金资助项目, No. 2000BB2DBA1
项目负责人: 姜军梅, 250021, 山东省济南市, 山东大学山东省立医院消化内科. jiangjunm@hotmail.com
电话: 0531-7938911-2355
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 观察5-FU联合L-Arg对裸鼠人肝癌移植瘤的作用并探讨其作用机制。

方法: 采用BEL-7402细胞株建立裸鼠人肝癌移植瘤模型, 分

别给裸鼠 ip 生理盐水, 5-FU, 5-FU+L-Arg, 观察各组药物对肿瘤的抑制作用, 病理学观察移植瘤的坏死程度和范围. 免疫组化测定移植瘤组织内 iNOS 的表达. 统计分析采用 SPSS10.0 软件进行 one-way ANOVA, Kruskal-Wallis H 检验.

结果: 5-FU 联合 L-Arg 能明显增加对肿瘤生长的抑制作用, 对照组, 5-FU 组、5-FU+L-Arg 组的肿瘤体积增长分别为 257.978 ± 59.0 、 172.232 ± 66.0 、 $91.523 \pm 26.7 \text{ mm}^3$, 方差分析 F 值为 30.241, $^aP < 0.05$; $^bP < 0.05$, vs A,C; $^cP < 0.05$, vs B,C. 肿瘤的坏死范围与用药有明显关系, 5-FU+L-Arg 组的坏死范围最大($\chi^2 = 15.963$, $P < 0.05$), 5-FU 组、5-FU+L-Arg 组的 iNOS 表达均明显增加, 且 5-FU+L-Arg 组增加更加明显, 与对照组比较 $P < 0.05$.

结论: 5-FU 联合 L-Arg 能够抑制裸鼠人肝癌移植瘤的生长, 其机制可能与诱导一氧化氮合酶合成, NO 生成增加有关.

尹晓燕, 姜军梅, 朱菊人. 5-氟尿嘧啶联合 L-精氨酸治疗裸鼠人肝癌移植瘤及其机制. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2475-2478
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2475.asp

0 引言

L-精氨酸是一氧化氮合酶的底物, 可以生成一氧化氮(NO), 所产生的 NO 作为自由基气体小分子具有两种不同的生物学效能. NO 通过激活可溶性鸟苷酸环化酶合成 cGMP 发挥其生理调节作用, 又具有细胞毒作用, 许多研究认为 NO 可通过调节信号传导抑制肿瘤的生长繁殖^[1-3]. 我们在体外实验中证实, NO 在 5-FU 诱导 BEL-7402 细胞凋亡中发挥作用, 联合 L-Arg 能增加肝癌细胞的凋亡^[4]. 但关于 NO 在体内抗肿瘤作用研究较少. 对裸鼠人肝癌模型用 5-FU 进行化疗的同时补充 L-精氨酸, 探讨 L-Arg/NO 的体内抗肿瘤作用.

1 材料和方法

1.1 材料 兔抗人 iNOS 多克隆抗体, SABC 试剂盒, DAB 显色试剂, 武汉博士德生物工程公司产品; DMEM 高糖培养基 Gibco 公司产品; 新生小牛血清, 杭州四季青公司产品. 5-FU 注射液, 上海旭东海普药业有限公司; L-Arg 注射液, 上海信谊金朱药业有限公司. BEL7402 肝癌细胞株购于山东省医学科学院基础研究所. Balb/c 裸鼠由山东大学动物研究中心提供.

1.2 方法 BEL7402 细胞培养于 37°C , 50 mL/LCO₂ 的孵箱内, 培养基为含有 100 mL/L 新生小牛血清, 青霉素 100 KU/L, 链霉素 100 mg/L 的高糖 DMEM. 以 2.5 g/L 胰酶消化传代数次. 使其满足实验所需的癌细胞数量. Balb/c 裸鼠饲养于层流环境, 笼具, 垫料, 饮水及食物均采用高压蒸汽灭菌. Balb/c 裸鼠 30 只, δ , 4-5 周龄, 采用随机数字法分为 3 组, 无菌条件下, 裸鼠颈背部或腹股沟内侧接种 $5 \times 10^6/\text{L}$ 细胞悬液 0.2 mL, 接种后, 裸鼠在无菌, 恒温, 恒湿条件下饲养, 每日观察确定肿瘤出现时间, 测量肿瘤直径, 在肿瘤直径长成约 5 mm 大小时采用 ip 的方法给药, 分别注射 0.2 mL 生

理盐水、20 mg/kg 5-FU, 20 mg/kg 5-FU+100 mg/kg L-Arg, 隔日给药, 共 3 次. 观察裸鼠的一般情况, 质量, 测量移植瘤体积, 描绘肿瘤生长曲线(用 SPSS10.0 的图表功能绘制), 并计算肿瘤的生长抑制率 = 对照组($V_1 - V_0$) - 治疗组($V_1 - V_0$) / 对照组($V_1 - V_0$) (V_0 为给药前瘤体体积, V_1 为给药后瘤体体积, 单位均为 mm^3 , $V = 1/2AB^2$, A, B 分别为肿瘤的长径和短径). 常规 HE 染色观察, 评价移植瘤坏死的程度和范围. 按切片内肿瘤组织坏死面积占切片内癌组织面积的百分比分成四个等级, $\leq 25\%$ 为(+), 25-50% 为(++), 50-75% 为(+++), 百分比 $> 75\%$ 为(++++) . 免疫组织化学法检测 iNOS 蛋白的表达用石蜡切片, 载玻片预先经 APES 处理, 按 SABC 试剂盒说明操作. iNOS 阳性反应为黄色到棕褐色, 定位于胞质, 亦可见于胞膜. 染色结果综合染色强度及阳性细胞数量两个方面, 进行半定量分析. 分别评为 0-3 分. 染色强度: 阴性(0分); 染色弱但明显高于阴性对照(1分); 染色清晰(2分); 染色强(3分). 阳性细胞数 $\leq 10\%$ (0分); 11-25% (1分); 26-50% (2分); $\geq 50\%$ (3分). 根据两项指标相加分数划分为四级: 0-1 分为“-”; 2 分为“+”; 3-4 分为“++”; 5-6 分为“+++”.

统计学处理 肿瘤体积的变化采用单因素方差分析, 坏死程度及免疫组化结果采用等级资料的秩和检验(Kruskal-Wallis H), 所有数据均采用 SPSS10.0 统计软件进行处理.

2 结果

2.1 药物对裸鼠移植瘤生长的影响 治疗过程中裸鼠进食量减少, 治疗组裸鼠体重减轻明显, 裸鼠均未出现死亡. 5-FU 对肝癌移植瘤有明显的抑制作用, 联用 L-Arg 后, 肿瘤生长明显减慢, 抑瘤率明显增加(图 1, 表 1).

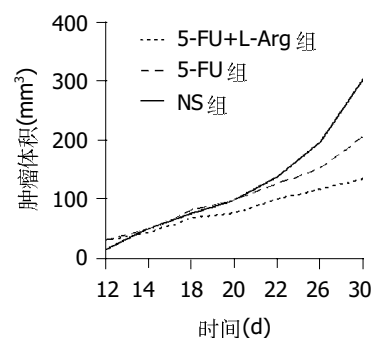


图 1 各组肿瘤生长曲线.

表 1 5-FU 联用 L-Arg 对抑瘤率的影响

分组	n	体重变化(g)	肿瘤体积变化(mm^3)	抑瘤率(%)
A: NS	10	$+1.5 \pm 0.3$	257.978 ± 59.0	
B: 5-FU	10	-3.0 ± 0.5	172.232 ± 66.0	33.2
C: 5-FU+L-Arg	10	-2.5 ± 0.4	91.523 ± 26.7	64.5

方差分析 F 值为 30.241, $^aP < 0.05$; $^bP < 0.05$ vs A,C; $^cP < 0.05$ vs B,C.



图2 A: 对照组可见小范围的肿瘤坏死, B: 5-FU 组肿瘤坏死范围增大, C: 5-FU+L-Arg 组肿瘤坏死范围最大。

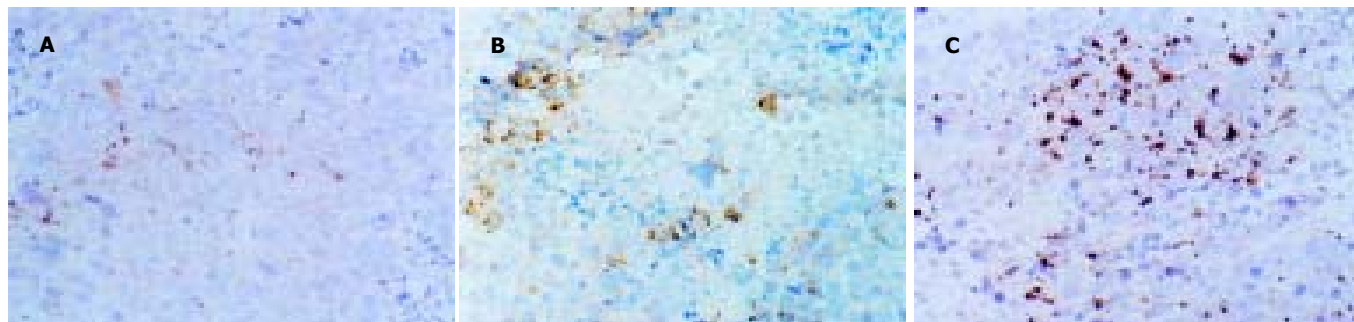


图3 A: 对照组 iNOS 呈弱表达; B: 5-FU 诱导了 iNOS 的表达; C: 5-FU+L-Arg 组 iNOS 表达最强。

2.2 裸鼠移植瘤组织的病理学观察 肉眼观察移植瘤为结节状, 表面有较完整的纤维包膜, 切面灰白, 周围有纤维组织向瘤中央生长并分隔移植瘤组织. 光镜下观察瘤组织间有较多粗细不一的纤维组织将瘤细胞分隔成巢状, 部分瘤细胞呈梁状, 腺腔状排列, 可见较多发育不完整的血窦结构, 大多数细胞呈三角形, 胞质丰富, 较多嗜酸性颗粒, 胞核大小形态极不规则, 核质比例增大, 可见较多病理性核分裂象, 瘤巨细胞偶见. 用药后, 肿瘤组织出现不同程度的坏死, 结果显示, 各组坏死程度不一, 对照组肿瘤内可见局部坏死, 坏死(+)6, 坏死(++)3, 坏死(+++)1, 5-FU 组坏死(++)5, 坏死(+++)3, 坏死(++++)2, 5-FU+L-Arg 组, (++)1, (+++)4, (++++)5, 等级资料秩和检验结果 $\chi^2=15.963$, $P<0.05$, 表明坏死范围与药物有明显关系(图2).

2.3 免疫组织化学法检测 iNOS 蛋白表达 iNOS 以细或粗颗粒存在于胞质, 部分表达于胞膜, 胞核内及间质细胞未见表达, 在越靠近坏死区的细胞, iNOS 表达越强, 癌巢中央的细胞表达较弱或不表达. 在各组裸鼠移植瘤组织中, iNOS 表达情况如下, 对照组“-”2, “+”6例, “++”2; 5-FU 组“+”3, “++”5例, “+++”2例, 5-FU+L-Arg 组“++”6例, “+++”4例, 等级资料秩和检验结果 $\chi^2=11.794$, $P<0.05$, iNOS 表达强度与用药有明显关联, 即对照组最弱, 5-FU+L-Arg 组最强(图3).

3 讨论

5-FU在美国曾为化学治疗肝癌中应用最为普遍的药物之一. 诱导胃癌、结肠癌、胰腺癌的凋亡是其发挥治

疗作用的一种方式^[5-7], 体外实验证实了5-FU也可以诱导人肝癌细胞的凋亡, 5-FU 诱导细胞的凋亡是通过诱导 iNOS 的表达, 增加胞内自分泌 NO 介导的^[4], 我们的实验进一步证实5-FU在体内也同样能够诱导肝癌细胞 iNOS 的表达. L-Arg 是非必须氨基酸, 在代谢过程中可生成 NO, 多胺及 L-脯氨酸等, 参与细胞生长的调节^[8-10]. L-Arg 治疗肿瘤中已有研究, 伴恶病质的头颈部肿瘤患者, 围手术期提供富含精氨酸的营养, 患者营养状况及免疫功能虽未明显改善, 但患者生存期明显延长^[11]. 关于 Arg 抗肿瘤的机制, 大量实验研究表明, Arg 具有组织特异性免疫刺激作用, 能通过对宿主非特异性免疫调控, 起到改善宿主免疫力和抑制肿瘤细胞生长的作用^[12-14]. 另一方面 L-Arg 是 NO 的前体, 在一氧化氮合酶的存在下生成一氧化氮和 L-脯氨酸. 高浓度 NO 可以抑制三羧酸循环, DNA 复制和线粒体呼吸, 使细胞受阻于 S 期, 亦可引起细胞死亡^[15-16]. NO 可诱导各种肿瘤细胞的凋亡^[17-18], 其机制可能有: (1)直接损伤 DNA 和抑制蛋白质、核酸合成. (2)通过修饰核苷酸合成限速酶—核苷酸还原酶抑制蛋白质合成. (3)抑制三羧酸循环, 使 ATP 生成减少, 引起细胞凋亡, 也可使顺-乌头酸酶合成减少, 从而抑制细胞有氧代谢, 使无氧酵解增强, 产生过多酸性产物, 细胞内 PH 下降, 同时使细胞内线粒体 Ca^{2+} 分布变化, 诱发 NO 的细胞毒作用^[19-20]. (4)诱导抑癌基因 P⁵³ 的表达^[21-23]. 在体外实验中, 5-FU 协同 L-Arg 能够使 NO 生成增加, 从而引起肝癌细胞的凋亡. 在我们的实验中, 5-FU 协同 L-Arg 能明显增加对裸鼠移植瘤的抑瘤率, 病理显示移植瘤组织的坏死程度明显增加, 免疫组化

结果显示 5-FU 组, 5-FU+L-Arg 组 iNOS 表达均有增加, 而后者增加更加明显, 表明诱导 iNOS 的表达是 5-FU 抗肿瘤的一种方式, 在 iNOS 表达增高的情况下, 补充底物 L-Arg, 会使 NO 的生成增加, 从而引起肿瘤细胞的凋亡和坏死. L-Arg 同时可能通过正反馈机制使 iNOS 的表达进一步增加.

L-Arg 可以肝脏中合成, 在肝癌患者中一般肝功能较差, 合成功能减弱, 加之肿瘤患者食欲较差, L-Arg 摄入减少, 因此体内 L-Arg 不足. 对肝癌患者应用 5-FU 进行化疗时, 肝癌中的 iNOS 的表达增强, 辅以 L-Arg, 增加 NO 的生成, 可能会提高 5-FU 的化疗效果和患者的抗癌能力. 因此, L-Arg 可为治疗肝癌的有效辅剂.

4 参考文献

- 1 Papapetropoulos N, Zhou Z, Roussos C, Goumas P, Papapetropoulos A. Effects of modulation of the NO/cGMP pathway in tumor cell lines derived from the upper airway tract. *Pharmacology* 2004;72:167-176
- 2 Chan MH, Chien TH, Lee PY, Chen HH. Involvement of NO/cGMP pathway in toluene-induced locomotor hyperactivity in female rats. *Psychopharmacology* 2004;29[Epub ahead of print]
- 3 Perrotta C, Falcone S, Capobianco A, Camporeale A, Sciorati C, De Palma C, Pisconti A, Rovere-Querini P, Bellone M, Manfredi AA, Clementi E. Nitric oxide confers therapeutic activity to dendritic cells in a mouse model of melanoma. *Cancer Res* 2004;64:3767-3771
- 4 Jiang J, Liu J, Zhu J, Yang C, Zhang A. Mechanism of apoptotic effects induced by 5-fluorouracil on human liver carcinoma Bel7402 cell line. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:968-971
- 5 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
- 6 Yi TB, Yang LY. Caspase-8 in apoptosis of hepatoma cell induced by 5-fluorouracil. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:98-101
- 7 邵宏伟, 齐清会. 几种抗癌药物诱导胰腺癌细胞凋亡能力的比较. *世界华人消化杂志* 2002;10:187-192
- 8 Lind DS. Arginine and cancer. *J Nutr* 2004;134(Suppl 10):2837S-2841S
- 9 张剑, 何生, 李茂德. L-精氨酸在肝癌细胞生长增生中的作用. *贵阳医学院学报* 2003;28:5-8
- 10 孟玫, 姜军梅, 尹晓燕, 朱菊人. 内毒素联合精氨酸对人肝癌细胞 Bel-7402 增生及凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:2053-2056
- 11 van Bokhorst-De Van Der Schueren MA, Quak JJ, von Blomberg-van der Flier BM, Kuik DJ, Langendoen SI, Snow GB, Green CJ, van Leeuwen PA. Effect of perioperative nutrition, with and without arginine supplementation, on nutritional status, immune function, postoperative morbidity and survival in severely malnourished head and neck cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2001;73:323-332
- 12 郝悦, 周新民. 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:1636-1638
- 13 Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem* 2002;277:21123-21129
- 14 杨道贵, 李复领, 随永领, 李蕊, 魏发才. 术前精氨酸强化 PN 对结、直肠癌细胞对凋亡和增生的影响. *肠外与肠内营养* 2002;9:18-20
- 15 陈会松, 柳利明, 黄华, 杨晋辉. 小鼠实验性肝损伤中 NO 的动态检测及意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:838-840
- 16 Gong JP, Tu B, Wang W, Peng Y, Li SB, Yan LN. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004;10:73-76
- 17 Hussain SP, Trivers GE, Hofseth LJ, He P, Shaikh I, Mechanic LE, Doja S, Jiang W, Subleski J, Shorts L, Haines D, Laubach VE, Wilttrout RH, Djurickovic D, Harris CC. Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis. *Cancer Res* 2004;64:6849-6853
- 18 Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:2232-2240
- 19 Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 2002;12:311-320
- 20 Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol* 2002;8:40-43
- 21 Yung HW, Bal-Price AK, Brown GC, Tolkovsky AM. Nitric oxide-induced cell death of cerebrocortical murine astrocytes is mediated through p53- and Bax-dependent pathways. *J Neurochem* 2004;89:812-821
- 22 Wang X, Zalcenstein A, Oren M. Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation. *Cell Death Differ* 2003;10:468-476
- 23 Qiu LQ, Sinniah R, Hsu SI. Coupled induction of iNOS and p53 upregulation in renal resident cells may be linked with apoptotic activity in the pathogenesis of progressive IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2066-2078

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 •

食管癌 p53 基因第 5 外显子突变影响因素的病例对照研究

王波, 张艳, 徐德忠, 王安辉, 张磊, 孙长生, 李良寿

王波, 徐德忠, 王安辉, 张磊, 孙长生, 李良寿, 中国人民解放军第四军医大学预防医学系流行病学教研室 陕西省西安市 710032
张艳, 陕西省血液中心血型室 陕西省西安市 710061
项目负责人: 王波, 710032, 陕西省西安市长乐西路 17 号, 中国人民解放军第四军医大学, wbfmmu@263.net
电话: 029-83374872 传真: 029-83374872
收稿日期: 2004-07-23 接受日期: 2004-08-25

摘要

目的: 探讨 p53 基因第 5 外显子基因突变的影响因素.

方法: 应用 DNA 序列分析技术和病例对照研究方法, 分析西安和林州食管癌 p53 基因第 5 外显子的突变情况及其影

结果显示 5-FU 组, 5-FU+L-Arg 组 iNOS 表达均有增加, 而后者增加更加明显, 表明诱导 iNOS 的表达是 5-FU 抗肿瘤的一种方式, 在 iNOS 表达增高的情况下, 补充底物 L-Arg, 会使 NO 的生成增加, 从而引起肿瘤细胞的凋亡和坏死. L-Arg 同时可能通过正反馈机制使 iNOS 的表达进一步增加.

L-Arg 可以肝脏中合成, 在肝癌患者中一般肝功能较差, 合成功能减弱, 加之肿瘤患者食欲较差, L-Arg 摄入减少, 因此体内 L-Arg 不足. 对肝癌患者应用 5-FU 进行化疗时, 肝癌中的 iNOS 的表达增强, 辅 L-Arg, 增加 NO 的生成, 可能会提高 5-FU 的化疗效果和患者的抗癌能力. 因此, L-Arg 可为治疗肝癌的有效辅剂.

4 参考文献

- 1 Papapetropoulos N, Zhou Z, Roussos C, Goumas P, Papapetropoulos A. Effects of modulation of the NO/cGMP pathway in tumor cell lines derived from the upper airway tract. *Pharmacology* 2004;72:167-176
- 2 Chan MH, Chien TH, Lee PY, Chen HH. Involvement of NO/cGMP pathway in toluene-induced locomotor hyperactivity in female rats. *Psychopharmacology* 2004;29[Epub ahead of print]
- 3 Perrotta C, Falcone S, Capobianco A, Camporeale A, Sciorati C, De Palma C, Pisconti A, Rovere-Querini P, Bellone M, Manfredi AA, Clementi E. Nitric oxide confers therapeutic activity to dendritic cells in a mouse model of melanoma. *Cancer Res* 2004;64:3767-3771
- 4 Jiang J, Liu J, Zhu J, Yang C, Zhang A. Mechanism of apoptotic effects induced by 5-fluorouracil on human liver carcinoma Bel7402 cell line. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:968-971
- 5 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
- 6 Yi TB, Yang LY. Caspase-8 in apoptosis of hepatoma cell induced by 5-fluorouracil. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:98-101
- 7 邵宏伟, 齐清会. 几种抗癌药物诱导胰腺癌细胞凋亡能力的比较. *世界华人消化杂志* 2002;10:187-192
- 8 Lind DS. Arginine and cancer. *J Nutr* 2004;134(Suppl 10):2837S-2841S
- 9 张剑, 何生, 李茂德. L-精氨酸在肝癌细胞生长增生中的作用. *贵阳医学院学报* 2003;28:5-8
- 10 孟玫, 姜军梅, 尹晓燕, 朱菊人. 内毒素联合精氨酸对人肝癌细胞 Bel-7402 增生及凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:2053-2056
- 11 van Bokhorst-De Van Der Schueren MA, Quak JJ, von Blomberg-van der Flier BM, Kuik DJ, Langendoen SI, Snow GB, Green CJ, van Leeuwen PA. Effect of perioperative nutrition, with and without arginine supplementation, on nutritional status, immune function, postoperative morbidity and survival in severely malnourished head and neck cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2001;73:323-332
- 12 郝悦, 周新民. 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:1636-1638
- 13 Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem* 2002;277:21123-21129
- 14 杨道贵, 李复领, 随永领, 李蕊, 魏发才. 术前精氨酸强化 PN 对结、直肠癌细胞对凋亡和增生的影响. *肠外与肠内营养* 2002;9:18-20
- 15 陈会松, 柳利明, 黄华, 杨晋辉. 小鼠实验性肝损伤中 NO 的动态检测及意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:838-840
- 16 Gong JP, Tu B, Wang W, Peng Y, Li SB, Yan LN. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004;10:73-76
- 17 Hussain SP, Trivers GE, Hofseth LJ, He P, Shaikh I, Mechanic LE, Doja S, Jiang W, Subleski J, Shorts L, Haines D, Laubach VE, Wilttrout RH, Djurickovic D, Harris CC. Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis. *Cancer Res* 2004;64:6849-6853
- 18 Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:2232-2240
- 19 Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 2002;12:311-320
- 20 Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol* 2002;8:40-43
- 21 Yung HW, Bal-Price AK, Brown GC, Tolkovsky AM. Nitric oxide-induced cell death of cerebrocortical murine astrocytes is mediated through p53- and Bax-dependent pathways. *J Neurochem* 2004;89:812-821
- 22 Wang X, Zalcenstein A, Oren M. Nitric oxide promotes p53 nuclear retention and sensitizes neuroblastoma cells to apoptosis by ionizing radiation. *Cell Death Differ* 2003;10:468-476
- 23 Qiu LQ, Sinniah R, Hsu SI. Coupled induction of iNOS and p53 upregulation in renal resident cells may be linked with apoptotic activity in the pathogenesis of progressive IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2066-2078

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 •

食管癌 p53 基因第 5 外显子突变影响因素的病例对照研究

王波, 张艳, 徐德忠, 王安辉, 张磊, 孙长生, 李良寿

王波, 徐德忠, 王安辉, 张磊, 孙长生, 李良寿, 中国人民解放军第四军医大学预防医学系流行病学教研室 陕西省西安市 710032
张艳, 陕西省血液中心血型室 陕西省西安市 710061
项目负责人: 王波, 710032, 陕西省西安市长乐西路 17 号, 中国人民解放军第四军医大学, wbfmmu@263.net
电话: 029-83374872 传真: 029-83374872
收稿日期: 2004-07-23 接受日期: 2004-08-25

摘要

目的: 探讨 p53 基因第 5 外显子基因突变的影响因素.

方法: 应用 DNA 序列分析技术和病例对照研究方法, 分析西安和林州食管癌 p53 基因第 5 外显子的突变情况及其影

响因素.

结果: 西安和林州 $p53$ 基因第5外显子突变率分别为 14.3% (6/42) 和 18.6% (8/43), 两地突变率比较差异无显著性. 西安不经常食用新鲜蔬菜者突变率 (37.5%) 显著高于经常食用新鲜蔬菜者 (8.8%, $P < 0.05$), $P = 6.20 (0.97-39.7)$. 林州食用酸菜者突变率 (38.5%) 显著高于不食用酸菜者 (17.1%, $P < 0.05$), $P = 5.63 (1.10-28.84)$. 其余因素与 $p53$ 基因第5外显子突变未见显著性差异.

结论: 在西安经常食用新鲜蔬菜可减少 $p53$ 基因第5外显子突变发生, 在林州经常食用酸菜可增加 $p53$ 基因第5外显子突变的机率.

王波, 张艳, 徐德忠, 王安辉, 张磊, 孙长生, 李良寿. 食管癌 $p53$ 基因第5外显子突变影响因素的病例对照研究. 世界华人消化杂志 2004; 12(10): 2478-2480

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2478.asp>

0 引言

$p53$ 基因作为食管癌发生发展过程中的重要分子学变化已被多项研究证实^[1-3]. 对 $p53$ 基因突变谱的分析有助于从分子水平探索危险因素引起肿瘤的机制^[4-6]. 如在肺癌 $p53$ 基因突变中 G → T 颠换较多见, 据认为与烟草中的苯并芘有关^[7]; 肝癌中 $p53$ 基因第7外显子249密码子的改变多发生在曾经食用被黄曲霉菌B1污染的粮食病例^[8]. 众所周知, 食管癌存在着显著的地理分布差异, 也就是说外源性致癌物在各地暴露的程度可能不同, 分析不同地区基因水平的改变是否能揭示造成这种差异的原因? 为此我们对属于食管癌高发区的河南省林州和中发区的西安食管癌组织 $p53$ 基因第5外显子基因突变进行了病例病例对照研究.

1 材料和方法

1.1 材料 分别选择西安(42例)和林州(43例)某综合性医院入院治疗的新发食管癌病例, 为连续病例, 均经病理学确诊, 术前未进行化疗和放疗, 且在当地居住 20a 以上. 由研究者按统一制订的调查表直接询问患者本人, 多在术前进行. 调查内容包括一般人口学特征(年龄、性别、职业和文化程度等)、烟酒嗜好、饮食习惯(食用酸菜、水果和新鲜蔬菜摄入情况、热烫饮食等)和食管癌家族史等.

1.2 方法 标本取自手术切除的癌组织, 捣碎, 蛋白酶 K 消化, 37 °C 过夜, 常规酚: 氯仿抽提 DNA. PCR 扩增目的基因片段, $p53$ 第5外显子引物序列为 P1: 5' -GTT TCT TTG CTG CCG TGT TC-3'; P2: 5' -AGG CCT GGG GAC CCT GGG CA-3', 扩增片段长度为 323 bp^[2]. PCR 反应条件为: 反应总体积 100 μ L, 其中含引物 25 pmol/L 各 1 μ L, 10 nmol/L 4 × dNTP 6 μ L, 10 × Buffer 25 mmol/L 10 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 模板 DNA 0.1-0.5 μ g, Taq 酶 3U. 94 °C 预变性 5 min 后加 Taq 酶 3 U, 94 °C 1 min, 66 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环后于 72 °C 延伸 10 min, 取 8 μ L 产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外

灯下照相分析. PCR 产物纯化回收, 应用 ABI 基因测序分析仪(ABI 公司)完成 DNA 序列检测.

统计学处理 建立 Foxbase 数据库, 将所有调查表信息核对无误后录入微机备用. 首先对西安和林州病例的年龄、性别进行均衡性检验. 然后进行单因素分析, 计算 χ^2 , OR 及 OR95%CI. 所有数据处理采用 SPSS10.0 软件完成.

2 结果

2.1 西安与林州食管癌 $p53$ 基因第5外显子突变率比较 西安和林州食管癌标本 $p53$ 基因第5外显子 DNA 序列测定结果显示, 西安 42 例标本中有 6 例(6 个位点)发生突变, 突变率为 14.3%; 林州 43 例食管癌标本中, 有 8 例 10 个位点发生突变, 其中有 2 例各检出 2 种突变, 突变率为 18.6%, 两地突变率比较无显著性差异($\chi^2 = 0.28$, $P = 0.59$).

2.2 病例病例对照研究 按年龄(<60 岁和 ≥ 60 岁)、性别分组比较, 西安和林州 $p53$ 基因第5外显子突变病例在 < 60 岁和 ≥ 60 岁组, 男性和女性组间分布均未见显著性差异($P > 0.05$, 表 1).

西安吸烟、饮酒、食用酸菜和食管癌家族史等食管癌主要危险因素与 $p53$ 基因第5外显子突变无显著性联系($P > 0.05$). 不经常食用新鲜蔬菜者 $p53$ 基因第5外显子突变率为 37.5%, 显著高于经常食用新鲜蔬菜者的 8.8% ($P < 0.05$, OR = 6.20, (0.97-39.7)). 林州吸烟、饮酒、不食用新鲜蔬菜、食管癌家族史等因素与林州食管癌 $p53$ 基因第5外显子突变未见显著性联系, 食用酸菜者 $p53$ 基因第5外显子突变率为 38.5%, 显著高于不食用酸菜者的 17.1% ($P < 0.05$, OR = 5.63 (1.10-28.84), 表 2).

3 讨论

本研究所有对象均为病理学确诊的食管癌患者, 两地病例均为当地常住居民, 年龄、性别无显著性差异, 具有可比性. 标本取自手术切除的癌组织, 所有调查信息通过直接询问患者本人而获得, 减少了选择偏倚和信息偏倚. DNA 序列测定是目前检测基因结构、序列变异最直接、最可靠的方法. 在实验中采取了质量控制措施, 因此本文结果较为可信和真实.

$p53$ 基因是迄今发现与人类相关性最高的基因, 大约 50% 的人类肿瘤中发现 $p53$ 基因突变. 吸烟肺癌 $p53$ 突变较多发生于 157、248 和 273 密码子, 主要为 G → T 颠换, 认为与烟草中的致癌物苯丙萘有关, 而非吸烟患者为 G : C → A : T 转换^[9]. 既吸烟又饮酒发生肺癌 $p53$ 突变的 OR 值为 18.6, 且有剂量 - 效应关系^[10]. 口腔部肿瘤 $p53$ 基因突变认为与咀嚼槟榔和烟草有联系, 有人认为 $p53$ 第5外显子是经常咀嚼萎叶引起口腔癌的靶基因^[11]. 因此, 对 $p53$ 基因突变谱的分析有助于识别不同肿瘤的致癌因子. $p53$ 基因突变在食管癌中也较常见, 但多数研究集中于突变率与癌病理组织学分型关系、预后等方面^[12-13]. 现有的文献报道多无详细的环境暴露资料, 故难以与环境致病因子进行综合分析. 本

表1 西安和林州 p53 基因第5外显子突变与无突变病例年龄和性别分布

因素	西安市				林州市			
	突变	未突变	χ^2	<i>P</i>	突变	未突变	χ^2	<i>P</i>
<60 yr	2	17	0.40	0.53	4	22	0.45	0.50
≥ 60 yr	4	19			4	13		
男	4	30	0.93	0.34	7	28	1.57	0.21
女	2	6			1	15		

表2 西安和林州 p53 基因第5外显子突变与食管癌主要危险因素的关系

因素	西安市						林州市				
	突变	未突变	χ^2	<i>P</i>	OR(95%CI)		突变	未突变	χ^2	<i>P</i>	OR(95%CI)
吸烟	+	3	25	0.87	0.35	0.44	6	20	0.87	0.35	2.25
	-	3	11			(0.08-2.53)	2	15			(0.40-12.75)
饮酒	+	2	25	2.92	0.09	0.22	1	5	0.02	0.89	0.86
	-	4	11			(0.08-2.53)	7	30			(0.09-8.54)
酸菜	食用	2	10	0.08	0.78	1.30	5	8	4.85	0.03	5.63
	不食用	4	26			(0.21-8.25)	3	27			(1.10-28.84)
新鲜蔬菜	不食用	3	5	4.35	0.04	6.20	2	6	0.27	0.61	1.61
	食用	3	31			(0.97-39.7)	6	29			(0.26-10.00)
食管癌家族史	+	1	15	1.36	0.24	0.28	4	18	0.01	0.94	0.94
	-	5	21			(0.03-2.67)	4	17			(0.20-4.39)

研究结果显示, 西安和林州食管癌 p53 基因第5外显子突变与性别、年龄均无关. 西安吸烟、饮酒、食用酸菜和食管癌家族史等食管癌主要危险因素与 p53 基因第5外显子突变未见显著性联系. 不经常食用新鲜蔬菜 p53 基因第5外显子突变率为 37.5%, 显著高于经常食用新鲜蔬菜者的 8.8% ($P < 0.05$), OR=6.20(0.97-39.7). 新鲜蔬菜含有 VitA, VitC 等大量维生素. 研究表明, 新鲜蔬菜、水果和维生素等有抗突变的作用, 维生素C在体内能阻断胺类的亚硝基化^[14]. 本研究表明, 在西安地区, 经常食用新鲜蔬菜可对抗 p53 基因突变而减少食管癌的发生.

林州单因素分析未发现吸烟、饮酒、食管癌家族史和食用新鲜蔬菜与 p53 基因第5外显子有显著性联系, 但与食用酸菜有明显联系, 其 OR 值为 5.63(1.10-28.84), 食用酸菜者 p53 基因第5外显子的突变率 38.5% 显著高于不食用酸菜者的 17.1% ($P < 0.05$). 酸菜中含有包括亚硝酸胺在内的多种致癌亚硝基化合物. 有人用甲基苄基亚硝酸胺(NMBzA)诱发的人胎儿食管癌组织发现有抑癌基因 *Rb*, *p53*, *APC* 和 *MCC* 的突变^[15]. 林州居民有食用酸菜的习俗, 酸菜中致癌物的量积累到一定程度, 可能诱发包括 p53 基因在内的癌基因发生突变而诱导食管癌的形成.

4 参考文献

- 1 Biramijamal F, Allameh A, Mirbod P, Groene HJ, Koomagi R, Hollstein M. Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran. *Cancer Res* 2001;61:3119-3123
- 2 邹建湘, 王立东, Shi ST, Yang GY, Xue ZH, 高珊珊, 李永欣, Yang CS. 河南食管癌高发区居民多灶性食管癌前病变和癌组织 p53 基因的突变分析. *世界华人消化杂志* 1999;7:280-284
- 3 Putz A, Hartmann AA, Fontes PR, Alexandre CO, Silveira DA, Klug SJ, Rabes HM. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (Southern Brazil): role of life style factors. *Int J Cancer* 2002;98:99-105
- 4 Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutat Res* 2000;462:311-322
- 5 王立东, 刘宾, 郑树. 林州居民食管癌 P53 基因突变谱分析与不同地区食管癌和其他类型肿瘤的比较. *中华流行病学杂志* 2003;24:202-205
- 6 Kato H, Yoshikawa M, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Tajima K, Masuda N, Tsukada K, Fukuda T, Nakajima T, Kuwano H. Expression of p53 protein related to smoking and alcoholic beverage drinking habits in patients with esophageal cancers. *Cancer Lett* 2001;167:65-72
- 7 Pfeifer GP, Hainaut P. On the origin of G → T transversions in lung cancer. *Mutat Res* 2003;526:39-43
- 8 Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat* 2003;21:201-216
- 9 Hainaut P, Pfeifer GP. Patterns of p53 G → T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis* 2001;22:367-374
- 10 Ahrendt SA, Chow JT, Yang SC, Wu L, Zhang MJ, Jen J, Sidransky D. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000;60:3155-3159
- 11 Hussain SP, Hollstein MH, Harris CC. p53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and human risk assessment. *Ann N Y Acad Sci* 2000;919:79-85
- 12 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
- 13 陶仪声, 武世伍, 宗永生. 抑癌基因 p53 在不同地区食管癌中的表达及临床预后分析. *肿瘤学杂志* 2002;8:79-80
- 14 陆建邦, 连士勇, 孙喜斌, 张中兴, 戴涤新, 李变云, 程兰平, 魏建荣, 段文杰. 林州食管癌发病因素病例对照研究. *中华流行病学杂志* 2000;21:434-436
- 15 Lu SH. Alterations of oncogenes and tumor suppressor genes in esophageal cancer in China. *Mutat Res* 2000;462:343-353

大鼠肝脏缺血再灌注损伤中谷氨酰胺对 HSP70 表达的影响

徐 锋, 戴朝六, 张 旭, 贾昌俊, 崔 凯, 许永庆, 黄 勇, 王明辉

徐锋, 戴朝六, 张旭, 贾昌俊, 许永庆, 黄勇, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)肝胆外科 辽宁省沈阳市 110004
崔凯, 沈阳医学院附属中心医院普通外科 辽宁省沈阳市 110024
王明辉, 辽宁省鞍钢铁东医院外科 辽宁省鞍山市 114001
辽宁省自然科学基金资助项目, No.20022063
项目负责人: 戴朝六, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)肝胆外科, daicl-sy@163.net
电话: 024-83955052 传真: 024-23926097
收稿日期: 2004-08-17 接受日期: 2004-08-25

摘要

目的: 探讨谷氨酰胺(glutamine, Gln)对肝脏缺血再灌注损伤(HIRI)时肝组织热休克蛋白70(HSP70)表达的影响。

方法: ♂ Wistar大鼠48只随机分为谷氨酰胺组(G组)及对照组(C组), 谷氨酰胺预处理后建立HIRI模型(以Pringle法阻断肝血流30 min), Western blotting法检测再灌注后肝组织HSP70表达, 并检测血清ALT, LDH水平以及肝组织病理学改变。

结果: 两组肝组织于再灌注后1 h均仅有微量HSP70表达, 再灌注后24 h HSP70表达明显增强并持续至48 h, 但各时点G组HSP70表达水平明显低于C组; G组血清ALT, LDH水平再灌注后1, 24 h均显著低于C组(1 h: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$; 24 h: $^bP<0.01$), 且两组肝酶水平再灌注后24 h均较再灌注后1 h有显著恢复。肝组织损害的病理学改变G组亦明显轻于C组。

结论: Gln对HIRI具有保护作用并能下调HIRI时肝组织中HSP70表达。

徐锋, 戴朝六, 张旭, 贾昌俊, 崔凯, 许永庆, 黄勇, 王明辉. 大鼠肝脏缺血再灌注损伤中谷氨酰胺对 HSP70 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10): 2481-2483
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2481.asp>

0 引言

肝脏缺血再灌注损伤(HIRI)是肝移植和肝脏外科所面临的一大难题。入肝血流完全阻断是肝脏外科手术中常用的控制出血的方法, 但其可引起门静脉系统(尤其是肠道)淤血, 肝脏恢复血供后淤滞门静脉血再灌注势必造成肝脏再灌注损伤。谷氨酰胺(Gln)作为条件必需氨基酸, 对多种器官和组织细胞具有独特而重要的代谢功能, 并可维持肠道结构和屏障功能, 减轻内毒素等对肠道的损伤以及增强 HSP70 的表达^[1-3]。热休克蛋白70 (HSP70)是 HSP 家族的主要成分, 是机体受到应激后产生的蛋白质, 其大量表达可提高细胞的应激能力,

抵御各种有害因素的损伤^[1,4-9]。目前对 Gln 在 HIRI 中的作用以及对肝组织 HSP70 表达影响的研究尚未见报道。我们应用大鼠 HIRI 模型, 探讨术前应用 Gln 对 HIRI 的作用以及对肝组织 HSP70 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 ♂ Wistar 大鼠, 体质量 200-300 g, 由中国医科大学附属第二医院动物实验中心提供。丙氨酸-谷氨酰胺二肽(力肽), 购自德国费森尤斯中国华瑞制药有限公司。HSP70 抗体及碱磷酶标记马抗小鼠 IgG(H+L)均购自北京中山生物技术有限公司。大鼠静脉输液模型的建立: 参照中国人民解放军第三军医大学静脉营养模型^[10]。大鼠术前禁食 12 h, 100 g/L 乌拉坦按 0.1 mL/kg ip 麻醉。模型建立后将大鼠置于代谢笼中, 允许自由活动, 常规进食。插管后 2 h 始用微量泵持续输注生理盐水(速度为 2 mL/h), 观察 3 d。48 只大鼠随机分为两组, 即 Gln 组(G 组)和对照组(C 组), 各组 24 只。G 组给予 Gln 溶液, C 组给予生理盐水, 输液速度为 2 mL/h, 共 3 d, 输液期间常规进食。第 7 d 麻醉成功后, 将大鼠置于电热毯上以保持体温在 36.5 ± 0.5 °C。局部备皮, 消毒, 取正中切口入腹, 离断肝周韧带, 以消除肝脏侧支循环。用无创伤微血管夹完全阻断门静脉、肝动脉及胆总管(Pringle 法), 肝脏持续缺血 30 min 后松开血管夹, 松动肝门恢复肝血供, 关腹。于再灌注后 1, 24 及 48 h 抽 3 mL 腹主动脉血, 随即用预冷镊子快速夹取一块肝组织, 用锡箔纸包裹置于液氮中保存, 再转至 -80 °C 冰箱中保存, 待测 HSP70 表达; 于再灌注后 1, 24 h 取 1 cm × 1 cm × 0.5 cm 大小肝组织, 置于 40 g/L 甲醛溶液中固定, 备作病理学检查。血液静置 20 min 后, 离心 10 min (2 500 r/min), 用微量移液器将上清液移至预冷弹头中, 置于 -30 °C 冰箱中冷冻保存, 待测生化指标。处死大鼠。

1.2 方法 用全自动生化分析仪测定动脉血清谷丙转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)水平。肝组织块切片后常规 HE 染色并行光镜观察。Western Blotting 法测定肝组织 HSP70 表达^[11]。

统计学处理 计量资料用统计软件 SPSS11.5 进行 *t* 检验, 结果用 mean ± SD 表示, $P<0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 血清肝酶水平 肝脏缺血再灌注后, 两组间血清肝

酶水平明显不同.再灌注1 h, G组血清 ALT, LDH 水平均显著低于C组($P<0.05$; $P<0.01$);再灌注24 h, 两组血清 ALT, LDH 水平均较本组再灌注1 h显著下降, 且G组显著低于C组($P<0.01$, 表1).

表1 大鼠血清 ALT, LDH 水平($\mu\text{kat/L}$, mean \pm SD, $n=8$)

分组	处理	ALT		LDH	
		再灌注1 h	再灌注24 h	再灌注1 h	再灌注24 h
G组	Gln	8.3 \pm 2.0 ^a	2.9 \pm 2.5 ^b	116.0 \pm 40.7 ^b	6.9 \pm 3.6 ^b
C组	NS	13.7 \pm 5.5	9.1 \pm 4.3	195.3 \pm 49.9	32.6 \pm 11.5

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs C组.

2.2 病理形态学改变 肝脏缺血再灌注后1 h, G组肝细胞仅有轻度肿胀, 少量脂肪变性; 而C组肝细胞则明显肿胀, 胞质内脂肪及空泡样变性较重, 肝窦腔隙明显变窄或消失, 窦内可见大量红细胞, 局部有炎症细胞浸润, 肝包膜下可见出血(图1). 再灌注后24 h, G组肝细胞肿胀变性略有加重, 但肝脏结构尚规整, 局部有点状坏死, 可见核分裂相; 而C组肝脏结构紊乱, 可见片状肝细胞坏死.

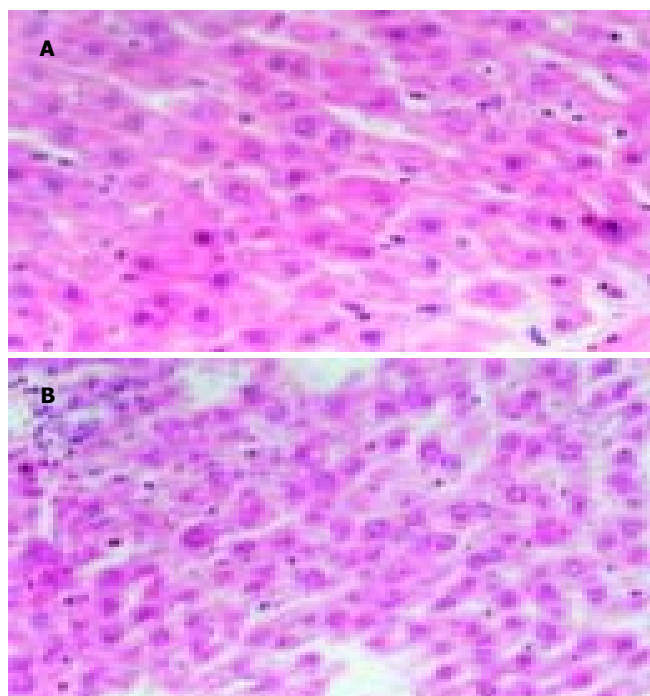


图1 再灌注后1 h肝脏病理组织学改变 HE \times 100. A: G组肝组织结构尚规整, 肝细胞轻度肿胀变性; B: C组肝组织结构明显紊乱, 肝细胞明显空泡变性.

2.3 肝脏组织 HSP70 表达 再灌注1 h, 两组肝组织内 HSP70 均只有轻微表达.再灌注24 h, C组 HSP70 表达明显增强, 持续至再灌注48 h仍维持于高水平; G组再灌注24 h肝脏 HSP70 表达亦有轻度增强并维持至再灌注48 h, 但水平明显低于C组(图2).

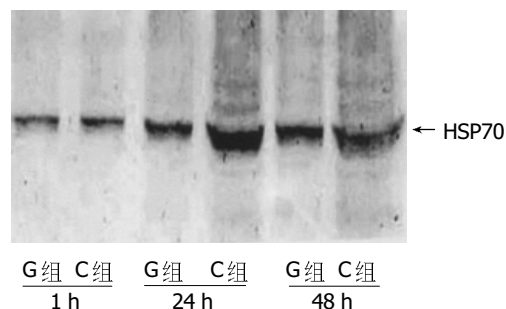


图2 再灌注后肝组织 HSP70 的表达.

3 讨论

肝脏缺血再灌注损伤的防护是肝移植和肝脏外科的难点和热点.目前常用的防护方法有缺血预处理、低温低氧预处理、药物预处理等, 其中药物预处理是较为热门的防护 HIRI 的方法, 但至今仍无一种药物能有效地防护 HIRI. 谷氨酰胺(Gln)作为条件必需氨基酸, 在肠道、心肌及骨骼肌的缺血再灌注损伤过程中具有保护作用^[1,12-20]. 在内毒素休克等应激时补充外源性Gln有利于 HSP70 表达增强^[1,21-22]. 肝脏缺血再灌注后 HSP70 表达水平、持续时间与应激方法和肝脏病理状态有关, 并在一定范围内 HSP70 随肝脏损伤程度的加重而表达增强, 随损伤的修复而逐渐消退. HSP70 被认为是肝缺血再灌注时肝脏损伤严重程度的敏感指标之一.^[23-24] 但目前就 Gln 在 HIRI 中的作用以及对肝组织 HSP70 的表达的影响仍不得而知, 因此通过建立 HIRI 模型对此进行初步探讨. 我们发现, 肝脏缺血再灌注后不同时点 G 组血清 ALT, LDH 水平均显著低于 C 组, 而且肝组织病理学改变 G 组亦较 C 组明显减轻; 两组肝组织再灌注后1 h HSP70 均只有轻微表达, 再灌注后24 h HSP70 表达均增强并持续至再灌注48 h仍维持于高水平, 但 G 组 HSP70 表达水平明显低于 C 组.

再灌注后 G 组血清酶水平和肝组织病理学损害程度均显著低于 C 组, 说明术前给予 Gln 能够减轻 HIRI. 再灌注后1 h 两组肝组织 HSP70 均只有轻微表达, 原因在于健康肝脏单纯长时间缺血并不能激活 HSP70 基因, HSP70 mRNA 只有在肝脏发生缺血再灌注区才有表达, 而在非缺血区则无表达.^[24-25] 并且 HSP70 多于再灌注后6 h左右才有表达增强, 于再灌注24-48 h达高峰^[23,26-27], 这与本实验结果一致. 但本研究 G 组 HSP70 表达水平反而明显低于 C 组, 与肠道等脏器内毒素休克时应用 Gln 可增强 HSP70 表达的结果不一致^[1,21-22]. 其原因可能为: Gln 作为肠道细胞的主要代谢燃料, 术前给予可维持入肝血流完全阻断门静脉系统淤血时小肠黏膜细胞、淋巴细胞及巨噬细胞的代谢和功能, 促进肠黏膜细胞分裂增生, 加快上皮增生与修复, 保护肠黏膜屏障; 并且 Gln 可增强肠黏膜细胞 HSP70 表达, 提高其应激能力, 减轻肠道淤血的损伤, 减轻肠道细菌及内毒素易位, 进而抑制了淤滞的门静脉血再灌注对肝脏枯否氏细胞的激活, 抑制了 TNF- α , IL-1 等细

胞因子的释放和氧自由基、活性氧簇的产生,从而减轻了对肝脏的损伤^[14,15,18,28-30],因此与C组相比相对减少了肝脏HSP70基因的激活,使肝组织HSP70表达水平下降。亦说明HSP70表达水平可以在一定程度上反映缺血再灌注时肝脏的损伤程度。

总之,术前给予Gln对HIRI具有保护作用,并能下调肝组织HSP70的表达,但其调控机制仍有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R, Ren H, Musch MM, Chang EB. Glutamine induces heat shock protein and protects against endotoxin shock in the rat. *J Appl Physiol* 2001; 90:2403-2410
- 2 Wischmeyer PE. Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition* 2002;18:225-228
- 3 黎君友, 盛志勇, 吕艺, 于勇, 胡森, 周宝桐. 严重创伤后肠屏障功能损伤及谷氨酰胺的保护. *世界华人消化杂志* 2000;8: 1093-1096
- 4 Oda H, Miyake H, Iwata T, Kusumoto K, Rokutan K, Tashiro S. Geranylgeranylacetone suppresses inflammatory responses and improves survival after massive hepatectomy in rats. *J Gastrointest Surg* 2002;6:464-472
- 5 Sumioka I, Matsura T, Kai M, Yamada K. Potential roles of hepatic heat shock protein 25 and 70i in protection of mice against acetaminophen-induced liver injury. *Life Sci* 2004;74: 2551-2561
- 6 Chen LJ, Su XW, Qiu PX, Huang YJ, Yan GM. Thermal preconditioning protected cerebellar granule neurons of rats by modulating HSP70 expression. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25: 458-461
- 7 Saito M, Tominaga L, Nanba E, Kinoshita Y, Housi D, Miyagawa I, Satoh K. Expression of HSP 70 and its mRNAs during ischemia-reperfusion in the rat bladder. *Life Sci* 2004; 75:1879-1886
- 8 White DJ, Carlson D, Ordway GA, Horton JW. Protective role of heat stress in burn trauma. *Crit Care Med* 2004;32: 1338-1345
- 9 袁志强, 李晓鲁, 彭毅志. 诱导HSP70减轻肠上皮细胞缺氧/再给氧的损伤. *世界华人消化杂志* 2002;11:800-804
- 10 彭曦, 汪仕良, 谭银玲, 尤忠义, 王凤君, 黎鳌. 烧伤大鼠静脉营养模型的建立及应用. *第三军医大学学报* 2000;22:1-4
- 11 Ip SP, Che CT, Kong YC, Ko KM. Effects of schisandrin B pretreatment on tumor necrosis factor- α induced apoptosis and Hsp70 expression in mouse liver. *Cell Stress Chaperones* 2001;6:44-48
- 12 Ahmad S, White CW, Chang LY, Schneider BK, Allen CB. Glutamine protects mitochondrial structure and function in oxygen toxicity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280: L779-791
- 13 de Aguilar-Nascimento JE, Gurgel Marques C, Carvalho Mariano A, Bicudo Salomao A, de Souza Neves J. Benefits of intraluminal injection of glutamine for intestinal mucosa during ischemia-reperfusion. *Eur Surg Res* 2003;35:352-356
- 14 Wu GH, Wang H, Zhang YW, Wu ZH, Wu ZG. Glutamine supplemented parenteral nutrition prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10:2592-2594
- 15 Kozar RA, Schultz SG, Bick RJ, Poindexter BJ, DeSoignie R, Moore FA. Enteral glutamine but not alanine maintains small bowel barrier function after ischemia/reperfusion injury in rats. *Shock* 2004;21:433-437
- 16 Wischmeyer PE, Jayakar D, Williams U, Singleton KD, Riehm J, Bacha EA, Jeevanandam V, Christians U, Serkova N. Single dose of glutamine enhances myocardial tissue metabolism, glutathione content, and improves myocardial function after ischemia-reperfusion injury. *J Parenter Enteral Nutr* 2003;27: 396-403
- 17 Wischmeyer PE, Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Ren H, Riehm J, Becker LB. Glutamine preserves cardiomyocyte viability and enhances recovery of contractile function after ischemia-reperfusion injury. *J Parenter Enteral Nutr* 2003; 27:116-122
- 18 Tazuke Y, Wasa M, Shimizu Y, Wang HS, Okada A. Alanyl-glutamine-supplemented parenteral nutrition prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Parenter Enteral Nutr* 2003;27:110-115
- 19 Ikeda S, Zarzaur BL, Johnson CD, Fukatsu K, Kudsk KA. Total parenteral nutrition supplementation with glutamine improves survival after gut ischemia/reperfusion. *J Parenter Enteral Nutr* 2002;26:169-173
- 20 Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg* 1999; 178:147-150
- 21 Hayashi Y, Sawa Y, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H. Preoperative glutamine administration induces heat-shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response by regulating nitric oxide synthase activity. *Circulation* 2002;106: 2601-2607
- 22 Scharte M, Baba HA, Van Aken H, Schulzki C, Meyer J, Goeters C, Bone HG. Alanyl-glutamine dipeptide does not affect hemodynamics despite a greater increase in myocardial heart shock protein 72 immunoreactivity in endotoxemic sheep. *J Nutr* 2001;131:1433-1437
- 23 Dai CL, Xia ZL, Kume M, Yamamoto Y, Yamagami K, Ozaki N, Yamaoka Y. Heat shock protein 72 normothermic ischemia, and the impact of congested portal blood reperfusion on rat liver. *World J Gastroenterol* 2001;7:415-418
- 24 Sakai T, Takaya S, Fukuda A, Harada O, Kobayashi M. Evaluation of warm ischemia-reperfusion injury using heat shock protein in the rat liver. *Transpl Int* 2003;16:88-99
- 25 Gingalewski C, Theodoakis NG, Yang J, Beck SC, De Maio A. Distinct expression of heat shock and acute phase genes during regional hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1996; 271:R634-640
- 26 冯晓彬, 郑树国, 马正伟, 李昆, 董家鸿. 乙醇预处理对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用. *消化外科* 2004;5:207-210
- 27 冯晓彬, 董家鸿. 胃饲乙醇预处理对缺血再灌注大鼠肝脏HSP70表达和缺血再灌注损伤的影响. *第三军医大学学报* 2002;24: 1189-1192
- 28 张溪, 王为忠, 李孟彬, 罗兰. 力肽强化肠外营养对小肠移植大鼠肠黏膜结构及肠道细菌移位的影响. *第四军医大学学报* 2002;23: 1989-1992
- 29 Ding LA, Li JS. Effects of glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation in TPN-rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol* 2003;9:1327-1332
- 30 Yasuhara M. L-glutamine-induced heme oxygenase-1 protects small intestine from warm ischemia and reperfusion injury in the rat. *Hokkaido Igaku Zasshi* 2001;76:21-34

信号转导和转录激活因子6在溃疡性结肠炎中的表达

庞艳华, 郑长青, 宁 斌, 胡刚正, 张文杰

庞艳华, 郑长青, 胡刚正, 中国医科大学附属二院消化内科
辽宁省沈阳市 110004

宁斌, 中国医科大学基础医学院组胚教研室 辽宁省沈阳市 110001

张文杰, 武汉大学中南医院肿瘤研究所 湖北省武汉市 430020

项目负责人: 郑长青, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属二院消化内科, zhengchangqing@163.com

收稿日期: 2004-07-09 接受日期: 2004-09-04

摘要

目的: 探讨信号转导和转录激活因子6(STAT6)在溃疡性结肠炎(UC)中的表达和作用。

方法: 对50例经过结肠镜和病理检查证实的UC患者和50例正常对照者结肠黏膜病变, 采用免疫组化方法进行STAT6和磷酸化的STAT 6 (pSTAT6)的检测。

结果: UC黏膜组织中STAT6免疫组化反应产物主要定位于细胞质, 与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。pSTAT6免疫组化反应产物主要定位于细胞质和细胞核, 与对照组相比亦有显著性差异($P<0.05$)。

结论: STAT6在UC黏膜组织中表达上调, STAT6可能在UC的发病机制中起重要作用。

庞艳华, 郑长青, 宁斌, 胡刚正, 张文杰. 信号转导和转录激活因子6在溃疡性结肠炎中的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2484-2486
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2484.asp>

0 引言

信号转导和转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STATs)蛋白家族是近年来发现的一类转录因子, 包括STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b和STAT6等7个成员^[1], 通过JAK-STAT途径介导许多由细胞因子诱导的反应. 其中的信号转导和转录激活因子6(signal transducers and activators of transcription 6, STAT6)与炎症反应密切相关, 正日益受到人们的关注, 但STAT6在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者黏膜内的蛋白表达情况国内尚未见报道. 我们对STAT6在UC发病中的作用做了初步探讨. 鉴于磷酸化在STAT6的活化过程中起关键作用^[2-3], 我们选择了非磷酸化的STAT6和磷酸化的STAT6(pSTAT6)2种抗体作为一抗, 用免疫组化方法检测STAT6蛋白在UC黏膜中的表达。

1 材料和方法

1.1 材料 从中国医科大学附属第一医院胃癌研究室及

第二医院病理科2001/2004年经结肠镜活检的归档蜡块中选取UC病例50例, 男27, 女23, 年龄18-70(平均39.4岁)和正常对照者50名, 男26名, 女24名, 年龄20-65(平均37.8岁), 所有病例均经结肠镜和病理学检查确诊. 所有标本各切出3片, 其中1片行HE染色, 另2片行免疫组织化学染色。

1.2 方法 应用链霉菌素-生物素免疫组化染色法(SP法). 4 μ m石蜡切片脱蜡至水, 30 mL/L过氧化氢阻断, 微波抗原修复, 加正常山羊血清封闭液, 滴加一抗和二抗, DAB显色. 然后经苏木素复染, 逐步脱水, 二甲苯透明, 最后用中性树脂封片. 抗STAT6抗体为兔抗人多克隆抗体, 抗pSTAT6为羊抗人多克隆抗体(购自美国Santa Cruz公司), 免疫组化试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品. 以细胞质或核内出现黄色为阳性, 以PBS缓冲液代替一抗作为空白对照. 从以下两方面综合评分: (1)阳性染色深度(未见染色为0分, 轻度染色为1分, 中度染色为2分, 深度染色为3分). (2)阳性细胞率, 即阳性细胞占计数细胞的比例, 以高倍镜($\times 400$ 倍)下观察10个视野为准(染色细胞 $\leq 5\%$ 为0分, 6-30%为1分, 31-70%为2分, 71-100%为3分). 将这两方面得分相加, 最高分为6分. 得分0-1分为(-), 2分为(+), 3-4分为(++), 5-6分为(+++).

统计学处理 采用SPSS10.0软件包进行 χ^2 检验, 以精确概率法计算P值, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 STAT6蛋白的表达 STAT6的阳性表达位于大部分黏膜固有层的淋巴细胞、浆细胞以及腺上皮等处. 免疫组化反应产物呈黄色, 主要定位于细胞质(图1A), 阳性率为42%. 其中有2例在细胞质着色的同时可见散在1-2个细胞核着色, 但按评分标准视为阴性表达. 正常对照组细胞质也有着色, 阳性率为20%, 但多数染色浅淡(图1B), 未见细胞核染色. UC组与对照组相比, 差异有显著性($P<0.05$)。

2.2 pSTAT6蛋白的表达 免疫组化反应产物主要定位于细胞核和细胞质, 阳性表达位于黏膜固有层的淋巴细胞、浆细胞和腺上皮等处. UC组有12例阳性表达, 而对照组有2例弱阳性(+)表达, UC组与对照组染色的阳性率分别为30%和4%, 差异有显著性($P<0.05$). 其中UC组中有9例在细胞质表达的同时还可见少量细胞核着色(图1C), 均为弱阳性(+)表达, 对照组中则未见细胞核着色(图1D), 两组相比亦有统计学意义($P<0.05$)。

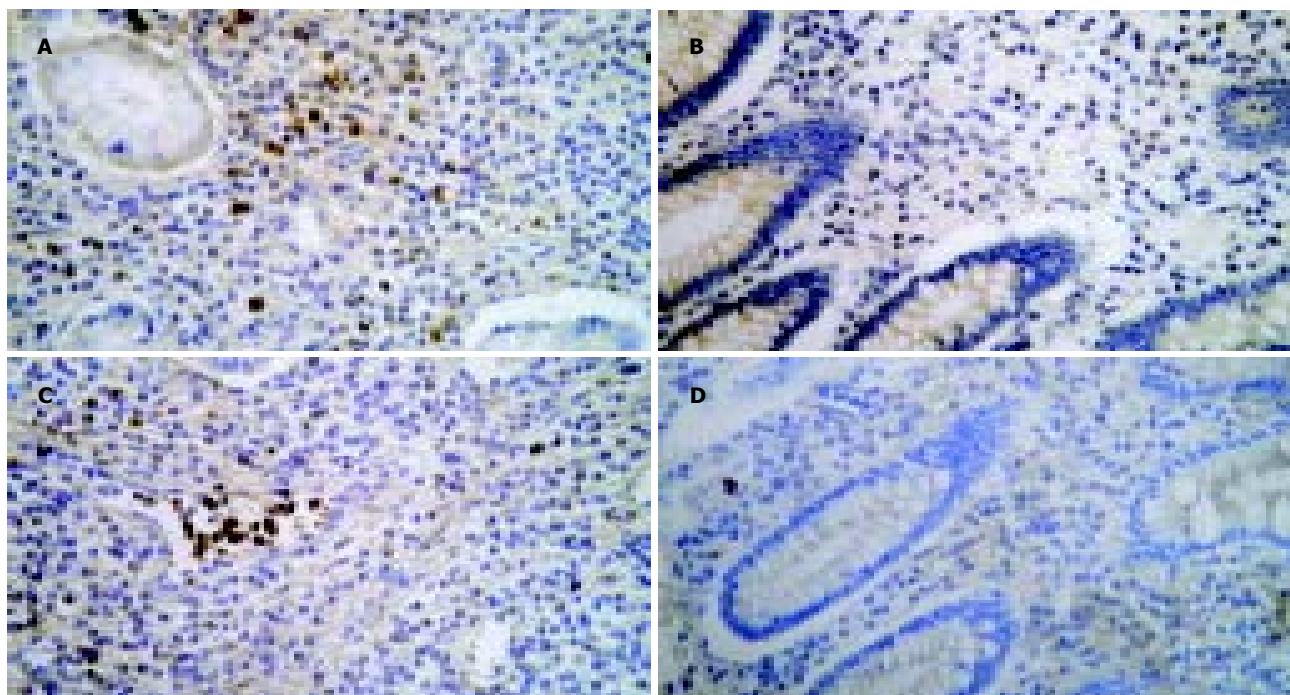


图1 UC肠黏膜STAT6和pSTAT6表达 SP $\times 400$. A: UC组 STAT6胞质着色, B:对照组 STAT6胞质染色浅淡, C: UC组 pSTAT6胞核和胞质着色, D:对照组 pSTAT6胞质无染色或染色浅淡.

3 讨论

目前,免疫因素在IBD的发病学中最为肯定, Th1/Th2亚群的平衡失调可能是IBD发病的重要机制之一^[4-5]. Th分化为Th1/Th2受多种因素调节^[6-7], 虽然现在已经发现了参与Th1细胞和Th2细胞分化的很多机制, 但是启动此分化的初始环节还不清楚^[8-9]. 许多数据表明一些重要的转录因子对Th1细胞和Th2细胞的程序性基因表达有启动作用. STAT6即是介导Th2的关键转录因子之一, 在维持Th1/Th2的平衡反应中起重要作用^[10-11], 而且STAT6是炎症性肠病的候选基因^[12], 所以我们研究STAT6是否在UC的发病中起作用. 对于UC与Th1/Th2细胞的关系, 目前还没有定论, 我们的研究结果显示STAT6免疫组化反应产物主要定位于细胞质, 阳性表达位于黏膜固有层的淋巴细胞、浆细胞以及部分肠黏膜上皮细胞等处. 众所周知, 各种类型的细胞因子是由淋巴细胞、上皮细胞等分泌的, STAT6表达增强可能是UC患者细胞因子增加的一个原因, 而细胞因子在UC发病中的重要性已得到公认, 所以我们可以认为STAT6在UC的发病中是起一定作用的. 又由于依赖细胞因子的JAK-STAT途径在健康和疾病的免疫反应中起重要作用, STAT6也参与正常细胞的分化、增生、生存、凋亡和血管发生^[13-14], 正常对照组也可见STAT6升高, 我们的实验证实了这一点. STAT6在胞质内是作为一种潜伏的单体形式存在, 如果某种刺激因素使STAT6结合在IL-4受体上, STAT6的641位点上的酪氨酸残基发生磷酸化, STAT6即被激活. 激活的STAT6穿过核膜, 进入细胞核, 与特定基因的启动子结合, 诱导特定基因的表达^[15]. 在以上过程中, STAT6的磷酸化是很重要的, 磷酸化的STAT6代表活化状态

的STAT6, 活化状态的STAT6参与Th2的分化^[16]. 在我们的实验中, pSTAT6免疫组化反应产物可见一部分细胞核染色, 且与对照组相比有显著性差异, 表明在UC的发病过程中有STAT6进入细胞核发挥转录活性, 也就是有STAT6的活化, 说明STAT6参与了UC的发病. 但是, 在UC的发病过程中, STAT6升高是否与Th2直接相关, 是否由于STAT6对Th1类细胞因子的负调节作用增强从而使STAT6升高, 还有待于进一步研究.

总之, 我们对STAT6在UC黏膜中的表达做了初步探讨, 认为UC的发病与STAT6有关. STAT6在UC发病机制中的作用有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630-1635
- 2 MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000;51:2-9
- 3 Christodouloulopoulos P, Cameron L, Nakamura Y, Lemiere C, Muro S, Dugas M, Boulet LP, Laviolette M, Olivenstein R, Hamid Q. TH2 cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:586-591
- 4 Van Damme N, De Keyser F, Demetter P, Baeten D, Mielants H, Verbruggen G, Cuvelier C, Veys EM, De Vos M. The proportion of Th1 cells, which prevail in gut mucosa, is decreased in inflammatory bowel syndrome. *Clin Exp Immunol* 2001;125:383-390
- 5 Smerz-Bertling C, Duschl A. Both interleukin 4 and interleukin 13 induce tyrosine phosphorylation of the 140-kDa sub-unit of the interleukin 4 receptor. *J Biol Chem* 1995;270:966-970
- 6 Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development: Roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest* 2002;109:431-435
- 7 Ben-Sasson SZ, Gerstel R, Hu-Li J, Paul WE. Cell division is

- not a "clock" measuring acquisition of competence to produce IFN γ or IL-4. *J Immunol* 2001;166:112-120
- 8 Bellinghausen I, Brand P, Bottcher I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology* 2003;108:167-176
- 9 Lund RJ, Ylikoski EK, Aittokallio T, Nevalainen O, Lahesmaa R. Kinetics and STAT4- or STAT6-mediated regulation of genes involved in lymphocyte polarization to Th1 and Th2 cells. *Eur J Immunol* 2003;33:1105-1116
- 10 Wang Y, Malabarba MG, Nagy ZS, Kirken RA. Interleukin 4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. Roles for multiple phosphorylation sites and Stat6 function. *J Biol Chem* 2004;279:25196-25203
- 11 Zhang WJ, Koltun WA, Thompson JL, Tilberg AF, Galka E, Poritz LS, Chorney MJ. Human B lymphoblast cell lines defective of Stat6 signaling produce high levels of proinflammatory cytokines IL-12, TNF α and IFN γ . *Int J Oncol* 2004;24:447-453
- 12 Xia B, Crusius JB, Wu J, Zwiers A, van Bodegraven AA, Pena AS. Signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism and inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2003;131:446-450
- 13 Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 2000;19:2577-2584
- 14 Calo V, Miglavec M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003;197:157-168
- 15 Kraus J, Borner C, Holtt V. Distinct palindromic extensions of the 5'-TTC...GAA-3' motif allow STAT6 binding *in vivo*. *FASEB J* 2003;17:304-306
- 16 Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol* 2001;166:7276-7281

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 •

新生鼠肠损伤时肝脏黄嘌呤氧化酶的变化

芦惠, 王丽杰

芦惠, 王丽杰, 中国医科大学附属第二医院儿科 辽宁省沈阳市 110004
项目负责人: 芦惠, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院儿科. luhui66999@sina.com
电话: 024-23930619 传真: 024-83955509
收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-09-04

摘要

目的: 探讨新生鼠肠损伤时肝脏黄嘌呤氧化酶(XO)的变化。

方法: 新生大鼠随机分为对照组8只, 实验组每一时相点各8只。将 *E coli*O₅₅: B₅ 脂多糖 5 mg/kg 注入新生鼠胃内, 分别于灌胃后3, 6, 12, 24, 72 h处死动物。取部分肝组织固定, 包埋, HE染色, 光镜下观察其组织学改变。其余肝组织用于测定XO活性。

结果: 实验组6, 12 h XO活性明显高于对照组(分别为 4.719 ± 0.793 nkat/g vs 3.961 ± 0.387 nkat/g, 4.929 ± 0.477 nkat/g vs 3.961 ± 0.387 nkat/g, $P < 0.05$); 3, 24, 72 h XO活性与对照组无显著差异($P > 0.05$)。内毒素治疗后随着时间的进行逐渐出现中央静脉扩张, 肝窦充血、炎性细胞浸润, 肝细胞水肿, 胞质疏松, 空泡变性。6, 12 h可见大量肝细胞内出血, 肝细胞坏死。24, 72 h肝细胞水肿渐消失, 出血坏死不明显。

结论: 新生鼠肠损伤时可致肝脏受累, 且XO活性愈高, 肝损伤愈重。

芦惠, 王丽杰. 新生鼠肠损伤时肝脏黄嘌呤氧化酶的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2486-2487
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2486.asp>

0 引言

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是新生儿期最常见的胃肠道疾病, 可导致多器官功能衰竭^[1]。肝脏是人体重要的免疫器官, 在肠屏障功能受损时, 作为第一道防线, 一定程度上能抑制肠源性感染扩散, 但其本身炎性细胞也可被激活, 在倍增全身炎症反应的同时自身亦受到损伤^[2]。我们通过内毒素(lipopolysaccharide, LPS)建立新生鼠肠损伤模型, 探讨肝脏黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)的变化及意义。

1 材料和方法

1.1 材料 健康1日龄Wistar新生大鼠, 平均体质量 6.3 ± 0.9 g, 由中国医科大学第二临床学院动物部提供。随机分为对照组8只, 实验组每一时相点(3, 6, 12, 24, 72 h)各8只。将1.9F硅胶管(B-D Inc, Sandy, UT, USA)经口插入胃内, *E coli* O₅₅: B₅ 脂多糖(LPS; Sigma Chemical CO., St. Louis, Mo) 5 mg/kg用无菌生理盐水稀释至0.2 mL注入胃内; 对照组则注入无菌生理盐水0.2 mL^[3]。灌胃后各组均放回母鼠旁, 继续哺乳, 直至实验结束。动物处死后, 分离肝脏。取肝组织于40 g/L多聚甲醛中固定, 常规脱水, 包埋切片, 行HE染色, 光镜下观察其组织学变化。其余肝组织于-80℃超低温冰箱中保存, 以备检测。

1.2 方法 肝组织XO活性测定, 按测定试剂盒要求, 应用紫外/可见分光光度计(法国500-P型), 测定肝组

- not a "clock" measuring acquisition of competence to produce IFN γ or IL-4. *J Immunol* 2001;166:112-120
- 8 Bellinghausen I, Brand P, Bottcher I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology* 2003;108:167-176
- 9 Lund RJ, Ylikoski EK, Aittokallio T, Nevalainen O, Lahesmaa R. Kinetics and STAT4- or STAT6-mediated regulation of genes involved in lymphocyte polarization to Th1 and Th2 cells. *Eur J Immunol* 2003;33:1105-1116
- 10 Wang Y, Malabarba MG, Nagy ZS, Kirken RA. Interleukin 4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. Roles for multiple phosphorylation sites and Stat6 function. *J Biol Chem* 2004;279:25196-25203
- 11 Zhang WJ, Koltun WA, Thompson JL, Tilberg AF, Galka E, Poritz LS, Chorney MJ. Human B lymphoblast cell lines defective of Stat6 signaling produce high levels of proinflammatory cytokines IL-12, TNF α and IFN γ . *Int J Oncol* 2004;24:447-453
- 12 Xia B, Crusius JB, Wu J, Zwiers A, van Bodegraven AA, Pena AS. Signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism and inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2003;131:446-450
- 13 Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 2000;19:2577-2584
- 14 Calo V, Migliaiavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003;197:157-168
- 15 Kraus J, Borner C, Holtt V. Distinct palindromic extensions of the 5'-TTC...GAA-3' motif allow STAT6 binding *in vivo*. *FASEB J* 2003;17:304-306
- 16 Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol* 2001;166:7276-7281

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 •

新生鼠肠损伤时肝脏黄嘌呤氧化酶的变化

芦惠, 王丽杰

芦惠, 王丽杰, 中国医科大学附属第二医院儿科 辽宁省沈阳市 110004
项目负责人: 芦惠, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院儿科. luhui66999@sina.com
电话: 024-23930619 传真: 024-83955509
收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-09-04

摘要

目的: 探讨新生鼠肠损伤时肝脏黄嘌呤氧化酶(XO)的变化。

方法: 新生大鼠随机分为对照组8只, 实验组每一时相点各8只。将 *E coli*O₅₅: B₅ 脂多糖 5 mg/kg 注入新生鼠胃内, 分别于灌胃后3, 6, 12, 24, 72 h处死动物。取部分肝组织固定, 包埋, HE染色, 光镜下观察其组织学改变。其余肝组织用于测定XO活性。

结果: 实验组6, 12 h XO活性明显高于对照组(分别为 4.719 ± 0.793 nkat/g vs 3.961 ± 0.387 nkat/g, 4.929 ± 0.477 nkat/g vs 3.961 ± 0.387 nkat/g, $P < 0.05$); 3, 24, 72 h XO活性与对照组无显著差异($P > 0.05$)。内毒素治疗后随着时间的进行逐渐出现中央静脉扩张, 肝窦充血、炎性细胞浸润, 肝细胞水肿, 胞质疏松, 空泡变性。6, 12 h可见大量肝细胞内出血, 肝细胞坏死。24, 72 h肝细胞水肿渐消失, 出血坏死不明显。

结论: 新生鼠肠损伤时可致肝脏受累, 且XO活性愈高, 肝损伤愈重。

芦惠, 王丽杰. 新生鼠肠损伤时肝脏黄嘌呤氧化酶的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2486-2487
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2486.asp>

0 引言

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是新生儿期最常见的胃肠道疾病, 可导致多器官功能衰竭^[1]。肝脏是人体重要的免疫器官, 在肠屏障功能受损时, 作为第一道防线, 一定程度上能抑制肠源性感染扩散, 但其本身炎性细胞也可被激活, 在倍增全身炎症反应的同时自身亦受到损伤^[2]。我们通过内毒素(lipopolysaccharide, LPS)建立新生鼠肠损伤模型, 探讨肝脏黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)的变化及意义。

1 材料和方法

1.1 材料 健康1日龄Wistar新生大鼠, 平均体质量 6.3 ± 0.9 g, 由中国医科大学第二临床学院动物部提供。随机分为对照组8只, 实验组每一时相点(3, 6, 12, 24, 72 h)各8只。将1.9F硅胶管(B-D Inc, Sandy, UT, USA)经口插入胃内, *E coli* O₅₅: B₅ 脂多糖(LPS; Sigma Chemical CO., St. Louis, Mo) 5 mg/kg用无菌生理盐水稀释至0.2 mL注入胃内; 对照组则注入无菌生理盐水0.2 mL^[3]。灌胃后各组均放回母鼠旁, 继续哺乳, 直至实验结束。动物处死后, 分离肝脏。取肝组织于40 g/L多聚甲醛中固定, 常规脱水, 包埋切片, 行HE染色, 光镜下观察其组织学变化。其余肝组织于-80℃超低温冰箱中保存, 以备检测。

1.2 方法 肝组织XO活性测定, 按测定试剂盒要求, 应用紫外/可见分光光度计(法国500-P型), 测定肝组

织匀浆 XO 活性. 同时按考马斯亮兰蛋白测定试剂盒说明测定每一样本的蛋白浓度. 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所.

统计学处理 经 SPSS 11.5 For Windows 数据分析软件处理. 所有数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间比较采用配对 t 检验. 统计结果显著性以 $P < 0.05$ 表示.

2 结果

2.1 肝组织 XO 活性变化 实验组 6, 12 h 肝组织 XO 活性($4\,719 \pm 793$ nkat/g, $4\,929 \pm 477$ nkat/g)均明显高于对照组($3\,961 \pm 387$ nkat/g, $P < 0.05$), 高峰在 12 h; 24 h ($4\,481 \pm 473$ nkat/g) XO 活性下降, 3($4\,268 \pm 455$ nkat/g), 24, 72 h ($3\,994 \pm 605$ nkat/g)肝组织 XO 活性与对照组无显著差异($P > 0.05$).

2.2 肝组织形态学改变 对照组新生鼠肝小叶分界不清, 肝板排列较成年大鼠差, 胞质嗜碱性, 门管区不清楚, 但中央静脉清晰可见. 内毒素治疗后随着时间的进行, 逐渐出现中央静脉扩张, 肝窦充血、炎性细胞浸润, 肝细胞水肿, 胞质疏松, 空泡变性. 6, 12 h 时可见大量肝细胞内出血, 肝细胞坏死. 24, 72 h 时肝细胞水肿渐消失, 出血坏死不明显.

3 讨论

NEC 多见于新生儿. 早产、缺氧/缺血、肠道喂养和细菌增生是导致此病的主要危险因素^[1,3-5]. 临床统计, 80%以上的 NEC 患儿是早产儿或低出生体重儿, 其发病率与胎龄呈负相关^[6-8], 原因是早产儿肠道免疫功能不成熟. 胃肠道免疫功能分为非特异性(先天性)和特异性两部分, 前者包括胃酸、蛋白水解酶、粘蛋白及通透性等^[9]. 生理功能完整的肠黏膜对细菌和内毒素构成屏障作用; 在感染和创伤等应激状况下, 肠屏障受损, 大量细菌和毒素经门静脉和肠系膜淋巴系统进入体循环, 导致肠源性内毒素血症和细菌移位, 并可引发炎症连锁反应, 引起全身炎症反应综合征, 最终致多器官功能衰竭(MOF)^[2]. 因此有人称肠道为“创伤后多器官功能衰竭的源泉”. NEC 亦可导致多器官功能衰竭.

新生鼠非特异性免疫功能缺陷^[3], 我们发现, 在肠道给予 LPS 后肝组织渐出现中央静脉扩张, 肝窦充血、炎性细胞浸润, 肝细胞水肿, 胞质疏松, 肝细胞出血、坏死等自身受损的表现. LPS 可增加肠黏膜通透性、改变肠动力、降低肠防御机能、损害肠上皮细胞紧密连接从而促进肠道细菌移位. 而肝脏是人体的主要代谢器官, 也是重要的免疫器官. 生理条件下, 肝肠形成肠肝轴(enterohepaticaxis), 发挥多种生理功能. 在肠屏障功能受损时, LPS 进入循环系统, 则肝脏炎性细胞可被源自肠道的细菌和毒素激活, 出现肝细胞坏死^[3,10].

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是造成肝损伤的重要因素. 黄嘌呤脱氢酶/黄嘌呤氧化酶(xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase, XD/XO)系统是肝脏 ROS

的主要来源^[11]. XD 是 XO 的前体, 二者既独立存在又可相互转化. XD 和 XO 均可催化次黄嘌呤向黄嘌呤及黄嘌呤向尿酸的转化. 不同的是 XD 需 NAD^+ 作为电子受体, 产生稳定的活性产物 NADPH; 而 XO 则以分子氧为电子受体, 产生高活性超氧阴离子(O_2^-)和过氧化氢(H_2O_2). 正常情况下, XD 占酶活性的 90%, 仅 10% 以 XO 形式存在. 主要参与核酸的分解代谢; 促进肠道对铁的吸收和转运; 而且, 当细菌或毒素侵袭导致毛细血管内皮轻微受损时, XD 从血管内皮细胞释出, 在有氧环境中转变为 XO, 在催化底物过程中产生 O_2^- , 对机体具有防御功能^[12-13]. 但在缺血/再灌注或感染时, 细胞内 ATP 分解过度, ATP 不足使钙泵活性下降, 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 激活钙依赖蛋白酶, 促使 XD 向 XO 转化, XO 活性显著增加, ROS 代谢产物亦增加. 介导脂质过氧化反应, 使膜受体、蛋白酶和离子通道的微环境发生改变, 导致细胞功能障碍, 甚至死亡^[10-12]. 我们发现, 经 LPS 治疗后, 肝组织 XO 活性愈高, 肝损伤愈重. 72 h 时 XO 活性降低, 肝细胞水肿消失, 出血坏死不明显. 提示临床如能应用 XO 抑制剂有效减少活性氧的产生, 对于新生儿 NEC 的整体治疗可能具有一定意义.

4 参考文献

- 1 Jilling T, Lu J, Jackson M, Caplan MS. Intestinal epithelial apoptosis initiates gross bowel necrosis in an experimental rat model of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 2004;55:622-629
- 2 Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr Opin Crit Care* 2003;9:143-151
- 3 Chan KL, Ho JC, Chan KW, Tam PK. A study of gut immunity to enteral endotoxin in rats of different ages: a possible cause for necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2002;37:1435-1440
- 4 Kafetzis DA, Skevaki C, Costalos C. Neonatal necrotizing enterocolitis: an overview. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:349-355
- 5 Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol* 2003;6:6-23
- 6 Buch NA, Ahmad SM, Ali SW, Hassan HM. An epidemiological study of neonatal necrotizing enterocolitis. *Saudi Med J* 2001;22:231-237
- 7 Lee JS, Polin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol* 2003;8:449-459
- 8 Foster J, Cole M. Oral immunoglobulin for preventing necrotizing enterocolitis in preterm and low birth-weight neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;1:CD001816
- 9 Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:685-694
- 10 Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* 2000;32:1008-1017
- 11 Kono H, Rusyn I, Bradford BU, Connor HD, Mason RP, Thurman RG. Allopurinol prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:296-303
- 12 Meneshian A, Bulkley GB. The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* 2002;9:161-175
- 13 Millar TM. Peroxynitrite formation from the simultaneous reduction of nitrite and oxygen by xanthine oxidase. *FEBS Lett* 2004;562:129-133

核孔复合体相互作用蛋白(NPIP)对乙型肝炎病毒核心启动子转录活性的调节作用

高学松, 成军, 甄真, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增

高学松, 成军, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

甄真, 河北医科大学第三医院感染科 河北省石家庄市 050051

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队九五科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队十五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队十五科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军302医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-07-30 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 构建HBV核心启动子及NPIP的重组载体, 研究NPIP对核心启动子表达的调节作用。

方法: 根据HBV核心启动子及NPIP的序列设计引物, 用聚合酶链反应(PCR)的方法分别扩增HBV核心启动子和NPIP基因, 分别构建HBV核心启动子的报告载体及NPIP的真核表达载体, 脂质体法瞬时转染HepG2细胞。

结果: 成功构建HBV核心启动子的报告载体及NPIP的真核表达载体。脂质体法瞬时转染HepG2细胞48 h后, 用ELISA法检测 β -gal的表达, 显示核心启动子在NPIP的影响下, 其活性有降低3-4倍。通过体内实验证明NPIP可以下调HBV核心启动子的表达。

结论: NPIP明显降低HBV核心启动子的表达, 为进一步研究HBV复制的分子生物学机制提供了新的线索。

高学松, 成军, 甄真, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增. 核孔复合体相互作用蛋白(NPIP)对乙型肝炎病毒核心启动子转录活性的调节作用. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2488-2491

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2488.asp>

0 前言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生密切相关。但HBV DNA复制的分子生物学机制仍不十分清楚^[1-7]。HBV的基因表达与哺乳动物细胞一样, 主要以转录水平调节为主的多层调节机制。其中启动子DNA与转录因子蛋白之间的结合和相互作用是其关键环节, 因此研究基因启动子DNA结合蛋白十分重要。筛选启动子DNA结合蛋白的技术途径多种多样, 我们曾经利用噬菌体表面展示技术, 以HBV核心基因启动子的DNA为固相支持分子, 筛选人肝细胞cDNA文库, 获得了和HBV核

心启动子结合的肝细胞蛋白-核孔复合体相互作用蛋白(NPIP), 为深入研究其和HBV核心启动子结合的机制及功能, 我们分别构建报告载体和真核表达载体, 共转染细胞, 阐明二者之间的关系, 为进一步研究HBV复制的分子生物学机制提供了新的线索。

1 材料和方法

1.1 材料 质粒pGEM-Teasy和pcDNA3.1(-)(Promega公司), Taq酶、琼脂糖、dNTP、T4 DNA连接酶、RNA酶、玻璃奶DNA回收试剂盒(博大科技), *EcoR* V、*Bam*HI、*Mlu*I、*Nhe*I(TaKaRa公司), 热循环仪、凝胶成像仪、酶联黏附读数仪、大肠杆菌DH5 α 、pCP10质粒为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 HBV核心启动子的扩增和克隆 根据HBV ayw的基因序列设计引物, 在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡核苷酸引物, P1: 5' -ACG CGT CCA AGG TCT TAC ATA AG-3', P2: 5' -GCT AGC ATG ATT AGG CAG AGG TG-3', 在引物5'端分别引入*Mlu*I和*Nhe*I位点, 由上海生工公司合成。

1.2.2 NPIP的扩增和克隆 根据NPIP基因序列设计引物。P1: 5' -GAATTC TTGTCCATCAAATGAATATGTG-3', P2: 5' -GGATCCCTTAGTTTCTTGAGATTATCATC-3' 在5'端分别引入*Eco*RI、*Bam*HI酶切位点。引物由上海生工公司合成。

1.2.3 重组报告载体pCAT-CP的构建与鉴定 将HBV核心启动子PCR纯化产物与pGEM-Teasy载体混合在16℃条件下用T4 DNA连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌DH5 α 感受态, 在铺有IPTG/X-gal的氨苄西林(LB/Amp)平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落采用碱裂解法提取质粒进行酶切鉴定。此质粒及pCAT Basic均用*Mlu*I和*Nhe*I双酶切回收相应的酶切片段, 在16℃条件下用T4 DNA连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌DH5感受态细胞, 随机挑选在LB/Amp平板上生长的菌落, 采用碱裂解法提取质粒, 进行*Mlu*I和*Nhe*I双酶切鉴定。

1.2.4 重组表达载体pcDNA3.1(-)-NPIP的构建与鉴定 将噬斑的PCR纯化产物pGEM-Teasy载体混合在16℃条件下用T4 DNA连接酶连接过夜, 随后转化大肠杆菌DH5感受态, 在铺有IPTG/X-gal的氨苄西林平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落用碱裂解法提取

质粒, 进行酶切鉴定. 此质粒及载体 pcDNA3.1(-)均用 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切回收相应的酶切片段在 16 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 感受态细胞, 随机挑选在 LB/Amp 平板上生长的菌落碱裂解法提取质粒, 进行 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切鉴定.

1.2.5 转染细胞 分别用磁珠法提取质粒将 pCAT basic、pCAT promoter、pCAT-CP 和 pCAT-CP+ pcDNA3.1(-)-NPIP 通过脂质体瞬时共转染 HepG2 细胞用 ELISA 法检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达研究 pcDNA3.1(-)-NPIP 对 pCAT-CP 的功能影响.

2 结果

2.1 pCAT-CP 重组质粒的酶切鉴定 利用自行设计的引物 P1/P2 成功扩增出 HBV 核心启动子基因片段, PCR 产物经 1 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段约为 206 bp, 与预期大小符合且无非特异扩增现象(图2). 用双酶切所得片段连接到用相同的 *MluI* 和 *NheI* 所切的 pCAT 中经酶切鉴定结果正确. 表明 pCAT-CP 质粒构建成功(图1).



图1 pCAT-CP 重组质粒酶切鉴定. Lane M: 15 000DNA Ladder; Lane 1: pCAT-CP *MluI*/*NheI* cut.

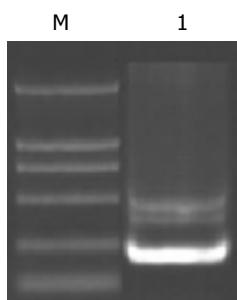


图2 HBV 核心启动子扩增片段 Lane M: 2000 DNA Ladder; Lane 1: HBV core promoter PCR.

2.2 pcDNA3.1(-)-NPIP 重组质粒的酶切鉴定 利用自行设计的引物 P3/P4 成功扩增出 NPIP 基因片段, PCR 产物经 1 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段约为 531 bp, 与预期大小符合且无非特异扩增现象(图3). 用双酶切所得片段连接到用相同的 *EcoRI* 和 *BamHI* 所切的 pcDNA3.1(-)中经酶切鉴定结果正确. 表明 pcDNA3.1(-)-NPIP 质粒构建成功(图4).

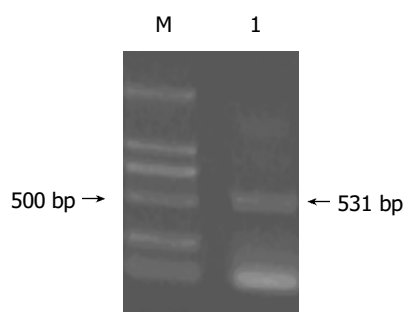


图3 NPIP 扩增片段. Lane M: 2000 DNA Ladder; Lane 1: NPIP PCR.

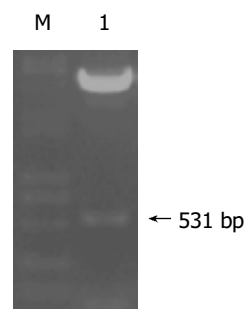


图4 pcDNA3.1(-)-NPIP 重组质粒的酶切鉴定. Lane M: 15000 DNA Ladder; Lane 1: pcDNA3.1(-)-NPIP *EcoRI*/*BamHI*.

2.3 pcDNA3.1(-)-NPIP 对 pCAT-CP 的激活作用 用脂质体法瞬时转染 HepG2 细胞质粒用量 1 μg, 脂质体用量 3 μL. 培养 48 h 后进行 ELISA 检测. 氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达(表1, 图5), pCAT-CP 实验组酶的表达是 pCAT 的 3 倍, 而 pcDNA3.1(-)-NPIP + pCAT-CP 表达与 pCAT-CP 相比下降 3-4 倍, 证明 NPIP 对 HBV 核心启动子有下调作用.

表1 重组载体共转染 HepG2 细胞氯霉素乙酰转移酶检测结果

质粒	A 值
pCAT-basic	0.021
pCAT-promoter	0.343
pCAT-CP	3.151
pCAT-CP- pcDNA3.1(-)-NPIP	0.969

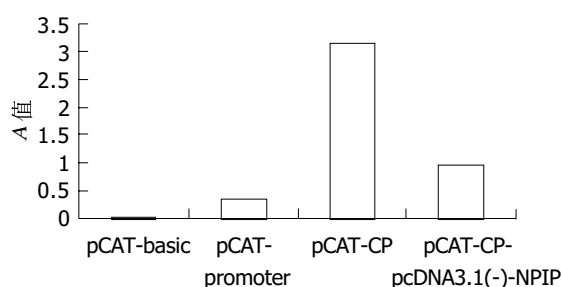


图5 CAT-ELISA 检测结果.

3 讨论

乙型肝炎病毒(HBV)是一种严重危害人类健康的致病因子. HBV 属嗜肝 DNA 病毒, 其基因组为 3.2 kb 部分双

链的环状 DNA. 目前已确定有四个主要的开放阅读框架, 分别负责编码核心抗原(pre-C/C)、核酸聚合酶(P)、表面抗原(pre-S/S)和 X 蛋白(X). 这些基因的表达受到顺式元件-启动子和增强子的调控. 目前在 HBV 基因组已发现并鉴定的顺式元件有四个启动子(C、X、SP I、SP II)、两个增强子(Enh I 和 Enh II)和糖皮质激素应答元件. 核心启动子产生两个 3.5 kb RNA: 前-核心和前基因组 RNA. 前-核心 RNA 编码前核心蛋白和 e 抗原前基因组 RNA 不仅作为 mRNA 编码核心和聚合酶蛋白而且与病毒蛋白一起包埋入核衣壳作为模板逆转录. 前基因组 RNA 的表达调控在病毒复制周期中起着关键作用. 核心启动子分为两部分: 基本核心启动子和核心上游调节元件(CURS)其上游为负性调节元件(NER 1 616-1 621 nt) CURS 能激活邻近下游的 BCP^[8-14].

我们利用噬菌体展示技术以 DNA 为固相分子筛选肝细胞文库研究启动子结合蛋白. 获得了与 HBV 核心启动子结合的蛋白^[15-25]. 经同源性比较确定该蛋白与 NP1P 同源, 同源率为 99%.

人核孔复合体相互作用蛋白(NPIP), 是一种巨大的蛋白复合物, 他插在核外膜的双层膜中, 他作为一种装配的可溶性通道起作用, 他是已知的真核细胞的细胞核与细胞质进行分子交换的惟一通道. 通过 NPC 的大分子运输是由细胞核浆穿梭受体 Kaps 介导的, Kaps 通过核孔复合体的物质运输是与包含苯丙氨酸-甘氨酸(FC)肽重复序列在内的核孔蛋白相互作用完成的. 不同可溶性转运受体可以识别许多转入或转出细胞核的转运物质, 并携带载物到达各自的目标物^[26]. 核质转运通过 NPC 转移定位, 具有高度选择性并非非常迅速. 输入蛋白或输出蛋白介导的转运所需要的能量来源只能由 RanGTP 周期提供, 他可通过调节底物接合和释放反应来进行定向转移. 由于核糖体亚基的复杂生物合成性, 对核糖体从核中转出的分析一直很难. 通过系列研究表明 40 s 转出要求 RanGTP 酶周期及核孔蛋白; 几种核孔蛋白的突变及 Ran 周期的成员突变禁止 60 s 转运; 60 s 成熟化与核释放以及转运到细胞质有紧密联系. NPIP 由免疫荧光显微术证实定位于核膜, 与核孔 P62 共区域化^[27-30]. Matsubayashi *et al*^[31] 构建绿色荧光蛋白(GFP)-融合有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)蛋白研究 MAPK 信号传导过程, 无论是否磷酸化, GFP-MAPK 都可在细胞核内聚集. 同时体外研究表明, MAPK 可与核蛋白 CAN/Nup214 苯丙氨酸-甘氨酸肽重复序列直接结合. 说明 MAPK 被激活后, 从细胞质向细胞核移位, 除经典的两条传导通路外, 第三条通路是通过与核孔复合体的直接作用而通过细胞核孔的.

我们的研究在本研究组既往研究结果的基础上, 利用 HBV 核心基因启动子 DNA 表达载体的构建, NP1P 真核表达载体的构建, 报告基因表达载体和真核基因表达载体的细胞共转染技术, 直接证实了 NP1P 与 HBV 核心基因启动子 DNA 之间的结合, 具有重要的生物学

意义, 即 NP1P 可以通过与 HBV 核心基因启动子 DNA 之间的结合, 实现对 HBV 核心基因启动子的下调作用. HBV 核心基因启动子指导着核心蛋白、聚合酶蛋白的 mRNA 的转录, 同时指导着 HBV 前基因组 RNA 的转录. 但是 NP1P 对于 HBV 核心基因启动子的这种调节作用, 究竟是对 HBV 蛋白编码基因的 mRNA 的转录产生下调作用, 还是下调前基因组 RNA 的转录, 或者兼而有之, 目前还不十分清楚, 需要进一步的研究加以证实.

总之, 通过噬菌体展示技术筛选到的核心启动子的结合蛋白 NP1P, 提示在 HBV 感染后, HBV 的复制及与相关蛋白的结合影响肝细胞核孔复合体功能, 影响核糖体的成熟, 物质的转运以及细胞信号的传导, 从而影响肝细胞的功能, 但其详细的分子生物学机制有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11:888-896
- 3 成军, 刘研, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- 4 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 5 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16:A185
- 6 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 世界华人消化杂志 2002;10:897-901
- 7 Wolcke J, Weinhold E. A DNA-binding peptide from a phage display library. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001;20:1239-1242
- 8 Cicchini C, Ansuini H, Amicone L, Alonzi T, Nicosia A, Cortese R, Tripodi M, Luzzago A. Searching for DNA-protein interactions by Lambda phage display. *J Mol Biol* 2002;322:697-706
- 9 巨立中, 成军, 钟彦伟. 启动子 DNA 结合蛋白研究策略. 世界华人消化杂志 2004;12:141-142
- 10 董菁, 施双双, 王业东, 钟彦伟, 王刚, 王琳. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-323
- 11 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136
- 12 Weaver RF. *Molecular biology*. 2 ed. 科学出版社, 2002:124-127
- 13 Johnson JJ, Raney AK, McLachlan A. Characterization of a functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *Virology* 1995;208:147-1589
- 14 成军, 钟彦伟, 施双双, 夏小兵, 王刚, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白人源单链可变区抗体的可溶性表达. 中国病毒学 2001;16:220-223
- 15 Burritt JB, Bow CW, Doss KW. Review: filamentous phage display of oligopeptide libraries. *Analytical Biochemistry* 1996;238:1-13
- 16 Dunn IS. *In vitro* alpha-complementation of beta-galactosidase on a bacteriophage surface. *Eur J Biochem* 1996;242:720-726
- 17 Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380:364-366
- 18 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 军医进修学院学报 2003;24:49-51
- 19 李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1002-1004

- 20 Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745
- 21 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *中国公共卫生* 2002;18:153-154
- 22 Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985;228:1315-1317
- 23 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林. 羧肽酶N调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1131-1134
- 24 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1242-1245
- 25 邵清, 成军, 白雪帆. 乙型肝炎病毒X基因启动子结构及调节研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1240-1242
- 26 Bodoor K, Shaikh S, Enarson P, Chowdhury S, Salina D, Raharjo WH, Burke B. Function and assembly of nuclear pore complex proteins. *Biochem Cell Biol* 1999;77:321-329
- 27 Kuersten S, Arts GJ, Walther TC, Englmeier L, Mattaj IW. Steady-state nuclear localization of exportin-t involves RanGTP binding and two distinct nuclear pore complex interaction domains. *Mol Cell Biol* 2002;22:5708-5720
- 28 Becskei A, Mattaj IW. The strategy for coupling the RanGTP gradient to nuclear protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1717-1722
- 29 Pyhtila B, Rexach M. A gradient of affinity for the karyopherin Kap95p along the yeast nuclear pore complex. *J Biol Chem* 2003;278:42699-42709
- 30 Llen NP, Patel SS, Huang L, Chalkley RJ, Burlingame A, Lutzmann M, Hurt EC, Rexach M. Deciphering networks of protein interactions at the nuclear pore complex. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:930-946
- 31 Matsubayashi Y, Fukuda M. Nishida Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *E J Biol Chem* 2001;276:41755-41760

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 •

β -微球蛋白对乙型肝炎病毒核心启动子转录活性的调节作用

高学松, 成军, 甄真, 杨艳杰, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增

高学松, 成军, 杨艳杰, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

甄真, 河北医科大学第三医院感染科 河北省石家庄市 050051

军队九五科技攻关项目, No.98D063

国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689

军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038

军队十五科技攻关青年基金项目, No.01Q138

军队十五科技攻关面上项目, No.01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军 302

医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-07-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 研究 β_2 -m 对核心启动子表达的调节作用.

方法: 根据HBV核心启动子及 β_2 -微球蛋白的序列设计引物, 用聚合酶链反应(PCR)的方法分别扩增HBV核心启动子和 β_2 -微球蛋白基因, 分别构建HBV核心启动子的报告载体及 β_2 -微球蛋白的真核表达载体, 脂质体法瞬时转染HepG2细胞.

结果: 成功构建HBV核心启动子的报告载体及 β_2 -微球蛋白(β_2 -m)的真核表达载体. 脂质体法瞬时转染HepG2细胞48 h后, 核心启动子在 β_2 -微球蛋白(β_2 -m)的影响下, 其启动子活性降低2倍.

结论: β_2 -微球蛋白(β_2 -m)明显HBV核心启动子的表达.

高学松, 成军, 甄真, 杨艳杰, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增. β -微球蛋白对乙型肝炎病毒核心启动子转录活性的调节作用. *世界华人消化杂志* 2004;12

(10):2491-2494

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2491.asp>

0 前言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生密切相关. 但HBV DNA复制的分子生物学机制仍不十分清楚. 为了寻找肝细胞中可能具有调节作用的蛋白, 前期研究中我们利用噬菌体表面展示技术, 以HBV核心启动子DNA为固相支持分子, 筛选人肝细胞cDNA文库, 获得了和HBV核心启动子结合的肝细胞蛋白- β_2 -微球蛋白(β_2 -m), 为深入研究其和HBV核心启动子结合的机制及功能, 我们分别构建了报告载体和真核表达载体, 共转染细胞, 阐明二者之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 质粒pGEM-Teasy和pcDNA3.1(-)(Promega公司), Taq酶、琼脂糖、dNTP、T4 DNA连接酶、RNA酶、玻璃奶DNA回收试剂盒(博大科技), CAT ELISA试剂盒(Roche), *EcoR* V、*Bam* H I、*Mlu* I、*Nhe* I(购置宝生物公司), 热循环仪、凝胶成像仪、酶联免疫吸附读数仪、大肠杆菌DH5 α 、pCP10质粒为本实验室保存.

1.2 方法

1.2.1 HBV核心启动子的扩增和克隆 根据HBV ayw的

- 20 Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733-1745
- 21 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *中国公共卫生* 2002;18:153-154
- 22 Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985;228:1315-1317
- 23 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林. 羧肽酶N调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1131-1134
- 24 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1242-1245
- 25 邵清, 成军, 白雪帆. 乙型肝炎病毒X基因启动子结构及调节研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1240-1242
- 26 Bodoor K, Shaikh S, Enarson P, Chowdhury S, Salina D, Raharjo WH, Burke B. Function and assembly of nuclear pore complex proteins. *Biochem Cell Biol* 1999;77:321-329
- 27 Kuersten S, Arts GJ, Walther TC, Englmeier L, Mattaj IW. Steady-state nuclear localization of exportin-t involves RanGTP binding and two distinct nuclear pore complex interaction domains. *Mol Cell Biol* 2002;22:5708-5720
- 28 Becskei A, Mattaj IW. The strategy for coupling the RanGTP gradient to nuclear protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1717-1722
- 29 Pyhtila B, Rexach M. A gradient of affinity for the karyopherin Kap95p along the yeast nuclear pore complex. *J Biol Chem* 2003;278:42699-42709
- 30 Llen NP, Patel SS, Huang L, Chalkley RJ, Burlingame A, Lutzmann M, Hurt EC, Rexach M. Deciphering networks of protein interactions at the nuclear pore complex. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:930-946
- 31 Matsubayashi Y, Fukuda M. Nishida Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *E J Biol Chem* 2001;276:41755-41760

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 •

β -微球蛋白对乙型肝炎病毒核心启动子转录活性的调节作用

高学松, 成军, 甄真, 杨艳杰, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增

高学松, 成军, 杨艳杰, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039

甄真, 河北医科大学第三医院感染科 河北省石家庄市 050051

军队九五科技攻关项目, No.98D063

国家自然科学基金攻关项目, No.C03011402, No.C30070689

军队回国留学人员启动基金项目, No.98H038

军队十五科技攻关青年基金项目, No.01Q138

军队十五科技攻关面上项目, No.01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军 302

医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-07-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 研究 β_2 -m 对核心启动子表达的调节作用.

方法: 根据HBV核心启动子及 β_2 -微球蛋白的序列设计引物, 用聚合酶链反应(PCR)的方法分别扩增HBV核心启动子和 β_2 -微球蛋白基因, 分别构建HBV核心启动子的报告载体及 β_2 -微球蛋白的真核表达载体, 脂质体法瞬时转染HepG2细胞.

结果: 成功构建HBV核心启动子的报告载体及 β_2 -微球蛋白(β_2 -m)的真核表达载体. 脂质体法瞬时转染HepG2细胞48h后, 核心启动子在 β_2 -微球蛋白(β_2 -m)的影响下, 其启动子活性降低2倍.

结论: β_2 -微球蛋白(β_2 -m)明显HBV核心启动子的表达.

高学松, 成军, 甄真, 杨艳杰, 黄燕萍, 郭江, 刘妍, 戴久增. β -微球蛋白对乙型肝炎病毒核心启动子转录活性的调节作用. *世界华人消化杂志* 2004;12

(10):2491-2494

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2491.asp>

0 前言

乙型肝炎病毒(HBV)的感染不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化、肝细胞癌的发生密切相关. 但HBV DNA复制的分子生物学机制仍不十分清楚. 为了寻找肝细胞中可能具有调节作用的蛋白, 前期研究中我们利用噬菌体表面展示技术, 以HBV核心启动子DNA为固相支持分子, 筛选人肝细胞cDNA文库, 获得了和HBV核心启动子结合的肝细胞蛋白- β_2 -微球蛋白(β_2 -m), 为深入研究其和HBV核心启动子结合的机制及功能, 我们分别构建了报告载体和真核表达载体, 共转染细胞, 阐明二者之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 质粒pGEM-Teasy和pcDNA3.1(-)(Promega公司), Taq酶、琼脂糖、dNTP、T4 DNA连接酶、RNA酶、玻璃奶DNA回收试剂盒(博大科技), CAT ELISA试剂盒(Roche), *EcoR* V、*Bam* H I、*Mlu* I、*Nhe* I(购置宝生物公司), 热循环仪、凝胶成像仪、酶联免疫吸附读数仪、大肠杆菌DH5 α 、pCP10质粒为本实验室保存.

1.2 方法

1.2.1 HBV核心启动子的扩增和克隆 根据HBV ayw的

基因序列设计引物,在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡核苷酸引物, P1: 5' -ACG CGT CCA AGG TCT TAC ATA AG-3', P2: 5' -GCT AGC ATG ATT AGG CAG AGG TG-3' 片段大小为 251 bp. 在引物 5' 端分别引入 *Mlu*I 和 *Nhe*I 位点, 由上海生工公司合成. 1.2.2 β -微球蛋白的扩增和克隆 根据 β_2 -微球蛋白基因序列设计引物. P3: 5' -GAT ATC ATG TCT CGC TCC GTG GCC TTA G-3', P4: 5' -GGA TCC TTA CAT GTC TCG ATC CCA-3' 在 5' -端分别引入 *Eco*R V、*Bam*HI 酶切位点. 引物由上海生工公司合成.

1.2.3 重组报告载体 pCAT-CP 的构建与鉴定 将 HBV 核心启动子 PCR 纯化产物与 pGEM-Teasy 载体混合在 16 °C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态, 在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林(LB/Amp)平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落采用碱裂解法提取质粒进行酶切鉴定. 此质粒及 pCAT Basic 均用 *Mlu*I 和 *Nhe*I 双酶切回收相应的酶切片段在 16 °C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态, 随机挑选在 LB/Amp 平板上生长的菌落, 采用碱裂解法提取质粒, 进行 *Mlu*I 和 *Nhe*I 双酶切鉴定.

1.2.4 重组表达载体 pcDNA3.1(-)- β m 的构建与鉴定 将噬斑的 PCR 纯化产物与 pGEM-Teasy 载体混合在 16 °C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒, 进行酶切鉴定. 此质粒及载体 pcDNA3.1(-) 均用 *Eco*R V 和 *Bam*H 双酶切回收相应的酶切片段在 16 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞随机挑选在 LB/Amp 平板上生长的菌落碱裂解法提取质粒, 进行 *Eco*R V 和 *Bam*HI 双酶切鉴定.

1.2.5 转染细胞 分别用磁珠法提取质粒, 将 pCAT-basic、pCAT-promoter、pCAT-CP 和 pCAT-CP+pcDNA3.1(-)- β_2 -m 通过脂质体瞬时共转染 HepG2 细胞, 用 ELISA 法检测氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达, 研究 pcDNA3.1(-)- β_2 -M 对 pCAT-CP 功能的影响.

2 结果

2.1 pCAT-CP 重组质粒的酶切鉴定 利用自行设计的引物 P1/P2 成功扩增出 HBV 核心启动子基因片段, PCR 产物经 1 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段为 206 bp, 与预期大小符合且无非特异扩增现象(图2). 用双酶切所得片段连接到用相同的 *Mlu*I 和 *Nhe*I 所切的 pCAT 中经酶切鉴定结果正确. 表明 pCAT-CP 质粒构建成功(图1).

2.2 pcDNA3.1(-)- β m 重组质粒的酶切鉴定 利用自行设计的引物 P3/P4 成功扩增出 β_2 -微球蛋白基因片段, PCR 产物经 1 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段为

360 bp, 与预期大小符合且无非特异扩增现象(图3). 用双酶切所得片段连接到用相同的 *Eco*R V 和 *Bam*HI 所切的 pcDNA3.1(-) 中经酶切鉴定结果正确. 表明 pcDNA3.1(-)- β_2 -m 质粒构建成功(图4).

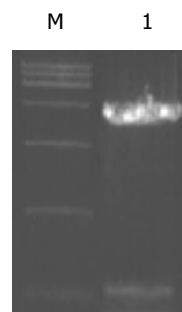


图1 pCAT-CP 重组质粒酶切鉴定. Lane M: 15 000 DNA Ladder; Lane 1: pCAT-CP *Mlu*I/*Nhe*I cut.

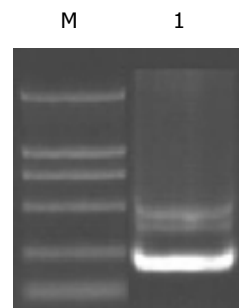


图2 HBV 核心启动子扩增片段 Lane M: 2000 DNA Ladder; Lane 1: HBV core promoter PCR.

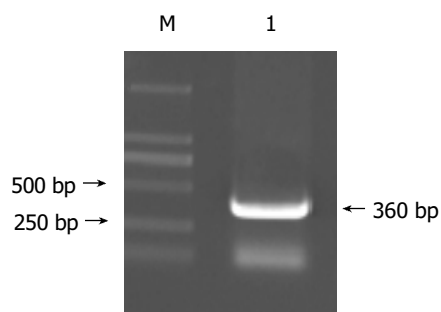


图3 β -微球蛋白扩增片段. Lane M: 2000 DNA Ladder; Lane 1: β -microglobulin PCR.

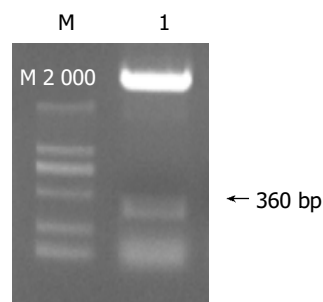


图4 pcDNA3.1(-)- β m 重组质粒的酶切鉴定. Lane M: 2000 DNA Ladder; Lane 1: pcDNA3.1(-)- β m *Eco*R V/*Bam*HI cut.

2.3 pcDNA3.1(-)- β m 对 pCAT-CP 的激活作用 用脂质体法瞬时转染 HepG2 细胞, 质粒用量 1 μ g, 脂质

体用量 3 μ L. 培养 48 h 后进行 ELISA 检测. 氯霉素乙酰转移酶(CAT)的 OD 值(见表 1, 图 5).

表 1 重组载体共转染 HepG2 细胞氯霉素乙酰转移酶检测结果

分组	质粒	A 值
1	pCAT-basic	0.021
2	pCAT-promoter	0.343
3	pCAT-CP	3.151
4	pCAT-CP-pcDNA3. 1(-)- β_2 m	1.524

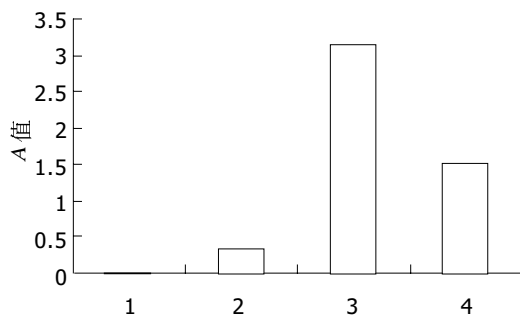


图 5 CAT-ELISA 检测结果.

3 讨论

乙型肝炎病毒(HBV)是一种严重危害人类健康的致病因子. HBV 属嗜肝 DNA 病毒, 其基因组为 3.2 kb 部分双链的环状 DNA. 目前已确定有四个主要的开放阅读框架, 分别负责编码核心抗原(pre-C/C)、核酸聚合酶(P)、表面抗原(preS/S)和 X 蛋白(X). 这些基因的表达受到顺式元件-启动子和增强子的调控. 目前在 HBV 基因组已发现并鉴定的顺式元件有四个启动子(C、X、SP I、SP II)、两个增强子(Enh I 和 Enh II)和糖皮质激素应答元件. 核心启动子产生两个 3.5 kb RNA: 前-核心和前基因组 RNA. 前-核心 RNA 编码前核心蛋白和 e 抗原前基因组 RNA 不仅作为 mRNA 编码核心和聚合酶蛋白而且与病毒蛋白一起包埋入核衣壳作为模板逆转录. 前基因组 RNA 的表达调控在病毒复制周期中起着关键作用. 核心启动子分为两部分: 基本核心启动子和核心上游调节元件(CURS)其上游为负性调节元件(NER 1 616-1 621 nt) CURS 能激活邻近下游的 BCP^[1-8].

我们利用噬菌体展示技术以 DNA 为固相分子筛选肝细胞文库研究启动子结合蛋白. 获得了与 HBV 核心启动子结合的蛋白^[1]. 经同源性比较确定该蛋白与 β_2 -微球蛋白(β_2 -m)同源, 同源性为 95%.

人 β_2 微球蛋白基因(β_2 -microglobulin, β_2 -m)位于染色体 15 q 21-22.2, 成熟蛋白产物由 99 个氨基酸组成的单链多肽低分子蛋白, 分子量为 11.8 ku, 电泳在 β_2 区, 故称 β_2 微球蛋白. β_2 微球蛋白起源于人体间质, 上皮细胞和造血系统的正常细胞以及恶性肿瘤细胞均能合成, 细胞合成的 β_2 微球蛋白是人类组织相容性抗原的一部分, 存在于细胞膜. β_2 微球蛋白与免疫球蛋白

有结构同源性, 特别是 IgG 分子的 CH3 区. 在大多数类型细胞的细胞膜上都可以检测到 β_2 微球蛋白^[9-23]. β_2 微球蛋白与病毒性肝炎关系密切. 其作为 HLA-I 复合体的一部分, 与肝细胞表面病毒抗原递呈有关, 在对病毒感染免疫应答中起重要作用^[24-25]. Akdogan *et al*^[26] 研究发现使用 α 干扰素治疗转氨酶反复波动的慢性乙型肝炎患者, β_2 微球蛋白水平高者有较高应答的趋势, 治疗前后的水平有助与预测预后. 而 LAPinski *et al*^[27] 在研究 HCV 感染患者在使用 α 干扰素治疗期间, β_2 微球蛋白与 CD4 淋巴细胞之间关系时发现 β_2 微球蛋白显著升高是预后不良的指标, 开始治疗时 CD4 淋巴细胞数量增加预示治疗效果良好. β_2 微球蛋白. 丙型肝炎患者血清 β_2 微球蛋白水平高于健康对照组, 与疾病的病程与严重程度有关. 而且, 血清 β_2 微球蛋白水平与 HCV RNA 水平显著相关, 与 HCV 基因型无关^[28]. 在 HCV 感染相关的肝癌患者中, 血清 β_2 微球蛋白水平升高反映肿瘤的大小, 似乎是免疫应答中体液因素(如 IL-6)作用于肝细胞的结果. 免疫系统功能降低导致肝癌的进展和 β_2 微球蛋白的过度表达^[29].

总之, β_2 微球蛋白具有重要的免疫功能, 我们利用噬菌体展示技术筛选出与 HBV 核心启动子结合的 β_2 微球蛋白, 提示其与肝细胞和肝炎病毒相互作用, 在病毒性肝炎、肝硬化发生发展过程中起一定作用, 但是确切的分子生物学机制有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 张忠东, 成军, 钟彦伟, 王业东, 董菁, 陈天艳, 杨倩, 张树林. 应用噬菌体展示技术筛选乙型肝炎病毒核心启动子结合蛋白. 解放军医学杂志 2004;29:16-19
- 2 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 3 成军. 病毒性肝炎发病机制中的反式调节机制. 世界华人消化杂志 2003;11:888-896
- 4 成军, 刘研, 陆荫英, 李克, 王琳. 生物信息学技术与新基因的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:474-477
- 5 陆荫英, 王琳, 刘妍, 于敏, 李克, 王业东, 张玲霞, 成军. 乙肝病毒核心抗原单链抗体细胞内免疫抗乙肝病毒基因治疗研究. 世界华人消化杂志 2002;10:765-769
- 6 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. J Gastroenterol Hepatol 2002;16:A185
- 7 钟彦伟, 成军, 蔡炯, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 抗独特型人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. 世界华人消化杂志 2002;10:897-901
- 8 邵清, 成军, 白雪帆. 乙型肝炎病毒 X 基因启动子结构及调节研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1240-1242
- 9 Wolcke J, Weinhold E. A DNA-binding peptide from a phage display library. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 2001;20:1239-1242
- 10 Cicchini C, Ansuini H, Amicone L, Alonzi T, Nicosia A, Cortese R, Tripodi M, Luzzago A. Searching for DNA-protein interactions by Lambda phage display. J Mol Biol 2002;322:697-706
- 11 巨立中, 成军, 钟彦伟. 启动子 DNA 结合蛋白研究策略. 世界华人消化杂志 2004;12:141-142
- 12 董菁, 施双双, 王业东, 钟彦伟, 王刚, 王琳. cDNA 文库噬菌体展示法的建立及乙型肝炎病毒前 S1 蛋白结合蛋白筛选. 解放军医学杂志 2002;27:321-323
- 13 钟彦伟, 成军, 陈新华, 王刚, 洪源, 王琳, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 应用噬菌体表面展示技术筛选丙型肝炎病毒 NS5A 抗原模拟表位. 世界华人消化杂志 2002;10:133-136

- 14 Johnson JJ, Raney AK, McLachlan A. Characterization of a functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *Virology* 1995; 208:147-1589
- 15 成军, 钟彦伟, 施双双, 夏小兵, 王刚, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白人源单链可变区抗体的可溶性表达. *中国病毒学* 2001;16: 220-223
- 16 Burritt JB, Bow CW, Doss KW. Review: filamentous phage display of oligopeptide libraries. *Analytical Biochemistry* 1996; 238:1-13
- 17 Dunn IS. *In vitro* alpha-complementation of beta-galactosidase on a bacteriophage surface. *Eur J Biochem* 1996;242:720-726
- 18 Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380:364-366
- 19 李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1002-1004
- 20 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *中国公共卫生* 2002;18:153-154
- 21 Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228:1315-1317
- 22 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林. 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1131-1134
- 23 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1242-1245
- 24 Hutteroth TH, Cleve H. Beta2-microglobulin: structure and function of an immunoglobulin-homologue. *Immun Infekt* 1976;4:110-115
- 25 Flisiak R, Prokopowicz D. Effect of misoprostol on serum beta2-microglobulin in the course of viral hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1227-1230
- 26 Akdogan M, Senturk H, Mert A, Tabak F, Ozbay G. Acute exacerbation during interferon alfa treatment of chronic hepatitis B: frequency and relation to serum beta-2 microglobulin levels. *J Gastroenterol* 2003;38:465-470
- 27 LApinski TW, Kot A, Prokopowicz D. Concentration of b2-microglobulin and percentage of CD4 lymphocytes in peripheral blood in patients with chronic HCV infection during IFN- α therapy. *Med Sci Monit* 2002;8:CR538-542
- 28 Malaguarnera M, Restuccia S, Di Fazio I, Zoccolo AM, Trovato BA, Pistone G. Serum beta2-microglobulin in chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1997;42:762-766
- 29 Malaguarnera M, Di Fazio I, Ferlito L, Pistone G, Laurino A, Vinci E, Mazzoleni G. Increase of serum beta2-microglobulin in patients affected by HCV correlated hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:937-939

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 •

肝移植围手术期低钾血症观察与分析

石 斌, 李玉民, 李 汛, 周文策, 曹 农, 杨清平, 张 磊, 孟文勃

石斌, 南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院解放军普通外科研究所 江苏省南京市 210002
李玉民, 李汛, 周文策, 曹农, 杨清平, 张磊, 孟文勃, 兰州医学院第一附属医院普外科 甘肃省兰州市 730000
甘肃省科学事业费科技项目(QS012-C33-31)
项目负责人: 李玉民, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州医学院第一附属医院普外科, joyzb1969@sina.com
电话: 025-83202367
收稿日期: 2004-03-31 接受日期: 2004-08-31

摘要

目的: 探讨肝移植围手术期低钾血症发生的规律、原因及防治措施。

方法: 监测4例肝移植患者围手术期各时段的血钾值及所采取的相应治疗措施, 分析肝移植低钾血症的原因和机制。

结果: 4例肝移植患者围手术期均发生不同程度的低钾血症, 尤其在肝移植新肝灌注到术后24 h期间最易出现危险的低血钾状态, 术中血钾最低达 1.5 mmol/L, 全组术后 1 wk 平均血钾浓度为 3.0 ± 1.1 mmol/L。至血钾纠正时平均总补钾量 260 mmol(19.5 g), 血钾纠正最短时间为 11 h, 最长为 98 h。

结论: 肝移植围手术期尤其术中及术后 24h 易发生低钾血症, 原因复杂, 纠正较为困难。

石斌, 李玉民, 李汛, 周文策, 曹农, 杨清平, 张磊, 孟文勃. 肝移植围手术期低钾血症观察与分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2494-2495
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2494.asp>

0 引言

严重低钾血症(<3.0 mmol/L)在外科临床并不少见, 在肝移植围手术期也时有发生。我院 2001-09/2003-07 进行肝移植手术 4 例, 均不同程度发生了低钾血症, 分析研究发现肝移植过程中的严重低钾血症有其自身特点, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 我院 2001-09/2003-07 进行肝移植 4 例, 均为男性, 年龄 43-60(平均 53)岁。乙肝后肝硬化失代偿 2 例, 乙肝后肝硬化合并原发性肝癌 1 例, 酒精性肝硬化 1 例。背驮式肝移植 1 例, 非静脉转流条件下原位肝移植 3 例。

1.2 方法 用干燥空针抽静脉血 2-3 mL 注入肝素抗凝管(避免在输液肢体抽血), 经离心后取血清, 用美国 Beckman-CX7 全自动生化分析仪离子选择电极法测定血钾浓度。补钾方法: 血钾在 2.5-3.0 mmol/L, 按每日 80-

- 14 Johnson JJ, Raney AK, McLachlan A. Characterization of a functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *Virology* 1995; 208:147-1589
- 15 成军, 钟彦伟, 施双双, 夏小兵, 王刚, 陈菊梅. 丙型肝炎病毒 E2 蛋白人源单链可变区抗体的可溶性表达. *中国病毒学* 2001;16: 220-223
- 16 Burritt JB, Bow CW, Doss KW. Review: filamentous phage display of oligopeptide libraries. *Analytical Biochemistry* 1996; 238:1-13
- 17 Dunn IS. *In vitro* alpha-complementation of beta-galactosidase on a bacteriophage surface. *Eur J Biochem* 1996;242:720-726
- 18 Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380:364-366
- 19 李强, 成军, 程明亮, 钟彦伟. 乙型肝炎病毒表面抗原基因启动子 I 结构及调节研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1002-1004
- 20 钟彦伟, 成军, 王刚, 田小军, 陈新华, 李莉, 陈菊梅, 张玲霞. 乙型肝炎病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选与鉴定. *中国公共卫生* 2002;18:153-154
- 21 Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228:1315-1317
- 22 张忠东, 成军, 钟彦伟, 杨倩, 王业东, 董菁, 杨艳杰, 张树林. 羧肽酶 N 调节乙型肝炎病毒核心启动子表达活性的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1131-1134
- 23 梁耀东, 成军, 陆荫英, 吴君, 程明亮. 乙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1242-1245
- 24 Hutteroth TH, Cleve H. Beta2-microglobulin: structure and function of an immunoglobulin-homologue. *Immun Infekt* 1976;4:110-115
- 25 Flisiak R, Prokopowicz D. Effect of misoprostol on serum beta2-microglobulin in the course of viral hepatitis B. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1227-1230
- 26 Akdogan M, Senturk H, Mert A, Tabak F, Ozbay G. Acute exacerbation during interferon alfa treatment of chronic hepatitis B: frequency and relation to serum beta-2 microglobulin levels. *J Gastroenterol* 2003;38:465-470
- 27 LApinski TW, Kot A, Prokopowicz D. Concentration of b2-microglobulin and percentage of CD4 lymphocytes in peripheral blood in patients with chronic HCV infection during IFN- α therapy. *Med Sci Monit* 2002;8:CR538-542
- 28 Malaguarnera M, Restuccia S, Di Fazio I, Zoccolo AM, Trovato BA, Pistone G. Serum beta2-microglobulin in chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 1997;42:762-766
- 29 Malaguarnera M, Di Fazio I, Ferlito L, Pistone G, Laurino A, Vinci E, Mazzoleni G. Increase of serum beta2-microglobulin in patients affected by HCV correlated hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:937-939

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 •

肝移植围手术期低钾血症观察与分析

石 斌, 李玉民, 李 汛, 周文策, 曹 农, 杨清平, 张 磊, 孟文勃

石斌, 南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院解放军普通外科研究所 江苏省南京市 210002
李玉民, 李汛, 周文策, 曹农, 杨清平, 张磊, 孟文勃, 兰州医学院第一附属医院普外科 甘肃省兰州市 730000
甘肃省科学事业费科技项目(QS012-C33-31)
项目负责人: 李玉民, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州医学院第一附属医院普外科, joyzb1969@sina.com
电话: 025-83202367
收稿日期: 2004-03-31 接受日期: 2004-08-31

摘要

目的: 探讨肝移植围手术期低钾血症发生的规律、原因及防治措施。

方法: 监测4例肝移植患者围手术期各时段的血钾值及所采取的相应治疗措施, 分析肝移植低钾血症的原因和机制。

结果: 4例肝移植患者围手术期均发生不同程度的低钾血症, 尤其在肝移植新肝灌注到术后24 h期间最易出现危险的低血钾状态, 术中血钾最低达 1.5 mmol/L, 全组术后 1 wk 平均血钾浓度为 3.0 ± 1.1 mmol/L。至血钾纠正时平均总补钾量 260 mmol(19.5 g), 血钾纠正最短时间为 11 h, 最长为 98 h。

结论: 肝移植围手术期尤其术中及术后 24h 易发生低钾血症, 原因复杂, 纠正较为困难。

石斌, 李玉民, 李汛, 周文策, 曹农, 杨清平, 张磊, 孟文勃. 肝移植围手术期低钾血症观察与分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2494-2495
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2494.asp>

0 引言

严重低钾血症(<3.0 mmol/L)在外科临床并不少见, 在肝移植围手术期也时有发生。我院 2001-09/2003-07 进行肝移植手术 4 例, 均不同程度发生了低钾血症, 分析研究发现肝移植过程中的严重低钾血症有其自身特点, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 我院 2001-09/2003-07 进行肝移植 4 例, 均为男性, 年龄 43-60(平均 53)岁。乙肝后肝硬化失代偿 2 例, 乙肝后肝硬化合并原发性肝癌 1 例, 酒精性肝硬化 1 例。背驮式肝移植 1 例, 非静脉转流条件下原位肝移植 3 例。

1.2 方法 用干燥空针抽静脉血 2-3 mL 注入肝素抗凝管(避免在输液肢体抽血), 经离心后取血清, 用美国 Beckman-CX7 全自动生化分析仪离子选择电极法测定血钾浓度。补钾方法: 血钾在 2.5-3.0 mmol/L, 按每日 80-

100 mmol(6–7.5 g)补钾;血钾<2.5 mmol/L, 按体质量 $\times 3$ =总补钾量(以 mmol/L 计算), 在 10 h 内先补一半, 复查血钾后再酌情补另一半. 根据计算的补钾量选用 100 g/L 氯化钾, 也可加少量生理盐水稀释, 中心静脉微量泵缓慢注入, 速率为 5–8 mL/h(或 0.5–1 g/h).

2 结果

术前 2 wk 平均血钾分别为 3.8 ± 0.3 mmol/L, 3.2 ± 0.4 mmol/L, 3.4 ± 0.5 mmol/L, 4.1 ± 0.8 mmol/L, 第 2, 3 例呈明显低血钾状况, 纠正后血钾基本恢复. 术中均发生不同程度低血钾状况(图1). 手术开始后逐渐下降趋势, 从新肝血液灌注到术后 24 h, 血钾处于谷值, 1 例在灌注后血钾降至 1.5 mmol/L.

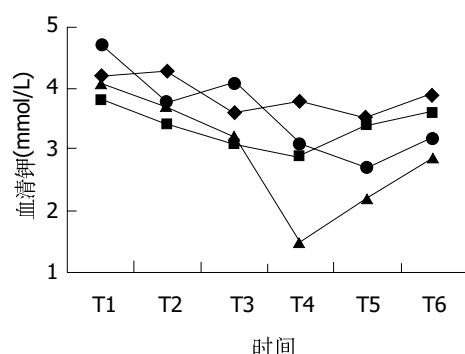


图1 肝移植术中术后血清钾变化趋势. T1: 麻醉诱导开始, T2: 无肝期开始, T3: 新肝植入灌注开始, T4: 手术结束, T5: 术后 24 h, T6: 术后 48 h.

全组术后 1 wk 平均血钾浓度为 3.0 ± 1.1 mmol/L, 平均日补钾量 80 mmol(6 g), 至血钾纠正时平均总补钾量 260 mmol(19.5 g), 最高补钾量达 300 mmol(22.5 g). 血钾纠正最短时间为 11 h, 最长为 98 h, 平均 44 h. 本组 4 例均经中心静脉补钾. 伴低氯血症 (83–94 mmol/L) 1 例, 低钠血症 (122–132 mmol/L) 2 例, 低镁血症 (0.6–0.8 mmol/L) 2 例. 动态心电图及心电监护示 4 例患者均有不同程度的 T 波低平、倒置, ST 段压低及 Q–T(U)延长 1 例, U 融合 1 例. 3 例有不同程度的室性或室上性早搏, 其中房颤 2 例、短阵室上性心动过速 1 例.

3 讨论

有调查显示超过 20% 的住院患者有低钾血症(血钾<3.6 mmol/L)^[1–2]. 而本组 4 例患者术前均有不同程度血钾偏低状况发生. 肝移植患者术前由于严重的肝脏疾病、体液丢失、营养状况不良、使用利尿剂等原因使总体钾储备减少, 致使围手术期易发生低钾血症^[2–9]. 在肝移植过程中, 手术操作复杂、创伤重、对机体影响较大, 尤其在无肝期、新肝灌注期, 生理指标包括血清钾会出现剧烈波动. 我们发现, 肝移植术中术后易发生低钾血症, 其特点是低钾血症发生突然; 伴随内环境紊乱明显; 短期纠正难以很快奏效; 补钾量大. 下列因素可能与肝移植术中及术后低血钾有关: (1) 创伤反应,

醛固酮分泌增加, 尿中钾排泄增多, 钾迅速丢失, 失钾量与手术创伤大小有关; (2) 丢失增多: 手术创面渗出增多或伴大量出汗, 也可使钾盐丢失增加. 肝移植术后 1–3 d 胃肠减压引流量每天在 300–600 mL 左右, 每天可丢失 4.2–8.4 mmol 的 K^+ , 而胆汁引流、腹腔渗出量每天在 300–600 mL 以上, 也可丢失 2.0–4.0 mmol 以上的 K^+ ; (3) 肝移植术中血糖升高和胰岛素、糖皮质激素、盐皮质激素灭活减少, 影响血清钾浓度, 易发生低钾血症; (4) 输血: 库存血中失钾的红细胞输入体内后, Na^+ , K^+ 泵摄钾释钠, 使部分血 K^+ 进入红细胞内, 有大量输血引起低血钾的报道; (5) 酸碱平衡紊乱: 在呼吸机使用过程中, 过度通气可引起呼吸性碱中毒, 使血清钾转移至细胞内而出现低血钾. 本组 2 例术后机械通气时间较长, 平均 226 h, 此期间均发生不同程度的动脉血二氧化碳分压下降及呼吸性碱中毒, 这是造成术后低钾血症的一个不容忽视的原因; (6) 使用麻醉药物 r -羟丁酸钠时也可促使细胞外钾向细胞内转移; (7) 输注大量含钠等渗液体; (8) 肝病患者术中术后大量使用利尿剂, 增加了钾的排出. 机体内 98% 的钾位于细胞内, 而钾缺乏所致的低钾血症主要为细胞内缺钾, 补充的钾绝大部分应转换到细胞内才能算是补钾完成, 加之术前即存在低钾血症, 这造成了肝移植患者术后补钾难以很快奏效的原因.

为了预防及治疗低钾血症, 更准确地早期补钾, 应详细记录胃肠减压量、胆汁量、尿量, 必要时抽血查电解质指导钾的补充. 肝移植围手术期低钾血症的预防应做到: (1) 肝移植术前应常规测定血钾, 对慢性缺钾患者应及时补钾; (2) 对全麻手术者, 在使用呼吸机时应定期进行血气分析, 并及时调整呼吸机参数, 预防呼吸性酸碱失衡的发生; (3) 避免选用能引起低钾血症的 r -羟丁酸钠等麻醉药物; (4) 术中术后使用大量含钠液体后应警惕低血钾; (5) 血钾状况不明或术后未及时补充钾离子时, 利尿应慎重; (6) 输血后应及时检测血清钾状况; (7) 在肝移植新肝灌注到术后 24 h 期间最易出现危险的低钾状态, 应予以严密监测, 及时纠正.

4 参考文献

- Gennari FJ. Hypokalemia. *New Engl J Med* 1998;339:451–458
- Gennari FJ. Disorders of potassium homeostasis. Hypokalemia and hyperkalemia. *Crit Care Clin* 2002;18:273–288
- 沈祖强, 孙新明. 梗阻性黄疸并发糖尿病病因及围手术期治疗. *世界华人消化杂志* 2004;12:1993–1995
- 许红兵, 石炳毅, 邹一平, 李为民, 蔡明, 萧荫祺, 郑方, 杜继东, 莫春柏, 曹敏. 原位肝移植 3 例. *世界华人消化杂志* 2001;9:1218–1220
- 张蓉, 闻勤生, 黄裕新, 赵海峰, 田力. 肝硬化患者血浆胃动素、胆囊收缩素、生长抑素及其胃电的改变. *世界华人消化杂志* 2003;11:1230–1233
- 管文贤, 窦科峰, 李开宗, 高志清, 付由池, 张新海, 王宏光, 王廷, 刘正才, Koichi T, Yoshio Y. 活体肝部分移植 4 例的围手术期管理. *世界华人消化杂志* 2001;9:1345–1347
- 王胜智, 马庆久, 褚延魁, 王景杰, 王青, 要秀. 肝移植对胃功能的影响及意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:182–186
- 周桂华, 陆建中, 李林根, 陈波. 重症肝炎合并感染 160 例. *世界华人消化杂志* 2002;10:1069–1070
- 齐灵之, 周皓, 郭玉琳. 肝硬变腹水的治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8:906–907

硫普罗宁体外对人胆石的直接溶解作用

郭玉宁, 杨昭徐, 孙会敏, 岳志华, 杨 华, 易 红

郭玉宁, 杨昭徐, 中国医学科学院北京天坛医院消化内科 北京市 100050
孙会敏, 岳志华, 中国药品生物制品检定所仪器分析室 北京市 100050
杨华, 易红, 中国中医研究院中药研究所 北京市 100700
北京市自然科学基金资助项目, No.7022033
项目负责人: 杨华, 100700, 北京市, 中国中医研究院中药研究所.
电话: 010-67050530
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-08-30

摘要

目的: 探讨巯基药物-硫普罗宁(Tiopronin)在直接接触溶石过程中所起的作用.

方法: 将形状、重量相似经手术获取的胆囊胆石随机分4组置入试管中, 分别加入不同溶石剂浸泡, 加盖后置于37℃恒温箱中. A组: 溶石I号(主要成分为甜橙油)组; B组: 硫普罗宁组; C组: 硫普罗宁与溶石I号混合液组; D组: 生理盐水对照组. 各组试管每日振摇2次, 每24h更换溶剂1次. 于24, 48, 72h取出残石, 干燥、称质量作比较, 计算胆石相对减质量率. 急性毒性试验: 60只小鼠分别以不同剂量硫普罗宁与溶石I号(1:3)混合液灌胃, 计算LD₅₀及95%可信限.

结果: 生理盐水对照组结石无溶解. 24, 48及72h结石减质量率A组均大于B组($P<0.01$); A组大于C组($P<0.01$). 硫普罗宁与溶石I号(1:3)混合液为48.57 ml/kg, 其95%可信限为44.91-55.91 ml/kg.

结论: 本硫普罗宁对胆石有直接溶解作用. 硫普罗宁与溶石I号(1:3)混合乳剂对胆石溶解效果显著. 硫普罗宁与溶石I号(1:3)混合剂较安全.

郭玉宁, 杨昭徐, 孙会敏, 岳志华, 杨华, 易红. 硫普罗宁体外对人胆石的直接溶解作用. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2496-2497
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2496.asp>

0 引言

胆石病是消化系统常见病. 胆石的主要成分为胆固醇和胆色素^[1], 其次为多种金属元素及磷脂、蛋白质、粘蛋白等, 近年的研究表明, 胆色素结石的形成还与自由基有关^[2]. 我们曾以甜橙油为主要成分研制出针对胆固醇结石的直接溶石剂-溶石I号, 在体外实验及临床应用中取得较好的溶石效果. 现应用巯基药物-硫普罗宁(Tiopronin)进行体外溶石试验. 探讨巯基药物对胆石的直接溶解作用及其在接触溶石过程中作为自由基清除剂对胆道局部黏膜的保护作用.

1 材料和方法

1.1 材料 胆石病患者20例手术取出胆囊胆石. 予以清洗、干燥后称质量, 选择直径5 mm 4枚, 编号后随

机分为4组. 从另随机选择1枚, 采用红外光谱法(溴化钾压片法)及HPLC-ELSD-UV法^[3]测定结石中胆固醇、胆红素含量, 结果胆固醇含量为77-98%. 注射用硫普罗宁(Tiopronin, 商品名为凯西莱)每瓶100 mg, 包括1瓶干粉和1瓶溶媒(2 ml), 由新谊药业股份有限公司提供; 溶石I号由本院配制. 昆明小鼠60只, 雌雄各半, 体质量18-22 g. 恒温箱、电子天平、日立270-30型红外分光光度计等.

1.2 方法 将来自同一患者形状、质量相似的结石随机分4组置入试管中, 分别为A组(硫普罗宁组): 加入硫普罗宁4 mL(200 mg); B组(溶石I号组): 加入溶石I号4 mL; C组(混合液组): 加入硫普罗宁1 mL(50 mg)和溶石I号3 mL混合液; D组(空白对照组): 加入生理盐水4 mL. 各组试管每日振摇2次, 每次30 min, 每24h更换溶剂1次. 24, 48, 72h, 取出残石, 清洗、干燥、称质量. 比较胆石的原始质量和残石质量, 计算胆石相对减质量率 = (结石原质量 - 结石残质量) / 结石原质量 × 100%

昆明小鼠60只, 随机分为6组, 每组10只. 空腹4 h后, 分别给予混合液灌胃, 剂量为每10 g体质量0.32, 0.36, 0.40, 0.44, 0.49, 0.54 mL. 统计小鼠48 h内死亡数, 计算LD₅₀.

统计学处理 应用SPSS软件包, 采用 t 检验对资料进行统计学分析.

2 结果

D组未加溶石剂, 仅加生理盐水作对照, 结石无溶解, 排除结石在生理盐水中自溶的可能. C组(混合液组)与A组(硫普罗宁组)比较, 24 h结石减质量率($P<0.01$)、48 h结石减质量率($P<0.01$)、72 h结石减质量率($P<0.01$)均有非常显著差异. C组与B组(溶石I号组)比较, 24 h结石减质量率($P<0.01$)、48 h结石减质量率($P<0.01$), 有非常显著差异; 72 h结石减质量率($P>0.05$)无显著差异. (表1)各组小鼠死亡数分别为0, 1, 2, 3, 5和7只. 混合液LD₅₀为48.57 mL/kg, 其95%的可信限为44.91-55.91 mL/kg.

表1 各组结石平均减质量率比较 ($n=20$, %, mean ± SD)

	24 h	48 h	72 h
A组	1.11 ± 0.70	2.18 ± 0.79	3.31 ± 1.08
B组	8.07 ± 1.72	32.81 ± 3.11	86.54 ± 18.04
C组	45.02 ± 6.27 ^b	74.19 ± 9.26 ^b	95.41 ± 8.24 ^b
D组	0	0	0

^b $P<0.01$ vs A, B组.

3 讨论

硫普罗宁(Tiopronin, 商品名: 凯西莱)的化学结构是 N-(2-巯基丙酰基)-甘氨酸, 为一种含游离巯基的甘氨酸衍生物, 具有巯基化合物的药理作用, 能够清除有害自由基, 络合金属离子, 是一个很好的抗氧化剂. 本研究显示, 硫普罗宁对胆石有一定的溶解作用. 主要依据以下几方面: (1) 硫普罗宁具有络合金属离子的作用. (2) 硫普罗宁具有清除自由基的作用. 大多数胆石均混合含有胆固醇及胆色素成分, 本试验所用胆囊结石经测定胆固醇含量为 77-98%. 对胆石结构的研究表明, 胆石表面比较坚硬和致密, 而内部则较为松散, 胆固醇结石和胆色素结石的外壳部分均表现为胆固醇结晶与胆色素钙颗粒同时存在, 构成片状结构. 由于硫普罗宁可溶解结石胆色素部分尤其是金属成分, 溶石 I 号可溶解结石胆固醇部分, 二者混合使用似更有利于结石的溶解. 在本研究中也证实了这一观点.

硫普罗宁作为直接溶石剂单独使用时, 结石减重率较低. 对胆石在不同溶石剂中减重率的比较显示, 硫普罗宁与溶石 I 号混合液(1:3)对胆石的减重效果显著. 在溶石初始 48 h, 混合液组结石减重率显著大于其他组, 而 72 h 结石减重率比较显示, 混合液组与溶石 I 号组无显著差异. 提示硫普罗宁的加入使溶液穿透结石表层的能力有所增强, 进而促进了结石的溶解.

硫普罗宁在直接溶石治疗中, 可能起到黏膜保护作用. 大量基础和临床研究表明, 黏膜损伤在细胞和分子水平上与自由基有很密切的关系^[4-5]. 巯基物质可以直

接或间接与氧自由基和活性亲电子物质反应, 具有清除自由基^[6-7]、稳定细胞膜、保护线粒体结构等细胞保护作用^[8]. 同时, 硫普罗宁在目前临床使用中安全性好, 无刺激性. 提示硫普罗宁有可能作为氧自由基清除剂, 在直接溶石治疗中, 可能起到黏膜保护作用. 目前对直接溶石药物的研究较多, 但多局限于体外或动物实验阶段, 主要是由于对局部黏膜的损伤较大, 难以用于临床, 如胆固醇结石溶解剂甲基叔丁基醚等. 硫普罗宁有望在溶石过程中起到黏膜保护作用, 从而减少溶石药物对局部黏膜的损伤. 但该药在临床应用时, 其使用方法, 用药剂量仍需进一步探讨.

4 参考文献

- 1 吴杰, 杨海珉, 李静仪, 宋一德, 刘刚. 国人胆囊结石的形态结构特征. 世界华人消化杂志 2003;11:1558-1562
- 2 朱友根, 周君富, 杨金禄, 彭芬英, 丁德云, 宋兆华, 蒋国祯. 一氧化氮等自由基与慢性胆囊炎伴结石的关系. 中华肝胆外科杂志 2001;7:164
- 3 岳志华, 孙会敏, 田颂九, 郭玉宁. HPLC-ELSD-UV 法同时测定人体胆结石中胆固醇、胆红素及各种胆酸的含量. 药物分析杂志 2004;24:310-331
- 4 张爱凤, 陈平圣, 李晓冰, 张丽达, 刘东风. 高压氧加自由基拮抗剂对大鼠肝脏基质金属蛋白酶-2 表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1909-1914
- 5 董满库, 崔彦, 周立艳, 施靖华, 王强, 王平, 吉敏, 李晓鸥. 山莨菪碱对肝脏缺血再灌注后氧自由基的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:82-84
- 6 Cui PL, Yang ZX, Zhang L, Sun YL. Effects of sulfhydryl compounds on pancreatic cytoprotection in acute necrotic pancreatitis. Chin Med J 2003;116:57-61
- 7 崔培林, 杨昭徐, 张磊, 孙异临. 巯基物质对大鼠急性坏死性胰腺炎胰腺细胞保护作用. 中华急诊医学杂志 2003;12:170-172
- 8 梁丕霞, 吕栋, 李瑞军. 大鼠急性坏死性胰腺炎心肌组织中巯基物质的抗氧化作用. 世界华人消化杂志 2004;12:1724-1725

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 •

创伤应激对兔胆汁流量及血浆胃泌素、胰高血糖素含量的影响

李贤珍, 罗和生, 胡利明, 陈敏, 于皆平

李贤珍, 罗和生, 陈敏, 于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
胡利明, 武汉大学人民医院肝胆外科 湖北省武汉市 430060
项目负责人: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市武昌解放路 238 号, 武汉大学人民医院消化内科. loutang@public.wh.hb.cn
电话: 027-88041919-2134
收稿日期: 2004-08-25 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 研究创伤应激兔胆汁流量、血浆胃泌素和胰高血糖素含量的变化及其关系.

方法: 行胆总管插管引流胆汁计量胆汁流量, 将兔双下肢钳断制备应激模型, 记录创伤应激前后胆汁流量的变化, 同时检测血浆胃泌素、胰高血糖素含量的改变.

结果: 创伤应激后兔胆汁流量较应激前明显增多(应激前后分别为 2.12 ± 0.24 mL/20 min, 3.01 ± 0.36 mL/20 min, $P < 0.01$), 血浆胃泌素(GAS)、胰高血糖素(GL)含量升高(应激前后 GAS 分别为 823.6 ± 58.1 ng/L, 938.8 ± 50.6 ng/L, $P < 0.01$; 应激前后 GL 分别 106.3 ± 5.4 ng/L, 202.0 ± 6.7 ng/L, $P < 0.01$), 胆汁流量的变化与激素的改变一致.

结论: 创伤应激可使兔胆汁流量明显增多, 胃肠激素的变化可能是影响胆汁分泌和排出的重要因素.

李贤珍, 罗和生, 胡利明, 陈敏, 于皆平. 创伤应激对兔胆汁流量及血浆胃泌素、胰高血糖素含量的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2497-2498
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2497.asp>

3 讨论

硫普罗宁(Tiopronin, 商品名: 凯西莱)的化学结构是 N-(2-巯基丙酰基)-甘氨酸, 为一种含游离巯基的甘氨酸衍生物, 具有巯基化合物的药理作用, 能够清除有害自由基, 络合金属离子, 是一个很好的抗氧化剂. 本研究显示, 硫普罗宁对胆石有一定的溶解作用. 主要依据以下几方面: (1) 硫普罗宁具有络合金属离子的作用. (2) 硫普罗宁具有清除自由基的作用. 大多数胆石均混合含有胆固醇及胆色素成分, 本试验所用胆囊结石经测定胆固醇含量为 77-98%. 对胆石结构的研究表明, 胆石表面比较坚硬和致密, 而内部则较为松散, 胆固醇结石和胆色素结石的外壳部分均表现为胆固醇结晶与胆色素钙颗粒同时存在, 构成片状结构. 由于硫普罗宁可溶解结石胆色素部分尤其是金属成分, 溶石 I 号可溶解结石胆固醇部分, 二者混合使用似更有利于结石的溶解. 在本研究中也证实了这一观点.

硫普罗宁作为直接溶石剂单独使用时, 结石减重率较低. 对胆石在不同溶石剂中减重率的比较显示, 硫普罗宁与溶石 I 号混合液(1:3)对胆石的减重效果显著. 在溶石初始 48 h, 混合液组结石减重率显著大于其他组, 而 72 h 结石减重率比较显示, 混合液组与溶石 I 号组无显著差异. 提示硫普罗宁的加入使溶液穿透结石表层的能力有所增强, 进而促进了结石的溶解.

硫普罗宁在直接溶石治疗中, 可能起到黏膜保护作用. 大量基础和临床研究表明, 黏膜损伤在细胞和分子水平上与自由基有很密切的关系^[4-5]. 巯基物质可以直

接或间接与氧自由基和活性亲电子物质反应, 具有清除自由基^[6-7]、稳定细胞膜、保护线粒体结构等细胞保护作用^[8]. 同时, 硫普罗宁在目前临床使用中安全性好, 无刺激性. 提示硫普罗宁有可能作为氧自由基清除剂, 在直接溶石治疗中, 可能起到黏膜保护作用. 目前对直接溶石药物的研究较多, 但多局限于体外或动物实验阶段, 主要是由于对局部黏膜的损伤较大, 难以用于临床, 如胆固醇结石溶解剂甲基叔丁基醚等. 硫普罗宁有望在溶石过程中起到黏膜保护作用, 从而减少溶石药物对局部黏膜的损伤. 但该药在临床应用时, 其使用方法, 用药剂量仍需进一步探讨.

4 参考文献

- 1 吴杰, 杨海珉, 李静仪, 宋一德, 刘刚. 国人胆囊结石的形态结构特征. 世界华人消化杂志 2003;11:1558-1562
- 2 朱友根, 周君富, 杨金禄, 彭芬英, 丁德云, 宋兆华, 蒋国祯. 一氧化氮等自由基与慢性胆囊炎伴结石的关系. 中华肝胆外科杂志 2001;7:164
- 3 岳志华, 孙会敏, 田颂九, 郭玉宁. HPLC-ELSD-UV 法同时测定人体胆结石中胆固醇、胆红素及各种胆酸的含量. 药物分析杂志 2004;24:310-331
- 4 张爱凤, 陈平圣, 李晓冰, 张丽达, 刘东风. 高压氧加自由基拮抗剂对大鼠肝脏基质金属蛋白酶-2 表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1909-1914
- 5 董满库, 崔彦, 周立艳, 施靖华, 王强, 王平, 吉敏, 李晓鸥. 山莨菪碱对肝脏缺血再灌注后氧自由基的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:82-84
- 6 Cui PL, Yang ZX, Zhang L, Sun YL. Effects of sulfhydryl compounds on pancreatic cytoprotection in acute necrotic pancreatitis. Chin Med J 2003;116:57-61
- 7 崔培林, 杨昭徐, 张磊, 孙异临. 巯基物质对大鼠急性坏死性胰腺炎胰腺细胞保护作用. 中华急诊医学杂志 2003;12:170-172
- 8 梁丕霞, 吕栋, 李瑞军. 大鼠急性坏死性胰腺炎心肌组织中巯基物质的抗氧化作用. 世界华人消化杂志 2004;12:1724-1725

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 •

创伤应激对兔胆汁流量及血浆胃泌素、胰高血糖素含量的影响

李贤珍, 罗和生, 胡利明, 陈敏, 于皆平

李贤珍, 罗和生, 陈敏, 于皆平, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
胡利明, 武汉大学人民医院肝胆外科 湖北省武汉市 430060
项目负责人: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市武昌解放路 238 号, 武汉大学人民医院消化内科. loutang@public.wh.hb.cn
电话: 027-88041919-2134
收稿日期: 2004-08-25 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 研究创伤应激兔胆汁流量、血浆胃泌素和胰高血糖素含量的变化及其关系.

方法: 行胆总管插管引流胆汁计量胆汁流量, 将兔双下肢钳断制备应激模型, 记录创伤应激前后胆汁流量的变化, 同时检测血浆胃泌素、胰高血糖素含量的改变.

结果: 创伤应激后兔胆汁流量较应激前明显增多(应激前后分别为 2.12 ± 0.24 mL/20 min, 3.01 ± 0.36 mL/20 min, $P < 0.01$), 血浆胃泌素(GAS)、胰高血糖素(GL)含量升高(应激前后 GAS 分别为 823.6 ± 58.1 ng/L, 938.8 ± 50.6 ng/L, $P < 0.01$; 应激前后 GL 分别 106.3 ± 5.4 ng/L, 202.0 ± 6.7 ng/L, $P < 0.01$), 胆汁流量的变化与激素的改变一致.

结论: 创伤应激可使兔胆汁流量明显增多, 胃肠激素的变化可能是影响胆汁分泌和排出的重要因素.

李贤珍, 罗和生, 胡利明, 陈敏, 于皆平. 创伤应激对兔胆汁流量及血浆胃泌素、胰高血糖素含量的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2497-2498
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2497.asp>

0 引言

应激性溃疡的发生原因可归结为黏膜防御屏障功能下降和攻击因子作用加强,其具体发病机制尚未清楚^[1],其中胆汁反流可能是其发病的一个原因.各种形式的应激可引起体内多种胃肠激素的改变^[2],而胆汁的分泌和排出主要受激素的调节^[3],为此我们从胆汁排出量及相关激素变化加以探讨,进一步阐明胆汁反流的机制,为应激性溃疡的防治提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料 健康雄性日本大耳白兔15只(购自武汉大学实验动物中心),质量2~2.4 kg,采取自身对照,术前在实验室内饲养1 wk以适应环境,术前禁食24 h,自由饮水,室温下操作,50 g/L氯胺酮1 mL/kg耳缘iv麻醉成功后,取仰卧位固定,常规消毒、开腹,在十二指肠后方分离胆总管,用眼科剪在Oddi括约肌上方约1.5 cm处胆总管剪开一小口,用一根长约12 cm导管(硬膜外导管)将两端分别插向肝脏及十二指肠方向约0.5~1.0 cm,用0号无损丝线分别将两端固定,中间剩余部分引向体外在腹壁固定用于引流胆汁^[4],关腹包扎术口,放回笼中饲养,给予正常饮食,术后恢复1 wk见状态良好用于实验.采取双下肢股骨钳断法造成急性创伤应激^[5],实验前禁食12 h,自由饮水,实验均在同一环境温度下(25℃)上午08:00进行,实验前将外置导管从正中剪断,将肝脏方向引流管接5 mL注射器内,胆汁直接引流至注射器内计量,在清醒状态下将兔双后肢膝关节以上钳断,不作任何处理,创伤前引流胆汁20 min作自身对照,计量后由十二指肠方向导管缓慢注入以保证胆汁酸的肠肝循环^[6],引流结束时由耳缘静脉抽血3 mL注入含100 g/L EDTA Na 30 μL和抑肽酶20 μL的预冷试管中混匀,4℃离心取血浆放-20℃保存^[7],创伤后即刻开始引流胆汁20 min,计量胆汁流量,引流结束时抽血,处理同上.

1.2 方法 以放免分析法检测血浆胃泌素、胰高血糖素,其放免试剂盒购自北京华英生物技术研究,采用GC-911-γ-放免计数器(中国科技大学实业总公司生产),由专职人员严格按说明书操作,质控均符合要求.

统计学处理 所有结果采取mean±SD表示,SPSS 11.5统计分析软件

2 结果

创伤应激后胆汁流量明显升高,血浆胃泌素、胰高血糖素含量增加,差异具有显著性意义;应激后胆汁流量的变化和激素的升高一致($P<0.01$,表1).

表1 创伤应激前后各项指标变化(mean±SD)

指标	应激前	应激后
胆汁流量(ml/20min)	2.12±0.24	3.01±0.36 ^b
胃泌素(ng/L)	823.6±58.1	938.8±50.6 ^b
胰高血糖素(ng/L)	106.3±5.4	202.0±6.71 ^b

^b $P<0.01$ vs 应激前.

3 讨论

胆汁分泌和排出受到多种因素的影响,如环境、温度、进食等外部因素,我们是在同一环境温度下进行并且在实验前均禁食12 h,基本排除了环境的变化对胆汁分泌和排除的影响;实验采取胆总管插管同时保证胆汁的肠肝循环及胆汁酸的总量,对其生理功能的影响非常小,同时手术后恢复1 wk动物生存状态良好,手术创伤对本实验结果的影响很小;不同形式的应激对机体造成的影响可能不同,我们通过钳断下肢的方法造成急性创伤应激标化了应激条件,排除其他应激因素的干扰.我们观察到创伤应激后胆汁排出量增加,且与激素水平变化一致.

胃泌素是主要调节胆汁分泌的物质之一,他可以通过血液循环直接作用于肝细胞引起胆汁分泌,也可先引起胃酸分泌,由胃酸作用于十二指肠再释放促胰液素而起作用^[8],多种应激方式均可引起胃泌素和胰高血糖素增高,我们实验结果显示,创伤应激后胃泌素和胰高血糖素明显增加,与胆汁流量的增加一致,考虑胃泌素增加促进肝胆汁分泌从而增加胆汁流量.胰高血糖素主要作用肝细胞,其利胆作用是由cAMP介导的^[9].分析认为创伤应激时胆汁流量的增加可能与胰高血糖素的增加有关.

总之,创伤应激时胆汁流量明显增加,而胆汁流量的变化可能主要受影响胆汁分泌和排出的胃肠激素调控;胆汁流量的增加可能加重胆汁反流,反流到胃中的胆汁破坏黏膜屏障引起胃黏膜损伤促进溃疡的发生^[10].为此,临床在预防应激性溃疡的发生过程中可通过减少胆汁排出或早期使用抗胆汁的药物.

4 参考文献

- 符建平, 许建衡. 应激性溃疡的发病机制和预防. 汕头大学医学院学报 2002;15:114-118
- 梁丕霞, 杨昭徐, 张绍东, 吴建中. 大鼠应激性溃疡与胃泌素、胰高血糖素和生长抑素的相关性研究. 首都医学院学报 1995;16:287-289
- 李新平, 欧阳克清, 蔡绍哲. 胆汁分泌与排出的调节. 世界华人消化杂志 2001;9:1066-1070
- 孙武权, 吴嘉容, 沈建雄, 郑凤胡. 推拿对家兔胆汁分泌影响的实验研究. 按摩与导引 2002;18:19-20
- 刘靖, 李兆申, 许国铭. 创伤急性期血浆内CCK-8, VIP, SS, GAS含量的变化. 上海医学 2000;23:293-295
- 黄卉, 朱元根, 龚传美. 耳-体穴电针对大鼠胆汁分泌的影响及其体液调节机制的研究. 中国针灸 1997;17:39-42
- 翟惠敏, 李亚洁, 陈光忠, 罗炳德, 赵卫东, 尹东. 湿热复合创伤应激对兔血浆胰高血糖素含量的影响. 南方护理学报 2002;9:62-64
- 朱元根, 黄卉, 王昕, 张仲前. 耳-体穴电针对大鼠十二指肠组织中胃泌素含量的影响及其促进胆汁分泌的作用. 针刺研究 2000;25:272-274
- Gradilone SA, Garcia F, Huebert RC, Tietz PS, Larocca MC, Kierbel A, Carreras FI, Larusso NF, Marinellu RA. Glucagon induces the plasma membrane insertion of functional aquaporin-8 water channels in isolated rat hepatocytes. Hepatology 2003;37:1435-1441
- 杨鸿, 侯家玉. 胆汁反流致慢性萎缩性胃炎的实验研究. 北京中医药大学学报 2001;24:26-29

天晴复欣序贯治疗慢性乙型肝炎 30 例

周桂华

周桂华, 盐城市第一人民医院感染科 江苏省盐城市 224006
项目负责人: 周桂华, 224006, 江苏省盐城市越河路 16 号, 盐城市第一人民医院感染科.
电话: 0515-8990255
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-09-09

摘要

目的: 观察天晴复欣两种剂型序贯治疗慢性乙型肝炎的疗效性及持久性.

方法: 60 例慢性乙型肝炎患者, 随机分为 2 组, 治疗组 30 例患者, 使用天晴复欣针剂(苦参素葡萄糖注射液 100 mL) 0.6 g, 静滴, 1 次/d, 共 30 d, 继以天晴复欣胶囊 0.6 g/d, 分 3 次口服, 共 150 d. 对照组 30 例患者使用甘利欣及一般保肝药物治疗 180 d.

结果: 观察 60 例患者, 治疗结束后, 治疗组患者乏力纳差腹胀等症状缓解, 对肝功能的影响明显, 肝功能全部恢复, eAg 有 4 例消失(13.3%)($n=30$, $\chi^2=0.142$, $P<0.05$), 有 2 例出现 eAb($n=30$, $\chi^2=0.938$, $P<0.05$), HBVDNA 有 12 例滴度降低($n=30$, $\chi^2=0.1$, $P<0.05$), 有 6 例转阴(20%)($n=30$, $\chi^2=4.29$, $P<0.05$). 对照组患者症状, 体征和肝功能亦有明显好转, 但血清 HBV 标记物及 HBVDNA 无明显变化. 治疗组有 8 例(11 例次)不良反应.

结论: 天晴复欣对肝功能有明显的治疗效果, 对 HBVDNA 的抑制亦较明显, 对 eAg 的转阴有一定的疗效.

周桂华. 天晴复欣序贯治疗慢性乙型肝炎 30 例. 世界华人消化杂志 2004; 12(10): 2499-2500
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2499.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎是一种常见病、多发病, 对人群的危害极大. 我们采用天晴复欣序贯治疗慢性乙型肝炎取得了一定的效果, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-03-01/2003-12-30 共观察符合入选标准患者 60 例, 年龄 37-58 岁, 其中, 男性 48 例, 女性 12 例, 平均年龄 41.8 岁. 60 例患者均无重症肝炎、失代偿期肝硬化, 未合并严重心、肾、内分泌、造血系统及精神神经性疾病.

1.2 方法 慢性乙型肝炎的诊断标准参照 2000-09 西安中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会联合修订的“病毒性肝炎防治方案”. 60 例患者随机分为二

组, 即治疗组和对照组. 治疗组 30 例, 年龄 38-58 岁, 其中, 男性 23 例, 女性 7 例, 平均年龄 40.1 岁. 使用天晴复欣针剂(苦参素葡萄糖注射液 100 mL) 0.6 g 静滴, 1 次/d, 共 30 d, 继以天晴复欣胶囊 0.6 g/d, 分三次, 口服 150 d. 对照组 30 例, 年龄 39-58 岁, 其中, 男性 25 例, 女性 5 例, 平均年龄 42.2 岁, 使用甘利欣及一般保肝药物治疗 180 d. 两组分别于治疗前、治疗 1 mo、4 mo 及 6 mo 检测血常规、肝功能、乙型肝炎病毒标记物(ELISA 法) 和 HBVDNA(PCR 法), 记录其症状和体征的变化. ALT, AST, TBIL 检测结果下降 50% 为好转, 达到正常值上限以下为恢复正常.

2 结果

2.1 治疗过程中及治疗结束时症状和体征的变化(表 1). 两组患者在治疗后症状和体征均有不同程度的改善, 治疗结束时症状均缓解, 体征亦有明显好转, 有效率比较无明显差异($P>0.05$).

表 1 症状和体征治疗组/对照组(n)

	乏力	肝区痛	胃纳差	腹胀	肝肿大	脾肿大
治疗前(异常)	30/30	25/24	28/29	20/21	24/24	26/27
治疗 1mo 后(正常)	06/08	12/12	18/18	09/03	0/0	0/0
治疗 4mo 后(正常)	24/18	15/12	20/18	20/24	0/0	0/0
治疗 6mo 后(正常)	30/30	25/24	24/25	20/21	06/06	0/0

2.2 肝功能及血清 HBV 标记物检测结果(表 2). 两组患者在治疗后肝功能均明显改善, 治疗结束时, 治疗组 eAg 有 4 例转阴(13.3%)($n=30$, $\chi=0.142$, $P<0.05$), 而且有 2 例出现 eAb($n=30$, $\chi=0.938$, $P<0.05$), HBVDNA 有 6 例转阴(20%)($n=30$, $\chi=4.29$, $P<0.05$), 有 12 例滴度下降($n=30$, $\chi=0.1$, $P<0.05$). 对照组血清 HBV 标记物及 HBVDNA 无明显变化.

表 2 肝功能及血清 HBV 标记物检测结果治疗组/对照组(n)

	ALT	AST	TBIL	HBsAg	eAg	eAb	cAb	HBVDNA
治疗前(异常)	30/30	30/30	22/24	30/30	30/30	0/0	30/30	30/30
治疗 1mo 后(正常)	04/12	11/13	08/10	0/0	02/0	01/0	0/0	02/0
治疗 4mo 后(正常)	30/30	30/30	22/24	0/0	04/0	01/0	0/0	04/0
治疗 6mo 后(正常)	30/30	30/30	22/24	0/0	04/0	02/0	0/0	06/0

2.3 肾功能的改变及不良反应(表 3). 治疗组共出现 8 例(11 例次)不良反应. 对照组未发现不良反应.

表3 肾功能及不良反应治疗组/对照组(n)

	BUN	Cr	不良反应
治疗前(异常)	0/0	0/0	0/0
治疗后	0/0	0/0	恶心3例, 头晕3例, 注射部位疼痛2例, 胸闷1例, 心悸2例/0

3 讨论

苦参性寒味苦, 具有清热解毒, 利湿退黄的功能, 中医常用其治疗黄疸型肝炎. 天晴复欣注射液及胶囊是从天然植物苦豆子中提取的生物碱, 其中氧化苦参碱(Oxymatrine)即苦参素占98%以上. 基础研究表明, 苦参素具有多方面的药理作用及临床功能^[1-8], 抗炎、抗菌、抗心律失常、抗寄生虫, 消肿利尿、抗过敏, 减轻环磷酸胺引起的白细胞减少, 调节免疫、稳定细胞膜, 激活细胞膜腺苷酸环化酶, 诱导肝细胞微粒体等作用. 有报道证实^[9-10], 氧化苦参碱在体外试验中, 对含有HBV基因的2.2.15细胞株分泌HBsAg方面有显著抑制作用, 机制可能与调节机体免疫功能, 增强Th淋巴细胞功能, 改善和纠正免疫紊乱, 使免疫系统识别和清除病毒的能力增强有关. 有报道^[11-12], 苦参素注射液对慢性乙型肝炎患者血清HBeAg, HBVDNA转阴率分别达到44.3%和45.3%. 我们的临床试验疗程结束时, HBeAg清除率为13.3%, e抗原的血清转换率为6.7%, HBVDNA的转阴率为20%, 好转率亦达到40%, 两组相比, 有显著性差异($P<0.05$). 天晴复欣针剂及胶囊对乙型肝炎病毒的抑制明显, 而且起效快, 疗效较好, 作用持久. 治疗结果表明, 天晴复欣针剂及胶囊能明显改善患者的症状体征和肝功能, 但与对照组相比, 无明显差异($P>0.05$). 而且苦参素对防治肝纤维化方面亦有明显效果^[13-15]. 治疗组在治疗期间共发生8例

(11例次)不良反应, 占26.6%, 但经过对症处理后很快缓解, 说明了天晴复欣的安全性十分可靠^[16]. 而且天晴复欣针剂及胶囊价格低, 疗效好, 可以作为治疗慢性乙型肝炎的常规用药^[17].

4 参考文献

- 1 于岩岩, 王勤环, 朱理珉, 张清波, 徐道振, 郭雁宾, 王兆荃, 郭树华, 周霞秋, 张玲霞. 苦参素治疗慢性乙型肝炎的临床研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:280-282
- 2 施光峰, 李谦, 翁心华, 郭祥惠. 苦参素对大鼠纤维化肝脏金属蛋白酶-1和 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响. 中华肝脏病杂志 2004;12:56
- 3 王邦才, 何伟芳, 贺娟. 苦参素注射液治疗慢性乙型肝炎与中医证型关系. 中国中医药信息杂志 2003;10:12-13
- 4 张海君, 张武松. 中西药联用治疗失代偿肝硬化临床研究. 河南中医学院学报 2003;18:36-37
- 5 费艳秋, 安富荣, 孙黎, 王平全, 祝德秋, 施安国. 苦参素注射液的人体药动学. 中国医院药学杂志 2003;23:21-22
- 6 张鸣杰, 黄建. 苦参碱类抗肿瘤作用机制研究的新进展. 中国中药杂志 2004;29:115-118
- 7 孙宏丽, 许超千, 李哲, 王宁, 于喜水, 杨宝峰. 氧化苦参碱对豚鼠单个心室肌细胞胞质 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响. 中国药理学杂志 2004;39:264-266
- 8 卢清, 张清波, 张继明, 尹有宽, 郭祥惠. 氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞旁分泌活化途径的抑制作用. 肝脏 2004;9:31-33
- 9 何支旺. 苦参素联合甘利欣治疗慢性乙型肝炎20例. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:367
- 10 石磊, 石嵩, 赵晓瑞, 侯佳娴, 孙国兴, 朱丽英, 李慧, 王魁彬. 苦参素与干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效对比分析. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:303-304
- 11 余会元, 郭祥惠, 张觉民, 冯正宗, 黄美云, 张幼娟, 刘立新. 苦参素注射液治疗慢性乙型肝炎98例. 中华传染病杂志 2004;22:212-213
- 12 周海兰. 苦参素注射液治疗慢性乙型病毒性肝炎35例. 湖北中医杂志 2002;24:28
- 13 宋健, 钟惠闽, 姚平. 苦参素对实验性大鼠肝纤维化的防治作用. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:282-2833
- 14 李彩霞, 冯亦农, 毕蓉. 苦参素联合复方丹参对慢性乙型肝炎肝纤维化阻断作用的临床观察. 山西中医 2003;19:8-10
- 15 孙维会, 宋明全, 刘中景. 小柴胡汤联合苦参素注射液治疗肝炎肝纤维化64例. 中西医结合肝病杂志 2003;13:41-42
- 16 尹银嘉, 施震, 杜光. 特异性萤光试剂检测苦参素葡萄糖注射液中心细菌内毒素. 中国药理学通报 2003;19:840
- 17 王林. 苦参素注射液治疗慢性乙型肝炎临床疗效成本分析. 四川医学 2003;24:746-747

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 •

大肠癌患者术前肠内营养对单核细胞功能影响

黎成金, 王烈, 涂小煌, 宋京翔

黎成金, 王烈, 涂小煌, 宋京翔, 中国人民解放军南京军区福州总医院普外科 福建省福州市 350025

项目负责人: 黎成金, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院普外科. licheng_jin@yahoo.com.cn

电话: 0591-2859415 传真: 0591-3796885

收稿日期: 2004-07-05 接受日期: 2004-07-15

摘要

目的: 探讨结、直肠癌手术肠道准备中应用肠内营养制剂

瑞素对外周血单核细胞功能的影响。

方法: 结直肠癌患者30例, 随机分为瑞素组和对照组各15例, 瑞素组于术前3d始, 每日华瑞公司产品瑞素(fresubin)30 mL/kg 口服, 不进行灌肠或口服泻药, 不口服抗生素. 对照组术前肠道准备按传统方法进行. 手术前后分别抽取外周静脉血10 mL, 用Ficoll Hypaque梯度离心法分离

表3 肾功能及不良反应治疗组/对照组(n)

	BUN	Cr	不良反应
治疗前(异常)	0/0	0/0	0/0
治疗后	0/0	0/0	恶心3例, 头晕3例, 注射部位疼痛2例, 胸闷1例, 心悸2例/0

3 讨论

苦参性寒味苦, 具有清热解毒, 利湿退黄的功能, 中医常用其治疗黄疸型肝炎. 天晴复欣注射液及胶囊是从天然植物苦豆子中提取的生物碱, 其中氧化苦参碱(Oxymatrine)即苦参素占98%以上. 基础研究表明, 苦参素具有多方面的药理作用及临床功能^[1-8], 抗炎、抗菌、抗心律失常、抗寄生虫, 消肿利尿、抗过敏, 减轻环磷酸胺引起的白细胞减少, 调节免疫、稳定细胞膜, 激活细胞膜腺苷酸环化酶, 诱导肝细胞微粒体等作用. 有报道证实^[9-10], 氧化苦参碱在体外试验中, 对含有HBV基因的2.2.15细胞株分泌HBsAg方面有显著抑制作用, 机制可能与调节机体免疫功能, 增强Th淋巴细胞功能, 改善和纠正免疫紊乱, 使免疫系统识别和清除病毒的能力增强有关. 有报道^[11-12], 苦参素注射液对慢性乙型肝炎患者血清HBeAg, HBVDNA转阴率分别达到44.3%和45.3%. 我们的临床试验疗程结束时, HBeAg清除率为13.3%, e抗原的血清转换率为6.7%, HBVDNA的转阴率为20%, 好转率亦达到40%, 两组相比, 有显著性差异($P<0.05$). 天晴复欣针剂及胶囊对乙型肝炎病毒的抑制明显, 而且起效快, 疗效较好, 作用持久. 治疗结果表明, 天晴复欣针剂及胶囊能明显改善患者的症状体征和肝功能, 但与对照组相比, 无明显差异($P>0.05$). 而且苦参素对防治肝纤维化方面亦有明显效果^[13-15]. 治疗组在治疗期间共发生8例

(11例次)不良反应, 占26.6%, 但经过对症处理后很快缓解, 说明了天晴复欣的安全性十分可靠^[16]. 而且天晴复欣针剂及胶囊价格低, 疗效好, 可以作为治疗慢性乙型肝炎的常规用药^[17].

4 参考文献

- 1 于岩岩, 王勤环, 朱理珉, 张清波, 徐道振, 郭雁宾, 王兆荃, 郭树华, 周霞秋, 张玲霞. 苦参素治疗慢性乙型肝炎的临床研究. 中华肝脏病杂志 2002;10:280-282
- 2 施光峰, 李谦, 翁心华, 郭祥惠. 苦参素对大鼠纤维化肝脏金属蛋白酶-1和 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响. 中华肝脏病杂志 2004;12:56
- 3 王邦才, 何伟芳, 贺娟. 苦参素注射液治疗慢性乙型肝炎与中医证型关系. 中国中医药信息杂志 2003;10:12-13
- 4 张海君, 张武松. 中西药联用治疗失代偿肝硬化变临床. 河南中医学院学报 2003;18:36-37
- 5 费艳秋, 安富荣, 孙黎, 王平全, 祝德秋, 施安国. 苦参素注射液的人体药动学. 中国医院药学杂志 2003;23:21-22
- 6 张鸣杰, 黄建. 苦参碱类抗肿瘤作用机制研究的新进展. 中国中药杂志 2004;29:115-118
- 7 孙宏丽, 许超千, 李哲, 王宁, 于喜水, 杨宝峰. 氧化苦参碱对豚鼠单个心室肌细胞胞质 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响. 中国药理学杂志 2004;39:264-266
- 8 卢清, 张清波, 张继明, 尹有宽, 郭祥惠. 氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞旁分泌活化途径的抑制作用. 肝脏 2004;9:31-33
- 9 何支旺. 苦参素联合甘利欣治疗慢性乙型肝炎20例. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:367
- 10 石磊, 石嵩, 赵晓瑞, 侯佳娴, 孙国兴, 朱丽英, 李慧, 王魁彬. 苦参素与干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效对比分析. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:303-304
- 11 余会元, 郭祥惠, 张觉民, 冯正宗, 黄美云, 张幼娟, 刘立新. 苦参素注射液治疗慢性乙型肝炎98例. 中华传染病杂志 2004;22:212-213
- 12 周海兰. 苦参素注射液治疗慢性乙型病毒性肝炎35例. 湖北中医杂志 2002;24:28
- 13 宋健, 钟惠闽, 姚平. 苦参素对实验性大鼠肝纤维化的防治作用. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:282-2833
- 14 李彩霞, 冯亦农, 毕蓉. 苦参素联合复方丹参对慢性乙型肝炎肝纤维化阻断作用的临床观察. 山西中医 2003;19:8-10
- 15 孙维会, 宋明全, 刘中景. 小柴胡汤联合苦参素注射液治疗肝炎肝纤维化64例. 中西医结合肝病杂志 2003;13:41-42
- 16 尹银嘉, 施震, 杜光. 特异性萤光试剂检测苦参素葡萄糖注射液中心细菌内毒素. 中国药理学通报 2003;19:840
- 17 王林. 苦参素注射液治疗慢性乙型肝炎临床疗效成本分析. 四川医学 2003;24:746-747

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 •

大肠癌患者术前肠内营养对单核细胞功能影响

黎成金, 王烈, 涂小煌, 宋京翔

黎成金, 王烈, 涂小煌, 宋京翔, 中国人民解放军南京军区福州总医院普外科 福建省福州市 350025

项目负责人: 黎成金, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总医院普外科. licheng_jin@yahoo.com.cn

电话: 0591-2859415 传真: 0591-3796885

收稿日期: 2004-07-05 接受日期: 2004-07-15

摘要

目的: 探讨结、直肠癌手术肠道准备中应用肠内营养制剂

瑞素对外周血单核细胞功能的影响。

方法: 结直肠癌患者30例, 随机分为瑞素组和对照组各15例, 瑞素组于术前3d始, 每日华瑞公司产品瑞素(fresubin)30 mL/kg 口服, 不进行灌肠或口服泻药, 不口服抗生素. 对照组术前肠道准备按传统方法进行. 手术前后分别抽取外周静脉血10 mL, 用Ficoll Hypaque梯度离心法分离

单核细胞, 放免法检测 PGE2 水平, 流式细胞术分析单核细胞 CD16, CD 80 的表达。

结果: 瑞素组术后单核细胞 CD16, CD 80 的表达明显高于对照组 ($t_{CD16d1}=2.566$, $P_{CD16d1}=0.0159$; $t_{CD16d7}=3.082$, $P_{CD16d7}=0.0046$; $t_{CD80d1}=2.530$, $P_{CD80d1}=0.0175$; $t_{CD80d7}=4.286$, $P_{CD80d7}=0.0002$), PGE2 分泌水平明显低于对照组 ($t=2.761$, $P_1=0.0102$; $t_7=3.625$, $P_7=0.0012$)。

结论: 瑞素用于结直肠癌术前肠道准备可使单核细胞功能受抑明显减轻。

黎成金, 王烈, 涂小煌, 宋京翔. 大肠癌患者术前肠内营养对单核细胞功能影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2500-2502
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2500.asp

0 引言

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤^[1-2], 大多数需手术根治^[3-4]。目前, 对传统的术前肠道准备有不同观点^[5-8]。研究表明, 利用肠内营养进行术前准备是可行的, 但以往的研究多从营养学和术后并发症方面进行探讨, 而单核吞噬系统细胞功能的紊乱, 是术后 SIRS/MODS 等发生的重要原因^[9-11], 不同的肠道准备方法, 对单核细胞功能有无影响? 我们对大肠癌患者进行肠内营养液瑞素进行术前肠道准备, 并与传统的肠道准备方法相对比, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 瑞素组 15 例(男 11 例, 女 4 例), 年龄 27-82(平均 49.6 ± 10.8 岁), 对照组 15 例(男 9 例, 女 6 例), 年龄 31-75(平均 50.7 ± 10.4 岁)。患者无手术禁忌证或内分泌及代谢性疾病, 肝肾功能正常, 未合并严重的慢性疾病和败血症, 术前未使用免疫抑制剂和增强剂, 术前未使用化疗/放疗。按研究编号术中顺序入组。

1.2 方法 瑞素组于术前 3 d 始, 每日用华瑞公司产品瑞素(Fresubin) 30 mL/kg 口服, 不进行灌肠或口服泻药, 不口服抗生素; 传统准备组采用术前 3 d 始流质饮食, 同时每日口服 300 g/L 硫酸镁 60 mL, 并用替硝唑(0.2 g, bid)及大量饮水导泻, 术前 1 d 禁食并加用肠外营养支持(液体量 2 500 mL/d, 每日热量 126 KJ/kg); 手术日清晨清洁灌肠。二组术后均以肠外营养支持。于肠

道准备前及术后 1, 7 d 分别抽取外周静脉血 10 mL, 用 Ficoll Hypaque(美国 Pharmingen 公司)细胞分层液将单个核细胞从全血中分离出来, 再经过贴壁作用弃除淋巴细胞, 得单核细胞, 经台盼蓝染色检测细胞活力在 98% 以上, 姬姆萨染色鉴定细胞纯度 94-98%。将纯化的单核细胞($1 \times 10^6/L$)在 RPMI 1640 完全培养液培养 2 h, 提取上清, 放免法检测 PGE2 水平。单核细胞悬液浓度调至约 $5 \times 10^5/L$, 流式细胞术(ESP, Coulter)分析其 CD16, CD 80 的表达, 每个样本分析约 5×10^3 个细胞。实验所得数据分别用均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 统计软件采用 SPSS, 用不配对 t 检验进行统计学处理, 率的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结果

两组术后单核细胞 CD16, CD 80 的表达均明显降低, PGE2 分泌水平均明显增高, 但瑞素组 CD16, CD80 的表达明显高于对照组 ($t_{CD16d1}=2.566$, $P_{CD16d1}=0.0159$; $t_{CD16d7}=3.082$, $P_{CD16d7}=0.0046$; $t_{CD80d1}=2.530$, $P_{CD80d1}=0.0175$; $t_{CD80d7}=4.286$, $P_{CD80d7}=0.0002$), 而 PGE2 分泌水平明显低于对照组 ($t=2.761$, $P_1=0.0102$; $t_7=3.625$, $P_7=0.0012$), 瑞素组第 7 d 明显恢复, 与对照组比较有显著差异(表 1)。

3 讨论

单核细胞是巨噬细胞前身, 属于单核吞噬系统, 在抗感染的特异性和非特异性免疫反应中起重要作用。CD16 作为 IgG Fc γ III 型受体, 参与了巨噬细胞的吞噬杀菌过程, 而且与单核细胞的吞噬功能和抗原提呈功能密切相关, CD80 又称 B7-1, 共同促进 T 细胞的增生和细胞因子的分泌, 在 T 细胞的活化中具有重要作用。PGE2 为一强烈的免疫抑制物, 他通过减少 IL-2 的释放抑制 T 细胞、巨噬细胞和粒细胞的活性与功能^[12]。肿瘤患者多伴有免疫抑制和营养不良, 在手术的刺激下, 单核吞噬系统大量分泌 PGE2, 加重患者的免疫抑制状态^[13-15]。本组资料显示, 在大肠癌患者中, 用瑞素行术前肠道准备, 与对照组相比, 术后单核细胞 CD16、CD80 的表达明显高于对照组, 而 PGE2 分泌水平明显低于对照组, 提示瑞素组在围手术期间, 单核细胞功能受抑制程度较轻, 并且恢复较快, 这将为机体术后恢复提供更为稳定的内环境, 更有利于患者安全度过围手术期。大肠癌手术前省略一切肠道准备, 其术后感染率并不比传

表 1 单核细胞 CD16, CD80 的表达及 PGE2 分泌水平 (mean \pm SD, $n=15$)

参数	实验组			对照组		
	术前	1 d	7 d	术前	1 d	7 d
CD16(%)	36.1 \pm 8.6	24.4 \pm 8.6 ^{bc}	33.0 \pm 10.0 ^{ad}	33.8 \pm 7.1	21.0 \pm 8.3 ^b	23.5 \pm 9.3 ^b
CD80(%)	46.7 \pm 13.7	32.0 \pm 10.0 ^{bc}	40.0 \pm 9.8 ^{ad}	43.8 \pm 11.2	27.8 \pm 9.1 ^b	30.3 \pm 11.0 ^a
PGE2(μ g/L)	1.2 \pm 0.8	3.5 \pm 0.8 ^{bd}	2.7 \pm 0.2 ^{ad}	1.1 \pm 0.5	4.4 \pm 0.8 ^b	3.9 \pm 0.5 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 术前; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 对照组。

术前准备者高^[6-7]。瑞素为不含膳食纤维的肠内营养制剂,其成分与正常人普通饮食成分相类似,可在胃肠道完全吸收,食用后肠道内无食物残渣存在,每日口服瑞素(Fresubin) 30 mL/kg,可满足患者每日的营养需求。用肠内营养剂瑞素代替传统的肠道准备,简化了术前准备的方法,由于不用口服抗生素,不干扰肠道菌群的生理状态,肠内容物对肠黏膜上皮有营养作用,防止菌群易位,提示用肠内营养剂瑞素代替传统的肠道准备,能使机体内环境在围手术期更为稳定,减少术后感染并发症的发生。

4 参考文献

- 1 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
- 2 Chao JC, Peng WL, Chen SH. Effects of epidermal growth factor and its signal transduction inhibitors on apoptosis in human colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:540-544
- 3 Wu WX, Sun YM, Hua YB, Shen LZ. Laparoscopic versus conventional open resection of rectal carcinoma: A clinical comparative study. *World J Gastroenterol* 2004;10:1167-1170
- 4 郑阳春,周总光,郑雪莲,李立,雷文章,王天才,邓伊伶,陈代云,刘卫平. 直肠癌细胞系膜内淋巴结转移的解剖病理学研究. 世界华人消化杂志 2004;12:570-573
- 5 van Geldere D, Fa-Si-Oen P, Noach LA, Rietra PJ, Peterse JL, Boom RP. Complications after colorectal surgery without mechanical bowel preparation. *J Am Coll Surg* 2002;194:40-47
- 6 Zmora O, Mahajna A, Bar-Zakai B, Rosin D, Herskho D, Shabtai M, Krausz MM, Ayalon A. Colon and rectal surgery

- without mechanical bowel preparation: a randomized prospective trial. *Ann Surg* 2003;237:363-367
- 7 Miettinen RP, Laitinen ST, Makela JT, Paakkonen ME. Bowel preparation with oral polyethylene glycol electrolyte solution Vs. no preparation in elective open colorectal surgery: prospective, randomized study. *Dis Colon Rectum* 2000;43:669-675
 - 8 Ahmad M, Abbas S, Asghar MI. Is mechanical bowel preparation really necessary in colorectal surgery? *J Coll Physicians Surg Pak* 2003;13:637-639
 - 9 Rivera-Chavez FA, Wheeler H, Lindberg G, Munford RS, O'Keefe GE. Regional and systemic cytokine responses to acute inflammation of the vermiform appendix. *Ann Surg* 2003;237:408-416
 - 10 Allen ML, Peters MJ, Goldman A, Elliott M, James I, Callard R, Klein NJ. Early postoperative monocyte deactivation predicts systemic inflammation and prolonged stay in pediatric cardiac intensive care. *Crit Care Med* 2002;30:1140-1145
 - 11 Ono S, Aosasa S, Tsujimoto H, Ueno C, Mochizuki H. Increased monocyte activation in elderly patients after surgical stress. *Eur Surg Res* 2001;33:33-38
 - 12 Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sc* 2000;30:3-21
 - 13 Schwacha MG, Chaudry IH, Alexander M. Regulation of macrophage IL-10 production postinjury via beta2 integrin signaling and the P38 MAP kinase pathway. *Shock* 2003;20:529-535
 - 14 Maddali S, Stapleton PP, Freeman TA, Yan Z, Duff M, Smyth GP, Daly JM. Altered cyclooxygenase-2 expression and nitric oxide metabolism following major elective surgery. *J Surg Res* 2004;116:211-218
 - 15 Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH Jr, Thurnher M. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:3369-3376

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 •

肥胖对急性胰腺炎病程及预后的影响

金洲祥,李永国,黄生福

金洲祥,李永国,黄生福,中南大学湘雅二医院肝胆外科 湖南省长沙市 410011
项目负责人: 金洲祥, 410011, 湖南省长沙市,中南大学湘雅二医院肝胆外科. jinzhoumail@hotmail.com
收稿日期: 2004-07-31 接受日期: 2004-08-04

摘要

目的: 探讨肥胖对急性胰腺炎患者预后评分(Ranson评分)、并发症及死亡率的影响。

方法: 我科 2002-01-01/2004-01-01 急性胰腺炎患者共 276 例: 年龄、性别、病因、入院时 Ranson 评分、并发症及预后情况。根据体重指数(BMI)分组, 把 BMI ≥ 24 kg/m² 归为肥胖组; BMI < 24 kg/m² 归为非肥胖组。比较两组预后评分、并发症及死亡率情况。

结果: 肥胖患者预后评分更高(15/75 vs 21/201, $P < 0.05$), 局部并发症(胰腺或胰周坏死、感染/脓肿)及呼吸功能衰竭发生率更高(分别为 18/75 vs 23/201, $P < 0.05$; 8/75 vs 7/201, $P < 0.05$; 14/75 vs 18/201, $P < 0.05$), 预后更差。

结论: 肥胖患者急性胰腺炎病程更加凶险, 肥胖对急性胰腺炎预后有预测价值。

金洲祥, 李永国, 黄生福. 肥胖对急性胰腺炎病程及预后的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2502-2503

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2502.asp>

0 引言

近年文献报道急性胰腺炎(AP)肥胖患者病程更加凶险,

术前准备者高^[6-7]。瑞素为不含膳食纤维的肠内营养制剂,其成分与正常人普通饮食成分相类似,可在胃肠道完全吸收,食用后肠道内无食物残渣存在,每日口服瑞素(Fresubin) 30 mL/kg,可满足患者每日的营养需求。用肠内营养剂瑞素代替传统的肠道准备,简化了术前准备的方法,由于不用口服抗生素,不干扰肠道菌群的生理状态,肠内容物对肠黏膜上皮有营养作用,防止菌群易位,提示用肠内营养剂瑞素代替传统的肠道准备,能使机体内环境在围手术期更为稳定,减少术后感染并发症的发生。

4 参考文献

- 1 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
- 2 Chao JC, Peng WL, Chen SH. Effects of epidermal growth factor and its signal transduction inhibitors on apoptosis in human colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:540-544
- 3 Wu WX, Sun YM, Hua YB, Shen LZ. Laparoscopic versus conventional open resection of rectal carcinoma: A clinical comparative study. *World J Gastroenterol* 2004;10:1167-1170
- 4 郑阳春,周总光,郑雪莲,李立,雷文章,王天才,邓伊伶,陈代云,刘卫平. 直肠癌细胞系膜内淋巴结转移的解剖病理学研究. 世界华人消化杂志 2004;12:570-573
- 5 van Geldere D, Fa-Si-Oen P, Noach LA, Rietra PJ, Peterse JL, Boom RP. Complications after colorectal surgery without mechanical bowel preparation. *J Am Coll Surg* 2002;194:40-47
- 6 Zmora O, Mahajna A, Bar-Zakai B, Rosin D, Herskho D, Shabtai M, Krausz MM, Ayalon A. Colon and rectal surgery

- without mechanical bowel preparation: a randomized prospective trial. *Ann Surg* 2003;237:363-367
- 7 Miettinen RP, Laitinen ST, Makela JT, Paakkonen ME. Bowel preparation with oral polyethylene glycol electrolyte solution Vs. no preparation in elective open colorectal surgery: prospective, randomized study. *Dis Colon Rectum* 2000;43:669-675
 - 8 Ahmad M, Abbas S, Asghar MI. Is mechanical bowel preparation really necessary in colorectal surgery? *J Coll Physicians Surg Pak* 2003;13:637-639
 - 9 Rivera-Chavez FA, Wheeler H, Lindberg G, Munford RS, O'Keefe GE. Regional and systemic cytokine responses to acute inflammation of the vermiform appendix. *Ann Surg* 2003;237:408-416
 - 10 Allen ML, Peters MJ, Goldman A, Elliott M, James I, Callard R, Klein NJ. Early postoperative monocyte deactivation predicts systemic inflammation and prolonged stay in pediatric cardiac intensive care. *Crit Care Med* 2002;30:1140-1145
 - 11 Ono S, Aosasa S, Tsujimoto H, Ueno C, Mochizuki H. Increased monocyte activation in elderly patients after surgical stress. *Eur Surg Res* 2001;33:33-38
 - 12 Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sc* 2000;30:3-21
 - 13 Schwacha MG, Chaudry IH, Alexander M. Regulation of macrophage IL-10 production postinjury via beta2 integrin signaling and the P38 MAP kinase pathway. *Shock* 2003;20:529-535
 - 14 Maddali S, Stapleton PP, Freeman TA, Yan Z, Duff M, Smyth GP, Daly JM. Altered cyclooxygenase-2 expression and nitric oxide metabolism following major elective surgery. *J Surg Res* 2004;116:211-218
 - 15 Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, Rogatsch H, Barsoum AL, Coggin JH Jr, Thurnher M. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:3369-3376

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 •

肥胖对急性胰腺炎病程及预后的影响

金洲祥, 李永国, 黄生福

金洲祥, 李永国, 黄生福, 中南大学湘雅二医院肝胆外科 湖南省长沙市 410011
项目负责人: 金洲祥, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院肝胆外科. jinzhoumail@hotmail.com
收稿日期: 2004-07-31 接受日期: 2004-08-04

摘要

目的: 探讨肥胖对急性胰腺炎患者预后评分(Ranson评分)、并发症及死亡率的影响。

方法: 我科 2002-01-01/2004-01-01 急性胰腺炎患者共 276 例: 年龄、性别、病因、入院时 Ranson 评分、并发症及预后情况。根据体重指数(BMI)分组, 把 BMI ≥ 24 kg/m² 归为肥胖组; BMI < 24 kg/m² 归为非肥胖组。比较两组预后评分、并发症及死亡率情况。

结果: 肥胖患者预后评分更高(15/75 vs 21/201, $P < 0.05$), 局部并发症(胰腺或胰周坏死、感染/脓肿)及呼吸功能衰竭发生率更高(分别为 18/75 vs 23/201, $P < 0.05$; 8/75 vs 7/201, $P < 0.05$; 14/75 vs 18/201, $P < 0.05$), 预后更差。

结论: 肥胖患者急性胰腺炎病程更加凶险, 肥胖对急性胰腺炎预后有预测价值。

金洲祥, 李永国, 黄生福. 肥胖对急性胰腺炎病程及预后的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2502-2503

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2502.asp>

0 引言

近年文献报道急性胰腺炎(AP)肥胖患者病程更加凶险,

并认为肥胖是急性胰腺炎严重程度预测的重要临床指标^[1-3]。Johnson *et al*^[4]甚至提出用 APACHE-O 来代替 APACHE-II 评分系统。但是肥胖对急性胰腺炎患者局部或系统并发症影响的有关文献^[1, 5]报道结果不完全一致,而且上述文献^[1-3]在划分肥胖时使用的 BMI 值存在差异;而目前国内又尚未见这方面的报道。因而,我们根据国人的特点,把 BMI ≥ 24 kg/m² 归为肥胖组,把 BMI < 24 kg/m² 归为非肥胖组。探讨肥胖对急性胰腺炎患者预后评分、并发症及死亡率的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-01-01/2004-01-01 共收治 AP 患者 276 例,男 133 例,女 143 例,平均(46.5 \pm 13.2 岁),随机分为肥胖组(BMI ≥ 24 kg/m²)75 例和非肥胖组(BMI < 24 kg/m²)201 例。胆源性胰腺炎 175 例,酒精性胰腺炎 41 例,其他原因引起胰腺炎共 60 例。

1.2 方法 用 Ranson 评分系统(SGO 1974;139:69-81)评估急性胰腺炎严重程度,分别收集 Ranson ≥ 3 与 Ranson < 3 患者例数,比较两组患者预后评分的差异。统计两组患者中局部并发症(坏死、感染/脓肿、胰腺假性囊肿形成)及系统并发症(呼吸功能衰竭、肾功能衰竭、胃肠道出血、休克等)发生例数,比较两组患者各并发症发生率的差异。比较两组患者的死亡率。

统计学处理 用 SPSS 10.0 软件,肥胖和非肥胖组预后评分、并发症及死亡率比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。P < 0.05 表示差异有显著性。

2 结果

肥胖组中入院时 Ranson ≥ 3 患者共 15 例,非肥胖组 21 例。肥胖组中 Ranson ≥ 3 患者比率(15/75=20.0%)明显高于非肥胖组(21/201=10.4%),有统计学意义(P < 0.05),提示肥胖患者预后评分更高,急性胰腺炎病情更严重。局部并发症中,肥胖组胰腺或胰周坏死发生率为 24.0%,感染/脓肿发生率为 10.7%,明显高于非肥胖组的 11.4%和 3.48%,有统计学意义(P < 0.05),而胰腺假性囊肿发生率两组间无统计学差异。系统并发症中,肥胖组呼吸功能衰竭发生率(14/75=18.7%)明显高于非肥胖组(18/201=8.96%),有统计学意义(P < 0.05)。而肾衰(7/75 vs 13/201)、休克(4/75 vs 9/201)、胃肠道出血(2/75 vs 3/201)等并发症两组之间并无统计学差异。当入院 Ranson ≥ 3 时,肥胖组死亡率(5/15=33.3%)明显高于非肥胖组(2/21=9.52%),有统计学差异(P < 0.05)。而入院 Ranson < 3 时,两组患者死亡率无统计学差异。

3 讨论

对急性胰腺炎严重程度及预后的早期评估至关重要,

准确的早期预测有利于及时正确干预、改善预后。目前公认的比较理想的评分系统有 APACHE II 和 Ranson 评分系统,但都未包括肥胖这一因素。近年来,国外不断有文献报道肥胖与急性胰腺炎预后的关系。本组结果显示肥胖患者急性胰腺炎病程更加凶险,并发症多,预后欠佳。本组结果显示肥胖患者胰腺/胰周坏死、感染/脓肿机率明显升高,而胰腺假性囊肿并无显著差异。由于胰腺感染与胰周脂肪坏死成正相关,因此患者容易并发胰腺感染;肥胖患者常伴有循环障碍和免疫功能缺陷,容易导致组织缺血和继发胰腺感染。肥胖患者在肾功能衰竭、肠道出血、休克等方面与非肥胖组没有显著差异,但发生呼吸衰竭的机率明显高于非肥胖组,有统计学意义。肥胖患者死亡率明显高于非肥胖患者,尤其在入院 Ranson 评分大于等于 3 时。因为肥胖患者胰周脂肪坏死、组织缺氧释放的炎症因子,加重了 SIRS^[6],容易并发 MODS。肥胖患者胰腺感染率高,而胰腺感染与患者死亡率密切相关^[7]。肥胖患者呼吸功能衰竭发生率高,而呼吸衰竭是急性胰腺炎患者早期死亡的重要原因^[8-9]。患者入院 Ranson 大于等于 3 时,胰腺炎病情已经比较严重,肥胖患者的上述各种因素容易使病情进一步恶化,而且肥胖患者耐受打击能力又比较差,导致预后欠佳。

总之,肥胖患者急性胰腺炎病程更加凶险,局部并发症和系统并发症发生率高,预后差,因此临床上应当把“肥胖”作为急性胰腺炎预后预测的重要指标,并进一步评估他的预测价值。

4 参考文献

- 1 Martinez J, Sanchez-Paya J, Palazon JM, Aparicio JR, Pico A, Perez-Mateo M. Obesity: a prognostic factor of severity in acute pancreatitis. *Pancreas* 1999;19:15-20
- 2 Martinez J, Sanchez-Paya J, Palazon JM, Suazo-Barahona J, Robles-Diaz G, Perez-Mateo M. Is obesity a risk factor in acute pancreatitis? A meta-analysis. *Pancreatol* 2004;4:42-48
- 3 Suazo-Barahona J, Carmona-Sanchez R, Robles-Diaz G, Milke-Garcia P, Vargas-Vorackova F, Uscanga-Dominguez L, Pelaez-Luna M. Obesity: a risk factor for severe acute biliary and alcoholic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1324-1328
- 4 Johnson CD, Toh SK, Campbell MJ. Combination of APACHE-II score and an obesity score (APACHE-O) for the prediction of severe acute pancreatitis. *Pancreatol* 2004;4:1-6
- 5 Tsai CJ. Is obesity a significant prognostic factor in acute pancreatitis? *Dig Dis Sci* 1998;43:2251-2254
- 6 夏菁,丁一民.急性胰腺炎早期全身炎症反应综合征和细胞因子变化的意义. *胰腺病学* 2002;2:162-165
- 7 于成功,陈隆典,张志宏.急性重症胰腺炎与胰腺感染. *世界华人消化杂志* 2001;9:689-693
- 8 Tao HQ, Zhang JX, Zou SC. Clinical characteristics and management of patients with early acute severe pancreatitis: Experience from a medical center in China. *World J Gastroenterol* 2004;10:919-921
- 9 Zhu AJ, Shi JS, Sun XJ. Organ failure associated with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2570-2573

大肠癌淋巴结微转移免疫组化检测与预后关系

于雁, 毛银玲, 尚丽华

于雁, 毛银玲, 尚丽华, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内科
黑龙江省哈尔滨市 150040
黑龙江省教育厅基金资助, No. 1051037
项目负责人: 于雁, 150040, 黑龙江省哈尔滨市哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内科, wig@wignet.com
电话: 0451-86628455
收稿日期: 2004-07-06 接受日期: 2004-08-25

摘要

目的:探讨大肠癌淋巴结微转移免疫组化检出率及淋巴结微转移与临床预后的关系。

方法:应用抗细胞角蛋白(CK)和癌胚抗原(CEA)mAb, 对82例大肠癌(Dukes' B期)根治术后经病理常规检查为转移阴性的667枚淋巴结进行免疫组化(SP法)检测, 结合随访资料进行临床预后分析。

结果:转移阴性的82例667枚淋巴结中, 18例(21.9%, 18/82)42枚(6.3%, 42/667)淋巴结中发现微小转移的癌细胞, 其中13例10a内因局部复发和远处转移死亡。64例免疫组化检测阴性的患者仅24例复发死亡。免疫组化诊断微转移阳性和阴性组10a生存率分别是27.8%(5/18)和62.5%(40/64), 差异非常显著($P < 0.05$)。

结论:应用肿瘤特异性抗体检测常规病理检查阴性的淋巴结有助于发现微小转移的癌细胞, 对估计临床预后, 指导治疗有重要意义。

于雁, 毛银玲, 尚丽华. 大肠癌淋巴结微转移免疫组化检测与预后关系. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2504-2506
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2504.asp>

0 引言

淋巴结微转移是指常规检查难以发现的微小转移灶。淋巴结微转移在常规HE染片中极难发现。免疫组化技术的出现和发展, 为发现淋巴结微转移提供了一项先进可靠的方法^[1-2]。大肠癌是我国常见的恶性肿瘤, 无淋巴结转移的大肠癌5a生存率一般在70-80%, 而有转移者仅为30%。因此, 确定大肠癌有无转移对判断患者预后及指导治疗至关重要。我们采用肿瘤mAb免疫组织化学技术对82例结肠癌患者的667枚常规病理诊断阴性的淋巴结进行检测, 目的在于探讨大肠癌患者术后复发及其预后的关系, 为大肠癌临床治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 1991/1993年哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腹外科行大肠癌根治术的患者病理存档石蜡包埋组织块。病例选择条件: 均行大肠癌根治术(清扫各组淋巴结),

并有确切的病理诊断。均为病理诊断阴性的淋巴结。均为诊断Dukes' B期大肠癌的患者。均为原发性大肠癌并首次接受外科治疗者。均为随访中患者。每个病例均具有完整的临床病史资料, 病理诊断和随访资料。参照《中国常见恶性肿瘤诊治规范大肠癌分册》的标准, 进行病理诊断观察组织分类, 组织学分级和浸润等指标。随访时间在2-11a, 男64例, 女18例。年龄30-74(平均54.5岁)。随访结果分为带瘤和死亡。

1.2 方法 应用SP法进行免疫组化染色。石蜡切片, 常规脱蜡至水。30 mL/L过氧化氢孵育5-10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min。滴加试剂1(蓝色液体)室温孵育10-15 min, 倾去。滴加适当比例稀释的一抗, 37℃孵育1-2 h或4℃过夜。PBS冲洗, 3 min × 3次。滴加试剂2(黄色液体), 室温或37℃孵育10-15 min。PBS冲洗, 3 min × 3次。滴加试剂C(橙色液体), 室温或37℃孵育10-15 min。PBS冲洗, 3 min × 3次。显色剂显色(DAB或AEC)。自来水充分冲洗, 复染, 封片。以细胞膜或细胞质内出现棕色颗粒为阳性细胞。强阳性(+++)胞质呈深棕色; 阳性(++), 胞质呈棕色; 弱阳性(+), 胞质呈浅黄色; 阴性(-)胞质不着色。对免疫组化检测阳性及阴性组复发率用SPSS10.0软件统计。

2 结果

2.1 免疫组化检测结果 在82例667枚淋巴结中CEA, CKmAb标记后18例42枚淋巴结内发现微小转移灶, 其中16例38枚淋巴结内可见CEA阳性的癌细胞, 17例36枚淋巴结内有CK阳性的细胞, 18例中6例24枚淋巴结内CEA, CK同时为阳性。CEA, CK阳性细胞成小灶状, 三五成群散在分布(图1), 部分以单个细胞形式存在(图2)。患者总阳性率为21.9%(18/82), 淋巴结总阳性率为6.29%(42/667)。18例微转移者12例原发灶为中分化腺癌, 6例为低分化腺癌。

2.2 微小转移与患者预后 患者平均追踪时间为6.5a表明18例淋巴结微转移者13例10a内因局部复发和远处转移而死亡。5例尚生存。淋巴结标记阴性者64例中40例存活, 24例死亡。10a生存率分别是27.8%(5/18)和62.5%(40/64), 差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

大肠癌有无淋巴结转移是确定临床分期及术后辅助治疗方法的重要依据, 也是影响患者预后的主要因素^[3-6]。常规方法不能查及淋巴结的大部分组织, 故有可能忽略



图1 CK 阳性, SP×400.

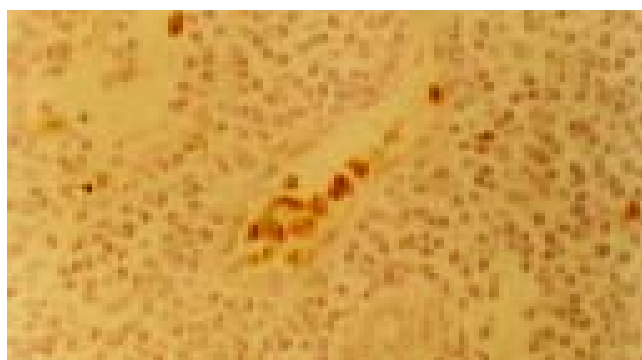


图2 CEA 阳性, SP×400.

淋巴结微转移的存在. 由于这些微转移有发展成致命的显性转移的可能, 因此微转移的检测日益为人们所重视, 并已成为目前研究的热点^[7-8]. 正确认识和判断有无转移以及转移的途径和范围, 对临床诊断、治疗及预后的判断具有十分重要的应用^[9-11]. 过去人们对转移的检测主要依靠常规组织学方法以及超声、CT、MRI 等物理学检查手段^[12], 这些方法敏感性太低, 不能检测体内存在的微转移. 近年来免疫组化和分子生物学技术的发展, 使得微转移的检测成为可能^[13-14]. 我们用免疫组化方法检测淋巴结中CK20和CEA抗原的表达, 可以准确评价大肠癌患者淋巴结中微转移的情况. CK20 含424个氨基酸, M_r 48 553, 等电点为5.66, 属酸性CK, 其编码DNA总长18 kb, 含8个外显子, 7个内含子. 其mRNA长1.75 Kb, 其在正常组织中不表达, 大肠癌高表达, 且在肿瘤侵袭、转移、扩散到其他组织器官时始终保持稳定. 在非上皮组织中检测到CK20提示存在肿瘤细胞^[15-21]. CEA是一种结构复杂的可溶性糖蛋白, M_r 200 000. CEA出现于胚胎时期胃肠黏膜上皮细胞内, 随着胚胎发育成熟, 抗原水平逐渐下降, 乃至消失. 当消化道上皮癌变时, 又可合成并分泌这些抗原^[22-23].

本组82例常规诊断阴性的667枚淋巴结分别用CEA和CK两种单克隆抗体标记, 结果18例(21.9%, 18/82)42枚(6.3%, 42/667)淋巴结内有阳性细胞. 常规病理检查阴性患者中, 33%出现淋巴结微转移, 本组为6.3%(42/667). 在全部82例中, 共有18例21.9%(18/82)检测出微转移, 与文献报道相仿. 此外, 大肠癌Dukes' B期应为无淋巴结转移的患者, 本组82例中18例淋巴结确认为有淋巴结微转移, 其临床分期应升级为Dukes' C期, 临床应按Dukes' C期患者进行综合治疗. 10a追踪随访资料结果显示淋巴结免疫组化阳性者和阴性者复发率有明显差异, 表明微小转移与预后密切相关.

虽然目前对微转移癌细胞在体内的转归尚不明确, 但确实有研究发现微转移的出现明显影响大肠癌患者的预后^[24-29]. 相信随着微转移癌细胞生物学特征性研究的深入, 微转移的检测会在肿瘤的诊断和治疗中发挥重要作用.

4 参考文献

- Matsumoto M, Natsugoe S, Ishigami S, Uenosono Y, Takao S, Aikou T. Rapid immunohistochemical detection of lymph node micrometastasis during operation for upper gastrointestinal carcinoma. *Br J Surg* 2003;90:563-566
- Moore KH, Thaler HT, Tan LK, Borgen PI, Cody HS 3rd. Immunohistochemically detected tumor cells in the sentinel lymph nodes of patients with breast carcinoma: biologic metastasis or procedural artifact? *Cancer* 2004;100:929-934
- Demirbas S, Ince M, Baloglu H, Celenk T. Should sentinel lymph node mapping be performed for colorectal cancer? *Turk J Gastroenterol* 2004;15:39-44
- Fukagawa T, Sasako M, Mann GB, Sano T, Katai H, Maruyama K, Nakanishi Y, Shimoda T. Immunohistochemically detected micrometastases of the lymph nodes in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001;92:753-760
- 卿三华, 蒋会勇, 齐德林, 周正端, 黄祥成, 张福明, 盛权根. 影响大肠癌淋巴结转移的因素间相关性探讨. *世界华人消化杂志* 2000;8:654-657
- 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
- Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Yamaguchi K, Hirabayashi Y, Kitano S. Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001;8:300-304
- Nagakura S, Shirai Y, Yokoyama N, Hatakeyama K. Clinical significance of lymph node micrometastasis in gallbladder carcinoma. *Surgery* 2001;129:704-713
- Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Higashi H, Watanabe T, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Clinical impact of micrometastasis of the lymph node in gastric cancer. *Am Surg* 2003;69:573-577
- Kronberg U, Lopez-Kostner F, Soto G, Zuniga A, Wistuba I, Miranda V, Pinto E, Viviani P, Marshall G. Detection of lymphatic micrometastases in patients with stages I and II colorectal cancer: impact on five-year survival. *Dis Colon Rectum* 2004;47:1151-1157
- Nakamura T, Ide H, Eguchi R, Hayashi K, Ota M, Takasaki K. Clinical implications of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative (pN0) esophageal carcinoma. *J Surg Oncol* 2002;79:224-229
- 高天师, 吴炳进, 安玉, 张勇, 黄颖, 任国君. 大肠癌的CT诊断. *世界华人消化杂志* 2000;8(特刊8):966
- Noura S, Yamamoto H, Miyake Y, Kim B, Takayama O, Seshimo I, Ikenaga M, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Immunohistochemical assessment of localization and frequency of micrometastases in lymph nodes of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:759-767
- Sasaki M, Watanabe H, Jass JR, Ajioka Y, Kobayashi M, Matsuda K, Hatakeyama K. Occult lymph node metastases detected by cytokeratin immunohistochemistry predict recurrence in "node-negative" colorectal cancer. *J Gastroenterol* 1997;32:758-764
- Miyake Y, Yamamoto H, Fujiwara Y, Ohue M, Sugita Y, Tomita N, Sekimoto M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M. Extensive micrometastases to lymph nodes as a marker for rapid

- recurrence of colorectal cancer: a study of lymphatic mapping. *Clin Cancer Res* 2001;7:1350-1357
- 16 Aoki S, Takagi Y, Hayakawa M, Yamaguchi K, Futamura M, Kunieda K, Saji S. Detection of peritoneal micrometastases by reverse transcriptase-polymerase chain reaction targeting carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20 in colon cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2002;21:555-562
- 17 Chen G, McIver CM, Texler M, Lloyd JM, Rieger N, Hewett PJ, Sen Wan D, Hardingham JE. Detection of occult metastasis in lymph nodes from colorectal cancer patients: a multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Dis Colon Rectum* 2004;47:679-686
- 18 Oberg AN, Lindmark GE, Israelsson AC, Hammarstrom SG, Hammarstrom ML. Detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR for CEA and CK20 mRNAs. *Int J Cancer* 2004;111:101-110
- 19 Liu Z, Ye X, Bi W, Wang M, Li Y, Chen T. Detection of occult metastases in lymph nodes from patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:529-531
- 20 叶欣, 李毅, 侯刚, 刘忠民, 陈廷武. 大肠癌患者淋巴结细胞角蛋白-20 mRNA 基因表达的临床意义. *中华肿瘤杂志* 2002;24:261-263
- 21 孙青, 丁彦青, 张福明, 李国新, 张素娟. 逆转录聚合酶链反应检测结直肠癌淋巴结微转移. *临床与实验病理学杂志* 2003;19:643-645
- 22 Roma A, Alvarez C, Paes de Lima A, Denninghoff V, Elsner B. Detection of micrometastases of colorectal carcinoma in lymph nodes. *Medicina (B Aires)* 2003;63:399-402
- 23 Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, Ueo H, Akiyoshi T. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995;55:3417-3420
- 24 Kienle P, Koch M. Are "micrometastases" of the peritoneum equivalent to distant metastases? *Dig Surg* 2002;19:453-458
- 25 Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Inomata M, Takeuchi H, Kitano S. Prognostic effect of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2002;9:771-774
- 26 Komukai S, Nishimaki T, Watanabe H, Ajioka Y, Suzuki T, Hatakeyama K. Significance of immunohistochemically demonstrated micrometastases to lymph nodes in esophageal cancer with histologically negative nodes. *Surgery* 2000;127:40-46
- 27 Yokoyama N, Shirai Y, Hatakeyama K. Immunohistochemical detection of lymph node micrometastases from gallbladder carcinoma using monoclonal anticytokeratin antibody. *Cancer* 1999;85:1465-1469
- 28 Shimoyama M, Yamazaki T, Suda T, Hatakeyama K. Prognostic significance of lateral lymph node micrometastases in lower rectal cancer: an immunohistochemical study with CAM5.2. *Dis Colon Rectum* 2003;46:333-339
- 29 Noura S, Yamamoto H, Ohnishi T, Masuda N, Matsumoto T, Takayama O, Fukunaga H, Miyake Y, Ikenaga M, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Comparative detection of lymph node micrometastases of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2002;20:4232-4241

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 •

无痛结肠镜检查技术在电烧治疗结肠息肉中的临床应用

潘林娜, 张志燕, 李 曼

潘林娜, 张志燕, 李曼, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腔镜室
黑龙江省哈尔滨市 150040
项目负责人: 潘林娜, 150040, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腔镜室。
电话: 0451-82081615
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-09-09

摘要

目的: 探讨应用得普利麻、芬太尼作镇静麻醉辅助在电子结肠镜下进行息肉电切治疗的可行性, 评价其疗效和安全性。

方法: 将142例结肠镜下进行息肉电切治疗患者随机分为2组: 麻醉组(96例)静脉注射得普利麻和芬太尼, 至患者进入睡眠状态后进行结肠镜检查, 并进行息肉电切治疗; 对照组(46例)按常规进行结肠镜下息肉电切治疗。观察2组检查前、检查中、检查后的血压、脉搏、血氧饱和度以及检查反应和进镜时间。

结果: 检查过程中, 麻醉组血压、心率各时段均变化明显, 有显著性差异 ($t_{\text{收缩压}}=36.909$, $P<0.01$; $t_{\text{舒张压}}=25.423$, $P<0.01$; $t_{\text{心率}}=4.243$, $P<0.01$), 对照组血压、心率各

时段均变化明显, 有显著性差异($t_{\text{收缩压}}=57.470$, $P<0.01$; $t_{\text{舒张压}}=35.636$, $P<0.01$; $t_{\text{心率}}=6.132$, $P<0.01$), 2组操作过程前、中、后的 SpO_2 无显著性差异($t_{\text{麻醉组}}=1.367$, $P>0.05$ $t_{\text{对照组}}=1.061$, $P>0.05$)。麻醉组入镜时间和检查反应明显优于对照组。

结论: 得普利麻和芬太尼辅助结肠镜检查进行息肉电切治疗是安全有效的, 其入镜时间和检查反应优于常规结肠镜下进行息肉电切治疗。

潘林娜, 张志燕, 李曼. 无痛结肠镜检查技术在电烧治疗结肠息肉中的临床应用. *世界华人消化杂志* 2004;12(10):2506-2508
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2506.asp>

0 引言

无痛结肠镜检查技术是近年来发展的新概念, 已越来越受到人们的重视, 他的出现从根本上解决了结肠镜检查治疗给患者带来的痛苦, 促进了此项检查的广泛开展. 而无痛的实质是在患者接受结肠镜检查治疗前应

- recurrence of colorectal cancer: a study of lymphatic mapping. *Clin Cancer Res* 2001;7:1350-1357
- 16 Aoki S, Takagi Y, Hayakawa M, Yamaguchi K, Futamura M, Kunieda K, Saji S. Detection of peritoneal micrometastases by reverse transcriptase-polymerase chain reaction targeting carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20 in colon cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2002;21:555-562
- 17 Chen G, McIver CM, Texler M, Lloyd JM, Rieger N, Hewett PJ, Sen Wan D, Hardingham JE. Detection of occult metastasis in lymph nodes from colorectal cancer patients: a multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Dis Colon Rectum* 2004;47:679-686
- 18 Oberg AN, Lindmark GE, Israelsson AC, Hammarstrom SG, Hammarstrom ML. Detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR for CEA and CK20 mRNAs. *Int J Cancer* 2004;111:101-110
- 19 Liu Z, Ye X, Bi W, Wang M, Li Y, Chen T. Detection of occult metastases in lymph nodes from patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:529-531
- 20 叶欣, 李毅, 侯刚, 刘忠民, 陈廷武. 大肠癌患者淋巴结细胞角蛋白-20 mRNA 基因表达的临床意义. *中华肿瘤杂志* 2002;24:261-263
- 21 孙青, 丁彦青, 张福明, 李国新, 张素娟. 逆转录聚合酶链反应检测结直肠癌淋巴结微转移. *临床与实验病理学杂志* 2003;19:643-645
- 22 Roma A, Alvarez C, Paes de Lima A, Denninghoff V, Elsner B. Detection of micrometastases of colorectal carcinoma in lymph nodes. *Medicina (B Aires)* 2003;63:399-402
- 23 Mori M, Mimori K, Inoue H, Barnard GF, Tsuji K, Nanbara S, Ueo H, Akiyoshi T. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995;55:3417-3420
- 24 Kienle P, Koch M. Are "micrometastases" of the peritoneum equivalent to distant metastases? *Dig Surg* 2002;19:453-458
- 25 Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Inomata M, Takeuchi H, Kitano S. Prognostic effect of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2002;9:771-774
- 26 Komukai S, Nishimaki T, Watanabe H, Ajioka Y, Suzuki T, Hatakeyama K. Significance of immunohistochemically demonstrated micrometastases to lymph nodes in esophageal cancer with histologically negative nodes. *Surgery* 2000;127:40-46
- 27 Yokoyama N, Shirai Y, Hatakeyama K. Immunohistochemical detection of lymph node micrometastases from gallbladder carcinoma using monoclonal anticytokeratin antibody. *Cancer* 1999;85:1465-1469
- 28 Shimoyama M, Yamazaki T, Suda T, Hatakeyama K. Prognostic significance of lateral lymph node micrometastases in lower rectal cancer: an immunohistochemical study with CAM5.2. *Dis Colon Rectum* 2003;46:333-339
- 29 Noura S, Yamamoto H, Ohnishi T, Masuda N, Matsumoto T, Takayama O, Fukunaga H, Miyake Y, Ikenaga M, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Comparative detection of lymph node micrometastases of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2002;20:4232-4241

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 •

无痛结肠镜检查技术在电烧治疗结肠息肉中的临床应用

潘林娜, 张志燕, 李 曼

潘林娜, 张志燕, 李曼, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腔镜室
黑龙江省哈尔滨市 150040
项目负责人: 潘林娜, 150040, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腔镜室.
电话: 0451-82081615
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-09-09

摘要

目的: 探讨应用得普利麻、芬太尼作镇静麻醉辅助在电子结肠镜下进行息肉电切治疗的可行性, 评价其疗效和安全性。

方法: 将142例结肠镜下进行息肉电切治疗患者随机分为2组: 麻醉组(96例)静脉注射得普利麻和芬太尼, 至患者进入睡眠状态后进行结肠镜检查, 并进行息肉电切治疗; 对照组(46例)按常规进行结肠镜下息肉电切治疗。观察2组检查前、检查中、检查后的血压、脉搏、血氧饱和度以及检查反应和进镜时间。

结果: 检查过程中, 麻醉组血压、心率各时段均变化明显, 有显著性差异 ($t_{\text{收缩压}}=36.909$, $P<0.01$; $t_{\text{舒张压}}=25.423$, $P<0.01$; $t_{\text{心率}}=4.243$, $P<0.01$), 对照组血压、心率各

时段均变化明显, 有显著性差异($t_{\text{收缩压}}=57.470$, $P<0.01$; $t_{\text{舒张压}}=35.636$, $P<0.01$; $t_{\text{心率}}=6.132$, $P<0.01$), 2组操作过程前、中、后的 SpO_2 无显著性差异($t_{\text{麻醉组}}=1.367$, $P>0.05$ $t_{\text{对照组}}=1.061$, $P>0.05$)。麻醉组入镜时间和检查反应明显优于对照组。

结论: 得普利麻和芬太尼辅助结肠镜检查进行息肉电切治疗是安全有效的, 其入镜时间和检查反应优于常规结肠镜下进行息肉电切治疗。

潘林娜, 张志燕, 李曼. 无痛结肠镜检查技术在电烧治疗结肠息肉中的临床应用. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2506-2508
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2506.asp>

0 引言

无痛结肠镜检查技术是近年来发展的新概念, 已越来越受到人们的重视, 他的出现从根本上解决了结肠镜检查治疗给患者带来的痛苦, 促进了此项检查的广泛开展。而无痛的实质是在患者接受结肠镜检查治疗前应

用一种或多种对中枢神经有抑制作用的药物,使患者处于适度镇静状态下,再进行结肠镜检查^[1-2]。近年来研究发现,得普利麻应用于结肠镜检查治疗,具有起效快、作用时间短、苏醒恢复迅速的特点,有抗呕吐作用。他与芬太尼联合应用可减少各自用量,增强效果,减少副作用,临床应用取得了较满意的效果,现就得普利麻和芬太尼在无痛结肠镜检查电烧治疗结肠息肉中的应用概述如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2003-05/2004-05月到我科就诊进行结肠镜检查并切除结肠息肉的142例患者将其分为2组:麻醉组96例,男58例,女38例,年龄7-83岁,平均年龄 60.25 ± 14.17 岁,其中合并高血压者14例,糖尿病患者3例,既往有腹腔手术史者8例。对照组46例,男27例,女19例,年龄16-89岁,平均年龄 52.40 ± 12.80 岁。麻醉组与对照组所有患者均行结肠镜下息肉高频电凝电切除术,电烧切除息肉264枚,最小为 $0.2 \times 0.2 \text{ cm}^2$,最大为 $3.5 \times 4.5 \text{ cm}^2$,其中直肠息肉83枚,乙状结肠息肉62枚,降结肠息肉22枚,横结肠息肉31枚,升结肠息肉43枚,回盲部息肉23枚,经病理组织学分析,复合息肉104枚,管状腺瘤75枚,绒毛状腺瘤59枚,类癌1枚,各种炎性息肉25枚。

1.2 方法 患者于检查前按内镜常规准备,麻醉组于检查前用鼻导管以3 L/min的流量持续给氧,开辟静脉通道,给予得普利麻1-1.5 mg/kg,芬太尼0.5 mg,缓慢静脉注入,待患者进入浅睡眠状态后,开始进行结肠镜检查,并进行内窥镜下结肠息肉电烧切除术。检查过程中,如患者清醒或因内镜牵拉导致不自主运动较多时,可追加得普利麻用量。本组患者得普利麻最小用量2 mL,最大用量为40 mL。对照组按常规方法进行结肠镜检查,并进行内窥镜下结肠息肉的电烧切除术。两组均检测血压、心率和动脉血氧饱和度(SpO_2),并观察患者呼吸频率,详细记录2组术前、术中、术后的检测结果,记录操作时间及患者反应。检查结束后,2组患者均在观察室观察5-10 min,无异常即可离院。

1.2.1 观察指标 (1)血压、心率、动脉血氧饱和度(SpO_2)。 (2)镇静程度:参照RAMSAY分级法:0级为清醒;I级为困倦,但反应好;II级为入睡,但易唤醒;III级为入睡,唤醒困难,睫毛反射存在;IV级为入睡,睫毛反射消失。 (3)疼痛程度:分四级:1级为无疼痛;2级为轻微疼痛;3级为疼痛较重,但能忍受;4级为疼痛重,无法忍受。 (4)检查成功率:结肠镜插入至回盲部为检查成功,否则为检查失败(除外因肿瘤、梗阻造成肠腔狭窄,镜身无法通过的情况)。 (5)进镜时间:镜身从肛门插入至到达回盲部的时间。 (6)不良反应。 (7)麻醉组记得普利麻用药总量,起效时间(注药开始至睫毛反射消失的时间),苏醒时间(停止给药至患者呼之能应的)和完全清醒时间(停止给药至患者能正确回答问

题的时间)。

统计学处理 计量资料用 t 检验进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 麻醉组得普利麻最小用量为2 mL,最大用量为40 mL,首剂平均用量为 (1.1 ± 2.5) mL。注药后30 s,患者进入睡眠状态,停药后3-5 min患者开始苏醒,5-10 min可完全清醒,对答如流。

2.2 结肠镜检查成功率 麻醉组96例中95例完成检查,检查成功率99.0%(95/96),对照组检查成功率95.7%(44/46),麻醉组进镜时间为3-5 min,平均所用时间为 6.4 ± 1.5 min。对照组进镜时间为8-30 min,平均所用时间为 11.5 ± 1.7 min,两组比较各指标均有显著性差异,麻醉组检查成功率明显高于对照组,进镜所需时间少于对照组。

2.3 患者反应 麻醉组99.0%的患者在整个结肠镜操作过程中均能保持安静,所有患者对检查操作无任何知晓,6例述出现梦幻,但无任何不良记忆,极少数患者有轻微的痛苦表情或不自主动作,但稍暂停结肠镜操作1-2 s后患者即恢复安静状态。检查结束后患者的清醒时间为1-12 min,平均为 3.0 ± 1.6 min。约50%的患者在开始能独立行走时有轻度眩晕及无力感,除8例症状持续达5-10 min外,多数症状在5 min内自行消失。对照组患者绝大多数有痛苦表情、叫喊及其他抵抗动作,甚至不能耐受检查。2组均无肠穿孔等并发症。(见表1)。

2.4 血压、心率和动脉血氧饱和度的变化 麻醉组操作过程中均可见一过性血压和心率下降($t_{\text{收缩压}} = 36.909$, $P < 0.01$; $t_{\text{舒张压}} = 25.423$, $P < 0.01$; $t_{\text{心率}} = 4.243$, $P < 0.01$)与检查前比较有显著性差异,但检查结束后又恢复原来水平。对照组检查开始时及检查过程中均有不同程度的血压升高($t_{\text{收缩压}} = 57.470$, $P < 0.01$; $t_{\text{舒张压}} = 35.636$, $P < 0.01$)心率加快($t_{\text{心率}} = 6.132$, $P < 0.01$),与检查后比较有显著性差异,两组操作过程前、中、后的 SpO_2 无显著性差异($t_{\text{麻醉组}} = 1.367$, $P > 0.05$ $t_{\text{对照组}} = 1.061$, $P > 0.05$)。(表2)。

3 讨论

我们的研究结果显示,常规结肠镜检查,是在患者清醒状态下进行的,在操作过程中,因肠管被牵拉、注气导致肠管鼓胀而引起患者疼痛、恶心、呕吐等不适,致患者难以忍受,不能顺利进行结肠镜检查及治疗^[3]。对照组中58%的患者接受检查后不愿意复查,自述“疼痛难以忍受”,疼痛较重能忍受或不能忍受的共占72.8%。麻醉组患者意识短暂消失,无任何痛苦经历,无1例患者表示拒绝再检查。所以得普利麻在结肠镜检查时的镇静镇痛效果是良好的。

由于得普利麻良好的镇痛镇静效果,可使医生在

表1 两组患者在结肠镜检查中的反应

组别	n	安静		痛苦表情		叫喊		抵抗动作	
		n	率(%)	n	率(%)	n	率(%)	n	率(%)
麻醉组	96	95	99.0	3	3.1	0	0.0	1	1.0
对照组	46	12	26.1	34	74.0	19	41.3	9	19.6

表2 两组患者血压、心率和血氧饱和度的变化

组别	n	检查时间	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	心率(次/min)	血氧饱和度(%)
麻醉组	96	检查前	123.1±14.7	76.4±12.6	88.4±19.4	98.8±1.5
		检查中	100.4±14.5	64.2±13.1	76.6±13.2	97.7±2.0
		检查后	117.2±13.9	69.3±11.7	81.3±18.7	98.4±1.3
对照组	46	检查前	120.2±14.1	75.6±12.5	87.5±17.0	98.5±1.1
		检查中	139.2±24.8	86.1±17.9	109.8±18.4	97.8±1.7
		检查后	119.8±14.6	74.2±12.8	96.4±17.8	98.4±1.5

患者较稳定的状态下实施检查诊断与息肉切除术。麻醉后患者安静,肌肉松弛,肠蠕动减弱,尤其对肠扭转,术后肠腹腔粘连的患者最适合,有助于提高确诊率、治愈率及检查成功率,镜检速度可比常规镜检提高一倍。同时,患者心态稳定,消除了恐惧心理,肠管被牵拉的不适感、疼痛感,以及心理紧张带来的血压、心率、脉搏波动,更有助于患者顺利接受治疗。得普利麻具有起效快,持续时间短,恢复快,毒性小的特点,适用于在较短的时间内辅助完成结肠息肉电烧切除术,术后可迅速恢复正常状态。他与芬太尼联合应用可减少各自用量、加强镇痛、提高麻醉效果,减少副作用和不良反应,使麻醉诱导和苏醒更加迅速。

得普利麻对交感神经兴奋有一定的抑制作用,还具有心肌抑制和外周血管扩张作用,使心率减慢,血压下降。我们发现,得普利麻静脉注入后所有患者均有一过性血压下降,心率减慢,但大多数仍保持正常范围,无须特殊处理,操作结束后基本恢复至原来水平。本组伴高血压14例,注射得普利麻后均有不同程度血压下降,这对于不能耐受常规结肠镜检查的高血压患者非常有利。对于基础血压较低的患者注射得普利麻后可能出现血压(包括收缩压和舒张压)低于正常值,但操作过程中血压下降是非常短暂的,只要严密观察即可,无须特殊处理,检查治疗结束后,血压可自行恢复至原来水平。

两组检查治疗均未发生肠道穿孔,但麻醉组因患

者麻醉后反应性降低,故检查时应小心循腔进镜,切忌盲目进镜及使用暴力。

总之,得普利麻静脉麻醉是一种安全有效的麻醉方法,与芬太尼联合使用辅助结肠镜检查并进行结肠息肉电烧切除术是成功的,使结肠镜检查及治疗操作的痛苦下降到最低程度,操作时间缩短,不良反应明显低于传统的结肠镜检查,已经为广大患者所乐于接受,这将有助于进一步提高肠道疾病的早期诊断及早期治疗,值得大力推广。得普利麻静脉注射后可产生不同程度的呼吸抑制,特别是当注射稍快或遇到年老体弱的患者时更可能发生,故应缓慢注射。另外,为确保患者的安全,避免麻醉意外,我们认为实行结肠镜麻醉诊疗术仍需要麻醉科医师密切配合,术中及时检测血压、心率、及血氧饱和度。常备急救用具及药品,并配备术后复苏室,以备可能发生意外的及时处理。

4 参考文献

- 1 Gremse DA, Kumar S, Sacks AI. Conscious sedation with high-dose midazolam for pediatric gastrointestinal endoscopy. *South Med J* 1997;90:821-825
- 2 Diab FH, King PD, Barthel JS, Marshou JB. Efficacy and safety of combined meperidine and midazolam for EGD sedation compared with midazolam alone. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:1120-1125
- 3 张婉雯, 欧阳同伟, 邵晓刚, 何培强, 王敏, 张伟山. 异丙酚静脉麻醉辅助结肠镜检查的应用研究. *中华消化内镜杂志* 2002;19: 333-335

内镜微波与探条扩张联合治疗重度食管贲门狭窄 12 例

陶浩祥

陶浩祥, 余姚市临山医院消化科 浙江省余姚市 315460
项目负责人: 陶浩祥, 315460, 浙江省余姚市临山镇车站西路 60 号, 余姚市临山医院消化科. lsthx@mail.nbptt.zj.cn
电话: 0574-62059239 传真: 0574-62055080
收稿日期: 2004-08-25 接受日期: 2004-09-25

摘要

目的:探讨内镜下微波与探条扩张联合治疗重度食管贲门狭窄的临床疗效。

方法:内镜直视下对 12 例重度食管贲门部狭窄患者, 采用微波烧灼扩大狭窄口后再进行探条扩张治疗, 术后定期随访和检查, 观察患者临床症状缓解与复发以及内镜检查结果。

结果:12 例重度食管贲门狭窄患者经内镜微波与探条扩张联合治疗后, 吞咽困难症状明显缓解, 梗阻解除; 显效 8 例, 占 66.7%, 有效 4 例, 占 33.3%, 总有效率为 100%。治疗后均出现不同程度的黏膜撕裂、擦伤和渗血, 未发生呕血、穿孔、食管气管瘘等严重的并发症。术后随访 1 mo 无病例复发; 随访 2 mo, 有 2 例因食管异物再次梗阻, 经取异物及再次微波与扩张联合治疗后成功解除; 随访 3 mo, 有 5 例出现不同程度的吞咽困难症状。

结论:内镜下微波与探条扩张联合治疗重度食管贲门狭窄是一种简便易行, 临床近期疗效确实可靠的治疗方法。对癌性狭窄疗效难以持久。

陶浩祥. 内镜微波与探条扩张联合治疗重度食管贲门狭窄 12 例. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2509-2510
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2509.asp>

0 引言

2000-10/2003-10 我院采用经内镜微波与探条扩张联合治疗各种重度食管贲门部狭窄患者 12 例^[1], 取得了较好的近期疗效, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 OlympusXQ30 纤维胃镜, OlympusGIF-140 电子胃镜, OlympusFG-17K、FG-45L、FG-46L、FG-8L 异物钳; 江苏产萨氏锥形硅胶扩张器, 共 6 根, 长 85 cm, 导丝长度 220 cm; 南京新技术应用研究所的多功能内镜微波治疗仪, 导线电极等, 均在术前调试, 功能正常。12 例重度食管贲门部狭窄患者, 男 10 例, 女 2 例, 年龄 49-75 岁, 平均年龄 62±1 岁。病程 1 mo-2 a。所有病例均经食管吞钡 X 线拍片和内镜检查确诊。

其中食管癌梗塞性狭窄 5 例, 贲门癌梗塞性狭窄 2 例, 食管癌术后吻合口狭窄 3 例, 贲门癌术后吻合口狭窄 2 例。狭窄程度按 Stooler 分级法^[2-3], 0 级: 能正常进食; 1 级(轻度狭窄): 能进软食, 狭窄口直径大多 >0.8 cm; 2 级(中度狭窄): 仅能进半流质饮食, 狭窄口直径多在 0.6-0.8 cm; 3 级(重度狭窄): 只能进全流质饮食, 狭窄口直径多在 0.3-0.5 cm, 本组 4 例; 4 级(极重度狭窄): 进食全流质饮食有困难或完全不能进食, 狭窄口直径多 <0.2 cm, 本组 8 例。患者表现为进行性吞咽困难, 餐后呕吐, 直到进食流汁困难或完全不能进食。患者多数呈全身衰竭状态, 难以承受手术治疗。治疗前内镜检查有 3 例狭窄口完全闭锁, 组织弹性消失, 糜烂, 肿瘤组织及肉芽组织增生, 其余 9 例均见狭窄口不同程度充血, 肿胀, 糜烂, 瘢痕组织肥厚及肿瘤组织增生。

1.2 方法

1.2.1 术前准备 术前常规 X 线碘油造影摄片了解食管贲门部狭窄情况, 术前 3 d 常规给予抗反流(制酸)、消炎(激素及抗生素)治疗、补液、纠正水电解质失衡等。术前与家属谈话签字, 常规检查血小板计数、出凝血时间。术前 8 h 禁食, 30 min 前肌注 654-2 针 10 mg, 安定针 10 mg。

1.2.2 操作方法^[4] 先行常规内镜检查, 观察并记录狭窄口部位, 了解狭窄程度。如有异物(多为大块食物)堵塞致狭窄口观察不清, 可先用异物钳取出, 同时清除干净周围黏液污秽, 选用合适的针形或柱状微波电极, 将微波同轴导线插入活检孔, 导线电极应超出镜端 2 cm 以上, 伸入至狭窄口内, 接通微波发生器与电极联接电源, 治疗功率调至 50-60 W, 脚踏开关控制, 将电极头部在狭窄内侧缘选 4-6 点依次做烧灼凝固治疗, 每次定时 3-5 s, 多次烧灼致使组织气化变白, 狭窄口内径增大无出血时停止治疗退出微波电极。继之由内镜活检管道放入带弹簧头的导引钢丝, 插入狭窄入口到狭窄处远端 10-15 cm 处, 固定并保留导丝, 退出内镜, 在导丝引导下依次放入直径为 5、7、9、11、12.8、15 mm 的 Savary 锥管探条进行扩张治疗, 术中操作缓慢轻柔, 每次扩张管滞留 3 min 后更换扩张管直到适当为止^[3], 然后将扩张器和导丝一起取出。并常规胃镜检查观察狭窄部位扩张效果及出血情况, 以及远端胃部有无病变情况, 如发现活动出血, 可再行微波止血治疗。

1.2.3 术后处理 术后 4 h 内禁食, 4 h 后可进流汁或半流汁温凉饮食, 同时服用生理盐水、维生素 C 针、地塞米松针和庆大霉素针混合液, 以利局部消炎和消

肿,补液3 d后过渡到正常饮食.常规给予抗反流(制酸)、消炎(激素及抗生素)等治疗^[5],以抑制炎症及瘢痕形成.术后留院观察12-24 h,注意有无食管破裂及出血等并发症.初次治疗后效果不佳者可每周重复治疗1次,直至狭窄解除为止.

2 结果

2.1 疗效标准 根据治疗后狭窄口径增加与吞咽困难症状改善情况判定.显效:管腔直径>12 mm,吞咽困难症状消失;有效:治疗后管腔直径增加4-6 mm或Stooler分级提升2级,吞咽困难症状缓解;无效:治疗后管腔直径无改变,症状无改善,只能进全流汁饮食.

2.2 疗效 12例患者经内镜微波与探条扩张联合治疗2次6例,3次4例,>4次2例.显效8例,占66.7%,有效4例,占33.3%,总有效率为100%.治疗后自觉症状明显改善或消失,产生“解除梗塞”的效应.结果术后随访1 mo,全部病例均无吞咽困难发生;随访2 mo,有2例因食管异物再次梗阻,经取异物及再次微波与扩张联合治疗后成功解除;随访3 mo,有5例出现不同程度的吞咽困难症状.我们对恶性狭窄病例的联合治疗短期内均有效,延长了患者生存期,提高了生活质量;但远期疗效差,提示恶性食管贲门狭窄患者的生存期与食管贲门梗阻缓解程度相一致^[1].

2.3 并发症 12例患者经内镜下治疗后均出现胸骨后不适或隐痛,以及上腹部灼痛,对症治疗1-2 d,症状消失.全部病例治疗后均出现不同程度的黏膜撕裂、擦伤和渗血,3例出现少量黑便2 d,所有病例均未出现呕血、食管穿孔、食管气管瘘及假道形成等严重的并发症.

3 讨论

重度食管贲门狭窄患者因进食困难,全身状况差,导致营养不良.虽然手术可得到较好的疗效,但本组12例患者多不愿手术或已失去手术时机,且手术后吻合口狭窄发生率较高.食管贲门部狭窄的非手术治疗随着内镜治疗技术的普及与设备条件的改进应用日趋广泛.本组病例因狭窄口过小,探条扩张器不易通过,高频和激光穿透力较强,容易引起穿孔,故临床治疗上较为棘手^[6].我院采用微波及探条扩张联合治疗方法,取得较为满意的疗效.微波是一种电磁波,其治疗原理是

利用微波产生的高温凝固效应使局部组织发生变性坏死凝固,产生气化,萎缩而达到治疗目的.微波波长约3 mm,凝固范围为微波天线轴周3 mm,一般无穿孔之虑,对于较长的狭窄段,可逐步“掘进”,且微波本身具有止血作用,治疗过程中很少出血,微波还具有抗肿瘤免疫效应.用微波烧灼扩大狭窄口后再进行探条扩张治疗,使狭窄部位纤维组织轻度撕裂,松懈,最后狭窄解除,吞咽困难得到缓解.此方法具有成功率高,疗效显著,操作简便,安全系数大等优点,但在具体的操作治疗过程中仍应注意以下几点:(1)术前准备:所有病例均常规行X线食管贲门部造影,观察狭窄程度及长度,有无管腔扭曲,有无食管气管瘘口,以防将导丝插入瘘口之中使瘘口扩大,同时观察心肺功能.对于严重心肺疾病,气管内转移明显缺氧以及高龄或体质情况极差应视为禁忌证.(2)术中注意事项:术中应嘱患者深呼吸,防止过度屏气造成缺氧致呼吸心跳骤停.视患者情况给予鼻导管高流量吸氧以及无创心电监护等对症措施.(3)微波治疗时,电极头及微波功率的选择应视不同情况而定,烧灼时间要适当掌握,以避免发生穿孔.(4)探条扩张器的使用应遵循先细后粗的原则,逐渐加大外径,不要跨度太大,狭窄严重者,首次扩张最好不要超过11 cm,可停1-2 wk再次扩张.治疗中力度使用应均匀得当,切忌粗暴用力与过度扩张,严禁将扩张探条在狭窄口部位来回抽动或转动,以防止狭窄口严重撕裂出血.(5)治疗过程中如患者因疼痛较剧以手语表示时,即应停止治疗,并作内镜检查,仔细观察狭窄口情况,并作出及时的对症治疗措施.(6)术后注意事项:探条扩张治疗后,使狭窄部位组织轻度撕裂出血,易致感染,扩张治疗24 h后有30%的患者出现低热及白细胞轻度增高现象,因此术后应常规进行抗生素治疗.除此之外,还应注意并积极治疗术后并发症.

4 参考文献

- 1 陶浩祥.沙氏探条扩张治疗食管贲门狭窄38例分析.浙江临床医学 2004;6:575
- 2 胡运彪.食管贲门狭窄的扩张治疗.内镜 1991;8:15
- 3 杨庆寿.食管贲门癌术后吻合口狭窄扩张术.内镜 1993;10:237
- 4 李益龙,陆星华.消化内镜学.科学出版社,1995:484-488
- 5 柯美云.食管狭窄扩张结合抗返流的远期疗效评价.内镜 1995;12:72
- 6 郭素珍,杨国玲.食管癌及贲门癌术后吻合口狭窄内镜综合治疗.中国内镜杂志 2000;6:73-74

酒精与重症急性胰腺炎的相关性

余贤恩

余贤恩, 百色市人民医院消化科, 广西省百色市 533000
项目负责人: 余贤恩, 533000, 广西百色市人民医院消化科.
电话: 0776-2851303 传真: 0776-2821040
收稿日期: 2004-06-24 接受日期: 2004-09-04

摘要

目的: 探索酒精与重症急性胰腺炎(SAP)的相关性.

方法: 2001-07/2003-12住院急性胰腺炎(AP)患者148例临床资料进行回顾性分析.

结果: 酒精性、胆源性、高脂血症性、其他原因性及未明原因性AP的患病比分别为34.5%, 20.3%, 13.5%, 9.5%及22.3%. 2酒精性AP的Ranson评分 ≥ 3 分, Balthazar CT分级 $\geq D$ 级及死亡的发生率与非酒精性AP的相比具有显著差异($P<0.05$).

结论: 酒精占本地区AP病因的1/3以上; 酒精性AP较非酒精性AP易发展成SAP.

余贤恩. 酒精与重症急性胰腺炎的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(10): 2511-2512
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2511.asp>

0 引言

胆石、酒精、高脂血症、高钙血症、药物、ERCP、创伤、手术等多种原因可导致急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)^[1]. 大多数患者的临床表现为轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP), 但约20%的患者发展为重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP). 哪些因素更易导致SAP呢? 肥胖可能是AP时早期独立的预后因素, 其易导致SAP的发生^[2-3]. 酒精性胰腺炎易发展为坏死性胰腺炎而较多地需要人工辅助呼吸^[4]. 我们

探索本地区的各种病因与重症急性胰腺炎的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2001-07/2003-12收治的AP患者148例. 按病因分为酒精组、胆石组、高脂血症组、其他原因组及病因未明. AP、MAP及SAP的诊断标准参照“中国急性胰腺炎诊治指南(草案)”^[5].

1.2 方法 记录各组的Ranson ≥ 3 分例数, Balthazar CT $\geq D$ 级例数, 外科手术例数及死亡例数. 酒精性AP组与非酒精性AP组间资料进行 χ^2 检验($P<0.05$ 为显著性差异), 并进行病因与SAP之间联系强度的OR及95%可信区间(CI)分析. 此外, 对高脂血症组AP与除酒精组之外的AP资料进行 χ^2 检验.

2 结果

在148例AP患者中, 男125例, 女23例. 以中青年男性为多, 但胆源性AP的患者年龄较其他组患者的年龄为高. 所有AP患者中, 酒精性AP为51例(占34.5%), 胆源性AP为30例(占20.3%), 高脂血症性AP为20例(占13.5%), 其他原因性AP为14例(占9.5%), 未明原因性AP为33例(占22.3%). AP的病因学分组、各组平均年龄及严重情况(见表1).

3 讨论

近年来, AP的发病率有所上升, 这与人们的生活习惯改变有关. 临床上大多数AP为MAP, 但约20%发展为SAP. 按Ranson评分 ≥ 3 分计算, 本研究中SAP为30例, 占24.3%; 按Balthazar CT分级 $\geq D$ 级计算, 148例中SAP为31例, 占20.9%.

胆石、酒精、高脂血症、高钙血症、药物、创伤、手术等多种病因可导致AP^[1]. 本研究显示, 148例

表1 急性胰腺炎148例的病因、年龄及严重程度

项目	酒精(n=51)	胆石(n=30)	高脂血症(n=20)	其他(n=14)	未明(n=33)
年龄/岁	39.0 \pm 8.5	52.5 \pm 16.4	40.2 \pm 5.1	46.6 \pm 18.6	34.0 \pm 17.0
Ranson 评分 ≥ 3	18 (35.3%)	6 (20.0%)	5 (25.0%)	0	7 (21.2%)
Balthazar CT 分级 $\geq D$ 级	16 (31.4%)	3 (10.0%)	4 (20.0%)	1 (7.1%)	7 (21.2%)
外科手术例数	6 (11.8%)	1 (3.3%)	0	0	2 (6.1%)
死亡例数	6 (11.8%)	0	1 (5.0%)	0	1 (3.0%)

* $P<0.05$ vs 非酒精性AP.

AP中酒精性、胆源性、高脂血症性、其他原因性、未明原因性AP的病例数分别为51例(34.5%), 30例(20.3%), 20例(13.5%), 14例(9.5%)及33例(22.3%)。表明酒精是引起AP的最重要因素^[6], 已占本地区AP病因的1/3以上。这与本地区的少数民族人们经常饮酒有关, 而且近年来嗜酒的人数逐年增加, 且常见有酗酒者。此外, 胆石、高脂血症也是引起AP的重要因素, 患病率分别达20.3%及13.5%。本研究中未明原因AP占22.3%, 考虑部分可能是胆道显微结石及病毒感染所致^[6-7]。

Lankisch *et al*^[4]研究表明, 酒精性AP最易发展成为坏死性AP而较多地需要人工辅助呼吸。Andersson *et al*^[9]报道, 在院外死于AP的36例患者中, 27例与酒精有关。唐承薇^[10]指出, 酒精所致的急性胰腺炎的病例中, 急性重症胰腺炎的比例较高。本研究显示, 酒精性AP组的Ranson评分 ≥ 3 分、Balthazar CT分级 $\geq D$ 级及死亡等病例数均较非酒精性AP组的高($P < 0.05$), 具有显著性差异, 且 P 值均大于1。表明, 酒精性AP较非酒精性AP易发展成SAP, 酒精与SAP为正关联, 即酒精使发生SAP的危险度增加。本研究提示, 在临床工作中, 对酒精性AP要警惕其发展成SAP, 特别是对酗酒及长期嗜酒的AP患者要高度警惕, 积极采取各种综合方法进行处理, 尽量减少发生不良后果。

Martinez *et al*^[2]研究表明, 中心性肥胖是急性胰腺炎重症化的预后指标。龚自华 *et al*^[3]研究也表明, 肥胖可能是AP时早期独立的预后因素, 其易导致SAP。吴

郁珍^[8]报道三酰甘油/高密度脂蛋白胆固醇比值与急性胰腺炎严重程度之间显示了很强的相关性^[8]。肥胖几乎均伴有高脂血症, 高脂血症是导致AP的重要原因。但本研究显示, 除酒精外, 高脂血症引起的SAP的发生率与别组的AP比较, 无差异($P > 0.05$)。

总之, 我们的研究显示, 酒精占本地区AP病因的1/3以上, 而且酒精性AP较非酒精性AP易发展成为SAP, 即酒精使发生SAP的危险度明显增加。

4 参考文献

- 1 Bank S, Indaram A. Causes of acute and recurrent pancreatitis: clinical considerations and clues to diagnosis. *Gastroenterol Clin North Am* 1999;28:571-589
- 2 Martinez J, Sanchez-Paya J, Palazon JM, Aparicio JR, Pico A, Perez-Mateo M. Obesity: a prognostic factor of severity in acute pancreatitis. *Pancreas* 1999;19:15-20
- 3 龚自华, 王兴鹏, 张汝玲, 董育伟, 吴丽颖, 吴恺. 肥胖为急性胰腺炎患者早期独立的预后指标. *胰腺病学* 2001;1:21-23
- 4 Lankisch PG, Assmus C, Pflichthofer D, Struckmann K, Lehnick D. Which etiology causes the most severe acute pancreatitis? *International J Pancreatol* 1999;26:55-57
- 5 王兴鹏. 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). *中华消化杂志* 2004;24:190-192
- 6 杨冬华. 胰腺炎病因研究现状. *中华消化杂志* 2003;23:517-518
- 7 高普均, 朴云峰, 夏宇欧. 1007例急性胰腺炎病因分析. *临床消化病杂志* 2003;15:150-151
- 8 吴郁珍. 甘油三酯/高密度脂蛋白胆固醇比值在重症急性胰腺炎诊断中的价值. *中华急诊医学杂志* 2003;12:626-627
- 9 Andersson R, Andren-Sandberg A. Fatal acute pancreatitis. Characteristics of patients never reaching hospital. *Pancreatol* 2003;3:64-66
- 10 唐承薇. 酒精与胰腺疾病. *胰腺病学* 2003;3:127-128

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 •

慢性肝病患者血清中可溶性细胞间黏附分子-1, 可溶性P-选择素的检测及临床意义探讨

王燕, 李丽滨, 周力

王燕, 李丽滨, 周力, 贵阳医学院附属医院消化内科
贵州省贵阳市 550001

项目负责人: 王燕, 550001, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院消化内科.
电话: 0851-6855119-3026

收稿日期: 2004-07-26 接受日期: 2004-08-30

摘要

目的: 研究检测血清中可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)和可溶性P-选择素(sP-selectin)水平在慢性肝病病情判

断, 疗效观察及预后估计等方面的临床意义。

方法: 肝炎后肝硬化34例, 男24例, 女10例; 原发性肝癌21例, 男18例, 女3例; 正常对照20例, 男女各10例。静脉采血, 离心取上清, -20°C 冰箱保存。酶联免疫法(ELISA)检测sICAM-1, sP-selectin水平。

结果: 肝炎后肝硬化, 原发性肝癌患者血清sICAM-1明显

AP中酒精性、胆源性、高脂血症性、其他原因性、未明原因性AP的病例数分别为51例(34.5%), 30例(20.3%), 20例(13.5%), 14例(9.5%)及33例(22.3%)。表明酒精是引起AP的最重要因素^[6], 已占本地区AP病因的1/3以上。这与本地区的少数民族人们经常饮酒有关, 而且近年来嗜酒的人数逐年增加, 且常见有酗酒者。此外, 胆石、高脂血症也是引起AP的重要因素, 患病率分别达20.3%及13.5%。本研究中未明原因AP占22.3%, 考虑部分可能是胆道显微结石及病毒感染所致^[6-7]。

Lankisch *et al*^[4]研究表明, 酒精性AP最易发展成为坏死性AP而较多地需要人工辅助呼吸。Andersson *et al*^[9]报道, 在院外死于AP的36例患者中, 27例与酒精有关。唐承薇^[10]指出, 酒精所致的急性胰腺炎的病例中, 急性重症胰腺炎的比例较高。本研究显示, 酒精性AP组的Ranson评分 ≥ 3 分、Balthazar CT分级 $\geq D$ 级及死亡等病例数均较非酒精性AP组的高($P < 0.05$), 具有显著性差异, 且 P 值均大于1。表明, 酒精性AP较非酒精性AP易发展成SAP, 酒精与SAP为正关联, 即酒精使发生SAP的危险度增加。本研究提示, 在临床工作中, 对酒精性AP要警惕其发展成SAP, 特别是对酗酒及长期嗜酒的AP患者要高度警惕, 积极采取各种综合方法进行处理, 尽量减少发生不良后果。

Martinez *et al*^[2]研究表明, 中心性肥胖是急性胰腺炎重症化的预后指标。龚自华 *et al*^[3]研究也表明, 肥胖可能是AP时早期独立的预后因素, 其易导致SAP。吴

郁珍^[8]报道三酰甘油/高密度脂蛋白胆固醇比值与急性胰腺炎严重程度之间显示了很强的相关性^[8]。肥胖几乎均伴有高脂血症, 高脂血症是导致AP的重要原因。但本研究显示, 除酒精外, 高脂血症引起的SAP的发生率与别组的AP比较, 无差异($P > 0.05$)。

总之, 我们的研究显示, 酒精占本地区AP病因的1/3以上, 而且酒精性AP较非酒精性AP易发展成为SAP, 即酒精使发生SAP的危险度明显增加。

4 参考文献

- 1 Bank S, Indaram A. Causes of acute and recurrent pancreatitis: clinical considerations and clues to diagnosis. *Gastroenterol Clin North Am* 1999;28:571-589
- 2 Martinez J, Sanchez-Paya J, Palazon JM, Aparicio JR, Pico A, Perez-Mateo M. Obesity: a prognostic factor of severity in acute pancreatitis. *Pancreas* 1999;19:15-20
- 3 龚自华, 王兴鹏, 张汝玲, 董育伟, 吴丽颖, 吴恺. 肥胖为急性胰腺炎患者早期独立的预后指标. *胰腺病学* 2001;1:21-23
- 4 Lankisch PG, Assmus C, Pflichthofer D, Struckmann K, Lehnick D. Which etiology causes the most severe acute pancreatitis? *International J Pancreatol* 1999;26:55-57
- 5 王兴鹏. 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). *中华消化杂志* 2004;24:190-192
- 6 杨冬华. 胰腺炎病因研究现状. *中华消化杂志* 2003;23:517-518
- 7 高普均, 朴云峰, 夏宇欧. 1007例急性胰腺炎病因分析. *临床消化病杂志* 2003;15:150-151
- 8 吴郁珍. 甘油三脂/高密度脂蛋白胆固醇比值在重症急性胰腺炎诊断中的价值. *中华急诊医学杂志* 2003;12:626-627
- 9 Andersson R, Andren-Sandberg A. Fatal acute pancreatitis. Characteristics of patients never reaching hospital. *Pancreatol* 2003;3:64-66
- 10 唐承薇. 酒精与胰腺疾病. *胰腺病学* 2003;3:127-128

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 •

慢性肝病患者血清中可溶性细胞间黏附分子-1, 可溶性P-选择素的检测及临床意义探讨

王燕, 李丽滨, 周力

王燕, 李丽滨, 周力, 贵阳医学院附属医院消化内科
贵州省贵阳市 550001

项目负责人: 王燕, 550001, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院消化内科.
电话: 0851-6855119-3026

收稿日期: 2004-07-26 接受日期: 2004-08-30

摘要

目的: 研究检测血清中可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)和可溶性P-选择素(sP-selectin)水平在慢性肝病病情判

断, 疗效观察及预后估计等方面的临床意义。

方法: 肝炎后肝硬化34例, 男24例, 女10例; 原发性肝癌21例, 男18例, 女3例; 正常对照20例, 男女各10例。静脉采血, 离心取上清, -20°C 冰箱保存。酶联免疫法(ELISA)检测sICAM-1, sP-selectin水平。

结果: 肝炎后肝硬化, 原发性肝癌患者血清sICAM-1明显

高于正常对照(分别为 $1\ 131.2 \pm 76.2$, $1\ 315.0 \pm 81.5$ vs 336.1 ± 44.8 , $t=2.16$, $P=0.008<0.01$); 肝炎后肝硬化, 原发性肝癌患者血清sP-selectin明显高于正常对照(分别为 46.6 ± 6.9 , 127.3 ± 19.7 vs 21.3 ± 7.4 , $t=2.26$, $P=0.006<0.01$); 原发性肝癌化学栓塞介入治疗前后 sICAM-1, sP-selectin 含量变化有显著性差异(分别为 $1\ 315 \pm 81.5$ vs $1\ 190.2 \pm 40.1$, $t=2.34$, $P=0.008<0.01$; 127.3 ± 19.7 vs 65.2 ± 8.0 , $t=2.36$, $P=0.03<0.05$). sICAM-1 与 sP-selectin 呈正相关($r=0.8820$, $P<0.0478$). sICAM-1, sP-selectin 与甲胎球蛋白(AFP)无相关性。

结论: 慢性肝病患者血清sICAM-1, sP-selectin可以在一定程度上反映慢性肝病的炎症反应程度, 肝损伤以及肿瘤负荷情况。

王燕, 李丽滨, 周力. 慢性肝病患者血清中可溶性细胞间黏附分子-1, 可溶性P-选择素的检测及临床意义探讨. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2512-2514 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2512.asp>

0 引言

近年研究表明, 肝脏疾病的发生与黏附分子介导的免疫损伤及炎症反应, 肿瘤免疫逃避机制有关, 我们通过检测细胞间黏附分子-1 及 P-选择素在肝炎后肝硬化, 肝细胞肝癌(HCC)患者血清中含量, 旨在评价二者在慢性肝病的病情判断, 疗效观察及预后估计等方面意义。

1 材料和方法

1.1 材料 肝炎后肝硬化34例来源于贵医附院消化科及感染科, 男24例, 女10例, 年龄32-78(平均58岁); 21例HCC来源于贵医附院消化科及介入科, 男18例, 女3例, 年龄34-76岁(平均56岁); 20名正常对照标本来源于贵医附院体检中心, 男女各10名, 年龄30-70岁(平均54岁)。肝硬化诊断标准符合中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学分会联合修订的病毒肝炎防治方案^[1], HCC诊断标准符合HCC的临床诊断与分期标准^[2], 且均有乙肝病史, 均为AFP阳性的HCC。静脉采血, 离心取上清, $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 方法 sICAM-1, sP-selectin 检测采用酶联免疫吸附法(ELISA), 试剂盒购于深圳晶美生物制品公司, 按说明书操作。

统计学处理 采用SPSS 11.0统计学软件包, 方差分析及相关性分析。

2 结果

2.1 血清 sICAM-1 肝炎后肝硬化患者血清 sICAM-1 水平为 $1\ 131.2 \pm 76.2$ ug/L, HCC治疗前患者血清 sICAM-1 水平为 $1\ 315.0 \pm 81.5$ ug/L, HCC治疗后患者血清 sICAM-1 水平为 $1\ 190.2 \pm 40.1$ ug/L, 正常对照血清 sICAM-1 水平为 336.1 ± 44.8 ug/L($P<0.01$, $P<0.05$)(表1)。

2.2 血清 sP-selectin 肝炎后肝硬化患者血清 sP-selectin 水平为 46.6 ± 6.9 ug/L, HCC患者血清治疗前 sP-selectin 水平为 127.3 ± 10.7 ug/L, HCC患者治疗后血清 sP-selectin 水平为 65.2 ± 8.0 ug/L, 正常对照血清为 21.3 ± 7.4 ug/L($P<0.01$, $P<0.05$)(表1)。

表1 肝炎后肝硬化, HCC治疗前后 sICAM-1, sP-selectin 水平 (mean \pm SD, ug/L)

分组	n	sICAM-1	SP-selectin
正常对照	20	336.1 ± 44.8	21.3 ± 7.4
肝炎后肝硬化	34	$1\ 131.2 \pm 76.2^b$	46.6 ± 6.9^d
原发性肝癌治疗后	21	$1\ 190.2 \pm 40.1$	65.2 ± 8.0
原发性肝癌治疗前	21	$1\ 315.0 \pm 81.5^{bh}$	127.3 ± 19.7^{ad}

^b $P<0.01$, ^d $P<0.01$ 肝炎后肝硬化组 vs 对照组; ⁱ $P<0.01$, ^h $P<0.01$ HCC治疗前 vs 对照组; ⁱ $P<0.05$, ^k $P<0.05$ HCC治疗前 vs HCC治疗后。

2.3 相关性 sICAM-1 与 sP-selectin 呈正相关(对数变换的相关检验概率 $P=0.0478$, 均数的相关系数 $r=0.882$, $t=3.2414$)。sICAM-1, sP-selectin 与甲胎球蛋白(AFP)无相关性($r=0.0132$, $P<0.05$)。

3 讨论

ICAM-1 表达与储脂细胞(HSC)活化有关, 在肝纤维化形成中起重要作用^[3]。血清sP-selectin增加是血小板和内皮细胞活化或破坏的标志^[4]。由于肝硬化患者存在血小板功能异常, 使血清中sP-selectin升高。本资料显示肝炎后肝硬化患者 sICAM-1 较正常对照显著性增高($P<0.05$), 肝炎后肝硬化 sP-selectin 含量较正常对照明显增高($P<0.01$)。正常肝组织中肝细胞无 ICAM-1 抗原表达, 而在 HCC 组织中表达增强^[3]。肝癌细胞的 ICAM-1 表达是由于肝细胞的恶性转化所诱导并释放入血, 这可能代表 HCC 的一种免疫逃避机制, 即通过 sICAM-1 封闭白细胞膜的 LFA-1, 避免为免疫系统识别杀伤。HCC 血清 P-selectin 增高可能由于 HCC 体内强烈的炎症反应和肝癌细胞的异常代谢产物使血小板与内皮细胞大量被激活, 产生大量 P-selectin 所致^[5]。本资料显示, HCC 患者介入治疗前血浆 sICAM-1, sP-selectin 水平明显高于对照组, 有显著性差异($P<0.01$)。这可能与 HCC 患者有较强的炎症反应, 内皮细胞等受到由肿瘤细胞分泌的某些细胞因子(IL-1, TNF)及血管通透因子的刺激有关。介入治疗后 2 wk sICAM-1, sP-selectin 水平下降明显($P<0.05$), 但仍然高于正常对照组($P<0.05$)。可能是因为介入化学栓塞治疗后, 瘤体血供受阻, 使肿瘤病灶缺血坏死以及化疗使肿瘤负荷减少, 肿瘤细胞分泌的异常代谢产物有所减少, 但炎症反应及肿瘤细胞的异常代谢产物一定程度上仍旧存在。sICAM-1 与 sP-selectin 含量呈正相关关系($r=0.882$, $P=0.0478$)。本研

究表明 HCC 患者血清 sICAM-1 与 sP-selectin 水平与肿瘤负荷有关, 提示临床上动态观察血清 sICAM-1, sP-selectin 水平对病情判断、疗效观察、肿瘤复发、预后估计有一定价值。

本研究还显示 sICAM-1, sP-selectin 与 AFP 无明显相关性。虽然 AFP 是 HCC 诊断的一个特异性指标, 而 sICAM-1, sP-selectin 与 AFP 统计学分析无明显相关性, 可能与他们在释放的调控上不一致有关。我们的结果显示, HCC 组 sICAM-1, sP-selectin 含量与肝炎后肝硬化组比较差异显著, 但其中肝硬化肝功能 ChildC 级组 sICAM-1 含量与 HCC 组含量差异无显著性 ($P>0.05$)。一方面可能与样本量少有关, 需扩大样本量进一步观察; 另一方面需追踪观察, 是否这一部份 sICAM-1 含量与

肝癌组含量差异无显著性患者发生肝癌转归的概率高于其他患者。如果是这样, sICAM-1, sP-selectin 有可能成为 HCC 诊断的辅助性肿瘤标志物, 特别是对于 AFP 阴性的 HCC 的诊断。

4 参考文献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000;8:324-329
- 2 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准. 中华肝脏病杂志 2001;9:324
- 3 潘勤, 李定国. 细胞间黏附分子-1 与慢性肝病. 临床消化病杂志 2002;14:272-273
- 4 胡美茹, 于清宏, 沈倍奋. 选择素家族的分布及生物学功能研究进展. 免疫学杂志 2001;17:143-145
- 5 官成浓, 梁启廉, 谢杰荣, 银正民, 徐军发. 血浆可溶性 P-选择素的检测及临床意义. 肿瘤杂志 2002;22:145-146

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 •

老年十二指肠溃疡患者夜间酸突破现象治疗方案研究

李 聪, 姜 铀, 姜妙娜, 张善红, 李艳静, 姜春萌, 贾玉杰

李聪, 大连医科大学病理生理教研室 辽宁省大连市 116027
姜铀, 姜妙娜, 张善红, 李艳静, 姜春萌, 贾玉杰, 大连医科大学 116027
项目负责人: 李聪, 116027, 辽宁省大连市, 大连医科大学病理生理教研室.
lcsdzjs@online.ln.cn
收稿日期: 2004-07-30 接受日期: 2004-09-09

摘要

目的: 观察老年十二指肠溃疡患者夜间酸突破(nocturnal acid breakthrough NAB)现象及其与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)之间的关系, 探讨不同治疗方案的疗效。

方法: 将老年十二指肠溃疡患者32例随机分为四组, 每组8例, A组: 口服奥美拉唑 20 mg/次; 2次/d, 法莫替丁 20 mg 睡前口服; B组: 口服奥美拉唑 20 mg/次; 2次/d; C组: 口服奥美拉唑 20 mg/次, 1次/d; 法莫替丁 20 mg 睡前口服; D组: 口服奥美拉唑 20 mg, 1次/d。以上病例均用药5 d, 于第5 d早上8时起连续24 h监测其胃内pH值, 同时检测Hp。

结果: 发生NAB者: A组0例, B组1例12.5%, C组1例12.5%, D组5例62.5%; A、B、C组NAB发生率均显著低于D组 ($P<0.05$); 8例Hp阴性者中4例(50%)发生NAB, 24例Hp阳性者中3例(12.5%)发生NAB, 二者比较有显著性差异 ($P<0.05$)。四组患者的平均胃内pH值、平均中位pH值、夜间平均胃内pH值和夜间平均中位pH值比较, A组显著高于其他各组 ($P=0.02<0.05$ vs B, C组, $P=0.005<0.01$ vs D组); B组与C组明显高于D组, B、C

组之间无显著性差异。A组pH值 <4.0 的时间占总检测时间的百分比、夜间pH值 <4.0 的时间占夜间检测时间的百分比均显著低于其他各组 ($P=0.005<0.01$), 而B组与C组明显低于D组 ($P<0.05=0.03$), B、C组之间无统计学差异; D组明显高于其他各组 ($P=0.02<0.05$)。

结论: 老年十二指肠溃疡患者单用奥美拉唑治疗多发生NAB, 改变奥美拉唑用药方式、剂量; 联用高舒达可降低NAB的发生率。

李聪, 姜铀, 姜妙娜, 张善红, 李艳静, 姜春萌, 贾玉杰. 老年十二指肠溃疡患者夜间酸突破现象治疗方案研究. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2514-2517
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2514.asp>

0 引言

夜间酸突破现象(nocturnal acid breakthrough, NAB)是指在应用质子泵抑制(PPD)的情况下, 夜间(当晚22时至次日早上8:00)胃内pH值小于4.0的时间持续超过60 min。其与消化性溃疡、反流性食管炎(GERD)、糜烂性食管炎、Barrett's食管等酸相关性疾病密切相关。同时, NAB的发生还与Hp (*Helicobacter pylori*) 的感染有着密切的相关性, 国内外均有关于NAB发生情况的相关研究^[1-3]。但对于老年患者尚缺乏这一方面的详细报道。为此我们对老年十二指肠溃疡患者不同的给药方式对其造成的不同影响、及其与幽门螺杆菌感染的关系进行探讨。

究表明 HCC 患者血清 sICAM-1 与 sP-selectin 水平与肿瘤负荷有关,提示临床上动态观察血清 sICAM-1, sP-selectin 水平对病情判断、疗效观察、肿瘤复发、预后估计有一定价值。

本研究还显示 sICAM-1, sP-selectin 与 AFP 无明显相关性。虽然 AFP 是 HCC 诊断的一个特异性指标,而 sICAM-1, sP-selectin 与 AFP 统计学分析无明显相关性,可能与他们在释放的调控上不一致有关。我们的结果显示, HCC 组 sICAM-1, sP-selectin 含量与肝炎后肝硬化组比较差异显著,但其中肝硬化肝功能 ChildC 级组 sICAM-1 含量与 HCC 组含量差异无显著性($P>0.05$)。一方面可能与样本量少有关,需扩大样本量进一步观察;另一方面需追踪观察,是否这一部份 sICAM-1 含量与

肝癌组含量差异无显著性患者发生肝癌转归的概率高于其他患者。如果是这样, sICAM-1, sP-selectin 有可能成为 HCC 诊断的辅助性肿瘤标志物,特别是对于 AFP 阴性的 HCC 的诊断。

4 参考文献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000;8:324-329
- 2 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准. 中华肝脏病杂志 2001;9:324
- 3 潘勤, 李定国. 细胞间黏附分子-1 与慢性肝病. 临床消化病杂志 2002;14:272-273
- 4 胡美茹, 于清宏, 沈倍奋. 选择素家族的分布及生物学功能研究进展. 免疫学杂志 2001;17:143-145
- 5 官成浓, 梁启廉, 谢杰荣, 银正民, 徐军发. 血浆可溶性 P-选择素的检测及临床意义. 肿瘤杂志 2002;22:145-146

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 •

老年十二指肠溃疡患者夜间酸突破现象治疗方案研究

李 聪, 姜 铀, 姜妙娜, 张善红, 李艳静, 姜春萌, 贾玉杰

李聪, 大连医科大学病理生理教研室 辽宁省大连市 116027
姜铀, 姜妙娜, 张善红, 李艳静, 姜春萌, 贾玉杰, 大连医科大学 116027
项目负责人: 李聪, 116027, 辽宁省大连市, 大连医科大学病理生理教研室.
lcsdzjs@online.ln.cn
收稿日期: 2004-07-30 接受日期: 2004-09-09

摘要

目的: 观察老年十二指肠溃疡患者夜间酸突破(nocturnal acid breakthrough NAB)现象及其与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)之间的关系, 探讨不同治疗方案的疗效。

方法: 将老年十二指肠溃疡患者32例随机分为四组, 每组8例, A组: 口服奥美拉唑 20 mg/次; 2次/d, 法莫替丁 20 mg 睡前口服; B组: 口服奥美拉唑 20 mg/次; 2次/d; C组: 口服奥美拉唑 20 mg/次, 1次/d; 法莫替丁 20 mg 睡前口服; D组: 口服奥美拉唑 20 mg, 1次/d。以上病例均用药5 d, 于第5 d早上8时起连续24 h监测其胃内pH值, 同时检测Hp。

结果: 发生NAB者: A组0例, B组1例12.5%, C组1例12.5%, D组5例62.5%; A、B、C组NAB发生率均显著低于D组($P<0.05$); 8例Hp阴性者中4例(50%)发生NAB, 24例Hp阳性者中3例(12.5%)发生NAB, 二者比较有显著性差异($P<0.05$)。四组患者的平均胃内pH值、平均中位pH值、夜间平均胃内pH值和夜间平均中位pH值比较, A组显著高于其他各组($P=0.02<0.05$ vs B, C组, $P=0.005<0.01$ vs D组); B组与C组明显高于D组, B、C

组之间无显著性差异。A组pH值 <4.0 的时间占总检测时间的百分比、夜间pH值 <4.0 的时间占夜间检测时间的百分比均显著低于其他各组($P=0.005<0.01$), 而B组与C组明显低于D组($P<0.05=0.03$), B、C组之间无统计学差异; D组明显高于其他各组($P=0.02<0.05$)。

结论: 老年十二指肠溃疡患者单用奥美拉唑治疗多发生NAB, 改变奥美拉唑用药方式、剂量; 联用高舒达可降低NAB的发生率。

李聪, 姜铀, 姜妙娜, 张善红, 李艳静, 姜春萌, 贾玉杰. 老年十二指肠溃疡患者夜间酸突破现象治疗方案研究. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2514-2517
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2514.asp>

0 引言

夜间酸突破现象(nocturnal acid breakthrough, NAB)是指在应用质子泵抑制(PPD)的情况下, 夜间(当晚22时至次日早上8:00)胃内pH值小于4.0的时间持续超过60 min。其与消化性溃疡、反流性食管炎(GERD)、糜烂性食管炎、Barrett's食管等酸相关性疾病密切相关。同时, NAB的发生还与Hp(*Helicobacter pylori*)的感染有着密切的相关性, 国内外均有关于NAB发生情况的相关研究^[1-3]。但对于老年患者尚缺乏这一方面的详细报道。为此我们对老年十二指肠溃疡患者不同的给药方式对其造成的不同影响、及其与幽门螺杆菌感染的关系进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-01/2003-04 就诊于消化科的老年患者,按就诊的先后顺序随机分为四组,其中男 19 例,女 13 例,平均年龄为(66.1±4.9 岁),四组患者的年龄、性别、身高、体重、症状积分、*Hp*感染相比,差异无显著性。其中 *Hp*感染阳性的诊断指标为快速尿素酶试验、¹⁴C 呼气试验检查均为阳性(表 1)。药品:奥美拉唑为 AstraZeneca 公司生产(商品名:洛赛克),法莫替丁为山之内公司生产(商品名:高舒达)。

表 1 病例资料一览表

	年龄 (mean±SD)	性别		体重(kg)	<i>Hp</i> (n)	症状积分
		男	女			
A 组	66±2.1	5	3	61.1±7.1	6	3.3±0.6
B 组	68±3.1	4	4	60.7±5.5	5	3.6±0.4
C 组	65±3.5	6	2	56.7±3.4	7	3.9±0.2
D 组	67±4.2	4	4	59.9±5.3	6	3.0±0.3

各组间比较均, $P>0.05$ 。

1.2 方法

1.2.1 用药 A 组:口服奥美拉唑 20 mg/次, 2 次/d, 晨空腹及晚睡前口服;并法莫替丁 20 mg 睡前口服; B 组:口服奥美拉唑 20 mg/次, 2 次/d;晨空腹及晚睡前口服; C 组:口服奥美拉唑 20 mg/次, 1 次/d, 晨空腹口服;并法莫替丁 20 mg 睡前口服; D 组:奥美拉唑 20 mg/次, 1 次/d;晨空腹口服。所有患者均于早上 7:00 及晚 8:00 用药,不再用其他影响胃酸分泌的药物。统一订餐,规律饮食,同时要求禁烟酒等不良生活习惯。以上病例均连续用药 5 d,并于第 5 d 早上 8:00 起连续 24 h 监测其胃内 pH 值。

1.2.2 胃内 pH 值监测 采用便携式连续 24 h 胃内 pH 监测仪(瑞典 CTD 公司),定标,服药患者均于第 5 d 早上服药后,8:00 插入 pH 值监测电极,深度为 55 cm,监测期间患者的起居和活动不受限制。24 h 后记录完毕,拔除 pH 监测电极,计算机读取数据。数据采用专业 Esophogram 5.7C2 软件进行分析。计数资料采用方差分析检验。

2 结果

2.1 NAB 的发生情况(表 2,图 1)。

表 2 NAB 的发生情况

	A 组	B 组	C 组	D 组
NAB 发生率(%)	0	8(1 例)	8(1 例)	8(5 例) ^b

^b $P<0.01$, D 组 vs A, B, C 组。

从典型病例的 24 h 胃内 pH 图谱中可以直观地看到

这一结果。A 组显示 24 h 胃内 pH 持续控制在 6 以上,抑酸效果非常稳定持久。B 组可以有效控制 pH 在 4 以上,夜间 pH<4(凌晨 4:30)的时间<1 h。但 pH 波动较 A 组大。C 组 pH 值波动较大,夜间 pH 值控制稳定。D 组夜间 pH<4 的时间持续达 5 h。有明显的 NAB 发生。

2.2 胃内平均 pH 值的变化 夜间加用一次奥美拉唑或加用一次法莫替丁,此两种方法提高平均 pH 值的效果基本相同,而夜间加用奥美拉唑和法莫替丁提高平均 pH 值的效果,优于二者单独加用(表 3)。

表 3 胃内平均 pH 值各项指标的变化

	A 组	B 组	C 组	D 组
平均胃内 pH 值	7.11±0.22 ^b	5.41±0.21 ^c	5.39±0.57 ^c	4.20±0.61
平均中位 pH 值	7.19±0.43 ^b	5.07±0.55 ^c	4.81±0.35 ^c	4.19±0.61
夜间平均胃内 pH 值	7.33±0.59 ^b	5.41±0.24 ^c	5.30±0.41 ^c	4.40±0.74
夜间平均中位 pH 值	7.41±0.37 ^b	5.39±0.27 ^c	5.24±0.52 ^c	4.16±0.76

^b $P<0.01$ vs D 组, ^c $P<0.05$ vs A 组, ^e $P<0.05$ vs D 组。

2.3 pH<4 的时间比例(表 4)。

表 4 各组胃内 pH 值<4 的时间百分比

	A 组	B 组	C 组	D 组
pH 值<4.0 的时间 %	7.91±3.11 ^b	15.72±4.01 ^c	16.47±3.27 ^c	29.97±4.70
夜间 pH 值<4.0 的时间 %	1.84±1.23 ^b	7.76±5.51 ^c	10.05±8.76 ^c	33.69±5.77

^b $P<0.01$ vs D 组, ^c $P<0.05$ vs A 组, ^e $P<0.05$ vs D 组。

D 组 pH<4.0 的时间占整个监测时间的百分数、夜间 pH<4.0 的时间占夜间检测时间的百分数明显高于其他各组($P<0.05$),即发生酸突破的机会大于其他各组。

2.4 *Hp* 与 NAB 发生的关系趋势 在 32 例老年患者中,有 8 例 *Hp* 阴性,其中 4 例发生 NAB,占 50%;而 24 例 *Hp* 阳性者只有 3 例发生 NAB,仅占 12.5%;二者相比有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

NAB 的存在与消化性溃疡、反流性食管炎(GERD)、Barrett's 食管等酸相关性疾病的症状及疗效密切相关^[1]。美国学者报道 NAB 在口服奥美拉唑 20 mg/次, 1 次/d 时发生率高达 90%, 2 次/d 时发生率也达 69-74%;而在日本,有 39% 的正常人发生 NAB^[1]。广州学者的报道用奥美拉唑 20 mg/次, 1 次/d 时 NAB 的发生率为 62.5%^[2]。我们的研究对象为老年患者亦与上述结果相似,但远低于欧美。造成种族差异的原因可能是多因素的。

3.1 *Hp* 感染影响 NAB 的发生 *Hp* 感染在影响 NAB 发生中可能起重要作用,因为 *Hp* 感染可以增强质子泵抑制剂(PPI)的抑酸效果,中国、日本等东亚人的 *Hp* 感

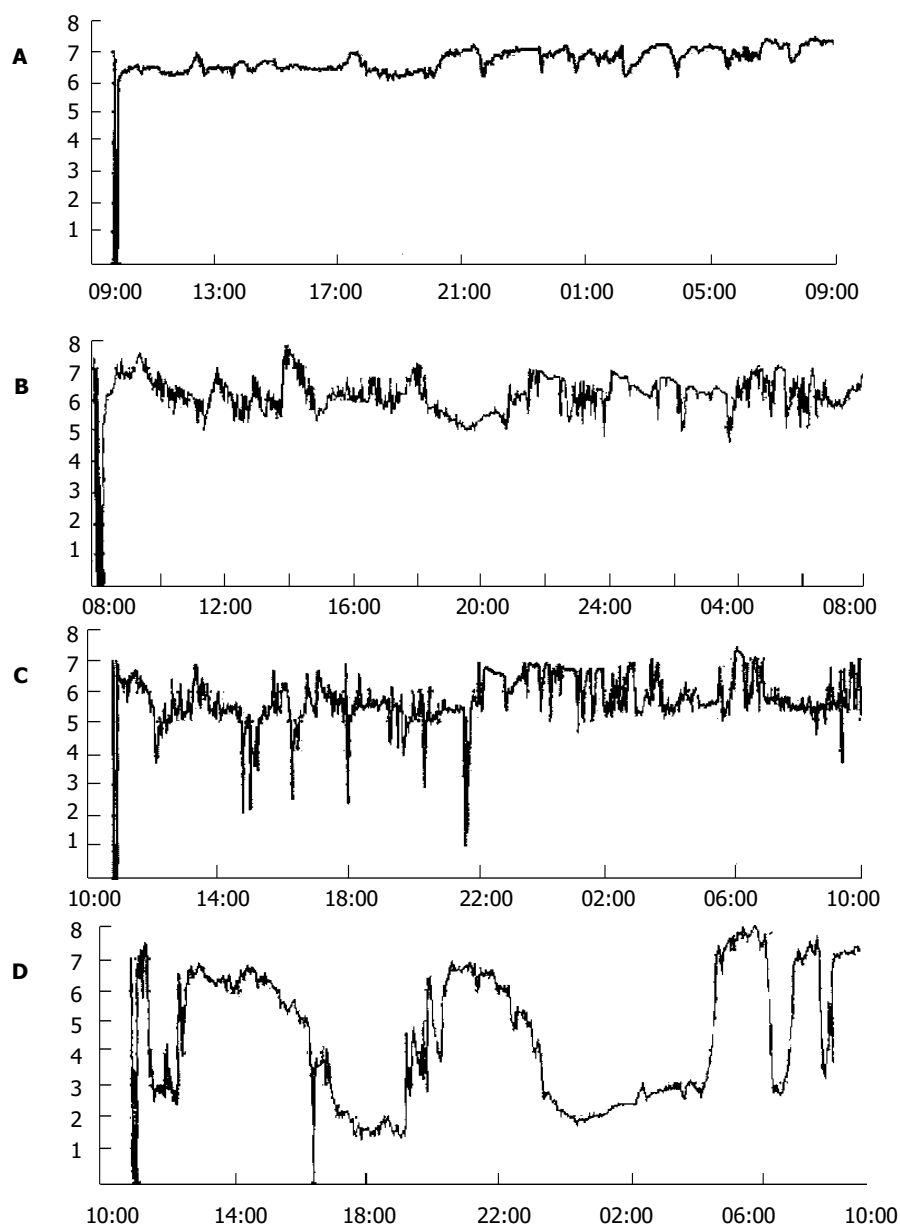


图1 A, B, C, D 四组 24 h 胃内 pH 监测结果.

染率高于欧美^[1-2], 造成 NAB 发生明显低于欧美. 其次, 与 PPI 代谢酶 CYP2C19 的基因类型差异有关. 大多数 PPI 的代谢主要是经过 CYP2C19 酶来完成的, 在白种人群中有 70-75% 的人该酶控制基因为 CYP2C19 homEM 型, 即纯合子型, 具有高 CYP2C19 酶活性, 而在亚洲人群中却仅有 30-40% 为上述基因型, CYP2C19 酶活性相对较低, 因此我们有理由假定, 在 homEM 型个体中, 正是由于 PPI 的快速代谢分解才导致了酸分泌的迅速恢复, 这可能是 NAB 的发生机制之一^[2].

目前, 大量的研究证明^[3]: 幽门螺杆菌感染与 NAB 的发生呈负相关. *Hp* 感染可增强 PPI 的抑酸作用^[3-4]. 国外多个研究显示, 在未应用 PPI 时, *Hp* 阴性者与 *Hp* 阳性者的胃内酸度相似, 但应用 PPI 后, *Hp* 阴性者 NAB 的发生率明显高于 *Hp* 阳性者. 这表明, *Hp* 阴性者较 *Hp* 阳性者更易发生 NAB. 在我们的 32 例老年患者中, 有 8 例 *Hp* 阴性, 其中 4 例发生 NAB, 占 50%;

而 24 例 *Hp* 阳性者只有 3 例发生 NAB, 仅占 12.5%; 二者相比有显著性差异, 即 *Hp* 感染与 NAB 的发生呈负相关^[5-6], *Hp* 感染可以减少 NAB 的发生. 上述现象产生的机制目前考虑为, *Hp* 阳性者与 *Hp* 阴性者相比, 其胃底腺黏膜中质子泵的 mRNA 明显减少, 这将导致质子泵合成明显受到抑制, 因此, 在 PPI 的作用消除后, 其泌酸功能的恢复大大延迟, 从而导致了 *Hp* 阳性者 NAB 的发生率明显低于 *Hp* 阴性者.

NAB 的发病机制比较复杂, 参与因素较多, 其确切的发生机制目前尚不完全清楚, 可能与下列因素有关: 生理性酸分泌有着 24 h 的固定模式, 在夜间呈逐渐上升趋势, 一般在半夜达到顶峰. 这种趋势并不与血清中胃泌素的含量相平行. 在夜间, 组胺对胃基础酸分泌的作用很重要^[7], PPI 类药物仅对壁细胞上激活的质子泵产生抑制, 对未激活的质子泵则无抑制作用, 在夜晚, 质子泵处于更新阶段, 激活的质子泵数量较白天

少,故夜间PPI的抑酸作用较白天弱^[8]。由于饮食原因,夜间睡眠时缺少相应的食物刺激,激活的质子泵数量少,故PPI的抑酸作用降低。另外,夜间迷走神经兴奋性高,胃酸分泌增多亦与此有关^[1]。

3.2 控制NAB发生的方案探讨 由于单独应用PPI在部分个体中不能达到令人满意的抑酸效果,所以有学者提出联合应用H₂受体阻滞剂治疗酸相关性疾病,并控制NAB的发生。

从我们的结果来看,D组有5例发生,占62.5%。无论是每日一次奥美拉唑加睡前一次法莫替丁,每日2次奥美拉唑或者是每日2次奥美拉唑加睡前一次法莫替丁,均能有效控制NAB的发生。其中以后者为最佳,单纯从控制NAB的目的出发,这3组均可以达到满意疗效。如果考虑药品价格因素,早一次PPI,睡前一次H₂受体阻滞剂是一种经济有效的方案。

总体来讲,酸相关疾病的胃酸控制要求达到PH值>4,而且要达到持续稳定。pH值<4的百分比反映了胃酸未达到有效控制的时间,越高说明胃酸控制的稳定性越差,抑酸的质量越差。我们发现,睡前同时加服奥美拉唑和法莫替丁,24h胃内pH值<4的时间仅为7.91%,睡前单独加服奥美拉唑或法莫替丁组为15.72%和16.47%,明显优于晨一次奥美拉唑组(29.97%)。

总之,对于老年十二指肠溃疡患者,每日一次奥

美拉唑口服NAB的发生率较高,睡前加服奥美拉唑或法莫替丁可有效控制NAB的发生,睡前同时加服奥美拉唑和法莫替丁可以更稳定地控制夜间胃酸分泌。上述结果与国内报道的其他年龄组十二指肠溃疡患者的NAB发生情况相似^[9-11]。

4 参考文献

- 1 Katsube T, Adachi K, KawaMura A, Shirai N. *Helicobacter pylori* infection influences nocturnal gastric acid breakthrough. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1049-1056
- 2 沙卫红,李瑜元,聂玉强,戴寿军,余庆珠. 十二指肠溃疡患者夜间酸突破现象分析. *中华消化杂志* 2001;12:723-725
- 3 范学工,彭小宇. 螺杆菌属及其相关性疾病. *世界华人消化杂志* 2001;9:979-983
- 4 周惠萌,范欣敏. 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析. *世界华人消化杂志* 2004;12:497-498
- 5 张万岱,萧树东,胡伏莲,胡品津,徐智民. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. *中华医学杂志* 2000;80:394-395
- 6 王凯娟,王润田. 中国幽门螺杆菌感染流行病学 Meta 分析. *中华流行病学杂志* 2003;24:443-446
- 7 Ernst PB, Jin Y, Reyes VE, Crowe SE. The role of the local immune response in the pathogenesis of peptic ulcer formation. *Scand J Gastroenterol* 1994;205:22-28
- 8 Maton PN. Omeprazole. *N Engl J Med* 1991;324:965-975
- 9 徐有青,王丽华,崔桂兰,田自然. 老年人消化性溃疡幽门螺杆菌感染的探讨. *中华老年医学杂志* 1999;18:41
- 10 张汝,汤哲. 老年人消化性溃疡病与相关因素的影响. *中华内科杂志* 1998;37:702-703
- 11 Pilotto A. *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer diseases in older patients: current management strategies. *Drug Aging* 2001;18:487-494

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 •

可切除性小肝癌冷循环射频消融治疗 15 例

李文亮,陈明清,李云峰,李强,高屹,张洪涛,蔡昕怡,余昆

李文亮,陈明清,李云峰,李强,高屹,张洪涛,蔡昕怡,余昆,云南省肿瘤医院腹部肿瘤外科 云南省昆明市 650118
项目负责人:陈明清,650118,云南省昆明市人民西路174号,云南省肿瘤医院腹部肿瘤外科. ruralsun@163.com
电话:0871-8181942 传真:0871-8181942
收稿日期:2004-07-23 接受日期:2004-09-09

摘要

目的:探讨射频消融(RFA)治疗可切除性小肝癌的近期疗效和可行性。

方法:采用冷循环电极对可手术切除的小肝癌患者进行RFA治疗,共治疗小肝癌患者15例,17个病灶,肿瘤直径1.2-5 cm,平均3.5 cm,其中12例行经皮途径,3例

行开腹射频,均在B超引导下治疗,治疗前对AFP阴性者行细针肝穿活检,治疗前后查肝功、AFP、增强CT扫描、彩超,观察RFA治疗的并发症、复发率和肿瘤完全坏死率,并随访患者的生存情况。

结果:15例患者共行RFA治疗20次,每次治疗时间为12-15 min, RFA 治疗的主要并发症包括高热(1例),疼痛(1例)。肝功能1 wk后恢复正常,AFP阳性的9例患者在治疗后6 mo内转阴, RFA 治疗后6 mo以上的CT复查,肿瘤完全坏死率为100%,随访6-20 mo,患者全部存活。

结论:RFA对可切除性小肝癌的治疗,近期疗效良好,有

少,故夜间PPI的抑酸作用较白天弱^[8]。由于饮食原因,夜间睡眠时缺少相应的食物刺激,激活的质子泵数量少,故PPI的抑酸作用降低。另外,夜间迷走神经兴奋性高,胃酸分泌增多亦与此有关^[1]。

3.2 控制NAB发生的方案探讨 由于单独应用PPI在部分个体中不能达到令人满意的抑酸效果,所以有学者提出联合应用H₂受体阻滞剂治疗酸相关性疾病,并控制NAB的发生。

从我们的结果来看,D组有5例发生,占62.5%。无论是每日一次奥美拉唑加睡前一次法莫替丁,每日2次奥美拉唑或者是每日2次奥美拉唑加睡前一次法莫替丁,均能有效控制NAB的发生。其中以后者为最佳,单纯从控制NAB的目的出发,这3组均可以达到满意疗效。如果考虑药品价格因素,早一次PPI,睡前一次H₂受体阻滞剂是一种经济有效的方案。

总体来讲,酸相关疾病的胃酸控制要求达到PH值>4,而且要达到持续稳定。pH值<4的百分比反映了胃酸未达到有效控制的时间,越高说明胃酸控制的稳定性越差,抑酸的质量越差。我们发现,睡前同时加服奥美拉唑和法莫替丁,24h胃内pH值<4的时间仅为7.91%,睡前单独加服奥美拉唑或法莫替丁组为15.72%和16.47%,明显优于晨一次奥美拉唑组(29.97%)。

总之,对于老年十二指肠溃疡患者,每日一次奥

美拉唑口服NAB的发生率较高,睡前加服奥美拉唑或法莫替丁可有效控制NAB的发生,睡前同时加服奥美拉唑和法莫替丁可以更稳定地控制夜间胃酸分泌。上述结果与国内报道的其他年龄组十二指肠溃疡患者的NAB发生情况相似^[9-11]。

4 参考文献

- 1 Katsube T, Adachi K, KawaMura A, Shirai N. *Helicobacter pylori* infection influences nocturnal gastric acid breakthrough. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1049-1056
- 2 沙卫红,李瑜元,聂玉强,戴寿军,余庆珠. 十二指肠溃疡患者夜间酸突破现象分析. *中华消化杂志* 2001;12:723-725
- 3 范学工,彭小宇. 螺杆菌属及其相关性疾病. *世界华人消化杂志* 2001;9:979-983
- 4 周惠萌,范欣敏. 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析. *世界华人消化杂志* 2004;12:497-498
- 5 张万岱,萧树东,胡伏莲,胡品津,徐智民. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. *中华医学杂志* 2000;80:394-395
- 6 王凯娟,王润田. 中国幽门螺杆菌感染流行病学 Meta 分析. *中华流行病学杂志* 2003;24:443-446
- 7 Ernst PB, Jin Y, Reyes VE, Crowe SE. The role of the local immune response in the pathogenesis of peptic ulcer formation. *Scand J Gastroenterol* 1994;205:22-28
- 8 Maton PN. Omeprazole. *N Engl J Med* 1991;324:965-975
- 9 徐有青,王丽华,崔桂兰,田自然. 老年人消化性溃疡幽门螺杆菌感染的探讨. *中华老年医学杂志* 1999;18:41
- 10 张汝,汤哲. 老年人消化性溃疡病与相关因素的影响. *中华内科杂志* 1998;37:702-703
- 11 Pilotto A. *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer diseases in older patients: current management strategies. *Drug Aging* 2001;18:487-494

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 •

可切除性小肝癌冷循环射频消融治疗 15 例

李文亮,陈明清,李云峰,李强,高屹,张洪涛,蔡昕怡,余昆

李文亮,陈明清,李云峰,李强,高屹,张洪涛,蔡昕怡,余昆,云南省肿瘤医院腹部肿瘤外科 云南省昆明市 650118
项目负责人:陈明清,650118,云南省昆明市人民西路174号,云南省肿瘤医院腹部肿瘤外科. ruralsun@163.com
电话:0871-8181942 传真:0871-8181942
收稿日期:2004-07-23 接受日期:2004-09-09

摘要

目的:探讨射频消融(RFA)治疗可切除性小肝癌的近期疗效和可行性。

方法:采用冷循环电极对可手术切除的小肝癌患者进行RFA治疗,共治疗小肝癌患者15例,17个病灶,肿瘤直径1.2-5 cm,平均3.5 cm,其中12例行经皮途径,3例

行开腹射频,均在B超引导下治疗,治疗前对AFP阴性者行细针肝穿活检,治疗前后查肝功、AFP、增强CT扫描、彩超,观察RFA治疗的并发症、复发率和肿瘤完全坏死率,并随访患者的生存情况。

结果:15例患者共行RFA治疗20次,每次治疗时间为12-15 min, RFA 治疗的主要并发症包括高热(1例),疼痛(1例)。肝功能1 wk后恢复正常,AFP阳性的9例患者在治疗后6 mo内转阴, RFA 治疗后6 mo以上的CT复查,肿瘤完全坏死率为100%,随访6-20 mo,患者全部存活。

结论:RFA对可切除性小肝癌的治疗,近期疗效良好,有

可能成为一种可供选择的微创治愈方法。

李文亮, 陈明清, 李云峰, 李强, 高屹, 张洪涛, 蔡昕怡, 余昆. 可切除性小肝癌冷循环射频消融治疗 15 例. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2517-2519
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2517.asp>

0 引言

手术切除或肝移植是目前有可能治愈原发性小肝癌最有效的治疗手段^[1], 但由于手术的创伤、费用、术后肝衰竭的发生和术后复发的再切除率以及肝移植体缺乏的影响, 使近年来国内外兴起了一股肝癌微创治疗热潮. 在许多的微创治疗方法中, 射频消融(radiofrequency ablation RFA)越来越受到学者们的重视. 因其安全, 操作简单, 可重复多次治疗, 在国外一些治疗中心, 对小肝癌的治疗已取得了和手术切除相近的治疗效果, RFA 已成为小肝癌治疗最有效的方法之一^[2]. 2001-12/2003-08 云南省肿瘤医院应用 RFA 治疗可切除性小肝癌 15 例, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 小肝癌患者 15 例, 共 17 个病灶, 其中男 12 例, 女 3 例, 年龄 42-69 岁, 平均年龄 52.8 ± 2.32 岁. 肿瘤直径 1.2-5 cm, 平均 3.5 cm. 单病灶 13 例(86.7%), 双病灶 2 例(13.3%), 双病灶者肿瘤大小算其最大直径之和. 合并肝硬化者 11 例, 占 73.3%. AFP 阳性者 9 例, 占 60%. 肿瘤位于右肝者 10 例, 左肝者 5 例. 3 例开腹治疗者癌肿邻近膈肌和胆囊. AFP 阴性 6 例, 患者行肝穿刺活检证实. 所有病例均无远处转移或门静脉癌栓、腹水及黄疸, 肝功能 Child 分级均为 A 级, 心肺功能正常, 能耐受手术, 均同意接受 RFA 治疗. 射频消融治疗仪为美国 Radionics 公司生产的冷循环超能射频治疗仪, 射频电极针分单束和集束两种, 单束针尖端露电极长度采用 3.0 cm, 集束针电极为 3.0 cm, 针外径为 1.1 mm. 超声为 ACUSON SEQUOIA 512 型, CT 扫描设备使用西门子公司 Somtoma AR.C.

1.2 方法

1.2.1 操作方法 12 例患者行经皮 B 超引导下途径, 3 例行开腹射频消融治疗, 经皮途径者治疗前给予镇静剂及止痛剂, 肝右叶病变采用左侧卧位或斜位, 左叶病变采用仰卧位. 超声检查确定肿块位置及深度, 选择穿刺点和路径, 局部皮肤消毒, 20 mL/L 盐酸利多卡因局部麻醉, 在超声引导下将射频针插入肿瘤内部, 针尖位于癌肿深部近边缘, 针体位于癌肿中央, 超声确定位置后开始射频能量输出治疗, 持续时间为 12 min, 肿瘤直径 2.0 cm 者选用单束针, 裸露尖端 3.0 cm, 直径 >2.0 cm 者选用集束针, 治疗过程中超声监测治疗过程, 并用计算机监测输出能量、阻抗和针尖温度. 对开腹途径者, 在硬膜外麻醉下选右肋缘下斜切口, 切口长约 5 cm, 术中超声确定位置, 其他操作同经皮途径. 在开始射频前, 用 Pringle 氏法阻断肝门血流. 治疗结

束常规处理后将患者送入病房监测.

1.2.2 疗效评价方法和标准 治疗后 1 wk 复查肝功、AFP, 1 mo 后行 CT 断层扫描及 B 超检查, 了解肿瘤的变化, 此后每 2-3 mo 复查 1 次, 随访 6-20 mo, 观察患者的生存情况. 疗效评价标准采用病变是否缩小及 CT 扫描后是否有强化, CT 检查病区无强化为肿瘤完全坏死, 坏死范围在 90-99% 为不完全坏死, 50-89% 为部分坏死.

2 结果

2.1 并发症 全组病例未见严重并发症, 经皮治疗过程中患者诉肝区或全身发热感, 肝区轻中度胀痛, 能忍受, 仅 1 例患者治疗过程中疼痛剧烈, 治疗 8 min 后终止治疗. 1 例出现术后高热, 体温达 39 °C, 给予抗炎治疗 1 wk 后体温恢复正常. 治疗过程中未出现与治疗相关的死亡病例. 肝功能 1 wk 后复查均恢复正常.

2.2 随访 全组病例中 12 例患者仅治疗一次, 6 mo 后的 CT 增强扫描确定为完全坏死. 1 例患者为不完全坏死, 该病例为治疗中疼痛而终止治疗者, 治疗后 1 mo 复查提示为不完全坏死, 改在硬膜外麻醉下行经皮射频治疗, 另 2 例患者于随访过程中出现射频治疗病灶外的肝内复发(各自为 1 个复发病灶), 给予再次射频消融治疗, 3 例患者再次治疗后 6 mo 之内的 CT 增强扫描为完全坏死, 全组病例坏死率为 100%, 共行 20 次射频治疗. 经随访 6-20 mo, 复发者 2 例, 复发率为 13.3%, 患者全部存活. 9 例 AFP 阳性患者 6 mo 后全部转为阴性.

3 讨论

3.1 RFA 对小肝癌的治疗效果 目前对小肝癌的治疗主要采取手术切除和肝移植治疗, 但因大部分患者合并 HBV 感染后的肝硬化, 手术切除后肝功能衰竭的发生率较高, 手术创伤大. 且原发性肝癌为多中心起源, 术后可能发生肝内的复发, 我们研究的病例中 2 例就出现消融原位外的肝内复发. 对术后出现的复发由于残留肝脏储备功能的影响, 再手术切除率低. 因此对能手术切除的患者而言, 手术切除可能是一次性的治疗^[3]. 在国外, 可切除性小肝癌是肝移植的主要适应证之一, 虽然小肝癌肝移植的 5 a 生存率优于手术切除^[4], 但治疗的价格昂贵, 加上 HBV 病毒的重新侵入和供体缺乏的影响, 以及术后需应用免疫抑制剂, 显然是不符合我国的国情. 为了寻找一种更安全和有效的有可能治愈小肝癌的方法, 以替代手术切除和肝移植, 近年来国内外学者进行了积极的探索, 开展了多种局部消融治疗术方法, 如: 无水酒精注射(PEI)、醋酸注射(PAI)、微波凝固治疗(PMCT)、射频消融(RFA)等. 在这些局部消融治疗术的比较研究中, 由于 RFA 治疗的单次毁损的肿瘤直径较大且所需的治疗次数较少, 而受到多数学者的推崇^[5]. 从回顾性资料分析^[6]看, RFA 与手术切除的治疗效果相当, 但目前仍无前瞻性随机临床试验结果报告. Livraghi *et al*^[7]报道单个 <5 cm 小肝癌伴肝硬化者,

RFA 治疗的 3 a 生存率高达 85%。Olschewski *et al*^[8] 新近报道了一组 52 例肿瘤直径 < 5 cm 的小肝癌 RFA 治疗病例, 随访结果分析显示, 12 mo 和 24 mo 的生存率分别为 100% 和 98%。首次开展肝癌 RFA 治疗的美国学者 Rossi *et al*^[2] 长期随访了 39 例 ≤ 3 cm 的原发小肝癌 RFA 治疗后的结果, 其 1、3、5 a 生存率分别为 94%、86%、40%。国内学者陈敏山 *et al*^[9] 采用 B 超引导下经皮 RFA 治疗肿瘤直径小于 3 cm 的小肝癌(原发性 30 例, 术后复发 16 例, 肝转移癌 7 例), 1 a 生存率为 98.1%。我们的治疗病例经 6–20 mo 的随访, 全部存活, 近期治疗效果良好。对于术后复发的小肝癌患者, RFA 治疗更能发挥其微创治疗的优越性。陈孝平 *et al*^[10] 对 256 例共 339 个病灶的复发小肝癌(肿瘤直径为 2.6 ± 1.7 cm) 行 B 超引导下 RFA 治疗, 1、3 a 生存率分别为 78.3% 和 56.2%。从 RFA 开始应用于临床治疗肝癌到目前为止, RFA 仍然被认为是一种姑息性治疗手段, 因此大量的临床治疗病例仅仅是针对不能手术切除的小肝癌患者, 如若将 RFA 应用于可手术切除的小肝癌患者, 其治疗的生存率可能会有更大的提高, RFA 可以作为一种治愈性的治疗手段于实践应用。

3.2 RFA 治疗可切除性小肝癌的可行性 射频消融治疗肝癌的开始阶段, 因技术上的限制, 仅能应用单电极毁损小于 1.6 cm 的病灶, 疗效不佳, 而随着技术的进步, 相继出现了双电极、伞状电极、盐水增强电极、冷循环电极(Cooled-Tip)等, 在射频能量输出时应用脉冲波发送, 这些技术的应用使单次毁损的体积不断增大, 一次毁损坏死率不断提高, 从大量的临床应用治疗效果看, 对小于 5.0 cm 的肿瘤可以一次性完全彻底毁损。我们采用的冷循环电极为中空电极, 可持续灌注冰水使针尖温度降低, 避免电极针尖周围组织的炭化而影响热量的传导, 单束电极(针尖裸露端为 3.0 cm)射频毁损直径可达 3.0 cm 左右, 而集束电极针为 6.0 cm。单纯从射频技术角度上讲, 小肝癌一次毁损是完全可行的, 并可保证覆盖 1 cm 的癌旁正常组织, 达到手术根治的要求。

原发性小肝癌 90% 以上为肝动脉供血, 癌肿血流丰富, 射频能量可被血流带走而减少了热量的沉积(热丢失效应), 特别是邻近大血管的肿瘤^[11], 影响了消融的范围, 为了避免这种效应的发生, 治疗前可先行 TACE 或治疗时球囊、Pringler 氏法、降低血压等减少和阻断癌肿血流, 增大消融范围。我们对开腹射频者采用 Pringler 氏策略阻断肝门血流, 使 3 例治疗者一次彻底毁损。

RFA 可采用经皮穿刺、腹腔镜和开腹三种途径, 各种都有其优点。对小肝癌患者而言, 多采用经皮影像学引导穿刺途径, 我们治疗的病例 80%(12/15) 采用该途径。但对于癌肿邻近膈肌、结肠和胆囊者, 为避免脏器的穿孔和损伤而采用开腹或腹腔镜途径。我们的 3

个病例因癌肿邻近膈肌和胆囊而采用开腹射频, 开腹射频与经皮穿刺途径相比, 虽手术的创伤增大, 不能体现微创技术的优势, 但与手术切除相比, 创伤仍相对较小, 且在直视下更能准确的确定癌肿的位置, 使用术中超声发现肝内微小病灶一并进行治疗, 同时可阻断肝门血流, 将邻近的器官隔开以减少周围器官的损伤。可切除性小肝癌行 RFA 治疗, 创伤小、操作简单方便、可多次重复, 尤其对手术后期肝内复发者, 可避免正常肝组织的损伤, 减少了术后肝衰和并发症的发生率。我们的研究中仅 1 例高热, 考虑癌肿坏死合并感染, 经抗炎治疗后恢复。1 例疼痛剧烈, 考虑癌肿位于肝表面, 射频能量对壁层腹膜的刺激引起, 全部病例的肝功能于 1 wk 后恢复正常, 充分体现了 RFA 治疗技术的安全性。

小肝癌患者 HBV 的感染率为 87% 以上, 往往合并肝硬化, 对合并肝硬化的癌肿, 由于肝纤维组织的增多, 导热性下降, 射频热量不易散发, 可形成所谓的“烤箱效应(oven effect)”^[5, 11], 使小肝癌单次治疗的坏死率高, 可以实现一次完全毁损。根据部分基础研究的推测, RFA 的热效应可改变肿瘤的免疫原性, 使机体的免疫力和抗肿瘤免疫作用增强, 抑制肿瘤的复发。

总之, 随着 RFA 技术的不断进步和治疗经验的积累, RFA 完全有可能取代手术切除和肝移植术, 成为小肝癌的首选治疗方法。

4 参考文献

- 1 Schafer DF, Sorrell MF. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1999; 353:1253-1257
- 2 Rossi S, Di Stasi M, Buscarini E, Quaretti P, Garbagnati F, Squassante L, Paties CT, Silverman DE, Buscarini L. Percutaneous RF interstitial thermal ablation in the treatment of hepatic cancer. *Am J Roentgenol* 1996;167:759-768
- 3 McGahan JP, Dodd GD 3rd. Radiofrequency ablation of the liver: current status. *Am J Roentgenol* 2001;176:3-16
- 4 Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Wong J. Long-term survival and pattern of recurrence after resection of small hepatocellular carcinoma in patients with preserved liver function: implication for a strategy of salvage transplantation. *Ann Surg* 2002;235:373-382
- 5 Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, Meloni F, Solbiati L, Gazelle GS. Small hepatocellular carcinoma: treatment with radio-frequency ablation versus ethanol injection. *Radiology* 1992;210:655-661
- 6 Lau WY, Leung TW, Yu SC, Ho SK. Percutaneous local ablative therapy for hepatocellular carcinoma: a review and look into the future. *Ann Surg* 2003;237:171-179
- 7 Livraghi T, Lazzaroni S, Meloni F. Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma. *Eur J Ultrasound* 2001;13:159-166
- 8 Lencioni RA, Allgaier HP, Cioni D, Olschewski M, Deibert P, Crocetti L, Frings H, Laubenberger J, Zuber I, Blum HE, Bartolozzi C. Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology* 2003;228: 235-240
- 9 陈敏山, 梁惠宏, 李锦清. 直径小于 3 cm 肝癌的经皮射频微创治疗. *中国肿瘤* 2002;11:242-243
- 10 陈孝平, 李东华. 射频灭活治疗肝癌的适应证及疗效评价. *中国微创外科杂志* 2003;3:1890-191
- 11 Gazelle GS, Goldberg SN, Solbiati L, Livraghi T. Tumor ablation with radio-frequency energy. *Radiology* 2000;217:633-646